

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DEPARTAMENTO DE FÍSICA

Estudio Bioquímico y Estructural de Sangre Gamma Irradiada con Nanodiamantes Carboxilados como Precusores de Reoxigenación

Tesis que como requisito para obtener el grado de Doctor en
Nanotecnología

Presenta:

M.C Mónica Alessandra Acosta Elías

Director: Dr. Martín Rafael Pedroza Montero.

Co-Director: José García Solé

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

RECONOCIMIENTO

Al comité de Tesis:

Dr. Martin Rafael Pedroza Montero.
Presidente

Dr. Marcelino Barboza Flores.
Secretario

Dr. Rodrigo Meléndrez Amavizca.
1er Vocal

Dr. Mario Enrique Álvarez Ramos.
2do Vocal

Dr. José García Solé
Sinodal Externo.

DEDICATORIA

A mi esposo e hijas, mis padres, hermanas, abuelos y amigos, por todo su apoyo incondicional

AGRADECIMIENTOS

Sin lugar a dudas este proyecto se lo dedico especialmente a mi esposo Francisco quien me ha brindado todo su apoyo incondicional, comprensión y por su puesto su infinito amor. Durante este trayecto llegaron mis hermosas hijas Alessandra y Alondra quienes han tenido paciencia y comprensión (aun ellas sin saberlo). Estas personitas me han llenado de ganas de dar lo mejor de mi cada día. Sin poder faltar una gran persona que nos ha ayudado para poder dedicar todo el tiempo extra necesario mi suegra Esperanza Félix, agradezco por todo su apoyo.

Agradezco infinitamente a mis padres Leonardo y Graciela ya que sin ellos nada de esto fuera posible, me han brindado su incondicional apoyo desde siempre y han hecho de mi lo que hoy soy. Gracias por ser una gran motivación y enseñarme a luchar por mis metas.

A mi Director Dr. Martin Pedroza por la confianza que deposito en mí, así como su apoyo profesional y personal, Dr. José García Solé por ser una guía académica y una gran persona, Dra. Aracely Angulo Molina una gran amiga que me ayudo en momentos importantes académica y personalmente, Dr. Enrique Álvarez Ramos quien me invito a inicial el posgrado en esta área.

A mi comité sinodal, por su importante colaboración en este trabajo, disponibilidad y apoyo.

A la Universidad de Sonora, a la División de Ciencias Exactas y Naturales, al Departamento de Física y Al posgrado de Nanotecnología. A Conacyt por el financiamiento del proyecto.

¡Muchas gracias a todos!

INDICE

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABLAS	ix
RESUMEN.....	x
1. INTRODUCCIÓN.	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Tejido Sanguíneo.....	3
2.1.1 Glóbulos rojos y su función.....	3
2.1.2 Enfermedad injerto contra huésped asociada a transfusión.	5
2.2 Radiación gamma (γ).....	8
2.3 Irradiación de sangre para transfusión.....	9
2.3.1 Efectos de la radiación gamma en glóbulos rojos	9
2.4 Espectroscopia Raman.....	12
2.5 Espectroscopia Raman en sistemas biológicos.	14
2.5.1 Espectroscopia Raman de glóbulos rojos.....	14
2.5.2 Espectroscopia Raman Resonante de glóbulos rojos.....	14
2.5.3 Estudio de los modos vibracionales Raman de la hemoglobina.....	17
2.6 Microscopia de Fuerza Atómica.	20
2.7 Nanopartículas en aplicaciones biomédicas.	23
2.7.1 Nanodiamantes	24
3. HIPÓTESIS	26
4. OBJETIVO GENERAL	26
5. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	26
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
6.1 Irradiación de sangre y almacenamiento.....	27

6.2 Obtención y tratamiento de sangre periférica incubados con cNDs.	27
6.3 Síntesis y principales características de nanodiamantes de detonación.....	28
6.4 Síntesis de nanodiamantes carboxilados.	28
6.5 Viabilidad de glóbulos rojos en presencia de NDs y cNDs.	29
6.6 Fragilidad osmótica de glóbulos rojos gamma irradiados y almacenados.	29
6.7 Desoxigenación y reoxigenación de glóbulos rojos.	30
6.8 Espectroscopia Raman de glóbulos rojos almacenados y gamma irradiados.	30
6.9 Espectroscopia Raman de glóbulos rojos almacenados y gamma irradiados incubados con nanodiamantes.	31
6.10 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)	32
7. RESULTADOS Y DISCUSION	33
7.1 Estudio morfológico y estructural de sangre gamma irradiada y almacenada.	34
7.1.1 Evaluación de la fragilidad osmótica de la membrana en glóbulos rojos almacenados e irradiados.	34
7.1.2 Alteración morfológica de los glóbulos rojos.	37
7.1.3 Alteración de la microestructura superficial en la membrana de glóbulos rojos.....	39
7.1.4 Análisis de sangre gamma irradiada y almacenada mediante espectroscopía Raman.....	42
7.2 Procesos de reoxigenación asistido con nanodiamantes carboxilados en glóbulos rojos gamma irradiados y almacenados.....	44
7.2.1 Técnicas de caracterización estructural de nanodiamantes y nanodiamantes carboxilados.	44
7.2.2 Técnicas de caracterización morfológica de nanodiamantes carboxilados. ..	47
7.2.3 Estudio de la hemólisis de glóbulos rojos por nanodiamantes.....	48
7.2.4 Estudio del proceso de reoxigenación en glóbulos rojos gamma irradiados..	49
7.2.4.1 Reoxigenación de glóbulos rojos gamma irradiados asistidos con cNDs.....	49
7.2.4.2 Estudio del proceso de reoxigenación asistidos con cNDs de glóbulos rojos gamma irradiados y almacenados durante tres días.	51

7.2.4.3 Estudio del proceso de reoxigenación asistidos con cNDs de glóbulos rojos gamma irradiados y almacenados durante cinco días.	52
7.3 AFM de glóbulos rojos + cNDs.	53
7.4 Modelo fenomenológico: Interacción cNDs – Glóbulos rojos.	54
8. CONCLUSIONES.	55
9. REFERENCIAS.	56
10. ANEXOS.	62

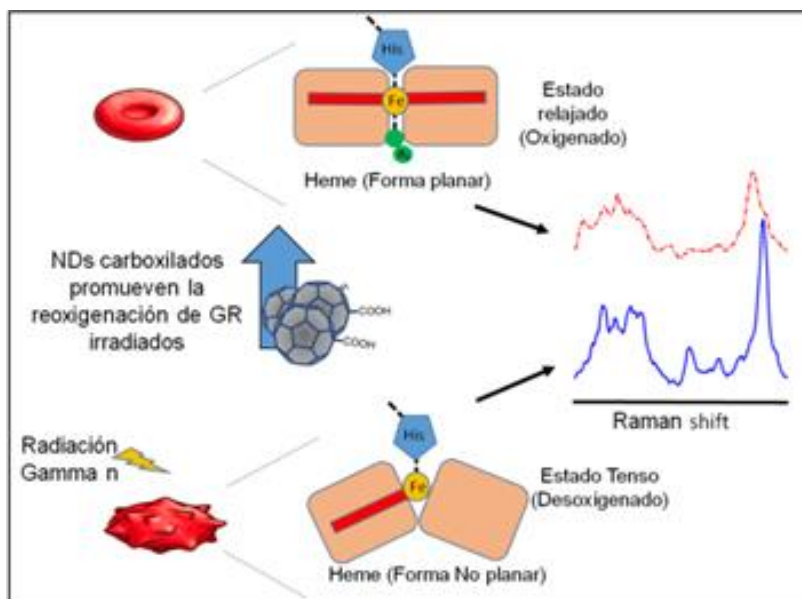
LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Glóbulo rojo que contiene la estructura de la molécula de hemoglobina situada en el eritrocito.....	15
Figura 2. Grupo Hemo de la hemoglobina.....	16
Figura 3. Esquema del proceso para la toma de espectros Raman.....	22
Figura 4. Configuración de la hemoglobina	25
Figura 5. Espectro Raman de glóbulo Rojo	28
Figura6. Esquema de la configuración del Microscopio de Fuerza Atómica.....	31
Figura 7. Fragilidad osmótica de glóbulos rojos irradiados y almacenados	45
Figura 8. Imágenes de AFM de γ - GR y almacenados	47
Figura 9. Imágenes ampliadas de la superficie del eritrocito por AFM	49
Figura 10. Espectros Raman promedio de GRs parcialmente oxigenados	53
Figura 11. Espectro infrarrojo por la transformada de Fourier	54
Figura 12. Espectros Raman de nanodiamantes de detonación	55
Figura 13. Dispersión dinámica de la luz de nanodiamantes carboxilados	49
Figura 14. Espectros Raman de glóbulos rojos almacenados al día 3.....	61
Figura 15. Espectros Raman de glóbulos rojos almacenados al día 5.....	62
Figura 16. Imagen de glóbulos rojos por Microscopia de Fuerza Atómica	63
Figura 17. Imagen gráfica de la interacción de cNDs con glóbulos rojos.....	64

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Reacciones de radicales libres con Fe ²⁺	19
Tabla 2.	Características químicas de Nanodiamantes grado G	37
Tabla 3.	Rugosidad de la membrana en glóbulos rojos γ -irradiados y almacenados	50
Tabla 4.	Hemolisis de glóbulos rojos inducida por nanodiamantes.....	58

RESUMEN



En pacientes con el sistema inmunológico comprometido y que requieren de una transfusión sanguínea, el uso de sangre gamma irradiada es una precaución necesaria para prevenir un riesgo mayor como la enfermedad injerto contra huésped asociada a transfusión (EICH-AT). Sin embargo, en la sangre gamma (γ) irradiada se produce un daño oxidativo en los glóbulos rojos (GR), incluyendo anomalías en las membranas celulares que provoca como consecuencia la hemólisis. El aseguramiento de la calidad de sangre a irradiar es el aspecto más importante para considerar. En este punto, los procesos de reoxigenación deben analizarse para obtener un tejido sanguíneo saludable. Una manera directa de realizar esta inspección es estudiar los procesos bioquímicos relacionados con la oxigenación efectiva de los GR. El uso de nanodiamantes carboxilados (cNDs) en estos procesos ha dado resultados favorables. En el mismo sentido existen trabajos previos que presentan a este tipo de nanoestructuras como una plataforma biocompatible, que se ha empleado exitosamente como agente luminiscente para bioimagen. También se ha utilizado como vehículo para la liberación de fármacos y, recientemente, para estudiar procesos de reoxigenación en glóbulos rojos almacenados o expuestos a factores estresantes. Se han reportado datos

experimentales en dónde se plantea que los cNDs pudieran también tener un efecto terapéutico radioprotector en GR debido a que mantienen o ayudan a su recuperación morfológica cuando estos son expuestos a radiación ionizante. Principalmente por la interrupción de los mecanismos generadores de ROS o por la rehidratación de la membrana de GR ya que los cNDs poseen una ligera capa de agua. En este trabajo se evaluó el efecto de la radiación en glóbulos rojos almacenados, a dosis menores de 50 Gy se estudió el daño celular, el daño inducido por radiación y el almacenamiento de sangre y irradiada. Además, se estudiaron los fenómenos de reoxigenación asistidos con cNDs. El estudio bioquímico de los estados de oxigenación de GR fue analizado mediante microespectroscopía Raman, las alteraciones morfológicas y biomecánicas inducidas por radiación y almacenamiento fueron evaluadas mediante Microscopía de Fuerza Atómica (AFM). En conclusión, es posible, mediante este estudio, desarrollar un modelo fenomenológico para estimar el daño en GR inmediatamente después de su irradiación, así como los cambios en el tiempo cuando son almacenados en condiciones estándares de un banco de sangre.

Palabras clave: Glóbulos rojos, Radiación gamma, nanodiamantes, microespectroscopía Raman, Microscopía de Fuerza Atómica.

1. INTRODUCCIÓN

La irradiación de la sangre se requiere para disminuir el riesgo de transfusión asociada a la enfermedad de injerto contra huésped. Los protocolos de irradiación sugieren para la inactivación de linfocitos T, el tejido irradiado reciba dosis mayores a 25 Gy, sin exceder los 50 Gy. Durante este procedimiento, la calidad estructural y funcional de la sangre son cruciales para un tratamiento exitoso. Sin embargo, además de las lesiones de almacenamiento dependientes del tiempo que afectan a las capacidades biomecánicas, la radiación gamma (γ) induce la producción de ROS a través de la radiólisis del agua. Por lo tanto, las ROS pueden alterar la membrana y el citoesqueleto de los glóbulos rojos, lo que perjudica la calidad de la sangre y el éxito de la transfusión. A pesar de la importancia en la salud pública este tejido, la bioquímica y biofísica de este fenómeno es pobremente entendido. Siendo de vital importancia el estudio de las propiedades reológicas a micro y nanoescala para conocer hasta qué punto estas alteraciones afectan la función de los glóbulos rojos.

Diferentes técnicas de caracterización pueden utilizarse para este propósito y, en particular, AFM, la fragilidad osmótica y la espectroscopía Raman pueden resultar relevantes. Siendo estas técnicas utilizadas ampliamente en la Nanotecnología ya que proporcionan información complementaria sobre los cambios en la topografía y la rugosidad (nanoescala), como resultado de los procesos metabólicos, de modo que las células y las biomoléculas de superficie pueden caracterizarse bajo diferentes condiciones, de nuestro particular interés son: el tiempo de almacenamiento y los efectos de la radiación γ . A pesar de su importancia, existen pocos estudios sobre los efectos que el tiempo de almacenamiento y la irradiación γ pueden producir sobre la estructura de la membrana de los glóbulos rojos y el estado de la hemoglobina.

Es importante resaltar que los nanodiamantes carboxilados se han propuesto como nanodetectores de los estados de oxigenación, en este proyecto se utilizaran para evaluar la capacidad de reoxigenación en glóbulos rojos

almacenados e irradiados.

En este trabajo de tesis, se investigó la topografía superficial (micro y nanoescala) de RBC almacenados e irradiados utilizando AFM y la fragilidad osmótica. Mediante espectroscopia Raman se evaluó la integridad de la Hb y el proceso de reoxigenación en presencia y ausencia de cNDs. De esta manera, hemos seguido los efectos de la lesión de almacenamiento y γ -irradiados RBC por el estudio a nanoescala de la estructura de membrana y los estados de oxigenación de la hemoglobina. Es importante remarcar que es la primera vez que se caracteriza tanto la membrana de los glóbulos rojos como la hemoglobina contenida a escala nanométrica, lo que aporta un conocimiento más detallado sobre la interacción de la radiación con los glóbulos rojos.

Finalmente, este trabajo de investigación contribuirá de forma significativa a los avances en el área de la nanomedicina, específicamente en la medicina transfusional.

2. ANTECEDENTES

2.1 Tejido Sanguíneo

El tejido sanguíneo está compuesto por dos tipos de elementos: una parte sólida, compuesta por glóbulos blancos, rojos y plaquetas que constituye alrededor de 45%, y la parte líquida que es el plasma sanguíneo (55%) un fluido amarillento translucido que representa la matriz extracelular líquida en la que están suspendidas las células. Entre las principales funciones de este tejido, se encuentra el transporte de nutrientes y oxígeno. Una función remarcable de la sangre es el mantenimiento de la homeostasis, proceso que consiste en conservar las condiciones estándares de temperatura, pH, viscosidad, la composición, entre otros.

2.1.1 Glóbulos rojos y su función

Los glóbulos rojos (GR) o eritrocitos son discos bicóncavos aproximadamente de 7.5 μm de diámetro y 2.5 μm de grosor. Estas células tienen gran capacidad de deformación, lo que les permite pasar a través de los capilares. Estudios científicos han reportado que es importante su forma para su función [1]. En el mismo sentido el glóbulo rojo es la célula más abundante en el organismo la cual carece de núcleo y mitocondria, su citoplasma está ocupado mayoritariamente por la hemoglobina (Hb), alrededor de 250 millones de moléculas por eritrocito [2]. Además, el GR en su interior contiene una mezcla de agua, sales, proteínas, carbohidratos, etc. Las sales son responsables de otorgarle tonicidad, cuando es sometida a un medio hipotónico, la célula se llena de fluido lo que tendrá como resultado su lisis; mientras que cuando es sometida a un medio hipertónico la célula toma la forma de una pasa deshidratada.

El glóbulo rojo es la célula encargada del transporte de oxígeno desde los órganos respiratorios hasta los tejidos y el dióxido de carbono desde los tejidos hasta los pulmones que lo eliminan, siendo responsable de este proceso bioquímico la heteroproteína mejor conocida como hemoglobina, el componente principal de los

glóbulos rojos (Figura 1). La hemoglobina también participa en la regulación del pH de la sangre en vertebrados y algunos invertebrados; tiene una masa molecular de 64.000 g/mol (64kDa), está compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas a cada una de las cuales se le une un grupo hemo, el cual contiene un átomo de hierro que tiene la capacidad de unirse reversiblemente al oxígeno molecular, esta combinación da el color rojo de la sangre [3].

El grupo hemo es el grupo prostético de la hemoglobina, el cual contiene un ion Fe^{2+} (ferroso) dentro de cuatro subunidades de pirrol unidos entre sí por medio de puentes metino, formando la Protoporfirina IX (Figura 2). Este grupo está localizado en la parte hidrofóbica dentro de las cadenas polipeptídicas. El átomo de hierro se encuentra en el centro del anillo de la Protoporfirina IX y tiene cinco o seis enlaces de coordinación dependiendo de la unión del oxígeno a la Hb, cuatro de sus enlaces son con los nitrógenos de los grupos pirrolicos en un plano horizontal, su quinto enlace es con el nitrógeno del imidazol de la histidina proximal (E7) y el sexto enlace es con el oxígeno, el cual está unido a un segundo imidazol de la histidina distal (F8). El quinto y sexto enlace se encuentran en un plano perpendicular al plano del anillo protoporfirinico.

En el mismo sentido la unión del oxígeno con la hemoglobina es cooperativa, su efecto se debe a la interacción entre los grupos Hemo. Cuando la hemoglobina se une al oxígeno se le conoce como Oxihemoglobina (Forma Relajada) dando un color rojo intenso a la sangre, cuando la hemoglobina pierde al oxígeno se le conoce como hemoglobina reducida o Desoxihemoglobina (Forma Tensa) la cual presenta un color rojo oscuro. Es importante recordar que los glóbulos rojos son un excelente ejemplo de relación estrecha entre forma y función, como ya se mencionó anteriormente su función principal es el transporte de oxígeno y este depende de la difusión rápida de esta molécula a través de su membrana, por lo que, si se ve afectada su forma, la función también se encuentra comprometida.

El tejido sanguíneo se utiliza para transfusiones, en especial los glóbulos rojos. Sin embargo, algunas patologías requieren el uso de sangre gamma irradiada debido a que desarrollan la enfermedad contra huésped asociada a transfusión.

