

7. Nanopartículas metálicas: oro

SONIA AL-QADI Y CARMEN REMUÑÁN-LÓPEZ

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela.

INTRODUCCIÓN

Las nanopartículas de metales nobles y, más específicamente, las nanopartículas de oro (AuNPs), exhiben unas excelentes propiedades físicas, químicas y biológicas, que son intrínsecas a su «tamaño nanométrico». Destacan especialmente sus peculiares e inesperadas propiedades fototérmicas, por las que al ser activadas en presencia de luz láser, desprenden calor, actuando como auténticos «nano-calefactores». Las AuNPs pueden ser producidas con distintos tamaños y formas y ser fácilmente funcionalizadas con un amplio abanico de ligandos (anticuerpos, polímeros, sondas de diagnóstico, fármacos, material genético...). Por todo ello, las AuNPs despiertan un gran interés en el campo de la biomedicina.

Las AuNPs presentan un extraordinario potencial como agentes fototerapéuticos en el tratamiento del cáncer, así como para la elaboración de nanoestructuras útiles para el transporte y la vectorización selectiva de fármacos y macromoléculas terapéuticas y en terapia génica (vehiculización de plásmidos, DNA, RNA...) (1-3). También destaca la utilidad de las AuNPs en la elaboración de «sistemas transportadores inteligentes» que permiten controlar, en el espacio y en el tiempo, la liberación del compuesto terapéutico asociado, ya que ésta es desencadenada por un estímulo biológico interno (por ejemplo una variación en la concentración de glutatión entre el exterior y el interior de la célula) (4, 5) o por activación de un estímulo externo (por ejemplo luz láser) (6, 7).

En los últimos años, la comunidad científica ha dirigido notables esfuerzos a la investigación y aplicación de las AuNPs en la detección precoz, diagnóstico y tratamiento del cáncer (3, 8-17), tal y como lo demuestra el gran volumen

de excelentes trabajos de investigación que están siendo publicados en este campo. En este sentido, es preciso subrayar el excepcional interés de la estrategia dirigida a diseñar nanoplataformas «duales», en las que se combinan -gracias a la utilización de AuNPs-, los principios de diagnóstico y terapia del cáncer.

En este capítulo de revisión analizaremos las propiedades más interesantes de las AuNPs desde el punto de vista de sus aplicaciones terapéuticas y, seguidamente, abordaremos los recientes avances recogidos en la bibliografía tanto en lo que se refiere a su aplicación en fototerapia térmica y vectorización selectiva del cáncer así como a su utilización en la elaboración de sistemas de liberación de fármacos, proteínas terapéuticas y material genético.

UTILIZACIÓN DEL ORO CON FINES TERAPÉUTICOS

La utilización de oro con fines médicos no es nueva, sino que se remonta a la antigüedad, existiendo constatación de la utilización de oro coloidal en China en 2500 AC. En el siglo XVI el oro era utilizado para tratar la epilepsia y a principios del siglo XIX era el fármaco de elección para el tratamiento de la sífilis. El descubrimiento por *Robert Koch* del efecto bacteriostático del cianuro de oro frente al bacilo de la tuberculosis, marca el comienzo su utilización en medicina moderna siendo introducido en la terapia de la tuberculosis en 1920 (1, 18-20). Una de las indicaciones actuales más importantes del oro es en el tratamiento de la artritis reumatoide y otras enfermedades reumáticas, incluyendo psoriasis y lupus eritematoso (2, 21-22). En el tratamiento de la artritis reumatoide en principio se utilizaron tiolatos (tiomalato, tioglucosa...) de oro que eran inyectados intramuscularmente en forma de solución. Pero estos compuestos, que experimentaban una rápida distribución a órganos como el riñón, hígado y bazo, no estaban exentos de poder causar desórdenes sanguíneos así como nefro- y hepatotoxicidad. Por este motivo se introdujo en 1985 una segunda generación de fármacos de oro conteniendo ligandos fosfina, que eran más liofílicos y permanecían más tiempo en circulación, reduciéndose de manera significativa la nefrotoxicidad (23, 24).

A raíz del descubrimiento de la actividad antitumoral del cisplatino en 1969, que promovió, la investigación de otros metales con el mismo fin y fue identificada la actividad antitumoral del oro (25), especialmente de su complejo con fosfina (24, 26), el cual presenta, sin embargo, toxicidad cardiovascular que impide de su utilización en clínica. Es de destacar el reciente descubrimiento por *Bhattacharya y Mukherjee* (1) de las propiedades anti-angiogénicas de las

AuNPs, lo que abre interesantísimas perspectivas de cara a su utilización en terapias del cáncer.

En las pasadas décadas también se puso de manifiesto la actividad antimicrobiana, antimalárica y anti-HIV de diversos complejos orgánicos de oro (2, 22, 27, 28). Otras aplicaciones médicas del oro incluyen su utilización en dispositivos médicos tales como marcapasos y «stents», así como implantes de oído y odontología (1, 2).

INTERÉS DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO

Las AuNPs presentan, en principio, una baja toxicidad y, como acabamos de comentar, unas propiedades peculiares e increíblemente interesantes las cuales pueden ser, modificadas mediante su funcionalización con múltiples ligandos, con la finalidad de obtener nanosistemas óptimos para las distintas aplicaciones terapéuticas.

Biocompatibilidad y baja toxicidad

Es muy importante disponer de información fiable acerca del perfil de toxicidad *in vivo* de las AuNPs aisladas y formando parte de nanoconjugados y otros nano-transportadores, de cara a su posible aplicación en clínica.

En la sección anterior acabamos de exponer que el oro coloidal, que presenta una elevada estabilidad química, ha sido utilizado históricamente con fines médicos. En consecuencia, de entrada cabría esperar que las AuNPs presentasen una baja toxicidad y elevada biocompatibilidad. Efectivamente, de acuerdo con *Connor y col*, los núcleos de oro de las nanopartículas son inertes y no-tóxicos (29). Sin embargo, en la bibliografía reciente existen discrepancias acerca de su citotoxicidad, que podrían guardar relación con los diferentes tamaños y formas de las AuNPs investigadas así como con los distintos agentes empleados para su estabilización y funcionalización, los cuales otorgan a las AuNPs características superficiales distintas.

En un estudio que tuvo por objeto determinar la citotoxicidad e inmunogenicidad de las AuNPs frente a células macrofágicas RAW264.7, se observó que las AuNPs no son tóxicas y no dan lugar a la secreción de citoquinas proinflamatorias TNF- α y IL1- β , siendo, además, internalizadas por los cuerpos lisosomales dispuestos en forma perinuclear. Estos resultados subrayan las propieda-

des no citotóxicas y no inmunogénicas de las AuNPs y su biocompatibilidad, corroborando su excelente potencial en nanoinmunología, nanobiotecnología y nanomedicina (30).

Una investigación *in vivo* en la que se evaluó la biodistribución de AuNPs tras su inyección intravenosa (AuNPs con tamaños 2 y 4 nm) y peritoneal (30 nm) a ratones (rastreo a los tiempos 1, 4 y 24 h), reveló que las AuNPs son captadas en cierta medida por las membranas celulares por endocitosis, no observándose otros mecanismos no-endocíticos. Además, independientemente de su tamaño, las AuNPs son internalizadas principalmente por las células Kupffer en el hígado y, en menor medida, por los macrófagos existentes en otros órganos como el bazo. Las AuNPs no parecen atravesar la barrera placentaria ni la barrera que protege el cerebro. Es interesante destacar que no se observa acumulación de AuNPs en otros órganos analizados como riñón, cerebro, pulmón, ovarios, placenta o hígado fetal y que las AuNPs de menor tamaño (2 nm) parecen ser eliminadas no sólo por endocitosis macrofágica, sino también por simple filtración glomerular en orina (31).

Pan y col. determinaron el efecto del tamaño de partícula sobre la citotoxicidad de las AuNPs en diversas líneas celulares. Para ello, recurrieron a AuNPs solubles en agua estabilizadas con derivados de trifenilfosfina, con un tamaño entre 0.8 y 15 nm. y llevaron a cabo un estudio sistemático de citotoxicidad de estas AuNPs en cuatro líneas celulares representativas de los principales tipos funcionales (con función barrera y fagocítica): fibroblastos de tejido conectivo, células epiteliales, macrófagos y células melanoma. Estos autores demostraron que la respuesta y el mecanismo de muerte celular dependen del tamaño, siendo todas las células investigadas más sensibles a las AuNPs de 1.4 nm, variando los valores de IC_{50} entre 30 y 56 μ M dependiendo del tipo de célula. En contraste, las AuNPs de 15 nm de tamaño y de tiomalato de oro resultan no tóxicas hasta, respectivamente, concentraciones 60 y 100 veces superiores (32).

