

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***ADMINISTRACIÓN INTRANASAL DE NANOPARTÍCULAS DE
ORO FUNCIONALIZADAS CON POLIETILENGLICOL Y
PÉPTIDO D1***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado
de Doctor en Ciencias Farmacéuticas por:**

EDUARDO IGNACIO GALLARDO TOLEDO

Director de Tesis: Dr. Marcelo Kogan

Santiago-CHILE

Octubre 2020

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

EDUARDO IGNACIO GALLARDO TOLEDO

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias Farmacéuticas en el examen público rendido el día _____

Director de Tesis:

Dr. Marcelo Kogan _____

Co-director de Tesis:

Dr. Amnon Sintov _____

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Andrónico Neira _____

Dra. Karina Valdés _____

Dr. Carlos Díaz _____

Dr. Carlos Von Plessing _____

Agradecimientos

En primer lugar, agradecer a Marcelo Kogan por brindarme la oportunidad de formar parte de su gran grupo de investigación, por confiar en mí, y por ser un excelente guía en todo momento. A Amnon Sintov por permitirme hacer mi pasantía doctoral en su laboratorio, por su guía, y apoyo durante mi estadía en Israel.

A los miembros de la comisión, Dr. Andrónico Neira, Dra. Karina Valdés, Dr. Carlos Díaz, y Dr. Carlos Von Plessing, por sus consejos y críticas constructivas a lo largo de este período.

A todos los integrantes del laboratorio de Nanotecnología, por su ayuda, consejos, y por ser un excelente grupo humano. Agradecer especialmente a Andreas, por el trabajo en conjunto, el apoyo en la lucha incansable contra los nanoprismas, y por ser una excelente persona.

A los Pharmaceuticals Pancho, Memo, Paula y Rorro, por las salidas, apañes, y ser unos tremendos compañeros de doctorado. A Dani y Moni por el compañerismo en el agua, los excelentes desayunos, y ser grandes personas. A la bandita, Seba y Fran, por las celebraciones y su gran amistad. A mis amigos Gran, Foncho, Nico, Diegol, Lucho, y Vicho, por la buena onda, los lindos momentos, y ser lo más grande.

A mis suegros y cuñado por su gran apoyo y afecto. A mis papás, hermanas, y sobrinas por su cariño y apoyo incondicional durante todo este proceso.

Y a la mejor, a Carolina, por ser la hermosa persona que es, por estar siempre presente, y acompañarme durante todo este proceso. Por su ayuda y consejos que me permitieron llegar a este momento. No existen palabras para expresar mi gratitud y amor por ti, contigo todo es simplemente mejor.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | |
|--|----|
| Tabla de Abreviaturas | 1 |
| Índice de Figuras y Tablas | 3 |
| Resumen..... | 6 |
| Abstract..... | 8 |
| Capítulo 1: Introducción, Hipótesis y Objetivos | 10 |
| Introducción..... | 11 |
| 1.1. Nanobiotecnología: aplicaciones de nanopartículas de oro en biomedicina | 11 |
| 1.2. Uso de nanopartículas de oro para una potencial terapia para la enfermedad de Alzheimer | 14 |
| 1.3. Llegada de las NPO al cerebro | 17 |
| 1.3.1 Barrera hematoencefálica | 17 |
| 1.3.2 Una ruta alternativa para evitar el cruce de la BHE: La vía intranasal..... | 20 |
| 1.4. Estrategias para incrementar la biodisponibilidad mediante la administración por la vía intranasal..... | 24 |
| Hipótesis..... | 28 |
| Objetivos..... | 28 |
| Referencias..... | 29 |
| Capítulo 2: Metodología..... | 34 |
| 2.1. Síntesis nanoprismas de oro (NPrO) | 35 |
| 2.2. Síntesis de nanoesferas de oro (NEO)..... | 35 |
| 2.3. Funcionalización con HS-PEG-COOH..... | 36 |
| 2.4. Purificación de NPrO mediante centrifugación | 36 |
| 2.5. Doble funcionalización con HS-PEG-COOH | 37 |
| 2.6. Conjugación del péptido D1 | 37 |
| 2.7. Recubrimiento con polímeros mediante <i>layer-by-layer</i> | 38 |
| 2.8. Espectrofotometría UV-Visible-NIR | 39 |
| 2.9. Dispersión dinámica de la luz (DLS) | 40 |
| 2.10. Potencial Zeta | 40 |
| 2.11. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)..... | 40 |
| 2.12. Determinación de la concentración de nanopartículas | 41 |
| i) Absorción atómica..... | 41 |
| ii) Nanosight..... | 42 |

| | |
|---|----|
| 2.13. Número de péptidos por nanopartícula | 43 |
| 2.14. Espectroscopía Raman | 44 |
| 2.15. Determinación de la estabilidad coloidal..... | 45 |
| 2.16. Ensayos de viabilidad celular | 46 |
| 2.17. Experimentos <i>In Vivo</i> | 47 |
| i) <i>Animales</i> | 47 |
| ii) <i>Administración intranasal (IN) e intravenosa (IV)</i> | 48 |
| iii) <i>Estudio farmacocinético de NEO-D1</i> | 48 |
| iv) <i>Digestión y cuantificación de oro</i> | 49 |
| v) <i>Biodistribución de NEO-D1 en cerebro</i> | 50 |
| Referencias..... | 52 |
| Capítulo 3: Síntesis, Purificación, y Funcionalización de Nanoprismas de Oro | 53 |
| 3.1 Concentración de solución áurica | 54 |
| 3.2 Concentración de la solución reductora | 55 |
| 3.3 Segunda adición de Na ₂ S ₂ O ₃ y formación de NPrO | 57 |
| 3.4 Volumen de la segunda adición | 59 |
| 3.5 Primera funcionalización con HS-PEG | 63 |
| 3.6 Purificación NPrO-PEG | 64 |
| 3.7 Segunda funcionalización con PEG y adición del péptido D1 | 68 |
| 3.8 Recubrimiento con polímeros | 71 |
| Conclusiones..... | 75 |
| Referencias..... | 76 |
| Capítulo 4: Obtención de Nanoesferas de oro funcionalizadas con PEG, péptido D1, y polímeros | 77 |
| 4.1 Síntesis NEO..... | 78 |
| 4.2 Funcionalización con HS-PEG-COOH..... | 81 |
| 4.3 Incorporación del péptido D1 | 83 |
| 4.4 Adición de los polímeros PEI, CAR, y AAC sobre NEO-D1 | 84 |
| Conclusiones..... | 87 |
| Referencias..... | 88 |
| Capítulo 5: Caracterización, Estabilidad Coloidal, y Viabilidad Celular | 89 |
| 5.1 Caracterización de las nanopartículas..... | 90 |
| 5.1.1 Determinación de la concentración..... | 90 |
| i) <i>Absorción atómica</i> | 90 |

| | |
|---|------------|
| <i>ii) NTA</i> | 91 |
| 5.1.2 Cuantificación D1 y disposición del péptido sobre la superficie (Raman) | 94 |
| 5.1.3 Comparación de las características fisicoquímicas de NPrO y NEO funcionalizados | 99 |
| 5.2 Estabilidad coloidal | 100 |
| 5.3 Ensayos de viabilidad celular | 106 |
| Conclusiones | 112 |
| Referencias | 113 |
| Capítulo 6: Administración Intranasal de los Nanosistemas y su llegada al SNC ... | 115 |
| 6.1 Ensayos preliminares y evaluación del recubrimiento de nanopartículas de oro con polímeros para la llegada al sistema nervioso central | 116 |
| 6.2 Comparación en la llegada al SNC entre NPrO-D1 y NEO-D1 | 120 |
| 6.3 Farmacocinética de NEO-D1 administradas por vía IN | 125 |
| 6.4 Comparación entre la ruta IN e IV para NEO-D1 | 128 |
| 6.5 Distribución de NEO-D1 en cerebro post administración IN e IV | 132 |
| Conclusiones | 136 |
| Referencias | 137 |
| Grado cumplimiento de objetivos | 138 |
| Conclusiones generales | 139 |
| Perspectivas | 140 |
| Congresos | 141 |
| Publicaciones | 143 |
| Financiamiento | 144 |
| Material Suplementario | 144 |

Tabla de Abreviaturas

β A: β -amiloide

AABA: Ácido α -aminobutírico

AAC: Ácido algínico

BHE: Barrera hematoencefálica

CAR: Carbopol

CCHEN: Comisión Chilena de Energía Nuclear

DLS: Dispersión dinámica de la luz

DMEM/F12: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12*

EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

EPR: *Enhanced permeation and retention*

ICP-MS: Espectrometría de masa con plasma acoplado inductivamente

IN: Intranasal

IV: Intravenosa

LbL: Auto-ensamblaje *layer-by-layer*

MTS: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio

NEO: Nanoesferas de oro

NEO-D1: Nanoesferas funcionalizadas con PEG y el péptido D1

NEO-PEG: Nanoesferas funcionalizadas con PEG

NHS: N-hidroxisuccinimida

NIR: Región del infrarrojo cercano

NPrO: Nanoprismas de oro

NPrO-D1: Nanoprismas funcionalizados con PEG y el péptido D1

NPrO-PEG: Nanoprismas funcionalizados con PEG

NPO: Nanopartículas de oro

NTA: Análisis de seguimiento de nanopartículas

NVO: Nanovarillas de oro

PEG: Polietilenglicol HS-PEG-COOH

PEI: Polietilenimina

PSS: Poliestireno sulfonato

RPS: Resonancia del plasmón superficial

SFB: Suero fetal bovino

SNC: Sistema nervioso central

TEM: Microscopía electrónica de transmisión

TMA: Transcitosis mediada por adsorción

TMR: Transcitosis mediada por receptor

XTT: 2,3-Bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida

Índice de Figuras y Tablas

Capítulo 1: Introducción, Hipótesis y Objetivos.

- Fig. 1.1. Plasmón superficial y ventana biológica.
- Fig. 1.2. Imágenes TEM antes y después de la irradiación con microondas.
- Fig. 1.3. Secuencia del péptido βA_{1-42} .
- Fig. 1.4. BHE y sus mecanismos de transporte.
- Fig. 1.5. Contenido de oro en cerebros de rata luego de administración de NP.
- Fig. 1.6. Características de la ruta IN.
- Fig. 1.7. Polímeros usados en administración intranasal.
- Fig. 1.8. Resumen trabajo de tesis.

Capítulo 3: Síntesis, Purificación, y Funcionalización de Nanoprismas de Oro.

- Fig. 3.1. Efecto de la concentración áurica.
- Fig. 3.2. Efecto concentración solución reductora.
- Fig. 3.3. Intervalo temporal entre adiciones de $Na_2S_2O_3$.
- Fig. 3.4. Imágenes TEM de NPrO sintetizados a distintos tiempos.
- Fig. 3.5. Efecto del volumen de la segunda adición de tiosulfato.
- Fig. 3.6. Síntesis NPrO.
- Fig. 3.7. Caracterización NPrO a NPrO-D1.
- Fig. 3.8. Espectros Vis-NIR del proceso de purificación de NPrO-PEG.
- Fig. 3.9. Imágenes TEM de NPrO-D1.
- Fig. 3.10. Espectros de absorción de NPrO-D1-PEI y NPrO-D1-PSS.
- Fig. 3.11. Imágenes TEM de NPrO-D1-PEI y NPrO-D1-PSS.

Tabla 3.1. Resumen cambios fisicoquímicos NPrO.

Tabla 3.2. Caracterización mediante espectrofotometría Vis-NIR.

Tabla 3.3. Proporción del número de prismas y esferas.

Tabla 3.4. Caracterización NPrO-D1 recubiertos con los polímeros PEI y PSS.

Capítulo 4: Obtención de Nanoesferas de oro funcionalizadas con PEG, péptido D1, y polímeros.

Fig. 4.1. Espectros de absorción de NEO obtenidas por el método de Turkevich.

Fig. 4.2. Imágenes TEM de NEO sintetizadas.

Fig. 4.3. Caracterización los pasos de funcionalización desde NEO a NEO-D1.

Fig. 4.4. Espectros de absorbancia NEO-D1 recubiertos con PEI, CAR, o AAC.

Tabla 4.1. Condiciones de síntesis NEO.

Tabla 4.2. Superficie nanopartículas.

Tabla 4.3. Caracterización fisicoquímica de NEO, NEO-PEG, y NEO-D1.

Tabla 4.4. Caracterización NEO-D1 recubiertos con polímeros.

Capítulo 5: Caracterización, Estabilidad coloidal, y Viabilidad Celular.

Fig. 5.1. Rectas NTA.

Fig. 5.2. Disposición del péptido D1 sobre la superficie de oro.

Fig. 5.3. Estabilidad de nanosistemas almacenados a 4°C, y disueltos en agua Milli-Q, durante 28 días.

Fig. 5.4. Estabilidad de NPrO-D1 y NEO-D1 a 37°C en distintos medios.

Fig. 5.5. Ensayo MTS de viabilidad celular a las 24 h.

Fig. 5.6. Ensayo XTT de proliferación celular en BV-2.

Tabla 5.1. Cálculo del coeficiente de extinción (ϵ) de NPrO-PEG P4.

Tabla 5.2. Coeficiente de extinción (ϵ) para NPrO-D1 y NEO-D1.

Tabla 5.3. Propuesta de asignación de bandas para el análisis espectrometría Raman.

Tabla 5.4. Resumen y comparación de los nanosistemas basados en NPrO y NEO.

Capítulo 6: Administración Intranasal de los Nanosistemas y su Llegada al SNC.

Fig. 6.1. Ensayos preliminares de administración intranasal.

Fig. 6.2. Cuantificación de oro 0.5 h post administración IN de NPrO-D1 y NEO-D1.

Fig. 6.3. Estudio farmacocinético post administración IN.

Fig. 6.4. Cuantificación de oro 0.75 h post administración IN e IV de NEO-D1.

Fig. 6.5. Distribución de NEO-D1 en cerebro a las 0.75 h.

Tabla 6.1. Lista de muestras indeterminadas

Material Suplementario.

Fig. S.1. Esquema quimisorción a través del enlace S-Au.

Fig. S.2. Porcentaje de dosis en ensayos preliminares de administración intranasal.

Fig. S.3. Porcentaje de dosis 0.75 h post administración IN e IV de NEO-D1.

Tabla S.1. Distribución de NEO-D1 0.75 h post administración IN o IV.

Resumen

El estudio de nanopartículas de oro (NPO) para su potencial uso en terapia y diagnóstico de trastornos del sistema nervioso central (SNC) ha sido ampliamente descrito en literatura. Sin embargo, muchos estudios *in vivo* han demostrado que las cantidades de NPO que llegan al SNC son limitadas después de ser administradas por la vía intravenosa (IV), siendo la presencia de la barrera hematoencefálica (BHE) la principal limitante. A pesar de que se ha sugerido a la vía intranasal (IN) como una buena estrategia para evitar la BHE, son pocos los estudios que relacionen esta vía de administración y las NPO. En esta tesis se han desarrollado dos nuevos sistemas de NPO basados en nanoprismas y nanoesferas de oro funcionalizadas con un derivado de polietilenglicol HS-PEG-COOH (PEG) y el péptido D1 (NPrO-D1 y NEO-D1, respectivamente) para evaluar su llegada al SNC después de ser administrado por vía IN. Los ensayos de viabilidad celular mostraron que NPrO-D1 y NEO-D1 no fueron citotóxicos en un rango de concentraciones entre 0.05 a 0.5 nM. La administración IN de NPrO-D1 y NEO-D1 mostró una diferencia entre las dos formas de NPO, en los que esta última llegó al SNC con niveles significativamente mayores que NPrO-D1. El estudio farmacocinético mostró que el nivel máximo de oro en el cerebro fue a las 0.75 h post administración IN de NEO-D1. Comparando las administraciones IN e IV de NEO-D1, se encontró que las concentraciones de oro observadas en cerebro fueron 55 veces más altas por vía IN que por IV, mientras que en hígado y bazo las concentraciones de oro fueron 1470 y 1000 veces mayores por vía IV. Se concluye, por tanto, que la vía IN es más eficaz para dirigir las NPO al cerebro que la

administración IV, evitando a su vez una exposición sistémica. Finalmente, aunque se acumuló más oro en cerebro después de la administración IN, no se observaron diferencias significativas en la distribución de NEO-D1 en las diversas áreas del cerebro entre las rutas IN y IV.

Abstract

Gold nanoparticles (GNP) for therapeutics and diagnostics of central nervous system (CNS) disorders have been extensively reported. However, many in vivo studies have shown that limited quantities of nanoparticles reached the CNS after intravenous (IV) administration and only traces crossed the blood-brain barrier (BBB), which is a chief drawback. The intranasal (IN) route has been suggested as a good strategy for circumventing the BBB, but only a few reports related with GNP have been published so far. In this thesis, it has been developed two new gold nanoparticulate systems based on gold nanoprisms and gold nanospheres functionalized with a polyethylene glycol derivative HS-PEG-COOH (PEG) and D1 peptide (GNPr-D1 and GNS-D1, respectively) to evaluate their delivery to the CNS after IN administration. Cell viability assay showed that GNPr-D1 and GNS-D1 were not cytotoxic for concentrations ranging from 0.05 to 0.5 nM. An IN administration of GNPr-D1 and GNS-D1 demonstrated a significant difference between the two types of GNP, in which the latter reached the CNS in higher levels than GNPr-D1. Pharmacokinetic study showed that the peak brain level of gold was 0.75 h after IN administration of GNS-D1. By comparing IN and IV administrations of GNS-D1, it was found that the gold concentrations observed in brain was 55 times higher via the IN route than via IV bolus injection. In contrast, the liver and the spleen were richer with gold by 1470 and 1000-fold 45 min after IV injection. It is concluded, therefore, that the IN route is more effective for targeting gold to the brain than IV administration, apparently by avoiding a systemic exposure. Finally, even though more gold was accumulated in the brain after IN administration, no significant

difference was observed between the IN and IV routes in the distribution of GNS-D1 in the various brain areas.

Capítulo 1: Introducción, Hipótesis y Objetivos

Introducción

A pesar del amplio estudio sobre el potencial uso de nanopartículas de oro (NPO) en terapia y diagnóstico de enfermedades relacionadas con el sistema nervioso central (SNC), la llegada *in vivo* de estos nanosistemas al cerebro se ve limitada debido a la presencia de la barrera hematoencefálica (BHE). A pesar de que se ha sugerido a la vía intranasal (IN) como una buena estrategia para evitar la BHE, existen pocos estudios que evalúen si las nanopartículas metálicas llegan al cerebro a través de esta vía. En la mayoría de los casos, las investigaciones están enfocadas en toxicidad neuronal relacionada con exposición ambiental, por lo que se hace interesante evaluar la llegada al SNC de NPO con un potencial uso terapéutico a través de la vía IN, y comparar su acumulación y localización en cerebro en relación con una administración sistémica.

1.1. Nanobiotecnología: aplicaciones de nanopartículas de oro en biomedicina

La nanobiotecnología es un campo emergente que tiene el potencial de desarrollar terapias y métodos de diagnóstico para diferentes patologías. Entre los diferentes materiales utilizados para la síntesis de nanopartículas, las nanopartículas metálicas, en especial las NPO, han sido ampliamente estudiadas para aplicaciones biomédicas tales como biosensores [1, 2], imagenología [3, 4], y entrega de fármacos y/o material genético [5-7]. Lo mencionado anteriormente se debe a las propiedades tanto físicas como químicas de las NPO [8]. Las mismas poseen una alta área superficial, que permite acoplar fármacos, péptidos o polímeros y tienen la

capacidad de penetrar modelos de membrana y células. Asimismo, poseen acumulación preferencial en tejido tumoral por sobre el tejido sano, proceso denominado efecto de permeación y retención aumentado o EPR (*enhanced permeation and retention*) por sus siglas en inglés, [6, 7, 9, 10]. Además, las NPO poseen propiedades ópticas que están dadas por la interacción de la radiación electromagnética y los electrones confinados en la superficie de la nanopartícula, lo que da origen al fenómeno de resonancia del plasmón superficial (RPS). Cuando las NPO son irradiadas a una longitud de onda significativamente mayor a su tamaño, se produce una oscilación colectiva de los electrones, lo que lleva a una gran absorción de energía y posterior liberación de esta como calor (Fig. 1.1A). Este aumento de temperatura de manera local puede ser utilizado para la destrucción de células tumorales o agregados tóxicos de proteínas involucradas en ciertas patologías (e.g. agregados β -amiloides y enfermedad de Alzheimer) [11, 12]. La longitud de onda a la que ocurre el fenómeno RPS depende del tamaño, forma y entorno dieléctrico de la nanopartícula [13]. En el caso de las nanoesferas de oro (NEO), si el diámetro de la nanopartícula aumenta, la banda RPS se desplaza a mayores longitudes de onda [3]. En el caso de NPO anisotrópicas, como las nanovarillas (NVO) o nanoprismas de oro (NPrO), las propiedades ópticas se ven afectadas por su razón de aspecto y simetría [14]. El espectro de absorbancia de los NPrO muestra dos bandas RPS; una localizada alrededor de los 530 nm, la cual se atribuye tanto a nanopartículas esféricas como al ancho de los prismas, y un segundo máximo de absorbancia en la región del infrarrojo cercano (*Near Infrared Region*, NIR), el cual corresponde al largo del NPrO [15, 16].

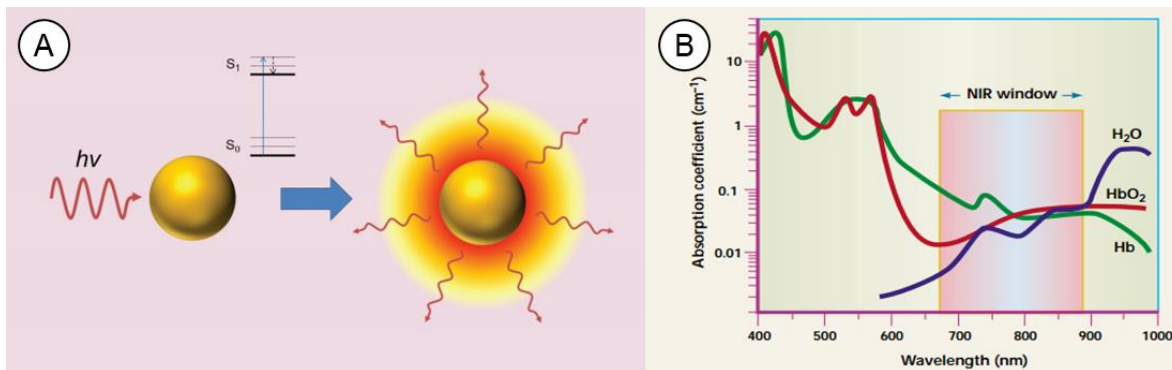


Fig. 1.1. Plasmón superficial y ventana biológica. A) Cuando las NPO son irradiadas, estas absorben la energía llevando a una transición electrónica de los electrones de superficie ($S_0 \rightarrow S_1$), para luego disiparla como calor local. B) Espectros de absorción del agua, hemoglobina, y oxihemoglobina donde se observa la ventana biológica. Imagen A y B extraídas de Guerrero et al. (2014) y Weissleder (2001), respectivamente.

En el caso de una aplicación biomédica, la excitación en la NIR es el escenario más favorable ya que en esta región existe la ventana biológica, donde moléculas como el agua, hemoglobina y oxihemoglobina tienen sus coeficientes de absorción más bajos (Fig. 1.1B). En esta zona del espectro (700 – 950 nm) el tejido biológico se vuelve “transparente”, ya que la radiación tiene una mayor penetración y transmisividad sobre el tejido [8, 17-21]. Por lo tanto, NVO o NPrO podrían ser utilizados para desarrollar terapias contra cáncer o Alzheimer, ya que poseen bandas plasmónicas en la NIR. Sin embargo, el bromuro de cetiltrimetilamonio, o CTAB, es el surfactante más utilizado para la síntesis de nanopartículas anisotrópicas como NVO o NPrO [14, 22, 23], a pesar de sus conocidos efectos citotóxicos como disruptor de membranas celulares [24]. Por esta razón, es relevante considerar otras metodologías de síntesis que eviten el uso de CTAB. Pelaz et al. [25] desarrollaron un proceso de síntesis de NPrO en el cual el tiosulfato

de sodio actúa como agente reductor y estabilizante. Además, dependiendo de la razón molar entre la sal de oro y tiosulfato se puede modificar el largo de los NPrO, y por consiguiente su banda RPS en la NIR, manteniendo el ancho de la nanopartícula constante.

1.2. Uso de nanopartículas de oro para una potencial terapia para la enfermedad de Alzheimer

Las enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer o Parkinson tienen como características principales su aparición tardía en la vida, una gran pérdida neuronal, anormalidades sinápticas, y la presencia de agregados de proteínas en el cerebro, lo cuales se relacionan con la muerte neuronal [26]. La enfermedad de Alzheimer es la principal causa de demencia en el mundo, siendo una enfermedad neurodegenerativa progresiva y crónica que se describe clínicamente como un impedimento en la memoria y aprendizaje, y patológicamente como una atrofia cerebral, como signo de la pérdida neuronal [27].

La agregación de la proteína β -amiloide (β A) producida bajo condiciones patológicas lleva a la formación de distintas especies como oligómeros, protofibrillas, fibras amiloides, etc [28, 29]. La agregación de β A es un proceso complejo de varios pasos que comienza con cambios conformacionales que incluyen la presencia de agregados amiloidogénicos intermedios prefibrilares (PIAAs) como protofibrillas, amiloesferoides, fibrillas cortas, etc. Aunque la fibra madura (etapa final del proceso de agregación) muestra toxicidad, los PIAAs son aún más tóxicos [27]. Por esta razón, los estudios que están enfocados en el

diagnóstico o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer tienen como blanco terapéutico el péptido β A en todas sus formas.

Nuestro laboratorio demostró que el uso de NEO y NVO, ambas conjugadas con el péptido CLPFFD, son útiles para la destrucción de los agregados tóxicos de la proteína β A, a través de la liberación local de calor producida por las NPO al ser irradiadas con láseres y microondas [30, 31]. El péptido anfipático CLPFFD (Cis-Leu-Pro-Fen-Fen-Asp) reconoce selectivamente los agregados tóxicos de β A [32, 33]. Además, la conjugación de este péptido aumenta la estabilidad de la NPO por efecto estérico y promueve el traspaso de la BHE [30, 34]. NEO conjugadas con CLPFFD fueron incubadas con péptido β A₁₋₄₂ durante 7 días, produciéndose la interacción entre las nanopartículas y las fibras amiloides. Luego, estos complejos fueron irradiados con microondas produciendo una absorción y disipación localizada de energía por parte de las NEO, llevando a la destrucción de los agregados tóxicos de β A (Fig. 1.2).

Para alcanzar una terapia exitosa basada en NPO, se debe lograr un reconocimiento correcto y selectivo del blanco molecular. Una manera de lograr esto es usando proteínas, péptidos o anticuerpos conjugados a las NPO que permitan el reconocimiento de los agregados tóxicos β A. Péptidos que reconocen selectivamente estos agregados y además pueden inhibir los procesos de agregación son los candidatos ideales. El diseño de estos péptidos está basado en utilizar un fragmento β A que actúa como “elemento de reconocimiento” e introduce un “elemento disruptor”, haciendo posible el reconocimiento y disrupción, o inhibición, de la formación de agregados β A [35]. Un ejemplo es el péptido CLPFFD

introducido por Soto et al. [33], el cual es un derivado de la secuencia LVFFA, que correspondería a uno de los núcleos de agregación de βA_{1-42} (Fig. 1.3), jugando un rol importante en el proceso de agregación.

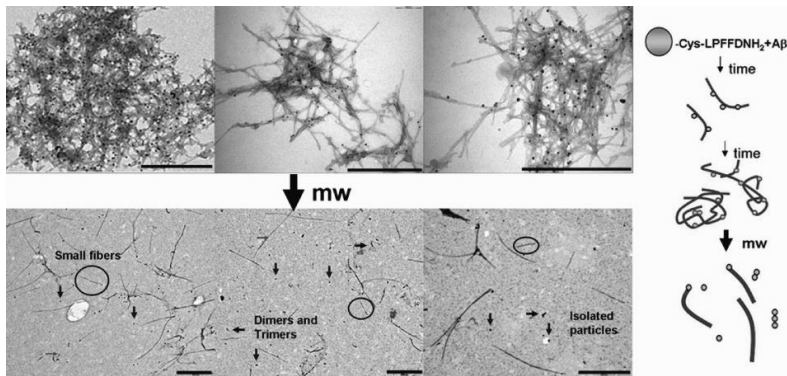


Fig. 1.2. Imágenes TEM antes y después de la irradiación con microondas. NEO-CLPFFD unidas a los agregados βA , los cuales son desagregados luego de 8 h de irradiación. Imagen extraída de Kogan et al. (2006).

El péptido posee tres residuos hidrofóbicos (L y dos F) que permiten la interacción con el núcleo de βA , un ácido aspártico (D) que aumenta la solubilidad, una prolina (P) que evita que βA forme puentes de hidrógeno y una estructura sábana β . Además, para poder conjugar el péptido a la nanopartícula, una cisteína fue incorporada al extremo N terminal de la secuencia para obtener el péptido CLPFFD, que permite la quimisorción sobre la superficie de oro (Au-S, Fig. S.1) [34]. Sin embargo, para que CLPFFD tenga un efecto como inhibidor de agregación, o como disruptor de fibra, tiene que encontrarse a una alta concentración, en una proporción equimolar al βA . Además, al ser un péptido, este presenta una baja vida media en plasma, lo cual es una desventaja para utilizarse en aplicaciones biomédicas.



Fig. 1.3. Secuencia del péptido βA_{1-42} . Núcleo hidrofóbico en rojo.

Recientemente, una familia de péptidos que ha llamado la atención por tener un reconocimiento selectivo de los agregados tóxicos de βA son los péptidos de la serie D (configuración D). Estos están constituidos por aminoácidos D, los cuales son menos sensibles a proteasas, resistentes a degradación, y menos o incluso no inmunogénicos, en comparación a los péptidos de la serie L [36, 37]. Liu et al. [38] reportaron la síntesis de un péptido de la serie D que se une específicamente y con gran afinidad a βA_{1-42} , y con una constante de disociación en el rango submicromolar ($0.4 \mu M$). Los autores lo llamaron “d-pep” o “D1”, el cual corresponde a la secuencia peptídica **qshyrhispaqv** (en minúsculas por tratarse de aminoácidos D), y este posee una afinidad diez mil veces mayor por βA , en comparación con LPFFD. Lo anterior, junto a su mayor resistencia a la degradación, lo hace un promisorio candidato para su posible uso terapéutico en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

1.3. Llegada de las NPO al cerebro

1.3.1 Barrera hematoencefálica

Actualmente, el estudio y desarrollo de agentes terapéuticos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer está focalizado en la administración sistémica, la cual tiene como limitante la presencia de la BHE. Esta barrera tiene características

defensivas y selectivas que aíslan el SNC, generando un ambiente estable para la función neuronal. Además, debido a la presencia de esta barrera, el 98% de las moléculas pequeñas y el 100% de las moléculas grandes (peso molecular > 1 kD) no son capaces de llegar al cerebro [39].

La BHE está formada por células endoteliales las cuales recubren los microvasos cerebrales. Además, está constituida por astrocitos y pericitos, los cuales rodean el endotelio [40]. Los pericitos envuelven aproximadamente un tercio del tubo endotelial (37%), mientras que los dos tercios restantes (63%) están recubiertos por los botones terminales de los astrocitos [41]. El rol principal de la BHE es limitar el flujo de moléculas inespecíficas o xenobióticos hacia el cerebro a través de un aislamiento estricto del SNC [42]. La permeabilidad relativa de la BHE se debe a la presencia de uniones estrechas entre las células endoteliales capilares, a lo que se suma la presencia de sistemas enzimáticos, como ecto y endo enzimas dentro de las células endoteliales, que protegen el cerebro mediante la degradación de moléculas que cruzan las membranas celulares. Sin embargo, existen mecanismos de transporte en la barrera que permiten el pasaje de moléculas esenciales y nutrientes para el correcto funcionamiento del cerebro (Fig. 1.4). Entre los diferentes mecanismos de transporte descritos, la transcitosis mediada por adsorción (TMA) y mediada por receptor (TMR) son las más estudiadas para el transporte de nanopartículas al SNC.

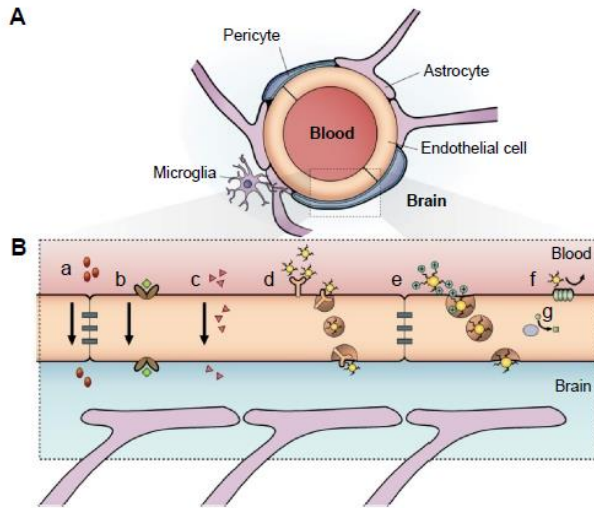


Fig. 1.4. BHE y sus mecanismos de transporte. A) Representación de los pericitos y astrocitos, los cuales son parte de la unidad neurovascular que constituye la BHE. B) Mecanismos de transporte. (a) Uniones estrechas presentes en las células de la BHE. (b) Proteínas transportadoras del endotelio que actúan como *carriers* para distintas moléculas. (c) Moléculas solubles en lípidos cruzan la BHE por vía difusiva. (d) La TMR y endocitosis permite el transporte de proteínas como transferrina e insulina. (e) Moléculas con carga positiva penetran la BHE por TMA. (f) Bombas de eflujo. (g) Citocromo P450. Imagen extraída de Velasco-Aguirre et al. (2015).

Estudios en animales han entregado evidencia directa que las nanopartículas pueden llegar y acumularse en el parénquima cerebral, incluyendo el cuerpo estriado e hipocampo. En el caso de NPO funcionalizadas con transferrina, estas pueden llegar y acumularse en el parénquima cerebral luego de la administración sistémica en ratones a través de la vía de transcitosis mediada por receptor [43]. Estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio demostraron una mejora en la llegada al cerebro al conjugar el péptido CLPFFD a las NPO [34]. Además, para aumentar la permeación de las NPO-CLPFFD a través de la BHE, nuestro grupo incorporó la secuencia peptídica THRPPMWSPVWP (la cual reconoce el receptor de transferrina expresado en las células endoteliales de la BHE), lo cual incremento la llegada al cerebro (Fig. 1.5) [44]. Sin embargo, el porcentaje de la dosis inyectada permaneció en un nivel bajo (0.07%), en comparación con órganos como hígado o bazo.

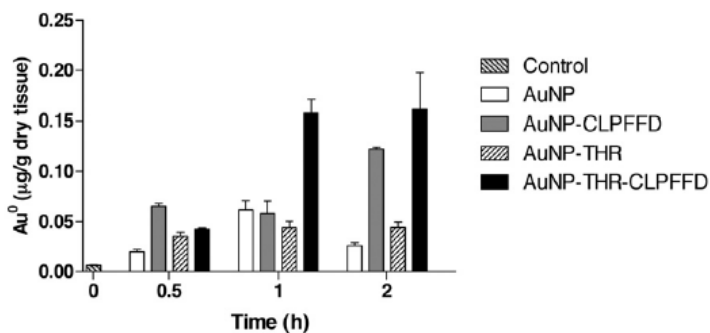


Fig. 1.5. Contenido de oro en cerebros de rata luego de administración de NP. En todos los animales se realizó una perfusión con PBS antes de extraer los órganos. El contenido de oro fue determinado por activación neutrónica. Imagen extraída de Prades et al. (2012).

Este perfil de biodistribución se debe a la interacción de proteínas plasmáticas con la superficie de las nanopartículas, lo cual lleva a la formación de la corona de proteínas [45-47]. Una vez en este estado, las nanopartículas pueden ser reconocidas y capturadas por macrófagos y el sistema retículo endotelial, provocando su acumulación en hígado y bazo, y por consiguiente, la pérdida de la mayoría de la dosis administradas [48].

1.3.2 Una ruta alternativa para evitar el cruce de la BHE: La vía intranasal

En el SNC existen regiones específicas que no poseen BHE o áreas donde esta barrera es más permeable, como lo es la parte inferior de los ventrículos cerebrales y los nervios olfatorios. Estos últimos se han considerado como una puerta abierta para el transporte directo desde la nariz al SNC de fármacos, biomarcadores y agentes de contrastes [49-53]. El poseer una gran área superficial epitelial (150 cm² aprox.), mucosa nasal vastamente vascularizada, y evitar el metabolismo enterohepático, aparecen como los potenciales beneficios de la vía intranasal [52, 54-58].

