



Vehiculización de compuestos efectivos frente al virus de la hepatitis C (VHC)

Trabajo fin de Máster

Rafael Clavería Gimeno
24/06/2013

Directores:
Olga Abián Franco
Adrián Velázquez Campoy



Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular
Universidad de Zaragoza

Máster en Biología Molecular y Celular 2012-2013

Índice

Introducción.....	2
Objetivos.....	13
Materiales y métodos.....	14
Cultivos celulares.	
Síntesis y naturaleza de las nanopartículas.	
Monitorización de la entrada de AuNPs por espectroscopía.	
Monitorización de la entrada y la localización de las AuNPs por microscopía y citometría de flujo.	
Estudio competencia con Galactosa.	
Evaluación del metabolismo celular (cell titter).	
Monitorización de la formación de complejos CD γ -OAV por espectroscopía.	
Calorimetría isotérmica de titulación (ITC).	
Docking.	
Evaluación de la actividad antiviral de los complejos (luminiscencia).	
Resultados.....	27
<u>Estudio de la incorporación de AuNPs en diferentes tipos celulares:</u>	
Estudio de la incorporación de AuNPs por espectroscopía.	
Estudio de la incorporación de AuNPs por citometría de flujo y la localización celular de las AuNPs incorporadas por microscopía.	
Inhibición de la entrada de AuNP-Gal en presencia de galactosa.	
<u>Estudio de la interacción CDγ-compuestos antivirales y su actividad en cultivo celular:</u>	
Monitorización de la formación de complejos por espectroscopía.	
Caracterización de la unión CD γ -OAVs mediante ITC.	
Docking	
Efecto de los complejos sobre la replicación de “HCV replicon system cells” y sobre la viabilidad celular.	
Discusión.....	42
Conclusiones.....	48
Bibliografía.....	49

INTRODUCCIÓN

La hepatitis C es una enfermedad infecciosa hepática producida por un virus, VHC, que afecta a más de 170 millones de personas en todo el mundo. En España tiene una prevalencia del 2% en la población. La principal vía de transmisión es la parenteral, aunque también están descritas la vía sexual y la transmisión vertical (en mujeres inmunodeprimidas) (Esteban, 2008).

En la mayor parte de los casos el VHC provoca infecciones hepáticas crónicas, sin manifestaciones clínicas hasta fases tardías, que pueden evolucionar a cirrosis y hepatocarcinoma, siendo necesario un trasplante hepático. La magnitud del problema sanitario y social de esta infección es enorme, ya que conlleva un descenso en la esperanza de vida de los pacientes que la padecen y comporta un elevado coste social y económico cuando progresa hacia los estadios más avanzados de la enfermedad (Lauer, 2001; Hoofnagle, 2002).

El hecho de que la regresión espontánea de la enfermedad sea algo excepcional, unido a que la mortalidad relacionada con enfermedades hepáticas es mayor en pacientes con hepatitis C crónica y a la elevada tasa de aparición de cirrosis y hepatocarcinoma en estas personas, hace necesaria la existencia de un tratamiento adecuado para la hepatitis C crónica (Garg, 2009; Sarrazin, 2010). De momento no existe vacuna para prevenir la infección, y el tratamiento más efectivo aunque inespecífico hasta hace poco, se basaba en la administración de interferón α -pegilado y ribavirina, con numerosos efectos secundarios y un bajo nivel de tolerancia en muchos pacientes (Neukam, 2009; Fried 2004). En los últimos años han sido aprobados dos fármacos telaprevir y boceprevir, y aunque se trata de dos fármacos muy efectivos, las resistencias en monoterapia aparecen apenas 10 días después del inicio del tratamiento, con lo que es necesaria su administración junto con el interferón y la ribavirina (Shang, 2013). La efectividad de este tratamiento oscila según el genotipo del virus (hay 6 diferentes), pero está lejos de ser la deseada para la gran mayoría de los casos.

Existe, por lo tanto, una necesidad imperiosa de desarrollar nuevos tratamientos más eficaces, mejor tolerados, y aplicables a la mayor parte de los enfermos infectados. Para abordar el problema, en este trabajo se propone la utilización de nanopartículas (NPs) como vehículos portadores de potenciales compuestos antivirales (OAVs), previamente caracterizados en trabajos anteriores.

La idea es conjugar estos OAVs con ciclodextrinas (CDx) que posteriormente se utilizarán para funcionalizar las nanopartículas con estos complejos.

El trabajo descrito a continuación se enmarca dentro de un proyecto FIS que lleva por título "Nanopartículas multifuncionales para el transporte y liberación selectiva de fármacos frente al virus de la hepatitis C (VHC)". El trabajo consta de dos bloques, por un lado, estudiar la captación de las nanopartículas por células en cultivo, y por otro lado, estudiar la interacción entre los compuestos antivirales y las ciclodextrinas y evaluar la actividad antiviral de los mismos antes y después de haberse formado dicho complejo. El siguiente paso natural, en un futuro, sería proceder a la funcionalización de las nanopartículas con los complejos estudiados que hayan resultado tener una actividad antiviral satisfactoria.

Nanopartículas (NPs)

En Biomedicina las nanopartículas (NP) representan una tecnología prometedora para el transporte y liberación de fármacos. Utilizando las amplias posibilidades de funcionalización que nos ofrece la superficie de las NP se puede pensar en diferentes estrategias de inclusión de fármacos en ellas de forma que los dirijan preferentemente al lugar donde ejercen su acción. Estas NP pueden ser funcionalizadas con diferentes biomoléculas: anticuerpos, péptidos, RNA, DNA y carbohidratos entre otros.

Durante esta última década, el uso de NP inorgánicas como sistemas liberadores de fármacos y como marcadores moleculares se ha consolidado como una estrategia válida e interesante (Xu, 2006).

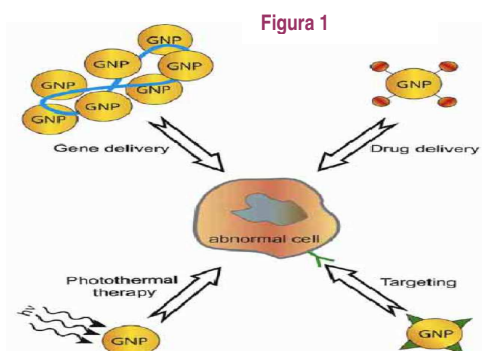


Figura 1: Esquema de las posibilidades de tratamiento con AuNPs.

En este trabajo vamos a utilizar nanopartículas de oro (AuNP), que se están considerando un candidato muy atractivo para la liberación de diferentes fármacos en sus lugares de acción terapéutica (Paciotti 2004, Paciotti 2006). Las moléculas que portan pueden ser desde pequeñas moléculas de fármaco hasta biomoléculas de gran tamaño como proteínas, DNA o RNA. Las AuNPs tienen unas propiedades físico-químicas únicas para el transporte y liberación de fármacos. Primero, el core de oro es inerte y no es tóxico (Connor 2005); segundo, son baratas de fabricar, fáciles de sintetizar y funcionalizar; y tercero, su tamaño oscila entre 1-150 nm. Estos sistemas de liberación de fármacos proporcionan ventajas sobre el fármaco libre al mejorar la solubilidad, su estabilidad *in vivo*, su biodistribución o mejorando en algún caso su farmacocinética desfavorable. Incluso, dada la alta carga de fármaco que pueden llevar estos sistemas, se pueden utilizar como reservorios para una liberación controlada del fármaco, manteniendo el nivel del mismo dentro de la ventana terapéutica (Gibson 2007).

Típicamente, los preparados químicos en solución de las AuNPs se llevan a cabo en presencia de agentes estabilizantes tiol (“capping molecules” o moléculas terminadoras de cadena) dado que la química del tiol es el método más popular por el que los ligandos se unen a la superficie de oro. Este “capping” o terminación conduce a la estabilización y limitación impidiendo el crecimiento descontrolado y la agregación de las AuNPs. (Mandal 2005). Por lo tanto, en un procedimiento de una sola etapa, sin necesidad de altas temperaturas de reacción, es posible obtener AuNPs monodispersas con grupos químicos en la superficie diferentes según la funcionalidad de la “capping molecule” seleccionada.

Para la aumentar la vehiculización de estas nanopartículas al hígado se puede recubrir su superficie de pequeñas moléculas como glucosa y otros azúcares (Barrientos, 2003; De la Fuente, 2006). En este trabajo compararemos la entrada de dos tipos diferentes de nanopartículas, unas con su superficie bloqueada con Tris (AuNPTris) y otras funcionalizadas con galactosa (AuNPGal).

Virus de la hepatitis C (VHC)

Estructura y genoma del VHC

El virus de la hepatitis C es un virus envuelto perteneciente a la familia Flaviviridae, género Hepacivirus, con genoma de ARN monocatenario de polaridad positiva. La partícula vírica tiene un tamaño de 40-70 nm de diámetro, de simetría helicoidal y presenta una envoltura lipídica de doble capa, que envuelve la nucleocápsida.

Su genoma de 9,6 kb, está constituido por dos regiones no codificantes (NCR) en cada uno de los extremos, y un único marco de lectura (ORF) que da lugar a una poliproteína de unos 3000 aminoácidos. Una vez es procesada la poliproteína, se obtienen tres proteínas estructurales (core, E1 y E2) y siete proteínas no estructurales (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B). (Figura 2)

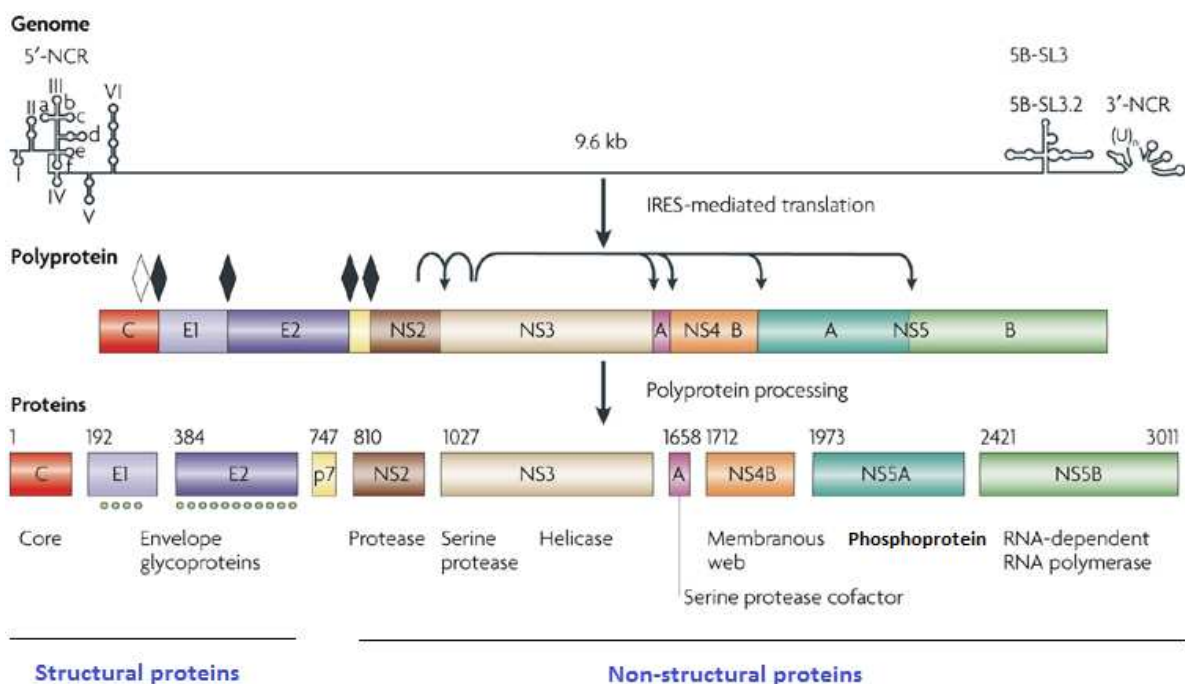


Figura 2.- Estructura del genoma del virus de la hepatitis C (VHC). La poliproteína es segmentada por las proteasas virales y del hospedador para dar origen a las proteínas virales estructurales (core, E1 y E2) y las proteínas no estructurales NS2 a NS5B.

El extremo 5'-NCR del genoma está muy conservado entre los distintos genotipos aislados del virus y presenta un lugar interno de entrada del ribosoma (IRES), que es esencial para la traducción independiente de Cap. Está compuesto por 4 dominios, que se designan de I a IV siendo los dominios I y II, esenciales para la replicación.

El extremo 3'-NCR consta de una región corta variable (poli U/UC con unos 80 nucleótidos) y una región casi invariable de 98 nucleótidos llamada cola X. Los elementos conservados son también esenciales para la replicación *in vitro* e *in vivo*.

A continuación se explican brevemente las funciones de las proteínas virales que constituyen el genoma del virus:

- Proteína core: es la que forma la nucleocápsida. Podría tener un papel importante en la replicación y en la morfogénesis de VHC. Interacciona con gotas lipídicas, y esto podría afectar al metabolismo de los lípidos, ocasionando el desarrollo de esteatosis hepática, frecuente en pacientes con Hepatitis C.
- Proteínas de envuelta E1 y E2: están glicosiladas y forman un complejo no covalente que sería la unidad que forma la envoltura. Junto al core son los principales componentes de la partícula vírica. Estas dos proteínas se anclan a la envoltura lipídica que rodea la nucleocápsida e interaccionan con los glucosaminoglucanos de la membrana celular, participando en la unión inicial del virus al hepatocito, que es su principal célula diana. Los dominios transmembrana de E1 y E2, localizados en el extremo C-terminal, están implicados en la heterodimerización y tienen propiedades de retención del retículo endoplásmico.
- Proteína p7: es un polipéptido de 63 aminoácidos esencial para la infección productiva *in vivo*. Forma oligómeros y tiene actividad de canal catiónico, por lo que es muy posible que pertenezca a la familia de las viroporinas, con un papel muy importante en la maduración y liberación del virus. Podría ser una buena diana antiviral.
- NS2-3: es una cisteín-proteasa que corta entre las proteínas NS2 y NS3 durante el procesamiento de la poliproteína. Es esencial para que haya replicación *in vitro* e *in vivo*. La actividad catalítica reside en la mitad C-terminal de NS2 y el tercio N-terminal de NS3. Como todas las proteínas de VHC, se asocia con membranas intracelulares.

- NS4B: es una proteína de 27 kD que induce la formación de la red membranosa, pero su función no se conoce muy bien. La red membranosa (también llamada complejo replicativo) es una estructura que se forma durante la replicación del virus, compuesta por membranas del retículo endoplásmico y gotas lipídicas, donde el ARN viral se amplifica.
- NS5A: es una fosfoproteína que puede encontrarse en dos formas, basalmente fosforilada o hiperfosforilada. Probablemente el estado de fosforilación modula la eficiencia de la replicación.
- NS5B: es la ARN polimerasa-ARN dependiente (RdRp), es otra de las principales dianas antivirales.
- NS3/4A: NS3 es una proteína fundamental para el ciclo de replicación del virus. Presenta un dominio con actividad serín-proteasa y otro que actúa como helicasa. El dominio C-terminal presenta actividad ARN helicasa/NTPasa, desenrollando el molde de RNA durante la replicación del genoma y el dominio N-terminal posee actividad serina-proteasa, implicado en el procesamiento de la región codificadora de proteínas no estructurales. Una proteína viral accesoria, NS4A, actúa como cofactor de NS3 y regula alostéricamente la actividad enzimática uniéndose a la proteasa en la región N-terminal, provocando un cambio conformacional que reorganiza y reestructura el dominio N-terminal de NS3. Dicho cambio conformacional sitúa los tres residuos catalíticos (Asp81-His57-Ser139) en la configuración óptima, de modo que la eficiencia catalítica aumenta enormemente, provocando que el sitio activo de NS3 esté muy expuesto al solvente (Manzanares, 2011).

Además se ha identificado un marco de lectura alternativo en la región codificante de la proteína core, llamado ARF, en el genotipo 1a, que tiene el potencial de codificar una proteína de hasta 160 aminoácidos denominada ARFP o proteína F. En pacientes con Hepatitis C se han detectado anticuerpos y linfocitos T específicos de la proteína F, lo que sugiere que esta proteína se expresa durante la

infección del virus. Sin embargo, no es necesaria para la replicación *in vivo* o *in vitro*. Todavía se desconoce su función.

Ciclo de replicación del VHC

El virus puede circular en varias formas, es capaz de unirse a lipoproteínas de baja densidad (LDL) y de muy baja densidad (VLDL), lo cual le facilita la entrada a la célula, utilizando los receptores para estas lipoproteínas (Agnello, 1999) o circular como virión (unido a inmunoglobulinas o libre).

El VHC infecta únicamente a humanos y chimpancés, siendo los hepatocitos su principal célula diana. Pero, también puede infectar a linfocitos B, células dendríticas y otros tipos celulares, a través de diferentes receptores como CD81 (presente en la superficie de muchas células, incluidas los hepatocitos), el receptor LDL (LDLR) o el receptor de fagocito clase B tipo I (SR-BI).