2.1.2 Enfermedad injerto contra huésped asociada a transfusión

La enfermedad injerto contra huésped asociada a transfusión (*EICH-AT*) es una complicación poco frecuente, sin embargo cuando se presenta es letal. Se ha reportado una mortalidad entre el 90-100%[4]. Para que se desencadene la EICH-AT de acuerdo con el criterio de Billingham se deben reunir tres factores esenciales: 1.) El injerto contiene células inmunocompetentes maduras, 2.) El receptor expresa diferencias antigénicas en el complejo principal de histocompatibilidad (CPH) con el donante, 3.) El receptor cuenta con un grado de inmunosupresión, dado que un individuo con un sistema inmune suprimido es incapaz de establecer una respuesta en contra de las células T del donador y por lo tanto desarrolla la EICH-AT [5].

La EICH-AT ocurre debido a que los linfocitos T del donante desencadenan una respuesta inmune al identificar a los linfocitos del receptor como cuerpos extraños. En condiciones normales el receptor rechaza y elimina los linfocitos T del donante, sin embargo cuando existe condición con deficiencia del sistema inmunológico, no hay un rechazo de estos linfocitos T lo que conlleva a una proliferación y posteriormente a la EICH-AT. En términos generales los linfocitos T producen un exceso de citocinas entre las que se encuentran el TNF- α y el IFN- γ . Los desencadenantes de esta reacción pueden ser un gran número de antígenos presentes en las células del receptor, entre los que se encuentran los antígenos leucocitarios humanos mejor conocidos como HLA (human leucocyte antigen). La interacción entre los linfocitos T del donador y las células del receptor que expresan HLA de clase I y II llevan a cabo un daño celular mediado por células asesinas naturales (NK). Siendo los linfocitos T CD4+ los que reconocen diferencias en HLA de clase II y los linfocitos T CD8+ las HLA de clase I [6]. Cuando se presentan diferencias completas en las moléculas del complejo principal de

histocompatibilidad (CMH) de clase I y II, los linfocitos CD4+ y CD8+ pueden iniciar indistintamente la reacción.

Estudios científicos mencionan que algunas patologías como lo son: síndrome de inmunodeficiencia de linfocitos T, pacientes inmunocomprometidos, neonatos prematuros (sistema inmunológico incompetente), Linfoma de Hodking, anemia aplásica, transfusiones intrauterinas, entre otras requieren el uso de sangre irradiada debido a que se han asociado a la enfermedad injerto contra huésped asociado a transfusión (*EICH-AT*) [7-9]. Al desarrollarse esta patología el receptor presenta un síndrome agudo que compromete la piel, el tracto gastrointestinal, el hígado y la médula ósea. Hasta el momento no existe una terapia efectiva para combatir esta patología, por lo que la irradiación de sangre es la única alternativa terapéutica segura.

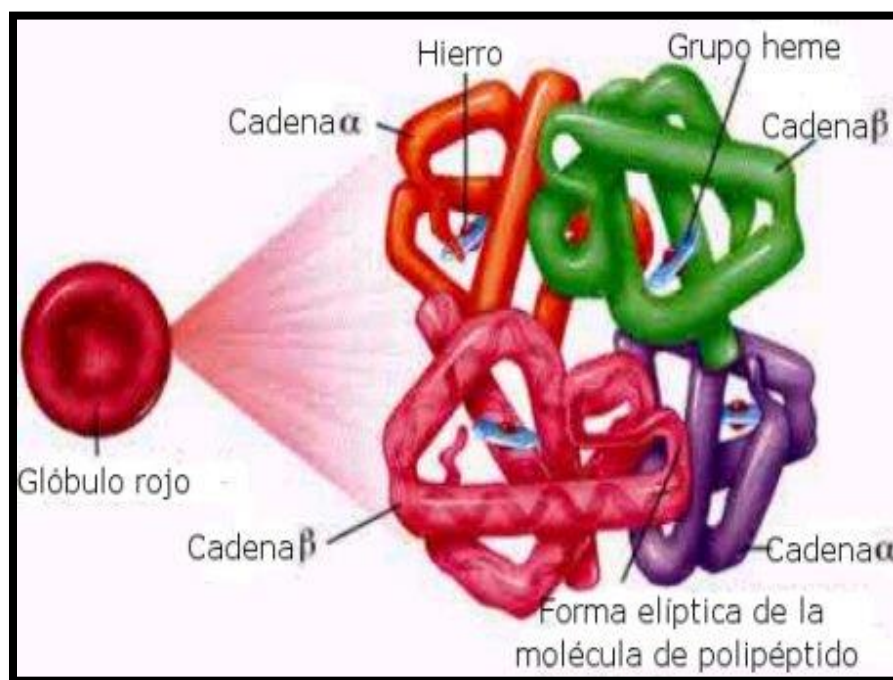


Figura 1 Glóbulo rojo que contiene la estructura de la molécula de hemoglobina situada en el eritrocito.

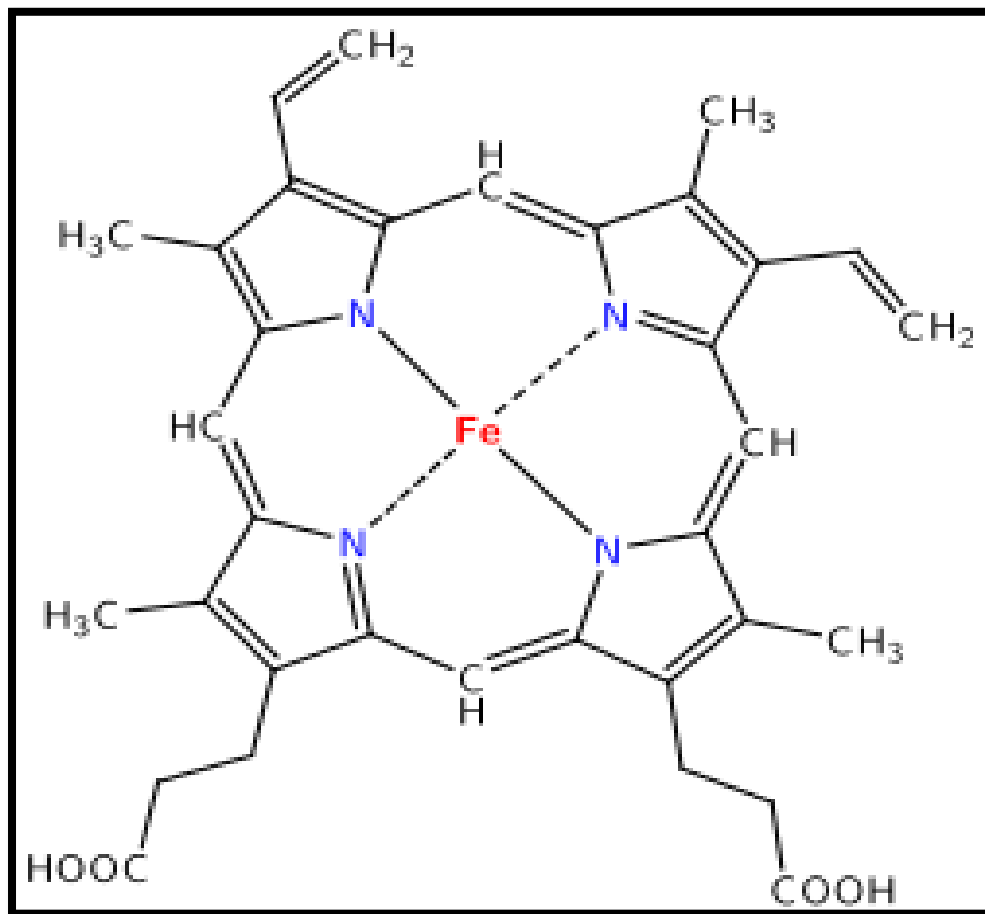


Figura 2. Grupo Hemo de la hemoglobina.

2.2 Radiación gamma (γ)

Los rayos gamma son un tipo de radiación electromagnética de alta frecuencia, siendo sus fotones de alta energía. En el mismo sentido la radiación gamma es de tipo ionizante con gran capacidad de penetración [10, 11]. En el proceso de ionización se arranca un electrón de un átomo o molécula a la cual se le conoce como ion. Los iones suelen ser altamente reactivos y se estabilizan mediante la captura de cargas o bien con la unión a otros átomos o moléculas.

En este proyecto se utiliza una fuente de cobalto 60 (^{60}Co), que decae por desintegración β a ^{60}Ni , siendo este un isotopo estable que emite dos rayos gamma con energías de 1.17 y 1.33 MeV, respectivamente. Cuando los rayos gamma de esta fuente de ^{60}Co interactúan con la materia se generan dos fenómenos físicos principales: el efecto fotoeléctrico y efecto Compton [10]. El efecto fotoeléctrico consiste en la emisión de electrones por un material al incidir sobre él fotones de alta energía; mientras que el efecto Compton se basa en la interacción de un fotón con un electrón libre, teniendo como resultado un cambio en la longitud de onda del haz incidente.

Por otra parte, en el área de radiología y protección radiológica es importante determinar la cantidad de dosis absorbida, esto con el fin de calcular la radiación ionizante que recibió un material, tejido o ser vivo. Siendo el Gray (Gy) la unidad de medida de la radiación gamma, lo que corresponde en el sistema internacional a J/Kg [12]. Una de las aplicaciones de la radiación gamma es la esterilización de tejidos, la cual se logra al reducir la capacidad de reproducción de microorganismos y células. En relación al tejido sanguíneo se utiliza para la inactivación de linfocitos T, y por lo tanto prevenir la enfermedad injerto contra huésped asociada a transfusión en pacientes inmunosuprimidos, la cual se describe en la sección siguiente.

2.3 Irradiación de sangre para transfusión

El procedimiento de irradiación de sangre es un método estandarizado internacionalmente que inactiva a los linfocitos, la dosis de radiación establecida se encuentra entre 15 -50 Gy [7, 8, 13] se considera que a estas dosis los glóbulos rojos son viables. Sin embargo la prevención del daño a los eritrocitos continúa siendo tema de estudio[14, 15].

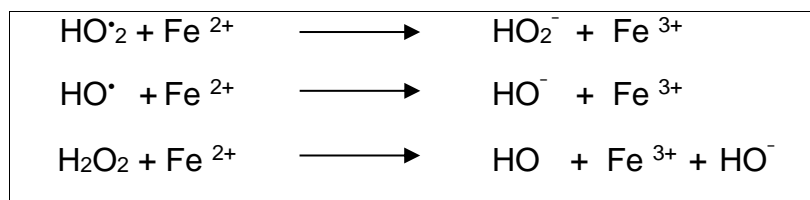
2.3.1 Efectos de la radiación gamma en glóbulos rojos

Investigaciones científicas indican que la radiación gamma produce radicales libres los cuales pueden alterar el estado de lípidos y proteínas al formarse peroxidación de lípidos, formación de puentes disulfuro, entre otros, dañinos para las proteínas membranales por lo que podrían reducir la capacidad de deformación de la membrana y aumentar su rigidez. Teniendo como resultado la pérdida de elasticidad de la membrana y un aumento en la fragilidad osmótica[16]. Además, como producto de la interacción de los GR con la radiación ionizante se produce la hemina que es un producto de oxidación de la hemoglobina, la radiación ionizante también conduce a la destrucción de la membrana. Investigaciones científicas reportan el incremento de hemolisis en glóbulos rojos almacenados por más de 30 días. Sin embargo, este efecto es acelerado por irradiación debido a la inducción en la susceptibilidad de la membrana como se observó por fragilidad osmótica, la cual se describe en la siguiente sección.

Al interaccionar la radiación ionizante (radiación γ) con la sangre se desencadena una serie de procesos bioquímicos en los que se generan radicales libres, los cuales inducen el deterioro temprano de los glóbulos rojos, funcional y estructuralmente. Estudios científicos han reportan que al momento de irradiar la sangre se producen especies reactivas de oxígeno mejor conocidas como ROS, entre ellas están radicales hidroxilo (OH^\cdot) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2)[17]. Altas concentraciones de ROS inducen un daño oxidativo y posteriormente citotoxicidad [18], incluyendo

daño en la membrana y la hemólisis [13, 19]. Aunado a esto, al interactuar la Hb con ROS los iones de Fe^{2+} se pueden oxidar a Fe^{3+} , el cual tiene alta afinidad por el oxígeno. Algunas de las reacciones de oxidación del Hierro (Fe), se proponen en la siguiente tabla [20]:

Tabla 1. Reacciones de radicales libres con Fe^{2+}



2.3.2 Fragilidad osmótica

La fragilidad osmótica es un método antiguo para investigar el estado físico de los eritrocitos. Esta técnica se utiliza para determinar la susceptibilidad de los GR a la hemólisis, cuando estos son expuestos a condiciones estresantes siendo el caso concentraciones hipotónicas o hipertónicas. Una concentración hipotónica es aquella en la cual la cantidad de iones es menor en el interior que al exterior de la célula, en este caso las células tienden a hincharse y reventarse (lisarse), mientras que el caso contrario la hace hipertónica (toma la forma de una pasa deshidratada). La fragilidad osmótica por lo general se expresa como el grado o porcentaje de hemólisis que se produce cuando una muestra de glóbulos rojos se somete a estrés (mecánico, químico o físico). Estudios científicos han reportado resistencia osmótica disminuye durante el almacenamiento debido a la pérdida de una parte de la membrana celular.

En este trabajo se hace uso de esta herramienta para determinar el grado de fragilidad de glóbulos rojos cuando estos son irradiados y almacenados en condiciones estándares de un banco de sangre.

2.4 Espectroscopia Raman

La Espectroscopia Raman se basa en la dispersión de un haz de luz láser por el material. En el proceso de dispersión, la mayoría de la luz dispersada es de la misma frecuencia que la fuente de excitación, siendo el proceso más probable la dispersión elástica o mejor conocida como dispersión Raleigh, donde la energía de la luz no cambia. También puede ocurrir que la dispersión sea inelástica siendo este proceso menos probable (aprox. 5-10% de la intensidad de la luz incidente), es decir cuando hay cambio de la energía incidente, y se conoce como Dispersión Raman, donde los fotones de la luz láser son absorbidos por la muestra y luego se reemite. La frecuencia reemitida de los fotones se desplaza hacia arriba o hacia abajo en comparación con la frecuencia monocromática original [21]. El Raman es de tipo Stokes cuando la dispersión involucra la activación de un modo vibracional del material, y por tanto la luz pierde energía (zona stokes del espectro), y será Raman Anti-Stokes cuando la energía de un modo vibracional se suma a la energía del haz incidente. Habitualmente se trabaja en el rango de Raman Stokes y las unidades se expresan en cm^{-1} tomando el origen en la energía del haz incidente [22]. Por tanto, la espectroscopia Raman nos da información sobre los modos vibracionales del material. Para que ocurra la dispersión Raman, la interacción de la radiación electromagnética con la molécula debe provocar un cambio en la polarizabilidad, es decir que mediante la aplicación de un campo de fuerza externo, los electrones pueden ser inducidos a moverse dentro de una molécula[23]. Estos modos están ligados a los tipos de átomos, sus enlaces y a la simetría del material y por ello se trata de una técnica que nos proporciona información estructural.

Un Sistema Raman Convencional consiste mayoritariamente de cuatro componentes principales (Figura 3):

1. Luz de excitación (Laser).
2. Iluminación de la muestra y recolección óptica de la luz.
3. Selector de la longitud de onda (Filtro o Espectrofotómetro).
4. Detector (CCD).

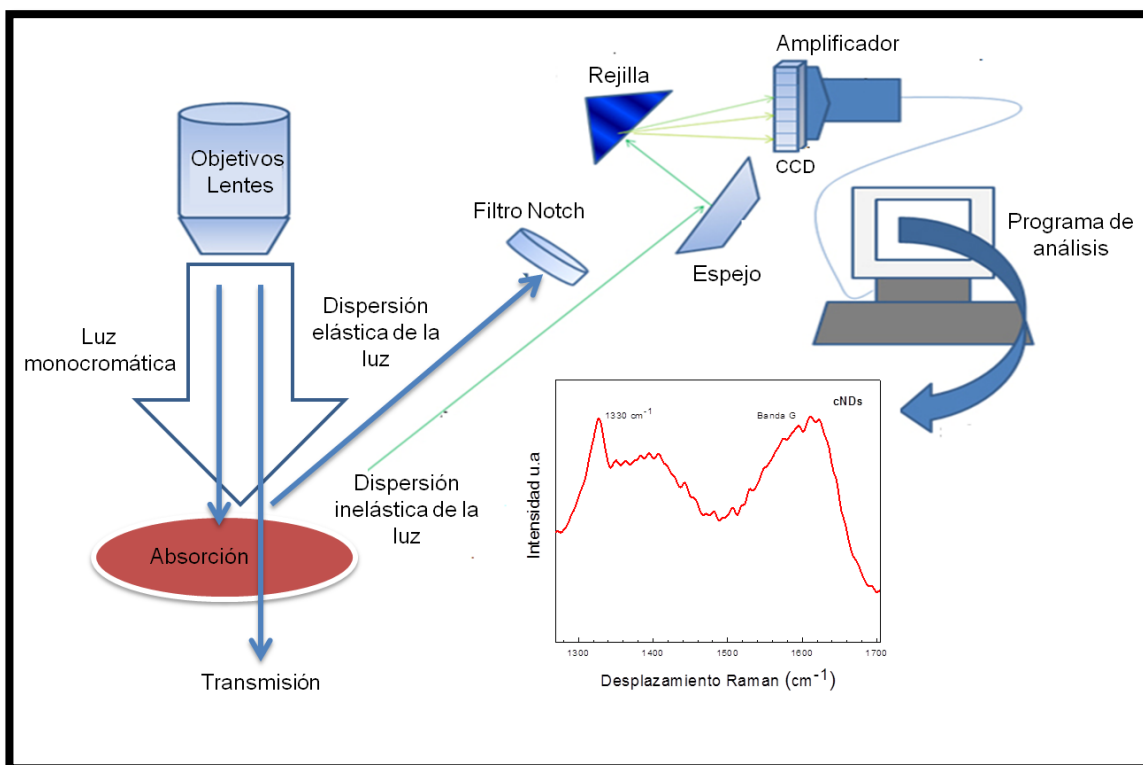


Figura 3. Esquema del proceso para la toma de espectros Raman. La mayor parte de la luz dispersada, se dispersa elásticamente, lo que significa que es la misma longitud de onda que la fuente de excitación. Un filtro de limpieza se utiliza para eliminar la luz dispersada elásticamente, para dejar pasar la los fotones dispersados de forma inelástica o la señal débil Raman ($\sim 1/10^6$ fotones dispersados) se detecta mediante una CCD. Se muestra un espectro Raman de cNDs.

2.5 Espectroscopia Raman en sistemas biológicos

Varios estudios científicos posicionan a la técnica de Espectroscopia Raman como una herramienta de análisis estructural con gran potencial, la cual nos proporcionar información no invasiva de una gran diversidad de muestras biológicas [20, 24-26], por lo tanto será una de nuestras herramientas de estudio.

