RIDAA
Repositorio Institucional
Digital de Acceso Abierto de la
Universidad Nacional de Quilmes

Universidad
Nacional
de Quilmes

Achilli, Estefanía E.

Diseño de nanopartículas proteicas con reconocimiento molecular mediante entrecruzamiento radio-inducido

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:
Achilli, E. E. (2019). Diseño de nanopartículas proteicas con reconocimiento molecular mediante entrecruzamiento radio-inducido. (Tesis de doctorado). Bernal, Argentina : Universidad Nacional de Quilmes. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/1729

Puede encontrar éste y otros documentos en: https://ridaa.unq.edu.ar

Universidad Nacional de Quilmes
Roque Sáenz Peña 352 // Bernal
Buenos Aires // Argentina
t.: (+41 11) 4365 7100
f.: (+54 11) 4365 7101
info@unq.edu.ar

Estefanía E. Achilli, Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto,
Noviembre de 2019, 175 pp.,
http://ridaa.unq.edu.ar,
Universidad Nacional de Quilmes, Secretaría de Posgrado,
Doctorado en Ciencia y Tecnología

Diseño de nanopartículas proteicas con reconocimiento molecular mediante entrecruzamiento radio-inducido

TESIS DOCTORAL

Estefanía E. Achilli
eachilli1985@gmail.com

Resumen

En este trabajo se describe la preparación de nanopartículas de proteína y oro/proteína a a partir de un nuevo método que involucra la estabilización por radiación ionizante. Estas nanoestructuras son acopladas al péptido sintético Bombesina-DOTA para direccionarlas hacia células tumorales con sobreexpresión de receptores afines al mismo. De esta manera, se obtienen nanosistemas con potencial uso teranóstico.

TESIS DOCTORAL

DISEÑO DE NANOPARTÍCULAS PROTEICAS CON RECONOCIMIENTO MOLECULAR MEDIANTE ENTRECRUZAMIENTO RADIOINDUCIDO

Lic. Estefanía E. Achilli

Director
Dr. Mariano Grasselli

Codirectora
Dra. Silvia Del Valle Alonso

Lugar de trabajo
Laboratorio de Materiales Biotecnológicos,
UNQ-IMBICE (CONICET).

Tesis presentada para obtener el título de
Doctora de la Universidad Nacional de Quilmes
Mención en *Ciencia y Tecnología*.

Dedicado a Irene y Damián,

mis abuelos y familia.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a la UNQ y al IMBICE, por haberme brindado un lugar de trabajo. A CONICET por la beca otorgada para realizar el doctorado. A la Agencia Internacional de Energía Atómica (IAEA) y la UNQ por el financiamiento económico. A los jurados por tomarse el trabajo de leer esta tesis.

En el ámbito académico, le debo un profundo agradecimiento al Dr. Mariano Grasselli, mi director y guía profesional, el cual ha sabido enseñarme a pensar y a tratar de ser una buena profesional. Gracias por la oportunidad de formar parte de su grupo de Investigación y por la paciencia. A mi co-directora, Dra. Silvia Alonso, por sus aportes constantes a esta tesis. A mis amigos de trabajo, con los cuales he pasado momentos inolvidables. Gracias a Silvi, Costy, Clau, Flor, Lau, Pame, Lean, Fla, Mir, Gonza, Gaby, Sole, Luke, Mel, Mica y Manu, por haber convertido estos años en un camino lindo de transitar, por las risas compartidas y por el apoyo constante. A Conie, le debo un agradecimiento especial, por haber sido mi guía en el mundo de nanopartículas y haber convertido jornadas interminables en amenas.

A los colegas de otros labos, Juan, Dani F, Dani I, Maca y libio-amigos, gracias por la buena onda de siempre. A Facu Temprana, gracias por las jornadas de mediciones de citometría, a R. Candall y J. Montes de Oca, por las mediciones de DLS. A Bruno y Néstor por los asados y por prestarme los reactivos difíciles de conseguir.

En lo personal, quiero agradecer y dedicarle esta tesis a los 4 pilares de mi vida, mi mamá, mi novio, mi familia y amigas. Sin su apoyo no hubiera llegado a nada.

A Irene, mi mamá, a la cual le debo TODO. Mi ejemplo de lucha, perseverancia, paciencia y entereza, quien me enseñó que sin sacrifico y esfuerzo no se logra nada.

A Damián, mi compañero de vida, que me brinda su apoyo y amor incondicional, el cual me acompaña en cada paso que doy desde siempre.

A mi familia, abuelos, tíos y primos, siempre presentes, apoyándome en todo y festejando mis logros (por más pequeños que sean)… A los que están y a los que me guían desde el cielo estaré siempre eternamente agradecida. A mi familia “adoptiva” por su acompañamiento incondicional.

A mis amigas, por escucharme, y aunque no entiendan nada, apoyarme y alentarme siempre.

A todos los que ayudaron en mayor o menor medida en este camino, **GRACIAS TOTALES.**

Estefanía.

ÍNDICE GENERAL

FINANCIAMIENTO…… A
PUBLICACIONES CIENTÍFICAS……... C
ABREVIATURAS…… E
RESUMEN…….... G

Capítulo I. INTRODUCCIÓN GENERAL ……..…… 1
1. Nanopartículas de Albúmina…… 2
   Preparación de Nanopartículas de Albúmina…… 3
   Albúminas: BSA y HSA…….. 4
2. Radiaciones ionizantes en síntesis o estabilización de NPs…… 6
3. Nanopartículas de oro …… 7
   Técnicas de síntesis de NPs de oro …… 7
   Propiedades ópticas de las Au-NPs - Resonancia de plasmón superficial…….. 9
   Nanopartículas de oro en aplicaciones de liberación controlada …… 10
   Terapia Fototérmica……... 11
   Radioterapia con Nanopartículas de oro como radiosensibilizadores…….... 11
4. Nanosistemas multifuncionales…….. 13
   Sistemas Bombesina/Receptores de péptidos liberadores de .gastrina……. 14
5. Interacción entre células y Nanopartículas …… 16
   Fagocitosis ...……...17
   Endocitosis mediada por clatrina (CME) ……...18
   Endocitosis mediada por caveolina …… 18
   Endocitosis independiente de clatrina/caveolina ..……...…….19
   Diseño de Nanopartículas para internalización ……..….. 20
Referencias…… 20

OBJETIVOS…….. 27

CAPÍTULO II. NANOPARTÍCULAS DE PROTEÍNA…… 29
Materiales y métodos……..... 29
   Preparación de NPs…… 29
   Preparación de NPs por irradiación con haz de electrones……...30
   Determinación de tamaño…….. 30
   Caracterización de BSA-NPs mediante Espectroscopía UV-visible, Dicroísmo Circular y FT-IR…… 30

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Comparación de técnicas de entrecruzamiento proteico…….. 31
Resultados y discusión…….……31
Preparación de BSA-NPs…….…….. 31
Preparación de BSA-NPs mediante irradiación con haz de electrones……..37
Caracterización de las BSA-NPs……...39
Comparación de técnicas de entrecruzamiento proteico…….. 44
Conclusiones parciales…… 44
Referencias…… 45

CAPÍTULO III. ROL DE LOS RADICALES EN LA PREPARACION DE NANOPARTÍCULAS……..……... 47
Materiales y métodos……..... 47
Irradiación de soluciones de aminoácidos……...… 47
Preparación de nanopartículas…….. 48
Espectroscopía de fluorescencia de estado estacionario…….. 48
Cuantificación de aminoácidos por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) -ESI-MS/MS……... 48
Electroforesis SDS-PAGE…….. 50
Espectroscopía UV-visible……. 50
Determinaciones analíticas…… 50
Resultados y discusión…….……51
Espectroscopía de fluorescencia de estado estacionario……. 52
Cuantificación de aminoácidos por HPLC-ESI-MS/MS……. 55
Buscando evidencias del entrecruzamiento inducido por radiación…… 56
Análisis de radicales a partir de la radiólisis del solvente……..…….. 57
Radicales implicados en el entrecruzamiento de proteínas……. 62
Radicales en el medio proteico……..67
Análisis mediante electroforesis SDS-PAGE……. 69
Propuesta de un modelo de entrecruzamiento inducido por la radiación ionizante. 70
Conclusiones parciales…… 72
Referencias…… 73

CAPÍTULO IV. NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS…… 79
Materiales y métodos……..... 79
Preparación de nanopartículas de oro/Albúmina…… 79
Determinación de condiciones óptimas para la preparación de HNPs…….. 80
Espectroscopía UV-Visible……. 81

Acondicionamiento/Purificación…… 81
Determinación de tamaño y morfología de las NPs…….. 82
Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)…… 82
Determinación de Potencial Z (ZP)……... 82
Caracterización mediante FT-IR…… 83
Electroforesis SDS-PAGE…….. 83
Estabilidad del recubrimiento proteico…….. 83
Análisis mediante dicroísmo circular…… 83
Reconocimiento Albúmina/Anticuerpo α-BSA…… 83
Resultados y discusión…….84
Preparación de NPs…… 84
Caracterización de Au-NPs…… 86
Determinación de condiciones óptimas para la preparación de HNPs…….. 88
Caracterización de HNPs……93
Purificación de las HNPs…… 96
Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)……..…100
Determinación de potencial Z ..…… 101
Análisis por FT-IR …….. 101
Electroforesis SDS-PAGE ……102
Estabilidad de recubrimiento proteico ……102
Análisis mediante Dicroísmo Circular……104
Reconocimiento Albúmina/Anticuerpo α-BSA ……..…105
Conclusiones parciales ……..106
Referencias……..107

CAPÍTULO V. DECORACIÓN DE NANOPARTÍCULAS…… 109
Materiales y métodos……..... 109
Decoración de NPs…… 109
Caracterización por DLS y Espectroscopía UV-visible ……110
Caracterización por ESI-MS……110
Análisis mediante MALDI TOF/TOF……110
Cuantificación de tioles libres……...110
Cuantificación de BD/NP ……..112
Resultados y discusión……..113
Decoración de NPs ……116
Caracterización por DLS y UV-visible……118
Caracterización mediante ESI-MS……..121

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Análisis mediante MALDI-TOF/TOF……122
Determinación de tioles libres……. 124
Cuantificación de BD/NP…….. 125
Conclusiones parciales……...…….. 127
Referencias……. 128

CAPÍTULO VI. INTERACCIÓN DE NANOPARTÍCULAS CON CÉLULAS……131
Materiales y métodos…….....131
Cultivo celular……. 131
Aislamiento in vitro de células mononucleares de sangre periférica humana……..131
Estudios de interacción mediante citometría de flujo..……132
Análisis de interacción por microscopía de contraste de fases ……. 132
Análisis de interacción por microscopía láser confocal……132
Resultados y discusión…….……. 134
Estudio de interacción en células PC-3 mediante citometría de flujo ..……137
Estudio de interacción de NPs con células mononucleares humanas ……141
Análisis de interacción mediante microscopía de contraste de fases ..……143
Análisis de interacción mediante imágenes de microscopía láser confocal…….144
Conclusiones parciales ……..148
Referencias……..149

CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES FINALES…..……153

ANEXO ……...157

FINANCIAMIENTO

El trabajo de investigación fue realizado gracias a la beca doctoral CONICET, que me fue otorgada en junio de 2014.

El financiamiento para materiales, equipos de laboratorio y congresos fue aportado por los siguientes programas:

- 04/2011 al 04/2015 ***Programa Prioritario Materiales poliméricos biofuncionales*** (PUNQ 974/11 – UNQ), bajo la dirección y codirección de Dra. Silvia Del Valle Alonso y Dr. Mariano Grasselli, respectivamente.
- 04/2014 al 06/2019 ***Nanosized delivery systems for radiopharmaceuticals - Radiosynthesis of protein-gold nanoparticles for theranostics applications*** (CRP F22064 – IAEA), bajo la dirección del Dr. Mariano Grasselli y codirección de Dra. Silvia Del Valle Alonso.
- 05/2015 al 04/2019 ***Programa de Bio-Nanotecnología de lípidos y proteínas*** (PUNQ 1388/15 – UNQ), bajo la Dirección de la Dra. Silvia Del Valle Alonso y la codirección del Dr. Mariano Grasselli.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

- ***Preparation of protein nanoparticle by dynamic aggregation and ionizing-induced crosslinking.*** E. Achilli, G. Casajus, M. Siri, C. Flores, S. Kadlubowski, S.V. Alonso, M. Grasselli (2015). *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects,* 486, 161-171.

- ***Albumin nanocarriers, γ-irradiated crosslinked, combined with therapeutic drugs for cancer therapy.*** M. Siri, E. Achilli, M. Grasselli, S.V. Alonso (2017). *Current Pharmaceutical Design, 23(35), 5272-5282.*

- ***Radiosynthesis of Gold/Albumin Core/shell Nanoparticles for Biomedical Applications.*** C. Flores, E. Achilli, M. Grasselli (2017). *MRS Advances*, 2(49), 2675-2681.

- ***Radiation-induced preparation of core/shell gold/albumin nanoparticles.*** C.Y. Flores, E. Achilli, M. Grasselli (2018). *Radiation Physics and Chemistry*, 142, 60-64.

- ***Plasmon properties of multilayer Albumin/gold hybrid Nanoparticles.*** C.Y. Flores, L.J.M. Herrera, E. Achilli, D. Schinca, M. Grasselli (2018). *Materials Research Express.*

PREMIOS RECIBIDOS

- ***Mención honorable en área química de radiaciones y fotoquímica.*** Premio grupal otorgado por la *Polish Radiation Research Society, Memorial to Marie Sklodowska-Curie* por artículos publicados. *17th Congress of the Polish Radiation Research Society* (2016, Polonia).

ABREVIATURAS

AFM – Microscopía de fuerza atómica

Alb – Albúmina

Alb-NPs – Nanopartículas de albúmina

Alb_m/Au-NPs – Nanopartículas oro/albúmina con recubrimiento en monocapa

AAIII – Arsenazo III

Au-NPs – Nanopartículas de oro

BD – Péptido sintético Bombesina-DOTA

BMPS – 3-(maleimido) ácido propiónico N-hydroxisuccinimida éster

BSA – Albúmina sérica bovina

CD – Dicroísmo circular

CEM – Cromatografía de exclusión molecular

CEM G-25 – Cromatografía de exclusión molecular, matriz G-25 (CEM comercial PD-10)

CEM G-200 – Cromatografía de exclusión molecular, matriz Sephadex G-200

DLS – Dispersión dinámica de la luz

DMF – N,N-dimetilformamida

DOTA – Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético

DTNB – Ácido 5,5′-Ditiobis (2-nitrobenzoico), reactivo de Ellman

DTT – Ditiotreitol

EDTA – Ácido etilendiaminotetraacético

EPR – Efecto de la permeabilidad y retención mejoradas

ESI-MS – Espectrometría de masas de ionización por electrospray

FT-IR – Espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier

GRPr – Receptor de análogos de gastrina

HNPs – Nanopartículas híbridas

HSA – Albúmina Sérica Humana

ICP-AES – Espectrómetro de Emisión Atómica por Plasma de Acoplamiento Inductivo

NCI-H460 – Línea celular cáncer de pulmón de células no pequeñas

NHS – N-hidroxisuccinimida

NPs – Nanopartículas

NSCLC – Línea celular de cáncer de pulmón de células no pequeñas

ON – Overnight (durante la noche)

PBMC – Células mononucleares de sangre periférica

PBS – Buffer fosfato salino 10 mM, pH 7,4

PB – Buffer fosfato 30 mM, pH 7

PC-3 – Línea celular de cáncer de próstata

PEG – Polietilenglicol

PM – Peso molecular

Rpm – Velocidad de centrifugación (revoluciones por minuto)

LSPR – Resonancia de plasmón superficial localizada

SCLC – Línea celular de cáncer de pulmón de células pequeñas

SFB – Suero fetal bovino

SMCC – Succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato

SPR – Resonancia de plasmón

TEM – Microscopía de transmisión electrónica

TRXF – Fluorescencia de rayos X de reflexión total

ZP – Potencial Z

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

RESUMEN

En la presente tesis se describe la preparación de nanopartículas de Albúmina e híbridas, compuestas de un núcleo inorgánico de oro y recubiertas por una multicapa de proteína. Dichas nanoestructuras son estabilizadas mediante entrecruzamiento radio-inducido razón por la cual, se estudia en profundidad el proceso que genera la estabilización durante la irradiación. Para ello, se evalúan detalladamente los radicales que se forman durante la radiólisis del solvente.

Las nanoestructuras preparadas son extensamente caracterizadas física y químicamente, para su posterior conjugación con el péptido sintético Bombesina-DOTA. Este simil-péptido, es una herramienta que permite: (i) el direccionamiento hacia células tumorales con sobreexpresión de receptores con afinidad al mismo y; (ii) la posible radiomarcación con isotopos radiactivos de interés en terapia y diagnóstico, a través de la coordinación mediada por el grupo DOTA, que forma parte de la estructura del péptido sintético.

Finalmente, los nanosistemas preparados son evaluados en dos líneas celulares tumorales, PC-3 (cáncer de próstata) y NCI-H460 (cáncer de pulmón de células no pequeñas), ambas con sobreexpresión del receptor afín al péptido. Adicionalmente, se estudia la interacción de las NPs con células mononucleares aisladas de sangre periférica humana, principalmente monocitos y linfocitos. Los ensayos *in vitro*, se realizan de manera de simular las condiciones *in vivo* a la que serán expuestos los nanosistemas en futuras aplicaciones teranósticas.

Como resultado concluyente, los nanosistemas obtenidos con señal de direccionamiento fueron capaces de incorporarse de manera significativa en las células tumorales estudiadas, confirmando su potencial uso como herramienta en terapia y diagnóstico en Nanomedicina.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

Según las últimas estimaciones realizadas por la Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer (IARC) en base a datos disponibles a nivel mundial para el año 2018, Argentina presenta una tasa de incidencia de 212 casos de cáncer cada 100.000 habitantes, cifra que la posiciona dentro de los países del mundo con incidencia de cáncer media-alta (rango 177 a 245,6 por 100.000 habitantes). Esta estimación corresponde a más de 125.000 casos nuevos de cáncer en ambos sexos por año, con porcentajes similares tanto en hombres como en mujeres. Dichos datos, son centralizados por el Instituto Nacional del Cáncer, dependiente de la Secretaría de Gobierno de Salud de la Nación, que es el ente que nuclea la información de incidencia y mortalidad de dicha enfermedad. Según datos oficiales, el cáncer de mama fue el de mayor magnitud en cuanto a ocurrencia en el 2018: con un volumen de más de 21.000 casos al año, que representando el 17 % de todos los tumores malignos y casi un tercio de los cánceres en mujeres. El cáncer colorrectal en ambos sexos registra aproximadamente 15.692 casos nuevos por año, concentrando el 13 % del total de tumores. En los varones, la mayor incidencia está dada por el cáncer de próstata, con una ocurrencia de más de 11.000 casos anuales, que representan el 20 % de todos los tumores malignos en varones y 10 % de la totalidad de cánceres registrados en el país [Instituto Nacional del Cáncer, 2018].

Es por esta razón que muchas investigaciones están dirigidas a estrategias de diseño de fármacos para diagnóstico y tratamiento del cáncer. Se han realizado enormes avances en el tratamiento, la prevención y la detección temprana de estos tumores malignos. Sin embargo, ninguna de las terapias actuales puede cubrir específicamente todas las variantes de esta enfermedad, que difieren en sus características histopatológicas y variaciones genómicas y genéticas [Gupta and Massagué, 2006]. Además, muchos de los medicamentos disponibles no pueden llegar al sitio de metástasis [Van't Veer, *et al.*, 2002]. Por esta razón, existe un enfoque alternativo en el desarrollo de estrategias terapéuticas que busca la generación de nuevas formas de atacar a células malignas de manera específica. Este enfoque está basado en nanomateriales, que permite a los investigadores combinar las propiedades de múltiples materiales (por ejemplo, NPs inorgánicas y/u orgánicas, biomoléculas, fármacos terapéuticos, etc.) mediante la producción de arquitecturas multifuncionales con capacidad de acumularse en el sitio blanco para aumentar así la eficiencia terapéutica y/o detección.

El uso de la nanotecnología en medicina, también llamada nanomedicina, se basa en la generación de nanoestructuras, especialmente de partículas esféricas

denominadas nanopartículas (NPs). Muchas características de estas nanomedicinas dependerán del tamaño y las propiedades de superficie de las NPs. La captación y transporte intracelular de las mismas se ve influido por las características intrínsecas de los nanomateriales, donde se incluye el tamaño, la carga superficial y la estructura de su recubrimiento [Lundqvist, *et al.,* 2008; Zhao, *et al*., 2011; Verma and Stellacci, 2010].

Un conocido caso de éxito en el tratamiento contra el cáncer, son las NPs de Albúmina cargadas con la droga antitumoral Paclitaxel, conocido por su nombre comercial Abraxane™.

1. Nanopartículas de Albúmina

Las NPs de Albúmina (Alb-NPs) constituyen un sistema atractivo de transporte molecular, debido a su biodegradabilidad, a que no son tóxicas y no presentan *a priori* inmunogenicidad. Las Alb-NPs son biodegradables y se pueden preparar fácilmente en tamaños definidos [Otagiri and Chuang, 2016]. Además, pueden incorporar una cantidad significativa de fármaco en la matriz de las NPs debido a los diferentes sitios de unión presentes en las moléculas de Albúmina [Patil, 2003]. Otras ventajas de su uso son la protección que ofrecen al fármaco que transportan contra la degradación inespecífica y, la absorción mejorada, así como la mejora de la distribución farmacocinética y tisular, entre otras [Siri, *et al*., 2017].

La primera formulación exitosa de NPs basada en Albúmina para la industria farmacéutica fue la conjugación de esta proteína con la droga Paclitaxel (PX/Alb-NPs, Abraxane™), aprobada en el 2005 por la FDA. El Paclitaxel es un potente agente antitumoral hidrofóbico con baja solubilidad en soluciones acuosas. Es la droga terapéutica de la formulación Taxol, que la contiene en una mezcla de etanol y Cremophor-EL. Sin embargo, la elevada toxicidad del Taxol, llevó al desarrollo de la formulación Abraxane, donde la droga es unida de forma no covalente a Alb-NPs. En primer lugar, el Abraxane se aprobó para el tratamiento del cáncer de mama metastásico, administrándose por primera vez en pacientes donde los tratamientos de quimioterapia habían fallado. En 2012, fue aprobado para el tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) [Green, *et al*., 2006; Siri, *et al*., 2017]. Estas NPs tienen un tamaño promedio de aproximadamente 130 nm.

En un intento de mejorar la formulación del Abraxane, se desarrollaron dos formulaciones decoradas con los péptidos CREKA y LyP-1 (CGNKRTRGC), respectivamente. LyP-1-Abraxane demostró una acción antitumoral significativamente

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

mejorada, posiblemente gracias a la direccionalidad conferida por el péptido, en comparación con la formulación sin LyP-1 [Karmali, *et al*., 2009].

1.1. Preparación de nanopartículas de Albúmina

Las Alb-NPs pueden prepararse por varias técnicas distintas. Los métodos de emulsificación, tecnología *Nab* y desolvatación son los más comúnmente usados. También existen otras técnicas como la gelificación térmica [Yu, *et al*., 2006], el secado por nano-pulverización [Lee, *et al*., 2011], y técnicas de auto-ensamblaje [Gong, *et al*., 2009].

La preparación de NPs por emulsificación se basa en la emulsión espontánea que se produce al mezclar una fase acuosa con una orgánica. En este proceso, una solución acuosa que contiene Albúmina se convierte en una emulsión homogénea en aceite vegetal a temperatura ambiente utilizando un homogeneizador mecánico de alta velocidad [Patil, 2003; Sundar, *et al*., 2010]. El tamaño obtenido de NPs es alrededor de 500 nm [Rahimnejad, *et al*., 2012]. La desventaja de este método de preparación de NPs reside en la necesidad de un disolvente orgánico, y su posterior eliminación. Además, la proteína suele sufrir daños en su conformación nativa producto del precalentado de la fase orgánica a alrededor de 120 °C.

La tecnología *Nab* (NPs ligadas de Albúmina) fue desarrollada para solubilizar los compuestos químicos lipofílicos en NPs. El compuesto se mezcla con Albúmina sérica humana (HSA) en un disolvente acuoso. Posteriormente, se dispersa con un homogeinizador a alta presión para formar Alb-NPs de diámetro entre 100 y 200 nm [Desai, 2007].

El método más común de preparación de Alb-NPs es la desolvatación seguida de un paso de entrecruzamiento químico. Esta técnica se basa en la característica de las proteínas globulares, como la Alb, que precipitan en presencia de solventes orgánicos polares, como los alcoholes de cadena corta. Las NPs se obtienen mediante la adición del alcohol gota a gota a una solución acuosa de Alb bajo agitación, hasta que la solución se vuelve turbia. Cuando se alcanza un cierto nivel de desolvatación, se forman agregados de proteínas [Langer, *et al*., 2003]. Las NPs se estabilizan luego por entrecruzamiento de los aminos presentes en los residuos de lisina (Lys) y las cadenas laterales de guanidinio de la arginina (Arg) a través de una reacción de condensación con un grupo aldehído, como el agente de entrecruzamiento glutaraldehído [Merodio, *et al*., 2001; Weber, *et al*., 2000]. Muchos parámetros pueden ser modificados para regular el tamaño de partículas obtenidos. Langer *et al*. demostraron que, cuando se utilizan valores de pH más altos, se obtienen NPs más

pequeñas con diámetros promedios que varían entre 150 y 280 nm [Langer, *et al*., 2003]. La desventaja de la preparación de Alb-NPs por esta técnica, es la utilización de alta concentración del agente de entrecruzamiento para estabilizar los agregados de proteína. Esto suma una toxicidad no deseada a las NPs que, si tienen como finalidad su uso en nanomedicina, debería evitarse. Weber *et al.* reportaron la necesidad de un tratamiento con 40 % de glutaraldehído por 24 h para obtener un entrecruzamiento total [Weber, *et al*., 2000].

Es importante destacar que todos estos métodos implican una desnaturalización parcial o total de la Alb como consecuencia de la presencia de aceites, surfactantes, alta concentración de alcoholes y/o por tratamiento térmico [Siri, *et al*., 2017]. Por lo tanto, no se espera que estos métodos conserven la conformación nativa de la proteína.

Soto Espinoza *et al.* desarrollaron una modificación a la técnica de desolvatación, donde el agente químico es reemplazado por el entrecruzamiento entre proteínas inducido por radiación con rayos gamma. Este método involucra dos pasos, primero se produce la agregación dinámica de las proteínas en etanol, seguido de la irradiación de la muestra para estabilizar la estructura. Como resultado, se obtienen Alb-NPs formadas únicamente por Albúmina con un tamaño que varía entre 20 y 40 nm [Soto Espinoza, *et al*., 2012]. La conformación de las proteínas en dichas NPs será estudiada en profundidad en el Capítulo II.

1.2. Albúminas: BSA y HSA

Perteneciente a la familia de las proteínas globulares, existen distintos tipos de Alb, compuestas de alrededor de 600 aminoácidos.

La Albúmina sérica bovina (BSA), tiene un PM de 66.500 Da y un punto isoeléctrico (pI) de 4,7 en agua (a 25 °C). Se usa ampliamente para la administración de medicamentos debido a su importancia médica, abundancia, bajo costo, facilidad de purificación, propiedades inusuales de unión al ligando y su amplia aceptación en la industria farmacéutica [Elzoghby, *et al*., 2012].

Está formada por tres dominios, uno de los cuales contiene una cisteína libre (dominio I, Cys-34). La Fig 1.1, corresponde a la estructura cristalina de la BSA.

La Albúmina sérica humana (HSA), puede sustituir a la BSA en preparaciones con aplicaciones en nanomedicina, para evitar una posible respuesta inmunológica *in vivo*. La HSA es la proteína plasmática más abundante (35 a 50 g/L del suero humano) con una vida media promedio de 19 días. Consta de 585 aminoácidos, con un PM de 66.500 Da [Otagiri and Chuang, 2016]. Es la proteína mayoritaria del plasma

sanguíneo y desempeña un papel importante en la regulación de la presión osmótica, la capacidad antioxidante del plasma humano y el transporte de numerosos compuestos endógenos como ácidos grasos, hormonas, metabolitos tóxicos (por ejemplo, bilirrubina), ácidos biliares, aminoácidos y metales [Peters 1995; Kragh-Hansen, *et al*., 2002].

La HSA tiene ciertas características diferenciales. Es resistente al pH (estable en el rango de pH de 4 a 9), temperatura (se puede calentar a 60 °C hasta 10 h) y disolventes orgánicos. Cuando la HSA se descompone, los aminoácidos proporcionarán nutrición a los tejidos periféricos. Estas propiedades, así como su captación preferencial en tumores y tejidos inflamados, su disponibilidad inmediata, su biodegradabilidad y su falta de toxicidad la convierten en una proteína ideal para realizar suministro de fármacos [Kratz, 2008; Fasano, *et al*., 2005]. Adicionalmente, esta reportada la retención de Albúmina en varios tumores sólidos a través de estudios realizados a partir de ensayos con esta proteína radiomarcada [Peterson and Appelgren, 1973; Sinn, *et al*., 1990; Andersson, *et al*., 1991; Schilling, *et al*., 1992; Stehle, *et al*., 1997; Wunder, *et al*., 1997].

Además, varios estudios han propuesto que los tumores son un sitio de catabolismo de Albúmina [Andersson, *et al*., 1991; Schilling, *et al*., 1992; Stehle, *et al*., 1997]. Por lo tanto, se cree que éstos la utilizan como fuente de energía, al descomponerla en sus aminoácidos constituyentes dentro de los lisosomas. Posteriormente, las células cancerígenas utilizan estos aminoácidos para su crecimiento acelerado [Stehle, *et al*., 1997].

La proteína tiene tres dominios y contiene 35 residuos de cisteína, 34 de ellos están formando 17 puentes disulfuro, mientras que el restante mantiene el tiol libre (dominio, Cys-34). Puede unirse a fármacos hidrófobos de manera reversible para transportarlos por sangre, liberándolos en la superficie celular [Paal, *et al*., 2001]. Además, se transporta activamente a las células tumores mediante una sobreexpresión selectiva del receptor denominado gp60 (con un PM de 60.000 Da) en sus membranas [Vogel, *et al*., 2001].

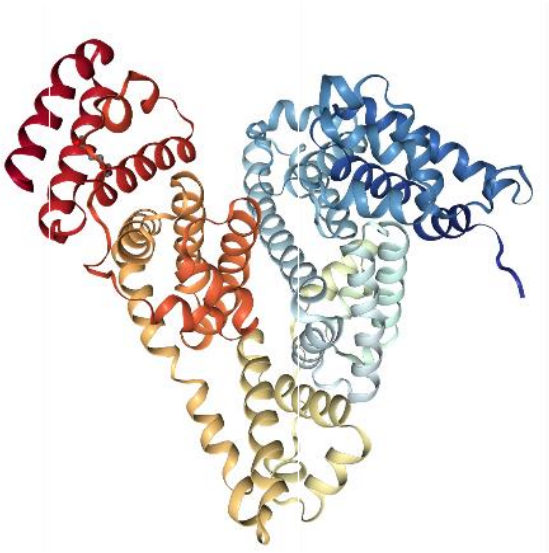

Fig. 1.1 – Estructura cristalina de BSA, obtenida de Protein Data Bank (http://www.rcsb.org/3d-view/4F5S/1).

2. *Radiaciones ionizantes en síntesis o estabilización de NPs*

La radiación ionizante se utiliza desde hace mucho tiempo en la modificación de polímeros. Tiene dos aplicaciones principales, generar entrecruzamiento entre los materiales irradiados o degradación. Otro uso importante es la descontaminación/esterilización de productos a usar en el cuerpo humano, como por ejemplo, cremas corporales, solución fisiológica inyectable, etc.

Hace más de 25 años que la tecnología de radiación se comenzó a utilizar para generar micropartículas de polímeros, a partir de la polimerización por precipitación, con una distribución de tamaño estrecha [Naka, *et al*., 1991; Grasselli, *et al*., 2001]. Sin embargo, aún no se ha podido desarrollar partículas de tamaño sub-micrométrico con esta técnica.

Ulanski *et al*. demostraron que en condiciones apropiadas, soluciones de polímeros orgánicos puede entrecruzarse intramolecularmente mediante radiación ionizante, dando lugar a nanogeles [Ulanski, *et al*., 1998; Kadlubowski, *et al*., 2003]. Los biopolímeros, como las proteínas y los polipéptidos, se han utilizado recientemente como materias primas para la preparación de nanogeles utilizando técnicas de ionización [Akiyama, *et al*., 2007].

En los últimos años, creció el número de reportes del uso de esta tecnología de radiación ionizante en la preparación y esterilización de nanomateriales. Algunos ejemplos son la preparación de NPs de plata/polivinilpirrolidona (Ag/PVP) [Gasaymeh, *et al*., 2010], magnéticas de Au/γ-Fe_2O_3 [Seino, *et al*., 2003], NPs de plata [Naghavi, *et al*., 2010], NPs de oro en solución acuosa de polivinil pirrolidona [Misra, *et al*., 2012], y

NPs de papaína [Varca, *et al*., 2014], entre otras. En los Capítulos II y IV, se detallará la utilización de esta tecnología para la obtención de NPs de Albúmina y oro/Albúmina, respectivamente.

3. Nanopartículas de oro

Las NPs de oro (Au-NPs) tienen propiedades físicas características que las hacen atractivas para aplicaciones médicas. Son inertes y se consideran biocompatibles y no tóxicas [Nie and Chen, 2012]. Además, la absorbancia y la fluorescencia de las Au-NPs es mayor en comparación con el oro sólido, y puede cambiar sus propiedades absortivas desde la región visible al infrarrojo cercano (NIR) solo por el cambio en el tamaño y la morfología de la nanoestructura. El tejido biológico absorbe luz débilmente en la región NIR, lo que la hace ideal para aplicaciones basadas en óptica [Mieszawska, *et al*., 2013]. La dispersión óptica de Au-NPs puede ser aprovechada para detectarlas con una variedad de métodos de microscopía. Estas nanoestructuras absorben fuertemente los rayos X y, por lo tanto, pueden usarse como agentes de contraste para las técnicas de imágenes basadas en rayos X y como adyuvantes para la radioterapia (RT).

Las Au-NPs pueden transformar la luz absorbida en calor, lo que da como resultado un aumento localizado de la temperatura, que puede usarse para proporcionar contraste para las imágenes fotoacústicas o para la terapia fototérmica (PTT). Además, la superficie de las NPs de oro se puede modificar fácilmente para una aplicación específica, introduciendo ligandos de direccionamiento, fármacos o recubrimientos biocompatibles. En la actualidad, se busca la preparación de NPs de oro multifuncionales para múltiples aplicaciones.

3.1. Técnicas de síntesis de NPs de oro

Numerosos métodos preparativos de Au-NPs han sido desarrollados; algunos basados en el enfoque de "arriba hacia abajo" (manipulación física) y, otros "de abajo hacia arriba" (transformación química) [Daniel and Astruc, 2004]. El énfasis está puesto en la preparación de Au-NPs teniendo control sobre su tamaño, forma, solubilidad, estabilidad y funcionalidad.

Los métodos más comunes de síntesis son el de Turkevick-Frens y el de Brust-Schiffrin. Sobre todo de este último, hay muchas modificaciones desarrolladas con diferentes ligandos para la estabilización de la NP final.

En 1951, Turkevich *et al.* sintetizaron Au-NPs en base a la reducción de una sal de cloruro áurico ($HAuCl_4$) en agua, por medio del agregado de citrato de sodio. Por esta técnica, se obtienen NPs de 20 nm de diámetro, donde el citrato de sodio actúa como agente reductor y estabilizante [Turkevich, *et al*., 1951]. En 1973, Frens reportó la obtención de Au-NPs mediante la técnica de Turkevich, donde variando las relaciones de agente reductor y sal de Au(III), se pueden generar NPs de tamaño controlado, entre 16 y 147 nm [Frens, 1973]. En este método, la solución de cloruro áurico se calienta a ebullición para luego agregarle, de manera rápida el agente reductor. Una ventaja importante de esta síntesis es que se produce en medio acuoso sin el agregado de agentes tóxicos, además de que es reproducible. Esto adquiere relevancia si dichas NPs van a ser utilizadas en nanomedicina.

La otra técnica muy utilizada para la preparación de Au-NPs es la descripta por Brust-Schiffrin. Ésta permite la síntesis de NPs térmicamente estables, con una dispersión reducida y tamaño controlado (entre 1,5 y 5,2 nm). De hecho, estas Au-NPs pueden aislarse repetidamente y volver a redispersarse en solventes orgánicos comunes sin agregación o descomposición irreversible, y pueden manipularse y funcionalizarse fácilmente con compuestos orgánicos estables [Brust, *et al*., 1994; Brust, *et al*., 1995]. Esta técnica de síntesis se basa en un sistema de dos fases y utiliza tioles como ligandos que se unen fuertemente al oro para la estabilización de las Au-NPs. El $AuCl_4^-$ se transfiere de la fase acuosa a tolueno utilizando bromuro de tetraoctilamonio (TOAB) como reactivo de transferencia de fase y se reduce con borohidruro de sodio ($NaBH_4$), en presencia de dodecanotiol. La fase orgánica cambia de color naranja a marrón oscuro en unos pocos segundos después de la adición de borohidruro.

Brust *et al*. extendieron esta síntesis de Au-NPs estabilizadas con *p*-mercaptofenol en un sistema de una sola fase, lo que dio lugar a numerosos reportes de preparaciones de Au-NPs estabilizadas por una amplia variedad de ligandos con grupos tioles funcionales [Brust, *et al*., 1995], basadas en la afinidad tiol/Au.

Otra técnica de síntesis involucra la sustitución de los ligandos tiolados usados para la estabilización por intercambio con otras moléculas que también contengan en sus estructuras tioles libres. Este método, descripto por Murray *et al*., permite la funcionalidad química en forma de monocapa de las Au-NPs de manera divergente [Hostetler, *et al*., 1996; Templeton, *et al*., 1998; Hostetler, *et al*., 1999]. Sin embargo, Ionita *et al*. reportaron que la movilidad del ligando en la superficie de las Au-NPs está restringida a varios factores, entre los que se incluyen el empaque de la monocapa orgánica y la temperatura [Ionita, *et al*., 2007; Ionita, *et al*., 2008].

3.2. Propiedades ópticas de las Au-NPs - Resonancia de plasmón superficial

Cuando las Au-NPs son expuestas a la radiación de la luz, el campo eléctrico de la luz causa la oscilación colectiva de los electrones de la superficie de la partícula. La oscilación coherente de los electrones metálicos libres en resonancia con el campo electromagnético se denomina Resonancia de Plasmón de Superficie (SPR) [Huang, *et al*., 2007].

Para NPs esféricas, esta resonancia ocurre en la región espectral visible, a aproximadamente 520 nm, razón por la cual el color de estas dispersiones es rojo en solución. En cambio, para los nanobastones (NRs), los electrones libres oscilan en ambos ejes longitudinal y transversal, produciendo una fuerte banda de resonancia en la región del infrarrojo cercano (NIR) y una banda débil en la región visible (similar a la de las NPs esféricas). Estas últimas nanoestructuras, son útiles para terapia fototérmica por su fuerte banda de resonancia en el NIR. Sin embargo, suelen estar estabilizadas por bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB). Este recubrimiento le confiere toxicidad a los NRs, lo que implica una desventaja para su uso en nanomedicina.

La excitación de la SPR resulta en una mejora de las propiedades fotofísicas de las Au-NPs. Este fenómeno depende del índice de refracción de la región interfacial. Las NPs metálicas, como las Au-NPs, exhiben resonancia de plasmón superficial localizada (LSPR) en longitudes de onda incidentes específicas. La SPR está influenciada no solo por el tamaño de partícula sino también por el solvente, el ligando, la distancia entre partículas y la temperatura. Además, la frecuencia de SPR es sensible a la proximidad de otras NPs. Por esta razón, la agregación de NPs da como resultado un desplazamiento significativo al rojo (desde aproximadamente 520 a 650 nm) y un ensanchamiento en la señal SPB, cambiando el color de la dispersión de rojo a azul debido al acoplamiento de plasmón entre partículas en concentraciones nanomolares [Su, *et al*., 2003; Srivastava, *et al*., 2005]. Este fenómeno ha convertido a las Au-NPs en candidatas atractivas para el desarrollo de sensores colorimétricos, químicos y biológicos [Saha, *et al*., 2012].

Las Au-NPs pueden dispersar la luz en la misma frecuencia que la incidente (dispersión de Rayleigh o Mie). Esta dispersión de la luz se ve mejorada gracias a la LSPR de las Au-NPs [Huang, *et al*., 2007]. Por esta razón, estas nanoestructuras adquieren propiedades ópticas que las hacen especiales. Por ejemplo, Au-NPs de 30-100 nm dispersan la luz intensamente y gracias a esto, pueden ser fácilmente detectadas por Microscopía de campo oscuro, bajo condiciones de iluminación especiales [Orendorff, *et al*., 2006]. Igualmente, la dispersión de Au-NPs de 60 nm es 10^5 más fuerte que la emisión de una molécula fluorescente [Huang, *et al*., 2007].

Una técnica en pleno desarrollo que promete ser revolucionaria es la Tomografía Computarizada de Fluorescencia de Rayos X (XFCT). Esta técnica permite identificar, cuantificar y ubicar elementos dentro de objetos a partir de la fluorescencia de rayos X característicos, estimulada por una fuente de excitación de rayos X, típicamente derivada de un sincrotrón. Debido a la limitación del uso de un sincrotrón en la práctica de rutina de imágenes biomédicas, Manohar *et al.* desarrollaron una variación de esta técnica donde la fuente de excitación es reemplazada por una fuente de rayos X policromáticos, haciéndola más accesible para imágenes biomédicas de rutina. De esta manera, XFCT puede ser una herramienta poderosa para el seguimiento de imágenes moleculares de sondas de alto número atómico (alto Z) como las Au-NPs (Z_{Au} = 79). Para el propósito de las imágenes de rayos X, en particular, las Au-NPs ofrecen notables ventajas sobre los agentes de contraste convencionales (por ejemplo, yodo), como una mayor probabilidad de interacción fotoeléctrica y propiedades bioquímicas más favorables. Además las Au-NPs también son biológicamente no reactivas y químicamente inertes. El grupo de investigación de Manohar, logró reportar la obtención de imágenes precisas de la distribución de Au-NPs inyectadas en un tumor de ratón [Manohar, *et al*., 2016].

3.3. Nanopartículas de oro en aplicaciones de liberación controlada

Las Au-NPs proporcionan plataformas no tóxicas para aplicaciones de administración de fármacos y genes. Con estos sistemas, el núcleo de oro imparte estabilidad al conjunto, mientras que la monocapa de recubrimiento permite el ajuste de las propiedades de la superficie, como la carga y la hidrofobicidad. Una característica atractiva adicional de las Au-NPs es su interacción con los tioles, proporcionando un medio efectivo y selectivo de liberación intracelular controlada [Ghosh, *et al*., 2008].

Estos nanomateriales podrían transportar desde pequeñas moléculas de fármacos hasta grandes biomoléculas, como proteínas, ADN o ARN. Sin embargo, la liberación eficaz de estos agentes terapéuticos es un requisito que previamente necesita ser diseñada para una terapia eficaz. La liberación podría ser provocada por estímulos internos (por ejemplo, glutatión (GSH) [Hong, *et al*., 2006], o pH [Polizzi, *et al*., 2007]) o externos (por ejemplo, luz [Han, *et al*., 2006]). Significativamente, los estímulos internos operan de manera biológica, mientras que los estímulos externos proporcionan un control espacio-temporal sobre la liberación.

Como se mencionó anteriormente, las ventajas en la administración de las Au-NPs radican en que el núcleo de oro es esencialmente inerte y no tóxico [Connor, *et*

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

al., 2005], mientras que además son de fácil obtención. Más versatilidad es impartida por su funcionalización, relativamente simple, generalmente a través de enlaces mediados por la afinidad tiol/Au. La capacidad de carga de las NPs es otra ventaja del uso de las mismas. Por ejemplo, una Au-NPs con 2 nm de diámetro puede ser conjugada con aproximadamente 100 ligandos en un recubrimiento en forma de monocapa sobre su superficie [Hostetler, *et al*., 1998].

3.4. Terapia Fototérmica

Otra de las aplicaciones de las Au-NPs es la denominada Terapia Fototérmica (PTT). Cuando las NPs son irradiadas con luz en el rango de los 800-1200 nm, ocurre un calentamiento selectivo local que podría ser utilizado para la destrucción de tumores [Ghosh, *et al*., 2008].

Desde el punto de vista del tratamiento del cáncer, las NPs de metales nobles se vuelven muy útiles como agentes para PTT debido a sus secciones transversales de absorción mejoradas, que son de cuatro a cinco órdenes de magnitud más grandes que las ofrecidas por los colorantes foto-absorbentes convencionales (como Indocianina verde y naftalocianina, usadas en diagnóstico médico). Esta fuerte absorción garantiza una terapia con láser eficaz a energías relativamente bajas, lo que hace que el método de terapia sea mínimamente invasivo. Además, las nanoestructuras metálicas tienen una mayor foto-estabilidad y no sufren foto-decoloración.

Las Au-NPs son consideradas herramientas prometedoras para PTT debido a la absorción fuertemente mejorada en las regiones visible y NIR producto de sus oscilaciones de resonancia de plasmón de superficie (SPR). Huang *et al*. utilizan Au-NPs estabilizadas con citrato de sodio, de alrededor de 30 nm, recubiertas con anti-EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico) para atacar células cancerosas mediante PTT. Reportaron un aumento de 20 veces en la efectividad de la terapia por la presencia de las Au-NPs [Huang, *et al*., 2007].

3.5. Radioterapia con nanopartículas de oro como radiosensibilizadores

La radioterapia (RT) se usa comúnmente como tratamiento primario o adyuvante en más del 50 % de los pacientes con cáncer. En varios tipos de cáncer, como el de mama y el cáncer del sistema nervioso central, la tasa de utilización de la RT es del 80 al 90 %. A pesar de su papel crítico en la terapia del cáncer, existen desafíos asociados con la RT. En primer lugar, la toxicidad para los tejidos normales circundantes a menudo limita la dosis máxima de irradiación (IR) que se puede

administrar a los tumores. Además, los tumores incluyen un alto grado de heterogeneidad en el genotipo, fenotipo y microambiente, lo que lleva a una variabilidad en la sensibilidad a la radiación y en la respuesta de las diferentes poblaciones de células tumorales.

El efecto del IR en los sistemas biológicos se puede dividir en fases físicas, químicas y biológicas. La fase física es el período en el que las partículas con alta energía (fotones, electrones, protones o iones pesados) viajan a través del blanco biológico, causando la ionización y/o excitación de las moléculas, seguido de la ruptura de los enlaces químicos y la generación de radicales libres. La fase química posterior involucra dos tipos de reacciones competitivas, reacciones de eliminación y de fijación, en donde los radicales libres altamente reactivos reaccionan rápidamente con moléculas para restablecer el "equilibrio de carga electrónica". En particular, las reacciones de captación se refieren a la inactivación de los radicales libres por agentes reductores como las moléculas que contienen grupos tioles.

Las reacciones de fijación dan como resultado un daño irreparable permanente a los componentes biológicos por moléculas con alta afinidad de electrones, como el oxígeno. La fase biológica comprende las respuestas de los blancos biológicos al IR a nivel molecular, celular y tisular. En radiobiología, estas respuestas se describen como las 5R: reparación, reoxigenación, redistribución, repoblación y radiosensibilidad intrínseca. Se considera que las 5R son los factores clave que determinan el resultado después de la IR. Los radiosensibilizadores mejoran los efectos de la RT a través de los múltiples mecanismos que intervienen en estas tres fases. En los últimos años, las Au-NPs han atraído un gran interés en el campo biomédico, registrándose un rápido crecimiento en el número de publicaciones en esta área debido a sus propiedades físicas y químicas descriptas previamente. Las Au-NPs han sido reconocidas como un potente agente de radiosensibilización en ensayos preclínicos, debido al alto número atómico del Au (Z = 79). Los radiosensibilizadores, son moléculas con una elevada absorción fotoeléctrica de energía IR en comparación con los tejidos blandos.

Dos de los principales factores que obstaculizan la aplicación clínica de las Au-NPs como radiosensibilizadores son la falta de direccionamiento a tumores y la toxicidad potencial después de la administración sistémica. Por esta razón Cui *et al*. propusieron que en un primer ensayo clínico, se considere utilizar la inyección intratumoral de las Au-NPs como modo de administración. Para minimizar el efecto de la dilución local de las NPs a lo largo del tratamiento, debido al crecimiento del tumor y la fuga de las mismas, recomiendan combinar las Au-NPs con un régimen de dosificación de radiación que tenga una duración de tratamiento corta [Cui, *et al*., 2017]. Los ensayos clínicos con estas nanoestructuras como radiosensibilizadores,

deberían diseñarse teniendo en cuenta las propiedades fisicoquímicas de las Au-NPs, el tipo de tumor y la RT adecuada para el tratamiento del mismo, además de la ruta de administración más conveniente.

4. Nanosistemas multifuncionales

La multifuncionalidad de las NPs se logra mediante la combinación de diferentes propiedades para la obtención de imágenes, direccionamiento o suministro de un agente terapéutico en una única plataforma. Por esta razón, el diseño de estos nanosistemas es fundamental si su campo de aplicación es la nanomedicina. Wilhelm *et al.,* realizaron un estudio sobre las publicaciones científicas de los últimos 10 años en el área de nanomedicina. Ellos afirman que sólo el 0,7 % de las NPs administradas logran llegar a un tumor sólido. Esto evidencia que existe una incapacidad para controlar el transporte de NPs dentro del cuerpo lo que representa la mayor limitación en el uso de nanotecnología para diagnosticar y tratar enfermedades [Wilhelm, *et al*., 2016].

Existen tres clases de Au-NPs con aplicaciones teranósticas. La primera clase involucra las Au-NPs desnudas, solo estabilizadas con agentes como citrato de sodio, durante la síntesis.

La segunda clase, surgió como consecuencia de que las Au-NPs se aglomeran fácilmente en presencia de diferentes solutos [Chegel, *et al*., 2012]. Por lo tanto, el recubrimiento de la superficie de estas NPs con moléculas orgánicas y/o proteínas es un requisito ineludible para desarrollar aplicaciones, tanto *in vitro* como *in vivo,* con muestras biológicas reales [Giljohann, *et al*., 2010]. Esta clase, comprende a las Au-NPs con recubrimientos de ligandos, en forma de monocapa sobre su superficie. Estos ligandos pueden ser proteínas, péptidos, y demás biomoléculas (DNA, RNA, entre otras) de interés teranóstico. En general, los mismos se unen a las NPs mediante grupos tioles.

Si bien el recubrimiento con proteínas es una solución para mejorar la estabilidad de las Au-NPs, es importante destacar que la mayoría de las proteínas pierden parcialmente su conformación nativa cuando interactúan con la superficie altamente estructurada de estas NPs [Tsai, *et al*., 2011]. Además, esta unión está muy lejos de ser estable. Esta interacción se disocia fácilmente (constante en el rango milimolar), por lo que se produce un intercambio de proteínas cuando estos materiales interactúan con una muestra compleja [Brewer, *et al.,* 2005; Lee, *et al.*, 2015]. Esto ocasiona un problema cuando las proteínas de recubrimiento son decoradas con

péptidos o señales químicas para direccionamiento ya que lo más probable es que se pierda dicha señal.

La tercera clase, involucra la preparación de NPs como un nanosistema, compuestas por más de una característica que las hace promisorias para nanomedicina. Por ejemplo, NPs que contienen señales de direccionamiento más el agregado de un radioisótopo de interés en diagnóstico. En este caso, las NPs están compuesta múltiples ligandos funcionales. Hoy en día, la nanotecnología está enfocada hacia el desarrollo de estos nanosistemas, formados por distintos materiales que permitan potenciar las características de las nanoestructuras, convirtiéndolas en multifuncionales.

5. *Sistemas Bombesina/Receptores de péptidos liberadores de gastrina*

Como se mencionó, actualmente se hace énfasis en las ventajas de diseñar nanosistemas con direccionamiento hacia células tumorales. Está reportado que el neuropéptido Bombesina (BN), es reconocido por los receptores liberadores de gastrina (GRPr) sobreexpresados en varios tipos de células tumorales, como las de cáncer de mama, próstata, pulmón y páncreas. Este hecho, convierte a la BN en una señal de direccionamiento y en un ligando que atrae atención para el diseño de nanosistemas.

La BN es un neuropéptido compuesto de 14 aminoácidos, que tiene alta afinidad por GRPr (K_d del orden nM) [Okarvi and Jammaz, 2012; Van de Wiele, *et al*., 2000]. Los péptidos similares a la BN, incluidos el péptido liberador de gastrina (GRP) y la neuromedina B (NMB), participan en la regulación de un gran número de procesos biológicos en el intestino y sistema nervioso central (SNC). Estos péptidos regulan su acción mediante la unión a los receptores específicos acoplados a la proteína G [Kroog, *et al.,* 1995].

Se conocen cuatro subtipos del receptor de BN. Tres de ellos, el receptor NMB (BB_1), el receptor GRP (BB_2) y el subtipo 3 del receptor BN (BRS-3 o BB_3), son receptores de mamíferos, mientras que el cuarto subtipo (BB) se encuentra solo en anfibios [Visser, *et al*., 2007]. Sin embargo, el único de estos receptores bien caracterizado es el GRPr; mientras que los otros subtipos no están caracterizados en cuanto a la distribución ni función en tejidos humanos. Estos receptores consisten en una única cadena polipeptídica, con siete dominios transmembrana, un dominio extracelular con la unión al ligando y un dominio intracelular unido a proteínas G. Representan objetivos moleculares útiles para la detección y el tratamiento del cáncer debido a que se encuentran en la membrana plasmática y, al unirse al ligando, el

complejo receptor-ligando se internaliza, lo que permite una larga retención en las células tumorales.

Existen numerosos reportes de terapias o sondas para diagnóstico en base a análogos de BN sintéticos radiomarcados. Sin embargo, un inconveniente importante del uso de pequeños péptidos radiomarcados para el tratamiento del cáncer es que su rápida eliminación del flujo sanguíneo puede reducir potencialmente la dosis efectiva administrada al tumor [Smith, *et al*., 2005]. Rogers *et al.* desarrollaron un derivado de BN con el objetivo de superar algunos de los problemas inherentes con los radiofármacos basados en péptidos/anticuerpos mediante la conjugación del péptido con polietilenglicol (PEG). Los péptidos PEGilados tienen cierto potencial para mejorar la farmacocinética de los radioconjugados y mejorar la captación de tumores [Rogers, *et al*., 2004]. Otra alternativa a esta propuesta es la incorporación de estos péptidos de interés biomédico a nanomateriales.

Una mejora a los sistemas basados en péptidos de direccionamiento es su marcación con radionucleídos. Esto requiere que el isotopo radiactivo esté unido de manera estable al péptido utilizando un agente quelante bifuncional (BFCA). Una propiedad importante de los BFCA es que quelan radiometales con alta estabilidad *in vivo*, lo que resulta en un depósito mínimo de radiometal libre en tejidos normales. Los BFCA más usados para coordinar radionucleídos son DADT (diaminaditiol), TETA (ácido 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano-1,4,8,11-tetraacético), DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético), DTPA (Ácido dietilentriaminopentaacético), entre otros [Okarvi and Jammaz, 2012]. Los radionucleídos clínicamente relevantes en la marcación de péptidos bioactivos para imágenes de diagnóstico son ^{99m}Tc, ^{111}In, $^{68/66}$Ga, ^{18}F, ^{123}I, ^{64}Cu; mientras que para terapia son ^{111}In, $^{64/67}$Cu, ^{90}Y, ^{177}Lu, ^{213}Bi.