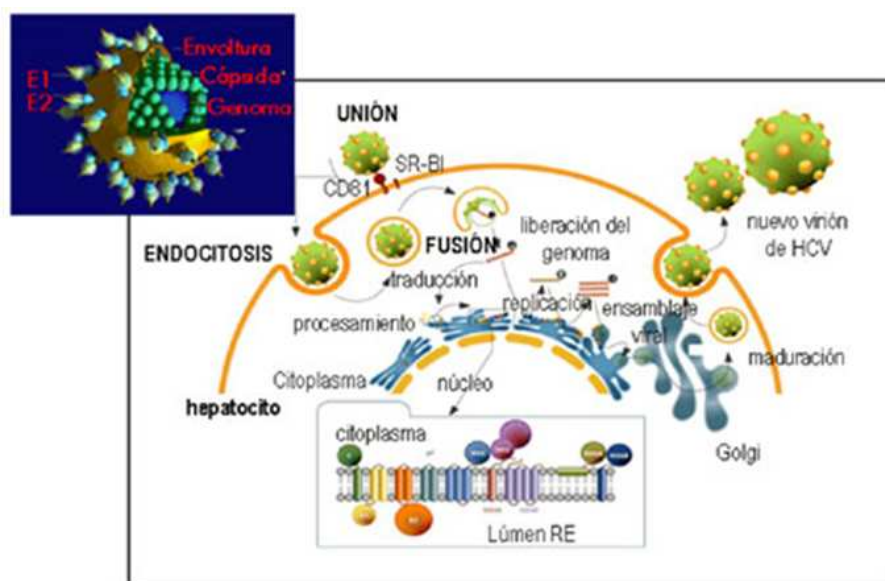


Figura 3: Dibujo de como se produce la infección y la replicación del VHC en el interior celular.

Tanto CD81 como SR-BI son capaces de unir a E2, y son necesarios pero no suficientes para la entrada de VHC, lo que sugiere que se requieren otros factores específicos de hepatocitos para la entrada del virus.

La claudina-1 se ha identificado como co-receptor, siendo esencial para la entrada de VHC en los hepatocitos y convierte a determinadas células no hepáticas,

en susceptibles a la infección. Actúa en una fase tardía del proceso de entrada, después de la unión e interacción de VHC con CD81.

De esta forma, la internalización del virus es un proceso de endocitosis mediado por clatrina. Después, el virus queda englobado en un endosoma, donde el posterior descenso del pH da lugar a un cambio conformacional en las glicoproteínas del virus (Manzanares, 2011), que provoca la fusión de la membrana viral con la membrana del endosoma, liberándose la partícula viral desnuda al interior del hepatocito.

El RNA vírico es traducido por los ribosomas, lo que da lugar a la síntesis de una poliproteína de gran tamaño, que tras ser procesada por las proteasas víricas y del propio hepatocito da lugar a todo el compendio de proteínas víricas descrito anteriormente en el apartado anterior y que permite la síntesis de nuevos viriones infectivos.

Una vez sintetizadas, algunas de estas proteínas víricas forman el replisoma, complejo que tiene como función la replicación del genoma vírico. Primero se forma una copia de la cadena antisentido del RNA viral, que posteriormente se utiliza como molde para la síntesis de más RNA viral. Llegados este punto, las nuevas copias de RNA viral pueden ser traducidas de nuevo, o bien se puede producir el ensamblaje de la cápsida alrededor suyo dando lugar a nuevas partículas virales (Bartenschlager, 2010). El ensamblaje se produce en el retículo endoplásmico donde se produce la interacción core-NS5A, la señal necesaria para el inicio del proceso de formación de la nucleocápsida, que más tarde son transportadas y liberadas por exocitosis, obteniendo su envuelta de la membrana plasmática de la célula infectada.

Si algo caracteriza al VHC es su alta tasa de variabilidad genética, fruto de la rápida replicación del virus y la elevada tasa de error de la RNA polimerasa, que no posee actividad correctora de errores. La región más variable del genoma vírico es la que codifica las lipoproteínas de la cubierta viral, E1 y E2, y las proteínas NS4B y NS5A.

El tratamiento actual con Interferón α -pegilado (IFN-PEG) combinado con Ribavirina suprime la transcripción y la traducción del RNA, activando la transcripción de genes que participan en la respuesta antiviral.

Sistema replicon

El “sistema replicon” (HCV replicon system) mimetiza el ciclo de replicación del virus y vamos a transfectar células con él para obtener una línea celular que simule una infección por VHC, sin los problemas de bioseguridad de infectar cultivos celulares con partículas víricas viables (Bartenschlager, 2002; Lohmann, 2009). El sistema replicón posee parte del genoma del virus (desde la región codificante de NS3 hasta la región NRT3[´]) imprescindible para la replicación (NS3 proteasa, NS3 helicasa y NS5B RdRp) y al mismo tiempo, un sistema de selección compuesto por un gen reportero, la luciferasa de luciérnaga (*Photinuspyralis*) y un gen de selección, el gen de la neomicina fosfotransferasa (neo), que confiere resistencia a geneticina o G418. Además este sistema también contiene la región NRT 5[´] del virus de la encefalomiocarditis (EMCV) y un sitio interno de unión al ribosoma (IRES).

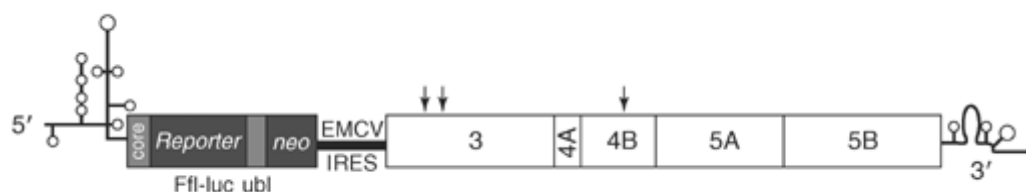


Figura 4- Esquema descriptivo de la estructura del replicon VHC.

Se transfecta la línea celular hepática humana Lunet (células de hepatocarcinoma), que son seleccionadas positivamente en medio de cultivo con G418. De esta manera, se obtiene un modelo celular que simula la infección por el VHC, permitiendo testar y cuantificar el efecto antiviral producido por los compuestos estudiados, ya que, los efectos producidos sobre el sistema replicón, son equivalentes a la inhibición de la replicación del virus in vivo. (Vrolijk, 2003).

Compuestos antivirales (OAVs)

Principalmente se están desarrollando compuestos dirigidos a detener el ciclo replicativo del VHC, interfiriendo el proceso infeccioso. La proteasa NS3, implicada en la maduración de la poliproteína, se ha revelado como una de las principales dianas terapéuticas para abordar el tratamiento de las infecciones por VHC (Kieffer, 2010).

La estructura de NS3 depende de un ión de zinc, coordinado con tres residuos de cisteína y una histidina en el dominio C-terminal de la región proteasa, que resulta esencial para su actividad proteolítica, estabilizando su conformación. Al eliminarlo, la proteína pierde dicha conformación y se vuelve inactiva (Abián, 2010; Abián, 2009). Esto es lo que hace de esta proteasa una potencial y esperanzadora diana terapéutica (posibles fármacos), inhibidores competitivos o alostéricos del enzima podrían impedir su acción catalítica y actuar como antivirales específicos. Sin embargo, en el desarrollo de nuevos tratamientos no debe pasarse por alto la elevada tasa de variabilidad genética que caracteriza a este virus, ya que partículas virales genéticamente distintas, pueden escapar al efecto del inhibidor y generar resistencia al tratamiento (Bermúdez, 2008).

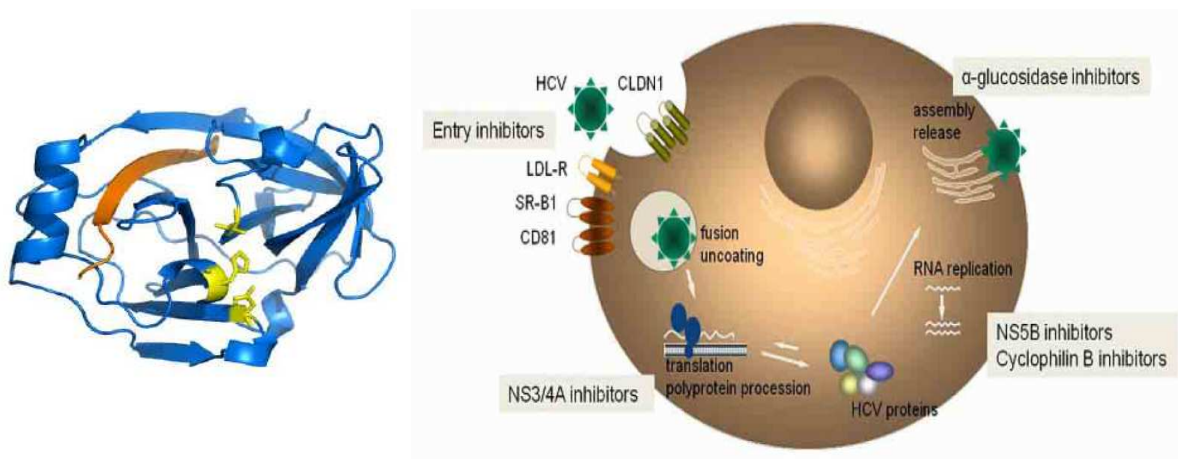


Figura 5.- Izquierda: Estructura de la proteasa NS3. Derecha; Esquema del ciclo de infección del VHC y posibles puntos donde interferirlo.

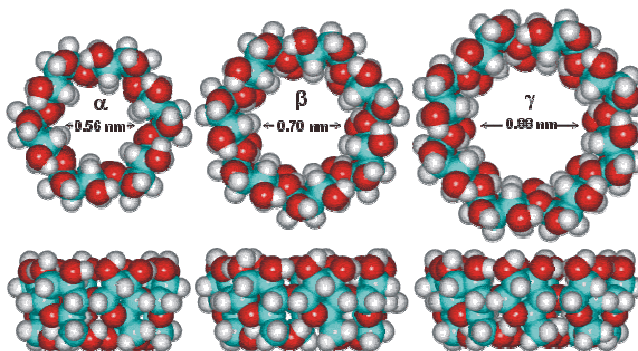
Tras la puesta a punto de la expresión y la purificación de esta proteína, se realizaron ensayos *in vitro*, haciendo un screening experimental masivo que permitiera identificar compuestos capaces de inhibir esta proteasa. Los compuestos antivirales OAVs objeto del presente estudio, han demostrado ser capaces de inhibir *in vitro* la proteasa NS3, con lo que a fin de comprobar si estos compuestos ejercen el mismo efecto *in vivo se van a realizar* estudios de viabilidad celular y de inhibición de la replicación del virus (potencia antiviral). Al mismo tiempo también se estudiará si su conjugación con CDy aumenta, disminuye, o no tiene influencia, sobre su acción antiviral.

Ciclodextrinas (CDx)

Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos de unidades de D-(glucopiranosas) obtenidas de la degradación del almidón por la acción de enzimas producidas por *Bacillus macerans*. Están formados por unidades de α -D-[1,4] glucosa que dan lugar a una estructura molecular en forma de cono truncado, rígida y con una cavidad interior de volumen específico. Dicho volumen varía según el tipo de ciclodextrina, de igual modo que varía el número de moléculas de glucosa que las forman, 6 (α), 7 (β) u 8 (γ).

En la parte externa están localizados los grupos hidroxilo primarios en posición 6 en el lado más estrecho, y los grupos hidroxilo secundarios en el lado más ancho de la estructura, por esto son hidrófilas y solubles tanto en agua como en disolventes polares, como el DMSO. Por lo tanto, su superficie es hidrofílica y la cavidad interior es lipofílica (hidrofóbica). Esto hace que la interacción más probable se dé entre la región más apolar del compuesto y la región interna de la ciclodextrina, quedando la parte más polar y frecuentemente cargada hacia el solvente, aumentando así, la solubilidad de moléculas poco solubles en agua, sin producir modificación química alguna en la molécula huésped, al no establecerse ningún enlace covalente durante la interacción ciclodextrina-molécula (Martinez, 2007).

Figura 6.- Estructura de las ciclodextrinas alfa, beta y gamma.



De este modo, las ciclodextrinas se van a usar como

“cestas portadoras”, para aumentar la solubilidad de moléculas poco solubles en agua sin la necesidad de utilizar cosolventes, surfactantes o agentes formadores de complejos y son una alternativa en el desarrollo de las formulaciones de diferentes fármacos (Loftsson, 2005). Incluiremos los compuestos antivirales a estudio (OAVs) en el interior de CD γ , comprobándose de esta manera, si la formación de complejos entre la ciclodextrina y los mismos facilita su entrada al interior de la célula infectada y su acción antiviral.

OBJETIVOS

1) Estudiar el comportamiento de dos tipos de nanopartículas (AuNPs) utilizando tres tipos celulares diferentes.

a) Diseñar y validar un método de monitorización de la entrada de las AuNPs a las células mediante técnicas espectroscópicas.

b) Cuantificar la entrada de las AuNPs a las células mediante citometría de flujo.

c) Determinar la localización celular de las AuNPs por microscopía confocal.

2) Vehicular compuestos (OAVs) con actividad frente a la proteasa NS3 del virus de la hepatitis C (VHC) mediante la formación de complejos con ciclodextrina γ (CD γ).

a) Estudiar la interacción entre OAV-CD γ .

b) Determinar el efecto sobre la replicación viral de los complejos OAV-CD γ .

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos celulares

Tipos celulares

En los ensayos realizados se utilizaron tres tipos celulares diferentes: HeLa, Lunet y Huh 5-2. HeLa es una línea celular de cáncer de cérvix de útero caracterizado por ser muy prolífico y duradero y utilizado como modelo para una gran cantidad de estudios de investigación. Lunet es una línea derivada de cáncer hepático con una morfología y características celulares muy diferentes a HeLa y que utilizaremos como blanco frente a las Huh 5-2, que son Lunet en las que se ha introducido el *sistema replicon*. Estas células contienen dicho sistema que simula la replicación de VHC y permite su selección y la monitorización de la *pseudoreplicación* del VHC, al expresar junto con las proteínas del virus una proteína de fusión de neomicina fosfotransferasa-luciferasa.

Mantenimiento de las células

Las células se mantuvieron en cultivo con DMEM Completo con (Huh 5-2) o sin (HeLa y Lunet) G418 con Rojo Fenol (RF), suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB), Penicilina / Glutamina / Streptavidina, non-esencial amino acids (NEAA) y 500 µg/ml Geneticina (G418) de Invitrogen, en condiciones constantes de temperatura (37°C), 5%CO₂, 95% de aire y 1 atm de presión.

Los medios y soluciones que se van a utilizar se atemperan a 37°C antes de entrar en contacto con las células para no alterar el metabolismo celular, toda manipulación será llevada a cabo en campana de flujo laminar y habiéndose tomado previamente todas las precauciones pertinentes para evitar la contaminación de los cultivos.

Para llevar a cabo el mantenimiento de los cultivos, en primer lugar se retira el medio en el que se encuentran las células, se añade PBS para eliminar los restos celulares, se lava y se añade Tripsina-EDTA 0.05%. Tras incubar durante 5-10 minutos, las células se han desprendido de la placa y se añade medio fresco DMEM completo con o sin G418 con RF. Se resuspenden bien para eliminar los agregados celulares y se pasan a un frasco de cultivo nuevo a la concentración adecuada para su crecimiento óptimo, asegurándose de que las células quedan

bien distribuidas para que crezcan uniformemente en la base del frasco. Se incuban a 37 °C en atmósfera de CO₂.

Obtención de células para la realización de los ensayos

Tanto para los ensayos de monitorización de la entrada de AuNPs como para los estudios de determinación de la actividad antiviral de los complejos CDγ-OAVs, el medio empleado fue DMEN Completo con o sin G418, según el tipo celular y sin RF para que no hubiera interferencias en las medidas de absorbancia y fluorescencia.

Una vez que tenemos las células desprendidas (descrito en el apartado anterior) se diluyen 5 veces el volumen de tripsina con DMEN y se centrifugan 5 minutos a 0,5 rcf. A continuación se elimina el sobrenadante y se resuspende el pellet en medio fresco DMEN sin RF hasta llevarlo a 40 ml y se procede a medir la concentración (Scepter® Millipore) que debe de ser en torno a 7x10⁴ células/mL. Para asegurarnos de la buena ejecución del ensayo, es necesario asegurarnos de que las células que estamos sembrando son viables, por lo que confirmamos la viabilidad celular por citometría (Muse Cell Analyzer), disponemos en un eppendorf 40 µL de nuestra suspensión celular con 160 µL del reactivo (Muse Count & Viability Kit) y lo introducimos en el citómetro. Esta suspensión de células se siembra en placas de 96 pocillos (100µl por pocillo, unas 7000 células) utilizando una pipeta multicanal, si se mide luminiscencia (Bright-Glo™ Luciferase Assay System de Promega) o citotoxicidad (Cell Titer 96® AQueous de Promega) las placas de 96 pocillos serán blancas o transparentes respectivamente. Se incuban durante 72 h a 37°C en atmósfera 5% CO₂.

