



**FACULTAD DE FARMACIA**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**NANOPARTÍCULAS FLUORESCENTES  
PARA APLICACIONES BIOMÉDICAS**

Autor: RIHAB ELFETTAHI YACOUBI

Fecha: Julio de 2019

Tutor: MARCO LAURENTI

# Índice

1	RESUMEN .....	3
2	ABSTRACT.....	3
3	INTRODUCCIÓN .....	3
3.1	Uso de las nanopartículas: .....	4
3.2	Artritis reumatoide:.....	5
3.2.1	<i>Biomarcadores de la artritis reumatoide:</i> .....	6
4	OBJETIVOS.....	7
5	METODOLOGÍA .....	7
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	7
6.1	Nanopartículas luminiscentes:.....	7
6.2	Lantánidos, naturaleza y propiedades:.....	8
6.3	Conversión ascendente y ETU: .....	9
6.4	Matriz de las UCNPs: .....	10
6.4.1	<i>Métodos de preparación de las matrices y las UCNP:</i> .....	11
6.4.2	<i>Elección de la matriz que compone la UCNP:</i> .....	11
6.5	Péptidos citrulinados: .....	12
6.5.1	<i>Anclaje de los CCP a la UCNP:</i> .....	12
6.6	ACPA: .....	13
6.6.1	<i>Elección del soporte al que se van a anclar los ACPA:</i> .....	14
7	CONCLUSIONES .....	15
8	BIBLIOGRAFÍA.....	15

## 1 RESUMEN

Diversos métodos de diagnóstico se han perfeccionado adaptándolos y enfocándolos a las múltiples patologías existentes. Algunos de ellos son caros y necesitan tanto material como personal especializado, por ello con la investigación desarrollamos nuevos métodos de diagnóstico basados en la detección de biomarcadores por fluorescencia.

En este trabajo de investigación se desarrolla una nanopartícula (UCNP) enfocada a detectar la presencia de autoanticuerpos generados en la artritis reumatoide, enfermedad que cursa con inflamación de las articulaciones y que tiene la peculiaridad de que se generan autoanticuerpos (ACPA) frente a péptidos citulinados (CCP). Las UCNP están basadas en el proceso de conversión ascendente y permiten detectar la presencia de biomarcadores de enfermedades, contra los que van dirigidas, mediante el uso de un microscopio de fluorescencia. Para el desarrollo de esta UCNP, se hace un análisis profundo de su matriz  $\text{NaYF}_4$ , del dopaje con los lantánidos, responsables del proceso de ETU (*Energy Transfer Upconversion*) y del recubrimiento de la UCNP para protegerla del medio y facilitar el anclaje de los CCP. Los ACPA que queremos detectar los anclaremos a un soporte para facilitar su unión a la UCNP. En este trabajo profundizamos en cada parte de la UCNP para ensamblarla y obtener así una nanopartícula teórica para el diagnóstico de la artritis reumatoide.

Palabras clave: UCNP,  $\text{NaYF}_4$ , conversión ascendente, artritis reumatoide, CCP y ACPA.

## 2 ABSTRACT

Several diagnostic methods have been improved by adapting and focusing them to the multiple pathologies. Some of them are expensive and require both material and specialized personnel, so by researching we develop new diagnostic methods based on the fluorescence detection of biomarkers.

In this research work we develop a nanoparticle (UCNP) focused on detecting the presence of autoantibodies generated in rheumatoid arthritis, a disease that takes place with joints' inflammation and it has the peculiarity that autoantibodies (ACPA) versus citrullinated peptides (CCP) are generated. UCNP are based on the upconversion process and can detect the presence of disease biomarkers, against which they are directed, using a fluorescence microscope. For the development of this UCNP, an in-depth analysis of its  $\text{NaYF}_4$  matrix, lanthanides doping, responsible for the ETU (*Energy Transfer Upconversion*) process and the UCNP coating carried out to protect it from the environment and to facilitate the anchoring of the CCP. The ACPA we want to detect will be anchored to a support to facilitate their union with the UCNP. In this work we delve into each part of the UCNP to assemble it to obtain a theoretical nanoparticle for rheumatoid arthritis' diagnosis.

Keywords: UCNP,  $\text{NaYF}_4$ , upconversion, rheumatoid arthritis, CCP and ACPA.

## 3 INTRODUCCIÓN

Patologías como el cáncer de mama (1), enfermedades cardiovasculares (2) y muchas infecciones virales como HIV (3) y Ébola (4), tienen sus propios protocolos de detección y diagnóstico. Muchas de estas pruebas diagnósticas son económicamente dispendiosas y por esto muchos tienen un acceso muy limitado a ellas. En este sentido, la investigación está

desarrollando nuevas metodologías de diagnóstico basadas en la detección de biomarcadores por fluorescencia. En este campo entran en juego las nanopartículas.

En medicina se utilizan métodos de identificación por imagen como la tomografía computarizada (TC) y la resonancia magnética nuclear (RMN) para detectar estructuras sospechosas como tumores. En 2004 en el Instituto de Tecnología de Georgia, Shuming Nie y sus colaboradores emplearon las nanopartículas para iluminar sólo las células de cáncer de próstata humano que habían inyectado en ratones en un punto determinado. Logrado este objetivo se dieron cuenta de que si este proceso fuera posible aplicarlo a los humanos, supondría el diagnóstico precoz del cáncer sin cirugía ni imágenes del tumor. Nie intentó mejorar más su técnica y gracias a esto, los investigadores pudieron desarrollar más diseños de nanopartículas y extrapolarlos a otras enfermedades. Se abrió un nuevo horizonte frente a nosotros, ya que estas nanopartículas podríamos combinarlas con diversos marcadores o moléculas y nos permitirían una detección precoz de las enfermedades (5).

La palabra nanopartícula contiene el prefijo “nano-” que proviene del griego que significa “enano”, esto nos indica que son partículas tan pequeñas que son imperceptibles para el ojo humano y se necesita un microscopio de fluorescencia para observarlas (6). El microscopio fluorescente se basa en la diferenciación de objetos que emiten luz. Cuando las nanopartículas absorben energía, quedan excitadas y liberan esta energía en forma de luz. El microscopio de fluorescencia expone la presencia, y la forma si procede, de lo que tenemos marcado con la nanopartícula y queremos detectar (7).

Al ser tan pequeñas tienen una gran utilidad en la clínica ya que pueden incorporar a su estructura principios activos, anticuerpos y distintos tipos de elementos con el fin de detectar, diagnosticar e incluso tratar una patología. Las nanopartículas no solo se limitan al ámbito de la medicina, también se utilizan en cosmética (sombros de ojos (8), pastas de dientes, protectores solares (9), etc) e incluso en repelentes de insectos y en desinfectantes, en la electricidad y la óptica entre otras áreas (8).