2.5.1 Espectroscopia Raman de glóbulos rojos

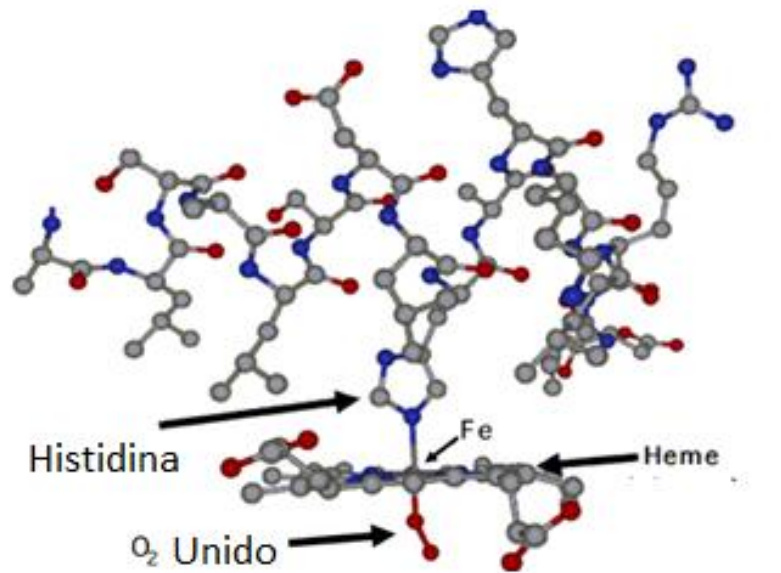
El uso de Espectroscopia Raman en glóbulos rojos ha demostrado ser una herramienta valiosa para monitorear la dinámica molecular de los estados de oxigenación (estado Tenso y Relajado) [27]. En el mismo sentido estudios previos han reportado el espectro Raman de la hemoglobina en estado oxigenado y desoxigenado usando diferentes longitudes de onda de excitación entre las cuales se encuentran 488, 514, 568 y 632.8 nm [28]. Por otra parte, algunas investigaciones científicas muestran resultados mediante espectroscopia Raman acerca de la agregación, desnaturalización del grupo hem, diagnóstico de malaria (identificando el hemozoin, un biomarcador exclusivo de la malaria), entre otros [28-30].

2.5.2 Espectroscopia Raman Resonante de glóbulos rojos

La hemoglobina puede ser fácilmente estudiada mediante Espectroscopia Raman Resonante (ERR), debido a que la intensidad de la señal obtenida es mejorada cuando la longitud de onda de excitación de láser coincide con la banda de absorción del anillo de porfirina [25, 31]. La hemoglobina exhibe un complejo conjunto de bandas mediante espectroscopia Raman en la región de $600 - 1800 \text{ cm}^{-1}$, las cuales son provenientes de las vibraciones del grupo hemo. Los primeros estudios de Raman Resonante de proteínas hemo informaron de bandas sensibles

al estado de oxidación del hierro hémico (Fe). Observándose que la banda más fuerte en los espectros de la hemoglobina se produce entre 1361 y 1356 cm^{-1} asociados al ion ferroso (Fe^{2+}) y entre 1378 y 1370 cm^{-1} asociadas al ion férrico (Fe^{3+})[25]. En el mismo sentido estudios previos reportan espectros Raman de las diferentes configuraciones que puede tomar la hemoglobina, dependiendo de la presencia o ausencia de oxígeno. Las principales diferencias en los espectros Raman de Hb se atribuyen a los cambios en el estado de espín. En hemoglobina oxigenada, el átomo de Fe está en un estado $S = 0$ y la porfirina es plana con una simetría D_{4h} (R o estado relajado, figura 4A). En la Hemoglobina desoxigenada, el átomo de Fe presenta un estado $S = 2$ y se encuentra fuera del plano de la porfirina que exhibe una simetría C_{4v} (T o estado de tensión, figura 4B) [28, 30, 32]. Por la importancia del espectro Raman de la hemoglobina se describirá su espectro y la asociación con los diferentes modos de vibración en las siguientes secciones.

A



B

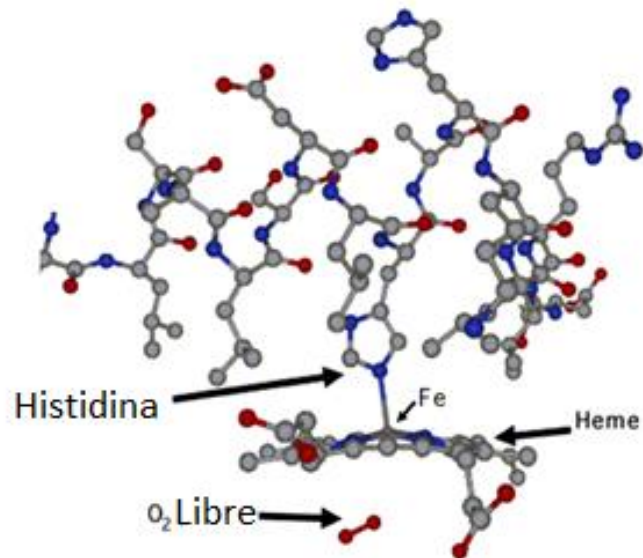


Figura 4. Configuración de la hemoglobina. (A) Unida al oxígeno, en su estado relajado (R), (B) En ausencia de oxígeno, en estado Tenso (T)

2.5.3 Estudio de los modos vibracionales Raman de la hemoglobina

Las bandas asociadas al estado de spin se encuentran en el rango de 1650-1500 cm^{-1} . En glóbulos rojos desoxigenados se muestra un patrón similar tanto en términos de posición de la banda y la intensidad relativa con las diferentes longitudes de onda de excitación que han sido investigados (488, 514, 568 y 632.8 nm). En las células desoxigenadas esta región se compone de tres bandas principales que aparecen entre 1608-1604, 1582-1580 y 1547-1544 cm^{-1} asignados a ν_{19} , ν_{37} y ν_{11} , respectivamente. Por otra parte, en GR oxigenados esta región muestra cierta variación para las diferentes longitudes de onda de excitación especialmente en términos de la intensidad relativa de las bandas. Tanto la longitud de onda de excitación 488 muestra espectro con bandas que aparecen entre 1640-1638, 1588-1586 y 1568-1567 cm^{-1} asignados a ν_{10} , ν_{37} y ν_2 , respectivamente. Por otra parte el espectro obtenido con una longitud de excitación 632.8 nm tiene cinco bandas principales 1638, 1618, 1604, 1565 y 1546 cm^{-1} asignadas a ν_{10} , $\nu_{\text{C=C}}$, ν_{19} , ν_2 y ν_{11} respectivamente [28, 33]. La región entre 1300-1400 cm^{-1} se ha asociado a tres modos principales de vibración del anillo de pirrol [34]. Estos incluyen ν_{20} (1398-1391 cm^{-1}), ν_4 (1367-1356 cm^{-1}) y ν_{41} (1342-1335 cm^{-1}). La banda asignada a ν_4 es una banda muy intensa observada con una longitud de excitación de 488nm, presente en estados de oxigenación y desoxigenación, sin embargo, a la mayor longitud de onda (632.8 nm), esta es disminuye significativamente. El uso de la longitud de onda de láser 488 nm permite la observación del modo ν_4 (que es una banda asociada al estado de oxidación) [26, 35] asignado a la mitad del anillo pirrólico relacionado a una vibración de tensión se observa a 1376 cm^{-1} y 1357 cm^{-1} de Fe^{3+} y Fe^{2+} . Hb, respectivamente [21, 25, 28]. Sin embargo, con la longitud de excitación de 632.8nm estas bandas aparecen con una menor intensidad y un ligeramente desplazadas (1367 cm^{-1}) oxigenada y (1365 cm^{-1}) desoxigenada. La deformación del grupo metino (1200-1300 cm^{-1}) se ha relacionado principalmente a tres bandas ν_{13} , ν_{13} ó ν_{42} y $\nu_5 + \nu_{18}$ las cuales corresponden a bandas entono de 1249 cm^{-1} , 1228 cm^{-1} , 1213 cm^{-1} respectivamente. En las células oxigenadas el

doblete que domina esta región se encuentra 1249-1248 y 1228-1223 cm^{-1} para todas las longitudes de onda investigados. En el GR oxigenados predomina un doblete generado por dos vibraciones 1249 y 1213 cm^{-1} , mientras que estado desoxigenado aparece un doblete en las bandas 1228 y 1213 cm^{-1} . En el mismo sentido, la proximidad del grupo metino con la subunidad de la proteína podría influir en el Angulo de deformación y consecuentemente al desplazamiento de las bandas Raman en los estados oxigenados y desoxigenados [32]. La región de bajo número de onda se localiza entre 600-1200 cm^{-1} . Las bandas que aparecen a 1173 y 1134 cm^{-1} en glóbulos rojos oxigenados han sido asignados a las vibraciones de estiramiento asimétricas del medio anillo de pirrol, v30 y v22, respectivamente, mientras que en el estado desoxigenado aparecen ligeramente desplazadas a 1172-1169 y 1125-1121 cm^{-1} , se ha reportado que la intensidad de las bandas varía dependiendo de la longitud de onda de excitación, indistinguiblemente para los dos estados. Las bandas observadas a 1003-993 (v47) y 978-973 cm^{-1} (v46) corresponden a la vibración de estiramiento asimétrico del C-C del anillo protoporfirínico. Se ha observado que a 632.8nm la intensidad relativa de las bandas que aparecen en esta región se ve incrementada si se compara con otras longitudes de onda de excitación. La banda que asociada a la deformación del grupo metino fuera de plano asignándosele γ_{10} (827 cm^{-1}). En el mismo sentido el modo respiratorio del pirrol corresponde a v6 y v15 asignadas a 792-787 cm^{-1} y 755-753 respectivamente, mientras que la 678-668 cm^{-1} (v7) corresponde al modo de deformación simétrico del pirrol [25, 28].

Con lo descrito en esta sección se concluye que los cambios bioquímicos pueden ser observados mediante espectroscopia Raman, sin embargo, para determinar los cambios morfológicos se requiere de la técnica de AFM la cual se describe en la sección 2.7.

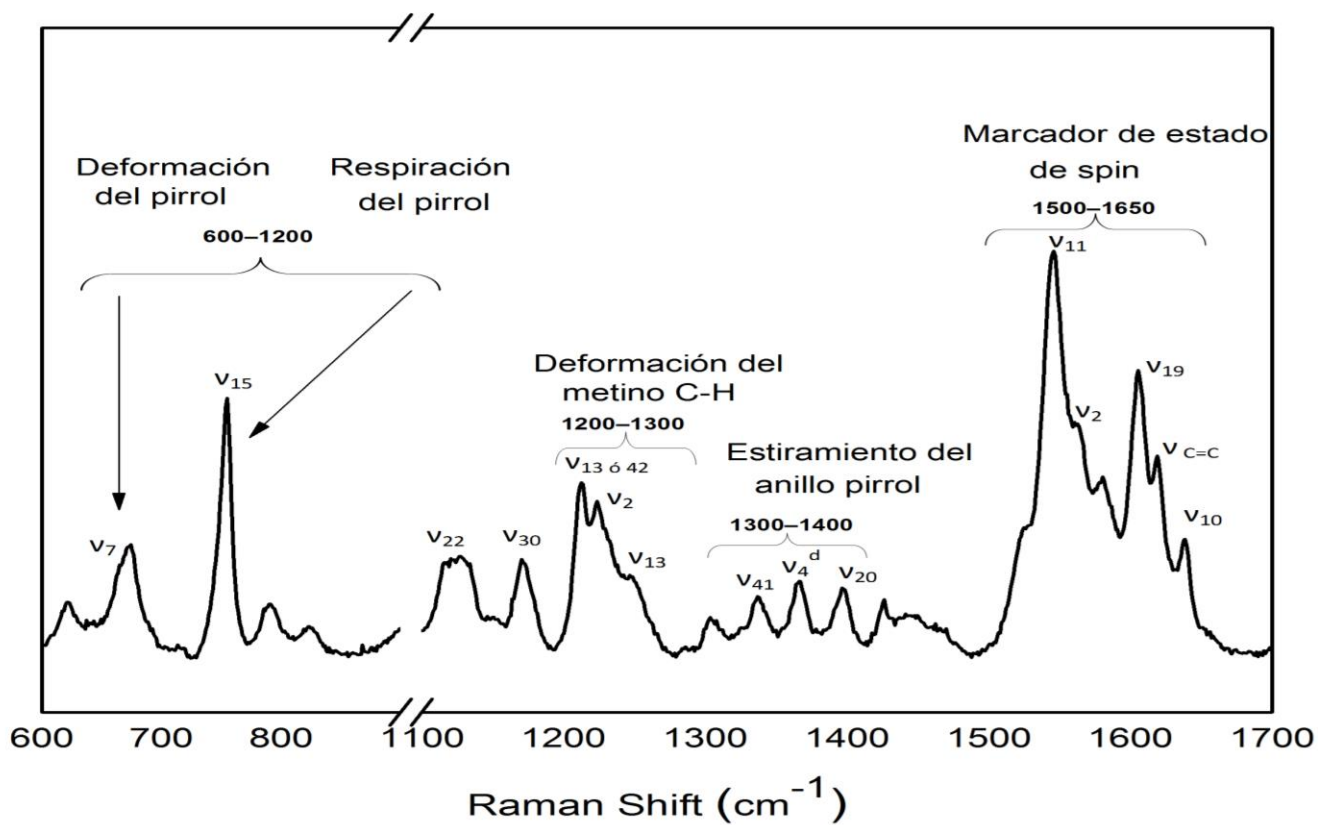


Figura 5. Espectro Raman de glóbulo Rojo con láser de excitación 632.8nm, potencia 2mW, tamaño de spot 1µm. (Construcción original).

2.6 Microscopia de Fuerza Atómica

El AFM es un instrumento óptico-mecánico capaz de detectar fuerzas del orden de piconewtons al monitorear una muestra, registrando continuamente su topografía mediante una sonda conocida como cantiléver. Dependiendo de la distancia entre los átomos de la punta del cantiléver y los de la superficie de la muestra se da una interacción, ya sea de atracción o repulsión, la cual puede usarse para medir la superficie de la muestra. La fuerza entre los átomos de la superficie de la muestra y los del cantiléver son detectados lo da como resultado una desviación del cantiléver. Esta flexión del cantiléver se puede cuantificar por la desviación de un haz que incide sobre el cantiléver y es detectado por un fotodetector sensible a la posición. Debajo de la muestra se encuentra un piezoeléctrico el cual se mueve en dirección X, Y y Z. Este escanea repetidamente la muestra línea por línea, mientras que la señal en el fotodetector se utiliza para establecer un punto secuencial de realimentación que controla el movimiento vertical del escáner del cantiléver a través de la superficie de la muestra.

Los principales componentes del AFM son:

1. Cantiléver
2. Láser
3. Punta
4. Foto detector
5. Piezoeléctrico.

El cantiléver es una estructura flexible, compuesta mayoritariamente de silicio, que se curva según las fuerzas que existan entre la punta y la muestra. La punta es la herramienta que se utiliza para escanear la superficie de la muestra, es uno de los aspectos que determinan la resolución de las imágenes obtenidas por AFM. Las mejores puntas se encuentran con un radio de curvatura de aproximadamente 5nm. Además, se utiliza un láser (633nm) que es importante en la técnica de AFM debido a que incide sobre el cantiléver detectando los cambios en el cantiléver, tal deflexión

es directamente proporcional al ángulo de reflexión del láser que incide sobre el fotodetector (diodo de cuatro cuadrantes). Por otra parte, el piezoeléctrico es el encargado de mover la muestra para su escaneo. El AFM trabaja en tres modos: contacto, no contacto y contacto intermitente.

En el modo de contacto, la punta barre la superficie de la muestra, aplicando una fuerza (repulsiva) constante sin levantar la punta de la superficie. Entre las ventajas de este modo se encuentra alta velocidad de barrido, resolución atómica y cambios bruscos en topografía. Las desventajas son que generan fuerzas laterales con la posible distorsión de imagen, posible aparición de fuerzas normales fuertes, la combinación de las fuerzas anteriores podría ocasionar una disminución en la resolución espacial y el daño de muestras blandas.

El modo de contacto intermitente mide la topografía tocando intermitentemente la superficie de la muestra con una punta oscilante. Se eliminan las fuerzas laterales y de presión que pueden dañar las muestras blandas, lo que ocasiona una disminución en la resolución de la imagen. Entre las ventajas de este modo se encuentran: una mejor resolución lateral (1-5 nm), menor riesgo de dañar muestras blandas (la fuerza es más débil). Entre sus desventajas esta la menor velocidad de barrido comparado con el modo contacto.

En el modo no contacto Mide la topografía de acuerdo a las fuerzas de Van der Waals que existen entre la superficie de la muestra y la punta. Se hace oscilar a la punta cerca de su frecuencia de resonancia por lo que vibrara cerca de la superficie de la muestra a una distancia entre 10-100 Å. Entre las ventajas de este modo es la ausencia de fuerzas aplicadas sobre la muestra, sin embargo, muestra menor resolución lateral, menor velocidad de barrido siendo útil para muestras biológicas. En esta tesis se trabajó con el modo no contacto debido a que resulta ser ideal para trabajar con muestras biológicas al ser la menos agresiva. Esta técnica nos permite evaluar la alteración de la membrana celular por efecto del almacenamiento y radiación: ya que cambios como la rugosidad, forma de la membrana, cambio de volumen, son cambios presentes en glóbulos rojos dañados o disfuncionales.

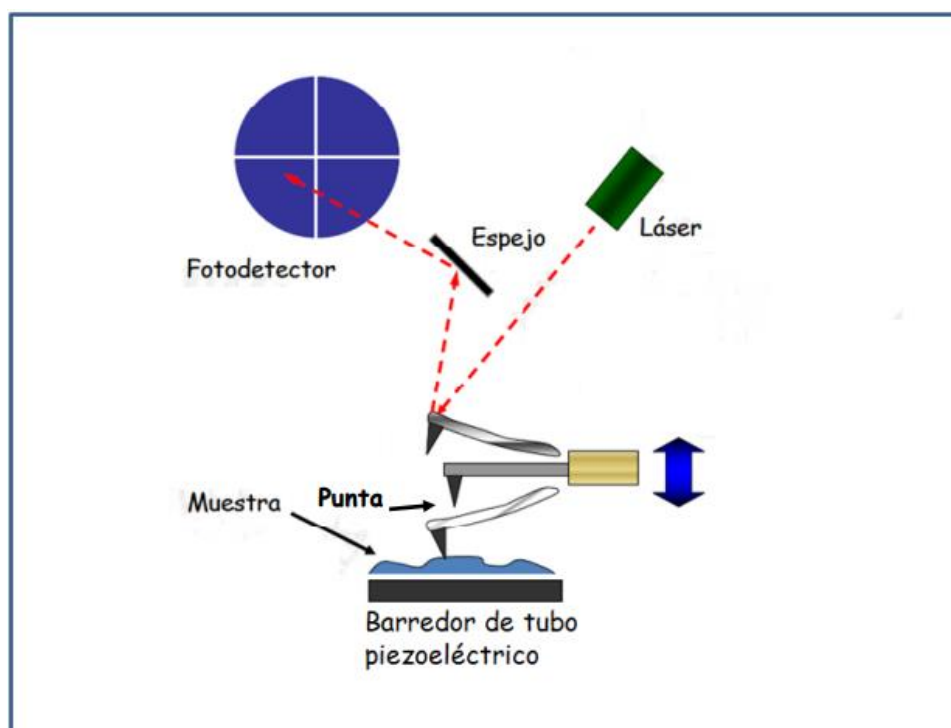


Figura 6. Esquema de la configuración del Microscopio de Fuerza Atómica (AFM).

