

ENTENDIENDO LA CORRELACIÓN ENTRE FORMACIÓN DE CORONAS PROTEICAS Y FENÓMENOS DE AGREGACIÓN EN NANOPARTICULAS

Agustín S. Picco,^{1,*} Larissa F. Ferreira,² Flavia E. Galdino,² Jean-François Berret,³ Mateus B. Cardoso²

¹Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA-UNLP-CONICET). La Plata, Argentina.

²Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS-Sirius). Campinas, Brasil.

³Matière et Systèmes Complexes, UMR 7057 CNRS Université Denis Diderot Paris-VII. Paris, France.

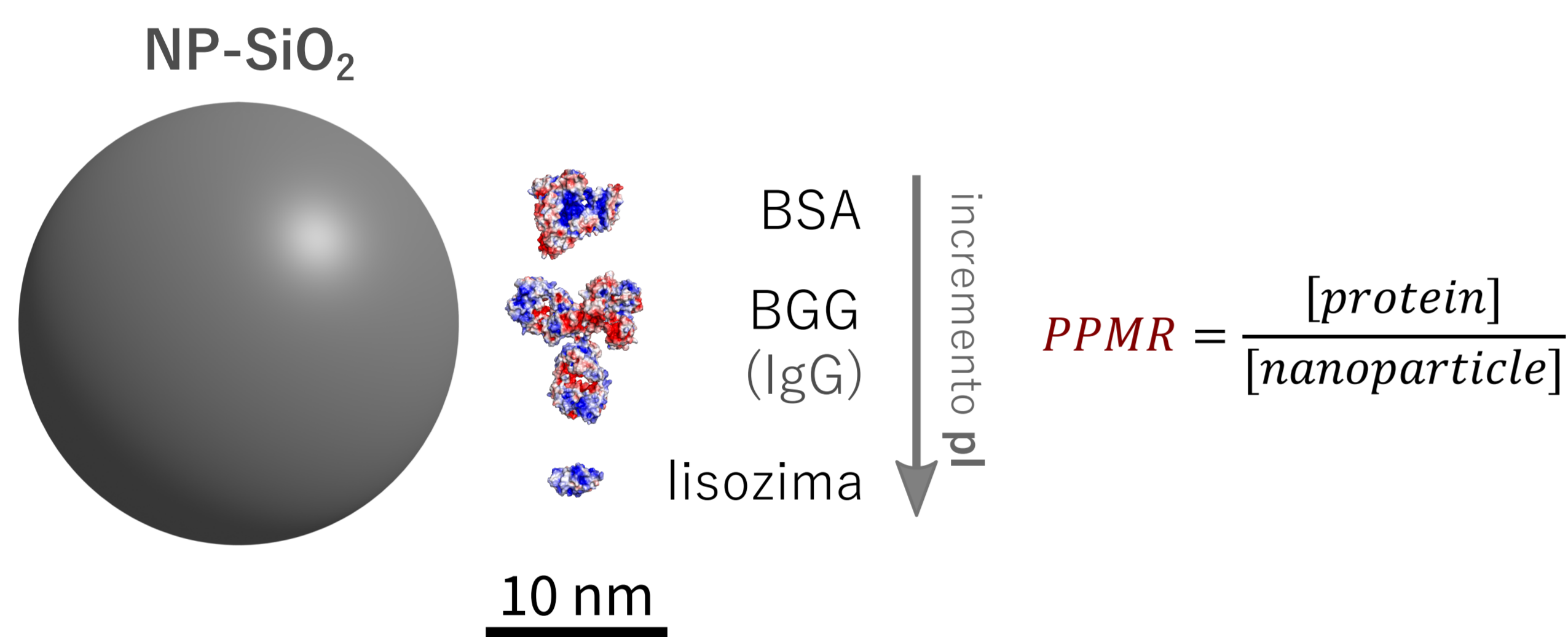


*apicco@inifta.unlp.edu.ar

MOTIVACIÓN

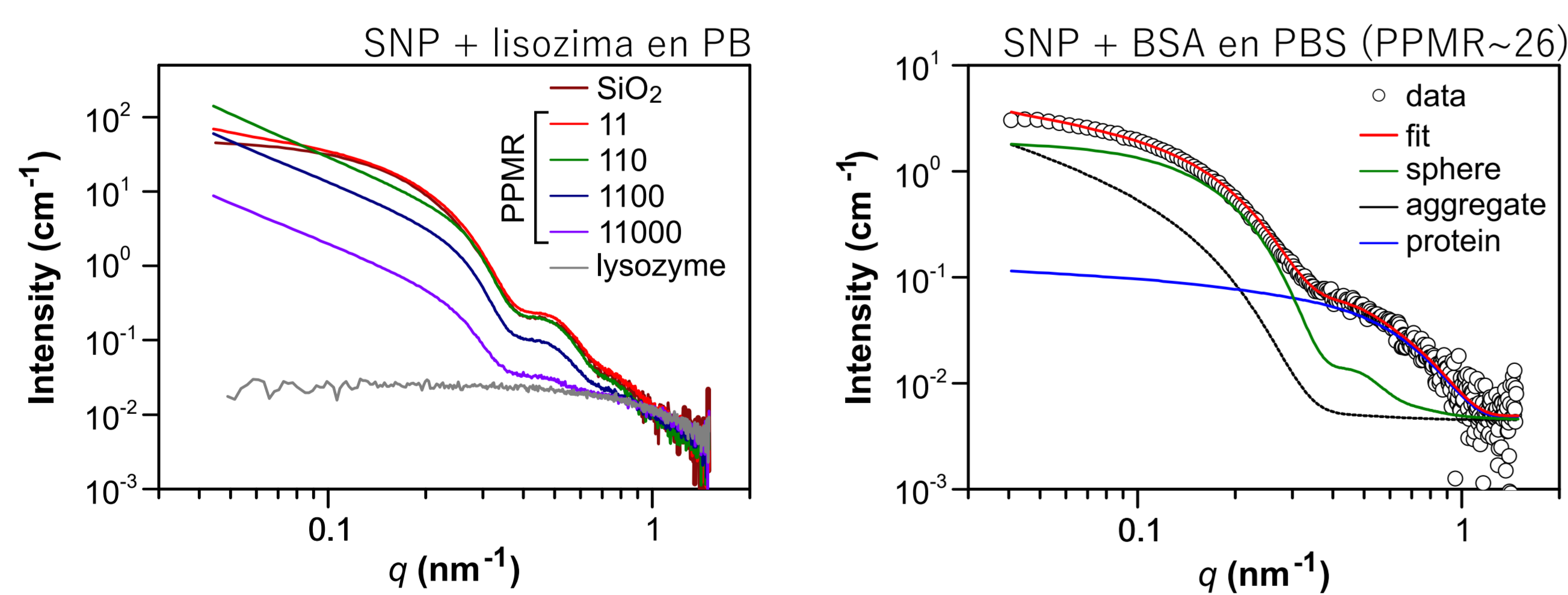
La nanomedicina enfrenta grandes desafíos que condicionan su transferencia a la clínica médica. En particular, la formación de coronas de proteínas sobre nanopartículas (NPs) dispersas en fluidos biológicos (ej. suero), afecta radicalmente la interacción de NPs con sistemas biológicos, modificando su destino y performance. Además, al modificar las propiedades coloidales, la corona proteica puede inducir (o prevenir) la agregación de NPs. Frecuentemente, los estudios que examinan la interacción NP-proteína aplican esquemas de titulación y utilizan concentraciones que distan de las encontradas en fluidos biológicos. En este trabajo, se presenta un enfoque alternativo, basado en la aplicación del *método de las variaciones continuas* (Berret; *Macromolecules* 2007, 40, 4260) al estudio de la interacción de NPs (de silica, SNPs) y diferentes proteínas o fuentes de proteínas, como albumina bovina (BSA), lisozima, γ -globulina bovina (BGG) o suero fetal bovino (FBS) mediante DLS, SAXS y cryo-TEM, prestando especial atención al efecto de la adsorción de proteínas sobre la estabilidad coloidal de SNPs.

