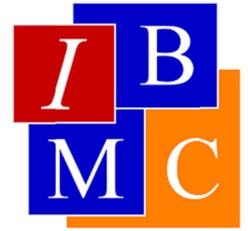




UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ
Instituto de Biología Molecular y Celular
Departamento de Agroquímica y Medio Ambiente
Área de Química Física



Diseño y preparación de nanopartículas magnéticas inmunodirigidas contra células tumorales. Evaluación de su especificidad en modelos celulares

Tutores

Francisco Javier Gómez Pérez y Miguel Saceda Sánchez

Trabajo de Fin de Grado realizado por

M^a Dolores Capilla López

Grado en Biotecnología 2015-2016

Facultad de Ciencias Experimentales

Índice

Abreviaturas y acrónimos.....	i
Resumen.....	ii
1. Introducción	1
1.1 El cáncer	1
1.2. Sistemas de transporte y liberación de fármacos (Drug Delivery Systems, DDS).....	2
1.3. Nanopartículas magnéticas (NPMs)	3
1.4. Recubrimiento (Poliectrolitos).....	5
1.5. Anticuerpos monoclonales y la familia erbB	6
2. Antecedentes y objetivos	8
3. Materiales y Métodos.....	10
3.1. Preparación de las y caracterización NPMs.....	10
3.2. Recubrimiento de las NPMs	11
3.3. Caracterización de las NPMs recubiertas	12
3.3.1. Tamaño y potencial zeta	12
3.3.2. Concentración	13
3.4. Proteínas modelo	14
3.5. MAb	14
3.6. Ensayo de adsorción.....	15
3.7. Espectroscopía óptica para la caracterización de proteínas.....	15
3.7.1. Medidas de Absorción	15
3.7.2. Medidas de fluorescencia.....	16
3.7.3. Medidas de dicroísmo circular	17
3.8. Líneas celulares	19
3.9. MTT.....	19
3.10. Ensayo de especificidad.....	20
4. Resultados	21
4.1. OBJETIVO 1. Obtener un stock de NPMs recubiertas con un PE catiónico y un stock de NPMs recubiertas con un PE aniónico.	21
4.2. OBJETIVO 2. Caracterizar la adsorción del anticuerpo a las NPs recubiertas de PE.	23
4.3. OBJETIVO 3. Estudiar la capacidad de las NPs que contienen anticuerpo para reconocer células tumorales en ensayos celulares	29
5. Discusión.....	32
6. Conclusiones y proyección futura	35
7. Bibliografía.....	38

Abreviaturas y acrónimos

BSA: albumina de suero bovino	NPM: nanopartícula magnética
buffer EL: buffer de lisis de eritrocitos	PAA: ácido poliacrílico
DC: difracción circular	PAAH: hidrocloreto de polialiamina
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium	PBS: solución salina tamponada con fosfato
DMSO: dimetilsulfóxido buffer EL: buffer de lisis de eritrocitos	PDADMA: Cloruro de polidialildimetilamonio
DDS: Drug Delivery Systems (sistemas de liberación de fármacos)	PE: polielectrolito
erbB-1/EGFR /HER-1: receptor del factor de crecimiento epidérmico	PEI: polietilamina
ErbB-1-4/HER1-4: familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico humano	pI: punto isoeléctrico
Fe ₃ O ₄ (s): magnetita	PVSA: ácido polivinilsulfónico
LbL: Layer by Layer (capa-a-capas)	PZC: punto de carga nula
LZM: lisozima	TEM: microscopio electrónico de transmisión
mAb: monoclonal antibody (anticuerpo monoclonal)	TK: tirosina quinasa
MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio	

Resumen

En la última década, la nanobiotecnología ha evolucionado rápidamente con una amplia repercusión en el área biomédica. Con el fin de mejorar la biodisponibilidad y reducir al mínimo los efectos adversos, los sistemas de administración dirigida de fármacos a base de nanopartículas magnéticas (NPMs) están en desarrollo, principalmente para la terapia antitumoral. En este estudio, se ha diseñado un sistema transportador dirigido de fármacos como prueba de concepto. Para ello, se ha sintetizado NPMs de magnetita recubiertas con un polielectrolito aniónico (ácido poliacrílico, PAA), sobre el cual se ha adsorbido el cetuximab (anticuerpo monoclonal), cuyo antígeno es el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR/erbB-1), que está asociado con varios tipos de tumores. Se ha observado que, aunque altas concentraciones de sal disminuye la capacidad de adsorción debido a la reducción de la atracción electrostática, el sistema diseñado es efectivo ya que las NPMs recubiertas con PAA presentan una baja toxicidad y el cetuximab mantiene su especificidad hacia el erbB-1 en la línea celular estudiada.

Palabras clave: transportador dirigido de fármacos, terapia antitumoral, nanopartículas magnéticas inmunodirigidas, anticuerpo monoclonal, erbB-1.

Abstract

Within the last decade, nanobiotechnology has evolved rapidly with an extensive impact on the biomedical area. In order to improve bioavailability and minimize adverse effects, targeted drug delivery systems based on magnetic nanoparticles (NPMs) are under development mainly for antitumor therapy. In this study, a drug targeted carrier system has been designed as a probe of concept test. With this aim, magnetite NPMs coated with an anionic polyelectrolyte (polyacrylic acid, PAA) have been synthesized, on which it has adsorbed cetuximab (monoclonal antibody), against the epidermal growth factor receptor (EGFR/erbB-1), this receptor has been associated with several types of tumors. It has been observed that, although high salt concentrations decreases its adsorption capability due to the shielding of electrostatic attraction, the designed system has proved to be effective because the low toxicity shown by the coated MNPs while the antigen cetuximab maintained its specificity in the studied cell line.

Keywords: drug targeted carrier systems, antitumor therapy, immunotargeted magnetic nanoparticles, monoclonal antibody, erbB-1.

1. Introducción

1.1. El cáncer

Cáncer es el nombre que se da a un conjunto de enfermedades relacionadas en las cuales el organismo produce un exceso de células malignas con rasgos típicos de comportamiento y crecimiento descontrolado, siendo capaces de invadir otros tejidos (*De la Torre et al. 2008*). En condiciones normales, las células crecen, se dividen de forma controlada y, cuando están senescentes o dañadas, mueren por apoptosis (o muerte programada) siendo reemplazadas por células nuevas. No obstante, el material genético puede sufrir mutaciones que afectan al crecimiento y a la división celular controlada, provocando que las células dañadas no mueran y se multipliquen dando lugar finalmente a un tumor.

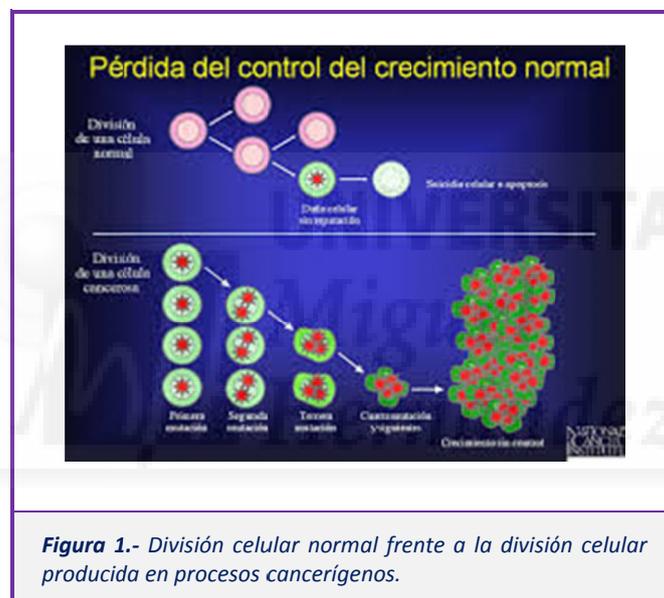


Figura 1.- División celular normal frente a la división celular producida en procesos cancerígenos.

Estas enfermedades son una de las principales causas de los altos índices de mortalidad y morbilidad en todo el mundo; recientemente, ha superado a las enfermedades del corazón como la causa principal de muerte (*Blanco et al. 2011*). Además, se prevé un aumento en la incidencia de todos los tipos de cáncer de 12,7 millones casos diagnosticados en 2008 a 22,2 millones en 2030 (*Bray et al. 2012*).

En la actualidad, las terapias utilizadas para el tratamiento del cáncer son principalmente la quimioterapia y la radioterapia. Pero la selectividad de la gran mayoría de los fármacos utilizados hacia las células cancerígenas es demasiado baja. Esta baja especificidad junto con el bajo índice terapéutico y la resistencia de las células tumorales a algunos de estos fármacos, provoca que la eficacia de estas terapias disminuya. Algunos de los problemas específicos están asociados con el tratamiento de tumores sólidos, a los que el acceso de los fármacos a las células cancerosas se suele

ver limitado por la necrosis y la pobre vascularización (Fang et al. 2007). Otro problema es la heterogeneidad histológica de la población celular dentro del tumor (Niculescu-Duvaz et al. 2005). En definitiva, la gran desventaja de estas terapias es que afectan en la misma medida a las células cancerosas que a las sanas con alta tasa de proliferación, causando efectos secundarios graves debido a su toxicidad celular, pudiendo resultar en la debilidad del sistema inmunológico y daño hepático, fundamentalmente (Lungu et al. 2016). Con el objetivo de subsanar estas desventajas, se han desarrollado los sistemas de transporte dirigido de fármacos (DDS, por sus siglas en inglés *Drug Delivery Systems*).

1.2. Sistemas de transporte y liberación de fármacos (Drug Delivery Systems, DDS)

Los últimos años han sido testigos de un crecimiento sin precedentes de la investigación y aplicaciones en el campo de la nanociencia y la nanotecnología. Estas ciencias están evolucionando muy rápido y se espera un impacto considerable en el campo de la medicina, sobre todo en la investigación del cáncer. Los DDS y desarrollo farmacéutico en el contexto de la nanomedicina se deben ver como la ciencia y la tecnología de los sistemas complejos a escala nanométrica (10-1000 nm), que consta de al menos dos componentes, un agente que actúe como vehículo y un compuesto farmacéuticamente activo (Duncan 2003), (Ferrari 2005).

En definitiva, se trata de sistemas que permiten encapsular (sistema reservorio) o unir/adsorber en su exterior (sistema matricial) un fármaco, por medio de unión no covalente (adsorción inespecífica o por afinidad) o mediante la formación de una unión covalente. Es frecuente la utilización de una molécula señalizadora (anticuerpo, tratándose de vehículos inmunodirigidos) que facilite la focalización del sistema transportador sobre la diana terapéutica, aunque otros procesos, tales como la magnetoforesis (administración intravascular dirigida por un campo magnético) han sido utilizados. Por último, son varios los procesos que se han utilizado para conseguir la liberación controlada del fármaco en respuesta a estímulos biológicos específicos (tales como el pH o reacciones redox) (Dan et al. 2015) Los objetivos fundamentales de la investigación de nanobiotecnologías en DDS incluyen (De Jong et al. 2008):

- Vehiculización y liberación de fármacos más específicas
- Reducción de la toxicidad manteniendo los efectos terapéuticos
- Mayor seguridad y biocompatibilidad
- Un desarrollo más rápido de nuevos medicamentos seguros

Por tanto, la principal ventaja de los DDS se refiere a mejorar la biodisponibilidad del fármaco como consecuencia de la capacidad para dirigirlo a determinadas partes del cuerpo, lo que permitiría reducir nivel de la droga en el plasma y, con ello, minimizar los efectos secundarios no deseados.

1.3. Nanopartículas magnéticas (NPMs)

Los agentes utilizados como vehículos en este tipo de sistemas son nanopartículas (NPs). Este término hace referencia a materiales con al menos una dimensión entre aproximadamente 1 y 100 nm, y que normalmente contiene de varios cientos a 10^5 átomos. Esta disminución de escala, hace que el área superficial expuesta por las NP sea muy grande, ya que, asumiendo que las NPs son esféricas, la relación área superficial-volumen (A/V) aumenta a medida que disminuye el radio (R):

$$\left. \begin{array}{l} A = 4 \cdot \pi \cdot R^2 \\ V = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot R^3 \end{array} \right\} \Rightarrow \frac{A}{V} = \frac{1}{3 \cdot R}$$

dado que la masa de la partícula es directamente proporcional a su volumen,

$$m = d \cdot V$$

donde m es la masa de la partícula y d la densidad de la magnetita ($5,2 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$), deducimos que el área específica (por unidad de masa) de una partícula es inversamente proporcional a su radio,

$$\frac{A}{m} = \frac{d}{3} \cdot \frac{1}{R}$$

Por tanto, resulta evidente que la capacidad de una NP de interactuar con una biomolécula depende de la cantidad de área específica que ésta expone al disolvente y, por tanto, para una misma cantidad de NP, ésta aumenta proporcionalmente con la disminución de su tamaño. En la tabla 1 se muestran los valores de masa, volumen, área total y área específica de dos partículas esféricas de magnetita de $1 \mu\text{m}$ y $0,1 \mu\text{m}$ (100 nm) de diámetro.

Tabla 1.- Comparación de la masa, volumen, área total expuesta y área específica de dos partículas de $1 \mu\text{m}$ y $0,1 \mu\text{m}$ (100 nm) de diámetro.

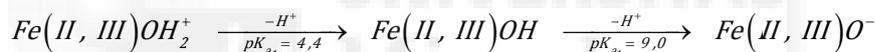
	$d = 1 \mu\text{m} (1000 \text{ nm})$	$d = 0,1 \mu\text{m} (100 \text{ nm})$
Masa (g)	$2,72 \cdot 10^{-12}$	$2,72 \cdot 10^{-15}$
Volumen (cm^3)	$5,24 \cdot 10^{-13}$	$5,24 \cdot 10^{-16}$
Área expuesta (μm^2)	3,14	0,0314
Área específica ($\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$)	1,15	11,5

Los materiales magnéticos son aquellos materiales que muestran una respuesta a un campo magnético externo aplicado, como consecuencia de la interacción de éste con el momento magnético de los átomos paramagnéticos que contiene. Se clasifican en cinco tipos principales: ferromagnéticos, paramagnéticos, diamagnéticos, antiferromagnéticos, y ferrimagnéticos (Issa et al. 2013).

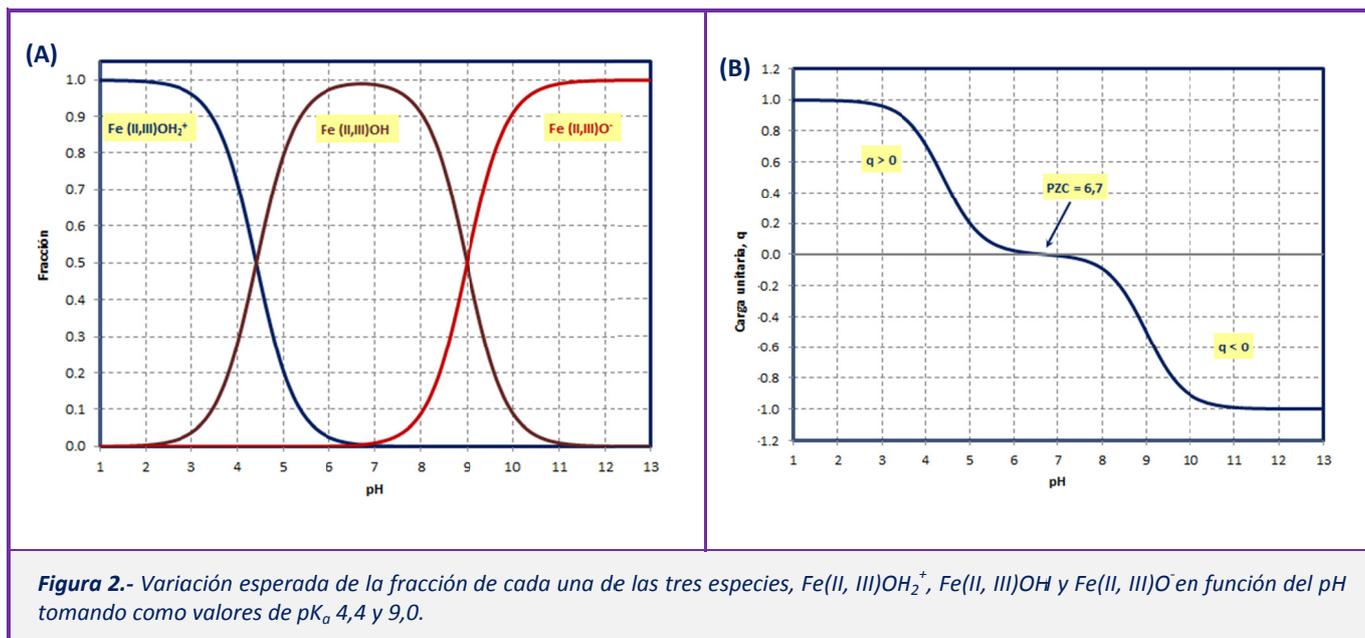
Por tanto, las nanopartículas magnéticas (NPMs) son NPs que muestran respuesta a un campo magnético aplicado. Las características que deben cumplir este tipo de NPs para poder ser empleadas en la biomedicina son (Issa et al. 2013).