2.7 Nanopartículas en aplicaciones biomédicas

La nanotecnología es un campo de ciencias aplicadas en las que convergen la ingeniería, la química, la biología, la medicina y otras, dedicado al control y manipulación de la materia a una escala nanométrica [36]. Los recientes avances tecnológicos en la generación de diversos tipos de nanopartículas son una muestra clara de la importancia de éstas en aplicaciones de imágenes biológicas [37]. En estas dimensiones las nanopartículas presentan propiedades únicas (debido principalmente a su alta actividad superficial y al efecto del tamaño cuántico) que pueden ser distintas de ambas, moléculas y sólidos, en volumen. Las tecnologías emergentes de nanopartículas trabajan en conjunto para incrementar el desarrollo de nuevas alternativas, para la detección de enfermedades en etapas tempranas mediante la obtención de imágenes. La imagen molecular se refiere al desarrollo de sondas moleculares para la visualización de la función celular, caracterización y la medición de los procesos moleculares en organismos vivos a nivel celular y molecular, sin perturbar los procesos celulares [38]. La nanomedicina es la rama de la medicina que aplica los conocimientos de la nanotecnología en procedimientos médicos, entre los cuales se encuentran el diagnóstico, seguimiento y el control de los sistemas biológicos. La integración de la nanotecnología a las ciencias biológicas ofrece la oportunidad del desarrollo de nuevos materiales en el rango de tamaño nanométrico, utilizándolos en posibles aplicaciones biológicas y médicas [39]. Las tecnologías modernas de imagen biomédica han dado lugar a avances significativos en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades. Debido a que la mayoría de los procesos de una enfermedad se producen a nivel molecular y celular, los científicos se enfrentan a grandes desafíos, tanto en la observación como en la comprensión precisa y en tiempo real de estos procesos. Las nanopartículas utilizadas en aplicaciones biomédicas incluyen liposomas, micelas poliméricas, dendrímeros, nanopartículas inorgánicas y poliméricas, nanorods y puntos cuánticos (mejor conocidos como *Quantum dots*). Todas estas nanopartículas han sido probadas clínicamente pudiéndose utilizar como agentes de entrega del fármaco y marcadores en bioimagenología [40-42]. Dentro de este campo, la escala

nanométrica representa la resolución ideal de imagen, debido al hecho de que la gran mayoría de los eventos biológicos ocurren a esta escala de longitud. Por esta razón han sido desarrollados agentes de imagen, moleculares y celulares, a base de nanopartículas inorgánicas, con la finalidad de estudiar los procesos biológicos de una forma no invasiva [43].

En los últimos años, la comunidad científica ha dirigido notables esfuerzos a la investigación y aplicación de los nanodiamantes en la detección precoz, diagnóstico y tratamiento del cáncer, tal y como lo demuestra el gran volumen de referencias científicas que están siendo publicados en este campo [44-47].

2.7.1 Nanodiamantes

Los nanodiamantes (NDs) son nanoestructuras de carbono que han atraído atención científica debido a sus potenciales aplicaciones biomédicas. Además ellos ofrecen excelentes propiedades como la estabilidad química, gran área superficial, baja citotoxicidad, y la modificación de su superficie con moléculas específicas para conseguir más biocompatibilidad o mejorar sus propiedades espectroscópicas [48, 49]. Además los nanodiamantes muestran una banda Raman única a 1330cm^{-1} que corresponde a la estructura del diamante, hibridación Sp^3 del carbono [50]. Los NDs se obtienen principalmente mediante detonación de explosivos que contienen carbono. Este material se obtiene comercialmente y se caracteriza por ser muestras con un tamaño uniforme en torno a 5 nm con una alta capacidad de funcionalización de su superficie y una excelente biocompatibilidad. Existe un gran número de referencias científicas que abarcan sus aplicaciones en Biomedicina especialmente en la detección precoz, diagnóstico y tratamiento del cáncer. Recientemente se ha propuesto el uso de NDs como marcadores fluorescentes para aplicaciones en Imagenología debido a la presencia de múltiples centros de color en su estructura cristalina, principalmente defectos Nitrógeno-Vacante de carbono conocidos como centros N-V. La combinación de las propiedades de los NDs con la posible

funcionalización mediante biomoléculas incluyendo medicamentos o genes permitiría emplearlos para aplicaciones de detección y tratamiento simultáneo con un único nano material.

Por otra parte, en la sección 2.4.1 se mencionó el efecto de la radiación ionizante (radiación γ) en la sangre, algunas referencias mencionan que se desencadena una serie de procesos bioquímicos en los que se generan radicales libres, los cuales inducen el deterioro temprano de los glóbulos rojos, funcional y estructuralmente. Para el estudio de estos procesos hemos seleccionado a los cNDs ya que se ha reportado su uso potencial como plataformas en procesos biológicos, existiendo un gran número de referencias científicas que abarcan sus aplicaciones en biomedicina especialmente en la detección precoz, diagnóstico y tratamiento del cáncer [44]. En el mismo sentido, estudios científicos mencionan que los nanodiamantes poseen una capa de agua, lo cual es importante en aplicaciones biomédicas[51, 52], proponiéndose su uso como fuente de rehidratación para la membrana celular. Por otra parte, recientes estudios indican que los nanodiamantes carboxilados actúan como agentes reductores y posiblemente podrían reducir el daño oxidativo en los sistemas biológicos[20].

En resumen, en esta tesis se estudian los estados de reoxigenación en sangre gamma irradiada con la adición de nanodiamantes y la lesión por almacenamiento, así como efectos de la radiación sobre GR gamma irradiados-almacenados y la posible foto daño inducido por láser. Los análisis de estos fenómenos son estudiados mediante Espectroscopia Raman (huella bioquímica) y Microscopia de Fuerza Atómica (AFM) (huella biomecánica).

3. HIPÓTESIS

El aseguramiento de la calidad de la sangre gamma irradiada se logra mediante el estudio bioquímico y estructura.

Es posible utilizar nanodiamantes carboxilados para el estudio de estados de oxigenación en hemoglobina sangre almacenada gamma irradiada -y para inducir su reoxigenación.

4. OBJETIVO GENERAL

Utilizar nanodiamantes carboxilados como agentes precursores de reoxigenación en glóbulos rojos sometidos a estrés inducido por radiación, fotodaño y almacenamiento.

5. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 5.1** Estudiar de fotodaño inducido por láser en glóbulos rojos almacenados e irradiados.
- 5.2** Estudiar de la fragilidad osmótica en glóbulos rojos irradiados y almacenados.
- 5.3** Caracterizar nanodiamantes carboxilados.
- 5.4** Determinar la concentración óptima de cNDs para la incubación en glóbulos rojos.
- 5.5** Evaluar el proceso de reoxigenación de glóbulos rojos asistidos con nanodiamantes y sin nanodiamantes en sangre almacenada gamma irradiada.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Irradiación de sangre y almacenamiento

Se obtuvo sangre por flebotomía de voluntarios sanos en edades de 26-33 años, los cuales se consideran aptos para donaciones. La sangre fue recolectada en tubos de plástico estándar con el anticoagulante Acido etilen-diamino-tetracético mejor conocido como EDTA. Estas muestras fueron irradiadas utilizando un Gammacell 220 Excel (Tasa de 0.6 Gy/s) con una fuente de Cobalto 60 (^{60}Co) a dosis de 15, 25, 35 y 50 Gy. Los eritrocitos no irradiados y sin almacenar se utilizaron como muestra de control. Cada sangre irradiada se almacena por separado a 4 ° C y se analizan a los 0, 5 y 13 días.

6.2 Obtención y tratamiento de sangre periférica incubados con cNDs

Los glóbulos rojos se obtuvieron mediante flebotomía a voluntarios sanos. La sangre fue recolectada en tubos de plástico estándar con el anticoagulante EDTA. Estas muestras fueron irradiadas utilizando un Gammacell 220 Excel (Tasa de 0.8Gy/s) con una fuente de Cobalto 60 (^{60}Co) a una dosis de 25 Gy. Después de la irradiación, la sangre se almacenó hasta 5 días a 4 °C. Los cNDs se añadieron a la sangre total en una concentración final de 0.004% (w/v) se diluyeron en tampón fosfato salino (PBS, pH 7.05) como se muestra a continuación 15 µl GR: 20 µl cNDs: 975 µl PBS.

6.3 Síntesis y principales características de nanodiamantes de detonación

Los nanodiamantes de detonación (referencia del catálogo: PL-Nanopure-G-50 m) fueron adquiridos de Plasma Chem GmbH (Rudower Chaussee 29, D-12489, Berlín). Dichos nanodiamantes se encontraban en una suspensión acuosa al 4%, siendo almacenados en el refrigerador hasta que estaban a punto de ser utilizados.

6.4 Síntesis de nanodiamantes carboxilados

Nanodiamantes comerciales por detonación se carboxilaron bajo condiciones ácidas fuertes, similares a los descritos por Liu et al. [28]. Se deshidrataron los NDs y posteriormente se tomaron 0.5 gramos, los cuales se suspendieron en una mezcla 3: 1 de H₂SO₄: HNO₃ (15 ml) durante 24 horas a 75 °C. A continuación, se añadió 1 ml de NaOH 0.1M a 90 °C manteniéndose en agitación durante 2 h, y finalmente se añadió 1ml HCl 0.1M a 90 °C durante 2 h. Los nanodiamantes carboxilados (cND) se lavaron con agua destilada 3 veces, se secó a 60 °C y fueron almacenados a temperatura ambiente.

Tabla 2. Características químicas de Nanodiamantes grado G.

Numero de Stock	PL-Nanopure-G
Tamaño de partícula	4-6nm
Estabilizador	Ninguno
Pureza	>87%
Contenido de cenizas	<6%
Impurezas , peso % diamantes sin contenido	Fe<1.2;Ca+Zn+Cr+Ni+Cu+M <6
Superficie de área	290 m ² /g
Potencial Zeta	-50 ±5 eV

6.5 Viabilidad de glóbulos rojos en presencia de NDs y cNDs

El efecto citotóxico de NDs y cNDs se estimó mediante el porcentaje de hemólisis de GR, se considera que la intensidad del pico alrededor de 415 nm corresponde a la banda Soret de la hemoglobina (método Harboe). Dicho pico es utilizado para determinar la cantidad de hemoglobina libre y por consiguiente la citotoxicidad. En este ensayo se incluyó una serie de diluciones de NDs y cNDs en presencia de GR en una suspensión de PBS. Posteriormente las muestras se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente y 24 horas a 4 °C. Para cada tiempo de incubación se midió el sobrenadante el cual contenía cierta cantidad de Hb libre. Como control de 100% de hemólisis se utilizaron glóbulos rojos en agua desionizada. Todas las mediciones se llevaron a cabo por triplicado en un espectrofotómetro (espectrofotómetro de absorbancia XMark microplaca, BioRad).

6.6 Fragilidad osmótica de glóbulos rojos gamma irradiados y almacenados

Se evaluó la fragilidad osmótica *in vitro* usando el método descrito por Faulkner and King [53], para nuestros fines se utilizaron condiciones hipotónicas de cloruro de sodio con las siguientes concentraciones: 0,1, 2, 2.5, 3,3.5, 4,5, 6, 7 y 8 g/L NaCl en tampón de fosfato (2.7 mM de KCl, 10 mM de NaHPO₄ y 1.8 mM de KH₂PO₄), pH 7.4. Posteriormente se preparó una suspensión diluida de células con 75µL de sangre irradiada en 1425 µL de PBS, se tomaron 50 µL de la muestra anterior y se agregaron a 200 µL a cada concentración de NaCl, se incubó cada muestra durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las muestras fueron centrifugadas a 2000 rpm durante diez minutos. Se tomó el sobrenadante aproximadamente 100 µL, y se transfirió a otra placa de 96 pocillos. Finalmente se leyó la absorbancia en un rango de 350 a 600 nm utilizando un espectrofotómetro de microplacas (Synergy HTX, Biotek). Se calculó el porcentaje de hemólisis mediante la determinación de Hb libre con el método Harboe. El porcentaje de hemólisis se calcula mediante la siguiente fórmula: $[\text{sobrenadante Hb (mg/L)}] / [\text{Total Hb (mg/L)}] \times 100$. La Hb total se

cuantifico para cada muestra (dosis de radiación y almacenamiento) utilizando como control positivo el 100% de hemólisis, el cual se obtuvo a una concentración de 0g/L de NaCl.

6.7 Desoxigenación y reoxigenación de glóbulos rojos

5 ml de una suspensión de glóbulos rojos en PBS (425µl PBS+75 µl GR) fueron incubados con cNDs (0.004%) durante 2 horas, posteriormente fueron expuestos a una atmósfera de N₂ durante 40 min para su desoxigenación. Los glóbulos rojos se reoxigenaron por la exposición al oxígeno atmosférico hasta los 90 minutos. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente. Los estados de oxigenación fueron estudiados mediante la técnica Raman.

6.8 Espectroscopia Raman de glóbulos rojos almacenados y gamma irradiados

Los espectros Raman de los glóbulos rojos fueron adquiridos con un microespectrómetro Witeck (alpha 300, RA) utilizando un láser de Nd:YAG (longitud de onda 532 nm) a una potencia de 2 mW y un objetivo 100 X. De la suspensión de glóbulos rojos se colocaron 10 µl en un sustrato de Silicio el cual contiene una película delgada de poli-L-lisina colocándose finalmente un cubreobjetos sobre la gota. Los espectros Raman de los glóbulos rojos se realizaron con 20 s de tiempo de acumulación. Esto nos permitió lograr una buena calidad de espectros Raman sin afectar la integridad de los glóbulos rojos (revisado por imagen óptica). Los espectros fueron recogidos en la región de 600 a 1800 cm⁻¹, normalizándose a la señal de sustrato de silicio. Para cada muestra se tomaron 100 espectros en diferentes glóbulos rojos (25 glóbulos rojos de cada paciente).

6.9 Espectroscopia Raman de glóbulos rojos almacenados y gamma irradiados incubados con nanodiamantes

Los espectros Raman de los glóbulos rojos fueron adquiridos con un microespectrómetro Raman (Horiba, LabRAM HR) utilizando un láser de Argón (longitud de onda 488 nm) a una potencia de 2 mW y un objetivo 50 X. De la suspensión de glóbulos rojos se colocaron 10 μl en un sustrato de Silicio el cual contiene una película delgada de poli-L-lisina colocándose finalmente un cubreobjetos sobre la gota. Los espectros Raman de los glóbulos rojos se realizaron con 20 s de tiempo de acumulación y un filtro D.06. Esto nos permitió lograr una buena calidad de espectros Raman sin afectar la integridad de los glóbulos rojos (revisado por imagen óptica). Los espectros fueron recogidos en la región de 600 a 1800 cm^{-1} normalizándose a la señal de sustrato de silicio. Para cada muestra se tomaron 20 espectros en diferentes glóbulos rojos. Es importante tener en cuenta que, en los glóbulos rojos sanos, el tiempo de re-oxigenación se determinó previamente por la señal Raman de hemoglobina oxigenada (oxiHb), tomando alrededor de 90 min para la oxigenación

6.10 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

Los cambios estructurales se estudiaron mediante el análisis de imágenes de eritrocitos mediante un Microscopio de Fuerza Atómica (Park Systems XE-BIO) acoplado a un microscopio invertido (Nikon Ti-E, Nikon Instruments Inc. USA). El microscopio óptico se utiliza para seleccionar las células deseadas y así poder establecer la posición la punta del AFM (Park Systems corp., Korea). Todas las imágenes se obtuvieron en el modo no contacto utilizando un cantiliver (constante de fuerza 10-130 N/m). Se analizaron GR no irradiados e irradiados (15, 25, 35 y 50 Gy) almacenados durante 0, 5 y 13 días de almacenamiento. Los frotis de GR se prepararon por métodos clínicos convencionales. El método para el análisis de las células se realizó de la siguiente manera: se hicieron de 10-12 escaneos (50 μm x 50 μm) para cada muestra seguido de 40 escaneos de 1500 nm x 1500 nm para analizar a detalle la estructura de la membrana, esto se realizó para cada condición de almacenamiento (0, 5 y 13 días), así como sus respectivas dosis de radiación (0, 15, 25,35 y 50 Gy). El número de puntos de exploración fue de 256. Las imágenes y sus perfiles se analizaron en los modos 2D y 3D con el del software XEI 1.8 proporcionado por los sistemas Park. El valor de la rugosidad de la superficie se calcula como el valor de la raíz cuadrada media (R_{rms}) de la distribución de la altura como ha sido descrito con anterioridad [54]

7. RESULTADOS Y DISCUSION

A continuación, describiremos y discutiremos los resultados obtenidos en este trabajo doctoral. En la primera parte, se analiza el daño en GR inmediatamente después de su irradiación, así como los cambios en el tiempo cuando son almacenados en condiciones estándares de un banco de sangre hasta por 13 días (sección 7.1). Continuando con este análisis, en la sección 7.2 se describen los resultados sobre la capacidad de la sangre para reoxigenarse cuando se ha sometido a factores estresantes, como los son la radiación y el tiempo de almacenamiento. Finalmente, en el apartado 7.3 y 7.4 se discute el papel de nanodiamantes carboxilados en este proceso y posible mecanismo.

7.1 Estudio morfológico y estructural de sangre gamma irradiada y almacenada

7.1.1 Evaluación de la fragilidad osmótica de la membrana en glóbulos rojos almacenados e irradiados

El GR es relativamente impermeable manteniendo el equilibrio osmótico con el medio fisiológico cuando no es sometida a factores estresantes. Cuando es sometida a un medio hipotónico, la célula se llena de fluido, lo que tendrá como resultado su lisis. Investigaciones científicas muestran que glóbulos patológicos o sometidos a factores estresantes disminuyen su capacidad de deformación de la membrana comparados con glóbulos rojos sanos[55]. En el mismo sentido, en los glóbulos rojos la proteína eritrocitaria banda 3, que está asociada al equilibrio osmótico, volumen celular, intercambio de iones, remoción celular y la integridad estructural de la célula sufre un proceso de oxidación, las cuales generan señales de muerte celular [56-58]. Estudios recientes indican que la radiación gamma produce radicales libres, los cuales pueden alterar el estado de los lípidos y las proteínas. Se menciona que puede ocurrir peroxidación de lípidos, así como la formación de puentes disulfuro, entre otros, todo ello dañino para las proteínas membranales, y que podrían reducir la capacidad de deformación de la membrana y aumentar su rigidez. Lo anterior tiene como resultado la pérdida de elasticidad de la membrana y un aumento en la fragilidad osmótica[16]. Además, como producto de la interacción de los GR con la radiación ionizante se produce la hemina, que es un producto de oxidación de la hemoglobina, aunado a que la radiación ionizante también conduce a la destrucción de la membrana[59]. Reportes científicos han demostrado que la hemina induce la formación de equinocitos a bajas concentraciones y esferoequinocitos a altas concentraciones [60] lo que conlleva finalmente a una hemólisis. También se ha reportado el incremento de hemólisis en glóbulos rojos almacenados por más de 30 días. Se ha observado que este efecto puede acelerarse por la radiación debido a la inducción en la susceptibilidad de la membrana, como se observó por fragilidad osmótica.