Síntesis y naturaleza de las AuNPs

Las AuNPs se sintetizan mediante la reducción de una sal de oro con un agente reductor (NBH₄ o citrato) en presencia de un agente de recubrimiento orgánico (Templeton, 1999; De la Fuente 2005). La sal de oro se reducirá a oro (0) y se formará una cobertura orgánica de enlaces covalentes oro-tiol, o por interacciones iónicas. La purificación de las AuNPs se realizará mediante diálisis o filtración por centrifugado.

A estas AuNPs se les incorporará un marcador de fluorescencia (TAMRA) que posibilite su seguimiento y otros azúcares para mejorar la biocompatibilidad

(Barrientos, 2003). Se dispuso de dos tipos de AuNPs diferentes: bloqueadas con TRIS, AuNPs TRIS, y funcionalizadas con galactosa, AuNPs GAL. Las AuNPs utilizadas en este trabajo fueron proporcionadas por Valeria Grazú del grupo de Jesús Martínez de la Fuente del Instituto de Nanociencia de Aragón (INA). La metodología detallada para la síntesis de las AuNPs está recogida en la bibliografía proporcionada.

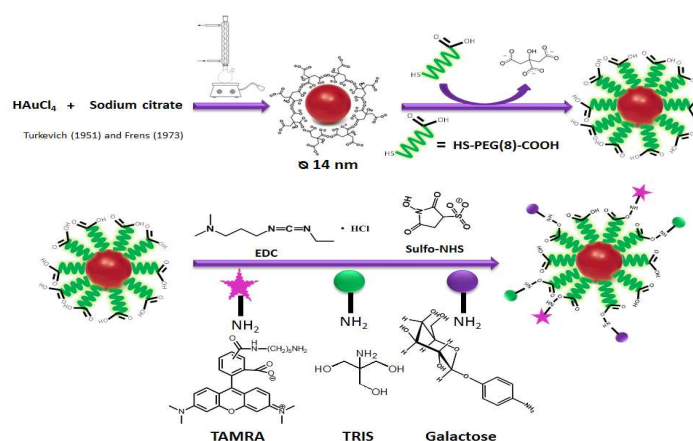


Figura 7.- Esquema-resumen de los pasos de la síntesis de AuNPs

Monitorización de la entrada de las AuNPs por espectroscopía

Preparación de las diluciones de AuNPs

El primer paso es esterilizar las AuNPs, esto lo hacemos a través de un sistema de filtrado empleando un filtro de 0,22 µm de tamaño de poro y una jeringuilla de 1ml, todo ello en campana de flujo laminar y depositando las AuNPs resultantes en un eppendorf estéril y opaco para que la luz no afecte a la fluorescencia de las AuNPs.

Tras la esterilización, el siguiente paso es determinar la concentración de las AuNPs estériles. La determinación de la concentración se realizó por espectroscopía utilizando el equipo Nanovue plus, que presenta la ventaja de que necesita una cantidad mínima de muestra, unos 4 µl. Para la determinación de la concentración se midió la absorbancia a 520nm, λ a la que se conoce el coeficiente de extinción molar (ϵ_0) de las AuNPs ($\epsilon_0 = 2,7 \cdot 10^8$ l/cm.M). Aplicando la ley de Beer-Lambert determinamos la concentración.

Ley de Beer-Lambert

$$A = \epsilon \cdot l \cdot C$$

A= Absorbancia

ϵ = Coef. extinción molar (L/cm.M)

l= Paso óptico (cm)

C= Concentración (M/l)

Una vez tenemos la concentración de cada tipo de AuNPs calculamos los volúmenes que necesitamos para preparar una disolución madre de 200 mg/mL de AuNP TRIS/GAL con DMEM completo con o sin G418 (según tipo celular) y sin RF. Después procedemos a la preparación de las demás por diluciones seriadas 1:2, teniendo la consideración de que hay que corregir la proporción de DPBS que lleva la disolución madre, por lo que las diluciones se hacen con DMEM + %DPBS (similar al volumen de AuNPs adicionado, puesto que las AuNPs van suspendidas en DPBS).

Realización del ensayo

En este ensayo vamos se utilizaron los tres tipos celulares: HeLa, Lunet y HuH5-2 con el fin de ver si existían diferencias en los niveles de internalización de las AuNPs en función del tipo celular. En la placa se sembraron aproximadamente 7000 cell/pocillo de los distintos tipos celulares.

Una vez preparadas las disoluciones de los dos tipos de AuNPs añadimos 100 µl de la disolución pertinente a cada pocillo de la placa, tal y como indica el siguiente esquema:

	AuNPs (µg/ml)	HeLa			Control Sin cells	Lunet			Control Sin cells	Huh5-2			Control Sin cells
AuNP TRIS	200	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Orange	Orange	Orange	Orange	Red	Red	Red	Red
	100	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Orange	Orange	Orange	Orange	Red	Red	Red	Red
	50	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Orange	Orange	Orange	Orange	Red	Red	Red	Red
	0	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Orange	Orange	Orange	Orange	Red	Red	Red	Red
AuNP GAL	200	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Orange	Orange	Orange	Orange	Red	Red	Red	Red
	100	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Orange	Orange	Orange	Orange	Red	Red	Red	Red
	50	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Orange	Orange	Orange	Orange	Red	Red	Red	Red
	0	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Orange	Orange	Orange	Orange	Red	Red	Red	Red

Figura 8.- Esquema de la disposición de las diferentes disoluciones en la placa tras el sembrado de las células para la ejecución del ensayo de monitorización de la entrada de AuNPs.

Determinación de la entrada de AuNPs

Las AuNPs están marcadas con TAMRA, un grupo fluorescente cuyo espectro de absorción presenta un pico a 520 nm. En consecuencia, para la monitorización de la entrada de las AuNPs en las células vamos a determinar la concentración de AuNPs presentes en el sobrenadante a diferentes tiempos: 0h, 24h, 48h y 72h.

Se determinaron los espectros de absorción (300-800nm, tomando medidas cada 2 nm) de las muestras a los diferentes tiempos utilizando el Lector Multi-Modal de Microplacas Synergy HT de Biotek (software Gen5™ Data Analysis). Con la finalidad de minimizar errores y evitar problemas asociados al desplazamiento de la línea base, no se determinó la concentración a partir de la absorbancia a una longitud de onda concreta, $\lambda=520\text{nm}$, sino a partir de la diferencia de absorbancia entre el pico y la línea base (para lo que se utilizó la absorbancia a $\lambda=800\text{nm}$).

Una vez calculadas las diferencia de absorbancia entre el máximo del pico y la línea base para todas las muestras, y con el objetivo de minimizar posibles errores experimentales en el pipeteo, preparación de disoluciones... realizamos un ajuste por mínimos cuadrados a partir de los valores obtenidos de los diferentes controles (triplicados) a tiempo 0h, que nos permita establecer la pendiente de la curva de absorbancia frente a concentración teórica de AuNPs. Esto nos permite conocer la concentración real de AuNPs que había en la placa a la hora de comenzar el ensayo.

Tras aplicar esta corrección, el descenso en la diferencia de absorbancia a tiempos cada vez mayores se asocia a un descenso en la concentración de AuNPs en el sobrenadante, y por lo tanto, a la internalización de las mismas en las células. Todas estas medidas se corrigen en base al ajuste por mínimos cuadrados y se comparan con el valor a tiempo 0 para determinar el porcentaje de AuNPs internalizadas. Una vez conocida la concentración de AuNPs a un tiempo "t" también podemos cuantificar la cantidad de AuNPs internalizadas en base a la diferencia con respecto al mismo valor a tiempo 0h. Al conocer el volumen de la muestra y el número aproximado de células (7000 células/pocillo) podemos hacer una estimación de la cantidad de AuNPs internalizadas por célula.

Por último, con el fin de dar solidez y significación estadística a los datos obtenidos, es necesario calcular el error cometido en el tratamiento de los datos, puesto que al hacer triplicados de todas la muestras y utilizar el valor de la media para el tratamiento de datos posterior, va a llevar asociada una desviación y un error que es fundamental conocer. Todo el tratamiento de datos, la estimación del error y el diseño de gráficos se ha realizado utilizando el programa Origin7 (Scientific Graphing and Analysis software).

Monitorización de la entrada y la localización de las AuNPs por microscopía y citometría de flujo.

Con el objetivo de validar el método descrito en el apartado anterior para seguir la internalización de las AuNPs en las células, monitorizamos el mismo proceso por citometría de flujo y microscopía confocal.

La citometría de flujo permite determinar la fluorescencia que presentan las células como resultado de las AuNPs internalizadas, lo que nos permite observar y cuantificar la entrada de las AuNPs en las células. Por otro lado, la microscopía confocal nos proporciona la posibilidad de ver in situ la localización de las AuNPs en el interior de las células, gracias a la fluorescencia del TAMRA (tetrametilrodamina) que poseen las AuNPs, lo que resulta una prueba irrefutable de la internalización de las mismas en las células.

En el caso de ambas técnicas, el primer paso es proceder a la incubación de las células (utilizaremos los 3 tipos celulares mencionados en el apartado cultivos celulares) con las AuNPs, para lo cual será necesario preparar una disolución de AuNPs en medio DMEM completo sin RF y con o sin G418 según el tipo celular. Las disoluciones preparadas tienen una concentración de AuNPs de 0,95 nM y 2 nM. En el caso del ensayo de microscopía se añaden 300 µl de cada disolución en los pocillos correspondientes (placas de 24 pocillos), en el ensayo de citometría se añaden 1000µl de las disoluciones correspondientes en cada pocillo(placas de 12 pocillos) de acuerdo con el esquema que se presenta a continuación: A continuación se incuban a 37°C, 5%CO₂, 95% de aire y 1 atm de presión, durante el tiempo correspondiente, en este caso vamos a analizar la entrada a los 30 min, 4 h y 24 h.

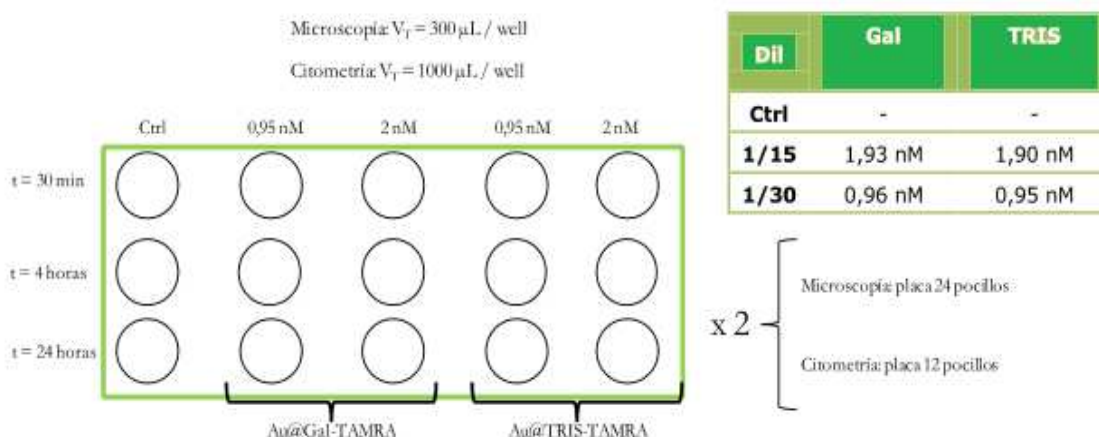


Figura 9.-Esquema de la disposición de las disoluciones ensayadas en la incubación de las células con AuNPs.

Se incuban a 37°C, 5%CO₂, 95% de aire y 1 atm de presión, durante el tiempo al que se quiera estudiar la entrada, en este caso vamos a analizar la entrada a los 30 min, 4 h y 24 h.

En el caso de la citometría de flujo, después de la incubación de las células con las nanopartículas se realizan una serie de lavados con 500 µl de DPBS en 3 ocasiones, se levantan las células de los pocillos donde estaban adheridas utilizando tripsina, siguiendo el protocolo descrito en el apartado cultivos celulares, y se introducen en el citómetro de flujo que nos proporcionará datos de la fluorescencia que presentan las células fruto de la entrada de AuNPs. Puesto que las AuNPs poseen un marcador fluorescente (TAMRA), no es necesario ningún tipo de marcaje.

En cambio, el ensayo de microscopía sí necesita de un marcaje de actina. Tras la incubación se pasan los cubres a una placa nueva y se lleva a cabo el marcaje de la Phalloidina. Se realizan 3 lavados de las células con 500 µl/pocillo de DPBS previamente, antes de la adición de la adición de 500 µl/pocillo de una disolución de PFA () al 3% con la que se incuban las células durante 15 min. Se repiten los lavados con DPBS y un último con 500 µl de DPBS + 10µl de NH₄Cl. A continuación las células se incuban durante una hora con Phalloidina-A488, diluida 1/200 en una solución de DPBS con BSA 1% y Sap 0,1%. Se lava primero con esta misma solución sin Phalloidina, en segundo lugar con DPBS con BSA 1%, y por último, con agua destilada. Finalmente las células ya marcadas se tiñen con DAPI y DRAQ5, utilizando mowiol como medio de montaje y se visualizan al microscopio confocal, pudiéndose distinguir y localizar las AuNPs en el interior de las células.

Las concentraciones de AuNPs con las que trabajamos en este ensayo, unido a la variabilidad interindividual de cada célula en la internalización de las nanopartículas, no permite llevar a cabo una determinación cuantitativa de las AuNPs internalizadas mediante esta técnica de microscopía.

Estudio de la competencia con galactosa

Los ensayos para analizar la posible competencia de la galactosa con las AuNPs a la hora de su internalización en la célula son similares a los realizados para la monitorización de la entrada de las AuNPs por espectroscopía.

La única salvedad es que el medio utilizado para preparar la disolución madre a partir de la cual se realizan las diluciones seriadas contiene una

concentración de galactosa 400mM (DMEM completo sin RF, con o sin G418 según el tipo celular y 400mM de galactosa). Las diluciones seriadas se hacen en proporción 1:4 utilizando el mismo medio sin galactosa, de tal forma que vamos a obtener concentraciones de galactosa de 400mM, 100mM, 25mM y 0mM (control). La galactosa utilizada para este ensayo es galactosa comercial de Sigma.

En este ensayo la concentración de AuNPs va a ser similar para todos los pocillos, 100 µg/ml, puesto que queremos evaluar el efecto de la galactosa en la internalización de las AuNPs. Utilizaremos también como control una columna sin células que permita determinar los niveles de internalización (permite fijar el 0% de internalización, o lo que es lo mismo el 100% de AuNPs en el sobrenadante).

Una vez preparadas las diferentes disoluciones, añadimos 100 µl de la disolución correspondiente a cada pocillo, tal y como indica el esquema recogido a continuación:

	Galactosa (mM)	HeLa			Control Sin cells	Lunet			Control Sin cells	Huh5-2			Control Sin cells
AuNP TRIS (100µg/ml)	400/200*	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Orange	Orange	Orange	Orange	Red	Red	Red	Red
	100	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Orange	Orange	Orange	Orange	Red	Red	Red	Red
	25	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Orange	Orange	Orange	Orange	Red	Red	Red	Red
	0	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Orange	Orange	Orange	Orange	Red	Red	Red	Red
AuNP GAL (100µg/ml)	400/200*	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Orange	Orange	Orange	Orange	Red	Red	Red	Red
	100	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Orange	Orange	Orange	Orange	Red	Red	Red	Red
	25	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Orange	Orange	Orange	Orange	Red	Red	Red	Red
	0	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Orange	Orange	Orange	Orange	Red	Red	Red	Red

Figura 10.- Esquema de la disposición de las diferentes disoluciones en la placa tras el sembrado de las células para la ejecución del ensayo de monitorización de la entrada de AuNPs en competencia con galactosa.

* En un segundo experimento se utilizó como máximo una concentración de 200mM de galactosa, porque en el primero se demostró que una concentración de 400mM de galactosa resultaba tóxica para las células en los tres tipos celulares diferentes.

El seguimiento de la internalización fue similar al explicado anteriormente en el apartado monitorización de la internalización de AuNPs, se tomaron medidas a tiempos 0h, 24h, 48h y 72h, y se procedió a un análisis y procesamiento similar de los datos obtenidos.

Evaluación del metabolismo celular (Cell titter)

Para estudiar la citotoxicidad, tanto de las AuNPs como de los complejos CD γ -OAVs, se determinaron los niveles del metabolismo celular de los cultivos tras 72h mediante el kit Cell Titer 96®AQueous de Promega. Se trata de un método colorimétrico que contiene sales de tetrazolio, MTS (2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfonil)-2H-tetrazolio-5-carbo-anilida). Este método está basado en la escisión de la sal de tetrazolio a formazán en aquellas células metabólicamente activas gracias a la succinato-tetrazolio reductasa (Technical Bulletin CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay). El formazán es un producto coloreado, que puede cuantificarse mediante absorbancia a 490nm en un Lector Multi-Modal de Microplacas Synergy HT de Biotek (software Gen5™ Data Analysis) que informa del número de células metabólicamente activas con respecto a un blanco no tratado.

Transcurridas las 72h de incubación, se añade a cada pocillo 20 μ l de Cell Titer 96®AQueous (1:4) en DMEN completo con o sin G418 (según tipo celular) sin RF, y se incuban 3h a 37°C, 5% CO₂ y 1 atm de presión. Transcurrido este tiempo se procede a medir la absorbancia a 490nm y 800nm (λ a la que no absorbe). La diferencia de estos valores de absorbancia es la que se compara con el blanco para determinar el porcentaje de metabolismo celular de nuestro cultivo, a fin de determinar la citotoxicidad del elemento estudiado.