En la cada cavidad del espacio nasal humano (dos cavidades divididas por el septum nasal) se puede encontrar una región vestibular, olfatoria, y respiratoria [59]. La región olfatoria es considerada como la puerta al SNC, y su epitelio se encuentra formado por tres tipos de células: neuronales, de soporte y basales. Estas células neuronales poseen cilios que detectan las moléculas volátiles e inician una depolarización en los axones olfatorios, los cuales son originados desde el bulbo olfatorio a las células neuronales. Sin embargo, la región olfatoria abarca una superficie de 10 cm² de toda la cavidad nasal, mucho menos que la región respiratoria, la cual posee una amplia área superficial que se encuentra bien vascularizada. El destino de un fármaco cuando es administrado por vía intranasal depende del volumen y la forma mediante la cual la formulación es aplicada. Aunque el volumen de la cavidad nasal en humanos es alrededor de 25 mL, para llegar al cerebro se recomiendan volúmenes menores a 0.4 mL en alícuotas de 100 µL, con el fin de prevenir una absorción irregular o que la formulación sea drenada a través de la nasofaringe [49]. Si el fármaco no es metabolizado o depurado de la cavidad nasal, puede ser adsorbido por los vasos pertenecientes a la región respiratoria. Finalmente, el fármaco puede llegar al tejido parenquimal del cerebro a través de la región olfatoria (Fig. 1.6A).

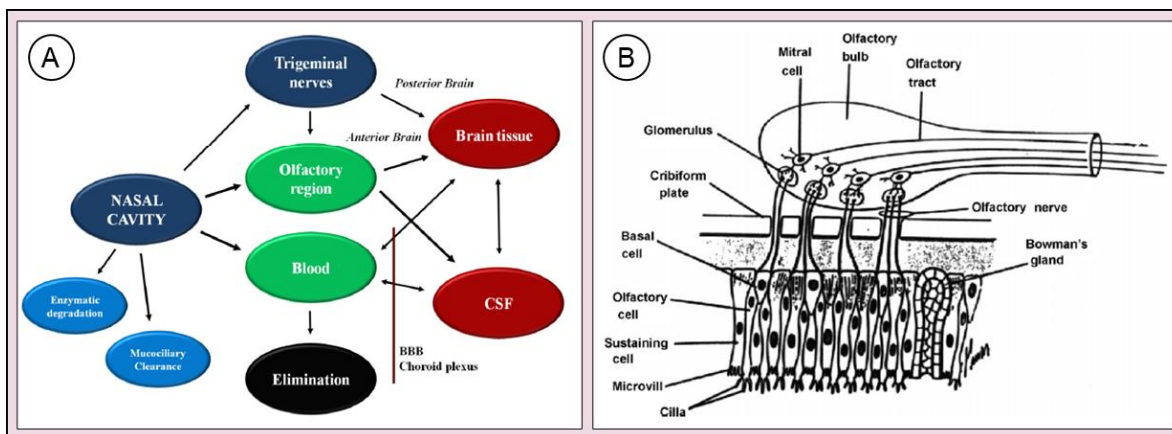


Fig. 1.6. Características de la ruta IN. A) Biodistribución de un fármaco luego de ser administrado intranasalmente. B) Diagrama de la región olfatoria que muestra el epitelio, bulbo, y tracto olfatorio. Imagen A y B extraída de Casettari et al. (2014) y Mistry et al. (2009), respectivamente.

La organización anatómica de los nervios olfatorios permite que un compuesto alcance el SNC (Fig. 1.6B), aunque los mecanismos involucrados en este proceso no se conocen exactamente. Un compuesto, o una nanopartícula, pueden migrar desde la nariz al cerebro principalmente por tres vías. Una vía es a través del transporte transcelular a través de las células de soporte en la región olfatoria. Una segunda vía es la difusión paracelular a través de los canales generados por las células que cubren los axones olfatorios o mediante las hendiduras intercelulares en el epitelio olfatorio. Sin embargo, en el caso de nanopartículas con un tamaño sobre 20 nm, es poco probable que lleguen al cerebro a través de este mecanismo debido a las uniones estrechas. Finalmente, el tercer mecanismo, y más probable para las nanopartículas, corresponde a endocitosis neuronal seguida del transporte a través del axón al bulbo olfatorio [50, 60-63].

Existen pocos estudios que evalúen si las nanopartículas metálicas llegan al cerebro a través de la vía intranasal. En la mayoría de los casos, las investigaciones están

enfocadas en toxicidad neuronal relacionada con exposición ambiental. En modelos murinos se han observado efectos neurotóxicos como acumulación en compartimientos del SNC, daño y estrés oxidativo, o activación de células neurogliales luego de administrar por vía intranasal nanopartículas de plata, cobre, óxido de hierro, óxido de titanio, y óxido de manganeso [64-69]. Sin embargo, a pesar de que estos estudios demuestran efectos negativos a nivel de SNC por parte de estas nanopartículas, también demuestran la capacidad de las nanopartículas metálicas de llegar de manera directa desde la cavidad nasal al SNC. En el caso de las NPO, el primer reporte pertenece a 1970 y se refiere a la aplicación de coloides de Au¹⁹⁸ en la mucosa de la región olfatoria en conejos. Los resultados muestran oro dentro del fluido cerebro espinal de la fosa craneal anterior [70]. Otros estudios publicados se enfocan en la entrega de agentes terapéuticos y los efectos fisiológicos producidos al administrar por vía intranasal NPO. Joshi et al. [71] demostró que el uso de NPO mejora la llegada de insulina al cerebro en ratas diabéticas, mientras que Hutter et al. [72] evaluó la respuesta de la microglía luego de administrar intranasalmente NPO de distintas morfologías (esferas, varillas y erizos) recubiertas con PEG o CTAB. La exposición de células neuronales después de la administración nasal a ratones transgénicos mostró que las NPO se internalizaron tanto en las neuronas primarias del hipocampo como en las células microgliales, y una activación transitoria del receptor tipo Toll 2 en el bulbo olfatorio. Este reporte demuestra la importancia y la influencia que tiene la geometría de las NPO en la activación microglial. Por otro lado, es necesario tener en cuenta las limitaciones de esta ruta, como lo son la baja capacidad de carga, irritación de la mucosa, y poca reproducibilidad [52, 54-58]. Finalmente, la eficiencia en el uso de

la vía intranasal para el tratamiento de una enfermedad neurológica depende de: (1) la llegada del compuesto activo al SNC, (2) de alcanzar una concentración que permita un efecto terapéutico que con otra ruta de administración no es posible y (3) de reducir la toxicidad sistémica generada por los fármacos de acción central.

1.4. Estrategias para incrementar la biodisponibilidad mediante la administración por la vía intranasal

Las nanopartículas aparecen como vectores de tamaño nanométrico que pueden mejorar la llegada de fármacos por la vía nariz-cerebro debido a que son capaces de proteger al fármaco de la degradación química y/o biológica, o de las proteínas transportadoras de eflujo extracelulares, aumentando la biodisponibilidad en el SNC. Además, la modificación superficial de las NPO puede asegurar la correcta llegada del fármaco al blanco terapéutico y permitir un transporte transcelular a través de las neuronas olfatorias mediante endocitosis. Moléculas como lectinas, polietilenglicol (PEG), y polímeros pueden ser utilizados para aumentar la llegada al SNC de fármacos acoplados a nanopartículas a través de la administración intranasal. La estabilidad de las NPO en un determinado medio y su tiempo de circulación *in vivo* puede ser mejorado usando agentes como PEG [73]. El PEG tiolado (HS-PEG), el cual es un polímero hidrofílico, ha sido ampliamente utilizado como un ligando de superficie que mejora la vida media de las NPO en circulación, debido a que reduce el proceso de opsonización al reducir la adsorción de proteínas [74]. Diferentes variables pueden afectar la capacidad de nanopartículas modificadas con PEG de penetrar el mucus y ser transportadas a través de células

epiteliales, las que incluye: 1) Peso molecular del PEG, ya que cadenas de PEG más largas pueden aumentar las interacciones entre las fibras del mucus reduciendo el movimiento transmucosa de las nanopartículas, 2) La composición de la nanopartícula, la cual afecta el potencial zeta y/o las proteínas absorbidas del medio biológico [75, 76]. Además, las moléculas de PEG permiten un mejor reconocimiento molecular del blanco mediante la separación de las moléculas activas sobre la superficie de la NPO [77].

Por otro lado, el uso de polímeros biocompatibles como PLGA, quitosano, Pluronic, ácido poli láctico, entre otros, en NPO para mejorar la entrega de fármacos ha sido ampliamente estudiado [78-83]. Existen diferentes estrategias para funcionalizar, encapsular o recubrir nanosistemas con polímeros tales como la nanoprecipitación, emulsión simple en *oil-in-water* (o/w), *electrospraying*, auto-ensamblaje *layer-by-layer* (LbL), entre otras [84-86]. La metodología LbL se basa en alternar la adsorción de polímeros cargados capa por capa, como policationes y polianiones, hasta obtener la arquitectura deseada. Las principales ventajas del método LbL sobre otros procesos de encapsulación son: 1) El ancho y el diámetro de la nanocapsula puede variar con una precisión de unos pequeños nanómetros, 2) La arquitectura de la capa de encapsulación puede ser diseñada combinando polímeros, péptidos, bicapas lipídicas, 3) el diámetro final obtenido permite su uso para ser administrado mediante inyecciones (menos de 1 micra), y 4) la posibilidad de modificar la carga superficial y el grosor de la capa permite evaluar y determinar cuáles son los mejores parámetros para una correcta permeación y entrega del agente terapéutico. Diversos polímeros pueden ser utilizados a través de esta metodología debido a sus

características de carga por lo cual se han empleado en estudios que evalúan la entrega de fármacos a través de la vía intranasal debido a sus propiedades mucoadhesivas tales como la polietilenimina (PEI), poliestireno sulfonato (PSS), carbopol (CAR), y ácido alginico (AAC), entre otros (Fig. 1.7) [87-90].

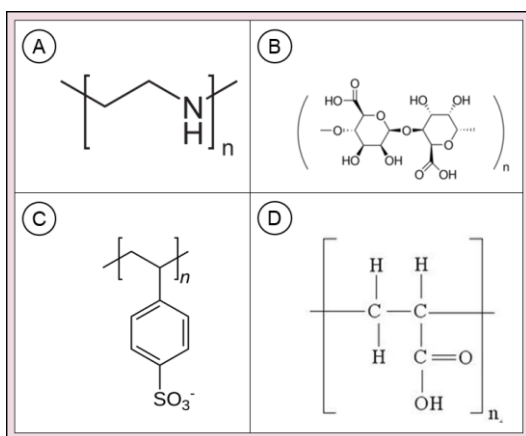


Fig. 1.7. Polímeros usados en administración intranasal. Fórmula de polímeros que tienen propiedades mucoadhesivas, y que además son policationes o polianiones que pueden ser utilizados mediante la metodología de recubrimiento *layer-by-layer*. A) Polietilenimina (PEI), B) Ácido alginico (AAC), C) Poliestireno sulfonato (PSS), y D) Carbopol (CAR).

Sin embargo, estudios que evalúen el uso de NPO, ensamblaje LbL, llegada al SNC, y administración IN no fueron encontrados en literatura, haciendo interesante la posibilidad de evaluar y estudiar un nanosistema que englobe todos estos tópicos. Por lo anterior, este proyecto se enfoca en la preparación de un nanosistema basado en NPrO funcionalizado con HS-PEG y el péptido D1. Luego, el sistema será recubierto con polímeros mediante el método LbL y se evaluará su llegada al cerebro al ser administrado por vía IN. Además, este nanosistema se comparará con otro de similares características fisicoquímicas, pero que solo difiere en la forma (NEO), con el fin de evaluar si existe alguna influencia de este parámetro en la llegada al SNC a través de la ruta IN. Finalmente, con el nanosistema de mejor desempeño, se realizará un estudio farmacocinético por vía IN, y se comparará su

acumulación en distintos órganos y distribución en cerebro al ser administrado tanto de manera IN, como IV (Fig. 1.8).

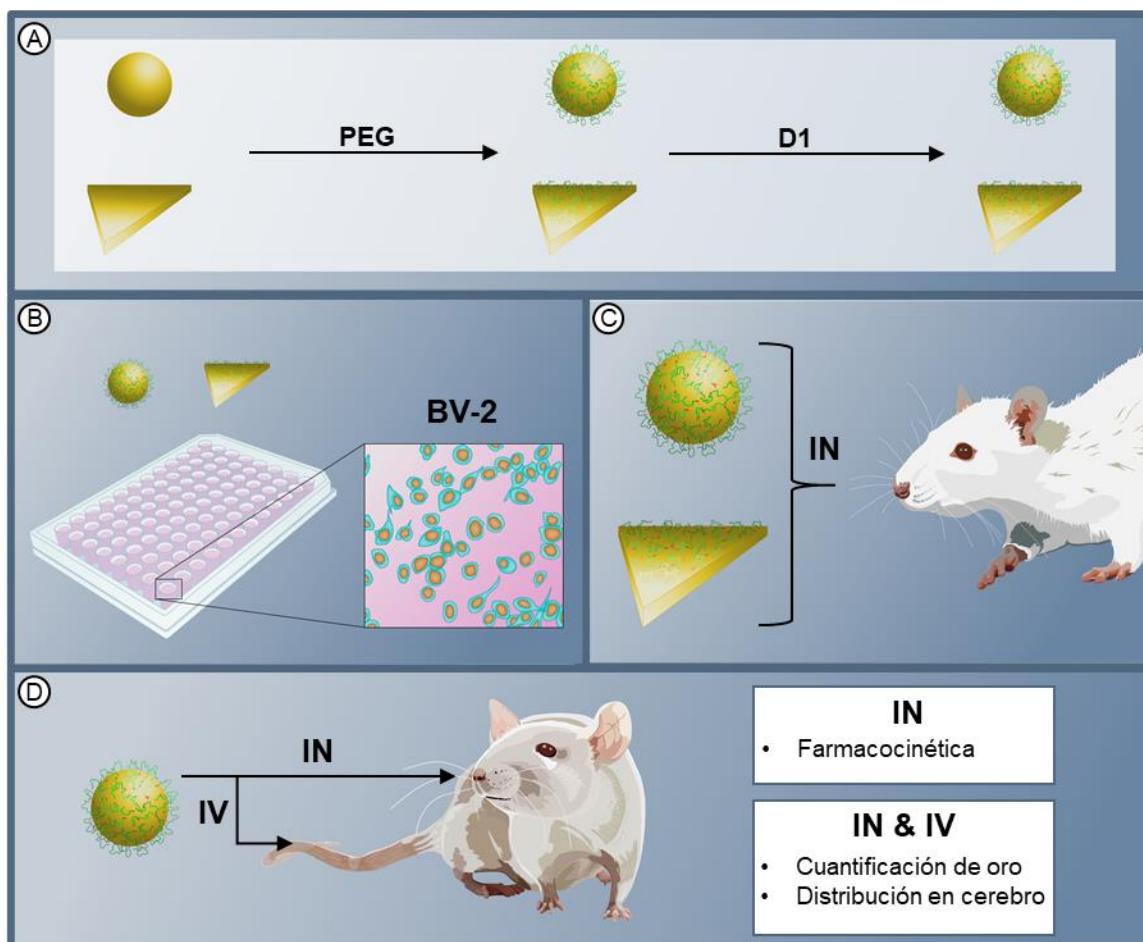


Fig. 1.8. Resumen trabajo de tesis. A) Tanto NPrO como NEO fueron funcionalizados con HS-PEG-COOH y el péptido D1. Ambos nanosistemas fueron caracterizados fisicoquímicamente. B) Evaluación de la viabilidad celular en células de microglía BV-2 utilizando diferentes concentraciones de nanopartículas. C) NPrO-D1 y NEO-D1 fueron administrados por la ruta IN para evaluar si la forma afecta en la acumulación de oro en cerebro, bulbo olfatorio, y plasma. D) Se encontró una mayor cantidad de oro en cerebro cuando se utilizaron NEO-D1, por lo que se llevó a cabo un estudio farmacocinético utilizando este nanosistema. Los resultados mostraron que 0.75 h post administración existe un *pico de concentración de oro* en cerebro. Finalmente, se realizó una comparación entre la vía IN e IV, determinando la cantidad de oro en distintos órganos, así como también la distribución en cerebro.

Hipótesis

Nanopartículas de oro funcionalizadas con PEG, D1 y recubiertas con polímeros, llegan al SNC a través de la administración intranasal.

Objetivos

A) Objetivo general

Evaluar la llegada al SNC luego de la administración intranasal de NPO-PEG-D1 recubiertas con polímeros cargados a través de la metodología layer-by-layer.

B) Objetivos específicos

- 1) Sintetizar nanoprismas y nanoesferas de oro y conjugadas con HS-PEG y con el péptido D1.
- 2) Recubrir los nanosistemas con polímeros usando el método layer-by-layer y determinar la estabilidad.
- 3) Evaluar los cambios fisicoquímicos en las distintas etapas de conjugación.
- 4) Determinar la citotoxicidad de los nanosistemas mediante ensayos in vitro.
- 5) Evaluar la llegada al SNC de los nanosistemas luego de ser administrado intranasalmente.

Referencias

1. Karhanek, M., et al., *Single DNA molecule detection using nanopipettes and nanoparticles*. Nano Lett, 2005. **5**(2): p. 403-7.
2. Taton, T.A., G. Lu, and C.A. Mirkin, *Two-color labeling of oligonucleotide arrays via size-selective scattering of nanoparticle probes*. J Am Chem Soc, 2001. **123**(21): p. 5164-5.
3. El-Sayed, I.H., X. Huang, and M.A. El-Sayed, *Surface plasmon resonance scattering and absorption of anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles in cancer diagnostics: applications in oral cancer*. Nano Lett, 2005. **5**(5): p. 829-34.
4. Yguerabide, J. and E.E. Yguerabide, *Resonance light scattering particles as ultrasensitive labels for detection of analytes in a wide range of applications*. J Cell Biochem Suppl, 2001. **Suppl 37**: p. 71-81.
5. Hirsch, L.R., et al., *Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(23): p. 13549-54.
6. Kohler, N., et al., *Methotrexate-modified superparamagnetic nanoparticles and their intracellular uptake into human cancer cells*. Langmuir, 2005. **21**(19): p. 8858-64.
7. Yang, P.H., et al., *Transferrin-mediated gold nanoparticle cellular uptake*. Bioconjug Chem, 2005. **16**(3): p. 494-6.
8. Bergen, J.M., et al., *Gold nanoparticles as a versatile platform for optimizing physicochemical parameters for targeted drug delivery*. Macromol Biosci, 2006. **6**(7): p. 506-16.
9. Ghosh, P., et al., *Gold nanoparticles in delivery applications*. Adv Drug Deliv Rev, 2008. **60**(11): p. 1307-15.
10. Iyer, A.K., et al., *Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting*. Drug Discov Today, 2006. **11**(17-18): p. 812-8.
11. Gobin, A.M., et al., *Near-infrared-resonant gold/gold sulfide nanoparticles as a photothermal cancer therapeutic agent*. Small, 2010. **6**(6): p. 745-52.
12. Guerrero, A.R., et al., *Gold nanoparticles for photothermally controlled drug release*. Nanomedicine (Lond), 2014. **9**(13): p. 2023-39.
13. Jain, P.K., et al., *Noble metals on the nanoscale: optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology, and medicine*. Acc Chem Res, 2008. **41**(12): p. 1578-86.
14. Millstone, J.E., et al., *Observation of a quadrupole plasmon mode for a colloidal solution of gold nanoprisms*. Journal of the American Chemical Society, 2005. **127**(15): p. 5312-5313.
15. Saverot, S.E., et al., *Characterization of Conventional One-Step Sodium Thiosulfate Facilitated Gold Nanoparticle Synthesis*. Nanoscale Res Lett, 2015. **10**(1): p. 940.
16. Sun, X., et al., *Targeted cancer therapy by immunoconjugated gold-gold sulfide nanoparticles using protein G as a cofactor*. Annals of biomedical engineering, 2012. **40**(10): p. 2131-2139.
17. Bardhan, R., et al., *Theranostic nanoshells: from probe design to imaging and treatment of cancer*. Accounts of chemical research, 2011. **44**(10): p. 936-946.
18. Dreaden, E.C., et al., *Beating cancer in multiple ways using nanogold*. Chemical Society Reviews, 2011. **40**(7): p. 3391-3404.
19. Ghoroghchian, P.P., M.J. Therien, and D.A. Hammer, *In vivo fluorescence imaging: a personal perspective*. Wiley Interdisciplinary Reviews-Nanomedicine and Nanobiotechnology, 2009. **1**(2): p. 156-167.

20. Stolik, S., et al., *Measurement of the penetration depths of red and near infrared light in human "ex vivo" tissues*. Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology, 2000. **57**(2-3): p. 90-93.
21. Weissleder, R., *A clearer vision for in vivo imaging*. Nature Biotechnology, 2001. **19**(4): p. 316-317.
22. Millstone, J.E., G.S. Métraux, and C.A. Mirkin, *Controlling the edge length of gold nanoprisms via a seed-mediated approach*. Advanced Functional Materials, 2006. **16**(9): p. 1209-1214.
23. Nikoobakht, B. and M.A. El-Sayed, *Preparation and growth mechanism of gold nanorods (NRs) using seed-mediated growth method*. Chemistry of Materials, 2003. **15**(10): p. 1957-1962.
24. Alkilany, A.M. and C.J. Murphy, *Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far?* Journal of nanoparticle research, 2010. **12**(7): p. 2313-2333.
25. Pelaz, B., et al., *Tailoring the synthesis and heating ability of gold nanoprisms for bioapplications*. Langmuir, 2012. **28**(24): p. 8965-70.
26. Soto, C., *Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases*. Nature Reviews Neuroscience, 2003. **4**(1): p. 49-60.
27. Ittner, L.M. and J. Gotz, *Amyloid-beta and tau - a toxic pas de deux in Alzheimer's disease*. Nature Reviews Neuroscience, 2011. **12**(2): p. 67-72.
28. Pike, C.J., et al., *In vitro Aging of Beta-Amyloid Protein Causes Peptide Aggregation and Neurotoxicity*. Brain Research, 1991. **563**(1-2): p. 311-314.
29. Lorenzo, A. and B.A. Yankner, *Beta-Amyloid Neurotoxicity Requires Fibril Formation and Is Inhibited by Congo Red*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994. **91**(25): p. 12243-12247.
30. Kogan, M.J., et al., *Nanoparticle-mediated local and remote manipulation of protein aggregation*. Nano Letters, 2006. **6**(1): p. 110-115.
31. Adura, C., et al., *Stable Conjugates of Peptides with Gold Nanorods for Biomedical Applications with Reduced Effects on Cell Viability*. Acs Applied Materials & Interfaces, 2013. **5**(10): p. 4076-4085.
32. Hetenyi, C., T. Kortvelyesi, and B. Penke, *Mapping of possible binding sequences of two beta-sheet breaker peptides on beta amyloid peptide of Alzheimer's disease*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2002. **10**(5): p. 1587-1593.
33. Soto, C., et al., *Beta-sheet breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis: implications for Alzheimer's therapy*. Nat Med, 1998. **4**(7): p. 822-6.
34. Guerrero, S., et al., *Improving the brain delivery of gold nanoparticles by conjugation with an amphipathic peptide*. Nanomedicine (Lond), 2010. **5**(6): p. 897-913.
35. Bieler, S. and C. Soto, *beta-sheet breakers for Alzheimer's disease therapy*. Current Drug Targets, 2004. **5**(6): p. 553-558.
36. Findeis, M.A., et al., *Modified-peptide inhibitors of amyloid beta-peptide polymerization*. Biochemistry, 1999. **38**(21): p. 6791-800.
37. Van Regenmortel, M.H. and S. Muller, *D-peptides as immunogens and diagnostic reagents*. Curr Opin Biotechnol, 1998. **9**(4): p. 377-82.
38. Liu, H., S.A. Funke, and D. Willbold, *Transport of Alzheimer disease amyloid-beta-binding D-amino acid peptides across an in vitro blood-brain barrier model*. Rejuvenation Res, 2010. **13**(2-3): p. 210-3.
39. Pardridge, W.M., *Drug targeting to the brain*. Pharmaceutical Research, 2007. **24**(9): p. 1733-1744.

40. Spuch, C. and C. Navarro, *Transport mechanisms at the blood-cerebrospinal-fluid barrier: role of megalin (LRP2)*. Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery, 2010. **4**(3): p. 190-205.
41. Mathiisen, T.M., et al., *The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: an electron microscopic 3D reconstruction*. Glia, 2010. **58**(9): p. 1094-103.
42. Velasco-Aguirre, C., et al., *Peptides and proteins used to enhance gold nanoparticle delivery to the brain: preclinical approaches*. Int J Nanomedicine, 2015. **10**: p. 4919-36.
43. Wiley, D.T., et al., *Transcytosis and brain uptake of transferrin-containing nanoparticles by tuning avidity to transferrin receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(21): p. 8662-7.
44. Prades, R., et al., *Delivery of gold nanoparticles to the brain by conjugation with a peptide that recognizes the transferrin receptor*. Biomaterials, 2012. **33**(29): p. 7194-205.
45. Arvizo, R.R., et al., *Identifying New Therapeutic Targets via Modulation of Protein Corona Formation by Engineered Nanoparticles*. Plos One, 2012. **7**(3).
46. Monopoli, M.P., et al., *Physical-chemical aspects of protein corona: relevance to in vitro and in vivo biological impacts of nanoparticles*. J Am Chem Soc, 2011. **133**(8): p. 2525-34.
47. Tenzer, S., et al., *Nanoparticle size is a critical physicochemical determinant of the human blood plasma corona: a comprehensive quantitative proteomic analysis*. ACS Nano, 2011. **5**(9): p. 7155-67.
48. Dobrovolskaia, M.A., et al., *Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution*. Mol Pharm, 2008. **5**(4): p. 487-95.
49. Dhuria, S.V., L.R. Hanson, and W.H. Frey, 2nd, *Intranasal delivery to the central nervous system: mechanisms and experimental considerations*. J Pharm Sci, 2010. **99**(4): p. 1654-73.
50. Illum, L., *Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system*. Eur J Pharm Sci, 2000. **11**(1): p. 1-18.
51. Illum, L., *Nasal drug delivery: new developments and strategies*. Drug Discov Today, 2002. **7**(23): p. 1184-9.
52. Illum, L., *Nasal drug delivery--possibilities, problems and solutions*. J Control Release, 2003. **87**(1-3): p. 187-98.
53. Illum, L., *Is nose-to-brain transport of drugs in man a reality?* J Pharm Pharmacol, 2004. **56**(1): p. 3-17.
54. Merkus, F.W.H.M., N.G.M. Schipper, and J.C. Verhoef, *The influence of absorption enhancers on intranasal insulin absorption in normal and diabetic subjects*. Journal of Controlled Release, 1996. **41**(1-2): p. 69-75.
55. Arora, P., S. Sharma, and S. Garg, *Permeability issues in nasal drug delivery*. Drug Discovery Today, 2002. **7**(18): p. 967-975.
56. Ugwoke, M.I., et al., *Nasal mucoadhesive drug delivery: background, applications, trends and future perspectives*. Adv Drug Deliv Rev, 2005. **57**(11): p. 1640-65.
57. Wolfe, T.R. and T. Bernstone, *Intranasal drug delivery: an alternative to intravenous administration in selected emergency cases*. J Emerg Nurs, 2004. **30**(2): p. 141-7.
58. Sintov, A.C., H.V. Levy, and S. Botner, *Systemic delivery of insulin via the nasal route using a new microemulsion system: In vitro and in vivo studies*. J Control Release, 2010. **148**(2): p. 168-76.
59. Casettari, L. and L. Illum, *Chitosan in nasal delivery systems for therapeutic drugs*. J Control Release, 2014. **190**: p. 189-200.
60. Thorne, R.G., et al., *Quantitative analysis of the olfactory pathway for drug delivery to the brain*. Brain Res, 1995. **692**(1-2): p. 278-82.

61. Hanson, L.R. and W.H. Frey, 2nd, *Strategies for intranasal delivery of therapeutics for the prevention and treatment of neuroAIDS*. J Neuroimmune Pharmacol, 2007. **2**(1): p. 81-6.
62. Hanson, L.R. and W.H. Frey, 2nd, *Intranasal delivery bypasses the blood-brain barrier to target therapeutic agents to the central nervous system and treat neurodegenerative disease*. BMC Neurosci, 2008. **9 Suppl 3**: p. S5.
63. Mistry, A., S. Stolnik, and L. Illum, *Nanoparticles for direct nose-to-brain delivery of drugs*. International Journal of Pharmaceutics, 2009. **379**(1): p. 146-157.
64. Elder, A., et al., *Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system*. Environ Health Perspect, 2006. **114**(8): p. 1172-8.
65. Liu, Y., et al., *Oxidative stress and acute changes in murine brain tissues after nasal instillation of copper particles with different sizes*. J Nanosci Nanotechnol, 2014. **14**(6): p. 4534-40.
66. Wu, J., T. Ding, and J. Sun, *Neurotoxic potential of iron oxide nanoparticles in the rat brain striatum and hippocampus*. Neurotoxicology, 2013. **34**: p. 243-53.
67. Yin, N., et al., *Vitamin E attenuates silver nanoparticle-induced effects on body weight and neurotoxicity in rats*. Biochem Biophys Res Commun, 2015. **458**(2): p. 405-10.
68. Yin, N., et al., *Silver nanoparticle exposure induces rat motor dysfunction through decrease in expression of calcium channel protein in cerebellum*. Toxicol Lett, 2015. **237**(2): p. 112-20.
69. Ze, Y., et al., *Molecular mechanism of titanium dioxide nanoparticles-induced oxidative injury in the brain of mice*. Chemosphere, 2013. **92**(9): p. 1183-9.
70. Czerniawska, A., *Experimental investigations on the penetration of 198Au from nasal mucous membrane into cerebrospinal fluid*. Acta Otolaryngol, 1970. **70**(1): p. 58-61.
71. Joshi, H.M., et al., *Gold nanoparticles as carriers for efficient transmucosal insulin delivery*. Langmuir, 2006. **22**(1): p. 300-5.
72. Hutter, E., et al., *Microglial response to gold nanoparticles*. ACS Nano, 2010. **4**(5): p. 2595-606.
73. Tsai, D.H., et al., *Competitive Adsorption of Thiolated Polyethylene Glycol and Mercaptopropionic Acid on Gold Nanoparticles Measured by Physical Characterization Methods*. Langmuir, 2010. **26**(12): p. 10325-10333.
74. Duguet, E., et al., *Magnetic nanoparticles and their applications in medicine*. Nanomedicine, 2006. **1**(2): p. 157-168.
75. Göppert, T.M. and R.H. Müller, *Polysorbate-stabilized solid lipid nanoparticles as colloidal carriers for intravenous targeting of drugs to the brain: comparison of plasma protein adsorption patterns*. Journal of drug targeting, 2005. **13**(3): p. 179-187.
76. Wang, Y.Y., et al., *Addressing the PEG mucoadhesivity paradox to engineer nanoparticles that "slip" through the human mucus barrier*. Angewandte Chemie International Edition, 2008. **47**(50): p. 9726-9729.
77. Oh, E., et al., *Cellular Uptake and Fate of PEGylated Gold Nanoparticles Is Dependent on Both Cell-Penetration Peptides and Particle Size*. Acs Nano, 2011. **5**(8): p. 6434-6448.
78. Campardelli, R., et al., *Au-PLA nanocomposites for photothermally controlled drug delivery*. Journal of Materials Chemistry B, 2014. **2**(4): p. 409-417.
79. Choi, W.I., et al., *Tumor Regression In Vivo by Photothermal Therapy Based on Gold-Nanorod-Loaded, Functional Nanocarriers*. Acs Nano, 2011. **5**(3): p. 1995-2003.
80. Kim, J.H. and T.R. Lee, *Discrete thermally responsive hydrogel-coated gold nanoparticles for use as drug-delivery vehicles*. Drug Development Research, 2006. **67**(1): p. 61-69.
81. Liu, J., et al., *Gold nanorods coated with a thermo-responsive poly(ethylene glycol)-b-poly(N-vinylcaprolactam) corona as drug delivery systems for remotely near infrared-triggered release*. Polymer Chemistry, 2014. **5**(3): p. 799-813.

82. Topete, A., et al., *Fluorescent Drug-Loaded, Polymeric-Based, Branched Gold Nanoshells for Localized Multimodal Therapy and Imaging of Tumoral Cells*. *ACS Nano*, 2014. **8**(3): p. 2725-2738.
83. You, J., et al., *Near-Infrared Light Triggers Release of Paclitaxel from Biodegradable Microspheres: Photothermal Effect and Enhanced Antitumor Activity*. *Small*, 2010. **6**(9): p. 1022-1031.
84. Ai, H., S.A. Jones, and Y.M. Lvov, *Biomedical applications of electrostatic layer-by-layer nano-assembly of polymers, enzymes, and nanoparticles*. *Cell Biochem Biophys*, 2003. **39**(1): p. 23-43.
85. Seremeta, K.P., D.A. Chiappetta, and A. Sosnik, *Poly(epsilon-caprolactone), Eudragit(R) RS 100 and poly(epsilon-caprolactone)/Eudragit(R) RS 100 blend submicron particles for the sustained release of the antiretroviral efavirenz*. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2013. **102**: p. 441-9.
86. Sosnik, A., *Production of drug-loaded polymeric nanoparticles by electrospraying technology*. *J Biomed Nanotechnol*, 2014. **10**(9): p. 2200-17.
87. Walsh, S., et al., *Extended nasal residence time of lysostaphin and an anti-staphylococcal monoclonal antibody by delivery in semisolid or polymeric carriers*. *Pharm Res*, 2004. **21**(10): p. 1770-5.
88. Chaturvedi, M., M. Kumar, and K. Pathak, *A review on mucoadhesive polymer used in nasal drug delivery system*. *J Adv Pharm Technol Res*, 2011. **2**(4): p. 215-22.
89. Basu, S. and S. Maity, *Preparation and characterisation of mucoadhesive nasal gel of venlafaxine hydrochloride for treatment of anxiety disorders*. *Indian J Pharm Sci*, 2012. **74**(5): p. 428-33.
90. Zaman, M., S. Chandrudu, and I. Toth, *Strategies for intranasal delivery of vaccines*. *Drug Deliv Transl Res*, 2013. **3**(1): p. 100-9.

Capítulo 2: Metodología

2.1. Síntesis nanoprismas de oro (NPrO)

NPrO con un largo de arista de 50 nm fueron preparados utilizando $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ como agente reductor de HAuCl_4 , de acuerdo con el protocolo descrito por Pelaz et al. [1]. Brevemente, una solución 0.7 mM de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ preparada en el momento fue añadida a una solución acuosa de HAuCl_4 (2 mM). La mezcla se dejó reaccionar durante 9 minutos a temperatura ambiente, y un nuevo volumen de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ fue añadido. Después de 30 minutos la reacción estaba completa, y la solución final fue caracterizada. Las muestras fueron caracterizadas por espectrofotometría, dispersión dinámica de la luz, potencial zeta, y microscopía electrónica de transmisión.

2.2. Síntesis de nanoesferas de oro (NEO)

Nanoesferas de oro cubiertas con citrato (48 nm) fueron preparadas mediante la reducción de HAuCl_4 con citrato de sodio, de acuerdo con el método de Turkevich. Una solución acuosa de HAuCl_4 (0.01% p/v) fue llevada a ebullición y una solución de citrato de sodio (1% p/v) fue rápidamente añadida. La reacción se llevó a cabo durante 15 minutos bajo agitación magnética, hasta la formación de una solución púrpura. La solución fue enfriada a temperatura ambiente, para luego ser caracterizada. Las muestras obtenidas fueron caracterizadas mediante espectrofotometría, dispersión dinámica de la luz, potencial zeta, y microscopía electrónica de transmisión.

2.3. Funcionalización con HS-PEG-COOH

Tanto los NPrO como las NEO fueron funcionalizados con HS-PEG-COOH (5kDa). Para lograr la quimisorción del grupo tiol sobre la superficie de las nanopartículas de oro, los siguientes protocolos fueron llevados a cabo:

NPrO: 15 μ L de una solución acuosa de HS-PEG-COOH (0.1 mg) fueron añadidos a una solución de NPrO (1 de absorbancia, pH = 7) bajo agitación suave. La solución reaccionó durante 3 horas, y luego el vial fue sonicado durante 5 minutos. Con el fin de eliminar el exceso de moléculas de PEG, la solución fue centrifugada a 5,900 g durante 20 minutos. El sobrenadante fue descartado, y la pella resuspendida en agua Milli-Q.

NEO: Una solución de NEO 1 de absorbancia se mezcló con 300 μ L de una solución acuosa de HS-PEG-COOH (1.5 mg) bajo agitación suave durante 1.5 horas. Transcurrido el tiempo de reacción, la solución fue sonicada durante 5 minutos y centrifugada durante 20 minutos a 5,900 g. El sobrenadante fue descartado, y la pella resuspendida en agua Milli-Q.

2.4. Purificación de NPrO mediante centrifugación

Con el fin de eliminar las nanoesferas formadas durante la síntesis de los NPrO (contaminantes), las muestras que fueron funcionalizadas con HS-PEG-COOH (NPrO-PEG), fueron purificadas mediante centrifugación. La muestra NPrO-PEG o "P1" (pella 1) fue centrifugada a durante 20 minutos a 3,300 g, descartando el sobrenadante y resuspendiendo la pella en agua Milli-Q (P2). Luego, P2 fue

centrifugada a 1,500 g durante 20 minutos, y nuevamente, el sobrenadante fue descartado y la pella resuspendida en agua Milli-Q (P3). El mismo procedimiento fue repetido para obtener P4 (400 g, 20 minutos), P5 (1,500 g, 20 minutos), P6 (400 g, 20 minutos), y P7 (5,900 g, 20 minutos), siempre descartando el sobrenadante y resuspendiendo la pella. Todas las centrifugaciones fueron llevadas a cabo a temperatura ambiente y las muestras siempre fueron sonicadas antes de ser centrifugadas. La caracterización de P7 realizada mediante espectrofotometría Vis-NIR y TEM confirma el éxito de la purificación.