Se ha demostrado que las características superficiales de las AuNPs influyen en su toxicidad. Las nanoestructuras catiónicas presentan mayor toxicidad que las aniónicas: las nanopartículas aniónicas con núcleo de tamaño 2 nm son prácticamente no tóxicas mientras que las equivalentes catiónicas son moderadamente tóxicas encontrándose la toxicidad probablemente relacionada con la lisis celular (mediada inicialmente por una unión electrostática) dependiente de la concentración (33). Se observó que AuNPs (con forma de nanocilindros) que habían sido estabilizadas con bromuro de hexadecil-trimetilamonio (BHTA) mostraban una fuerte citotoxicidad, por lo que se procedió a su modificación con polietilenglicol (PEG) mediante adición de PEG-SH a la solución anterior

y eliminación del exceso de BHTA mediante diálisis. Se comprobó que las AuNPs-PEGiladas muestran una superficie próxima a la neutralidad y una baja toxicidad *in vitro*. Además, cuando se administran por vía intravenosa a ratones, al cabo de 30 minutos, el 54% de las AuNPs-PEGiladas aparece en sangre, mientras que la mayoría de las AuNPs que habían sido estabilizadas con BHTA se localizan en el hígado (34).

Facilidad de síntesis y multifuncionalidad

Las AuNPs se pueden preparar fácilmente, obteniéndose sistemas coloidales monodispersos estables con un tamaño entre 1 nm y 150 nm y una distribución de tamaños bien controlada.

En la bibliografía se recogen distintos tipos de AuNPs, preparadas utilizando diversas técnicas, que se diferencian en el tamaño, la forma y las propiedades físicas. En la Figura 7.1 se representan algunos ejemplos de estas AuNPs y sus denominaciones: *nanoesferas*, *nanocilindros*, *nanocubiertas*, *nanojaulas*, *nanopartículas* y «SERS».

Las *nanoesferas* de oro de 2-100 nm de diámetro pueden ser obtenidas por reducción controlada de cloruro de oro usando distintos agentes reductores y condiciones. *Faraday* fue el primero en preparar en 1857 oro coloidal por reducción del cloruro de oro con fósforo, atribuyendo el color rojo resultante a la obtención de partículas de tamaño muy pequeño. Años después, *Mie* corroboró que el color del oro coloidal es dependiente del tamaño. Desde entonces y especialmente durante los últimos años, se han dirigido importantes esfuerzos a la

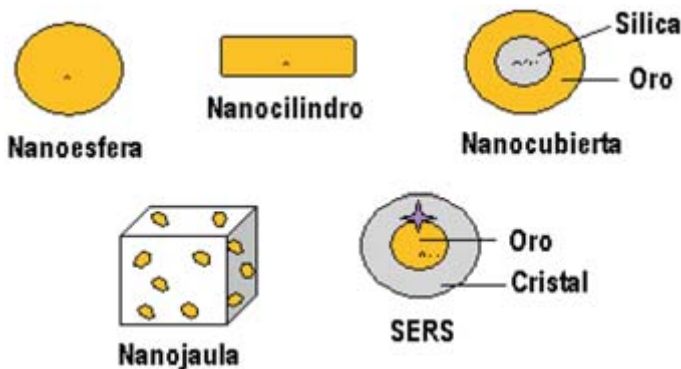


FIGURA 7.1. Diversas nanoestructuras conteniendo oro.

preparación por reducción de sales de oro -utilizando generalmente citrato como agente reductor y en presencia de agentes estabilizantes que previenen la aglomeración-, de AuNPs prácticamente monodispersas y de tamaño controlado (35-39). Se comprobó que la relación de citrato/oro y la velocidad de adición del agente reductor pueden influir en el tamaño de las AuNPs obtenidas: cuanto más rápida es la adición del agente reductor, más pequeñas y monodispersas son las AuNPs) (38).

Se ha recurrido a la utilización de dendrímeros (40-44) y copolímeros bloque biocompatibles (45) para obtener AuNPs estéricamente estabilizadas en solución acuosa y más biocompatibles, cuyo tamaño y forma se puede controlar fácilmente (en el segundo de los sistemas) por modificación de parámetros de síntesis tales como la composición del bloque y las concentraciones relativa/absoluta del copolímero bloque y el cloruro de oro.

Para la obtención de AuNPs con formas distintas a la esférica se han utilizado diferentes procedimientos; por ejemplo técnicas de síntesis electroquímica o deposición electroquímica de oro en el interior de los poros de plantillas de policarbonato o alúmina, síntesis mediada por semillas o procedimientos de bio-reducción, han permitido obtener AuNPs con forma de *nanocilindro*. Las AuNPs tipo *nanocubierta* pueden ser obtenidas por técnicas de recubrimiento de sílica o *beads* de polímero con cubiertas de oro de espesor variable (17).

Se discute sobre cual es el tipo de AuNP más adecuado de cara a su aplicación en terapéutica. Así, se encontró que la captación intracelular de las AuNPs depende de su forma y tamaño (46-47). Las eficacias de las razones absorción/dispersión y las longitudes de resonancia óptica fueron calculadas para tres tipos distintos de AuNPs (*nanoesferas*, *nanocubiertas* y *nanocilindros*), encontrándose que el estrecho rango de los picos de resonancia de las nanoesferas (~ 520-550 nm) podría limitar su aplicación *in vivo*, al contrario de lo que sucede con las *nanocubiertas* y los *nanocilindros* (15). Por otra parte, las *nanocubiertas* de oro, huecas en su interior, son apropiadas para encapsular enzimas como peroxidada de rábano, que mantienen la actividad cuando se incorporan al interior de estas AuNPs pero no cuando se asocia a AuNPs sólidas (48).

Las AuNPs presentan una elevadísima área superficial, por lo que pueden ser fácilmente funcionalizadas y bioconjugadas, modificando sus propiedades superficiales. Una AuNP de 2 nm de diámetro de núcleo podría, en principio, ser conjugada a ~ 100 moléculas en los ligandos disponibles ($n = \sim 108$) (49). Por ejemplo, recientemente Gibson y col. anclaron ~ 70 moléculas del agente quimioterapéutico paclitaxel en una AuNP de 2 nm de diámetro (50).

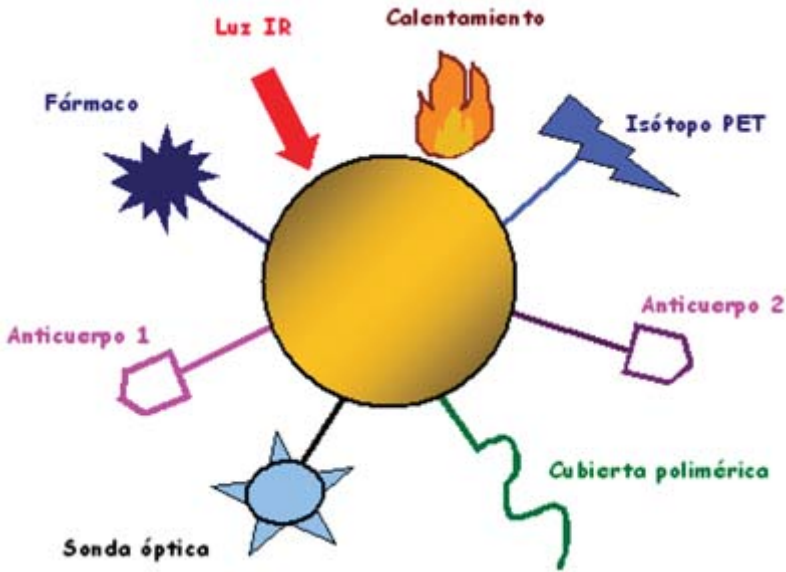


FIGURA 7.2. Nanopartícula de oro multifuncional que incorpora ligandos de vectorización, diagnóstico por imagen y entidades terapéuticas entre otros. En el esquema se incluye el calentamiento de la nanopartícula (efecto hipertérmico) desencadenado por una fuente de radiación luminosa (láser). Únicamente son necesarios los componentes seleccionados para cada aplicación.

La funcionalización de las AuNPs se realiza generalmente mediante enlaces «tiol» (51), si bien también muestran afinidad por los grupos amino, fosfito y bisulfito. Numerosas moléculas han sido ligadas a la superficie de las AuNPs con distintos propósitos, ampliando su rango de aplicación. Se pueden utilizar procedimientos de modificación post-sintética (52) para funcionalizar la superficie de la partícula con porciones biocompatibles tales como oligo(etilenglicol) (OEG) y poly(etilenglicol) (PEG) (52-60).

Ejemplos de estrategias de funcionalización de las AuNPs de aplicación en terapia del cáncer son la conjugación con PEG-tiolado para conseguir una vectorización pasiva hacia células tumorales (aumenta el tiempo de vida media en el torrente sanguíneo y mejora de la permeabilidad y del efecto de retención en el tumor) (16, 34, 61); y la utilización de anticuerpos específicos de biomarcadores moleculares sobreexpresados en la superficie de células cancerígenas (17, 62) o la utilización de péptidos con propiedades de reconocimiento específico de componentes intracelulares (63). Estos pueden ser conjugados directamente a las AuNPs o mediante puentes de PEG tiolado.