Monitorización de la formación de complejos CD γ -OAVs por espectroscopía

Valoramos la posibilidad de seguir la formación de los complejos CD γ -OAVs por espectroscopía analizando los posibles desplazamientos y modificaciones que pudieran sufrir los picos característicos de los espectros de los diferentes OAVs al interactuar con la CD γ .

Todas las medidas y espectros descritos a continuación se realizaron con el equipo Cary 100Bio UV-Visible Spectrophotometer Varian.

En primer lugar, se estudiaron los espectros (250-800 nm) de los OAVs a diferentes concentraciones con el fin de ajustar el rango de concentración dentro del cual se podía estudiar las modificaciones del espectro de absorción y no dieran unos niveles de absorbancia exagerados o mínimos que lo impidiera. Se valoraron

rangos de concentración de los OAVs desde 0,01-1 mM, variando dentro de este rango entre unos compuestos y otros.

Después de estudiar el espectro de los diferentes OAVs y determinar el rango de concentraciones a utilizar, se procedió a la formación de los compuestos. Para ello, se dispusieron en un eppendorf 100 μ l de una disolución 10mM de CD γ con el volumen correspondiente de OAVs 20mM para dejarlo a la concentración final deseada, después se midieron los espectros a tiempo 0h, 2h, 24h permitiendo analizar la formación del complejo y la interacción de los dos elementos. Durante el tiempo entre las diferentes medidas las muestras permanecieron en agitación en un roller a temperatura ambiente. Los espectros obtenidos se compararon con el espectro del OAV en ausencia de CD γ previamente caracterizado.

Calorimetría isotérmica de titulación (ITC)

La Calorimetría Isoterma de Titulación es una técnica termodinámica que permite estudiar el calor de interacción entre dos moléculas. Al unirse o disociarse dos moléculas, se libera o se absorbe calor. La medida de este calor hace posible la determinación de las constantes de unión, la estequiometría de reacción y un perfil termodinámico de la reacción que incluye la variación de entalpía (ΔH) y de entropía (ΔS).

En este trabajo se caracterizó el proceso de unión de las CDx y los diferentes compuestos inhibidores de la replicación del VHC, OAVs, adicionando de forma secuencial alícuotas de CD γ 1,8 mM a la celda de reacción que contiene 120 μ M de un tipo de OAV. El equipo utilizado fue el VP-ITC MicroCal. Los volúmenes adicionados en cada uno de los compartimentos del ITC para el estudio de la interacción de todos los OAVs fueron los siguientes:

	Celda	Jeringa	Lavado
PBS	2194 μ L	453,5 μ L	2194 μ L
DMSO	-	1,5 μ L	6,6 μ L
OAVs (20mM)	6,6 μ L	-	-
CD γ (10mM)	-	45 μ L	-

Tabla 1: Volúmenes utilizados en los ensayos de ITC

El lavado debe tener la misma composición a excepción de los elementos que participan en la interacción.

En el transcurso de la titulación, el calor disminuye o incrementa dependiendo de que la reacción de asociación macromolecular sea endotérmica o exotérmica.

La medición directa observable en un experimento de ITC, es la entrada de potencia térmica dependiente del tiempo que se requiere para mantener temperaturas iguales en las celdas de referencia y de muestra. La celda de referencia contiene agua o buffer careciendo de la macromolécula. Durante la inyección de titulante hacia la celda de muestra, se mide el calor liberado o absorbido en la formación del complejo respecto a la celda de referencia. (Pierce, 1999; Freire, 1990).

En el termograma obtenido, cada pico equivale a una inyección de OAVs y es proporcional a la cantidad de calor que interviene en la formación del complejo CDx-OAVs.

Las medidas se llevaron a cabo en un Auto-iTC200 Isothermal Titration Calorimetry (MicroCal, GE Healthcare).

Docking

Las predicciones por docking de la unión de los diferentes OAVs a la CDy se hicieron utilizando el programa CycloPredict, disponible online en el sitio web (<http://interactions.cyclodextrin.net/web>). Este sistema evalúa las diferentes posiciones del ligando y la CDy y determina cual es la interacción más probable y de mínima energía. El programa va girando las moléculas en todas las dimensiones del espacio y cada 0,2 Å analiza los parámetros energéticos de esa interacción teniendo en cuenta múltiples variables como: la naturaleza de los diferentes átomos de las moléculas, las cargas, la movilidad de los enlaces, los parámetros de solvatación, las fuerzas de van del Waals, las fuerzas electrostáticas...

Se extrajeron las formulas moleculares de los distintos OAVs de la base de datos PubChem y se enfrentaron a la CDy mediante CycloPredict.

Determinación de la actividad antiviral de los complejos mediante estudios de bioluminiscencia

Preparación de los complejos CD γ -OAVs y las consiguientes diluciones

En primer lugar, se deben preparar las soluciones Stock de CD γ 200mM en DPBS. A continuación vamos a proceder a la preparación de los complejos CD γ -OAVs, para ello disponemos en un eppendorf 12 μ l de OAVs 20 mM junto con cantidades crecientes de CD γ , de tal forma que tenemos concentraciones finales de CD γ de 0, 50, 100 y 200 mM. Incubamos estos eppendorf a temperatura ambiente y en agitación en un roller durante 24h. Las constantes de afinidad de los estudios de la interacción CD γ -OAVs por ITC permitieron determinar que a 200 mM de CD γ no queda OAV libre y prácticamente todo esta acomplejado.

En las diluciones anteriores la concentración de los complejos y compuesto (cuando no se añaden CD γ) es de 1,2 mM. Hacemos una dilución 1:10 con DMEM completo con G418 y sin RF, necesario para el mantenimiento del cultivo. Finalmente, tenemos una disolución de 90% de DMEM con 120 μ M de complejo o OAVs.

Partiendo de esta Solución Madre, se realizarán diluciones en serie 1:2 (120 μ M, 60 μ M, 30 μ M, 15 μ M, 7.5 μ M, 3.75 μ M, 1.875 μ M y 0 μ M) sobre una solución compuesta por DMEN completo con G418 sin RF, DMSO (al 0,6%, igual que la concentración de DMSO en la solución madre). Esta misma solución utilizada para hacer las diluciones seriadas se emplea como solución control.

Realización del ensayo

Para estos ensayos se va a utilizar solamente un único tipo celular, Huh 5-2, que contiene el sistema replicon que permite el seguimiento de los niveles de replicación del VHC.

Las disoluciones anteriormente preparadas se añadirán en una placa de 96 pocillos blanca. En cada pocillo se siembran aproximadamente 7000 células. Se harán triplicados añadiendo 100 μ l por pocillo de la disolución indicada en el siguiente esquema:

OAVs (μM)	CONTROL (OAVs Sin CDx)			CD γ -OAVs (50 μM CD γ)			CD γ -OAVs (100 μM CD γ)			CD γ -OAVs (200 μM CD γ)		
120												
60												
30												
15												
7.5												
3.75												
1.875												
0												

Figura 11.- Esquema de la disposición de las diferentes disoluciones en placa tras el sembrado de células para la ejecución del ensayo para la determinación de la capacidad antiviral de los complejos.

Determinación de la actividad antiviral

Para la determinación de la actividad antiviral de los OAVs se empleó el kit Bright-Glo™ Luciferase Assay System. Dicha actividad se determina cuantificando la replicación del VHC en las células HUH 5-2 (replicon system cells), las cuales expresan luciferasa (gen reportero) como una proteína de fusión con el gen de la neomicina fosfotransferasa (marcador de selección) que confiere resistencia a geneticina. Si la proteasa (NS3) se expresa se produce luciferasa, que es cuantificada por la emisión de fluorescencia al añadir su sustrato específico, la luciferina, convertida en oxoluciferina en presencia de Mg^{2+} , ATP y oxígeno molecular, siendo la señal proporcional a la cantidad de ARN expresado (Technical Manual Bright-Glo™ Luciferase Assay System).

Una vez transcurridas las 72h de incubación con el complejo CD γ -OAVs, se adiciona a cada pocillo 30 μL Bright-Glo™ Luciferase Assay System de Promega, tras añadir el sustrato se procede a la lectura de la luminiscencia en un Lector Multi-Modal de Microplacas Synergy HT de Biotek (software Gen5™ Data Analysis). La luminiscencia es proporcional a la cantidad de ARN expresado por el gen reportero.

Análisis estadístico

Todas las muestras se hicieron por triplicado para evitar variaciones entre experimentos. El análisis estadístico se realizó utilizando SPSS (Statistical Package for the Social Sciences version 20.0; SPSS, Chicago, IL, USA). Se compararon los niveles de internalización de AuNPs como absorbancia, a diferentes tiempos y concentraciones en los distintos tipos celulares. Las diferencias se examinaron mediante un ANOVA de una vía. La significancia fue fijada al valor de probabilidad $p < 0,05$. Los valores se presentan con la media y su desviación estándar.

RESULTADOS

Estudio de la incorporación de AuNPs en diferentes tipos celulares

Estudio de la incorporación de AuNPs por espectroscopía

1. Relación Abs – Concentración.

Para la determinación y cuantificación de las AuNPs incorporadas se realizó una recta patrón tomando los valores por triplicado a $t=0$ de las diferentes concentraciones de AuNPs. Se hizo una recta patrón por cada AuNPs y cada tipo celular de forma independiente determinando los parámetros (a y b) de la recta ($y = ax + b$) para la cuantificación de las AuNPs presentes en el sobrenadante.

De esta forma, se puede cuantificar la internalización mediante la diferencia entre las medidas a un tiempo determinado con respecto a las medidas a $t=0$. La utilización de estas rectas patrón permite minimizar el error cometido.

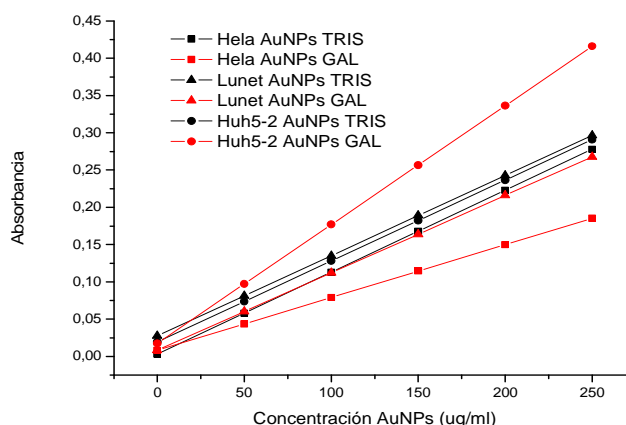


Figura 12.- Representación de las rectas patrón calculadas para la determinación de los niveles de internalización de cada una de las 2 AuNPs en los 3 tipos celulares.

2. Influencia del tipo celular, tipo de AuNPs y concentración de AuNPs ofrecida.

Se evaluó la cantidad de AuNPs internalizadas utilizando diferentes tipos celulares, los dos tipos de nanopartículas: AuNPs TRIS y AuNPs GAL, y diferentes concentraciones iniciales de las mismas ($0\mu\text{g/ml}$, $50\mu\text{g/ml}$, $100\mu\text{g/ml}$ y $200\mu\text{g/ml}$), con la finalidad de determinar si existía alguna diferencia significativa en los niveles de internalización de AuNPs en base a alguno de estos factores.

La determinación de la concentración de AuNPs en cada caso se llevo a cabo empleando las rectas patrón calculadas en el apartado anterior y que relacionan la diferencia entre la absorbancia a $\lambda=520$ y $\lambda=700$, con la concentración de AuNPs.

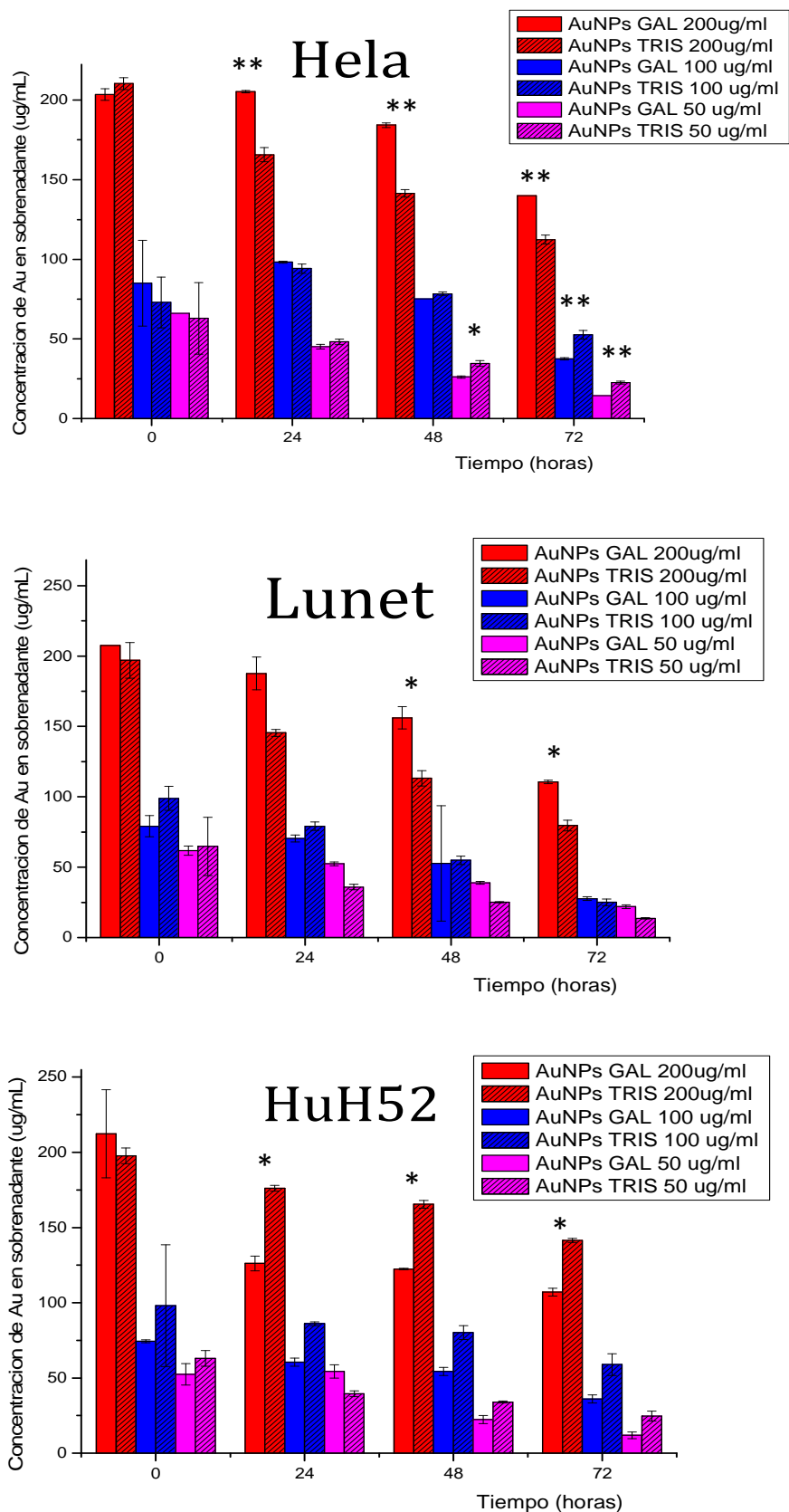


Figura 13.- Representación gráfica de la concentración de AuNPs en el sobrenadante según tipo celular (cada gráfica), según tipo de AuNP (Gal: lisa, Tris:rayada), y según concentración de AuNPs ofrecida (rojo:200 µg/ml, azul:100 µg/ml, morado:50 µg/ml) a lo largo del tiempo (0h, 24h, 48h y 72h). (*) Muestra un cambio significativo con respecto al otro tipo de nanopartícula ($p < 0,05$). (**) ($p < 0,001$).

Posteriormente, se estudió más en detalle los niveles de internalización de AuNPs en cada tipo celular. Se determinaron los niveles de entrada de las nanopartículas calculando la diferencia entre la concentración a t=0 y a los diferentes tiempos. A continuación y a modo de ejemplo se muestran las gráficas referentes a los niveles de internalización en el tipo celular Lunet.