### **3.1 *Uso de las nanopartículas:***

Las nanopartículas pueden estar enfocadas a diversos campos, pero en el que más expectativas hay es en el campo de ciencias de la salud o biomedicina. Pueden usarse como método rápido de diagnóstico. Las hay de varios tipos según el material del cual estén compuestas (10):

- Composites: se combinan con otras nanopartículas o con materiales más grandes.
- De base metálica: hay 2 tipos:
  - o Nanopartículas de oro o plata
  - o Puntos cuánticos (Quantum dots)
- De base de carbón: tienen forma esférica, elipsoidal o tubular. Conducen la electricidad y tienen gran elasticidad.
- Dendrimeros: está formada por polímeros nanométricos.

Hay muchas técnicas usadas para el diagnóstico de las patologías, algunos de ellos son inmunoensayos (11), entre otros. Sin embargo, muchos de estos métodos requieren de

maquinaria específica, son caras de obtener y de mantener, requieren personal cualificado, los reactivos son caros y, a veces, se necesita mucho tiempo para obtener un resultado. (12) Por ello es necesario el desarrollo de una alternativa que permita una identificación rápida y precoz de las enfermedades y las nanopartículas son una alternativa muy interesante.

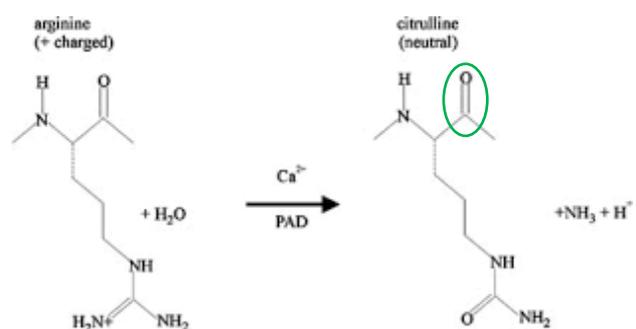
### 3.2 Artritis reumatoide:

Para poder continuar con el desarrollo de este trabajo tenemos que hablar de la artritis reumatoide. La artritis reumatoide (AR) es una inflamación crónica de las articulaciones y se caracteriza por la presencia de autoanticuerpos (13). Los síntomas principales incluyen inflamación, dolor y sensibilidad en las articulaciones, puede haber rigidez matutina y con el paso del tiempo las articulaciones pueden perder la movilidad y volverse deformes (14).



**Figura 1.** Síntomas característicos de la artritis reumatoide (14)

Los principales factores que determinan la susceptibilidad a padecer la artritis reumatoide son los genes heredados y genes de histocompatibilidad mayor (MHC) del antígeno leucocitario humano (HLA). Sin embargo, hay muchos otros factores no genéticos que influyen en la activación de la enfermedad como los estímulos ambientales. Diversos estímulos ambientales pueden provocar la activación repetida de la inmunidad innata, hasta que dé lugar a un desequilibrio y aparezca la enfermedad clínica. Uno de los estímulos ambientales que más influencia tiene en la AR es el hábito tabáquico ya que se induce la expresión de peptidil-arginina deiminasa (PAD) (15). Esta enzima, como se muestra en la figura 2 (16), es la encargada de la conversión de la arginina en **citrulina**, dando lugar a péptidos citrulinados que pueden ser reconocidos por el sistema inmunitario. Este aumento del proceso de la citrulinación no es exclusivo de la artritis reumatoide, lo que sí es exclusivo de la misma es la generación de anticuerpos frente a estos péptidos citrulinados, denominados ACPA (17).



**Figura 2.** Citrulinación (16)

### 3.2.1 Biomarcadores de la artritis reumatoide:

Los marcadores biológicos o biomarcadores son sustancias biológicas detectables que nos sirven como indicadores de procesos normales o patológicos y también nos sirven como identificadores de la respuesta al tratamiento.

En los últimos años se han realizado diversas investigaciones para hallar biomarcadores para el diagnóstico de la artritis reumatoide. Hasta ahora el más utilizado ha sido el factor reumatoide (FR) que es un anticuerpo, característico de la AR, dirigido contra la fracción constante de la inmunoglobulina G. Este FR se determina mediante un análisis de una muestra de sangre, sin embargo, tiene poca especificidad contra la diana. Por ello se han realizado estudios y el principal descubrimiento ha sido un nuevo biomarcador denominado anticuerpo frente a péptidos citrulinados (ACPA) (18).

Autoanticuerpos	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
Factor reumatoide	65-80%	85%
Anti-péptidos citrulinados	60-80%	95-98%
Anti-RA33	30-35%	96%
Anti-colágeno tipo II	30%	NE
Anti-GPI	15-64%	70%
Anti-BiP	63-73%	65-99%
Anti-calpastatina	5-83%	96%
Anti-ro (SSA)	3-15%	NE
Antifosfolipídicos/anticardiolipina	12-48%	NE
ANCA	0-70%	NE

ANCA: anticuerpos frente a citoplasma de neutrófilos; BiP: *endoplasmic reticulum chaperone binding proteína*; GPI: glucosa-6-fosfato isomerasa; NE: no evaluado.

**Figura 3. Sensibilidad y especificidad de autoanticuerpos en la AR (18)**

Los ACPA, de entre todos los autoanticuerpos, son los más específicos de la artritis reumatoide, por lo que son idóneos para su diagnóstico. Los ACPA, tal y como indica su nombre van dirigidos frente a péptidos cíclicos citrulinados (CCP). Estos CCP, como hemos mencionado anteriormente, resultan de la citrulinización de la arginina por la PAD. Este proceso ocurre durante la inflamación, apoptosis y queratinización (19).

Serre y sus colaboradores fueron los que confirmaron que la citrulina es un componente esencial para el desarrollo de la artritis y los anticuerpos específicos contra esta. Los primeros ensayos para detectar la presencia de estos anticuerpos se realizaron con péptidos citrulinados lineales, pero la sensibilidad y la especificidad del ensayo eran bajas (20). Para aumentar la sensibilidad y la especificidad Schellekens y sus colaboradores usaron péptidos cíclicos citrulinados, los cuales han sido modificados para que el epítipo citrulinado sea más fácilmente reconocido por los ACPA (21). A partir de entonces, se han realizado diversas recopilaciones de CCP mediante el análisis del suero de los pacientes con AR, y se han desarrollado CCP sintéticos. El CCP2 (segunda generación) es el que mejor resultados ha dado en el diagnóstico de la artritis reumatoide; la prueba de diagnóstico que lo incluye se ha estado comercializando desde 2002 y no ha cambiado desde entonces. Esta prueba de diagnóstico

ha sido llevada tanto a diagnóstico inmunológico por ELISA como incorporado a maquinaria especializada de análisis clínicos (22).