En esta tesis se analizó la fragilidad osmótica de los glóbulos rojos por los fundamentos mencionados anteriormente. En la Figura 7, se muestra el efecto de la radiación y el almacenamiento en el porcentaje de hemólisis inducido por el estrés osmótico. Al día 0 no se detectaron efectos significativos en ninguna dosis de radiación en concentraciones de 2,5 a 8 g / l. Esto se relaciona con el hecho de que los RBCs tienen mecanismos para resistir la deformación y recuperarse, por lo que el efecto se observa hasta varios días después de la irradiación [61]. En el caso del almacenamiento a los 5 días después de la irradiación, se alteró la fragilidad osmótica para todas las dosis analizadas con un aumento del porcentaje de hemólisis a 2,5 g / L de NaCl hasta 1,5, 1,9, 2,3 y 3 veces en relación al control para las dosis de 15, 25, 35 y 50 Gy, respectivamente. Al día 13 se observó un aumento del efecto sobre el porcentaje de hemólisis en todas las muestras. En los eritrocitos irradiados se observó más del 70% de la hemólisis a 2,5 g / L de NaCl. No se observaron diferencias significativas en la hemólisis entre las distintas dosis de radiación (15, 25, 35 y 50 Gy). Todas las dosis de radiación tuvieron un impacto negativo sobre la estructura de la membrana de los glóbulos rojos, incluso a las dosis recomendadas en el protocolo de radiación de sangre [7]. Los resultados que obtuvimos concuerdan con informes previos. La fragilidad osmótica es una prueba complementaria para abordar los cambios morfológicos y estructurales inducidos en los glóbulos rojos. Es importante determinarla debido a que, cuando las células son transfundidas, se someten a agentes tensores tales como deformabilidad, fricción y cambios de presión en el torrente sanguíneo, siendo estos factores los que podrían aumentar la hemólisis en los RBCs [62]. Estos resultados nos permitieron detectar diferencias a los 5 días de almacenamiento en los eritrocitos irradiados y no irradiados. Además, las dosis utilizadas produjeron un efecto similar en 13 días, incluso en la muestra control. Por esta razón no se recomienda la transfusión después de 14 días como lo indica la FDA.

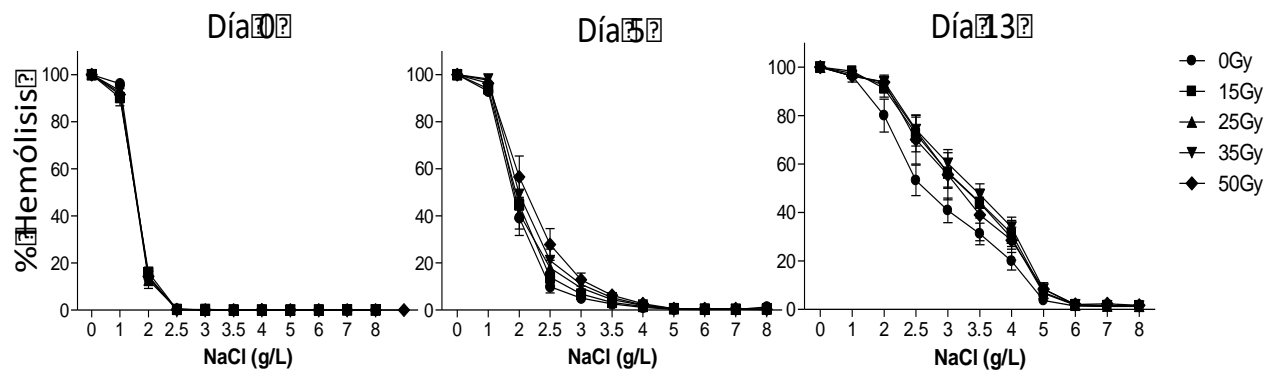


Figura 7. Fragilidad osmótica de glóbulos rojos irradiados y almacenados.

7.1.2 Alteración morfológica de los glóbulos rojos

Por lo general, la morfología y los cambios geométricos como son la forma y el tamaño de glóbulos rojos a escala micrométrica se han utilizado como un buen indicador de lesiones. Debido a que estos cambios surgen de modificaciones en los procesos estructurales y metabólicos [63]. Sin embargo, las anomalías a nanoescala no han sido ampliamente exploradas. Con este propósito, hemos utilizado Microscopia de Fuerza Atómica para la evaluación de los cambios morfológicos de RBCs inducido por el almacenamiento y la irradiación gamma (γ). Al día 0, se observó que la sangre gamma irradiada no presentó cambios en su forma y tamaño. Sin embargo, los equinocitos (eritrocitos con proyecciones cortas con extremo romo) y los ovalocitos (eritrocitos en forma de limón) se observaron en muestras almacenadas durante 5 días cuando fueron irradiadas a 25, 35 y 50 Gy (ver Fig. 8). Por otra parte, aunque otros estudios no han informado cambios morfológicos aparentes en RBC almacenados [64], hemos encontrado algunas alteraciones en nano y microescala en las células mediante el análisis por AFM (Fig. 2). Estos cambios podrían ser producidos por el envejecimiento, los cuales se observaron desde los primeros días de la evaluación en los glóbulos rojos irradiados. Esta transformación se asocia a una pérdida progresiva de la superficie celular y los cambios en relación al volumen y funcionalidad de RBC [65]. Se encontraron resultados similares en el día 13 a dosis más baja de radiación gamma (15 Gy). Tomando en conjunto los efectos mencionados anteriormente, podría ser indicativo de una lesión de almacenamiento temprana acelerada por la irradiación gamma la cual es detectada mediante AFM. Por ello consideramos que el tiempo de almacenamiento juega un papel crucial en los efectos de deformación en las células y se acelera cuando se somete a radiación gamma, al dañar la bicapa lipídica, la membrana y las proteínas del citoesqueleto. De hecho, provoca alteraciones en la conformación de la membrana, interfiriendo con las funciones celulares normales [66]. Además, pequeñas alteraciones con propiedades micro-reológicas pueden afectar tanto la función como parámetros biofísicos (fragilidad,

grado de agregabilidad y viscosidad) [67]. Estos cambios morfológicos podrían estar afectando el flujo normal de sangre transfundida, la agregación célula a célula y la adhesión a las células endoteliales [68]. De hecho, los RBC irradiados se vuelven más frágiles, lo cual se refleja con un aumento de hemólisis [69], y con la formación temprana de estructuras topológicas en la membrana a nivel nanoescala como se observó en esta tesis [70]. Estos cambios bioquímicos y reológicos son muy relevantes en la medicina transfusional y deben considerarse para evitar reacciones adversas a lo largo del procedimiento de transfusión.

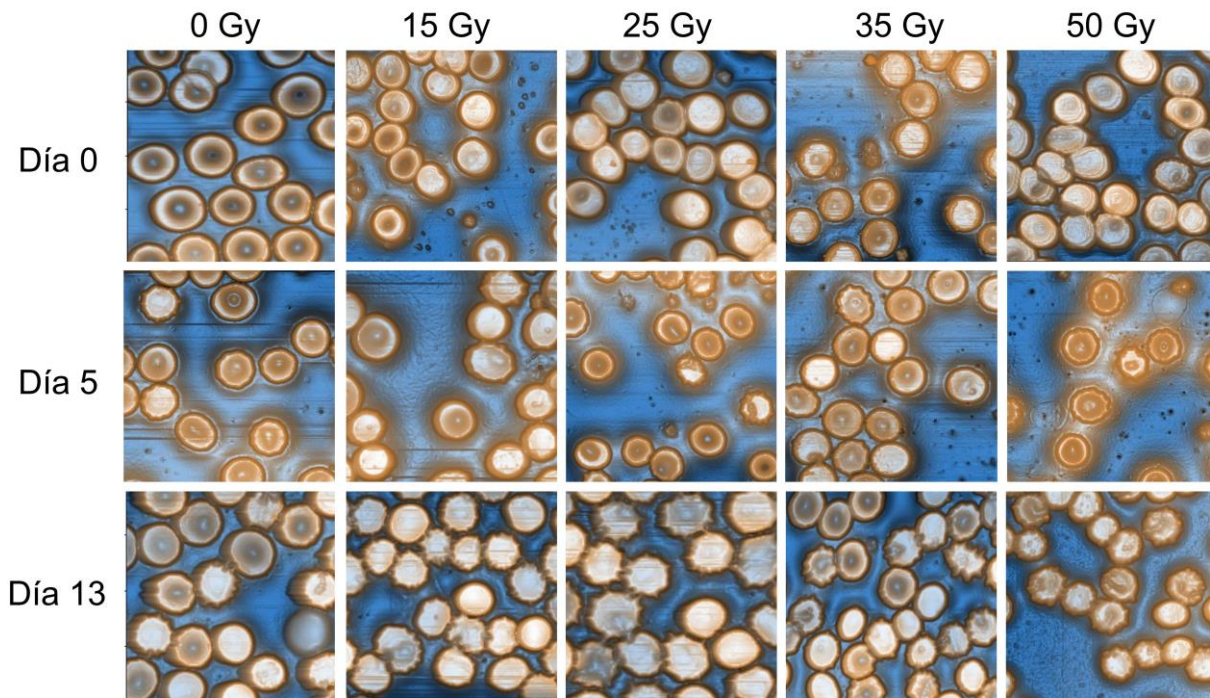


Figura 8. Imágenes de AFM de γ -GR y almacenados. Se tomaron frotis de GR y γ -GR, las imágenes de AFM se tomaron $50 \times 50 \mu\text{m}$, se utilizó como control GR se tomaron imágenes de γ -GR (15, 25, 35 y 50) se analizaron a los cero, cinco y trece días de almacenamiento.

7.1.3 Alteración de la microestructura superficial en la membrana de glóbulos rojos

Un trastorno en la microestructura de los glóbulos rojos puede comprometer su función. Por esta razón en este estudio se evaluó la rugosidad por AFM como parte de la caracterización de la superficie de la membrana. El valor de rugosidad media (Rrms) puede usarse como representativo del total de las muestras, de ahí su importancia [54, 71, 72]. La Figura 9 muestra imágenes de nanoestructuras de membrana de glóbulos rojos almacenados y gamma irradiados. En la tabla 3 se muestran la Rrms (promedio \pm desviación estándar, tomados de al menos 40 RBC para cada tratamiento). En el caso de los RBC no irradiados, se observó una disminución con el tiempo de almacenamiento en la Rrms de 2.1nm, 1.2nm y 0.82nm para 0, 5 y 13 días de almacenamiento, respectivamente. Esto puede estar relacionado a la disminución de la rugosidad en los RBC, reportes previos lo han relacionado con un aumento en la rigidez y mayor susceptibilidad a la ruptura y pérdida de algunas funciones [73, 74]. Adicionalmente, al evaluar la topografía de la membrana detectamos nanovesículas desde el 5 día de almacenamiento, lo cual coincide con reportes previos por *Girasole et.al* [73]. En cambio, en las RBCs irradiadas fue posible detectar nanovesículas incluso al día 0, las cuales aumentaban en número y tamaño a medida que aumentaban las dosis de radiación. Al hacer una revisión extensa de la literatura no encontramos un reporte similar. La vesiculación es un proceso celular que conduce a la comunicación intracelular y a la apoptosis celular. Las vesículas se producen cuando los fosfolípidos de la membrana plasmática y el citoesqueleto pueden dislocarse debido a la oxidación de los lípidos de membrana y de la proteína del citoesqueleto [68]. En el caso de las muestras irradiadas y no almacenadas, se observa claramente una disminución de Rrms (2,1-1,14 nm) a medida que aumenta la dosis de radiación (Figura 9). Al día 5 se observó la misma tendencia en Rugosidad para RBC irradiados. En los RBC no irradiados e irradiados, se observó una disminución similar de la rugosidad al día 13 observándose también un aumento de nanovesículas. El origen de la vesiculación podría estar asociado a una pérdida de partes de la membrana de

glóbulos rojos y este efecto puede ser un buen marcador de envejecimiento celular a nanoescala [73]. Nuestros resultados de Rrms proporcionaron un análisis cuantitativo de los cambios inducidos por la radiación γ y el tiempo de almacenamiento en la estructura de los RBCs. Proponemos que a Rrms se puede utilizar como un parámetro sensible temprano de integridad en la membrana.

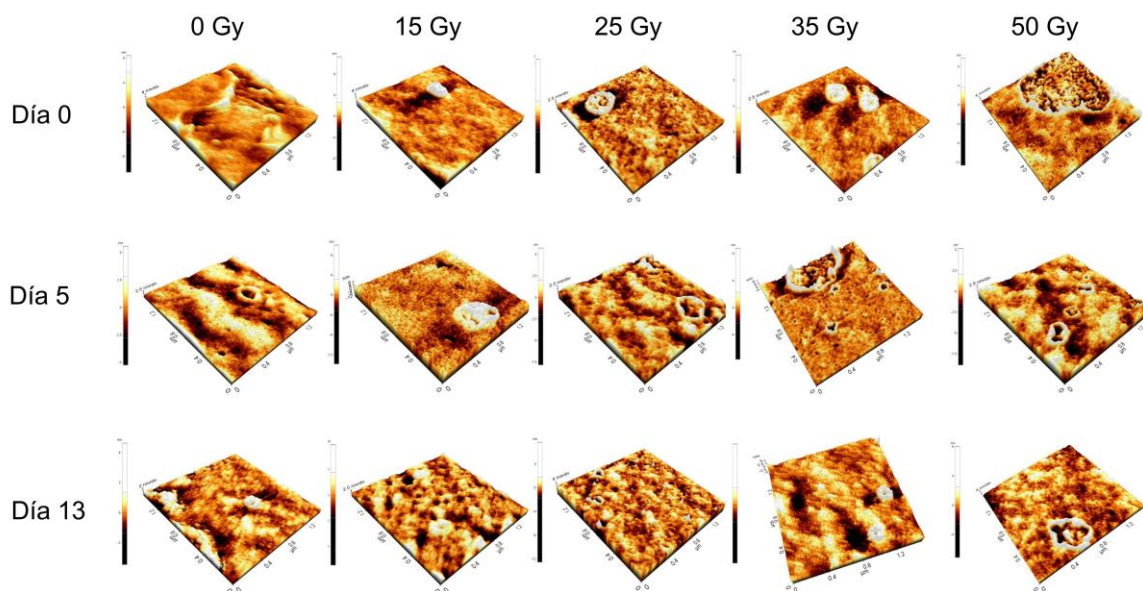


Figura 9. Imágenes ampliadas de la superficie del eritrocito γ irradiado y almacenado por AFM. Imágenes de 1.5 x 1.5 nm se tomaron de la zona cóncava del eritrocito a los cero, cinco y trece días de almacenamiento, en GR irradiados y sin irradiar. Se utilizó como control GR sin irradiar, se analizaron GR y γ -GR (15, 25, 35, y 50 Gy).

Tabla 3. Rugosidad de la membrana en glóbulos rojos γ -irradiados y almacenados.

Parámetro	Tiempo (Días)	0 Gy	15 Gy	25 Gy	35 Gy	50 Gy
Rugosidad (nm)	0	2.13 \pm 0.48	1.38 \pm 0.28	1.21 \pm 0.34	1.19 \pm 0.25	1.14 \pm 0.22
	5	1.28 \pm 0.36	1.23 \pm 0.34	1.21 \pm 0.26	1.04 \pm 0.24	0.90 \pm 0.18
	13	0.82 \pm 0.15	0.79 \pm 0.15	0.76 \pm 0.16	0.75 \pm 0.15	0.73 \pm 0.16

7.1.4 Análisis de sangre gamma irradiada y almacenada mediante espectroscopía Raman

La microespectroscopía Raman es una técnica específica que brinda un análisis no destructivo de las muestras, y tiene un potencial uso en aplicaciones médicas. En este trabajo se investigó el papel que juega el tiempo de almacenamiento y la radiación gamma sobre la estructura de Hb de los glóbulos rojos, mediante espectroscopía Raman. Se analizaron los espectros Raman de glóbulos rojos en el rango de 600-1700 cm^{-1} . Los espectros se originan principalmente de Hb y sus derivados como son oxi-, desoxi, met- y cianomethemoglobina [75]. La Figura 10 muestra los espectros de glóbulos rojos usando un láser de 532 nm. La selección de esta fuente de excitación generó una respuesta resonante de la Hb que supera la señal de las proteínas de la membrana. En nuestro análisis seguimos tanto la posición como la intensidad de las bandas (ν^4 , ν^{37} y ν^{10}), las cuales están estrechamente relacionadas con la oxigenación de la Hb debido a que, si existe algún cambio en dichas bandas, se ve comprometida la función de esta proteína. Cualquier modificación en estas bandas es fuertemente dependiente de la simetría del anillo principal de porfirina contribuyente de Hb e indican si han ocurrido cambios del estado Tenso (Oxy) o el estado Relajado (DeOxy). En nuestro experimento, los espectros de Raman mostraron que la radiación γ y el almacenamiento no producen cambios en el estado de oxigenación de la Hb. Por lo tanto, nuestros datos sugieren que las dosis bajas clínicas de radiación γ (15-50 Gy) no afectan la integridad de la Hb, pero el daño inducido en la membrana altera el transporte de oxígeno. Por esta razón se realizaron experimentos adicionales los cuales se muestran en la sección 7.2.4.1.

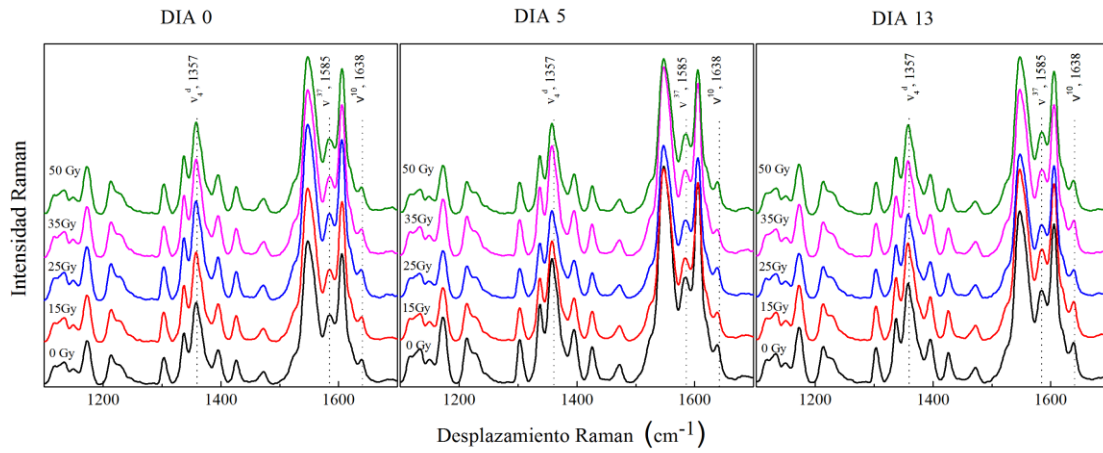


Figura 10. Espectros Raman promedio de GRs parcialmente oxigenados (100 espectros en diferentes eritrocitos bajo las mismas condiciones), con una excitación de 532 nm (20s de exposición, una acumulación), Potencia de láser 2mW. Se muestran los espectros Raman en diferentes tiempos de almacenamiento y con sus correspondientes dosis de radiación gamma (0,15, 25, 35 y 50 Gy).