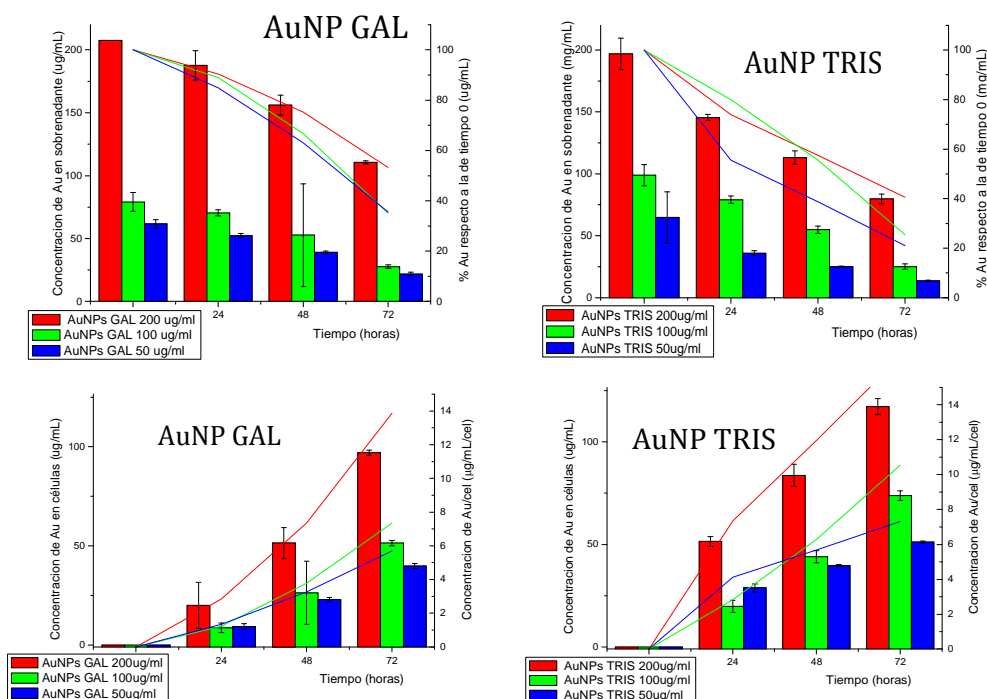


Figura 14.- Arriba. Concentración (µg/ml) de AuNPs en el sobrenadante a diferentes tiempos y diferentes concentraciones iniciales (barras) y el porcentaje de AuNPs que permanece en el sobrenadante (líneas). Abajo. Concentración de AuNPs que ha entrado en las células a diferentes tiempos y concentración de AuNPs (barras) y el número estimado de AuNPs por célula internalizadas (líneas). Este último dato es orientativo, existe una gran variabilidad intercelular en cuanto al número de partículas internalizadas, resulta del cociente entre la concentración de AuNPs internalizadas y las 7000 células que se disponen aproximadamente en cada pocillo.

En la *Tabla 2* se muestran los porcentajes de AuNPs presentes en el sobrenadante a diferentes tiempos según tipo celular, tipo de AuNP y concentración inicial de AuNPs ofrecida.

Tipo celular	Tipo de nano	Tiempo 0			Tiempo 24h			Tiempo 48h			Tiempo 72h		
		200	100	50	200	100	50	200	100	50	200	100	50
HeLa	AuNPGal	100	100	100	100	100	74	91	90	51	71	53	37
	AuNPTris	100	100	100	80	67	82	70	57	66	57	42	52
Lunet	AuNPGal	100	100	100	91	90	88	77	72	70	56	45	48
	AuNPTris	100	100	100	79	86	75	66	70	65	52	50	55
Huh5-2	AuNPGal	100	100	100	63	85	73	61	79	59	55	60	45
	AuNPTris	100	100	100	90	91	77	86	87	72	76	72	63

Tabla 2.- Porcentajes de AuNPs no internalizadas por las células a diferentes tiempos considerando el 100% la concentración de AuNPs presentes en el sobrenadante a t=0.

En la *Tabla 3* se recoge la concentración de AuNPs ($\mu\text{g/ml}$) que han entrado en el interior de las células según tipo celular, tipo de AuNP y concentración inicial de AuNPs ofrecida.

Tipo celular	Tipo de nano	Tiempo 0			Tiempo 24h			Tiempo 48h			Tiempo 72h		
		200	100	50	200	100	50	200	100	50	200	100	50
HeLa	AuNPGal	0	0	0	0	0	21	19	10	40	63	47	52
	AuNPTris	0	0	0	43	54	14	66	69	27	94	94	39
Lunet	AuNPGal	0	0	0	20	9	9	51	26	23	97	51	40
	AuNPTris	0	0	0	51	20	29	84	44	40	117	74	51
Huh5-2	AuNPGal	0	0	0	86	14	20	90	20	30	105	38	40
	AuNPTris	0	0	0	21	12	23	31	18	28	55	38	38

Tabla 3.- Concentración ($\mu\text{g/ml}$) de AuNPs internalizadas por las células a diferentes tiempos.

3. Citotoxicidad de las AuNPs.

Un parámetro muy importante a evaluar para utilizar las AuNPs como un elemento que nos permita vehiculizar los compuestos con actividad antiviral a las células hepáticas es su posible citotoxicidad y los efectos deletéreos que pudieran tener sobre las células.

Con este propósito, tras las 72 h de incubación con las AuNPs se determinaron los niveles de metabolismo celular de las células en cultivo utilizando el kit Cell Titer 96®_{Aqueous}, siguiendo el protocolo recogido en el correspondiente apartado de materiales y métodos.

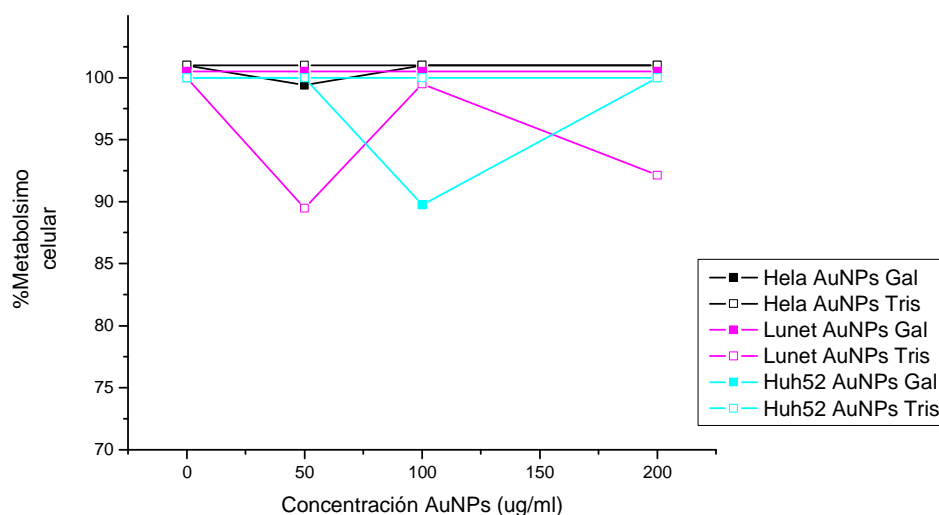


Figura 15.- Porcentaje de metabolismo celular de los diferentes tipos celulares incubados con los dos tipos de AuNPs durante 72 h. Como referencia para determinar el 100% se utilizaron los blancos de los ensayos que se habían tratado de una forma similar pero sin añadir AuNPs.

Estudio de la incorporación de AuNPs por citometría de flujo y su localización celular por microscopía confocal.

A fin de validar el método anterior y verificar la posibilidad de monitorizar la internalización de las AuNPs por espectroscopía, así como también refrendar los resultados obtenidos por este método, se estudió el mismo fenómeno por citometría de flujo. Se compararon los niveles de entrada de ambos tipos de nanopartículas en los 3 tipos celulares.

En primer lugar se evaluó la entrada en células Lunet tras 4 horas de incubación con las AuNPs obteniéndose los siguientes resultados:

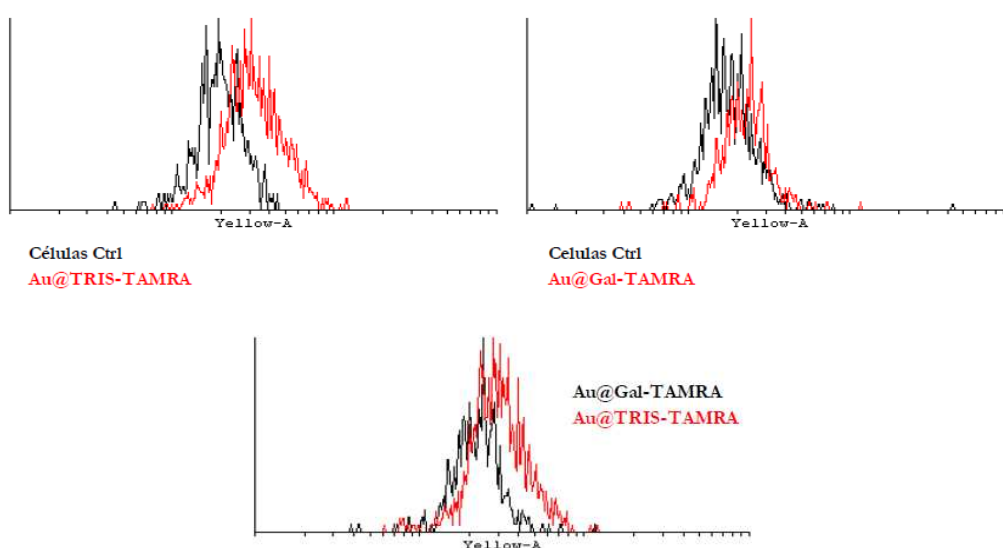


Figura 16: Gráficos de citometría de flujo con células lunet tras incubación durante 4 horas con ambos tipos de AuNPs con respecto a células no incubadas y entre ellas.

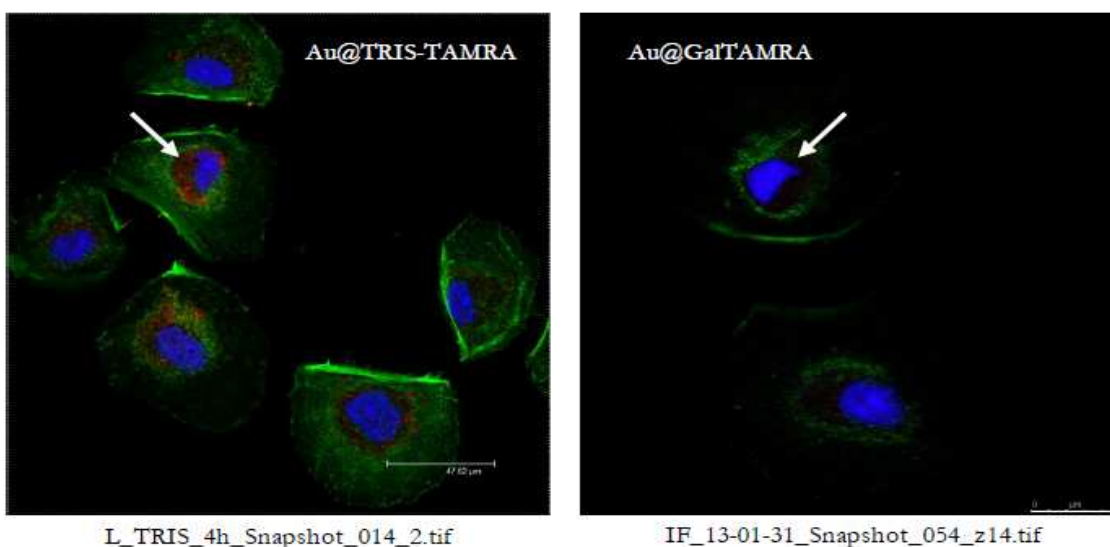


Figura 17: Imagen de microscopía confocal de células lunet tras incubación de 4 horas con AuNPs.

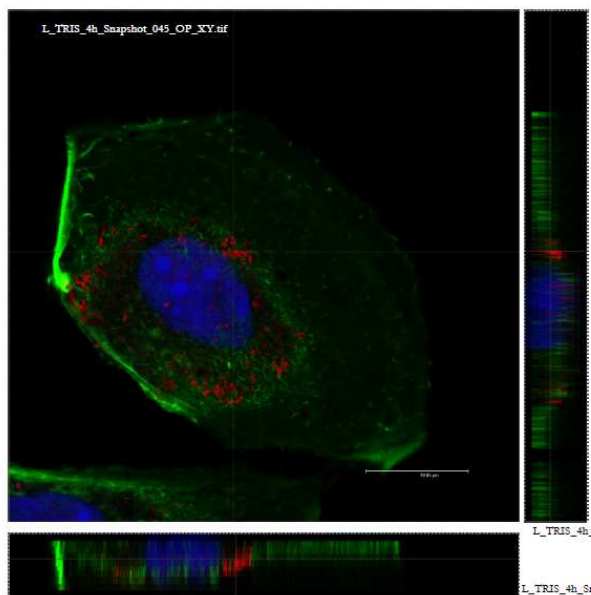


Figura 18: Imagen de una célula lunet que ha incorporado AuNPs. Reconstrucción de ortogonal de un stack en Z de 10 planos diferentes.

En segundo lugar, se siguió la entrada de AuNPs en células HeLa tras 4 horas de incubación, las muestras también se tiñeron y se observaron al microscopio. Las gráficas e imágenes resultantes se muestran a continuación.

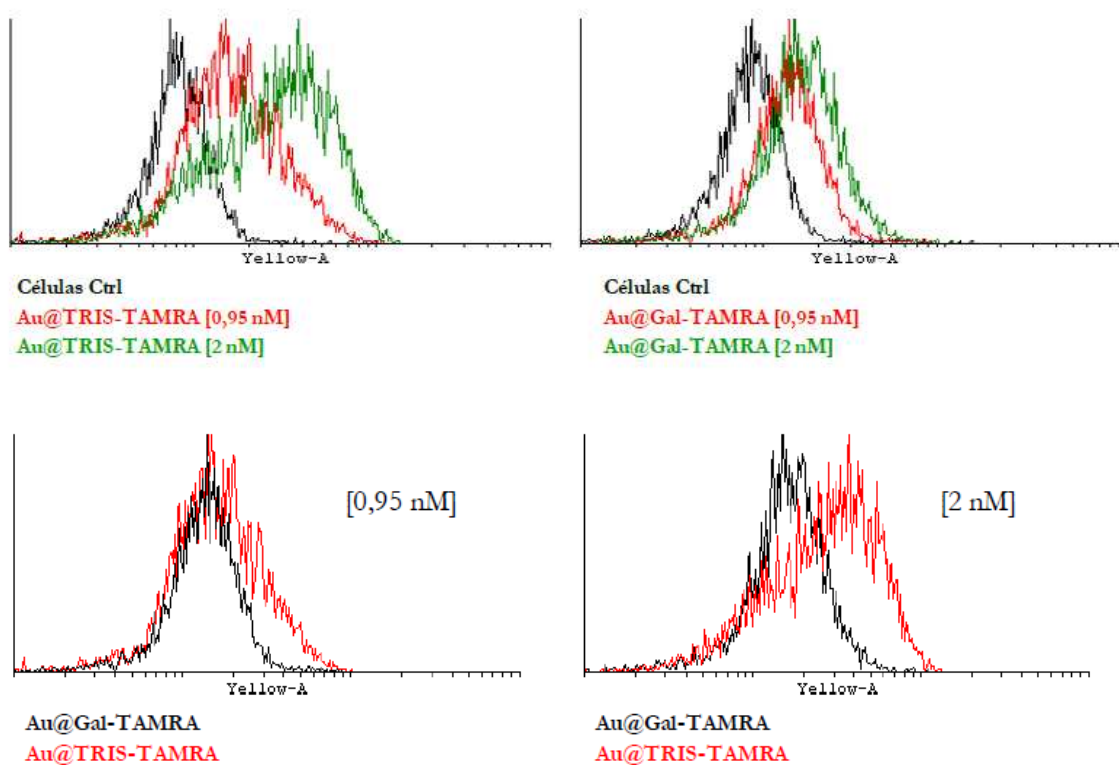


Figura 19: Gráficos de citometría de flujo con células HeLa tras incubación durante 4 horas con ambos tipos de AuNPs con respecto a células no incubadas y entre ellas.