- Ser biocompatibles y no tóxicas.
- Presentar un tamaño suficientemente pequeño (10-50 nm), lo que hará que preserven la estabilidad coloidal.

Existen diversos métodos para la preparación de NPs de magnetita (Fe_3O_4), aunque todos ellos implican, de una u otra forma, la oxidación iones metálicos (Fe^{2+} y Fe^{3+}) al aumentar el pH de la disolución para dar lugar a sus hidróxidos. Estos grupos son los responsables del carácter anfótero de los óxidos de hierro en general, y de la magnetita en particular, dando lugar bien a grupos positivos, Fe(II, III)OH_2^+ ; neutros, Fe(II, III)OH o negativos, Fe(II, III)O^- , dependiendo de factores tales como el pH o la fuerza iónica de la disolución. En el caso de la magnetita, los valores de pKs para los hidróxidos de su superficie han sido estimados en los valores $\text{pK}_{a1} = 4,4$ y $\text{pK}_{a2} = 9,0$. Por tanto, la variación de la carga superficial de la partícula de magnetita con el pH podría representarse mediante la deprotonación sucesiva de los hidróxidos de hierro de acuerdo con la reacción:



La Fig.2 muestra la variación esperada de la fracción de cada una de las tres especies así como la variación de la carga superficial en función del pH asumiendo los valores de 4,4 y 9,0 para cada uno de los dos pKas sucesivos.



1.4. Recubrimiento (Poliectrolitos)

Dado que el punto isoeléctrico (pI, pH en el que la carga neta es nula) o punto de carga nula (PZC) de la magnetita es cercano al pH fisiológico (ver Fig.2), la repulsión entre las partículas individuales es pequeña por lo que se favorece su aglomeración haciendo que las NPM no sean estables en estas condiciones. Para aumentar la estabilidad coloidal de las NPM (evitar su aglomeración para formar agregados de mayor tamaño) se han desarrollado dos estrategias complementarias:

- a) La *estabilización estérica* que se consigue recubriendo las NPM con moléculas orgánicas o polímeros que expongan al disolvente largas cadenas más o menos hidrofóbicas que estabilizan la partícula mediante el impedimento estérico resultante de la interacción entre las cadenas expuestas al disolvente de partículas diferentes.
- b) La *estabilización electrostática* mediante la cual se aumenta la estabilidad coloidal de la NP recubriéndolo de moléculas orgánicas o polímeros cargados que inducen la repulsión electrostática entre las partículas individuales reduciendo así su tendencia a la aglomeración.

Por tanto, esta doble estabilización se puede conseguir mediante el recubrimiento de las NPs con polielectrolitos (PEs). Los PEs son polímeros que contienen grupos ionizables, los cuales pueden disociarse total (PEs fuertes), o parcialmente (PEs débiles) en disolución, obteniendo cadenas poliméricas cargadas (macroiones) y que están acompañadas por pequeños contraiones (*Markus Deserno, 2001*). Los PEs fuertes mantienen la carga fija independientemente del pH, mientras que los débiles son aquellos en los que la densidad de carga varía al cambiar el pH.

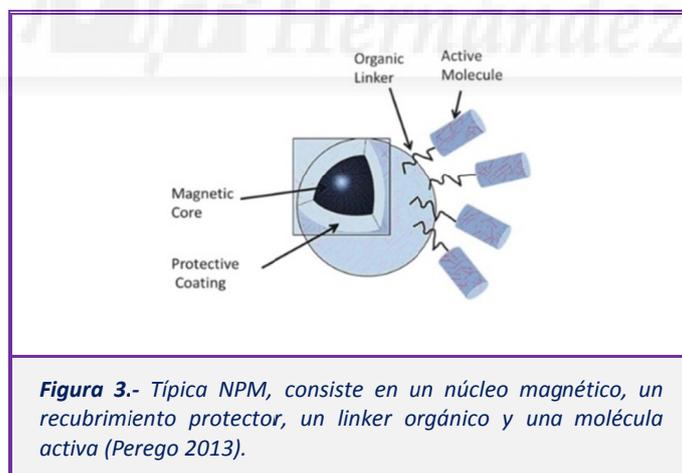
Los PEs pueden ser clasificados en función de diversos factores, uno de ellos es su origen que puede ser natural (proteínas o nucleótidos), natural modificado (celulosa) o sintético (polisulfonatos, policarboxilatos, polifosfatos, poliaminas, etc.), obtenidos principalmente por polimerización de radicales libres. Otros factores de diversificación son la carga, pudiendo ser divididos en polianiones, policationes y polianfolitos; y la localización de los sitios cargados en las cadenas del PE, de modo que si estos se encuentran dentro de la cadena principal se llaman de tipo integral, y si están localizados en cadenas laterales de la cadena principal, se llaman de tipo colgante (*Koetz J., 2007*).

Cuando los PEs son adsorbidos a las superficies de las NPs se produce una estabilización electrostática entre ambos debido a la intensa repulsión electrostática entre partículas recubiertas de PE del mismo signo que vence la atracción hidrofóbica favoreciendo la persistencia de partículas individualizadas. La energía de adsorción de PE sobre superficies con carga opuesta es muy grande debido a la gran energía de unión de cada segmento y el gran número de puntos de fijación del PE. Es

por ello que la isoterma de adsorción es de gran afinidad, y además el proceso inverso (desorción) es extremadamente lento (Per M.Claesson, 2001).

Los polímeros pueden ser unidos de manera covalente (*grafting*) o adsorbidos, siendo uno de los métodos más utilizados el recubrimiento capa-a-capita (LbL, por sus siglas en inglés “Layer by Layer”) que se basa en interacciones electrostáticas. Otras fuerzas como enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y de Van der Waals también pueden participar en el recubrimiento.

Además de interactuar el PE con la NP y estabilizarlas coloidalmente, es bien sabido que las proteínas pueden formar complejos con los PEs. Las proteínas pueden unirse covalentemente o adsorberse sobre el PE. La adsorción de proteínas es definida como la adhesión espontánea de una capa de moléculas de proteína sobre una superficie, siendo conducida, fundamentalmente, por el aumento entrópico derivado de la liberación de las moléculas de agua de las superficies interaccionantes además del cambio conformacional que la proteína pudiera sufrir (Norde 1986). Se trata de un proceso complejo que puede afectar a la estabilidad estructural de la proteína (Larsericsdotter et al. 2001), por factores tales como temperatura, pH, fuerza iónica o composición del tampón (Rabe et al. 2011). Las interacciones más importantes que determinan la estructura de las proteínas y su influencia sobre la adsorción son los enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas, hidrofóbicas y de Van der Waals (Perego 2013). En definitiva, un DDS basado en una NPM según lo dicho hasta ahora sería de la siguiente forma:

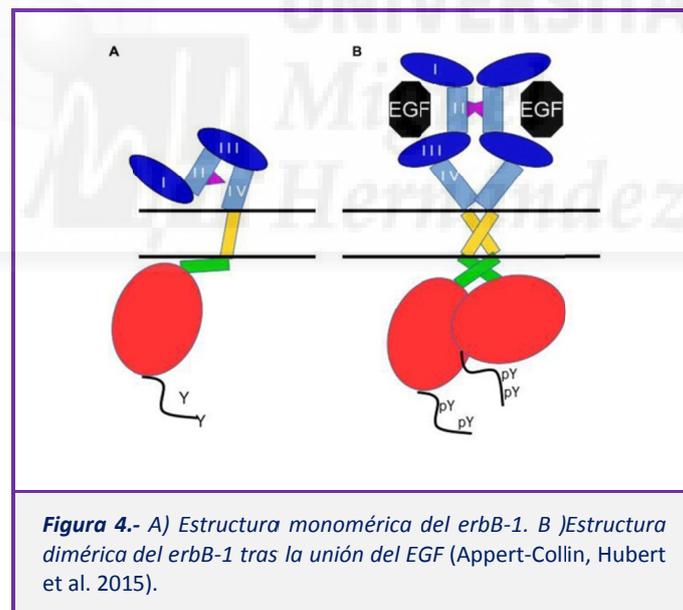


1.5. Anticuerpos monoclonales y la familia erbB

A pesar de tratarse de una NPM (puede responder a un campo magnético aplicado) también se puede inmunodirigir como consecuencia de la unión o adsorción en su superficie de un anticuerpo monoclonal (mAb, por sus siglas en inglés, “Monoclonal antibody”). Los mAb son Ab homogéneos producidos por un clon de células, el cual es derivado de una célula híbrida (hibridoma) creada a partir de la fusión de un linfocito B y una célula de mieloma (linfocito B canceroso). Pueden ser

intrínsecamente terapéuticos o conjugados con moléculas diferentes para una variedad de aplicaciones biomédicas.

Son muy utilizados en el tratamiento del cáncer, siendo su antígeno principalmente algún receptor de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico humano, entre otros (IGF-1R, VGFR, etc.). Esta familia de receptores consta de cuatro miembros (HER1-4) que pertenecen al linaje de las proteínas ErbB (ErbB-1-4) (Dimitrov *et al.* 2009). Son receptores de membrana que consisten en una parte extracelular (formada por 4 dominios), un segmento transmembrana, y una parte intracelular constituida por un segmento yuxtamembrana, un dominio quinasa, y una cola carboxiterminal. El receptor más estudiado de esta familia es el erbB-1 (también EGFR/HER-1). La unión de su ligando (el factor de crecimiento epidérmico, EGF) induce un cambio de conformación que conlleva a la dimerización del EGFR. Este cambio provoca la formación de una interacción anti-paralela entre los dos dominios yuxtamembrana y, con ello, una interacción "head to tail" de los dos dominios quinasa, dando como resultado la activación alostérica de la quinasa y la fosforilación de las tirosinas de la cola C-terminal activando, en definitiva, las vías de señalización aguas abajo (Appert-Collin *et al.* 2015).



Esta familia de receptores regula la apoptosis, la progresión del ciclo celular, la diferenciación, el desarrollo y la transcripción celular (Appert-Collin *et al.* 2015). Es bien sabido que un gran número de tumores malignos está asociado con la mutación o sobreexpresión de este tipo de receptores, por lo tanto, son una importante diana terapéutica para el tratamiento del cáncer.

2. Antecedentes y objetivos

Recientemente, se ha utilizado distintos DDS para el tratamiento del cáncer, basados en NPs de diversa naturaleza, así pues en la literatura encontramos NPs de materiales naturales o derivados (liposomas, dextrano, quitosano, alginatos), dendrímeros, fullerenos, NPs de sílice o recubiertas con polímeros (De Jong et al. 2008).

Nosotros hemos empleado NPMs, cuyas propiedades magnéticas permiten su localización mediante un campo magnético externo, y que están recubiertas con polímeros que permiten la adsorción de proteínas. Las NPs de óxidos de hierro se pueden formar en tres tipos naturales: hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) y magnetita (Fe_3O_4) (Kwizera et al. 2016). Aunque todas estas formas exhiben propiedades prometedoras como la biocompatibilidad y toxicidad relativamente baja en el cuerpo humano, baja sensibilidad a la oxidación, alta estabilidad en respuesta magnética (incluso superior a 50 años), posibilidad de transferencia a forma superparamagnética por la disminución de tamaño de partícula, y la facilidad de proceso de síntesis y tratamiento de superficie, las nanopartículas de magnetita tienen comportamientos más apropiados (Ghazanfari et al. 2016). Por ello, en este estudio se ha trabajado con NP de magnetita, un material ferrimagnético compuesto por átomos de hierro que ocupan distintos sitios reticulares con momentos magnéticos antiparalelos que no se anulan. De manera general, la estructura de espinela de las ferritas es $(\text{Me}^{2+})[\text{Fe}^{3+}_2]\text{O}_4$, donde Me^{2+} representa iones metálicos, que en el caso de la magnetita es Fe^{2+} .

De acuerdo con la literatura, las NPs de magnetita han sido sintetizadas por diferentes métodos químicos tales como coprecipitación (Kwizera et al. 2016), microemulsión (Kale et al. 2004), sol-gel (Oh et al. 2011), descomposición térmica (Lu et al. 2002), hidrotérmica (Lai et al. 2004) y la técnica de aleación mecánica (Yin et al. 2005). Nosotros obtuvimos las NPs de magnetita mediante el método de coprecipitación, el cual será explicado en el apartado de Materiales y Métodos.

Respecto al recubrimiento, se ha empleado una gran cantidad de PEs en la nanotecnología, de distintos orígenes y cargas. Nosotros hemos empleado PEs de origen sintético, cuya ventaja es que se puede controlar algunos aspectos de la estructura polimérica, produciendo materiales a medida y aumentando la eficiencia del DDS. Los PEs utilizados han sido tanto polianiones como policationes.

En las últimas décadas, en los sistemas DDS diseñados para el tratamiento del cáncer se ha utilizado la terapia enzimática, basada en enzimas como las generadoras de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Ben-Yoseph et al. 1994); también terapia génica, basada en ARNi (ARN interferente), que impide la expresión de algunos oncogenes (Conde et al. 2015) y adsorción de moléculas como inhibidores de la tirosina quinasa o anticuerpos. La diana molecular tanto de los inhibidores de la

tirosina quinasa (TK) como de los anticuerpos son receptores de la familia erbB. Los primeros impiden la activación alostérica de las quinasas mientras que los mAb, se unen a un epítipo concreto de estos receptores impidiendo que el EGF se una, inhibiendo la activación del receptor. Algunos ejemplos de los inhibidores TK utilizados en investigación son: erlotinib (dirigido frente erbB-1) y lapatinib (frente erbB-1/erbB-2). Ejemplos de mAb son: cetuximab y panitumab (frente EGFR), y pertuzumab y trastuzumab (frente HER2) (Modjtahedi et al. 2014).

En este estudio se ha utilizado el mAb cetuximab, de acuerdo con la disponibilidad de fármacos del laboratorio y con las características de las NPMs sintetizadas en el laboratorio (adecuadas para sistemas de tipo matricial). El cetuximab es una buena elección dado que se une al EGFR con una afinidad aproximadamente 5 a 10 veces superior a la del EGF, además induce la internalización de EGFR lo que conlleva a una disminución de los receptores disponibles en la superficie celular (*downregulation*). También dirige a las células efectoras inmunitarias citotóxicas hacia las células tumorales que expresan EGFR (citotoxicidad mediada por células dependiente de Ab, ADCC) (Lo Nigro et al. 2016).

En definitiva, este trabajo constituye una prueba de concepto basada en un sistema de vehiculización de fármacos formado por una NPM inmunodirigida, es decir, a la que se le ha adsorbido un mAb, concretamente el cetuximab.

Objetivo principal del proyecto:

Conseguir la inmovilización del cetuximab en NPMs y comprobar su especificidad en células tumorales. Para conseguir este objetivo, se proponen los siguientes objetivos específicos:

OBJETIVO 1. - *Obtener un stock de NPMs recubiertas con un PE catiónico y un stock de NPMs recubiertas con un PE aniónico.*

No se dispone de información fisicoquímica del cetuximab dado que es propiedad intelectual de la entidad farmacéutica (MERCK®). En particular, se desconoce su pl por lo que será necesario probar su adsorción a NPs recubiertas tanto con PE aniónicos como catiónicos.

OBJETIVO 2. - *Caracterizar la adsorción del anticuerpo a las NPs recubiertas de PE.*

En particular, nos proponemos determinar la capacidad máxima de adsorción de la NP recubierta expresada como la masa de proteína que se adsorbe por unidad de masa de la NP, q_{\max} .

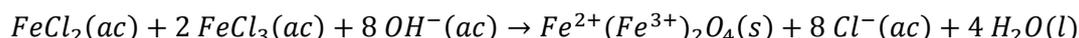
OBJETIVO 3. - *Estudiar la capacidad de las NPs que contienen anticuerpo para reconocer células tumorales en ensayos celulares.*

Una vez caracterizada la unión del anticuerpo a las NPs recubiertas, conoceremos las condiciones óptimas para vehiculizar la biomolécula. Se plantean ensayos en modelos celulares para determinar si las NPs inmunodirigidas son capaces de reconocer células tumorales.