2.5. Doble funcionalización con HS-PEG-COOH

Las muestras NPrO-PEG (P7) fueron funcionalizadas nuevamente con HS-PEG-COOH para asegurar la presencia de un gran número de moléculas PEG sobre la superficie de los nanoprismas. Una alícuota de 150 μ L HS-PEG-COOH (0.2 mg) fue añadida a una solución P7 (1 de absorbancia, pH = 12). La funcionalización fue realizada bajo agitación suave, durante toda la noche, y a temperatura ambiente. Después de esto, la muestra fue sonicada durante 5 minutos y centrifugada a 3,300 g durante 20 minutos. El sobrenadante fue descartado, y la pella resuspendida en agua Milli-Q, obteniéndose la muestra NPrO-PEGx2.

2.6. Conjugación del péptido D1

A través del uso de los reactivos 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida y N-hidroxisuccinimida (EDC/NHS), un enlace amida fue generado entre los grupos

carboxílicos y aminos, presentes en HS-PEG-COOH y el péptido D1, respectivamente. Primero, NPrO-PEGx2 y NEO-PEG fueron centrifugadas durante 20 minutos a 3,300 g y 5,900 g, respectivamente, y las pellas obtenidas fueron resuspendidas en 400 μ L de agua Milli-Q. Luego, 100 μ L de una solución EDC/NHS fue añadida para activar los grupos carboxílicos. Las cantidades de EDC/NHS añadidas para NPrO-PEGx2 y NEO-PEG fueron de 0.9/1.35 mg y 1/2.5 mg, respectivamente. Ambas muestras reaccionaron durante 15 minutos bajo agitación orbital. Las muestras fueron sonicadas y centrifugadas durante 20 minutos a 3,300 g (NPrO) y 5,900 g (NEO) con el fin de eliminar el exceso de moléculas de EDC/NHS. Las pellas fueron resuspendidas en 700 μ L de PBS y 100 μ L de una solución del péptido D1 (3 mg/mL) fue añadida a los NPrO y NEO activados. Las muestras fueron sonicadas durante 5 minutos y luego incubadas toda la noche a temperatura ambiente bajo agitación orbital. Finalmente, NPrO-D1 y NEO-D1 fueron nuevamente centrifugadas, las pellas resuspendidas en agua Milli-Q y almacenadas a 4°C. Ambos sistemas fueron caracterizados mediante espectrofotometría, dispersión dinámica de la luz, potencial zeta, y microscopía electrónica de transmisión.

2.7. Recubrimiento con polímeros mediante *layer-by-layer*

NPrO: Una solución de NPrO-D1 fue añadida gota a gota a 2.5 mL de una solución de polietilenimina (PEI, 1 mg/mL) bajo agitación suave. Luego, la mezcla fue agitada durante 1 hora y centrifugada 15 minutos a 3,300 g. La pella fue resuspendida en agua Milli-Q. La suspensión de nanoprismas, NPrO-D1-PEI, fue añadida gota a gota

a 2 mL de una solución de poliestireno sulfonato (PSS, 5 mg/mL), siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente. Finalmente, luego de dos centrifugaciones, la pella NPrO-D1-PSS fue obtenida.

NEO: Al igual que en el caso de los NPrO-D1, se añadió gota a gota una solución de NEO-D1 sobre 2.5 mL de una solución PEI (1 mg/mL). Luego de 1 hora bajo agitación suave, la muestra se centrifugó 20 minutos a 5,900 g. La muestra fue resuspendida en agua Milli-Q y se añadió gota a gota sobre 2 mL de A: Carbopol (CAR, 2 mg/mL) o B: Ácido algínico (AAC, 5 mg/mL) siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente. La muestra fue resuspendida en agua Milli-Q y almacenada a 4°C.

Todos los nanosistemas obtenidos fueron caracterizados mediante espectrofotometría, dispersión dinámica de la luz y potencial zeta para determinar sus parámetros fisicoquímicos.

2.8. Espectrofotometría UV-Visible-NIR

Los espectros de absorción fueron obtenidos a temperatura ambiente y utilizando agua Milli-Q como solvente, a través del espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25. Cada espectro fue usado para determinar y observar las bandas plasmónicas características de NPrO y NEO desnudas, y sus respectivas formas funcionalizadas. Cubetas de cuarzo con 1 cm de paso óptico fueron utilizadas para llevar a cabo las mediciones, usando agua Milli-Q como blanco.

2.9. Dispersión dinámica de la luz (DLS)

Los diámetros hidrodinámicos y la estabilidad coloidal de todas las muestras fueron medidos utilizando un Malvern Zetasizer 3000 (Malvern Instruments, UK). Una alícuota de cada muestra fue depositada en una celda capilar de policarbonato desechable (DTS 1061) y las medidas fueron realizadas a una longitud de onda de 633 nm, ángulo fijo de dispersión de 173°, y bajo un control preciso de temperatura (25°C).

2.10. Potencial Zeta

Las mediciones de potencial zeta de todas las muestras fueron realizadas en el equipo Zetasizer 3000 (Malvern Instruments, UK) a 25°C. Como las muestras se encontraban en solución acuosa, se utilizó la aproximación de Smoluchowski para calcular los valores de potencial zeta. Todas las mediciones fueron realizadas utilizando agua Milli-Q como solvente, procurando que las soluciones resultantes tuviesen un pH cercano a 5.5.

2.11. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

El tamaño y morfología de las nanopartículas de oro fue determinado mediante microscopía electrónica a través del microscopio de transmisión FEI Tecnai G² TWIN, operado a 120 kV. Las grillas fueron preparadas dejando caer una gota de solución de NPrO o NEO sobre una microgrilla de cobre cubierta con carbono/Formvar. Luego de 5 minutos, el exceso de solución fue removido con

papel absorbente. Con el fin de observar materia orgánica sobre la superficie de las nanopartículas, algunas muestras fueron teñidas con ácido fosfotúngstico al 1%.

2.12. Determinación de la concentración de nanopartículas

i) Absorción atómica

Una alícuota de volumen conocido de NPrO-PEG (P4) fue analizada mediante absorción atómica para determinar la concentración de oro (C_{Au}) y establecer una relación entre el valor de absorbancia del plasmón y la concentración de NPrO (C_{NPrO}). Las muestras fueron puestas en viales y secadas en una estufa a 60°C. Después de esto, 2 mL de una solución HNO₃ 1N y HCl 1N fue añadida a cada vial para desintegrar las nanopartículas de oro y convertirlas en átomos de oro. Las muestras fueron dejadas en la estufa a 60°C durante toda la noche. Una vez que las muestras se encontraban secas, fueron diluidas con agua Milli-Q a un volumen final de 10 mL para ser analizadas por absorción atómica. Para determinar la concentración de oro en cada muestra, una curva de calibración medida el mismo día fue utilizada (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 5.5, y 7 mg/L). Todas las muestras fueron medidas 3 veces. Con el valor de la C_{Au} y el conocimiento del largo (L) y ancho (A) promedio de los NPrO (determinado mediante TEM), la C_{NPrO} fue calculada de la siguiente manera:

$$C_{NPrO} = \frac{C_{Au}}{\rho_{Au} \times V_{NPrO}} \times \%NPrO$$

C_{NPrO} : Concentración NPrO (nM)

C_{Au} : Concentración de oro (nM)

ρ_{Au} : Densidad de átomos de oro en bulk (59 átomos/nm³)

V_{NPrO} : Volumen de los NPrO determinado mediante la fórmula: $\frac{\sqrt{3} \times L^2 \times A}{4}$

%NPrO: Porcentaje de NPrO en la muestra

Las muestras usadas para estos análisis fueron observadas por TEM con el fin de determinar la razón entre número de nanoprismas/nanoesferas. Además, las imágenes TEM fueron utilizadas para determinar los tamaños de los prismas y esferas, lo cual permitió determinar sus volúmenes y la razón $V_{\text{NPrO}}/V_{\text{NEO}}$. La relación entre las razones del número de nanoprismas/nanoesferas y $V_{\text{NPrO}}/V_{\text{NEO}}$ nos permitió calcular el porcentaje de nanoprismas (%NPrO) y nanoesferas (%NEO) presentes en la muestra. Finalmente, consideramos que todo el oro presente en cada muestra correspondía a NPrO, y estos resultados fueron multiplicados por el %NPrO de cada muestra, obteniéndose la concentración de NPrO.

ii) Nanosight

Con el fin de determinar el número de nanopartículas por mililitro, se realizó un análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) con el equipo NanoSight NS3000 (Malver Instruments, UK), y la acumulación de datos y posterior análisis fue hecho con el *software* NanoSight, versión NTA 3.2. El NTA es una aproximación rápida

que puede ser usada para mediciones cuantitativas. Se estableció una relación lineal entre la concentración de las nanopartículas y el valor de absorbancia de la banda plasmónica. Cinco muestras de NPrO-D1 o NEO-D1 con diferentes valores de absorbancia, entre 0.1 y 1, fueron diluidas y medidas. Los datos fueron obtenidos usando un nivel de cámara de 15, videoclips de 50 segundos, y un límite de detección de 3. En el caso de los NPrO-D1, las mediciones fueron realizadas con 3 láseres de distinta longitud de onda (405, 488, y 642 nm) para corroborar de que no existiera influencia del tipo de láser usado y el resultado obtenido. El láser rojo, 642 nm, fue usado para las mediciones de NEO-D1. Todas las mediciones se llevaron a cabo a una temperatura de 25°C y con agua Milli-Q como solvente.

2.13. Número de péptidos por nanopartícula

A través de análisis de aminoácidos se determinó el número de moléculas de péptido en una solución con una concentración conocida de nanopartículas [2, 3]. Las muestras fueron concentradas mediante centrifugación a 5,900 g durante 20 minutos para obtener una solución de 40 µL. Un volumen de 12 µL de ácido α -aminobutírico (AABA, 2.5 mM) fue añadido con patrón interno. La mezcla fue hidrolizada por 72 horas en HCl 6 N, evaporada, y resuspendida a un volumen final de 200 µL en HCl 20 mM. Para cada *stock* se tomaron 20 µL y se mezclaron con 60 µL de tampón borato. Los aminoácidos en el hidrolizado se derivatizaron al agregar 20 µL de carbamato heterocíclico activado con 6-aminoquinolil-n-hidroxisuccinimida (reactivo de Waters AccQ-Fluor™), los cuales se dejaron reaccionar durante 1 min a temperatura ambiente seguido de 10 min a 55°C. Las muestras fueron inyectadas

en un HPLC-PDA con una columna AccQ-Tag (C18; 4 μm ; 3,9 x 15 mm). Los picos obtenidos fueron comparados con estándares de aminoácidos (Waters Pico-Tag). El número de moléculas de péptido por mL fue dividido por el número de nanopartículas de oro por mL con el fin de obtener el número de moléculas de péptido por nanopartícula:

$$N = \frac{\text{Péptido } (\mu\text{M})}{\text{NP } (\text{nM})} \times 1000$$

N: número de moléculas del péptido D1 por nanopartícula.

Péptido: concentración del péptido D1 (μM) determinado mediante análisis de aminoácidos.

NP: concentración de nanopartículas (nM; NPrO o NEO) determinado mediante NTA.

2.14. Espectroscopía Raman

Todos los espectros Raman fueron medidos en un espectrómetro Raman Renishaw InVia. El microespectrómetro estaba equipado con una línea láser de 785 nm, un detector CCD enfriado eléctricamente, y acoplado a un microscopio Leica DMDL. La señal Raman se calibró internamente a la línea de silicio de 520 cm^{-1} . El rango espectral se estableció entre $200\text{-}2000 \text{ cm}^{-1}$, y el número de adquisiciones fue de 1 a 10 s de tiempo de integración. La potencia del láser fue de 0.2 mW (menos del 1%) para evitar cualquier fotodescomposición. Las muestras se depositaron en una

fina lámina de oro para eliminar la fluorescencia intrínseca. Esta superficie se preparó depositando una película de Au en plasma de argón sobre un sustrato de vidrio mediante el método de pulverización catódica. Los espectros Raman del péptido D1 se registraron en estado sólido, mientras que los espectros SERS de NPrO-D1 y NEO-D1 se obtuvieron después de evaporar el disolvente sin ninguna exposición a la luz.

2.15. Determinación de la estabilidad coloidal

Para determinar la estabilidad coloidal de los nanosistemas basados en NPrO y NEO se realizaron diferentes ensayos. Todas las muestras fueron caracterizadas con el fin de obtener los valores de sus bandas plasmónicas, diámetros hidrodinámicos, y potenciales zeta. Cada condición fue evaluada mediante experimentos independientes y en triplicado. Soluciones de NPrO-D1, NPrO-D1-PEI, NPrO-D1-PSS, y NEO-D1 en agua Milli-Q fueron almacenadas a 4°C por un periodo de 28 días. Sus parámetros fisicoquímicos fueron evaluados los días 1, 7, 14, y 28 con el fin de determinar su estabilidad. Por otro lado, se determinó la estabilidad de NPrO-D1 y NEO-D1 al ser resuspendidos en agua Milli-Q, PBS, y medio de cultivo RPMI-1640 durante 24 h a 37°C. Las propiedades fisicoquímicas fueron determinadas a tiempo cero (T0) y luego de 24 h (T24). Antes de cada medición, las muestras disueltas en los distintos medios fueron centrifugadas y resuspendidas en agua Milli-Q para ser caracterizadas. Tanto la determinación de estabilidad en el tiempo, como en la evaluación de distintos medios, las muestras fueron sonicadas 5 min previo a la realización de las mediciones.

2.16. Ensayos de viabilidad celular

Para determinar los efectos de los NPrO y NEO funcionalizados sobre la viabilidad celular, se realizó el ensayo de reducción de la sal 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS). Este ensayo establece una relación lineal entre el número vial de células y la absorbancia. Se utilizaron dos líneas celulares: la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y mantenidas con *Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12* (DMEM/F12), y la línea celular de endotelio de cerebro de ratón bEnd.3, para las cuales se utilizó el medio DMEM alto en glucosa (Gibco). Ambas líneas fueron sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad celular de 10,000 células/pocillo, y suplementadas con suero fetal bovino (SFB) al 1%, 50 U/mL de penecilina, y 0,05 g/mL de estreptomicina. Las células fueron incubadas con concentraciones crecientes de NPrO-PEGx2, NPrO-D1, NEO-PEG, y NEO-D1 a 37°C y con una atmósfera al 5% de CO₂. Después de 24 horas, la viabilidad celular fue determinada (triplicado) en 3 experimentos independientes usando el ensayo MTS de acuerdo con el protocolo del fabricante. Brevemente, la sal de tetrazolio MTS necesita un reactivo de acoplamiento de electrones (fenazina metosulfato; PMS). Tanto el MTS, como el PMS fueron disueltos en buffer fosfato salino de Dulbecco (DBPS) a un pH óptimo entre 6-6.5. El MTS y PMS fueron mezclados para obtener una concentración final de 333 µg/mL de MTS y 25 µM de PMS en el ensayo. La mezcla fue añadida a las células y se incubó durante 1 a 3 horas a 37°C. La absorbancia a 490 nm fue

monitorizada en un lector *Multiscan* con una longitud de onda de referencia de 655 nm.

Además, se determinaron los efectos de NEO-D1 y NPrO-D1 sobre la viabilidad celular en línea de microglía BV-2 mediante el ensayo de reducción de la sal 2,3-Bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida (XTT). Las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad celular de 20,000 células/pocillo y mantenidas con medio RPMI-1640, SFB 10%, y L-glutamina. Las células fueron incubadas con concentraciones crecientes de NEO-D1 y NPrO-D1 durante 24 horas. Posterior a esto, la viabilidad celular fue determinada (triplicado) en 2 experimentos independientes. El procedimiento para la lectura de resultados es similar al usado para el MTS, teniéndose que mezclar XTT con PMS, incubarlo de 1 a 3 horas a 37°C, y medir la placa a 2 longitudes de onda, en este caso a 475 y 660 nm.

2.17. Experimentos *In Vivo*

i) Animales

Para los siguientes estudios se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley (350-400 g de peso, Harlam, Jerusalén). Los animales fueron mantenidos en jaulas de policarbonato bajo ciclos de luz/oscuridad de 12/12 horas. Las ratas tenían libre acceso a comida y agua bajo condiciones reguladas de temperatura y humedad. Todas las metodologías y procedimientos experimentales usados fueron revisados y aprobados por el *Institutional & Use Committee, Ben-Gurion University of the*

Negev, el cual se ajusta al Cuidado Humano y Uso de Animales de Laboratorio de Israel.

ii) Administración intranasal (IN) e intravenosa (IV)

Los animales fueron divididos aleatoriamente en 6 grupos (n = 1, IN, experimento preliminar), 2 grupos (n = 3, IN, 0.5 h, NPrO-D1 y NeO-D1), y 2 grupos (n = 3, IN e IV, 0.75 h, NEO-D1). La dosis administrada para cada tratamiento en cada animal fue de 4.5×10^{11} nanopartículas/kg de peso. En el caso de la vía intranasal, el volumen utilizado fue de 75 μL /kg de peso (37.5 μL /fosa/kg de peso), mientras que, en el caso de la vía intravenosa, el volumen administrado fue de 1,230 μL /kg de peso (vena de la cola). Previo a realizar la administración, ya fuese IN o IV, los animales fueron sedados con vapor de isoflurano. Después de 30 o 45 minutos, los animales fueron anestesiados con ketamina (80 mg/kg, i.p.) y xilazina (10 mg/kg, i.p.). Luego, se extrajo un volumen de 0.5 mL de sangre de la aurícula derecha del corazón, para luego proceder a perfusión cardiaca con PBS 1X hasta que el corazón se detuvo, con el fin de eliminar la sangre residual de cada órgano. Los órganos de interés fueron removidos, lavados con PBS, congelados a -80°C , y luego liofilizados hasta que estuviesen completamente secos. Finalmente, todos los órganos secos fueron pesados.

iii) Estudio farmacocinético de NEO-D1

15 animales se dividieron de manera aleatoria en 5 grupos de 3 ratas cada uno. La dosis administrada intranasalmente en este experimento fue la misma utilizada en

los experimentos anteriores (4.5×10^{11} nanopartículas/Kg; 37.5 μ L por fosa/Kg). Las ratas fueron sacrificadas a las 0.75, 2, 4, 8, 24 h post administración siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente. Del corazón se tomó un volumen de 0.5 mL de sangre, se extrajeron el cerebro, bulbo olfatorio, e hígado, los cuales fueron lavados en PBS, congelados a -80°C , y liofilizados. Luego, todos los órganos fueron molidos, y una cantidad de masa conocida fue analizada mediante activación neutrónica para determinar el contenido de oro.

iv) Digestión y cuantificación de oro

Se utilizó espectrometría de masa con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS Agilent 7500cx, Universidad Hebrea de Jerusalén, Jerusalén, Israel) para determinar la cantidad de oro en cada muestra de los experimentos descritos en la sección 2.16 (ii). Cada órgano, una vez seco, fue digerido con H_2SO_4 (96%), HNO_3 (70%) y H_2O_2 (30%) hasta obtener una solución transparente y limpia. Luego, con el fin de desintegrar completamente las nanopartículas de oro, las soluciones obtenidas fueron digeridas con agua regia ($\text{HCl}:\text{HNO}_3$, 3:1) y H_2O_2 (30%), hasta obtener soluciones transparentes. Ambos procesos de digestión fueron llevados a cabo en una placa calefactora, y se dieron por terminados una vez que todos los ácidos fueron completamente evaporados. Finalmente, cada muestra fue resuspendida en 5 mL de agua Milli-Q y almacenada a 4°C previo a su medición por ICP-MS. Las concentraciones de oro fueron determinadas de acuerdo con los valores de absorbancia, en correlación con las curvas de calibración determinadas

utilizando soluciones con concentraciones de oro conocidas (0.1 a 10 ppb). El límite de detección del equipo es de 0.01 ppb.

Para el estudio farmacocinético la cantidad de oro fue determinada mediante activación neutrónica en la Comisión Chilena de Energía Nuclear (CCHEN), procedimiento que ha sido utilizado por nuestro laboratorio anteriormente [2]. Brevemente, las muestras fueron selladas mediante soldadura por fricción y expuestas durante 17 h en un reactor RECH-1 a un flujo de neutrones de $0.25 - 1.3 \times 10^{13} \text{ n/cm}^2\text{s}$ con una potencia de 5 mW para desencadenar la conversión de ^{197}Au a ^{198}Au . Luego de 7-12 días de decaimiento, los rayos γ emitidos por cada muestra fueron medidos utilizando un detector de germanio acoplado a un espectrómetro de rayos γ y multicanal. Los espectros fueron analizados mediante el software SAMPO90 Canberra. Los estándares de oro fueron analizados junto con las muestras experimentales para estandarizar la librería de datos de oro a partir de la cual se calculó la cantidad de oro en las muestras desconocidas.

v) Biodistribución de NEO-D1 en cerebro

Para determinar la distribución de NEO-D1 en cerebro, 4 animales fueron divididos de manera aleatoria en 2 grupos de 2 ratas cada uno. Un grupo fue administrado intranasalmente, mientras que el otro recibió una inyección de un bolo IV. Se aplicaron los mismos procesos de sedación, administración y anestesia descritos previamente en este experimento. Después de la perfusión transcardial de PBS, el cerebro y bulbo olfatorio fueron fijados con una solución de formaldehído al 4%. Los órganos fueron removidos e incubados una noche a 4°C en solución formaldehído

al 4%. Luego, estos fueron lavados y puestos en una solución de sucrosa al 30% en PBS hasta que los tejidos se hundieron. Los cerebros y bulbos olfatorios fueron embebidos en OCT y seccionados (plano coronario) con un grosor de 4 μm utilizando un criostato LEICA CM 1950. La localización y distribución de NEO-D1 en los tejidos fue determinado mediante el kit GoldEnhance™ para microscopía óptica, siguiendo los protocolos descritos en literatura y por el fabricante [4, 5]. A través de microscopía óptica, las NEO-D1 fueron identificadas como pigmentos negros granulares, los cuales no fueron encontrados en los tejidos control (sin tratamiento con NEO-D1). Cada grupo de gránulos fue asignado a una específica localización en cerebro utilizando el atlas de rata Waxholm como referencia [6-8]. Más de cuatrocientos grupos de gránulos fueron encontrados para cada ruta de administración. El porcentaje de localización fue calculado usando el número total gránulos por ruta de administración como el 100%.

Referencias

1. Pelaz, B., et al., *Tailoring the synthesis and heating ability of gold nanoprisms for bioapplications*. Langmuir, 2012. **28**(24): p. 8965-70.
2. Velasco-Aguirre, C., et al., *Improving gold nanorod delivery to the central nervous system by conjugation to the shuttle Angiopep-2*. Nanomedicine (Lond), 2017. **12**(20): p. 2503-2517.
3. Morales-Zavala, F., et al., *Peptide multifunctionalized gold nanorods decrease toxicity of beta-amyloid peptide in a Caenorhabditis elegans model of Alzheimer's disease*. Nanomedicine, 2017. **13**(7): p. 2341-2350.
4. Ng, C.T., et al., *Clathrin-mediated endocytosis of gold nanoparticles in vitro*. Anat Rec (Hoboken), 2015. **298**(2): p. 418-27.
5. Talamini, L., et al., *Influence of Size and Shape on the Anatomical Distribution of Endotoxin-Free Gold Nanoparticles*. ACS Nano, 2017. **11**(6): p. 5519-5529.
6. Sergejeva, M., et al., *Anatomical landmarks for registration of experimental image data to volumetric rodent brain atlasing templates*. J Neurosci Methods, 2015. **240**: p. 161-9.
7. Papp, E.A., et al., *Waxholm Space atlas of the Sprague Dawley rat brain*. Neuroimage, 2014. **97**: p. 374-86.
8. Kjonigsen, L.J., et al., *Waxholm Space atlas of the rat brain hippocampal region: three-dimensional delineations based on magnetic resonance and diffusion tensor imaging*. Neuroimage, 2015. **108**: p. 441-9.

Capítulo 3: Síntesis, Purificación, y Funcionalización de Nanoprismas de Oro

La síntesis de NPrO se basó en el protocolo descrito previamente por Pelaz y colaboradores [1], en el que una solución acuosa de HAuCl_4 se mezcla con una solución fresca de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, se deja reaccionar durante 9 minutos, y se vuelve a agregar $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. El volumen de esta segunda adición puede variar, lo que permite obtener un rango de plasmón entre 750 a 1075 nm. La primera adición de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ formará las “semillas”, las cuales crecerán asimétricamente con la segunda adición para formar los nanoprismas. Tomando en consideración estos antecedentes, se evaluaron los parámetros críticos para la obtención de una síntesis estable y reproducible de NPrO en nuestro laboratorio.

3.1 Concentración de solución áurica

Utilizando una concentración fija de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.5 mM, se evaluó la cinética de crecimiento de las semillas utilizando distintas concentraciones de oro. El seguimiento se realizó mediante espectrofotometría Vis-NIR utilizando concentraciones de 2 y 2.5 mM de HAuCl_4 (Fig. 3.1).

Bajo las mismas condiciones, se pudo observar que, al utilizar una concentración menor de oro, la localización del plasmón en la región NIR es a menores longitudes de onda comparado con la reacción a 2.5 mM de oro. Además, los valores de absorbancia de las bandas plasmónicas en Vis son mayores para 2 mM de oro. Ambas características se pueden explicar debido a que, al mantener constante la concentración del agente reductor, la cinética de reducción y formación de nanopartículas a menores concentraciones de oro ocurre de manera más rápida. Dicho fenómeno favorece, por un lado, la formación de esferas (mayor absorbancia

en Vis), y por otro la aparición de NPrO de menor tamaño (menores longitudes de onda en la región NIR). Debido a que las nanopartículas formadas en este paso son las semillas precursoras para la formación de NPrO, mientras más desplazada se encuentre la banda hacia el infrarrojo, de mayor tamaño serán las semillas y, por consiguiente, mayor será el tamaño de los prismas finales. De acuerdo con los resultados obtenidos por Pelaz y colaboradores [1], NPrO con un plasmón superior a los 1100 nm, tienen un tamaño de 165 nm en promedio. Sin embargo, en esta tesis se busca obtener NPrO con un tamaño menor a los 100 nm, por lo que se continuó trabajando con una concentración de oro de 2 mM.

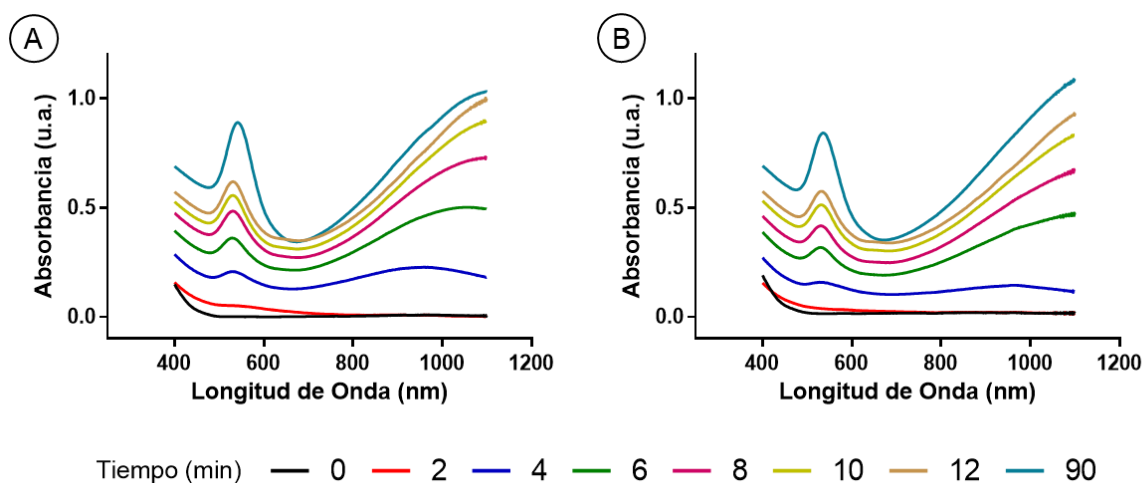


Fig. 3.1. Efecto de la concentración áurica. Espectro de absorbancia Vis-NIR utilizando 2 y 2.5 mM de HAuCl_4 reducido con 0.5 mM de tiosulfato (A y B, respectivamente). El crecimiento de las semillas fue evaluado en el tiempo (0-90 min) a 20°C .

3.2 Concentración de la solución reductora

La segunda prueba para reproducir la síntesis fue evaluar diferentes concentraciones de tiosulfato de sodio como agente reductor, para lo cual se

utilizaron cuatro concentraciones de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$: 0.25; 0.5; 0.625; y 1.0 mM. Dejando constante la concentración de la solución de oro (2 mM), se obtuvieron las cinéticas de crecimiento de las semillas para diferentes concentraciones de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (Fig. 3.2).

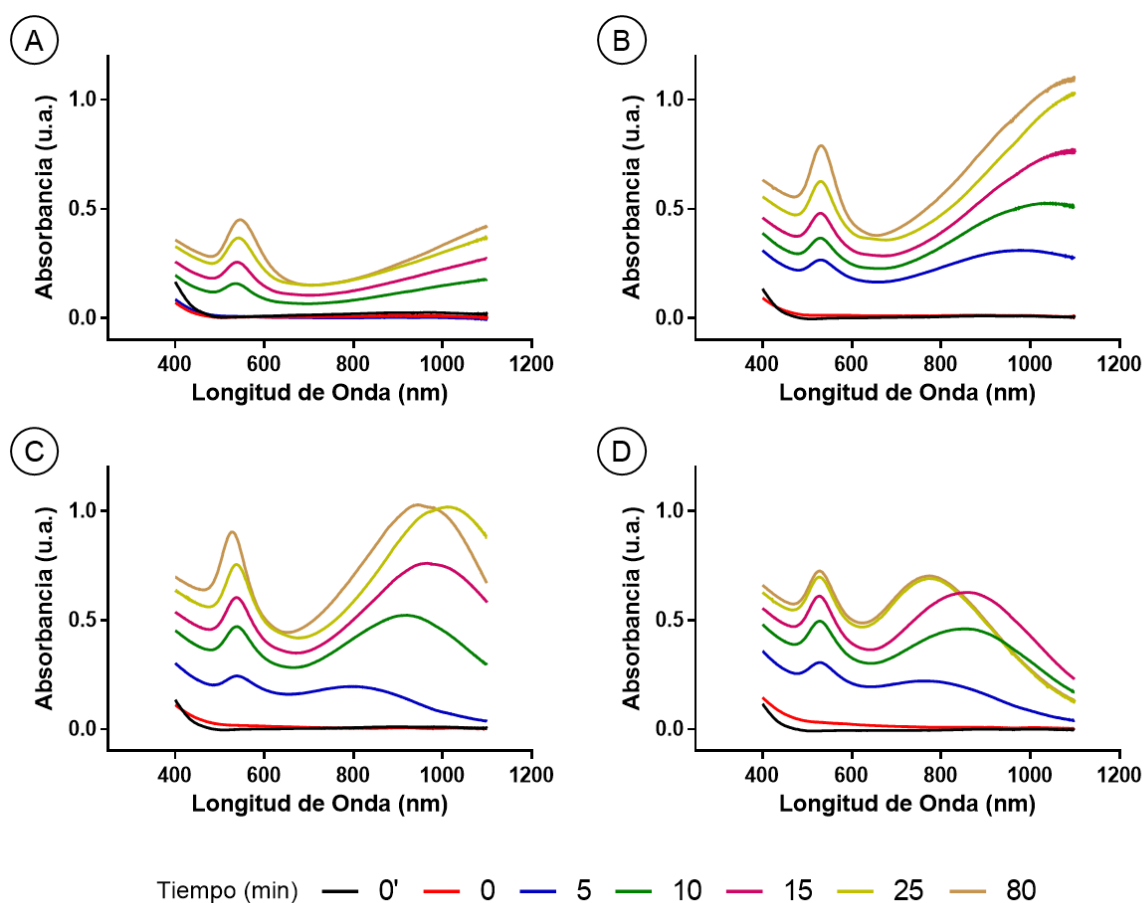


Fig. 3.2. Efecto concentración solución reductora. Espectro de absorbancia Vis-NIR de HAuCl_4 (2 mM) reducido con A) 0.25, B) 0.5, C) 0.625, y D) 1.0 mM de tiosulfato. El crecimiento de las semillas fue evaluado en el tiempo (0-80 min) a 20°C . Previo a la adición de tiosulfato, se determinó el espectro de absorbancia de la solución de oro (0' min).

Los resultados muestran que a medida que aumenta la concentración del agente reductor el plasmón en la región NIR se localiza a menores longitudes de onda, lo que se relaciona con que las semillas NPrO formadas son más pequeñas. Como se

mencionó anteriormente, debido a que en este punto se están formando las semillas, no se desea tener nanopartículas grandes, ya que éstas crecerán con la segunda adición de tiosulfato. Por lo tanto, solo las concentraciones de 0.5, 0.625, y 1 mM parecen ser las más adecuadas. Sin embargo, también es importante considerar la proporción que se obtiene entre esferas y nanoprismas en este punto, lo cual puede ser estimado mediante el valor obtenido a partir de la razón entre el valor de absorbancia para el plasmón en NIR y el plasmón a 530 nm, desde ahora, razón NIR/Vis. Entre mayor sea el valor numérico obtenido para la razón NIR/Vis, mayor es la cantidad de prismas en relación con la cantidad de esferas. De esta manera, se descartó la concentración 1 mM ya que posee una razón NIR/Vis cercana a 1, mientras que las concentraciones de 0.5 y 0.625 mM tienen razones de 1.4 y 1.2, respectivamente.

Finalmente, entre 0.5 y 0.625 mM, se escogió continuar trabajando con la segunda concentración, que a pesar de tener una proporción NIR/Vis levemente menor que 0.5 mM, la banda plasmónica en NIR se encuentra a menores longitudes de onda.

3.3 Segunda adición de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ y formación de NPrO

En la Fig. 3.2C se puede observar que entre los 5 y 15 minutos después de la primera adición de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ se encuentra el intervalo propicio para la segunda adición de tiosulfato (9 minutos en el protocolo de Pelaz y colaboradores [1]), el cual permite el crecimiento de las semillas para la obtención de los NPrO. Por esta razón, se evaluó la segunda adición a 8, 9, 10, y 15 minutos (Fig. 3.3).

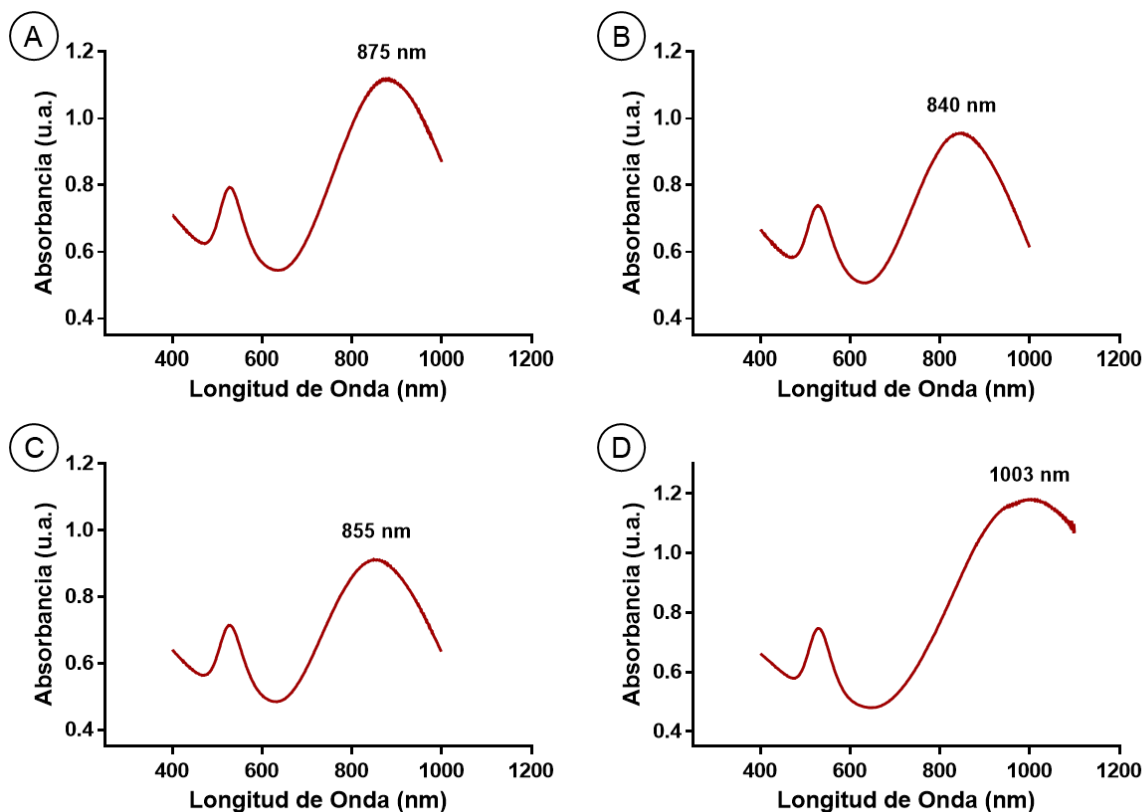


Fig. 3.3. Intervalo temporal entre adiciones de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Espectro de absorbancia Vis-NIR de HAuCl_4 2 mM reducido con tiosulfato de sodio 0.625 mM. La segunda adición se realizó a los 8 (A), 9 (B), 10 (C), y 15 (D) minutos después de la primera adición.