## 4 OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es el desarrollo teórico de una nanopartícula para la detección de anticuerpos frente péptidos citrulinados producidos en la artritis reumatoide. Como objetivos secundarios tenemos:

- Abordar la importancia de las nanopartículas en medicina y su uso.
- Conocer las principales matrices que se usan para el desarrollo de una nanopartícula (UCNP), así como un método de síntesis de a misma.
- Conocer en qué consiste la conversión ascendente (UC) y en concreto la conocida como ETU.
- Conocer los lantánidos, su naturaleza, propiedades y su implicación en el dopaje de la UCNP y la conversión ascendente.
- Tener una visión general de la artritis reumatoide, de sus síntomas y de los biomarcadores que se están usando actualmente para su diagnóstico.
- Tener una visión de la estructura de un anticuerpo y buscar un método para anclarlos a un soporte.

## 5 METODOLOGÍA

La metodología empleada para el desarrollo de este trabajo ha sido la revisión bibliográfica de muchas fuentes de información e indagación en publicaciones nacionales e internacionales en busca de información sobre las UCNP, la matriz  $\beta$ -NaYF<sub>4</sub>, los CCP y los ACPA en artículos científicos obtenidos de revistas científicas y de portales como PubMed. También se ha usado la plataforma del Catálogo Cisne de la Universidad Complutense de Madrid para acceder a diversos artículos, trabajos de fin de máster, tesis doctorales y libros electrónicos para buscar la información necesaria. Libros de química avanzada y de nanotecnología también han sido consultados.

## 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 *Nanopartículas luminiscentes:*

Las nanopartículas **luminiscentes** son las que vamos a usar en el desarrollo de nuestro sensor. La presencia de ácidos nucleicos que participan en la regulación de la expresión de genes y producción de proteínas se usa como biomarcadores para la detección de algún tipo de cáncer. La ventaja de este proceso es que se pueden detectar de manera precoz, antes de que el daño al organismo sea más grave, y tomar medidas. Muchas otras patologías e infecciones tienen sus propios biomarcadores, y sus propias formas de diagnóstico. La principal ventaja de las nanopartículas fluorescentes es que son capaces de detectar los biomarcadores para

los que van dirigidas a bajas concentraciones de manera rápida, barata y eficaz. Estos sistemas se basan en el proceso de fotoluminiscencia provocado por el dopaje de la nanopartícula con lantánidos (23). Para entender un poco mejor el proceso vamos a hablar de los lantánidos.

## 6.2 Lantánidos, naturaleza y propiedades:

Los lantánidos son elementos químicos de la tabla periódica conocidos también por el nombre de “tierras raras”. Están presentes en muchos minerales y su uso principalmente era en mezcla con otros metales. Actualmente se usan en la industria metalúrgica, como catalizadores que descomponen la contaminación del aire, etc (24). Los lantánidos pertenecen al grupo de metales de transición interna de la tabla periódica, se muestra en la figura 3. Los catorce electrones 4f se añaden sucesivamente a los orbitales con una configuración general  $[Xe]4f^n6s^2$ , con la excepción de La, Ce, Gd, y Lu que para los cuales la configuración electrónica es  $[Xe] 4f^n5d^16s^2$ . Por esto los iones lantánidos más estables son los de estado de oxidación +3, obtenidos mediante la pérdida de electrones de los orbitales 5d y 6s (25). Tienen un comportamiento espectral y magnético distinto al resto de elementos químicos de la tabla periódica, y esta diferencia se basa fundamentalmente en su configuración electrónica (26). Son responsables de las propiedades de los iones lantánidos los electrones 4f, y además, los orbitales 4f están protegidos por influencias de fuerzas externas gracias ya que tienen completos los orbitales 5s y 5p (25). Esto les confiere estabilidad y son menos afectados por influencias de fuerzas externas comparados con los metales de transición de la serie 3d.

Elementos de los grupos representativos		26 Fe 55,845 Número atómico Símbolo Peso atómico		Metal		Metaloide		No metal		Elementos de los grupos representativos																																			
1	IA	1	H	2	He	Metales de transición						18	VIIIA																																
2	IIA	3	Li	4	Be	13	B	14	C	15	N	16	O	17	F	18	Ne																												
3		11	Na	12	Mg	13	Al	14	Si	15	P	16	S	17	Cl	18	Ar																												
4		19	K	20	Ca	21	Sc	22	Ti	23	V	24	Cr	25	Mn	26	Fe	27	Co	28	Ni	29	Cu	30	Zn	31	Ga	32	Ge	33	As	34	Se	35	Br	36	Kr								
5		37	Rb	38	Sr	39	Y	40	Zr	41	Nb	42	Mo	43	Tc	44	Ru	45	Rh	46	Pd	47	Ag	48	Cd	49	In	50	Sn	51	Sb	52	Te	53	I	54	Xe								
6		55	Cs	56	Ba	57	La*	72	Hf	73	Ta	74	W	75	Re	76	Os	77	Ir	78	Pt	79	Au	80	Hg	81	Tl	82	Pb	83	Bi	84	Po	85	At	86	Rn								
7		87	Fr	88	Ra	89	Ac**	104	Rf	105	Ha	106	Sg	107	Ns	108	Hs	109	Mt	110		111				112																			
																		Metales de transición interna																											
																		58	Ce	59	Pr	60	Nd	61	Pm	62	Sm	63	Eu	64	Gd	65	Tb	66	Dy	67	Ho	68	Er	69	Tm	70	Yb	71	Lu
																		90	Th	91	Pa	92	U	93	Np	94	Pu	95	Am	96	Cm	97	Bk	98	Cf	99	Es	100	Fm	101	Md	102	No	103	Lr

Figura 4. Tabla periódica (24)

Estos electrones de valencia están deslocalizados en los niveles de permitidos de las bandas de conductividad, hecho que les permite ser conductores de la electricidad (24). Nos interesan las propiedades fotoluminiscentes de los lantánidos, que se dan debido a las transiciones de los electrones entre orbitales **4f**. Cada elemento va a emitir su propia luminescencia después de ser excitado; en la siguiente tabla se recogen los estados electrónicos y los colores correspondientes a los iones  $L^{3+}$ : (27)

ION	ESTADO FUNDAMENTAL	COLOR	ION	ESTADO FUNDAMENTAL
Lantano (La)	$^1S_0$	Incoloro	Lutecio (Lu)	$^1S_0$
Cerio (Ce)	$^2F_{5/2}$	Incoloro	Iterbio (Yb)	$^2F_{7/2}$
Praseodimio (Pr)	$^3H_4$	Verde	Tulio (Tm)	$^3H_6$
Neodimio (Nd)	$^4I_{9/2}$	Lila	Erbio (Er)	$^4I_{15/2}$
Prometio (Pm)	$^5I_4$	Rosa; Amarillo	Holmio (Ho)	$^5I_8$
Samario (Sm)	$^6H_{5/2}$	Amarillo	Disprobio (Dy)	$^6H_{15/2}$
Europio (Eu)	$^7F_0$	Rosa pálido	Terbio (Tb)	$^7F_6$
Gadolinio (Gd)	$^3S_{7/2}$	Incoloro	Gadolinio (Gd)	$^3S_{7/2}$

**Figura 5.** Estado fundamental de los iones de los lantánidos y el color en el que emiten luminescencia (27)

Los que vamos para dopar nuestro sensor van a ser el erbio y el iterbio:

- Erbio (Er): de número atómico 68, es un sólido de color metálico, soluble en ácidos dando soluciones de color rosa, pero no es soluble en agua.
- Iterbio (Yb): de número atómico 70, es un sólido blando y plateado, muy maleable y soluble en ácidos y amoniacos dando lugar a soluciones incoloras.