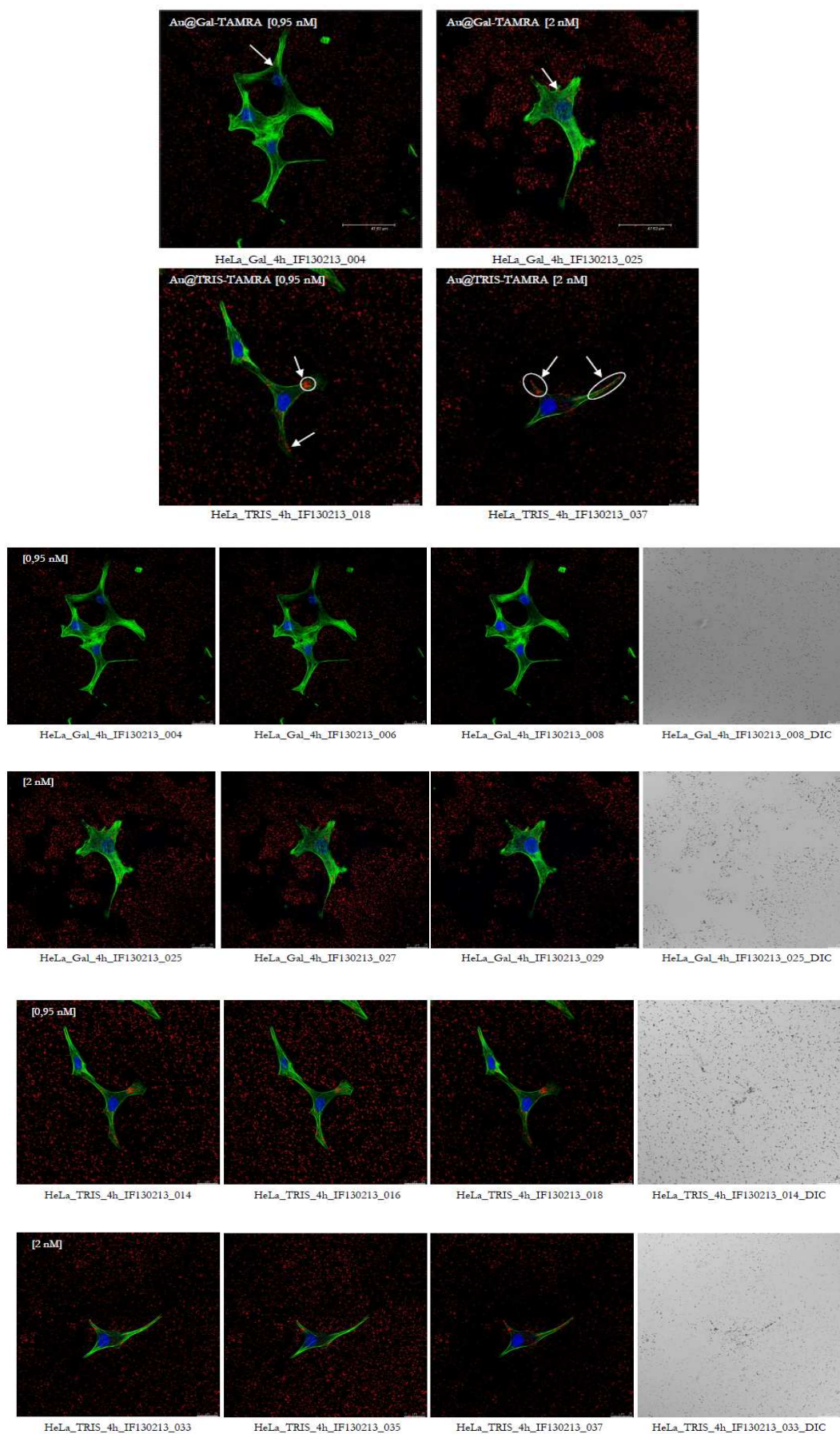


Figura 20.- Imágenes de microscopia confocal de células HeLa tratadas con AuNPs e incubadas durante 4 h.

Por último, se realizaron ensayos con células Huh5-2 para investigar la entrada de AuNPs. Las siguientes imágenes corresponden a dichos ensayos.

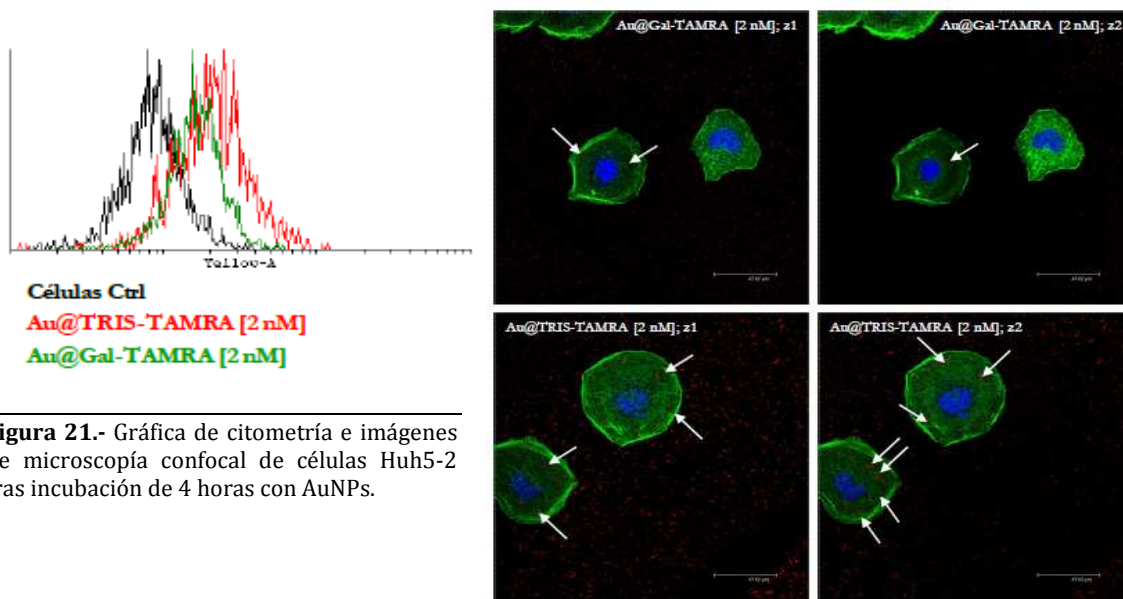
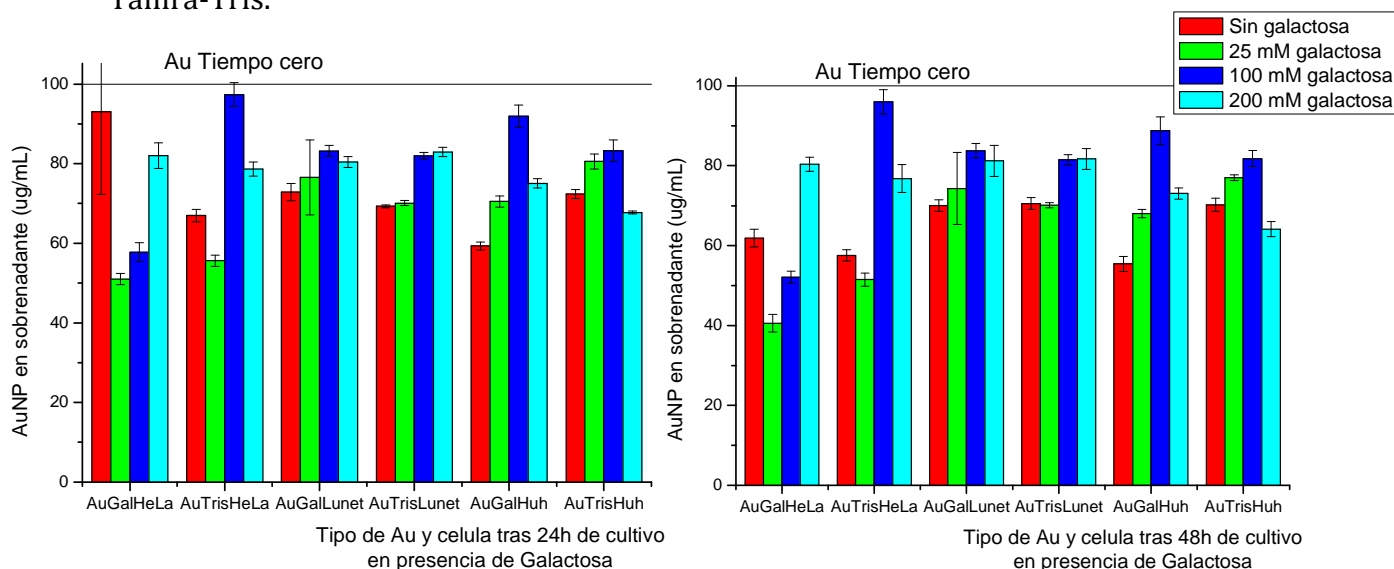


Figura 21.- Gráfica de citometría e imágenes de microscopía confocal de células Huh5-2 tras incubación de 4 horas con AuNPs.

Inhibición de la internalización de las AuNP-GAL en presencia de galactosa

Con el fin de determinar si el mecanismo de entrada de las AuNP-Tamra-Gal a las células es específico a través de sus receptores de galactosa, se procedió a evaluar la entrada de las nanopartículas en las células a una concentración fija de AuNP (100 µg/mL) en presencia de concentraciones crecientes de galactosa (0 mM, 25 mM, 100 mM y 200 mM). Dicha galactosa podría entorpecer la entrada al bloquear los receptores que utilizan las AuNP-Tamra-Gal para entrar a la célula, no siendo así en el caso de las AuNP-Tamra-Tris.



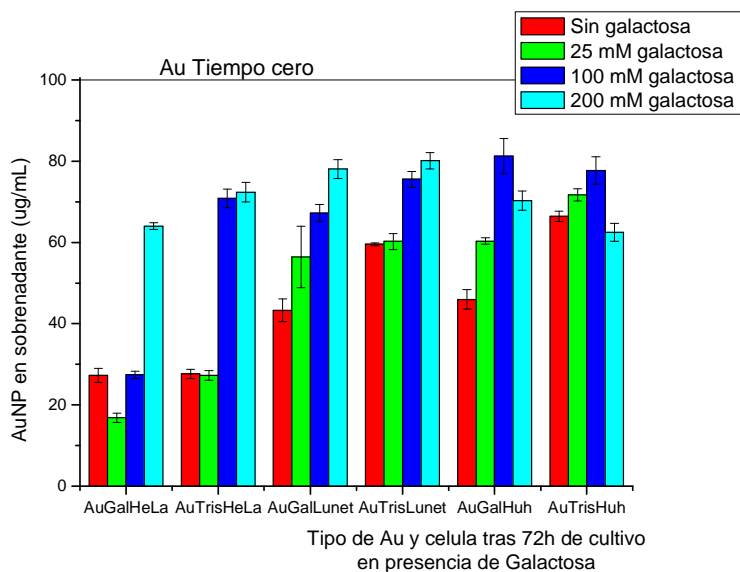


Figura 22.- Cada una de las gráficas recoge la concentración de AuNPs en el sobrenadante con respecto a la inicial a diferentes tiempos. Recogen datos de los tres tipos celulares y las dos AuNP diferentes con distintas concentraciones de galactosa en el medio de cultivo.

Del mismo modo que en el apartado anterior, se descartaron posibles efectos citotóxicos y deletéreos de las concentraciones crecientes de galactosa con el kit Cell Titer 96®AQ_{ueous}. Los resultados obtenidos se recogen en la siguiente gráfica.

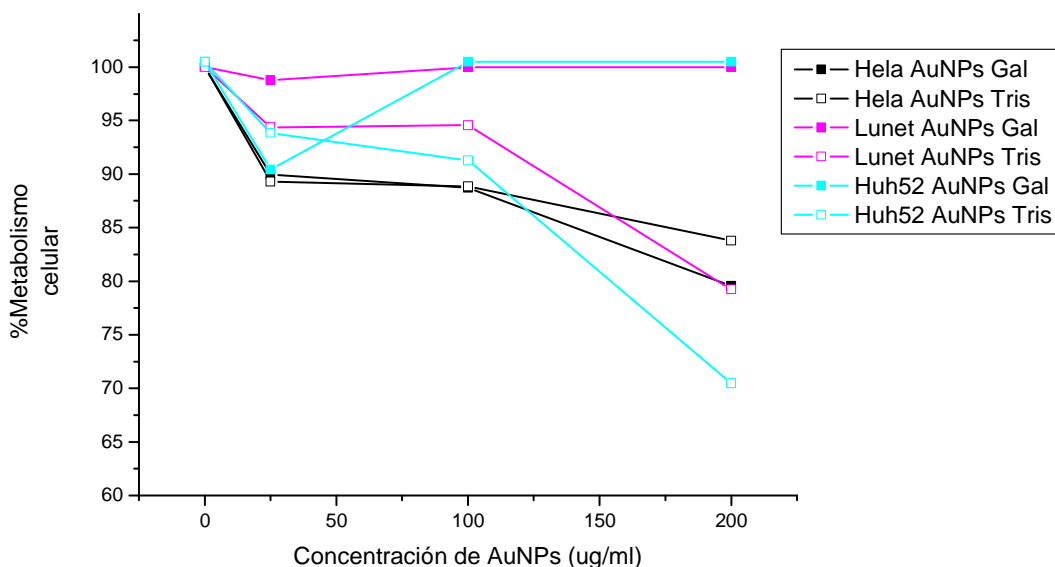


Figura 23.- Porcentaje de metabolismo celular de los diferentes tipos celulares incubados con los dos tipos de AuNPs durante 72 h a concentraciones crecientes de galactosa representadas en el eje X. Como referencia para determinar el 100% se utilizaron los blancos de los ensayos que se habían tratado de una forma similar pero sin añadir galactosa.

Estudio de la interacción CDγ-OAVs y su actividad antiviral en cultivo celular

Monitorización de la formación de complejos por espectroscopia

Se estudiaron los espectros de 250 a 800nm de los OAVs a diferentes concentraciones en ausencia de CDγ y en presencia de la misma, a distintos tiempos, con la finalidad de ver si era posible evaluar la formación del complejo CDγ-OAVs por absorbancia, estudiando las variaciones y desplazamientos que sufrían los picos característicos del espectro.

En este trabajo se evaluó la formación de complejos de 6 compuestos: OAV19, OAV20, OAV27, OAV28, OAV31 y OAV37.

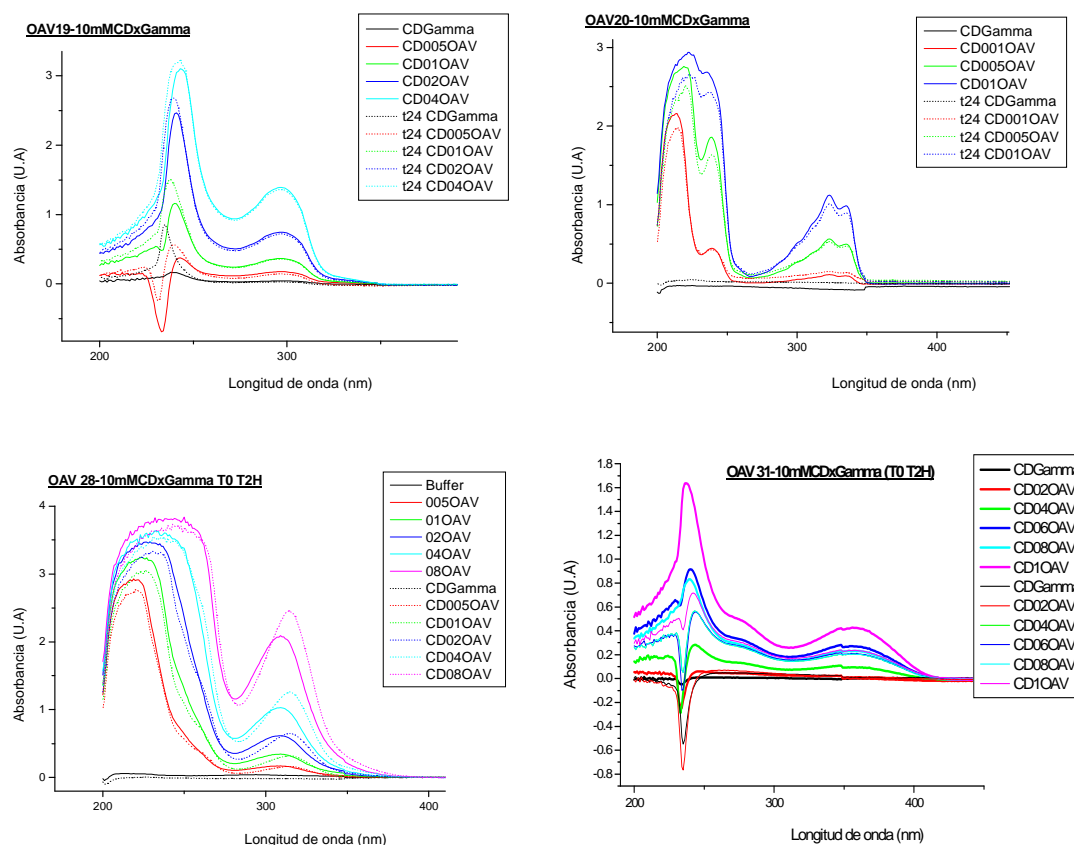


Figura 24.- Espectros (250-800 nm) de los compuestos OAVs a diferentes concentraciones (0,01-1 mM), en ausencia de CDγ, y en presencia de CDγ transcurridas 2 horas de incubación.

Caracterización de la unión CDγ-OAVs mediante ITC

Se monitorizó la formación de los complejos de los 6 OAVs estudiados en este trabajo con CDγ mediante calorimetría isotérmica de titulación (ITC).

A modo de ejemplo se muestran las curvas de titulación obtenidas y ajustadas de los compuestos: OAV19, OAV28 y OAV37.