Entre todos los tiempos evaluados, la muestra a los 15 minutos se descartó debido a que su banda en la región NIR se encontraba sobre los 1000 nm (Fig. 3.3D). Posteriormente, se tomaron imágenes TEM para identificar el tamaño real de los nanoprismas, y la presencia de nanoesferas, para las muestras en las que la segunda adición se llevó a cabo a los 8, 9, y 10 minutos (Fig. 3.4). En todas las muestras se observa la presencia de nanoesferas de alrededor de 24 nm de diámetro y NPrO pequeños de 40 nm de largo aproximadamente, que corresponderían a las semillas.

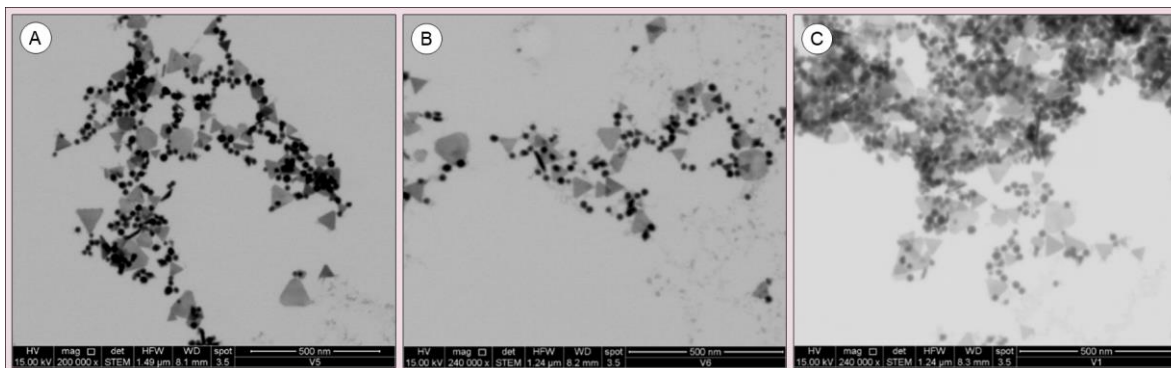


Fig. 3.4. Imágenes TEM de NPrO sintetizados a distintos tiempos. Las figuras A, B, y C son imágenes TEM representativas de las síntesis con una segunda adición a los 8, 9, y 10 minutos después de la primera adición, respectivamente.

El tamaño de los nanoprismas obtenidos a 8, 9, y 10 minutos corresponde en promedio a 90, 80, y 100 nm, respectivamente. Además, en las imágenes se observa que existe una mayor presencia de nanoesferas a los 10 minutos (Fig. 3.4C), en relación con las imágenes obtenidas para las muestras a 8 y 9 minutos (Fig. 3.4A y B). Lo anterior se puede correlacionar con las razones NIR/Vis obtenidas para las síntesis a 8, 9, y 10 minutos, las cuales fueron de 1.4, 1.3, y 1.2, respectivamente. Tomando en consideración el plasmón en NIR, tamaño de los NPrO, y el valor numérico para la razón NIR/Vis obtenido para cada muestra, se seleccionó el tiempo de 9 minutos como el apropiado para la segunda adición de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ en la síntesis de NPrO.

3.4 Volumen de la segunda adición

En los resultados obtenidos en la sección anterior, se utilizó una razón en volumen de 1.0/1.2/0.2 para las soluciones de HAuCl_4 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (1^{ra} adición), y $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (2^{da}

adición), respectivamente. Con el fin de evaluar si existe influencia en el volumen utilizado en la segunda adición de tiosulfato, se utilizó el doble (1.0/1.2/0.4) y la mitad (1.0/1.2/0.1) de volumen a lo utilizado anteriormente, lo cual fue caracterizado mediante espectrofotometría Vis-NIR (Fig. 3.5).

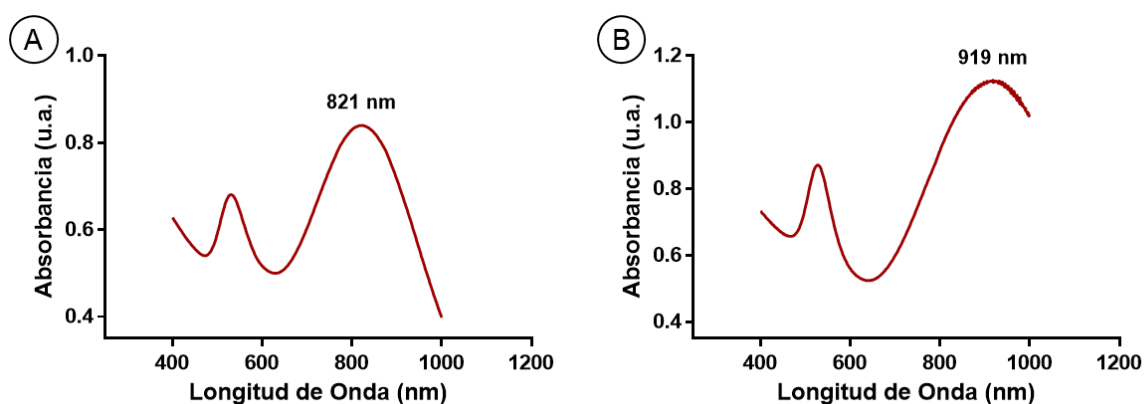


Fig. 3.5. Efecto del volumen de la segunda adición de tiosulfato. Espectros Vis-NIR de NPrO sintetizados con diferentes volúmenes de tiosulfato en la segunda adición, con una razón de volumen de 1.0/1.2/0.4 (A), y 1.0/1.2/0.1 (B) para las soluciones de HAuCl_4 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (1^{ra} adición), y $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (2^{da} adición), respectivamente.

Cuando se utilizó la relación 1.0/1.2/0.4, la banda plasmónica en NIR mostró un máximo de absorbancia a 821 nm y una razón NIR/Vis de 1.2 (Fig. 3.5A), ambos valores menores a lo obtenido en la Fig. 3.3B (840 nm, razón NIR/Vis 1.3). Por otro lado, la relación 1.0/1.2/0.1 muestra un máximo de absorbancia en NIR a 919 nm, con una razón NIR/Vis de 1.3 (Fig. 3.5B). A pesar de que en este caso se obtiene una razón NIR/Vis de igual valor a la obtenida anteriormente (Fig. 3.3B), el valor del plasmón sobre los 900 nm da cuenta de la obtención de NPrO sobre los 100 nm de largo. Ambos resultados son coherentes con lo esperado, ya que al agregar una mayor cantidad de tiosulfato se espera que exista una mayor y más rápida

reducción, lo que lleva a la formación de prismas más pequeños y mayor cantidad de esferas, mientras que, al agregar menos tiosulfato, se obtiene una población de prismas de mayor tamaño.

Considerando todos los resultados obtenidos, se fijaron los siguientes parámetros para la síntesis de los NPrO:

- Solución HAuCl_4 2 mM y $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.625 mM
- Relación de volúmenes de 1.0:1.2:0.2
- Tiempo de 9 minutos entre primera y segunda adición

La Fig. 3.6 muestra el espectro de absorbancia, imágenes TEM y tomografía de los NPrO obtenidos mediante las consideraciones mencionadas anteriormente para su síntesis. Además, en la Tabla 3.1 se resumen los valores obtenidos para los plasmones superficiales, razón NIR/Vis, diámetro hidrodinámico, y potencial zeta para NPrO y sus posteriores funcionalizaciones. En el espectro se observa la presencia de dos bandas plasmónicas a 838 nm y 530 nm, cuya razón NIR/Vis es de 1.3 (Fig. 3.6A), mientras que el diámetro hidrodinámico y carga superficial tienen un valor de 48 ± 1 nm y -55 ± 3 mV, respectivamente (Tabla 3.1).

La imagen TEM de los NPrO (Fig. 3.6B) muestra la obtención de los nanoprismas de oro junto a la presencia de esferas, las cuales fueron eliminadas posteriormente a través de un proceso de purificación desarrollado en esta tesis (sección 3.6). El análisis de la distribución de tamaños tanto de prismas como de esferas (histogramas Fig. 3.6B) muestra que los promedios de tamaño corresponden a 50

± 24 y 24 ± 6 nm, respectivamente (Fig. 3.6D). Finalmente, mediante tomografía se pudo obtener imágenes donde los NPrO aparecen verticales, pudiéndose determinar el grosor de las nanopartículas con un valor de 11 ± 1 nm (Fig. 3.6C).

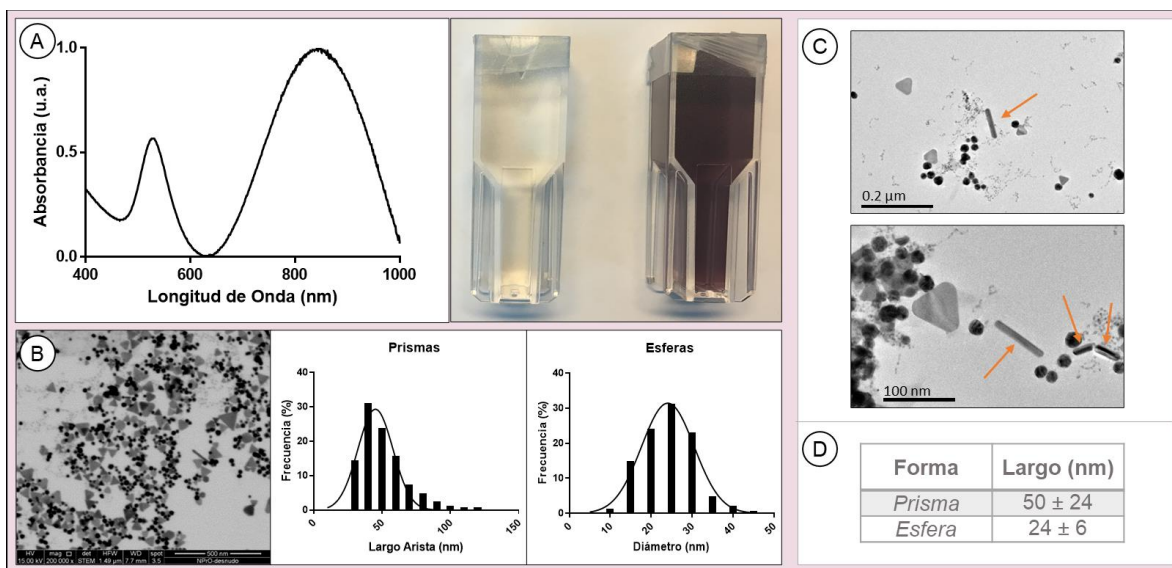


Fig. 3.6. Síntesis NPrO. A) Izquierda: Espectro de absorción de NPrO, con dos plasmones característicos en 838 y 530 nm (NIR/Vis = 1.3). Derecha: Solución de oro inicial (izq.) y NPrO (der.). B) Imagen TEM de NPrO, con escala de 500 nm, y los correspondientes histogramas de distribución de tamaño de prismas y esferas producidas en la síntesis. C) Imágenes de tomografía obtenidas mediante TEM donde se observa el ancho de los prismas (indicado por flechas), cuyo valor es de 11 ± 1 nm. D) Tabla con los valores del largo (prismas) y diámetro (esferas) de las nanopartículas obtenidas en la síntesis.

Tabla 3.1. Resumen cambios fisicoquímicos NPrO. Cambios en el diámetro hidrodinámico y en los valores de potencial zeta durante las distintas etapas de conjugación, desde la síntesis de NPrO a la obtención de NPrO-D1.

| Muestra | Diámetro hidrodinámico (nm) | Potencial zeta (mV) |
|------------|-----------------------------|---------------------|
| NPrO | 48 ± 1 | -55 ± 3 |
| NPrO-PEG | 67 ± 7 | -36 ± 2 |
| P7 | 81 ± 8 | -34 ± 4 |
| NPrO-PEGx2 | 92 ± 5 | -41 ± 1 |
| NPrO-D1 | 108 ± 11 | -25 ± 2 |

3.5 Primera funcionalización con HS-PEG

Una vez sintetizados los NPrO, se procedió a funcionalizarlos con PEG, el cual por un extremo posee un grupo tiol que permite la quimisorción en la superficie de oro (enlace Au-S), mientras que el grupo carboxílico permite su posterior modificación para incorporar el péptido D1. Para lo anterior, a una solución de NPrO pH = 7 y 1 de absorbancia (en NIR) se agregó 0.1 mg de PEG, y se dejó bajo agitación durante 3 horas. Una vez transcurrido este tiempo, la muestra fue centrifugada a 5,900 g para eliminar el exceso de PEG. La muestra NPrO-PEG fue resuspendida en agua Milli-Q y se midió su espectro de absorbancia (Fig. 3.7A). Se observa un leve desplazamiento de la banda plasmónica en NIR desde los 838 a los 846 nm entre NPrO y NPrO-PEG, lo cual es un fenómeno común al funcionalizar nanopartículas de oro, ya que al modificar las superficies de estas ocurre un cambio en el índice de refracción que provoca un desplazamiento de la banda plasmónica a mayores longitudes de onda. En ambas muestras el valor de NIR/Vis se mantiene en 1.3, mientras que un aumento en 16 nm en el diámetro hidrodinámico y de 8 mV en el potencia zeta es observado en NPrO-PEG en relación con NPrO (Tabla 3.1). En su conjunto, estos cambios en los parámetros fisicoquímicos analizados dan cuenta de la funcionalización de la superficie de NPrO con moléculas de PEG.

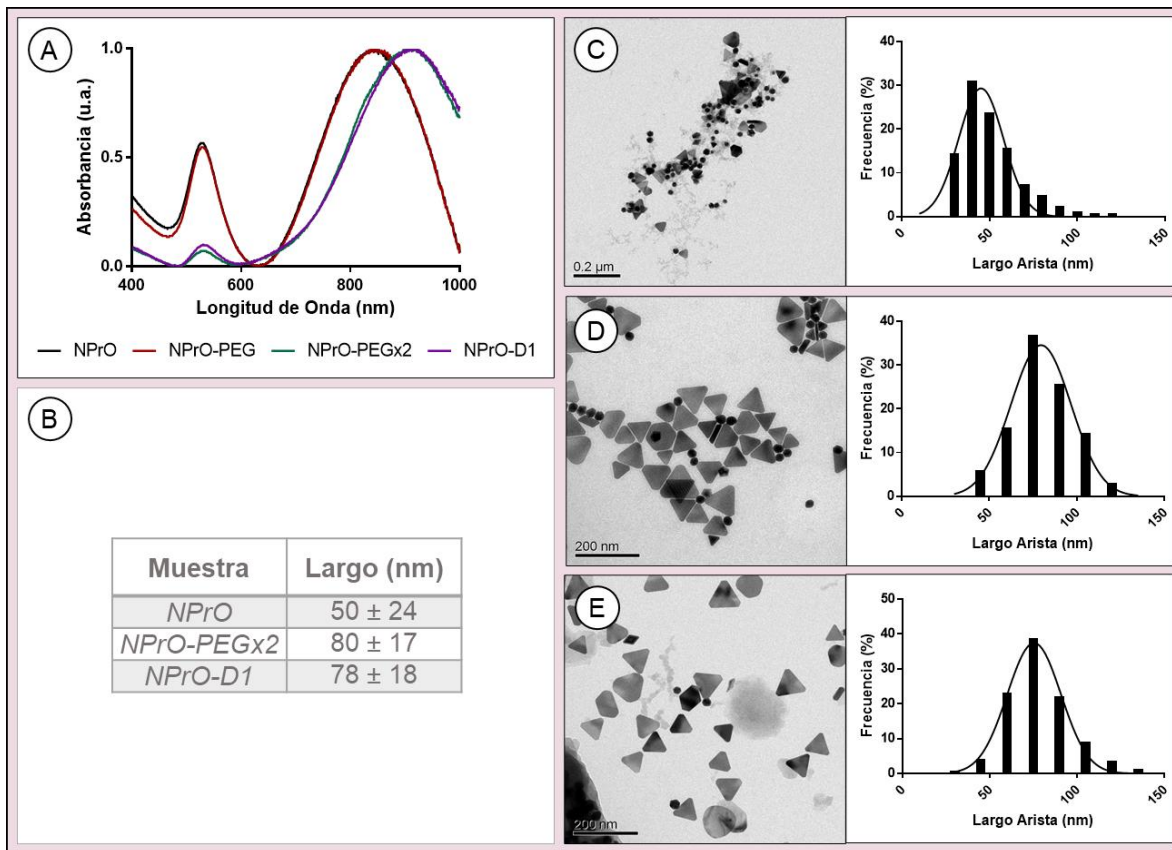


Fig. 3.7. Caracterización NPrO a NPrO-D1. A) Espectros de absorbancia normalizados de NPrO, NPrO-PEG, NPrO-PEGx2, y NPrO-D1 en el que se observa el desplazamiento del plasmón en NIR y el cambio en la razón NIR/Vis. B) Tabla con los valores de largo de arista promedio obtenidos mediante TEM de los NPrO en distintas etapas de funcionalización. Imágenes TEM de NPrO (C), NPrO-PEGx2 (D), y NPrO-D1 (E), con sus respectivos histogramas correspondientes al largo de arista de los nanoprismas.

3.6 Purificación NPrO-PEG

Una vez obtenida la muestra NPrO-PEG, o “P1” (pella 1), esta se sometió a un proceso de purificación mediante centrifugaciones con el fin de eliminar el exceso de esferas en relación con el número de prismas. La purificación consta de 6 centrifugaciones desde que se obtiene P1, siempre eliminando el sobrenadante y conservando la pella, hasta llegar a la muestra final denominada P7. Es importante mencionar que para llevar a cabo este proceso los NPrO deben estar

funcionalizados previamente con PEG ya que, al centrifugar sistemáticamente nanopartículas desnudas, estas se comienzan a agregar a partir de la segunda centrifugación. Además, la cantidad de PEG añadido en la primera funcionalización es un paso crítico para realizar el proceso de purificación debido a que, si se agrega una mayor cantidad de PEG, se obtienen razones NIR/Vis menores en P7. La posible explicación de este fenómeno es que al agregar mayor PEG se produce una mayor funcionalización de prismas y de esferas, lo que ocasionaría una mayor interacción entre las cadenas de PEG de ambas nanopartículas, no pudiendo separarse a través de la centrifugación.

El seguimiento del proceso de purificación se llevó a cabo mediante espectrofotometría Vis-NIR con el fin de determinar el desplazamiento de las bandas plasmónicas, así como también los cambios en los valores de NIR/Vis. En la Fig. 3.8 y Tabla 3.2 se puede observar la caracterización fisicoquímica del proceso de purificación.

La caracterización mediante espectrofotometría da cuenta de un aumento en el valor de la razón NIR/Vis en cada paso de la purificación desde P1 a P7, partiendo con un valor de 1.3 para llegar a un valor final de 2.9 (Fig. 3.8H y Tabla 3.2). Además, se puede observar un desplazamiento de la banda plasmónica en NIR a mayores longitudes de onda, partiendo en 846 nm y terminando en 910 nm. El desplazamiento de las bandas plasmónicas obedece a que el proceso de purificación va eliminando sistemáticamente las nanopartículas más pequeñas, las cuales incluyen principalmente nanoesferas, pero también nanoprismas más

pequeños, por lo que en P7 se encuentra una muestra con mayor proporción de NPrO y de mayor tamaño.

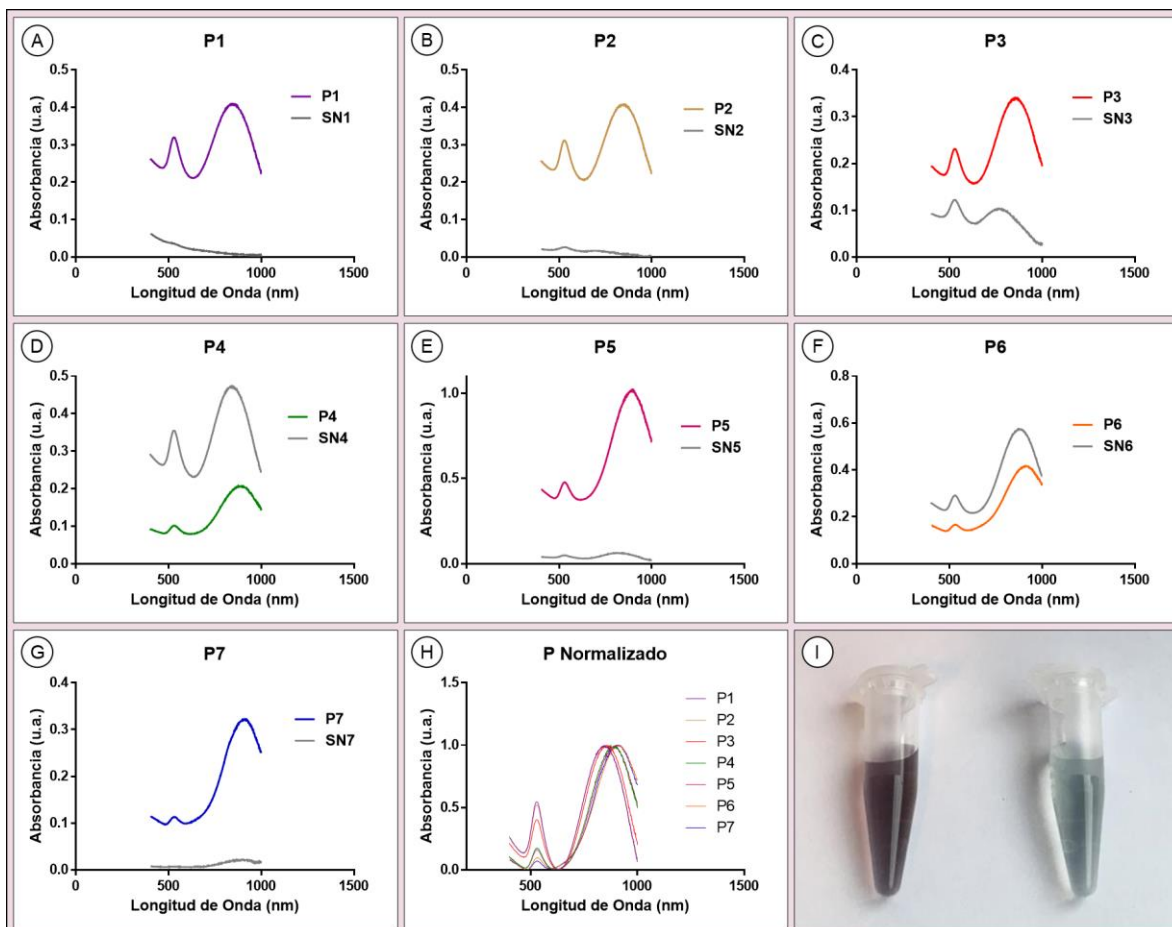


Fig. 3.8. Espectros Vis-NIR del proceso de purificación de NPrO-PEG. Se puede observar los espectros de la pella y sobrenadante desde la obtención de P1 hasta P7 (A-G). H) gráfico muestra todos los espectros de las pellas obtenidas normalizadas a 1 de absorbancia. I) Fotografía representativa de una solución P1 (izq.) y P7 (der.) con un mismo valor de absorbancia en NIR.

Lo anterior se confirma a través del aumento en 20 nm en el diámetro hidrodinámico desde P1 a P7 (Tabla 3.1). Además, la disminución del valor absoluto del potencial zeta a partir de NPrO hasta la obtención de NPrO-PEG P7 (-55 a -34 mV) da cuenta de que la eliminación del exceso de tiosulfato como estabilizante al funcionalizar

con PEG, así como también la remoción de gran cantidad de esferas en el proceso de purificación, vuelven menos negativo el valor de potencial zeta.

Tabla 3.2. Caracterización mediante espectrofotometría Vis-NIR. Resumen de los máximos de absorbancia en NIR y Vis desde la síntesis, durante el proceso de purificación, hasta la incorporación del péptido D1. Además, se incluye la razón NIR/Vis para cada etapa.

| Muestra | NIR (nm) | Vis (nm) | NIR/Vis |
|-------------------|----------|----------|---------|
| <i>NPrO</i> | 838 | 530 | 1.3 |
| <i>NPrO-PEG</i> | 846 | 530 | 1.3 |
| <i>P1</i> | 846 | 530 | 1.3 |
| <i>P2</i> | 847 | 530 | 1.3 |
| <i>P3</i> | 859 | 531 | 1.4 |
| <i>P4</i> | 888 | 531 | 2.0 |
| <i>P5</i> | 893 | 531 | 2.1 |
| <i>P6</i> | 905 | 531 | 2.4 |
| <i>P7</i> | 910 | 531 | 2.9 |
| <i>NPrO-PEGx2</i> | 915 | 531 | 2.9 |
| <i>NPrO-D1</i> | 920 | 531 | 2.7 |

Finalmente, con el fin de comprobar el éxito en el proceso de purificación, se tomaron imágenes TEM (Fig. 3.7C y D). El análisis de las imágenes da cuenta de un desplazamiento del histograma y promedio de tamaño a mayores longitudes a medida que las muestras son purificadas. Además, el cálculo de la proporción entre los prismas y esferas presentes en cada muestra corrobora la disminución de esferas (Tabla 3.3), lo que se condice con los cambios en los valores de NIR/Vis analizados anteriormente. Mientras los *NPrO* presentan una razón NIR/Vis de 1.3 y una proporción de *NPrO*/NEO de 0.5, a medida que estos son purificados (NIR/Vis: 2.9) las proporciones de *NPrO*/NEO aumentan a 3.8. Esta relación que se establece resulta interesante, ya que confirma que la razón entre las absorbancias del

plasmón en NIR y Vis son una forma de determinar el grado de purificación de la muestra.

Tabla 3.3. Proporción del número de prismas y esferas. Relación entre el valor de la razón NIR/Vis, obtenida mediante espectrofotometría, con el valor de la razón entre el número de prismas y esferas (Prismas/Esferas), determinado mediante TEM, para NPrO en distintas etapas de funcionalización.

| Muestra | NIR/Vis | Prismas/Esferas |
|-------------------|---------|-----------------|
| <i>NPrO</i> | 1.3 | 0.5 |
| <i>NPrO-PEGx2</i> | 2.9 | 3.8 |
| <i>NPrO-D1</i> | 2.7 | 2.3 |

Además, desde el punto visual, se puede observar un cambio en el color de la solución de NPrO a P7, desde un intenso color púrpura, principalmente debido a la presencia de esferas, a una coloración gris-verdosa (Fig. 3.8I). Finalmente, es importante mencionar que el rendimiento en el proceso de purificación es alrededor del 5%; A partir de 20 mL de NPrO-PEG P1, 1 de absorbancia, se obtiene 1 mL de NPrO-PEG P7, 1 de absorbancia.

3.7 Segunda funcionalización con PEG y adición del péptido D1

La muestra purificada P7 fue sometida a un nuevo proceso de funcionalización con PEG con el fin de aumentar la cantidad de moléculas sobre la superficie de los NPrO, con el fin de mejorar la estabilidad coloidal del sistema y, además, tener una mayor disponibilidad de grupos carboxílicos sobre la superficie para su posterior modificación con el péptido D1. Para ello se agregaron 0.2 mg de PEG a 5 mL de

una solución P7 (1 de absorbancia, pH = 12) y se dejó bajo agitación toda la noche. Al otro día, la solución se centrifugó y se resuspendió en agua para obtener NPrO-PEGx2. En el espectro de absorbancia de la muestra se observa un desplazamiento de la banda plasmónica en NIR de 910 nm a 915 nm, manteniéndose el valor de la razón NIR/Vis en 2.9 (Fig. 3.7A y Tabla 3.2). Se observa un aumento en el diámetro hidrodinámico (81 a 92 nm), mientras que en el caso del potencial zeta se evidencia un aumento considerable en el valor absoluto, llegando a un valor de -41 mV (Tabla 3.1). La adición de moléculas de PEG que poseen un grupo carboxílico en uno de sus extremos aumenta la densidad de cargas negativas en la superficie de la nanopartícula, lo que lleva a que se vuelva más negativa.

Posteriormente, mediante la reacción EDC/NHS, se activaron los grupos carboxílicos de la muestra NPrO-PEGx2 para formar un enlace amida con el grupo amino del péptido D1. Para lograr esto, la muestra se concentró previamente mediante centrifugación y se activó en agua Milli-Q durante 15 minutos. Los NPrO-PEGx2 activados se centrifugaron para eliminar el exceso de EDC/NHS y se resuspendieron en una solución con el péptido D1 en PBS. La muestra se incubó durante toda la noche para obtener NPrO-D1. La caracterización muestra un aumento en el diámetro hidrodinámico a 108 nm, mientras la carga superficial se vuelve más positiva, llegando a un valor de -25 mV (Tabla 3.1). La formación de un enlace amida, que bloquea la carga negativa aportada por el -COOH del PEG, así como también la incorporación de grupos aminos que se encuentran en el péptido llevan a una disminución en el valor absoluto del potencial zeta. La caracterización mediante espectrofotometría Vis-NIR da cuenta de un desplazamiento de la banda

plasmónica en NIR (920 nm) y una leve disminución en la razón NIR/Vis de 2.9 a 2.7 (Fig. 3.7A y Tabla 3.2). Lo último se puede explicar debido a que al momento de realizar las centrifugaciones para eliminar el exceso de D1, parte de la muestra se queda adherida a las paredes del tubo al ser resuspendida la pella. Es más, a pesar de usar tubos especiales que disminuyen la interacción de péptidos y proteínas con la superficie del tubo (*Eppendorf*® *Protein LoBind Tubes*) y someter a reiteradas sonicaciones la muestra, siempre existe una parte de ella que se pierde.

Además, mediante TEM se obtuvo la distribución y promedio de tamaño de NPrO-D1 (Fig. 3.7B y E). Los resultados muestran que el tamaño promedio de las NPrO-D1 se mantiene prácticamente inalterado (78 nm). Además, se observa que el valor de la proporción entre prismas y esferas disminuye a 2.3 (Tabla 3.3), lo cual se condice con la disminución en la razón NIR/Vis a 2.7 mencionada anteriormente. Finalmente, a través de tinción con ácido fosfotúngstico 1% se trató de observar la presencia del halo de materia orgánica (PEG y D1) sobre la superficie del nanosistema (Fig. 3.9). A pesar de que se ve un leve borde alrededor de los NPrO-D1 a través de la tinción con ácido fosfotúngstico 1%, las imágenes no son concluyentes para confirmar la presencia de un halo de materia orgánica alrededor de las nanopartículas debido a que en el *background* de cada imagen se observan patrones azarosos productos de la tinción (Fig. 3.9B y C).

Con el fin de corroborar la correcta funcionalización NPrO-D1, se realizó un análisis de aminoácidos para determinar el número de moléculas de péptido D1 por nanopartícula (Sección 5.2, Capítulo 5).

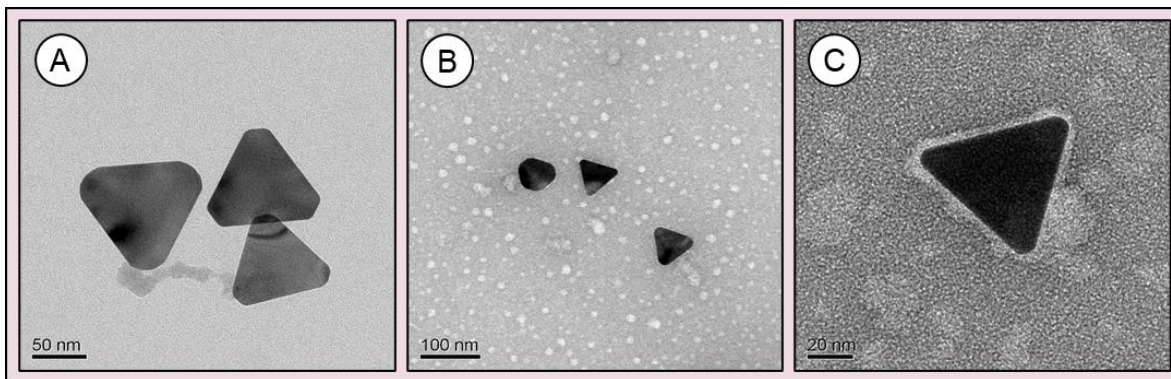


Fig. 3.9. Imágenes TEM de NPrO-D1. Se prepararon muestras de NPrO-D1 sin (A) y con tinción (B y C) de ácido fosfotúngstico al 1%, para determinar la presencia de halo de materia orgánica sobre la superficie del prisma.

3.8 Recubrimiento con polímeros

Una vez obtenido y caracterizado el nanosistema NPrO-D1, se procedió a recubrirlo con polímeros a través del método *layer-by-layer*. Para ello se utilizó como policación la PEI, y como polianión el PSS. Debido a que el valor de potencial zeta de NPrO-D1 fue de -25 mV (Tabla 3.1), se recubrió primero con PEI. Una solución de NPrO-D1 se agregó gota a gota sobre una solución de PEI y se dejó bajo agitación suave durante 1 hora. Posteriormente se centrifugó para eliminar el exceso de polímero y se resuspendió en agua Milli-Q. Posteriormente, la solución NPrO-D1-PEI se añadió gota a gota a una solución de PSS, y se siguió el mismo protocolo utilizado con PEI.

En la Tabla 3.4 se puede observar la caracterización de las muestras NPrO-D1-PEI y NPrO-D1-PSS. Los espectros Vis-NIR muestran un desplazamiento de la banda plasmónica de NPrO-D1 (920 nm) hacia mayores longitudes de onda al incorporar los polímeros PEI (946 nm) y PSS (964 nm), y un leve desplazamiento de la banda plasmónica en Vis a 532 nm.

Tabla 3.4. Caracterización NPrO-D1 recubiertos con los polímeros PEI y PSS. Determinación de las bandas plasmónicas, diámetros hidrodinámicos, y potenciales zeta al adicionar polímeros. NPrO-D1-PSS 1, 2, y 3 hace referencia al número de centrifugaciones posteriores a la incorporación del polímero PSS sobre NPrO-D1-PEI.

| Muestra | Banda Plasmónica | | | Diámetro hidrodinámico (nm) | Potencial zeta (mV) |
|----------------------|------------------|-----|---------|-----------------------------|---------------------|
| | NIR | Vis | NIR/Vis | | |
| <i>NPrO-D1-PEI</i> | 946 | 532 | 2.1 | 125 ± 13 | 17 ± 1 |
| <i>NPrO-D1-PSS 1</i> | 964 | 532 | 1.9 | 105 ± 3 | -43 ± 3 |
| <i>NPrO-D1-PSS 2</i> | 965 | 532 | 1.9 | 105 ± 2 | -37 ± 2 |
| <i>NPrO-D1-PSS 3</i> | 920 | 532 | 1.7 | 101 ± 2 | -31 ± 3 |

En relación con el diámetro hidrodinámico, este aumenta al incorporarse PEI, llegando a un valor de 125 nm. Sin embargo, cuando se incorpora el segundo polímero, se observa una disminución de 20 nm en este parámetro. Una posible explicación para esto es que, ya que el nanosistema se encuentra previamente funcionalizado con moléculas de cadena flexible como PEG y D1, los posibles cambios espaciales que adopten al incorporar los polímeros pueden provocar una disminución en el diámetro hidrodinámico, siendo esta la conformación más estable para el nanosistema bajo las condiciones estudiadas. Respecto a la carga superficial, la incorporación de PEI y PSS provocan grandes cambios en el potencial zeta, observándose un cambio de -25 a 17 mV al incorporar la PEI (policación), y una vuelta a un valor negativo de -37 mV, al recubrir con el polianión PSS.

Por otro lado, en la región UV del espectro se observa la aparición de una banda a 260 y 225 nm, las cuales son atribuibles a presencia de PEI y PSS, respectivamente (Fig. 3.10B). Sin embargo, una fuerte disminución en la razón NIR/Vis fue evidenciada al agregar los polímeros, específicamente la PEI. Lo anterior se explica debido a que posterior al proceso de centrifugación para remover el exceso de PEI,

gran cantidad de los NPrO-D1-PEI se pierden al adherirse a las paredes del tubo de centrifugación, obteniendo soluciones con una menor razón NIR/Vis al resuspender el nanosistema.

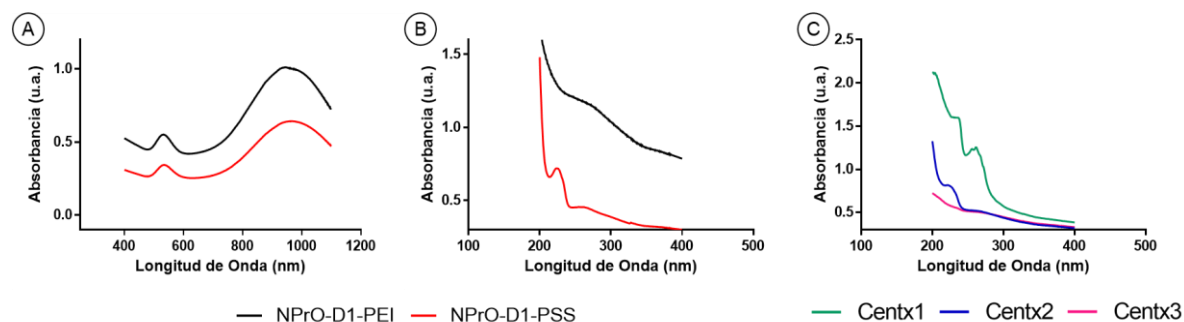


Fig. 3.10. Espectros de absorción de NPrO-D1-PEI y NPrO-D1-PSS. A) Espectros de NPrO-D1 al ser recubiertos con solo PEI y PEI/PSS. B) Espectros en la región UV (200-400 nm) donde se observa la presencia de un máximo de absorbancia a 260 nm (PEI) y otro a 225 nm (PSS). C) Evaluación de la presencia de los máximos de absorbancia de los polímeros luego de centrifugar 1, 2, o 3 veces la muestra NPrO-D1-PSS (Centx1, Centx2, y Centx3, respectivamente).