En la Figura 7.2 se representa una AuNP esférica multifuncionalizada con posibles ligandos: fármacos, anticuerpos de vectorización, polímero, sondas de diagnóstico por imagen, ...

Propiedades fototérmicas

En la escala nanométrica, las propiedades electromagnéticas, ópticas y fototérmicas de los metales nobles difieren enormemente de las de sus correspondientes producto a granel. Por ejemplo las nanopartículas de oro (AuNPs) presentan una coloración «rojo vino» mientras que el correspondiente oro a granel es de color amarillo.

La peculiaridad de las propiedades ópticas y fototérmicas de las AuNPs proviene de las oscilaciones resonantes de sus electrones libres en presencia de luz («Resonancia localizada de plasmón de superficie»), gracias a la cual las nanopartículas pueden radiar luz (*Mie scattering*) o absorber luz que se transforma rápidamente en calor. En efecto, las AuNPs emiten un intenso calor cuando son estimuladas con la frecuencia correcta de luz láser u otra fuente de calor (microondas, radiofrecuencia, ultrasonidos...); así una colección de pequeñas AuNPs puede calentar localmente un área de mil veces su tamaño, actuando como auténticos «calefactores nanoscópicos activados por la luz».

El primer proceso encuentra una gran utilidad en el diagnóstico por imágenes (la aplicación más desarrollada hasta la fecha para las AuNPs); mientras que el segundo mecanismo ha abierto grandes expectativas principalmente en el tratamiento fototérmico (hipertérmico) láser selectivo de las células tumorales, pero también en la liberación de moléculas activas «a demanda» en lugares específicos del organismo, en la destrucción de virus y bacterias y en la desnaturalización de proteínas y ácidos nucleicos (3, 64).

Este singular comportamiento fototérmico de las AuNPs se encuentra muy influenciado por el tamaño, forma y propiedades superficiales de las AuNPs (65, 66), motivo por el cual en los últimos años ha habido un resurgimiento de la investigación de las rutas de síntesis y funcionalización de las AuNPs, al objeto de obtener nanopartículas con características idóneas para los distintos fines.

APLICACIONES TERAPÉUTICAS DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO

En esta sección revisaremos las aplicaciones más interesantes y prometedoras de las AuNPs desde el punto de vista terapéutico y de la liberación de fár-

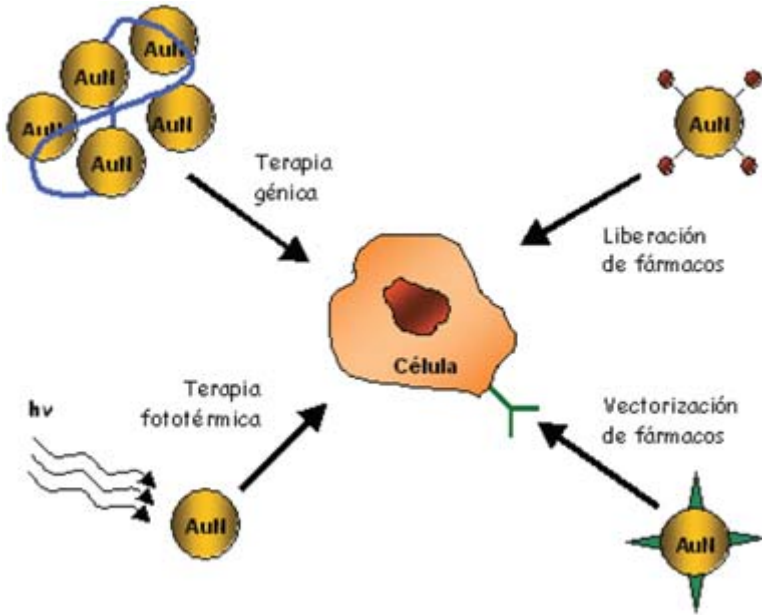


FIGURA 7.3. Principales aplicaciones terapéuticas de las nanopartículas de oro.

maco, las cuales se recogen en el esquema de la Figura 7.3: liberación de fármacos y macromoléculas terapéuticas, terapia génica, terapia fototérmica y vectorización de fármacos en el tratamiento del cáncer.

Liberación de fármacos y macromoléculas terapéuticas

Estudios recientes confirman el gran potencial de las AuNPs en la elaboración de nanotransportadores de fármacos y macromoléculas terapéuticas. Las AuNPs también son útiles en la preparación de «sistemas inteligentes» que liberan la molécula terapéutica encapsulada como consecuencia de la activación de un estímulo interno (liberación mediada por un cambio de pH o liberación mediada por glutatión) o externos (liberación desencadenada por una fuente de luz láser).

Un ejemplo de liberación dependiente del pH es la del óxido nítrico (regula múltiples procesos celulares incluyendo la angiogénesis, vasodilatación y respuesta inmune) en condiciones ácidas (pH = 3) a partir de sus nanoconjugados covalentes con AuNPs estabilizadas con poliamina (67, 68). Este mecanismo tie-

ne aplicación en la liberación de fármacos en el interior de los tejidos inflamatorios y tumorales (pH ~ 6.8) o vesículas celulares como endosomas (pH ~ 5.5-6) y lisosomas (pH 4.5-5.0) que presentan un ambiente ligeramente ácido (69, 70).

La liberación mediada por glutatión de fármacos unidos a AuNPs mediante enlaces bisulfito, representa una estrategia alternativa de activación intracelular selectiva de pro-medicamentos. El glutatión, principal componente «tiol» de la célula, es un tripéptido constituido por los aminoácidos glicina, cisteína y ácido glutámico que actúa como antioxidante intracelular (el grupo tiol de la cisteína actúa como reductor). Este mecanismo de liberación guarda relación con la dramática diferencia existente entre la concentración intracelular de glutatión (1-10 mM) y la concentración extracelular de «tioles» (concentración de glutatión y cisteína en plasma: 2 μ M y 8 μ M, respectivamente) (71-74).

Este mecanismo de liberación ha sido puesto de manifiesto para el Bodipy (colorante modelo de fármaco hidrofóbico) y la enzima beta-galactosidasa. El Bodipy se encuentra unido a AuNPs (tamaño de núcleo: 2 nm) funcionalizadas con ligandos catiónicos de tetra(etilenglicol) y fluorogénicos para facilitar la penetración a través de la membrana celular. Experimentos en cultivos celulares muestran una rápida captación celular de los nanoconjugados y una eficaz liberación intracelular de la carga, mediada por un proceso de intercambio de glutatión en la superficie de la partícula. Este mecanismo queda demostrado por el aumento experimentado por la liberación del colorante cuando se añade glutatión desde el exterior a las células (5). La unión electrostática de β -galactosidasa a AuNPs catiónicas funcionalizadas con trimetil-amonio, da lugar a una completa inhibición del enzima, que puede ser revertida en presencia de las concentraciones intracelulares de glutatión que da lugar a la liberación de la β -galactosidasa. El grado de restauración de la actividad enzimática depende de la longitud de cadena de la monocapa de las AuNPs y de la concentración de glutatión (75). Una limitación de estos sistemas con liberación mediada por el glutatión es la posibilidad de que se pueda producir un intercambio tiol-bisulfito con las cisteínas de superficie de las proteínas existentes en el torrente sanguíneo, lo que podría dar lugar a la formación de conjugados proteína-transportador con biodisponibilidad y perfil farmacocinético no esperados.

Las AuNPs también están siendo investigadas para controlar la liberación de macromoléculas terapéuticas (péptidos, proteínas...), como lo demuestran interesantes trabajos publicados recientemente. Destaca el sistema desarrollado por *Bhumkar y col.* para el transporte transmucosal de insulina, consistente en AuNPs funcionalizadas y estabilizadas con una cubierta del polímero catiónico quitosano (Figura 7.4). Las AuNPs recubiertas de quitosano y con la insulina

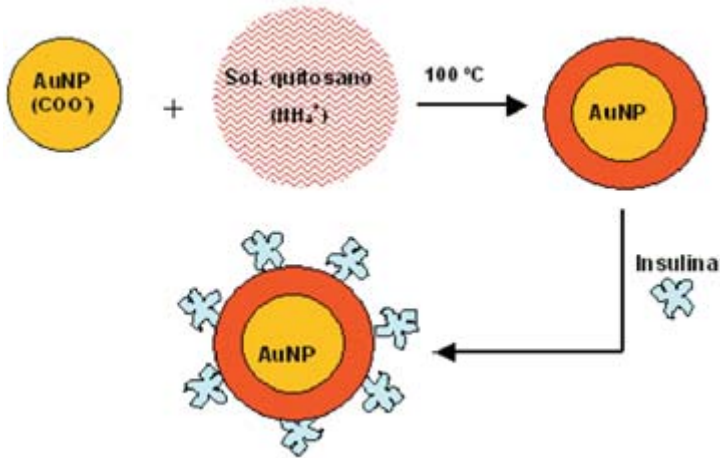


FIGURA 7.4. Diagrama esquemático que muestra el recubrimiento de una nanopartícula de oro con el polímero quitosano y la asociación posterior de insulina.

adsorbida en su superficie, cuando son administradas por vía oral y nasal, dan lugar a un efecto hipoglucémico comparable al de la insulina inyectada subcutáneamente y significativamente superior al correspondiente a las soluciones de insulina o de quitosano-insulina administradas por las mismas vías. El descenso máximo de glucosa tras la administración de los nanotransportadores metálicos (60-70%) se alcanza al cabo de 2 h y 3 h, para las vías oral y nasal, respectivamente (76, 77).