3. Materiales y Métodos

3.1. Preparación de las y caracterización NPMs

El método de preparación de las MNPs se basa en un método de coprecipitación, es cual se basa en la precipitación de los hidróxidos de Fe(II) y Fe(III) inducida por un aumento del pH de la disolución y su posterior oxidación para dar lugar a la magnetita. La reacción de formación de la magnetita inducida por el aumento de pH puede expresarse de la siguiente forma:



En primer lugar, se tomó 1 L de agua degasificada (previamente llevada a ebullición y enfriada a temperatura ambiente), donde se burbujeó N₂ bajo continua y vigorosa agitación mecánica (homogeinizador Turrax T-18 de IKA). El pH de la disolución se monitorizó mediante un pHmetro Crison. Tras degasificar el agua durante 15 minutos, se añadieron 11,93 g de FeCl₂·4 H₂O y 32,80 g de FeCl₃·6 H₂O manteniendo la corriente de N₂ y la agitación. La disolución inicial, transparente, de color anaranjado (mezcla de Fe²⁺ y Fe³⁺ en relación molar 1:2) presentó un pH de 1,8. El pH de la disolución fue aumentado paulatinamente añadiendo una disolución de NH₃ al 25 % en peso a una velocidad de 1 mL·min⁻¹ utilizando una bomba peristáltica (Pharmacia Biotech Pump P-50). A medida que el pH de la disolución se acerca a 7, se observa la formación de un precipitado negro correspondiente a los hidróxidos de hierro que forman las partículas Fe₃O₄ aglomeradas. La adición de NH₃ continúa hasta alcanzar el pH un valor de 10. La dispersión así obtenida se mantiene en agitación y bajo atmósfera de N₂ durante 1 h.

El contenido sólido de la dispersión obtenida (partículas de Fe₃O₄) se separó del disolvente mediante la utilización de imanes de neodimio niquelado de dimensiones 40 mm x 20 mm x 10 mm cuyo campo era de 13000 Gauss (1,3 T). Las partículas obtenidas se lavaron con H₂O destilada mediante ciclos de resuspensión - decantación sucesiva y se almacenaron como dispersión a 4 °C.

La reacción global puede expresarse de la siguiente forma:

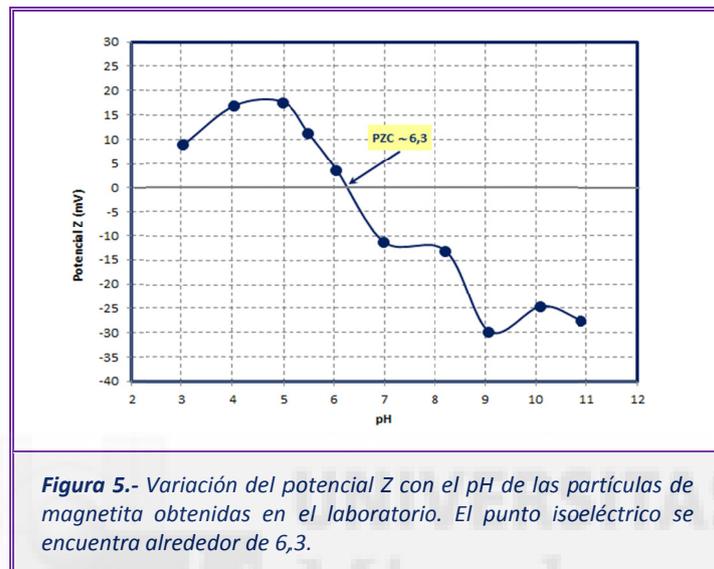
Tabla 2.-Reacción global del método de coprecipitación.

		m (g)	P.M. (g·mol ⁻¹)	n (moles)
reactivos	FeCl ₂ ·4 H ₂ O	11.93	198.85	0.060
	FeCl ₃ ·6 H ₂ O	32.80	270.33	0.120
producto	Fe ₃ O ₄	13.89	231.53	0.060

Para caracterizar las NPMs “desnudas” se puso una muestra diluida en una rejilla de cobre, se dejó secar y se tomó una imagen con el microscopio electrónico de transmisión (TEM) Jeol JEM 1011.

3.2. Recubrimiento de las NPMs

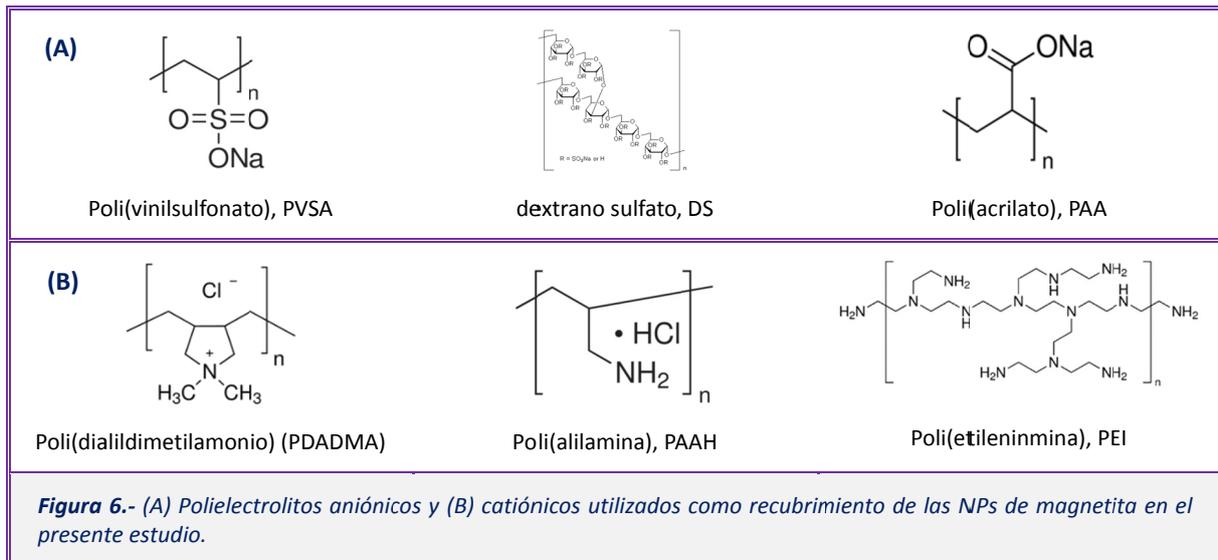
Como se comentó en la Introducción, la superficie de las partículas de magnetita está formada por grupos positivos, Fe(II, III)OH_2^+ ; neutros, Fe(II, III)OH o negativos, Fe(II, III)O^- que le confieren un carácter anfótero. La Fig.5 muestra la variación del potencial Z de las partículas de magnetita obtenidas en el laboratorio mostrando que el pl es 6,3. En consecuencia, la partícula está cargada positivamente por debajo de su pl mientras que tiene una carga negativa por encima de este.



Como consecuencia de este valor de pl, alrededor de pH fisiológico, la densidad de carga superficial de las NPs es pequeña y, por tanto, la repulsión electrostática que se ejerce entre las partículas individuales no es suficiente para vencer el efecto hidrofóbico que favorece la agregación. En estas condiciones, la estabilidad coloidal de las partículas es muy baja como para evitar su aglomeración, aumentando su tamaño de forma significativa.

Los intentos para individualizar las NPs mediante sonicación fueron infructuosos ya que únicamente se consigue revertir la aglomeración durante el tiempo en que se somete a la muestra a la agitación por ultrasonidos. Por tanto, además de sonicar, las recubrimos con PEs, los cuales aumentan la estabilidad coloidal de las NPs (tanto la estabilidad estérica como la electrostática). Esto hará que haya repulsión entre las NPMs, de forma que disminuye su radio y, con ello, aumenta la superficie específica de adsorción, ya que, asumiendo que las NPMs son esféricas, la relación área superficial-volumen (A/V) aumenta a medida que disminuye el radio (R), tal y como se comentó en el apartado de Introducción.

Hemos utilizado distintos PEs (aniónicos y catiónicos) con el fin de obtener una $q_{\text{máx}}$ óptima. La $q_{\text{máx}}$ se relaciona con la capacidad máxima de adsorción, es decir, representa los mg de proteína que es capaz de adsorber 1 mg de NP. Todos los PEs utilizados (Sigma Aldrich) han sido de origen sintético y se muestran en la Fig.6.



El ácido poliacrílico (o poliacrilato) de 1,5 kD de peso molecular fue el PE que mostró una mayor capacidad de adsorción entre los PE aniónicos mientras que entre los PE catiónicos lo fue la polialilamina de 17,5 kD.

El proceso de recubrimiento de las NPMs con PAA (con el resto de PEs fue similar), comienza con la sonicación (sonicador Branson) de un stock NPMs en MES 10 mM pH 6 durante 30 minutos efectivos. Después se le añade PAA (preparado previamente en agua), al doble de concentración, en MES 10 mM pH 6 y la dispersión se mantiene bajo agitación continua durante 18 h para que se complete la adsorción. A continuación, el pH de la dispersión se baja hasta pH 3 con objeto de protonar los carboxilatos y reducir la estabilidad coloidal de las NPs recubiertas. La dispersión, mantenida a pH 3, se decantan magnéticamente las NPs (con un imán de neodimio niquelado) para eliminar el exceso de PAA que no ha reaccionado. Finalmente, las dejamos en agua a pH 7 y volvemos a sonicar 30 minutos efectivos para separar las NPMs que habían quedado aglomeradas al decantar.

Para recubrir las NPMs con PAAH, añadimos, a un pequeño volumen de la disolución anterior, el doble de concentración de PAAH. De forma que las NPMs con PAA son recubiertas, de nuevo, con PAAH (preparado anteriormente en agua) por interacciones electrostáticas mediante el procedimiento de recubrimiento capa-a-capo. Tras dejar la dispersión agitando durante 18 h, se quita el exceso de PAAH con lavados con HEPES 10 mM y 75 mM de NaCl, con el objetivo de que la sal apantalle las cargas del PE y las NPMs puedan ser separadas por decantación magnética. Por último, las dejamos en agua a pH 7 y volvemos a sonicar 15 minutos efectivos.

3.3. Caracterización de las NPMs recubiertas

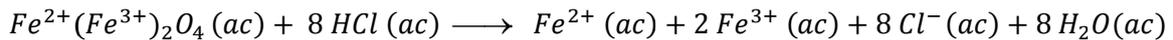
3.3.1. Tamaño y potencial Z

Tanto las mediciones de la movilidad electroforética para caracterizar la carga superficial de las partículas y su efecto sobre la agregación, como las medidas del diámetro hidrodinámico basado

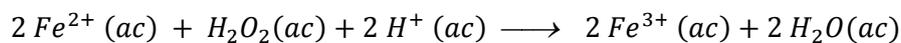
en los principios de dispersión de luz dinámica (dynamic light scattering, DLS), se llevaron a cabo con un analizador de partículas Brookhaven Plus 90.

3.3.2. Concentración

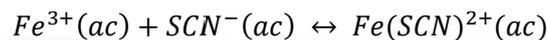
En los lavados es muy probable la pérdida de NPMs con lo que se debe calcular la concentración de magnetita después de lavar. Para ello, las partículas de magnetita se disolvieron utilizando HCl concentrado. La muestra a cuantificar se incubó a 70°C durante 30 minutos junto con HCl (6M) y H₂O₂ (3M). El ácido concentrado va a disolver las partículas de Fe₃O₄:



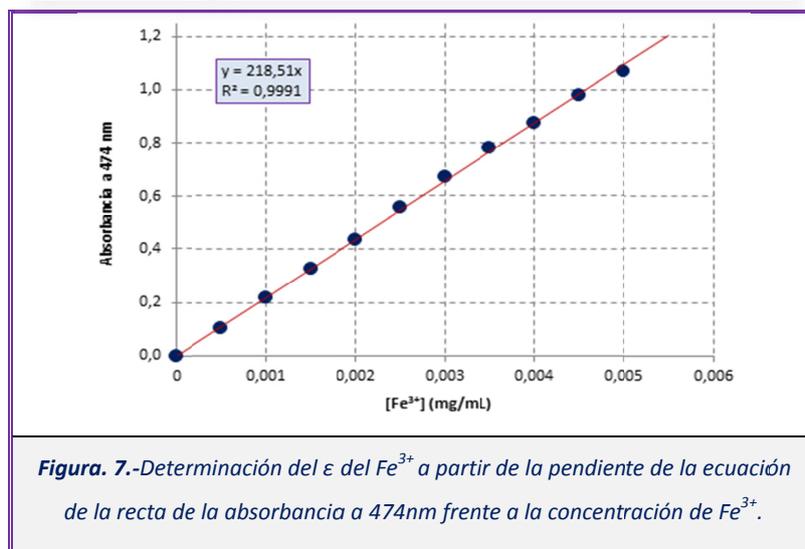
Por su parte, el peróxido de hidrógeno oxida el Fe²⁺ a Fe³⁺:



Finalmente, todo el Fe³⁺ presente en la disolución reacciona con el SCN⁻ para dar lugar al complejo coloreado:



El complejo Fe(SCN)²⁺ es fuertemente coloreado y su espectro de absorción presenta un máximo a 474 nm cuyo coeficiente de extinción se calculó tras obtener una recta patrón con concentraciones crecientes de Fe³⁺ (stock comercial 1 mg/mL) en presencia de tiocianato potásico (KSCN) en medio ácido. El ajuste de los datos experimentales a la ley de Lambert-Beer (fig. 7) permite determinar el coeficiente de extinción es $\epsilon(474nm) = 218.51 (mg \cdot mL)^{-1} \cdot cm^{-1}$.

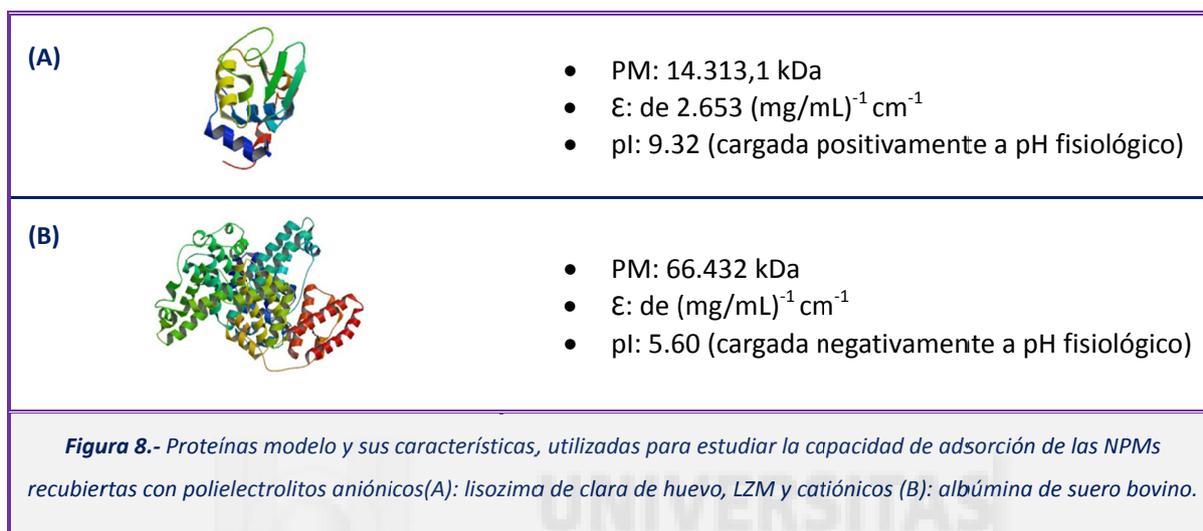


Después, debemos pasar de la concentración de Fe³⁺ a la de magnetita con la siguiente conversión:

$$\frac{mg}{ml} Fe^{3+} \cdot \frac{mol Fe^{3+}}{55.85 \frac{mg}{ml} Fe^{3+}} \cdot \frac{mol Fe_3O_4}{3 mol Fe^{3+}} \cdot \frac{231.55 \frac{mg}{ml} Fe_3O_4}{mol Fe_3O_4}$$

3.4. Proteínas modelo

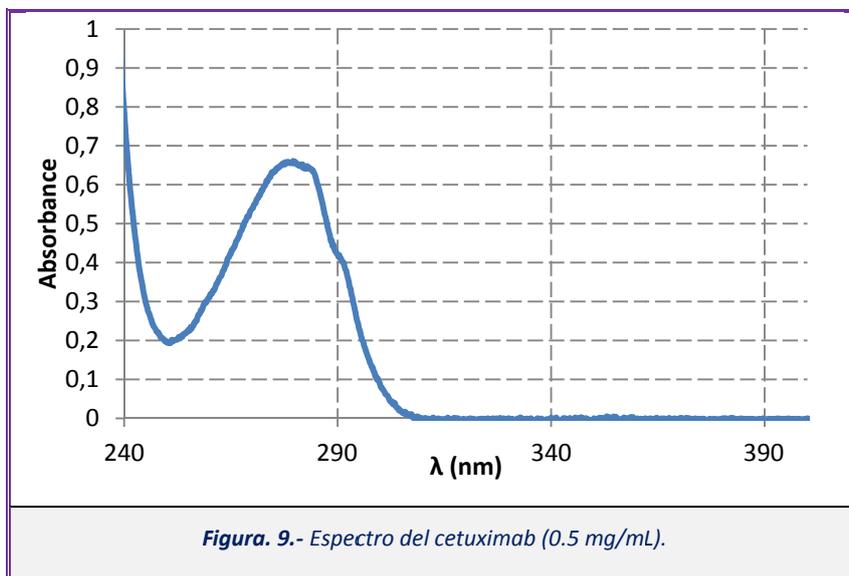
Con el objetivo de comprobar si las NPMs son capaces de adsorber proteína, antes de llevar a cabo la adsorción del cetuximab, empleamos proteínas modelo para cada stock de NPMs. En el caso de las NPMs recubiertas con PAA, nuestra proteína modelo ha sido la lisozima de clara de huevo (LZM) (Sigma Aldrich), (Fig.9A). Respecto a las NPMs recubiertas con PAAH, nuestra proteína modelo ha sido la albumina de suero bovino (BSA, Sigma Aldrich) (Fig.9B).