Posteriormente se determinó hasta qué punto el nanosistema mantenía el recubrimiento con PSS al realizar centrifugaciones consecutivas en el sistema NPrO-D1-PSS (Fig. 3.10C y Tabla 3.4). Los resultados muestran que a partir de la tercera centrifugación los parámetros evaluados se vuelven similares a los registrados para el sistema NPrO-D1. Un plasmón a 920 nm (NPrO-D1: 920 nm), diámetro hidrodinámico de 101 nm (NPrO-D1: 108 nm) y potencial zeta de -31 mV (NPrO-D1: -25 mV), sumado a una gran disminución de la banda perteneciente a PSS en la región UV. Debido a lo anterior, una vez obtenido el sistema NPrO-D1-PSS este no fue centrifugado más de dos veces previo a su utilización con el fin de asegurar la presencia del polímero.

Finalmente, las muestras NPrO-D1-PEI y NPrO-D1-PSS fueron caracterizadas mediante microscopía electrónica TEM y teñidas con ácido fosfotúngstico al 1% para visualizar la materia orgánica presente sobre la superficie de los nanoprismas (Fig. 3.11).

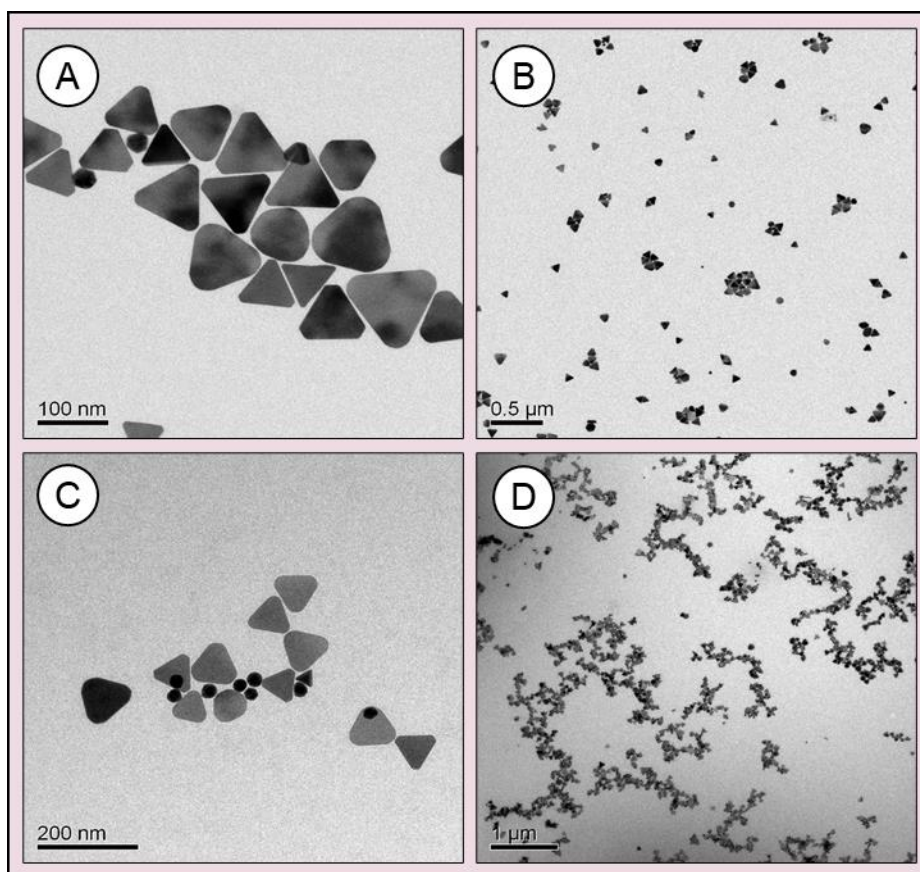


Fig. 3.11. Imágenes TEM de NPrO-D1-PEI y NPrO-D1-PSS. Las muestras fueron teñidas previamente con ácido fosfotúngstico al 1%. Las imágenes A y B corresponden a NPrO-D1-PEI, mientras que las imágenes C y D a NPrO-D1-PSS.

Sin embargo, al igual que en el caso de NPrO-D1, ni en las imágenes con solo PEI (Fig. 3.11A y B) o con ambos polímeros (Fig. 3.11C y D), se puede observar la presencia de un halo de materia orgánica. Lo anterior se podría explicar debido a

que la disposición de los polímeros sobre la superficie de oro sería solo sobre las caras triangulares, y no sobre los bordes rectangulares del prisma. Debido a que a través de la imagen TEM solo se pueden observar los prismas sobre sus caras triangulares, el halo no sería observado. Además, al comparar las imágenes obtenidas para NPrO-D1-PEI y NPrO-D1-PSS, se observa que en el segundo caso existe una mayor presencia de esferas en relación con el número de prismas, lo cual concuerda con la disminución en la razón NIR/Vis de 2.1 (PEI) a 1.9 (PSS) entre un recubrimiento y otro.

Conclusiones

- Se logró desarrollar un protocolo de síntesis de NPrO reproducible y estable que permitió la obtención de nanopartículas con las características fisicoquímicas deseadas.
- El protocolo de purificación permitió la eliminación de las nanoesferas producidas durante la síntesis, enriqueciendo la cantidad de NPrO en las muestras.
- Se consiguió la correcta funcionalización de PEG y péptido D1, lo que fue corroborado a través de los cambios fisicoquímicos observados.
- Se desarrolló un protocolo para el recubrimiento del nanosistema NPrO-D1 con el polication PEI y el polianión PSS a través de la metodología LbL.

Referencias

1. Pelaz, B., et al., *Tailoring the synthesis and heating ability of gold nanoprisms for bioapplications*. Langmuir, 2012. **28**(24): p. 8965-70.

Capítulo 4: Obtención de Nanoesferas de oro funcionalizadas con PEG, péptido D1, y polímeros

Con el fin de estudiar si existe una dependencia entre la morfología de la nanopartícula y su llegada al cerebro por vía IN, se realizó la síntesis de nanopartículas esféricas cuya superficie fuese similar a la de los nanoprismas obtenidos. La síntesis se realizó mediante el conocido método de Turkevich [1], el cual consiste en la reducción de HAuCl_4 con citrato de sodio.

4.1 Síntesis NEO

Para controlar el diámetro de las nanopartículas, se llevó a ebullición una solución de HAuCl_4 , para luego agregar una alícuota de citrato de sodio. Dependiendo del volumen de solución citrato añadido, y del tiempo de reacción, se obtuvieron distintos tamaños de nanopartículas (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Condiciones de síntesis NEO. Resumen de los volúmenes y tiempos de reacción utilizado para las síntesis de las muestras A, B, C, D y E.

| Muestra | HAuCl_4 0.01% p/v (mL) | Citrato de sodio 1% p/v (mL) | Tiempo de reacción (min) |
|---------|---------------------------------|------------------------------|--------------------------|
| A | 10 | 0.06 | 15 |
| B | 10 | 0.1 | 15 |
| C | 10 | 0.2 | 15 |
| D | 10 | 0.3 | 15 |
| E | 10 | 0.5 | 30 |

En la Fig. 4.1 se pueden observar los espectros de absorción obtenidos para las distintas síntesis y una imagen de referencia de las muestras analizadas, mientras que en la Fig. 4.2 se pueden ver imágenes TEM de las mismas muestras.

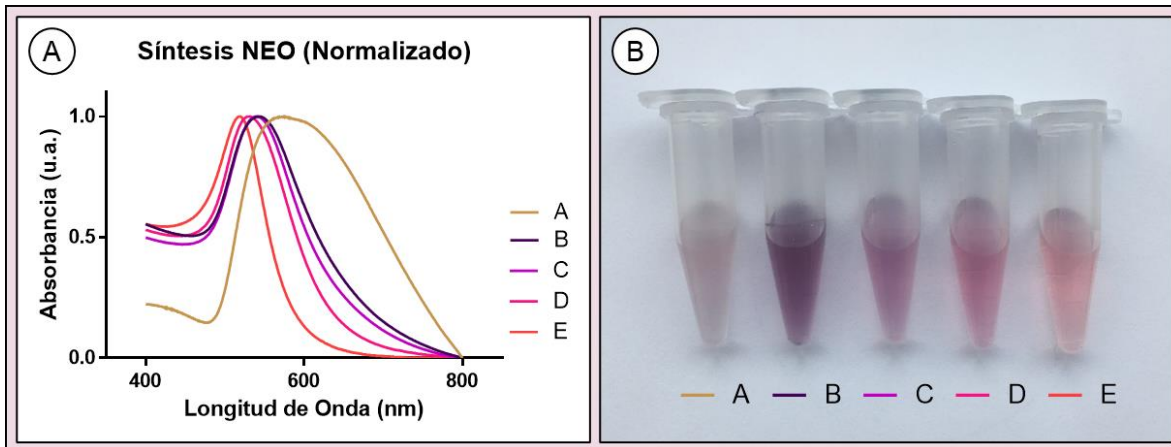


Fig. 4.1. Espectros de absorción de NEO obtenidas por el método de Turkevich. A) Espectros normalizados de las muestras obtenidas variando el volumen de citrato añadido (1% p/v). B) Imagen representativa de las muestras A, B, C, D, y E obtenidas y medidas por espectrofotometría.

Se puede observar que las muestras obtenidas presentaron distintos valores de bandas plasmónicas, siendo 570, 532, 528, 524, y 519 nm para las síntesis A, B, C, D, y E, respectivamente (Fig. 4.1A). Los resultados dan cuenta de que a medida que se utilizan mayores volúmenes de citrato de sodio, se obtienen NEO con una banda plasmónica a menores longitudes de onda. Por otro lado, mediante el análisis de imágenes TEM obtenidas para cada síntesis, se pudo determinar la distribución y promedio de tamaño para cada una de ellas (Fig. 4.2). Los valores obtenidos para las síntesis A, B, C, D, y E corresponden a 116, 48, 35, 29, y 16 nm de diámetro, respectivamente. Al tomar los valores de las bandas plasmónicas y los tamaños obtenidos para cada síntesis, se observa que existe una relación que a medida que el valor del plasmón se encuentra a mayores longitudes de onda, mayor es el diámetro de las nanopartículas obtenidas.

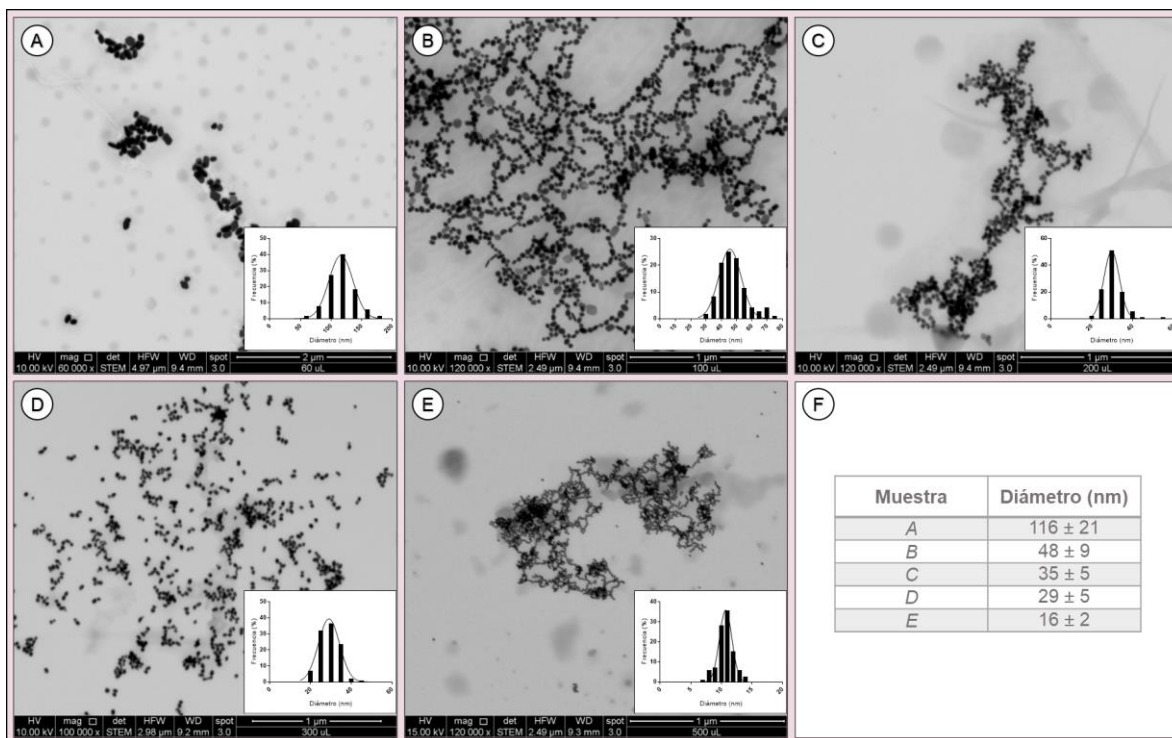


Fig. 4.2. Imágenes TEM de NEO sintetizadas. Imágenes de las síntesis A, B, C, D, y E utilizando 0.06, 0.1, 0.2, 0.3, y 0.5 mL de citrato de sodio 1% p/v, respectivamente (A-E). En la esquina inferior derecha de cada imagen se encuentra el histograma de distribución de tamaño para cada síntesis. F) Tabla con los promedios de diámetro para cada una de las síntesis obtenidas.

Debido a que se busca comparar la llegada al cerebro de nanopartículas de diferente morfología, pero de superficies similares, se calculó la superficie de los NPrO y se comparó con la superficie de cada NEO obtenida (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Superficie nanopartículas. Cálculo del área de nanopartículas (nm²) basándose en sus morfologías (prismas y esferas) y dimensiones obtenidas mediante TEM.

| Muestra | Superficie (nm ²) |
|---------|-------------------------------|
| NPrO | 8000 |
| NEO A | 42250 |
| NEO B | 7235 |
| NEO C | 3845 |
| NEO D | 2640 |
| NEO E | 800 |

Entre las distintas síntesis obtenidas, se decidió continuar trabajando con la síntesis B (banda plasmónica 532 nm, diámetro 48 nm), ya que su valor de superficie de 7235 nm² es el más cercano al calculado para los NPrO (8000 nm²).

Las caracterizaciones fisicoquímicas de la síntesis B de NEO, así como las obtenidas en las posteriores etapas de funcionalización, se encuentran resumidas en la Tabla 4.3. Los resultados muestran que las NEO estabilizadas en citrato poseen un diámetro hidrodinámico de 65 nm y un potencial zeta de -21 mV.

Tabla 4.3. Caracterización fisicoquímica de NEO, NEO-PEG, y NEO-D1. Los valores de las bandas plasmónicas, diámetros hidrodinámicos, y potenciales zeta fueron evaluados para cada nanosistema.

| Muestra | Banda plasmónica (nm) | Diámetro hidrodinámico (nm) | Potencial zeta (mV) |
|---------|-----------------------|-----------------------------|---------------------|
| NEO | 532 | 65 ± 9 | -21 ± 1 |
| NEO-PEG | 533 | 92 ± 4 | -34 ± 1 |
| NEO-D1 | 534 | 99 ± 5 | -31 ± 2 |

4.2 Funcionalización con HS-PEG-COOH

Al igual que en el caso de los prismas, se recubrió la superficie de las NEO con HS-PEG-COOH. La metodología empleada fue similar. A una solución de NEO (10 mL, 1 de absorbancia) se le agregó una alícuota con 1.5 mg de PEG. La reacción se llevó a cabo durante 1.5 h bajo agitación suave, para luego centrifugar la muestra y resuspender la pella en agua Milli-Q (NEO-PEG). En la Fig. 4.3A se puede apreciar

el desplazamiento de la banda plasmónica al agregar moléculas de PEG sobre la superficie (de 532 a 533 nm).

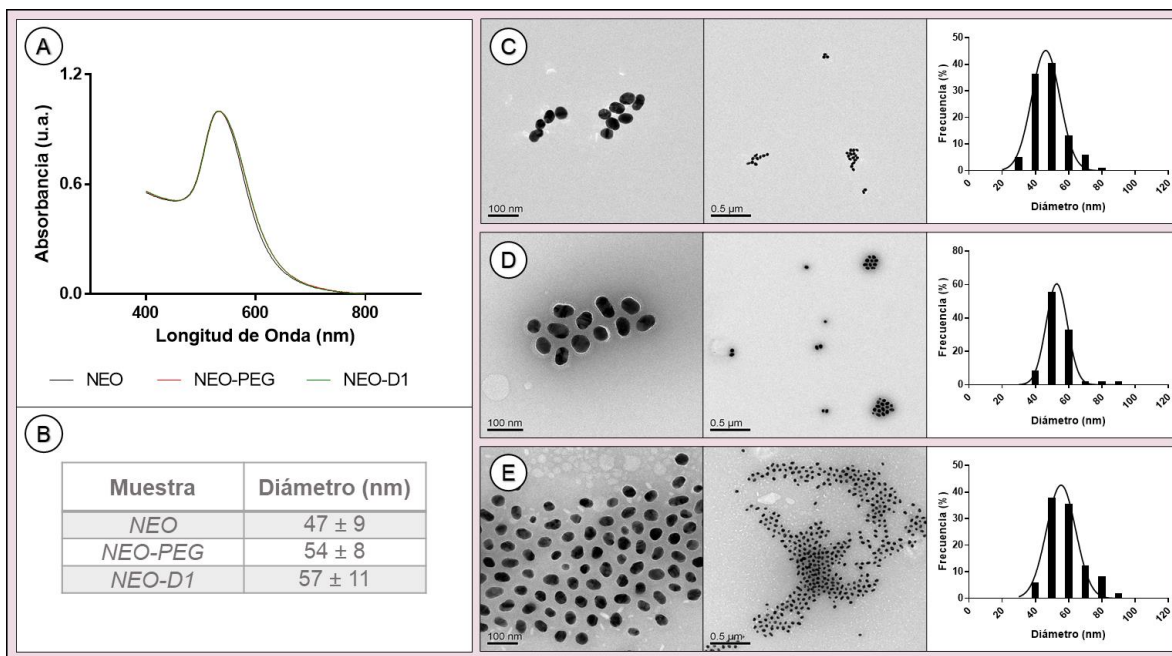


Fig. 4.3. Caracterización los pasos de funcionalización desde NEO a NEO-D1. A) Espectro de absorción normalizado de NEO, NEO-PEG, y NEO-D1. B) Tabla con los diámetros promedio de NEO a NEO-D1 obtenidos mediante TEM, considerando el halo de materia orgánica (PEG y D1). C), D), y E) muestran las imágenes TEM para NEO, NEO-PEG, y NEO-D1, respectivamente. Todas las muestras fueron teñidas con ácido fosfotúngstico al 1%. Además, cada imagen cuenta con un histograma con la distribución de tamaño para cada etapa de funcionalización.

En relación con el diámetro hidrodinámico, se observa un aumento de 27 nm al incorporar el PEG sobre la superficie de las NEO (92 nm), mientras que las mediciones de potencial zeta muestran un aumento en el valor absoluto de la carga superficial, alcanzando un valor de -34 mV (Tabla 4.3). Debido a que en un comienzo la superficie de las NEO se encuentra estabilizada con moléculas de citrato, las cuales poseen 3 cargas puntuales negativas, se esperaría que el potencial zeta se volviese menos negativo al incorporar moléculas de PEG, ya que

estas poseen 1 carga puntual negativa (grupo COOH). Sin embargo, como la relación entre el número de moléculas de citrato y PEG es desconocido, un aumento en la negatividad del potencial zeta no puede ser descartado.

Además, se tomaron imágenes TEM de la muestra NEO-PEG, las cuales fueron teñidas con ácido fosfotúngstico al 1%, en donde se puede observar la presencia del halo perteneciente a la presencia de materia orgánica sobre la superficie de las esferas (Fig. 4.3D). Por último, se determinó la distribución de tamaño y diámetro promedio para las NEO-PEG considerando el halo. Se obtuvo un valor promedio de 54 nm, es decir, 7 nm más al compararlo con la NEO desnuda (Fig. 4.3B). Se ha descrito que una molécula de PEG con un peso molecular de 5000 Da completamente extendida posee una longitud aproximada entre 30 y 40 nm [2, 3]. La diferencia aproximada de 20 - 30 nm que se observa entre los 30 - 40 nm de la molécula de PEG y el aumento de 7 nm sobre la superficie de las NEO se puede explicar debido a la flexibilidad que posee la molécula y que esta no se encuentre completamente estirada sobre la superficie de la nanopartícula [4].

4.3 Incorporación del péptido D1

Mediante la misma estrategia utilizada para los NPrO-PEGx2, se funcionalizó el nanosistema NEO-PEG con el péptido D1. Las muestras se concentraron mediante centrifugación, se activaron los grupos COOH mediante EDC/NHS, y nuevamente se centrifugaron las muestras. A la pella activada se le agregó 0.3 mg de péptido en PBS, y se incubó durante toda la noche. En la Fig. 4.3 se puede observar la caracterización de NEO-D1 mediante espectrofotometría y TEM. Nuevamente se

observa un desplazamiento del máximo de absorbancia desde los 533 a los 534 nm, así como también la presencia del halo de materia orgánica en TEM. El tamaño promedio, considerando el halo, no se vio mayormente alterado respecto a NEO-PEG luego de incorporar el péptido sobre la superficie. Lo anterior es esperable, ya que el péptido D1 está compuesto por 11 aminoácidos, por lo que posee un largo de cadena aproximado de 3.8 nm. Por otro lado, en el caso del diámetro hidrodinámico, se observó un pequeño aumento de 7 nm entre NEO-PEG y NEO-D1 (Tabla 4.3). Sin embargo, la modificación de las moléculas de PEG con el péptido D1 no produjo grandes cambios en el potencial zeta de NEO-D1 (-34 a -31 mV), en comparación al cambio observado en los nanoprismas (-41 a -25 mV). Al igual que en el caso de NPrO-D1, y con el fin de corroborar la correcta funcionalización de NEO-D1, se realizó un análisis de aminoácidos para este nanosistema (Sección 5.2, Capítulo 5).

4.4 Adición de los polímeros PEI, CAR, y AAC sobre NEO-D1

Al igual que la metodología empleada para NPrO-D1, una vez que se obtuvo y caracterizó el nanosistema NEO-D1, se procedió a recubrirlo con PEI a través del método *layer-by-layer*. Para ello, se dejó caer gota a gota NEO-D1 sobre una solución de polianión PEI bajo agitación suave durante 1 hora. Posteriormente, se centrifugó para eliminar el exceso de polímero y se resuspendió en agua Milli-Q. La solución NEO-D1-PEI se añadió gota a gota a una solución de polianión, siguiendo el mismo protocolo descrito para la incorporación de PEI. En el caso de las NEO se utilizaron dos polianiones: CAR y AAC, obteniéndose los sistemas NEO-D1-CAR y

NEO-D1-AAC. La razón por la cual se eligió trabajar con estos polímeros en lugar del PSS, fue debido a que estos se encuentran aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA) y cumplen con el criterio de ser usado como polianiones. En la Tabla 4.4 y Fig. 4.5 se detallan los datos obtenidos de la caracterización fisicoquímica de las muestras obtenidas.

Tabla 4.4. Caracterización NEO-D1 recubiertos con polímeros. Se determinó la banda plasmónica, diámetro hidrodinámico, y potencial zeta para los nanosistemas recubiertos con PEI, CAR, y AAC.

| Muestra | Banda plasmónica (nm) | Diámetro hidrodinámico (nm) | Potencial zeta (mV) |
|------------|-----------------------|-----------------------------|---------------------|
| NEO-D1-PEI | 535 | 83 ± 2 | 17 ± 1 |
| NEO-D1-CAR | 536 | 97 ± 2 | -36 ± 3 |
| NEO-D1-AAC | 537 | 89 ± 7 | -32 ± 2 |

Al igual que en el caso de NPrO-D1, la superficie de NEO-D1 presenta una carga negativa, por lo que la incorporación de un polianión como PEI permitirá la interacción entre las cargas opuestas de la nanopartícula y el polímero, y por consiguiente, el recubrimiento del nanosistema. Los datos muestran un desplazamiento de las bandas plasmónicas a medida que el sistema NEO-D1 se recubre con los polímeros, desplazándose de 534 a 535 nm al incorporarse la PEI. Al añadir CAR o AAC sobre la superficie de NEO-D1-PEI, el máximo de absorbancia presenta un corrimiento a 536 nm en el caso del primero, mientras que en el caso del segundo se desplazó a 537 nm (Tabla 4.4, Fig. 4.5A). Al igual que en el caso del nanosistema NPrO-D1-PEI, en el rango 200-400 nm del espectro de

absorbancia de NEO-D1-PEI, se puede observar la presencia de una banda a 260 nm correspondiente al polication (Fig. 4.5B).

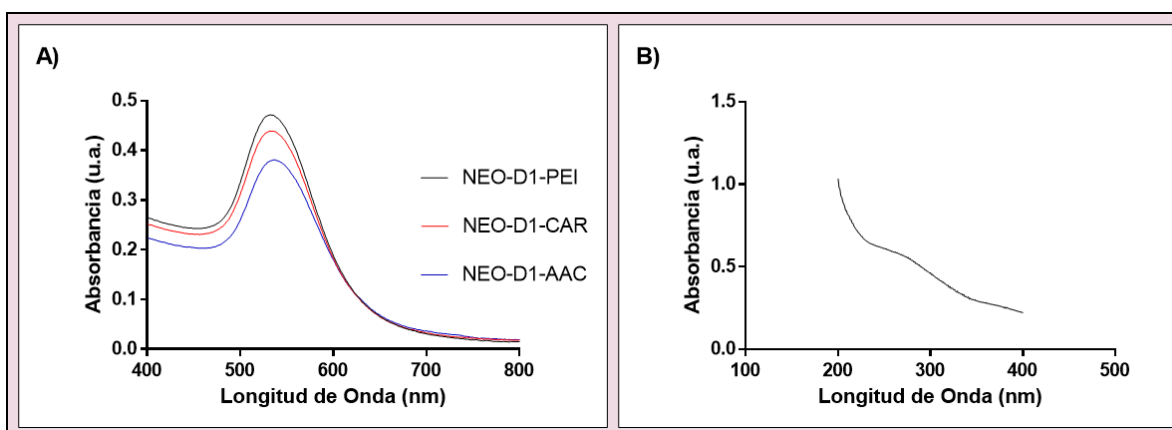


Fig. 4.4. Espectros de absorbancia NEO-D1 recubiertos con PEI, CAR, o AAC. A) Espectros de NEO-D1-PEI, NEO-D1-CAR, y NEO-D1-AAC. B) Espectro en la región UV de la muestra NEO-D1-PEI donde se observa la banda correspondiente a la presencia de PEI.

En relación con los cambios en los valores de potencial zeta, se puede observar que la incorporación del polication PEI sobre NEO-D1, al igual que en el caso de NPrO-D1, produce un cambio desde un valor negativo a uno positivo (-31 a 17 mV), el cual vuelve a valores negativos al incorporar CAR o AAC (-36 y -32 mV, respectivamente). Por otro lado, el diámetro hidrodinámico presenta una disminución al incorporar la PEI en relación con NEO-D1 (121 nm a 83 nm), el cual nuevamente vuelve a incrementar tras la incorporación de CAR (97 nm) y AAC (89 nm). Al igual que la disminución observada para el diámetro hidrodinámico entre NPrO-D1-PEI y NPrO-D1-PSS (121 a 105 nm, Sección 3.8, Capítulo 3), se cree que la flexibilidad de las cadenas de PEG sobre la superficie, sumado a la interacción

con la PEI, genera posiblemente un cambio en el estiramiento en las cadenas de PEG, lo que deriva en una reducción del diámetro hidrodinámico.

Conclusiones

- Se consiguió una síntesis de nanoesferas que permite la obtención de NEO cuyo valor de superficie es similar al obtenido para NPrO.
- Los cambios en los parámetros fisicoquímicos dan cuenta de la correcta funcionalización de las NEO con PEG y el péptido D1.
- Utilizando el mismo protocolo LbL descrito para NPrO, se logró recubrir el nanosistema NEO-D1 con el polication PEI y los polianiones CAR y AAC.

Referencias

1. Turkevich, J., *Colloidal gold. Part I*. Gold Bulletin, 1985. **18**(3): p. 86-91.
2. Oesterhelt, F., M. Rief, and H.E. Gaub, *Single molecule force spectroscopy by AFM indicates helical structure of poly(ethylene-glycol) in water*. New Journal of Physics, 1999. **1**: p. 6.1 - 6.11.
3. Sedlak, S.M., et al., *Monodisperse measurement of the biotin-streptavidin interaction strength in a well-defined pulling geometry*. PLoS One, 2017. **12**(12): p. e0188722.
4. Steinmetz, N.F. and M. Manchester, *PEGylated viral nanoparticles for biomedicine: the impact of PEG chain length on VNP cell interactions in vitro and ex vivo*. Biomacromolecules, 2009. **10**(4): p. 784-92.

Capítulo 5: Caracterización, Estabilidad Coloidal, y Viabilidad Celular

5.1 Caracterización de las nanopartículas

5.1.1 Determinación de la concentración

Con el fin de tener certeza de las concentraciones de nanopartículas utilizadas para los experimentos *in vitro* e *in vivo*, se determinó el coeficiente de extinción molar de los nanosistemas basados en NPrO y NEO asociando el máximo de absorbancia de la muestra con la concentración de ésta. En el caso de los NPrO se utilizaron las técnicas de absorción atómica y NTA, mientras que, para el caso de las NEO, solo se utilizó la última.

i) Absorción atómica

Muestras NPrO-PEG P4, de volumen y absorbancia conocida, fueron digeridas con HNO₃ 1N y HCl 1N, secadas, y llevadas a un volumen final de 10 mL en agua Milli-Q. Una vez obtenida la concentración de oro (C_{Au}), se calculó la concentración de los NPrO (C_{NPrO}) a través de la siguiente fórmula:

$$C_{NPrO} = \frac{C_{Au}}{\rho_{Au} \times V_{NPrO}} \times \%NPrO$$

El volumen de los NPrO (V_{NPrO}) se calculó utilizando los valores de largo y ancho (69 y 11 nm, respectivamente) descritos anteriormente en la Sección 3.4 del Capítulo 3. Debido a que en la fórmula empleada se utiliza el volumen de la nanopartícula, se consideró que todo el oro cuantificado correspondería a NPrO.

Mediante el uso de imágenes TEM, y conteo de nanopartículas, se determinó la proporción en número de prismas y esferas para las muestras analizadas, así como también la relación entre el volumen de un prisma y una esfera a través de las dimensiones obtenidas mediante TEM y tomografías. De esta manera, se pudo calcular el porcentaje de prismas (%NPrO) en las muestras, en relación con su volumen y el de las esferas. En la Tabla 5.1 se resumen las características de las muestras analizadas, la concentración de oro encontrada, y sus coeficientes de extinción molar aplicando el ajuste en la fórmula explicado anteriormente. A través de los datos obtenidos, se determinó que $7.7 \pm 0.8 \text{ nM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ es el valor promedio para el coeficiente de extinción para los NPrO.

Tabla 5.1. Cálculo del coeficiente de extinción (ϵ) de NPrO-PEG P4. Mediante los datos de C_{Au} obtenidos por absorción atómica, y el ajuste a través del porcentaje de prismas presente en cada muestra (% NPrO), se calculó la C_{NPrO} (nM) y el valor de ϵ .

| Muestra | C_{Au} (mg/L) | NIR/Vis | % NPrO | C_{NPrO} (nM) | ϵ ($\text{nM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) |
|---------|-----------------|---------|--------|-----------------|---|
| 1 | 36.837 | 2.5 | 0.88 | 0.132 | 8.594 |
| 2 | 43.261 | 2.4 | 0.87 | 0.153 | 7.056 |
| 3 | 36.515 | 2.4 | 0.87 | 0.129 | 7.544 |

ii) NTA

Se realizó un análisis NTA para determinar el número de nanopartículas por mililitro. Con el fin de determinar el coeficiente de extinción molar, se estableció una relación lineal entre la concentración de las nanopartículas determinada por Nanosight, y el valor de absorbancia de la banda plasmónica en NIR determinado mediante espectrofotometría. La determinación se realizó utilizando muestras NPrO-D1 con

el protocolo modificado de purificación. Las mediciones fueron realizadas con tres láseres de distintas longitudes de onda (405, 488, y 642 nm) con el fin de descartar alguna influencia entre el tipo de láser utilizado y el conteo de nanopartículas. Los valores obtenidos de concentración, así como también los coeficientes de extinción, fueron similares empleando los tres láseres. En la Fig. 5.1A-C se pueden observar las 3 rectas obtenidas, mientras que en la Tabla 5.2 se muestran los tres coeficientes de extinción para cada láser, y el promedio de estos cuyo valor es $8.6 \pm 0.2 \text{ nM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Tabla 5.2. Coeficiente de extinción (ϵ) para NPrO-D1 y NEO-D1. Mediante el análisis NTA se determinó la concentración de diferentes muestras de NPrO-D1 y NEO-D1, y se correlacionaron con sus respectivas absorbancias para calcular ϵ . Se utilizaron láseres de diferentes longitudes de onda.

| Muestra | $\epsilon \text{ (nM}^{-1} \text{ cm}^{-1}\text{)}$ | | | |
|----------------|---|--------|--------|---------------|
| | 405 nm | 488 nm | 642 nm | Promedio |
| <i>NPrO-D1</i> | 8.6 | 8.7 | 8.4 | 8.6 ± 0.2 |
| <i>NEO-D1</i> | x | x | 10.8 | 10.8 |

Además, es importante considerar que en este caso no es necesario realizar un ajuste por el número de esferas aún presente en las muestras, debido a que la sensibilidad en el equipo no permite determinar la concentración de nanopartículas menores a 30 nm de tamaño, y las esferas presentes en las muestras de nanoprismas tienen un diámetro de 24 nm. Cabe destacar, que a pesar de las limitaciones en el proceso de purificación los datos obtenidos por absorción atómica, así como también los ajustes matemáticos que se tuvieron que realizar en la fórmula, los valores obtenidos tanto con esta técnica como con NTA son similares

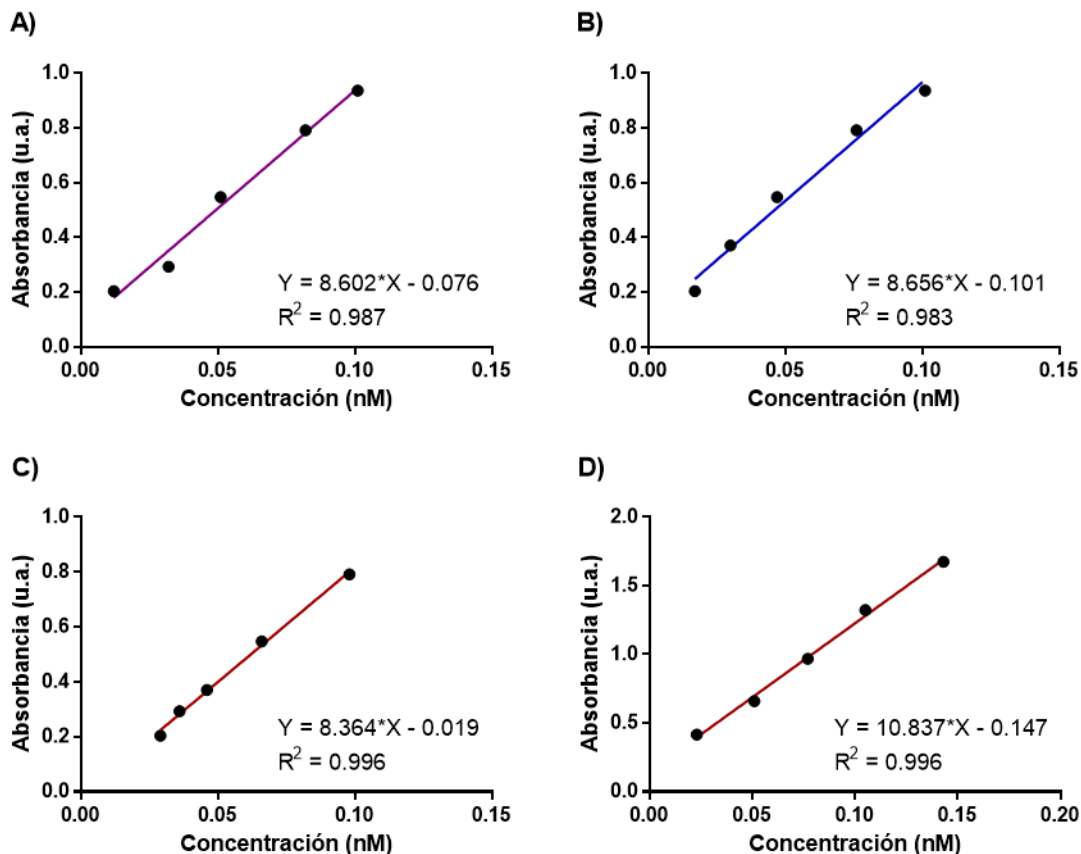


Fig. 5.1. Rectas NTA. Determinación coeficiente de extinción a través de la linealidad observada entre la absorbancia del plasmón v/s concentración (nM). En el caso de NPrO-D1, se utilizaron 3 láseres: 405 (A), 488 (B), y 624 nm (C). Al no ver diferencias entre los 3 láseres, se utilizó solo el de 624 nm para NEO-D1 (D).