El efecto fototérmico de las AuNPs presenta una atractiva oportunidad en el tratamiento fototerapéutico del cáncer, que abordaremos posteriormente, así como en el desarrollo de vehículos de liberación sensibles a estímulos luminosos externos, interesantes para fármacos que se emplean en el tratamiento de procesos patológicos que requieran una liberación del fármaco en respuesta a requerimientos metabólicos. Este es el caso de la insulina y ciertos enzimas, para los que niveles constantes de fármaco podrían provocar efectos adversos. Siguiendo este principio, se han diseñado sistemas microparticulares de liberación conteniendo dextranos marcados con fluoresceína, que incorporan AuNPs en la cubierta. La liberación del FITC-dextrano (Figura 7.5) se produce como respuesta a la exposición del sistema a radiación láser que ocasiona el calentamiento de la AuNPs y la ruptura de la cubierta, con la consiguiente salida del fármaco (78).

Un concepto similar se aplicó a la preparación de un hidrogel termo-sensible que incorpora embebidas AuNPs de oro-sílica; de forma que al ser externamente activado por luz láser, la irradiación es absorbida por las AuNPs y con-

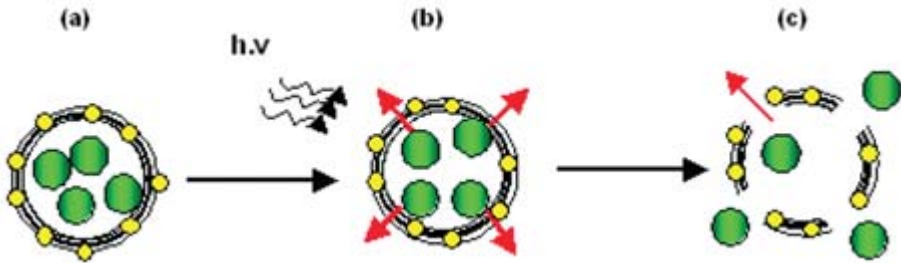


FIGURA 7. 5. Liberación fototérmica de FITC-dextrano a partir de una microcápsula conteniendo AuNPs en su cubierta, por irradiación de luz: (a) Microcápsula conteniendo FITC-dextrano en el interior y AuNPs en la cubierta; (b) Estimulación fototérmica de la microcápsula y ruptura de la cubierta; (c) Liberación de la macromolécula terapéutica.

vertida en calor, que conduce al hinchamiento y colapsamiento del gel, facilitando la liberación del fármaco (79). Ejemplos de macromoléculas activas incorporadas a este sistema son insulina y lisozima, que son liberadas a una velocidad dependiente de su peso molecular (80).

Terapia génica

La terapia génica representa una novedosa estrategia para el tratamiento de diversas enfermedades genéticas o adquiridas, resultando particularmente prometedora en el tratamiento de ciertos cánceres (81). El éxito de esta modalidad terapéutica depende de la identificación de un vehículo adecuado para transportar el material genético (DNA plasmídico, RNA de interferencia, oligonucleótidos antisentido...). Para ello, un nano-transportador ideal ha de proporcionar al ácido nucleico una protección eficaz frente a la degradación por las nucleasas, favorecer su internalización al interior de las células y permitir una liberación en forma funcional en el núcleo de las mismas (82). En sus inicios, se recurría a la utilización de vehículos de tipo vírico, los cuales resultaban muy eficaces aunque, sin embargo presentaban importantes inconvenientes relacionados con su citotoxicidad e inmunogenicidad (83) que dificultaban su posible utilización en clínica. Estas limitaciones fueron subsanadas con la introducción de los sistemas de liberación sintéticos no virales, generalmente catiónicos, tipo liposomas, dendrímeros, lipoplexes y polyplexes que presentan, por el contrario, una eficacia menor debido a la barreras a que se enfrentan entre el lugar de administración y su localización en el núcleo de la célula (84).

Las AuNPs, que pueden presentar una elevada relación carga/portador, constituyen una interesante apuesta en terapia génica. Estudios recientes demuestran que las AuNPs mejoran la estabilidad del DNA frente a la degradación enzimática, química y física; reducen su toxicidad y aumentan la eficacia de transfección intracelular (6, 7). Además, es posible ajustar la carga y la hidrofobicidad de las AuNPs al objeto de maximizar la eficacia de transfección y minimizar la toxicidad, retos prioritarios en el desarrollo de sistemas de liberación génica. En este sentido, se sabe que la hidrofobicidad de las nanopartículas mejora la eficacia de captación celular y/o subsiguiente liberación del DNA, y que las nanopartículas anfifílicas constituyen vectores de transfección más eficaces.

Se pueden obtener dos tipos de nanoconjugados entre el material genético y las AuNPs, dependiendo de se trate de una unión de tipo no covalente o covalente.

AuNPs funcionalizadas con grupos de amonio cuaternario fueron asociadas a DNA plasmídico mediante interacciones de tipo electrostático. Los resultados demostraron que el nanoconjugado DNA-AuNP resultantes es capaz de proteger al DNA de la digestión enzimática y facilitar su liberación, constituyendo un eficaz sistema de liberación génica (6, 85, 86).

Las AuNPS fueron funcionalizadas por *Klibanov y col.* con polietilenimina ramificada (PEI, 2 KDa), polication ampliamente utilizado en terapia génica, a fin de proporcionar vectores híbridos de transfección AuNP-polímero. Comprobaron que la eficacia de transfección celular, en células renales Cos-7, varía con la razón molar PEI:oro, siendo los conjugados doce veces más potentes que el propio polímero; es decir que las AuNPS potencian la capacidad de transfección de la PEI. Al igual que en los estudios anteriores, estos autores observaron que al aumentar la hidrofobicidad del sistema nanotransportador, aumenta la internalización celular y, como consecuencia, la eficacia de transfección (87).

Wong y col. diseñaron un interesante sistema de liberación de DNA mediante anclaje de β -cyclodextrina (CD) en la periferia de las AuNPs modificadas con oligo(etileno diamina) (OEA) y demostraron la capacidad de los nanoconjugados OEA-CD de liberar DNA plasmídico en células de cáncer de mama (MCF-7) (88).

Rotello y col. pusieron de manifiesto el interés de la utilización de nanopartículas fotolábiles que liberan el DNA asociado a la superficie de las mismas mediante un mecanismo fotoquímico. La superficie de estas partículas, que presentan un enlace *o*-nitrobencil éster fotoprocresable y una sal de amonio cuaternario

como grupo final, cambia de catiónica a aniónica bajo irradiación UV próxima, que rompe el puente nitrobenzoílo del complejo nanopartícula-DNA, creando un grupo aniónico carboxilato y liberando el DNA, cuya transcripción es restablecida. En cultivos celulares, los complejos nanopartícula-DNA son eficazmente captados por las células, produciéndose la liberación del DNA-FITC en el interior de las mismas, que se localiza principalmente en el núcleo de la célula (7).

Los ácidos nucleicos pueden ser fácilmente modificados con tioles (-SH) para ser injertados en las nanopartículas mediante uniones de tipo covalente, dando lugar a nanoconjugados covalentes.

Nagasaki y col. prepararon conjugados siRNA tiolado-AuNPs que recubrieron con copolímero bloque de poli(etilenglicol) y metacrilato de poli(2-(*N,N*-dimetil amino) etilo para mejorar su internalización celular. Estos sistemas encuentran utilidad en silenciamiento génico (60).

La PEGilación de las AuNPs transportadoras de DNA, mejora su estabilidad y prolonga su vida media en plasma. Además, la excitación (longitud de onda: 400 nm) de las DNA-AuNPs puede originar la desorción del DNA de la superficie por rotura de los enlaces oro-sulfuro (89). La estabilidad de los bioconjugados de AuNPs en medios de elevada fuerza iónica, mejora al aumentar la fracción molar y cadena de PEG y disminuir el diámetro de partícula. Las AuNPs modificadas con cadenas de PEG de PM 5000 son internalizadas tan eficazmente como los conjugados con cadenas de PM 900. Basándonos en este hallazgo, las AuNPs funcionalizadas con cadenas de PEG de al menos PM 5000 (para evitar la captación por el SRE), que presentan una vida media de circulación de unas pocas horas, podrían resultar las más eficaces para su utilización en, por ejemplo, la terapia del cáncer (90).