La posibilidad de utilización de péptidos radiomarcados en la preparación de un nanosistema tiene la ventaja de que la acción biológica de estos péptidos esta mediada por su unión a receptores de alta afinidad. La sobreexpresión de estos receptores en diversas células tumorales en comparación con su baja densidad en tejidos normales proporciona las bases moleculares para el uso clínico de péptidos radiomarcados tanto como agentes de diagnóstico por imagen o para terapia [Mankoff, *et al*., 2008]. Por esta razón, adquiere fundamental importancia que la unión de los péptido radiomarcado a los nanosistemas sea lo más estable posible, mediada por uniones covalentes preferentemente, ya que los péptidos constituyen la señal de direccionamiento a sitios con alta densidad de sus receptores afines, para la internalización de los nanosistemas.

6. *Interacción entre células y nanopartículas*

Un desafío importante en la ciencia de los materiales para nanomedicina es desarrollar enfoques que aseguren que, cuando se administran *in vivo*, puedan dirigirse al sitio de acción designado. Sin embargo, al entrar en contacto con los fluidos corporales, los nanomateriales son recubiertos inmediatamente por proteínas séricas, que afectan su captación celular, transporte y destino, incluida la respuesta celular. Este fenómeno llamado "efecto corona" puede tener importantes consecuencias en la eficiencia terapéutica de las NPs [Damalakiene, *et al.*, 2013]. Es por esta razón que en la actualidad, se busca obtener NPs multifuncionales, donde se hace hincapié en el estudio de su interacción con las células blanco y con las proteínas séricas. Se ha informado que la reducción de la adsorción de proteínas séricas *in vivo* ayuda a evitar el sistema reticuloendotelial y por lo tanto, la eliminación de las nanoestructuras [Jiang, *et al.*, 2010]. Todavía queda mucho por aprender sobre la captación celular y el transporte intracelular de NPs para interpretar los datos de estudios *in vitro* de forma inequívoca, para mejorar su uso *in vivo* y para facilitar el diseño racional de nanomateriales funcionalizados a utilizar en nanomedicina.

Antes de que las NPs alcancen las membranas citoplasmáticas de las células blanco, deben interactuar con el microambiente que contiene a las mismas. Este microentorno, compuesto por la matriz extracelular y diversos factores microambientales y de pH definidos, también puede cambiar las propiedades de las NPs y afectar sus interacciones con la membrana celular y, finalmente, su destino intracelular. En el caso de las NPs diseñadas para atacar a las células tumorales, el microentorno del tumor (TME) podría tener una gran influencia en su destino celular. La naturaleza replicativa altamente agresiva de las células tumorales produce un drenaje linfático deficiente y una matriz celular densa, que provocan elevadas presiones del líquido intersticial, lo que puede dificultar la captación celular de los nanosistemas [Behzadi, *et al*., 2017]. Por lo tanto, en el diseño de NPs debe considerarse el microentorno de las células blanco, ya que influye en gran medida a dónde van y con qué tipo de células van a interactuar.

Cuando las NPs llegan a la membrana citoplasmática de una célula, pueden interactuar con los componentes de ésta o de la matriz extracelular. Las interacciones de las NPs con las células involucran procesos biológicos activos dependientes de energía, impulsados por el reconocimiento biológico de las características específicas de las NPs [Polo, *et al*., 2017]. La endocitosis, principal vía de captación, ocurre mediante la captación mediada por la formación de vesículas endocíticas, a partir de invaginaciones de membrana, seguidas de su brotación. Luego, estas vesículas son

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

transportadas a compartimientos especializados de clasificación/seguimiento intracelular. Dependiendo del tipo de célula, la endocitosis se puede clasificar en: fagocitosis, endocitosis mediada por clatrina, endocitosis mediada por caveolina, endocitosis independiente de clatrina/caveolina y macropinocitosis. Algunos autores se refieren a los últimos cuatro tipos de endocitosis, como pinocitosis. En comparación con la fagocitosis, que se produce principalmente en los fagocitos, los mecanismos pinocíticos son más comunes y ocurren en muchos tipos de células. A continuación se describirán los mecanismos más comunes.

6.1. Fagocitosis

La fagocitosis se produce principalmente en los fagocitos (por ejemplo, macrófagos, monocitos, neutrófilos y células dendríticas), que son responsables del sistema de defensa. La fagocitosis de las NPs suele iniciarse por opsonización: las opsoninas, como las inmunoglobulinas (es decir, los anticuerpos), las proteínas del complemento u otras proteínas de la sangre (por ejemplo, la laminina y la fibronectina) se adsorben en la superficie de las NPs. Las NPs opsonizadas son reconocidas y unidas a los fagocitos mediante interacciones específicas de ligando-receptor. Esto inicializa una cascada de señalización que puede desencadenar en la formación de un "fagosoma" similar a un endosoma para su eliminación.

La captación por la ruta fagocítica se rige por las características fisicoquímicas de las NPs, que incluyen tamaño, forma y demás propiedades superficiales. En general, las partículas más grandes experimentan una captación más eficiente por los fagocitos. Por ejemplo, cuando se usan NPs de Albúmina radiomarcada en el rango de tamaño de 200-1500 nm, las partículas más grandes se someten claramente a una mayor captación fagocítica cuando son incubadas con células mononucleares humanas [Schäfer, *et al*., 1992].

Otro parámetro crítico que controla la captación de NPs por los fagocitos son sus propiedades superficiales. Se encontró que la funcionalización de las NPs con polímeros como el PEG, puede alterar la captación celular. Las NPs PEGiladas pueden repeler la opsonización al prevenir o minimizar la adsorción de proteínas a su superficie. Esto puede explicarse por la conformación que las moléculas de PEG adoptan en la solución: su forma extendida tiende a crear una barrera repulsiva entre las NPs [Owens and Peppas, 2006]. Tal fuerza puede equilibrar o superar la fuerza atractiva para la opsonización prevista. La PEGilación puede aumentar la vida media de circulación de las NPs de unos pocos minutos a varias horas al evitar la captación por parte del sistema reticuloendotelial (RES) [Couvreur and Vauthier, 2006].

6.2. Endocitosis mediada por clatrina (CME)

La CME tiene lugar en un área de la membrana plasmática que es rica en clatrina; dichos dominios cubren alrededor del 0,5 a 2 % de la superficie celular. Durante la CME, se forman vesículas con un diámetro de 100 a 150 nm, que envuelven un volumen de líquido extracelular proporcional al volumen interno disponible de la vesícula formada.

Es el mecanismo más estudiado de la internalización mediada por receptor y probablemente también el más ampliamente utilizado por la mayoría de las células para internalizar materiales macromoleculares y nanométricos. Posiblemente los receptores más conocidos que adoptan este mecanismo son la transferrina, el receptor de la lipoproteína de baja densidad (LDL), el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, receptor tirosina quinasa) y los receptores acoplados a proteína G.

En el caso más frecuente, las estructuras de clatrina se multimerizan para producir invaginaciones altamente curvadas. Una vez invaginada la membrana, la clatrina finalmente se recicla a la membrana celular, sin recubrir las vesículas que evolucionan en endosomas tempranos. Estos últimos luego experimentan acidificación y se fusionan con otras estructuras vesiculares originadas principalmente en el aparato de Golgi, dando lugar a endosomas tardíos donde la mayoría de los complejos ligando-receptor se disocian, interrumpiendo las cascadas de señalización que comenzaron en la superficie celular. Los ligandos o los complejos ligandos-receptores residuales se clasifican luego en diferentes compartimentos celulares o permanecen en el endosoma durante su fusión con los lisosomas, donde las condiciones ambientales locales (enzimas proteolíticas, pH bajo) finalmente conducen a la degradación de las estructuras internalizadas.

6.3. Endocitosis mediada por caveolina

La endocitosis dependiente de caveolina desempeña un papel crítico en muchos procesos biológicos, como la señalización celular, la transcitosis y la regulación de lípidos, ácidos grasos y proteínas de membrana [Behzadi, *et al*., 2017].

Las caveolas son pequeñas invaginaciones (60-80 nm) en la membrana plasmática que son particularmente abundantes en fibroblastos, células endoteliales, células del músculo liso y adipocitos. Las principales proteínas de membrana que se encuentran en las caveolas se denominan caveolinas. Están presentes en células epiteliales y no epiteliales. En el caso de las células no epiteliales, como los adipocitos y las células del músculo liso, las caveolas constituyen una proporción sustancial de la membrana celular, lo que aumenta el área de la superficie hasta en un 75 %.

La formación de caveolas tiene lugar en el citoplasma, involucrando tanto el retículo endoplásmico (donde se sintetizan las caveolinas), como el Golgi (donde se ensamblan las caveolas tempranas). Las caveolas terminan localizándose en la membrana celular solo en la maduración completa. Las caveolas arqueadas luego se fusionan con los endosomas tempranos y/o con caveosomas, donde no sufren acidificación. Típicamente, en lugar de ser canalizados a los lisosomas, los primeros endosomas y caveosomas formados se dirigen al complejo de Golgi o descargan a través de la transcitosis. La internalización a través de la endocitosis mediada por caveolina abre camino a la posibilidad de evitar el compartimiento lisosómico agresivo y también, si se trata de caveosomas, cualquier forma de acidificación [Zaki and Tirelli, 2010].

Esta reportado que la forma de Paclitaxel unida a Albúmina y la fórmula comercial Abraxane, es captada por las células cancerosas mediante endocitosis mediada por caveolas. La Albúmina es de gran valor agregado para la preparación, ya que se une a gp60, el receptor de Alb presente en las caveolas de las células endoteliales, facilitando su transporte a los espacios intersticiales del tumor, donde ejerce su acción sobre las células cancerosas [Sahay, *et al*., 2010]. Debido a que las partículas que entran en la célula por tales mecanismos dependientes de caveolina pueden escapar de la degradación lisosomal, esta ruta de entrada es explotada por algunos patógenos como los virus.

6.4. Endocitosis independiente de clatrina/caveolina

Este mecanismo tiene lugar en células desprovistas de clatrina y caveolina. Fundamentalmente es el mecanismo elegido para la incorporación de hormonas de crecimiento y de interleucinas a través de membranas con una composición lipídica específica (principalmente colesterol).

Se conoce que el ácido fólico se internaliza a través de esta vía. Teniendo en cuenta la naturaleza del crecimiento de las células cancerosas, incluida la mayor demanda de ácido fólico, la funcionalización de NPs con folato se ha abordado con frecuencia en el diseño de nanoestructuras [Lu and Low, 2012]. Estas NPs son un excelente ejemplo de partículas internalizadas por esta ruta. La endocitosis, mediada por el receptor de folato, permitir a estas nanoestructuras escapar a la degradación en lisosomas y, a menudo, ser retienen en los compartimentos endocíticos o liberadas directamente en el citoplasma [Kelemen, 2006].

6.5. Diseño de nanopartículas para internalización

Las propiedades fisicoquímicas de las NPs como composición, tamaño, forma, carga superficial, funcionalización de la superficie e hidrofobicidad superficial, desempeñan un papel clave en la captación de las mismas por las células.

El diseño de los nanosistemas debe incluir un estudio detallado de las células blanco y sus mecanismos más comunes de internalización.

Un nanosistema "ideal" para uso biomédico debería diseñarse para lograr los siguientes objetivos *in vivo*: (i) tener un tiempo de circulación prolongado (evitando la rápida eliminación renal); (ii) evitar una acumulación en el hígado y bazo; (iii) evitar el secuestro por el sistema fagocítico mononuclear (MPS); y, (iv) interaccionar solo células y tejidos específicos mediante una internalización controlada [Polo, *et al*., 2017].

REFERENCIAS

- Akiyama, *et al*., 2007. Preparation of stimuli-responsive protein nanogel by quantum-ray irradiation. *Colloid and Polymer Science*, *285*(7), 801-807.
- Andersson, *et al*., 1991. Identification of tissue sites for increased albumin degradation in sarcoma-bearing mice. *Journal of Surgical Research,* 50(2), 156-162.
- Behzadi, *et al*., 2017. Cellular uptake of nanoparticles: journey insede the cells. *Chemical Society Reviews*, 46, 4218-4244.
- Brust, *et al*., 1994. Synthesis of thiol-ferivatized Gold Nanoparticles in a two phase Liquid-Liquid system. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, (7), 801-802.
- Brust, *et al*., 1995. Synthesis and reactions of functionalised Gold Nanoparticles. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 1655-1656.
- Connor, *et al*., 2005. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small*, 1(3), 325-327.
- Couvreur and Vauthier, 2006. Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease. *Pharmaceutical Research*, 23(7), 1417-1450.
- Cui, *et al*., 2017. Radiosensitization by gold nanoparticles: Will they ever make it to the clinic? *Radiotherapy and Oncology,* 124, 344-356.
- Damalakiene, *et al*., 2013. Intracellular distribution of nontargeted quantum dots after natural uptake and microinjection. *International Journal of Nanomedicine*, 8, 555.

- Daniel and Astruc, 2004. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chemical Reviews*, 104(1), 293-346.

- Desai, 2007. Nanoparticle albumin bound (nab) technology: targeting tumors through the endotelial gp60 receptor and SPARC. *Nanomedicine*, 3, 337-346.

- De Visser, *et al*., 2007. Androgen-dependent expression of the gastrin-releasing peptide receptor in human prostate tumor xenografts. *Journal of Nuclear Medicine*, 48(1), 88.

- Elzoghby, *et al*., 2012. Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 157(2), 168-182.

- Fasano, *et al*., 2005. The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. *IUBMB Life*, 57, 787-796.

- Frens, 1973. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nature Physical Science*, 241(105), 20-22.

- Gasaymeh, *et al*., 2010. Synthesis and characterization of silver/polyvinilpirrolidone (Ag/PVP) nanoparticles using gamma irradiation techniques. *African Review of Physics*, 4.

- Ghosh, *et al*., 2008. Gold nanoparticles in delivery applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(11), 1307-1315.

- Gong, *et al*., 2009. Synthesis, characterization, drug-loading capacity and safety of novel octyl modifi ed serum albumin micelles. *International Journal of Pharmaceutics,* 376, 161-168.

- Grasselli, *et al*., 2001. From microspheres to monoliths: Synthesis of porous supports with tailored properties by radiation polymerization. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 185(1-4), 254-261.

- Green, *et al*., 2006. Abraxane®, a novel Cremophor®-free, albumin-bound particle from of paclitaxel for the treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *Annals of Oncology*, *17*(8), 1263-1268.

- Gupta and Massagué, 2006. Cancer metastasis: building a framework. *Cell*, 127(4), 679-695.

- Han, *et al*., 2006. Light-regulated release of DNA and its delivery to nuclei by means of photolabile gold nanoparticles. *Angewandte Chemie International Edition*, *45*(19), 3165-3169.

- Hong, *et al*., 2006. Glutathione mediated delivery and release using monolayer protected nanoparticle carriers. *Journal American Chemistry Society*, 128, 1078-1079.

- Hostetler, *et al*., 1996. Monolayers in three dimensions: synthesis and electrochemistry of ω-functionalized alkanethiolate-stabilized gold cluster compounds. *Journal of the American Chemical Society*, 118(17), 4212-4213

- Hostetler, *et al*., 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.

- Hostetler, *et al*., 1999. Dynamics of place-exchange reactions on monolayer-protected gold cluster molecules. *Langmuir*, 15(11), 3782-3789.

- Huang, *et al*., 2007. Gold nanoparticles: interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostics and therapy. *Nanomedicine*, 2(5), 681-693.

- Instituto Nacional del Cáncer, 2018. www.msal.gov.ar/inc/acerca-del-cancer/incidencia.

- Ionita, *et al*., 2007. Ligand dynamics in spin-labeled Au nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry C*, 111(45), 16717-16723.

- Ionita, *et al*., 2008. Lateral diffusion of thiol ligands on the surface of Au nanoparticles: an electron paramagnetic resonance study*. Analytical Chemistry*, 80(1), 95-106.

- Jiang, *et al*., 2010. Endo- and exocytosis of zwitterionic quantum dot nanoparticles by live HeLa cells. *ACS Nano*, 4, 6787-6797.

- Kadlubowski, *et al*., 2003. Pulses of Fast Electrons as a Tool To Synthesize Poly(acrylic acid) Nanogels. Intramolecular Cross-Linking of Linear Polymer Chains in Additive-Free Aqueous Solution. *Macromolecules,* 36, 2484-2492.

- Karmali, *et al*., 2009. Targeting of albumin-embedded paclitaxel NPs to tumors. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 5(1), 73-82.

- Kelemen, 2006. The role of folate receptor α in cancer development, progression and treatment: cause, consequence or innocent bystander?. *International Journal of Cancer*, *119*(2), 243-250.

- Kragh-Hansen, *et al*., 2002. Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin. *Biol Pharm Bull,* 25, 695-704.

- Kratz, 2008. Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles, *Journal of Controlled Release*, 132, 171-183.

- Kroog, *et al*., 1995. Mammalian bombesin receptors. *Medicinal Research Reviews*, 15(5), 389-417.

- Langer, *et al*., 2003. Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics,* 257, 169-180.

- Lee, *et al*., 2011. Nano spray drying: a novel method for preparing protein nanoparticles for protein therapy. *International Journal of Pharmaceutics,* 403, 192-200.

- Lu and Low, 2012. Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer therapeutic agents. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *64*, 342-352.

- Lundqvist, *et al.,* 2008. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proceedings of the National Academy of Sciences.*

- Mankoff, *et al*., 2008. Tumor receptor imaging. *Journal of Nuclear Medicine*, 49(2), 149S-163S.

- Manohar, *et al*., 2016. Quantitative imaging of gold nanoparticle distribution in a tumor-bearing mouse using benchtop x-ray fluorescence computed tomography. *Scientific Reports,* 6, 22079.

- Merodio, *et al*., 2001. Ganciclovir-loaded albumin nanoparticles: characterization and in vitro release properties. *European Journal of Pharmaceutical Sciences,* 12(3*)*, 251-259.

- Mieszawska, *et al*., 2013. Multifunctional gold nanoparticles for diagnosis and therapy of disease. *Molecular pharmaceutics*, *10*(3), 831-847.

- Misra, *et al*., 2012. Gamma radiation induced synthesis of gold nanoparticles in aqueous polyvinyl pyrrolidone solution and its application for hydrogen peroxide estimation. *Radiation Physics and Chemistry*, *81*(2), 195-200.

- Naghavi, *et al*., 2010. Influence of dose on particle size of colloidal silver nanoparticles synthesized by gamma radiation. *Radiation Physics and Chemistry*, 79(12), 1203-1208.

- Naka, *et al*., 1991. Preparation of microspheres by radiation-induced polymerization. I. Mechanism for the formation of monodisperse poly(diethylene glycol dimethacrylate) microspheres. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry,* 29, 1197-1202.

- Nie and Chen, 2012. Au nanostructures: an emerging prospect in cancer theranostics. *Science China Life Sciences*, 55(10), 872-883.

- Okarvi and Jammaz, 2012. Preparation and evaluation of bombesin peptide derivatives as potential tumor imaging agents: effects of structure and composition of amino acid sequence on in vitro and in vivo characteristics. *Nuclear Medicine and Biology*, 39(6), 795-804.

- Orendorff, *et al*., 2006. Shape-Dependent Plasmon-Resonant Gold Nanoparticles. *Small*, 2(5), 636–639.

- Otagiri and Chuang (Eds.), 2016. *Albumin in Medicine: Pathological and Clinical Applications*. *Springer.*

- Owens and Peppas, 2006. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, *307*(1), 93-102.

- Paál, *et al*., 2001. High affinity binding of paclitaxel to human serum albumin. *European Journal of Biochemistry,* 268(7), 2187-2191.

- Patil, 2003. Biopolymer albumin for diagnosis and in drug delivery. *Drug Development Research,* 58(3), 219-247.

- Peters, 1995. All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications. *Academic press*.

- Peterson and Appelgren, 1973. Experimental studies on the uptake and retention of labelled proteins in a rat tumour. *European Journal of Cancer*, 9(8), 543-547.

- Polizzi, *et al*., 2007. Water-soluble nitric oxide-releasing gold nanoparticles, *Langmuir,* 23, 4938-4943.

- Polo, *et al*., 2017. Advances toward more efficient targeted delivery of nanoparticles in vivo: understanding interactions between nanoparticles and cells. *ACS nano*, 11(3), 2397-2402.

- Rahimnejad, *et al*., 2012. Investigation and modeling effective parameters influencing the size of BSA protein NPs as colloidal carrier. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 412, 96-100.

- Saha, *et al*., 2012. Gold nanoparticles in chemical and biological sensing. *Chemical Reviews*, *112*(5), pp.2739-2779.

- Sahay, *et al*., 2010. Endocytosis of nanomedicines. *Journal of Controlled Release*, 145(3), 182-195.

- Schäfer, *et al*., 1992. Phagocytosis of nanoparticles by human immunodeficiency virus (HlV)-infected macrophages: a possibility for antiviral drug targeting. *Pharmaceutical Research*, *9*(4), 541-546.

- Schilling, *et al*., 1992. Design of compounds having enhanced tumour uptake, using serum albumin as a carrier–Part II. *In vivo* studies*. International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part B. Nuclear Medicine and Biology,* 19(6), 685-695.

- Seino, *et al*., 2003. Magnetic composite nanoparticle of Au/γ-Fe2O3 synthesized by gamma-ray irradiation. *Chemistry letters*, 32(8), 690-691.

- Sinn, *et al*., 1990. Design of compounds having an enhanced tumour uptake, using serum albumin as a carrier. Part I. *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part B. Nuclear Medicine and Biology*, 17(8), 819-827.

- Siri, *et al*., 2017. Albumin Nanocarriers, γ-Irradiated Crosslinked, Combined with Therapeutic Drugs for Cancer Therapy. *Current Pharmaceutical Design*, 23(35), 5272-5282.

- Soto Espinoza, *et al.*, 2012. Radiation synthesis of seroalbumin nanoparticles. *Radiation Physics and Chemistry*, 81(9), 1417-1421.

- Srivastava, *et al*., 2005. Controlled plasmon resonance of gold nanoparticles self-assembled with PAMAM dendrimers. *Chemistry of Materials*, 17(3), 487-490.

- Stehle, *et al*., 1997. Plasma protein (albumin) catabolism by the tumor itself–implications for tumor metabolism and the genesis of cachexia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, *26*(2), 77-100.

- Su, *et al*., 2003. Interparticle coupling effects on plasmon resonances of nanogold particles. *Nano letters*, 3(8), 1087-1090.

- Sundar, *et al*., 2010. Biopolymeric nanoparticles. *Science and Technology of Advanced Materials*, 11(1), 1-13.

- Templeton, *et al*., 1998. Reactivity of monolayer-protected gold cluster molecules: steric effects. *Journal of the American Chemical Society*, 120(8), 1906-1911.

- Tsai, *et al.,* 2011. Adsorption and conformation of serum albumin protein on gold nanoparticles investigated using dimensional measurements and in situ spectroscopic methods. *Langmuir*, 27(6), 2464-2477.

- Turkevitch, *et al*., 1951. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of coloidal gold. *Discussions of the Faraday Society*, 11, 55-75.

- Ulanski, *et al*., 1998. Radiation formation of polymeric nanogels. *Radiation Physics and Chemistry*, 52(1-6), 289-294.

- Van't Veer, *et al.*, 2002. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature,* 415(6871), 530-536.

- Varca, *et al*., 2014. Radio-synthesized protein-based nanoparticles for biomedical purposes. *Radiation Physics and Chemistry*, *94*, 181-185.

- Verma and Stellacci, 2010. Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. *Small,* 6, 12-21.

- Vogel, *et al*., 2001. Albumin uptake and transcytosis in endothelial cells in vivo induced by albumin-binding protein. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology,* 281(6), 151-222.

- Weber, *et al*., 2000. Desolvation process and surface characteristics of protein nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 194, 91-102.

- Wilhelm, *et al.*, 2016. Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nature Reviews Materials*, 1(5), 16014.

- Wunder, *et al*., 1997. Enhanced albumin uptake by rat tumors. *International Journal of Oncology,* 11(3), 497-507.

- Yu, *et al*., 2006. Nanogels prepared by self-assembly of oppositely charged globular proteins. *Biopolymers*, 83, 148-158.

- Zaki and Tirelli, 2010. Gateways for the intracellular access of nanocarriers: a review of receptor-mediated endocytosis mechanisms and of strategies in receptor targeting. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 7(8), 895-913.

- Zhao, *et al*., 2011. Cellular uptake, intracellular trafficking, and cytotoxicity of nanomaterials. *Small*, 7, 1322-1337.

OBJETIVOS

Es objetivo de este trabajo de tesis la obtención de NPs de potencial uso *in vivo* para el diagnóstico y tratamiento del cáncer, a partir de la combinación de diferentes materiales.

Recientemente en el LaMaBio se describió la preparación de nanopartículas de proteína utilizando radiación ionizante, sin embargo es desconocido el proceso fisicoquímico involucrado. Por ello, los Capítulos II y III estarán abocados al estudio de dichas NPs.

En el Capítulo II se estudiarán las condiciones de agregación y se caracterizará la fracción proteica de las Alb-NPs; mientras que en el Capítulo III, se ahondará en un estudio de la química de los posibles radicales involucrados en el entrecruzamiento de las proteínas durante la irradiación. Se discutirán los eventos más importantes de la radiólisis del solvente y una aproximación del mecanismo de estabilización de las NPs por esta técnica.

Posteriormente, se utilizarán esos conocimientos para extender este método de preparación a la obtención de nanopartículas híbridas oro/albúmina (HNPs). Este será el eje principal del Capítulo IV, dónde además, se hará una exhaustiva caracterización prestando especial atención a las propiedades y características de cada uno de los componentes de las NPs.

Con el objeto de conferirle direccionamiento hacia células tumorales las HNPs serán decoradas superficialmente con el péptido DOTA-Bombesina (BD), con potenciales aplicaciones en la terapia del cáncer. En el Capítulo V, se detallará la funcionalización superficial y se caracterizarán los nanosistemas preparados.

Finalmente en el Capítulo VI, se estudiará la interacción de las NPs con cultivos de las líneas celulares PC-3 y NCI-H460, que sobreexpresan receptores con afinidad por BD y, con células mononucleares sanguíneas, mediante Citometría de Flujo y Microscopía Confocal. De esta manera se evaluará la potencialidad de las HNPs para su uso como nanoestructuras teranósticas.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

CAPÍTULO II. PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PROTEÍNA

En los últimos años, las Alb-NPs han sido foco de estudio por numerosos grupos de investigación. Las propiedades de las NPs, como la alta absorción en los tejidos biológicos, las convirtieron en materiales atractivos para aplicaciones teranósticas [Wacker, 2014; Sachdeva, 1998; Patwekar, *et al.,* 2014]. Adicionalmente, la Albúmina ha atraído la atención de la industria farmacéutica por ser la proteína sérica más abundante con capacidad de unirse a una amplia variedad de fármacos y alterar sus parámetros farmacocinéticos.

Como vimos en el Capítulo I, las Alb-NPs pueden prepararse por varios métodos aunque la conservación de la estructura nativa de la proteína en la nanoestructura final aún no ha recibido demasiada atención.

En este contexto, se buscó un procedimiento para preparar Alb-NPs a partir de una técnica que conserve las propiedades de la proteína como unidad monomérica, y por lo tanto, su conformación nativa.

A continuación, se describe la preparación de estas NPs, específicamente compuestas por BSA, mediante una serie de pasos que implican: (i) la agregación dinámica de la proteína por etanol y, (ii) el entrecruzamiento radio-inducido mediante irradiación con rayos gamma o haz de electrones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la preparación de las NPs, se utilizó Albúmina sérica bovina, Fracción V (BSA) proveniente de Sigma Aldrich. La lisozima Hansozyme® fue donada por Chr. Hansen Argentina. Todos los demás reactivos fueron de grado analítico.

Preparación de NPs

Se preparó una solución de BSA 60 mg/ml en buffer fosfato 30 mM, pH 7 (PB). A la misma se le añadieron diferentes cantidades de etanol absoluto frío (10, 20, 30, 40 y 45 %v/v), gota a gota con agitación constante. La concentración final de proteína en cada muestra fue 30 mg/ml. Una vez preparadas, fueron saturadas con nitrógeno gaseoso y posteriormente, selladas. Durante la preparación de las NPs, la temperatura se mantuvo alrededor de los 0 ºC.

Las muestras se irradiaron con rayos gamma provenientes de una fuente de Cobalto-60, en la *Planta de Irradiación Semi-Industrial* (PISI) del *Centro Atómico Ezeiza*

perteneciente a la *Comisión Nacional de Energía Atómica* (CNEA). La dosis de irradiación fue 10 kGy, mientras que tasa de dosis fue 1 kGy/h. La temperatura se mantuvo entre 5-10 °C durante este proceso.

Después de la irradiación, las muestras se diluyeron a una concentración adecuada en BP para posteriores experimentos.

Preparación de NPs por irradiación con haz de electrones

La irradiación con haz de electrones se realizó mediante pulsos cortos de electrones acelerados bajo las siguientes condiciones: duración del pulso: 4 µs, frecuencia del pulso: 20 Hz, energía del electrón: 6 MeV. La dosis absorbida de radiación ionizante por pulso (tiempo de irradiación: 6 s) fue 1 kGy, generada por un acelerador lineal ELU-6 (Eksma, Rusia). Las irradiaciones se realizaron en el *Institute of Applied Radiation Chemistry, Lodz University of Technology* (Polonia) en colaboración con los investigadores S. Kadłubowski y P. Ulanski de dicho Instituto.

Determinación de tamaño

El tamaño de partícula se determinó mediante la técnica de Dispersión de Luz Dinámica (DLS) a 25 ºC usando un analizador de tamaño de partícula 90Plus/Bi-MAS (Brookhaven Instruments Corporation), con una fuente de luz de 632,8 nm y un láser de 10 mW (cedido gentilmente por el Dr. Candal - *UNSAM*).

Cada resultado consistió en el promedio de tres mediciones. Las muestras se mantuvieron a 4 °C hasta que se analizaron. Las mediciones se llevaron a cabo entre 1 y 30 días después de la preparación de la muestra.

Caracterización de BSA-NPs mediante Espectroscopía UV-visible, Dicroísmo Circular y FT-IR

Se midió la absorbancia de las muestras irradiadas y sin irradiar, con el agregado de etanol, en un espectrofotómetro Shimadzu UV160U. Para ello, se utilizaron cubetas de cuarzo con 1 cm de paso óptico y un volumen de muestra de 100 µl. Posteriormente, se realizaron los análisis de cuarta derivada de los espectros UV-visible (4dUVv) obtenidos.

Las mediciones de Dicroísmo Circular (CD) se llevaron a cabo a 20 ºC en un equipo Spectropolarimeter Jasco 810, en una celda Peltier para control de temperatura (Jasco Corporation). Se promediaron entre seis y diez espectros para cada muestra.

La Espectroscopía FT-IR de las muestras se realizó mediante el equipo Shimadzu FT-IR Affinity con un módulo GladiATR (PIKE Technologies). Los espectros se

registraron a partir de 64 adquisiciones de la muestra, con una resolución de 1 cm^{-1}. Los datos fueron analizados con el software *IR Solution*.

Comparación de técnicas de entrecruzamiento proteico

Se prepararon BSA-NPs a partir del agregado de glutaraldehído 2,5 % a muestras etanólicas de BSA (etanol 35 %v/v). Luego del agregado del agente de entrecruzamiento, se procedió a la purificación mediante una columna de exclusión molecular (CEM) con la matriz G-25 (columnas PD10, GE Healthcare).

A dichas muestras se les midió el tamaño mediante DLS y se las comparó con las BSA-NPs obtenidas por irradiación a una dosis de 10 kGy.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Preparación de BSA-NPs

Es conocido que el agregado de etanol a una solución de proteína genera agregados, más o menos solubles, según el tamaño de los mismos [Lin, *et al.,* 2004]. Por esta razón, se buscó estudiar el perfil de agregación de la BSA en función de la concentración de etanol presente. Para ello, se utilizó la técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS) que permite observar las distribuciones de macroagregados presentes en una solución de BSA, en presencia o ausencia de etanol. Es importante señalar que el disolvente se añadió a temperaturas entre 0 y 5 ºC para evitar la desnaturalización proteica.

En la Fig. 2.1, se observan los histogramas de dispersión de tamaño obtenidos en mezclas de BSA con distintos porcentajes de etanol. En ausencia de etanol agregado, la solución de proteína tiene un diámetro promedio de 5 nm. Sin embargo, en el rango de 10 a 45 %v/v de etanol agregado, se evidenció la presencia de ligeros aumentos en el tamaño de las partículas presentes en el medio (diámetro promedio 30 nm).

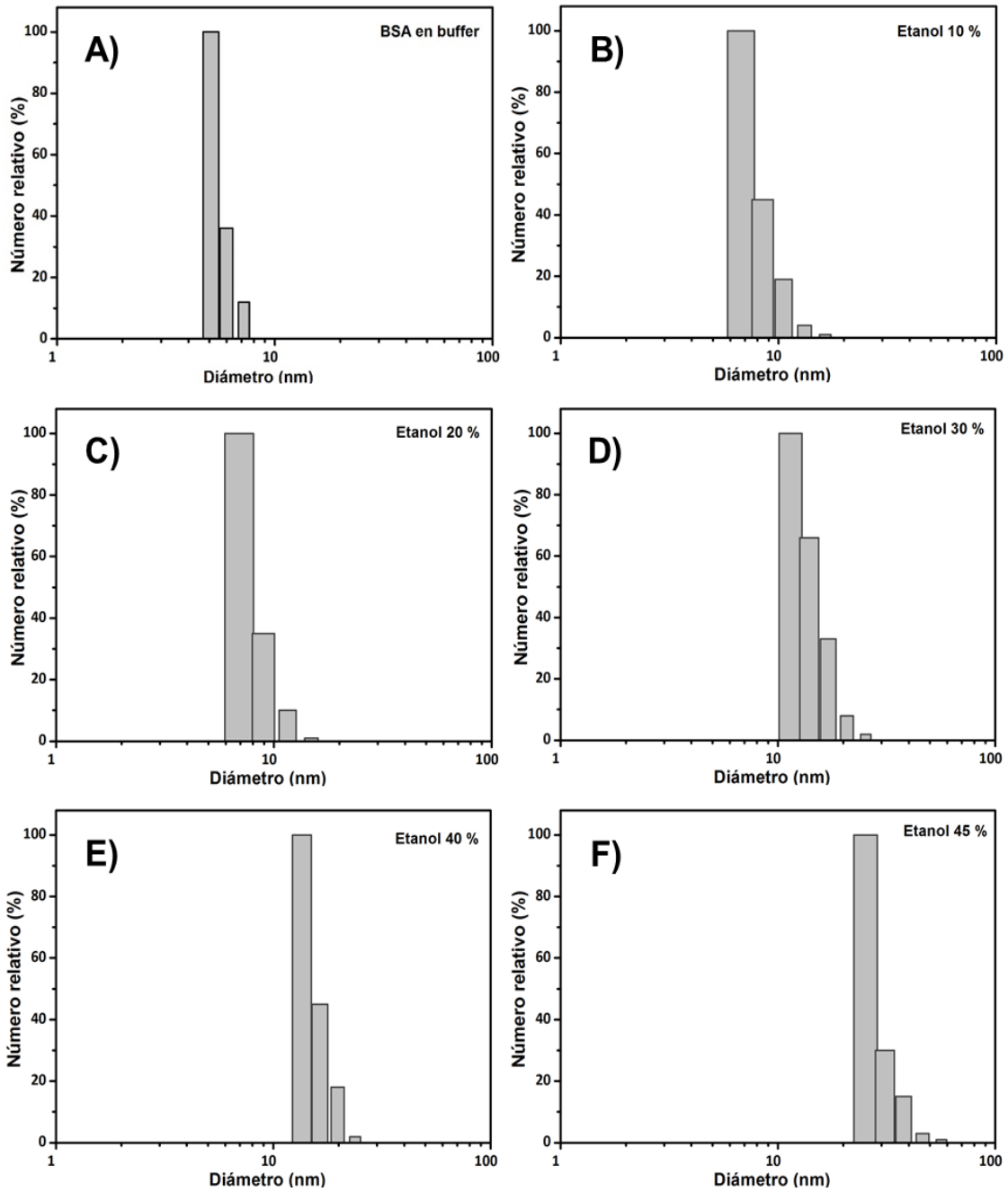

Fig. 2.1 – Estudio de distribución de tamaño de BSA en distintos porcentajes de etanol por DLS. BSA en BP (**A**), con la adición de etanol al 10 % (**B**), 20 % (**C**), 30 % (**D**), 40 % (**E**) y, 45 % (**F**).

A partir de estos resultados, se construye la Fig. 2.2, dónde se compilan los datos de DLS en un gráfico de diámetro hidrodinámico promedio frente al porcentaje de etanol agregado a la solución de proteína. En presencia de 40 % de etanol, se generaron partículas tres veces más grandes que el diámetro hidrodinámico de la BSA en buffer. Por encima de este porcentaje, se observó un fuerte aumento en el diámetro de las NPs. Por ejemplo, con el agregado de 45 % de etanol, el diámetro promedio ascendió a 30 nm. A las muestras con más de este porcentaje de etanol agregado, no se les pudo

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

determinar el diámetro debido a la presencia de un aumento de la viscosidad y/o la formación de geles [Van Oss, 1989].

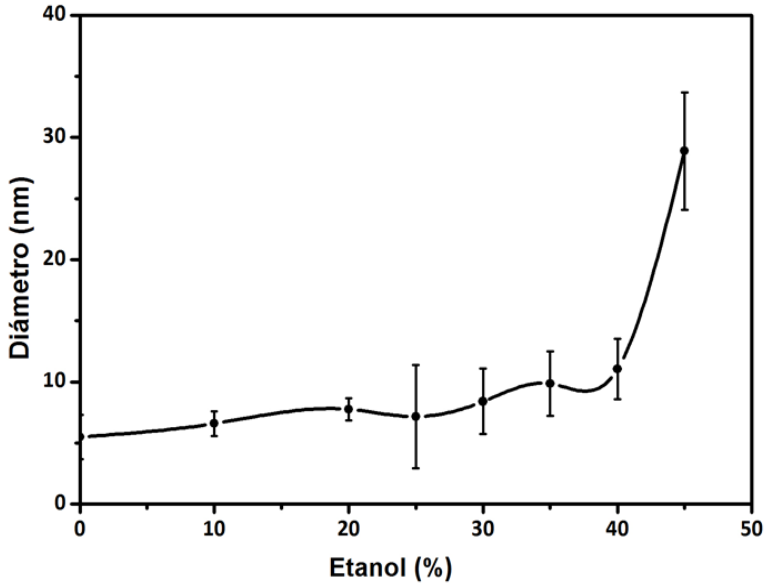

Fig. 2.2 – Diámetro hidrodinámico medio de la solución de BSA con el agregado de cantidades crecientes de etanol.

Con el objetivo de estudiar la estabilidad de estos agregados de proteína, se diluyeron las muestras etanólicas con agua más de diez veces. Al reducirse la concentración de etanol, se observó la desaparición de los agregados. En los histogramas de DLS de estas diluciones, solo se evidenció el diámetro hidrodinámico promedio característico de la BSA en ausencia de etanol. Este fenómeno es compatible con un proceso de agregación completamente reversible a concentraciones de etanol subprecipitantes. Por lo tanto, de acuerdo con las mediciones de DLS, las NPs de proteínas preparadas de esta manera tienen baja estabilidad.

Una vez realizados los análisis de diámetro de las soluciones proteicas en presencia de diferentes concentraciones de etanol, se procedió a la irradiación de las mismas. Como se describe en la sección “Materiales y métodos”, las muestras fueron irradiadas con rayos gamma provenientes de una fuente de Cobalto-60. Estudios previos, realizados en nuestro laboratorio, evidenciaron el requerimiento de una dosis de 20 kGy para lograr un cambio apreciable en el tamaño de partícula [Soto Espinoza, *et al.*, 2012]. Sin embargo, con el objetivo de disminuir la dosis total utilizada, la irradiación de las muestras se realizó con 10 kGy, a una tasa de dosis de 1 kGy/h.

En la Fig. 2.3, se observa la distribución de diámetros hidrodinámicos de una solución de BSA en BP, en ausencia y presencia de etanol (35 %v/v), irradiada y sin irradiar.

Al comparar los DLS de la BSA en presencia de etanol 35 %v/v, irradiada y sin irradiar (Fig. 2.3, histogramas D y B), se observa que la distribución de tamaño es similar. Esto significa que el proceso de irradiación en sí mismo no induce a la agregación de las moléculas de proteína.

Sin embargo, este proceso de irradiación adquiere importancia al equilibrar la muestra irradiada con buffer mediante una cromatografía de exclusión molecular. Es ahí cuando se observa, que en ausencia de etanol, la muestra irradiada conserva una distribución de tamaño mayor que la muestra de BSA en BP sin irradiar (histogramas A y C de la Fig. 2.3). Las muestras de BSA-NPs demostraron ser estables incluso después de la dilución en buffer.

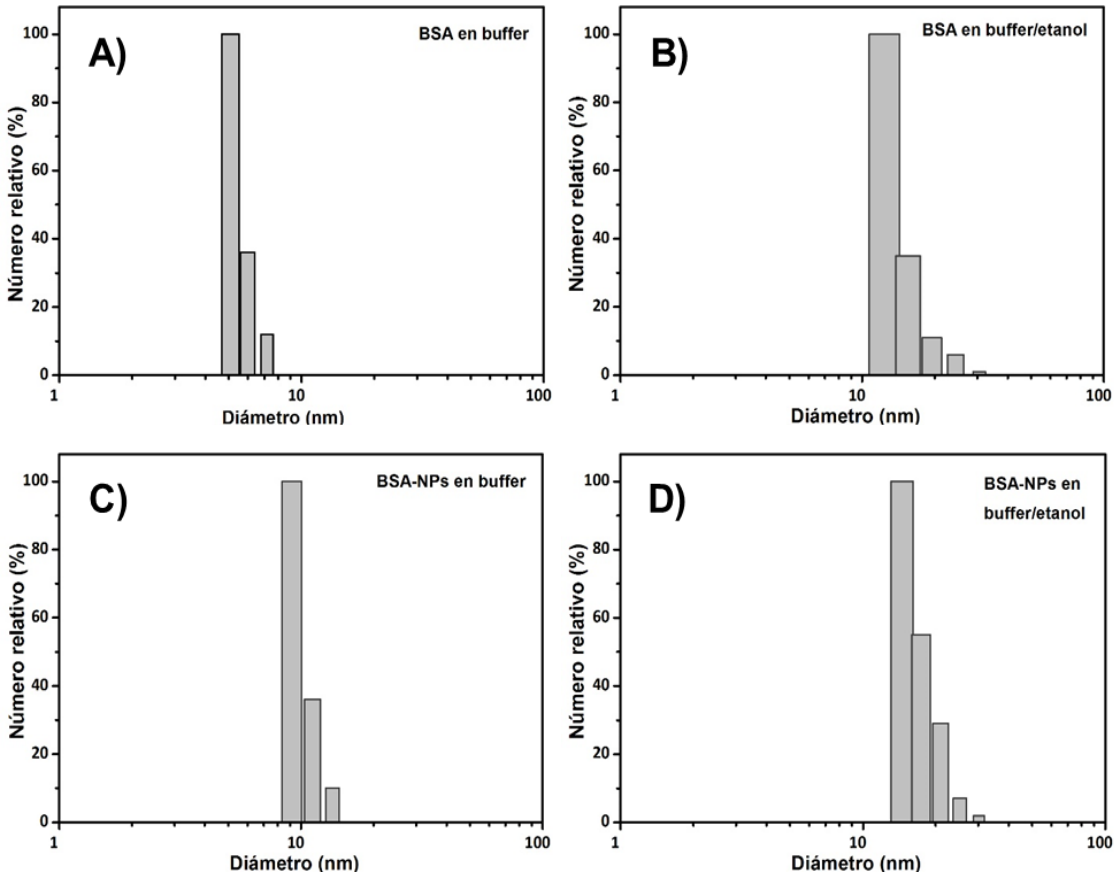

Fig. 2.3 – Gráficos de la distribución del diámetro de partícula obtenidos por DLS: Solución de BSA en BP (**A**) y en presencia de 35 %v/v de etanol (**B**), sin irradiar. BSA-NPs irradiadas y equilibradas en BP (**C**). BSA-NPs en condiciones de irradiación (35 % etanol) (**D**).

La Fig. 2.4 muestra un resumen de los cambios en los tamaños medios de las partículas en diferentes condiciones experimentales, considerando la presencia/ausencia de etanol y las condiciones de muestras irradiadas/no irradiadas. Las moléculas de BSA están principalmente en forma monomérica en soluciones de

agua/buffer. Por lo tanto, el proceso de agregación no es favorable bajo estas condiciones. La adición de etanol desplaza el equilibrio hacia la agregación de proteínas (que tiene una dependencia con el disolvente, como se mostró en la Fig. 2.1). Después del entrecruzamiento, mediado por radiación ionizante, este equilibrio se desplaza a la condición de agregación aumentando el tamaño de las NPs. Pero, cambiando el medio a una condición de agregación desfavorable (por dilución con buffer, o intercambio de disolvente por CEM), se observa que todas las moléculas de BSA no entrecruzadas covalentemente se separan de las NPs, con la excepción de las covalentemente entrecruzadas.

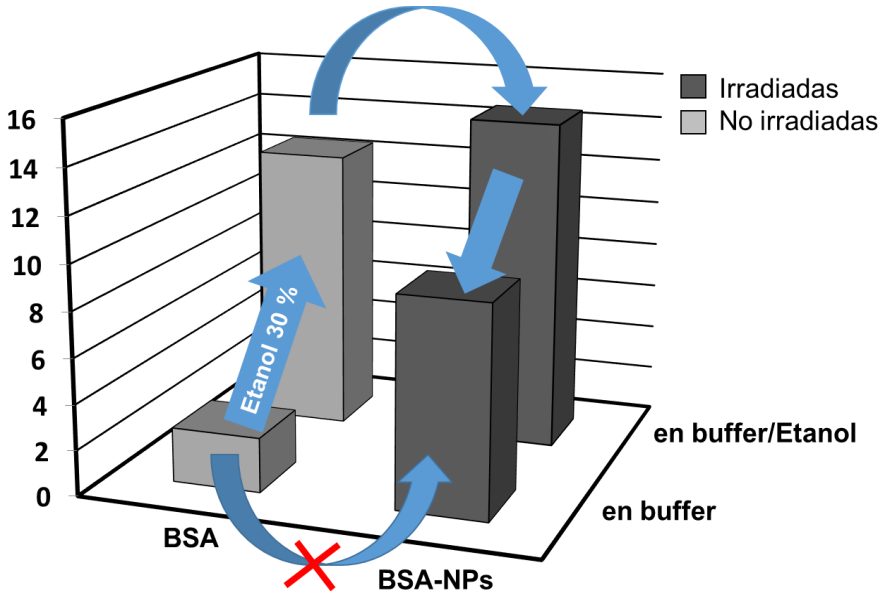

Fig. 2.4 – Gráfico de barras 3D que muestra la evolución del diámetro hidrodinámico medio del procedimiento secuencial de preparación de BSA-NPs.

El análisis de los datos permitió inferir que el mecanismo de formación de las BSA-NPs es producto de la combinación de una agregación dinámica y un efecto de entrecruzamiento mediado por la irradiación de la BSA en presencia de una solución etanólica. Dicho mecanismo se esquematiza en la Fig. 2.5.

En este mecanismo propuesto, el principal efecto del disolvente es la reducción de la capa de hidratación que recubre las proteínas. Adicionalmente el etanol genera una reducción de la constante dieléctrica de la solución. Esto produce un aumento en la interacción electrostática entre las moléculas de BSA, lo que induce la agregación de proteínas. En estudios previos de nuestro laboratorio también se demostró que otros disolventes polares solubles en agua, como el acetonitrilo y el isopropanol, también generan BSA-NPs, mientras que otros precipitantes de proteínas, como el sulfato de

amonio o las sales de cloruro de sodio, no inducen la formación de BSA-NPs [Soto Espinoza, *et al*., 2012].

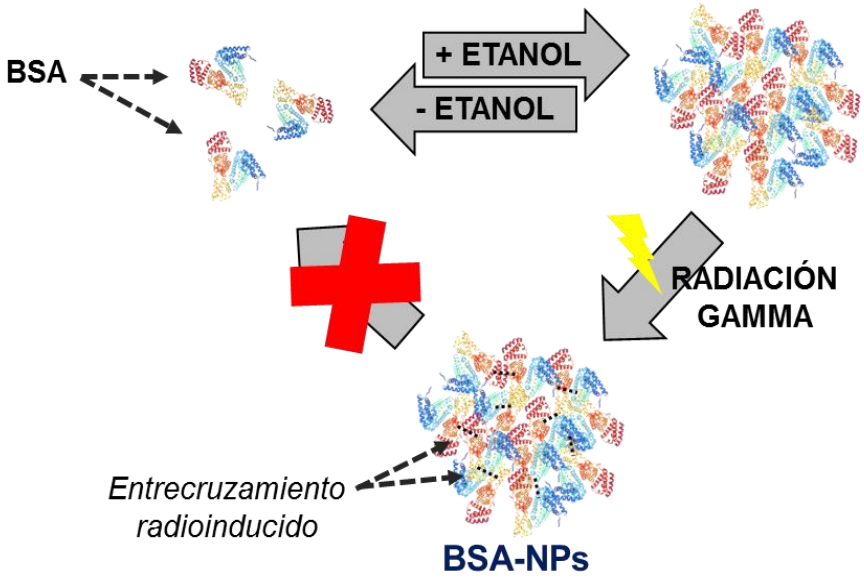

Fig. 2.5 – Esquema del mecanismo propuesto para la preparación y estabilización de BSA-NPs.

Con el fin de evaluar la influencia de gases en el proceso de irradiación de las NPs, se prepararon soluciones etanólicas de BSA saturadas con nitrógeno, aire (oxígeno 21 %) y acetileno. Las muestras, en frascos sellados, fueron irradiadas con rayos gamma, a una dosis de 10 kGy y una tasa de dosis de 1 kGy/h. El análisis de los tamaños se realizó por DLS. En la Fig. 2.6, se observan los histogramas de distribución de tamaño de las diferentes muestras.

Como resultado, los gases reactivos frente a la radiación, como el oxígeno o el acetileno, permitieron obtener NPs de tamaños mayores. Esto demuestra que pequeñas cantidades de aditivos (en este caso gases disueltos) generan cambios en los radicales libres generados por la radiación ionizante que impactan sobre el diámetro hidrodinámico final de las BSA-NPs. En el Capítulo III, se estudiará con más detalle el rol de los radicales libres en la estabilización de la nanoestructura mediante radiación ionizante.

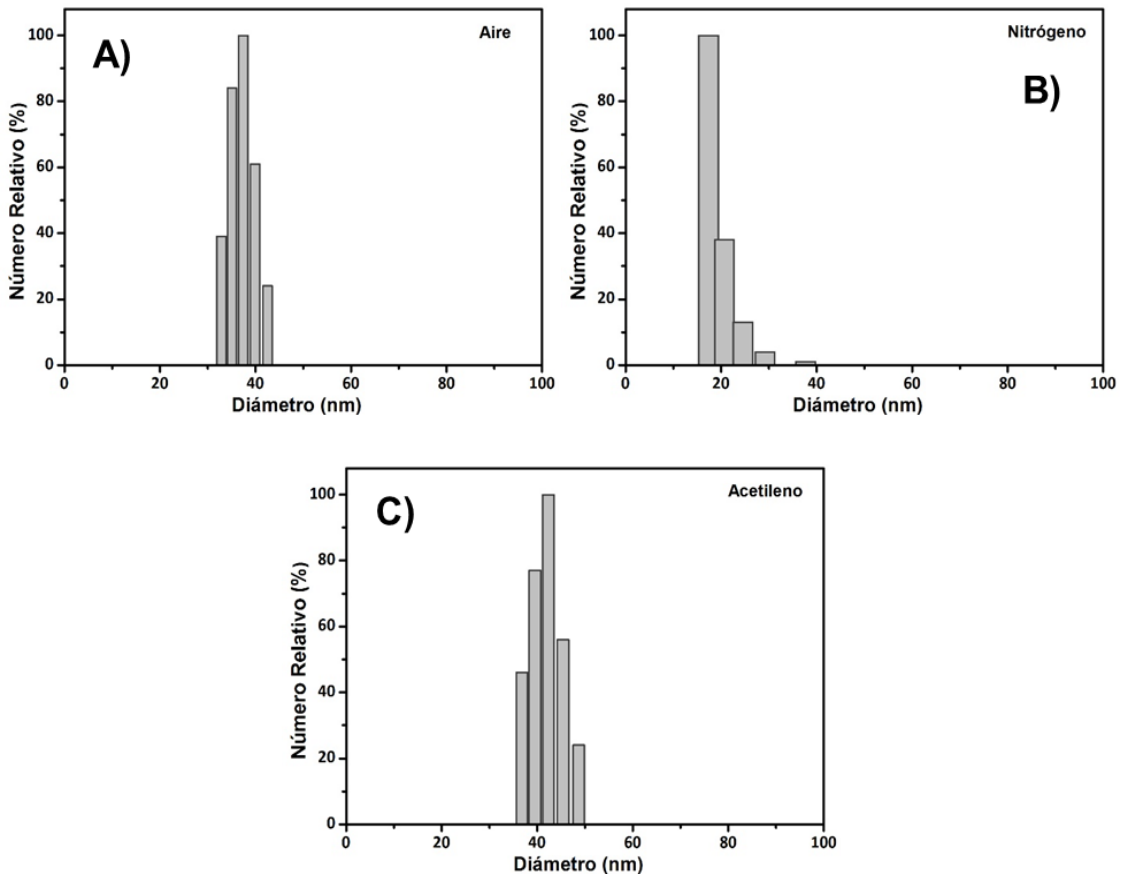

Fig. 2.6 – Histogramas de distribución de tamaño de una solución etanólica de BSA (35 %v/v) irradiada bajo atmósfera de aire (**A**), nitrógeno (**B**) y, acetileno (**C**).

Preparación de BSA-NPs mediante irradiación con haz de electrones

Como se mencionó en el Capítulo I, el entrecruzamiento inducido por radiación es un proceso bien conocido para crear nuevos enlaces químicos. Se ha descripto para varios polímeros sintéticos y naturales disueltos en agua e irradiados con rayos gamma y/o haz de electrones [Ulański, *et al.*, 2002; Kadlubowski, *et al.*, 2003; Kadlubowski, *et al.*, 2012; Kadlubowski, 2014]. La capacidad de inducir reordenamientos macromoleculares de las moléculas en solución, alcanzando un macrohidrogel (principalmente entrecruzamiento intermolecular) o nanogeles (principalmente por entrecruzamiento intramolecular), puede ajustarse cambiando las condiciones experimentales.

Como vimos anteriormente, es factible la obtención de BSA-NPs mediante irradiación con rayos gamma. Por ello se propuso estudiar la preparación de las mismas a partir de la irradiación con un haz de electrones.

Para soportar un mecanismo de dos pasos (agregación y entrecruzamiento), se realizó una irradiación muy corta a una tasa de dosis alta, utilizando un haz de electrones pulsado. Se prepararon muestras libres de oxígeno (saturadas con argón) para evitar

otras reacciones secundarias. Este experimento también se usó para determinar la dosis de irradiación mínima requerida para preparar NPs de proteína en condiciones libres de oxígeno.

El acelerador de haz de electrones se ajustó para administrar una dosis de 1 kGy por pulso (6 s). Se realizaron uno y dos pulsos en muestras de BSA desgasificadas. En la Fig. 2.7 se observa el gráfico del diámetro hidrodinámico promedio de las NPs irradiadas en una solución de etanol 35 %v/v en las condiciones ensayadas.