Ambas proteínas, fueron disueltas en agua milli-Q y filtradas con un filtro de $0.2 \mu\text{m}$. Su concentración fue determinada espectrofotométricamente y haciendo uso del coeficiente de extinción determinado previamente.

3.5. Anticuerpo monoclonal (mAb)

El mAb empleado en este proyecto es el cetuximab (Erbix®), el cual fue facilitado por el departamento de farmacología del Hospital Universitario de Elche. Su ϵ es de $1.318 \text{ (mg/mL)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, el cual ha sido determinado en el laboratorio a partir de su absorbancia a 280 nm y aplicando la Ley de Lambert-Beer (Fig.9).



3.6. Ensayo de adsorción

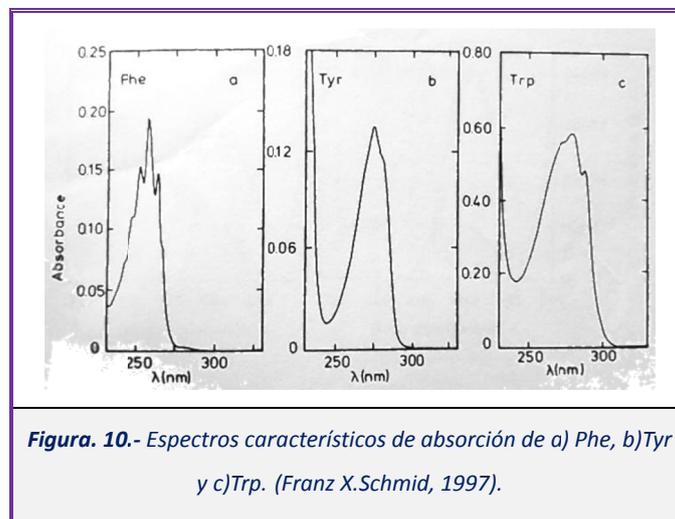
Debido a la naturaleza de los polielectrolitos que recubren las NPs, la adsorción de las proteínas se lleva a cabo por medio de interacciones electrostáticas, en las que los residuos de aminoácidos que poseen carga eléctrica se encuentran mayoritariamente en la parte externa de la molécula. Si hay grupos cargados en el interior se encuentran formando pares iónicos.

Para llevar a cabo el ensayo de adsorción, se han preparado diluciones con concentraciones de NPMs crecientes, frente a concentraciones constantes de proteína (excepto en algunos casos, en los que se tuvo que mantener un ratio constante en la concentración de NPMs y proteínas), en presencia de HEPES 10 mM a pH 7.0 y, en ciertas ocasiones, 150mM de NaCl (condiciones similares a las fisiológicas). Esta mezcla se mantiene en un agitador rotativo durante unas 18 h, para asegurarnos de que las proteínas son adsorbidas por las NPMs.

3.7. Espectroscopía óptica para la caracterización de proteínas

3.7.1. Medidas de Absorción

La cantidad de proteína que se ha adsorbido a las NPMs fue cuantificada como la diferencia entre la cantidad total inicial y la presente en el sobrenadante una vez retiradas las NPMs mediante decantación magnética. Experimentalmente, la cantidad de proteína no adsorbida (presente en el sobrenadante) se determinó mediante espectroscopía óptica puesto que las proteínas absorben luz y emiten radiación en la zona UV del espectro electromagnético. Durante la absorción, la energía lumínica es usada para promover electrones desde un estado fundamental a uno excitado. Electrones que participan en sistemas aromáticos deslocalizados absorben frecuentemente en la región del UV cercano o de la región del visible (Franz X.Schmid, 1997). En concreto, nosotros cuantificamos la concentración de proteína adsorbida a partir de la absorbancia debida al triptófano (Trp), cuyo máximo de absorción se encuentra a una longitud de onda de 280 nm (Fig.10).



Por tanto, a partir de la absorbancia a una longitud de onda de 280 nm y aplicando la ley de Lambert-Beer, calculamos la concentración de proteína adsorbida por las NPMs. Las medidas fueron tomadas con un espectrofotómetro Shimadzu UV-2700 (Tokyo, Japón). Con el objetivo de corregir el espectro por la posible dispersión de las partículas sólidas de magnetita no compactadas que pudieran quedar en el sobrenadante, se determina el espectro en el rango 240 – 400 nm. La dependencia de la densidad óptica detectada entre 340 y 400 nm (donde el ϵ de la proteína es despreciable) con la longitud de onda se utilizó para corregir la contribución de la dispersión de acuerdo al método de Leach y Sheraga (*Leach & Scheraga, 1960*). Los espectros fueron adquiridos con una velocidad de barrido media y un intervalo de muestreo de 0.2 nm. La línea base se hizo con el tampón correspondiente.

A partir de la pendiente de la gráfica que representa la concentración de proteína frente a la de NPMs recubiertas, obtenemos la $q_{\text{máx}}$, de acuerdo con la ecuación isoterma de Langmuir:

$$q = \frac{\text{masa adsorbida de proteína}}{\text{masa MNPs total}} = \frac{q_{\text{max}} \cdot k[\text{proteína}]}{1 + k[\text{proteína}]}$$

Donde, asumiendo que, si la concentración de proteína es mucho más grande que la constante de disociación (que es igual a $\frac{1}{k}$), entonces $k[\text{proteína}]$ es mucho mayor que 1 y, por tanto, al despreciar el 1 en la ecuación de Langmuir, podremos decir que $q \approx q_{\text{max}}$, con lo cual tenemos la siguiente ecuación de la recta, donde la pendiente es q_{max} :

$$q_{\text{max}} = \frac{\text{masa adsorbida de proteína}}{\text{masa MNPs total}} \Rightarrow \text{masa adsorbida de proteína} = q_{\text{max}} \cdot \text{masa MNPs total}$$

3.7.2. Medidas de fluorescencia

Con el objetivo de observar si hay cambios en la conformación del anticuerpo monoclonal tras la adsorción en las NPMs, realizamos medidas de fluorescencia, ya que estos cambios provocan variaciones en la emisión de fluorescencia, la cual es mucho más sensible a los cambios en el estado de hidratación y conformación del cromóforo que la absorbancia. La emisión de fluorescencia de la proteína se produce al pasar los electrones, previamente excitados, desde su estado excitado al fundamental. En el estado excitado parte de la energía se pierde por procesos no radiativos, como transiciones vibracionales, conversión interna, etc. Como consecuencia, la energía emitida es siempre menor que la energía absorbida y, por tanto, la fluorescencia ocurre a longitudes de onda mayores que la absorción. Al igual que en la absorbancia, la fluorescencia es debida a los aminoácidos aromáticos, pero es dominada por los residuos de Trp. Por tanto, empleamos la medida de fluorescencia debida al Trp, el cual emite a 355 nm (Fig.11).

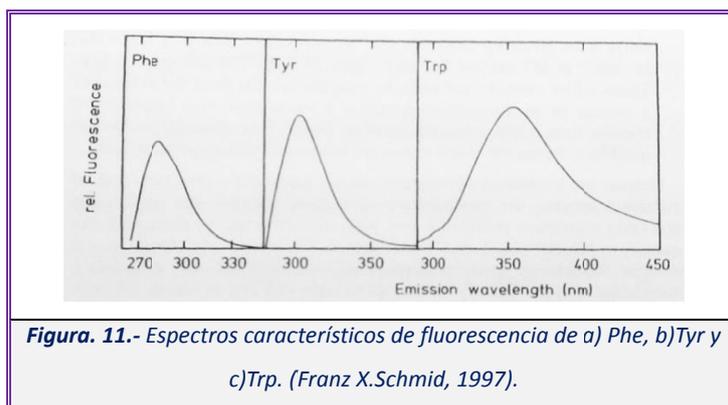


Figura. 11.- Espectros característicos de fluorescencia de a) Phe, b) Tyr y c) Trp. (Franz X.Schmid, 1997).

Si hay cambios en la conformación del anticuerpo, tanto la longitud de onda del máximo como la intensidad de emisión del espectro del Trp varían. El máximo de emisión se desplaza a longitudes de onda mayores cuando se produce una mayor exposición del triptófano al disolvente (desplegamiento parcial o total) mientras que se desplaza a longitudes de onda menores si se produce su deshidratación como consecuencia de un plegamiento local de la proteína que entierra en el interior de la proteína al triptófano previamente expuesto.

Los espectros de fluorescencia se han recogido con un fluorímetro Cary Eclipse (Varian, Australia) equipado con una unidad Peltier y se utilizó una cubeta de 10 mm de paso óptico. La concentración de cetuximab fue de 0,05 mg/mL en 10 mM de HEPES y 150 mM de NaCl y fue excitada a 280 nm, recogiendo el correspondiente espectro de emisión desde 300 a 450 nm. El voltaje del fotomultiplicador se mantuvo a 750 V y las ventanas de excitación y emisión se mantuvieron a 5 nm. Los espectros fueron adquiridos con una velocidad de barrido rápida y un intervalo de muestreo de 0.5 nm, promediándose los valores medidos cada 0,1 s y a 20°C. Además se hicieron rampas de temperatura, en las que los parámetros eran los mismos que para la obtención del espectro, pero aumentando la temperatura desde 20°C hasta 100°C a una velocidad de calentamiento constante de 1 °C·min⁻¹. Los espectros resultantes fueron filtrados para reducir el nivel de ruido tomando, para cada punto del espectro, los 5 valores anteriores y posteriores y calculando una función spline cúbica en el ajuste.

3.7.3. Medidas de dicroísmo circular (DC)

Con objeto de estudiar la estructura secundaria del anticuerpo monoclonal y los posibles cambios conformacionales al interactuar con las MNPs, se obtuvo su espectro de dicroísmo circular (DC). Esta técnica instrumental mide la capacidad de absorción luz polarizada por moléculas en disolución. Obtenemos información sobre la distinta absorción de luz polarizada circularmente a izquierdas y derechas por una molécula ópticamente activa (molécula quiral). Medimos $\Delta A = A_l - A_d$,

pero el parámetro que normalmente obtenemos es la elipticidad (θ) expresado en miligrados (mdeg). La relación es la siguiente:

$$\theta = 2.303 \cdot (A_I - A_D) \cdot \frac{180}{4\pi} \approx 33 \cdot \Delta A \text{ (deg)} = 33000 \cdot \Delta A \text{ (mdeg)}$$

Las bandas de proteínas en DC se dan en dos regiones espectrales. Una de ellas es el UV lejano o región amida (170 – 250 nm) donde se aprecian las contribuciones de los enlaces peptídicos (cuya conformación está directamente relacionada con la estructura secundaria de las proteínas), y la otra zona es el UV cercano (250 – 350 nm) donde se observan bandas correspondientes a los aminoácidos aromáticos y da información acerca de la estructura terciaria de la proteína alrededor de estos aminoácidos. En este proyecto, hemos estudiado el espectro de la región amida, en el cual se puede caracterizar la estructura secundaria y los cambios producidos en ella, concretamente se muestra un característico espectro de hélice α y de lámina β (Fig.12).

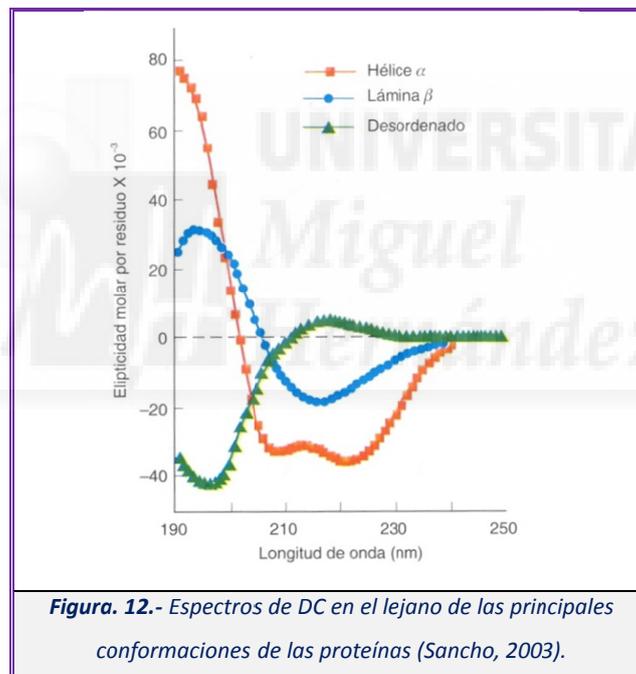


Figura. 12.- Espectros de DC en el lejano de las principales conformaciones de las proteínas (Sancho, 2003).

El experimento fue llevado a cabo en un dicógrafo Jasco J815 (Tokyo, Japón), equipado con un soporte de celda termostatzado y con una unidad Peltier y se utilizó una cubeta de cuarzo de 0,1 cm de paso óptico. La concentración de cetuximab fue de 1 mg/mL en 10 mM de HEPES pH 7.0 y 150 mM de NaCl y el espectro recogido de 210 a 250 nm a 20 °C. Los resultados del espectro fueron suavizados (*smoothing*), para reducir el nivel de ruido utilizando el software del dicógrafo Jasco J815.

3.8. Líneas celulares

Durante el desarrollo de los experimentos celulares, se han empleado líneas procedentes de distintos tipos de tumores. La línea celular de carcinoma de colón empleada ha sido SW-620 y la línea celular de carcinoma de páncreas exocrino fue la RWP-1, ambas obtenidas del repositorio del Instituto Municipal de Investigaciones Médicas (IMIM) de Barcelona. Las dos líneas fueron cultivadas a 37°C y con un 5% de CO₂, durante 48 o 72 horas, dependiendo del experimento. Cuando alcanzan un 70-80% de confluencia, las células eran tripsinizadas. Se empleó el medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Gibco®) suplementado con L-Glutamina a una concentración final de 2 mM, Penicilina/Estreptomicina (BioWhittaker) a una concentración final de 50 U/mL, Piruvato sódico (BioWhittaker) a una concentración final de 1 mM y suero fetal bovino (SBF) en una proporción del 10%.

Para ciertos experimentos control empleamos linfocitos, los cuales se obtuvieron a partir de cultivos primarios de linfocitos de sangre periférica, obtenida de los restos no utilizados para su análisis por el Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario de Elche. El procedimiento para obtener los linfocitos a partir de la sangre periférica, empieza con la adición de buffer EL (buffer de lisis de eritrocitos) (Gibco®), se agita, se incuba durante 30 min y se centrifuga a 2600 rpm. Después nos quedamos con el precipitado, donde se encuentran los linfocitos. Estos se incuban a 37°C y 5% CO₂ en medio de cultivo RPMI (Gibco®) suplementado con 10% suero fetal de ternera y L-Glutamina a una concentración final de 2 mM, Penicilina/Estreptomicina (BioWhittaker) a una concentración final de 50 U/mL.

