

DESARROLLO DE UN NANOBIOSENSOR FLUORESCENTE PARA LA DETECCIÓN DE LINFOBLASTOS EN PACIENTES CON LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

Paccamiccio, Julieta¹

Laboratorio de Desarrollo Analítico y Quimiometría (LADAQ) – FCB – UNL.¹

Directora: Culzoni, María Julia
Codirectora: Montemurro, Milagros

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Leucemia, Nanopartículas, Biosensores.

INTRODUCCIÓN

La leucemia es una enfermedad de la médula ósea y la sangre asociada a la proliferación clonal de células hematopoyéticas inmaduras (blastos), que tienden a diseminarse y acumularse en varios tejidos del cuerpo interfiriendo con las funciones vitales del organismo. En lo que respecta a la leucemia linfoblástica aguda (LLA), este es el cáncer más común en edad pediátrica, representando el 40% de todas las patologías oncológicas; afectando también a adultos de todas las edades. (Mancero Rodríguez et al., 2020)

Actualmente, los métodos disponibles para el diagnóstico de leucemia aplican combinaciones de análisis citoquímicos de médula ósea y sangre periférica que incluyen inmunofenotipo por citometría de flujo y amplificación de mutaciones de células malignas por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), los que resultan complejos y a la vez costosos. (Ma et al. 2016). En consecuencia, existe la necesidad de desarrollar nuevas tecnologías que contribuyan con la generación de diagnósticos mejorados en términos de rapidez, simplicidad y costo, y que se puedan realizar preferentemente en sangre periférica, para disminuir las extracciones de médula ósea.

Actualmente, la nanobiotecnología y, en particular, las nanopartículas (NPs) están siendo evaluadas en la construcción de sensores que contribuyan en el diagnóstico y el tratamiento de la leucemia. Es posible sintetizar diferentes tipos de NPs, como las metálicas, óxido-metálicas, lipídicas y poliméricas, que se pueden conjugar con ligandos y dirigirse específicamente a fenotipos de la enfermedad. Esta selectividad se puede alcanzar mediante la unión en la superficie de la NP de moléculas de reconocimiento específicas de marcadores presentes en células de sangre periférica, como ser péptidos, aptámeros y anticuerpos. (Ye et. al 2018)

Título del proyecto: “Desarrollo de biosensores selectivos para marcadores tumorales basados en nanopartículas y detección espectroscópica. Aplicación al diagnóstico de la Leucemia Linfocítica Aguda”.

Instrumento: PICT 2018-01785 (ANPCyT).

Año convocatoria: 2018

Organismo financiador: Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica

Director/a: Culzoni, María Julia

Las técnicas de detección dependen tanto de las propiedades de las NPs empleadas como de las moléculas de funcionalización. Las NPs de oro (AuNPs) se distinguen de otras clases de nanoplateformas por su efecto de resonancia de plasmón superficial localizado (LSPR). La banda LSPR presenta un máximo de absorción UV-Vis característico del tipo, tamaño y forma de las NPs ofreciendo múltiples modalidades para aplicaciones biológicas y médicas. (Jain et al., 2007). Por otro lado, la funcionalización con ligandos con propiedades fluorescentes se puede utilizar para mejorar la detección y/o cuantificación en sistemas complejos, a través de un mecanismo de activación (*off-on*) basado en el fenómeno de transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) (Periasamy et al., 2001). En este sentido, las AuNPs resultan excelentes candidatas para la construcción de nanosensores fluorescentes activables, debido a su gran capacidad de extinción de fluorescencia. En el presente trabajo, se sintetizaron AuNPs en presencia de cistamina (Cys), una molécula que contiene un enlace disulfuro orgánico que actuará como linker entre la AuNP y el fluoróforo. Se trabaja bajo la hipótesis de que la fluorescencia de fluoróforo permanece apagada y se restaura una vez que el sensor llega a la célula leucémica blanco donde, debido a las condiciones intracelulares se rompe el enlace disulfuro activándose el sensor y generándose una señal de fluorescencia cuantificable.

OBJETIVOS PERSEGUIDOS

Desarrollar un nanobiosensor fluorescente activable, basado en AuNPs funcionalizadas, para la detección selectiva de linfoblastos en muestras de sangre periférica de pacientes con LLA, con potencial aplicación en el diagnóstico y monitoreo de la enfermedad.