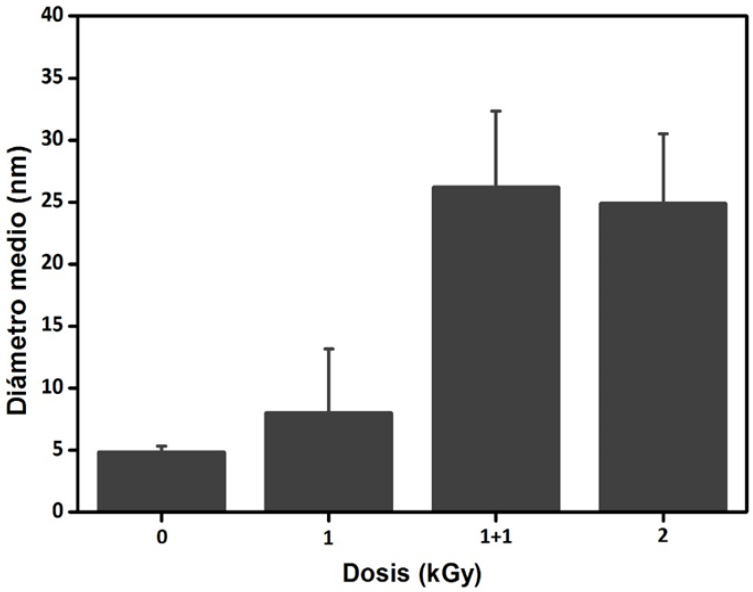

Fig. 2.7 - Diámetro hidrodinámico medio de una solución acuosa de BSA-NPs preparadas por irradiación con haz de electrones a diferentes dosis. La condición 1+1 se refiere a una administración de dosis total de 2 kGy en dos pulsos con un intervalo de 300 s entre ellos.

En el caso de la condición de irradiación de 2 kGy, se investigaron dos configuraciones experimentales: (i) una irradiación pulsada continua (Fig. 2.7, 2 kGy) y, (ii) un irradiación pulsada con un tiempo de espera de 300 s entre pulsos (Fig. 2.7, 1+1 kGy), realizada con el objetivo de permitir la relajación de la muestra y evitar de esta manera, un aumento de la temperatura local.

Como resultado se observó que la dosis de 1 kGy mostró una desviación estándar amplia que podría asignarse a un proceso de entrecruzamiento incompleto, mientras que la dosis de 2 kGy permitió la formación de NPs independientemente de las condiciones de irradiación (continua o por pulsos).

El entrecruzamiento intramolecular de polímeros solubles inducido por radiación fue desarrollado por Ulański y Rosiak [Ulański, *et al.*, 1998; Ulanski and Rosiak, 1999]. La principal ventaja que presenta es que puede llevarse a cabo en un sistema polímero/disolvente puro, libre de monómeros, iniciadores, agentes entrecruzantes o

cualquier otro aditivo, por lo que es especialmente adecuado para la síntesis de productos de alta pureza para uso biomédico. En este enfoque, la solución acuosa pura de un polímero se somete a un pulso corto de radiación ionizante (unos pocos microsegundos). De esta manera, muchos radicales se generan simultáneamente a lo largo de cada cadena polimérica, y su recombinación intramolecular conduce a la formación de nanogeles. Se ha demostrado que dicho procedimiento puede usarse para sintetizar nanogeles a partir de polímeros hidrófilos simples, por ejemplo, poli(alcohol vinílico) [Ulanski and Rosiak, 1999], poli(*N*-vinilpirrolidona) [Kadlubowski, *et al.*, 2012; Kadlubowski, *et al.*, 2014; Ulanski and Rosiak, 1999; An, *et al.*, 2011; Dispenza, *et al.*, 2012], poli(vinil metil éter) [Schmidt, *et al.*, 2005] y poli(ácido acrílico) [Kadlubowski, *et al.*, 2003; Furusawa, *et al.,* 2004].

El uso de radiación para controlar la nanoestructura de péptidos y proteínas fue demostrado por Furusawa, *et al.* y por Akiyama, *et al.,* quienes prepararon partículas de gelatina de tamaño nanométrico [Furusawa, *et al.,* 2004; Akiyama, *et al.*, 2007]. Sin embargo, la gelatina proviene de un hidrolizado del colágeno (una proteína fibrilar), con lo cual las propiedades de disolución son muy parecidas a un polímero sintético. La generación de estas nanopartículas se podría explicar por el mecanismo descripto previamente por Ulański y Rosiak.

Las BSA-NPs constituyen agregados de proteínas en estado nativo, con lo cual el mecanismo de entrecruzamiento no respondería a este mecanismo. En el Capítulo III se discutirá en profundidad este tema.

Caracterización de las BSA-NPs

Para caracterizar las BSA-NPs obtenidas, se realizó un análisis espectroscópico utilizando las técnicas que se aplican al estudio de las proteínas y sus cambios conformacionales, tales como UV-visible, CD y FT-IR.

Para aumentar la sensibilidad del análisis por UV-visible se realizó un análisis de cuarta derivada de los espectros (4dUVv). Esto proporciona información principalmente sobre los aminoácidos aromáticos. La alteración de los microambientes de fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr) y triptófano (Trp) (polaridad, hidratación, interacciones hidrofóbicas y densidad de empaquetamiento) puede seguirse con esta técnica. La BSA tiene 28 Phe, 20 Tyr y solo 2 Trp (BLAST P02769/25-607). Los últimos se encuentran en los dominios I y II de los tres dominios de BSA. Esta proteína también tiene 35 residuos de cisteína, 34 de los cuales están formando 17 enlaces disulfuro. Estos puentes tienen una banda de absorción débil en la región UV cerca de 260 nm.

En la Fig. 2.8, se observan los espectros 4dUVv de las muestras analizadas.

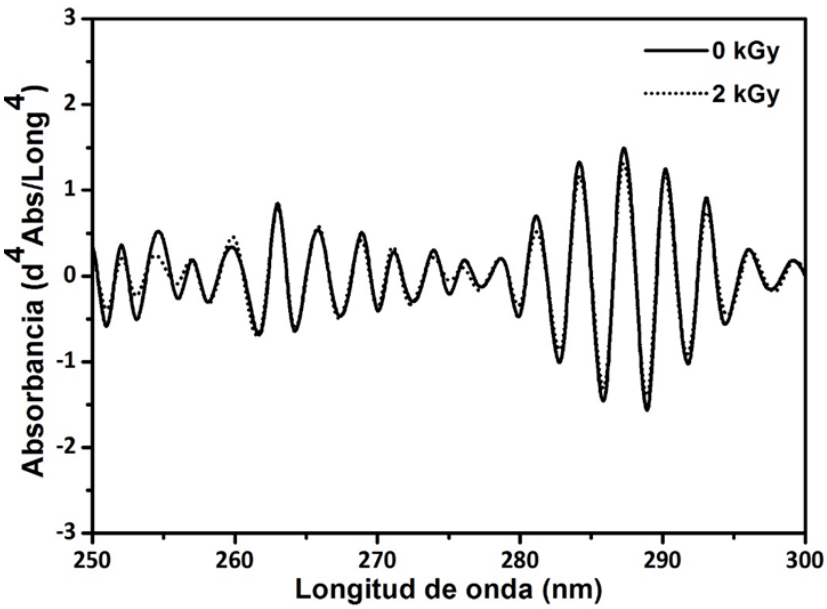

Fig. 2.8 – Cuarta derivada del espectro UV-visible de las BSA-NPs, en presencia de etanol al 35 %v/v, irradiadas con el haz de electrones a 2 kGy (condición 1+1).

Las BSA-NPs irradiadas con 2 kGy (condición 1+1) no presentaron cambios de picos máximos de absorbancia, observándose la misma forma espectral que una solución de BSA no irradiada. Esto indica que el microambiente de los aminoácidos aromáticos mantiene la misma conformación características presente en la proteína sin irradiar [Soto Espinoza, *et al.*, 2012]. Solo se notaron ligeros cambios en el rango de 250-260 nm en la muestra irradiada. Según la literatura, esto se puede asignar a cambios en los aminoácidos aromáticos, particularmente en Phe. Es posible que ocurra alguna modificación en dicho aminoácido, ya que la longitud de onda de absorbancia máxima para el mismo es a 258 nm, mientras que para Trp y Tyr es 280 y 275, respectivamente.

En estudios anteriores de nuestro laboratorio, Soto Espinoza *et al*. demostró que el análisis espectral de CD de las muestras de BSA irradiadas no presenta cambios importantes en la "región de huella digital" que corresponde al CD cercano. Esto se observó al realizar la técnica de CD de las muestras diluidas en agua. Ellos atribuyeron un aumento en la señal de CD de las muestras de NPs a una estructura conformacional más rígida de BSA [Soto Espinoza, *et al.*, 2012].

En este contexto, se realizó el análisis de Espectroscopía de CD sobre muestras de BSA diluidas en el mismo buffer de irradiación, que contiene etanol, como se observa en la Fig. 2.9. Se compararon los espectros CD cercano de las BSA-NPs en etanol, antes y después de la irradiación. Como resultado, se observó que las proteínas no presentaron cambios significativos en su estructura ternaria.

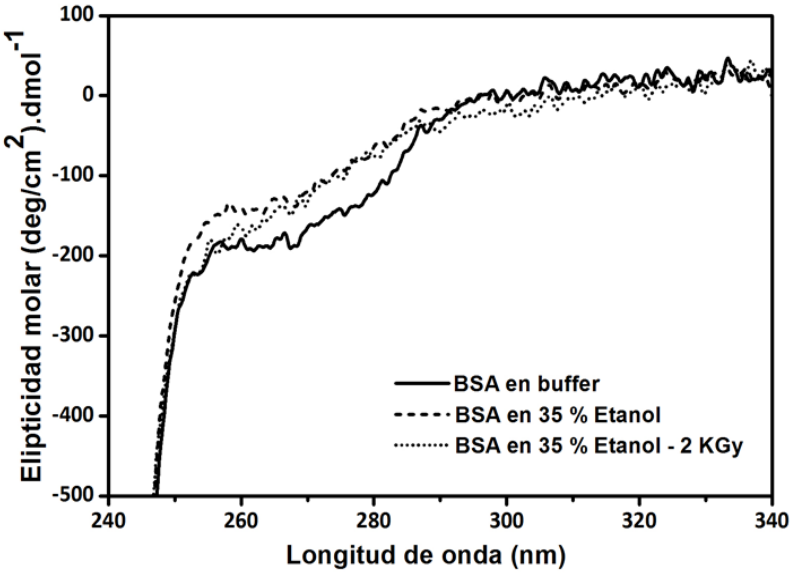

Fig. 2.9 – Espectros de CD cercano correspondientes a la proteína BSA en: BP (**A**); con la adición de 35 %v/v de etanol (**B**); irradiadas con haz de electrones a unas dosis de 2 kGy (condición 1+1) (**C**).

Adicionalmente, se analizó la estructura secundaria de las proteínas con el objetivo de encontrar información estructural complementaria a partir de los espectros de CD lejano. De acuerdo con la base de datos de UniProt, la estructura tridimensional de la BSA (P02769-ALBU BOVIN) tiene alrededor de 74 % de hélices alfa y 3 % de las estructuras láminas beta. Por lo tanto, el espectro total de CD corresponde a la adición de las señales de todas las estructuras, que es principalmente la forma de la señal de hélice alfa [https://www.uniprot.org/uniprot/P02769].

En la Fig. 2.10 se observa el gráfico de CD lejano. El espectro muestra picos mínimos a 208 nm y 222 nm y, un máximo a 192 nm. La adición de etanol (35 %v/v) no mostró un efecto apreciable sobre la composición relativa de hélices alfa, las láminas beta y las estructuras aleatorias. Sin embargo, después de la irradiación (2 kGy), se detectó una reducción en los picos mínimos y en el máximo (Fig. 2.10, espectro línea punteada). Estos cambios podrían atribuirse a la pérdida parcial de estructuras secundarias (hélices alfa) y a la aparición de estructuras desordenadas. Las estructuras aleatorias tienen una contribución de señal de CD muy baja en el rango de 210-240 nm y una señal negativa en el rango de 190-210 nm. Considerando la altura del pico de 208 nm, se puede estimar una reducción (pérdida) de aproximadamente un 20 % de la estructura secundaria de las hélices alfa durante el proceso de nanoestructuración.

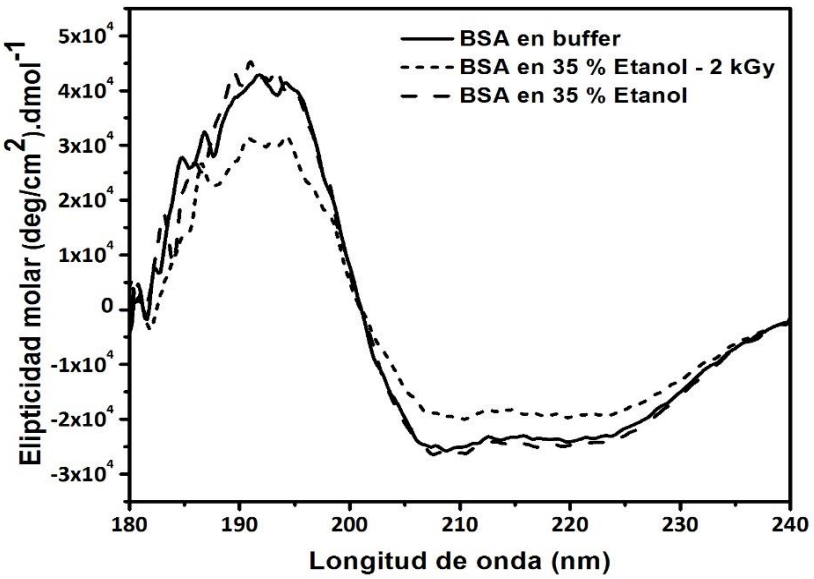

Fig. 2.10 – Espectros de CD lejano correspondientes a la proteína BSA en: BP (**A**); con la adición de 35 %v/v de etanol (**B**); irradiadas con haz de electrones a unas dosis de 2 kGy (condición 1+1) (**C**).

El análisis de CD proporciona una imagen completa de todas las proteínas presentes en la muestra irradiada. Por lo tanto, se pueden esperar al menos dos escenarios posibles: (i) que algunas moléculas BSA están completamente desnaturalizadas mientras que otras están completamente inalteradas; o (ii) que todas las moléculas BSA están parcialmente desnaturalizadas.

Se realizó el estudio comparado de la BSA-NPs respecto de la BSA por FT-IR. Esta técnica proporciona un método para estudiar la desnaturalización de proteínas porque las frecuencias, intensidades y anchos de banda de sus señales características son muy sensibles a los cambios conformacionales en la proteína y en sus microentornos [Murayama and Tomida, 2004].

Las bandas de Amida I y Amida II de proteínas en soluciones acuosas se centran en aproximadamente 1660 y 1550 cm^{-1}, respectivamente. La amida I se atribuye principalmente a una combinación desfasada de estiramientos de C=O y C–N de los grupos amida. En general, la banda Amida I tiene un perfil de banda compuesto, que consta de varios componentes espectrales relacionados con las diferentes estructuras secundarias. Además, la banda Amida II se atribuye a una combinación de las señales de estiramiento C–N y flexión N–H de los grupos amida [Murayama and Tomida, 2004; Militello, *et al*., 2004].

Los espectros de FTIR se observan en la Fig. 2.11. Como resultado de este análisis de las muestras de BSA-NPs y BSA se observó que los picos correspondientes a las amidas estaban conservados. Mediante esta técnica, se observaron señales similares,

en la región amida, tanto para la BSA como para las NPs. Los espectros son comparables a los de las muestras de BSA hidratadas preparadas por otros autores [Grdadolnik and Maréchal, 2001]. Dado el grado de hidratación que presentan no fue posible un análisis más exhaustivo del contenido de estructura secundaria a partir de estos espectros.

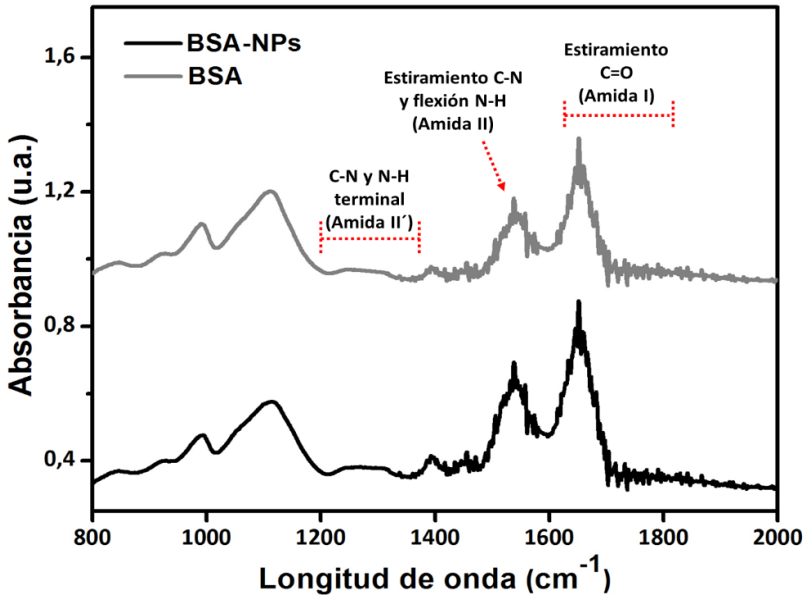

Fig. 2.11 – Espectros ATR FT-IR de la BSA y BSA-NPs correspondientes a la región amida.

A partir de los resultados obtenidos mediante las tres técnicas de caracterización antes mencionadas, podemos concluir que la mayoría de las proteínas en las muestras mantuvieron su estructura nativa. Por lo tanto, las NPs estarían formadas por la agregación de moléculas de proteína con una alteración menor en su estructura.

Comparación de técnicas de entrecruzamiento proteico

Con el fin de comparar los métodos de entrecruzamiento de proteínas por radiación ionizante y agentes químicos, se prepararon NPs de Albúmina por ambas técnicas. Las BSA-NPs obtenidas por radiación fueron comparadas con el método alternativo de preparación que usa glutaraldehído como agente de entrecruzamiento. Parar ello, una solución etanólica de BSA se trató con el mencionado agente.

Se obtuvieron NPs con un diámetro medio similar al de las irradiadas (no estadísticamente diferentes) como se observa en la Tabla 2.1.

Estos datos también están en concordancia con un mecanismo secuencial de formación de NPs. Sin embargo, la utilización de glutaraldehído para la

preparación/estabilización de las NPs tiene la desventaja de la naturaleza tóxica del mismo, lo que conlleva a la necesidad de asegurar la remoción completa del mismo para el posterior uso de las NPs en Nanomedicina.

CONDICIÓN	DIÁMETRO (nm)
Glutaraldehído (2,5 %)	17,5 ± 3,0
Irradiación (Dosis: 10 kGy)	20,5 ± 3,5

Tabla 2.1 – Diámetro promedio medio de las BSA-NPs obtenidas por radiación y mediante entrecruzamiento químico. Ambas NPs se prepararon en etanol 35 %v/v.

CONCLUSIONES PARCIALES

Se obtuvieron NPs de BSA preparadas por irradiación de soluciones de proteínas en mezclas de agua/etanol, utilizando una fuente de radiación ionizante. Los datos experimentales respaldan la hipótesis de un proceso en dos pasos en el que se produce la agregación de las proteínas en la mezcla agua/disolvente, y el entrecruzamiento radio-inducido de las mismas.

Las diferentes concentraciones de etanol revelan la presencia de partículas de diferentes tamaños que pueden ser interconvertidas dinámicamente. Después de la irradiación de las muestras, se produce un proceso irreversible de agregación.

Las NPs fueron caracterizadas por las técnicas de UV-visible, CD y FT-IR. El análisis de cuarta derivadas de los espectros de las NPs obtenidos por Espectroscopía UV-visible mostró cambios en el microambiente de los aminoácidos aromáticos, principalmente de Phe. Los espectros CD cercanos y lejanos mostraron que la estructura secundaria y ternaria de BSA se modifica levemente. Al analizar los espectros de CD lejanos se observó una ligera reducción en el contenido de alfa hélice de la estructura secundaria de la proteína luego de la irradiación.

Por otro lado, el análisis por FT-IR de las muestras parcialmente hidratadas no mostró cambios globales en la cadena principal de la proteína que forma las NPs.

Los resultados de estos estudios permiten concluir que las moléculas de BSA que constituyen las NPs se encuentran principalmente en su conformación nativa.

- Akiyama, *et al.*, 2007. Preparation of stimuli-responsive protein nanogel by quantum-ray irradiation. *Colloid and Polymer Science*, 285(7), 801-807.

- An, *et al.*, 2011. Radiation-induced synthesis of poly(vinylpyrrolidone) nanogel. *Polymer,* 52(25), 5746-5755.

- Dispenza, *et al.*, 2012. Studies of network organization and dynamics of e-beam crosslinked PVPs: From macro to nano. *Radiation Physics and Chemistry*, 81(9), 1349-1353.

- Furusawa, *et al.*, 2004. Nanometer-sized gelatin particles prepared by means of gamma-ray irradiation. *Colloid and Polymer Science*, 283(2), 229-233.

- Grdadolnik and Maréchal, 2001. Bovine serum albumin observed by infrared spectrometry. I. Methodology, structural investigation, and water uptake. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules,* 62(1), 40-53.

- Kadlubowski, 2014. Radiation-induced synthesis of nanogels based on poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) -A review. *Radiation Physics and Chemistry*, 102, 29-39.

- Kadlubowski, *et al.*, 2003. Pulses of fast electrons as a tool to synthesize poly(acrylic acid) nanogels. Intramolecular cross-linking of linear polymer chains in additive-free aqueous solution. *Macromolecules*, 36(7), 2484-2492.

- Kadlubowski, *et al*., 2012. Synthesis of tailored nanogels by means of two-stage irradiation. *Polymer,* 53(10), 1985-1991.

- Lin, *et al*., 2004. Ethanol or/and captopril-induced precipitation and secondary conformational changes of human serum albumin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 60(13), 3107-3111.

- Militello, *et al*., 2004. Aggregation kinetics of bovine serum albumin studied by FTIR spectroscopy and light scattering. *Biophysical Chemistry*, 107, 175-187.

- Muratama and Tomida, 2004. Heat-induced secondary structure and conformation change of Bovine Serum Albumin investigated by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Biochemistry*, 43, 11526-11532

- Patwekar, *et al.,* 2014. Review on nanoparticles used in cosmetics and dermal products. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(8), 1407-1421.

- Sachdeva, 1998. Drug targeting systems for cancer chemotherapy. *Expert opinion on investigational drugs*, 7(11), 1849-1864.

- Schmidt, *et al.,* 2005. Pulsed electron beam irradiation of dilute aqueous poly(vinyl methyl ether) solutions. *Polymer*, 46(23), 9908-9918.

- Soto Espinoza, *et al.*, 2012. Radiation synthesis of seroalbumin nanoparticles. *Radiation Physics and Chemistry*, 81(9), 1417-1421.

- Ulański, *et al.,* 1998. Radiation formation of polymeric nanogels. *Radiation Physics and Chemistry,* 52(1-6), 289-294.

- Ulanski and Rosiak, 1999. The use of radiation technique in the synthesis of polymeric nanogels. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, 151(1-4), 356-360.

- Ulański, *et al.,* 2002. Synthesis of poly(acrylic acid) nanogels by preparative pulse radiolysis. *Radiation Physics and Chemistry,* 63(3-6), 533-537.

- Universal Protein Resource (UniProt) – Bovine Serum Albumin. https://www.uniprot.org/uniprot/P02769.

- Van Oss, 1989. On the mechanism of the cold ethanol precipitation method of plasma protein fractionation. *Journal of Protein Chemistry,* 8(5), 661-668.

- Wacker, 2014. Nanotherapeutics - Product development along the “Nanomaterial” discussion. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 103(3), 777-784.

CAPÍTULO III. ROL DE LOS RADICALES EN LA PREPARACIÓN DE NPs

Los efectos de la radiación ionizante sobre las proteínas se han estudiado desde las etapas iniciales de esta tecnología. Estos efectos pueden ser directos o indirectos y se espera que ocurran muchas reacciones radicalarias de acuerdo con las condiciones de irradiación y la preparación de la muestra.

La mayoría de las condiciones estudiadas de irradiación de soluciones de proteínas en estado líquido generan la degradación de la misma. Sin embargo, como se describe en el Capítulo II, se pueden obtener Alb-NPs mediante la irradiación de soluciones de proteínas en presencia de una alta concentración de etanol.

Dado que el proceso de entrecruzamiento inducido por radiación que ocurre al generarse las NPs es aún un motivo de debate [Szafulera, *et al*., 2018], en el presente Capítulo se evaluarán nuevos datos experimentales buscando dilucidar las principales reacciones radicalarias involucradas en dicho proceso.

MATERIALES Y MÉTODOS

La Albúmina (BSA), L-histidina (His)>99% y L-prolina (Pro)> 99% fueron comprados a Sigma Aldrich. El L-triptófano (Trp), pureza 99% y la L-alanina (Ala), de grado USP, se adquirieron de Gibco. La L-fenilalanina (Phe) pureza > 99% y el metanol (grado HPLC) fueron proporcionados por Merck; el ácido fórmico por J.T. Baker y, tanto la L-tirosina (Tyr) pureza > 99% como la cistina (Cys-sCy) pureza > 99% de Anedra. El etanol, de grado analítico, se compró a Biopack. Por otro lado, se adquirió difenil-1-pirenilfosfina (DPPP) de Cayman Chemical Co.

Todos los demás reactivos utilizados para estos ensayos fueron de calidad analítica.

Irradiación de soluciones de aminoácidos

Se prepararon soluciones madre de los aminoácidos Trp, Tyr, Phe, Ala, His y Cys-sCy, en una concentrañción de 2 mM, usando agua bidestilada. Las muestras a irradiar se prepararon diluyendo cada solución madre (1 ml) en agua bidestilada (0,4 ml) y etanol absoluto (0,6 ml). La concentración final de aminoácidos en la muestra fue 1 mM y de etanol 30 %v/v. Las muestras se prepararon en viales de vidrio, se burbujearon con N_2 durante 5 min y se cerraron herméticamente, manteniendo la temperatura inferior a 10 °C durante todo el procedimiento.

Las muestras se irradiaron con una fuente de rayos gamma provenientes de una fuente de Cobalto-60, en la *Planta de Irradiación Semi-Industrial (PISI)* del Centro Atómico Ezeiza perteneciente a la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA). La dosis de irradiación fue 10 kGy, mientras que tasa de dosis fue 1 kGy/h. La temperatura se mantuvo entre 5-10 °C durante este proceso, con un riguroso control de la misma.

Preparación de nanopartículas

Las BSA-NPs se prepararon según el protocolo descripto en el Capítulo II. Brevemente, se diluyó una solución acuosa de BSA (30 mg/ml) con etanol frío hasta alcanzar el 30 %v/v, manteniendo la temperatura a 0 °C bajo agitación constante. Las muestras de agua/etanol se desgasificaron previamente mediante burbujeo de N_2 durante unos minutos antes de sellarlas herméticamente. Se irradiaron a 10 kGy con una tasa de dosis 1 kGy/h. La temperatura de la muestra durante la irradiación estuvo entre 5 y 10 ºC.

Después de la irradiación, se eliminó el disolvente mediante una columna PD10, (GE Healthcare). Las BSA-NPs se purificaron mediante CEM con Sephadex G-200 (volumen de lecho 19 ml) utilizando agua bidestilada como disolvente. Flujo: 0,5 ml/min.

Espectroscopía de fluorescencia de estado estacionario

Se realizaron estudios de fluorescencia en un Fluorospectrofotómetro S2 Scinco. La ranura de excitación se fijó en 2,5 nm, mientras que la ranura de emisión se fijó en 1 nm de ancho. El barrido de velocidad se estableció a 60 nm/min y la resolución fue de 0,5 nm.

Las soluciones de Tyr, antes y después de la irradiación, se excitaron a 280 nm y su rango de emisión se observó entre 280-550 nm. Para el Trp, las muestras antes y después de la irradiación, se excitaron a 295 nm, registrando la emisión en el rango de 350-550 nm. Además, la presencia de biTyr se evaluó por excitación a 325 nm de las muestras de Tyr irradiadas en agua y etanol/agua. La emisión se detectó entre 350-550 nm [Queiroz, *et al*., 2016].

Cuantificación de aminoácidos por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) -ESI-MS/MS

Las muestras de aminoácidos se analizaron por cromatografía liquida utilizando un sistema HPLC-MS/MS Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific), acoplado a un espectrómetro de masas Quantum AccessMax TSQ (Thermo Fisher Scientific). El esquema de medición por esta técnica es descripto en la Fig. 3.1.

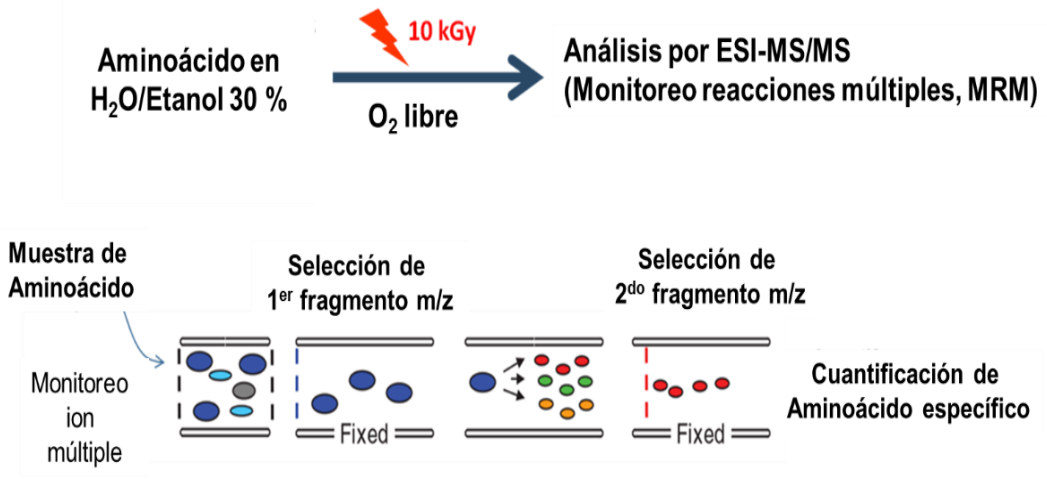

Fig. 3.1 – Esquema del análisis ESI-MS/MS de aminoácidos individuales mediante la técnica de MRM.

Los analitos se separaron en un modo mixto HILIC-1 Acclaim ™ (150 mm x 4,6 i.d., 5 µm) (Thermo Fisher Scientific), en condiciones isocráticas. La fase móvil consistió en formiato de amonio 10 mM en metanol/agua (95/5) a un caudal de 0,5 ml/min. La temperatura de la columna se ajustó a 40 °C y el volumen de inyección fue de 25 µL.

El espectrómetro de masas de triple cuadrupolo TSQ Quantum Access Max con una fuente de ionización por electrospray (ESI) se hizo funcionar en el monitoreo de reacciones múltiples (MRM) en modo positivo. Las transiciones de MRM para los analitos y su energía óptima de colisión de MS se resumen en la Tabla 3.1. Los datos se adquirieron utilizando el software Xcalibur 2.1 (Thermo Fisher Scientific). Las condiciones de MRM para la detección de los aminoácidos Pro, Ala, Phe, Tyr, Trp, Cys-sCy e His se resumen en la Tabla 3.1.

Una solución de Pro se utilizó como estándar interno. Se preparó pesando con precisión 10 mg de Pro y disolviéndola en un matraz volumétrico de 25,0 ml en ácido fórmico 0,1 %.

Las muestras se diluyeron hasta una concentración final de 0,8 µM. Las diluciones se realizaron en metanol y se agregó el estándar interno a una concentración final de 100 ng/ml. El agua ultrapura utilizada se obtuvo utilizando un equipo de RF puro EASY (Barnstead). Todas las soluciones se filtraron a través de una membrana de nylon de 0,45 µm (Micron Separations), y se desgasificaron antes del uso.

Este trabajo fue realizado en colaboración con las investigadoras Dra. Sabrina Flor y Dra. Silvia Lugangioli del *Departamento de Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia y Bioquímica* (*UBA*).

Aminoácido	Ion precursor $[M+H]^+$ (m/z)	Ion fragmento $[M+H]^+$ (m/z)	Energía de colisión (eV)
L-Pro	116,2	68,2 70,3	20 15
L-Ala	90,2	44,4	13
L-Phe	166,2	120,3	12
L-Tyr	182,2	91,2	31
L-Trp	205,2	146,1	17
L-His	156,1	110,2	11
L-$(Cys)_2$	241,0	116,2 120,0	20 20

Tabla 3.1 – Condiciones de MRM monitoreadas para las muetras de aminoácidos irradiados y sin irradiar.

Electroforesis SDS-PAGE

Las NPs se analizaron utilizando electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). Para ello, siguiendo el protocolo descripto por Laemmli, se preparó un gel 8 % [Laemmli, 1976]. El gel se corrió con una corriente de 12 mA, en un sistema de electroforesis Mini-Protean (BioRad), y se tiñó con Amido Black. Las muestras se prepararon en buffer de siembra *(sample buffer)* sin el agregado de β-mercaptoetanol, a menos que se describa lo contrario.

Espectroscopía UV-visible

La espectroscopía UV-vis se realizó con un espectrofotómetro Shimadzu UV160U en el rango de 220 a 420 nm, según el procedimiento descripto en el Capítulo II.

Determinaciones analíticas

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se determinó con un reactivo fluorescente específico a 37 ºC en una solución de cloroformo/metanol (1/1). La muestra se mezcló con una solución que contenía DPPP, que en presencia de hidroperóxidos se oxida a un óxido de DPPP fluorescente [Okimoto, *et al*., 2000]. Las longitudes de onda de excitación y emisión se establecieron a 351 nm y 380 nm (ancho de corte 5,0 nm), respectivamente. Las mediciones se realizaron durante los siguientes 5 min utilizando el espectrofluorometro Cytation 5 (Biotek Instruments). Se usó una solución de DPPP sin hidroperóxidos como control negativo. El límite de detección fue de 1 μM.

El amoníaco libre se midió mediante una reacción enzimática de un kit comercial para medir el amoníaco en plasma humano (Wiener Laboratorios SAIC). La reacción enzimática procedió a 37 ºC durante 30 min. El límite de detección fue de 10 μM.

El acetaldehído se midió según un método colorimétrico estándar [Johnson and Scholes, 1954]. El volumen de la reacción se redujo 20 veces para reducir el consumo de solvente. El límite de detección fue de 1 nM.

El pH se determinó utilizando un medidor de pH (Denver Instrument), utilizando un electrodo de vidrio de pH (Sartorius).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Hace más de 30 años se describió que la Albúmina irradiada en una solución libre de oxígeno, puede formar enlaces covalentes intermoleculares que contribuyen a la precipitación de la solución en forma de agregados [Schuessler and Schilling, 1984]. La aplicación de la tecnología de la radiación ionizante se extendió a la modificación de otras proteínas [Kamarei and Karel, 1983; Singh and Vadasz, 1983; Ressouany, *et al*., 1998; Audette, *et al*., 2000; Hawkins and Davies, 2001]. Según la dosis de radiación adsorbida y el tiempo de exposición a la radiación, los resultados pueden variar desde la polimerización hasta la despolimerización de las moléculas de proteína [Kuan, *et al*., 2013]. En la mayoría de los casos, ambos procesos ocurren simultáneamente.

Los principales mecanismos de dimerización o polimerización identificados en las soluciones de proteínas irradiadas en agua y en ausencia de oxígeno son: (i) la formación de puentes disulfuro intermoleculares provenientes de la oxidación de los grupos tioles; (ii) la formación de biTyr proveniente de la oxidación de las Tyr; y (iii) la dimerización de residuos de Phe. También se ha propuesto la ocurrencia de una oxidación de los enlaces peptídicos [Houée-Levin and Sicard-Roselli, 2001]. Sin embargo, hasta el presente no hay trabajos científicos publicados sobre la irradiación de Albúmina en presencia de una alta concentración de etanol, como el que se describe en este trabajo de tesis.

El estudio detallado sobre el efecto del etanol en la agregación de Albúmina (Capítulo II) demostró que la presencia del cosolvente en la solución permite una agregación reversible de las proteínas que es proporcional a la cantidad de etanol agregado. El proceso debe realizarse a temperaturas cercanas a 0 ºC, para preservar la estructura nativa de la Albúmina, a través la estabilización de los enlaces puente de hidrógeno del solvente alrededor de las macromoléculas. Este efecto también fue descripto para otros solventes, como acetonitrilo e isopropanol (Capítulo II) y, metanol

[Queiroz, *et al*., 2016]. Sin embargo, la reversibilidad de la agregación de la Alb y la conservación de la estructura de la proteína nativa, no han sido estudiadas en profundidad para estos solventes.

Como se demostró en el Capítulo II, para estabilizar la agregación de proteínas, es necesario generar un entrecruzamiento intermolecular entre las moléculas de las mismas. De esta manera, la etapa de irradiación con rayos gamma o con un haz de electrones permite la obtención de una nanoestructura estabilizada. El mecanismo del proceso de entrecruzamiento, bajo estas condiciones experimentales, es una cuestión de estudio. Recientemente, otros autores han informado la presencia de una señal fluorescente en la suspensión irradiada, que se ha asignado al entrecruzamiento de proteínas por la formación de enlaces entre dos residuos de tirosina (biTyr) [Queiroz, *et al*., 2016]; de manera similar a los descripto por otros autores que estudian el entrecruzamiento de proteínas de alimentos [Ressouany, *et al*., 1998; Kuan, *et al*., 2013]. Sin embargo, el aumento específico de la señal de fluorescencia correspondiente a la presencia de biTyr se detecta principalmente en muestras de proteínas irradiadas en agua. En muestras con una proporción creciente de etanol, las señales de fluorescencia detectadas para biTyr son de menos intensidad [Queiroz, *et al*., 2016]. Tampoco se ha demostrado una correlación entre la intensidad de fluorescencia de biTyr y otra variable, como por ejemplo la cantidad de Alb o de etanol.

Espectroscopía de fluorescencia de estado estacionario

Teniendo en cuenta la gran importancia de la radiólisis del solvente en las muestras irradiadas en medios acuosos, y la necesidad de esclarecer el mecanismo por el cual ocurre la estabilización de las nanoestructuras por radiación, se llevó a cabo un estudio de fluorescencia de muestras de BSA-NPs. Para ello, una muestra preparada de acuerdo a lo descripto en el Capítulo II, se purificó por CEM con una columna de Sephadex G-200. Se sembraron 500 µl de una muestra de BSA-NPs previamente acondicionada mediante una columna PD10. La elución se recolectó en fracciones de 500 µl para construir el perfil de la Fig. 3.2. La fracción correspondiente al primer pico (BSA-NPs purificada) fue recuperada. La muestra fue analizada por DLS para corroborar que efectivamente correspondía a las nanopartículas.

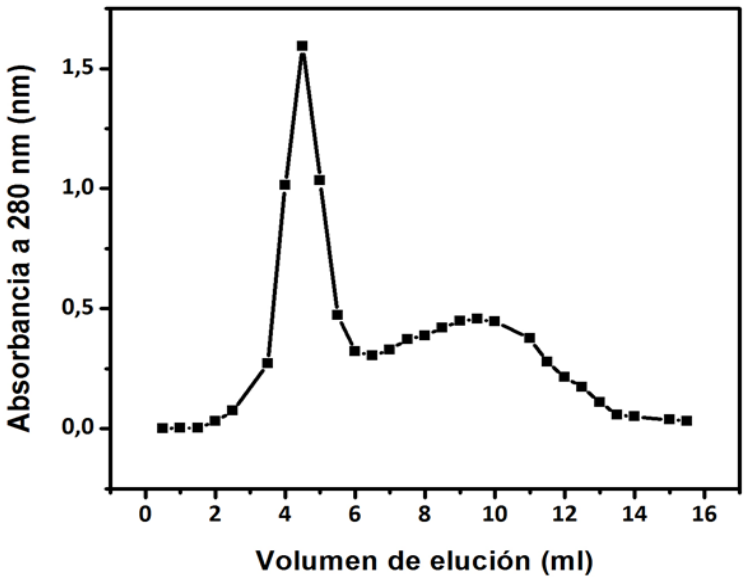

Fig. 3.2 – Perfil de purificación de las BSA-NPs irradiadas mediante una CEM G-200.

Se realizó una espectroscopía de fluorescencia de la muestra de BSA-NPs iradiadas purificadas y sin purificar para estudiar la presencia de enlaces biTyr. Esta última estructura puede detectarse fácilmente por fluorescencia ya que al excitar la muestra a 325 nm, se observa un pico de emisión entre 410-420 nm. La generacción de biTyr ha sido bien estudiada previamente por Davies *et al*. sobre una solución acuosa de BSA irradiada con rayos gamma [Davies, *et al*., 1987]. Estos autores demostraron que el radical hidroxilo (•OH), proveniente de la radiólisis en agua, induce una generación proporcional de biTyr en todas las dosis estudiadas en ausencia de oxígeno. La presencia de este último gas inhibe la generación de biTyr.

En el análisis de fluorescencia de la muestras irradiada sin purificar se detectó un pico de emisión amplio en el rango comprendido entre 380-460 nm. Sin embargo, las muestras de BSA-NPs purificadas no mostraron señales de fluorescencia después de la excitación a 325 nm. Cabe destacar que la señal de fluorescencia obtenida en la muestra sin purificar presentó una forma similar a los datos informados por Queiroz, *et al*. [Queiroz, *et al*., 2016].

Las proteínas y las NPs basadas en proteínas son sistemas complejos; por lo tanto, para simplificar el análisis, soluciones de Tyr en agua y en una mezcla acuosa de etanol se irradiaron con rayos gamma con una dosis de 10 kGy. Se ha descrito previamente que la irradiación gamma de soluciones acuosas de Tyr y péptidos que contienen Tyr produce dihidroxifenilalanina a pH neutro [Lynn and Purdie, 1976]. Los mismos resultados se han informado para las Tyr presentes en proteínas como consecuencia

de los radicales •OH [Gieseg, *et al*., 1993]. Adicionalmente, se ha reportado la presencia de biTyr en soluciones acuosas irradiadas de Tyr y péptidos que contienen Tyr, en ausencia de oxígeno [Boguta, *et al*., 1982]. Algunos años después, la formación de biTyr a partir de Tyr de diferentes moléculas se ha identificado como uno de los enlaces más importantes entre proteínas entrecruzadas por radiaciones [Ressouany, *et al*., 1998; Kuan, *et al*., 2013].

En la Fig. 3.3 se muestran los espectros de fluorescencia correspondientes a muestras de Tyr irradiada y sin irradiar. Además, se analizaron muestras preparadas en agua y agua/etanol 30 %v/v. En todos los gráficos se observan los espectros de emisión después de la excitación a 280 nm (línea continua del gráfico) y 325 nm (línea punteada), que corresponden a los máximos de absorción de la Tyr y biTyr, respectivamente.

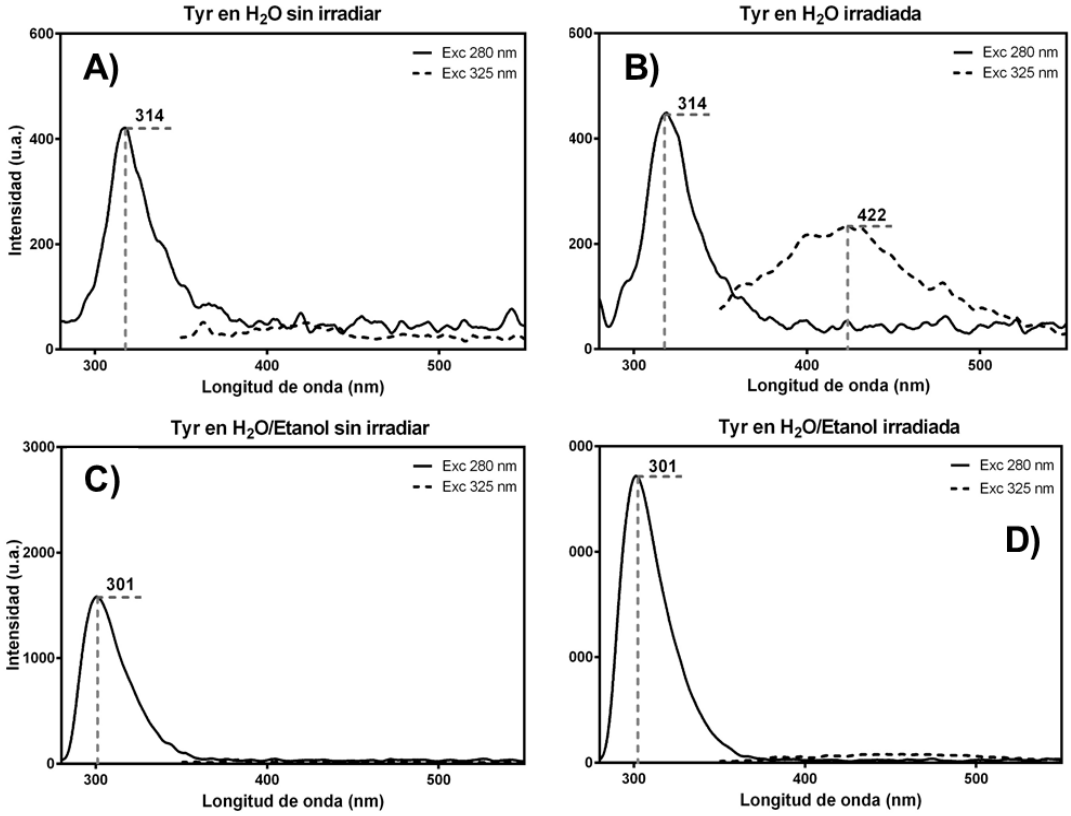

Fig. 3.3 – Espectros de fluorescencia de: Tyr en solución acuosa sin irradiar (**A**), irradiada a una dosis de 10 kGy (**B**); solución etanólica de Tyr sin irradiar (**C**), e irradiada (**D**).

Las muestras evidenciaron una señal en los espectros de emisión correspondiente a Tyr a 314 nm y 301 nm, en las muestras preparadas en agua y agua/etanol respectrivamente. El cambio de pico en el último espectro se asigna a las diferencias en la composición del disolvente. La muestra irradiada en agua mostró la emisión esperada

correspondiente a biTyr (422 nm en este caso) después de la excitación a 325 nm, mientras que la muestra irradiada en la mezcla conteniendo etanol no mostró señal de biTyr. Adicionalmente, esta última mostró un aumento de la señal en el espectro de emisión después de la excitación a 280 nm.

Este fenómeno de inhibición de la formación de biTyr también fue detectado previamente en Tyr presentes en proteínas. La irradiación de BSA (a una dosis <1 kGy) en presencia de alcohol isopropílico 1 M inhibió la formación de biTyr en la muestra [Davies, *et al*., 1987].

Cuantificación de aminoácidos por HPLC-ESI-MS/MS

Dado que la presencia de etanol modifica de manera importante los productos obtenidos (ausencia de biTyr), se decidió estudiar el efecto del solvente sobre muestras de aminoácidos irradiadas.

La irradiación de aminoácidos fue un tema de estudio de muchos grupos de investigación por décadas [Hawkins and Davies, 2001]. Es conocido que cada aminoácido tiene varios productos de degradación dependiendo de las condiciones de irradiación (solvente, gases disueltos, dosis, etc.). Dado la enorme complejidad del tema y, como forma de realizar una aproximación rápida al problema, se decidió estudiar cuantitativamente la ***no*** modificación de un aminoácido por efecto de la irradiación en nuestra condición de solvente que estabiliza las NPs.

Para estudiar el grado de modificación de los aminoácidos irradiados en un 30 % de etanol, las muestras se analizaron mediante el monitoreo de múltiples reacciones (MRM) en modo positivo usando un HPLC-ESI-MS/MS. Mediante esta técnica es posible cuantificar un aminoácido específico (no modificado) después de la detección de dos iones consecutivos con m/z específicos, sin la necesidad de una exahutiva separación cromatográfica previa. El resultado de este análisis nos permite obtener datos cuantitativos sobre la presencia de un aminoácido determinado en la muestra anterior y posterior a la irradiación (utilizando un estándar interno). Por lo tanto, se puede calcular el porcentaje de modificación de cada aminoácido por el efecto de los radicales generados en el solvente (radiólisis del solvente). Desafortunadamente, mediante el uso de este procedimiento no se recupera información sobre el tipo de modificación química que ocurre en los aminoácidos.

En la Tabla 3.2, se enumeran los resultados obtenidos para los aminoácidos irradiados y sin irradiar.

Solución de aminoácido	Dosis de irradiación (kGy)	Área aa[1]/Área Std[2] (-)	Desviación estándar (%)	Modificación (%)
Tyr	-	0,89	0,2	
Tyr	10	0,68	1,9	23
Phe	-	4,61	6,1	
Phe	10	4,71	2,3	-2
Trp	-	1,64	0,4	
Trp	10	0	0	100
Ala	-	0,26	7,6	
Ala	10	0,25	7,1	6
His	-	0,95	0,01	
His	10	0	0	100
Cys-sCy	-	0,4	1,6	
Cys-sCy	10	0,14	3,9	64

Tabla 3.2 – Cuantificación de la degradación de aminoácidos irradiados en solución etanólica al 30 %v/v en ausencia de oxígeno, determinada por MRM. [1]Área del pico cromatografico detectado de acuerdo a cada aminoácido epecífico a un fragmento particular $[M+H]^+$ m/z → $[M+H]^+$ m/z. [2]Área del pico cromatográfico de la Pro usada como estándar interno (Std), detectado a un fragmento particular $[M+H]^+$ m/z → $[M+H]^+$ m/z de acuerdo a la Tabla 3.1.

El análisis de HPLC-ESI-MS/MS mostró una disminución del 23 % en el contenido de Tyr (Tabla 3.2) en la muestra irradiada en la solución etanólica. Además, se buscaron específicamente los iones m/z → m/z 361 → 315 correspondientes a o-o' del enlace biTyr [Orhan, *et al*., 2004]. Estos iones no fueron detectados, con lo cual se puede deducir que no hay presencia de este compuesto en la muestra.

Estos resultados experimentales, además de las evidencias reportadas previamente por otros autores, apoyan la hipótesis de que no se generan enlaces biTyr en muestras irradiadas en solución etanólica al 30 % en ausencia de oxígeno.

Buscando evidencias del entrecruzamiento inducido por radiación

La concentración de BSA utilizada en la preparación de las NPs se encuentra en el rango del mg/ml (10^{-4} M). Adicionalmente, como el efecto de agregación reduce la superficie expuesta de la proteína en aproximadamente un orden de magnitud, se espera que la concentración efectiva expuesta a la radiólisis del solvente sea del orden de 10^{-5} M. Por lo tanto, los efectos directos de la radiación ionizante sobre las proteínas en estado líquido son despreciables. En consecuencia, el proceso predominante esta dado por los efectos indirectos de la radiación ionizante. En este proceso, los radicales generados a partir de la radiólisis del solvente son la fuente de especies químicas

primarias reactivas que inducirán modificaciones de proteínas. Además, ha sido reportado que otros agentes precipitantes, como el sulfato de amonio que induce la agregación de proteínas, no pueden generar Alb-NPs por entrecruzamiento inducido por radiación [Soto Espinoza, *et al*., 2012]. Por lo tanto, es de esperar que la alta concentración de etanol en la muestra tenga un efecto adicional de agregación, como el descripto en el Capítulo II, para obtener NPs.

Como vimos, las mejores condiciones experimentales para preparar Alb-NPs corresponden al agregado de etanol (30 a 50 %v/v) a una solución de BSA (Capítulo II). De manera similar, la concentración óptima de etanol para preparar NPs híbridas oro/proteína es 30 %v/v, como se determinará en el Capítulo IV [Flores, *et al*., 2018]. Estas mezclas corresponden a concentraciones molares de etanol en el rango de 6 a 10 M; por lo que la presencia del mismo en la muestra de irradiación no puede ser despreciada a la hora de discutir los tipos de radicales que se forman y sus posibles efectos en el proceso de entrecruzamiento.

Análisis de radicales a partir de la radiólisis del solvente

En las NPs preparadas en este trabajo de investigación, el principal componente de las muestras es el agua, con una concentración molar en el rango de 25 a 40 M. Como análisis preliminar, se considera que el agua y el etanol tienen una eficiencia similar de absorción de energía; por lo tanto, el agua será el principal blanco de la radiación ionizante.

Los productos de la radiólisis del agua, tales como los radicales hidroxilo (•OH), los electrones hidratados (e_{aq}^-) y los radicales de hidrógeno (•H), son las principales especies reactivas generadas durante el proceso de irradiación, además del hidrógeno molecular (H_2) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) [Buxton, *et al.*, 1988; Ferradini and Jay-Gerin, 2000]. El radical •OH es la principal especie oxidante, mientras que los e_{aq}^- son la principal especie reductora. La generación esperada de radicales •OH, considerando una dosis de irradiación de 10 kGy, está en el rango de 1 a 3 mM, considerando un rendimiento de la reacción de 0,27 µmol.J^{-1} [LaVerne and Pimblott, 1991]. Sin embargo, la alta concentración molar de etanol (6 a 10 M) eliminará las especies radicalarias primarias para producir radicales α-hidroxietilo (HER) de acuerdo con las siguientes reacciones [Dorfman and Taub, 1963; Baquey, 1970; LaVerne and Pimblott, 1991]:

$$\bullet OH + C_2H_5OH \rightarrow CH_3C\bullet HOH + H_2O \qquad k = 1{,}9\times10^9\ M^{-1}s^{-1}$$

$$\bullet H + C_2H_5OH \rightarrow CH_3C\bullet HOH + H_2 \qquad k = 1{,}6\times10^7\ M^{-1}s^{-1}$$

La última reacción es menos eficiente, pero la alta proporción de etanol en la muestra permite el secuestro de radicales muy reactivos, llegando a la obtención de hidrógeno molecular como molécula neutra [Taub and Dorfman, 1962; Simic, *et al.*, 1969; Baquey, 1970]. Además, la radiólisis del etanol genera principalmente HER e hidrógeno molecular [Taub and Dorfman, 1962; Akhtar and Freeman, 1971]. Se espera que por la alta proporción de estos HER, se recombinen entre sí, dada que tienen una alta reactividad ($2k = 2{,}3x10^9\ M^{-1}s^{-1}$) [Simic, *et al.*, 1969] bajo dicha condición.

Mientras tanto, los e_{aq}^- puede reaccionar con el agua y el etanol produciendo el radical •H con una velocidad de reacción muy baja [Dorfan and Taub, 1963; Buxton, 1988; Baquey, 1970]:

$$e_{aq}^- + H_2O \rightarrow \bullet H + OH^- \qquad k = 1{,}9x10^1\ M^{-1}s^{-1}$$

$$e_{aq}^- + C_2H_5OH \rightarrow CH_3CH_2O^- + \bullet H \qquad k = 3{,}05x10^2\ M^{-1}s^{-1}$$

Por lo tanto, es de esperar que los e_{aq}^- queden disponibles para reaccionar con las proteínas en solución.

La irradiación ionizante (0,5 a 5 kGy, rayos gamma) de mezclas binarias de etanol acuoso conduce a tres productos finales principales: hidrógeno molecular, 2,3-butandiol y acetaldehído, como consecuencia de reacciones de dimerización o dismutación [Taub and Dorfman, 1962; Baquey, *et al.*, 1970; Freeman, 1974]. En una solución de etanol 5 M, estos productos tienen un rendimiento de 0,23, 0,22 y 0,07 $\mu mol.J^{-1}$, respectivamente. Sin embargo, en una solución de etanol 10 M, estos productos se obtienen con un rendimiento final de 0,33, 0,21 y 0,16 $\mu mol.J^{-1}$, respectivamente. Los rendimientos de otros hidrocarburos, como el metano y el etano, son insignificantes. Además, las propiedades de secuestrador de radicales del etanol consumen todo el •OH, al suprimir su autorecombinación para generar H_2O_2 en soluciones de etanol superiores a 5 M [Roux, *et al.*, 1973].