3.9. MTT

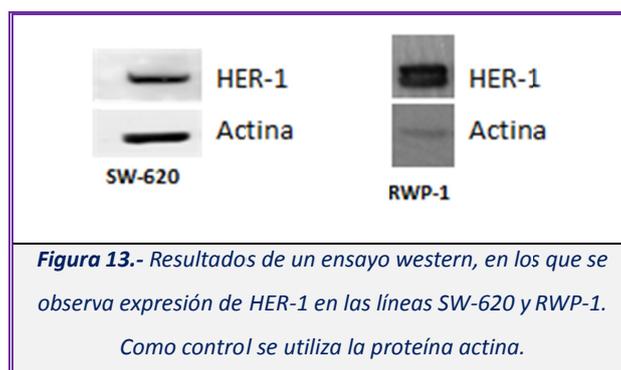
Mediante este ensayo, se evaluó la proliferación celular. Este método se basa en la actividad de la enzima mitocondrial, succinato deshidrogenasa, la cual reduce el bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Sigma Aldrich), una sal de tetrazolio de color amarillo, a un compuesto de color púrpura, el formazán, permitiendo así la valoración del número de células viables, que será proporcional a la cantidad de formazán producido.

Para realizar este ensayo, se siembran las células en placas de 96 pocillos con entre 2-4000 células por pocillo y, tras 24 horas, se añaden los tratamientos por sextuplicado. Las placas se incuban a 37°C con un 5% de CO₂ durante 72 horas. Después, se añade el reactivo MTT a una concentración de 0.25 mg/mL y se incuba durante 3 horas. Se elimina el medio de los pocillos, se añaden 200µl de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich) para disolver los cristales de formazán y se deja la placa en agitación a temperatura ambiente durante 20 minutos. Por último, se mide la absorbancia a 570 nm en un lector de microplacas Anthos 2001.

3.10. Ensayo de especificidad

Este tipo de experimento se hizo con los objetivos de, por un lado, comprobar que el cetuximab sigue estando adsorbido por las NPMs y, por otro, evaluar la especificidad del cetuximab inmovilizado. Para ello se preparó una muestra compuesta por 1 mg/mL de cetuximab adsorbido en 3,5 mg/mL de NPMs y otra de 3,5 mg/mL de NPMs libres, ambas en 10 mM de HEPES. El blanco era cetuximab libre. Las tres condiciones se prepararon por triplicado. A tres tubos se les añadió 0,05 mg/mL de lisozima y se incubaron durante 10 minutos. Después, se tomó 50 μ l de cada uno de los nueve tubos, se les añadió 1 mL de células RWP-1 en DMEM (dilución 1:20) y se dejó incubar durante una hora. Luego se decantaron las NPMs con un imán de Nd, se quitó el sobrenadante y se añadió 500 μ l de PBS 1x (solución salina tamponada con fosfato). Además, a otros tres tubos (que no habían sido tratados con la lisozima) se les hizo dos lavados más con PBS 1x. Por último, se contaron el número de células en cada una de las condiciones con la cámara de *Neubauer* y, para evaluar la especificidad del cetuximab inmovilizado, se compararon el número de células que hay entre las dos muestras.

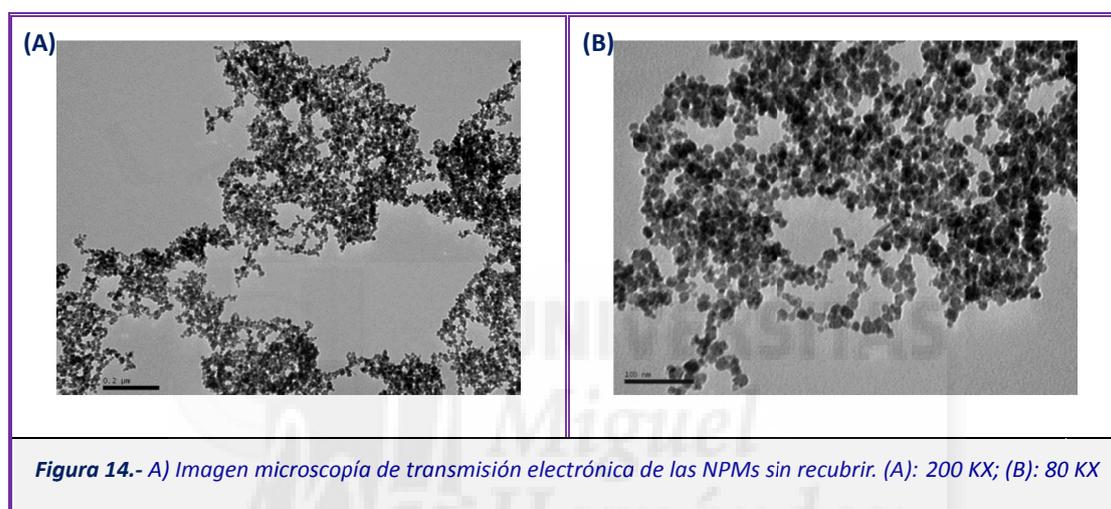
Este experimento se repitió en la línea celular SW-620 y en los linfocitos pero con solo un lavado con PBS 1x y sin tratar con lisozima. En el caso de los linfocitos se hizo el ensayo por triplicado. El motivo por el que se repite el experimento en estas líneas es para poder comparar la especificidad del anticuerpo monoclonal en diferentes modelos celulares. Tanto la SW-620 como la RWP-1 pertenecen a tumores de tipo epitelial y, por tanto, expresan el antígeno del cetuximab, es decir, el receptor erbB-1 (Fig.13). Sin embargo, los linfocitos no expresan este receptor, en consecuencia, se espera que el sistema NPM con el cetuximab adsorbido se una específicamente a las líneas celulares epiteliales.



4. Resultados

4.1. OBJETIVO 1. Obtener un stock de NPMs recubiertas con un PE catiónico y un stock de NPMs recubiertas con un PE aniónico.

En primer lugar, mediante el proceso de coprecipitación se sintetizaron NPMs. La Fig. 14 recoge dos fotografías de estas partículas obtenidas mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM). Las partículas resultan tener una forma más o menos esférica y, aunque su tamaño nominal es menor de 50 nm, las partículas se encuentran aglomeradas formando agregados por interacción entre partículas individuales.



Como ya se comentó en la Introducción, el punto isoeléctrico de la magnetita está cercano a 7 (6,3) por lo que, a pH fisiológico la partícula está escasamente cargada y, como consecuencia, su baja estabilidad coloidal favorece su agregación reduciendo la cantidad de área hidrofóbica expuesta al disolvente.

Para el recubrimiento de las NPMs, se utilizaron, en primer lugar, los PE aniónicos con grupos sulfonato y sulfato (PVSA y DS). En ambos casos, a pH 7, se detectaba una fuerte adsorción de la lisozima ($pI = 9,32$) aunque también se observaba la presencia de proteína en el sobrenadante formando algún tipo de agregados solubles. Un estudio más pormenorizado, demostró que ambos recubrimientos basados exclusivamente en la atracción electrostática entre el PE (cargado negativamente) y la superficie de la magnetita (cargada positivamente a $pH < 6,3$) no eran lo suficientemente fuertes para asegurar que la atracción electrostática se estableciese a valores de pH ligeramente por encima del pI de la magnetita. Como consecuencia, parte del PE que recubría la NP a bajo pH se desprendía a pH fisiológico quedando libre en el medio (reduciendo el grado de recubrimiento de la NP). Por su parte, el PE libre en el medio se unía a la proteína formando

complejos electrostáticos que resultaban ser insolubles al reducir de forma drástica la carga global expuesta al disolvente.

Experimentos y resultados similares fueron obtenidos al recubrir las NPMs con PE catiónicos tales como el PDADMA Cl y PEI. Aunque el recubrimiento es estable a pH alcalino (partícula cargada negativamente y PE cargado positivamente), al bajar el pH hasta 7, la carga de la superficie era insuficiente para mantener al PE unido provocando su disociación. El PE catiónico libre en el medio se unía a las moléculas de BSA (cargadas negativamente a pH 7) formando, igual que en el caso anterior) complejos insolubles que interferían en la medida de la adsorción.

Sin embargo, se observó que el PAA establece una interacción especialmente fuerte con la superficie de la magnetita al sumar a la mera atracción electrostática un efecto quelante sobre los iones metálicos de la superficie gracias a los grupos carboxilato. Esto hace que la NP recubierta con PAA posea carga negativa en un amplio rango de pH (pH superior a 4), permitiéndonos la posterior unión de un polielectrolito positivo (PAAH) donde la interacción, aunque sea puramente electrostática, será muy fuerte por la gran compensación de cargas entre ambos PEs.

El tamaño de las NPMs recubiertas con PAA y de las NPMs recubiertas con PAA_PAAH se estimó midiendo su diámetro hidrodinámico y su potencial Z mediante la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS, Dynamic Light Scattering). Los resultados se recogen en la Tabla 3:

Tabla 3. Diámetro hidrodinámico, polidispersidad y potencial zeta de los dos stocks de NPMs.

	Diámetro hidrodinámico	Polidispersidad	Potencial z (mV)
NPM_PAA	98 ± 3	0,167 ± 0.002	-26 ± 6
NPM_PAA_PAAH	186 ± 3	0,10 ± 0.02	+17 ± 8

El hecho de que el potencial Z de las NPMs recubiertas con PAA y recubiertas con PAA y PAAH sea negativo y positivo, respectivamente, es un indicador de que el recubrimiento ha sido efectivo. Por otro lado, la polidispersidad de las muestras es relativamente baja (0,1 – 0,17) lo que indica que la población mayoritaria de partículas es la que corresponde al valor promedio del diámetro hidrodinámico sin que existan poblaciones significativas de otras dimensiones. Por tanto, el recubrimiento permite la individualización de las NP al aumentar su densidad de carga superficial y, por tanto, la intensidad de la repulsión electrostática entre NPMs individuales.

4.2.OBJETIVO 2. Caracterizar la adsorción del anticuerpo a las NPs recubiertas de PE.

Se hicieron los ensayos de adsorción con proteínas modelo y los dos stocks de NPMs, y se tomaron las medidas de absorbancia, a partir de las cuales se ha calculado la concentración de proteína adsorbida en función de la cantidad de NP presente en el medio. La pendiente de la correlación lineal es igual a la cantidad máxima de proteína adsorbida por unidad de masa de la nanopartícula recubierta, $q_{max} = m_{proteína\ adsorbida} / m_{NPM}$ (Fig.15 y Fig.16).

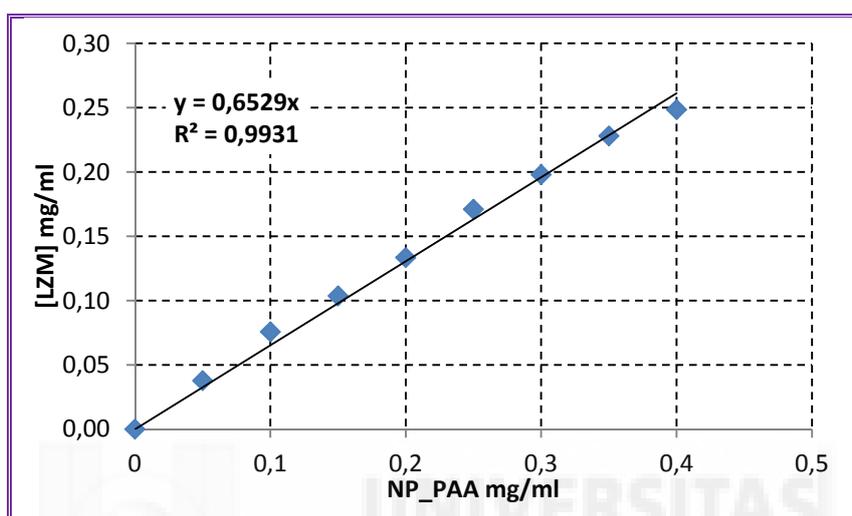


Figura 15.- Concentración de lisozima adsorbida por 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35 y 0.4mg/mL de NPMs recubiertas con PAA en HEPES 10 mM (a partir de una concentración de 0.35 mg/ml de NPMs_PAA, toda la lisozima estaba adsorbida). Podemos ver que la q_{max} es 0.65 mg de lisozima por mg de NPM recubierta con PAA.

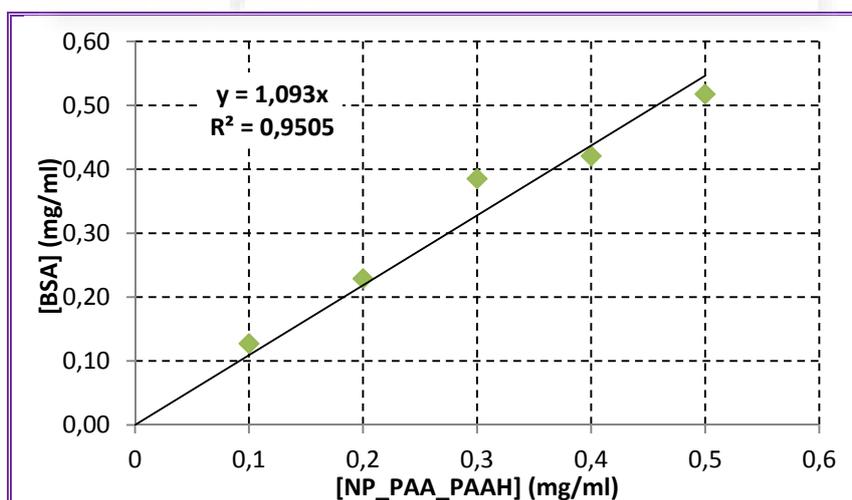


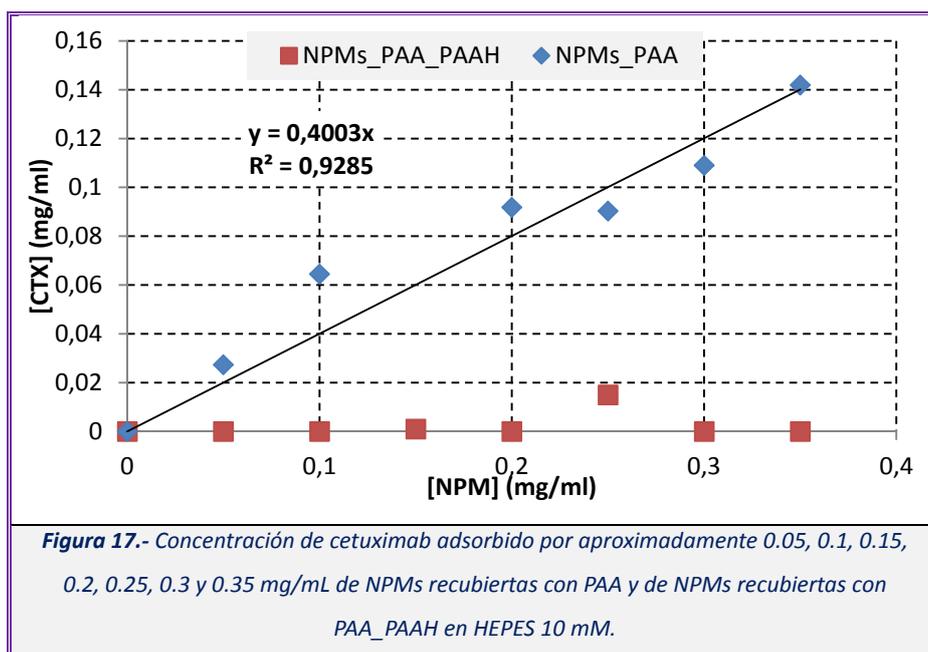
Figura 16.- Concentración de BSA adsorbida por 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mg/mL de NPMs recubiertas con PAA_PAAH en HEPES 10 mM. Apreciamos que la q_{max} es de 1.09 mg de BSA por mg de NPM recubierta con PAAH.

En este último caso, tuvimos que optimizar las condiciones del experimento y mantener un ratio en el que la concentración de BSA es el doble que de NPMs_PAA_PAAH en todos los puntos para

poder medir las muestras sin dispersión, ya que de otro modo, las NPMs no decantaban bien magnéticamente.