7.2 Procesos de reoxigenación asistido con nanodiamantes carboxilados en glóbulos rojos gamma irradiados y almacenados

7.2.1 Técnicas de caracterización estructural de nanodiamantes y nanodiamantes carboxilados

En esta sección describiremos la caracterizaremos de nanodiamantes adquiridos en plasma chem y nanodiamantes carboxilados en nuestro laboratorio, haciendo el uso de técnicas de espectroscopia como lo son FTIR y Raman. Además, para determinar el tamaño de estas partículas se utilizaron las técnicas de DLS y AFM.

La espectroscopia de infrarrojo por la transformada de Fourier (FT-IR) y espectroscopia Raman son una herramienta útil para la caracterización estructural de materiales, por esa razón en nuestro trabajo las usaremos para conocer si el proceso de carboxilación ha sido exitoso. A continuación, se presentan los resultados por FTIR y Raman de los nanodiamantes adquiridos en plasma chem y los carboxilados.

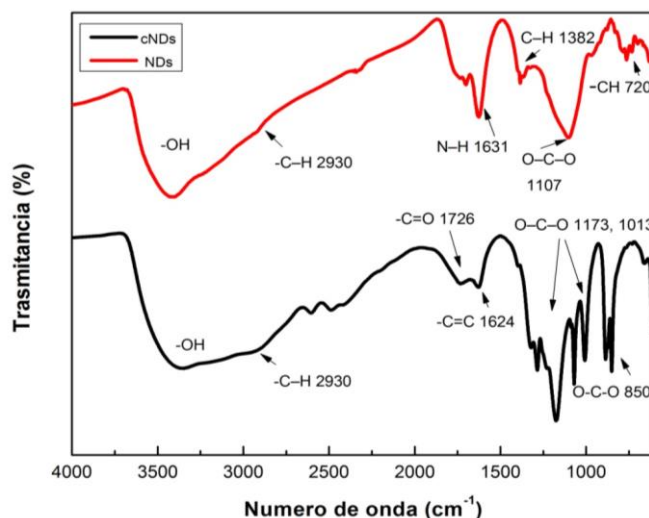


Figura 11. Espectro infrarrojo por la transformada de Fourier. NDs (línea de color negro), y NDs carboxilados (línea roja). Realizados en una pastilla de KBr [76].

Los espectros de FTIR se obtuvieron utilizando un espectrofotómetro Nicolet Protégé Modelo 460. El espectro de transmitancia se obtuvo de 4000 a 700 cm^{-1} . En la figura 11 se muestran los espectros FTIR de NDs (línea roja) y cNDs (línea negra). La característica principal de la eficiencia del proceso de carboxilación es la presencia de la banda de estiramiento asociada a $\text{C}=\text{O}$ alrededor de 1726 cm^{-1} . [77] La banda amplia alrededor de 3400 cm^{-1} está asociada a grupos $-\text{OH}$, atribuido a agua adsorbida en la superficie ND [78, 79]. La banda ancha cerca de 3000 cm^{-1} se puede atribuir al estiramiento CH formadas en la superficie ND durante el tratamiento con ácido [78]. Por último, las bandas en la región de $1450\text{-}700 \text{ cm}^{-1}$ podrían atribuirse a $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$ grupos éter que se encuentran en la superficie ND [79].

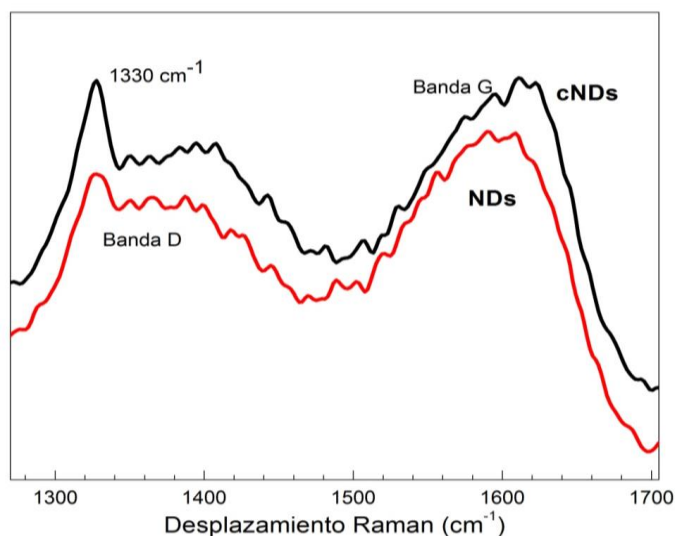


Figura 12. Espectros Raman de nanodiamantes de detonación a temperatura ambiente (línea roja) y nanodiamantes carboxilados (línea negra). Longitud de onda de excitación 633nm con láser de Helio-Neón.[76]

El espectro Raman característico de los nanodiamantes presenta sus bandas entre $1200\text{-}1700 \text{ cm}^{-1}$. La figura 12 muestra el espectro Raman de dos tipos de nanodiamantes a temperatura ambiente. El espectro de Raman de los nanodiamantes de detonación (línea roja, solución comercial), permiten identificar la estructura del diamante por la presencia de una banda estrecha alrededor de

1330 cm^{-1} atribuida a la estructura C-sp³ [80] y dos amplias bandas alrededor de 1350 y 1580 cm^{-1} asociados a las bandas D y G respectivamente en la estructura C-sp² del grafito [48]. Esta estructura de grafito es producto del residuo grafitico que se encuentra en los nanodiamantes de detonación como producto de su proceso. Por lo tanto, el análisis cualitativo de las dos curvas muestra que la intensidad de la banda de 1330 cm^{-1} aumenta en relación a la banda de grafito en la muestra cNDs. La deconvolución para esta región Raman de compuestos de carbono es muy compleja[81]. La deconvolución en la banda de 1300-1500 cm^{-1} nos aportaría información del tamaño de las partículas dispersadas, por otra parte la banda de 1500-1700 cm^{-1} nos da información valiosa de la presencia de grupos funcionales tales C-O, C=O, COOH y otros puede generar bandas Raman adicionales. A partir de este resultado, suponemos que existe una reducción de la capa grafitica presente en los nanodiamantes por detonación adquiridos en plasma chem, después del tratamiento con ácidos. Además, el espectro de los nanodiamantes carboxilados muestra una banda alrededor de 1625 cm^{-1} la cual ha sido asociada a la presencia de enlaces C=O en nanodiamantes [49, 82].

7.2.2 Técnicas de caracterización morfológica de nanodiamantes carboxilados

Microscopia de Fuerza Atómica, mejor conocida como AFM y Dispersión dinámica de la luz (DLS) son técnicas utilizadas para determinar el tamaño de nanodiamantes carboxilados.

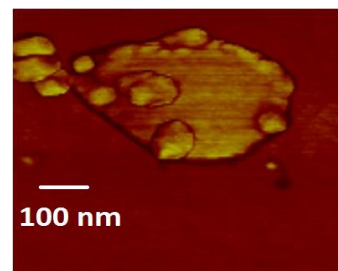
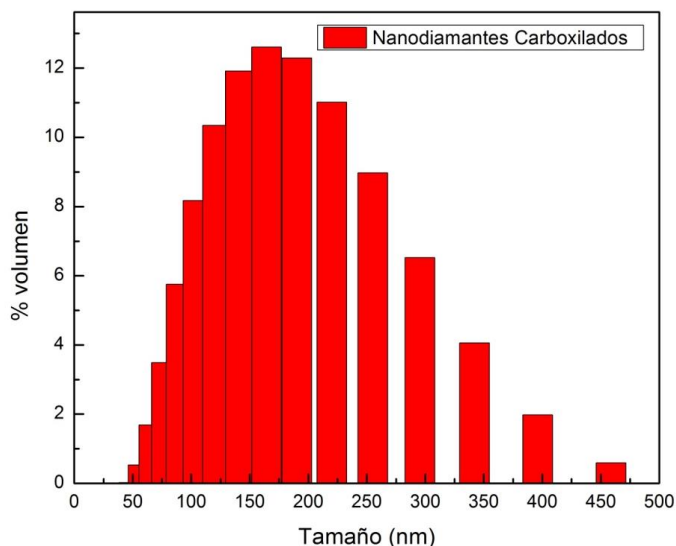


Figura 14. Microscopia de Fuerza Atómica de nanodiamantes carboxilados [76].

Figura 13. Dispersión dinámica de la luz mejor conocida como DLS de nanodiamantes carboxilados[76].

La técnica de dispersión dinámica de la luz se realizó a temperatura ambiente en solución acuosa, dicha técnica se utiliza con el fin de conocer la distribución de tamaño de los nanodiamantes carboxilados encontrándose una muestra poli dispersa en un intervalo de tamaño 50-450 nm, mostrando un máximo de población alrededor de los 150 nm (figura 13); la distribución de tamaño es confirmada mediante microscopia de fuerza atómica (ver figura 14). Los nanodiamantes tienen la tendencia a agregarse, antes de someterlos al proceso de carboxilación estos tenían un intervalo de tamaño de 100-600 nm, la reducción de tamaño probablemente está asociada a la repulsión electrostática provocada por los grupos carboxilos presentes en la superficie de los cNDs. En este punto, la estabilidad de los cNDs en suspensión fue favorecida por la presencia de los grupos carboxilos. Se calculó el potencial Z siendo de -17.9mV en pH=7.4.

7.2.3 Estudio de la hemólisis de glóbulos rojos por nanodiamantes

Los glóbulos rojos (GR) son discos bicóncavos con un diámetro aproximadamente de 7.5µm de diámetro y 1-2,5 µm de grosor. Cualquier cambio en su forma se ha relacionado con ciertas patologías o anormalidades [83], asociándose a cambios químicos o mecánicos que afectan su integridad, la mayoría de estos cambios están relacionados con la deformación de la membrana, formando glóbulos rojos espiculados o en forma de vesículas, entre otras. La aparición de estas alteraciones en la membrana está implicada la pérdida de antioxidantes endógenos del GR. Esta deficiencia puede dañar tanto el citoesqueleto como los fosfolípidos de la membrana [84]. En el mismo sentido, como consecuencia de estos cambios se induce la ruptura de la membrana y la hemólisis. El proceso de hemólisis es destructivo y limita la viabilidad de los glóbulos rojos. En nuestro estudio de hemólisis de NDs y cNDs muestran una baja tasa de hemólisis siendo directamente proporcional a la concentración, como se muestra en la Tabla 4. Es importante remarcar que la sangre almacenada cumplido con las directrices dictadas por el Consejo de Europa (menos del 0,8%) y la FDA de EE.UU. (menos que 1%).

Tabla 4. Hemólisis de glóbulos rojos inducida por nanodiamantes

	Concentración de cNDs y NDs (%p/v)							
	0.032	0.016	0.008	0.004	0.002	0.001	0.0005	0.00
cNDs 2h	0.17±0.08	0.08±0.1	0.06±0.1	0.02±0.09	0.05±0.1	0.09±0.05	0.08±0.05	0.1±0.09
cNDs 24h	0.8±0.1	0.63±0.05	0.93±0.1	0.92±0.09	0.7±0.09	0.86±0.05	0.83±0.05	0.69±0.01
NDs 2h	0.76±0.08	0.7±0.2	0.67±0.1	0.51±0.05	0.46±0.05	0.52±0.01	0.5±0.0	0.39±0.1
NDs 24h	2.73±0.01	1.53±0.01	1.13±0.02	1.64±0.1	0.93±0.1	0.91±0.05	0.6±0.03	0.44±0.04

El porcentaje de hemolisis fue determinado a las 2 y 24 horas después de la incubación de cNDs en glóbulos rojos. Se utilizaron 15 μl de sangre total y se diluyeron en un volumen de 1000 μl en un buffer fosfato salino (PBS) en presencia de NDs y cNDs. Los valores representan el promedio \pm desviación estándar [76].

7.2.4 Estudio del proceso de reoxigenación en glóbulos rojos gamma irradiados

Se estudió el seguimiento de reoxigenación de glóbulos rojos gamma irradiados en presencia y ausencia de cNDs, inmediatamente después de la irradiación (día cero), al 3^{er} y 5^{to} día de almacenamiento, la sangre fue irradiada utilizando una fuente de Cobalto 60 (^{60}Co) a una dosis de 25 Gy. Las Figuras 15, 16 y 17 muestran los espectros Raman de los glóbulos rojos bajo diferentes factores estresantes, se observan bandas Raman alrededor de 1635, 1582, y 1379 cm^{-1} que se asocian a hemoglobina oxigenada (Oxi-Hb) y bandas en 1603, 1547, y 1355 cm^{-1} que corresponden a hemoglobina desoxigenada (Desoxi-Hb)[28]. La capacidad de reoxigenación de los glóbulos rojos puede ser establecida por la relación entre el Oxi-Hb y Desoxi-Hb, especialmente entre los picos de 1379 y 1355 cm^{-1} ($R_{O/D}$) debido a su alta intensidad.

7.2.4.1 Reoxigenación de glóbulos rojos gamma irradiados asistidos con cNDs

Se utilizó la técnica de espectroscopia Raman para el estudio de los procesos de reoxigenación en glóbulos rojos, debido a que como se mencionó en la sección de marco teórico (2.6.1), la Hb se caracteriza por una huella digital única, sin embargo presenta variantes si cambia su estado de oxigenación, específicamente el estado de spin del Hierro (Fe). Los espectros Raman de Oxi-Hb y Desoxi-Hb presentan picos característicos en la región de 1700-1300 cm^{-1} . En la figura 9 se muestran los espectros Raman de glóbulos rojos desoxigenados (línea azul) en presencia y

ausencia de nanodiamantes, irradiados y sin irradiar, la hemoglobina desoxigenada presenta picos característicos 1603, 1547, y 1355 cm^{-1} entre estos espectros no se encontraron resultados significativos, lo que nos indica que los cNDs no tienen ningún efecto (positivo, ni negativo) en la desoxigenación de glóbulos rojos. Por otra parte, en el proceso de reoxigenación (línea roja) se observó que la presencia de nanodiamantes en sangre irradiada y sin irradiar promueve una reoxigenación casi total a los 90 minutos. Sin embargo, la sangre irradiada y sin irradiar en ausencia de cNDs presentan una reoxigenación parcial. Por lo cual vemos un indicio de que los nanodiamantes están promoviendo una reoxigenación.

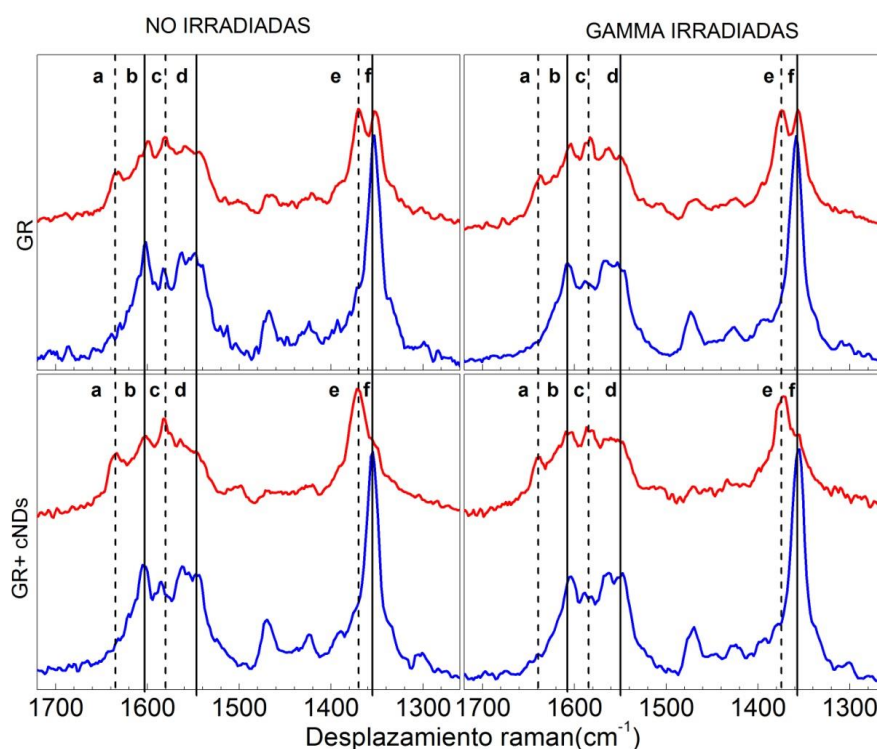


Figura 15. Espectros Raman de glóbulos rojos desoxigenados (azul línea inferior) y reoxigenada (línea superior roja) con una combinación de factores estresantes como son: la ausencia y presencia de cNDs (gráficas inferiores y superiores, respectivamente); GR y GR-gamma irradiados (gráficos izquierdo y derecho, respectivamente), inmediatamente después de la irradiación. Las líneas verticales A, C, y E corresponden a picos de Oxi-Hb en 1635, 1582, y 1379 cm^{-1} , respectivamente; Verticales de las líneas B, D y F corresponden a la Desoxi-Hb en 1603, 1547, y 1355 cm^{-1} , respectivamente[76].

7.2.4.2 Estudio del proceso de reoxigenación asistidos con cNDs de glóbulos rojos gamma irradiados y almacenados durante tres días

La sangre utilizada en la sección 4.2.4.1 se almaceno a 4°C y al tercer día se analizó bajo las mismas condiciones. A los 3 días de almacenamiento, los GR irradiados y sin irradiar presentan una reoxigenación parcial cuando están en presencia de cNDs, lo que nos da un indicio de efecto favorable atribuido por la presencia de estas partículas (Fig. 16). En nuestros resultados se muestra que los glóbulos rojos irradiados tienen una mejor capacidad de reoxigenación y recuperación morfológica cuando están en presencia de los cNDs: Aquí la función cooperativa de cNDs probablemente intervenga para restaurar de manera más eficiente la forma nativa de RBC, lo que se relaciona con la capacidad de adsorción de agua. Otra posible explicación de la protección de GR podría estar relacionada con una capacidad anti-oxidante de NDs adquirida en el proceso de carboxilación, que inactiva las ROS inducida por radiólisis.