En un trabajo más reciente, LaVerne estudió la radiólisis del agua utilizando el formalismo de Laplace, que permite reconstruir la dependencia temporal de los radicales y los productos moleculares de la radiólisis del agua [LaVerne and Pimblott, 1991]. Este método permite interconvertir la dependencia de la concentración del secuestrador en la dependencia temporal. En este estudio se obtuvieron datos experimentales del efecto de diferentes secuestradores de radicales (etanol, ácido fórmico, nitrato, etc.) a muy altas concentraciones. [LaVerne and Pimblott, 1991; LaVerne, 2000; Hiroki, *et al.*, 2002]. De esta manera, estos informes proporcionaron datos experimentales cuantitativos, valiosos para nuestras necesidades, sobre el rendimiento de los productos de la

radiólisis del agua a altas concentraciones de etanol. Estos datos permitieron a los autores determinar los rendimientos químicos de H_2O_2, que se acercan a cero con el aumento de la concentración de los secuestradores de radicales en todas las soluciones, como se observa en la Fig. 3.4. Estos resultados sugieren que el •OH es el único precursor de la formación de H_2O_2 [Hiroki, *et al*., 2002]. Por lo tanto, la eliminación de los radicales •OH evita la formación de H_2O_2 como producto final de la irradiación.

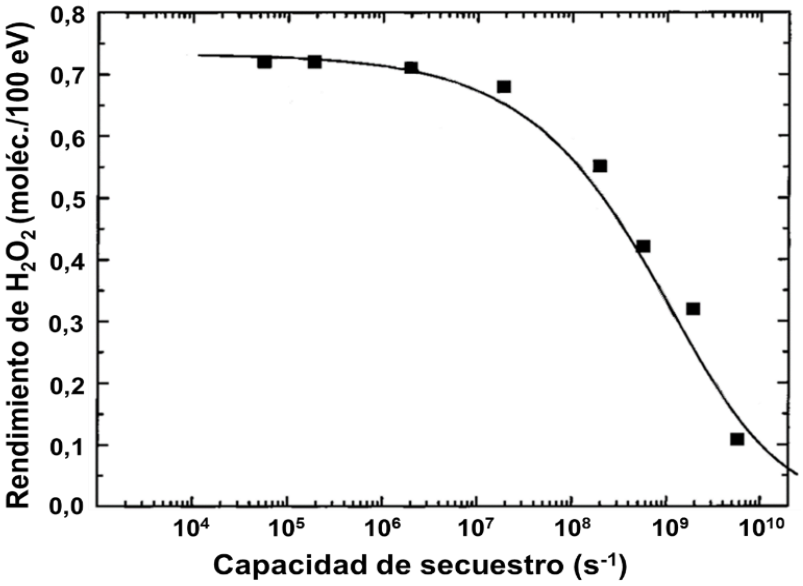

Fig. 3.4 – Rendimiento de H_2O_2 en γ-radiólisis (eje y) en función de la capacidad de secuestro de los radicales •OH por metanol y etanol. Grafico adaptado de referencia Štefanić, I. and LaVerne, J.A., (2002).

LaVerne *et al*. define la capacidad de secuestrar radicales *("Scavenging capacity"*) de un sistema como el producto de la concentración del secuestrador de radicales ("*scavenger")* y la constante de velocidad de la reacción involucrada. La capacidad de eliminación es formalmente equivalente a la constante de velocidad de una reacción de pseudo-primer orden. Su inversa, es la vida útil de la formación de H_2O_2 en agua pura, dado que el radical •OH es el único precursor del H_2O_2. Teniendo en cuenta las concentraciones molares de etanol utilizadas en la preparación de NPs, la capacidad de secuestrar •OH está en el rango de 1 a $2x10^{10}$ s^{-1}. Por lo tanto, la formación de H_2O_2 es solo 0,07 moléculas/100 eV a esta capacidad de secuestro, a una tasa de dosis de 0,64 kGy/h, temperatura ambiente y una dosis total inferior a 1 kGy [Štefanić and LaVerne, 2002]. Teniendo en cuenta que el valor de rendimiento es válido para una dosis de 10 kGy y una tasa de dosis de 1 kGy/h, la concentración final de H_2O_2 en las muestras irradiadas debería ser inferior a 80 µM.

Es importante resaltar que otra fuente de radicales •OH, en tiempos prolongados (horas a días), proviene de la descomposición térmica del H_2O_2 de acuerdo a la ecuación:

$$H_2O_2 \rightarrow \bullet OH + \bullet OH$$

Esta reacción es importante a temperaturas superiores a 10 °C. El uso de la energía de activación de 71 $kJ.mol^{-1}$ y el coeficiente de velocidad de esta reacción k_{dH2O2} = $6{,}4x10^5 \exp(-71\ kJ*mol^{-1}/RT)s^{-1}$ [Takagi and Ishigure, 1985; Štefanić and LaVerne, 2002] permite calcular la vida media de descomposición térmica, $t_{1/2} = \ln(2)/kk_{dH2O2}$. La estimación del $t_{1/2}$ para temperaturas inferiores a 10 °C (temperatura de irradiación) da mayor a 160 días.

La radiólisis del agua y las mezclas etanólicas también pueden afectar el equilibrio ácido/base del agua. Es conocido que una de las principales reacciones de los e_{aq}^- es con el radical •OH [Hiroki, *et al*., 2002] generando OH^-, con una constante de velocidad muy alta:

$$\bullet OH + e_{aq} \rightarrow OH^- \qquad k = 3{,}02x10^{10}\ M^{-1}s^{-1}$$

Conociendo este efecto se analizó el cambio en la concentración de protones en muestras irradiadas de agua y agua/etanol (30, 40 y 50 %v/v), a través de la determinación del pH. Se esperaba obtener una reducción de la concentración de protones en las soluciones acuosas irradiadas, pero no en las soluciones de etanol. Los resultados se observan en la Tabla 3.3, y son producto de la medición independiente de tres muestras para cada condición, medidas a su vez por triplicado. La muestra que no contiene etanol presentó una muy leve reducción (no estadísticamente significativa). Mientras tanto, las muestras que contienen etanol irradiado con 10 kGy, mostraron un aumento en la concentración de protones (disminución del pH), que fue proporcional a la concentración de etanol en la mezcla. Este comportamiento fue propuesto como consecuencia de la radiólisis directa del etanol [Jha and Freeman, 1972].

Muestra	Dosis de irradiación (kGy)	Concentración de H^+ (M)	Desviación estándar (M)	Incremento en concentración de H^+ (M)
Agua	-	2,20E-006	1,46E-006	
Agua	10	2,09E-006	9,50E-007	9,55E-007
Etanol 30 %v/v	-	5,05E-006	2,49E-006	
Etanol 30 %v/v	10	1,09E-005	8,36E-006	4,70E-006
Etanol 40 %v/v	-	4,17E-007	4,47E-007	
Etanol 40 %v/v	10	1,31E-007	7,42E-006	1,37E-005
Etanol 50 %v/v	-	1,92E-007	2,40E-007	
Etanol 50 %v/v	10	2,26E-005	1,10E-005	3,62E-005

Tabla 3.3 – Cuantificación de la cantidad de protones en agua y en mezclas acuosas de etanol, antes y después de la irradiación.

Además, se determinó el peróxido de hidrógeno en las mezclas de agua/etanol para confirmar la ausencia de los radicales •OH en estas condiciones de irradiación. La detección de H_2O_2 utilizando un método de fluorescencia muy sensible dio valores inferiores a una concentración de 1 µM, confirmando reportes anteriores. Las muestras se irradiaron y se mantuvieron a temperaturas inferiores a 10 °C para evitar la degradación térmica del H_2O_2 antes mencionada.

Por lo tanto, se puede afirmar que durante el proceso de irradiación, las moléculas de proteínas y los agregados de proteínas encontrados en la mezcla agua/etanol se exponen principalmente a los radicales HER y, en menor medida, a e_{aq}^-.

Es importante señalar que bajo esta condición experimental, el etanol no es solo un secuestrador de •OH, sino también, es la principal fuente de generación de los HER. En base a todo lo descrito, en la Fig. 3.5 se propone un proceso de generación de NPs de proteína por la radiólisis del solvente.

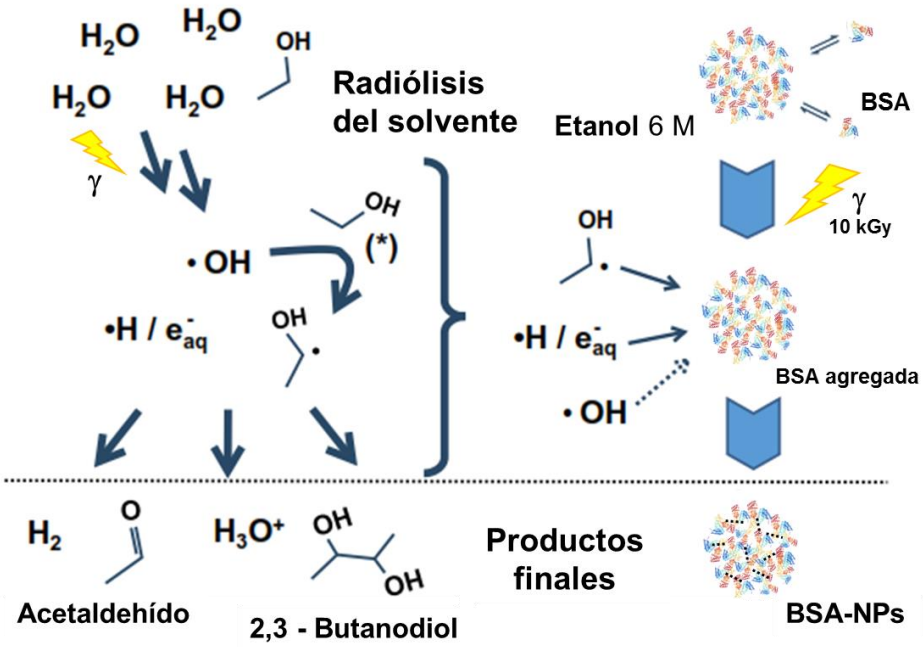

Fig. 3.5 - Esquema de la radiólisis del solvente (izquierda) en condiciones experimentales (etanol 30 %v/v) y, síntesis de BSA-NPs (derecha) como consecuencia de la reacción de entrecruzamiento inducido por radicales. Ambos procesos ocurren en paralelo. En la parte inferior se muestran los productos finales del proceso. El asterisco se refiere a una reacción de secuestro de •OH y H_2O_2 por el etanol.

Además, las proteínas y los agregados de proteínas podrían reaccionar con moléculas neutras pero reactivas, como el acetaldehído, provenientes de los productos de la radiólisis del solvente. Sin embargo, las reacciones con lisinas, presentes en la estructura de Alb, pueden minimizarse manteniendo la temperatura por debajo de 10 °C. Se ha descrito que estas reacciones ocurren a 37 °C y en largos tiempos de reacción [Tuma, *et al*., 1987].

Radicales implicados en el entrecruzamiento de proteínas

La química de la radiación ionizante de aminoácidos, péptidos y proteínas se ha estudiado durante muchos años. Houée-Levin, Sicard-Roselli y Davies publicaron las últimas revisiones en este campo [Houée-Levin and Sicard-Roselli, 2001; Davies, 2012]. Como se discutió anteriormente, las soluciones de proteínas en estado líquido se ven afectadas principalmente por los efectos indirectos de la radiación ionizante. La radiólisis del solvente evoluciona en otras reacciones químicas sobre las proteínas (como monómeros o agregados), que se encuentran en la solución irradiada. Como ya fue mencionado, las modificaciones por entrecruzamiento y/o hidrólisis son los principales procesos descritos. El entrecruzamiento de proteínas implica la formación de enlaces covalentes dentro de la misma molécula u otras cadenas polipeptídicas

(entrecruzamiento intra o intermolecular), mientras que la hidrólisis puede derivar en la ruptura o degradación de las cadenas de aminoácidos. En el caso del entrecruzamiento, los enlaces biTyr se han identificado como uno de los enlaces entrecruzantes más importantes generados por la activación de las Tyr de proteínas a través de los radicales de la radiólisis de agua [Ressouany, *et al*., 1998; Kuan, *et al*., 2013]. Sin embargo, como se demostró en este trabajo, en las NPs preparadas en una alta concentración de etanol, estos enlaces no estan implicados en el entrecruzamiento de las proteínas.

Es esperable que se generen una amplia variedad de radicales sobre las proteínas por la reacción con los radicales del solvente. La selectividad del ataque en las cadenas laterales se ve notablemente afectada por las especies radicalarias y la presencia de grupos funcionales que pueden estabilizar los radicales resultantes. En general, los radicales electrófilos, como los radicales •OH y alcoxilo, oxidan preferentemente los sitios ricos en electrones; mientras que las especies nucleófilas como los e_{aq}^-, •H, fenilo y muchos otros radicales centrados en el carbono, como los HER, atacan los sitios con deficiencia de electrones [Hawkins and Davies, 2001]. En nuestra condición particular de solvente, la alta proporción de etanol consume los •OH y •H de la solución, manteniendo las especies reactivas nucleofílicas como los HER y los e_{aq}^-, como los principales radicales disponibles para atacar los agregados de Alb.

Entender los cambios que ocurren en los aminoácidos y péptidos por la radiólisis del solvente es crucial para estudiar los efectos de la irradiación en las proteínas. En este sentido, varios investigadores han estudiado los efectos de las radiaciones ionizantes sobre soluciones de aminoácidos aislados, algunos dipéptidos, tripéptidos y algunas proteínas [Garrison, 1987; Shadyro, *et al*., 2000; Nauser, *et al.*, 2008]. Más recientemente, se ha abordado el efecto de los radicales reductores sobre péptidos y proteínas mediante la eliminación de los radicales •OH del medio [Salzano, *et al*., 2011; Chatgilialoglu, *et al*., 2011; Konarska, *et al*., 2018]. También es sabido que la química generada por la radiación ionizante de los aminoácidos no se puede extrapolar directamente a péptidos o proteínas, por el efecto del grupo amida. Sin embargo, los estudios sobre modelos de aminoácidos y péptidos proporcionan información valiosa. En este caso, es particularmente relevante para la reactividad de los HER. Hasta 1996 no se habían informado interacciones con los aminoácidos [Neta, *et al*., 1996]. Sólo recientemente se reportó la reacción con el Trp [Sverdlov, *et al*., 2014].

Es por ello que, además de la Tyr irradiada, se realizaron experimentos de irradiación de algunos aminoácidos seleccionados. Los aminoácidos aromáticos Phe y Trp, sumado a la His, Ala y cistina (Cys-sCy) fueron irradiados con 10 kGy en solución acuosa de etanol al 30 %v/v (a pH neutro) en muestras degaseadas con N_2 (libres de O_2).

Uno de los procesos típicos de degradación de aminoácidos libres en agua por la radiación ionizante es la liberación de amoníaco. La cuantificación de amoníaco de las soluciones de Ala, Phe y Tyr (1 mM) irradiadas en una mezcla agua/etanol mostró valores del mismo por debajo del límite de detección (10 μM). Además, no se detectaron aumentos de pH (como consecuencia de la liberación de NH_3). Por lo tanto, el proceso de desaminación puede ser considerado minoritario en estas condiciones experimentales.

Las cantidades finales de aminoácidos después de la irradiación se cuantificaron mediante MRM utilizando espectrometría HLC-ESI-MS/MS. Como vimos anteriormente (Tabla 3.2) se determinaron las cantidades de aminoácidos no modificados antes y después de la irradiación. La irradiación de soluciones de aminoácidos individuales dió resultados bastante diferentes. Las soluciones de Ala y Phe exhibieron un proceso de degradación insignificante. Mientras tanto, Tyr y Cys-sCy mostraron una degradación del 23 % y 64 % y, el Trp y la His se degradaron completamente.

La espectroscopía UV-visible es una técnica particularmente útil para el análisis de aminoácidos aromáticos a traves del análisis de la adsorción de luz de los enlaces químicos conjugados. En la Fig. 3.6, se representan los espectros de las muestras de aminoácidos preparados en una solución etanólica 30 %v/v, irradiadas y sin irradiar.

Los espectros de Trp, Tyr y Phe mostraron pequeños cambios en rangos de 260 a 300 nm; mientras tanto, el espectro de absorbancia de la His mostró un nuevo pico de absorbancia en esta región después de la irradiación.

El caso particular del Trp se ha investigado previamente con mucho detalle [Wickern, *et al*., 1997a; Wickern, *et al*., 1997b; Domingues, *et al*., 2003]. Se han identificado varios productos de degradación, como la N-formilquinurenina (NFK), la β–oxiindolilalanina (OIA) y los isómeros de hidroxitriptófano (OH-Trp) como consecuencia de la radiólisis del agua. Sólo los isómeros de OH-Trp mantienen las propiedades de fluorescencia del Trp [Wickern, *et al*., 1997a]. Wickern *et al*., describió que el 85 % de la Trp inicial se degrada después de la irradiación con 10 kGy a una solución de Trp 1 mM. En comparación, ante la presencia de la mezcla agua/etanol en la muetras de Trp, se encontró que el aminoácido presenta una degradación completa luego de la irradiación (porcentaje de degradación calculado en la Tabla 3.2). Los espectros UV-visibles mostraron diferencias menores entre las muestras de Trp irradiadas y no irradiadas (Fig. 3.6); por lo tanto, el grupo indol debe conservarse en los productos de degradación. Mientras tanto, los espectros de fluorescencia (Fig. 3.7) muestran un cambio de pico máximo (de 347 a 355 nm), manteniendo un espectro de emisión similar ante la excitación a 280 nm. Todos estos datos experimentales son

compatibles con la presencia de compuestos de Trp con adición de HER y/o biTrp [Domingues, *et al*., 2003] como los principales productos de degradación. Además, se encontraron nuevos picos fluorescentes después de la excitación a 325 nm (Fig. 3.7).

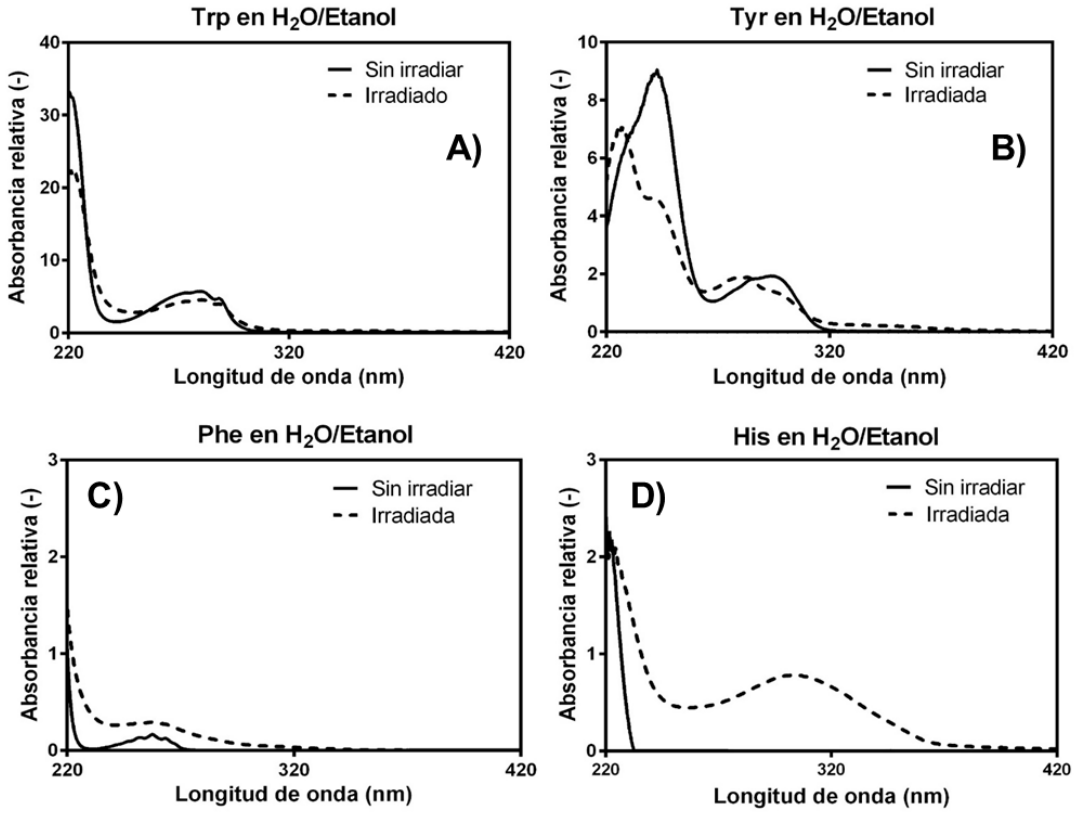

Fig. 3.6 – Espectros de UV-visible para los aminoácidos irradiados y sin irradiar en agua/etanol: Trp (**A**); Tyr (**B**); Phe (**C**); y, His (**D**).

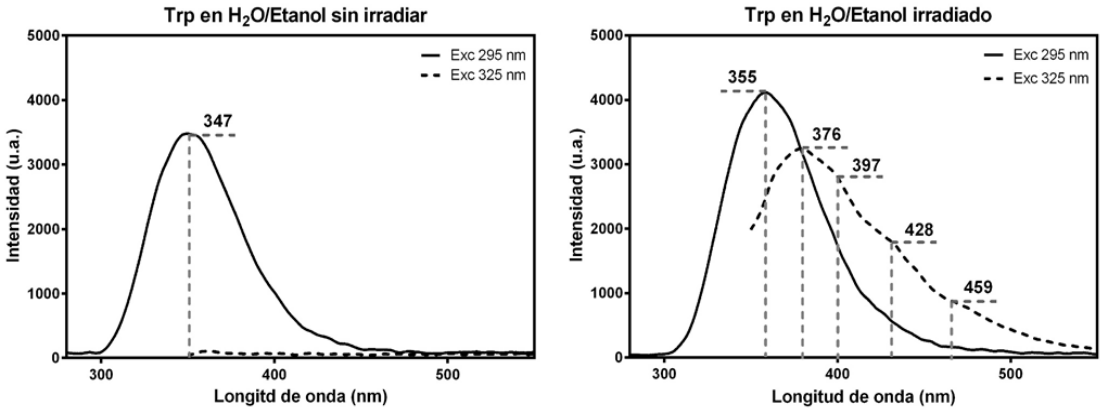

Fig. 3.7 – Espectros de fluorescencia para el Trp sin irradiar (**A**), e irradiado (**B**) en agua/etanol al 30 %v/v. Los valores sobre los picos indican los máximos de emisión.

Davies *et al*., reportó que la fluorescencia del Trp en la estructura de BSA se pierde rápidamente en presencia de radicales •OH después de la irradiación en solución acuosa, con una dosis <1 kGy. Mientras que, la adición de alcohol t-butílico 1 M a la muestra inhibe la desaparición de la fluorescencia del Trp [Davies, *et al*., 1987].

Todos los datos experimentales encontrados y reportados relacionados con el Trp concuerdan con lo informado por Sverdlov, *et al*. Este autor describió la generación de los aductos del Trp, contiendo uno o dos restos hidroxietilo por la irradiación del aminoácido en una solución de etanol 1 M (en ausencia de oxígeno) [Sverdlov, *et al*., 2014].

El estudio de la solución de Tyr irradiada mostró cambios menores en los espectros UV-visible; por lo tanto, no es esperable que se produzcan reacciones de apertura de anillo en este aminoácido ni que se forme algún enlace biTyr, como fue antes descripto. Sin embargo, el análisis de espectrometría de masas mostró un grado parcial de modificación. Este fenómeno podría explicarse por la recombinación de Tyr y HER para generar aductos como los descriptos para el Trp. De manera similar, se demostró la adición de t-butanol al residuo de Tyr en la estructura de la RNAsa A, irradiada en presencia de 0,2 M de este alcohol [Chatgilialoglu, *et al*., 2011].

La solución de Phe irradiada mostró un proceso de degradación insignificante (descripto en Tabla 3.2) mientras que los espectros UV-visible evidenciaron un pequeño aumento en la señal en el rango de 240 a 270 nm, manteniendo el mismo máximo (Fig. 3.6). No es esperable un ataque directo de los radicales HER a Phe. Sin embargo, se ha informado que la interacción de los e_{aq}^- con la Phe contenida en péptidos en solución acuosa (en presencia de t-butanol 1,5 M), muestran las siguientes reacciones principales: (i) desaminación y, (ii) adición de electrones al anillo aromático. Sin embargo, la última reacción es preponderante en péptidos, generando un radical-anión transitorio, que rápidamente es protonado para dar un radical ciclohexadienilo [Mittal and Hayon, 1974; Getoff, 1992; Davies, 2012]. En la solución de Phe libre irradiada, estos radicales podrían evolucionar en una recombinación entre sí para alcanzar dímeros de Phe-Phe (biPhe). Estos dímeros poseen coeficientes de extinción en la región UV aproximadamente cuatro veces más altos que la Phe libre [Kim, *et al*., 1984] y, una ruta de fragmentación bastante similar por análisis MS/MS. Este incremento de absorbancia podría asignarse a la formación de una baja cantidad de biPhe.

En el caso de la His, la irradiación de este aminoácido en una mezcla acuosa de etanol conduce a la aparición de un importante pico de absorción (260-360 nm) en el espectro UV-visible (Fig. 3.6). Este dato coincide con los datos reportados por Garrison

en 1987. Esto demuestra la presencia de estructuras conjugadas de carbono [Garrison, 1987]. Adicionalmente, se determinó una modificación completa de la estructura química de este aminoácido, de acuerdo con el análisis de espectrometría de masas (Tabla 3.2). La química de las reacciones de radicales provenientes de la radiólisis con His es compleja y aún no está completamente resuelta [Davies, 2012]. Sin embargo, se espera la presencia de aductos por reacciones de adición de radicales basados en carbono a la cadena lateral de este aminoácido. Esta suposición se basa en las reacciones de adición descriptas de los HER con los heterocíclicos, como las bases purina y pirimidina [Neta, *et al*., 1996] y; también, en las similitudes químicas entre el imidazol de la His y el indol del Trp.

La solución de Ala irradiada no mostró modificaciones por análisis de MS/MS, mientras que la solución de Cys-sCy se modificó en más del 50 % luego de la irradiación. Sin embargo, en ambos casos no se pudo obtener información adicional mediante las técnicas de espectroscopia de fluorescencia y UV-visible.

En resumen, los radicales HER generan aductos del Trp y posiblemente de His, dada la similitud química/estructural (ambos contienen heterociclos), y en menor extensión de Tyr. No se han reportado pruebas experimentales de adiciones radicalarias o abstracción de H a la cadena polipeptídica de la proteína.

Por otro lado están los e_{aq}^-. Ha sido reportado, hace varias décadas, que estos no son reactivos frente a cadenas hidrocarbonadas, hidroxilos y grupos carboxilo [Anbar, *et al*., 1973]. Sin embargo, por su alto potencial de reducción, es capaz de reaccionar con varios aminoácidos como His, Cys y Cys-sCy con constantes de velocidad del orden de 10^9-10^{10} $M^{-1}s^{-1}$ [Konarska, *et al*., 2018], seguido por la arginina (Arg) y los aminoácidos aromáticos, con constantes de velocidad de 10^8-10^9 $M^{-1}s^{-1}$ [Konarska, *et al*., 2018]. También, se puede producir desaminación sobre aminoácidos simples, como la glicina o Ala, con constantes de velocidad bajas (orden de 10^6-10^7 $M^{-1}s^{-1}$).

Radicales en el medio proteico

La adición de etanol a la estructura de Alb por la irradiación en presencia de este solvente se describió hace más de 35 años utilizando etanol marcado con Carbono-14 [Schuessler, 1981]. Por lo tanto, la adición de los HER es un proceso demostrado. Teniendo en cuenta que la BSA tiene 2 Trp, 28 Phe, 20 Tyr y 17 His formando parte de sus 583 aminoácidos, no es esperable que los aductos de Trp desempeñen un papel predominante en el entrecruzamiento que estabiliza las NPs. Además, según los datos experimentales mostrados anteriormente, los aminoácidos Tyr y Phe tienen una baja

reactividad en estas condiciones de irradiación. En cambio, sí es más probable que la His tenga un rol predominante en el proceso de entrecruzamiento, debido a su capacidad de formación de aductos y su mayor proporción en la estructura de la Alb.

Teniendo en cuenta las posibles modificaciones de la cadena polipeptídica de la BSA como consecuencia de las reacciones de los radicales e_{aq}^-, se ha descrito que el amoníaco es uno de los principales productos de la descomposición de la radiólisis de aminoácidos, dipéptidos y tripéptidos formados por aminoácidos no aromáticos [Garrison, 1987; Shadyro, *et al*., 2000]. La reacción de desaminación reductora ocurre a través de una etapa de adición del e_{aq}^- al carbonilo del enlace peptídico, seguido de la eliminación de una molécula de amoníaco del N-terminal [Shadyro, *et al*., 2000]. Por esta razón, se determinó la concentración de amoníaco en las muestras de aminoácidos individuales y BSA-NPs irradiadas en solución etanólica 30 %v/v. Como resultado, la cuantificación de amoníaco de las soluciones de Ala, Phe y Tyr irradiadas, mostró valores de amoníaco por debajo de 10 µM. Adicionalmente, no se observó un aumento del pH en las muestras después de irradiar de Alb-NPs y aminoácidos. Por lo tanto, el proceso de desaminación, bajo estas condiciones experimentales, puede considerarse insignificante. Adicionalmente, en las estructuras peptídicas, con el incremento del número de aminoácidos no aromáticos, el rendimiento de amoníaco libre disminuye como consecuencia de la adición de e_{aq}^- a los enlaces peptídicos "internos" [Garrison, 1987]. Se ha reportado que la constante de velocidad de esta última reacción es del orden de 10^9 $M^{-1}s^{-1}$ [Garrison, 1987], donde el enlace amida, -CONH-, es la diferencia más relevante con los aminoácidos. Se ha descrito, además, que el enlace -CONH- muestra una afinidad hacia e_{aq}^- que resulta en la formación de macroradicales donde los e^- reciden más probablemente en el carbono-α de los enlaces peptídicos. En ausencia de O_2, estas especies formadas en el medio de la cadena peptídica, evolucionan a recombinarse con otros radicales [Davies, 2012].

Los radicales carbono-α tienen una estabilidad diferente según las estructuras secundarias y terciarias de la proteína, como resultado de las restricciones que dicha estructura juega en las geometrías radicales [Davies, 2012]. Estos radicales evolucionarán hacia otras entidades químicas mediante: (i) reacciones de transferencia de electrones que pueden ocurrir con aceptadores de electrones, como los residuos de Cys-sCy o His y, (ii) la escisión de la cadena polipeptídica, que se cree que es un proceso de menor probabilidad [Davies, 2012].

No obstante, la Alb tiene 35 Cys en su secuencia primaria, 34 de las cuales están involucradas en la formación de puentes disulfuro. Los 17 puentes disulfuro (Cys-sCy) se convierten en el sumidero principal de electrones y equivalentes reductores. Por lo tanto, Cys-sCy (y no Cys libre) juega un papel relevante en el proceso de

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

entrecruzamiento en las condiciones experimentales de irradiación estudiadas (mezcla agua/etanol y dosis de 10 kGy). Este hecho se ha demostrado recientemente mediante experimentos de radiólisis por pulsos de HSA en solución acuosa [Konarska, *et al*., 2018]. Para obtener e_{aq}^-, los autores agregan t-butanol 0,1 M en la solución y degasean con N_2 para eliminar el oxígeno. Bajo estas condiciones de irradiación, se encontraron que las Cys-sCy son los sitios de mayor reactividad hacia los e_{aq}- generando los radicales •Cys-sCy$^-$. Estos radicales tienen un proceso de decaimiento muy lento (escala de tiempo de segundos), especialmente a temperaturas por debajo de 20 °C [Konarska, *et al*., 2018]. La evolución de la adición de estos radicales no fue encontrada, en la escala de microsegundos, mediante experimentos de radiólisis por pulsos. El radical anión disulfuro o pertiil (RSSR$^-$•) formado como resultado de la transferencia de electrones, puede disociarse de manera reversible, para dar el anión (-SR$^-$) y un radical tiil (-RS•) en ausencia de oxígeno [Konarska, *et al*., 2018].

Según trabajos recientes, las modificaciones químicas finales de la Albúmina libre sometida a e_{aq}^- (radiación ionizante sobre una solución conteniendo una baja concentración de alcohol) generan principalmente productos de desulfuración de aminoácidos. Los residuos Met y Cys se convierten en ácido α-aminobutírico y Ala, respectivamente [Salzano, *et al*., 2011; Chatgilialoglu, *et al*., 2011]. La irradiación de HSA, en estas condiciones de generación de e_{aq}^-, mostró la escisión de los disulfuros correspondiente a Cys^{200}-sCy^{246}, Cys^{392}-sCy^{438} y Cys^{514}-sCy^{559} [Chatgilialoglu, *et al*., 2011], proteína que tiene puentes disulfuro equivalentes a la BSA.

Sin embargo, para las condiciones experimentales descriptas en este trabajo (alta proporción de etanol, presencia de agregados de Alb en el medio y dosis de irradiación > 5 kGy) se espera una evolución diferente de los radicales •Cys-sCy generados. Considerando la alta probabilidad de que las 17 Cys-sCy esten involucradas en el proceso de entrecruzamiento, se decidió estudiar el sistema por electroforesis en condiciones reductoras y no reductoras.

Análisis mediante electroforesis SDS-PAGE

Como se observa en la Fig. 3.8, la muestra irradiada de Alb en solución etanólica presenta proteínas libres en la suspensión. Además, las Alb-NPs pueden tener un número desconocido de moléculas de proteínas adsorbidas físicamente a la nanoestructura. Por lo tanto, el análisis por SDS-PAGE se realizó sobre la muestra purificada de NPs.

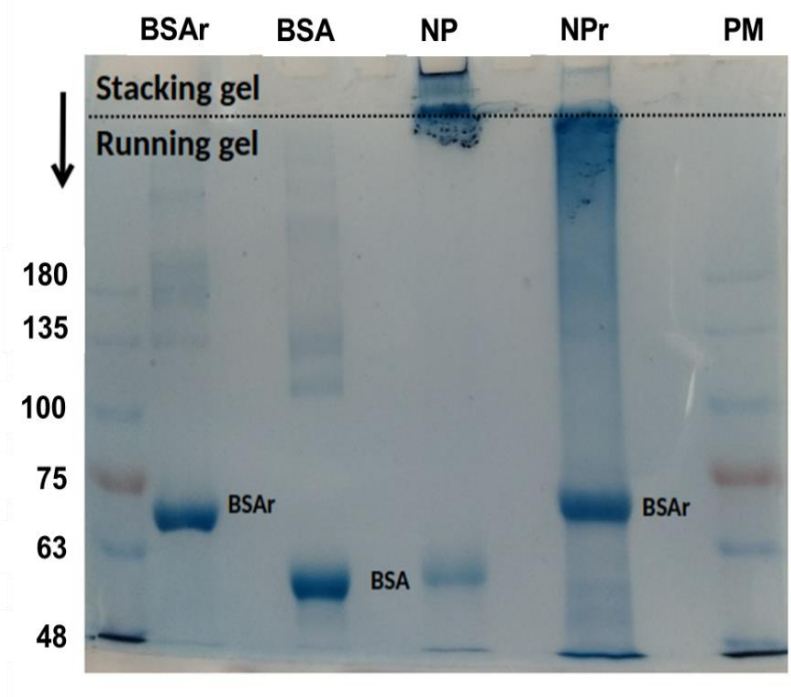

Fig. 3.8 – Gel SDS-PAGE 8 % de BSA-NPs en condiciones estándar (NP) y reductivas (NPr). BSA y BSA tratados con β-mercaptoetanol (BSAr) se agregaron para la comparación.

El gel SDS-PAGE mostró que la mayoría de las proteínas de las BSA-NPs purificadas quedaron retenidas en el gel concentrador ("*stacking gel*") debido al muy alto PM de las mismas. Sólo se pudo encontrar una baja cantidad de BSA, que posiblemente estaba físicamente adsorbida a la superficie de las NPs. Esta misma muestra tratada con β-mercaptoetanol fue sembrada en el gel (condición reductora). En este caso, la nanoconstrucción se dividió en fragmentos (Fig. 3.8, calle correspondiente a NPr), principalmente en dos fracciones, BSA y agregados de PM mayores a 180 kDa. En este caso, no se encontró ninguna otra banda de proteína preponderante.

A partir de estos resultados, se puede concluir que uno de los enlaces relevantes de entrecruzamiento que tiene lugar en las NPs puede reducirse con reactivos reductores de disulfuros. Dado la gran cantidad de Alb liberada de las NPs se puede decir que el proceso de entrecruzamiento a través de puentes disulfuro tiene una gran relevancia en la formación Alb-NPs.

Propuesta de un modelo de entrecruzamiento inducido por la radiación ionizante

En base a los resultados experimentales obtenidos y el estudio de sistemas similares descriptos en bibliografía, se propone el siguiente esquema (Fig. 3.9) para explicar la formación de los enlaces intermoleculares inducidos por la radiación ionizante.

Resumiendo, los radicales HER atacan la proteína para generar aductos, especialmente sobre los aminoácidos His, Tyr y Phe, donde el primero surge como el más importante. Estos aductos son radicales generados sobre la estructura proteica. Los e_{aq}^-, a su vez generarán principalmente •Cys-sCy$^-$, y en menor medida, radicales basados en el carbono-α de la cadena polipeptídica de la proteína. Los radicales •Cys-sCy$^-$ puede clivarse para generar -Cys•.

Los radicales pertiil y tiil son los de mayor vida media, con la consecuente mayor probabilidad de recombinarse con otros radicales. Estos radicales, en ausencia de oxígeno, se desintegrarán principalmente a través de reacciones de recombinación, creando diferentes especies de entrecruzamiento intramolecular, favorecidas por las restricciones impuestas por la estructura proteica secundaria y terciaria, o por la proximidad de otras proteínas, generando en este caso un entrecruzamiento intermolecular.

La recombinación de los radicales pertiil con un radical de carbono generará un nuevo puente disulfuro, como se esquematiza en la Fig. 3.9. Sin embargo, la estructura de este puente disulfuro no será el clásico Cys-sCy, sino que tendrá la forma de Cys-s-R, donde R corresponderá a un aducto de otro aminoácido, muy probablemente His.

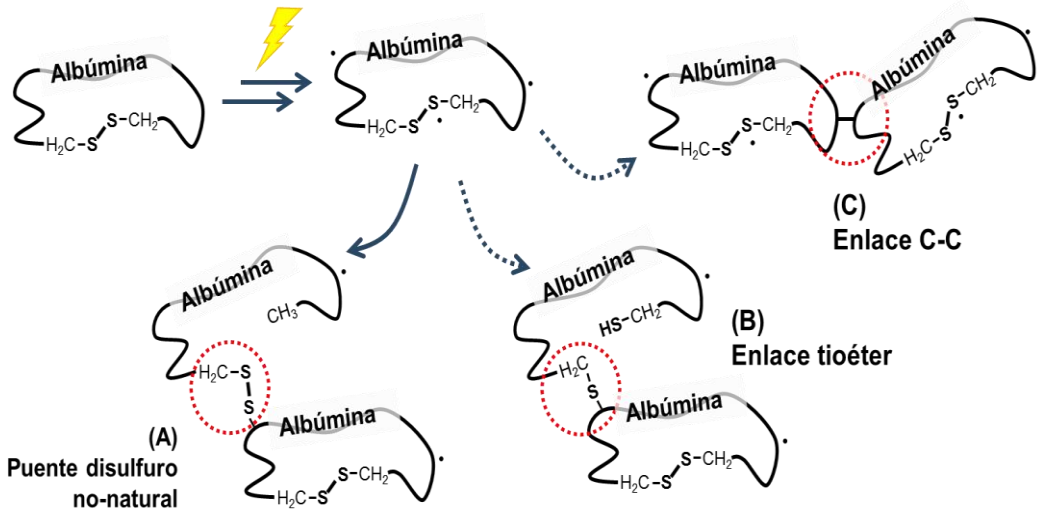

Fig. 3.9 – Esquema propuesto de la vía de entrecruzamiento generada a partir del radical disulfuro proveniente de los e_{aq}^- secuestrados por la Albúmina (según Chatgilialoglu, *et al*., 2011 y Konarska, *et al*., 2018) y de los aductos de aminoácidos generados por los ataques de los radicales HER. La línea continua refiere a un puente disulfuro recién formado (**A**), demostrado por la SDS-PAGE (Fig. 3.8); las líneas punteadas muestran los puentes propuestos para el enlace tioéter (**B**) y, la formación del enlace C-C (**C**) que se mantienen como hipótesis.

La recombinación de los radicales tiil con un radical de carbono generara un nuevo puente tioéter; mientras que la recombinación de dos radicales carbono-α y/o aductos

de radicales, generan una unión C-C, en ausencia de O_2, como se esquematiza en la Fig. 3.9.

La presencia del puente disulfuro fue claramente demostrada por la electroforesis y tiene una gran preponderancia. No se cuentan con datos experimentales que avalen los otros dos tipos de entrecruzamiento. La unión tioéter y C-C son mucho más estables y no son posibles de clivarlas en condiciones suaves. Sin embargo, existen ejemplos de uniones C-C previamente descriptas en la dimerización de di- y tetra-péptidos mediante radiaciones ionizantes [Dizdaroglu and Simic, 1983].

CONCLUSIONES PARCIALES

La preparación de NPs de proteína por entrecruzamiento inducido por radiación es un proceso complejo de reacciones radicalarias. La presencia de concentraciones similares de etanol y agua en el disolvente, sin la adición de otro agente químico y en ausencia de oxígeno, genera principalmente radicales HER. Sin embargo, en la mezcla de reacción debe esperarse la presencia de e_{aq}^-, como consecuencia de que el etanol no es un buen secuestrador de estas especies.

Los radicales HER tienen una reactividad baja y selectiva. Se ha demostrado que los aminoácidos tales como Phe, Tyr y Ala muestran una reactividad muy baja; mientras que los aminoácidos que contienen heterociclos como Trp e His están completamente modificados por las reacciones de adición de estos radicales. Por lo tanto, como consecuencia de la mayor abundancia de His que Trp en la estructura de BSA, la His tendrá un papel preponderante en el proceso de entrecruzamiento.

Las reacciones de los e_{aq}^- con aminoácidos, péptidos y proteínas han sido descriptas por otros autores. El e_{aq}^- tiene un alto potencial de reducción que genera diferentes radicales a partir de las cadenas laterales de los aminoácidos, especialmente los aminoácidos His, Cys, Cys-sCy, Arg y aromáticos, y los radicales centrados en el carbono en el esqueleto de la proteína. Sin embargo, los experimentos recientes de radiólisis por pulsos sobre Alb en condiciones reductoras, mostraron que los restos de Cys-sCy son los sitios más reactivos para generar •Cys-sCy-; y que pueden evolucionar a los radicales tiil y pertiil.

El entrecruzamiento que estabiliza la estructura de las Alb-NPs se puede explicar mayormente por la presencia de nuevos puentes disulfuro. Sin embargo no pueden descartarse la formación de nuevas uniones tioéter y C-C en el entrecruzamiento intermolecular.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

REFERENCIAS

- Akhtar and & Freeman, 1971. Gamma-Radiolysis of liquid ethanol. Yields of hydrogen and free ions. Solvated electron rate constants. *Journal of Physical Chemistry*, 75(18), 2756-2762.

- Alizadeh and Sanche, 2012. Precursors of solvated electrons in radiobiological physics and chemistry. *Chemical reviews*, 112(11), 5578-5602.

- An and Zhang, 2017. Strategies for preparing albumin-based nanoparticles for multifunctional bioimaging and drug delivery. *Theranostics*, 7(15), 3667.

- Anbar, *et al*., 1973. Selected specific rates of reactions of transients from water in aqueous solution. 1. Hydrated electron *(No. COO-38-759; NSRDS-NBS-43)*. Stanford Research Inst., Menlo Park, Calif. (USA); Notre Dame Univ., Ind. (USA). Radiation Lab.

- Audette, *et al*., 2000. Protein gamma-radiolysis in frozen solutions is a macromolecular surface phenomenon: fragmentation of lysozyme, citrate synthase and alpha-lactalbumin in native or denatured states. *International Journal of Radiation Biology*, *76*(5), 673-681.

- Baquey, *et al*., 1970. Radiolysis of 1 M aqueous ethanol solutions of potassium nitrate. *Journal of Physical Chemistry*, 74(24), 4210-4216.

- Boguta and Dancewicz, 1982. Radiolytic dimerization of tyrosine in alkaline solutions of poly-L-tyrosine, glycyl-L-tyrosine and tyrosine. *Radiation Physics and Chemistry* (1977), 20(5-6), 359-363.

- Buxton, *et al*., 1988. Critical review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals ·OH/·O− in aqueous solution. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 17(2), 513-886.

- Chatgilialoglu, *et al.,* 2011. Radiation-induced reductive modifications of sulfur-containing amino acids within peptides and proteins. *Journal of proteomics*, 74(11), 2264-2273.

- Davies, *et al*., 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids. *Journal of Biological Chemistry*, 262(20), 9902-9907.

- Davies, 2012. Oxidative damage to proteins. *Chapter of Encyclopedia of Radicals in Chemistry, Biology and Materials.*

- Dizdaroglu and Simic, 1983. Isolation and characterization of radiation-induced aliphatic peptide dimers. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*, 44(3), 231-239.

- Domingues, *et al*., 2003. Identification of oxidation products and free radicals of tryptophan by mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 14(4), 406-416.

- Dorfman and Taub, 1963. Pulse radiolysis studies. III. Elementary reactions in aqueous ethanol solution. *Journal of the American Chemical Society*, 85(16), 2370-2374.

- Farkas, 2006. Irradiation for better foods. *Trends in food science & technology*, 17(4), 148-152.

- Farkas and Mohácsi-Farkas, 2011. History and future of food irradiation. *Trends in Food Science & Technology*, 22(2), 121-126.

- Ferradini and Jay-Gerin, 2000. The effect of pH on water radiolysis: a still open question—a minireview. *Research on Chemical Intermediates*, 26(6), 549-565.

- Flores, *et al*., 2018. Radiation-induced preparation of core/shell gold/albumin nanoparticles. *Radiation Physics and Chemistry*, 142, 60-64.

- Freeman, 1974. Radiation chemistry of ethanol: A review of data on yields, reaction rate parameters, and spectral properties of transients (No. NSRDS-NBS-48). National Standard Reference Data System.

- Garrison, 1987. Reaction mechanisms in the radiolysis of peptides, polypeptides, and proteins. *Chemical Reviews*, 87(2), 381-398.

- Getoff, 1992. Pulse radiolysis of aromatic amino acids—State of the art. *Amino Acids*, 2(3), 195-214.

- Gieseg, *et al.*, 1993. Protein-bound 3, 4-dihydroxyphenylalanine is a major reductant formed during hydroxyl radical damage to proteins. *Biochemistry*, 32(18), 4780-4786.

- Güven, 2016. Ionizing radiation: a versatile tool for nanostructuring of polymers. *Pure and Applied Chemistry*, 88(10-11), 1049-1061.

- Hawkins and Davies, 2001. Generation and propagation of radical reactions on proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1504(2), 196-219.

- Hiroki, *et al*., 2002. Hydrogen peroxide production in the radiolysis of water with high radical scavenger concentrations. *Journal of Physical Chemistry A*, 106(40), 9352-9358.

- Houée-Levin and Sicard-Roselli, 2001. Radiation chemistry of proteins. *Studies in Physical and Theoretical Chemistry*, 87, 553-584.

- Jha and Freeman, 1972. Effect of pressure on the rates of reaction of solvated electrons in liquid ethanol. *Journal of Chemical Physics*, 57(4), 1408-1414.

- Jithan, *et al*., 2011. Preparation and characterization of albumin nanoparticles encapsulating curcumin intended for the treatment of breast cancer. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 1(2), 119.

- Johnson and Scholes, 1954. Micro-determination of acetaldehyde as its 2: 4-dinitrophenylhydrazone. *Analyst*, 79(937), 217-219.

- Kamarei and Karel, 1983. Effects of ionizing radiation on nitric oxide myoglobin. Part 2 Effects on the globin moiety. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*, 44(2), 135-142.

- Kim, *et al*., 1984. Binding site specificity of gamma-radiation-induced crosslinking between phenylalanine and a phenylalanine-containing tetrapeptide. *Radiation Research*, 100(1), 30-40.

- Konarska, *et al*., 2018. Scavenging of hydrated electron by HSA or Ligand/HSA adduct: Pulse radiolysis study. *Radiation Physics and Chemistry*, 152, 23-35.

- Kuan, *et al.*, 2013. Radiation processing of food proteins–a review on the recent developments. *Trends in Food Science & Technology*, 30(2), 105-120.

- Kume, *et al*., 2009. Status of food irradiation in the world. *Radiation Physics and Chemistry*, 78(3), 222-226.

- Laemmli, 1976. SDS-PAGE to evaluate extent of hydrolysis, of proteins. *Nature*, *227*(5259), 680-685.

- LaVerne, 2000. OH radicals and oxidizing products in the gamma radiolysis of water. *Radiation Research*, 153(2), 196-200.

- LaVerne and Pimblott, 1991. Scavenger and time dependences of radicals and molecular products in the electron radiolysis of water: examination of experiments and models. *Journal of Physical Chemistry*, 95(8), 3196-3206.

- Lynn and Purdie, 1976. Some pulse and gamma radiolysis studies of tyrosine and its glycyl peptides. *International Journal for Radiation Physics and Chemistry*, 8(6), 685-689.

- Mittal and Hayon, 1974. Interaction of hydrated electrons with phenylalanine and related compounds. *Journal of Physical Chemistry*, 78(18), 1790-1794.

- Nauser, *et al.,* 2008. Reversible intramolecular hydrogen transfer between cysteine thiyl radicals and glycine and alanine in model peptides: absolute rate constants derived from pulse radiolysis and laser flash photolysis. *Journal of Physical Chemistry B*, 112(47), 15034-15044.

- Neta, *et al*., 1996. Rate constants for reactions of aliphatic carbon-centered radicals in aqueous solution. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 25(3), 709-1050.

- Okimoto, *et al.*, 2000. A novel fluorescent probe diphenyl-1-pyrenylphosphine to follow lipid peroxidation in cell membranes. *Febs Letters*, 474(2-3), 137-140.

- Orhan, *et al.*, 2004. Simultaneous determination of tyrosine, phenylalanine and deoxyguanosine oxidation products by liquid chromatography–tandem mass spectrometry as non-invasive biomarkers for oxidative damage. *Journal of Chromatography B*, 799(2), 245-254.

- Queiroz, *et al*., 2016. Radiation-synthesized protein-based drug carriers: Size-controlled BSA nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 85, 82-91.

- Ressouany, *et al*., 1998. Irradiation dose and calcium effect on the mechanical properties of cross-linked caseinate films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(4), 1618-1623.

- Roux, *et al*., 1973. The radiolysis of binary ethanol-water mixtures. *International Journal for Radiation Physics and Chemistry*, 5(3), 309-322.

- Salzano, *et al.,* 2011. Human serum albumin modifications associated with reductive radical stress. *Molecular BioSystems*, 7(3), 889-898.

- Schuessler, 1981. Reactions of ethanol and formate radicals with ribonuclease A and bovine serum albumin in radiolysis. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*, 40(5), 483-492.

- Schuessler and Schilling, 1984. Oxygen effect in the radiolysis of proteins: Part 2 bovine serum albumin. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*, 45(3), 267-281.

- Shadyro, *et al*., 2000. Deamination and degradation of hydroxyl-containing dipeptides and tripeptides in the radiolysis of their aqueous solutions. *High Energy Chemistry*, 34(5), 290-294.

- Simic, 1978. Radiation chemistry of amino acids and peptides in aqueous solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26(1), 6-14.

- Simic, *et al*., 1969. Pulse radiolysis study of alcohols in aqueous solution. *Journal of Physical Chemistry*, 73(11), 3794-3800.

- Singh and Vadasz, 1983. Effect of gamma radiation on E. *coli* ribosomes. I. Inactivation by hydrogen atoms, hydroxyl radicals, hydrated electrons and secondary radicals. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*, 44(6), 601-606.

- Siri, *et al.,* 2016. Albumin-based nanoparticle trehalose lyophilisation stress-down to preserve structure/function and enhanced binding. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 126, 66-74.

- Siri, *et al.*, 2017. Albumin Nanocarriers, γ-Irradiated Crosslinked, Combined with Therapeutic Drugs for Cancer Therapy. *Current pharmaceutical design*, 23(35), 5272-5282.

- Soto Espinoza, *et al.*, 2012. Radiation synthesis of seroalbumin nanoparticles. *Radiation Physics and Chemistry*, 81(9), 1417-1421.

- Štefanić and LaVerne, 2002. Temperature dependence of the hydrogen peroxide production in the γ-radiolysis of water. *Journal of Physical Chemistry A*, 106(2), 447-452.

- Sverdlov, *et al.*, 2014. Interaction of tryptophan and related compounds with oxygen-and carbon-centered radicals. *Free Radical Research*, 48(10), 1200-1205.

- Szafulera, *et al*., 2018. Radiation synthesis of biocompatible hydrogels of dextran methacrylate. *Radiation Physics and Chemistry*, en prensa.

- Takagi and Ishigure, 1985. Thermal decomposition of hydrogen peroxide and its effect on reactor water monitoring of boiling water reactors. *Nuclear Science and Engineering*, 89(2), 177-186.

- Taub and Dorfman, 1962. Pulse radiolysis studies. II. Transient spectra and rate processes in irradiated ethanol and aqueous ethanol solution. *Journal of the American Chemical Society*, 84(21), 4053-4059.

- Tuma, *et al.*, 1987. Covalent binding of acetaldehyde to proteins: participation of lysine residues. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 11(6), 579-584.

- Varca, *et al.*, 2016. Synthesis of papain nanoparticles by electron beam irradiation. A pathway for controlled enzyme crosslinking. *International Journal of Biological Macromolecules*, 92, 654-659.

- Wickern, *et al*., 1997a. Determination of g-radiation induced products in aqueous solutions of tryptophan and synthesis of 4-, 6-and 7-hydroxytryptophan. *Journal of Chromatography-A incl Cumulative Indexes*, 786(1), 57-66.

- Wickern, *et al.*, 1997b. HPLC analysis of γ-irradiation-induced products of tryptophan in peptides and lysozyme. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*, 205(6), 446-451.

- Zhang and Mittal, 2010. Biodegradable protein-based films from plant resources: A review. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 29(2), 203-220.

- Zhou, *et al*., 2016. Human serum albumin nanoparticles as a novel delivery system for cabazitaxel. *Anticancer Research*, 36(4), 1649-1656.

CAPÍTULO IV. PREPARACIÓN DE NPs HÍBRIDAS ORO/PROTEÍNA

Con el objetivo de darle mayor funcionalidad a las NPs de proteína, en este Capítulo se describe la introducción de un *core* de oro a las mismas. Como se describe en la Introducción, las Au-NPs están siendo intensamente estudiadas por sus propiedades plasmónicas. Sin embargo, estas NPs tiene varios problemas de biocompatibilidad y estabilidad.

La funcionalización de la superficie de las Au-NPs les proporciona solubilidad, estabilidad y capacidad de interacción con células y/u otras biomoléculas. Además de mejorar sus propiedades fisicoquímicas, la modificación de la superficie con proteínas aumenta la biocompatibilidad en comparación con las Au-NPs estabilizadas por citrato de sodio. Sin embargo, la mayoría de las proteínas pierden parcialmente su conformación nativa cuando interactúan con la superficie altamente estructurada de las NPs [Tsai, *et al*., 2011]. Por lo tanto, los sitios de reconocimiento de proteínas disponibles en su superficie son parcialmente perdidos por esta interacción, ya que existe un grado de desnaturalización.