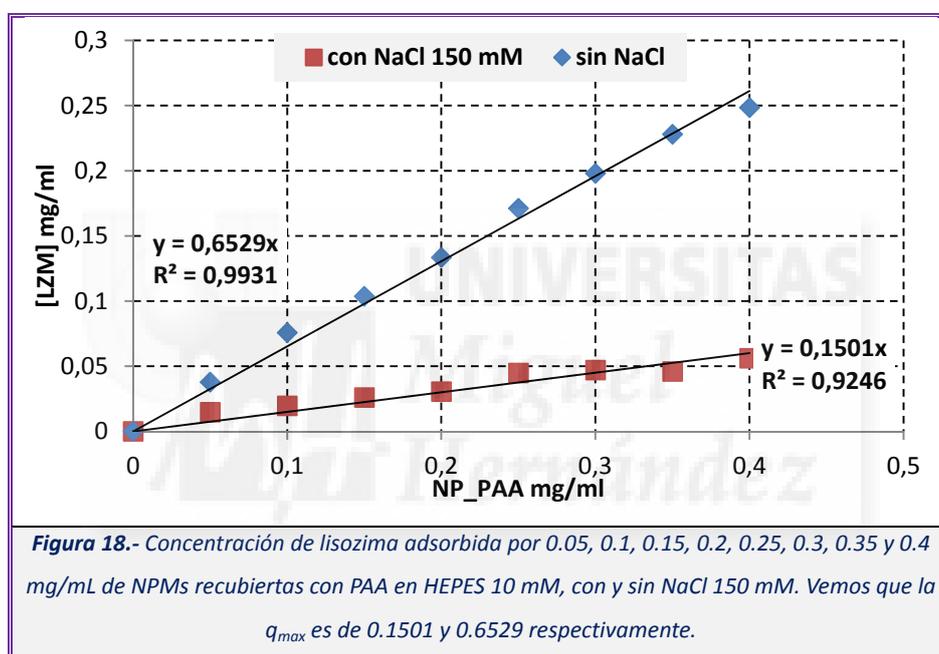
Nuestros resultados indican que las NPMs, tanto recubiertas por PE aniónicos como catiónicos tienen una elevada capacidad de adsorber proteínas de signo opuesto mediante interacciones mayoritariamente electrostáticas. Así, 1 mg de NPMs recubiertas por PAA es capaz de adsorber 0,65 mg de lisozima a pH 7,0, mientras que esas mismas NPMs recubiertas con, además, PAAH, pueden llegar a adsorber 1,09 mg de BSA por mg de NP. Es importante tener en mente que los resultados no son directamente comparables ya que la BSA tiene un peso molecular 4,6 veces mayor que la lisozima (66,4 y 14,3 kD, respectivamente) por lo que sería de esperar que el grosor de la corona esférica formada por proteína adsorbida a la NPM recubierta de PE tuviese un mayor grosor si está formada de BSA que de lisozima.

Una vez demostrada la capacidad de las NPMs recubiertas tanto con PE aniónicos como catiónicos para adsorber proteínas con carga opuesta, se ampliaron estos estudios a la adsorción del cetuximab. Dado que, como se comentó anteriormente, no se dispone de datos fisicoquímicos del anticuerpo, desconocemos si, a pH fisiológico, la biomolécula tendrá una carga positiva o negativa y, por tanto, si podrá adsorberse a superficies cargadas positiva o negativamente. Por ello, se evaluaron los ensayos de adsorción con el cetuximab y los dos stocks de NPMs: NPMs recubiertas con PAA (aniónicas, NPMs_PAA) y NPMs recubiertas con PAA y PAAH (catiónicas, NPMs_PAA_PAAH). La cantidad de anticuerpo adsorbido por unidad de masa de NPMs se determinó a partir de la absorbancia del sobrenadante, como se ha comentado anteriormente. Los resultados se muestran en la fig. 17.

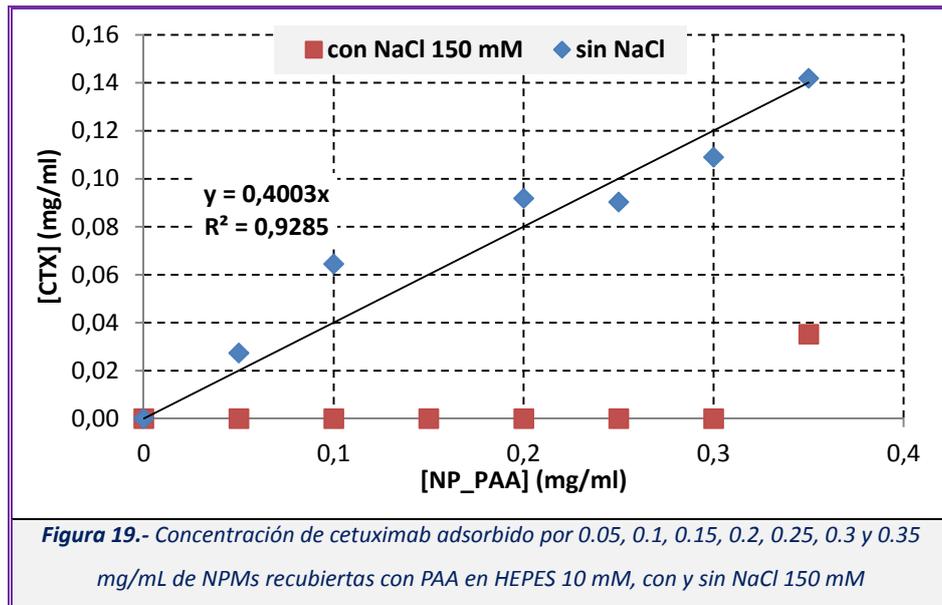


Los resultados muestran claramente que el cetuximab no es adsorbido por las NPMs recubiertas con PAA_PAAH (positivas), mientras que sí lo es por las NPMs recubiertas con el polielectrolito negativo, PAA. Este resultado apunta que el cetuximab tendría un punto isoeléctrico mayor de 7. La máxima capacidad de absorción de las NPMs recubiertas con PAA se estimó alrededor de 0,40 mg de anticuerpo adsorbido por mg de NPM recubierta. Como consecuencia, se eligieron las NPMs aniónicas para continuar con el proyecto.

El siguiente paso ha sido probar el ensayo de adsorción tanto con la lisozima (Fig.18) como con el cetuximab (Fig.19), en condiciones de fuerza iónica similares a las fisiológicas, es decir, además de 10 mM de HEPES se ha añadido 150 mM de NaCl. Se hicieron las medidas de absorbancia y se calculó la concentración de proteína adsorbida, representada frente a la de NPMs.



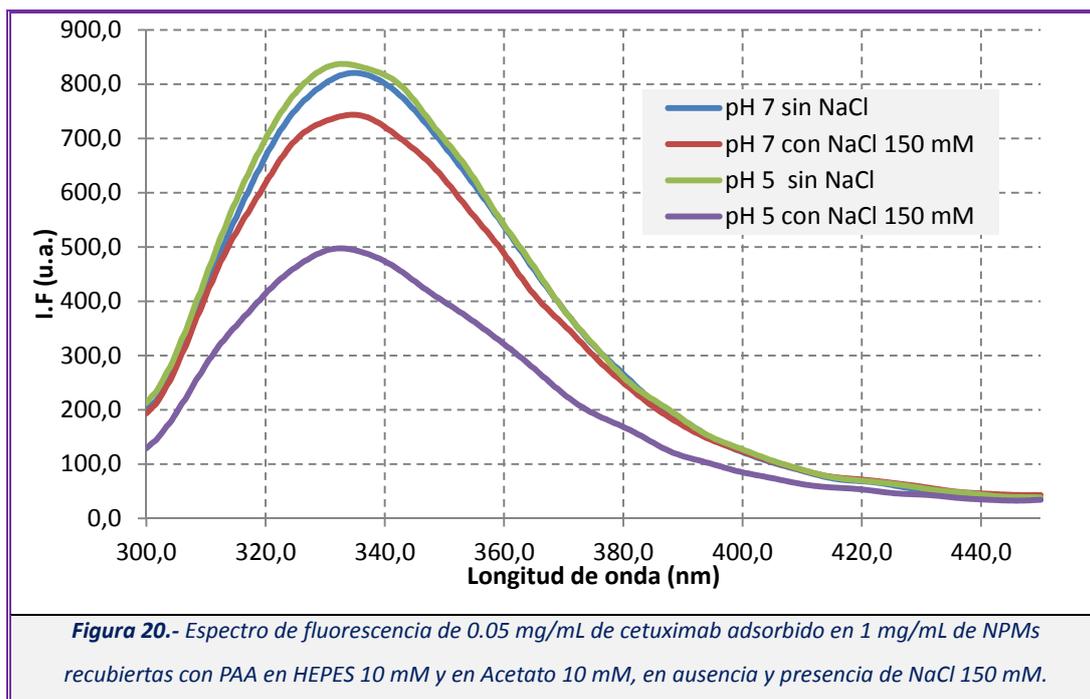
En el caso de la lisozima se observa que el aumento de fuerza iónica de 10 a 150 mM provoca una disminución de la capacidad máxima de adsorción, q_{max} , desde 0,65 a 0,15 mg de proteína por mg de NPM. El resultado es consistente con la atenuación de las interacciones electrostáticas atractivas como consecuencia del apantallamiento de las mismas por la presencia de los iones en la disolución.



Por su parte, en el caso del cetuximab, el aumento de fuerza iónica tiene un efecto más acusado que el observado para la lisozima disminuyendo desde 0,40 mg de cetuximab por mg de NPM a 0 M de NaCl a ser prácticamente nula en presencia de 150 mM de NaCl. La disminución de la q_{\max} puede deberse a dos motivos:

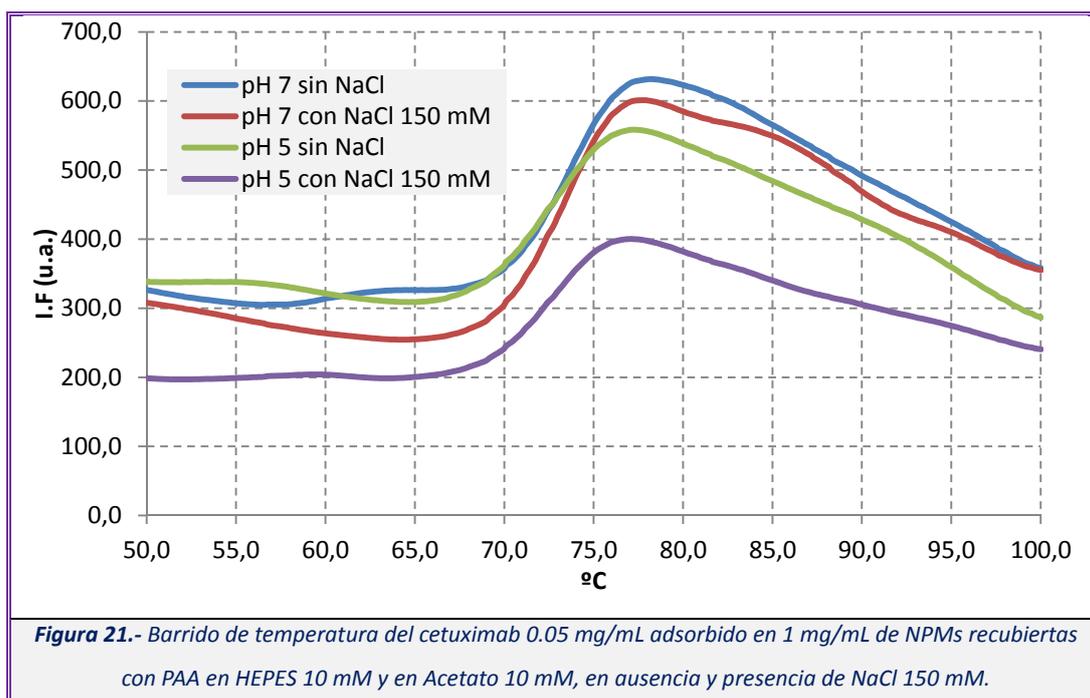
- Que la presencia de NaCl 150 mM dé lugar a una disminución de la estabilidad conformacional de la proteína que disminuya su capacidad de adsorción.
- Que el pI del cetuximab esté muy cercano a 7 y que, por tanto, al estar muy poco cargado en las condiciones en las que se hace el ensayo de adsorción, cuando este se hace en presencia de NaCl 150 mM, la interacción electrostática entre el Ab y el PAA es muy débil debido a que la sal apantalla las cargas del PE.

Dado que la peor situación sería que se dé el desplegamiento del anticuerpo, se decidió realizar ensayos de fluorescencia con el objetivo de analizar el efecto que pudiera tener la sal en la estructura conformacional del cetuximab. Se evaluó un espectro de fluorescencia a pH 5 y 7, y en presencia y ausencia de NaCl (fig.20).



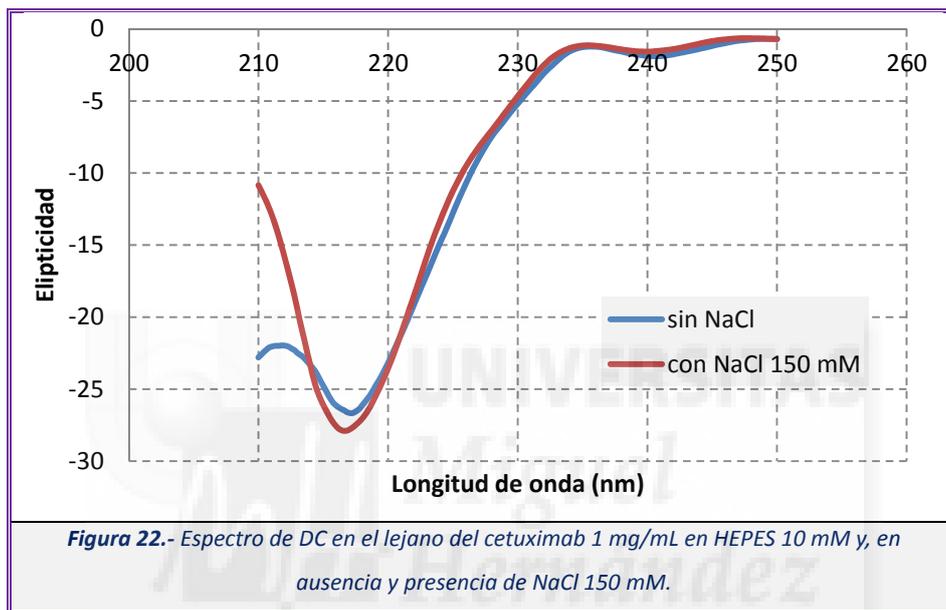
Observamos que la intensidad máxima de fluorescencia se encuentra a una longitud de onda de entre 330-335 nm, lo que nos permite decir que los Trp no están expuestos y que, por tanto, en ninguna de las condiciones la molécula está desplegada, ya que de ser así, el máximo de fluorescencia estaría sobre 350 nm. Además, en los cuatro casos la longitud de onda en el máximo de fluorescencia apenas varía, con lo que la conformación de la proteína no varía prácticamente al cambiar el pH a 5 o al añadir NaCl 150 mM.

Además, se ha estudiado la estabilidad térmica de la proteína a pH 5 y pH 7 en presencia y ausencia de sal (150 mM) monitorizando la emisión de la proteína a 335 nm (fig.21).



Se ha ajustado la variación fluorescencia-temperatura a una sigmoïdal con líneas de base inicial y final. El punto de inflexión de la sigmoïdal es igual a la temperatura de fusión (T_m) y dt nos indica cómo de abierta o cerrada es la sigmoïdal. Vemos que la T_m (~ 73 °C) es muy similar en las cuatro condiciones, al igual que dt , por tanto podemos decir que la estabilidad térmica no varía notablemente al cambiar el pH a 5 o al añadir 150 mM de NaCl.