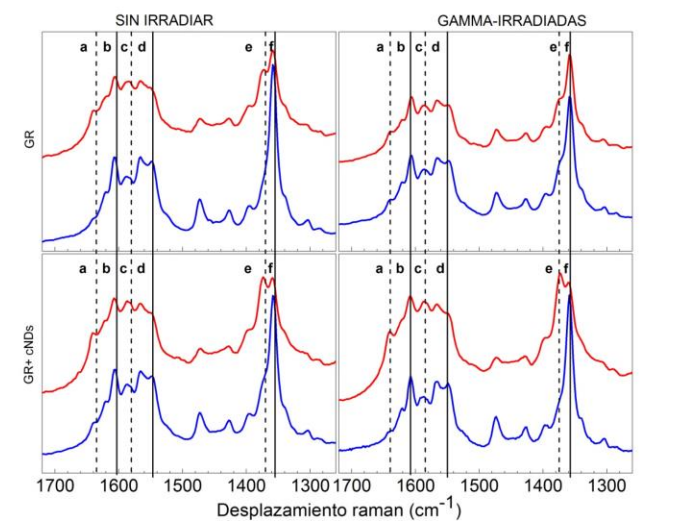


Figura 16. Espectros Raman de glóbulos rojos almacenados al día 3. Los GR-desoxigenados (azul línea) y GR-reoxigenada (línea roja) con una factores estresantes como son: la ausencia y presencia de cNDs); GR y GR-gamma irradiados. Las líneas verticales A, C, y E corresponden a picos de Oxi-Hb en 1635, 1582, y 1379 cm^{-1} , respectivamente; las líneas verticales de las líneas B, D y F corresponden a la Desoxi-Hb en 1603, 1547, y 1355 cm^{-1} , respectivamente[76].

7.2.4.3 Estudio del proceso de reoxigenación asistidos con cNDs de glóbulos rojos gamma irradiados y almacenados durante cinco días

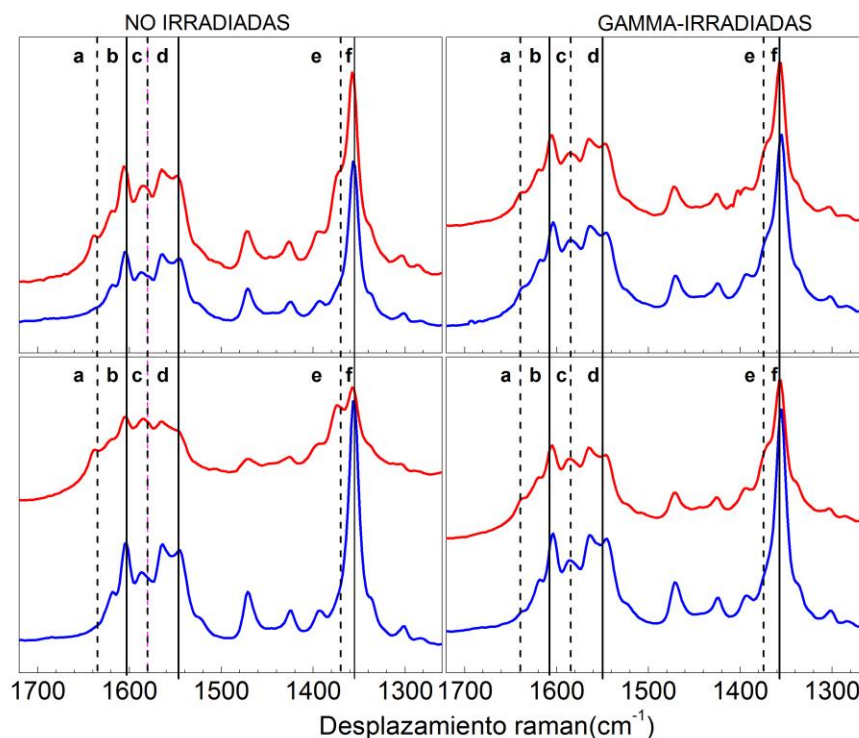


Figura 17. Espectros Raman de glóbulos rojos almacenados al día 5. Los GR-desoxigenados (azul línea) y GR-reoxigenada (línea roja) con una factores estresantes como son: la ausencia y presencia de cNDs); GR y GR-gamma irradiados. Las líneas verticales A, C, y E corresponden a picos de Oxi-Hb en 1635, 1582, y 1379 cm^{-1} , respectivamente; las líneas verticales de las líneas B, D y F corresponden a la Desoxi-Hb en 1603, 1547, y 1355 cm^{-1} , respectivamente [76].

La sangre que se utilizó en las dos secciones anteriores se analizó al día 5 de almacenamiento, todas las muestras disminuyeron la capacidad de reoxigenación a los 90 minutos, siendo más notorio en los hematíes irradiados (Fig. 17). En este caso, la capacidad de re-oxigenación de los glóbulos rojos se reduce, pero la presencia de cNDS revela un aumento significativo.

7.3 AFM de glóbulos rojos + cNDs

En esta sección se muestran dos imágenes de glóbulos rojos mediante Microscopía de Fuerza Atómica. En la figura 18A, se muestra la morfología de un glóbulo rojo con su tamaño estándar de $7.5\mu\text{m}$ diámetro y $2.5\mu\text{m}$ de espesor aparentemente tiene su forma regular. Por otra parte la figura 18B se muestra el glóbulo rojo en presencia de cNDs con lo cual podemos decir que se encuentran mayoritariamente en la membrana del eritrocito, lo cual concuerda a lo publicado por otros autores que nanodiamantes carboxilados de aproximadamente 100 nm se quedan en la membrana celular mientras cNDs entorno a 5 nm se internalizan en GR [85]. Sin embargo nuestra contribución con estas imágenes fue observar que la distribución de cNDs no es homogénea, se queda como un anillo alrededor de los glóbulos rojos.

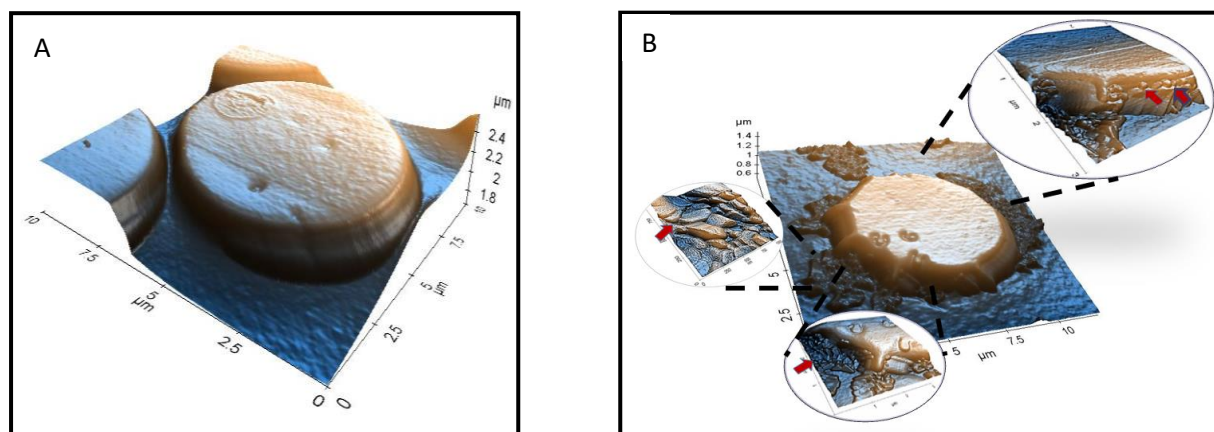


Figura 18. Imagen de glóbulos rojos por Microscopía de Fuerza Atómica (AFM). A.) Glóbulos rojos, B.) Glóbulos en presencia de cNDs.

7.4 Modelo fenomenológico: Interacción cNDs – Glóbulos rojos

Nuestros resultados están de acuerdo con estudios anteriores, donde se hace énfasis en que la interacción de cNDs con GR posiblemente puede producir cambios estructurales en las membranas celulares y modificar la dinámica de desoxigenación-oxigenación [85]. Otro efecto compensatorio sobre RBC capacidad re-oxigenación se puede atribuir a los nanodiamantes carboxilados. En este caso, los grupos carboxilo pueden actuar como iones "hidratantes", debido a la fuerte interacción entre las moléculas de agua y compuestos ionizados. Este proceso se explica cómo los electrolitos pueden o bien retener o absorber agua [86] y por lo tanto, la hidratación resultante puede promover la recuperación de la morfología glóbulos rojos. Como un posible mecanismo de interacción del glóbulo rojo con nanodiamantes se podría atribuir a la interacción de estos con iones divalentes como lo son el Ca^{2+} y Mg^{2+} . Por otra parte, en la membrana se encuentran proteínas transmembranales las cuales contienen aminoácidos básicos (aminoácidos como Arginina, Histidina y Lisina), los cuales pueden interaccionar con los nanodiamantes carboxilados.

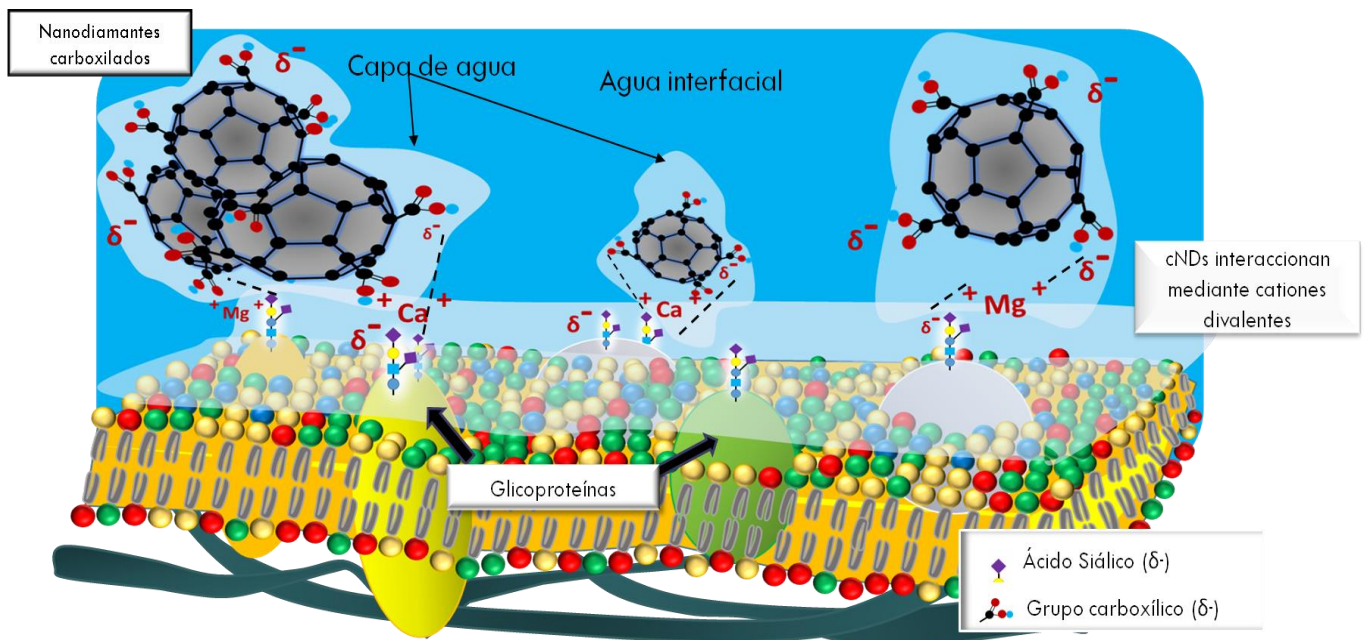


Figura 19. Imagen gráfica de la interacción de cNDs con glóbulos rojos.

(Construcción Original).

8. CONCLUSIONES

Los glóbulos rojos humanos son más susceptibles al daño al aumentar la dosis de radiación y el tiempo de almacenamiento.

Los resultados muestran que la morfología celular y el estado de oxigenación-Hb de los glóbulos rojos difieren con la presencia de nanodiamantes carboxilados.

Los nanodiamantes carboxilados aumentan la tasa de re-oxigenación de los glóbulos rojos irradiados y no irradiados después del almacenamiento.

Proponemos que el nanodiamante carboxilado podría estar actuando como un escudo protector que podría añadirse a la sangre irradiada para proteger las propiedades mecánicas de los glóbulos rojos. Se necesita más investigación para determinar los mecanismos implicados.

Proponemos que el valor de rugosidad media y la presencia de nanovesículas se pueden utilizar como un parámetro sensible temprano de integridad en la membrana. Sin embargo se requieren más estudios al respecto.

9. REFERENCIAS

1. Mukherjee, R., et al., *Nanoscale Surface Characterization of Human Erythrocytes by Atomic Force Microscopy: A Critical Review*. IEEE transactions on nanobioscience, 2015. **14**(6): p. 625-633.
2. Sackmann, E., *Biological membranes architecture and function*. Structure and Dynamics of Membranes, 1995. **1**: p. 1-63.
3. Weed, R.I., C.F. Reed, and G. Berg, *IS HEMOGLOBIN AN ESSENTIAL STRUCTURAL COMPONENT OF HUMAN ERYTHROCYTE MEMBRANES?* J Clin Invest, 1963. **42**(4): p. 581-8.
4. Kilic, S.S., S. Kavurt, and S.B. Adim, *Transfusion-Associated Graft-Versus-Host Disease in Severe Combined Immunodeficiency*. Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology, 2010. **20**(2): p. 153-156.
5. Del Lama, L.S., et al., *Prevention of Transfusion-Associated Graft-versus-Host Disease by Irradiation: Technical Aspect of a New Ferrous Sulphate Dosimetric System*. Plos One, 2013. **8**(6): p. 9.
6. Guermonprez, P., et al., *Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells*. Annual Review of Immunology, 2002. **20**: p. 621-667.
7. Treleaven, J., et al., *Guidelines on the use of irradiated blood components prepared by the British Committee for Standards in Haematology blood transfusion task force*. British Journal of Haematology, 2011. **152**(1): p. 35-51.
8. Chapman, J., et al., *Guidelines on gamma irradiation of blood components for the prevention of transfusion-associated graft-versus-host disease*. Transfusion Medicine, 1996. **6**(3): p. 261-271.
9. Fast, L.D., et al., *Treatment of whole blood with riboflavin plus ultraviolet light, an alternative to gamma irradiation in the prevention of transfusion-associated graft-versus-host disease?* Transfusion, 2013. **53**(2): p. 373-381.
10. L'Annunziata, M.F., *Handbook of radioactivity analysis*. 2012: Academic Press.
11. Dendy, P.P. and B. Heaton, *Physics for diagnostic radiology*. 2011: CRC Press.
12. Bushong, S.C., *Radiologic science for technologists. Manual de radiología para técnicos: física, biología y protección radiológica*. 1993.
13. Moroff, G. and N.L.C. Luban, *The irradiation of blood and blood components to prevent graft-versus-host disease: Technical issues and guidelines*. Transfusion Medicine Reviews, 1997. **11**(1): p. 15-26.
14. Góes, E.G., et al., *Quality control of blood irradiation: determination T cells radiosensitivity to cobalt-60 gamma rays*. Transfusion, 2006. **46**(1): p. 34-40.
15. Erkal, H.Ş., Y. Karakoç, and M. Serin, *The effects of irradiation on the blood dynamics*. Clinical hemorheology and microcirculation, 2009. **41**(4): p. 263-267.

16. Das, D.K., et al., *Modulatory role of quercetin against gamma radiation-mediated biochemical and morphological alterations of red blood cells*. Int J Radiat Biol, 2013. **89**(6): p. 471-81.
17. Burns, W.G. and H.E. Sims, *EFFECT OF RADIATION TYPE IN WATER RADIOLYSIS*. Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions I, 1981. **77**: p. 2803-2813.
18. Hensley, K., et al., *Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury*. Free Radical Biology and Medicine, 2000. **28**(10): p. 1456-1462.
19. Collard, K., D. White, and A. Copplestone, *The influence of storage age on iron status, oxidative stress and antioxidant protection in paediatric packed cell units*. Blood Transfusion, 2014. **12**(2): p. 210-219.
20. Santacruz-Gomez, K., et al., *Carboxylated nanodiamonds inhibit gamma-irradiation damage of human red blood cells*. Nanoscale, 2016. **8**(13): p. 7189-7196.
21. Ferraro, J.R., *Introductory raman spectroscopy*. 2003: Academic press.
22. Solé, J., L. Bausa, and D. Jaque, *An introduction to the optical spectroscopy of inorganic solids*. 2005: John Wiley & Sons.
23. Long, D.A., *Raman spectroscopy*. New York, 1977: p. 1-12.
24. Zaczek, M.B. and U.o. Houston, *Biological Applications of Resonance Raman Spectroscopy: Structural Characterization of Copper-cysteinate Active Sites in Blue Copper Proteins*. 2008: University of Houston.
25. Spiro, T.G. and T.C. Streckas, *Resonance Raman spectra of heme proteins. Effects of oxidation and spin state*. Journal of the American Chemical Society, 1974. **96**(2): p. 338-345.
26. Spiro, T.G., *Resonance Raman spectroscopy. New structure probe for biological chromophores*. Accounts of Chemical Research, 1974. **7**(10): p. 339-344.
27. Spiro, T.G. and X. Li, *Resonance Raman spectroscopy of metalloporphyrins. Biological applications of Raman spectroscopy*, 1988.
28. Wood, B.R. and D. McNaughton, *Raman excitation wavelength investigation of single red blood cells in vivo*. Journal of Raman Spectroscopy, 2002. **33**(7): p. 517-523.
29. Chen, K.R., et al., *Review of Surface Enhanced Raman Spectroscopy for Malaria Diagnosis and a New Approach for the Detection of Single Parasites in the Ring Stage*. Ieee Journal of Selected Topics in Quantum Electronics, 2016. **22**(4): p. 9.
30. Wood, B.R., et al., *Raman microspectroscopy and imaging provides insights into heme aggregation and denaturation within human erythrocytes*. Journal of Biomedical Optics, 2005. **10**(1): p. 014005-01400513.
31. Marzec, K.M., et al., *High-resolution Raman imaging reveals spatial location of heme oxidation sites in single red blood cells of dried smears*. Journal of Raman Spectroscopy, 2015. **46**(1): p. 76-83.
32. Wood, B.R., B. Tait, and D. McNaughton, *Micro-Raman characterisation of the R to T state transition of haemoglobin within a single living erythrocyte*.

- Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research, 2001. **1539**(1-2): p. 58-70.
33. Callahan, P.M. and G.T. Babcock, *INSIGHTS INTO HEME STRUCTURE FROM SORET EXCITATION RAMAN-SPECTROSCOPY*. Biochemistry, 1981. **20**(4): p. 952-958.
 34. Hu, S.Z., K.M. Smith, and T.G. Spiro, *Assignment of protoheme Resonance Raman spectrum by heme labeling in myoglobin*. Journal of the American Chemical Society, 1996. **118**(50): p. 12638-12646.
 35. Rygula, A., et al., *Raman spectroscopy of proteins: a review*. Journal of Raman Spectroscopy, 2013. **44**(8): p. 1061-1076.
 36. Nune, S.K., et al., *Nanoparticles for biomedical imaging*. Expert opinion on drug delivery, 2009. **6**(11): p. 1175-1194.
 37. Ferrari, M., *Cancer nanotechnology: Opportunities and challenges*. Nature Reviews Cancer, 2005. **5**(3): p. 161-171.
 38. Weissleder, R., *Molecular imaging in cancer*. Science, 2006. **312**(5777): p. 1168-1171.
 39. Erathodiyil, N. and J.Y. Ying, *Functionalization of Inorganic Nanoparticles for Bioimaging Applications*. Accounts of Chemical Research, 2011. **44**(10): p. 925-935.
 40. Burleson, T., N. Yusuf, and A. Stanishevsky, *Surface modification of nanodiamonds for biomedical application and analysis by infrared spectroscopy*. J Ach Mat Manufac Eng, 2009. **37**(2): p. 258-263.
 41. Deerinck, T.J., *The application of fluorescent quantum dots to confocal, multiphoton, and electron microscopic imaging*. Toxicologic pathology, 2008. **36**(1): p. 112-116.
 42. Son, S.J., X. Bai, and S.B. Lee, *Inorganic hollow nanoparticles and nanotubes in nanomedicine: Part 1. Drug/gene delivery applications*. Drug Discovery Today, 2007. **12**(15): p. 650-656.
 43. Duncan, R. and F. Spreafico, *Polymer conjugates. Pharmacokinetic considerations for design and development*. Clinical pharmacokinetics, 1994. **27**(4): p. 290-306.
 44. Schrand, A.M., S.A.C. Hens, and O.A. Shenderova, *Nanodiamond particles: properties and perspectives for bioapplications*. Critical reviews in solid state and materials sciences, 2009. **34**(1-2): p. 18-74.
 45. Ho, D., *Beyond the sparkle: the impact of nanodiamonds as biolabeling and therapeutic agents*. ACS nano, 2009. **3**(12): p. 3825-3829.
 46. Chow, E.K., et al., *Nanodiamond therapeutic delivery agents mediate enhanced chemoresistant tumor treatment*. Science translational medicine, 2011. **3**(73): p. 73ra21-73ra21.
 47. Salata, O.V., *Applications of nanoparticles in biology and medicine*. Journal of nanobiotechnology, 2004. **2**(1): p. 1.
 48. Ferrari, A.C. and J. Robertson, *Interpretation of Raman spectra of disordered and amorphous carbon*. Physical Review B, 2000. **61**(20): p. 14095-14107.
 49. Mochalin, V.N., et al., *The properties and applications of nanodiamonds*. Nature Nanotechnology, 2012. **7**(1): p. 11-23.

50. Ager III, J.W., D.K. Veirs, and G.M. Rosenblatt, *Spatially resolved Raman studies of diamond films grown by chemical vapor deposition*. Physical Review B, 1991. **43**(8): p. 6491.
51. Sapsford, K.E., et al., *Functionalizing Nanoparticles with Biological Molecules: Developing Chemistries that Facilitate Nanotechnology*. Chemical Reviews, 2013. **113**(3): p. 1904-2074.
52. Petit, T., et al., *Probing Interfacial Water on Nanodiamonds in Colloidal Dispersion*. Journal of Physical Chemistry Letters, 2015. **6**(15): p. 2909-2912.
53. Faulkner, R. and J.W. King, *Manual of Clinical Laboratory Procedures*. Chemical Rubber Company, 1970.
54. Girasole, M., et al., *Roughness of the plasma membrane as an independent morphological parameter to study RBCs: a quantitative atomic force microscopy investigation*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1768**(5): p. 1268-76.
55. Soares, J.C., et al., *Ebselen exhibits glycation-inhibiting properties and protects against osmotic fragility of human erythrocytes in vitro*. Cell Biol Int, 2014. **38**(5): p. 625-30.
56. Kay, M.M.B., et al., *BRAIN MEMBRANE-PROTEIN BAND-3 PERFORMS THE SAME FUNCTIONS AS ERYTHROCYTE BAND-3*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1991. **88**(7): p. 2778-2782.
57. Kay, M.M.B., et al., *MOLECULAR-BASIS OF HUMAN BAND-3 MUTATION ASSOCIATED WITH INCREASED ANION TRANSPORT*. Experimental and Clinical Immunogenetics, 1994. **11**(4): p. 209-221.
58. Perlman, D.F., M.W. Musch, and L. Goldstein, *Band 3 in cell volume regulation in fish erythrocytes*. Cellular and Molecular Biology, 1996. **42**(7): p. 975-984.
59. Kozlova, E., et al., *Transformation of membrane nanosurface of red blood cells under hemin action*. Sci Rep, 2014. **4**: p. 6033.
60. Chiu, D.T.Y., et al., *Hemin-induced membrane sulfhydryl oxidation: Possible involvement of thiyl radicals*. Free Radical Research, 1997. **27**(1): p. 55-62.
61. Benderitter, M., et al., *The cell membrane as a biosensor of oxidative stress induced by radiation exposure: a multiparameter investigation*. Radiat Res, 2009. **159**: p. 471- 483.
62. Relevy, H., et al., *Blood banking-induced alteration of red blood cell flow properties*. Transfusion, 2008. **48**(1): p. 136-46.
63. Hess, J.R., et al., *Red blood cell hemolysis during blood bank storage: using national quality management data to answer basic scientific questions*. Transfusion, 2009. **49**(12): p. 2599-603.
64. Moroz, V.V., et al., *Disorders in the Morphology and Nanostructure of Erythrocyte Membranes after Long-term Storage of Erythrocyte Suspension: Atomic Force Microscopy Study*. Bull Exp Biol Med, 2015. **159**(3): p. 406-10.
65. Jaferzadeh, K. and I. Moon, *Quantitative investigation of red blood cell three-dimensional geometric and chemical changes in the storage lesion using digital holographic microscopy*. Journal of biomedical optics, 2015. **20**(11): p. 111218-10.

66. Kamat, J.P., et al., *Reactive oxygen species mediated membrane damage induced by fullerene derivatives and its possible biological implications*. Toxicology, 2000. **155**(1-3): p. 55-61.
67. Moroz, V.V., et al., *Comparison of red blood cell membrane microstructure after different physicochemical influences: atomic force microscope research*. J Crit Care, 2010. **25**(3): p. 539 e1-12.
68. Sut, C., et al., *Duration of red blood cell storage and inflammatory marker generation*. Blood Transfusion, 2017. **15**(2): p. 145-152.
69. Jozwiak, Z., *Radiation damage to the erythrocyte membrane in the presence of radical anions. I*. Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med, 1983. **43**(2): p. 195-200.
70. Kriebardis, A.G., et al., *Progressive oxidation of cytoskeletal proteins and accumulation of denatured hemoglobin in stored red cells*. J Cell Mol Med, 2007. **11**(1): p. 148-55.
71. Mukherjee, R., et al., *Nanoscale Surface Characterization of Human Erythrocytes by Atomic Force Microscopy: A Critical Review*. IEEE Trans Nanobioscience, 2015. **14**(6): p. 625-33.
72. Wang, D.C., et al., *AFM membrane roughness as a probe to identify oxidative stress-induced cellular apoptosis*. J Biomech, 2011. **44**(16): p. 2790-4.
73. Girasole, M., et al., *The how, when, and why of the aging signals appearing on the human erythrocyte membrane: an atomic force microscopy study of surface roughness*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2010. **6**(6): p. 760-768.
74. Santacruz-Gomez, K., et al., *An AFM Approach of RBC Micro and Nanoscale Topographic Features during Storage*. World Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of Medical, Health, Biomedical, Bioengineering and Pharmaceutical Engineering, 2014. **8**(8): p. 478-481.
75. Wood, B.R., et al., *Raman microspectroscopy and imaging provides insights into heme aggregation and denaturation within human erythrocytes*. J Biomed Opt, 2005. **10**(1): p. 14005.
76. Acosta-Elias, M., et al., *Carboxylated nanodiamond and re-oxygenation process of gamma irradiated red blood cells*. Physica Status Solidi a-Applications and Materials Science, 2015. **212**(11): p. 2437-2444.
77. Desai, C., K. Chen, and S. Mitra, *Aggregation behavior of nanodiamonds and their functionalized analogs in an aqueous environment*. Environmental Science-Processes & Impacts, 2014. **16**(3): p. 518-523.
78. Tu, J.S., et al., *Size-dependent surface CO stretching frequency investigations on nanodiamond particles*. Journal of Chemical Physics, 2006. **125**(17): p. 7.
79. Chung, P.H., et al., *Spectroscopic study of bio-functionalized nanodiamonds*. Diamond and Related Materials, 2006. **15**(4-8): p. 622-625.
80. Ager, J.W., D.K. Veirs, and G.M. Rosenblatt, *SPATIALLY RESOLVED RAMAN STUDIES OF DIAMOND FILMS GROWN BY CHEMICAL VAPOR-DEPOSITION*. Physical Review B, 1991. **43**(8): p. 6491-6499.

81. Diez-Betriu, X., et al., *Raman spectroscopy for the study of reduction mechanisms and optimization of conductivity in graphene oxide thin films*. Journal of Materials Chemistry C, 2013. **1**(41): p. 6905-6912.
82. Mermoux, M., et al., *Surface Modifications of Detonation Nanodiamonds Probed by Multiwavelength Raman Spectroscopy*. Journal of Physical Chemistry C, 2014. **118**(40): p. 23415-23425.
83. Tomaiuolo, G., *Biomechanical properties of red blood cells in health and disease towards microfluidics*. Biomicrofluidics, 2014. **8**(5): p. 19.
84. Almac, E. and C. Ince, *The impact of storage on red cell function in blood transfusion*. Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology, 2007. **21**(2): p. 195-208.
85. Lin, Y.C., et al., *The influence of nanodiamond on the oxygenation states and micro rheological properties of human red blood cells in vitro*. Journal of Biomedical Optics, 2012. **17**(10): p. 9.
86. Fukasawa, T. and Y. Adachi, *Direct observation on the Brownian coagulation of PSL particles through optical microscope in the regime near critical coagulation concentration (CCC)*. Journal of Colloid and Interface Science, 2010. **344**(2): p. 343-347.

10. ANEXOS



Nano alterations of membrane structure on both γ -irradiated and stored human erythrocytes

Mónica Alessandra Acosta-Elías, Alexel Jesús Burgara-Estrella, J. Andrei Sarabia-Sainz, Erika Silva-Campa, Aracely Angulo-Molina, Karla Josefina Santacruz-Gómez, Beatriz Castaneda, Diego Soto-Puebla, Ana Irene Ledesma-Osuna, Rodrigo Melendrez-Amavizca & Martín Pedroza-Montero

To cite this article: Mónica Alessandra Acosta-Elías, Alexel Jesús Burgara-Estrella, J. Andrei Sarabia-Sainz, Erika Silva-Campa, Aracely Angulo-Molina, Karla Josefina Santacruz-Gómez, Beatriz Castaneda, Diego Soto-Puebla, Ana Irene Ledesma-Osuna, Rodrigo Melendrez-Amavizca & Martín Pedroza-Montero (2017) Nano alterations of membrane structure on both γ -irradiated and stored human erythrocytes, *International Journal of Radiation Biology*, 93:12, 1306-1311, DOI: [10.1080/09553002.2017.1393581](https://doi.org/10.1080/09553002.2017.1393581)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/09553002.2017.1393581>



Accepted author version posted online: 16 Oct 2017.
Published online: 07 Nov 2017.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 49



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Part of Topical Section on
20 Years of Science for Diamond

Carboxylated nanodiamond and re-oxygenation process of gamma irradiated red blood cells

M. Acosta-Elías¹, A. Sarabia-Sainz², S. Pedroso-Santana³, E. Silva-Campa², K. Santacruz-Gomez⁴, A. Angulo-Molina², B. Castaneda⁴, D. Soto-Puebla², M. Barboza-Flores², R. Melendrez², S. Álvarez-García², and M. Pedroza-Montero^{*2}

¹ Doctorado en Nanotecnología, Universidad de Sonora, Mexico

² Departamento de Investigación en Física, Universidad de Sonora, P.O. Box. 5-088, Hermosillo, Mexico

³ Doctorado en Ciencias (Física), Universidad de Sonora, Hermosillo, Mexico

⁴ Departamento de Física, Universidad de Sonora, Hermosillo, Mexico

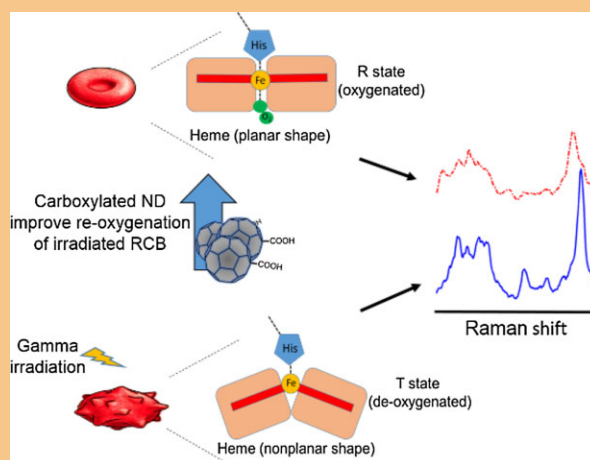
Received 18 March 2015, revised 9 October 2015, accepted 20 October 2015

Published online 5 November 2015

Keywords γ irradiation, diamond, nanomaterials, Raman spectroscopy, red blood cells

* Corresponding author: e-mail martin.pedroza@gmail.com, Phone: +52 662 259 2156, Fax: +52 662 212 6649

Nanodiamonds (NDs) possess exceptional physical, chemical, and biological properties, which make them suitable for potential biomedical applications. They are biocompatible and their usefulness as effective Raman/fluorescence probes for labeling as well as for drug delivery has been demonstrated. Related to their biocompatibility, the interaction between NDs and red blood cells (RBCs) is of great interest. In this work, the influence of carboxylated NDs (cNDs) in the re-oxygenation capability of both γ -irradiated and stored RBCs was studied. The standard 25 Gy γ dose recommended to prevent transfusion associated graft-versus-host disease was used. A 5-day maximum storage time was used to evaluate the “storage lesion”. The hemoglobin (Hb) oxygenation state was assessed by Raman microspectroscopy and the morphologic changes on cells were tracked by optical imaging. Our results show that irradiated RBCs have a better re-oxygenation capability and morphological recovery when they are in presence of cNDs.



© 2015 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

1 Introduction Nanodiamonds (NDs) are nanostructured carbon materials that have attracted scientific attention due to their potential biomedical applications. They offer excellent properties as chemical stability, high surface/volume ratio, low cytotoxicity, and their surface can be modified with specific molecules to get more biocompatibility or improve their spectroscopic properties. Additionally, NDs exhibit unique Raman (single band at around 1330 cm^{-1}) [1, 2] and fluorescence (without

photobleaching) signals with great potential as markers in several biomedical applications [3–7].

The successful biomedical application of NDs depends on the understanding of the mechanisms involved in their interaction with blood components such as red blood cells (RBCs). The main function of RBCs is the transportation of oxygen coupled to the hemoglobin protein (Hb) through the capillaries of organs and tissues. The interaction between NDs and living cells have been studied by many authors



Original Research Article

Deagglomeration and characterization of detonation nanodiamonds for biomedical applications



Seidy Pedroso-Santana^{a,*}, Andrei Sarabia-Saíñz^a, Noralvis Fleitas-Salazar^a,
Karla Santacruz-Gómez^b, Monica Acosta-Elías^b, Martin Pedroza-Montero^a, Raul Riera^a

^a Departamento de Investigación en Física, Universidad de Sonora, Apartado postal 5-088, Hermosillo, C.P. 83190, Mexico

^b Departamento de Física, Universidad de Sonora, Hermosillo, Apartado postal 1626, C.P. 83000, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 April 2016

Accepted 22 September 2016

Available online 4 October 2016

Keywords:

Nanodiamond
Deagglomeration
Carboxylation
Raman
RBC

ABSTRACT

Detonation nanodiamonds (DNDs) are usually small particles of 4–5 nm, but in aqueous suspension, DNDs form agglomerates in sizes larger than 1 μm . We propose the use of Bead Assisted Sonic Disintegration and a carboxylation procedure, to reduce DNDs aggregates sizes to approximately 100 nm. High cost zirconium beads have been substituted by silica beads synthesized in our laboratory and less-time consuming conditions were standardized. Techniques as Dynamic Light Scattering (DLS), Fourier Transform InfraRed Spectroscopy (FTIR), Transmission Electron Microscopy (TEM) and X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS), have been used to characterize the resulting diamond nanoparticles. While the incubation of Red Blood Cells with partially disaggregated DNDs was used to study whether these nanodiamonds impact in a living system. Our results show the absence of a negative effect in cell viability as well as no differences between Raman spectra of hemoglobin (Hb), from control and cell + DNDs conditions.

© 2016 Faculty of Health and Social Sciences, University of South Bohemia in Ceske Budejovice. Published by Elsevier Sp. z o.o. All rights reserved.

Introduction

Nowadays detonation nanodiamonds with sizes between 4 and 6 nm, are very attractive for nanotechnology. Among several important applications, their narrow size distribution together with biocompatibility and chemical inertness, potentiate the use of DNDs in biomedical research. DNDs have a wide range of possibilities for surfaces functionalization (Krueger and Boedeker, 2008) allowing its combination with antibodies, and other biomolecules, with implications in cell imaging and drug delivery (Mochalin et al., 2012). However, the use of DNDs in biomedicine has been limited due to their tendency to form aggregates, and the impossibility of standard methods, like sonication and centrifugation, to break the micro-sized agglomerates.

To overcome this limitation, during the last decade, some works have used different methods to achieve a complete, or considerable, disaggregation. Kruger and colleagues obtained primary particles by using of stirred-media milling with micron-sized ceramic beads, from DNDs agglomerates of 100–200 nm. They used

a self-made vertical stirred mill and spherical silica beads added to DNDs. After milling, beads separation, and sonication, a clear colloid with less than 10 nm particles was obtained. Although this process was efficient breaking the agglomerates, it started from relatively short aggregates and some silica contamination was generated (Kruger et al., 2005). Aleksenskiy et al. (2011) performed a similar procedure using zirconium beads instead of silica. The result showed a considerable reduction of the agglomerates and, also, the presence of contamination with zirconium dioxide. To avoid the contamination, these authors proposed a second and more extensive method of disaggregation, using strong acids for treatment of DNDs and annealing at 450 °C. This method rendered particles of 70–80 nm, with a group of small units (less than 10 nm in size) that was separated by centrifugation.

The procedure developed by Pentecost et al. (2010) sought to overcome the contamination problems using dry media assisted attrition milling, with non-contaminating compounds as sodium chloride or sucrose and stainless steel grinding balls. Nevertheless, contamination with iron is possible and must be removed using an acid treatment. After 5 h of milling and a subsequent pH adjustment, the size of the agglomerates was reduced to less than 100 nm with predominant presence of particles around 10 nm. This could be one of the most efficient procedures but the

* Corresponding author.

E-mail address: seidypedroso@gmail.com (S. Pedroso-Santana).