A partir del método descripto en el Capítulo II se estudiará la preparación de NPs híbridas de oro y Albúmina (HNPs). Se caracterizarán las nanoestructuras obtenidas, y se pondrán a punto las condiciones óptimas de preparación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la preparación de las NPs, se utilizó cloruro áurico (III) hidratado ($HAuCl_4$. X H_2O) y BSA Fracción V, ambos provenientes de Sigma Aldrich. La Alb sérica humana (HSA) fue donada por el *Laboratorio de Hemoterapia* de la *Universidad Nacional de Córdoba*. Todos los demás reactivos fueron de grado analítico.

Preparación de nanopartículas de oro/Albúmina

Esta preparación se llevo a cabo en un protocolo de tres pasos. Primero, se realizó la síntesis de las Au-NPs según el método descripto por Frens que implica la reducción del oro mediante citrato de sodio [Frens, 1973]. Para ello, se prepararon las soluciones de cloruro áurico 1 mM y citrato de sodio 39 mM (Merck), ambas en agua bidestilada.

El cloruro áurico se calentó en una plancha calefactora con agitación constante. Una vez en ebullición, se le agregó el citrato de sodio de manera rápida continuando

con la agitación en caliente por 15 min. Luego se apagó la plancha calefactora, dejando la dispersión por 15 min más en agitación. Posteriormente, se guardaron las Au-NPs a 5 °C (heladera) y oscuridad. Esta síntesis se llevó a cabo en un medio acuoso para obtener un sistema nanoestructurado compatible con medios biológicos.

En un segundo paso, las Au-NPs ($9{,}81 \times 10^{11}$ NPs/mL) se dispersaron en diferentes soluciones de Albúminas. Se prepararon Au-NPs recubiertas con HSA, BSA y una mezcla de HSA/BSA con una concentración máxima de proteína ensayada de 30 mg/ml.

Luego del agregado de la Alb a las Au-NPs, se procedió a añadir, gota a gota, etanol absoluto frío hasta una concentración final de 30 %v/v, en agitación constante. Finalmente, se procedió a la irradiación de las muestras con rayos gamma provenientes de una fuente de Cobalto-60 (PISI CNEA-Ezeiza). La tasa de dosis utilizada fue 1 kGy/h y la dosis total fue 10 kGy. Durante la irradiación, se mantuvo la temperatura de la muestra en el rango de 5-10 °C.

Las Au-NPs recubiertas con una monocapa de Albúmina (Alb_m/Au-NPs), utilizadas como control de los ensayos de funcionalidad, se prepararon a partir de una solución de proteína a una concentración de 1 mg/ml. Estas NPs no son irradiadas.

Determinación de condiciones óptimas para la preparación de HNPs

Se determinaron las mejores condiciones de concentración de proteína y etanol para la obtención de HNPs. Para ello, se dispersaron 500 µl de Au-NPs en diferentes soluciones de HSA. Las concentraciones ensayadas de proteína fueron 0, 2,5, 5, 10 y 15 mg/ml, todas preparadas en agua bidestilada. Luego, se añadieron diferentes cantidades de etanol absoluto (30, 40 y 50 %v/v), gota a gota, a la solución de oro y Alb, manteniendo la temperatura a 0 ºC y la agitación constante.

La suspensión etanólica final se irradió con una dosis de 10 kGy a una tasa de dosis de 1 kGy/h. La temperatura de las muestras se mantuvo entre 5-10 °C durante el proceso de irradiación. Cabe destacar, que las muestras fueron burbujeadas con N_2 con el fin de desplazar el oxígeno, antes de irradiar. Los resultados fueron analizados por espectroscopía UV-visible y DLS.

Posteriormente, se procedió al estudio de la dosis de irradiación mínima requerida para la obtención de dichas NPs. Para ello, se irradiaron muestras a las dosis comprendidas entre 0-10 kGy, con una tasa de dosis fija de 1 KGy/h. Los resultados fueron analizados por espectroscopía UV-visible.

Espectroscopía UV-visible

Se le midió el espectro de absorbancia en el rango de 220 a 800 nm, con un espectrofotómetro Shimadzu UV160U, siguiendo el mismo protocolo descipto en el Capítulo II.

Además, se realizó una curva de calibración para poder determinar la cantidad de NPs por litro de suspensión. Para ello, se realizaron diluciones seriadas en agua bidestilada a partir de la suspensión madre de Au-NPs 0,91 mM. Esta concentración se dividió por la masa del Au (196,96 g) y se multiplicó por 1000, para obtener los kg/l de Au.

A partir del diámetro hidrodinámico promedio obtenido por DLS para las Au-NPs (26,25 nm), se calculó el radio y el volumen de una NP (aplicando la fórmula: volumen = $\frac{3}{4}*\pi*r^3$). Este último por la densidad del oro (19.300 kg/m^3) da finalmente la masa de una Au-NP.

Los kg/l de Au se dividieron por la masa de una NP. Este calculo teórico se hizo con cada dilución seriada y, se relacionó con la absorbancia a 520 nm medida para cada una. De esta manera se construyó un grafico de NPs/l frente a la absorbancia a 520 nm y se obtuvo la curva de regresión correspondiente.

Todo este cálculo se realizó también para las HNPs y Alb_m/Au-NPs, considerando el pico de absorbancia máxima a 534 nm.

Acondicionamiento/Purificación

Una vez irradiadas, las muestras fueron purificadas mediante CEM. Para ello, se preparó una columna de cromatografía G-200 (*Pharmacia Fine Chemicals*) con un volumen de matriz de 19 ml. Se utilizó agua bidestilada como fase móvil y se purificaron 0,5 ml de muestra. Se recolectaron fracciones de elución de 0,5 ml, a las cuales se les midió la absorbancia en 280 nm y 534 nm.

Previo a la cromatografía, las NPs fueron acondicionadas por CEM con G-25 como matriz (columnas comerciales PD10, GE Healthcare). Para ello, 2,5 ml de muestra fueron pasadas por la PD10 y eluídas en un volumen final de 3,5 ml (el buffer de elución puede ser agua bidestilada o PBS, dependiendo del caso).

Como método alternativo de purificación por CEM se utilizó la centrifugación. En este caso, las muestras fueron centrifugadas en dos ciclos de 20 min cada uno a 14.000 rpm, manteniendo la temperatura a 4 °C. La centrifuga utilizada fue marca Eppendorf, modelo 5804R, con control de temperatura. El pellet de NPs, se redispersó en agua bidestilada en todos los casos, a menos que se indique lo contrario.

Determinación de tamaño y morfología de las NPs

El tamaño de partícula se determinó mediante dos técnicas: dispersión dinámica de la luz (DLS) y microscopía de transmisión electrónica (TEM).

En el DLS, las muestras se midieron a 25 °C usando el analizador de tamaño de partícula 90Plus/Bi-MAS (Brookhaven Instruments Corporation), descripto en el Capítulo II.

Previo a la determinación del tamaño hidrodinámico, las NPs fueron acondicionadas por CEM, con una columna PD10. Se partió de 1 ml de muestra, y se eluyeron 1,5 ml en agua bidestilada.

Las imágenes de TEM fueron capturadas en el *Centro de Microscopías Avanzadas (CMA)* de la *Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA*), mediante el equipo Philips EM 301. Mediante esta técnica, se determinó tamaño y morfología de las NPs. Para ello, las muestras se purificaron por centrifugación en un ciclo a 14.000 rpm durante 20 min y, se redispersaron en agua bidestilada antes de la medición. Además, las HNPs fueron teñidas con acetato de uranilo por 2 min previo a la observación. Todas las mediciones se llevaron a cabo dentro de los 30 días posteriores a la preparación de la muestra.

Microscopía de fuerza atómica (AFM)

Se utilizó esta técnica para caracterizar las H(HSA)-NPs irradiadas. Para ello, las nanoestructuras fueron purificadas mediante centrifugación (3 ciclos de 20 min cada uno a 14.000 rpm y 4 °C). Las imágenes fueron tomadas en modo *Peak Force*, mediante el equipo Dimension Icon in Peak Force QNM (PFQNM) (Bruker). Durante la medición, se utilizaron puntas de nitruro de silicio rectangulares con una constante nominal de resorte 0,8 N/m y un radio de punta de 5 nm.

Este estudio se realizó en colaboración con los investigadores Constanza Flores del *LaMaBio* y, Beatriz F. de Carvalho Patricio y Gilberto Weismüller, del *Institute of Biophysics* de la *Universidade Federal do Rio de Janeiro* (Brasil).

Determinación de Potencial Z (ZP)

El ZP de las H(HSA)-NPs y HSA_m/Au-NPs purificadas fue determinado mediante el equipo Zeta Potential Malvern. La mediación se realizó en BP y los resultados fueron comparados con los datos de ZP para la HSA y Au-NPs reportados en bibliografía.

Caracterización mediante FT-IR

La espectroscopía FT-IR se realizó con el equipo Shimadzu FT-IR Affinity equipado con un módulo de reflectancia total atenuada GladiATR (PIKE Technologies). Los espectros se registraron colectando 64 barridos de la muestra, con una resolución de 1 cm^{-1}. Los datos fueron analizados con el software *IR Solution*, comparando los espectros obtenidos para las Au-NPs, Alb y HNPs.

Electroforesis SDS-PAGE

Las NPs se analizaron utilizando electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). Para ello, siguiendo el protocolo descripto por Laemmli, se preparó un gel 8 % [Laemmli, 1976]. El gel se corrió con una corriente de 12 mA, en un sistema de electroforesis Mini-Protean (BioRad), y se tiñó con Amido Black. Las muestras, previamente estandarizadas de acuerdo a la cantidad de Au-NPs, se prepararon en buffer de siembra *(sample buffer)* con β-mercaptoetanol.

Estabilidad del recubrimiento proteico

Se determinó mediante la disolución de las Au-NPs en presencia de una solución de cianuro. Para ello, se incubaron 670 µL de HNPs con 330 µL de KCN 0,2 mM a 40 °C. En varias ocasiones, se determinó el espectro de absorbancia para corroborar la pérdida del pico de resonancia de plasmón característico de las NPs.

Análisis mediante dicroísmo circular

Una vez disuelto el oro de las HNPs con KCN, se procedió a realizar el análisis de la estructura de las proteínas mediante CD a 20 °C. Se estudiaron las H(BSA)-NPs irradiadas a distintas dosis (1, 5 y 10 KGy). Para ello, se estandarizaron las muestras por absorbancia en buffer fosfato 50 mM, pH 7 y se compararon con el análisis mediante esta técnica de una solución de Albúmina sin irradiar, en igual concentración.

Reconocimiento Albúmina/Anticuerpo α-BSA

Se estudió el reconocimiento entre las proteínas que forman las NPs con el anticuerpo α-BSA inmovilizado.

Las NPs ensayadas fueron las H(BSA)-NPs irradiadas y las BSA_m/Au-NPs (preparadas por adsorción física de la BSA sobre la superficie del oro). Ambas nanoestructuras fueron purificadas antes de realizar el experimento.

Se inmovilizó el anticuerpo policlonal en una membrana *Unique membrane* (Oxyphen AG), diámetro de poros 320 nm y fluencia de 10^9 poros/cm^2. La concentración de anticuerpo fue 0,1 mg/ml en PBS. La incubación de las membranas

con el anticuerpo se realizó por 2 h a temperatura ambiente y agitación suave. Posteriormente, las membranas fueron incubadas con caseína 3 % por 2 h y lavadas con PBS-T (PBS con el agregado de 0,5 % de Tween 20). El tratamiento con las NPs se realizó durante ON con 200 µl de NPs en buffer Na_2CO_3 0,1 M, pH 9. Finalmente, las membranas fueron lavadas con PBS y comparadas entre sí. Como control negativo se utilizó una membrana incubada con caseína 3 % en lugar de anticuerpos, por 2 h. Este control siguió los mismos pasos de incubación con las NPs.

RESULTADOS

Preparación de NPs

Las nanopartículas plasmónicas están constituidas principalmente por núcleos de Au o Ag, caracterizados por la presencia de bandas de resonancia de plasmón de superficie localizadas (LSPR), en el rango espectral UV-visible e IR cercano.

La frecuencia de la LSPR es característica del tamaño y la forma de la nanoestructura y, también es extremadamente sensible a pequeños cambios en el entorno físicoquímico que rodea a las NPs. A menudo, se suele utilizar esta LSPR para caracterizar nanoestrusturas y monitorear sus modificaciones [Giner-Casares, *et al*., 2016].

La modificación superficial de las Au-NPs con diferentes biomoléculas se ha utilizado durante varias décadas en pruebas de diagnóstico rápido. Estas constituyen uno de los nanomateriales más estudiados para la detección y diagnóstico bioquímicos. En los últimos años, las Au-NPs han demostrado ser útiles en aplicaciones de terapia, imágenes y administración [Boisselier and Astruc, 2009; Ghosh and Pal, 2007; Janib, *et al*., 2010]. Adicionalmente, es conocido que el cuerpo humano es capaz de tolerar una cantidad del orden de gramos de este material sin efectos secundarios [Nie and Chen, 2012], lo que ha llevado a un creciente interés en el desarrollo de nuevos avances en nanotecnología “teranóstica” a partir de estos nanomateriales [Janib, *et al*., 2010] .

Aprovechando estas características de las NPs plasmónicas, y con el fin de mejorar la estabilidad de los materiales nanoestructurados basados en Au-NPs, se propuso la preparación de NPs híbridas (HNPs). Se buscó, mediante el recubrimiento de las Au-NPs con una multicapa de Alb (estabilizada por radiación ionizante), obtener una nanoestructura híbrida (oro/proteína) con la potencialidad de ser aplicada en Nanomedicina.

Como se discutió en el Capítulo II, es posible preparar Alb-NPs mediante un proceso en etapas, donde primero tiene lugar la agregación de las proteínas por la adición de etanol frío, seguido de la estabilización de las nanoestructuras inducida por la irradiación de las muetras con rayos gamma o pulsos de electrones. Aprovechando este conocimiento, se procedió a preparar Au-NPs recubiertas por Alb.

El esquema de preparación de estas NPs híbridas (Fig. 4.1) involucró los siguientes pasos: i) síntesis de Au-NPs mediante la utilización de citrato de sodio como agente estabilizante, ii) recubrimiento de las Au-NPs con Alb en presencia de etanol absoluto, iii) irradiación de las muestras con rayos gamma. La imagen que se observa en la Fig. 4.1, corresponde a un vial de HNPs post-irradiación, donde la muestra fue iluminada con un láser rojo. Puede observarse el efecto Tyndall producto de la dispersión de la luz por la presencia de NPs en el medio.

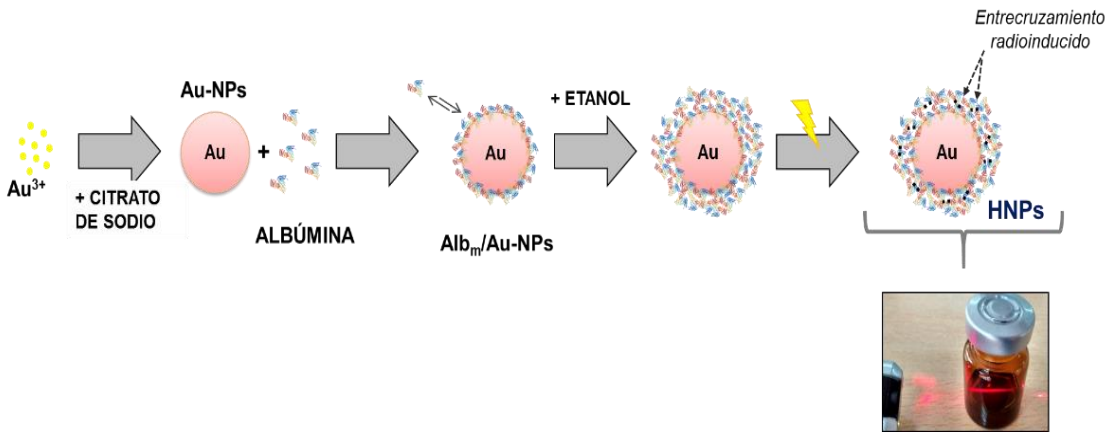

Fig. 4.1 – Esquema de preparación de NPs híbridas.

Con este método, se prepararon HNPs que pueden estar recubiertas con HSA, BSA y una mezcla de HSA/BSA. Para nombrar las distintas preparaciones de HNPs se utilizarán las siguientes abreviaturas: i) H(HSA)-NPs, para las recubiertas con HSA; ii) H(BSA)-NPs, en el caso de un recubrimiento de BSA; y, iii) H(HSA/BSA)-NPs para las NPs preparadas a partir de la mezcla de proteínas. La abreviación HNPs, que corresponde a las NPs híbridas oro/Alb, se utilizará para referirse a éstas cuando no sea necesaria la descripción del tipo de proteína que la compone. Cabe destacar que estas NPs son el producto final del proceso de preparación, por lo que si o si pasaron por la etapa de irradiación.

Las nanoestructuras preparadas a partir de la adsorción física de una monocapa de Alb sobre la superficie de las Au-NPs, se denominarán Alb_m/Au-NPs, donde Alb

podrá ser reemplazado por HSA, BSA o HSA/BSA según corresponda. Estas NPs, se preparan en ausencia de etanol y no son irradiadas.

Caracterización de Au-NPs

La síntesis de las Au-NPs se realizó según el método de Frens, para obtener NPs en el rango de 20 a 30 nm [Frens, 1973]. Esta síntesis se lleva a cabo en un medio acuoso para evitar la presencia de solventes orgánicos u otros ligandos hidrófobos que pueden contaminar la superficie de la NPs.

Las Au-NPs son muy sensibles al medio ambiente y se agregan fácilmente por la presencia de diferentes solutos [Chegel, *et al*., 2012]. Estos cambios pueden ser estudiados, como ya se mencionó, por el monitoreo de la señal de LSPR, midiendo la absorbancia de las muestras en la región visible del espetro electromagnético. Por lo tanto, esto puede ser usado como una técnica muy sensible para seguir los cambios en la superficie de las NPs.

La caracterización de las Au-NPs se realizó por las técnicas de espectroscopía UV-visible (señal LSPR), DLS y TEM. La Fig. 4.2 resume los resultados obtenidos.

El espectro de absorbancia característico de las Au-NPs se observa en la Fig. 4.2(A). El pico máximo en 520 nm corresponde a las bandas de LSPR. La dispersión de las Au-NPs obtenidas tiene una coloración rojiza, típica de este tipo de NPs. El color de la dispersión permite tener una aproximación rápida del estado de la muestra. En el caso de que las Au-NPs se agreguen, el color de la dispersión se volverá de color violeta.

En la Fig. 4.2(B), se observa el histograma de tamaño obtenido mediante DLS. Se comprobó un diámetro hidrodinámico promedio de 33 nm y la presencia de un agregado de NPs en menor proporción.

Para estudiar la forma de las NPs, se tomaron imágenes TEM (Fig. 4.2(C)). Se observó una preparación de NPs monodispersa, de forma esféricas. Adicionalmente, esta técnica permitió calcular el tamaño de las nanoestructuras. A partir del análisis de las imágenes, se construyó un histograma de tamaño que se muestra en la Fig. 4.2(D). Por esta técnica se confirmó un diámetro promedio para las nanoestructuras de 23 nm.

Es notable que la determinación de tamaño por las técnicas DLS y TEM dan distintos valores. La diferencia se encuentra bajo el error de dispersión de la muestra y en que ambas técnicas son distintas entre sí (por DLS se determina el radio hidrodinámico de las NPs).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

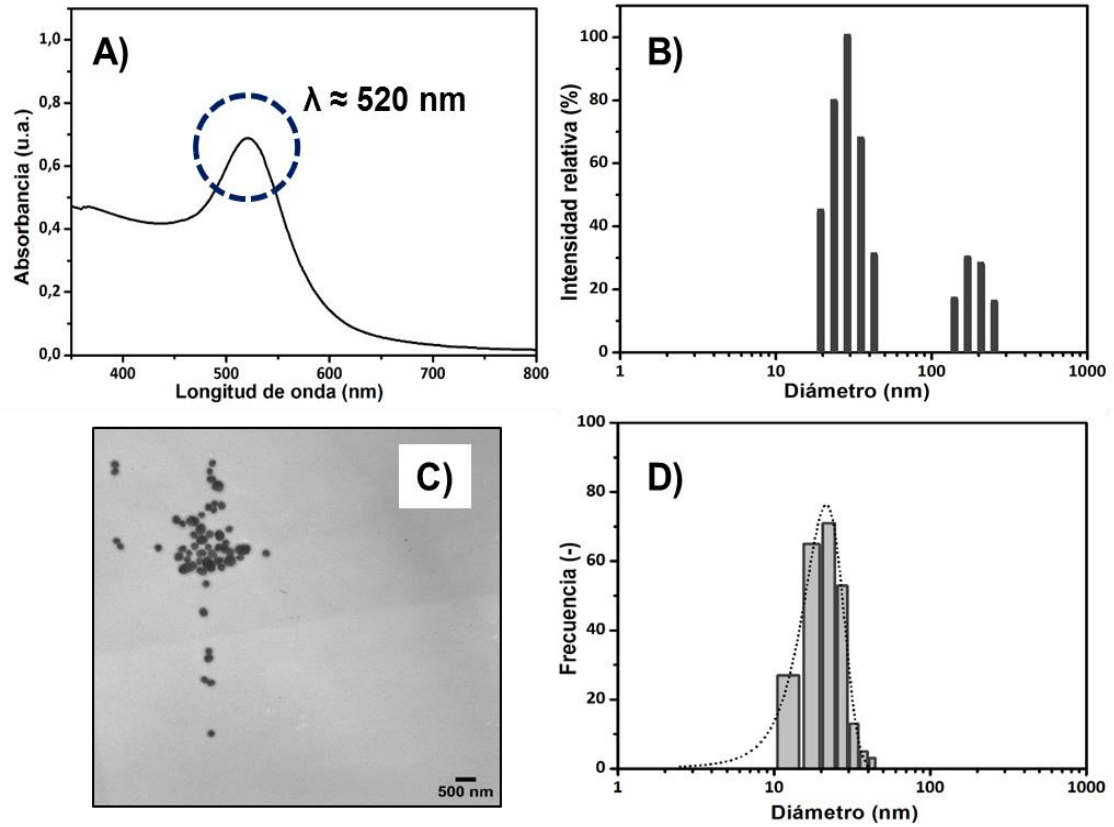

Fig. 4.2 – Caracterización de Au-NPs. Espectro UV-visible (**A**). Histograma de tamaño hidrodinámico por DLS (**B**). Imagen TEM (**C**). Histograma de tamaño a partir de imágenes TEM (**D**).

Para calcular la cantidad de NPs/l, se partió del diámetro hidrodinámico promedio obtenido por DLS para las Au-NPs (26,25 nm). Se calculó el volumen y la masa de una NP (según lo descripto en “Materiales y métodos”) y estos valores se relacionaron con la concentración de oro en las NPs. De esta manera, se obtuvo la cantidad de NPs/l en diluciones seriadas preparadas a partir de una suspensión madre de Au-NPs. A dichas diluciones se les midió la absorbancia a 520 nm (señal LSPR) y con estos datos se construyó el gráfico de la Fig. 4.3. La ecuación de la recta obtenida es la que permitió realizar el calculo de NPs/l, donde la variable y representa la absorbancia a 520 nm de la dispersión de NPs y, la pendiende es la concentración. El R^2 de esta recta fue 0,99957.

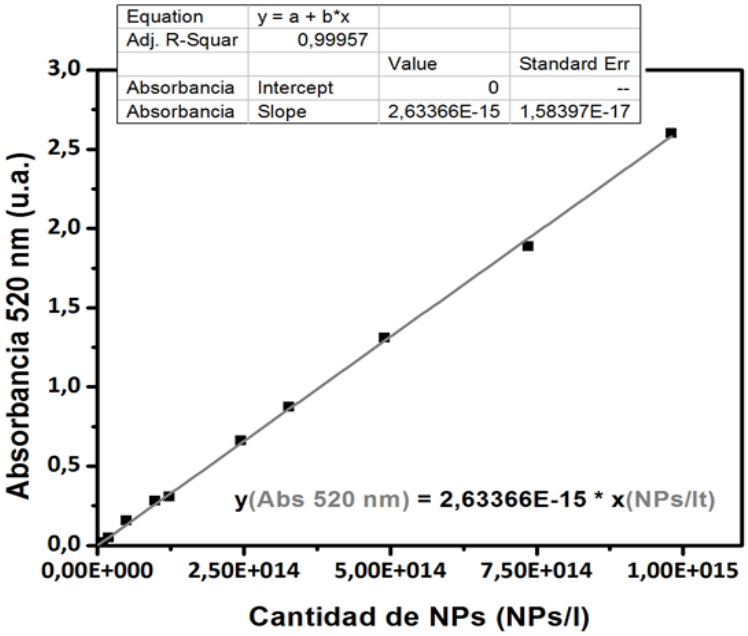

Fig. 4.3 – Curva de cantidad de NPs/l para las Au-NPs. La ecuación de regresión (ver gráfico) tiene un R^2 de 0,99957.

Determinación de condiciones óptimas para la preparación de HNPs

Con el objetivo de determinar la concentración de etanol necesaria para obtener NPs de un diámetro adecuado para su uso en Nanomedicina, se irradiaron muestras de oro/Alb, específicamente H(HSA)-NPs, en presencia de distintas concentraciones de etanol.

Actualmente se estima que el diámetro adecuado de NPs para aplicaciones *in vivo* en terapias para cáncer debe estar en el rango de 10 a 100 nm [Davis, *et al*., 2009]. El límite inferior se basa en la medición de los coeficientes de filtración de los capilares glomerulares, ya que se estima que el umbral para la eliminación en un primer paso por los riñones es de 10 nm (diámetro) [Venturoli and Rippe, 2005]. El limite superior es motivo de mayor debate y dependerá de la estrategia de ingreso a las células. En el caso de desear una internalización específica, a través de la endocitosis mediada por caveolina o clatrina, las NPs no deben tener diámetros superiores a 100 nm aunque dicho valor depende del tipo de células blanco [Behzadi, *et al*., 2017].

Se prepararon muestras con el agregado de 30, 40 y 50 %v/v de etanol, en las cuales la concentración de la proteína de recubrimiento se mantuvo constante (15 mg/ml). En la Fig. 4.4, se observan los espectros UV-visible de las distintas preparaciones antes y después de irradiar con una dosis de 10 kGy, en ausencia de

oxígeno y manteniendo la temperatura por debajo de los 10 °C durante todo el proceso.

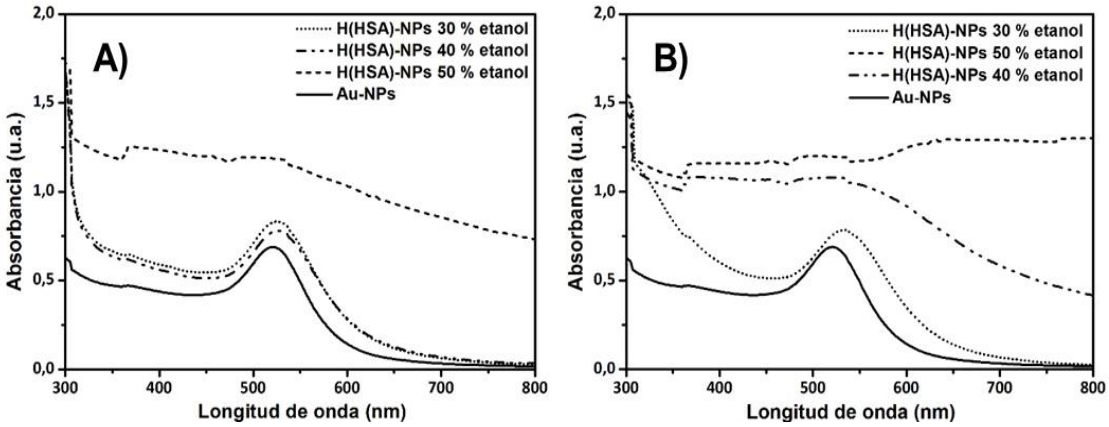

Fig. 4.4 – Espectro UV-visible de NPs preparadas con distinto porcentaje de etanol, antes de irradiar (**A**), y post-irradiación (**B**). Las Au-NPs se incorporan al gráfico para estudios basados en las bandas de LSPR. Concentración de NPs: 2,6x10^{14} NPs/l (Au-NPs) y 2,2x10^{14} NPs/l (demás muestras).

Como puede observarse, el espectro correspondiente a la preparación de las NPs con 30 %v/v de etanol mostró un desplazamiento de las señal de LSPR a longitudes de onda mayores que las Au-NPs estabilizadas con citrato de sodio. El pico de resonancia de plasmón de las H(HSA)-NPs tiene un máximo entre 532-534 nm. Se obseró un aumento entre 12 a 14 nm en esta señal con respecto a las Au-NPs. Este comportamiento se atribuye a cambios en el entorno de las Au-NPs asociados al recubrimiento con Albúmina.

Cuando se utilizó una concentración de etanol 40 %v/v en la preparación de las NPs, también se observó un corrimiento de la señal de LSPR pero el espectro mostró algunas distorsiones posteriores a la irradiación. Sin embargo, con el agregado de 50 %v/v de etanol a las muestras, la forma característica de las bandas de LSPR se pierde y, consecuentemente, se produce la agregación de las NPs.

En la Tabla 4.1, se detallan los valores de diámetro hidrodinámico promedio obtenidos mediante DLS para dichas muestras. Como se puede observar, con el agregado de 30 %v/v de etanol se obtienen HNPs con un diámetro menor a 100 nm. De acuerdo con estos resultados, el agregado de esta concentración de etanol es la que permitió obtener NPs dispersas de tamaño nanométrico, manteniendo las características típicas de la señal de LSPR de las Au-NPs.

MUESTRA	DIÁMETRO (nm)
Au-NPs	33 ± 10
H(HSA)-NPs en 30 % etanol	78 ± 5
H(HSA)-NPs en 40 % etanol	5650 ± 4000
H(HSA)-NPs en 50 % etanol	6400 ± 5000

Tabla 4.1 – Diámetro y desviación estándar de las muestras irradiadas en 30, 40 y 50 %v/v de etanol, determinados por DLS.

Una vez fijada esta concentración de etanol para la preparación de las HNPs, se procedió a estudiar la cantidad de proteína necesaria para el recubrimiento de las NPs y las diferencias, en caso de que existan, en utilizar Albúmina de distinta fuente (humana y bovina).

En la Fig. 4.5(A), se pueden observar los espectros de absorbancia de las Au-NPs recubiertas con distintas concentraciones de Alb. En estas muestras, la cantidad de Au-NPs se mantuvo constante mientras que lo único que se varió fue la cantidad de proteína desde 2,5, 5, 10 a 15 mg/ml.

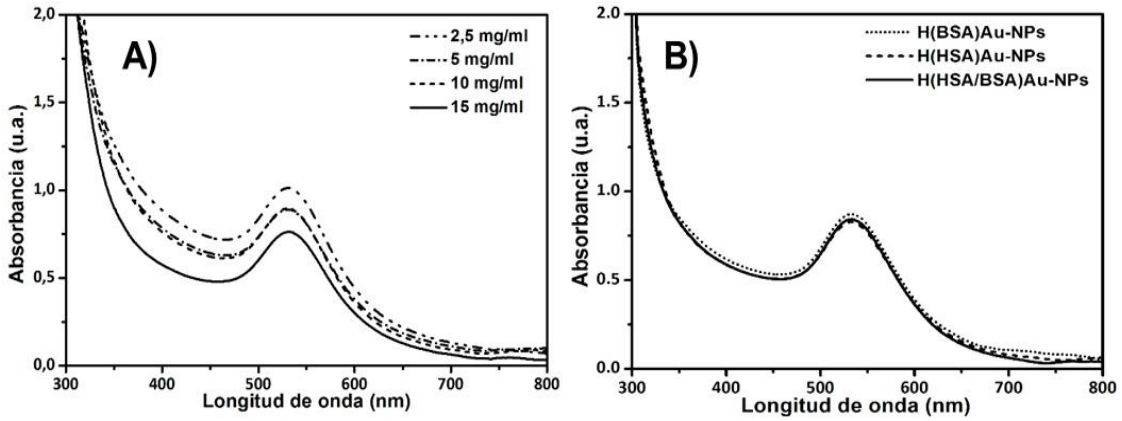

Fig. 4.5 – Espectros UV-visible de HNPs recubiertas con 2,5, 5, 10 y 15 mg/ml de HSA (**A**); y preparadas a partir de diferentes Albúminas (HSA, BSA y HSA/BSA) (**B)**.

No se observó corrimiento del pico de plasmón para las distintas concentraciones de Alb; sin embargo, sí se registró una disminución en la intensidad del mismo a mayores concentraciones de proteína. Este comportamiento también se ha informado para otras moléculas [Ghosh and Pal, 2007; Link and El-Sayed, 1999]. Se eligió la concentración de HSA 15 mg/ml para la preparación de las H(HSA)-NPs. Para el caso de las H(BSA)-NPs se encontró que 30 mg/ml es la cantidad de proteína óptima para

el recubrimiento. Las H(HSA/BSA)-NPs se prepararon a partir de una mezcla de 30 mg/ml de BSA y 15 mg/ml de HSA. Con el fin de determinar la presencia de cambios en las nanoestructuras por el recubrimiento de Alb de diferentes fuentes, es que se irradiaron preparaciones con Albúmina bovina, humana y una mezcla 2:1 (BSA/HSA). En la Fig. 4.5(B), se observa el espectro de absorbancia UV-visible de estas NPs. No se hallaron diferencias en la señal de LSPR para las NPs con los distintos recubrimientos. De acá en adelante, las muestras fueron preparadas en las condiciones descriptas como óptimas.

A las muestras irradiadas con distinta concentración de proteína se les determinó el tamaño hidrodinámico por DLS. Los resultados obtenidos se observan en la Fig. 4.6. En todos los casos, se obtuvieron histogramas que presentan tres poblaciones de tamaño. La de menor diámetro (de hasta 10 nm), puede adjudicarse a la presencia de proteína libre. La siguiente población en tamaño corresponde a las HNPs, mientras que además se observan la presencia de agregados (población con un diámetro mayor a 100 nm). Estos resultados confirmaron la necesidad de la purificación de las muestras post-irradiación.

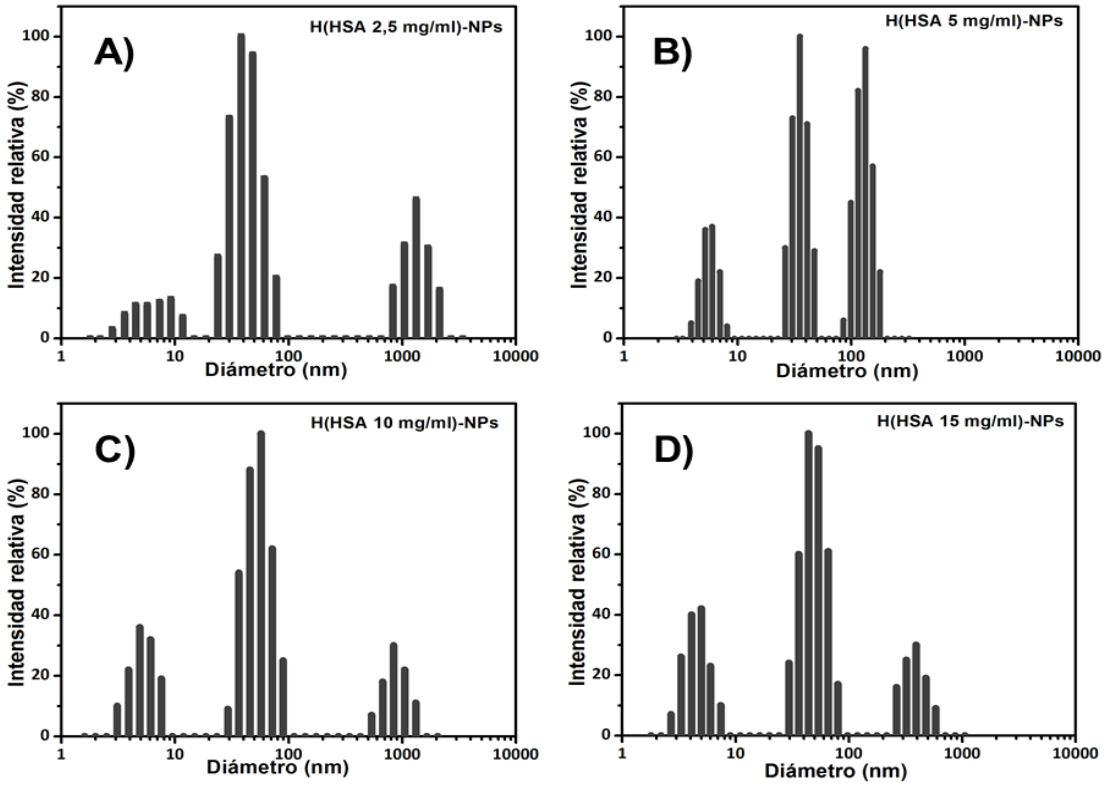

Fig. 4.6 – Histogramas de tamaño de Au-NPs recubiertas con 2,5, 5, 10 y 15 mg/ml de HSA.

Está reportado que la Alb y las Au-NPs interactúan espontáneamente con una constante del orden µM [Brewer, *et al*., 2005]. Sin embargo, la Alb, como la mayoría de las proteínas, pierde parcialmente su conformación nativa cuando interactúa con la superficie altamente estructurada de las Au-NPs [Tsai, *et al*., 2011]. Por lo tanto, los sitios de reconocimiento de proteínas, disponibles en la superficie, se pierden parcialmente como consecuencia de esta interacción, lo que afecta la bioreactividad general de las NPs [Saptarshi, *et al*., 2013]. Además, los principales inconvenientes se encuentran cuando las Au-NPs se utilizan en mezclas complejas o en aplicaciones *in vivo*. En estos casos, hay numerosas adsorciones de diferentes proteínas séricas donde las más abundantes inicialmente pueden ocupar la superficie y posteriormente, ser reemplazadas por otras proteínas con mayor capacidad de unión a las mismas. Durante estos procesos de intercambio de proteínas de la superficie de las NPs, es muy posible adquirir un plegamiento anormal inducido por la interacción con la nanoestructura. Dichos cambios conformacionales pueden alterar la función de la proteína nativa e incluso conducir a la exposición de epítopes no nativos que pueden resultar en el reconocimiento de las NPs por el sistema inmunológico [Saptarshi, *et al*., 2013].

La modificación superficial de las Au-NPs, con una estructura estable, es hoy en día foco de estudio. Es conocido que al estar en contacto con el suero humano, las NPs son recubiertas con proteínas plasmáticas, que pueden intercambiarse con los ligandos superficiales de las NPs. El sistema inmune y el efecto corona, son las barreras más importantes que deberán sortear las NPs *in vivo*, para poder ser usadas en aplicaciones teranósticas.

Como se mencionó, el estudio de las condiciones óptimas para la preparación de HNPs, se realizó irradiando las muestras con rayos gamma, a una dosis de 10 kGy y una tasa de dosis de 1 kGy/h. En base a estos parámetros de irradiación, se determinaron la concentración de Alb de recubrimiento y la concentración de etanol necesario para la obtención de NPs con un tamaño menor a 100 nm.

En un siguiente experimento, se buscó la determinación de la dosis mínima de irradiación requerida para la preparación de las HNPs. Para ello, muestras conteniendo 30 mg/ml de BSA y 30 %v/v de etanol fueron irradiadas en el intervalo de 0-10 kGy, con una tasa de dosis fija de 1 kGy/h. En la Fig. 4.7, se representan gráficamente los cambios en el pico de absorbancia de la resonancia de plasmón en función de la dosis de irradiación.

Se analizaron dos parámetros de absorbancia de plasmón, el máximo de la longitud de onda del pico de resonancia de plasmón y la intensidad máxima relativa

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

(respecto a la misma muestra no irradiada). La longitud de onda máxima del pico mostró un corrimiento de 528 ± 2 nm a 534 ± 2 nm. Se produjo un cambio brusco de este parámetro en el rango de 0,5-1 kGy. El otro parámetro estudiado, la absorbancia relativa del pico máximo, disminuyó de 0,97 a 0,83 ± 0,07 cuando la dosis de irradiación total aumentó. Tal como se representa en la Fig. 4.6, el cambio en la absorbancia tuvo lugar en la misma dosis que la otra variable. Este valor de dosis mínima fue menor que la dosis de irradiación requerida para preparar NPs de Albúmina por irradiación con haz de electrones (descripto en el Capítulo II). Por lo tanto, se podría especular que el núcleo de Au-NPs capturó parte de la energía y la liberó, aportándola al proceso de entrecruzamiento de proteínas, y por lo tanto, a la estabilización del recubrimiento.

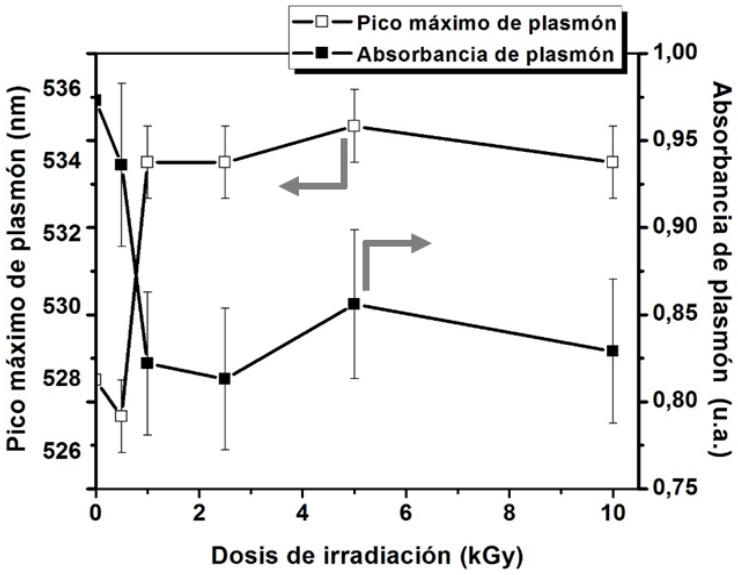

Fig. 4.7 – Características de la señal LSPR a distintas dosis de irradiación. El *eje y* izquierdo representa la longitud onda máxima del pico de plasmón, mientras que el *eje y* derecho representa la absorbancia del pico de plasmón.

Caracterización de HNPs

La caracterización de las HNPs se realizó por varias técnicas. Muestras de H(HSA)-NPs preparadas con 15 mg/ml de HSA y 30 %v/v de etanol, fueron irradiadas con rayos gamma (dosis: 10 kGy). El tamaño de las mismas fue determinado por DLS y TEM. El análisis de DLS, se observa en la Fig. 4.8(A). Esta muestra fue acondicionada previamente mediante el pasaje por una columna PD10. Este paso se realizó con el objetivo de cambiar el medio etanólico en el que se irradiaron las muestras a medio acuoso.

En el histograma de tamaño obtenido por DLS, se pudo observar la presencia de Alb libre como contaminante (partículas de aproximadamente 3-5 nm de diámetro) en las muetras de H(HSA)-NPs. Como se mencionó anteriormente, este resultado confirma la necesidad de la purificación de las muestras post-irradiación. Más allá de esta observación, en dicho histograma se registraron una familia, con un diámetro hidrodinámico promedio de 60 nm que se atribuyó a las HNPs y, la presencia de agregados.

La Fig. 4.8(B), corresponde a la imagen de TEM de las H(HSA)-NPs. Para este ensayo, las muestras fueron purificadas por un ciclo de centrifugación a 14.000 rpm, 4 °C por 20 min. Para poder observar las proteínas, se procedió a realizarles una tinción negativa con acetato de uranilo por 2 min.

Al observar las muestras al microscopio, se comprobó una estructura tipo núcleo/coraza (*core/shell*), con el centro metálico de oro y un "halo" de proteínas recubriéndolo. Las imágenes obtenidas fueron usadas para construir el histograma de tamaño de las nanoestructuras (Fig. 4.8(C)). Por esta técnica, se determinó un diámetro promedio de 52 nm para las HNPs.

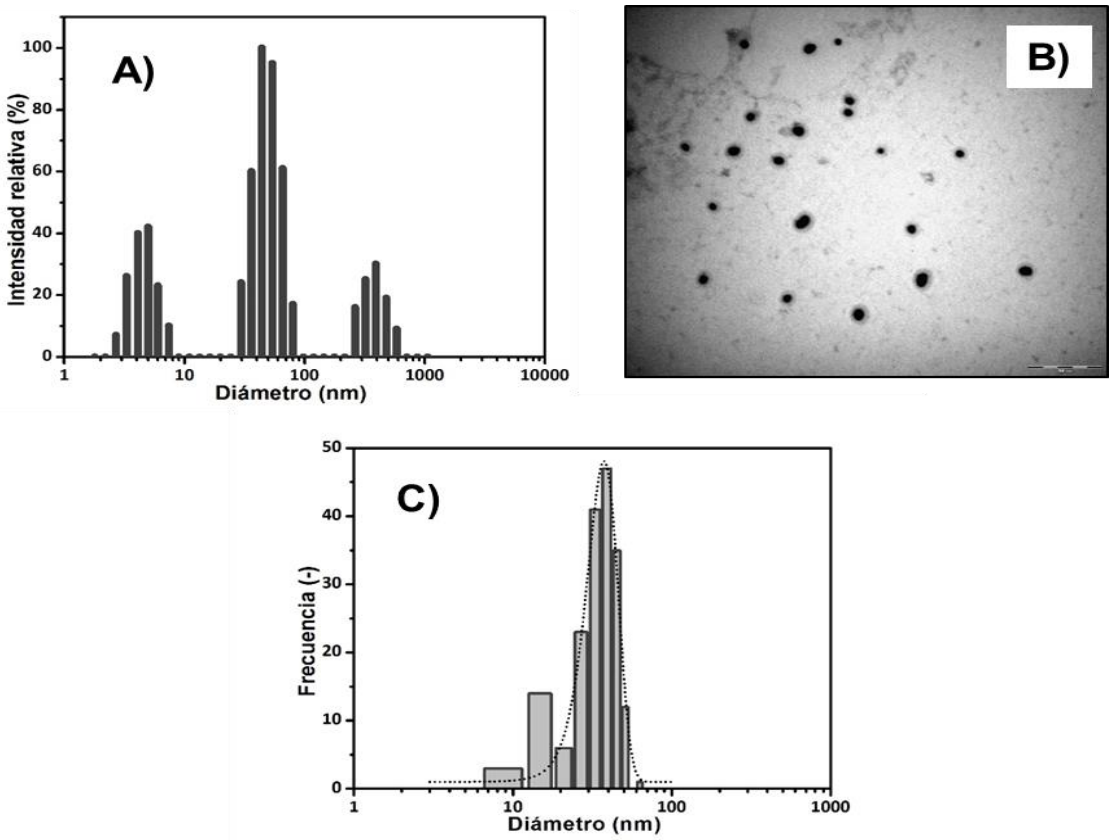

Fig. 4.8 – Caracterización de H(HSA)-NPs: histogramas de tamaño obtenidos por DLS (**A**), por TEM (**C**), e imagen de TEM (**B**).

A partir del diámetro hidrodinámico promedio obtenido por DLS para las HNPs, se calculó la cantidad de NPs por litro (basado en el contenido de oro de las mismas). Esto se relacionó con la absorbancia a 534 nm a partir de la medición de dilusiones seriadas con una concentración de oro conocida, y con estos datos se construyeron curvas de calibración. En la Fig. 4.9, se observa el gráfico correspondiente a las H(HSA)-NPs.

Este procedimiento (descripto anteriormente para las Au-NPs), se realizó para todas las HNPs (recubiertas de HSA, BSA y HSA/BSA) y para las NPs monocapa preparadas a partir de BSA. Los resultados se resumen en la Tabla 4.2.

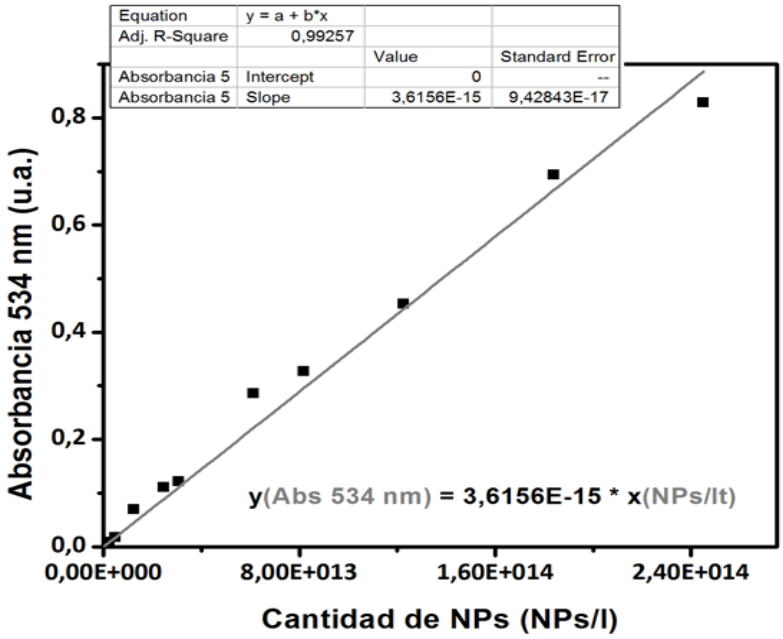

Fig. 4.9 – Curvas de cantidad de NPs/l para las H(HSA)-NPs.

MUESTRA	ECUACIÓN DE LA RECTA	R^2
Au-NPs	Y (Abs_{520}) = 2,6337x10^{-15} * X (NPs/l)	0,99957
H(HSA)-NPs	Y (Abs_{534}) = 3,6156x10^{-15} * X (NPs/l)	0,99257
H(BSA)-NPs	Y (Abs_{534}) = 3,5607x10^{-15} * X (NPs/l)	0,99843
H(HSA/BSA)-NPs	Y (Abs_{534}) = 3,4177x10^{-15} * X (NPs/l)	0,99534
BSA_m/Au-NPs	Y (Abs_{534}) = 2,7787x10^{-15} * X (NPs/l)	0,95749

Tabla 4.2 – Resumen de las ecuaciones de la recta halladas para las distintas NPs y sus errores asociados.

La ecuación de la recta hallada en cada caso nos permitió calcular la cantidad de NPs/l partiendo de la señal LSPR. Es importante destacar que estos cálculos están basados en la cantidad de oro presente en las muestras.

Purificación de las HNPs

Como se comprobó, la purificación de las NPs es un paso crucial para el posterior estudio de las muestras. En la Fig. 4.10, se observan imágenes de las HNPs tomadas por TEM. Las primeras dos imágenes (Fig. 4.10(A) y (B)) corresponden a muestras sin purificar donde se observa la presencia de Alb como contaminante de las NPs. Sin embargo, las otras dos (Fig. 4.10(C) y (D)), fueron tomadas de una muestra purificada por centrifugación. En este caso, se puede distinguir bien la morfología de las HNPs. Por esta razón, se estudiaron dos técnicas de purificación, centrifugación y CEM con la matriz G-200 (CEM G-200). Además de un previo acondicionamiento de las muestras por CEM, con la columna comercial PD10.

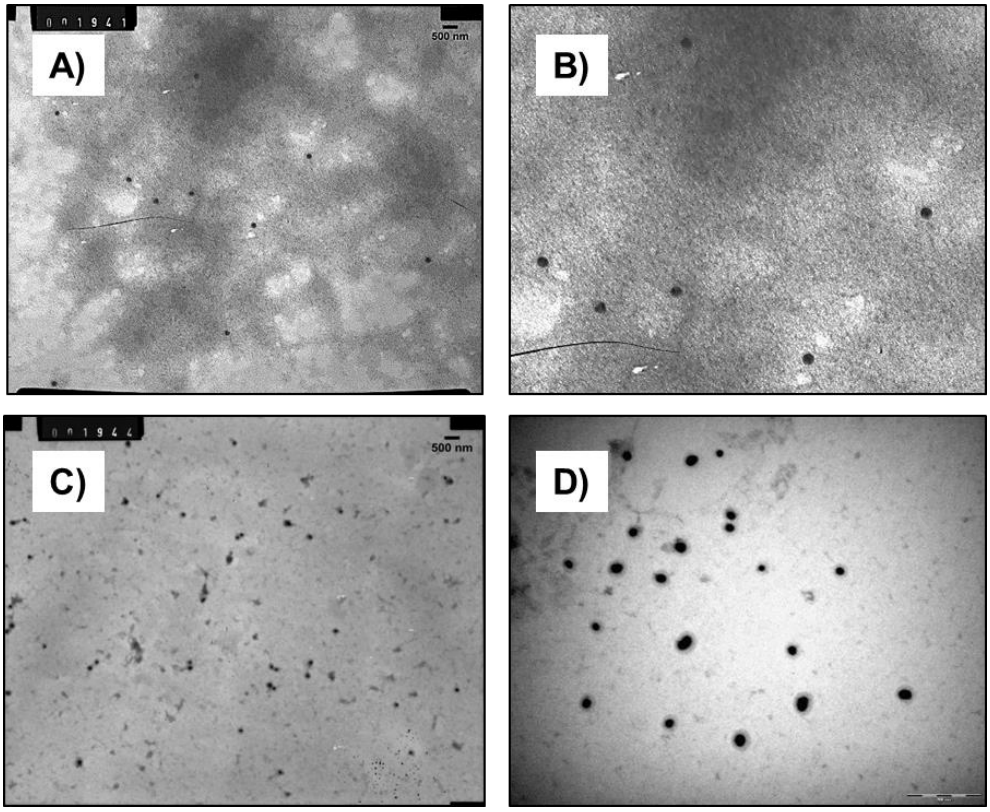

Fig. 4.10 – Imágenes TEM de las HNPs sin purificar (**A** y **B**), y purificadas por centrifugación (**C** y **D**). Las proteínas son teñidas con acetato de uranilo para poder ser observadas por esta técnica.

Las columnas PD10 (Sephadex G-25), se utilizan para la desalinización e intercambio de buffer, así como para la eliminación de compuestos de bajo peso

molecular. El acondicionamiento de las HNPs permite la eliminación de la solución etanólica después de la irradiación. Como resultado indeseado, la muestra es diluída pero es un paso necesario antes de poder realizar a purificación por CEM con G-200 como matriz, para evitar la compactación de la columna y la consecuente perdida de resolución de la misma.

En la Fig. 4.11(A), se observa la imagen correspondiente al pasaje de Au-NPs; mientras que las HNPs se corresponden con las Fig. 4.11(B) y (C). Las Au-NPs se precipitan y por ello se ven de color violáceo oscuro, demostrando así la inestabilidad de las mismas. Esto demuestra que mediante esta técnica no es posible el cambio de solvente de las Au-NPs.

En cambio, las HNPs no precipitan durante el paso de acondicionamiento por PD10. En la imagen puede verse que mantienen su coloración característica tanto durante el pasaje por la columna (Fig. 4.11(B)) como al salir de ella (Fig. 4.11(C)).

Es importante resaltar que mediante esta columna no se prifican las NPs. Éstas solo eliminan los solutos de bajo peso molecular (por eso es una una técnica de desalado de muestras). Las proteínas que no estén formando parte de la multicapa de las NPs no podrán ser eliminadas mediante esta técnica.