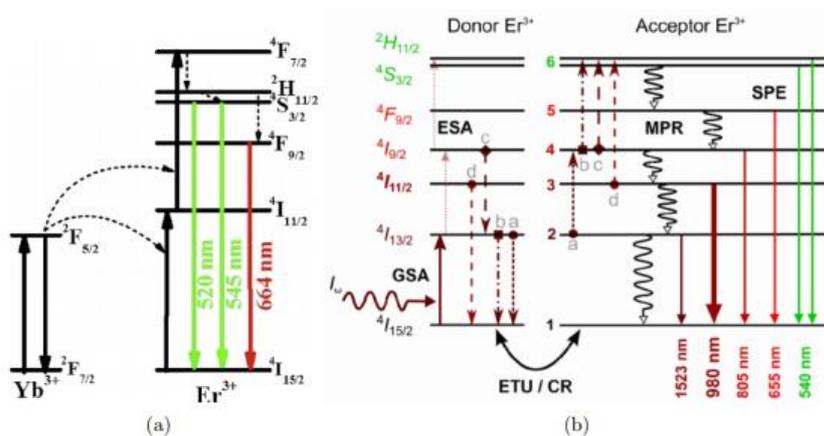
### 6.3 Conversión ascendente y ETU:

La fotoluminescencia de conversión ascendente (*upconversion*) consiste en la absorción de un fotón por parte de un material determinado, en nuestro caso los lantánidos, que excite el sistema a un nivel superior de energía y que dure lo suficiente para que sea excitado de nuevo por otro fotón a un nivel de energía superior; para que, posteriormente, el sistema decaiga al nivel fundamental de energía emitiendo un fotón con una energía mayor que los absorbidos (28).

Los lantánidos son el eje central de la conversión ascendente. Hay varios procesos de conversión ascendente, entre ellos destaca el denominado ETU (*Energy Transfer Upconversion*) y es en el que se basa el sensor. La ETU consiste en la transferencia de energía sucesiva de dos iones sensibilizadores a un ion activador para lograr la conversión ascendente de frecuencia. La ETU se compone de 3 procesos (29):

- Absorción de energía por sensibilizadores: la absorción dependerá de la intensidad de la luz, la naturaleza de los iones lantánidos usador y del espesor de la UCNP (29).
- Transferencia de energía de los sensibilizadores al activador: el estudio realizado por Dawei Lu y sus colaboradores en la Universidad de Colorado, revela que la tasa de ETU aumenta con el aumento de intensidad de excitación hasta que se alcanza la saturación, donde se logra la mayor eficiencia de conversión ascendente interna (29).
- Emisión de fotones por parte del activador: la eficiencia de la emisión dependerá de la tasa de decaimiento radiativo y decaimiento no radiativo. Nos interesa aumentar la tasa de decaimiento radiativo al máximo posible y disminuir la tasa de decaimiento no radiativo para evitar pérdidas de la emisión (29).

La conversión ascendente con el método ETU funciona como en el diagrama de la figura 6: el ion sensibilizador o dador, que es el iterbio, absorbe un fotón y pasa a su estado excitado. A continuación, esta energía almacenada en el sensibilizador se transmite a los iones aceptores, que son el tulio y el erbio, y estos son los que finalmente emiten la fotoluminiscencia. Los iones aceptores y sensibilizadores deben interactuar mediante un mecanismo multipolar (30).



**Figura 6.** Diagrama de la conversión ascendente entre un ion Yb y un ion Er (a); y dos iones Er (b). (30)

#### 6.4 Matriz de las UCNPs:

El núcleo de las UCNPs (nanopartículas de conversión ascendente) está formado principalmente de nanocristales dopados con lantánidos (31), y están basados en matrices como  $\beta$ -NaYF<sub>4</sub> (32) o matrices como CaF<sub>2</sub> (33), en un componente activador y un componente sensibilizador. Los lantánidos juegan un papel importante como activadores y

sensibilizadores. Para incorporar iones **activadores** se puede usar elementos como Erblio (Er), Holmio (Ho) y Tulio (Tm) (34); mientras que para incorporar iones **sensibilizadores o dadores** se pueden usar elementos como el Iterbio (Yb) o Neodimio (Nd).

Entre las UCNPs dopadas con lantánidos, la matriz  $\beta$ -NaYF<sub>4</sub> es de particular interés. Se usa mucho en fase cristalina beta porque es la más eficiente debido a su baja energía de fonón. Esta matriz  $\beta$ -NaYF<sub>4</sub> existe en simetría cúbica o en fase hexagonal. La simetría hexagonal es aproximadamente 10 veces más eficiente que la simetría cúbica y esto es debido a que la hexagonal tiene menor simetría que la fase cúbica. Esto repercute en una menor distancia en la hexagonal de 3,548 Å con respecto a los 3,868 Å de la simetría cúbica entre dos iones lantánidos vecinos. Por tanto, la simetría hexagonal favorece una mayor eficiencia de la ETU (35).

#### **6.4.1** Métodos de preparación de las matrices y las UCNP:

La preparación de las matrices  $\beta$ -NaYF<sub>4</sub> se realiza mediante diversos métodos y uno de ellos es el método de maduración de Ostwald (*Ostwald Ripening*), que consiste en un fenómeno de recristalización de partículas en el que los cristales pequeños, más solubles que los cristales grandes, se disuelven y precipitan en forma de partículas de mayor tamaño (36).

Otra forma de síntesis y formación de las UCNPs es la síntesis de nanopartículas NaYF<sub>4</sub>:Yb<sup>3+</sup>(16%),Er<sup>3+</sup>(2%) recubiertas de oleato. El proceso consiste en la disolución de los lantánidos, mediante agitación y bajo una atmósfera de N<sub>2</sub>, en una mezcla de ácido oleico y octadeceno. La mezcla resultante se enfría a temperatura ambiente y, posteriormente se añade metanol que contiene NaOH 0,5 M y NH<sub>4</sub>F 0,8 M dando lugar a una suspensión coloidal. Esta suspensión coloidal se agita durante 30 minutos bajo un flujo de nitrógeno, para después calentarla con reflujo durante 90 minutos. Al enfriar la mezcla a temperatura ambiente las UCNPs precipitan por adición de etanol y se aíslan por centrifugación, se lavan y se purifican y se dispersan en ciclohexano (37).