Al igual que con NPrO-D1, se realizó el mismo análisis NTA para determinar el número de nanopartículas por mililitro para NEO-D1. Debido a que no existió dependencia del láser en el caso de los NPrO, para este caso solo se utilizó el láser rojo (642 nm) para determinar el coeficiente de extinción molar, obteniéndose una curva que relaciona el máximo de absorbancia con la concentración de partículas (Fig. 5.1D). A partir de esta recta se pudo determinar que el coeficiente para NEO-D1 tiene un valor de $10.8 \text{ nM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Tabla 5.2). Para los posteriores experimentos

in vitro e *in vivo*, las concentraciones de las muestras utilizadas fueron determinadas a través de los coeficientes calculados mediante el uso de NTA tanto para NPrO y NEO, cuyos valores corresponden a $8.6 \text{ nM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y $10.8 \text{ nM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, respectivamente.

5.1.2 Cuantificación D1 y disposición del péptido sobre la superficie (Raman)

Con el fin de comprobar la correcta funcionalización de D1 sobre la superficie de NPrO y NEO, y evaluar la disposición del péptido sobre éstas, se realizaron los ensayos de análisis de aminoácidos y espectroscopia Raman. Para lo primero, se determinó y se calculó el número de moléculas de péptido por nanopartícula de oro relacionando la concentración de nanopartículas obtenida por NTA y la concentración de D1 mediante análisis de aminoácidos. Los resultados obtenidos dan cuenta de que existen alrededor de 1300 y 4800 moléculas del péptido D1 por NPrO y NEO, respectivamente. Debido a que sus áreas superficiales son similares, y dado que el número de moléculas de péptido depende del número de moléculas de PEG sobre la superficie, una explicación de este resultado sería que el grado de funcionalización de PEG en cada tipo de nanopartículas fue diferente, siendo mayor para NEO, resultando en una mayor funcionalización del péptido D1 sobre NEO en relación con NPrO.

Por otro lado, se llevó a cabo un análisis mediante espectrometría Raman para determinar la disposición del D1 sobre la superficie de oro en cada nanosistema. Lo primero que se realizó fue la obtención del espectro Raman para el péptido D1 (Fig. 5.2A-i), el cual exhibe señales características en 1440, 1274, 1212, 854, 837, 725, 643, 598 y 407 cm^{-1} con una intensidad relativa media-fuerte. La asignación de las

bandas propuesta se detalla en la Tabla 5.3 y se basa en datos publicados anteriormente [1-7].

Tabla 5.3. Propuesta de asignación de bandas para el análisis espectrometría Raman. De izquierda a derecha se muestran las asignaciones para el péptido D1 solo, sobre NEO, y sobre NPrO.

| Raman D1 | SERS NEO-D1 | SERS NPrO-D1 | Asignaciones |
|----------|-------------|--------------|--|
| 1677 | | | Q - Amida I ($\nu\text{C=O} + \nu\text{NH}$) |
| 1620 | 1604 | | Q |
| 1440 | 1472 | 1450 | R |
| 1274 | 1298 | 1295 | Y |
| 1212 | 1242 | 1242 | S - Amida III def. |
| 1051 | | | R |
| 991 | | | R |
| 924 | | | R/Q |
| 854 | 858 | | Y/A |
| 837 | | 839 | Y |
| 725 | | 718 | H |
| 643 | | 640 | Y |
| 598 | | 597 | A |
| 407 | | | CN - def. |

R: arginina; Y: tirosina; S: serina; Q: glutamina; A: alanina; H: histidina.
def.: deformación. ν : estiramiento.

De acuerdo con estas publicaciones, el grupo guanidino de la arginina (R) se puede observar a 1440 cm^{-1} , mientras que otras bandas del mismo aminoácido se pueden observar a 1051 , 991 y 924 cm^{-1} , con intensidades variables. Además, se observan vibraciones de tirosina (Y) a 1274 , 837 y 643 cm^{-1} . En particular, la banda a 837 cm^{-1} se observa con una intensidad relativa fuerte, la cual se asigna a la vibración CCN de Y. La señal asociada con la serina (S), con una intensidad relativa media, se observa a 1212 cm^{-1} . Por otro lado, se observa una vibración de acoplamiento de modos idénticos entre tirosina y alanina (A) a 854 cm^{-1} ; A también muestra una banda débil a 598 cm^{-1} , la que se asigna al grupo de deformación carboxilato. Otras

bandas de aminoácidos que pertenecen a la glutamina (Q) y la histidina (H) se observan en el perfil Raman de D1. Las bandas características de Q se encuentran a 1677 y 1620 cm^{-1} , mientras que la presencia de H se infiere de la aparición de la banda a 725 cm^{-1} . Finalmente, la banda a 407 cm^{-1} se atribuye a los modos de deformación que involucran el resto estructural CN.

Respecto al espectro Raman de NEO-D1, éste mostró solo unas pocas señales de los aminoácidos que constituyen el péptido D1 (Fig. 5.2A-ii). En este sentido, R, Y, H, S y A fueron los aminoácidos identificados en el espectro, proporcionando información sobre la parte de la secuencia del péptido D1 que interactúa con la superficie de oro. Por lo anterior, el análisis muestra que la secuencia qshyrh es la fracción representativa de D1 con una orientación que se encuentra más cercana a la superficie, en relación con la cola seccional compuesta por la secuencia spaqv (Fig. 5.2B, derecha). Además, el desplazamiento de algunas bandas sugiere una conformación de D1 sobre la superficie NEO distinta a la hallada en el análisis del péptido libre, como en el caso de Q que aparece a 1620 cm^{-1} en el espectro Raman de D1 y a 1604 cm^{-1} en el perfil Raman de NEO- D1. De manera similar, la banda Raman del péptido D1 que corresponde a R, ubicada a 1440 cm^{-1} , experimentó un importante desplazamiento hacia 1472 cm^{-1} en el espectro NEO-D1. Basado en la expresión de R y Q, es razonable determinar que la secuencia qshyrh tiene un papel importante en la interacción con la superficie NEO.

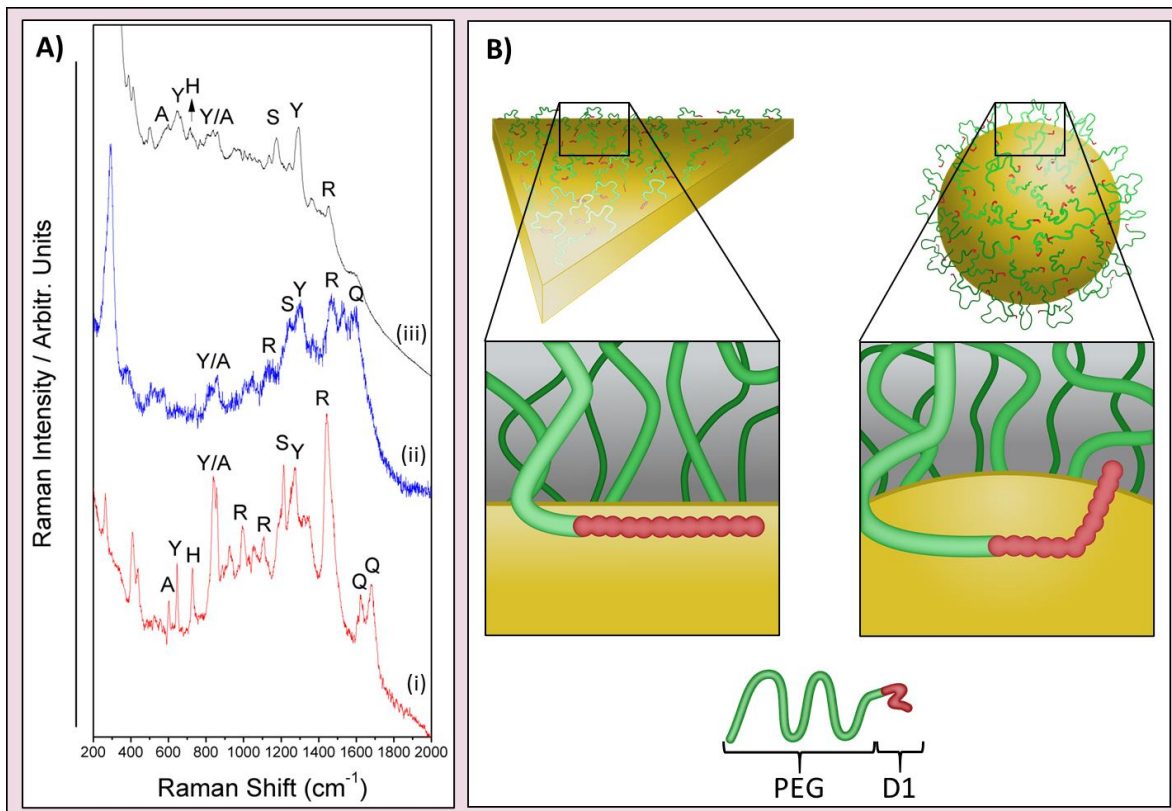


Fig. 5.2. Disposición del péptido D1 sobre la superficie de oro. A) Espectros Raman del péptido D1 (i), NEO-D1 (ii), y NPrO-D1 (iii). B) Representación esquemática de la disposición de D1 sobre la superficie de NPrO-D1 (izquierda) y NEO-D1 (derecha).

Por otro lado, se determinó que el espectro Raman del sistema compuesto por el péptido D1 unido a NPrO (Fig. 5.2A-iii) presenta un comportamiento estructural contrario al observado en la muestra NEO-D1, en el que los aminoácidos Y, H, R, S y A fueron identificados en el perfil. La presencia de las bandas características con intensidades relativas particulares de aminoácidos que constituyen la secuencia completa de D1 indica que el péptido se encuentra paralelo al plano de la superficie de NPrO (Fig. 5.2B, izquierda); sin embargo, la orientación de los grupos funcionales de cada aminoácido es perpendicular con respecto a la superficie de acuerdo con las reglas de selección de SERS [8]. Como se puede observar en la Fig. 5.2, las

bandas en 1442, 840 y 643 cm^{-1} que se atribuyen a R, Y / A e Y en el perfil Raman de D1, respectivamente, aparecen a 1450, 839 y 640 cm^{-1} en el espectro de NPrO-D1. Estos ligeros cambios en las señales de R, Y / A e Y indican que la conformación adoptada por el péptido D1 funcionalizado sobre NPrO es bastante similar a la conformación de D1 sin ninguna superficie nanoestructurada en las proximidades. Finalmente, el fondo de fluorescencia observado en todo el perfil Raman del sistema NPrO-D1 indica que el péptido D1 se encuentra más próximo a la superficie de oro de NPrO respecto a lo que ocurre con la superficie de NEO, lo que resulta en un aumento de fluorescencia de H e Y. El fenómeno de fluorescencia se produce debido al espacio molecular formado entre la superficie del metal y el analito en presencia de un agente de protección, lo cual mejora la señal de emisión formada por el efecto plasmónico de la nanopartícula.

Esta diferencia en la disposición del péptido D1 sobre la superficie de NEO y NPrO podría explicar la diferencia en el grado de funcionalización de cada nanosistema hallada mediante el análisis de aminoácidos. La disposición paralela al plano adoptada por el péptido D1 sobre la superficie NPrO bloquearía los grupos carboxilo activos durante el proceso de funcionalización, lo cual evitaría un mayor grado de conjugación, y por consiguiente un menor número de moléculas de D1 por nanopartícula. Sumado a esto, la disposición y número de moléculas de péptido por tipo de nanopartícula podría tener influencia en su comportamiento a nivel biológico. La interacción de estos nanosistemas con su blanco terapéutico, el péptido A β y sus distintas especies agregadas, podría verse afectada si la disposición espacial del péptido, o la cantidad de péptido por nanopartícula, no es la indicada para que el

nanosistema se una selectivamente a los agregados de proteína y permita su desagregación a través del proceso de fototermia. Ensayos *in vitro* que evalúen la interacción de las nanopartículas con agregados A β podrían dar indicios de la influencia de estos parámetros en el desempeño biológico de los nanosistemas desarrollados en esta tesis [9].

5.1.3 Comparación de las características fisicoquímicas de NPrO y NEO funcionalizados

Mediante la caracterización y el seguimiento de los parámetros fisicoquímicos de los sistemas desarrollados a partir de NPrO y NEO, se pudo confirmar el éxito en los distintos pasos de funcionalización, purificación y/o recubrimiento de las nanopartículas estudiadas (Capítulo 3 y 4). Exceptuando las diferencias encontradas en el número de moléculas de péptidos por nanopartícula y su disposición sobre la superficie descritas en el punto 5.1.2, los nanosistemas finales, de áreas superficiales similares (Tabla 4.2, Capítulo 4), presentan valores de diámetro hidrodinámico y potencial zeta cercanos durante las distintas etapas de funcionalización (Tabla 5.4).

La comparación entre los parámetros analizados muestra que en la mayoría de las etapas de funcionalización las diferencias son mínimas entre prismas y esferas. Solo en el caso de las muestras recubiertas con polímeros se pueden observar mayores diferencias, principalmente en relación con el diámetro hidrodinámico: 125 vs 83 nm (PEI) y 105 vs 89 nm (PSS/AAC) para NPrO y NEO, respectivamente. En su conjunto, los resultados muestran que los nanosistemas desarrollados son

similares desde sus características fisicoquímicas, lo cual es deseable y relevante para los experimentos tanto *in vitro* como *in vivo* que compararán si existe alguna influencia en la forma de la nanopartícula.

Tabla 5.4. Resumen y comparación de los nanosistemas basados en NPrO y NEO. Valores del diámetro hidrodinámico (nm) y potencial zeta (mV) para NPrO y NEO durante sus distintas etapas de funcionalización.

| Funcionalización | NPrO | NEO |
|------------------|--------------------------|--|
| PEG* | 92 ± 5 nm -41 ± 1 mV | 92 ± 4 nm -34 ± 1 mV |
| D1 | 108 ± 3 nm -25 ± 2 mV | 99 ± 5 nm -31 ± 2 mV |
| PEI | 125 ± 13 nm 17 ± 1 mV | 83 ± 2 nm 17 ± 1 mV |
| PSS/CAR/AAC** | 105 ± 2 nm -37 ± 2 mV | 97 ± 2 / 89 ± 7 nm -36 ± 2 / -32 ± 2 mV |

* En el caso de NPrO se considera el sistema NPrO-PEGx2.

** Los nanosistemas comparados son NPrO-D1-PSS con NEO-D1-CAR / NEO-D1-AAC.

5.2 Estabilidad coloidal

Una vez caracterizados los nanosistemas obtenidos, y previo a la realización de los ensayos celulares *in vitro*, se evaluó la estabilidad coloidal de los nanosistemas NEO-D1, NPrO-D1, NPrO-D1-PEI, y NPrO-D1-PSS. Todas las muestras fueron almacenadas a 4°C para evaluar sus características fisicoquímicas como plasmón superficial, diámetro hidrodinámico, y potencial zeta en un periodo de 28 días (Fig. 5.3). Los resultados muestran que los sistemas NPrO-D1 y NEO-D1 fueron estables durante todo el periodo de estudio. Las muestras NPrO-D1 mostraron una leve disminución en la absorbancia del plasmón localizado en NIR entre los días 14 y 28,

pero no se registraron cambios en la longitud de banda de este (920 nm). El diámetro hidrodinámico y potencial zeta no cambiaron significativamente, con valores iniciales de 108 nm y -24 mV, y de 109 nm y -20 mV al día 28. Igualmente, las muestras NEO-D1 no mostraron cambios en la longitud de onda y absorbancia de la banda plasmónica (534 nm), así como tampoco cambios en el potencial zeta (-32 mV). Sin embargo, el diámetro hidrodinámico aumentó levemente de 96 a 103 nm.

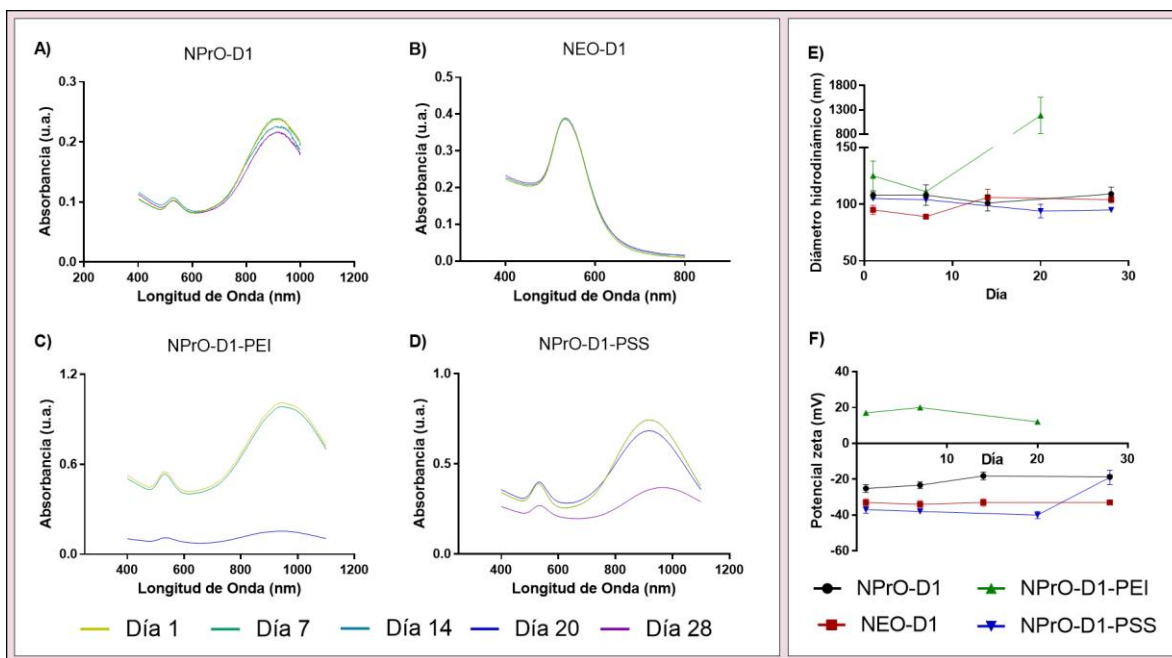


Fig. 5.3. Estabilidad de nanosistemas almacenados a 4°C, y disueltos en agua Milli-Q, durante 28 días. Se evaluó el plasmón superficial de NPrO-D1 (A), NEO-D1 (B), NPrO-D1-PEI (C), y NPrO-D1-PSS (D), así como también sus respectivos diámetros hidrodinámicos (E) y potenciales zeta (F).

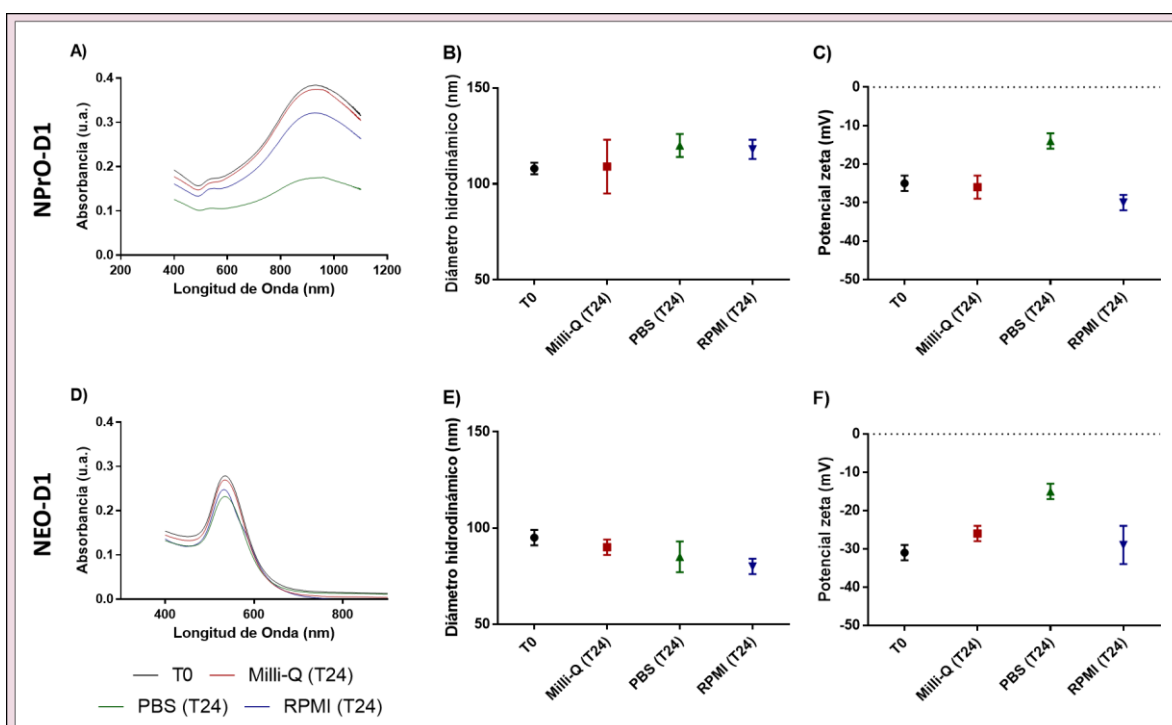
En el caso de las muestras NPrO-D1 recubiertas con polímeros, se observó que al estar recubiertos solo con PEI las muestras fueron estables durante la primera semana, pero a partir del día 20 se observó una disminución significativa en la

absorbancia de la banda plasmónica. Por otro lado, el sistema NPrO-D1 recubierto con ambos polímeros mostró una absorbancia estable durante los primeros 20 días, disminuyendo considerablemente hacia el día 28. Lo mencionado anteriormente se condice con los cambios observados mediante DLS; un aumento en el diámetro hidrodinámico en el día 20 para NPrO-D1-PEI, lo cual se evidencia en el día 28 para NPrO-D1-PSS, acompañado de cambios en el potencial zeta (Fig. 5.3E y F).

Los datos obtenidos dan cuenta que, dentro de este periodo, la muestra NPrO-D1-PEI resultó ser la menos estable. Una considerable disminución en la absorbancia, acompañada de un gran aumento del diámetro hidrodinámico dan cuenta de la agregación de la muestra. En el caso del sistema NPrO-D1-PSS, este mostró ser estable hasta los 28 días, a partir del cual se observa una disminución en la absorbancia, aumento en el diámetro hidrodinámico, y disminución en el valor absoluto de potencial zeta. Las únicas muestras que resultaron ser estables durante los 28 días fueron NPrO-D1 y NEO-D1, las cuales no tuvieron variaciones considerables en los valores de los parámetros analizados. A pesar de que las cuatro muestras analizadas poseían diámetros hidrodinámicos similares al comienzo del estudio, valores de potenciales zeta alejados de la neutralidad, y moléculas sobre la superficie que pudiesen mantener una estabilidad estérica, estas mostraron no ser igual de estables. Una explicación de esta diferencia podría encontrarse en las imágenes TEM de cada uno de los sistemas (Fig. 3.11, Capítulo 3). En estas se puede notar que los nanosistemas recubiertos con polímeros muestran una mayor interacción, lo cual se ve más acentuado en el sistema NPrO-D1-PEI (Fig. 3.11A y B, Capítulo 3). Esta favorecida interacción entre los

nanoprismas podría ser la principal razón por la cual sistemas con PEI y PSS no hayan mostrado la misma estabilidad que el sistema NPrO-D1 o NEO-D1.

Posterior a los resultados obtenidos, se evaluó la estabilidad de NPrO-D1 y NEO-D1 dispersados en tres medios: agua Milli-Q, PBS, y medio RPMI a 37°C durante un periodo de 24 h (Fig. 5.4).



Ambos nanosistemas fueron estables en agua Milli-Q luego de 24 h a 37°C, sin encontrar diferencias en los parámetros analizados. Tanto en PBS como en RPMI se observó una disminución en la absorbancia del plasmón de ambos

nanosistemas, especialmente cuando las muestras de NPrO-D1 fueron incubadas en PBS. En el caso del diámetro hidrodinámico, los valores se mantuvieron constantes para NPrO-D1 y NEO-D1 tanto en PBS, como en RPMI. Finalmente, el potencial zeta aumentó 10 y 15 mV para NPrO-D1 y NEO-D1, respectivamente, al ser incubadas en PBS, mientras que al ser incubadas en RPMI no se observaron cambios en la carga superficial.

Como se mencionó anteriormente, cuando el sistema NEO-D1 fue dispersado en PBS o RPMI, se observó una disminución significativamente menor en la intensidad del plasmón comparada a la observada en NPrO-D1. Esto puede ser explicado por la tendencia de las muestras de NPrO a interactuar con los tubos de centrifuga de plástico, la cual se ve incrementada cuando las muestras experimentan procesos como centrifugación, incremento de temperatura (37°C), o cambios en la fuerza iónica del medio (PBS). Es más, inclusive utilizando tubos de centrifuga que son considerados inertes, como los Eppendorf LoBind®, se observó la acumulación de una capa gris de NPrO en las paredes de los tubos, incluso después de varios minutos de sonicación. Por otro lado, la estabilidad coloidal también puede ser influenciada por el grado de funcionalización y por la orientación de las moléculas unidas a la superficie de la nanopartícula. La repulsión estérica o la atracción entre las moléculas funcionalizadas en la superficie de oro puede resultar en interacciones que puedan incrementar o disminuir la estabilidad de las nanopartículas, como ha sido descrito previamente [10]. Como se mencionó anteriormente en la sección 5.1.2, el sistema NPrO-D1 posee menos moléculas de péptido por nanopartícula que NEO-D1 (1300 vs 4800), y la orientación y proximidad de los péptidos sobre la

superficie de la nanopartícula son diferentes. Mientras el péptido D1 se encuentra completamente paralelo a la superficie de NPrO, sobre la superficie de las NEO solo una parte de la secuencia (*qshyrh*) interactúa con la superficie de oro, mientras que el resto de la molécula se encuentra más alejada de la misma. La menor cantidad de moléculas de péptido en NPrO, así como su mayor proximidad a la superficie en comparación a lo observado en NEO-D1 podrían ser las razones por la cual las muestras de NPrO-D1 fueron relativamente menos estables bajo las condiciones estudiadas. Por lo anterior, realizar los mismos ensayos de estabilidad probando diferentes concentraciones de péptido sobre la superficie de cada nanosistema cambiaría el número de moléculas de péptido por nanopartícula, lo que podría generar un cambio en la disposición espacial del péptido sobre NPrO y NEO. Lo anterior serviría para evaluar efectivamente si la estabilidad coloidal en este caso está sujeta exclusivamente a la forma de la nanopartícula, o si existe una influencia por el grado de funcionalización y por la orientación de las moléculas unidas a la superficie de oro.

Finalmente, es importante mencionar que tanto en la evaluación de estabilidad en el tiempo, así como utilizando diferentes medios, las soluciones fueron sonicadas previamente antes de realizar cada medición. En ambos ensayos se llevó a cabo este paso con el fin de homogenizar las soluciones; en el primer caso debido a que con el correr de los días existía una leve decantación de las nanopartículas, mientras que en el segundo caso se realizó con el fin de ayudar a la resuspensión de las muestras, luego de que estas fueran centrifugadas para cambiar del medio de estudio (agua, PBS, medio de cultivo) a agua Milli-Q para realizar las mediciones.

A pesar de que en el caso particular de las muestras con polímeros (Fig. 5.3) este paso no influyó en la agregación irreversible que se vio en estas muestras, no se puede descartar que la sonicación haya desagregado pequeños núcleos de agregación que se pueden haber formado en las otras muestras estudiadas, y por consiguiente, alterar los resultados. Realizar los mismos estudios evitando la sonicación podría dar cuenta si efectivamente los resultados obtenidos en esta tesis no se vieron influenciados por este proceso en la metodología de trabajo, y es un paso importante por considerar en la reproducibilidad de los resultados.

5.3 Ensayos de viabilidad celular

La evaluación del efecto de sistemas basados en nanotecnología sobre la viabilidad celular mediante ensayos *in vitro* es un paso fundamental para determinar la penetración y toxicidad celular de las nanopartículas. Por lo anterior, se evaluaron los efectos sobre la viabilidad celular en 3 líneas celulares (SH-SY5Y, bEnd.3, y BV-2) utilizando diferentes concentraciones de los nanosistemas desarrollados, las cuales fueron calculadas mediante los coeficientes de extinción molar obtenidos anteriormente (sección 5.1.1).

SH-SY5Y es una línea celular de origen humano proveniente de una biopsia de médula ósea de una niña con neuroblastoma. Por lo general se utiliza como modelo para evaluar citotoxicidad, diferenciación y función neuronal [11]. Por otro lado, bEnd.3 es una línea celular de cerebro de ratón derivada de ratones BALB/c, la cual se usa comúnmente en la investigación vascular y los estudios del tejido cerebral endotelial [12], y pueden servir especialmente como modelos de barrera

hematoencefálica [13]. A pesar de que el objetivo de este trabajo es utilizar la ruta IN para un transporte directo de las nanopartículas desde la cavidad nasal al SNC, se ha descrito que al utilizar esta vía también ocurre un transporte indirecto desde la cavidad nasal – circulación sistémica – cerebro, el cual debe atravesar la BHE [14]. Finalmente, la línea celular BV-2 proviene de células microgliales de murino que fueron inmortalizadas [15, 16], y comparten diversas propiedades con macrófagos como su capacidad antimicrobial y fagocítica. Sin embargo, al igual que las células de la microglía, las BV-2 se diferencian de los macrófagos periféricos. Debido a esto, la línea celular BV-2 ha sido ampliamente usada debido a su idoneidad como alternativa de cultivos primarios de microglía para el estudio de efectos tóxicos e inflamatorios de fármacos y nanopartículas con potencial uso en enfermedades neurodegenerativas [17-20].

La determinación de la viabilidad celular se realizó utilizando los ensayos colorimétricos MTS (SH-SY5Y y bEnd.3) y XTT (BV-2), los cuales se basan en la reducción de sales de tetrazolio y formación de un compuesto coloreado, formazán, producto de la actividad de enzimas presentes en la mitocondria [21], cuya actividad se relaciona con la viabilidad y/o proliferación celular. En todos los ensayos realizados, las células fueron incubadas con diferentes concentraciones de los nanosistemas a 37°C durante 24 h. Una vez finalizado el proceso de incubación, se descartó el contenido de cada pocillo, y se agregó una solución de MTS o XTT según corresponda, más PMS, el cual actúa como un portador de electrones que aumenta la sensibilidad de los ensayos, las placas fueron incubadas entre 1 y 4 h, para luego ser medidas en un lector de placas.

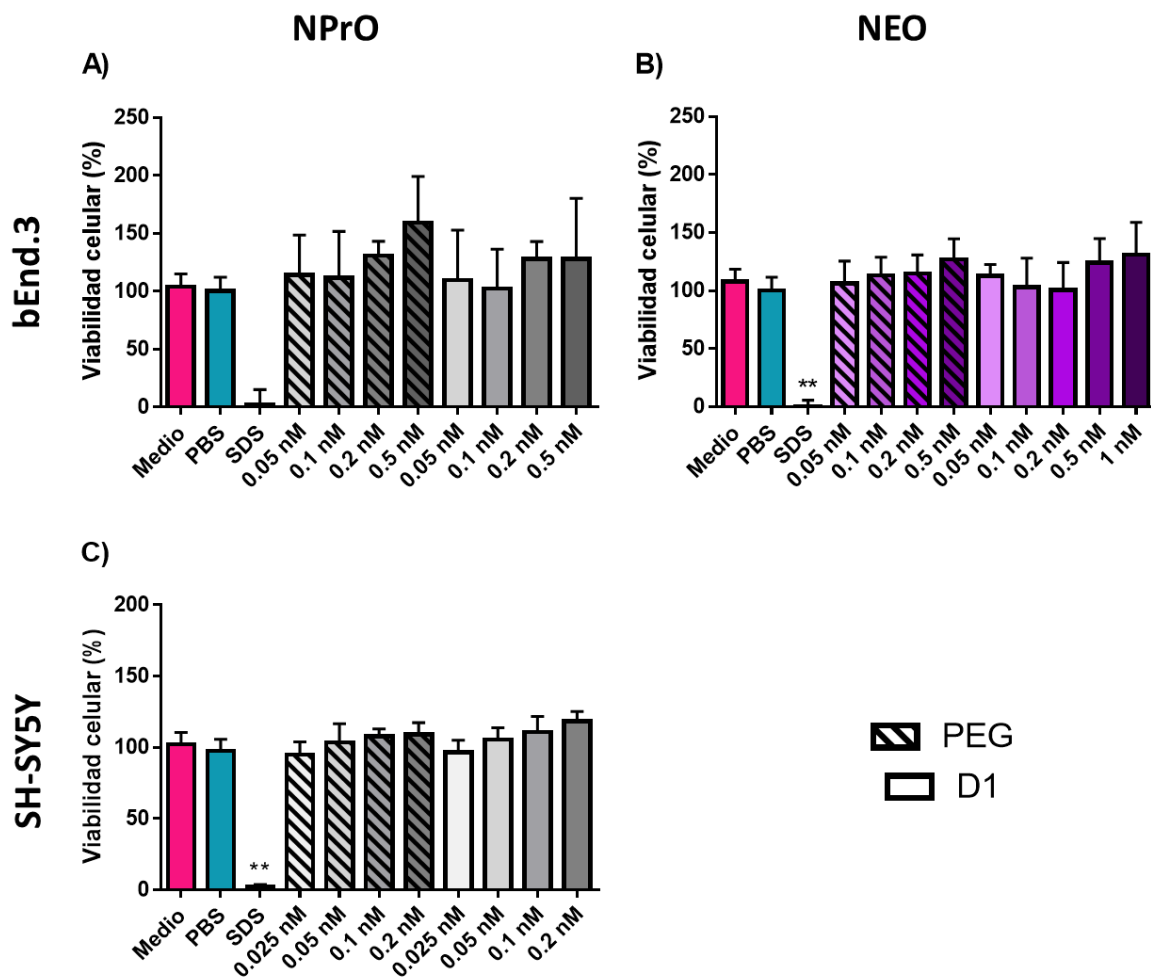


Fig. 5.5. Ensayo MTS de viabilidad celular a las 24 h. Las líneas celulares fueron incubadas con concentraciones crecientes de NPrO-PEGx2, NPrO-D1, NEO-PEG, y NEO-D1. A) y C) corresponden a células bEnd.3 y SH-SY5Y, respectivamente, tratadas con NPrO. B) Células bEnd.3 incubadas con NEO-D1. Los experimentos fueron realizados en triplicado con un $n = 2$ (A) y $n = 3$ (B y C). ** = $p < 0.05$, Kruskal-Wallis.

En el caso de las células bEnd.3 se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo MTS incubando las células con NPrO-PEGx2, NPrO-D1, y NEO-PEG en un rango de concentración de 0.05 a 0.5 nM y NEO-D1 entre 0.05 y 1 nM (Fig. 5.5A y 5.5B). Mediante el mismo ensayo, se evaluó la viabilidad celular en SH-SY5Y usando distintas concentraciones de NPrO-PEGx2 y NPrO-D1, en un rango entre

0.025 y 0.2 nM (Fig. 5.5C). Finalmente, utilizando la línea celular de microglía BV-2 se evaluaron concentraciones crecientes de NPrO-D1 y NEO-D1, de los 0.05 a 1 nM, para determinar la proliferación celular mediante el ensayo de viabilidad celular XTT (Fig. 5.6).

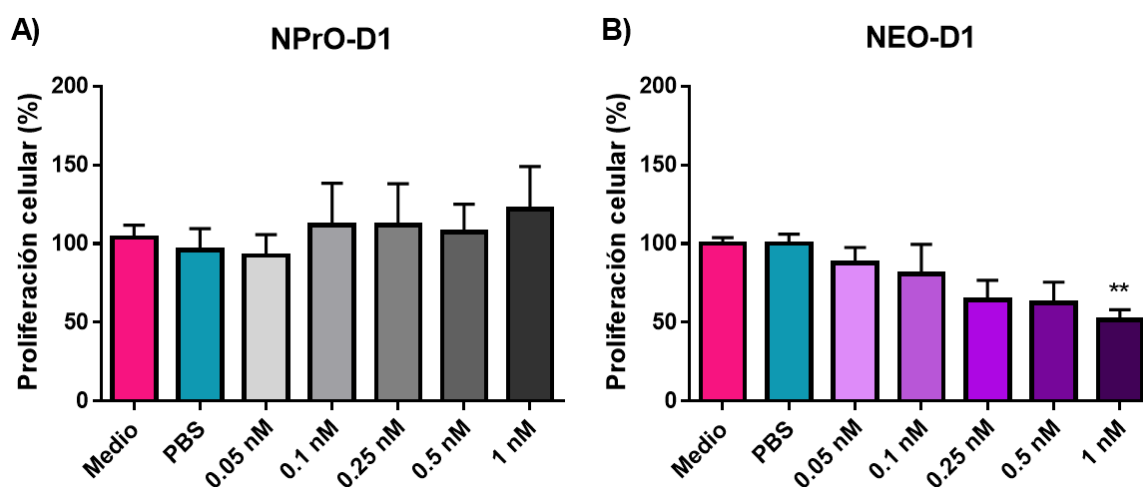


Fig. 5.6. Ensayo XTT de proliferación celular en BV-2. La línea celular de microglía fue incubada con concentraciones crecientes de NPrO-D1 (A) y NEO-D1 (B) durante 24 h. Los experimentos fueron realizados en triplicado con un $n = 3$, ** = $p < 0.05$, Kruskal-Wallis.

Los resultados obtenidos mediante MTS indican que solo existe diferencia significativa entre las células incubadas solo con medio y el tratamiento con el surfactante SDS (control de muerte celular), el cual es un control de muerte celular (Fig. 5.5). Tanto el vehículo utilizado para solubilizar las muestras (PBS), como las diferentes concentraciones de NPrO-PEGx2, NPrO-D1, NEO-PEG y NEO-D1 ensayadas no mostraron tener diferencia significativa con el control de vida. Por otro lado, en el ensayo XTT la muestra NPrO-D1 no mostró efectos sobre la proliferación celular a ninguna de las concentraciones evaluadas (Fig. 5.6A). Sin embargo, en el

caso de NEO-D1, la mayor de las concentraciones empleadas en el ensayo mostró ser significativamente diferente del control de vida (1 nM vs Medio, Fig. 5.6B).

La diferencia que se observa entre los prismas y esferas en este último ensayo se puede deber a la interacción de cada nanosistema con las células. A pesar de haber empleado las mismas concentraciones, y considerando que ambas nanopartículas poseen superficies, diámetros hidrodinámicos y potenciales zeta similares, solo su forma es distinta. Resultados similares han sido publicados por Hutter y colaboradores [22], los cuales evaluaron los efectos citotóxicos de nanopartículas de oro de diferente forma (esferas, varillas, y erizos) en cultivos de la línea celular de microglía N9. Los investigadores mostraron que nanoesferas funcionalizadas con PEG fueron significativamente citotóxicas a concentraciones $\geq 10^9$ NP/mL, mientras que las nanovarillas y nanoerizos fueron inocuos. Además, se sabe que la forma de la nanopartícula, y no solo su tamaño, tiene influencia en la penetración y acumulación celular, lo cual puede desencadenar la inhibición de la proliferación celular a través de diferentes mecanismos que no están necesariamente acompañados de muerte celular, como se ha descrito previamente en la línea celular BV-2 [18, 23].

En el caso de esferas y varillas, se ha demostrado que las primeras se acumulan en una mayor proporción que las últimas debido a que tienen mayor capacidad de penetrar las células [24]. Lo anterior se debería a que las nanopartículas con una forma anisotrópica pueden interactuar con la membrana celular a través de diferentes caras. Si esta interacción ocurre entre el eje longitudinal de la varilla y la membrana celular, el área de contacto sobre la membrana es mayor que el área

ocupada por una esfera, por lo que se limita la superficie celular disponible para procesos de internalización. Un escenario similar podría estar ocurriendo cuando NPrO-D1 interactúa con la membrana celular a través de sus caras triangulares, limitando su penetración celular en comparación a NEO-D1. Además, el diámetro promedio de NEO-D1 es de 47 nm, el cual se encuentra dentro del rango de tamaño óptimo para penetrar membranas, ya que se ha demostrado que nanoesferas con un diámetro de 50 nm tienen una mayor penetración que nanoesferas de menores o mayores diámetros [25].

Evaluar la citotoxicidad de un nanosistema es un punto importante si se desea emplear este en aplicaciones biomédicas. En nuestro caso, el desarrollo de estos nanosistemas tiene por fin utilizarlos como plataforma para tratar y/o diagnosticar la enfermedad de Alzheimer. Por lo anterior, las líneas celulares utilizadas se encuentran relacionadas con el SNC y su uso se encuentra ampliamente descrito en literatura. Si bien la mayoría de los casos estudiados no mostraron efectos sobre la viabilidad celular, el entendimiento del mecanismo por el cual las nanopartículas penetran la membrana celular y permiten su internalización dentro de las células, así como cuantificar el número de nanopartículas dentro de las células, permitiría dilucidar porque se observaron efectos significativos sobre la proliferación celular cuando se utilizó la máxima concentración de NEO-D1. Finalmente, es importante considerar que la extrapolación de este resultado en particular a un contexto *in vivo* no es del todo acertada, ya que tener una concentración de nanopartículas 1 nM durante 24 horas en cerebro resulta poco probable, considerando la cantidad de oro reportado que llega a cerebro y los procesos de *clearance* que existen.

En resumen, se consideró que los nanosistemas basados en NPrO y NEO son en su mayoría estables y no poseen efectos sobre la viabilidad celular. Por lo anterior, se procedió a realizar ensayos *in vivo* para determinar si la ruta IN permite la llegada de estos nanosistemas al SNC, y si la forma o el recubrimiento influye en su capacidad de translocarse desde la cavidad nasal al cerebro.

Conclusiones

- Existe una relación lineal entre la concentración de nanopartículas entregada por el ensayo NTA y los valores de absorbancias de las muestras, lo que permitió determinar los coeficientes de extinción de NPrO y NEO.
- El número de moléculas de péptido y su disposición sobre la superficie de oro difiere según la forma a la cual se encuentra asociada.
- Los parámetros fisicoquímicos determinados dan cuenta de que los nanosistemas desarrollados son similares en todas sus características, siendo solo diferentes en su forma.
- Los nanosistemas basados en NPrO o NEO funcionalizados con PEG y D1 demostraron ser estables bajo las diferentes condiciones estudiadas. La adición de polímeros disminuye la estabilidad coloidal en el tiempo, la cual se ve más afectada cuando solo se utiliza PEI.
- NPrO-D1 y NEO-D1 no afectaron la viabilidad celular de las líneas SH-SY5Y, bEnd.3, y BV-2 en ensayos de 24 h para las concentraciones estudiadas.

Referencias

1. Aliaga, A.E., et al., *SERS and theoretical studies of arginine*. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2010. **76**(5): p. 458-63.
2. Aliaga, A.E., et al., *Surface-enhanced Raman scattering and theoretical studies of the C-terminal peptide of the beta-subunit human chorionic gonadotropin without linked carbohydrates*. Biopolymers, 2011. **95**(2): p. 135-43.
3. Culka, A., J. Jehlicka, and H.G. Edwards, *Acquisition of Raman spectra of amino acids using portable instruments: outdoor measurements and comparison*. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2010. **77**(5): p. 978-83.
4. Garrido, C., et al., *Interaction of the C-terminal peptide from pigeon cytochrome C with silver nanoparticles. A Raman, SERS and theoretical study*. Vibrational Spectroscopy, 2012. **61**: p. 94-98.
5. Long, D.A., *Infrared and Raman characteristic group frequencies. Tables and charts George Socrates John Wiley and Sons, Ltd, Chichester, Third Edition, 2001. Price £135*. Journal of Raman Spectroscopy, 2004. **35**(10): p. 905-905.
6. Vera, A.M., et al., *Interaction of the CLPFFD peptide with gold nanospheres. A Raman, surface enhanced Raman scattering and theoretical study*. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2015. **134**: p. 251-6.
7. Zhu, G., et al., *Raman spectra of amino acids and their aqueous solutions*. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2011. **78**(3): p. 1187-95.
8. Moskovits, M., *Surface-Enhanced Spectroscopy*. Reviews of Modern Physics, 1985. **57**(3): p. 783-826.
9. Kim, Yuna, et al. *How do the size, charge and shape of nanoparticles affect amyloid β aggregation on brain lipid bilayer?*. Scientific reports 2016. **6**: p. 19548.
10. Olmedo, I., et al., *How changes in the sequence of the peptide CLPFFD-NH₂ can modify the conjugation and stability of gold nanoparticles and their affinity for beta-amyloid fibrils*. Bioconjug Chem, 2008. **19**(6): p. 1154-63.
11. Kovalevich, J. and D. Langford, *Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology*. Methods Mol Biol, 2013. **1078**: p. 9-21.
12. Yuen, D., et al., *Novel characterization of bEnd.3 cells that express lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1*. Lymphology, 2014. **47**(2): p. 73-81.
13. Ku, J.M., et al., *Characterisation of a mouse cerebral microvascular endothelial cell line (bEnd.3) after oxygen glucose deprivation and reoxygenation*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2016. **43**(8): p. 777-86.
14. Casettari, L. and L. Illum, *Chitosan in nasal delivery systems for therapeutic drugs*. J Control Release, 2014. **190**: p. 189-200.
15. Henn, A., et al., *The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation*. ALTEX, 2009. **26**(2): p. 83-94.
16. Stansley, B., J. Post, and K. Hensley, *A comparative review of cell culture systems for the study of microglial biology in Alzheimer's disease*. J Neuroinflammation, 2012. **9**: p. 115.
17. Xue, J., et al., *Neuroprotective effect of biosynthesised gold nanoparticles synthesised from root extract of Paeonia moutan against Parkinson disease - In vitro & In vivo model*. J Photochem Photobiol B, 2019. **200**: p. 111635.
18. Mrvová, N., et al., *Modulation of BV-2 microglia functions by novel quercetin pivaloyl ester*. Neurochemistry International, 2015. **90**: p. 246-254.

19. Duffy, C.M., et al., *Microglia as a Surrogate Biosensor to Determine Nanoparticle Neurotoxicity*. J Vis Exp, 2016(116).
20. Stojiljkovic, A., et al., *High-content analysis of factors affecting gold nanoparticle uptake by neuronal and microglial cells in culture*. Nanoscale, 2016. **8**(37): p. 16650-16661.
21. Riss, T.L., et al., *Cell Viability Assays*, in *Assay Guidance Manual*, G.S. Sittampalam, et al., Editors. 2004: Bethesda (MD).
22. Hutter, E., et al., *Microglial response to gold nanoparticles*. ACS Nano, 2010. **4**(5): p. 2595-606.
23. Gusain, A., et al., *Anti-proliferative Effects of Tricyclodecan-9-yl-xanthogenate (D609) Involve Ceramide and Cell Cycle Inhibition*. Molecular Neurobiology, 2012. **45**(3): p. 455-464.
24. Chithrani, B.D. and W.C. Chan, *Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes*. Nano Lett, 2007. **7**(6): p. 1542-50.
25. Chithrani, B.D., A.A. Ghazani, and W.C. Chan, *Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells*. Nano Lett, 2006. **6**(4): p. 662-8.

Capítulo 6: Administración Intranasal de los Nanosistemas y su Llegada al SNC

6.1 Ensayos preliminares y evaluación del recubrimiento de nanopartículas de oro con polímeros para la llegada al sistema nervioso central.

Una vez obtenidos y caracterizados los distintos nanosistemas, se procedió a evaluar su llegada al SNC luego de ser administrados por vía IN. Se realizó un experimento preliminar (Fig. 6.1), en el cual se comparó la acumulación de oro tanto a las 0.5 h y 1 h post administración de los distintos nanosistemas. En la Fig. 6.1, y en las siguientes presentadas en este capítulo, los niveles de oro serán expresados como microgramos de oro por gramos de tejido ($\mu\text{g Au/g tejido}$) o por mililitros de plasma ($\mu\text{g Au/mL plasma}$), según sea el caso.

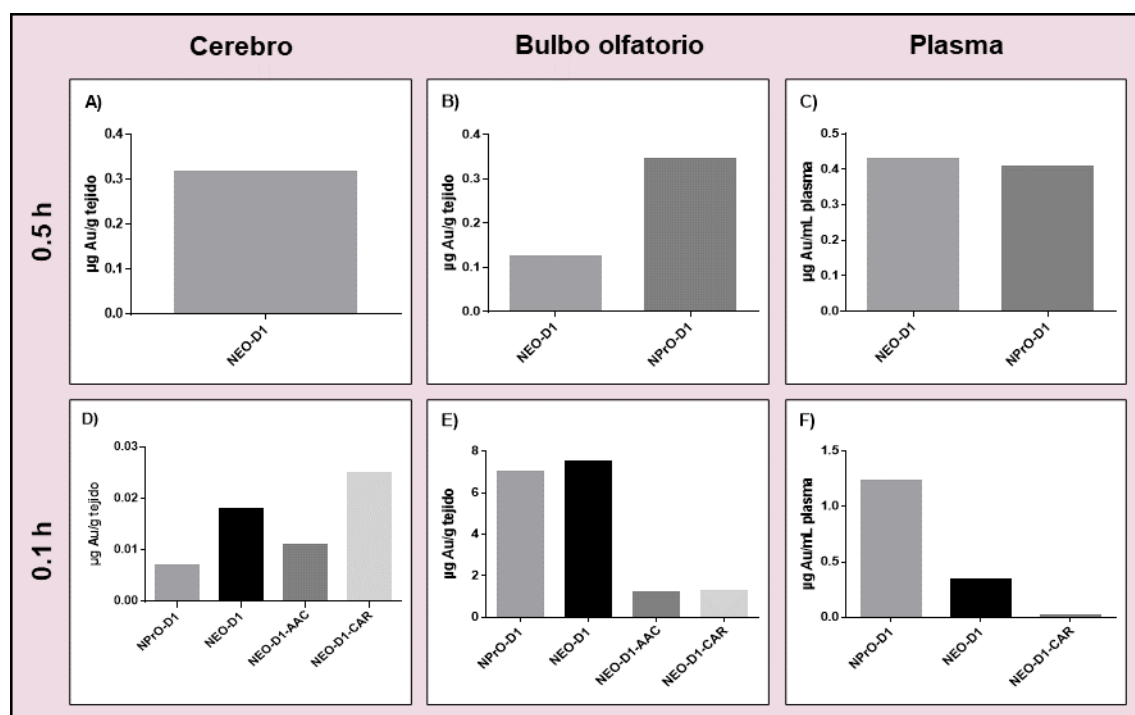


Fig. 6.1. Ensayos preliminares de administración intranasal. Se cuantificó el contenido de oro en cerebro (A y D), bulbo olfatorio (B y E), y plasma (C y F) a 0.5 y 1 h post administración, respectivamente. Previamente a la remoción de los órganos, los animales fueron perfundidos con PBS. Las muestras fueron digeridas y analizadas mediante ICP-MS. $n = 1$. Dosis utilizada de 4.5×10^{11} nanopartículas/kg de peso animal.

Cabe mencionar que no se pudo determinar la cantidad de oro en las muestras de cerebro (NPrO-D1, 0.5 h) y de plasma (NEO-D1-AAC, 1 h) debido a problemas con el ICP-MS utilizado en un comienzo. Además, otros nanosistemas como NPrO-D1-PEI, NPrO-D1-PSS, y NEO-D1-PEI también fueron administrados por vía IN, pero dificultades en el proceso de digestión, como también con los equipos utilizados en un comienzo para cuantificar los niveles de oro, no permitieron determinar si existía o no llegada al SNC y en qué cantidad. La Tabla 6.1 muestra un resumen de estas muestras. La Fig. S.2 muestra los resultados obtenidos en esta sección expresados como porcentaje de dosis administrada.

Tabla 6.1. Lista de muestras indeterminadas. Nanosistemas basados en NPrO y NEO fueron administrados por vía IN. Sin embargo, por problemas en el método de digestión, así como en la técnica analítica en sí, no se pudo determinar la cantidad de oro en SNC.

| <i>Muestra</i> | <i>Ratas (n°)</i> | <i>Tiempo (h)</i> | <i>Técnica cuantificación</i> |
|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------------------|
| <i>NPrO-D1</i> | 6 | 1 | Absorción atómica |
| | 2 | 1 | ICP-OES |
| | 1 | 0.5 | ICP-MS* |
| <i>NPrO-D1-PEI</i> | 2 | 1 | Absorción atómica |
| | 2 | 1 | ICP-OES |
| <i>NPrO-D1-PSS</i> | 2 | 1 | Absorción atómica |
| | 2 | 1 | ICP-OES |
| <i>NEO-D1</i> | 1 | 1 | Absorción atómica |
| <i>NEO-D1-PEI</i> | 1 | 1 | ICP-MS* |
| <i>NEO-D1-AAC</i> | 1 | 1 | ICP-MS* |

*ICP-MS en el *The Zuckerman Institute for Water Research* (BGU).

Al analizar las muestras NEO-D1 y NPrO-D1, y hacer una comparación de ambos tiempos estudiados, se puede observar que la cantidad de oro que llega al cerebro es mayor al tiempo de 0.5 h en relación con 1 h. Sin embargo, esta tendencia es inversa para el caso del bulbo olfatorio y el plasma, observándose una mayor

cantidad de oro a la hora. Por otro lado, al comparar los niveles de oro 1 h post administración entre los distintos nanosistemas, se observa que existe una mayor presencia de oro en cerebro para NEO-D1-CAR > NEO-D1 >> NEO-D1-AAC > NPrO-D1 (Fig. 6.1D). En relación con la cantidad de oro en bulbo olfatorio y plasma, los niveles de oro son mayores para las muestras no recubiertas con polímeros (NPrO-D1 y NEO-D1) en comparación a NEO-D1-CAR y NEO-D1-CAR.

Tomando la totalidad de los resultados obtenidos, se determinó que NEO-D1 presenta la mayor acumulación en cerebro a las 0.5 h, con un valor de 0.32 $\mu\text{g Au/g}$ de tejido, mientras que NPrO-D1 presentó la menor acumulación en este órgano (1 h), con un valor de 0.007 $\mu\text{g Au/g}$ de tejido (Fig. 6.1A y D). En el caso particular de las NEO-D1, se observó una disminución en la cantidad de oro en cerebro entre 0.5 y 1 h, pasando de 0.32 a 0.018 $\mu\text{g Au/g}$ de tejido (18 veces menos). Además, cuando se comparan los valores obtenidos en cerebro a 1 h entre los distintos nanosistemas basados en NEO, la mayor cantidad encontrada fue para NEO-D1-CAR, seguido de NEO-D1 y NEO-D1-AAC, con valores de 0.025, 0.018, y 0.011 $\mu\text{g Au/g}$ de tejido, respectivamente. Todos estos valores de igual manera siguen muy por debajo de los valores obtenidos para NEO-D1 a las 0.5 h. En relación con el bulbo olfatorio, se observa que todos los valores de las muestras analizadas a 1 h son mayores a los observados a las 0.5 h. De hecho, los valores en bulbo olfatorio a 1 h son 60 y 20 veces más altos para NEO-D1 y NPrO-D1, respectivamente, en comparación a lo obtenido a 0.5 h, siendo una tendencia opuesta a la observada en cerebro. En plasma se observaron cantidades similares de oro para NEO y NPrO a las 0.5 h, cuyo valor se mantuvo similar en el caso de los NEO a 1 h (0.429 a 0.337

$\mu\text{g Au/mL}$), mientras que en el caso de los NPrO aumentó, pasando de un valor de 0.405 a 1.235 $\mu\text{g Au/mL}$. Esta diferencia en el comportamiento entre ambos nanosistemas puede ser atribuible a la influencia de la forma de las nanopartículas en su biodistribución. Cuando una droga o nanopartícula es administrada por la vía intranasal puede llegar al SNC a través de los nervios olfatorios y/o los nervios trigeminales, y en paralelo puede ser absorbido por los vasos pertenecientes a la región respiratoria y pasar a circulación sistémica [1]. Sin embargo, no existe información en literatura respecto de cómo la forma de las nanopartículas de oro podría influenciar en los procesos de transporte desde la cavidad nasal al SNC y la circulación sistémica. Por otro lado, la cantidad de oro en plasma 1 h post administración para NEO-D1-CAR fue de 0.016 $\mu\text{g Au/mL}$, unas 20 y 80 veces menos que lo observado para NEO-D1 y NPrO-D1, respectivamente. Este resultado, sumado a la menor cantidad encontrada en bulbo olfatorio comparado con NEO-D1 y NPrO-D1, podría deberse a la viscosidad otorgada por el carbopol al nanosistema NEO-D1-CAR, lo que aumentaría su retención en la cavidad nasal, disminuyendo su tráfico tanto al bulbo como a circulación sistémica.

Por motivos bioéticos, se decidió no utilizar más animales en esta etapa de resultados preliminares. Mediante el análisis de los resultados obtenidos, se puede determinar la ventana de tiempo a la cual los siguientes experimentos deben realizarse, así como también que nanosistemas utilizar. Ya que la mayor cantidad de oro observada en cerebro fue a las 0.5 h con el sistema NEO-D1, y el objetivo de esta tesis planteado en un comienzo era evaluar la llegada de NPrO al SNC, se

decidió continuar trabajando con ambos nanosistemas sin recubrirlos con polímeros.

6.2 Comparación en la llegada al SNC entre NPrO-D1 y NEO-D1

Considerando los resultados preliminares se decidió determinar, con un $n = 3$, si la forma de la nanopartícula puede influenciar en su acumulación en cerebro, bulbo olfatorio, y plasma luego de 0.5 h post administración IN, utilizando los nanosistemas NEO-D1 y NPrO-D1, (Fig. 6.2). En este caso los resultados fueron expresados tanto como los niveles de oro encontrados ($\mu\text{g Au}$, Fig. 6.2A-C), así como también por el número de nanopartículas ($n^\circ \text{ NP}$, Fig. 6.2D-F), debido a que a pesar de que la superficie de los nanosistemas es similar y se administró la misma dosis ($n^\circ \text{ NP/mL}$), la cantidad de átomos de oro que contiene una nanopartícula es diferente para NEO y NPrO.

Los resultados muestran que existe una mayor cantidad de oro al utilizar NEO en comparación con los NPrO en todas las muestras analizadas (Fig. 6.2A-C). En el caso del cerebro, los niveles de oro son 6 veces más para NEO en comparación con los NPrO, mientras que en bulbo y plasma esta diferencia es alrededor de 5 a 2 veces más, respectivamente. Solo en cerebro estas diferencias fueron significativas (Fig. 6.2A). Sin embargo, es importante considerar que debido a que se administraron las mismas cantidades de nanopartículas para comparar ambos nanosistemas, y no las mismas cantidades de oro, calcular el número de nanopartículas por tejido y plasma resulta más útil al momento de comparar. Ya que se conocen las dimensiones promedio tanto de las esferas como de los prismas

utilizados, se determinó la cantidad de oro que posee una nanopartícula esférica y una con forma de prisma.

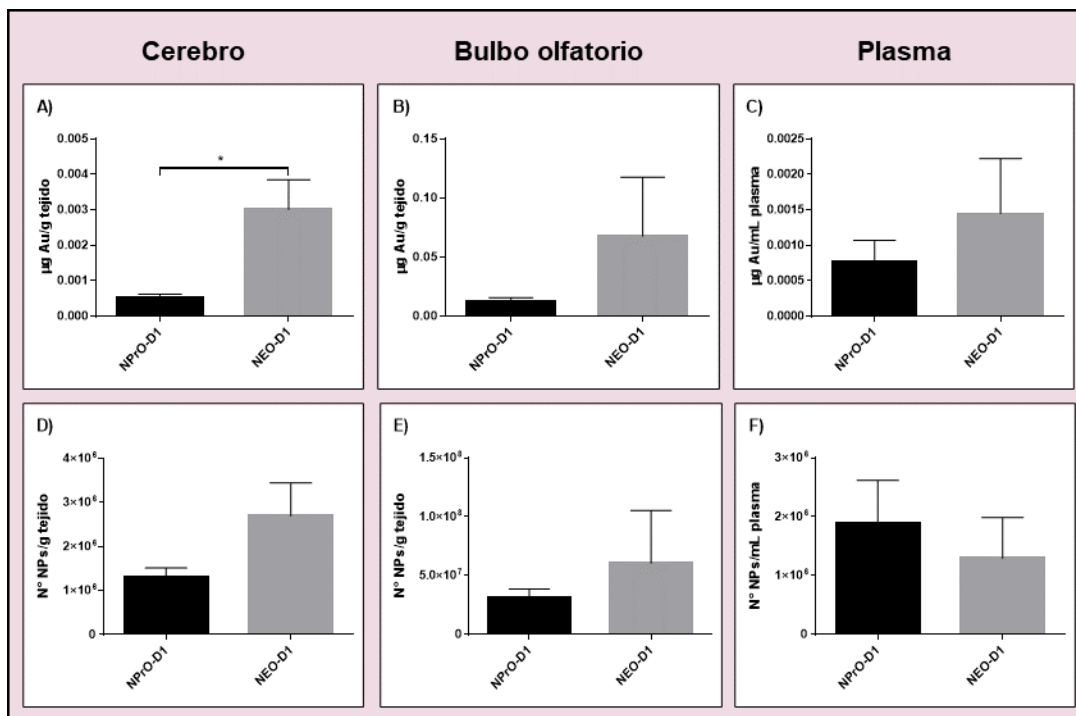


Fig. 6.2. Cuantificación de oro 0.5 h post administración IN de NPrO-D1 y NEO-D1. Se comparó la acumulación de oro en cerebro (A y D), bulbo olfatorio (B y E) y plasma (C y F) entre los dos nanosistemas. Se determinó los microgramos de oro (A-C) y el número de nanopartículas por tejido (D-F). * = $p < 0.05$, prueba t de Student, $n = 3$. Los resultados se muestran como promedio \pm ES. Dosis utilizada de 4.5×10^{11} nanopartículas/kg de peso animal.

Al comparar los datos obtenidos de esta manera, las diferencias entre un sistema y otro no son iguales a cuando se comparan por cantidad de oro. Tanto en cerebro como en bulbo (Fig. 6.2D y E), se observa que a pesar de que existe alrededor del doble de NEO-D1 en relación con los NPrO-D1 (2.7×10^6 sobre 1.3×10^6 , y 6.1×10^7 sobre 3.1×10^7 , respectivamente), estas diferencias no son significativas. Sorprendentemente, en el caso de las muestras de plasma, se observa un cambio en la tendencia observada al analizar los resultados por $\mu\text{g Au/mL}$, observándose

una mayor cantidad de NPrO-D1 en relación con NEO-D1, con valores de 1.9×10^6 y 1.3×10^6 nanopartículas por mL, respectivamente (Fig. 6.2F). A pesar de que las diferencias entre un nanosistema y otro se ven disminuidas al analizar los datos de esta manera, se sigue observando la tendencia de que NEO-D1 llegan en mayor proporción al SNC.

Actualmente existen pocos estudios en literatura que evalúen la llegada de nanopartículas metálicas desde la cavidad nasal al cerebro. La mayoría de los estudios han estado enfocados en toxicidad neuronal como resultado de contaminación ambiental de nanopartículas metálicas, en lugar del desarrollo de terapias o métodos de diagnóstico para SNC [2-7]. El primer estudio en que se utilizan nanopartículas de oro fue publicado hace 50 años, en el cual se aplicó ^{198}Au coloidal a la mucosa de la región olfatoria de conejos, detectándose oro en el líquido cefalorraquídeo de la fosa craneal anterior [8]. A la fecha, no se entiende completamente el mecanismo por el cual las nanopartículas son transportadas directamente desde la cavidad nasal al cerebro, y solo se han descrito las dos vías que inervan el epitelio de esta cavidad. Estos son los nervios olfatorios y nervios trigeminales, los cuales ingresan al cerebro a través del bulbo olfatorio y el puente de Varolio, respectivamente [9]. Hutter y colaboradores [10] estudiaron el efecto de la morfología de nanopartículas de oro (esferas, varillas, y erizos – recubiertas con PEG o CTAB) sobre la respuesta de la microglía post administración IN, para lo cual se evaluó la activación del receptor transitorio tipo toll 2 (TLR-2) en un modelo murino transgénico. Los resultados mostraron que la morfología y la química superficial influencia la activación de la microglía. Aunque los autores no evaluaron

la cantidad de oro que llega al SNC, experimentos *in vitro* revelaron que el grado de internalización para las formas anisotrópicas, especialmente para los erizos, fue mayor comparado a las esferas, lo que llevo a los investigadores a sugerir que los nanoerizos son preferentemente capturados por la microglía. A pesar de que los NPrO son diferentes a los nanoerizos, nuestros datos *in vitro* sugieren que las NEO entran a las células en mayor medida que los NPrO. Tomando esto en consideración, se puede suponer que un escenario similar ocurre cuando los nanosistemas son administrados intranasalmente, donde NEO-D1 penetrarían las células en una mayor proporción que NPrO-D1, facilitando su translocación desde la cavidad nasal al SNC (cerebro y bulbo olfatorio). Además del bulbo olfatorio, las nanopartículas de oro pueden ser transportadas a través los nervios trigeminales. Ye y colaboradores [11] evaluaron mediante el uso de una radiación de ultrasonido enfocada combinada con microburbujas (*FUSIN*) la llegada de *nanoclusters* de oro (6 nm de diámetro hidrodinámico) al SNC utilizando la vía IN en ratones hembra C57BL/6. Los autores encontraron que el uso de *FUSIN* aumenta la llegada de los *nanoclusters* al SNC, y que estos se encuentran presentes en los nervios trigeminales. Sin embargo, debido a que los investigadores midieron la intensidad de fluorescencia y radiactividad en lugar de una cuantificación directa de oro, sumado a que en esta tesis no se realizó el aislamiento del nervio trigeminal, el grado de transporte de NEO-D1 y NPrO-D1 a través de este nervio no puede ser estimado y debe ser investigado en el futuro.

La diferencia observada en la llegada al cerebro entre NEO-D1 y NPrO-D1 luego de ser administrados intranasalmente puede ser explicada por la diferencia en la forma

en que estas nanopartículas interactúan con la membrana celular. Otra explicación podría ser la diferencia en la absorción desde la cavidad nasal a circulación sistémica, y luego a través de la BHE al cerebro. Sin embargo, a pesar de que no podemos descartar este proceso, parece poco probable. Primero, no existen diferencias significativas en los niveles de oro monitorizados en plasma a las 0.5 h, y segundo, ni NEO-D1 ni NPrO-D1 poseen alguna molécula o característica fisicoquímica (como podría ser la hidrofobicidad), que se sepa que facilite su transporte a través de la BHE.

Finalmente, al comparar la cantidad de oro que se observa en cerebro luego de administrar las NEO-D1 entre este experimento y los resultados preliminares, se observa una gran disminución, cercana a 100 veces menos. Una posible explicación para este cambio tan drástico en los valores observados es una diferencia experimental que se realizó entre el ensayo preliminar y este experimento (Fig. 6.1 y 6.2, respectivamente). En el primer caso, el procedimiento quirúrgico para extraer la muestra de sangre y realizar la perfusión se hizo sobre los 30 minutos, ya que el animal fue anestesiado poco antes de alcanzar dicho tiempo. En cambio, en el caso del segundo experimento (Fig. 6.2), los animales fueron anestesiados alrededor de 8 minutos previo a las 0.5 h, por lo cual la perfusión del animal se realizó justo al tiempo estipulado. A pesar de que esta diferencia en tiempo no son muchos minutos, considerando los datos obtenidos en ambos experimentos se puede presumir que el pico de acumulación de oro en SNC ocurre en una pequeña ventana de tiempo (Fig. 6.1 y 6.2). Debido a esto, y teniendo en cuenta que siempre la tendencia de acumulación de oro en SNC mostró mayores niveles para esferas, se

procedió a realizar un análisis farmacocinético con NEO-D1 luego de ser administradas por la ruta IN.

6.3 Farmacocinética de NEO-D1 administradas por vía IN

Debido a que la acumulación de las nanopartículas en cerebro luego de la administración IN es uno de los principales objetivos de esta tesis, es importante determinar cuándo NEO-D1 alcanza su máximo nivel en el SNC (t_{max}) y cuando este es eliminado del plasma y otros órganos. Para evaluar esto, se realizó un estudio farmacocinético en ratas (Fig. 6.3). Los animales fueron sacrificados luego de 0.75, 2, 4, 8, y 24 h post administración IN de NEO-D1 (n = 3 para cada grupo). Los órganos perfundidos fueron liofilizados, triturados, y homogenizados. Una cantidad de peso conocida de cada muestra fue analizada mediante activación neutrónica para determinar la cantidad de oro, debido a que esta técnica es más sensible que el ICP-MS. Se obtuvo los niveles de oro para cerebro, bulbo olfatorio, plasma, e hígado versus un periodo de tiempo de 24 h (Fig. 6.3A-D). El nivel máximo de concentración de oro (C_{max}) fue encontrado en cerebro, bulbo olfatorio, y plasma a las 0.75 h post administración IN. Estas concentraciones son significativamente mayores a las encontradas en la Fig. 6.2, en donde se determinó los niveles de oro a las 0.5 h. Durante este intervalo de 15 min, el nivel de oro en cerebro aumentó 35 veces a $0.106 \pm 0.019 \mu\text{g Au/g}$, mientras que en bulbo olfatorio y plasma aumentó 3 y 15 veces ($0.175 \pm 0.055 \mu\text{g Au/g}$ y $0.021 \pm 0.004 \mu\text{g Au/mL}$, respectivamente). Por otro lado, a pesar de que nuevamente la cantidad de oro no es tan alta como la

observada en el preliminar (Fig. 6.1), resulta notoria la diferencia que existe en apenas 15 minutos de diferencia entre un experimento y otro.

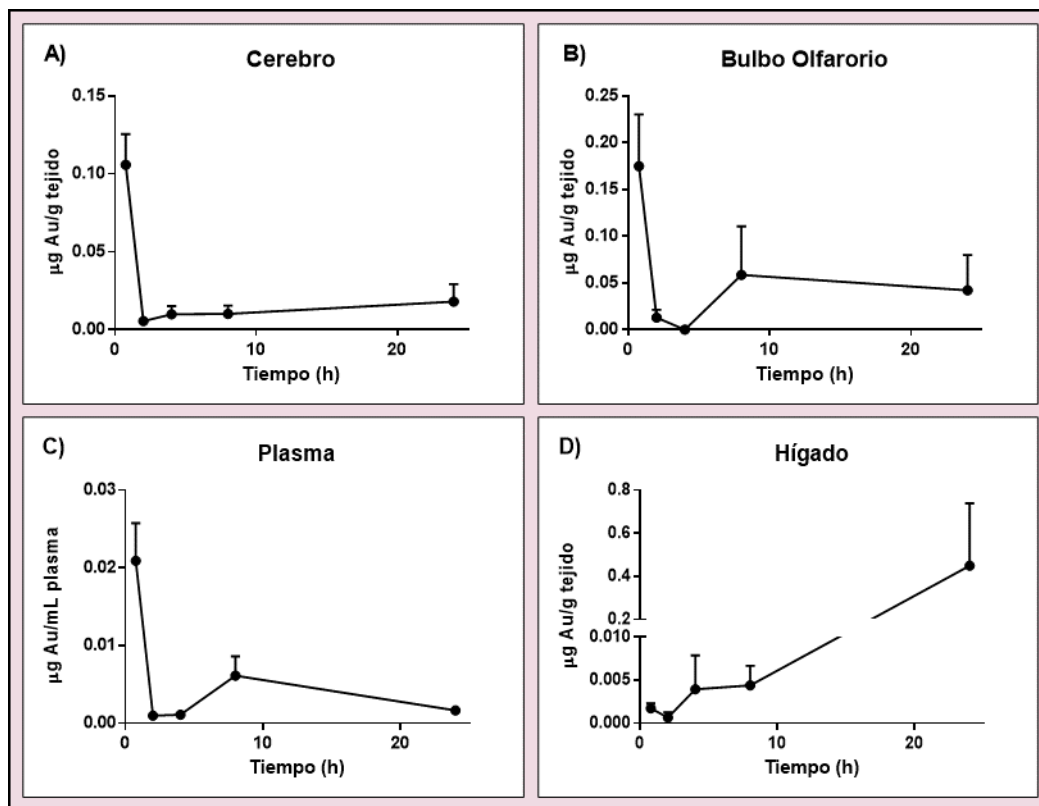


Fig. 6.3. Estudio farmacocinético post administración IN. Se determinó la cantidad de oro en cerebro (A), bulbo olfatorio (B), plasma (C), e hígado (D) a las 0.75, 2, 4, 8, y 24 h post administración IN de NEO-D1. Los resultados se muestran como promedio \pm ES. Dosis utilizada de 4.5×10^{11} nanopartículas/kg de peso animal.

Desde las 0.75 h a las 2 h post administración, una rápida fase de eliminación fue evidenciada en cerebro, bulbo olfatorio y plasma. Una posible explicación para esta rápida eliminación de NEO-D1 del SNC, es que debido a que las ratas utilizadas corresponden a animales sanos que no sobre expresan placas amiloides, el péptido D1 no tiene una interacción específica con algún componente celular que permita la retención del nanosistema en cerebro, por lo que es depurado del SNC. La

eliminación de oro en cerebro fue seguida de una absorción adicional de oro que se mantuvo constante hasta las 24 h. A diferencia del pequeño aumento de oro en cerebro, un segundo pico fue observado tanto en bulbo olfatorio como en plasma 8 h post administración, el cual decayó a niveles relativamente bajos a las 24 h. Sin embargo, en el caso del hígado los niveles de oro se fueron elevando lentamente durante las primeras 8 h, para luego observarse una rápida acumulación entre las 8 y 24, con un aumento de 100 veces alcanzando el valor de 0.45 $\mu\text{g Au/g}$ de tejido.