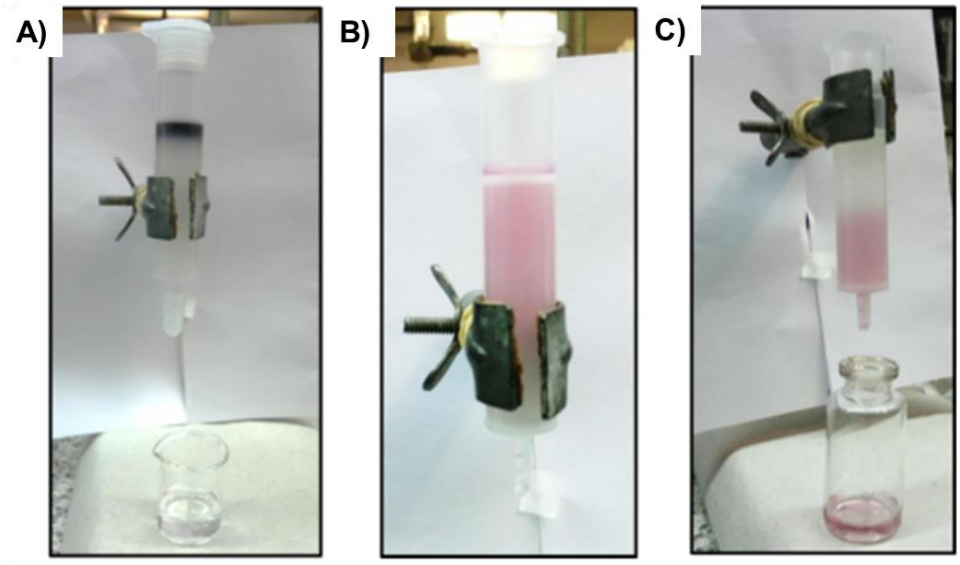

Fig. 4.11 – Acondicionamiento mediante CEM G-25, de las Au-NPs (**A**), y HNPs (**B** y **C**).

Como se mencionó, se estudió la purificación de las muestras por las técnicas de centrifigación y CEM para eliminar el exceso de proteínas libres. Al someter las NPs a centrifugación, las mismas forman un pellet que puede ser redispersado en buffer o agua. Para eliminar los restos de Albúmina, que no forman parte de la multicapa de proteína de recubrimiento, son necesarios tres pasos de centrifugación consecutivos,

con recambio de solvente entre dichos paso. Esta técnica se llevó a cabo en tubos de 1,5 ml, diluyendo las muestras de NPs tres veces. Cada ciclo se realizó a 14.000 rpm por 20 min y a 4 °C. La Fig. 4.12, corresponde al DLS de una muestra de HNPs, purificada por centrifugación, donde se observa que se genera el agregado de NPs.

La purificación de las NPs mediante CEM se realizó en una columna de Sephadex G-200 (volumen de lecho: 19 mL). Esta matriz de gel-dextrano, permite el fraccionamiento de proteínas con pesos moleculares entre 1.000 y 200.000.

Previo al pasaje de las muestras, se equilibró con agua bidestilada y se realizó un paso de acondicionamiento de las HNPs por columna PD10, con el objetivo de eliminar el etanol, siguiendo el procedimiento antes descripto. Luego, 500 µl de la muestra en solución acuosa fueron sembrados en la columna CEM G-200.

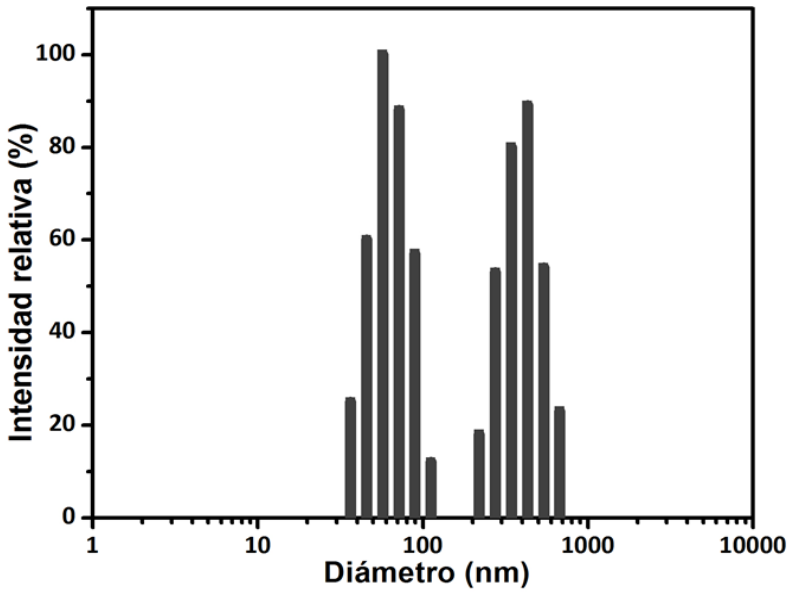

Fig. 4.12 – Purificación de HNPs mediante tres ciclos de centrifugación. Análisis de distribución de tamaño por DLS.

La elución se realizó en agua bidestilada y se recolectaron fracciones de 500 µl. El cromatograma se observa en la Fig. 4.13. Los gráficos A y B de la figura, corresponden a las medidas de absorbancia de las fracciones de elución a 280 nm (proteínas) y 530 nm (señal de LSPR de las Au-NPs), respectivamente. Como puede observarse, a los 6 ml de elución se encuentra la máxima absorbancia tanto a 280 nm como a 530 nm. En el gráfico A, también se observa un pico ancho, que sale entre los 8 y 13 ml de elución, que corresponde a la proteína libre. Este pico no aparece en el grafico B, por lo que se puede afirmar que en esa fracción no contiene Au-NPs ni HNPs.

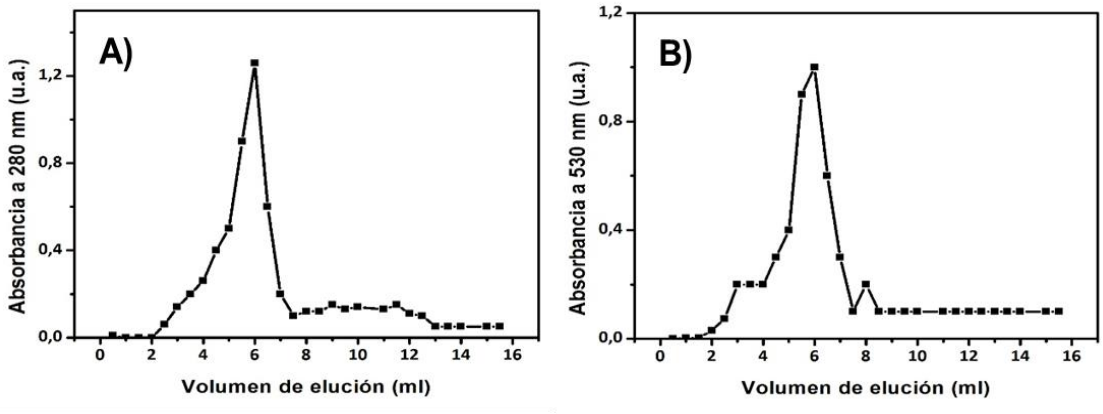

Fig. 4.13 – Cromatograma de purificación de HNPs mediante la CEM G-200, medido a 280 y 530 nm.

A continuación, se analizaron por DLS las fracciones 8 y 12 (que corresponden a los pico de absorbancia a 530 nm registrados a los 4 ml y 6 ml de elución). En la Fig. 4.14, se obsevan los histogramas de tamaño.

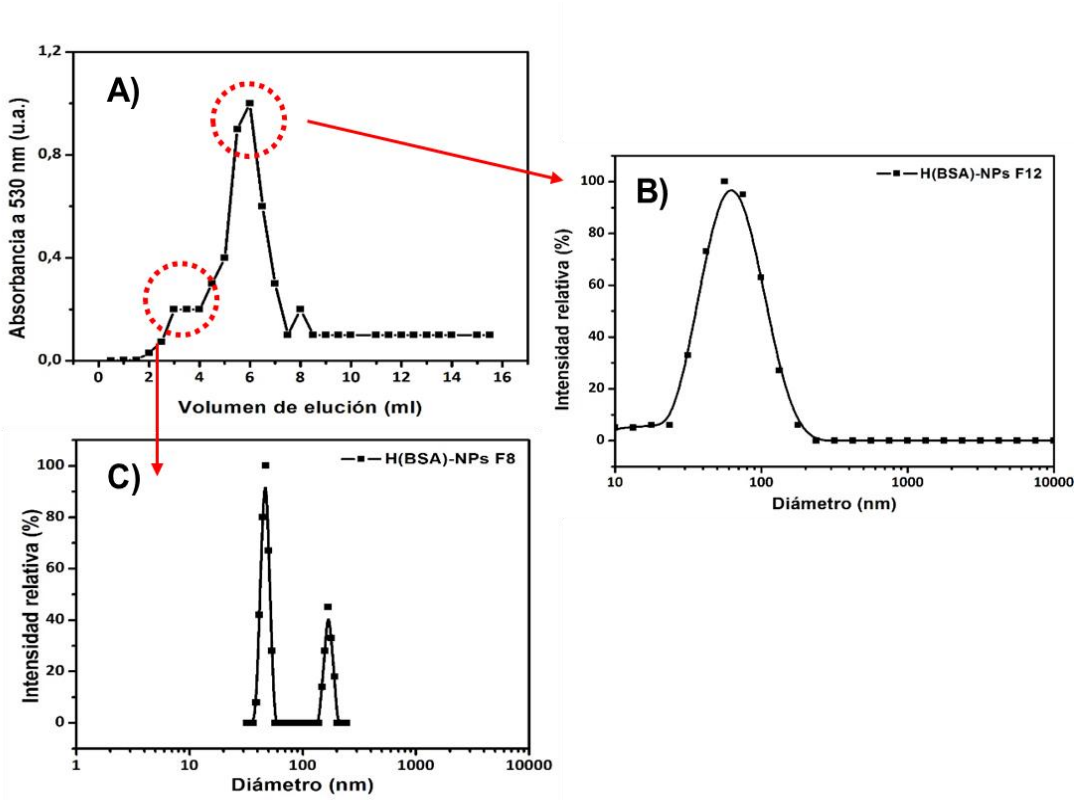

Fig. 4.14 – Análisis de tamaño por DLS de las fracciones de elución marcadas en el perfil de purificación de las HNPs (**A**). Diagramas de distribución de tamaño correspondientes a la fracción 12 (**B**) y a la fracción 8 (**C**) determinados por DLS.

En la Fig. 4.14(C) se encontró que el pico de absorbancia que presenta la fracción 8 (4 ml de elución), esta compuesto por NPs del tamaño de las HNPs, y de la presencia de agregados (con un porcentaje de intensidad relativa cercano al 50 %).

Sin embargo, en la Fig. 4.14(B), se observa que la fracción 12 está compuesta por las NPs con un tamaño promedio de 60 nm.

Como conclusión, las columnas de CEM G-200, permitieron la purificación de las HNPs. A partir del pasaje de las muestras por las mismas, podemos separar las NPs de los agregados y de las proteínas que no forman parte de la multicapa de recubrimiento.

Microscopía de fuerza atómica (AFM)

La microscopía de fuerza atómica líquida (AFM) permite analizar muestras en medios acuosos como tomar imágenes de las NPs en su entorno natural y en forma 3D. En la Fig. 4.15 se muestra una imagen obtenida para las H(HSA)-NPs. Se pueden observar la coexistencia de nanoestructuras de diferentes tamaños. Las nanoestructuras de mayor tamaño se asignaron a las HNPs. Es notable en la imagen la rugosidad y la heterogeneidad que presentan estas NPs que puede deberse al proceso de recubrimiento y de entrecruzamiento mediado por radiación.

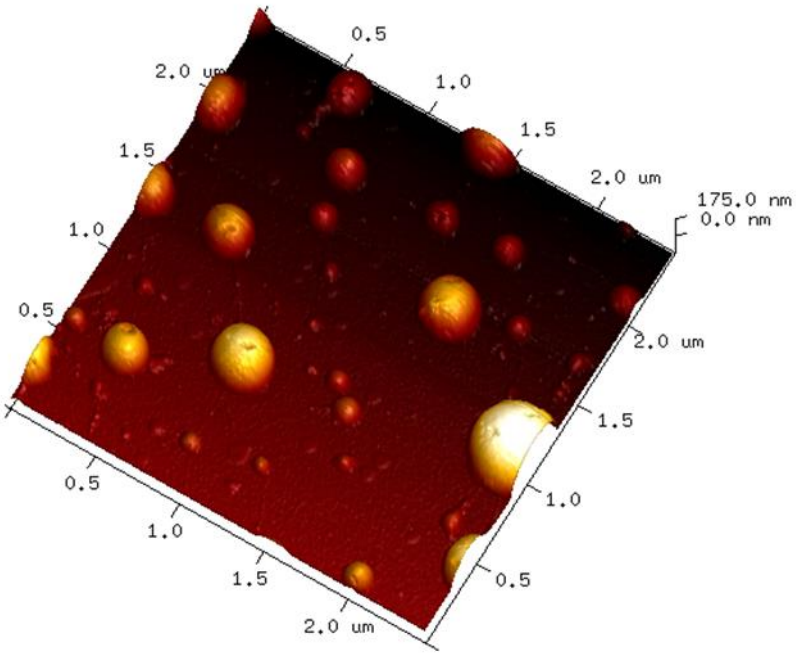

Fig. 4.15 – AFM en estado líquido de las H(HSA/BSA)-NPs post-irradiación.

A su vez, se observan en la imagen esferas de tamaño medio que se corresponden a las Au-NPs (o Au-NPs recubiertas con una monocapa de Alb), ya que muestran una superficie lisa, sin presencia de rugosidad. Cabe destacar, que la muestra analizada por AFM fue purificada previamente por varios pasos sucesivos de centrifugación (5 ciclos). Es muy probable que pueda haber ocurrido la pérdida del

recubrimiento proteico de algunas NPs. Esto explicaría la presencia en la imagen de Au-NPs, agregados, y de las estructuras de menor diámetro observadas (de pocos nm), que se le atribuyen a la Alb y pequeños agregados de esta proteína.

Determinación de potencial Z

El potencial Zeta (ZP) es un parámetro muy útil para la caracterización de NPs. La magnitud del ZP indica el grado de repulsión electrostática entre las partículas adyacentes en una dispersión, considerando solo un tipo de partículas. La Tabla 4.3 corresponde a los valores de ZP de diferentes tipos de NPs y de la HSA en solución.

MUESTRA	DIÁMETRO (nm)
Au-NPs	-40 a -50
HSA_m/Au-NPs	-21
H(HSA)-NPs	-12,1
HSA-NPs	-11,4
HSA	-15,4

Tabla 4.3 – Valores de potencial Z de las muestras Au-NPs (de acuerdo con Brewer, et al., 2005), H(HSA)-NPs, HSA-NPs, HSA_m/Au-NPs y HSA (según Hosainzadeh, *et al*., 2012).

Como se observa, las Au-NPs tienen muy bajo ZP como consecuencia de la estabilización con citrato de sodio. Las nanoestructuras irradiadas (HSA-NPs y H(HSA)-NPs), presentaron valores de ZP muy cercanos al de la proteína libre, mostrando un comportamiento de carga superficial similar. Las HSA_m/Au-NPs, preparadas por adsorción física de las proteínas a la superficie del oro en forma de monocapa, mostraron un valor levemente más negativo de ZP respecto de la HSA.

Análisis por FT-IR

Continuando con la caracterización de las NPs, se realizó un análisis mediante FT-IR para el estudio del recubrimiento proteico en las HNPs. Para ello, se utilizó un equipo de espectroscopia infrarroja acoplado a un módulo de reflectancia total atenuada. Es conocido que esta técnica es sensible para detectar cambios conformacionales presentes en las proteínas. Por esta razón, se realizaron los

espectros de BSA, Au-NPs y H(BSA)-NPs (Fig. 4.16). Las muestras fueron secadas sobre el cristal del módulo previo a la medida.

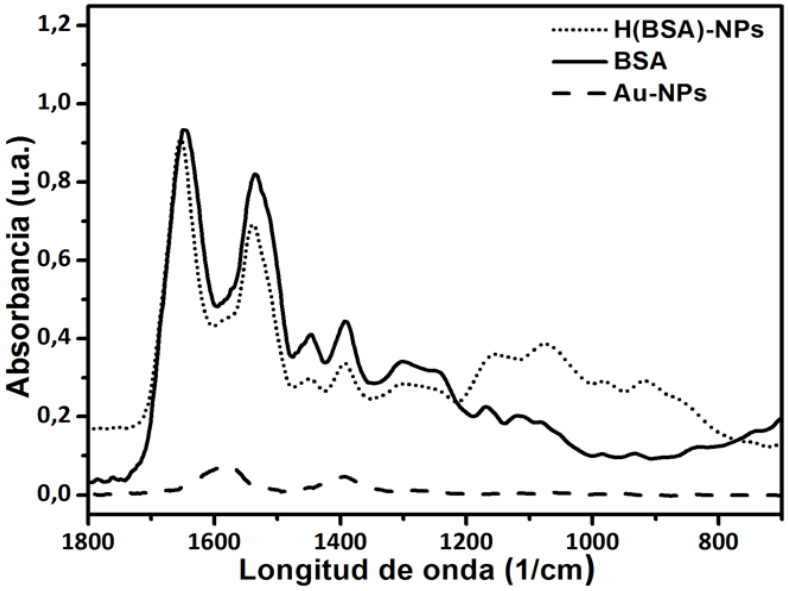

Fig. 4.16 – Espectros de FT-IR de las Au-NPs, H(BSA)-NPs y BSA.

Se observa el espectro característico de la BSA, con los picos correspondientes a las señales amida I y II (enlace peptídico) a 1651-1604 cm^{-1} y 1550 cm^{-1}. En el espectro de las H(BSA)-NPs podemos observar la presencia de los mismos picos, aunque en el espectro de las Au-NPs, éstos están ausentes. Este análisis proporciona una confirmación más acerca del recubrimiento de Alb de las Au-NPs. También se observa un aumento en la señal IR entre 1200 y 800 cm^{-1} en las H(BSA)-NPs que no ha podido ser asignado.

Electroforesis SDS-PAGE

La presencia de una unión covalente (entrecruzamiento) entre las proteínas de recubrimiento se evaluó mediante electroforesis SDS-PAGE. Se corrieron diferentes muestras de NPs (preparadas en medio reductor) en un gel 8 % de acrilamida (2,5 % de gel concentrador o "*stacking gel").* En la Fig. 4.17 se observa una imagen de las zonas del gel concentrador y corrida, ambos teñidos con Coomassie blue. Las muetras fueron estadarizadas a la misma absorbancia de pico de resonancia de plasmón.

Como puede verse, las Au-NPs quedan retenidas en el gel concentrador. En el caso de las Au-NPs (Fig. 4.17, calle 2) y HSA_m/Au-NPs (Fig. 4.17, calle 3), las bandas retenidas son de color violáceo oscuro, indicando la precipitación de estas NPs. En

cambio, las H(HSA)-NPs (sembradas por duplicado en calles 4 y 7) que quedaron en el gel concentrador, tienen la coloración rojiza características de las NPs dispersas.

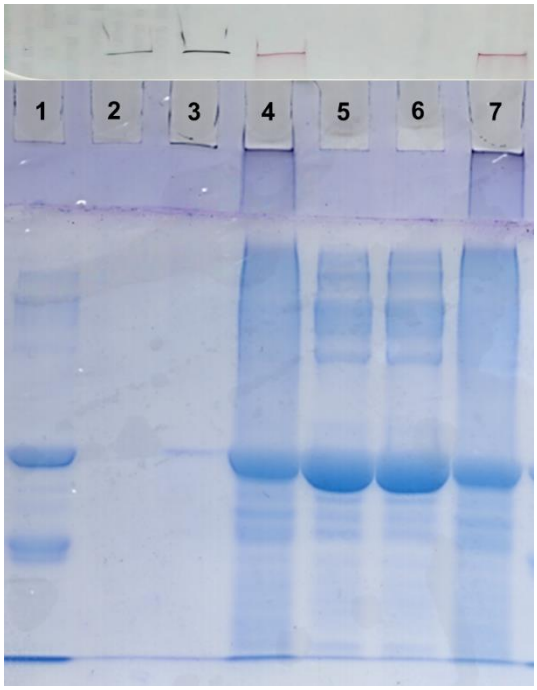

Fig. 4.17 – Gel SDS-PAGE 8 % de las siguientes muestras: Patrón de PM (**1**), Au-NPs (**2**), HSA_m/Au-NPs (**3**), H(HSA)-NPs (**4**), BSA en solución acuosa (**5**), BSA en solución etanólica (**6**) y, H(HSA)-NPs (**7**). En la parte superior se muestra el gel concentrador sin tinción.

Por otro lado, al analizar el gel de corrida puede observarse que las Au-NPs no presentan ninguna banda, como era de esperar. Las HSA_m/Au-NPs, tienen una banda muy tenue de alrededor de 66 kDa (PM de la Alb). En el caso de las H(HSA)-NPs, se encontró un patrón de bandas de proteínas de alto peso molecular. Este efecto que se encuentra en el gel podría ser compatible con un proceso de entrecruzamiento inducido por radiación.

Estabilidad de recubrimiento proteico

Las Au-NPs pueden disolverse fácilmente utilizando una solución de cianuro, transformando la suspensión rojiza de Au-NPs en un color amarillo claro correpondiente a la solución de iones áuricos [Demers, *et al.,* 2000]. Teniendo en cuenta que la irradiación con una fuente de Cobalto-60 genera el entrecruzamiento de las Albúminas del recubrimiento proteico de las HNPs, podría existir una diferencia en la velocidad de permeación de los iones de cianuro a través de este recubrimiento. Es esperable un comportamiento de disolución diferente del núcleo de oro de dichas NPs.

En la Fig. 4.18(A), se observa la cinética de disolución medida como la desaparición del pico de absorción de resonancia del plasmón a 40 °C. Las muestras de H(BSA)-NPs fueron irradiadas a distintas dosis: 0,5, 1, 2,5, 5 y 10 kGy, con 30 mg/ml de BSA en una solución etanólica al 30 %v/v. Para estandarizar todas las condiciones, se graficó la absorbancia relativa de las HNPs, preparadas a una dosis de irradiación diferente, con respecto a la misma muestra sin adición de cianuro. En un período de tres horas, las Au-NPs estabilizadas con citrato de sodio (sin recubrimiento proteico) se disolvieron por completo; mientras que todas las muestras irradiadas mostraron un comportamiento de disolución más lento (Fig. 4.18(A)).

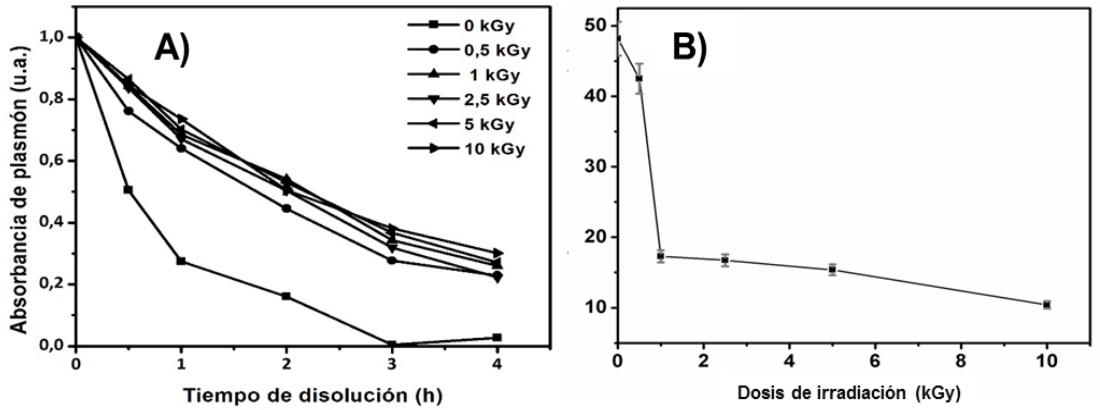

Fig. 4.18 – Perfil de disolución de las Au-NPs de las H(BSA)-NPs irradiadas a distintas dosis en función del tiempo (**A**); y de la dosis de irradiación (**B**).

En la Fig. 4.18(B) se representa gráficamente el porcentaje de disolución de las NPs, determinado como el porcentaje de variación del pico de resonancia de plasmón en los primeros 30 min de incubación con la solución de cianuro. Considerando este parámetro, la muestra irradiada con la dosis mínima estudiada (0,5 kGy) mostró una menor velocidad de disolución respecto a la no irradiada. Todas las otras muestras, irradiadas con el rango de dosis de 1 a 10 kGy, mostraron una marcada diferencia en la velocidad de disolución.

Análisis mediante Dicroísmo Circular

El gráfico de dicroísmo circular de las H(BSA)-NPs irradiadas a distintas dosis, frente a la Alb sin irradiar, se observa en la Fig. 4.19.

No se observaron cambios significativos entre la proteína sin irradiar y la proteína de las NPs irradiadas. Este análisis se realizó sobre muestras de HNPs donde las Au-NPs fueron disueltas completamente con cianuro de potasio. Se observó que a una dosis de irradiación de 1 kGy prácticamente no se hubo diferencias, mientras que una

leve modificación en la estructura secundaria de la Alb se observó para las NPs irradiadas a 5 y 10 kGy.

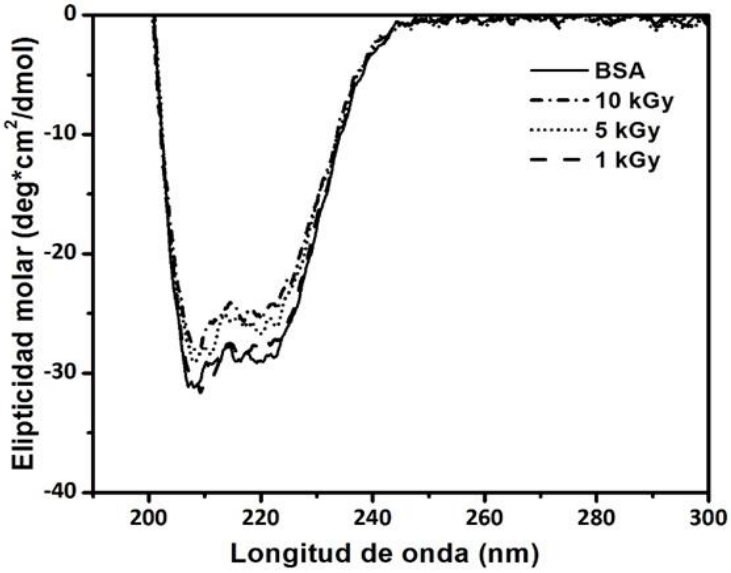

Fig. 4.19 – Estudio de CD de NPs irradiadas a 1, 5 y 10 kGy comparadas con una solución de BSA.

Reconocimiento Albúmina/Anticuerpo α-BSA

La fuerte interacción entre las tioles presentes en las proteínas y el oro, genera pérdida de la estructura de las proteínas [Wang, *et al.*, 2013]. Es por ello, que se estudió el bioreconocimiento entre la BSA de las NPs y el anticuerpo policlonal α-BSA. El ensayo se realizó con las H(BSA)-NPs irradiadas y con las BSA_m/Au-NPs como control (no irradiadas, con una monocapa de Alb adsorbida físicamente sobre la superficie de las Au-NPs). El anticuerpo fue inmovilizado en una membrana, mientras que como control de este ensayo se utilizaron las mismas membranas incubadas previamente con caseína.

En la Fig. 4.20, se compara el reconocimiento biológico de ambas NPs con los anticuerpos α-BSA inmovilizados. Efectivamente, las H(BSA)-NPs presentaron interacción con los anticuerpos, mientras que las NPs control no lo hicieron, demostrando así la pérdida de estructura proteica producto de la interacción de los tioles con el oro. Cabe destacar que las membranas control no mostraron interacción alguna con las NPs (que se observa como la ausencia de color).

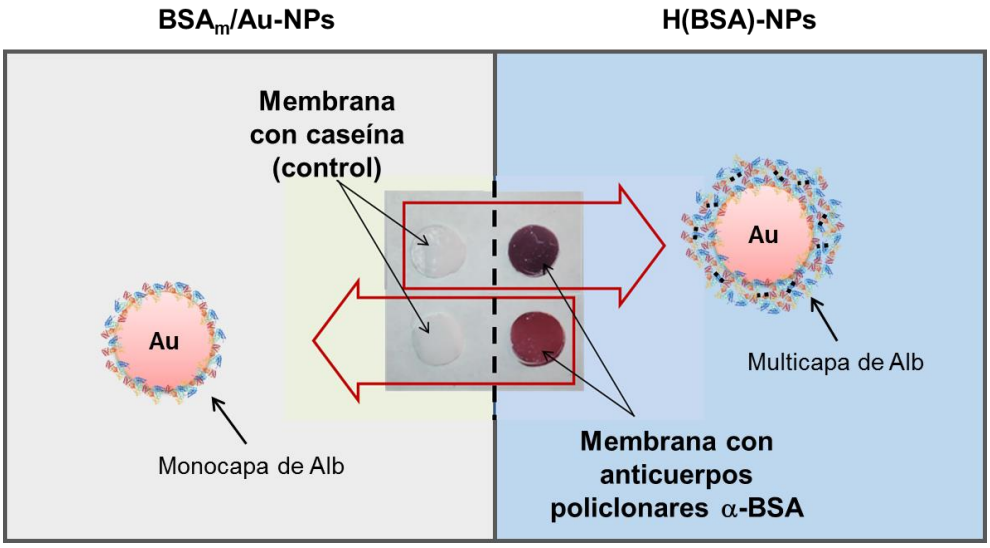

Fig. 4.20 – Biorreconocimieno entre Albúmina de NPs y Anticuerpo anti-BSA.

En los próximos Capítulos, este híbrido de Au-NP y Albúmina se funcionalizará con péptidos para mejorar el reconocimiento biológico con células específicas.

CONCLUSIONES PARCIALES

Mediante irradiación ionizante se obtuvieron NPs híbridas Au/Alb, con un recubrimiento en forma de multicapa, estabilizado por entrecruzamiento radio-inducido.

La caracterización mediante espectroscopía UV-visible, evidenció el corrimiento del pico de resonancia de plasmón característico de la modificación superficial de las Au-NPs, pasando de 520 nm a 534 nm para las NPs híbridas. Además, cabe destacar que el recubrimiento proteico no interfirió con las propiedades ópticas de las Au-NPs. Se logró determinar las condiciones óptimas de preparación de dichas muestras, tales como la concentración de proteína para recubrimiento (15 mg/ml HSA y 30 mg/ml BSA), la concentración de etanol (30 %) y la dosis de irradiación mínima (1 KGy) donde comienzan a registrarse cambios de comportamiento de las NPs.

Por medio de la técnica de TEM, se evidenció una estructura tipo *core/shell* de las NPs de forma esféricas, con un centro de Au-NPs y un recubrimiento de Alb. Un diámetro hidrodinámico promedio de 78 nm, fue determinado según la técnica DLS.

Las NPs pudieron ser purificadas mediante centrifugación y cromatografía de exclusión molécular. De ambas técnicas, la última resultó ser mejor debido a que no se produce agregación de la muestra durante el proceso de purificación. El paso de purificación resultó ser de suma importancia para obtener las NPs sin la presencia de

proteína libre o NPs de proteína como contaminantes de las muestras irradiadas (DLS y TEM).

Mediante dicroísmo circular, se observó que las proteínas no presentan cambios importantes en su estructura luego de la irradiación (sobre todo para dosis bajas como 1 kGy) y por medio de FT-IR, se pudo confirmar la presencia de Alb en las HNPs, con sus señales amida características.

El estudio de bioreconocimiento entre Alb y el anticuerpo α-BSA, permitió determinar que las proteínas que forman la multicapa de Albúmina, conservan su conformación luego de la irradiación, al menos las proteínas de la superficie más externa de la NPs.

REFERENCIAS

- Behzadi, *et al*., 2017. Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell. *Chemical Society Reviews*, 46(14), 4218-4244.

- Boisselier and Astruc, 2009. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chemical society reviews,* 38(6), 1759–1782.

- Brewer, *et al*., 2005. Probing BSA binding to citrate-coated gold nanoparticles and surfaces. *Langmuir, 21*(20), 9303-9307.

- Chegel, *et al.*, 2012. Gold nanoparticles aggregation: drastic effect of cooperative functionalities in a single molecular conjugate." *Journal of Physical Chemistry C*, 116(4), 2683-2690.

- Davis, *et al*., 2010. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. In *Nanoscience And Technology: A Collection of Reviews from Nature Journals*, 239-250.

- Demers, *et al*., 2000. A fluorescence-based method for determining the surface coverage and hybridization efficiency of thiol-capped oligonucleotides bound to gold thin films and nanoparticles. *Analytical chemistry,* 72(22), 5535-5541.

- Frens, 1973. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nature Physical Science*, 24(1), 20-22.

- Ghosh and Pal, 2007. Interparticle coupling effect on the surface plasmon resonance of gold nanoparticles: from theory to applications. *Chemical Reviews*, 107(11), 4797-4862.

- Giner-Casares, *et al*., 2016. Inorganic nanoparticles for biomedicine: where materials scientists meet medical research. *Materials Today*, 19(1), 19-28

- Hosainzadeh, *et al*., 2012. Probing the interaction of human serum albumin with bilirubin in the presence of aspirin by multi-spectroscopic, molecular modeling and zeta potential techniques: Insight on binary and ternary systems. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, *29*(5), 1013-1050.

- Janib, *et al*., 2010. Imaging and drug delivery using theranostic nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(11), 1052-1063.

- Laemmli, 1976. SDS-PAGE to evaluate extent of hydrolysis, of proteins. *Nature*, *227*(5259), 680-685.

- Link and El-Sayed, 1999. Size and temperature dependence of the plasmon absorption of coloidal gold nanoparticles. Journal of Physical Chemistry B, 103(21), 4212-4217.

- Nie and Chen, 2012. Au nanostructures: an emerging prospect in cancer theranostics. *Science China Life Sciences,* 55(10): 872-883.

- Saptarshi, *et al*., 2013. Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle. *Journal of Nanobiotechnology*, 11(1), 26.

- Tsai, *et al.*, 2011. Adsorption and conformation of serum albumin protein on gold nanoparticles investigated using dimensional measurements and in situ spectroscopic methods. *Langmuir*, 27(6), 2464-2477.

- Venturoli and Rippe, 2005. Ficoll and dextran vs. globular proteins as probes for testing glomerular permselectivity: effects of molecular size, shape, charge and deformability. *American Journal of Physiology-Renal Physiology,* 288(4), F605–F613.

- Wang, *et al*., 2013. Revealing the binding structure of the protein corona on gold nanorods using synchrotron radiation-based techniques: Understanding the reduced damage in cell membranes. *Journal of the American Chemical Society*, 135(46), 17359-17368.

CAPÍTULO V. DECORACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

Con el objeto de disponer de mejores herramientas diagnósticas y de tratamiento oncológico, se busca desarrollar terapias dirigidas a células específicas, y por esta razón, se planteó la modificación superficial de las HNPs con el péptido Bombesina-DOTA (BD). Como ya se comentó, este péptido es reconocido por los receptores GRP (GRPr), sobreexpresados en varias líneas células tumorales.

La decoración de las NPs con BD nos permitirá la obtención de un nanosistema final, con potencial uso en terapia y diagnóstico. Esto se debe a la señal de direccionamiento hacia células específicas y a la capacidad de marcación con radioisótopos de interés teranóstico a través de la quelación al grupo DOTA.

A continuación se detallan los pasos a seguir para la conjugación del péptido a las NPs por diferentes enfoques, seguido de su caracterización y cuantificación. Además, se discutirán las características que convierten a la BD en una herramienta útil en el diseño de nanosistemas con aplicaciones en Nanomedicina.

MATERIALES Y MÉTODOS

El péptido sintético Bombesina-DOTA fue donado por la IAEA en el marco del proyecto CRP F22064. Se utilizaron los reactivos de acoplamiento heterobifuncionales SMCC (Invirogen, ThermoFisher) y BMPS (Fluka, Sigma Aldrich). Los demás reactivos usados son de grado analítico.

Dos tipos de NPs fueron decoradas con BD: i) las HNPs, recubiertas con una multicapa de proteínas (HSA/BSA), estabilizadas mediante entrecruzamiento radio-inducido, y; ii) las Alb_m/Au-NPs, con un recubrimiento proteico (HSA/BSA) en forma de monocapa que ocurre por adsorción superficial de las proteínas al oro y, que utilizaremos como *control* en el estudio de interacción de los nanosistemas con células en el próximo capítulo.

Decoración de NPs

Tres estrategias de decoración se probaron para la modificación superficial. Todas cuentan con una etapa inicial de activación del péptido, dónde una solución de BD (20 mg/ml) en dimetilformamida (DMF) se hace reaccionar con el reactivo de acoplamiento heterofuncional SMCC o BMPS, durante ON, en agitación suave. La relación de BD/reactivo de acoplamiento utilizada fue 1:10.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

El exceso de reactivo heterobifuncional se eliminó mediante la adición de micropartículas de GMA/2G, derivatizadas con cisteamina (ver protocolo en Anexo). Una muestra de esta reacción fue guardada para posteriores estudios de caracterización. En una segunda etapa, se procedió a la conjugación del peptido activado con las Alb.

En la Estrategia I, decoración “pre-irradiación”, la modificación con BD se produjo sobre una solución de Alb. Estas proteínas luego, fueron utilizadas para preparar HNPs (como se detalló en el Capítulo IV), y enviadas a irradiar. La solución de Alb para recubrimiento de Au-NPs, consistió en un 95 % de Alb sin conjugar con BD y un 5 % de BD-Alb.

En la segunda estrategia, decoración “post-irradiación”, la BD fue incorporada sobre las Alb superficiales de NPs ya irradiadas. Estas NPs utilizadas, fueron previamente purificadas por un ciclo de centrifugación a 13.000 rpm, 4 °C y por 20 min, siguiendo los pasos descriptos en el Capítulo IV. Unas vez purificadas, por cada 1 ml de NPs se le agregó 100 µl de ditiotreitol (DTT) 10 mM para obtener una reducción parcial de tioles libres. El tiempo de incubación fue 1 h a temperatura ambiente manteniendo la agitación constante. Posteriormente, se eliminó el DTT con una columna PD10, equilibrada en el buffer de acoplamiento a Alb (fosfato 50 mM, 0,15 M NaCl, 10 mM EDTA, pH 7,2). La elución de las NPs se realizó en el mismo buffer.

La reacción de acoplamiento del péptido activado a las Alb se llevó a cabo durante ON a temperatura ambiente y con agitación constante. Posteriormente, las muestras fueron purificadas mediante CEM, utilizando PBS como buffer de elución.

En la tercera estrategia, el péptido activado fue acoplado a la Alb del recubrimiento en forma de monocapa de las $Alb_{m/}$Au-NPs. El protocolo seguido fue el mismo que el utilizado en la Estrategia II de decoración, con la salvedad de que las $Alb_{m/}$Au-NPs no son expuestas a una alta concentración de etanol ni irradiadas.

Caracterización por DLS y espectroscopía UV-visible

El tamaño de partícula se determinó mediante dispersión de luz dinámica (DLS) a 25 °C en un analizador de tamaño de partícula 90Plus / Bi-MAS, según el protocolo descripto en los capítulos anteriores.

Los espectros UV-visible se realizaron en un espectrofotómetro UV-Vis Shimadzu 160 A. Para ello se utilizó una cubeta de cuarzo con un volumen de 100 µl y un paso óptico de 1 cm.

El monitoreo de las NPs se realizó mediante las medidas de absorbancia a 280 nm (péptido y proteínas) y a 530 nm (señal LSPR).

Caracterización por ESI-MS

El péptido activado (BD-BMPS) y sin conjugar (BD) se caracterizó mediante Espectroscopía de Masas de Ionización por Electrospray (ESI-MS). Se usó un espectrofotómetro LCQ Advantage Max (ThermoFinnigan). Las muestras diluidas en acetonitrilo/agua (1:1), se acidificaron con ácido fórmico 0,1% y se analizaron por inyección directa en modo positivo, a temperatura ambiente.

Este estudio se realizó en el espectrómetro que cuenta el *Departamento de Ciencia y Tecnología (UNQ)* a cargo del Lic. Juan Brardinelli.

Análisis mediante MALDI TOF/TOF

Se utilizó un espectrómetro modelo Ultraflex II (Bruker). El equipo cuenta con un ionizador MALDI y analizador TOF/TOF, lo que permite realizar MS y luego MS/MS de las señales más intensas seleccionadas manualmente. Este análisis se realizó en el *Centro de Estudios Químicos y Biológicos en Espectrometría de Masa (*CEQUIBIEM), de la *Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA*), por la Dra. Silvia Moreno.

Para ello, se sembraron las diluciones originales, y diluciones 1/10 y 1/100. Sólo en el caso de las BD-Alb-NPs, las muestras fueron digeridas con Tripsina. Cada muestra se sembró en 3 matrices diferentes, HCCA, DHB y Sinapínico. El análisis de los datos obtenidos se realizó con el programa flexAnalysis y para realizar las búsquedas se utilizó MASCOT.

Cuantificación de tioles libres

Se realizó la cuantificación de los tioles libres presentes en las Alb de las HNPs antes y después del acoplamiento de la BD. Para ello, 450 µl de NPs se incubaron por 1 h a temperatura ambiente con 55 µl de DTT 10 mM y 50 µl de buffer fosfato de sodio 0,1 M, pH 6. Posteriormente, se eliminó el DTT con una columna PD10 preparada con 5 ml de matriz y equilibrada con el buffer antes mencionado. Se sembraron 0,5 ml de muestra, completando con 1,5 ml de buffer fosfato 0,1 M, pH 8 el volumen de siembra. La elución se realizó con este último buffer, recolectando 1 ml de muestra.

Finalmente, 5 µl del reactivo de Ellman (DTNB) se agregaron a las muestras para medir la absorbancia a 425 nm luego de transcurridos 10 min de incubación. El DTNB (3,9 mg/ml) se preparó en buffer fosfato de sodio 0,1 M, pH 7.

Este mismo procedimiento se llevó a cabo sobre muestras sin el agregado de DTT (con la adición de 55 µl de agua bidestilada para tener el mismo volumen de reacción en todas las muestras).

Para calcular los moles de tioles libres se le restó a la absorbancia a 425 nm de las muestras, la absorbancia del DTNB a esa longitud de onda. El resultado se dividió

por el coeficiente de extinción molar del DTNB (ε = 12400 $mol^{-1}cm^{-1}$). Finalmente, el valor obtenido se multiplicó por (1/concentración molar de Alb en la muestra). De esta manera, se calculó la relación SH/molécula en cada caso.

Cuantificación de BD/NP

Se estudiaron diferentes técnicas para la cuantificación del péptido por NPs.

En primer lugar, se realizó el método descripto por Dadachova *et al.* para la determinación de grupos DOTA [Dadachova, *et al*., 1999]. Para ello, se preparó una solución madre de Pb(II)-Arsenazo III (AAIII) en buffer acetato de amonio 0,15 M, pH 7, conteniendo AAIII 10 µM y Pb(II) 4,83 µM. Luego, 85 µl de este complejo se incubaron con 20 µl de muestra y 5 µl de NaCl 1 M. El volumen final de reacción fue de 1.050 µl, con un tiempo de incubación de 10 min a temperatura ambiente. Finalmente, se midió la absorbancia a 656 nm y se correlacionaron los valores obtenidos con una curva de calibración construida a partir de una solución de DOTA. Para la curva, se midieron 6 diluciones por triplicado, partiendo de una solución 10 µM de DOTA.

La determinación BD/NP también se realizó por medio de un Espectrómetro de Emisión Atómica por Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-AES). Para ello, 1 ml de las muestras HNPs y BD-HNPs se incubaron con 4,3 µl de una solución de cloruro de estroncio (Sr(II)) 0,305 mg/ml y 3,9 µl de una solución de ácido iminodiacético (IDA) 4 mM. La incubación se realizó ON, a temperatura ambiente en agitación. El Sr(II) que no fue quelado al DOTA, se eliminó por el pasaje de las muestras por una columna PD10, seguido de dos ciclos de diálisis de 16 h cada uno, en frío y agitación. Una membrana de PES (poliétersulfona) fue utilizada con un tamaño de corte ("*MWCO"*) de 10.000 Da (Vivaspin, Sartorius). El volumen de buffer de diálisis (buffer fosfato 200 mM, IDA 1 µM, pH 7) utilizado para cada ciclo fue 500 ml. Posteriormente, las muestras se colocaron en viales de vidrio sellados para su posterior medición en el *Laboratorio de Análisis Químicos, LANAQUI (CERZOS-CONICET-UNS),* por el Dr. Claudio Ferrarello y la Ing. Miryam Crespo.

El equipo ICP-AES utilizado fue un Shimadzu 9000 Simultáneo de alta resolución, según norma EPA 200.7. En todos los casos se utilizaron para las mediciones patrones/ estándares certificados Chem-Lab, (Zedelgem B-8210) y agua Milli Q Integral 10, Elix Technology Inside (Merck). Las muestras fueron previamente diluidas con agua Milli Q en una relación 1:5.

Para corroborar los resultados obtenidos, se realizó una tercera determinación de la relación BD/NP mediante la técnica de Fluorescencia de Rayos X de Reflexión Total

(TRXF). Se usó para ello un espectrómetro S2 PicoFox TRXF (Buker). El péptido se cuantificó por medio de la detección de Pb(II) transquelado al DOTA desde el complejo Pb(II)-AAIII según el protocolo descripto anteriormente.

Para ello, 15 µl de muestra (HNPs y BD-HNPs) fueron incubados con 85 µl de complejo Pb(II)-AAIII y 5 µl de NaCl 1 M, por 4 h en agitación constante y oscuridad. Luego, estas muestras fueron dializadas en buffer fosfato 20 mM, IDA 1 mM, pH 7. Esta diálisis se realizó en tres ciclos de 16 h cada uno, con recambio de buffer entre cada ciclo, con membranas de diálisis PES (*MWCO* 10.000 Da). Finalmente, se tomaron 5 µl que se mezclaron con 1 µl de una solución estándar de Co 0,01 mg/ml. De esta mezcla, 5 µl fueron depositados en los discos utilizados por el equipo para medir. Este protocolo se realizó por duplicado para cada muestra.

La determinación por TXRF fue realizada en un equipo Bruker S8 Tiger, en el *Centro Atómico Constituyentes* (*CNEA*), por la Dra. Graciela Custo.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Durante la última década, se han proporcionado estudios científicos donde péptidos reconocidos por receptores de membrana pueden utilizarse con éxito para la detección *in vivo* de cánceres humanos [Reubi, 2003]. En este contexto, los receptores GRP han adquirido gran relevancia debido a que se expresan en altas densidades en varios tumores primarios humanos y sus metástasis, incluyendo cáncer de próstata, mama, células pequeñas de pulmón y páncreas [Halmos, *et al*., 1995; Toi-Scott, *et al*., 1996; Reubi, *et al*., 2002; Sun, *et al*., 2000; Qin, *et al*., 1994; Markwalder and Reubi, 1999]. Basados en este hecho, estos receptores se convirtieron en un objetivo atractivo para la detección y tratamiento de estos cánceres.

Los péptidos GRP (liberadores de gastrina) y Bombesina (BN) se unen con alta afinidad a los GRPr. Éstos péptidos comparten una secuencia C-terminal de 7 aminoácidos altamente conservada (Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH_2), que se requiere para su reconocimiento y unión de los mismos a GRPr [Reubi, 2003; Okarvi, 2004]. Por esta razón, la BN tiene potencial para ser utilizada con fines diagnósticos y/o terapéuticos dirigidos a células tumorales con sobreexpresión de GRPr [Langer and Beck-Sickinger, 2001; Okarvi, 2004].

En los últimos años surgieron numerosos estudios de péptidos análogos a BN radiomarcados con fines teranósticos, en especial para tumores de mama y próstata. Está reportado que las células tumorales de próstata presentan sobreexpresión de GRPr [Reile, *et al*., 1994; Aprikian, *et al*., 1996; Sun, *et al*., 2000; Markwalder and

Reubi, 1999]. Markwalder y Reubi reportaron que el GRPr se encuentra en alta densidad en carcinomas de próstata invasivos y lesiones prostáticas intraepiteliales proliferativas, principalmente neoplasias intraepiteliales prostáticas, mientras que el tejido de próstata normal y, en la mayoría de los casos, el tejido prostático hiperplásico son GRPr negativos [Markwalder and Reubi, 1999].

Sin embargo, un inconveniente importante del uso de pequeños péptidos radiomarcados para el tratamiento del cáncer es que la rápida eliminación del flujo sanguíneo puede reducir potencialmente la dosis efectiva administrada al tumor [Smith, *et al*., 2005]. Como solución a este problema, se planteó en este trabajo de tesis la incorporación de estos péptidos a nanosistemas.

Las Au-NPs proporcionan vehículos atractivos para el suministro de medicamentos, materiales genéticos, proteínas y moléculas pequeñas. Las Au-NPs presentan una baja toxicidad sumado a la posibilidad de controlar el tamaño de las partículas y las propiedades de su superficie [Rana, *et al*., 2012]. Es así como varios grupos de investigación se encuentran en el desarrollo de nanopartículas conjugadas con péptidos. Por ejemplo, Mendoza-Sánchez *et al*., desarrolló un sistema compuesto por Au-NPs esféricas, modificadas superficialmente a través de la afinidad tiol/Au, con un simil-péptido BN, marcado con ^{99m}Tc [Mendoza-Sánchez, *et al*., 2010]. Jiménez-Mancilla *et al*., trabaja sobre una nanoestructura compuesta por un núcleo de oro conjugado espontáneamente con los tioles del péptido BN, marcado con ^{99m}Tc y ^{177}Lu [Jiménez-Mancilla, *et al*., 2013]. Sin embargo, estos grupos trabajan en modificar NPs superficialmente, utilizando solo la propiedad de la afinidad tiol/Au. Esta interacción esta mediada por fuerzas débiles de carácter intermoleculares.

En este trabajo de tesis, se buscó la incorporación del péptido sintético BD a través de su unión covalente a las proteínas que forman la multicapa de recubrimiento de las HNPs.

Como se mencionó en el Capítulo IV, la Albúmina y las Au-NPs interactúan espontáneamente con una constante del orden µM, perdiendo parcialmente su conformación nativa [Brewer, *et al*., 2005; Tsai, *et al*., 2011]. Sin embargo, los mayores desafíos a los que se enfrentan estas nanoestructuras con recubrimiento en forma de monocapa se encuentran cuando se utilizan en mezclas complejas o en aplicaciones *in vivo*. En estos casos, hay numerosas interacciones con diferentes proteínas séricas donde ocurren procesos de intercambio entre las proteínas adsorbidas en la superficie de las Au-NPs por otras con mayor capacidad de unión [Saptarshi, *et al*., 2013]. Durante estos procesos de intercambio de proteínas de la superficie de las NPs, es muy posible que ocurra la pérdida de los ligandos (proteínas o péptidos unidos por afinidad tiol/Au) que inicialmente decoraban las Au-NPs. En particular, es éste un

punto que se busca optimizar en el presente trabajo, partiendo de la conjugación del péptido de manera covalente a una nanoestructura estabilizada por uniones que también son del tipo covalente entre las proteínas del recubrimiento.

Para la decoración de las HNPs, se utilizará el simil-péptido Bombesina-DOTA (Lys^1,Lys^3(DOTA)-Bombesin(1-14)) que es un derivado del neuropéptido Bombesina, con un peso molecular de 1.993 g/mol y una pureza >90-95 %.

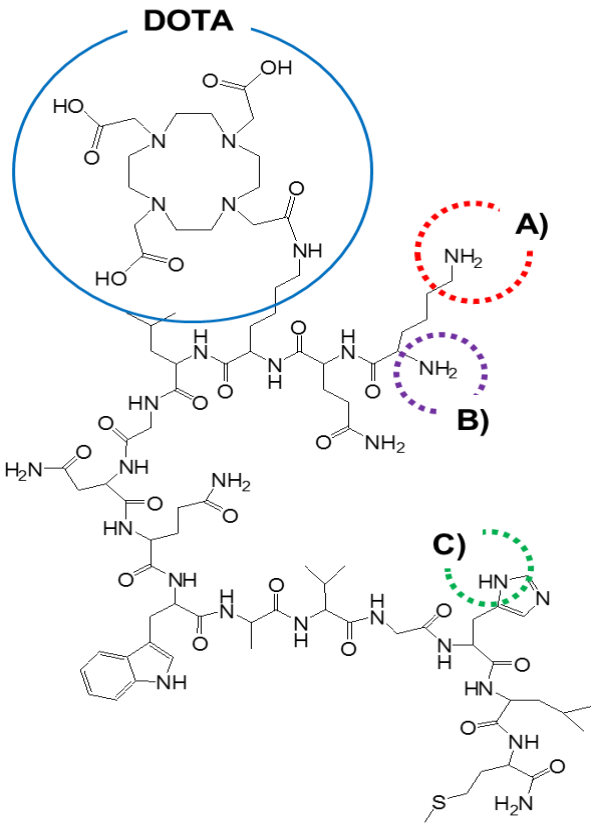

Fig. 5.1 – Estructura química de péptido BD. Los grupos aminos reactivos son: amina primaria (**A**), α-amino (**B**); y amino imidazol (**C**).

Este simil-péptido tiene además la ventaja de presentar el grupo quelante DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético), covalentemente unido a su estructura, que le confiere la capacidad de ser radiomarcado. De esta manera, no solo es útil para el direccionamiento hacia células tumorales que sobreexpresan GRPr, sino que también permite la quelación de radionucleídos de interés en terapia y diagnóstico, tales como Indio-111 (útil para obtener imágenes SPECT), Ytrio-90 y Lutecio-177 (aplicados en radioterapia), Cobre-64 y Galio-68 (usados para la obtención de imágenes PET). Su estructura química se describe en la Fig. 5.1, donde se observa que posee dos grupos aminos y un imidazol que serán los blancos de reacción para la unión del mismo a la Albúmina.

Decoración de NPs

Se realizó mediante una técnica de conjugación tradicional, mediada por un reactivo de acoplamiento heterobifuncional. Se probaron los reactivos 3-(maleimido) ácido propiónico N-hydroxisuccinimida éster (BMPS) y succinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), para llevar a cabo la unión del péptido a la Albúmina. Estos reactivos contienen los grupos éster N-hidroxisuccinimida (NHS) y maleimida que permiten la conjugación covalente de moléculas que contienen aminas y sulfhidrilos. El NHS reacciona con las aminas primarias a pH 7-9 para formar enlaces amida; mientras que los grupos maleimidas reaccionan con sulfhidrilos a pH 6,5-7,5 para formar enlaces tioéter estables. En soluciones acuosas, el NHS sufre degradación, por lo que la disolución del reactivo debe hacerse en N,N-dimetilformamida (DMF) o dimetilsulfóxido (DMSO).

La técnica de acoplamiento de BD a la Albúmina se realizó en dos pasos principales: i) activación del péptido por medio de la reacción de los grupos aminos con el extremo NHS del reactivo de acoplamiento en exceso y; ii) conjugación del péptido a la proteína (a través de la Cys-34 libre de la Alb) o las NPs dependiendo de la estrategia de decoración. La Fig. 5.2, resume los pasos a seguir para la conjugación de BD a la Alb, mediada por el reactivo BMPS.