Habitualmente, para la elaboración de vehículos de DNA, que han de ser internalizados por la células, se recurre a la utilización de materiales policatiónicos. Sin embargo, la demostración en 2006 de la internalización celular de nanopartículas modificadas con oligonucleótidos (DNA-NPs) que exhiben una superficie muy negativa (91) supone un «giro drástico en el planteamiento». En efecto, estas nanopartículas negativas son estables frente a la degradación enzimática y eficazmente captadas por las células por un proceso de endocitosis que es iniciado por la adsorción de numerosas proteínas séricas en la superficie de las partículas, como lo demuestra el hecho de que el DNA antisentido asociado a la nanopartícula es capaz de controlar la expresión proteica (92).

Terapia del cáncer

Los tratamientos de quimioterapia tradicionales empleados en la terapia del cáncer presentan importantes limitaciones relativas a la reducida especificidad de los agentes quimioterapéuticos por las células tumorales, la corta vida media de los fármacos debido al rápido aclaramiento *in vivo* y la resistencia a muchos fármacos ejercida por las células tumorales. En consecuencia, es objetivo prioritario la identificación un sistema nanotransportador que permita orientar selectivamente («vectorizar») y, en principio, liberar de manera eficaz la dosis adecuada del fármaco citotóxico en el tumor o células cancerígenas. Esto permitirá mejorar la eficacia y reducir la dosis de fármaco administrado así como los efectos secundarios consecuencia de una distribución aleatoria del fármaco en el organismo.

La vectorización pasiva consiste en la localización del vehículo o vector conteniendo el fármaco en el lecho capilar del tejido tumoral debido a un fenómeno de extravasación a través de los poros de los vasos sanguíneos. Los nanosistemas de 5-10 nm facilitan los efectos de permeación y retención y la PEGilación de las AuNPs (mediante conjugación por PEG-tiolado) permite prolongar el tiempo de permanencia de las nanopartículas en plasma y, en definitiva, mejorar su vectorización pasiva (16, 34, 61).

La vectorización activa conlleva el direccionamiento del fármaco a las células específicas diana, de manera que se modifica la distribución normal del mismo en el organismo, lo que hasta hace poco se consideraba impensable. Este tipo de vehiculización puede conseguirse conjugando al fármaco o nanotransportador una molécula (anticuerpo específico, lectina, proteína, hormona, ligando de bajo PM) capaz de reconocer específicamente y unirse a su diana terapéutica. Ambos tipos de mecanismos, vectorización pasiva y activa, se combinan en un nanotransportador ideal (93-95).

El desarrollo de un nanosistema terapéutico basado en AuNPs, que pueda ser dirigido al lugar adecuado y activado desde el exterior por una fuente luminosa apropiada (rayos láser), ofrece incuestionables ventajas en el tratamiento del cáncer por dos posibles mecanismos: (a) efecto hipertérmico localizado de las AuNPs y; (b) liberación de un posible fármaco antitumoral asociado a las AuNPs, como consecuencia de la incidencia de luz láser. Las AuNPs pueden ser funcionalizadas, como acabamos de comentar, con anticuerpos (biomarcadores moleculares específicos sobreexpresados en la superficie de las células cancerígenas) que se unan específicamente a las células tumorales. La irradiación externa de las células tumorales selectivamente marcadas con las AuNPs con un

láser de frecuencia adecuada al máximo de absorción de las AuNPs (10-50 nm) resulta en un calentamiento selectivo (40-80 °C) que da lugar a un daño celular irreversible y a la desorganización de los componentes tisulares, a unas potencias láser muy inferiores a las requeridas para destruir las células sanas (fototerapia o tratamiento de hipertermia del cáncer) (10-12, 14, 16, 17, 96, 97).

La gran mayoría de los estudios de vectorización activa con AuNPs y, más específicamente, de hipertermia dirigida, se basan en la utilización de EGFR (receptores del factor humano de crecimiento epidérmico) o HER2 (receptores de herceptina), obviamente debido a la facilidad de disponer de anticuerpos monoclonales (aprobados por la FDA para la terapia del cáncer) que reconocen estas dos proteínas. Así se comprobó que la utilización de AuNPs (diámetro del núcleo: 30 nm) estabilizadas con citrato y recubiertas con anti-EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico) a fin de dirigirlas de manera específica a las células tumorales HSC3 (células de carcinoma humano oral escamoso) multiplicaba por 20 la eficacia de la terapia fototérmica. La irradiación láser de las células tumorales marcadas con conjugados (nanocilindros) AuNPs-anti-EGFR daba lugar a una destrucción selectiva de las células cancerígenas (17).

AuNPs (*nanocilindros*) fueron funcionalizadas covalentemente con herceptina (trastuzumab; anticuerpo monoclonal que permite el reconocimiento molecular de cáncer de mama que sobre-expresa antígenos muy específicos asociados al tumor) y PEG (protege a las nanopartículas frente al SER). La estabilidad y funcionalidad de las partículas (Her-PEG-AuNPs) fabricadas, fue demostrada *in vitro* en presencia de sangre e *in vivo* en un modelo de cáncer de mama desarrollado en ratón desnudo, comprobándose que las Her-PEG-AuNPs se acumulan *in vivo* en el tumor (62).

Se han propuesto AuNPs-PEGiladas para transportar TNF- α (factor de necrosis tumoral) (8, 93, 98), proteína que tiene una doble función (ligando de vectorización y acción antitumoral) y se emplea en el tratamiento de los tumores carcinoma de colon. La aplicación clínica de esta citoquina, con una excelente eficacia anticancerígena, se encuentra limitada por la elevada toxicidad sistémica. La adsorción de TNF- α , a la superficie de AuNPs-PEGiladas permite maximizar su eficacia antitumoral y minimizar su toxicidad sistémica. *Paciotti y col.* comprobaron que cuando las TNF-AuNPs-PEGiladas son inyectadas intravenosamente a ratones, se acumulan fundamentalmente en las células de carcinoma de colon (MC-38) en detrimento del hígado y bazo (pobre acumulación en el SRE) u otros órganos sanos. La combinación de los principios de hipertermia local y liberación de fármaco en un mismo sistema se traduce en un aumento de la eficacia terapéutica con respecto a cada uno de los tratamientos por

separado: se retrasa significativamente el crecimiento tumoral, se reduce la perfusión sanguínea del tumor y disminuye la supervivencia de las células tumorales. Como consecuencia de estos interesantísimos resultados, en la actualidad se está llevando a cabo un estudio clínico en fase I de este conjugado (CYT-6091) con la finalidad de evaluar su perfil de toxicidad, farmacocinética y eficacia clínica (2). Por otra parte, se comprobó que se produce una mejora adicional de la terapia tumoral cuando el fármaco anticancerígeno paclitaxel se incorpora a las TNF-AuNPs-PEGiladas (9).

El anclaje del ligando Galactosa-PEG-tiol en las AuNPs (obtención de Gal-PEG-AuNPs) facilita la vectorización activa a los hepatocitos hepáticos, particularmente cuando se utilizan partículas de 50 nm (99).

El ácido fólico y el metotrexato son dos moléculas específicamente reconocidas por los receptores de folato que se encuentran sobreexpresados en las superficies de muchas células tumorales, presentando además el metotrexato, actividad antitumoral. Se han preparado conjugados de AuNPs con estos compuestos con fines de vectorización: *Andres y col.* conjugan ácido fólico a AuNPs (10 nm) mediante un espaciador PEG y demuestran la captación selectiva e internalización de las nanopartículas de ácido fólico-AuNPs por células KB receptor de folato-positivas, mientras que la captación por las células WI que no sobre-expresan el receptor de folato, es escasa (100). *Chen y col.* investigan in vitro e in vivo la actividad citotóxica/antitumoral de conjugados de metotrexato-AuNPs, comprobando que la administración del conjugado suprime el crecimiento tumoral en un modelo de carcinoma pulmonar de *Lewis* en ratón, mientras que una dosis similar de metotrexato no presenta actividad (101).

En ocasiones no es suficiente con que el nanotransportador se una a la superficie de la célula diana, sino que ha de ser capaz de atravesar la membrana e internalizarse en la misma (hipertermia y/o liberación intracelular del fármaco vectorizado) e incluso, en algunos casos (terapia génica) localizarse en el núcleo. Con este fin se han ensayado diversas estrategias dirigidas a optimizar el tamaño y las propiedades superficiales de los nanotransportadores. *Chithrani y col.* constatan que AuNPs de oro esféricas de 50 nm de diámetro, son internalizadas por las células de mamíferos a una velocidad más rápida y elevada que partículas con otros tamaños; y que las nanopartículas recubiertas de transferrina se internalizan en las células posiblemente vía un camino de endocitosis mediado por una proteína específica (46).

AuNPs con forma *cilíndrica*, recubiertas con bromuro de cetiltrimetilamonio (surfactante catiónico micelar utilizado en la síntesis de las AuNPs) son

rápidamente internalizadas por células KB vía un mecanismo de captación no específico, migrando hacia el núcleo a una velocidad de difusión cuadrática. Esta captación no específica disminuye (aumenta la acumulación de las nanopartículas en la superficie de la célula) cuando el surfactante catiónico es removido de AuNPs funcionalizadas con folato. En cualquier caso, ambos tipos de AuNPs confieren a las células tumorales una elevada susceptibilidad fototérmica (102).