METODOLOGÍA

Síntesis de nanopartículas de oro funcionalizadas con cistamina (Cys-AuNPs)

El método de síntesis consiste en la reducción química del tricloruro de oro (AuCl_3) con borohidruro de sodio (NaBH_4) en presencia de Cys. A modo de estudio preliminar, se evaluó el efecto de ciertas variables fisicoquímicas involucradas en el proceso de síntesis. En primer lugar, se sintetizaron Cys-AuNPs con diferentes concentraciones de reactivos, manteniendo la relación molar entre ellos. Posteriormente, se analizó el efecto de la temperatura, llevando a cabo una síntesis en baño de agua a una temperatura de 15°C y utilizando una manta calefactora a temperatura de 30°C ; por otro lado, se determinó el efecto del pH, realizando la síntesis a pH 5 y a pH 8.

Optimización de la síntesis de Cys-AuNPs

En base a los resultados preliminares obtenidos, se realizó un diseño experimental con el fin de determinar los factores que tienen un efecto significativo en la síntesis de Cys-AuNPs. Los factores seleccionados para el análisis fueron la temperatura en un rango de $5 - 20^\circ\text{C}$, el pH en un rango de 2.5 – 4.5, la concentración de cistamina en un rango de 0.07 – 1 mmol L⁻¹ y el tiempo de agitación de la solución en un rango de 1 – 60 minutos. En cuanto a las respuestas, se seleccionaron, por un lado, aquellas que permitan estimar el tamaño de las Cys-AuNPs, su concentración y estabilidad en el tiempo.

Para ello, se registraron el diámetro de cada NP (Z), el índice de polidispersidad (PDI) y la longitud de onda en el máximo de la banda correspondiente al plasmón superficial de resonancia (SPR). Por otro lado, se registraron los valores del potencial de reducción del grupo tiol unido a la AuNP (E) y el grado de recubrimiento (R) de las Cys-AuNPs, para tipificar el enlace de las AuNP con la Cys en términos de fuerza y cantidad, respectivamente. Se construyó un diseño factorial completo en dos niveles que consistió en 16 experimentos que se llevaron a cabo en dos bloques, correspondiendo cada bloque a un día de trabajo diferente. Las combinaciones de los niveles de los factores resultantes para cada experimento del diseño, así como las respuestas obtenidas, se muestran en la Tabla 1. En algunos casos, no pudieron ser registradas ciertas respuestas debido a la precipitación de las AuNPs sintetizadas.

Tabla 1: Combinaciones de factores y respuestas obtenidas en cada experimento del diseño.

Ensayo	Bloque	Factores				Respuestas				
		T (°C)	pH	Ccys (mM)	t (min)	Z (nm)	PDI	SPR	R (nmol/cm ²)	E (V)
1	1	20	4.5	0.07	60	-	-	-	-	-
2	1	5	4.5	1	60	60	0.849	506	0.519	-0.468
3	1	5	2.5	0.07	60	-	-	580	0.398	-0.367
4	1	5	2.5	1	1	32	0.551	520	1.37	-0.442
5	1	20	4.5	1	1	50	0.586	512	0.603	-0.445
6	1	20	2.5	1	60	18	0.629	516	0.034	-0.322
7	1	5	4.5	0.07	1	-	-	568	0.371	-0.379
8	1	20	2.5	0.07	1	-	-	554	0.409	-0.363
9	2	5	4.5	1	1	27	0.447	516	14.8	-0.592
10	2	5	2.5	1	60	18	0.571	516	77.5	-0.420
11	2	20	4.5	1	60	50	0.521	518	1.65	-0.477
12	2	20	4.5	0.07	1	86	0.306	536	0.419	-0.315
13	2	5	4.5	0.07	60	58	0.344	546	0.972	-0.360
14	2	20	2.5	0.07	60	-	-	-	-	-
15	2	5	2.5	0.07	1	-	-	554	-	-
16	2	20	2.5	1	1	-	-	526	0.0017	-0.358