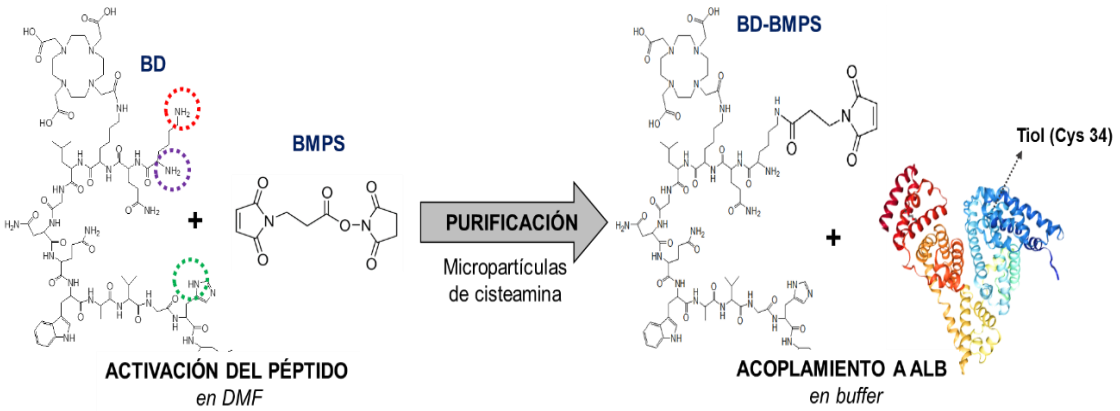

Fig. 5.2 – Reacción de acoplamiento del péptido BD a la Albúmina mediante BMPS. Los sitios reactivos de BD son señalados en círculos punteados.

La activación del péptido se llevó a cabo incubando el mismo con un exceso de reactivo de acoplamiento (relación 1:20) en DMF durante ON en agitación constante y temperatura ambiente.

Es importante mencionar que es necesario un paso de purificación posterior a la incubación del péptido con el reactivo de conjugación, para eliminar el exceso de este

último que no haya reaccionado. Este paso se realizó mediante la incubación con micropartículas compuestas de glicidil metacrilato (GMA) y 2G, derivatizadas con cisteamina preparadas en el laboratorio (ver protocolo en Anexo). Estas micropartículas secas (200 mg) fueron redispersadas en DMF y luego agregadas a la mezcla de reacción BD/reactivo de acoplamiento. Luego de una incubación de 2 h a temperatura ambiente y en agitación constante, se procedió a centrifugar la muestra, recuperando el sobrenadante compuesto por el péptido activado.

La segunda etapa, que consta de la unión del péptido con la Albúmina, se realizó mediante tres estrategias diferentes. En la primera estrategia, la decoración se realizó sobre Alb en solución, que posteriormente fue utilizada para preparar HNPs por irradiación (Estrategia I, decoración pre-irradiación). Luego del acoplamiento, las muestras fueron purificadas por PD10, para eliminar el péptido activado libre.

En la preparación de las HNPs, se utilizó una solución de proteína compuesta por un 5 % de BD-Alb y un 95 % de proteína sin péptido. Finalmente, las muestras fueron irradiadas, en solución etanólica 30 %v/v, según el protocolo descripto en el Capítulo IV, para obtener BD-HNPs.

En la segunda estrategia, la decoración se realizó sobre las Alb superficiales presentes en las HNPs ya irradiadas y purificadas por CEM G-200 (Estrategia II, decoración post-irradiación). Para ello, las HNPs (compuestas por HSA/BSA), fueron incubadas previamente con un agente reductor con el objetivo de reducir los grupos tioles libres de las proteínas de recubrimiento de las NPs. Los grupos tioles se oxidan fácilmente en el aire a disulfuros y otras estructuras oxigenadas. Para mantener estos grupos en estado reducido, se agrega un agente reductor como glutatión, cisteína, mercaptoetanol o DTT para que tenga lugar el intercambio [Cleland, 1964]. En el caso de la reducción de los tioles de las HNPs, las nanoestructuras se incubaron con DTT 10 mM, por 1 h a temperatura ambiente. Luego, las NPs se pasaron por una columna PD10, para eliminar el DTT, y se hicieron reaccionar con el péptido activado.

La tercera estrategia involucró la unión de BD activado a las Alb contenidas en la monocapa de las Alb_m/Au-NPs (compuestas por HSA/BSA). Para ello, se siguió el mismo protocolo descripto para las BD-HNPs en la segunda estrategia, con la diferencia de que estas NPs no son irradiadas.

La Fig. 5.3, resume los enfoques utilizados para el acoplamiento del péptido a la Alb libre o de recubrimiento de las HNPs.

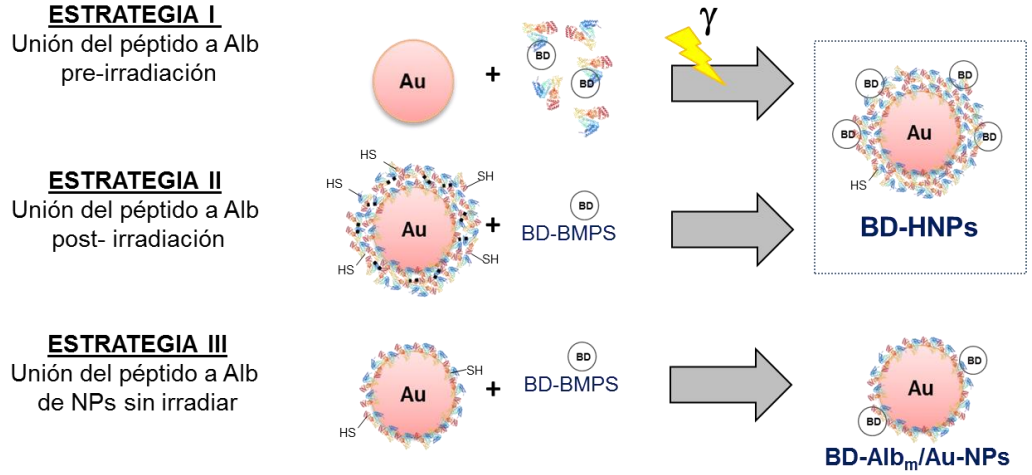

Fig. 5.3 – Estrategias de acoplamiento de BD activada a Albúmina.

Caracterización por DLS y UV-visible

Se realizó la caracterización de las muestras por UV-visible y DLS. En la Fig. 5.4, se observan los histogramas de tamaño hidrodinámico de las NPs obtenidas por las distintos enfoques de preparación mediante DLS.

La Fig. 5.4(A) corresponde a la muestras donde el péptido es conjugado a la Alb que luego es utilizada para preparar las HNPs. Esta BD-Alb, se mezcló con las Au-NPs, se le agregó la solución de etanol 30 %v/v, y fueron irradiadas a 10 kGy con rayos gamma. Lo que se observó es la presencia de agregados post-irradiación. La dispersión cambió de color rojizo a violáceo, por lo que para continuar con el análisis fue purificada por una columna CEM G-200. En el histograma, se observa el diámetro promedio de 102 nm para las BD-HNPs que pudieron ser purificadas. Sin embargo, estas no fueron estables, ya que a los pocos días de realizar la purificación, la muestra purificada también se agregó. Por esta razón, es que esta Estrategia I de decoración de NPs fue descartada.

El diámetro promedio de las BD-HNPs obtenidas por conjugación del péptido con la Alb de recubrimiento presente en las HNPs purificadas post-irradiación, se observa en la Fig. 5.4(B). En este caso, el tamaño promedio es de 63 nm, aunque el tamaño de población llega hasta los 110 nm. No se observó agregación de las muestras luego de todos los pasos de decoración. Por esta razón, se eligió esta estrategia de decoración para continuar con los ensayos.

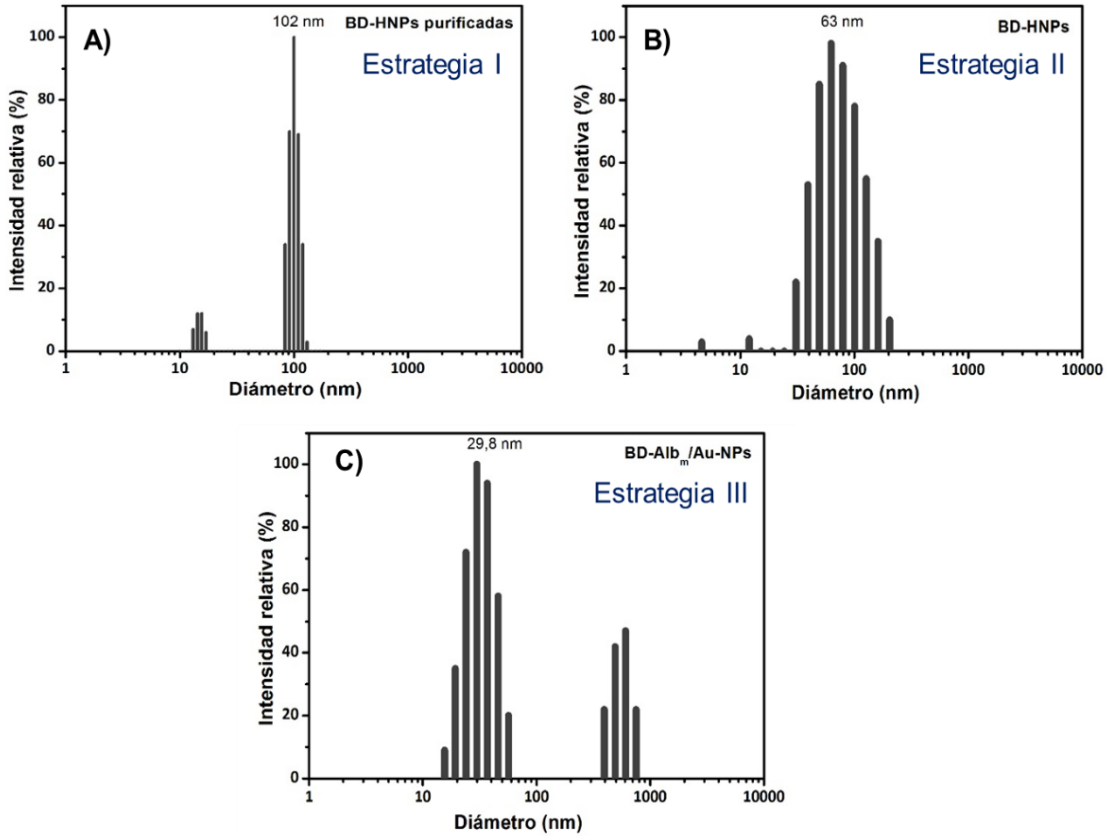

Fig. 5.4 – Tamaño hidrodinámico de las NPs decoradas con BD, según el enfoque de acoplamiento: (**A**) decoración pre-irradiación (Estrategia I); (**B**) decoración post-irradiación de NPs (Estrategia II); y, (**C**) decoración de NPs monocapa (Estrategia III).

El tercer enfoque de decoración se corresponde con la Fig. 5.4(C). En este caso, las NPs con recubrimiento proteico en forma de monocapa, fueron decoradas con BD. El diámetro promedio hallado de 30 nm, se puede asignar a las Alb$_m$/Au-NPs sin modificación por BD. Sin embargo, el tamaño de esta población alcanza un diámetro de hasta 50 nm. Adicionalmente, se observó la presencia de agregados en el histograma. Si bien estas NPs muestran agregación, serán evaluadas en ensayos *in vitro*, para comparar su interacción con el que presenten las BD-HNPs (ver Capítulo VI).

El análisis de Espectroscopía UV-visible de las muestras se observa en la Fig. 5.5. Los espectros corresponden a HNPs y BD-HNPs decoradas por la Estrategia II. El aumento en la absorbancia en 280 nm presente en las BD-HNPs puede asignarse a la presencia del péptido en la superficie de las NPs ya que contiene en su secuencia aminoácidos aromáticos.

Es importante observar que la conjugación del péptido con las NPs, no provoca un corrimiento del pico de la señal de LSPR que presentan las HNPs sin decorar. Como veremos más adelante, la conjugación de BD a las NPs mediante los reactivos de

acoplamiento BMPS y SMCC, dio valores muy bajos de péptido superficial. Por esta razón, se realizó el acoplamiento mediante la activación peptídica con una solución acuosa de glutaraldehído (MP Biomedicals). La relación BD/glutaraldehído utilizada para la activación del péptido fue 1:20.

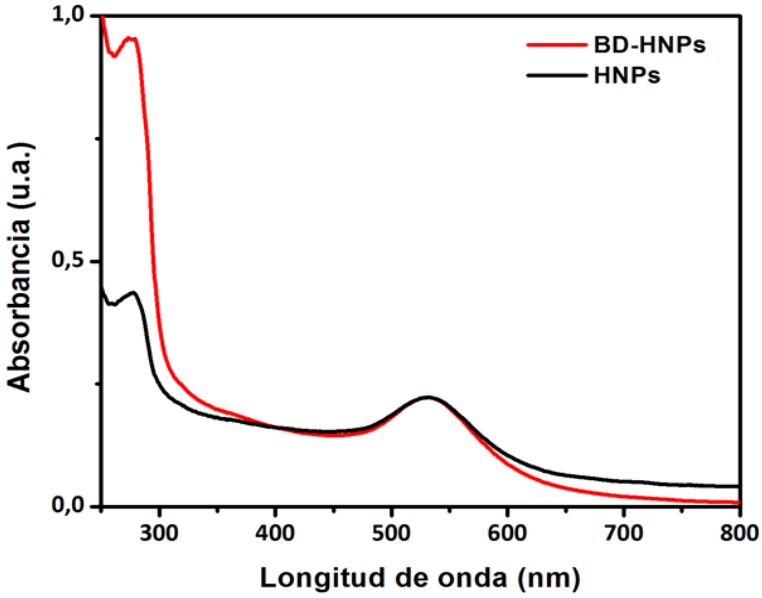

Fig. 5.5 – Espectros de absorbancia de las muestras HNPs y BD-HNPs (preparadas según la Estrategia II, acoplamiento realizado con glutaraldehído).

En la Fig. 5.6, se observan los espectros de absorbancia UV-visible de dos síntesis diferentes e independientes entre sí de HNPs decoradas con BD por la estrategia de acoplamiento post-irradiación. Las BD-HNPs I, corresponden a NPs decoradas con BD provenientes de una irradiación diferente que las nanoestructuras decoradas BD-HNPs II. En el caso de esta última muestra, puede observarse que se probó la modificación superficial con dos relaciones BD/NP distintas con el objetivo de poder regular la cantidad de péptido por NP. En el caso de las BD-HNPs II/A (Fig. 5.6, curva azul) la relación BD/NP utilizada en la síntesis fue 2 veces mayor con respecto a muestra BD-HNPs II/B (Fig. 5.6, curva roja). Esto se refleja en la disminución de la absorbancia a 280 nm que presenta esta última muestra.

Puede observarse en dicho gráfico que aunque se trate de diferentes muestras de HNPs (preparadas incluso en distintas irradiaciones), la decoración con una misma relación BD/NP (curva azul y fucsia) no varía significativamente a pesar de la heterogeneidad de las mismas.

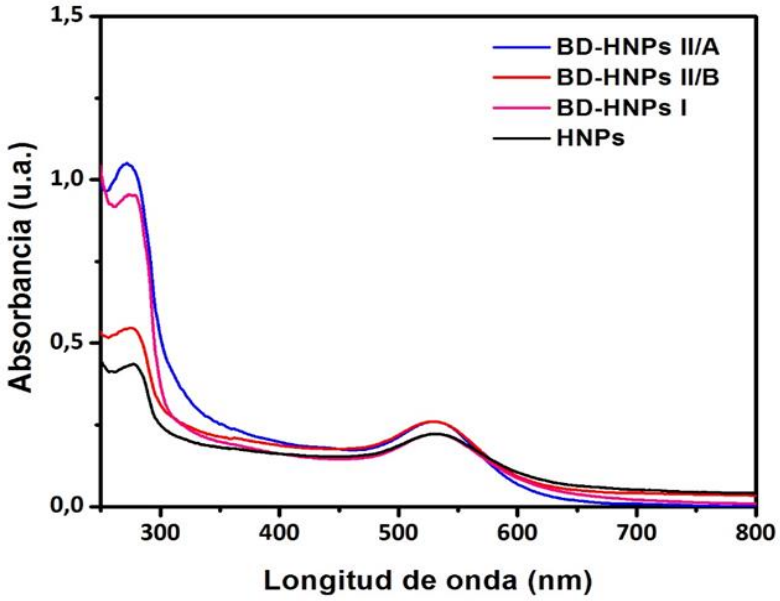

Fig. 5.6 – Espectros de absorbancia de dos series de decoración independientes de HNPs (preparadas según la estrategia post-irradiación utilizando glutaraldehído para el acoplamiento del péptido a la Alb) provenientes de dos irradiaciones distintas. La serie I, corresponde a las muestras HNPs I (curva negra) y BD-HNPs I (curva fucsia). La serie II está compuesta por las BD-HNPs II/A (curva azul) y las BD-HNPs II/B (curva roja), donde la primera tiene dos veces más péptido que la segunda.

Caracterización mediante ESI-MS

Con el objetivo de tratar de determinar si la reacción de activación del péptido tuvo lugar satisfactoriamente, se realizó un análisis mediante espectrometría de masas. Se analizaron las muestras de BD y BD-BMPS purificada, ambas diluidas en acetonitrilo/agua (1:1) con el agregado de ácido fórmico 0,1 %.

El PM de la BD es 1.993 g/mol y el del BMPS es 152 g/mol. Al reaccionar, una molécula de NHS (115 g/mol) es liberada, por lo que el producto BD-BMPS queda con un PM de 2.144 g/mol. El péptido puede mostrar señales de m/z 997,5, 665,33 y 499,25, dependiendo si adquiere 2, 3 o 4 cargas, respectivamente. Sin embargo, las señales esperadas para el péptido activado con esas cargas son 1.073, 715,67, y 537. Los espectros obtenidos de abundancia relativa en función de la relación m/z se observan en la Fig. 5.7.

En el gráfico correspondiente al péptido (Fig. 5.7(A)) se observan las tres señales esperables para las relaciones m/z antes mencionadas (remarcadas en rojo). Estas mismas señales aparecen también en el espectro del péptido activado (Fig. 5.7(B)). Esta muestra fue analizada después de la purificación, por lo que la presencia de dichas señales de m/z evidencia que hay BD sin reaccionar en la muestra BD-BMPS. Esto podría deberse a una ineficiente o incompleta purificación. Además, se observan las señales con m/z de 716,52 y 535,72 que se asignan al péptido activado con 2 y 3

cargas. Esto indica que la activación tuvo lugar, aunque la purificación haya sido deficiente.

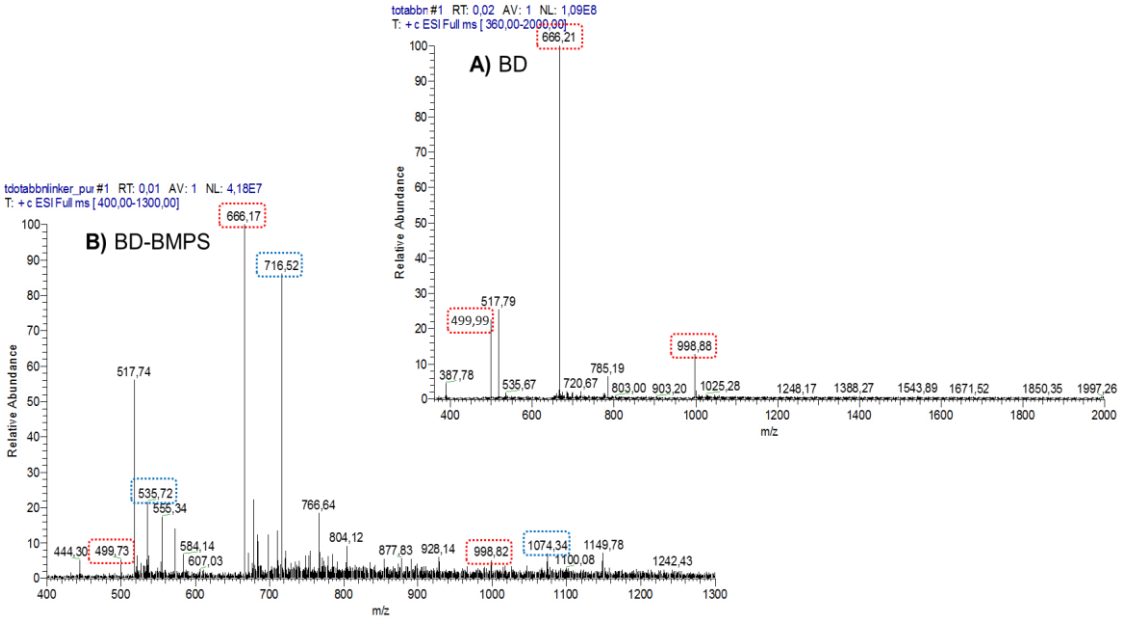

Fig. 5.7 – Análisis ESI-MS del péptido BD (**A**) y BD-BMPS (**B**).

Análisis mediante MALDI-TOF/TOF

Se analizó la muestra de BD-BMPS mediante MALDI-TOF/TOF. En la Fig. 5.8, se observan los resultados obtenidos.

Las dos señales más intensas del MS corresponden a los m/z 1.995,024 y 2.148,061. Éstas pueden corresponderse con la BD y BD-BMPS, respectivamente. Para comprobar dichos resultados, se realizó un análisis MS/MS de la señal 1.995,024 que se observa en la Fig. 5.9. A partir de este análisis de fragmentación, puede asignarse la señal de m/z 1995,024 al péptido BD.

El espectro MALDI-TOF (Fig. 5.8) mostró además de la presencia de BD libre y varias moléculas correspondientes al enlace de BD con diferentes relaciones de BD-BMPS (con relación molar de 1:1 a 1:3). De acuerdo con la Fig. 5.1 de la estructura del péptido, se pueden introducir de uno a tres BMPS por molécula de BD. Esto queda evidenciado por las señales de m/z 2.148,061, 2.300,044, 2.469,090 que se asignan a las uniones de BD-BMPS, BD-2*BMPS y BD-3*BMPS, respectivamente. Es posible que el tercer BMPS se encuentre unido al grupo imidazol (reacción que ocurre en solventes orgánicos), aunque esta descripto que esta unión es inestable en medios acuosos.

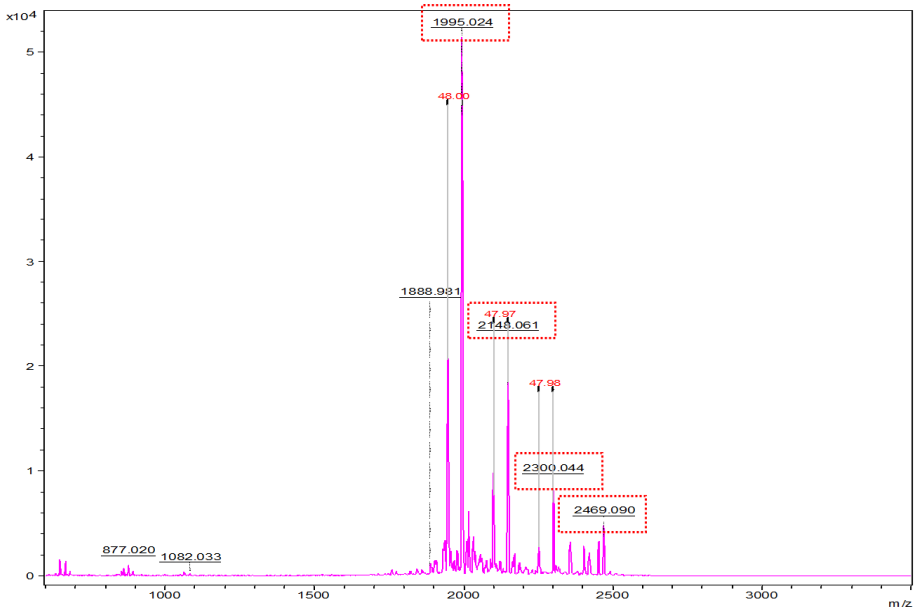

Fig. 5.8 – Análisis de MALDI-TOF de la muestra BD-BMPS.

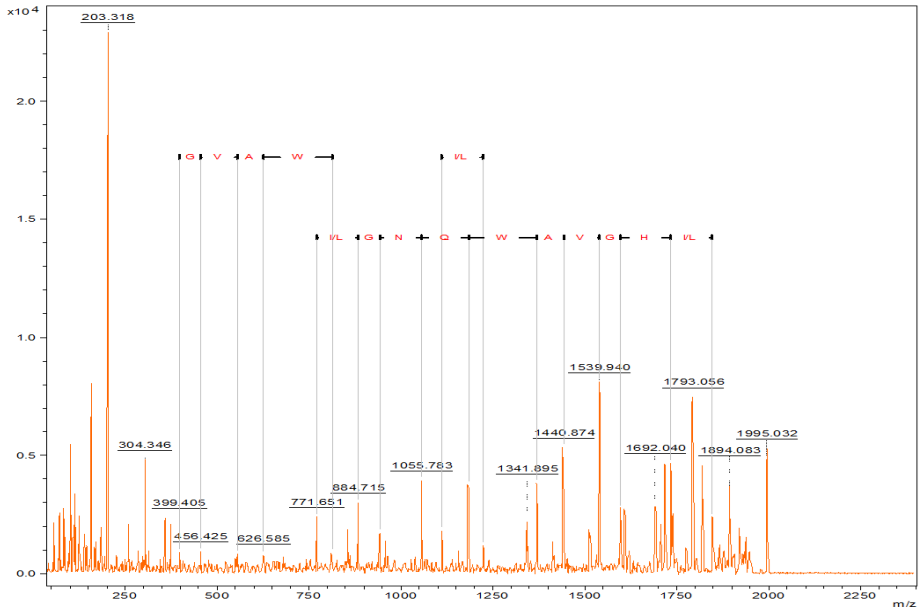

Fig. 5.9 – Análisis MS/MS de la señal con m/z 1.995,024.

Un análisis MALDI-TOF de las HNPs y BD-HNPs no se pudo hacer directamente como consecuencia del muy alto PM de las nanoconstrucciones. Sin embargo, para facilitar el análisis, se preparó BD-Alb-NPs siguiendo el mismo protocolo descripto para la decoración de las HNPs (según la Estrategia II). Esta muestra fue pre-tratada con tripsina para generar una hidrólisis peptídica. Previamente, se realizó un análisis similar sobre los productos proteolíticos de las proteínas BSA y HSA libres.

El análisis de los productos proteolíticos de la muestra BD-Alb-NPs generó varios picos m/z que, en su mayoría, no pudieron asignarse a la proteólisis estándar de las

proteínas libres por tripsina. Solo un péptido tríptico con m/z = 1.019 correspondiente al péptido (R)AFKAWAVAR(L) de la HSA, se identificó en las Alb-NPs (Fig. 5.9(A)). Adicionalmente, se observa una señal con un m/z = 2.164 que puede ser compatible con la BD-SMCC (m/z = 2.148). La identidad de este pico aún se encuentra en estudio (Fig. 5.10(B)).

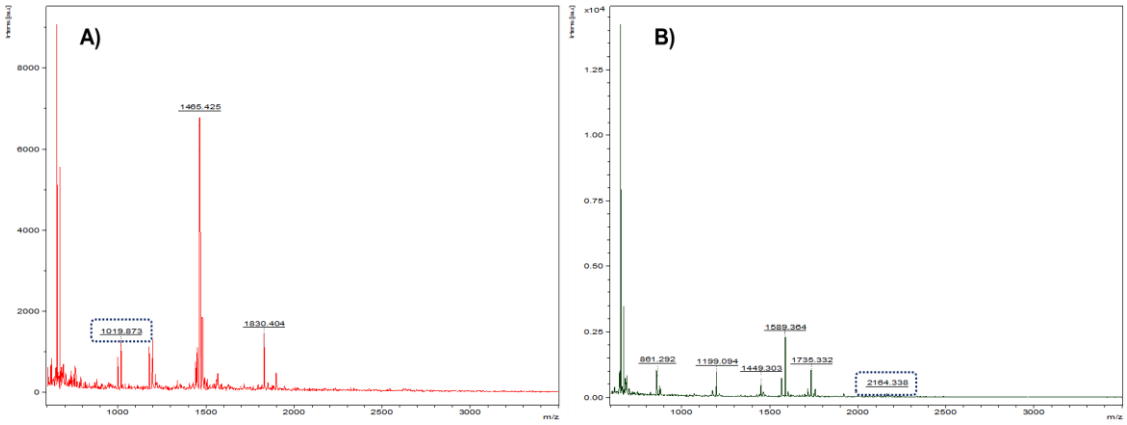

Fig. 5.10 – Análisis de digestión proteolítica de las Alb-NPs (**A**) y BD-Alb-NPs (**B**). Se observan marcadas las señales que se pudieron identificar.

Determinación de tioles libres

Es importante determinar la cantidad de grupos tioles libres en la superficie de la proteína de las NPs ya que la conjugación del péptido activado a la Alb (de las NPs o libre) se realiza mediante estos grupos al utilizar los reactivos de acoplamiento BMPS y SMCC.

La cuantificación de los tioles libre se realizó mediante el reactivo de Ellman sobre los NPs y la Alb libre. Para ello, las muestras fueron tratadas con DTT, con el objetivo de reducir los tioles oxidados [Cleland, 1964]. Posteriormente, fueron incubadas con el reactivo de Ellman (DTNB) para determinar los tioles libres por colorimetría. Los resultados se informan en la Tabla 5.1.

Se determinó un rango de 7.000-8.000 moléculas de tioles/NP de acuerdo con la intensidad del pre-tratamiento de reducción de tiol (incubación con el agente de reducción DTT). Se usó una relación molar de 10:1 de BD-SMCC:tiol para la segunda estrategia de acoplamiento (sobre la Alb presente en el recubrimiento de las NPs). La cuantificación de los tioles libres después de la reacción fue insignificante, por lo tanto, se presume que todos los tioles fueron modificados.

MUESTRA	Cantidad de NPs (NPs/l)[1]	Concentración de tioles (M)[2]	Moléculas de tioles	Moléculas de tioles/NP
H(HSA/BSA)-NPs	3,24E+11	8,47E-06	2,55E+15	7873

Tabla 5.1 – Cuantificación de tioles libres. [1]La cantidad de NPs/l se calculó a partir de la señal de resonancia de plasmón a 534 nm (en base a la cantidad de Au de las NPs, con las curvas de calibración descriptas en el Capítulo IV). [2]La concentración de tioles libres se calculó a partir de la absorbancia a 425 nm según lo descripto en la sección "Materiales y métodos".

Es importante aclarar, que esta determinación se realizó sobre muestras de NPs no purificadas por la columna CEM con la matriz G-200 (para eliminar la Albúmina libre), por lo tanto la estimación de la cantidad de tioles/NP está sobreestimada. La necesidad de purificar las NPs, para eliminar los contaminantes como proteínas o fragmentos de proteína libres y NPs de proteínas (como se describió en el Capítulo IV) fue identificada posteriormente.

Cuantificación de BD/NP

El principal desafío en la preparación de las NPs decoradas con BD ha sido la cuantificación del péptido, debido a su baja concentración.

En primera instancia, se intentó mediante un método espectrofotométrico simple desarrollado por Dadachova *et al*., para la determinación del número de ligandos poliazamacroclicos conjugados con inmunoproteínas [Dadachova, *et al*., 1999]. Se sabe que el Pb(II) forma complejos altamente coloreados con el Arsenazo(III). Es así que un complejo de color azul Pb(II)-AA(III) (relación 1:1), ha sido bien caracterizado, presentando un coeficiente de extinción molar de 10.000 en 660 nm. Además, esta reportado que el Pb(II) forma rápidamente complejos estables y cinéticamente inertes con el grupo DOTA, con una constante de estabilidad de 10^{23} - 10^{24} [Chaves, *et al*., 1992; Pippin, *et al*., 1995].

Este protocolo se llevó a cabo para cuantificar el DOTA mediante la transquelación del Pb(II) desde el complejo Pb(II)-AA(III). Para ello, se probaron distintas diluciones de muestras de BD-HNPs (obtenidas según la Estrategia II). Si bien se logró la preparación de una curva de calibración en el orden de 250 a 5.020 µmoles de DOTA, las muestras de NPs conteniendo el péptido no dieron resultados reproducibles.

Abordando el desafío por otro lado, se intentó la cuantificación del peptido a partir de la característica de alta afinidad del DOTA por los iones estroncio (Sr(II). Esta reportado que el DOTA coordina con alta afinidad distintos iones metálicos divalentes

y trivalentes. En el caso del ion estroncio (Sr(II)), la constante de afinidad es 14,39 pM [Martell, *et al*., 1996]. Esta característica hace al grupo DOTA del péptido BD, una herramienta importante para la cuantificación del mismo. En base a esta información, se probó una segunda técnica para determinar la relación BD/NP. Para ello, se incubaron muestras de NPs con y sin péptido, con una solución madre de Sr(II) en presencia de IDA, como se describe en la sección "Materiales y métodos", que actúa como un quelante de menor afinidad para evitar adsorciones inespecíficas. Los resultados obtenidos de la determinación de Sr(II) por la técnica ICP-AES se observan en la Tabla 5.2.

MUESTRA	Cantidad de NPs (NPs/l)[1]	Concentración de NPs (M)	Sr(II) determinado (µg)	Cantidad de DOTA (nmoles)[2]	Cantidad de NPs (nmoles)	Relación DOTA/NP (nmoles DOTA/nmol NP)
HNPs	6,24E+13	1,04E-10	0,045	0,513	1,04E-01	5
BD-HNPs	5,99E+13	9,94E-11	0,507	5,786	9,94E-02	58

Tabla 5.2 – Determinación de BD/NP mediante ICP-AES. [1]La cantidad de NPs/l se calculó a partir de la absorbancia a 534 nm (en base a la cantidad de Au de las NPs). [2]Los moles de DOTA se calcularon a partir del Sr(II) determinado. Una molécula de DOTA puede coordinar un Sr(II) por lo que los moles de estroncio se corresponden con los moles de DOTA, y por lo tanto BD.

Dado que la cantidad de BD por NP resultó más baja de lo esperado para la nanoconstrucción (60 nmoles BD/nmol de NP), se reemplazó el reactivo heterobifuncional de conjugación por glutaraldehído. Este último reacciona con grupos aminos (en lugar de tioles) de la Alb. La Alb tiene aproximadamente 30 aminos libres en su superficie [Habeeb, 1966] (frente a 1 grupo tiol), por lo que es esperable que la cantidad de péptidos a obtener en la decoración se vea incrementada al menos en un orden de magnitud.

Por otro lado, si bien por ICP-AES se logró la cuantificación del péptido, esta técnica tiene una desventaja muy importante que es el gran volumen de muestra que se necesita por determinación (1 ml) que no es recuperable. Este hecho, hizo que sea descartada como método de analítico.

Por esta razón, se probó una tercera forma de determinar el DOTA utilizando la capacidad de transquelación del Pb(II) del ligando Arsenazo(III). La determinación del Pb(II) quelado al DOTA se realizó finalmente mediante la técnica de Fluorescencia de Rayos X de Reflexión Total (TRXF). Respecto al rango elemental que esta técnica puede abordar, todos los elementos con Z > 13 pueden ser analizados disponiendo de las fuentes de excitación adecuadas. Los elementos con números atómicos inferiores a Z = 13 no se pueden determinar en equipos convencionales de TXRF. La medida

cuantitativa requiere de la adición de una solución patrón de concentración conocida, que debe tratarse de un elemento que no se encuentre en la muestra a analizar. Esta técnica puede detectar elementos en el límite inferior de partes por billón (ppb) [Fernández-Ruiz, 2010]. Una ventaja destacada de este método de medición es el volumen de muestra requerido por medida que está en el orden de pocos µl.

Se encontraron aproximadamente 1.800 BD/NPs en las muestras de BD-HNPs mientras que no se detectó Pb(II) en las HNPs sin péptido. La Tabla 5.3, muestra los resultados obtenidos. Estas muestras fueron preparadas por activación del péptido con glutaraldehído y su posterior unión a la Alb de las NPs, decoración realizada post-irradiación. Estas NPs fueron purificadas por CEM G-200 previo a la inmovilización de la BD sobre su superficie.

MUESTRA	Concentración de NPs (nM)[1]	Concentración de Pb(II) (ng/µl)[2]	Concentración de Pb(II) (nM)	Relación DOTA/NP	Promedio
HNPs	0,016	No detectable	-	-	-
BD-HNPs	0,017	0,003	18,10	1077	1831
BD-HNPs	0,017	0,008	43,44	2585	

Tabla 5.3 – Determinación de BD/NP mediante la medición del Pb(II) al DOTA del péptido BD. [1]La concentración de NPs se determinó a partir de la señal de pico de plasmón a 534 nm. [2]Concentración de Pb(II), cuantificado por esta técnica, corregido por estándar interno y volumen.

Mediante TXRF se pudo determinar la cantidad de péptido por NP. Se observó una relación de péptido alta comparada con la obtenida al conjugar el péptido con los acopladores heterobifuncionales. Para posteriores ensayos, la decoración fue realizada con glutaraldehído.

CONCLUSIONES PARCIALES

Se logró la decoración de las NPs híbridas oro/Alb con el péptido BD, mediante dos estrategias diferentes. La estrategia elegida es la que involucra la inmovilización del péptido sobre las NPs irradiadas y purificadas, ya que nos permitió obtener nanoestructuras con un diámetro hidrodinámico promedio de 100 nm, siendo estables en el tiempo y sin presentar agregación.

Se confirmó la activación del péptido y la unión del mismo a las NPs por técnicas de espectrometría de masas. Sin embargo, la cuantificación mediante ICP-AES, determinó alrededor de 60 nmoles de BD por nmol de NPs. Dada esta baja carga de

péptido, se procedió a realizar la conjugación del mismo a las NPs por el agente de entrecruzamiento glutaraldehído. Las NPs preparadas de esta forma, presentaron alrededor de 2.000 BD por NPs, determinado mediante TXRF.

Esta última técnica, fue la elegida para la cuantificación del DOTA (y, por lo tanto, del péptido), debido a su alta sensibilidad y el poco volumen de muestra requerido para la determinación.

REFERENCIAS

- Aprikian, *et al*., 1996. Bombesin specifically induces intracellular calcium mobilization via gastrin-releasing peptide receptors in human prostate cancer cells. *Journal of Molecular Endocrinology*, *16*(3), 297-306.
- Brewer, *et al*., 2005. Probing BSA binding to citrate-coated gold nanoparticles and surfaces. *Langmuir, 21*(20), 9303-9307.
- Chaves, *et al.*, 1992. The stability of metal complexes of cyclic tetraaza tetraacetic acid. *Talanta*, 39(3), 249-254.
- Cleland, 1964. Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups. *Biochemistry*, 3(4), 480-482.
- Dadachova, *et al*., 1999. Spectrophotometric method for determination of bifunctional macrocyclic ligands in macrocyclic ligand±protein conjugates. *Nuclear Medicine & Biology*, 26, 977-982.
- Fernández-Ruiz, 2010. Fluorescencia de Rayos X por reflexión total (TXRF): Una gran desconocida. *Anales de Química*, 106, 1.
- Habeeb, 1966. Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid. *Analytical Biochemistry*, 14(3), 328-336.
- Halmos, *et al*., 1995. Characterization of bombesin/gastrin-releasing peptide receptors in human breast cancer and their relationship to steroid receptor expression. *Cancer Research,* 55(2), 280-287.
- Jiménez-Mancilla, *et al*., 2013. Multifunctional targeted therapy system based on ^{99m}Tc/^{177}Lu-labeled gold nanoparticles-Tat (49–57)-Lys^{3}-bombesin internalized in nuclei of prostate cancer cells. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 56(13), 663-671.
- Langer and Beck-Sickinger, 2001. Peptides as carrier for tumor diagnosis and treatment. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*, 1(1), 71-93.
- Markwalder and Reubi, 1999. Gastrin-releasing peptide receptors in the human prostate: relation to neoplastic transformation. *Cancer Research*, 59(5),1152-1159.

- Martell, *et al*., 1996. Stability constants of metal complexes of macrocyclic ligands with pendant donor groups. *Supramolecular Chemistry*, 6(3-4), 353-363.

- Mendoza-Sánchez, *et al*., 2010. Lys^3-Bombesin conjugated to ^{99m}Tc-labelled gold nanoparticles for In Vivo Gastrin Releasing Peptide-Receptor imaging. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 6(4), 375-384.

- Okarvi, 2004. Peptide-based radiopharmaceuticals: future tools for diagnostic imaging of cancers and other diseases. *Medicinal Research Reviews*, 24(3), 357-397.

- Pippin, *et al*., 1995. Lead (II) complexes of 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N′,N ″,N‴-tetraacetate: solution chemistry and application to tumor localization with ^{203}Pb labeled monoclonal antibodies. *Inorganica Chimica Aacta*, 239(1-2), 43-51.

- Qin, *et al*., 1994. Inhibitory effect of bombesin receptor antagonist RC-3095 on the growth of human pancreatic cancer cells *in vivo* and *in vitro*. *Cancer Research*, 54(4),1035-1041.

- Rana, *et al*., 2012. Monolayer coated gold nanoparticles for delivery applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(2), 200-216.

- Reile, *et al*., 1994. Characterization of high-affinity receptors for bombesin/gastrin releasing peptide on the human prostate cancer cell lines PC-3 and DU-145: internalization of receptor bound ^{125}I-(Tyr^4) bombesin by tumor cells. *The Prostate,* 25(1), 29-38.

- Reubi, 2003. Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. *Endocrine reviews*, *24*(4), 389-427.

- Reubi, *et al*., 2002. Co-expressed peptide receptors in breast cancer as a molecular basis for in vivo multireceptor tumour targeting. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 29(7), 855-862.

- Rogers, *et al*., 2004. *In vitro* and *in vivo* evaluation of a 64Cu-labeled polyethylene glycol-bombesin conjugate. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 19(1), 25-34.

- Saptarshi, *et al*., 2013. Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle. *Journal of Nanobiotechnology*, 11(1), 26.

- Smith, *et al*., 2005. Radiolabeled peptide conjugates for targeting of the bombesin receptor superfamily subtypes. *Nuclear Medicine and Biology*, 32(7), 733-740.

- Sun, *et al*., 2000. Presence of receptors for bombesin/gastrin-releasing peptide and mRNA for three receptor subtypes in human prostate cancers. *The Prostate*, 42(4), 295-303.

- Toi-Scott, *et al*., 1996. Clinical correlates of bombesin-like peptide receptor subtype expression in human lung cáncer cells. *Lung Cancer*, 15(3), 341-354.

- Tsai, *et al.*, 2011. Adsorption and conformation of serum albumin protein on gold nanoparticles investigated using dimensional measurements and in situ spectroscopic methods. *Langmuir*, 27(6), 2464-2477.

CAPÍTULO VI. INTERACCIÓN DE NANOPARTÍCULAS CON CÉLULAS

Conocer la forma de interacción de las NPs con las células es de suma importancia para comprender y desarrollar nanosistemas con potencial uso en nanomedicina. En este contexto, es objetivo de este capítulo estudiar la interacción y captación de las NPs híbridas en presencia o ausencia del péptido sintético BD en la superficie de las mismas. Los resultados serán comparados con los obtenidos para las NPs recubiertas con una monocapa de Alb por adsorción física de las proteínas sobre la superficie de las Au-NPs.

Los ensayos de interacción *in vitro* se realizarán con dos líneas células tumorales y con un aislamiento de monocitos y linfocitos de sangre periférica humana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las NPs preparadas en los capítulos previos fueron marcadas con los cromóforos Bodipy FL NHS éster 502/508 y Bodipy NHS éster 630/650 (Invitrogen, ThermoFisher).

La línea celular PC-3 fue donada gentilmente por el *Laboratorio de Inflamación y Cáncer*, *FCEyN* (*UBA*).

Cultivo celular

Células PC-3 fueron incubadas en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10 % SFB (Internegocios) y 1 % de penicilina/estreptomicina (Gibco) a 37 °C y 5 % CO_2, hasta un 70-80 % de confluencia. Posteriormente, se sembraron placas de 24 pocillos con una densidad de $1{,}5 \times 10^5$ células/pocillo que se incubaron en medio fresco ON antes de realizar el tratamiento con las NPs.

Aislamiento in vitro de células mononucleares de sangre periférica humana

Se extrajeron 15 ml de sangre de una donante por punción venosa que inmediatamente fueron colocados en un tubo de 50 ml con 50 U/ml de heparina. Esta muestra se diluyó al medio con PBS, pH 7,4.

En un tubo de 15 ml, se colocaron 3 ml de Ficoll Paque PLUS (GE Healthcare) y se agregaron 12 ml de la muestra de sangre diluida (relación 1:3). En este paso, se forman dos fases por lo que se evitó el mezclado de las mismas. Posteriormente, se procedió a la centrifugación en frío a 400 g por 30 min. Las células mononucleares fueron recuperadas y lavadas con PBS dos veces, centrifugando a 250 g por 10 min

entre cada lavado para eliminar los restos de Ficoll. El pellet celular resultante se resuspendió en 1 ml de medio RPMI 1640 sin SFB, mezclando hasta homogeneizar. Una alícuota se usó para hacer recuento de células viables con cámara Newbauer y Azul Tripan.

Finalmente, las células ($1,5x10^5$ células/tubo) fueron colocadas en tubos con medio fresco suplementado con 10 % de SFB e incubadas por 4 h en estufa a 37 °C y 5 % CO_2. Este cultivo luego fue tratado con las NPs como se describe a continuación.

Estudios de interacción mediante citometría de flujo

La incubación de las células PC-3 y mononucleares con las NPs se llevó a cabo en el medio fresco RPMI 1640 con 10 % SFB y 0,5 mg/ml de HSA. Se estudiaron los tiempos 1, 2 y 4 h, mientras que la concentración final de NPs testeada fue 10 pM a 37 °C y 5 % de CO_2. Pasado el tiempo de incubación, las células PC-3 fueron lavadas 3 veces con PBS y tratadas con una solución de Tripsina 0,25 %/EDTA 0,53 mM (Gibco). Luego de la inactivación de la enzima con PBS suplementado con 10 % SFB, se procedió a centrifugar las células a 125 g por 5 min. El pellet celular resultante se resuspendió en 250 µl de PBS. Para las células mononucleares el protocolo seguido fue ligeramente diferente ya que después de los lavados, no se requirió el tratamiento con Tripsina/EDTA ya que este cultivo se realizó sin anclaje a soporte. Luego del tercer lavado y centrifugado, el pellet celular resultante se resuspendió en 250 µl de PBS.

Las NPs ensayadas fueron marcadas previamente con el cromóforo Bodipy FL NHS éster 502/508. Para ello, 100 µl de NPs se incubaron con 1 µl de una solución en DMF de Bodipy 2,5 mg/ml y 10 µl de buffer bicarbonato de sodio 0,8 M, pH 8,3. El tiempo de reacción fue 4 h a temperatura ambiente en agitación constante. Posteriormente, se agregó una solución de hidroxilamina 1,5 M, pH 8,5 para detener la reacción y se dializaron las muestras para eliminar el Bodipy no unido a las NPs. La diálisis se realizó en dos ciclos de 16 h cada uno en 500 ml de PBS, con intercambio de buffer entre cada ciclo. Se utilizó una membrana de diálisis PES (*MWCO* 10.000 Da). La marca fue equivalente en las distintas NPs ensayadas.

Una vez tratadas las células con las NPs y realizados los lavados, se procedió a analizar las muestras mediante el Citómetro Becton Dickinson FACSCalibur. La adquisición de datos y los análisis se realizaron utilizando el software BD CellQuest Pro. Se registraron 20.000 eventos por muestra, analizando para cada evento la dispersión directa, la dispersión lateral y la fluorescencia, registradas en el canal FL1

(filtro de paso de banda de 530/30 nm), correspondiente a FITC. Cabe destacar que todas las condiciones ensayadas se realizaron por triplicado.

Para aproximar los mecanismos involucrados en la captación de las BD-HNPs se estudió su interacción con las células a 5 y 37 °C. Para ello, se preincubaron las células a la temperatura correspondiente 1 h antes del tratamiento con las NPs y durante el mismo. El tiempo de incubación ensayado fue 4 h.

Para el análisis estadístico de los resultados, todas las mediciones directas realizadas fueron expresadas por su media geométrica (calculada para los 20.000 eventos registrados) ± la desviación estándar de la muestra, utilizada para describir la precisión del conjunto de datos. Dicho análisis se realizó utilizando el software Graph Pad Prism v6.0. Los ensayos de las nanoestructuras con recubrimiento monocapa versus las multicapa a 37 °C, se analizaron mediante un ANOVA de dos vías seguido por un post test de múltiples comparaciones Sidak. En cambio, el estudio de la interacción de las BD-HNPs con las células a 5 °C y 37 °C, se realizó mediante *test de Student.* Las diferencias se consideraron significativas sólo cuando $p < 0,05$.

Análisis de interacción por microscopía de contraste de fases

A partir de un cultivo de PC-3 al 70-80 % de confluencia, y de acuerdo al protocolo de Tkachenko *et al.*, se procedió a la siembra de $1x10^5$ células/pocillo en una placa de 24 pocillos sobre vidrios para microscopía tratados con poli-Lisina para facilitar la adhesión celular [Tkachenko, *et al.*, 2004]. Luego de un crecimiento ON a 37 °C y 5 % CO_2, se procedió a la incubación de las células con una concentración de NPs de 1 pM por 4 h en medio RPMI fresco complementado con 10 % SFB y 0,5 mg/ml HSA a 37 °C. Posteriormente, las células fueron lavadas 3 veces con PBS y tratadas con 4 % paraformaldehído por 20 min a 37 °C. Finalmente, se removió parte del agente de fijación celular con un lavado con PBS y se colocaron las muestras en portaobjetos para ser observadas en el microscopio.

Las muestras fueron observadas en un microscopio óptico Olympus IX-71 (Olympus), en una magnificación de 400 x.

Análisis de interacción por microscopía láser confocal

Siguiendo el protocolo descripto anteriormente, las células PC-3 fueron tratadas con una concentración 10 pM de NPs por 4 h en medio RPMI fresco complementado con 10 % SFB y 0,5 mg/ml HSA a 37 °C. Las NPs fueron marcadas con el cromóforo Bodipy NHS éster 630/650.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Los núcleos celulares de la línea PC-3 fueron marcados con el cromóforo Syber Green (Sigma-Aldrich). Las longitudes de onda de excitación y emisión para el Bodipy son 625 nm y 640 nm; el Syber Green se excita a 497 nm y emite a 520 nm.

Adicionalmente, se estudió la interacción de las NPs híbridas con la línea celular NCI-H460 (cáncer de pulmón de células no pequeñas). Las mismas fueron incubadas con 10 pM de NPs siguiendo los protocolos descriptos para la línea PC-3. Una vez lavadas y fijadas, los núcleos celulares fueron teñidos con un cromóforo azul para luego ser visualizadas en el microscopio.

Este trabajo se realizó en colaboración con el Dr. Juan Sebastian Yackisich (*Hampton University*, Virginia, USA).

Mediante el uso del microscopio láser confocal Olympus FV300/BX61 se excitaron las muestras con los láseres Blue Argon (488 nm) y Helio-Neón Rojo (633 nm). La detección de fluorescencia se realizó con los filtros de emisión pasa-banda 520/10 y pasa-altos mayores de 660 nm, respectivamente. Por otra parte, se utilizó un objetivo 10x de aumento UPlan Fl 10x/0,3 y un objetivo 60x PlanApo/1,4 de inmersión en aceite. El software de análisis de imágenes fue FluoView Olympus versión 5.0. Cabe destacar que por las combinaciones usadas de fluoróforos, se evitó cualquier posibilidad de superposición de señales.

Las nanoestructuras estudiadas fueron: Alb_m/Au-NPs, BD-Alb_m/Au-NPs (ambas con recubrimiento en forma de monocapa), HNPs y BD-HNPs (recubrimiento de Alb en multicapa, obtenido por estabilización radio-inducida) para las células PC-3. Con la línea NCI-H460, sólo se testearon las HNPs y BD-HNPs.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Como se describió en el Capítulo I, un desafío importante en la ciencia de los materiales para nanomedicina es desarrollar enfoques que aseguren que, cuando se administran *in vivo*, las NPs se direccionen hacia su sitio de acción u objetivo. En general, este sitio está compuesto por un conjunto de células que expresan una molécula blanco. Sin embargo, en un ambiente biológico, las NPs son rápidamente recubiertas por proteínas séricas, que afectan su estructura y pueden tener consecuencias importantes en la eficiencia terapéutica [Damalakiene, *et al.*, 2013]. Por esta razón en la actualidad se busca obtener NPs complejas, haciendo énfasis en el estudio de su interacción con las células blanco y con las proteínas séricas.

Hace unos años se considera que el tamaño de NPs efectivo para ser usado en terapia contra el cáncer debe variar entre 10 y 100 nm. Se cree que una ventaja del uso de estas nanoestructuras en cáncer es que la vasculatura tumoral tiene una mayor permeabilidad para las macromoléculas, además de que esta reportada una escasa funcionalidad del sistema linfático en los medios circundantes al tumor. Según esta corriente, las NPs tienden a acumularse en los tumores y dan lugar al fenómeno conocido como "Efecto de la permeabilidad y retención mejoradas", también llamado EPR [Kobayashi, *et al.,* 2014]. Sin embargo, en la actualidad este fenómeno genera controversias en el mundo científico. Hay reportados estudios recientes que contradicen este efecto [Van der Meel, *et al*., 2017].

A la hora de realizar el diseño de las NPs para uso en Nanomedicina, es fundamental tener en cuenta las barreras biológicas a las que se expondrán las nanoestructuras *in vivo*. La entrada de NPs a las células, la acumulación en órganos o el cruce de estas barreras biológicas puede controlarse mediante un diseño correcto. Tanto el tamaño, la carga, los distintos tipos de recubrimientos o ligandos expuestos en la superficie, así como también la interacción de estas nanoestructuras con las proteínas séricas, son características importantes a tener en cuenta durante el diseño de las mismas [Polo, *et al*., 2017; Verma and Stellacci, 2010]. Esto es relevante ya que, como se mencionó en el Capítulo I, la mayor limitación en la aplicación de las NPs en terapia y diagnóstico es producto de la incapacidad de controlar el transporte de las mismas dentro del cuerpo humano [Wilhelm, *et al.,* 2016].

Al entrar en contacto las NPs con el medio bilógico, se forma una corona de proteínas séricas sobre su superficie. La composición de esta corona proteica está fuertemente correlacionada con el tamaño, la composición y forma de las NPs. Los científicos encontraron la manera de modular esta interacción mediante la química de superficie de las NPs. Una vez más, el diseño de las nanoestructuras adquiere relevancia. En este sentido, diferentes tipos de recubrimientos fueron planteados para contrarrestar lo mayor posible los efectos de la corona proteica. Para ello, resulta de suma importancia comprender cómo está formada esta corona y cómo podría afectar la interacción de las NPs con las células blanco [Cedervall, *et al.,* 2007].

Tal es la importancia del efecto corona, que consideramos fundamental el estudio de la interacción de las NPs en un entorno similar al biológico y es por esta razón, que los ensayos posteriormente descriptos fueron realizados en medios de cultivo celulares suplementados con suero fetal bovino y albúmina sérica humana.

Siguiendo la corriente de preparación de nanosistemas complejos, con una sumatoria de características que los convierta en herramientas de Nanomedicina, se

propone a las NPs híbridas decoradas con Bombesina-DOTA para aplicaciones teranósticas. Estas NPs, compuestas por oro/Albúmina, tienen características que las convierten en una plataforma multifuncional con respecto a las NPs preparadas por adsorción física de proteínas o péptidos en forma de monocapa. Estas últimas NPs, en general basan su recubrimiento en la alta afinidad tiol/Au. Si bien el recubrimiento con proteínas es una solución para mejorar la estabilidad de las Au-NPs, es importante destacar que la mayoría de las proteínas pierden parcialmente su conformación nativa cuando interactúan con la superficie altamente estructurada de las NPs [Tsai, *et al*., 2011]. Además, esta unión que posee una constante en el rango milimolar, se disocia fácilmente dando lugar a un intercambio con otras proteínas presentes en un medio complejo [Brewer, *et al.,* 2005; Lee, *et al.*, 2015]. Esto representa una desventaja cuando las NPs son recubiertas con señales de direccionamiento ya que lo más probable es que ocurra la pérdida de dicha señal.