MATERIALES Y METODOS



SNPs ($D_{TEM} \sim 23\text{nm}$, $D_H \sim 30\text{nm}$ y $z\text{-pot} \sim -30\text{mV}$ a $\text{pH} = 7.4$) fueron incubadas con proteínas modelo de diferentes pI como **BSA** ($\text{pI} \sim 4.7\text{-}5.6$), **lisozima** ($\text{pI} \sim 11.4$) y **BGG** ($\text{pI} \sim 6.6$), en buffer fosfato (**PB**, $\text{pH} = 7.4$, $I \sim 25\text{mM}$) o buffer fosfato salino (**PBS**; $\text{pH} = 7.4$, $I \sim 163\text{mM}$), a diferentes *particle-to-molar ratios* (**PPMR**) y estudiadas mediante *DLS*, *SAXS* y *Cryo-TEM*. También se estudio la interacción de SNPs incubadas con **FBS**, en este caso a diferentes *mixing ratios* (equivalentes a la relación de concentraciones entre proteína y SNP en g/L)

ANÁLISIS DE DATOS SAXS



Los patrones SAXS de cada mezcla fueron adquiridos en la línea SAXS-1 de LNLS. Los patrones fueron modelados considerando la sumatoria de 3 niveles: SNP (esferas polidispersa), proteína y agregados de SNPs.

$$I(q) = I_{NP} + I_{prot} + I_{agg} + B$$

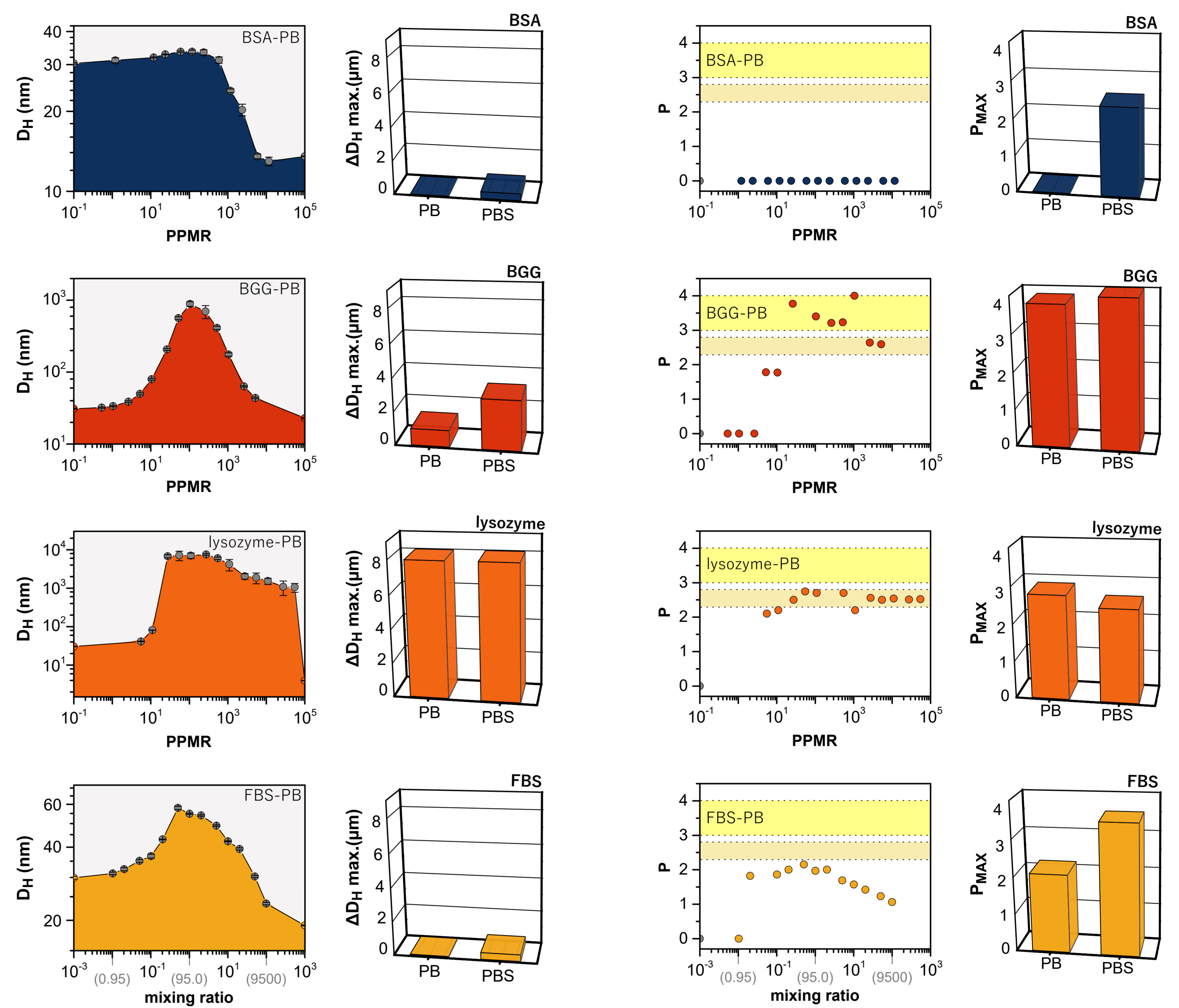
Los agregados fueron modelados como un decaimiento siguiendo una ley de potencia (con exponente negativo P , con cut-off) como lo implementado en el modelo de Beaucage (J. Appl. Crystallogr. 1995, 28, 717)