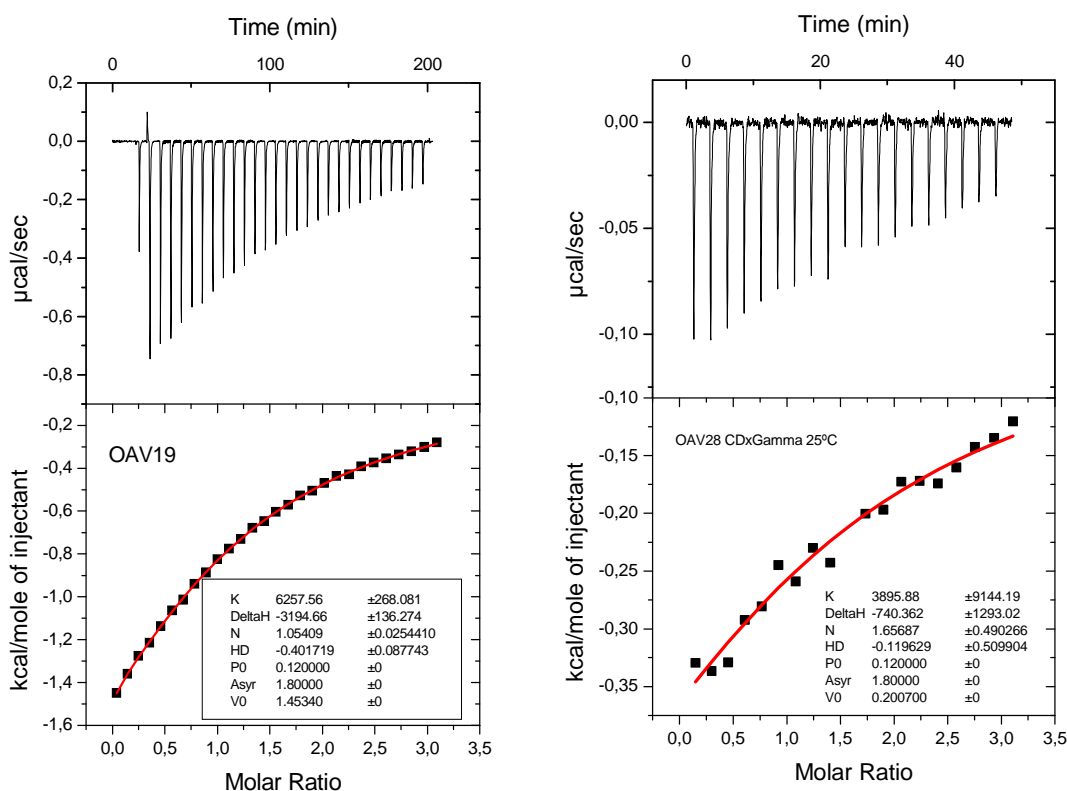


Figura 25.- Gráficas de ITC correspondientes a los compuestos OAV19 y OAV28 con CDy.

En la *Tabla 4* se representan los datos termodinámicos (entalpías de unión y constantes de afinidad) obtenidos una vez realizado el ajuste de las curvas de titulación de los 6 compuestos.

Compuesto	Ka (M ⁻¹)	ΔH (cal/mol)	ΔG (cal/mol)	-TΔS (cal/mol)
OAV19	6257,56	-3194,66	-5387,14	-2192,48
OAV20	5540,25	530	-5312,1	-5842,1
OAV27	nd	nd	nd	nd
OAV28	3895,88	-740	-5095,1	-4355,1
OAV37	5368,46	-2768,23	-5292,69	-2524,46

Nota: Error relativo Ka: 20-25%; Error relativo ΔH: 5-10%.

Tabla 4.- Datos termodinámicos obtenidos tras el ajuste de la curvas de titulación de los experimentos de ITC de los compuestos OAVs con CDy.

Como ya se ha descrito en materiales y métodos, el ITC nos permite determinar de forma directa parámetros termodinámicos de unión como: Ka y ΔH. ΔG se calcula a través de Ka ($\Delta G = -RT \ln K_a$) y -TΔS se calcula mediante la ecuación: $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$.

En la ecuación $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, el término entálpico y entrópico nos proporcionan diferente información, mientras que el término entálpico hace referencia a las interacciones específicas que tienen lugar en el proceso, el término entrópico nos informa de las interacciones no específicas.

De esta forma, para un proceso con ΔG negativo (o sea con energía favorable para que se produzca la interacción), y basándonos en el conocimiento de los parámetros ΔH o $-T\Delta S$, podremos determinar cuál de los dos es el que más contribuye a su valor negativo y qué tipo de interacciones son las que están dirigiendo la interacción.

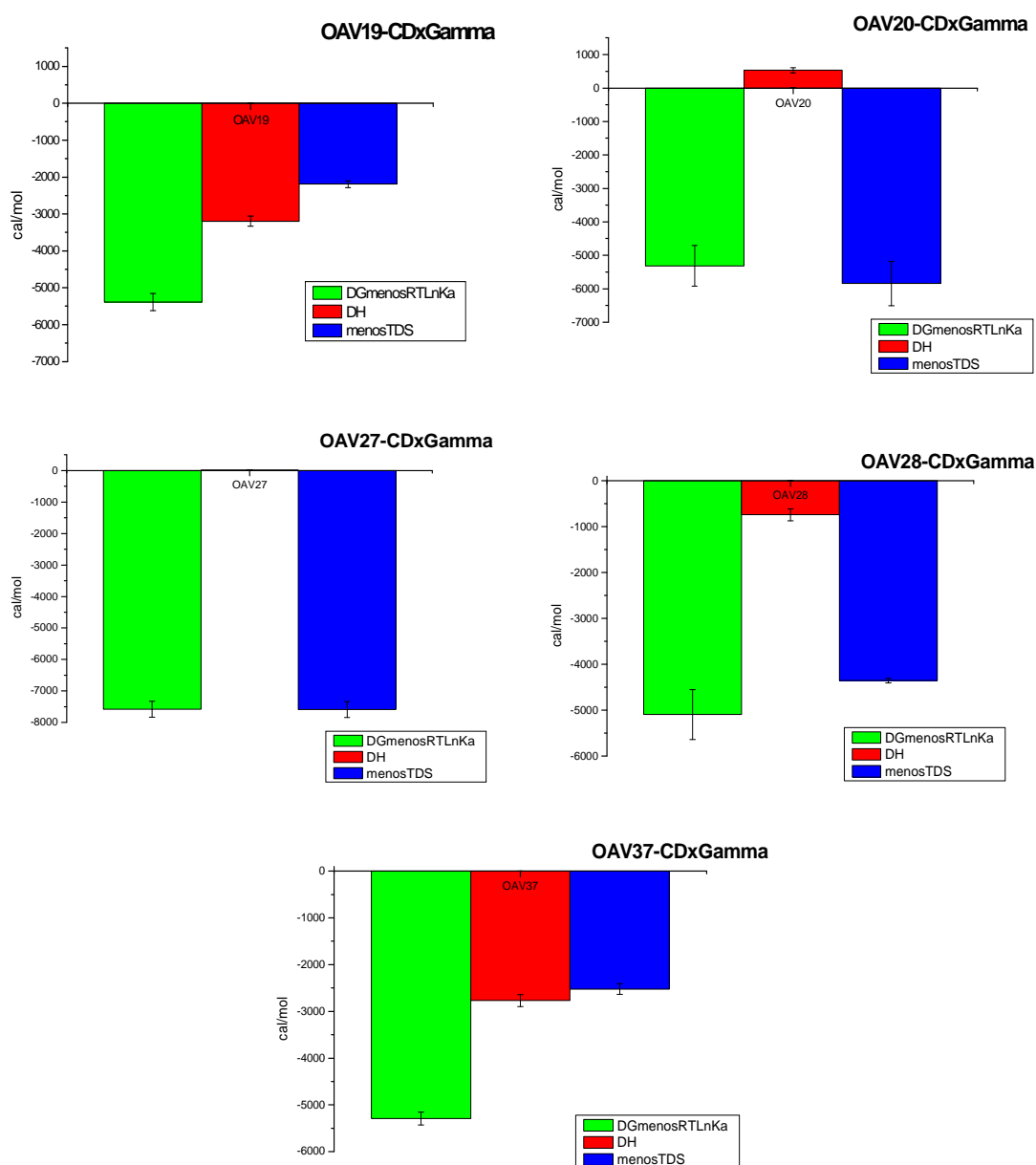


Figura 26.- Representación gráfica de los parámetros termodinámicos de unión de los complejos CD γ -OAVs estudiados. En ellas se representa ΔG (verde), ΔH (rojo) y $-T\Delta S$ (azul) en cal/mol.

Docking

Utilizando el programa informático Cyclo Predict se evaluó las posibles posiciones en las que pudieran interaccionar el ligando y la CDy. Se determinó la interacción más probable y de mínima energía.

La tabla presentada a continuación recoge los resultados de dichas predicciones para los 6 OAVs estudiados en este trabajo.

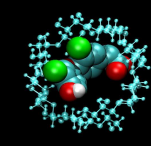
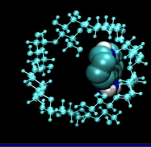
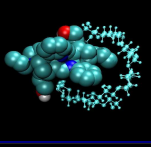
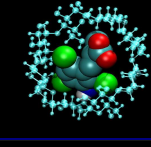
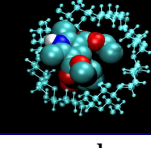
Compuesto	$\Delta G(\text{kcal/mol})$	Superficie interacción	
OAV19	-3,86	539,60	
OAV20	-4,57	438,62	
OAV27	-3,48	679,34	
OAV28	-2,92	493,53	
OAV31	-2,26	607,41	
OAV37	nd	nd	nd

Tabla 5.- Datos de ΔG y la superficie de interacción de la interacción más probable de los OAVs-CDy según el programa Cyclo Predict, acompañados de una predicción gráfica de la interacción.

*La interacción del OAV37 no se pudo predecir al no disponer de su fórmula química en la base de datos PubChem.

Determinación de la actividad antiviral y citotoxicidad de los complejos OAVs-CDy a través de estudios celulares de replicación viral.

Después de realizar los ensayos en los que se procedía a la incubación de las células (Huh 5-2) durante 72h a concentraciones crecientes de compuesto y de CDy, se determinó la actividad luciferasa, proporcional a la tasa de la replicación del virus, con el fin de determinar la actividad antiviral de los diferentes OAVs a concentraciones crecientes de CDy. También se analizó el metabolismo celular a las 72h con el fin de descartar posibles efectos citotóxicos de los compuestos y la

posibilidad de que la inhibición de la tasa de replicación viral fuera debida a una escasa supervivencia celular.

Los valores obtenidos de la actividad luciferasa y metabolismo celular de los 6 OAVs en estudio, se representan en función de la concentración de compuesto. A modo de ejemplo, se muestran a continuación las gráficas que recogen los datos de la actividad antiviral de los compuestos OAV20 y OAV28.

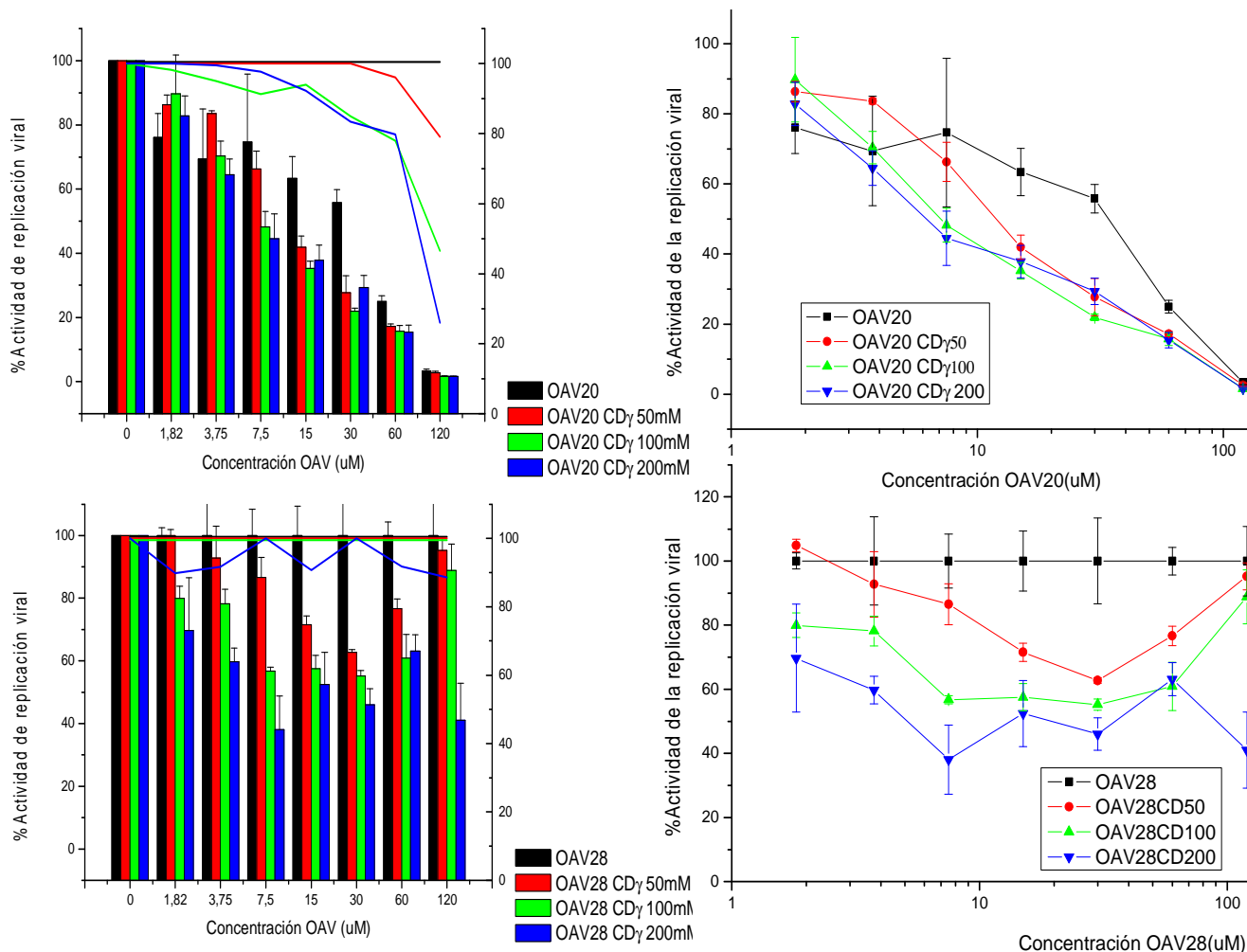


Figura 27.- Izquierda: Representación de la actividad luciferasa y del metabolismo celular respecto al cultivo no tratado, a concentraciones crecientes de diferentes compuestos OAVs sin CDγ (Negro) y en presencia de 50 μM de CDγ (Rojo), 100 μM de CDγ (Verde) y 200 μM de CDγ (Azul). Los porcentajes están calculados respecto a los controles no tratados. Las medidas se realizaron en experimentos repetidos por triplicado. Derecha: Representación de la actividad luciferasa en escala logarítmica.

Mediante el ajuste de las curvas representadas en las gráficas anteriores se pueden determinar los valores EC50 y LC50 para los OAVs en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de ciclodextrina. Estos valores aparecen recogidos en la *Tabla 6*.

La EC50 es la concentración de OAVs y OAVs-CDy, necesaria para que disminuya en un 50% la replicación viral en el cultivo celular tras 72 horas de incubación, respecto al cultivo no tratado (medida realizada a través de la aparición de luciferasa con el sustrato del Bright-Glo™ Luciferase Assay System).

La LC50 es la concentración necesaria de OAVs y OAVs-CDy, para que disminuya en un 50% el metabolismo celular en el cultivo celular tras 72 horas de incubación, respecto al cultivo no tratado (medida realizada a través de la aparición de formazán mediante Cell Titer 96®AQueous). Para los casos en los que no se pudieron determinar alguno de estos dos parámetros a las concentraciones de compuesto utilizadas en el experimento (120µM como máximo), el valor de EC50 y LC50 se representa como > 120µM. También se ha calculado el cociente LC50/EC50, muy relevante desde el punto de vista farmacológico, puesto que cuanto mayor sea este cociente, más alejada estará la concentración a la que el compuesto es efectivo de la concentración a la que es tóxico.

Compuesto	EC50	EC50	EC50	EC50	LC50	LC50	LC50	LC50
	Sin CDxG	50mM CDxG	100mM CDxG	200mM CDxG	Sin CDxG	50mM CDxG	100mM CDxG	200mM CDxG
OAV19	40	25	35	10	>120	>120	>120	>120
OAV20	40	10	10	15	>120	60	60	120
OAV27	50	--	30	--	>120	--	>120	--
OAV28	>120	--	20	10	>120	--	>120	>120
OAV31	60	40	20	10	100	>120	>120	>120
OAV37	100	60	20	10	120	120	120	120

Compuesto	LC50	LC50/EC50	LC50/EC50	LC50/EC50
	/EC50 Sin CDxG	50mM CDxG	100mM CDxG	200mM CDxG
OAV19	3	4,8	3,4	12
OAV20	3	6	6	4
OAV27	2,4	--	4	--
OAV28	1	--	> 6	> 12
OAV31	1,2	3	6	12
OAV37	1,2	2	6	12

Tabla 6.- Valores obtenidos tras el ajuste de las curvas experimentales obtenidas al representar los datos replicación viral (obtenidos con Bright-Glo™ Luciferase Assay System) y de citotoxicidad (obtenidos con Cell Titer 96®AQueous) de los experimentos celulares de distintas concentraciones de compuestos OAVs con CDy. *(--) No ha sido posible calcular la EC50 porque no se consigue reducir a la mitad la tasa de replicación del virus en el cultivo celular.