Las AuNPs han sido «decoradas» con péptidos (péptido CALNN, péptido TAT) (63, 103) que favorecen su transporte a través de la membrana celular y la vectorización de componentes intracelulares (translocación en el núcleo). Los complejos CALNN-AuNPs exhiben propiedades de reconocimiento específico hacia el núcleo y el retículo endoplásmico, pudiendo modularse la distribución hacia uno u otro en función de la concentración de péptido y el tamaño de partícula (63). El péptido TAT (indicador de localización nuclear) permite a las TAT-AuNPs atravesar la membrana celular (células humanas de fibroblasto) y localizarse en el núcleo (103).

Sin lugar a dudas una de las aplicaciones más prometedoras de las AuNPs es su utilización como plataforma que integra en el mismo sistema las dos funciones imprescindibles para el correcto tratamiento del cáncer: diagnóstico y subsiguiente terapia (62). Las AuNPs pueden ser detectadas en muestras biológicas y tejidos utilizando una gran variedad de métodos: microscopía electrónica, de campo oscuro, láser de barrido, tomografía óptica, espectroscopía Raman, imagen de Raxos X, etc. (62).

Este principio de dualidad es utilizado por *Loo y col.* al diseñar AuNPs (con forma de *nanocubierta*) «inmunovectorizadas» con doble función: permitir el diagnóstico del cáncer por imagen óptica molecular (por dispersar la luz en el infrarrojo próximo), y causar la destrucción selectiva de las células de carcinoma vectorizadas mediante terapia fototérmica (debido a que absorben luz y producen hipertermia). En una prueba experimental de concepto, estos autores emplean esta AuNPs para detectar (mediante microscopía de campo oscuro) y destruir (mediante radiación láser que origina hipertermia y ablación térmica) células de carcinoma de mama que sobre-expresan HER2 (biomarcador de cáncer de mama clínicamente relevante (10).

Siguiendo el mismo principio, *Huang y col.* diseñan nanoconjugados (conteniendo nanocilindros) anti EGFR-AuNPs que, en líneas celulares cancerígenas de epitelio oral, permiten visualizar y diferenciar las células cancerígenas de la sanas para, a continuación, destruirlas fototérmicamente (11-13).

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

La aplicación de las AuNPs en terapia génica y vectorización activa a células tumorales presenta un gran interés. El éxito de la vectorización de AuNPs a células tumorales *in vivo* requiere un esfuerzo de ingeniería que garantice su: (a) biocompatibilidad, (b) estabilidad *in vivo*; (c) capacidad de circular en sangre durante el tiempo suficiente para alcanzar la célula u órgano diana (protección frente al SER utilizando, por ejemplo, PEG); (d) capacidad de reconocer y unirse a las células tumorales; (e) ocasionalmente, capacidad de atravesar la membrana e internalizarse intracelularmente e incluso localizarse en el núcleo.

Especialmente prometedora es la estrategia que consiste en diseñar una nanoplataforma a base de AuNPs que combine, en la misma, las dos funciones: diagnóstico y terapia del cáncer.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Bhattacharya, R. & Mukherjee, P. (2008) Biological properties of «naked» metal nanoparticles. *Advanced Drug Delivey Reviews*. 60: 1289-1306.
- (2) Chen, P.C., Mwakwari, S.C. & Oyelere, A.K. (2008) Gold nanoparticles: Fron nanomedicine to nanosensing (Review). *Nanotechnology, Science and Applications*. I: 45-66.
- (3) Jain, P.K., Huang, X., El-Sayed, I.H. & El-Sayed, M.A. (2008) Noble metals on the nanoscale: optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology and medicine. *Accounts of Chemical Research*. 41 (12): 1578-1586.
- (4) Gunnarsdottir, S., Rucki, M. & Elfarr, A.A. (2002) Novel glutathione-dependent thiopurine prodrugs: evidence for enhanced cytotoxicity in tumor cells and for decreased bone marrow toxicity in mice. *J. Pharm. Exp. Ther.* 301: 77-86.
- (5) Hong, R., Han, G., Fernández, J.M., Kim, B.J. Forbes, N.S. & Rotello, V.M. (2006) Glutathione-mediated delivery and release using monolayer protected nanoparticle carriers. *J. Am. Chem. Soc.* 128: 1078-1079.
- (6) Han, G., Martín, C.T. & Rotello, V.M. (2006a) Stability of gold nanoparticle-bound DNA toward biological, physical, and chemical agents. *Chem. Biol. Drug Des.* 67: 78-82.
- (7) Han, G., You, C.C., Kim, B.J., Turingan, R.S., Forbes, N.S., Martin, C.T. & Rotello, V.M. (2006b) Light-regulated release of DNA and its delivery to nuclei by means of photolabile gold nanoparticles. *Angew. Chem. Int. Ed.* 45: 3165-3169.

- (8) Paciotti, G.F., Myer, L., Weinreich, D., Goia, D., Pavel, N., McLaughlin, R.E. & Tamarkin, L. (2004) Colloidal gold: a novel nanoparticle vector for tumor directed drug delivery. *Drug Deliv.* 11: 169-183.
- (9) Paciotti, G.F., Kingston, D.G.I. & Tamarkin, L. (2006) Colloidal gold nanoparticles: a novel nanoparticle platform for developing multifunctional tumor-targeted drug delivery vectors. *Drug Dev. Res.* 67: 47-54.
- (10) Loo, C., Lowery, A., Halas, N.J., West, J. & Drezek, W.R. (2005) Immunotargeted nanoshells for integrated cancer imaging and therapy. *Nanoletters.* 4(4): 709-711.
- (11) Huang, X., El-Sayed, I.H., Qian, W. & El-Sayed, M.A. (2006a) Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods. *J. Am. Chem. Soc.* 128: 2115-20.
- (12) Huang, X., Jain, P.K. & El-Sayed, I.H. (2006b) Determination of the minimum temperature required for selective photothermal destruction of cancer cells with the use immunotargeted gold nanoparticles. *Photochem. Photobiol.* 82: 412-17.
- (13) Huang, X., Jain, P.K. & El-Sayed, I.H. (2007a) Gold nanoparticles: interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostic and therapy. *Nanomed.* 2: 681-93.
- (14) Huang, X., Quian, W., El-Sayed, I.H. & El-Sayed, M.A. (2007b) The potential use of the enhanced nonlinear properties of gold nanospheres in photothermal cancer therapy. *Laser Surg. Med.* 39: 747-53.
- (15) Jain, P.K., Lee, K.S., El-Sayed, I.H. & El-Sayed, M.A. (2006a) Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape and composition: applications in biological imaging and biomedicine. *J. Phys. Chem. B.* 110: 7238-48.
- (16) Jain, P.K., El-Sayed, I.H. & El-Sayed, M.A. (2007) Au nanoparticles target cancer. *Nano Today.* 2 (2): 16.
- (17) Cai, W., Gao, T., Hong, H. & Sun J. (2008) Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology (Review). *Nanotechnology, Science and Applications I:* 17-32.
- (18) Mahdihassan, S. (1971). Colloidal gold as an alchemical preparation. *Janus.* 58: 112-118.
- (19) Higby, G.J. (1982) Gold in medicine: a review of its use in the West before 1900. *Gold Bull.* 15: 130-140.
- (20) Daniel, M.C. & Astruc, D. (2004) Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chem. Rev.* 104: 293-346.