Para reemplazar los ligandos de oleato unidos a la UCNP utilizamos la técnica de intercambio de ligandos utilizando el tetrafluoroborato de nitrosonio (NOBF<sub>4</sub>). Añadimos a la mezcla anterior de las nanopartículas en ciclohexano, dimetilformamida (DMF). Esto da lugar a un sistema bifásico; en la parte superior está el ciclohexano con las UCNPs recubiertas con ácido oleico y en la parte inferior está la dimetilformamida. A este sistema se le añade el tetrafluoroborato de nitrosonio y se mantiene en agitación durante 60 minutos. Durante este intervalo de tiempo tiene lugar el paso de las UCNP de la fase superior de ciclohexano a la fase inferior de dimetilformamida. Se separan ambas fases y las UCNP precipitan añadiendo cloroformo y se separan por centrifugación. Estos últimos dos pasos se repiten 3 veces para evitar la formación de aglomerados de las UCNP (37).

#### **6.4.2** Elección de la matriz que compone la UCNP:

Para el desarrollo de esta nanopartícula vamos a usar como matriz dopada el  **$\beta$ -NaYF<sub>4</sub> de simetría hexagonal: Yb<sup>3+</sup>, Er<sup>3+</sup>, Tm<sup>3+</sup>**; ya que se considera una de las matrices más eficientes en la conversión ascendente (38). Sin embargo, existe un inconveniente con estas nanopartículas y es que se ha observado una disminución en la luminescencia de conversión ascendente debido a las vibraciones del agua (39) y, además, se ha observado que las

nanopartículas tienden a desintegrarse en medios o tampones acuosos (40). Esto ocurre porque las nanopartículas son sales poco solubles, con un valor de  $K_{ps} = 10^{-26}$ , y en baja concentración pueden disolverse. En el caso del tampón fosfato ocurre que los lantánidos con el fosfato tienen valores de  $K_{ps}$  más bajas que los tetrafluoruros desplazando el equilibrio hacia a los fosfatos. Por ello sería interesante conseguir un recubrimiento de la nanopartícula que amortiguara la pérdida de la luminiscencia. Este recubrimiento lo obtenemos basándonos en un estudio realizado en la Universidad de Turku, Finlandia (41). En este estudio se recubrieron las nanopartículas con 2 tipos de polielectrolitos de carga negativa e iones de neodimio (Nd) con carga positiva. Nuestra nanopartícula será recubierta con uno de estos polielectrolitos: el ácido poliacrílico (PAA). De esta forma conseguiremos aumentar la eficacia de la nanopartícula de conversión ascendente y disminuir la pérdida de luminiscencia sin alterar su funcionalidad (41).

### 6.5 Péptidos citrulinados:

Los CCP son los que hemos descrito anteriormente en la introducción, y son los que vamos a anclar a la nanopartícula con el objetivo de detectar presencia de ACPA en la muestra. Se han conseguido sintetizar CCP artificiales de varias generaciones: (42)

- CCP1: primera generación.
- CCP2: segunda generación.
- CCP3: tercera generación.

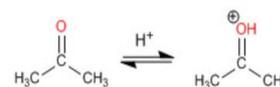
Schellekens y sus colaboradores, en 1998, produjeron péptidos citrulinados lineales sintéticos derivados de la filargina humana (43). Para mejorar la detección de los anticuerpos se desarrolló un péptido citrulinado cíclico (44).

Los CCP2 y CCP3 se comercializan como ensayos por varias empresas para el diagnóstico de la AR por ELISA-inmunoensayo. Los que vamos a usar para el desarrollo del sensor van a ser los CCP2 ya que no tienen homología conocida con ninguna proteína humana, su sensibilidad es superior a los CCP1 y son los más usados en clínica (45).

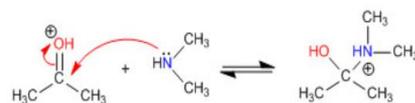
#### 6.5.1 Anclaje de los CCP a la UCNP:

En la figura 2 vemos la reacción de citrulinación por la cual se forma la citrulina. Para poder anclar los CCP2 (péptido sintético de citrulina de segunda generación) a la UCNP nos vamos a aprovechar de la cetona (rodeada en la figura 2) que forma parte de su estructura química. Nos basamos en el mecanismo de formación de enaminas para el anclaje de CCP2 a la UCNP. En primer lugar vamos a usar metilamina ( $\text{CH}_3\text{NH}_2$ ). Esta metilamina (figura 7) se va a unir por muchos sitios de unión, por el par de

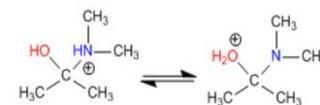
Etapa 1. Protonación del carbonilo



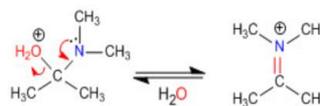
Etapa 2. Ataque nucleófilo de la amina secundaria



Etapa 3. Equilibrio ácido-base



Etapa 4. Pérdida de agua



Etapa 5. Eliminación

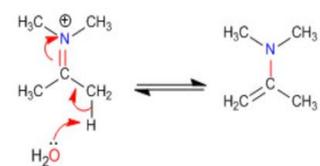


Figura 7. Formación de la enamina

electrones del N, a la UCNP dando lugar a  $\text{CH}_3\text{NH-UCNP}$ . La metilamina se une a la UCNP por diversos puntos gracias a la gran superficie que tiene.

Una vez realizado esto, enfrentamos la nanopartícula, rodeada de ligandos de metilamina a los CCP2 que vamos a usar para detectar los ACPA. Estos CCP2 tienen una estructura similar a la citrulina, pero con la diferencia de que son cíclicos. Para que los CCP2 se unan nos aprovechamos de la condensación de carbonilos con aminas secundarias que dan lugar a enaminas. Es este proceso que vemos en la figura Y a modo de ejemplo. En la figura  $\text{CH}_3\text{NHCH}_3$  correspondería a  $\text{CH}_3\text{NH-UCNP}$ , y la acetona correspondería al CCP2. De esta forma conseguimos anclar los CCP2 a la nanopartícula y tenemos montado el sensor. Este proceso se da a lo largo de toda la superficie de la nanopartícula para que se puedan unir a una misma nanopartícula muchos ACPA y así conseguir que la señal de emisión de luminiscencia sea suficientemente fuerte (46).

## **6.6 ACPA:**

Para poder proceder a anclar los anticuerpos en el soporte sólido del pocillo primero vamos a explicar la morfología de los anticuerpos y después la elección del propio soporte sólido.