DISCUSIÓN

Estudio de la incorporación de AuNPs en diferentes tipos celulares

Estudio de la incorporación de AuNPs por espectroscopía

En primer lugar, antes de valorar los resultados de los niveles de internalización de AuNPs obtenidos en los ensayos realizados, debemos comentar la relación entre absorbancia-concentración que hemos establecido para el desarrollo del método utilizado. Esta relación resulta fundamental, pues todos los datos obtenidos a posteriori están ajustados de acuerdo a ella. Así pues, cabe destacar que, mientras las rectas patrón de AuNP Tris determinadas para los tres tipos celulares poseen prácticamente la misma pendiente y se solapan, estableciéndose así una relación absorbancia-concentración similar en todos los tipos celulares para estas nanopartículas, en el caso de las AuNP Gal existe una ligera, pero evidente variación, que hace que dicha relación no sea igual para todos los tipos celulares y va a tener influencia en los resultados.

A la hora de valorar la entrada de los dos tipos de AuNPs, los resultados obtenidos son algo controvertidos, en los dos modelos celulares presentes en la naturaleza (no transfectados, puesto que Huh5-2 son células Lunet que han incorporado el "HCV replicon system") a altas concentraciones (200 µg/ml) de nanopartículas, los niveles de incorporación son superiores para AuNP Tris (HeLa a todos los tiempos, Lunet a 48 y 72 horas), mientras que a bajas concentraciones de nanopartículas, los niveles de incorporación son superiores para AuNP Gal en HeLa (HeLa 48 y 72 horas a [AuNP]= 50 µg/ml y 72 horas a [AuNP]= 100 µg/ml). En el caso de las células Huh5-2, a altas concentraciones entran más las AuNP Gal, mientras que a bajas concentraciones no se aprecian diferencias significativas.

A la vista de la controversia suscitada por los datos obtenidos que no mostraban un patrón claro de entrada, esperamos al estudio de la internalización por citometría de flujo para validar el método y lanzar una hipótesis sobre lo que posiblemente esté sucediendo.

Parece que la presencia de los dos tipos de AuNP no tiene ningún efecto, a las 3 concentraciones testadas, en el metabolismo de los 3 tipos de células, ya que en todos los casos el porcentaje de actividad metabólica respecto a células sin AuNP es mayor al 90% tras 72h de cultivo.

Estudio de la incorporación de AuNPs por citometría de flujo y su localización celular por microscopía confocal.

Las células incubadas con AuNPTris tienen más fluorescencia por citometría que las incubadas con AuNPGal en los ensayos realizados para los 3 tipos celulares. Esto podría hacer pensar que entran más. Aunque, puesto que el citómetro detecta fluorescencia asociada a la célula, tanto al interior como al exterior celular, solo analizando las imágenes de microscopía confocal tendremos datos que indiquen su localización.

Las imágenes de microscopía confocal de los dos tipos de AuNPs incorporadas muestran que se localizan preferentemente en regiones cercanas al núcleo. Sin embargo, mientras las AuNPGal se encuentran en el interior celular, las AuNPTris se encuentran adheridas a la membrana plasmática, es decir, que a pesar de que las células tratadas con AuNPTris muestran más fluorescencia, las nanopartículas no se encuentran en el interior celular.

Los resultados obtenidos por citometría resultan coherentes con los obtenidos por espectroscopía, lo que nos permite considerarlo como un método válido para el seguimiento de la internalización de las nanopartículas.

Una posible explicación de los resultados obtenidos por microscopía de que las AuNPs bloqueadas con Tris interaccionan y se pegan a la membrana plasmática de las células, mientras que las AuNPs funcionalizadas con galactosa se localizan en el interior celular podría ser que las AuNPGal presentan una internalización mucho más selectiva y posiblemente mediada por receptor, quizá el mismo que para galactosa, activando algún mecanismo de endocitosis.

La posibilidad de confirmar esta hipótesis es el motivo por el que se realiza el siguiente estudio de competencia con galactosa, en el que junto con las AuNPs se ofrecen concentraciones crecientes de galactosa en el medio de cultivo. Si esto fuera cierto y la galactosa compitiese con las AuNPGal, se verían reducidos los niveles de internalización de las AuNPGal al incrementar los niveles de galactosa presentes en el medio de cultivo.

Inhibición de la internalización de las AuNP-GAL en presencia de galactosa

A tiempos cortos no hay diferencias estadísticamente significativas entre los dos tipos de AuNPs en los distintos tipos celulares. A altas concentraciones de galactosa y tiempos más largos sí que se observan niveles reducidos de entrada de

las AuNPGal, lo que sucede es que este mismo efecto se observa también con las AuNPTris en dos de los tres tipos celulares.

A la vista de estos resultados no podemos concluir que la entrada de las AuNPGal es selectiva. Sin embargo, los datos de citotoxicidad revelan que las concentraciones más altas de galactosa afectan más a las células tratadas con AuNPTris (70-85% del metabolismo celular del control), esto podría significar que la menor entrada de AuNPTris fuera debida a que las células no estaban en las mejores condiciones, si esos daños afectaran a la membrana, donde se unen las AuNPTris, los resultados sería congruentes con la hipótesis propuesta inicialmente.

Una posible explicación para la ausencia de diferencias significativas a tiempos de incubación cortos de las AuNPs en medios con galactosa, podría ser que si de verdad la internalización fuera selectiva por un mecanismo mediado por receptor, la presencia de galactosa provocara una sobreexpresión de dicho receptor, contrarrestando el previsible efecto que ejerce la galactosa bloqueándolo.

A pesar de todo ello, no podemos llegar a ninguna conclusión definitiva. Actualmente se están llevando a cabo experimentos de microscopía y citometría de flujo para estudiar la competencia con galactosa de la entrada de las nanopartículas a fin de arrojar algo más de luz sobre los efectos observados.

[Estudio de la interacción CDy-OAVs y su actividad antiviral en cultivo celular](#)

Monitorización de la formación de complejos por espectroscopía

El objetivo de este estudio era determinar si mediante espectroscopía se puede realizar un seguimiento de la incorporación de los OAVs en la CDy. De los 6 compuestos estudiados en este trabajo, solo se pudieron obtener espectros de 4 de ellos a las concentraciones adecuadas debido a complicaciones técnicas, los otros 2 están todavía pendientes y se realizarán próximamente.

Aunque se observaron desplazamientos más o menos evidentes según el compuesto, en las curvas de los espectros, al no haber diferencias cuantitativas reseñables no se pudo obtener una curva adecuada de interacción. Por lo tanto, era necesaria otra manera de cuantificar la interacción.

Caracterización de la unión CD γ -OAVs mediante ITC

A diferencia de la espectroscopia, la calorimetría isotérmica de titulación sí nos permitió la caracterización de las interacciones entre los OAVs y CD γ , aportando datos de constantes de unión y parámetros termodinámicos para su comparación. En los 5 compuestos estudiados por ITC la interacción con la ciclodextrina se ve favorecida energéticamente ($\Delta G < 0$), y todos ellos presentan constantes de afinidad del mismo orden, entre (6257,56 - 3895,88 M⁻¹), luego no se aprecia una diferencia de afinidad entre ellos.

En el caso de OAV19 y OAV37 el término entálpico es el que más contribuye a la energética del proceso, lo que refleja que está guiado por uniones más específicas. Por otro lado, en el OAV20 y el OAV28 es el término entrópico el que dirige el proceso, con lo que la unión será más inespecífica. Dado que nuestro interés es que una vez que entre en contacto con la célula el complejo OAVx-CD γ se libere el OAVx, una interacción muy específica con una constante de afinidad muy alta y un ΔG muy negativo puede no ser lo más deseable. En cualquiera de los casos, como los compuestos estudiados poseen constantes de afinidad del mismo orden no esperamos grandes diferencias y no descartamos ninguno de ellos.

Docking

Las predicciones llevadas a cabo con este programa informático, nos dan una idea orientativa de cómo es la interacción OAVx-CD γ y cómo de amplia es la superficie de los dos elementos que interacciona. Analizando la estructura podemos determinar cuál es la región del OAV y los grupos funcionales del compuesto que participan.

Al evaluar los resultados observamos que los valores de ΔG de la predicción son coherentes con los obtenidos por ITC en el sentido de que no se desvían demasiado los valores de ΔG y permanecen todos en el mismo orden de magnitud, aunque bien es cierto que aparecen valores ligeramente menos negativos.

Determinación de la actividad antiviral y citotoxicidad de los complejos OAVs-CD γ a través de estudios celulares de replicación viral.

En el caso del OAV20 (primero de los dos compuestos representados), la actividad antiviral del mismo queda patente en cultivo celular, puesto que incluso en ausencia de ciclodextrina es capaz de reducir la actividad viral hasta niveles

mínimos. Ahora bien, la gráfica muestra una mejora de la actividad antiviral a concentraciones intermedias (de las empleadas en los ensayos) al formar complejos con CD γ . Al mismo tiempo, la formación de estos complejos también provoca un incremento en su citotoxicidad, esto probablemente sea debido a que el complejo favorece la entrada del compuesto en las células, potenciando los efectos nocivos sobre las células que este compuesto pudiera ya tener de forma intrínseca.

El caso del OAV28 (segundo de los dos compuestos representados) es totalmente distinto. El OAV28 es un compuesto que fue seleccionado mediante cribado de alto rendimiento (HTS) por presentar efecto in vitro frente a una diana terapéutica del VHC, la proteasa NS3. En ausencia de ciclodextrinas no exhibía actividad antiviral en cultivo celular en el rango de concentración utilizado de 0 a 120 μ M, pero al formar complejos con CD γ sí que se observa efecto sobre la replicación del virus, llegando a reducir al 45% la replicación del virus en presencia de 30 μ M de complejo en el medio de cultivo. Además, al aumentar la concentración de ciclodextrina, la actividad antiviral también aumenta. Estos datos sugieren que este compuesto era incapaz de atravesar la membrana plasmática y necesitaba de “ayuda” para su internalización en el interior de la célula donde debe ejercer su acción. De esta forma, somos capaces de rescatar un compuesto que tiene actividad antiviral, pero que por problemas de incorporación en las células no podría llevar a cabo dicho efecto.

A la vista de los resultados para todos los OAVs presentados en la tabla, en todos los casos se mejoramos los valores de concentración eficaz necesaria para reducir en un 50% la replicación viral. Como consecuencia de ello, se incrementa el cociente LC50/EC50 (margen terapéutico) y se mejoran las posibles propiedades terapéuticas de estos compuestos. Observando estos resultados también se puede afirmar que la concentración de ciclodextrinas es importante para aumentar la eficacia de los OAVs. Esto confirma que la vehiculización de estos compuestos se ve mejorada en presencia de CD γ .

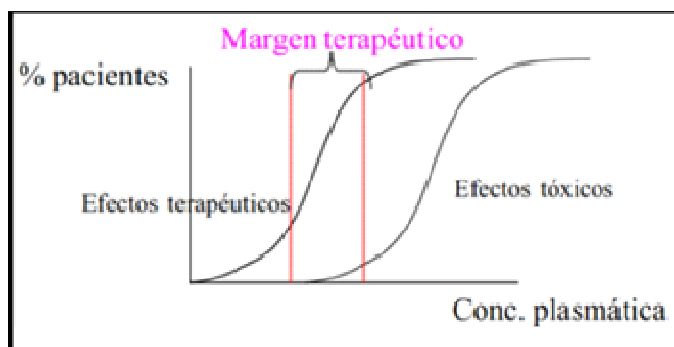


Figura 28: Esquema explicativo del margen terapéutico.

Estos complejos se utilizarán posteriormente para unirlos a nanopartículas, combinando ambas partes de este trabajo, en la búsqueda de un tratamiento completamente eficaz para la hepatitis C que a día de hoy no existe.

CONCLUSIONES

- Se ha validado un método para monitorizar la incorporación de AuNPs a las células mediante espectroscopía.
- Las AuNP funcionalizadas con galactosa tienen una entrada menor que las AuNP bloqueadas con Tris, aunque se localizan en el interior celular, mientras que las no modificadas se adsorben a la superficie de la membrana plasmática.
- No se ha podido determinar si la galactosa en el medio de cultivo compete con las nanopartículas modificadas con galactosa, ni el mecanismo por el que se produce su internalización.
- Ha sido posible caracterizar la unión de los compuestos (OAVs) con actividad frente a la proteasa NS3 del VHC a CDy mediante ITC y Docking, determinándose su constante de afinidad y parámetros termodinámicos.
- Se ha conseguido mejorar la eficacia antiviral de los compuestos estudiados mediante la formación de complejos con ciclodextrinas.
- En algún caso concreto, hemos sido capaces de rescatar algún compuesto que presentaba actividad antiviral in vitro, pero no en cultivo celular, mediante la formación de estos complejos.

BIBLIOGRAFIA

Abian O, Neira JL, Velazquez-Campoy A. Thermodynamics of zinc binding to hepatitis C virus NS3 protease: a folding by binding event. *Proteins*. 2009;77(3):624-36.

Abian O, Vega S, Neira JL, Velazquez-Campoy A. Conformational stability of hepatitis C virus NS3 protease. *Biophys J*. 2010;99(11):3811-20.

Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96(22):12766-71.

Barrientos AG, de la Fuente JM, Rojas TC, Fernández A, Penadés S. Gold glyconanoparticles: synthetic polyvalent ligands mimicking glycocalyx-like surfaces as tools for glycobiological studies. *Chemistry*. 2003;9(9):1909-21.

Bartenschlager R, Cosset FL, Lohmann V. Hepatitis C virus replication cycle. *J Hepatol*. 2010;53(3):583-5.

Bartenschlager R. Hepatitis C virus replicons: potential role for drug development. *Nat Rev Drug Discov*. 2002;1(11):911-6.

Bermúdez AD. Función de la proteasa NS3 del virus de la Hepatitis C. *Revista de Educación Bioquímica*. 2008;27:79-84.

Connor EE, Mwamuka J, Gole A, Murphy CJ, Wyatt MD. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small*. 2005 Mar;1(3):325-7.

De la Fuente JM, Penadés S. Glyconanoparticles: types, synthesis and applications in glycoscience, biomedicine and material science. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1760(4):636-51.

Esteban JI, Saudela S, Quer, J. The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe. *J Hepatol*. 2008;48:148-62.

Freire E, Mayorga OL, Straume M. Isothermal titration calorimetry. *Anal Chem*. 1990;62:950A-959A.

Fried MW, Hadziyannis SJ. Treatment of chronic hepatitis C infection with peginterferons plus ribavirin. *Semin Liver Dis.* 2004;24(S2):47-54.

Garg G, Kar P. Trop Management of HCV infection: current issues and future options. *Trop Gastroenterol.* 2009;30(1):11-8.

Gibson JD, Khanal BP, Zubarev ER. Paclitaxel-functionalized gold nanoparticles. *J Am Chem Soc.* 2007;129(37):11653-61.

Hoofnagle JH. Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology.* 2001;36:S21-27.

Kieffer TL, Kwong AD, Picchio GR. Viral resistance to specifically targeted antiviral therapies for hepatitis C (STAT-Cs). *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(2):202-12.

Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med.* 2001;345:1-52.

Loftsson T, Hreinsdóttir D, Másson M. Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs. *Int J Pharm.* 2005;302(1-2):18-28.

Lohmann V, Körner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science.* 1999;285(5424):110-3.

Manzanares M. Estudio de la genética del virus de la hepatitis C en cultivos celulares. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 2011;5(2):11-35.

Martínez G, Gómez M. Ciclodextrinas: Complejos de inclusión con polímeros. *Revista Iberoamericana de Polímeros.* 2007 (España):8(4):300-312.

Neukam K, Macías J, Mira JA, Pineda JA. A review of current anti-HCV treatment regimens and possible future strategies. *Expert Opin Pharmacother.* 2009;10(3):417-33.

Paciotti GF, Kingston DGI, Tamarkin L. Colloidal gold nanoparticles: A novel nanoparticle platform for developing multifunctional tumor-targeted drug delivery vectors. *Drug Dev Res.* 2006;67:47-54.

Paciotti GF, Myer L, Weinreich D, Goia D, Pavel N, McLaughlin RE, Tamarkin L. Colloidal gold: a novel nanoparticle vector for tumor directed drug delivery. *Drug Deliv.* 2004;11(3):169-83.

Pierce MM, Raman CS, Nall BT. Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions. *Methods.* 1999;19(2):213-21.

S. Mandal, S. Phadtare, M. Sastry, Interfacing biology with nanoparticles. *Current Applied Physics.* 2005;5(2):118-27.

Sarrazin C, Zeuzem S. Resistance to direct antiviral agents in patients with hepatitis C virus infection. *Gastroenterology.* 2010;138(2):447-62.

Shang L, Lin K, Yin Z. Resistance mutations against HCV protease inhibitors and antiviral drug design. *Curr Pharm Des.* 2013 May 13.

Templeton AC, Chen S, Gross SM, Murray RW. Water-soluble, isolable gold clusters protected by tiopronin and coenzyme a monolayers. *Langmuir* 1999;15:66-76.

Vrolijk JM, Kaul A, Hansen BE, Lohmann V, Haagmans BL, Schalm SW, Bartenschlager R. A replicon-based bioassay for the measurement of interferons in patients with chronic hepatitis C. *J Virol Methods.* 2003;110(2):201-9.

Xu ZP, Zeng QH, Lu GQ, Yu AB. Inorganic nanoparticles as carriers for efficient cellular delivery. *Chem Eng Sci.* 2006;61:1027-40.