- (21) Felson, D.T., Anderson, J.J. & Meenan, R.F. (1990) The comparative efficacy and toxicity of second-line drugs in rheumatoid arthritis. Results of two metaanalyses. *Arthritis. Rheum.* 33: 1449-1461.
- (22) Shaw, I.C. (1999) Gold-based therapeutic agents. *Chem. Rev.* 99: 2589-2600.
- (23) Berners-Price, S.J., Norman, R.E. & Sadler, P.J. (1987a) The autoxidation and proton dissociation constants of tertiary diphosphines: relevance to biological activity. *J. Inorg. Biochem.* 31: 197-209.
- (24) Berners-Price, S.J., Girard, G.R., Hill, D.T., Sutton, B.M., Jarrett, P.S., Faucette, L.F., Johnson, R.K., Mirabelli, C.K. & Sadler, P.J. (1990) Cytotoxicity and antitumor activity of some tetrahedral bis(diphosphino)gold(I) chelates. *J. Med. Chem.* 33: 1386-1392.
- (25) Haiduc, I. & Silvestru, C. (1989) Rhodium, iridium, copper and gold antitumor organometallic compounds (review). *In Vivo.* 3: 285-293.
- (26) Berners-Price, S.J. & Sadler, P.J. (1987b) Interaction of the antitumor Au(I) complex $[\text{Au}(\text{Ph}_2\text{P}(\text{CH}_2)_2\text{PPh}_2)_2]\text{Cl}$ with human blood plasma, red cells, and lipoproteins: ^{31}P and ^1H NMR studies. *J. Inorg. Biochem.* 31: 267-281.
- (27) Gielen, M. & Tiekink, E.R.T. (2005) Metallotherapeutic drugs and metal-based diagnostic agents: The use of metals in medicine. Hoboken N.J. John Wiley and Sons.
- (28) Sun, R.W.Y., Ma, D.L., Wong, E.L.M. & Che, C.M. (2007) Some uses of transition metal complexes as anti-cancer and anti-HIV agents. *Dalton Trans.* 43: 4884-92.
- (29) Connor, E.E., Mwamuka, J., Gole, A., Murphy, C.J. & Wyatt, M.D. (2005). Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small.* 1 (3): 325-327.
- (30) Shukla, R., Bansal, V., Chaudhary, M., Basu, A., Bhonde, R.R., & Sastry, M. (2005) Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: A microscopic overview. *Langmuir.* 21 (23): 10644-10654.
- (31) Sadauskas, E., Wallin, H., Stoltenberg, M., Vogel, U., Doering, P., Larsen, A. & Danscher, G. (2007) Kupffer cells are central in the removal of nanoparticles from the organism. *Part Fibre Toxicol.* 4: 10.
- (32) Pan, Y., Neuss, S., Leifert, A., Fischler, M., Wen, F., Simon, U., Schmid, G., Brandau, W. & Jahnke-Dechent, W. (2007) Size-Dependent Cytotoxicity of Gold Nanoparticles. *Small.* 3 (11): 1941-194.
- (33) Goodman, C.M., McCusker, C.D., Yilmaz, T. & Rotello, V.M. (2004) Toxicity of Gold Nanoparticles Functionalized with Cationic and Anionic Side Chains. *Bioconjugate Chem.* 15 (4): 897-900.

- (34) Niidome, T., Yamagata, M., Okamoto, Y., Akiyama, Y., Takahashi, H., Kawano, T., Katayama, Y. & Niidome, Y. (2006) PEG-modified gold nanorods with a stealth character for *in vivo* applications. *J. Control. Release.* 114 (3): 343-347.
- (35) Turkevich, J., Stevenson, P.C. & Hillier, J. (1951) A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold, discuss. *Faraday Soc.* 55-57.
- (36) Frens, G. (1973) Controlled nucleation for regulation of particle-size in monodisperse gold suspensions. *Nature Phys. Sci.* 241: 20-22.
- (37) Schmid, G. (1992) Large clusters and colloids - metals in the embryonic state. *Chem. Rev.* 92: 1709-1727.
- (38) Brust, M., Walker, M., Bethell, D., Schiffrin, D.J. & Whyman, R. (1994) Synthesis of thiol-derivatized gold nanoparticles in a 2-phase liquid-liquid system. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.:* 801-802.
- (39) Grabar, K.C., Freeman, R.G., Hommer, M.B. & Natan, M.J. (1995) Preparation and characterization of Au colloid monolayers. *Anal. Chem.* 67: 735-743.
- (40) Esumi, K., Suzuli, A., Aihara, N., Usui, K. & Torigoe, K. (1998) Preparation of gold colloids with UV irradiation using dendrimers as stabilizer. *Langmuir.* 14 (3): 3157-9.
- (41) Shi, X., Ganser, T.R., Sun, K., Balogh, L.P. & Baker, J.R. (2006) Characterization of crystalline dendrimer-stabilized gold nanoparticles. *Nanotechnology.* 17:1071-8.
- (42) Shi, X., Wang, S., Meshinchi, S., Van Antwerp, M. E., Bi, X., Lee, I. & Baker, J.R. (2007a) Dendrimer-entrapped gold nanoparticles as a platform for cancer-cell targeting and imaging. *Small.* 3: 1245-52.
- (43) Shi, X., Wang, S., Sun, H. & Baker, J.R. (2007b) Improved biocompatibility of surface functionalized dendrimer-entrapped gold nanoparticles. *Soft. Matter.* 3: 71-4.
- (44) Shi, X., Lee, I. & Baker, J.R. (2008) Acetylation of dendrimer-entrapped gold and silver nanoparticles. *J. Mater.Chem.* 18: 586-93.
- (45) Yuan, J.J., Schmid, A. & Armes, S.P. (2006) Facile synthesis of highly biocompatible poly(2-(methacryloyloxy)ethyl phosphorylcholine)-coated gold nanoparticles in aqueous Solutions. *Langmuir.* 22: 11022-7.
- (46) Chithrani, B.D., Ghazani, A.A. & Chan, W.C.W. (2006) Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano. Lett.* 6: 662-668.
- (47) Chithrani, B.D. & Chan, W.C.W. (2007) Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano. Lett.* 7: 1542-1550.

- (48) Kumar, R., Maitra, A.N., Patanjali, P.K. & Sharma, P. (2005) Hollow gold nanoparticles encapsulating horseradish peroxidase. *Biomaterials*. 26: 6743-53.
- (49) Hostetler, M.J., Wingate, J.E., Zhong, C.J., Harris, J.E., Vachet, R.W., Clark, M.R., Londono, J.D., Green, S.J., Stokes, J.J., Wignall, G.D. Glish, G.L., Porter, M.D., Evans, N.D. & Murray, R.W. (1998) Alkanethiolate gold cluster molecules with core diameters from 1.5 to 5.2 nm: core and monolayer properties as a function of core size. *Langmuir*. 14: 17-30.
- (50) Gibson, J.D., Khanal, B.P. & Zubarev, E.R (2007) Paclitaxel-functionalized gold nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* 129: 11653-11661.
- (51) Shimmin, R.G., Schoch, A.B. & Braun, P.V. (2004) Polymer size and concentration effects on the size of gold nanoparticles capped by polymeric thiols. *Langmuir*. 20: 5613-5620.
- (52) Fan, J., Chen, S.W. & Gao, Y. (2003) Coating gold nanoparticles with peptide molecules via a peptide elongation approach. *Colloids Surf., B Biointerfaces*. 28: 199-207.
- (53) Otsuka, H., Akiyama, Y., Nagasaki, Y. & Kataoka, K. (2001) Quantitative and reversible lectin-induced association of gold nanoparticles modified with alpha-lactosyl-omega-mercapto-poly(ethylene glycol). *J. Am. Chem. Soc.* 123: 8226-8230.
- (54) Otsuka, H., Nagasaki, Y. & Kataoka, K. (2003) PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55: 403-419.
- (55) Olivier, J.C., Huertas, R., Lee, H.J., Calon, F. & Pardridge, W.M. (2002) Synthesis of pegylated immunonanoparticles. *Pharm. Res.* 19: 1137-1143.
- (56) Ishii, T., Otsuka, H., Kataoka, K. & Nagasaki, Y. (2004) Preparation of functionally PEGylated gold nanoparticles with narrow distribution through autoreduction of auric cation by alpha-biotinyl-PEG-block-[poly(2-(N,N-dimethylamino)ethyl methacrylate)]. *Langmuir*. 20: 561-564.
- (57) Khalil, H., Mahajan, D., Rafailovich, M., Gelfer, M. & Pandya, K. (2004) Synthesis of zerovalent nanophase metal particles stabilized with poly(ethylene glycol). *Langmuir*. 20: 6896-6903.
- (58) Tshikhudo, T.R., Wang, Z. & Brust, M. (2004) Biocompatible gold nanoparticles. *Mater. Sci. Technol.* 20: 980-984.
- (59) Takae, S., Akiyama, Y., Otsuka, H., Nakamura, T., Nagasaki, Y. & Kataoka, K. (2005) Ligand density effect on biorecognition by PEGylated gold nanoparticles: regulated interaction of RCA(120) lectin with lactose installed to the distal end of tethered PEG strands on gold surface. *Biomacromolecules*. 6: 818-824.
- (60) Oishi, M., Nakaogami, J., Ishii, T. & Nagasaki, Y. (2006) Smart PEGylated gold nanoparticles for the cytoplasmic delivery of siRNA to induce enhanced gene silencing. *Chem. Lett.* 35: 1046-1047.