Los anticuerpos o inmunoglobulinas son glicoproteínas caracterizadas por una gran especificidad y sensibilidad frente al antígeno al que están dirigidos. Cada anticuerpo lo forman 4 cadenas polipeptídicas, de las cuales dos son cadenas ligeras (25kDa) y las otras dos son cadenas pesadas (50kDa) unidas entre sí por puentes disulfuro, dando al anticuerpo forma de "Y". Las cadenas pesadas y ligeras se fragmentan en tres partes: dos fragmentos Fab y un fragmento Fc. El fragmento Fab (Fragment Antigen Binding) es el fragmento de unión al antígeno, mientras que el fragmento Fc (Fragment Crystallizable) es el cuerpo de la inmunoglobulina y es el que se une a los receptores de membrana de las células y proteínas séricas. La región Fc de los anticuerpos es la que normalmente se ancla en los soportes sólidos para las técnicas inmunológicas, ya que la región Fab debe quedar libre para que interactúe con el antígeno. Otra zona importante que debemos mencionar es la región bisagra del anticuerpo que corresponde a los puentes disulfuro; esta región da cierta capacidad de flexibilidad al anticuerpo permitiendo que tome distintas disposiciones. De esta forma, esta flexibilidad permite que se pueda unir a los antígenos con fuerza aunque estos estén a mayor distancia (47).

Las cadenas polipeptídicas de los anticuerpos varían mucho en su secuencia de aminoácidos y esto se da en la región variable del anticuerpo o región V, que es el sitio de unión a antígenos. Esta variabilidad es la que permite la gran especificidad de anticuerpos frente a antígenos. Mientras que el resto del anticuerpo tiene una variación mucho más limitada y es lo que se conoce como región constante o región C (48).

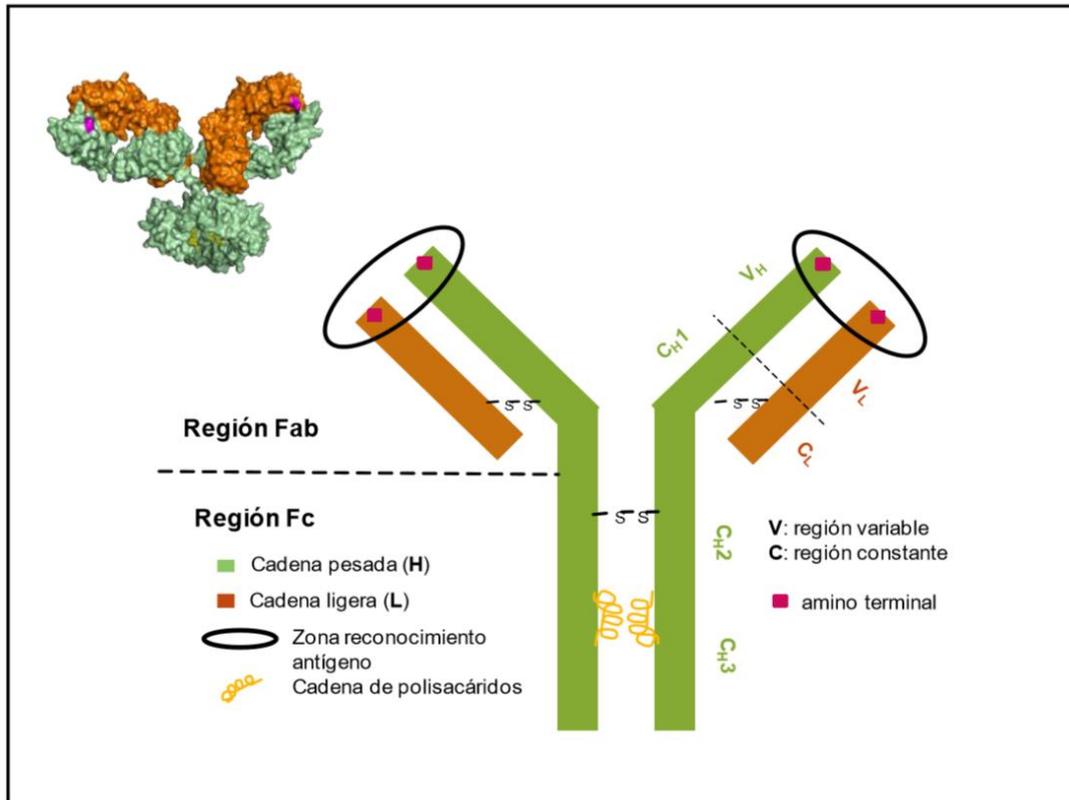


Figura 8. Esquema general de un anticuerpo (47)

Los anticuerpos que vamos a anclar en nuestro soporte sólido para su detección van a ser los explicados en la introducción: los ACPA.

- **Purificación de la muestra:** para la purificación de la muestra del paciente y conseguir extraer los anticuerpos vamos a usar el método de purificación de anticuerpos por precipitación con sulfato amónico. Es uno de los más métodos más frecuentes. Consiste en una elevación de la concentración salina, consiguiendo que determinadas proteínas disminuyan su solubilidad hasta que acaben precipitando. Los anticuerpos tienen la ventaja de precipitar a menor concentración de sulfato amónico que otras proteínas debido a la característica alta hidrofobicidad que tienen (49).

### 6.6.1 Elección del soporte al que se van a anclar los ACPA:

Hay diversos soportes sólidos estudiados que son muy efectivos para anclar anticuerpos en técnicas de inmunoensayo y análisis. El soporte sólido que vamos a usar está basado en unión de anticuerpos a proteína G de *Streptococcus sp.* Esta proteína G está en la pared celular de estas bacterias y tiene 2 dominios por los que se une con una alta especificidad a la región Fc de los anticuerpos. Debemos tener presente un inconveniente de este método y es que, aunque se permite la inmovilización de los anticuerpos con una orientación adecuada dejando expuesta la región Fab para su unión al antígeno, hay que tener en cuenta que la propia orientación de la proteína G limita la eficiencia del mecanismo. Es importante controlar la orientación de las proteínas G como soporte sólido, así como la orientación de los anticuerpos

de la muestra ya que si no se colocan de forma correcta influiría en la detección y daría una señal fotoluminiscente mucho menor de la que debería (50).

## 7 CONCLUSIONES

Con el desarrollo de este trabajo concluimos que:

- La UCNP pensada en este trabajo de investigación estaría compuesta por la fase  $\beta$  del  $\text{NaYF}_4$  dopada con  $\text{Yb}^{3+}$  y  $\text{Er}^{3+}$ . Está recubierta con ácido poliacrílico para disminuir las pérdidas de luminiscencia por las vibraciones del agua o la desintegración de la UCNP.
- La funcionalización superficial de las UCNP permitiría alcanzar el doble objetivo de proteger las nanopartículas del medio y a la vez de ofrecer un sitio de anclaje para los péptidos específicos para detectar los autoanticuerpos de la artritis reumatoide.
- Los péptidos utilizados en la funcionalización de la UCNP son CCP2 sintéticos y específicos para la detección de los ACPA. Tienen una sensibilidad superior al resto de CCP sintéticos de otras generaciones y, además, no tienen homología conocida con ninguna proteína humana.
- La UCNP pensada en este trabajo de investigación va dirigida a detectar ACPA, que es el biomarcador más específico de la artritis reumatoide, y su detección permite un diagnóstico precoz de la artritis reumatoide.
- La detección de los ACPA, por la UCNP funcionalizada, se basa en la conversión ascendente, en concreto en la ETU (*Energy Transfer Upconversion*) que consiste en la transferencia de energía sucesiva de dos iones sensibilizadores a un ion activador para lograr la conversión ascendente de frecuencia.