En cambio, las HNPs están compuestas por un núcleo metálico recubierto por Alb estabilizada, que conserva en su mayoría su estructura monomérica (Capítulos II y IV). La dispersión óptica de las Au-NPs se puede aprovechar para detectarlas con una variedad de métodos de microscopía [El-Sayed, *et al*., 2005]. Las Au-NPs absorben fuertemente los rayos X y, por lo tanto, se pueden usar como agentes de contraste para las técnicas de imagen basadas en rayos X y, como adyuvantes en radioterapia [Galper, *et al*., 2012; Liu, *et al*., 2010]. Además, las Au-NPs pueden transformar la luz absorbida en calor, lo que resulta en un aumento de la temperatura localizada, que se puede usar para proporcionar contraste para imágenes fotoacústicas o para terapia fototérmica [Mieszawska, *et al*., 2013].

Por otro lado, la Albúmina constituye aproximadamente el 50 % de las proteínas presentes en el plasma de individuos sanos. Es una proteína multifuncional que puede unirse y transportar numerosos compuestos endógenos y exógenos. El desarrollo de sistemas portadores de drogas en base a Albúmina adquiere cada vez más relevancia en la terapia contra el cáncer, particularmente como resultado de la aprobación en el mercado de las NPs de Albúmina cargadas con Paclitaxel (Abraxane®) [Merlot, *et al*., 2014]. Actualmente, hay un gran interés en el estudio de los receptores celulares de Albúmina, para comprender los mecanismos y vías responsables de su captación, distribución y catabolismo en múltiples tejidos [Sand, *et al*., 2015].

La retención de Albúmina en los tumores se ha observado experimentalmente en varios tumores sólidos a partir de estudios con esta proteína sérica radiomarcada [Peterson and Appelgren, 1973; Sinn, *et al*., 1990; Andersson, *et al*., 1991; Schilling, *et al*., 1992; Stehle, *et al*., 1997; Wunder, *et al*., 1997]. Además, varios estudios han

propuesto que los tumores son un sitio de catabolismo de Albúmina [Andersson, *et al*., 1991; Schilling, *et al*., 1992; Stehle, *et al*., 1997]. Por lo tanto, se cree que éstos la utilizan como fuente de energía, al descomponerla en sus aminoácidos constituyentes dentro de los lisosomas. Posteriormente, las células cancerígenas utilizan estos aminoácidos para su crecimiento acelerado [Stehle, *et al*., 1997]. De esta manera, la presencia de esta proteína en el nanosistema desarrollado, cumpliría más de una función.

Como se describió en el Capítulo V, la decoración de las HNPs con el péptido Bombesina-DOTA, completa la preparación del nanosistema, gracias a la posibilidad de brindar un direccionamiento hacia células tumorales con sobreexpresión de GRPr y la capacidad de radiomarcar el grupo DOTA con radioisótopos de interés teranóstico.

Todas estas características convierten a las NPs híbridas en un nanosistema con potencial uso teranóstico, como se detalla en la Fig. 6.1.

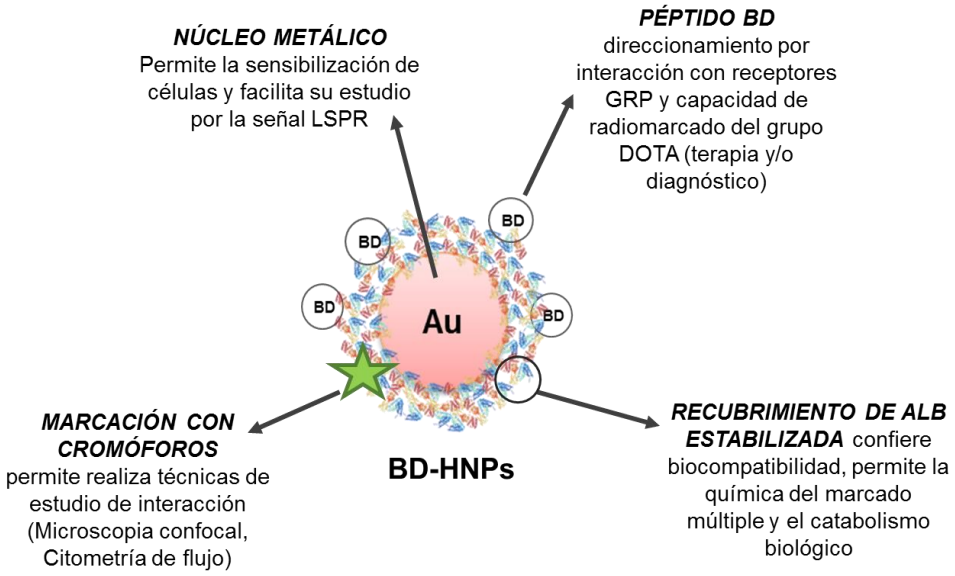

Fig. 6.1 – Descripción de BD-HNPs.

A continuación, se estudiará la interacción de distintos tipos de células con las HNPs con y sin BD, intentando hacer una aproximación de los mecanismos de internalización involucrados en la captación celular.

Estudio de interacción en células PC-3 mediante citometría de flujo

Para el estudio de interacción de las NPs con las células PC-3, las diferentes NPs, decoradas y sin decorar, fueron marcadas con el cromóforo Bodipy FL NHS éster 502/508. El grado de marcación fue equivalente en las diferentes NPs.

La línea celular PC-3 proviene de un adulto masculino de 62 años, con un adenocarcinoma de grado IV. Son células de tejido prostático, que crecen de manera adherente en forma de monocapa celular y tienen una morfología epitelial. Es utilizada como modelo en el estudio de nanomedicinas en base a BN/GRPr. Esto se debe a que está demostrado que varios modelos de cáncer de próstata responden a la BN y sus antagonistas. La proliferación de las células PC-3 puede ser estimulada por estos péptidos gracias a la sobreexpresión de los GRPr [Reile, *et al*., 1994]. Sin embargo, esta última característica convierte a los péptidos análogos a BN en una herramienta para el direccionamiento de nanosistemas. Una concentración superficial lo suficientemente baja del péptido en una NPs como para poder interaccionar con los GRPr sobreexpresados representa una ventaja en el diseño de nanosistemas. En este sentido, Van de Wiele *et al*. reportó una única clase de sitios de unión con alta afinidad para Bombesina en PC-3 (K_d 2,5 nM) [Van de Wiele, *et al.,* 2000]. Considerando que una NP interacciona con una decena de receptores de membrana, una cantidad de NPs/célula saturante del sistema estará en el orden los 10^2-10^3 NPs.

En la Fig. 6.2, se pueden observar los gráficos correspondientes a los resultados obtenidos para las NPs monocapa (Alb_m/Au-NPs y BD-Alb_m/Au-NPs) y las NPs híbridas multicapa (HNPs y BD-HNPs) con la línea celular PC-3.

Se observó una mínima interacción para las Alb_m/Au-NPs (Fig. 6.2(A)). Sin embargo, al decorarlas con BD (Fig. 6.2(B)), estas NPs sí mostraron una mayor interacción en comparación, que alcanza el máximo a las 4 h, aunque es mínima la diferencia observada entre 2 y 4 h. Este aumento de la intensidad de fluorescencia registrado puede deberse a la presencia de BD superficial ya que es la única diferencia entre la construcción de las dos NPs control.

La Fig. 6.2(C) corresponde al tratamiento de estas células con las HNPs con y sin péptido. Las HNPs se comportaron de manera similar que las nanoestructuras con recubrimiento en monocapa. No se observaron diferencias en la interacción con el tiempo, ya que a 1 y a 4 h se registró la misma intensidad de fluorescencia.

En cambio, las BD-HNPs, registraron la mayor interacción con respecto a todas las nanoestructuras ensayadas. Esto se observó como un mayor corrimiento hacia valores de fluorescencia mayores. Esta interacción se le adjudica a la presencia de BD en la superficie de las HNPs. A partir de la Fig. 6.2(C) se determinó 4 h como tiempo óptimo de incubación para obtener la mayor interacción.

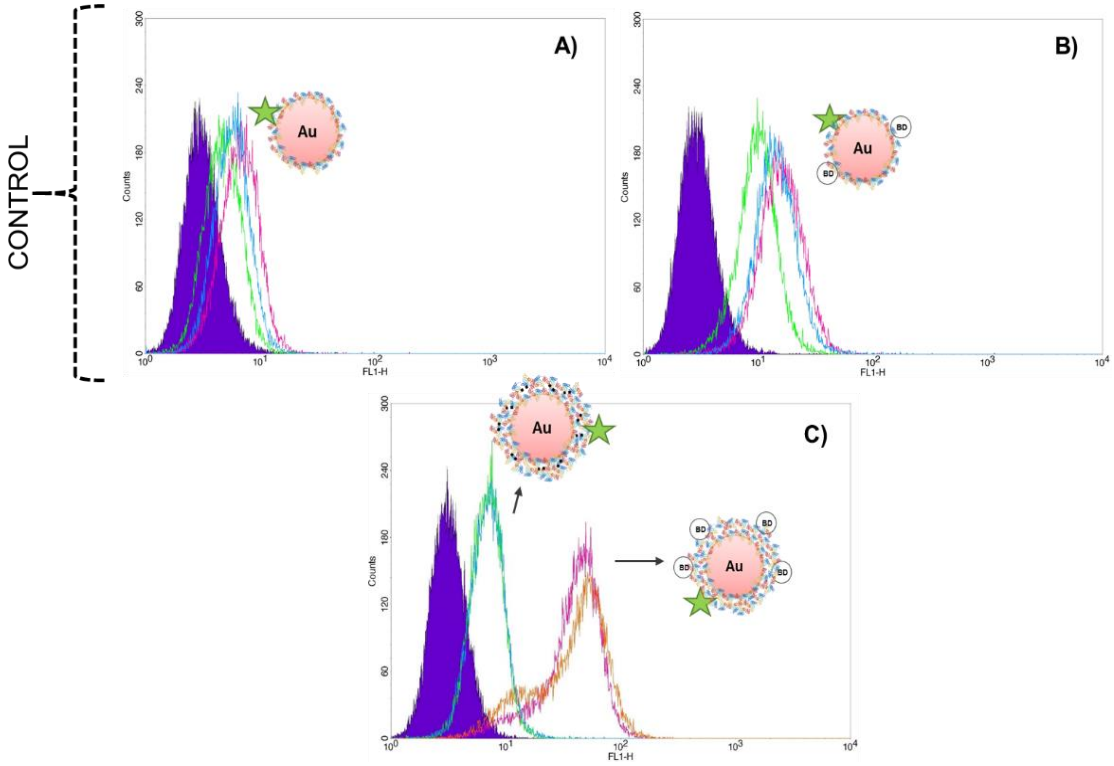

Fig. 6.2 – Citometría de flujo de células PC-3 tratadas a 37°C con: (**A**) Alb_m/Au-NPs a 1 h (verde), 2 h (celeste), 4 h (fucsia); (**B**) BD-Alb_m/Au-NPs a 1 h (verde), 2 h (celeste), 4 h (fucsia); (**C**) HNPs a 1 h (verde), 4 h (celeste); BD-HNPs a 1 h (fucsia), 4h (naranja).

Mediante el análisis estadístico de las medias geométricas y sus desvíos, se buscó confirmar si los resultados obtenidos por citometría demostraban diferencias significativas en la interacción de las células PC-3 con las distintas NPs ensayadas. Sobre todo este análisis resulta importante para interpretar los resultados obtenidos con las Alb_m/Au-NPs y HNPs, que mostraron interacciones similares.

En primer lugar, se compararon las cuatro nanoestructuras a los tiempos de incubación 1 h y 4 h. Para ello, se graficaron las medias geométricas frente al tiempo. En la Fig. 6.3, se observó que transcurrida 1 h de incubación, las nanoestructuras que más interaccionaron fueron las BD-HNPs con una significancia < 0,0001. A este tiempo, las Alb_m/Au-NPs presentaron una interacción significativamente distinta que las BD-HNPs ($p \leq 0,001$). Sin embargo, no se encontró diferencia significativa entre las NPs con recubrimiento en monocapa y las HNPs. Estas últimas nanoestructuras tampoco presentaron una interacción significativamente distinta con las BD-Alb_m/Au-NPs.

Una vez transcurridas 4 h de incubación, se observó un aumento mínimo en la interacción de las BD-HNPs. Esta nanoestructura aún continuó registrando la mayor interacción encontrada, con una significancia ≤ 0,0001. A dicho tiempo de incubación, las BD-Alb_m/Au-NPs control presentaron un corrimiento hacia valores de fluorescencia

mayores, que no se observó para las otras dos nanoestructuras probadas. Una vez más, el análisis estadístico demostró que las NPs monocapa y las HNPs no fueron significativamente diferentes a ese tiempo.

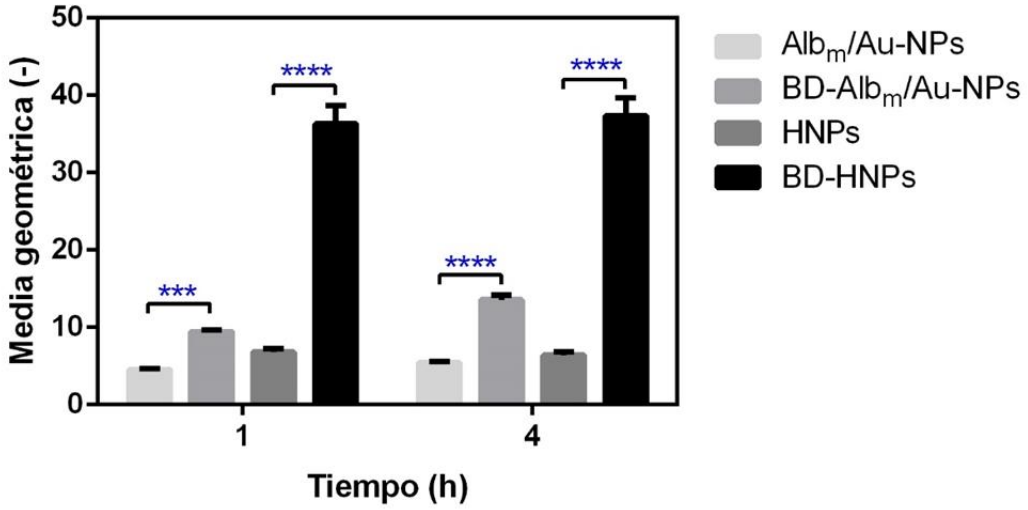

Fig. 6.3 – Análisis estadístico de interacción de los nanosistemas con las células PC-3. Media geométrica en función del tiempo de incubación (1 y 4 h) de las Alb$_m$/Au-NPs y HNPs, con y sin BD. Temperatura de incubación: 37 °C.

Cuando las NPs entran en contacto con las células su captación puede ocurrir por varios mecanismos, aunque se pretende que el ingreso sea a través de mecanismos de endocitosis. En este caso, las NPs son encapsuladas en vesículas que serán transportadas a los compartimientos especializados de clasificación intracelular. La endocitosis se puede clasificar en varios tipos: fagocitosis, endocitosis mediada por clatrina, endocitosis mediada por caveolina, endocitosis independiente de clatrina/caveolina y macropinocitosis. Estos mecanismos, descriptos en profundidad en el Capítulo I, son los responsables de la captación activa de ligandos a las células, los cuales requieren gasto de energía. En cambio, procesos como la difusión, ocurren sin gasto de energía y sin la mediación de receptores por lo que no son mecanismos de interacción selectivos.

Con el fin de estudiar los posibles mecanismos de interacción entre las células y las NPs, se realizó la incubación de las mismas con las nanoestructuras a 5 °C. Está reportado que a esta temperatura sólo se registran los mecanismos de internalización pasivos, por lo que de haber una interacción puede deberse a un proceso de adsorción superficial inespecífica o incorporación por difusión [Damalakiene, *et al.*, 2013]. Por medio de la incubación a baja temperatura, pueden inhibirse los

mecanismos de endocitosis y estudiar los mecanismos de captación celular [Mironava, *et al*., 2010].

En la Fig. 6.4, se puede observar la comparación de la interacción de las BD-HNPs con las células PC-3 incubadas por 4 h a 5 °C y 37 °C. Se comprobó que a 5 °C la interacción es menor con respecto a la observada incubando las células a 37 °C. La diferencia entre las dos temperaturas de incubación fue significativa ($p \leq 0{,}0001$). Este resultado nos permite indica que existe una pequeña interacción inespecífica. Sin embargo, se observó que la interacción a 37 °C es marcadamente mayor, por lo que podemos concluir que predomina la captación de las NPs por mecanismos activos (dependiente de energía). Cabe destacar que todos los ensayos se realizaron en presencia de 10 % SFB y el agregado de HSA a los medios de incubación durante los tratamientos con las NPs. Por esta razón, podemos afirmar que existe una interacción de las células tratadas con las NPs en condiciones similares a las biológicas (*in vivo*).

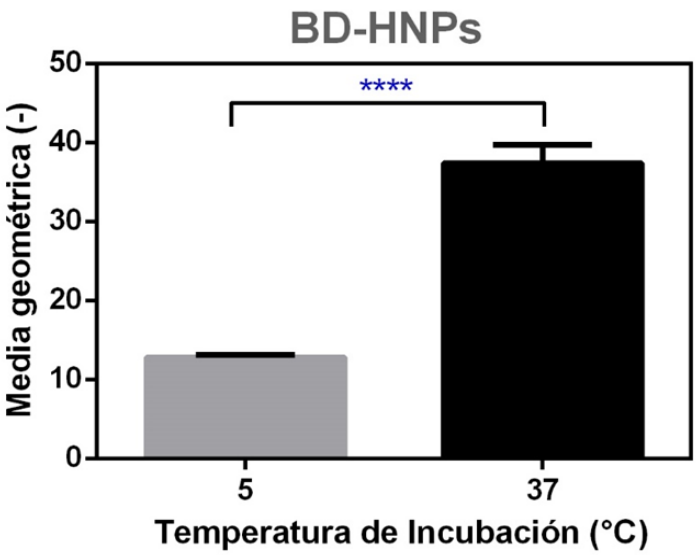

Fig. 6.4 – Análisis estadístico de resultados de Citometría para línea celular PC-3. Media geométrica en función de la temperatura de incubación (5 °C y 37 °C) de las BD-HNPs.

Estudio de interacción de NPs con células mononucleares humanas

La existencia de una conexión funcional entre el sistema nervioso y el sistema inmune está respaldada por la observación de receptores de neuropéptidos en las células de este último sistema [Del Río, *et al*., 1994]. Los linfocitos son células reguladoras y efectoras importantes en la respuesta inmune, y la posible modulación de su proliferación por los neuropéptidos de la familia de la Bombesina podría representar una forma significativa de acción de estos neuropéptidos en el sistema

inmunológico. Sin embargo, que los linfocitos reconozcan estos péptidos podría resultar una barrera para las nanomedicinas que contengan Bombesina o análogos a este péptido.

En este contexto, se buscó estudiar la interacción de las NPs con las células mononucleares de sangre periférica (PBMC), monocitos y linfocitos. Para ello, se realizó una extracción de muestra de sangre de una donante sana con Ficoll-Paque PLUS, como se detalla en la sección “Materiales y métodos”. Los linfocitos son recuperados de la interfaz entre el plasma y el Ficoll-Paque PLUS con otras partículas de sedimentación lenta (plaquetas y monocitos). Una vez recuperadas las células de la interfase, se someten a pasos cortos de lavado con PBS con el fin de eliminar las plaquetas, el reactivo de separación y el plasma. De esta manera, se aislaron monocitos y linfocitos humanos que fueron cultivados *in vitro* por 4 h antes de la incubación con las NPs en medio fresco.

Finalmente, estas células fueron tratadas con 10 pM de NPs con y sin BD. Los tiempos de incubación ensayados fueron 30 min, 1 h, 2 h y 4 h, a 37 °C y 5 % CO_2. En la Fig. 6.5 se observan los resultados obtenidos.

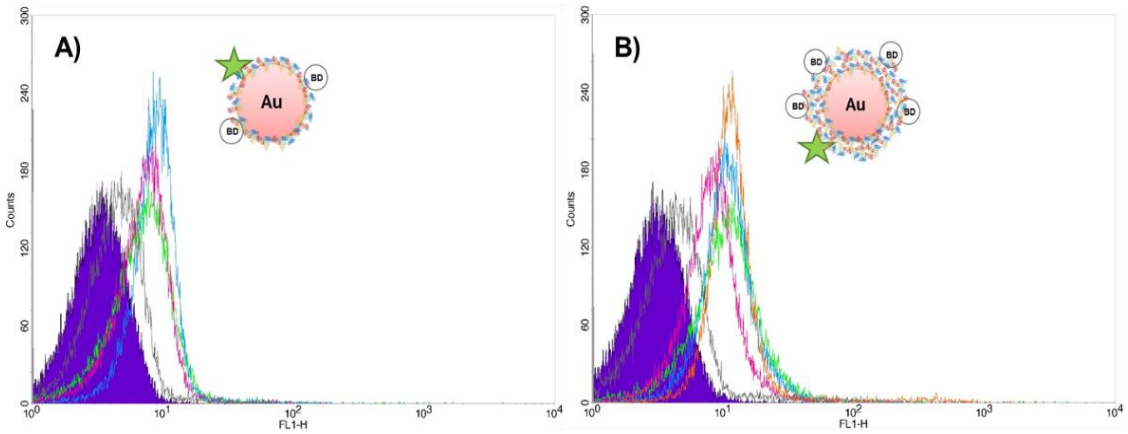

Fig. 6.5 – Citometría de flujo de linfocitos aislados incubados con: (**A**) Alb_m/Au-NPs a 4 h (gris) y BD-Alb_m/Au-NPs a 0,5 h (verde), 1 h (fucsia) y 4 h (celeste); (**B**) HNPs a 4 h (gris) y BD-HNPs a 0,5 h (verde), 1 h (fucsia), 2 h (celeste) y 4 h (naranja). Temperatura de incubación: 37 °C.

La Fig. 6.5(A) corresponde a las PBMC incubadas con las NPs con recubrimiento en forma de monocapa. Las NPs sin péptido mostraron una interacción menor (curva gris) similar a la obtenida con la línea celular PC-3. En el tratamiento con las BD-Alb_m/Au-NPs, se observó un corrimiento de las curvas hacia mayor fluorescencia. Con respecto al tiempo, se probaron incubaciones de 0,5, 1 y 4 h. Se observó que a mayor tiempo de incubación, mayor fue el número de células detectadas con igual fluorescencia. A 4 h, se detectó la mayor interacción. Sin embargo, al comparar estos resultados con los obtenidos para el mismo tratamiento en la línea celular PC-3, se

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

encontró que los valores de interacción son similares (ver Fig. 6.2(B)). Es más, transcurridas 4 h de incubación de las PBMC con las BD-Alb_m/Au-NPs, se observa igual interacción que la obtenida tras 1 h de incubación de estas NPs con las células PC-3 (con sobreexpresión de GRPr).

La Fig. 6.5, corresponde al tratamiento de las PBMC con las HNPs sin péptido (curva gris) y con BD (demás curvas). Se encontró que la interacción de las HNPs es similar que las NPs monocapa sin péptido. Cuando estas células fueron incubadas con las BD-HNPs, hubo un corrimiento de la señal hacia valores de fluorescencia mayores. Sin embargo, los valores de intensidad son menores a los encontrados al incubar estas NPs con células con sobreexpresión de GRPr (ver Fig. 6.2(C)).

Estos resultados demuestran que si bien hay una interacción de los nanosistemas probados con los linfocitos y monocitos, esta interacción es baja en comparación a la que presentan estas NPs con células con sobreexpresión del GRPr. Esta interacción podría ser regulada mediante la carga superficial de la señal de direccionamiento (BD en este caso).

Análisis de interacción mediante microscopía de contraste de fases

Se realizó un experimento preliminar para observar la captación de NPs en células PC-3. Para ello, éstas fueron incubadas por 4 h a 37 °C con una concentración 1 pM de las NPs control (Alb_m/Au-NPs y BD-Alb_m/Au-NPs) y las NPs híbridas (HNPs y BD-HNPs). Después de enjuagar el exceso de NPs, las células se fijaron y visualizaron en un microscopio de contraste de fase.

En la Fig. 6.6, se observan las imágenes obtenidas. Las BD-Alb_m/Au-NPs muestran grupos de NPs cerca de la membrana celular (puntos negros señalados en imagen Fig. 6.6(B)). Sin embargo, las BD-HNPs, muestran la localización de las NPs en el citoplasma. Además, las células tratadas con NPs sin péptido BD, muestran una menor absorción de células para las HNPs en comparación con Alb_m/Au-NPs. Cabe destacar que este ensayo se realizó con una concentración 10 veces menor de NPs respecto de los estudios realizados por citometría para la misma línea celular.

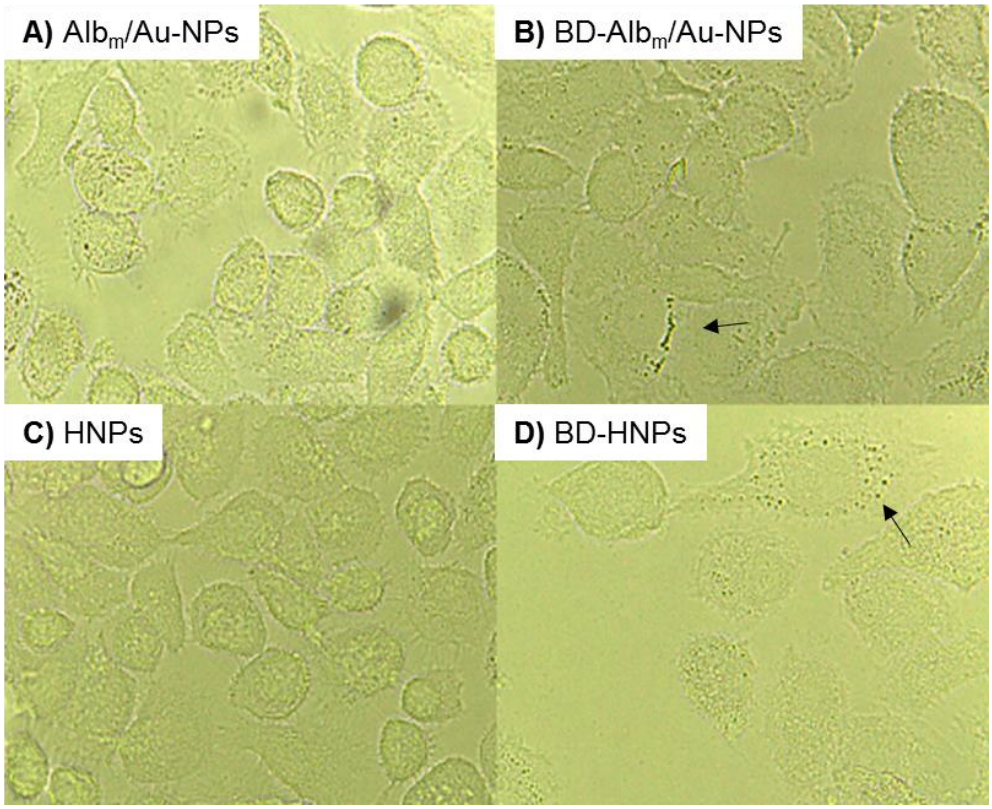

Fig. 6.6 – Imágenes obtenidas por microscopía de contraste de fases de células PC-3 tratadas con 1 pM de Alb$_m$/Au-NPs (**A**), BD-Alb$_m$/Au-NPs (**B**), HNPs (**C**) y BD-HNPs (**D**).

Análisis de interacción mediante imágenes de microscopía láser confocal

Se utilizó el análisis de imágenes de microscopía láser confocal con el fin de determinar la forma de interacción de las NPs con las células PC-3 tras 4 h de incubación. La concentración de NPs ensayada fue 10 pM final por pocillo en medio de cultivo RPMI suplementado con 10 % SFB y 0,5 mg/ml HSA. Para este ensayo, los nanosistemas fueron marcados con el cromóforo Bodipy NHS éster 630/650 y los núcleos celulares con Syber Green, para evitar superposición de las señales de fluorescencia.

En la Fig. 6.7(A), se observan los núcleos celulares marcados en color verde de las células PC-3 (Fig. 6.7(A)) y de las células tratadas con Alb$_m$/Au-NPs (Fig. 6.7(B)) y BD-Alb$_m$/Au-NPs (Fig. 6.7(C)). Únicamente en la imagen de las células incubadas con las NPs con péptido (Fig. 6.7(C)) se observó interacción ya que aparece la coloración roja proveniente de la excitación del cromóforo que marca las nanoestructuras.

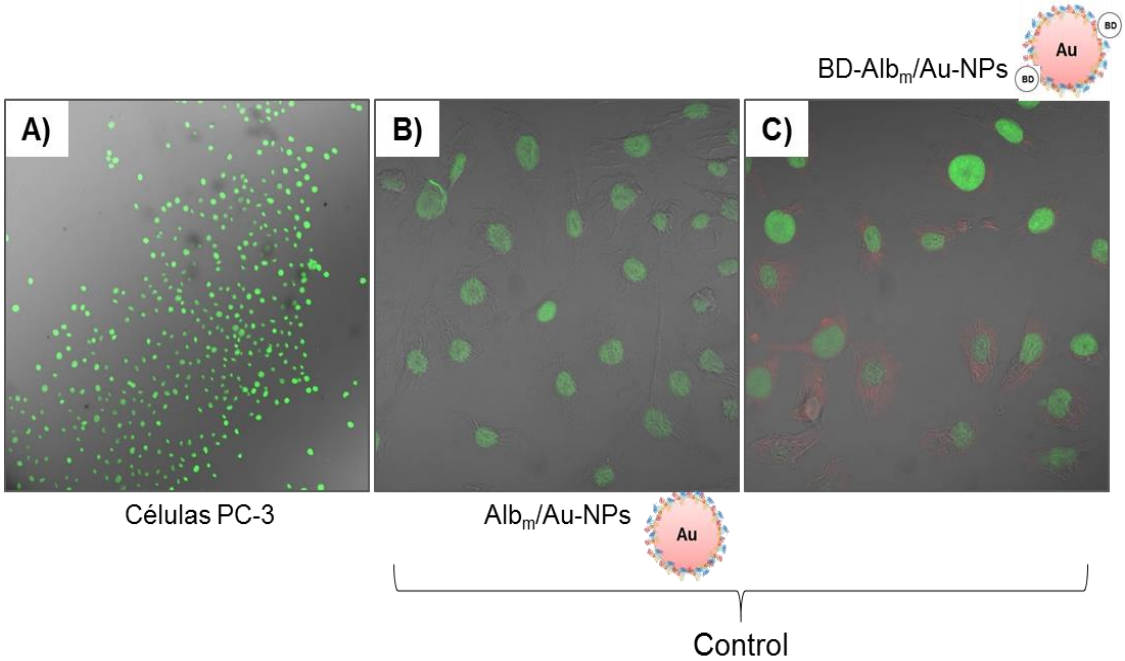

Fig. 6.7 – Imágenes de microscopía láser confocal de línea celular PC-3 (magnificación 10x) (**A**), y células tratadas con: Alb$_m$/Au-NPs (magnificación 60x) (**B**), y BD-Alb$_m$/Au-NPs (magnificación 60x) (**C**).

En la Fig. 6.8, se observan las imágenes de microscopía correspondientes a la incubación de las células con las NPs multicapa con y sin péptido. En este caso, se realizó el análisis de los resultados a partir de las imágenes con dos magnificaciones diferentes (10x y 60x).

La incubación de las células con las HNPs (Fig. 6.8(A)), registró una mayor intensidad de fluorescencia alrededor de los núcleos celulares comparado con las BD-Alb$_m$/Au-NPs. En este caso, si bien en la magnificación mayor (60x) casi todos los núcleos celulares están rodeados de NPs, al reducir la magnificación se observa un gran número de células que no interactuaron con estas NPs (ausencia de color rojo).

Sin embargo, al analizar las imágenes para la incubación con las NPs híbridas con recubrimiento proteico del núcleo de Au-NPs en forma de multicapa con BD, se observó, en ambas magnificaciones, la captación más alta registrada ya que casi la totalidad de las células interactuaron con las NPs. Este resultado es coincidente con lo obtenido por citometría de flujo. Ambas técnicas, evidenciaron que las BD-HNPs, son el nanosistema que mejor interaccionan con las células PC-3 en condiciones similares a las biológicas (medio de cultivo con alta concentración de proteínas séricas).

En un intento de determinar la captación por mecanismos que no requieren energía mediante microscopía, se incubaron las células con las NPs a 5 °C sobre portaobjetos. Lamentablemente, las células no resistieron el tratamiento, despegándose del soporte y perdiéndose en los pasos de lavado.

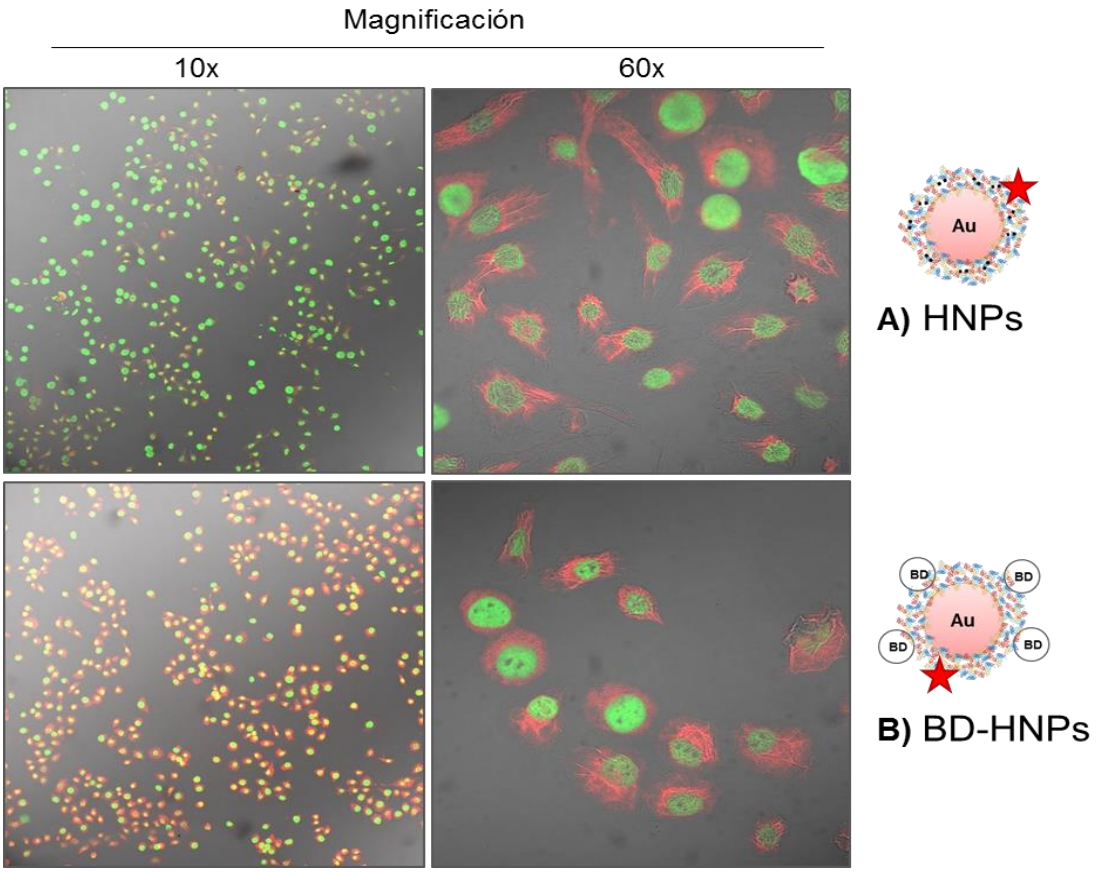

Fig. 6.8 – Imágenes de microscopía láser confocal de células PC-3 tratadas con: HNPs (**A**) y BD-HNPs (**B**).

Se considera que muchos tipos de células tumorales están bajo el control de factores de crecimiento específicos y neuropéptidos que actúan por mecanismos endocrinos o autocrinos/paracrinos para estimular su proliferación y disminuir la apoptosis [Schally, *et al*., 2001]. Cuttitta *et al.* describió que los péptidos BN y GRP pueden actuar como factores de crecimiento autocrino para células pequeñas de cáncer de pulmón (SCLC) [Cuttitta, *et al*., 1985]. Un tiempo después, se demostró que estos péptidos estimulan también la proliferación celular de otras neoplasias, como el cáncer de mama y de células no pequeñas de cáncer de pulmón (NSCLC) [Siegfried, *et al*., 1999; Schally, *et al*., 2001]. Está reportado que varios subtipos de receptores para Bombesina están presentes en líneas celulares de NSCLC, como las NCI-H460 [Siegfried, *et al*., 1997; Siegfried, *et al*., 1999]. Esto hace a estas células un buen modelo para el estudio de captación de las NPs decoradas con BD. Lamentablemente, las NSCLC poseen diversos mecanismos celulares que conducen a la supervivencia y la quimiorresistencia, por lo cual las quimioterapias modernas tienen una baja tasa de eficacia para el tratamiento de este tipo de cáncer [Hohla, *et al*., 2007].

Como se mencionó, la línea celular NCI-H460 es una línea tumoral inmortalizada proveniente de células NSCLC. Estas fueron utilizadas como modelo de estudio de interacción con las NPs híbridas a través de una colaboración establecida con el Dr. J.S. Yackisich (*Hampton University*, USA). Para ello, 10 pM de NPs híbridas en medio de cultivo completo fueron utilizadas para el ensayo, con un tiempo de incubación de 4 h a 37 °C. Luego, las células fueron lavadas y fijadas para su posterior análisis por microscopía láser confocal.

En la Fig. 6.9, se observan los resultados del tratamiento con las HNPs (Fig. 6.9(A)) y BD-HNPs (Fig. 6.9(B)). En este ensayo, los núcleos celulares se observan en azul y las NPs fueron marcadas con Bodipy 630/650, por lo que se observan en rojo. En la imagen correspondiente a la incubación con las HNPs sin péptido no se observó captación de NPs por las células (ausencia de señal roja en Fig 6.9(A)). En cambio, en las células tratadas con las BD-HNPs, se observó la presencia de NPs alrededor del núcleo (Fig. 6.9(B)). Es importante aclarar que estas células presentaron un grado de deshidratación notable a la hora de realizar la toma de imágenes (como puede observarse en las figuras). De todos modos, la interacción pudo ser estudiada igual ya que las diferencias entre las células tratadas con HNPs y BD-HNPs fue significativa.

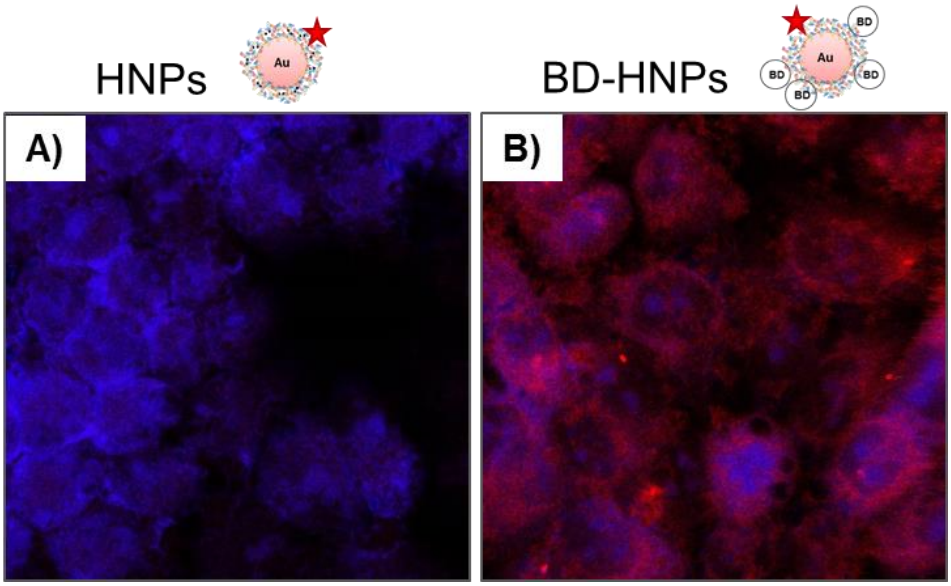

Fig. 6.9 – Microscopía láser confocal. Células NCI-H460 tratadas con: HNPs (**A**) y BD-HNPs (**B**), (magnificación 60x).

En resumen, las células NCI-H460 interactuaron únicamente con las NPs decoradas con el péptido BD como pudo observarse a partir de imágenes de distintas zonas del cultivo. Esta interacción puede estar mediada por la presencia de los GRPr

en las membranas celulares y su afinidad por el péptido BD presente en la superficie de las HNPs, aún en presencia de suero en el medio de cultivo.

Es importante destacar que actualmente, se están realizando ensayos de radiomarcación por quelación al grupo DOTA con Lutecio-177, por medio de una colaboración con la Dra. U. Karczmarczyk (*Radioisotope Centre Polatom*, Polonia). Posteriormente, estas NPs se utilizarán para realizar ensayos de biodistribución en ratones.

CONCLUSIONES PARCIALES

Se estudió la interacción de las NPs con tres cultivos celulares. Las líneas celulares tumorales PC-3 y NCI-H60, evidenciaron una mayor interacción/captación de las NPs híbridas decoradas con el péptido sintético BD (BD-HNPs).

En el caso de las PC-3, se incubaron con las NPs con recubrimiento proteico en forma de monocapa y las NPs híbridas, con y sin BD. A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que las NPs híbridas decoradas con BD (BD-HNPs) son las que presentaron mayor captación en las células gracias a la presencia del péptido y, su interacción con los GRPr sobreexpresados en dichas células. Esta afirmación fue comprobada por las técnicas citometría de flujo y microscopía láser confocal.

Además, se registró una interacción basal de las otras tres nanoestructuras ensayadas con esta línea celular, que no presentaron diferencias significativas entre sí. Estos resultados pueden correlacionarse con la interacción que tiene lugar con las células al incubarlas a 5 °C. A esa temperatura, solo están activos los mecanismos pasivos de ingreso a las células. Al incubar las BD-NPs con las mismas, se observó una interacción significativamente menor que la captación a 37 °C.

Resulta importante aclarar que la interacción se estudió con una concentración de NPs del orden pM (1 a 10 pM), en condiciones no saturantes de cantidad de NPs respecto de los GRPr, de 100 a 1.000 NP/célula. Considerando que la bombesina tiene una constante de disociación del orden de 1-10 nM para el GRPr y que la concentración de NPs utilizada en los experimentos es en el orden de 1 a 10 pM, es posible especular que la avidez de las NPs con BD es, al menos, tres órdenes de magnitud más alta que la del péptido libre (a 37 °C).

Las línea celular NCI-H460 fue utilizada para estudiar la interacción ya que también tiene sobreexpresión GRPr. Estas células sólo evidenciaron captación de las BD-HNPs. En ausencia del péptido sintético no se observó interacción alguna.

Podemos concluir que la presencia del mismo en este caso es crucial para el ingreso de las nanoestructuras a dichas células.

Adicionalmente, se estudió la interacción de los nanosistemas con las células mononucleares aisladas de sangre periférica humana (linfocitos y monocitos). En este caso, se observó una interacción comparable con la que presentan las Alb_m/Au-NPs y HNPs sin BD con las células PC-3. Dicha interacción, en el caso de las NPs decoradas con BD, puede explicarse por la presencia de receptores GRP en la membrana de los linfocitos.

Cabe destacar que todos los ensayos fueron realizados en presencia de medio de cultivo suplementado con 10 % SFB y 0,5 mg/ml HSA, por lo que de existir un efecto corona sobre las NPs, el mismo no impidió la interacción de estas con las células.

REFERENCIAS

- Andersson, *et al*., 1991. Identification of tissue sites for increased albumin degradation in sarcoma-bearing mice. *Journal of Surgical Research,* 50(2), 156-162.
- Cedervall, *et al.,* 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*, 104(7), 2050-2055.
- Cuttitta, *et al*., 1985. Bombesin-like peptides can function as autocrine growth factors in human small-cell lung cancer. *Nature*, *316*(6031), 823-826.
- Damalakiene, *et al.*, 2013. Intracellular distribution of non-targeted quantum dots after natural uptake and microinjection. *International Journal of Nanomedicine*, 8, 555-568.
- El-Sayed, *et al., 2005*. Surface plasmon resonance scattering and absorption of anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles in cancer diagnostics: applications in oral cancer. *Nano Letters*, 5(5), 829-834.
- Galper, *et al., 2012.* Effect of computed tomography scanning parameters on gold nanoparticle and iodine contrast. *Investigative Radiology*, 47(8), 475-481.
- Hohla, *et al*., 2007. Growth inhibition of non-small-cell lung carcinoma by BN/GRP antagonist is linked with suppression of K-Ras, COX-2, and pAkt. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(47), 18671-18676.
- Jiang, *et al.,* 2010. Endo- and exocytosis of zwitterionic quantum dot nanoparticles by live HeLa cells. *ACS Nano*, 4(11), 6787–6797.

- Kobayashi, *et al.*, 2014. Improving conventional enhanced permeability and retention (EPR) effects; what is the appropriate target? *Theranostics*, 4(1), 81-89.

- Lee, *et al*., 2015. Effect of the protein corona on nanoparticles for modulating cytotoxicity and immunotoxicity. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 97-113.

- Liu, *et al., 2010.* Enhancement of cell radiation sensitivity by pegylated gold nanoparticles. *Physics in Medicine & Biology*, 55(4), 931-945.

- Merlot, *et al*., 2014. Unraveling the mysteries of serum albumin—more tan just a serum protein. *Frontiers in Physiology*, 5, 299.

- Mieszawska, *et al*., 2013. Multifunctional Gold Nanoparticles for diagnosis and therapy of disease. *Molecular Pharmaceutics*, 10(3), 831-847.

- Mironava, *et al*., 2010. Gold nanoparticles cellular toxicity and recovery: Effect of size, concentration and exposure time. *Nanotoxicology*, 4(1): 120-137.

- Peterson and Appelgren, 1973. Experimental studies on the uptake and retention of labelled proteins in a rat tumour. *European Journal of Cancer*, 9(8), 543-547.

- Polo, *et al*., 2017. Advances toward more efficient targeted delivery of nanoparticles in vivo: understanding interactions between nanoparticles and cells. *ACS Nano*, 11(3), 2397-2402.

- Reile, *et al*., 1994. Characterization of high-affinity receptors for bombesin/gastrin releasing peptide on the human prostate cancer cell lines PC-3 and DU-145: internalization of receptor bound ^{125}I-(Tyr^{4}) bombesin by tumor cells. *The Prostate,* 25(1), 29-38.

- Sand, *et al*., 2015. Unraveling the interaction between FcRn and albumin: opportunities for design of albumin-based therapeutics. *Frontiers in Immunology*, 5, 682.

- Schally, *et al*., 2001. Hypothalamic hormones and cancer. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 22(4), 248-291.

- Schilling, *et al*., 1992. Design of compounds having enhanced tumour uptake, using serum albumin as a carrier–Part II. *In vivo* studies*. International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part B. Nuclear Medicine and Biology,* 19(6), 685-695.

- Siegfried, *et al*., 1997. Expression of mRNA for gastrin-releasing peptide receptor by human bronchial epithelial cells: association with prolonged tobacco exposure and responsiveness to bombesin-like peptides. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *156*(2), 358-366.

- Siegfried, *et al*., 1999. Evidence for autocrine actions of neuromedin B and gastrin-releasing peptide in non-small cell lung cancer. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 12(5), 291-302.

- Sinn, *et al*., 1990. Design of compounds having an enhanced tumour uptake, using serum albumin as a carrier. Part I. *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part B. Nuclear Medicine and Biology*, 17(8), 819-827.

- Stehle, *et al*., 1997. Plasma protein (albumin) catabolism by the tumor itself–implications for tumor metabolism and the genesis of cachexia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, *26*(2), 77-100.

- Tkachenko, *et al.*, 2004. Cellular trajectories of peptide-modified gold particle complexes: comparison of nuclear localization signals and peptide transduction domains. *Bioconjugate Chemistry*, 15(3), 482-490.

- Van de Wiele, *et al.,* 2000. Technetium-99m RP527, a GRP analogue for visualisation of GRP receptor-expressing malignancies: a feasibility study. *European Journal of Nuclear Medicine*, 27(11), 1694-1699.

- Van der Meel, *et al*., 2016. Cancer nanomedicines: oversold or underappreciated? *Expert Opinion on Drug Delivery*, 14(1), 1-5.

- Verma and Stellacci, 2010. Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. *Small,* 6(1), 12-21.

- Wilhelm, *et al.,* 2016. Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nature Reviews Materials*, 1(5), 1-12.

- Wunder, *et al*., 1997. Enhanced albumin uptake by rat tumors. *International Journal of Oncology,* 11(3), 497-507.

CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES FINALES

En el plan de trabajo se propuso la preparación de NPs proteicas, obtenidas mediante radiación ionizante para aplicaciones teranósticas.

Se prepararon NPs de Albúmina obtenidas mediante un procedimiento en dos pasos que involucra la agregación proteica en una solución etanólica y la estabilización de la nanoestructura por entrecruzamiento radio-inducido (irradiación con rayos gamma y con haz de electrones). Se encontró que diferentes concentraciones de etanol permiten obtener partículas de diferentes tamaños que pueden ser interconvertidas dinámicamente. Sin embargo, después de la irradiación de las muestras, se produce un proceso irreversible de agregación. Se encontró que una alta concentración de Alb (30 mg/ml) en presencia de etanol frío 35 %v/v constituyen las condiciones óptimas de preparación de las nanoestructuras al ser irradiadas con una dosis mínima de 2 kGy con haz de electrones o 10 kGy con rayos gamma.

Estas Alb-NPs fueron extensamente caracterizadas. No se encontraron cambios de importancia en la estructura secundaria y terciaria de las proteínas que forman las nanoestructuras, por lo que se puede concluir que se conserva mayoritariamente la conformación nativa de las mismas.

La preparación de NPs de proteína por entrecruzamiento radio-inducido es un proceso complejo de reacciones radicalarias. La presencia de concentraciones similares de etanol y agua en el disolvente, en ausencia de oxígeno, genera principalmente radicales HER con una reactividad baja y selectiva. Sin embargo, es esperable la presencia de e_{aq}^-, como consecuencia de que el etanol no es un buen secuestrador de estas especies radicalarias producidas por la radiólisis del agua.

Para el estudio de los radicales implicados en el entrecruzamiento de las Alb, se irradiaron diferentes aminoácidos en condiciones idénticas a las utilizadas para la preparación de las Alb-NPs. Se encontró que aminoácidos tales como Phe, Tyr y Ala muestran una reactividad muy baja; mientras que los aminoácidos que contienen heterociclos como His y Trp están completamente modificados por las reacciones de adición de los radicales HER. Por otro lado, la presencia de una mayor abundancia de His en la estructura de BSA, implica que este aminoácido tendrá un papel preponderante en el proceso de entrecruzamiento proteico. Adicionalmente, se ha reportado que la gran cantidad de puentes disulfuro presentes en la Alb y su rol de secuestradores de e_{aq}^- generan radicales tiil y pertiil. Ambos estarían involucrados en este proceso de entrecruzamiento que explicaría la presencia de nuevos puentes disulfuro. Sin embargo, no pueden descartarse la formación de nuevas uniones tioéter

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

y C-C en el entrecruzamiento intermolecular ni la formación de otras recombinanciones de radicales de C.

El entrecruzamiento radio-inducido también nos permitió obtener NPs híbridas compuestas por un núcleo metálico de Au-NPs y un recubrimiento proteico en forma de multicapa (estructura esférica tipo *core/shell*). Estas NPs fueron ampliamente caracterizadas, sobre todo en base a la señal de LSPR que evidenció un corrimiento de 520 nm (Au-NPs) a 534 nm para las NPs híbridas producto de la modificación superficial con Alb. Las HNPs pudieron ser preparadas a partir de una alta concentración de las proteínas BSA (30 mg/ml), HSA (15 mg/ml) o una mezcla BSA/HSA, en presencia de etanol frío 30 %v/v y una dosis de irradiación con rayos gamma de 10 kGy.

Se obtuvieron NPs con un diámetro hidrodinámico promedio de 78 nm que presentaron bioreconocimiento entre Alb y el anticuerpo α-BSA, evidenciando la conservación de la estructura de las proteínas (al menos de las más superficiales) luego del entrecruzamiento radio-inducido. Adicionalmente, se encontró que la purificación de las NPs es un paso crucial luego de la preparación de las mismas, sobre todo para su posterior decoración con el péptido.

Se logró la conjugación del péptido sintético BD con las NPs híbridas oro/Alb, mediante dos estrategias diferentes, siendo elegida la que involucró la inmovilización del péptido sobre las NPs irradiadas y purificadas. Se obtuvieron de esta manera nanosistemas con un diámetro hidrodinámico promedio de 100 nm, estables en el tiempo y sin presentar agregación.

Se confirmó la activación del péptido por reactivos de acoplamiento heterobifuncionales y la unión del mismo a las NPs por técnicas de espectrometría de masas. Sin embargo, la carga de BD superficial determinada fue demasiado baja. Por esta razón, se procedió a realizar la conjugación de BD a las NPs por el agente de entrecruzamiento glutaraldehído. Las NPs preparadas de esta forma, presentaron alrededor de 2.000 BD/NP según la cuantificación realizada por la técnica TXRF.

Finalmente, se estudió la interacción de los nanosistemas preparados con tres cultivos celulares. Las líneas celulares tumorales PC-3 y NCI-H60, evidenciaron una mayor interacción/captación de las NPs híbridas decoradas con BD (BD-HNPs). Posiblemente, esto se debe a la sobreexpresión de los receptores GRP en estas líneas celulares.

Como control de estos ensayos de interacción se incubaron las células con las nanoestructuras HNPs sin péptido y las NPs preparadas por recubrimiento de monocapa proteica (preparadas sin etanol y no irradiadas) con y sin BD. Para las NPs

sin péptido se observó una interacción basal, que no fue significativamente distinta entre sí. Sólo en el caso de las NPs monocapa decoradas con BD se observó una interacción mayor que, de todas formas, fue menor a la que presentaron las BD-HNPs con las células PC-3.

En el estudio de las posibles vías de captación de las NPs, se estudió la interacción a 5 °C, encontrando un ingreso similar al observado por las NPs sin péptido a 37 °C. Puede estimarse que esa captación es producto de mecanismos pasivos.

Por otro lado, células mononucleares aisladas de sangre periférica, fueron cultivadas e incubadas con las NPs. Se encontró que la interacción es comparable con la que presentan las Alb_m/Au-NPs y HNPs sin BD con las células PC-3.

Cabe destacar que todos los ensayos se realizaron con una concentración baja de NPs (alrededor de 100 a 1.000 NPs/célula), en presencia de medio de cultivo suplementado con 10 % SFB y 0,5 mg/ml HSA, tratando de simular las condiciones de una condición *in vivo*.

Para concluir, se obtuvo un nanosistema con potencial uso en diagnóstico por imágenes y terapia dirigida hacia células tumorales que sobreexpresen el receptor GRP y con la posibilidad de ser radiomarcadas a través del grupo DOTA.

Preparación de micropartículas

Muestras conteniendo 4 % de di(etilenglicol) dimetacrilato y 1 % de glicidil metacrilato en propianato de etilo y libres de oxígeno, fueron irradiadas a una dosis 10 kGy (tasa de dosis 1 kGy/h) con rayos gamma, según el protocolo descripto por Naka y colaboradores [Naka, *et al*., 1991]. Las micropartículas resultantes, de 800 nm de diámetro, fueron purificadas por centrifugación y secadas en estufa a 40 °C.

Posteriormente, 200 mg de micropartículas fueron derivarizadas con 10 ml de una solución de cisteamina 10 mg/ml, en buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, durante ON en agitación constante y temperatura ambiente. Luego, las micropartículas fueron lavadas y centrifugadas a 5000 rpm, por 5 min. Finalmente, fueron secadas en estufa a 40 °C y guardadas hasta su utilización.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes