

Andrada Heber¹, Alarcón Liliana P.², Olivera María E.², Falcone R. Darío¹ and Silva Oscar Fernando³.

1-Instituto para el Desarrollo Agroindustrial y de la Salud (IDAS). Dpto. de Química. UNRC. Río Cuarto, Argentina.

2-Unidad de Investigación y Desarrollo en Tecnología Farmacéutica (UNITEFA-CONICET). Dpto. de Ciencias Farmacéuticas, FCQ, UNC, Córdoba, Argentina.

3-Instituto de Investigaciones en Físico-Química de Córdoba (INFIQC-CONICET), Dpto. de Química Orgánica, FCQ, UNC, Córdoba, Argentina.

handrada@exa.unrc.edu.ar

INTRODUCCIÓN

En este estudio se caracterizaron complejos de ADN doble hebra de esperma de salmón con vesículas catiónicas de ModCD14-BHD (figura 1). [1-3] Una vesícula catiónica es aquella formada por un surfactante catiónico (BHD) y uno aniónico (ModCD14) en una relación estequiométrica de 1:1. El tamaño, morfología y carga superficial de los complejos se estudió a diferentes proporciones estequiométricas de ModCD14-BHD/ADN mediante DLS, AFM, TEM y potencial zeta (ζ). El tipo de conformación adoptada por el ADN cuando interactúa con ModCD14-BHD se midió mediante dicroísmo circular inducido (ICD). Finalmente, las vesículas de ADN-ModCD14-BHD se cargaron con doxorubicina (DOX) y se evaluó su liberación.

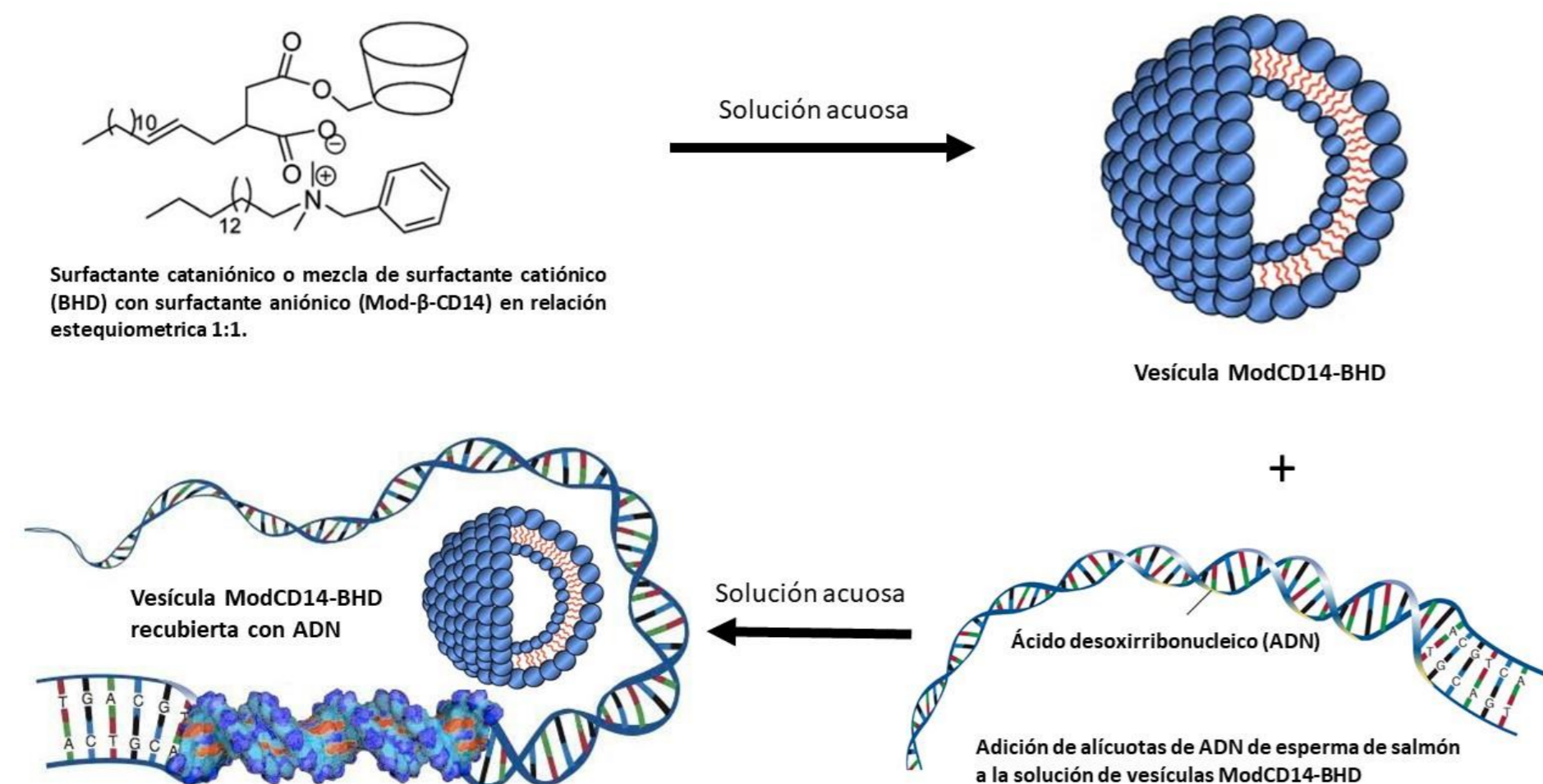


Figura 1: Esquema en donde se muestra la estructura química del surfactante catiónico ModCD14-BHD y la secuencia de pasos para la obtención de vesículas recubiertas con ADN.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudios mediante DLS y potencial zeta (ζ)

- ✓ Se disolvió ModCD14-BHD en agua [250 μ M], las vesículas presentaron un diámetro hidrodinámico de aproximadamente 200nm y un índice de polidispersidad (PDI) de 0,2-0,3.
- ✓ El potencial zeta (ζ) de las vesículas ModCD14-BHD fue positivo ($\zeta = +12$ mV).
- ✓ El ADN de esperma de salmón presentó 3 picos característicos, un pico principal a 327nm, a 1500nm y otro a 4500nm, con altos valores de PDI (PDI = 0,5-0,9) que reflejan alta polidispersidad.
- ✓ El potencial ζ del ADN fue negativo ($\zeta = -45$ mV).

La figura 2A muestra el diámetro hidrodinámico D de las soluciones de ADN-ModCBHD realizando una titulación con ADN, y en la figura 2B se muestran los valores de potencial ζ .

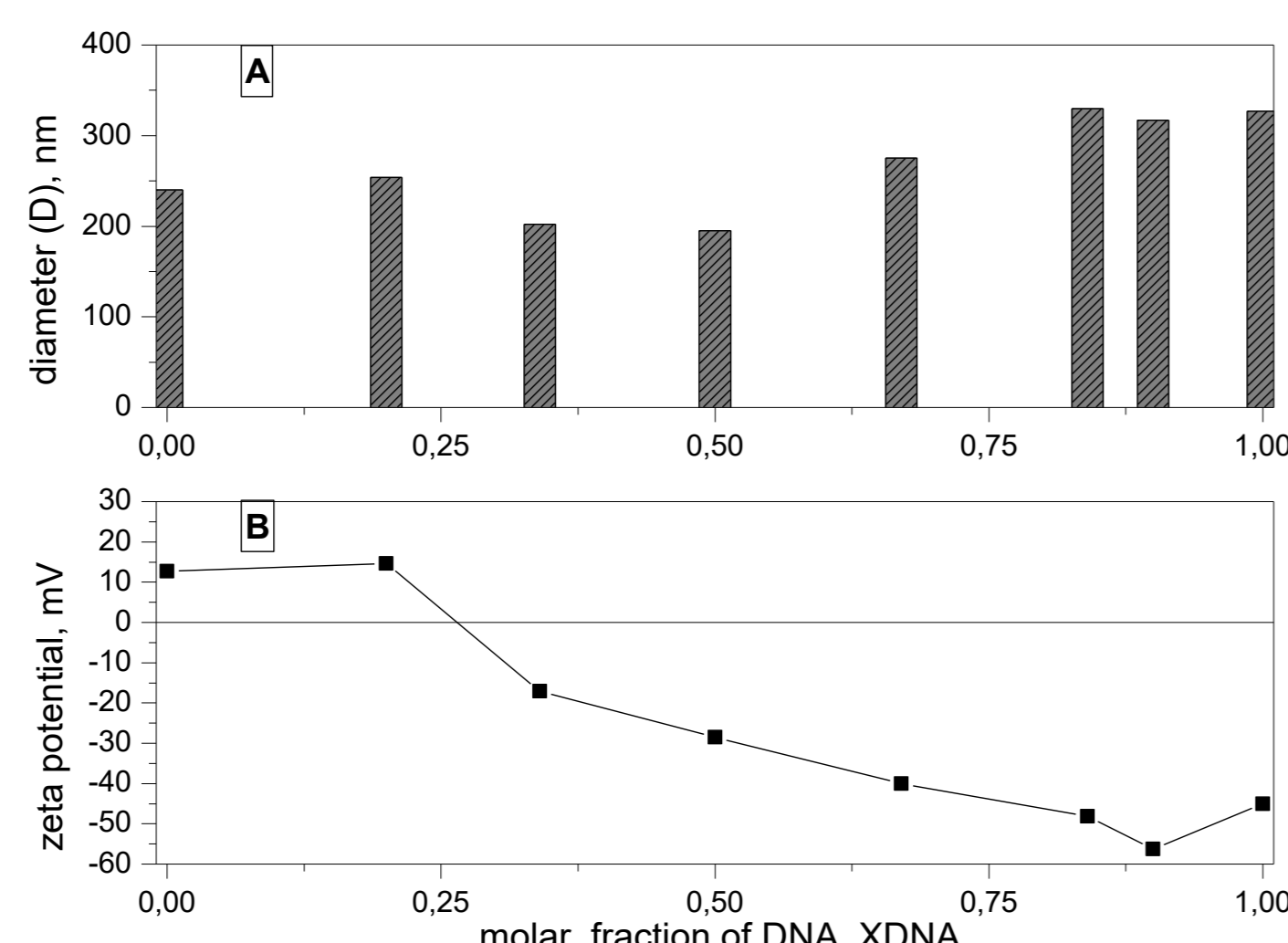


Figura 2. (A) Diámetro hidrodinámico y (B) potencial- ζ para la titulación de ADN en vesículas ModCD14-BHD ([ModCD14-BHD] = 250 μ M).

Microscopia de fuerza atómica AFM

Se realizaron imágenes AFM para conocer la morfología de las muestras, depositando una alícuota de la solución de ADN-ModCD14-BHD de distintas proporciones estequiométricas sobre una superficie ultra plana de mica.

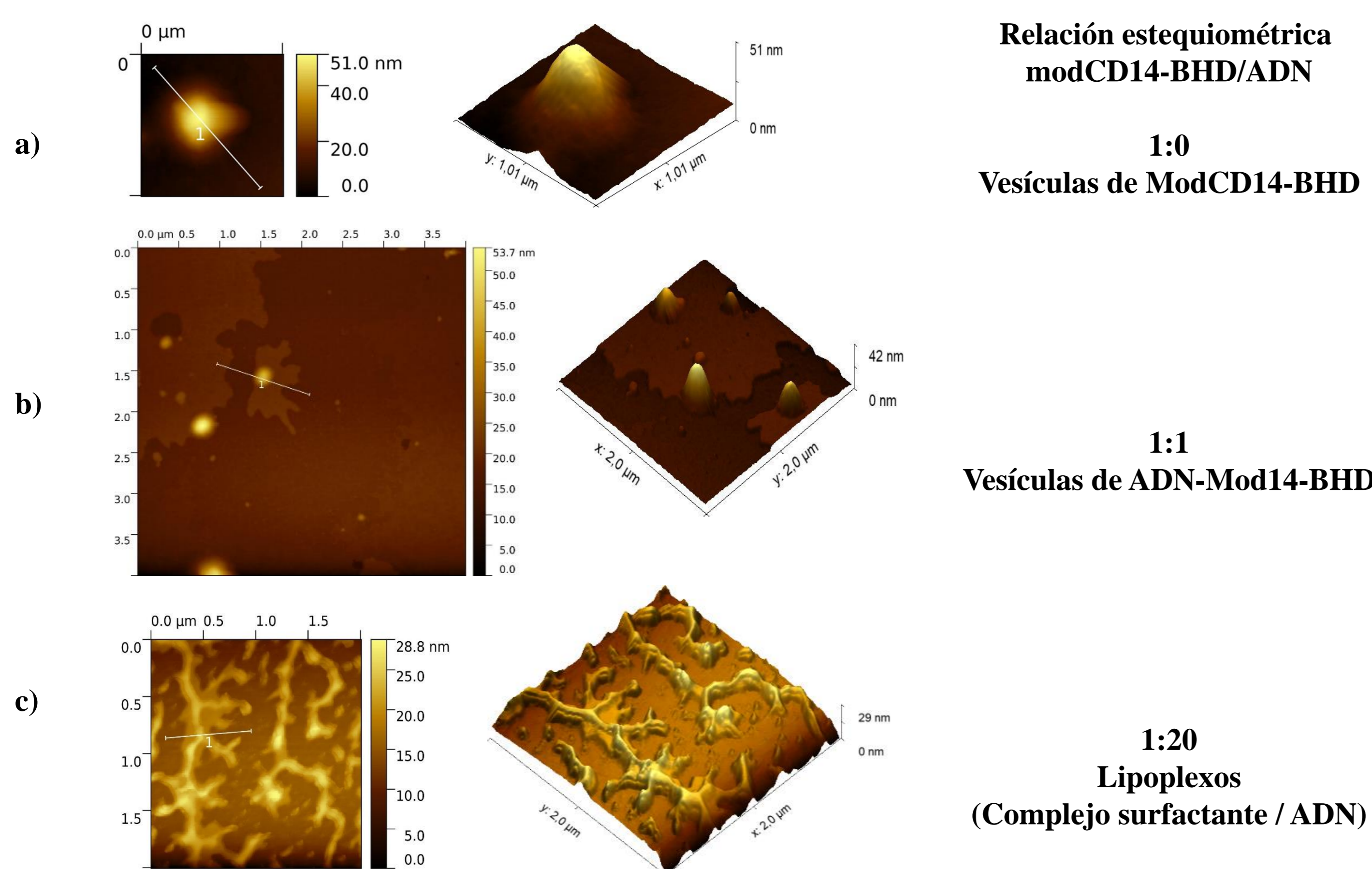


Figura 3. Imagen AFM de una vesícula ModCD14-BHD simple (A) antes de la adición de ADN y después de la adición de ADN alcanzando una relación molar (Panel B) $X_{DNA} = 0,5$ y (C) $X_{DNA} = 0,95$. [ModCD14-BHD] = 250 μ M.

Microscopia electrónica de transmisión TEM

Imagen del complejo ADN-ModCD14-BHD de relación estequiométrica 1:1.

- ✓ El tamaño de las vesículas observado en la imagen es consistente con el tamaño obtenido mediante DLS y AFM.

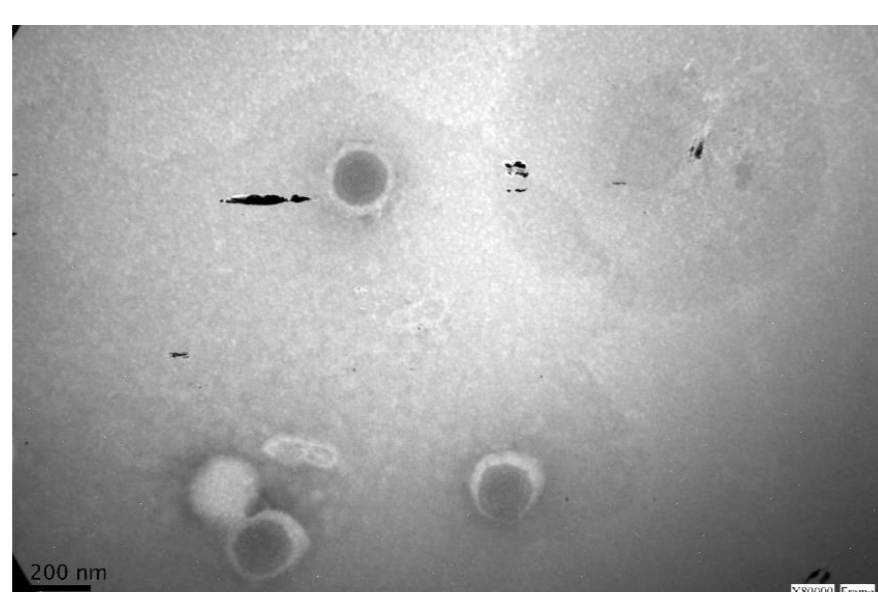


Figura 4. imagen obtenida mediante TEM de vesículas de ModCD14-BHD recubiertas con ADN.

Estudio de espectroscopia de dicroísmo circular (CD)

- ✓ Complejo ADN-ModCD14-BHD relación 1:1 ($X_{DNA} = 0,50$)

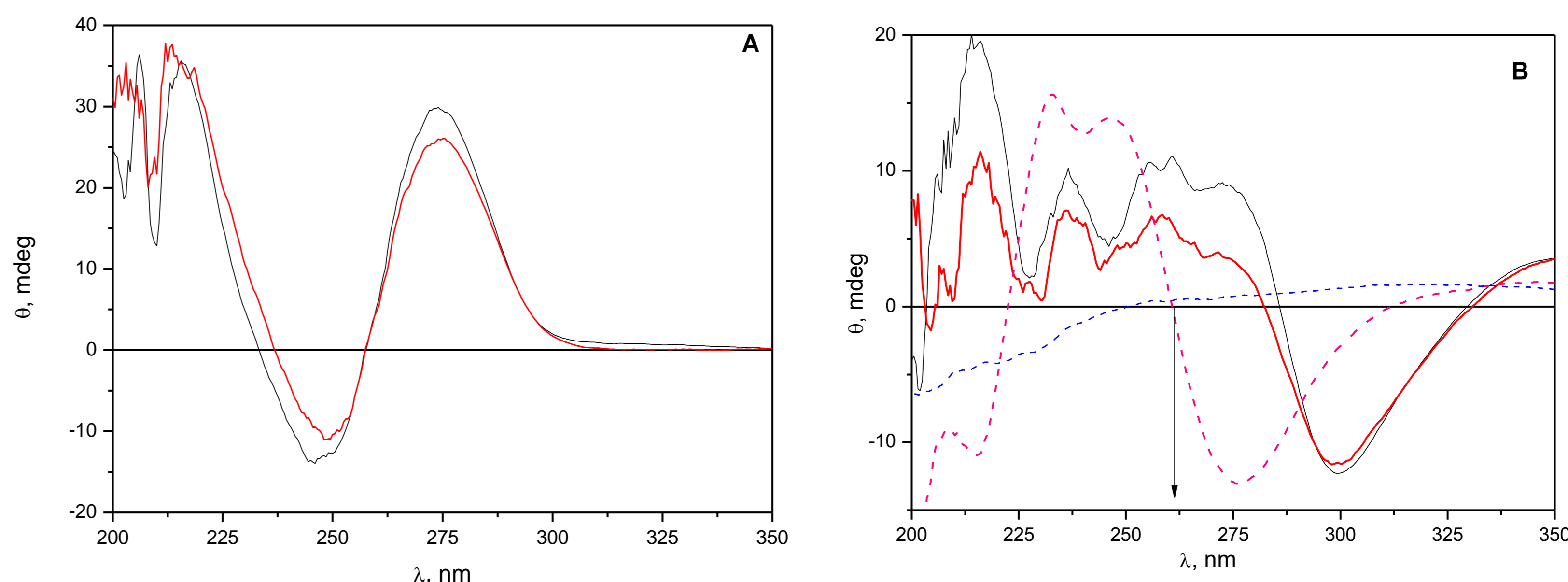


Figura 5. Espectros de ADN libre antes (A) (línea negra) y después de la adición en vesículas ModCBHD (línea roja). (B) Complejo DOX-ADN antes (línea negra) y después de la adición en vesículas ModCD14-BHD (línea roja), sin DOX (línea rosa), sin ModCD14-BHD (línea azul). La flecha en el gráfico representa $\lambda = 260$ nm. $X_{DNA} = 0,5$. [ModCD14-BHD] = 250 μ M. [ADN] = 250 μ M. [DOX] = 45 μ M.

Estudios sobre la interacción entre vesículas de ADN ModCD14-BHD y doxorubicina (DOX)

- ✓ DOX es un fluoróforo bien conocido excitable con luz visible (absorción máxima a 480-500 nm).
- ✓ DOX forma dímeros y complejos de orden superior con ADN a concentraciones superiores a 50 μ M.
- ✓ Utilizamos [DOX] = 45 μ M para monitorear las interacciones de DOX con ADN (complejo DOX-ADN) y vesículas ModCD14-BHD.

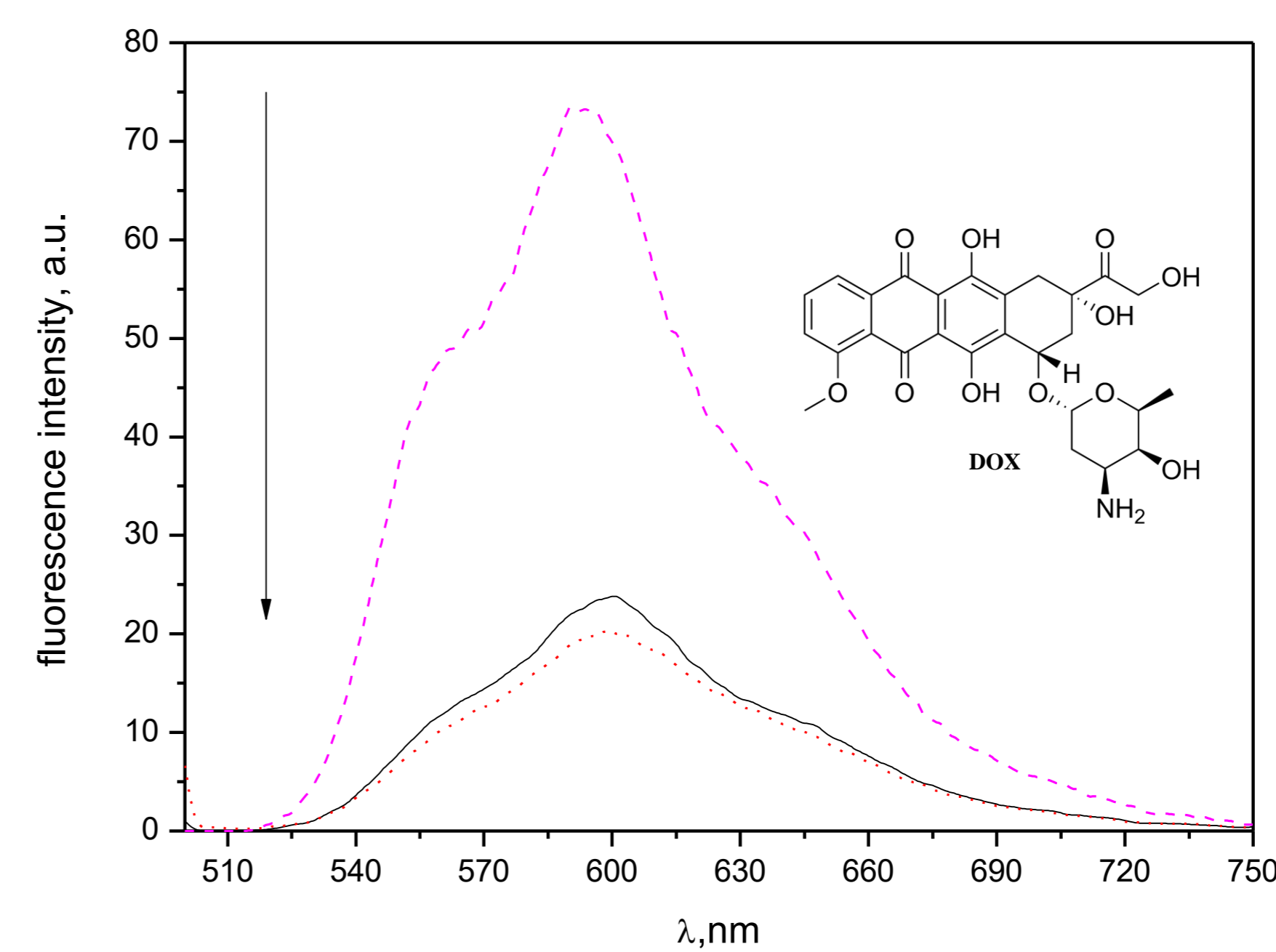


Figura 6. Espectros de emisión de fluorescencia de DOX (guión), complejo DOX-ADN en ausencia (línea) y en presencia de vesículas ModCD14-BHD (puntos). [DOX] = 45 μ M; $X_{DNA} = 0,50$. [ModCD14-BHD] = 250 μ M. $\lambda_{exc} = 489$ nm.

Estudios de liberación de doxorubicina (DOX)

- ✓ Se realizaron perfiles de liberación de complejos de DOX-ADN en agua, en NaCl al 0,9% (0,154 M) y en tampón de fosfato (pH = 7,4, 0,154 M).
- ✓ Para la relación estequiométrica 1:1 (ModCD14-BHD/ADN) se realizó un histograma de liberación acumulada de DOX utilizando celdas de Franz.

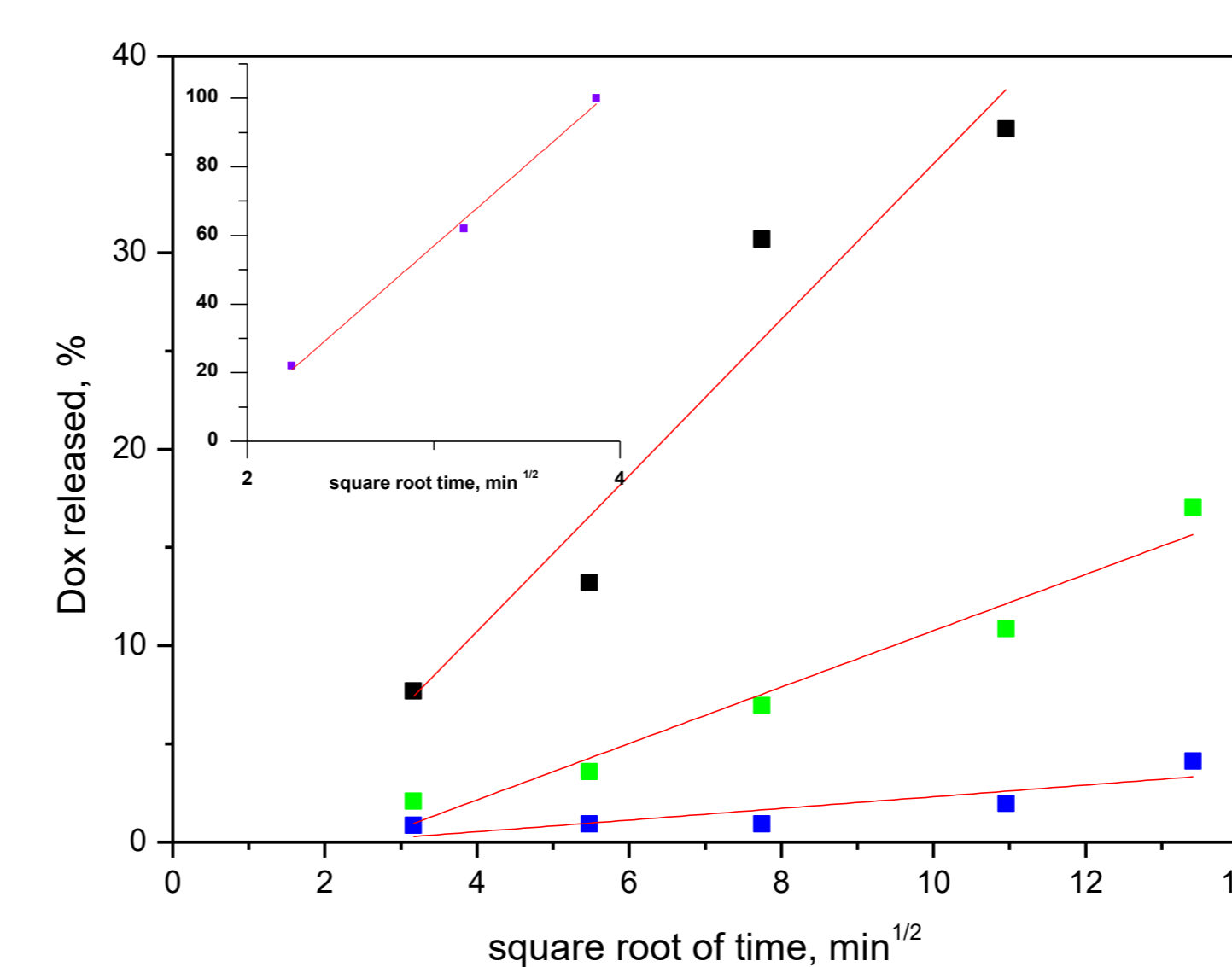


Figura 7. Gráficos de Higuchi de liberación de DOX del complejo DOX-ADN en tampón fosfato pH=7,4 (negro), NaCl 0,9% (verde) y agua (azul). Recuadro: liberación de DOX libre acumulativa (referencia, puntos magenta). [DOX] = 45 μ M; $X_{DNA} = 0,50$. [ADN] = 250 μ M.

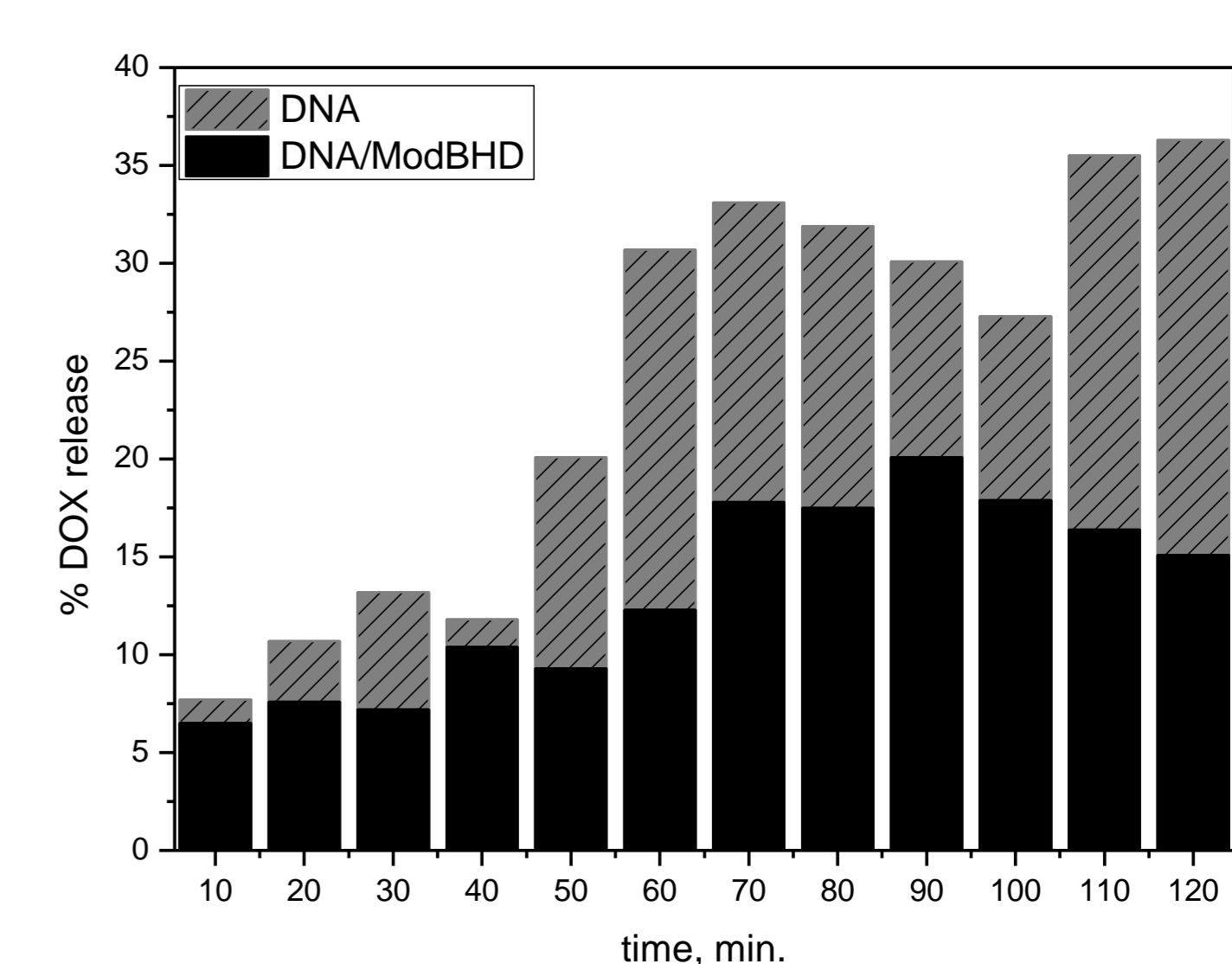


Figura 8. Liberación acumulada in vitro de DOX del complejo DOX-ADN (barra gris) antes y (barra negra) tras la adición de vesículas ModCD14-BHD utilizando una celda de difusión de Franz en función del tiempo en soluciones acuosas tamponadas a pH=7,4. [DOX] = 45 μ M; $X_{DNA} = 0,50$. [ModCD14-BHD] = 250 μ M.

Conclusiones

- ✓ Se caracterizaron vesículas catiónicas derivadas de ciclodextrinas recubiertas con ADN (ADN-ModCD14-BHD), capaces de cargar un fármaco antitumoral como la DOX.
- ✓ El diámetro hidrodinámico de las vesículas de ADN-ModCD14-BHD (1:1) fue de alrededor de 200nm, lo cual es consistente con mediciones realizadas mediante otras técnicas tales como AFM, TEM y con los requisitos básicos de un sistema nanométrico de liberación de fármacos.
- ✓ El estudio reveló que la tasa de liberación de DOX es más lenta en vesículas de ADN-ModCD14-BHD que en el complejo DOX-ADN, lo cual fue atribuido a que el ADN en la conformación β relajada mejora la intercalación de DOX tras la adición de ModCD14-BHD al complejo DOX-ADN.
- ✓ Destacó una estrategia novedosa para cargar y liberar DOX utilizando vesículas biocompatibles, ya que el proceso de intercalación de DOX en ADN puede controlarse mediante la presencia de vesículas ModCD14-BHD, pH y fuerza iónica.

Agradecimientos

Apoyo financiero del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (PIP CONICET 112-2015-0100283), Universidad Nacional de Río Cuarto (PPI-UNRC 2016-2019), Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica (PICT 2012-0232, PICT 2012 -0526, PICT 2015-0585, PICT 2018-0508), y se agradece al Ministerio de Ciencia y Tecnología, Gobierno de la Provincia de Córdoba (PID 2013 y PID 2018). O.F.S. M.E.O y R.D.F. ocupan un puesto de investigador en CONICET. H.E.A. y L.P.A. agradecen al CONICET por su beca Postdoctoral.

References

- 1) Agudelo, D.; Bourassa, P.; Bérubé, G.; Tajmir-Riahi, H. A. J. Photochem. Photobiol. B Biol. 2016, 158, 274–279.
- 2) Silva, E. F.; Bazoni, R. F.; Ramos, E. B.; Rocha, M. S. Biopolymers 2017, 107 (3), 1–9.
- 3) Silva, O. F.; De Rossi, R. H.; Correa, N. M.; Silber, J. J.; Falcone, R. D. RSC Adv. 2018, 8 (23), 12535–12539.