## 8 BIBLIOGRAFÍA

1. Hospital Universitario Ramón y Cajal de la Comunidad de Madrid. "Protocolo de cáncer de mama". 2013. Información sacada de este enlace: [http://seoq.org/docs/protocolo\\_cancer\\_mama\\_huryc.pdf](http://seoq.org/docs/protocolo_cancer_mama_huryc.pdf)
2. Cobos Palacios, L; Caballero Martínez, L.F; López Carmona, M.D. "Diagnostic protocol and quantification of cardiovascular risk factors". Medicine- Programa de Formación Médica Continuada Acreditado, 2017. 12 (42): 2509-2515
3. Información sacada de este enlace: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/003538.htm>
4. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. "Protocolo de actuación frente a casos sospechosos de enfermedad por virus ébola (EVE)", 2015. Información sacada de este enlace: [https://www.msbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/ebola/documentos/16.06.2015-Protocolo\\_Ebola.pdf](https://www.msbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/ebola/documentos/16.06.2015-Protocolo_Ebola.pdf)
5. Sargent, T. "La danza de las moléculas. Cómo la nanotecnología cambia nuestras vidas". ESPASA HOY; 2005. Páginas 60-64.
6. Información sacada de este enlace: <http://www.fundacionunam.org.mx/unam-al-dia/la-unam-te-explica-que-son-las-nanoparticulas/>

7. Prescott, LM; Harley, JP; Klein, DA. "Microbiología". México, D.F.: McGraw-Hill Interamericana; 2004. Página 27
8. Información sacada de este enlace: <https://solmeglas.com/nanoparticulas-medicina-cosmetica/>
9. Bouwmeester, H; van der Zande, M; Jepson, MA. "Effects of food-borne nanomaterials on gastrointestinal tissues and microbiota". Wiley Interdisciplinary Reviews Nanomedicine and Nanobiotechnology, 2018. 10(1):e1481.
10. Información sacada de este enlace: <https://solmeglas.com/que-son-nanoparticulas-tipos/>
11. Simes, LE; Brich, T. "Bioquímica orientada al análisis químico". Buenos Aires: Jorge Sarmiento Editor - Universitas; 2015. Capítulo 3, páginas 19-29.
12. Gómez-Velasco, A; León-Cortés, JL; Gordillo-Marroquín, C; Sánchez-Pérez, HJ; Alocilja, EC; Muñoz-Jiménez, SG; Bencomo-Alarm, A; Enríquez-Ríos, Natán; Jonapá-Gómez, L; Gómez-Bustamante, A. "Uso de nanopartículas magnéticas y un biosensor para el diagnóstico y monitoreo de enfermedades infecciosas emergentes, re-emergentes y tropicales desatendidas". Revista Enfermedades Emergentes, 2019. 18(1):23-31.
13. C. de Moel, E; F. A. M. Derkensen, V; A. Trouw, L; Bang, H; Collée, G; R. Lard, L; Ramiro, S; W. J. Huizinga, T; F. Allaart, C; E. M. Toes, R; van der Woude, D. "In rheumatoid arthritis, changes in autoantibody levels reflect intensity of immunosuppression, not subsequent treatment response". BioMed Central, 2019: 10.1186/s13075-019-1815-0
14. Información sacada de este enlace: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/000431.htm>
15. Makrygiannakis, D; Hermansson, M; Ulfgren, AK; Nicholas, AP; Zendman, AJ; Eklund, A; Grnewald, J; Skold, CM; Klaresog, L; Catrina, AI. "Smokin increases peptidylarginine deiminase 2 enzyme expression in human lungs and increases citrullination in BAL cells" Annals of the Rheumatic Diseases, 2008. 67(10): 1488-92.
16. Castillo Solano, FD. "Determinación de especificidad y sensibilidad del anticuerpo antipeptido ciclico citrulinado (anti-CCP) vs factor reumatoide e el diagnóstico temprano de artritis reumatoidea en pacientes de la ciudad de Loja" [Trabajo de Fin de Grado]. [Loja- Ecuador]. Universidad Técnica Particular de Loja. Escuela de Bioquímica y Farmacia, 2010.
17. Información sacada de este enlace: [https://www.uptodate.com/contents/pathogenesis-of-rheumatoid-arthritis?search=acpa&source=search\\_result&selectedTitle=4~83&usage\\_type=default&display\\_rank=4#H9](https://www.uptodate.com/contents/pathogenesis-of-rheumatoid-arthritis?search=acpa&source=search_result&selectedTitle=4~83&usage_type=default&display_rank=4#H9)
18. Sanmartí, R; Gómez-Puerta, JA. "Biomarcadores en la artritis reumatoide". Reumatología clínica, 2011. 6(S3): 1-38
19. Lee, DM; Schur, PH. "Clinical utility of the anti - CCP Assay in Patients with Rheumatic diseases". Ann Rheum Dis, 2003. 62: 870- 4.
20. Carubbi, F; Alunno, A; Gerli, R; Giacomelli R. "Post-Translational Modifications of Proteins: Novel Insights in the Autoimmune Response in Rheumatoid Arthritis". Cells, 2019. 29; 8(7).
21. van Venrooij, WJ; van Beers, JJ; Pruijn, GJ. "Anti-CCP antibodies: the past, the present and the future". Nature Reviews Rheumatology, 2011. 7; 7(7).
22. Carubbi, F; Alunno, A; Gerli, R; Giacomelli R. "Post-Translational Modifications of Proteins: Novel Insights in the Autoimmune Response in Rheumatoid Arthritis". Cells, 2019. 29; 8(7).

23. Mendez-Gonzalez, D; Laurenti, M; Latorre, A; Somoza, A; Vazquez, A; Negredo, AI; López-Cabarcos, E; Calderón, OG; Melle, S; Rubio-Retama, J. "Oligonucleotide Sensor Based on Selective Capture of Upconversion Nanoparticles Triggered by Target-Induced DNA Interstrand Ligand Reaction" *Applied Material and Interfaces*, 2017. 9: 12272-12281.
24. Caselles Pomares, MJ; Gómez Antón, MR; Molero Meneses, M. "Química aplicada a la ingeniería". Madrid: UNED - Universidad Nacional de Educación a Distancia; 2015. Capítulo 1. Página 49.
25. Layfield, R; Murugesu, M. "Lanthanides and Actinides in Molecular Magnetism". Berlin: John Wiley & Sons, Incorporated; 2015. Páginas 1-2.
26. Benelli, C; Gatteschi, D. "Introduction to Molecular Magnetism : From Transition Metals to Lanthanides". Somerset: John Wiley & Sons, Incorporated; 2015. Páginas 14-15.
27. Información sacada de este enlace: <https://www.textoscientificos.com/quimica/lantanidos>
28. Mitchem, BH; Sharnham, CL; editors. "Clinical Chemistry Research". New York: Nova Science Publishers, Incorporated; 2009.
29. Dawei, L; Chenchen, M; Suehyun, KC; Sungmo, A; Wounjhang, P. "Experimental demonstration of plasmon enhanced energy transfer rate in NaYF<sub>4</sub>:YB<sup>3+</sup>,Er<sup>3+</sup> upconversion nanoparticles". *Scientific Reports*, 2016. 6:18894.
30. Taboada Gutiérrez, J. "Síntesis, caracterización y propiedades ópticas de nanopartículas de titanato de estroncio dopado con tierras raras" [Trabajo de Fin de Máster] [Cantabria-España] Universidad de Cantabria, Facultad de Ciencias, 2017.
31. Alonso-de Castro, S; Ruggiero, E; Salassa, L. "Nuevos Materiaes de Conversión Ascendente para Fotoquimioterapia con Complejos de Metales de Transición". Información sacada de este enlace: <http://cicnetwork.es/sin-categoria/nuevos-materiales-de-conversion/>
32. Homann, C; Krukewitt, L; Frenzel, F; et al. "NaYF<sub>4</sub>:Yb,Er/ NaYF<sub>4</sub> Core/Shell nanocrystals with High Upconversion Luminiscence Quantum Yield". *Angwandte Chemie International Edition*, 2018. 57: 8765-8769.
33. Ishii, A; Adachi, Y; Hasegawa, A; Komaba, M; Ogata, S; Hasegawa, M. "Multicolor upconversion luminiscence of dye-coordinated Er<sup>3+</sup> at the interface of Er<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and CaF<sub>2</sub> nanoparticles". *Science and Technlogy of Advances Materials*, 2019. 20(1): 44-50.
34. Guo, H; Sun, S. "Lanthanide-Doped upconverting phosphors for bioassay and therapy". *Nanoscale* 2012, 4 , 6692–6706.
35. Damasco, JA; Chen, G; Shao, W; Agren, H; Huang, H; Song, W; Lovell, JF; Prasad, PN. "Size-Tunable and Monodisperse Tm<sup>3+</sup>/Gd<sup>3+</sup> -Doped Hexagonal NaYF<sub>4</sub> Nanoparticles with Engineered Efficient Near Infrared-to-Near Infrared Uconversion for In Vivo Imaging". *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2014. 6(16): 13884-13893
36. van Westen, T; Groot, RD. "Effect of Temperature Cycling on Ostwald Ripening". *Crystal Growth & Design*, 2018. 18(9): 4952-4962.
37. Estebanez, N; González-Béjar, M; Pérez-Prieto,J. "Polysulfonate Cappings on Upconversion Nanoparticles Prevent their Disintegration in Water and Provide Superior Stability in a Highly Acidic Medium" *ACS Omega*, 2019. 4, 2, 3012-3019.
38. Yang, S; Tse, WH; Zhang, J. "Deposition of Antibody Modified Upconversion Nanoparticles on Glass by a Laser-Assisted Method to Improve the Performance of Cell Culture". *Nanoscale research Letters*, 2019. 14:101.

39. Arppe, R; Hyppanen, I; Perälä, N; Peltomaa, R; Kaiser, M; Würth, C; Cristo, S; Resch-Genger, U; Schäferling, M; Soukka, T. "Quenching of the upconversion luminescence of NaYF<sub>4</sub>:Yb<sup>3+</sup>,Er<sup>3+</sup> and NaYF<sub>4</sub>:Yb<sup>3+</sup>,Tm<sup>3+</sup> nanophosphors by water: the role of the sensitizer Yb<sup>3+</sup> in non-radiative relaxation". *Nanoscale*, 2015. 7: 11746–11757.
40. Plohl, O; Kraft, M; Kovac, J; Belec, B; Ponikvar-Svet, M; Würth, C; Lisjak, D; Resch-Genger, U. "Optically Detected Degradation of NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm-Based Upconversion Nanoparticles in Phosphate Buffered Saline Solution". *Langmuir*, 2017. 33, 2, 553-560.
41. Palo, E; Lahtinen, S; Pääkkilä, H; Salomäki, M; Soukka, T; Lastusaar, M. "Effective Shielding of NaYF<sub>4</sub>:Yb<sup>3+</sup>,Er<sup>3+</sup> Upconverting Nanoparticles in Aqueous Environments Using Layer-by-Layer Assembly". *Langmuir*, 2018. 34(26): 7759-7766.
42. Aggarwal, R; Liao, K; Nair, R; Ringold, S; Costenbender, KH. "Anti-citrullinated peptide antibody assays and their role in the diagnosis of heumatoid arthritis". *Arthritis Care & Research*, 2009. 61 (11): 1472-1483.
43. Schellekens, GA; de Jong, BA, van den Hoogen, FH; van de Putte LB, van Venrooij, WJ."Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies". *The Journal of Clinical Investigation*, 1998. 101(1): 273-281.
44. Schellekens, GA; Visser, H; de Jong, BA, van den Hoogen, FH; Hazes, JM; Breedveld, FC; van Venrooij, WJ. "The diagnostic properties of reumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide". *Arthritis and rheumatism*, 2000. 43(1): 155-63.
45. Sanmartí, R; Gómez-Puerta, JA. "Biomarcadores en la artritis reumatoide". *Reumatología clínica*, 2011. 6(S3): 1-38
46. Bruckner, R. "Advanced Organic Chemistry: Reaction Mechanisms". San Diego: Elsevier Science & Technology; 2001. Páginas: 300-302.
47. Batalla Bosquet, P. "Nuevos métodos para la inmovilización orientada de anticuerpos sobre soportes sólidos" [Tesis doctoral] [Madrid-España] Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, 2009.
48. Parham, P. "Inmunología" (4a. ed.). Distrito Federal: Editorial El Manual Moderno; 2015. Pagina 82
49. Información sacada de este enlace: <http://www.abynetek.com/metodos-de-purificacion-de-anticuerpos/>
50. de Juan Franco, A. "Estrategias de inmovilización de anticuerpos para la detección directa de hormonas mediante Inmunosensores de Resonancia de Plasmón Superficial" [Tesis doctoral] [Barcelona-España] Universitat Autònoma de Barcelona, Facultad de Medicina, 2013