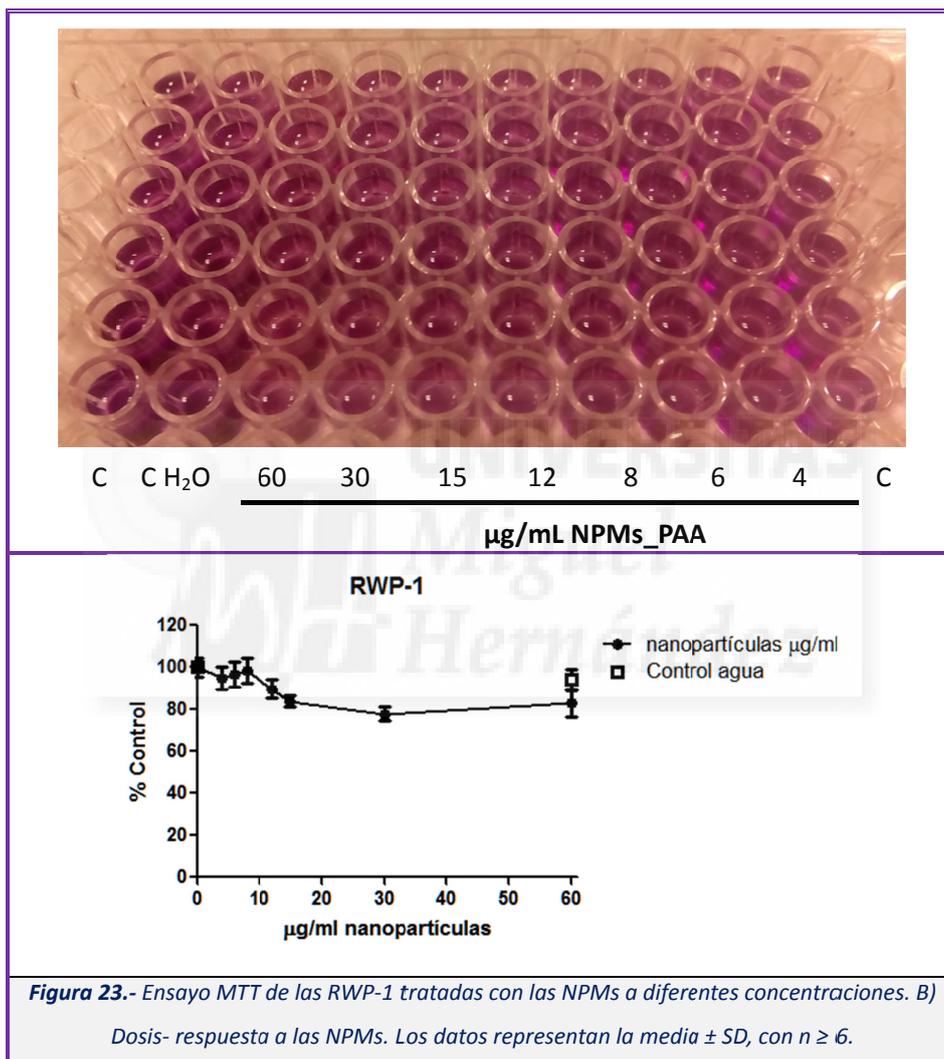
No se han observado variaciones significativas en la conformación del anticuerpo con los ensayos de fluorescencia, por lo que se decidió realizar un ensayo de DC para evaluar con más detalle la estructura (Fig.22).



Vemos que la estructura del cetuximab es una mezcla de conformación de hélice α y lámina β y, que en cualquier caso, no se observa una variación significativa de la estructura secundaria de la proteína como consecuencia de la adición de sal.

4.3.OBJETIVO 3. Estudiar la capacidad de las NPs que contienen anticuerpo para reconocer células tumorales en ensayos celulares

En primer lugar, con el fin de evaluar si las NPMs recubiertas con PAA son tóxicas per se, se realizaron ensayos MTT con la línea celular RWP-1 (de carcinoma de páncreas exocrino). Las células se trataron con NPMs recubiertas con PAA en concentraciones de 4, 6, 8, 12, 15, 30 y 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Como controles se ha empleado a las células sin tratar (filas de los extremos) y a las células tratadas solamente con agua estéril a pH 7, dado que las NPMs_PAA se encuentran en agua a pH 7.



En la gráfica se puede apreciar que el porcentaje de células viables no disminuye notablemente con el aumento de la concentración de NPMs recubiertas con PAA, con lo que podemos decir que no son tóxicas por sí mismas en la línea celular RWP-1 a concentraciones con las que se adsorbería una dosis adecuada de cetuximab para un paciente.

A continuación se llevaron a cabo ensayos de especificidad. Para ello, se tuvo que determinar la concentración de NPMs necesaria para asegurar la completa adsorción del anticuerpo, teniendo en

cuenta que se debe inmovilizar 1 mg/mL de cetuximab, para que al hacer la dilución de 1:20 quede una concentración alta de cetuximab (0.05 mg/mL) para este tipo de ensayos. Sabiendo que el anticuerpo es adsorbido por las NPMs recubiertas con PAA con una q_{\max} de 0.40 en ausencia de NaCl, se necesita 2.5 mg/mL de NPs para adsorber 1 mg/mL de la proteína. No obstante, trabajaremos con concentraciones de NPMs más altas, para asegurarnos de que todo el Ab está adsorbido, ya que el medio en el que se encuentran las células (DMEM) contiene sales.

En primer lugar, se hizo un ensayo de especificidad preliminar, en el que se utilizó sólo la línea celular RWP-1, en dos condiciones distintas (sin incubar con lisozima):

Tabla 4. - Número de células/mL unidas de la línea RWP-1 en cada una de las condiciones indicadas. La concentración de cetuximab es de aproximadamente 0.05 mg/mL y de NPMs es de 0.175 mg/mL (tras hacer la dilución 1:20).

	1 lavado con PBS	3 lavados con PBS
Cetuximab	17.500	17.500
NP_PAA	57.500	32.500
NP_PAA + cetuximab	102.500	117.500
NP_PAA + cetuximab/NP_PAA	1,783	3,615

Si analizamos los ratios cetuximab adsorbido por las NPMs frente NPs libres, se observa que el mejor método para eliminar las uniones inespecíficas es realizar tres lavados con PBS 1x. En ambos casos el número de células que se unen al cetuximab inmovilizado es más alto que el número que se une a las NPMs libres.

En el siguiente ensayo se utilizó también la línea celular RWP-1, en tres condiciones distintas:

Tabla 5. Número de células/mL unidas de la línea RWP-1 en cada una de las condiciones indicadas. La concentración de cetuximab es de aproximadamente 0.05 mg/mL y de NPMs es de 0.175 mg/mL (tras hacer la dilución 1:20).

	1 lavado con PBS	Con LZM (0.05 mg/ml)	3 lavados con PBS
Cetuximab	40.000	40.000	40.000
NP_PAA	102.500	200.000	80.000
NP_PAA + cetuximab	220.000	285.000	195.000
NP_PAA + cetuximab/NP_PAA	2,146	1,425	2,438

De nuevo, el mejor método para eliminar las uniones inespecíficas es realizar tres lavados con PBS 1x y el peor método es unir lisozima a las NPMs, pues con este método se ha producido un mayor número de interacciones inespecíficas, es probable que las células también se hayan unido a la lisozima. En los tres casos se observa que el número de células que se unen al cetuximab inmovilizado es más alto que el número que se une a las NPMs libres.

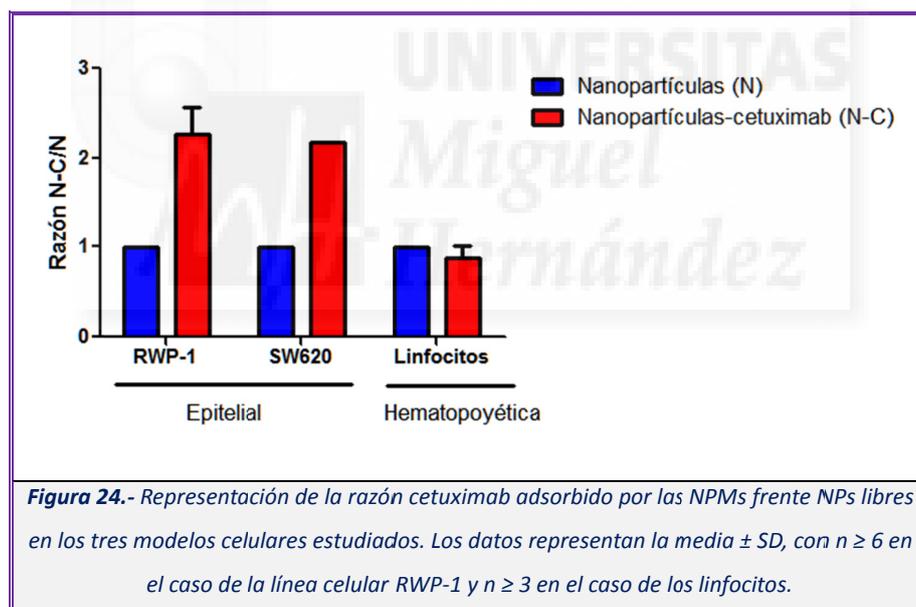
Se hizo otro ensayo de especificidad con tres modelos celulares distintos: dos líneas celulares de tumores de tipo epitelial (RWP-1y SW-620) y un modelo celular no epitelial, los linfocitos, con los que se ha hecho el experimento por triplicado:

Tabla 6. Número de células/mL unidas de cada una de las líneas celulares indicadas. La concentración de cetuximab es de aproximadamente 0.05 mg/mL y de NPMs es de 0.175 mg/mL (tras hacer la dilución 1:20).

	RWP-1	SW-620	Linfocitos (media)
Cetuximab	7.500	15.000	5.000
NP_PAA	220.000	305.000	35.000
NP_PAA + cetuximab	477.500	662.500	27.500
NP_PAA + cetuximab/NP_PAA	2,170	2,172	0,788

Tal y como esperábamos, observamos que en las líneas celulares de tumores de tipo epitelial y que, por tanto, expresan el antígeno del cetuximab (erbB-1), el ratio nos sigue indicando que el número de células que se unen al cetuximab inmovilizado es mucho mayor que el número de células que se une a las NPMs libres. En el modelo celular no epitelial, el cual no expresan el erbB-1, el número de células que se une a las NPMs libres es mayor, es decir, no se aprecia especificidad.

En resumen, se recogen todos los datos de los tres ensayos de especificidad en la siguiente gráfica:



En la gráfica se puede apreciar que se mantiene la especificidad del cetuximab en las dos líneas celulares de tumores de tipo epitelial (RWP-1y SW-620), mientras que no existe esta especificidad en el modelo celular no epitelial, los linfocitos.

5. Discusión

A lo largo de este trabajo se ha llevado a cabo el proceso de síntesis de NPMs recubiertas con diversos polímeros, sobre los cuales se han adsorbido distintas proteínas, incluido un mAb anticancerígeno, el cetuximab, obteniendo finalmente un multitransportador inmunodirigido. Además se ha evaluado la especificidad del cetuximab cuando está inmovilizado sobre las NPMs en distintos modelos celulares.

Para ello, en primer lugar se han sintetizado las NPMs por el método de coprecipitación, el cual ha resultado ser un proceso de obtención efectivo, además hace posible el control del tamaño de las partículas mediante la adaptación del pH y la fuerza iónica del medio de precipitación (*Lungu et al. 2016*). También podemos decir que el proceso de recubrimiento con los PEs ha sido efectivo, dado que el potencial zeta de las NPMs recubiertas con PAA y con PAAH es negativo y positivo, respectivamente, representando por tanto, la carga neta de los PEs a pH 7.

Tanto las NPM recubiertas con PEs catiónicos como aniónicos han demostrado ser especies con una elevada capacidad de adsorber proteínas cuya carga global es de signo opuesto. Así, cuando el recubrimiento externo de las NPM era de PAA, las partículas eran capaces de adsorber 0,65 mg de lisozima por mg de NPM mientras que si el recubrimiento externo era de PAAH, estas mismas NP podían adsorber 1,09 mg de BSA por mg de NP. Estas capacidades de adsorción se encuentran entre las más elevadas reportadas hasta ahora en bibliografía sin que exista evidencia alguna que apunte hacia la disminución de la estabilidad conformacional de la proteína como consecuencia de la adsorción. Este hecho se debe a que el PE que recubre la partícula le confiere a ésta una elevada densidad de carga que aumenta el número de grupos de la proteína con carga opuesta que pueden establecer enlaces salinos para reducir el potencial químico del complejo. Cuando la adsorción de la proteína se realiza sobre una superficie sólida, la estabilidad conformacional de la proteína disminuye ya que se favorece la adsorción de estados de la proteína que expongan mayor área y maximicen la formación de puentes salinos. Sin embargo, cuando la superficie está recubierta por PEs, debido a su mayor flexibilidad, los monómeros de PE pueden adaptarse a la estructura de la proteína para formar las interacciones electrostáticas sin obligar a la proteína a desplegarse total o parcialmente.

A partir de los estudios llevados a cabo acerca de la capacidad de adsorción por NPMs recubiertas de distintos PE, (PVSA, DS, PEI y PDADMA Cl) se puede extraer una importante conclusión acerca de la estabilidad del propio recubrimiento. Aquellos PE cuya interacción con la superficie de la NPM es consecuencia de la mera atracción electrostática no parecen ser los más adecuados para trabajar a pH fisiológico debido a que, al encontrarse cerca del pI de la partícula (6,3), al reducirse la densidad de carga superficial de la NPM se produce la disociación parcial del PE que recubría a la

NPM a pHs alejados de su pI . Esto tiene como consecuencia una disminución en el nivel de recubrimiento de la NPM, con la consiguiente disminución de la capacidad de adsorber biomoléculas de signo opuesto. Además, la liberación al medio de parte del PE inicialmente recubriendo la NPM podría tener efectos no deseados al asociarse con la proteína del sobrenadante (no adsorbida a la NPM).

Por el contrario en el caso del PAA, cuya adsorción a la superficie de la NPM se debe, no solo a la atracción electrostática, sino fundamentalmente a su capacidad quelante de los iones de hierro de la superficie, resulta ser mucho más estable y capaz de mantener tanto su fuerte unión a la NPM a pH fisiológico como su capacidad de adsorción de biomoléculas de signo opuesto. En el caso del PAAH, aunque la interacción con el PAA es puramente electrostática, es muy fuerte por la gran compensación de cargas entre ambos PEs, con lo que este PE también muy estable y mantiene su fuerte unión al PAA, así como su capacidad de adsorción de biomoléculas de signo opuesto.

Nuestros resultados indican que el cetuximab tiene una pI superior a 7 ya que únicamente es capaz de ser adsorbido por NPM recubiertas por un PE aniónico como es el PAA. La capacidad máxima de adsorción resulta ser de 0,40 mg de anticuerpo por mg de NP lo que supone una elevada tasa de adsorción. Sin embargo, la capacidad de adsorción de estas NPM recubiertas con PAA disminuye fuertemente con la fuerza iónica lo que apuntaría a que el apantallamiento de las interacciones electrostáticas como responsable de este comportamiento.

Se han planteado dos motivos por los que se pudiera producir una disminución tan pronunciada de la q_{max} , bien que la presencia de NaCl 150 mM dé lugar al desplegamiento de la estructura conformacional del cetuximab, o bien que el pI del cetuximab esté cercano a 7.

Los resultados obtenidos de los ensayos de fluorescencia y de DC nos permiten descartar que la adsorción tan baja del cetuximab en presencia de 150 mM pueda deberse a que su estructura conformacional haya cambiado. Esto lo podemos decir porque, tanto en ausencia como en presencia de NaCl 150 mM, no observamos variaciones significativas ni en la intensidad de fluorescencia ni en la posición del espectro de emisión de la proteína. Por otro lado, en el ensayo de desnaturalización térmica, tanto la T_m como la dt son similares en ausencia y presencia de sal, indicándonos que la estabilidad térmica prácticamente no varía. Por último, en el ensayo de DC vemos que la estructura del anticuerpo se mantiene de forma similar en las dos condiciones.

Por tanto, la capacidad de adsorción tan baja del anticuerpo por las NMPs recubiertas con PAA en presencia de NaCl 150 mM debe estar causada, fundamentalmente, por el apantallamiento de la atracción electrostática al aumentar la fuerza iónica. Es decir, es posible que el pI de la proteína sea cercano a 7 y que, al estar poco cargada al pH en el que trabajamos y debido al apantallamiento

de las cargas causado por la sal, el resultado sea una interacción electrostática débil entre el anticuerpo y el PAA.

Por tanto, para vehiculizar el fármaco en cuestión en presencia de 150 mM de NaCl, la adsorción está comprometida por una q_{max} pequeña, pero sabiendo que no se debe a cuestiones estructurales, la solución para asegurarnos de que nuestra proteína está adsorbida es aumentar la concentración de NPMs, ya que:

$$masa\ NPMs\ total = \frac{masa\ adsorbida\ de\ proteína}{q_{max}}$$

A raíz de los resultados obtenidos en el MTT de proliferación y viabilidad celular, podemos afirmar que las NPMs recubiertas con PAA no son tóxicas por sí mismas en la línea celular RWP-1 a concentraciones con las que se adsorbería una dosis adecuada de cetuximab para tener efecto en un paciente, coincidiendo con los resultados obtenidos en los ensayos de MTT con PAA realizados por otros autores (Wu, Shen et al. 2016). Además, la biocompatibilidad del PAA ha sido demostrada tanto *in vivo* como *in vitro* en informes anteriores (Seldon et al. 1994) y (Ghavamzadeh et al. 2004).