$$I_{agg} = B e^{-\frac{q^2 R_g^2}{3}} \left[\frac{erf(qkR_a/\sqrt{6})}{q} \right]^P$$

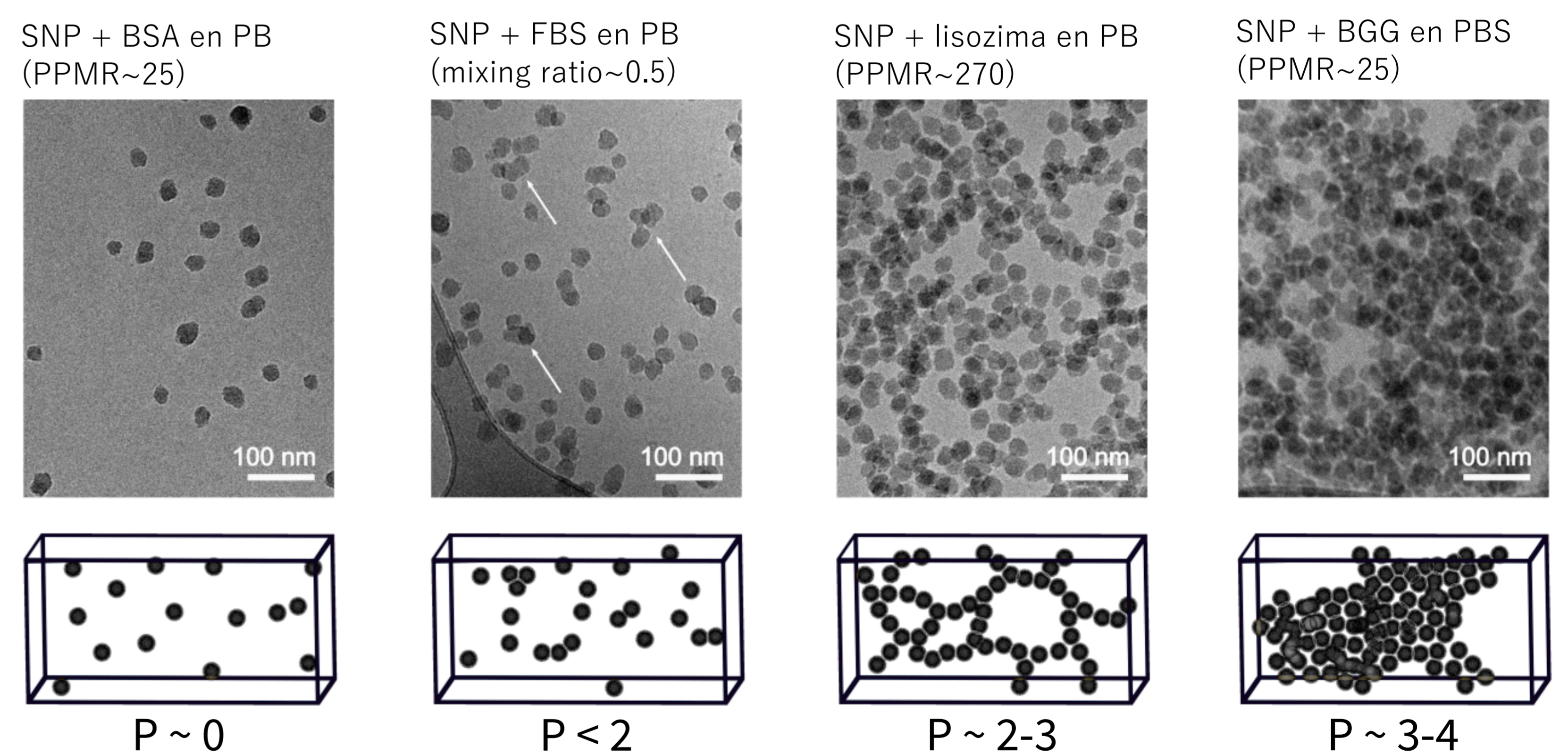
AGRADECIMIENTOS

CONICET, UNLP, FAPESP, LNLS

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



A izquierda y derecha, evolución con PPMR de D_H (por DLS) y valores de P derivados de SAXS en PB, respectivamente. Los resultados en PBS se encuentran en el material suplementario. BSA se adsorbe sobre las SNP formando coronas proteicas en PB (sin agregación), mientras que induce agregación leve en PBS. BGG no induce agregación solo a bajos PPMR. A valores mayores, genera grandes agregados de SNPs con características de fractal de superficie ($P \sim 3\text{-}4$). El proceso es mas abrupto en PBS que en PB. Lisozima produce agregación masiva de SNPs en ambos buffers, mostrando agregados de tipo fractal de masa ($P \sim 2\text{-}3$). FBS genera agregación muy leve en PB (formación de multímeros de SNPs; $P < 2$) y agregados mayores (de tipo fractal de superficie) en PBS.



Las tendencias observadas por DLS y SAXS fueron confirmadas mediante cryo-TEM de muestras seleccionadas (a PPMRs mostrando ΔD_H máximo). Las imágenes muestran los 4 comportamientos característicos observados: Formación de corona proteica (*sin agregación*), agregación muy leve (*multímeros de SNPs*), generación de agregados *fractales (de masa)* e inducción de agregados compactos *fractales (de superficie)*. Las gráficas debajo de las imágenes esquematizan lo mencionado y muestran su relación con P derivado por SAXS

CONCLUSIONES

El método de variaciones continuas, utilizando la combinación de DLS, SAXS y Cryo-TEM, permite explorar la relación entre adsorción de proteínas y agregación de NPs a lo largo de varios ordenes de magnitud. En vista de los resultados y considerando los pI de las diferentes proteínas queda en evidencia, *grosso modo*, que en la interacción entre SNPs y las proteínas (y los fenómenos de agregación inducidos, el componente electrostático cumple un rol fundamental.

Material suplementario disponible en:

<https://docs.google.com/document/d/1W8O-y1y22sYHIIcPNeYfNezJD0ZGm05do4AJNn9tjA/edit?usp=sharing>