Análisis estadístico y modelado de las respuestas

El diseño experimental y el análisis estadístico se realizó utilizando el software Design-Expert-7.0.0. Se obtuvo un modelo empírico, es decir, una ecuación derivada de los datos analizados que describe la relación entre la respuesta y los factores significativos seleccionados según el diagrama de Pareto. El ajuste del modelo y la significancia de los efectos y sus interacciones se evaluaron estadísticamente mediante el análisis de la varianza (ANOVA). Un nivel de probabilidad menor a 0.01 (valor- $p < 0.01$) se consideró estadísticamente significativo. Finalmente, una vez obtenido el modelo que explica el cambio en la respuesta en función de los factores, se realizó una optimización simultánea de las respuestas mediante la función deseabilidad de Derringer (Mnontgomery, 2001), tomando como criterio minimizar el tamaño de partícula y el PDI y maximizar el R.

RESULTADOS/CONCLUSIONES

Tanto los ensayos preliminares como el diseño experimental de *screening* mostraron que variaciones en diferentes parámetros fisicoquímicos tienen un impacto sobre las Cys-AuNPs sintetizadas.

Mediante el diseño experimental se determinaron los factores que afectan a cada respuesta analizada, así como las interacciones entre ellos, tal como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2: Factores e interacciones que afectan cada respuesta analizada en el diseño.

Respuestas	Factores			T (D)	Interacciones
	T (A)	pH (B)	Ccys (C)		
Z		✓	✓		-
PDI	✓	✓	✓	✓	AC - AD
SPR		✓	✓	✓	AC - ABD
R	✓	✓	✓	✓	AD - BD - CD - ABC
E	✓	✓	✓		BC

El análisis del efecto de los factores sobre las respuestas individuales evidencia la complejidad del sistema a la hora de encontrar la combinación de factores que permita obtener todas las respuestas estudiadas en sus niveles deseados. Por este motivo, se llevó a cabo la optimización simultánea de las respuestas mediante la función deseabilidad, que permite encontrar las condiciones operativas que aseguren el cumplimiento de los criterios de todas las respuestas en juego y, a la vez, provean el mejor valor en conjunto de respuesta deseable. Teniendo en cuenta que las Cys-AuNPs son la base del biosensor, siendo deseable un tamaño de partícula pequeño y monodispersa, y gran parte de su superficie recubierta con la cistamina, se tomó como criterio minimizar el tamaño de partícula y el PDI, y maximizar el R.

La optimización simultánea de las respuestas muestra que los niveles de factores que permiten obtener la mayor deseabilidad para los criterios propuestos ($D = 0.471$) son una T de 5°C, pH = 2.5, Ccys = 0.77 Mm, y t = 6.06 min. Como consecuencia, las respuestas predichas por el modelo incluyen un tamaño de partícula de 28 nm, PDI de 0.4, SPR de 522, un R de 14 mol/cm² y un potencial de -0.47 V.

El diseño experimental permitió obtener las condiciones óptimas para la síntesis de las Cys-AuNPs, que constituye la primera etapa del desarrollo del nanosensor para la detección de células leucémicas. Una vez sintetizadas las Cys-AuNPs en estas condiciones, se continuará con la siguiente etapa que involucra la unión del fluoróforo y de la molécula de reconocimiento selectivo.

BIBLOGRAFÍA BÁSICA

Douglas C. Mnontgomery, 2001. Design and analysis of experiment. (5ta ed.). John Wiley & Sons, Inc. Nueva York.

Jain P., Huang X., El-Sayed I., El-Sayed M., 2007. Noble metals on the nanoscale: Optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology, and medicin. Plasmonics, 2,107-118.

Ma D., Zhong S., Liu X., Mai H., Ma i G., Xu C., Zhou F., 2016. CD3D and PRKCQ work together to discriminate between B-cell and T-cell acute lymphoblastic leukemia. Computers in biology and medicine, 77, 16–22.

Mancero Rodríguez M.J., De la Paz Arellano Salinas K., Santo Cepeda K. A., Rodríguez Revelo M. E., 2020. Diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda. Recimundo, 4, 53-63.

Periasamy, A., 2001. Fluorescence resonance energy transfer microscopy: a mini review. Journal of Biomedical Optics, 6(3), 287.

Ye F., Zhao Y., El-Sayed R., Muhammed M., Hassan M., 2018. Advances in nanotechnology for cancer biomarkers. Nano Today, 18, 103- 123.