- (61) Yih, T.C. & Al-Fandi, M. (2006) Engineered nanoparticles as precise drug delivery systems. *J. Cell. Biochem.* 97: 1184-1190.
- (62) Eghtedari, M., Liopo, A.V., Copland, J.A., Oraevsky, A.A. & Motamedi, M. (2009) Engineering of Hetero-Functional Gold Nanorods for the in vivo Molecular Targeting of Breast Cancer Cells. *NANOLetters.* 9(1): 287-291.
- (63) Sun, L., Liu, D. & Wang, Z. (2008) Functional Gold Nanoparticle-Peptide Complexes as Cell-Targeting Agents. *Langmuir.* 24 (18): 10293-10297.
- (64) Zharov, V.P., Mercer, K.E., Galitovskaya, E.N. & Smeltzer, M.S. (2006) Photo-thermal nanotherapeutics and nanodiagnostics for selective killing of bacteria targeted with gold nanoparticles. *Biophys. J.* 90: 619-627.
- (65) Mulvaney, P. (1996) Surface plasmon spectroscopy of nanosized metal particles. *Langmuir.* 12: 788-798.
- (66) Burda, C., Chen, X., Narayanan, R. & El-Sayed, M.A. (2005) Chemistry and properties of nanocrystals of different shapes. *Chem. Rev.* 105: 1025-1102.
- (67) Mocellin, S., Bronte, V. & Nitti, D. (2007) Nitric oxide, a double edged sword in cancer biology: searching for therapeutic opportunities. *Med. Res. Rev.* 27: 317-352.
- (68) Polizzi, M.A., Stasko, N.A. & Schoenfisch, M.H. (2007) Water-soluble nitric oxide-releasing gold nanoparticles. *Langmuir.* 23: 4938-4943.
- (69) Mellman, I., Fuchs, R. & Helenius, A. (1986) Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu. Rev. Biochem.* 55: 663-700.
- (70) Engin, K., Leeper, D.B., Cater, J.R., Thistlethwaite, A.J., Tupchong, L. & Mcfarlane, J.D. (1995) Extracellular pH distribution in human tumors. *Int. J. Hypertherm.* 11: 211-216.
- (71) Anderson, M.E. (1998) Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chem.-Biol. Interact.* 112: 1-14.
- (72) Sies, H. (1999) Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic. Biol. Med.* 27: 916-921.
- (73) Jones, D.P., Carlson, J.L., Samiec, P.S., Sternberg, P., Mody, V.C., Reed, R.L. & Brown, A.S. (1998) Glutathione measurement in human plasma evaluation of sample collection, storage and derivatization conditions for analysis of dansyl derivatives by HPLC. *Clin. Chim. Acta.* 275: 175-184.
- (74) Jones, D.P., Carlson, J.L., Mody, V.C., Cai, J.Y., Lynn, M.J. & Sternberg, P. (2000) Redox state of glutathione in human plasma. *Free Radic. Biol. Med.* 28: 625-635.
- (75) Verma, A., Simard, J.M., Worrall, J.W.E. & Rotello, V.M. (2004) Tunable reactivation of nanoparticle-inhibited beta-galactosidase by glutathione at intracellular concentrations. *J. Am. Chem. Soc.* 126: 13987-13991.

- (76) Joshi, H.M., Bhumkar, D.R., Joshi, K., Pokharkar, V & Sastry, M. (2006) Gold nanoparticles as carriers for efficient transmucosal insulin delivery. *Langmuir*. 22: 300-305.
- (77) Bhumkar, D.R., Joshi, H.M., Sastry, M. & Pokharkar, V.P. (2007) Chitosan reduced gold nanoparticles as novel carriers for transmucosal delivery of insulin. *Pharm. Res.* 24: 1415-1426.
- (78) Angelatos, A.S., Radt, B. & Caruso, F. (2005) Light-responsive polyelectrolyte/gold nanoparticle microcapsules. *J. Phys. Chem. B.* 109: 3071-3076.
- (79) Sershen, S.R., Westcott, S.L., Halas, N.J. & West, J.L. (2000) Temperature-sensitive polymer-nanoshell composites for photothermally modulated drug delivery. *J. Biomed. Mater. Res.* 51: 293-8.
- (80) Bikram, M., Gobin, A.M., Whitmire, R.E. & West, J. (2007) Temperature-sensitive hydrogels with SiO₂-Au nanoshells for controlled drug delivery. *J. Control. Release.* 123: 219-27.
- (81) Miller, A.D. (1992) Human gene-therapy comes of age. *Nature*. 357: 455-460.
- (82) Thomas, M. & Klibanov, A.M. (2003a) Non-viral gene therapy: polycation-mediated DNA delivery. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62: 27-34.
- (83) Check, E. (2002) Gene therapy: a tragic setback. *Nature*. 420: 116-118.
- (84) Wiethoff, C.M. & Middaugh, C.R. (2003) Barriers to nonviral gene delivery. *J. Pharm. Sci.* 92: 203-217.
- (85) McIntosh, C.M., Esposito, E.A., Boal, A.K. Simard, J.M., Martin, C.T. & Rotello, V.M. (2001) Inhibition of DNA transcription using cationic mixed monolayer protected gold clusters. *J. Am. Chem. Soc.* 123: 7626-7629.
- (86) Sandhu, K.K., McIntosh, C.M., Simard, J.M., Smith, S.W. & Rotello, V.M. (2002) Gold nanoparticle-mediated transfection of mammalian cells. *Bioconjug. Chem.* 13: 3-6.
- (87) Thomas, M. & Klibanov, A.M. (2003b) Conjugation to gold nanoparticles enhances polyethylenimine's transfer of plasmid DNA into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100: 9138-9143.
- (88) Wang, H., Chen, Y., Li, X.Y. & Liu, Y. (2007) Synthesis of oligo(ethylenediamine)-beta-cyclodextrin modified gold nanoparticle as a DNA concentrator. *Mol. Pharm.* 4: 189-198.
- (89) Jain, P.K., Qian, W. & El-Sayed, M.A. (2006b) Ultrafast cooling of photoexcited electrons in gold nanoparticle-thiolated DNA conjugates involves the dissociation of the gold-thiol-bond. *J. Am. Chem. Soc.* 128: 2426-33.
- (90) Yanlin, L., Shipton, M.K., Ryan, L., Kaufman, E.D., Franzen, S. & Feldheim, D.L. (2007) Synthesis, stability and cellular internalization of gold nanoparticles containing mixed peptide-poly(ethylene glycol) monolayers. *Anal. Chem.* 79: 2221-9.

- (91) Rosi, N.L., Giljohann, D.A., Thaxton, C.S., Lytton-Jean, A.K.R., Han, M-S. & Mirkin, C.A. (2006) Oligonucleotide-modified gold nanoparticles for intracellular gene regulation. *Science*. 312: 1027-1030.
- (92) Giljohann, D.A, Seferos, D.S., Patel, P.C., Millstone, J.E., Rosi, N.L. & Mirkin, C.A. (2007) Oligonucleotide loading determines cellular uptake of DNA-modified gold nanoparticles. *Nano Lett.* 7: 3818-3821.
- (93) Baban, D.F. & Seymour, L.W. (1998) Control of tumour vascular permeability. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 34: 109-119.
- (94) Brigger, I., Dubernet, C. & Couvreur, P. (2002) Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54: 631-651.
- (95) Brannon-Peppas, L. & Blanchette, J.O. (2004) Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 56: 1649-1659.
- (96) El-Sayed, I.H., Huang, X. & El-Sayed, M.A. (2005) Selective laser photo-thermal therapy of pithelial carcinoma using anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles. *Cancer Lett.* 239: 129-35.
- (97) Chen, J., Wang, D., Xi, J., Au, L., Siekkinen, A., Warsen, A., Li, Z.Y., Zhang, H., Xia, Y. & Li, X. (2007a) Immuno gold nanocages with tailored optical properties for targeted photothermal destruction of cancer cells. *Nano Lett.* 7: 1318-22.
- (98) Visaria, R.K., Griffin, R.J., Williams, B.W., Ebbini, E.S., Paciotti, G.F., Song, C.W. & Bischof, J.C. (2006) Enhancement of tumor thermal therapy using gold nanoparticle-assisted tumor necrosis factor- α delivery. *Mol. Cancer. Ther.* 5: 1014-20.
- (99) Bergen, J.M., Von Recum, H.A., Goodman, T.T.Massey, A.P. & Pun, S.H. (2006) Gold nanoparticles as a versatile platform for optimizing physicochemical parameters for targeted drug delivery. *Macromol. Biosci.* 6: 506-516.
- (100) Dixit, V., Van den Bossche, J., Sherman, D.M., Thompson, D.H. & Andres, R.P. (2006) Synthesis and grafting of thioctic acid-PEG-folate conjugates onto Au nanoparticles for selective targeting of folate receptor-positive tumor cells. *Bioconjug. Chem.* 17: 603-609.
- (101) Chen, Y.H., Tsai, C.Y., Huang, P.Y., Chang, M.Y., Cheng, P.C., Chou, C.H., Chen, D.H., Wang, C.R., Shiau, A.L. & Wu, C. L. (2007b) Methotrexate conjugated to gold nanoparticles inhibits tumor growth in a syngeneic lung tumor model. *Mol. Pharm.* 4: 713-722.
- (102) Huff, T.B., Tong, L., Zhao, Y., Hansen, M.N., Cheng, J.X. & Wei, A. (2007) Hyperthermic effects of gold nanorods on tumor cells. *Nanomedicine.* 2 (1): 125-132.
- (103) Fuente, J.M. de la & Berry, C.C. (2005) Tat peptide as an efficient molecule to translocate gold nanoparticles into the cell nucleus. *Bioconjug. Chem.* 16: 1176-1180.