En los ensayos de especificidad en modelos celulares, se ha observado que se une un mayor número de células a la muestra en la que se encuentra el cetuximab adsorbido en las NPMs con respecto de la muestra en la que solamente están las NPMs. Este hecho demuestra que el cetuximab sigue estando adsorbido a la superficie de la NP y que, por tanto, el proceso de adsorción del cetuximab en NPMs recubiertas con PAA llevado a cabo en este proyecto es efectivo. Además, nos confirma que un aumento en la concentración de NPM para adsorber la cantidad de cetuximab necesaria para este tipo de ensayos, es una buena forma de que el Ab no sea desorbido a pesar de que haya fuerza iónica en el medio.

El motivo de la presencia de uniones inespecíficas, aunque sean menores, puede deberse a uniones a través de proteínas que se encuentren en las células que presenten carga positiva.

Por último, en este tipo de ensayos también se ha observado diferencias significativas entre el número de uniones específicas en las líneas celulares RWP-1 y SW-620, las cuales son de tipo epitelial (expresan el erbB-1) con respecto a los linfocitos, que son un modelo celular primario y que no expresan erbB-1. Este fenómeno demuestra que se mantiene la especificidad del cetuximab vehiculado en este tipo de NPs, ya que se une en mayor medida a líneas celulares las cuales expresan el antígeno de este fármaco, el erbB-1.

6. Conclusiones y proyección futura

Conclusiones

El presente trabajo muestra prueba de concepto que abre la puerta a desarrollo de nuevos sistemas de vehiculización de fármacos, concretamente de anticuerpos monoclonales antitumorales. Estos sistemas se basan en NPMs, las cuales son utilizadas cada vez más habitualmente en investigaciones recientes por sus propiedades fisicoquímicas exclusivas (*Ghazanfari et al. 2016*), que las hacen fácilmente manipulables. A partir de los resultados obtenidos en este estudio las conclusiones que podemos extraer son:

1. El método de coprecipitación utilizado, es un proceso de obtención de NPMs relativamente fácil y efectivo, que además hace posible el control del tamaño de las partículas mediante la adaptación del pH y la fuerza iónica del medio de precipitación.
2. El uso del ácido poliacrílico (PAA) ha sido una buena elección para recubrir este tipo de partículas en condiciones fisiológicas debido a su acción quelante del hierro, resultando ser más efectivo que PEs que recubren la superficie de las NPMs sólo mediante interacciones electrostáticas.
3. La influencia de la fuerza iónica en el medio es un factor importante, puesto que dificulta la interacción electrostática entre la proteína y el PE que recubre la NPM, afectando negativamente a la adsorción de la misma.
4. La disminución de la adsorción de anticuerpo monoclonal en presencia de fuerza iónica se debe al apantallamiento de las interacciones electrostáticas atractivas entre el anticuerpo y la partícula recubierta. Por otra parte, la adsorción no parece afectar ni a su estabilidad conformacional ni térmica, tal y como demuestran los experimentos realizados mediante espectroscopias de fluorescencia y de dicroísmo circular.
5. Incluso en presencia de concentraciones salinas similares a las encontradas fisiológicamente se puede conseguir la completa adsorción de la muestra de anticuerpo aumentando la cantidad de NPM para compensar la caída en la capacidad máxima de adsorción de estas últimas con el aumento de la fuerza iónica.
6. Las NPMs recubiertas con PAA no mostraron una toxicidad significativa en los modelos celulares probados y además, son una buena elección para vehicular el anticuerpo monoclonal, ya que este mantiene su especificidad por las líneas tumorales que presentan su antígeno (erbB-1).

Proyección futura

A pesar de que a lo largo de todo el estudio se ha podido demostrar que el mAb inmovilizado en las NPMs recubiertas con PAA sigue siendo específicamente activo en las líneas celulares estudiadas, este hecho debe ser confirmado en un mayor número de líneas celulares y en otros tipos de cáncer. También se debería comprobar la funcionalidad del anticuerpo y si, por tanto, inhibe la fosforilación del receptor erbB-1, mediante diferentes técnicas tales como el western blot o la utilización de un ensayo *fosfoarray*. Además, la potencialidad de este sistema *multicarrier* inmunodirigido debe ser verificada con estudios más avanzados de distribución y citotoxicidad en tejidos con el fin de dar mayor validez al sistema propuesto y su posible utilización como terapia inmunodirigida contra el cáncer.

Además, aunque una mayor concentración de NPMs ha resultado ser efectiva para que la proteína no sea desorbida en condiciones desfavorables (presencia de fuerza iónica) propias del medio celular, sería aconsejable unir el Ab al PE de recubrimiento de forma covalente mediante un enlace de tipo amida. Esto nos permitiría asegurarnos de que el Ab no se va a desorber en condiciones de mayor fuerza iónica. Sin embargo, la funcionalidad biológica del anticuerpo unido covalentemente deberá ser testada en líneas celulares y comparada con la del anticuerpo libre en disolución.

El sistema de vehiculización desarrollado en este estudio se puede orientar tanto a diagnóstico como a terapia. Respecto a diagnóstico, el fin sería recubrir la NPM con un polielectrolito cuyos carboxilos se hayan derivatizado con moléculas fluorescentes (de fluoresceína, por ejemplo). Sobre este PE se adsorbería un mAb cuyo epítipo esté sobreexpresado específicamente en un determinado tipo de tumor, de este modo, se podría tanto diagnosticar un cáncer como evaluar si el tratamiento que está recibiendo el paciente en ese momento está siendo efectivo para disminuir el número de células cancerosas.

En cuanto a terapia, el objetivo se basa en el desarrollo de un DDS, que comenzaría con la adsorción de un fármaco antitumoral a una NPM inmunodirigida. El hecho de que se pueda unir covalentemente el Ab a la NPM recubierta permitiría adsorber, después, un fármaco (tanto catiónico como aniónico) a la NPM, por el método capa-a-capas si fuese necesario. A este sistema le harían nuevos estudios de adsorción centrados en la determinación de su capacidad de adsorción máxima, q_{max} , de la nanopartícula respecto del fármaco de interés. Además, serían necesarios estudios de liberación de la droga en cuestión, en los que se podría aprovechar el pH fisiológico moderadamente ácido que suelen presentar los tumores (*Wang et al. 2016*) para liberar el fármaco adsorbido en un PE sensible al pH como lo es el PAA.

En definitiva, se trataría de un sistema inmunodirigido de administración de fármacos antitumorales, en el que el Ab se encargaría de dirigir la NPM para, después, ser liberado el fármaco. Este método permite aumentar la biodisponibilidad del fármaco, ya que se incrementa la concentración local del mismo, lo que permite disminuir la dosis y, con ello, los efectos secundarios generados por estos fármacos debido a su acción en células sanas.

Debido a esta ventaja, este sistema de transporte y liberación de maultifármacos podría ser empleado tanto para adsorber fármacos clásicos y, así, reforzar el tratamiento de terapias clásicas (como la quimioterapia y la radioterapia), como para diseñar nuevas terapias, tales como terapias enzimáticas o terapias epigenéticas adsorbiendo inhibidores de deacetilasas de histonas, por ejemplo.

Tanto el diagnóstico como todas las terapias comentadas pueden ser inmunodirigidas (como ha sido en este estudio) o simplemente, al tratarse de NPMs, se puede dirigir el fármaco de forma específica hacia su diana mediante el uso de un campo magnético externo.

Cabe destacar, que las nanopartículas son capaces de atravesar barreras biológicas como la hematoencefálica (*De Jong et al. 2008*), facilitando el acceso de estas drogas a tumores cerebrales, pudiendo así combinar la penetrabilidad con la direccionalidad de los campos magnéticos para obtener un tratamiento anticancerígeno muy eficaz.

7. Bibliografía

- De la Torre I., Cobo M. A., Mateo T. y Vicente L. I. (2008). "Descripción del área: Introducción a la oncología". Vértice S.L. (Ed.) Cuidados enfermeros al paciente oncológico: 1-28.
- Appert-Collin, A., P. Hubert, G. Crémel and A. Bennisroune (2015). "Role of ErbB Receptors in Cancer Cell Migration and Invasion." Front Pharmacol **6**: 283.
- Ben-Yoseph, O. and B. D. Ross (1994). "Oxidation therapy: the use of a reactive oxygen species-generating enzyme system for tumour treatment." Br J Cancer **70**(6): 1131-1135.
- Blanco, E., A. Hsiao, A. P. Mann, M. G. Landry, F. Meric-Bernstam and M. Ferrari (2011). "Nanomedicine in cancer therapy: innovative trends and prospects." Cancer Sci **102**(7): 1247-1252.
- Bray, F., A. Jemal, N. Grey, J. Ferlay and D. Forman (2012). "Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study." Lancet Oncol **13**(8): 790-801.
- Conde, J., C. Bao, Y. Tan, D. Cui, E. R. Edelman, H. S. Azevedo, H. J. Byrne, N. Artzi and F. Tian (2015). "Dual targeted immunotherapy via in vivo delivery of biohybrid RNAi-peptide nanoparticles to tumour-associated macrophages and cancer cells." Adv Funct Mater **25**(27): 4183-4194.
- Dan, Z., H. Cao, X. He, L. Zeng, L. Zou, Q. Shen and Z. Zhang (2015). "Biological stimuli-responsive cyclodextrin-based host-guest nanosystems for cancer therapy." Int J Pharm **483**(1-2): 63-68.
- De Jong, W. H. and P. J. Borm (2008). "Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards." Int J Nanomedicine **3**(2): 133-149.
- Dimitrov, D. S. and J. D. Marks (2009). "Therapeutic antibodies: current state and future trends--is a paradigm change coming soon?" Methods Mol Biol **525**: 1-27, xiii.
- Duncan, R. (2003). "The dawning era of polymer therapeutics." Nat Rev Drug Discov **2**(5): 347-360.
- Fang, J., H. Nakamura and A. K. Iyer (2007). "Tumor-targeted induction of oxystress for cancer therapy." J Drug Target **15**(7-8): 475-486.
- Ferrari, M. (2005). "Cancer nanotechnology: opportunities and challenges." Nat Rev Cancer **5**(3): 161-171.
- Franz X. Schmid (1997). *Optical spectroscopy to characterize protein conformation and conformational changes*, In T.E. Creighton (Ed.) Protein Structure: A practical approach, B. D. Hames, Oxford University Press: 261-298.
- Ghavamzadeh, R., V. Haddadi-Asl and H. Mirzadeh (2004). "Bioadhesion and biocompatibility evaluations of gelatin and polyacrylic acid as a crosslinked hydrogel in vitro." J Biomater Sci Polym Ed **15**(8): 1019-1031.
- Ghazanfari, M. R., M. Kashefi, S. F. Shams and M. R. Jaafari (2016). "Perspective of Fe₃O₄ Nanoparticles Role in Biomedical Applications." Biochem Res Int **2016**: 7840161.
- Issa, B., I. M. Obaidat, B. A. Albiss and Y. Haik (2013). "Magnetic nanoparticles: surface effects and properties related to biomedicine applications." Int J Mol Sci **14**(11): 21266-21305.

Kale, A., S. Gubbala, and R. D. K. Misra (2004). "Magnetic behavior of nano crystalline nickel ferrite synthesized by the reverse micelle technique." J of Magnetism and Magnetic Materials **277**: 350–358.

Koetz J., K. S. (2007). Introduction and Objective, in *Polyelectrolites and Nanoparticles*, Springer, Verlag Berlin Heidelberg.

Kwizera, E. A., E. Chaffin, X. Shen, J. Chen, Q. Zou, Z. Wu, Z. Gai, S. Bhana, R. O'Connor, L. Wang, H. Adhikari, S. R. Mishra, Y. Wang and X. Huang (2016). "Size- and Shape-Controlled Synthesis and Properties of Magnetic-Plasmonic Core-Shell Nanoparticles." J Phys Chem C Nanomater Interfaces **120**(19): 10530-10546.

Lai, J., K. V. P. M. Shafi, A. Ulman et al. (2004) "Mixed iron-manganese oxide nanoparticles." The Journal of Physical Chemistry B **108**: 14876–14883.

Larsericdotter, H., S. Oscarsson and J. Buijs (2001). "Thermodynamic Analysis of Proteins Adsorbed on Silica Particles: Electrostatic Effects." J Colloid Interface Sci **237**(1): 98-103.

Leach, S. J. & Scheraga, H. A. (1960). Effect of Light Scattering on Ultraviolet Difference Spectra 1. J of the American Chemical Society: 4790-4792.

Lo Nigro, C., V. Ricci, D. Vivenza, M. Monteverde, G. Strola, F. Lucio, F. Tonissi, E. Miraglio, C. Granetto, M. Fortunato and M. C. Merlano (2016). "Evaluation of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity activity and cetuximab response in KRAS wild-type metastatic colorectal cancer patients." World J Gastrointest Oncol **8**(2): 222-230.

Lu, Y., Y. Yin, B. T. Mayers, and Y. Xia (2002). "Modifying the surface properties of superparamagnetic iron oxide nanoparticles through a sol-gel approach." Nano Letters **2**: 183– 186.

Lungu, I. I., M. Rădulescu, G. D. Mogoşanu and A. M. Grumezescu (2016). "pH sensitive core-shell magnetic nanoparticles for targeted drug delivery in cancer therapy." Rom J Morphol Embryol **57**(1): 23-32.

Markus Deserno, C. H. a. K. K. (2001). Molecular Dynamics Simulations of the Cylindrical Cell Model, pp. 59-110. In T. Radeva (Ed.), Physical Chemistry of Polyelectrolytes, Marcel Dekker, New York.

Modjtahedi, H., B. C. Cho, M. C. Michel and F. Solca (2014). "A comprehensive review of the preclinical efficacy profile of the ErbB family blocker afatinib in cancer." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **387**(6): 505-521.

Niculescu-Duvaz, I. and C. J. Springer (2005). "Introduction to the background, principles, and state of the art in suicide gene therapy." Mol Biotechnol **30**(1): 71-88.

Norde, W. (1986). "Adsorption of proteins from solution at the solid-liquid interface." Adv Colloid Interface Sci **25**(4): 267-340.

Oh, J. K. and Park, J. M. (2011) "Iron oxide-based superparamagnetic polymeric nanomaterials: design, preparation, and biomedical application." Progress in Polymer Science **36**: 168– 189.

Per M. Claesson, A.D. a. E.P. (2001). *Polyelectrolyte-Surfactant Interactions at Solid-Liquid Interfaces Studied with Surface Force Techniques*, pp. 447-504. In T. Radeva (Ed.) Physical Chemistry of Polyelectrolytes, Marcel Dekker, New York.

Perego, A. F. (2013). "Adsorption techniques: dialysis sorbents and membranes." Blood Purif **35 Suppl 2**: 48-51.

Rabe, M., D. Verdes and S. Seeger (2011). "Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces." *Adv Colloid Interface Sci* **162**(1-2): 87-106.

Sancho, J. (2003). *Caracterización preliminar de la conformación proteica*. Ariel S.A. (Ed.) *Estructura de proteínas*, Gómez-Moreno, C. y Sancho, J. (coords.): 149-165

Seldon, H. L., M. C. Dahm, G. M. Clark and S. Crowe (1994). "Silastic with polyacrylic acid filler: swelling properties, biocompatibility and potential use in cochlear implants." *Biomaterials* **15**(14): 1161-1169.

Wang, Y. Y., D. D. Zhang, Y. Y. Kong, L. L. Shao, F. Y. Zhang, Y. Gao, X. Mu, J. Wang, H. F. Li, S. Q. Yu and Q. Xu (2016). "CS/PAA@TPGS/PLGA nanoparticles with intracellular pH-sensitive sequential release for delivering drug to the nucleus of MDR cells." *Colloids Surf B Biointerfaces* **145**: 716-727.

Wu, J., Y. Shen and W. Jiang (2016). "Magnetic targeted drug delivery carriers encapsulated with pH-sensitive polymer: synthesis, characterization and in vitro doxorubicin release studies." *J Biomater Sci Polym Ed*: 1-14.

Yin, H., H. P. Too, and G. M. Chow (2005) "The effects of particle size and surface coating on the cytotoxicity of nickel ferrite." *Biomaterials* **26**: 5818-5826.