Los datos indican que la translocación de NEO-D1 desde la cavidad nasal al cerebro ocurre en dos picos el primero donde una gran carga de NEO-D1 llega al cerebro en un periodo corto de tiempo (0.75 h), seguido por una absorción lenta resultando en una pequeña acumulación de oro. Este interesante fenómeno se puede explicar por: (1) Dos posibles mecanismos involucrados que poseen diferente penetrabilidad al SNC o la existencia de dos rutas anatómicas desde la nariz al cerebro (una más rápida que la otra), y (2) una llegada directa desde la cavidad nasal al cerebro seguida de un transporte sistémico indirecto de las nanopartículas a través de la BHE. Un ejemplo asociado a la segunda explicación puede ser la administración IN de sumatriptan, el cual muestra un comportamiento farmacocinético de absorción sistémica de dos picos [12]. El sumatriptan es un agonista selectivo que actúa los receptores vasculares de 5-hidroxitriptamina (5-HT_{1B/1D}), utilizado para el tratamiento de ataques de migraña. Se encontró que un pico temprano más pronunciado representa la absorción nasal directa, y un pico tardío reducido representa predominantemente una absorción gastrointestinal (GI) indirecta.

Finalmente, es importante considerar que debido a que el blanco terapéutico de NEO-D1 es la proteína βA , el tiempo de residencia del nanosistema en el cerebro va a estar fuertemente influenciado por la interacción entre éste y los agregados de proteína. En este trabajo se utilizaron ratas Sprague Dawley silvestres, las cuales no presentan la EA por lo que no existiría una cantidad de agregados y/o placas βA que mantuviesen a las nanopartículas en cerebro. En el caso de utilizar animales transgénicos que expresen la enfermedad (ratones APP), se esperaría que la farmacocinética de NEO-D1 en cerebro fuese similar a las 0.75 h (rápida acumulación), pero a partir de este punto presentara una depuración más lenta (pendiente menos inclinada) y/o que existiese una mayor acumulación en cerebro (C_{max} mayor y t_{max} desplazada a mayor tiempo) debido a la específica y fuerte unión del nanosistema con los agregados βA .

Considerando los datos obtenidos, se decidió comparar la acumulación de NEO-D1 en SNC y otros tejidos a las 0.75 h luego de ser administrados tanto por la vía IN, como por IV.

6.4 Comparación entre la ruta IN e IV para NEO-D1

Se determinó los niveles de oro en cerebro, bulbo olfatorio, plasma, hígado, bazo, y pulmones a las 0.75 h post administración de NEO-D1 por vía IN e IV (Fig. 6.4). Los niveles de oro encontrados en cerebro, bulbo olfatorio, y plasma fueron significativamente mayores luego de la administración IN comparada con la ruta IV (Fig. 6.4A-C). Una concentración de 0.106 μg Au/g de tejido fue encontrada en cerebro post administración IN mientras solo 0.002 ng Au/g de tejido fue encontrada

en el mismo órgano por la vía IV ($p < 0.01$). Similarmente, se encontraron $0.17 \mu\text{g Au/g}$ de tejido en bulbo olfatorio 45 min post administración IN en relación con los $0.007 \mu\text{g Au/g}$ de tejido encontrados por la ruta IV ($p < 0.05$). La tasa de eliminación de las nanopartículas de oro en plasma fue reflejada por un significativo aumento de oro en hígado luego de la administración IV, con un valor promedio de $2.5 \mu\text{g Au/g}$ de tejido, mientras que solo $0.002 \mu\text{g Au/g}$ de tejido fueron detectados en este órgano por la vía IN. Diferencias similares en los niveles de oro fueron encontradas en bazo, con valores de $2.3 \mu\text{g Au/g}$ de tejido y $0.002 \mu\text{g Au/g}$ de tejido post administración IV e IN, respectivamente. Pequeñas cantidades de oro llegaron a los pulmones luego de ambas administraciones, donde la diferencia entre ellas fue de $0.03 \mu\text{g Au/g}$ tejido (IV) y $0.001 \mu\text{g Au/g}$ tejido (IN).

Los niveles de oro en plasma luego de la administración IN fueron significativamente mayores a los obtenidos post administración IV, con valores de $0.02 \mu\text{g Au/mL}$ (IN) y $0.0006 \mu\text{g Au/mL}$ (IV) ($p < 0.05$), indicando que las nanopartículas de oro se desplazaron de la cavidad nasal a la sangre. Debido a que en el caso de la vía IV toda la dosis administrada queda inmediatamente biodisponible, esta se comienza a biodistribuir y acumular en distintos órganos, lo que lleva a que desde el tiempo cero, que es donde se encuentra el máximo de oro en plasma, comience a disminuir. Por otro lado, en el caso de la vía IN, la dosis administrada se encuentra en la cavidad nasal, pasando a la vía sistémica de manera mucho más lenta, desplazando el tiempo al cual se encuentra el máximo de oro en plasma. Por lo tanto, la diferencia de oro que se observa ya a los 45 minutos post administración en plasma se debería a que la farmacocinética por una vía y otra son distintas.

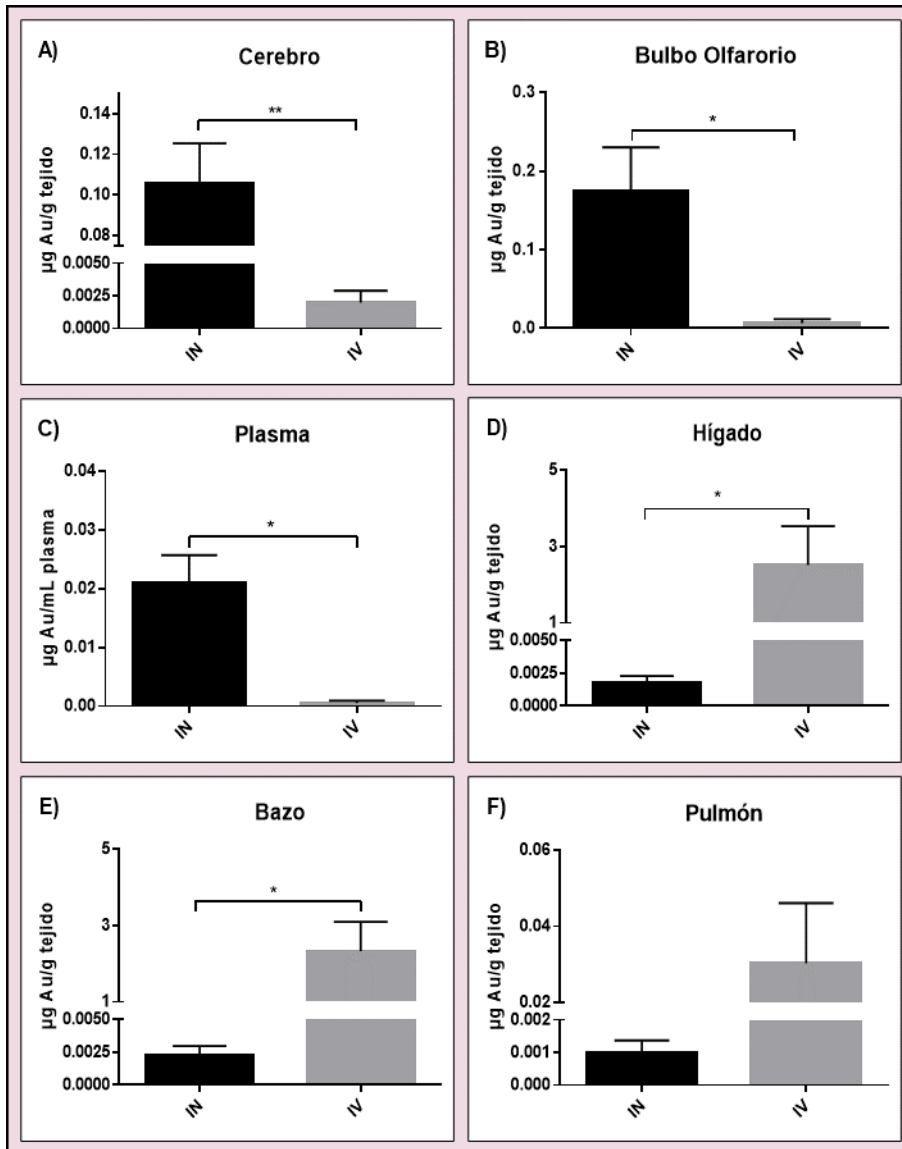


Fig. 6.4. Cuantificación de oro 0.75 h post administración IN e IV de NEO-D1. Se comparó la acumulación de oro en cerebro (A), bulbo olfatorio (B), plasma (C), hígado (D), bazo (E), y pulmones (F). Para cerebro $p < 0.01$, y para el resto $p < 0.05$, prueba de t de Student, $n = 3$. Los resultados se muestran como promedio \pm ES. Dosis utilizada de 4.5×10^{11} nanopartículas/kg de peso animal.

Estos resultados demuestran que aplicando el mismo nanosistema, su llegada a SNC es mayor cuando se utiliza la ruta IN, obteniéndose una razón de 55 entre los niveles de oro encontrados en cerebro post administración IN:IV, o expresado como porcentaje de dosis administrada, un 0.05 vs 0.001 % entre la vía IN vs IV,

respectivamente (Fig. S.3). Los altos niveles de oro observados en cerebro por la ruta IN pueden explicarse principalmente por dos fenómenos: Evitar el paso a través de la BHE permite un transporte directo de NEO-D1 desde la cavidad nasal al cerebro, y la reducida exposición sistémica evita la retención de NEO-D1 en órganos como hígado y bazo, que consecuentemente reducen su biodisponibilidad.

Es importante destacar que el porcentaje de la dosis administrada que llega al cerebro por la ruta IN fue del 0.05% (Fig. S.3), lo cual es bastante similar al porcentaje encontrado en estudios anteriores en los que se utilizó la ruta IV o intraperitoneal [13, 14]. Sin embargo, aun considerando esto, se pueden mencionar dos ventajas de utilizar la ruta IN. Primero, debido a que el nanosistema no debe cruzar la BHE, no existe la necesidad de incorporar moléculas, como péptidos o ligandos, que permitan traspasar esta barrera intraperitoneal [14]. El nanosistema utilizado solo fue funcionalizado con PEG, para aumentar su estabilidad coloidal, y el péptido D1, que permite el reconocimiento de las agregados de A β ; es decir, se puede simplificar el diseño del nanosistema. Segundo, el porcentaje de dosis encontrado en hígado y bazo fue bastante bajo (0.01% y 0.001%, respectivamente, Fig. S.3) al momento en que se encontró el pico de concentración de NEO-D1 en SNC por vía IN (0.75 h). Estudios previos han mostrado que luego de la administración intraperitoneal o IV de nanopartículas de oro, estas presentan una alta acumulación en hígado y bazo al momento en que el nanosistema alcanza su máxima concentración en el SNC, con valores entre el 10 y 80% para hígado, y cercano al 15% en el caso del bazo [13, 14], muy por encima a lo encontrado por la vía IN. Es más, incluso considerando la máxima concentración encontrada en

hígado post administración intranasal (24 h, Fig. 6.3D), este porcentaje no supera el 2% de la dosis administrada.

En resumen, los resultados muestran claramente que mediante el uso de la ruta IN en lugar de la IV, se puede obtener una rápida y significativa llegada de nanopartículas de oro al SNC, evitando exposición sistémica y posibles efectos adversos. A pesar de esto, es relevante saber si la distribución de las nanopartículas en el cerebro se puede ver afectada por la vía de administración escogida. Por lo anterior, se realizó un ensayo que permitiera dilucidar la distribución de NEO-D1 en cerebro post administración IN e IV.

6.5 Distribución de NEO-D1 en cerebro post administración IN e IV

La diferencia en la llegada de NEO-D1 al cerebro entre la ruta IN e IV es interesante en misma, pero no provee información sobre cómo se distribuyen las nanopartículas en relación con la ruta de administración empleada. Se puede hipotetizar que la distribución a través de la vía IN resultaría en un gradiente de concentración desde el bulbo olfatorio al cerebelo, mientras una distribución más uniforme sería observada a través de la administración IV. Para determinar la distribución de NEO-D1 en cerebro y bulbo olfatorio, se administró intranasal e intravenosamente la misma dosis de NEO-D1 empleada en los estudios anterior, y el cerebro fue extraído luego de 0.75 h, fijado y seccionado (plano coronario) para ser analizados mediante microscopía óptica. La Fig. 6.5 muestra la localización de NEO-D1 en diferentes cortes de cerebro, desde el bulbo olfatorio al cerebelo. Además, se elaboró una

detallada lista de datos que muestra la localización donde se encontraron NEO-D1 (Tabla S.1).

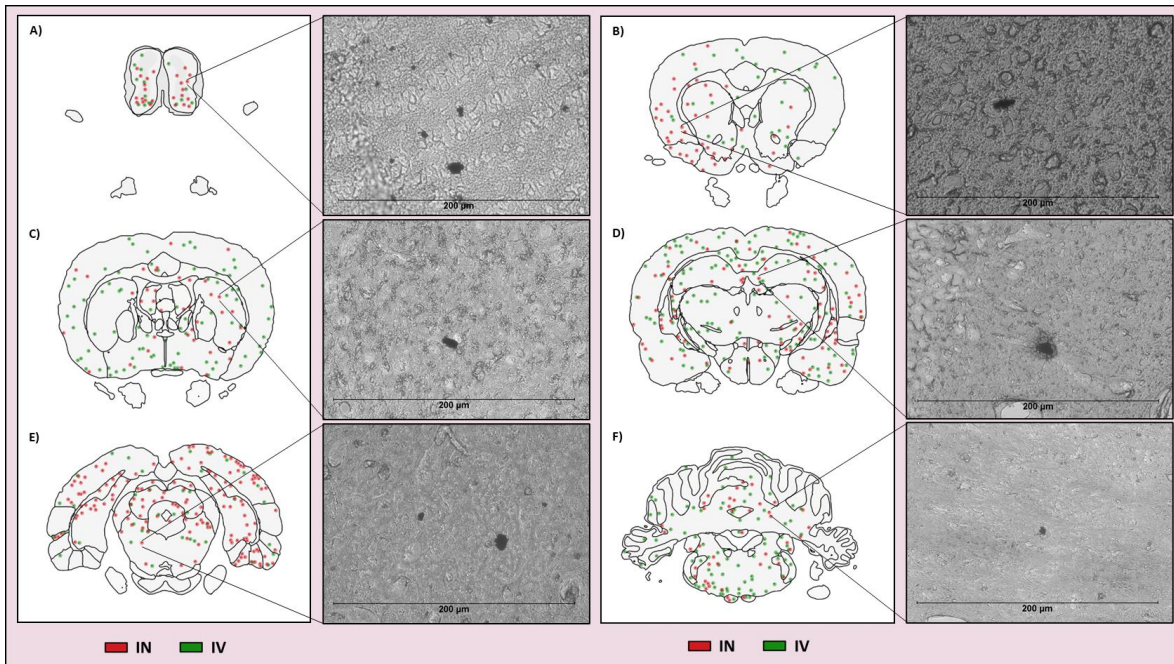


Fig. 6.5. Distribución de NEO-D1 en cerebro a las 0.75 h. Luego de la administración IN o IV, el cerebro fue fijado y seccionado (plano coronario) desde el bulbo olfatorio al cerebelo. Se utilizó el kit GoldEnhance™ para microscopía óptica para determinar y comparar la localización de NEO-D1. Los esquemas representativos muestran la biodistribución de NEO-D1 en diferentes planos coronarios: A) +9.18; B) +1.99; C) -0.2; D) -3.32; E) -6.76; and F) -10.82 mm ant. Bregma. Los puntos rojos y verdes representan los cúmulos de oro para la vía IN e IV, respectivamente. Imágenes obtenidas mediante microscopía óptica para la ruta IN se muestran como ejemplo para cada sección analizada. Dosis utilizada de 4.5×10^{11} nanopartículas/kg de peso animal.

Los resultados de la Fig. 6.5 muestran que en términos generales no existe mucha diferencia en la biodistribución del nanosistema entre la ruta IN e IV, a excepción del bulbo olfatorio. A pesar de que se esperaría una distribución en gradiente desde el bulbo olfatorio al cerebelo en el caso de la administración IN, y una menor cantidad aparente de cúmulos en el caso de la vía IV, considerando lo encontrado en los experimentos cuantitativos (Fig. 6.4), un fenómeno similar ha sido reportado

anteriormente [15]. Como esta metodología es cualitativa más que cuantitativa, y considerando el número de muestras analizadas, parece poco probable observar la misma diferencia “cuantitativa” mediante microscopía como la que se observó mediante ICP-MS y activación neutrónica. Incrementar el número de muestras y cortes podría ayudar a elucidar si estos resultados presentan algún sesgo. Por otro lado, es importante considerar que el nanosistema NEO-D1 administrado por vía IV debe haber sufrido cambios en su superficie debido a la corona de proteína, lo cual podría afectar su visualización mediante el kit Gold Enhance™.

Finalmente, calculamos el porcentaje de cúmulos oro en cada región del cerebro (Tabla S.1). El análisis muestra que un mayor porcentaje de NEO-D1 fue observado en el prosencéfalo basal, el tálamo y el cerebelo después de la inyección IV en relación con la administración IN, mientras que un porcentaje importante de las nanopartículas fue observado en el sustancia gris central, corteza perirrinal y entorrinal, bulbo olfatorio y región del hipocampo post administración IN. La región de la corteza mostró el mayor porcentaje de cúmulos de oro tanto con la administración IN como IV, con valores del 28% y 34%, respectivamente.

Cabe señalar que los resultados de la distribución cerebral de oro fueron específicos para t_{max} solamente (0.75 h), cuando la concentración de NEO-D1 en el cerebro es máxima post administración IN. La distribución de una nanopartícula en un tejido responde a un proceso dinámico, por lo que la localización determinada para NEO-D1 en distintas zonas del cerebro corresponde a un tiempo específico, y no representa necesariamente una distribución que se mantenga y no se altere en el tiempo. Debido a esto, sería relevante en el futuro realizar experimentos en los que

se evalúe el patrón de distribución en el transcurso del tiempo, lo cual se puede lograr utilizando tecnologías más avanzadas, como la tomografía computarizada. Una publicación reciente ha descrito el uso de esta técnica para la imagenología *in vivo* de exosomas marcados con nanopartículas de oro que se administraron intranasalmente a ratones macho C57BL/6 [16]. Los investigadores pudieron marcar la zona perteneciente al accidente cerebrovascular con los exosomas marcados, pudiendo ver esta marca de manera sostenida hasta 24 h post administración mediante el análisis por ICP-MS y tomografía computarizada.

La eficacia terapéutica y/o de diagnóstico de las nanopartículas de oro depende de su capacidad de llegar específicamente donde la enfermedad se desarrolla. El análisis de biodistribución en cerebro ha mostrado que NEO-D1 se localiza en las áreas pertenecientes a la corteza e hipocampo, las cuales son zonas del cerebro donde ocurre la acumulación de las placas A β . Estas zonas han sido ampliamente estudiadas en modelos murinos transgénicos de la enfermedad de Alzheimer [17-20]. Futuras investigaciones deben apuntar a evaluar la vía IN en modelos transgénicos de la enfermedad de Alzheimer (ratones APP), evaluando la localización de las nanopartículas en áreas del cerebro donde A β 1-42 se acumula. Es esperable que esta localización preferencial en la enfermedad de Alzheimer se logre debido a la interacción del péptido D1 en la superficie de la nanopartícula con los agregados tóxicos que caracterizan esta enfermedad. Los resultados en su conjunto comprueban la hipótesis planteada, demostrando que la vía intranasal puede ser utilizada por nanopartículas de oro para *drug delivery* al SNC, y que esta

ruta presentaría ventajas en acumulación y biodistribución en relación con la vía intravenosa.

Conclusiones

- Los resultados preliminares muestran que los nanosistemas con o sin recubrimiento de polímeros llegan al SNC post administración IN, siendo mayor la acumulación sin recubrimiento.
- La administración de IN reveló que a pesar de que ambos nanosistemas tenían características similares como área de superficie, diámetro hidrodinámico y carga superficial, su forma diferente influyó significativamente en su translocación de la cavidad nasal al cerebro, siendo mayor para las nanoesferas (NEO-D1) que para los nanoprismas.
- Los datos obtenidos de un estudio farmacocinético con NEO-D1 indicaron que la translocación de nanopartículas de la cavidad nasal al cerebro ocurre en dos fases, lo que puede atribuirse a la existencia de dos mecanismos de transporte, o la presencia de transporte directo / indirecto.
- A través de la comparación de la administración IN y IV de NEO-D1, obtuvimos resultados que respaldan firmemente el uso de la administración IN como una ruta prometedora para la entrega de fármacos y NPO al SNC, al tiempo que se evita la exposición sistémica.
- La distribución y localización de NEO-D1 en cerebro no se ve mayormente afectada según la ruta de administración utilizada.

Referencias

1. Casettari, L. and L. Illum, *Chitosan in nasal delivery systems for therapeutic drugs*. J Control Release, 2014. **190**: p. 189-200.
2. Elder, A., et al., *Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system*. Environ Health Perspect, 2006. **114**(8): p. 1172-8.
3. Liu, Y., et al., *Oxidative stress and acute changes in murine brain tissues after nasal instillation of copper particles with different sizes*. J Nanosci Nanotechnol, 2014. **14**(6): p. 4534-40.
4. Wu, J., T. Ding, and J. Sun, *Neurotoxic potential of iron oxide nanoparticles in the rat brain striatum and hippocampus*. Neurotoxicology, 2013. **34**: p. 243-53.
5. Yin, N., et al., *Silver nanoparticle exposure induces rat motor dysfunction through decrease in expression of calcium channel protein in cerebellum*. Toxicol Lett, 2015. **237**(2): p. 112-20.
6. Yin, N., et al., *Vitamin E attenuates silver nanoparticle-induced effects on body weight and neurotoxicity in rats*. Biochem Biophys Res Commun, 2015. **458**(2): p. 405-10.
7. Ze, Y., et al., *Molecular mechanism of titanium dioxide nanoparticles-induced oxidative injury in the brain of mice*. Chemosphere, 2013. **92**(9): p. 1183-9.
8. Czerniawska, A., *Experimental investigations on the penetration of ¹⁹⁸Au from nasal mucous membrane into cerebrospinal fluid*. Acta Otolaryngol, 1970. **70**(1): p. 58-61.
9. Lochhead, J.J. and R.G. Thorne, *Intranasal delivery of biologics to the central nervous system*. Adv Drug Deliv Rev, 2012. **64**(7): p. 614-28.
10. Hutter, E., et al., *Microglial response to gold nanoparticles*. ACS Nano, 2010. **4**(5): p. 2595-606.
11. Ye, D., et al., *Focused ultrasound combined with microbubble-mediated intranasal delivery of gold nanoclusters to the brain*. J Control Release, 2018. **286**: p. 145-153.
12. Djupesland, P.G., J.C. Messina, and R.A. Mahmoud, *Breath powered nasal delivery: a new route to rapid headache relief*. Headache, 2013. **53 Suppl 2**: p. 72-84.
13. Guerrero, S., et al., *Improving the brain delivery of gold nanoparticles by conjugation with an amphipathic peptide*. Nanomedicine (Lond), 2010. **5**(6): p. 897-913.
14. Velasco-Aguirre, C., et al., *Improving gold nanorod delivery to the central nervous system by conjugation to the shuttle Angiopep-2*. Nanomedicine (Lond), 2017. **12**(20): p. 2503-2517.
15. Talamini, L., et al., *Influence of Size and Shape on the Anatomical Distribution of Endotoxin-Free Gold Nanoparticles*. ACS Nano, 2017. **11**(6): p. 5519-5529.
16. Betzer, O., et al., *In Vivo Neuroimaging of Exosomes Using Gold Nanoparticles*. ACS Nano, 2017. **11**(11): p. 10883-10893.
17. Jankowsky, J.L., et al., *Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase*. Hum Mol Genet, 2004. **13**(2): p. 159-70.
18. Garcia-Alloza, M., et al., *Characterization of amyloid deposition in the APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer disease*. Neurobiol Dis, 2006. **24**(3): p. 516-24.
19. Jackson, R.J., et al., *Human tau increases amyloid beta plaque size but not amyloid beta-mediated synapse loss in a novel mouse model of Alzheimer's disease*. Eur J Neurosci, 2016. **44**(12): p. 3056-3066.
20. Cohen, R.M., et al., *A transgenic Alzheimer rat with plaques, tau pathology, behavioral impairment, oligomeric abeta, and frank neuronal loss*. J Neurosci, 2013. **33**(15): p. 6245-56.

Grado cumplimiento de objetivos

- 1) Sintetizar nanoprismas de oro y conjugarlos con HS-PEG y con el péptido D1 **(100%)**.
- 2) Recubrir el nanosistema con polímeros usando el método *layer-by-layer* y determinar la estabilidad **(100%)**.
- 3) Evaluar los cambios fisicoquímicos en las distintas etapas de conjugación **(100%)**.
- 4) Determinar la citotoxicidad del nanosistema mediante ensayos *in vitro* **(100%)**.
- 5) Evaluar la llegada al SNC del nanosistema luego de ser administrado intranasalmente **(100%)**.

Conclusiones generales

- Se desarrollaron nanosistemas basados en NPrO y NEO funcionalizados con PEG y D1, los cuales poseen parámetros fisicoquímicos similares.
- La disposición de D1 sobre la superficie de oro difiere según la forma de la nanopartícula a la cual se encuentra asociada.
- NPrO-D1 y NEO-D1 no afectaron la viabilidad celular de las líneas bEnd.3 y BV-2 en ensayos de 24 h en un rango de concentración entre 0.05 y 0.5 nM.
- Los nanosistemas con o sin recubrimiento de polímeros llegan al SNC post administración IN.
- La forma de las nanopartículas influye significativamente en su translocación de la cavidad nasal al cerebro.
- El estudio farmacocinético con NEO-D1 indica que la translocación de nanopartículas desde la nariz al cerebro ocurre en dos fases.
- Los resultados de la comparación entre administración IN e IV de NEO-D1 indican que la vía IN es una ruta prometedora para la entrega de fármacos y NPO al SNC, al tiempo que se evita la exposición sistémica.
- La distribución y localización de NEO-D1 en cerebro no se ve mayormente afectada según la ruta de administración utilizada.

Los resultados obtenidos validan la hipótesis de que nanopartículas funcionalizadas con PEG y D1, y recubiertas con polímeros, llegan al SNC luego de ser administradas por vía IN.

Perspectivas

Los resultados obtenidos dan cuenta de lo promisorio que es la ruta IN para el desarrollo de terapias y/o métodos de diagnóstico para enfermedades relacionadas con el SNC mediante la utilización de nanopartículas de oro. Considerando los niveles de oro alcanzados en cerebro, y la localización de las nanopartículas en este tejido, las futuras investigaciones deben apuntar a evaluar esta vía de administración en modelos transgénicos de la enfermedad de Alzheimer (ratones APP), determinando la localización de las nanopartículas en áreas del cerebro donde $A\beta_{1-42}$ se acumula. Si esta localización preferencial es conseguida a través de la interacción del péptido D1 con los agregados tóxicos de la proteína, el siguiente paso sería evaluar una posible terapia fototermal, determinando la carga de placas amiloides en los animales, así como también estudios de comportamiento que den cuenta del efecto de esta posible terapia.

Congresos

- [1] **Gallardo-Toledo, E.**, Tapia, A., Jara-Guajardo, P., Corrales, C., Sintov, A., Kogan, M.J. (2020) “*Administración intranasal de nanopartículas de oro funcionalizadas con polietilenglicol y péptido D1*”. XXXIII Jornada Chilena de Química, January 7-10, Puerto Varas, Chile.
- [2] Tapia, A., **Gallardo-Toledo, E.**, Celis, F., Campos, M., Carulla, M., Baez, M., Kogan, M. (2020) “*Efecto de la forma de la nanopartículas de oro sobre la cinética de agregación del péptido A β* ”. XXXIII Jornada Chilena de Química, January 7-10, Puerto Varas, Chile.
- [3] Tapia, A., **Gallardo-Toledo, E.**, Rivera, R., Carulla, M., Baez, M., Kogan, M. (2019) “*The shape of gold nanoparticles alters the aggregation kinetic of amyloid- β peptide*”. XLII Annual Meeting of the Chilean Biochemistry and Molecular Biology Society, October 8-11, Iquique, Chile.
- [4] Jara-Guajardo, P., **Gallardo-Toledo E.**, Tapia, A., Morales-Zavala, F., Kogan, M.J. (2018) “*Nanopartículas plasmónicas para mejorar la detección de agregados β -Amiloides por fluorescencia*”. V Congreso Nacional de Nanotecnología, November 25-29, Pucón, Chile.
- [5] Tapia, A., **Gallardo-Toledo, E.**, Jara-Guajardo, P., Kogan, M.J. (2018) “*Characterization of gold nanoprisms functionalized with a beta sheet breaker as a potential inhibitor in the Alzheimer’s disease*”. XI Young Scientist Symposium, May 24-25, Pessac, France.
- [6] **Gallardo-Toledo, E.**, Tapia, A., Jara-Guajardo, P., Corrales, C., Sintov, A., Kogan, M.J. (2018) “*Gold nanoprisms functionalized by organic polymers as a putative intranasal delivery platform for treatment of Alzheimer’s disease*”. 11th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, March 19-22, Granada, Spain.
- [7] **Gallardo-Toledo, E.**, Tapia, A., Jara-Guajardo, P., Corrales, C., Sintov, A., Kogan, M.J. (2018) “*Purificación y caracterización de Nanoprismas de Oro*”. XXXIII Jornada Chilena de Química, January 9-11, Puerto Varas, Chile.
- [8] Tapia, A., **Gallardo-Toledo, E.**, Jara-Guajardo, P., Corrales, C., Sierpe, R., Kogan, M.J. (2018) “*Influencia de la temperatura sobre la cinética de formación de nanoprismas de oro*”. XXXIII Jornada Chilena de Química, January 9-11, Puerto Varas, Chile.
- [9] Corrales, C., **Gallardo-Toledo, E.**, Tapia, A., Jara-Guajardo, P., Kogan, M.J., Celis, F. (2018) “*Caracterización del sistema Nanoprisma-Polietilenglicol-D1, mediante Espectrometría Raman*”. XXXIII Jornada Chilena de Química, January 9-11, Puerto Varas, Chile.
- [10] Jara-Guajardo, P., **Gallardo-Toledo E.**, Tapia, A., Sierpe, R., Corrales, C., Kogan, M.J. (2018) “*Determinación del coeficiente de extinción molar de Nanoprismas de oro para establecer la concentración de nanopartículas*”. XXXIII Jornada Chilena de Química, January 9-11, Puerto Varas, Chile.
- [11] Tapia, A., Rivera, R., **Gallardo-Toledo, E.**, Baez, M., Kogan, M.J. (2017) “*Effect of gold nanoparticles on β -amyloid peptide aggregation*”. XL Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile, September 26-29, Puerto Varas, Chile.
- [12] Tapia, A., Rivera, R., **Gallardo-Toledo, E.**, Jara-Guajardo, P., Baez, M., Kogan, M.J. (2017) “*Effect of gold nanoprisms on β -amyloid peptide aggregation*”. Workshop Novel Insights Into Chronic Diseases. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, September 25, Santiago, Chile.
- [13] **Gallardo-Toledo, E.**, Tapia, A., Jara-Guajardo, P., Corrales, C., Kogan, M.J. (2017) “*Síntesis y caracterización de nanoprismas de oro conjugados con polietilenglicol para aplicaciones en nanomedicina*”. XIV Jornadas de Investigación en Ciencia y Tecnología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, September 14, Santiago, Chile.

[14] Tapia, A., Ortiz, C. A., **Gallardo-Toledo, E.**, Sierpe, R., Kogan, M.J. (2016) "*Nanoprismas de oro funcionalizados con el péptido angiopep-2*". IV Congreso Nacional de Nanotecnología, September 5-7, Olmué, Chile.

[15] **Gallardo-Toledo E.**, Sintov A., Kogan M.J. (2016) "*Caracterización de nanopartículas de oro conjugadas con poli(etilenglicol) y polímeros para ser administradas a través de la ruta intranasal*". IV Congreso Nacional de Nanotecnología, September 5-7, Olmué, Chile.

Publicaciones

- [1] **Gallardo-Toledo, E.**, Tapia-Arellano, A., Celis, F., Sinai, T., Campos, M., Kogan, M.J., Sintov, A.C. (2020). Intranasal administration of gold nanoparticles designed to target the central nervous system: fabrication and comparison between nanospheres and nanoprisms. *International Journal of Pharmaceutics*. (Enviado).
- [2] Tapia-Arellano, A., **Gallardo-Toledo, E.**, Celis, F., Rivera, R., Campos, M., Carulla, N., Baez, M., Kogan, M.J. (2020). A low curvature degree of gold nanoparticles exposes amyloid- β hydrophobic residues promoting its aggregation by a surface catalysed nucleation mechanism. *Journal of Materials Chemistry B*. (Enviado).
- [3] Tapia-Arellano, A*, **Gallardo-Toledo, E***, Ortiz, C., Henríquez, J., Feijóo, C.G., Araya, E., Sierpe, R., Kogan, M.J. (2020). Functionalization with PEG/Angiopep-2 peptide to improve the delivery of gold nanoprisms to central nervous system: in vitro and in vivo studies. *Materials Science & Engineering C* (Enviado).
- [4] **Gallardo-Toledo, E.**, Velasco-Aguirre, C., Kogan, M.J. (2019). Book Chapter: Inorganic nanoparticles and their strategies to enhance brain drug delivery. Nanomedicines for brain drug delivery (Editors: Morales, J.O. & Gaillard, P. J.). *Springer Nature*. (En prensa).
- [5] Méndez-Rojas, C., Quiroz, G., Faúndez, M., Gallardo-Garrido, C., Pessoa-Mahana, C. D., Chung, H., **Gallardo-Toledo, E.**, ... & Zúñiga-López, M. C. (2018). Synthesis and biological evaluation of potential acetylcholinesterase inhibitors based on a benzoxazine core. *Archiv der Pharmazie*, 351(5), e1800024.
- [6] Velasco-Aguirre, C., Morales-Zavala, F., Salas-Huenuleo, E., **Gallardo-Toledo, E.**, Andonie, O., Muñoz, L., Rojas, X., Acosta, G., Sánchez-Navarro, M., Giralt, E., Araya, E., Albericio, F., Kogan, M.J. (2017). Improving gold nanorod delivery to the central nervous system by conjugation to the shuttle Angiopep-2. *Nanomedicine (Lond)*, 12, 2503-2517.
- [7] Sintov, A. C., Velasco-Aguirre, C., **Gallardo-Toledo, E.**, Araya, E., & Kogan, M. J. (2016). Chapter Six-Metal Nanoparticles as Targeted Carriers Circumventing the Blood–Brain Barrier. *International review of neurobiology*, 130, 199-227.
- [8] Velasco-Aguirre, C., Morales, F., **Gallardo-Toledo, E.**, Guerrero, S., Giralt, E., Araya, E., & Kogan, M. J. (2015). Peptides and proteins used to enhance gold nanoparticle delivery to the brain: preclinical approaches. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 4919-4936.

Financiamiento

Esta tesis fue desarrollada gracias a los fondos otorgados por la Beca Doctorado Nacional ANID (número 21151400); Proyecto FONDECYT (número 1170929); y proyecto FONDAP (número 15130011).

Material Suplementario

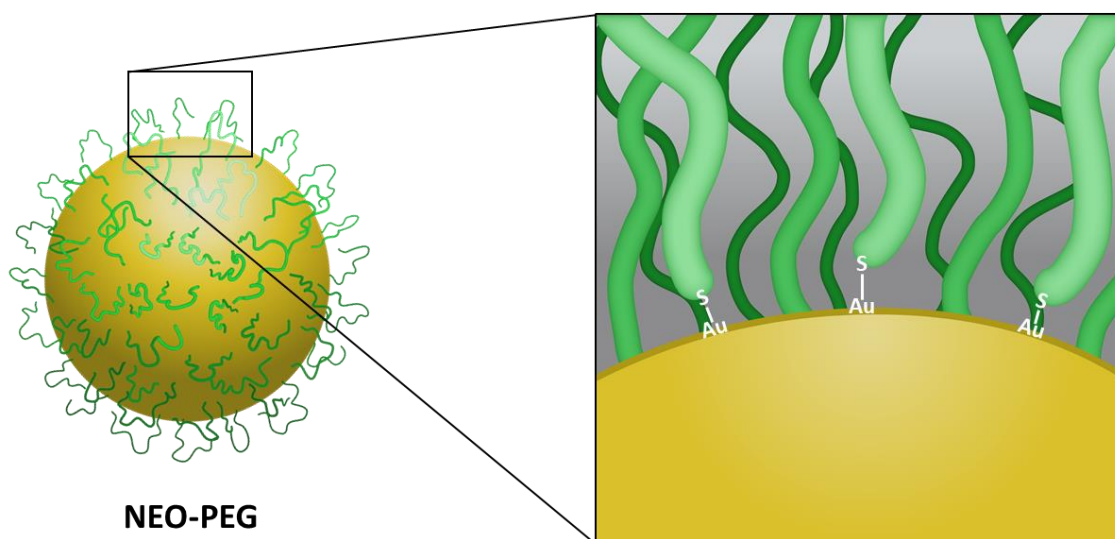


Fig. S.1. Esquema quemisorción a través del enlace S-Au. Representación esquemática de la funcionalización de una nanoesfera de oro con moléculas de HS-PEG-COOH. La unión se produce debido a la quemisorción entre los átomos de S, presentes en el grupo tiol del PEG, y los átomos de Au, presentes en la superficie de la nanopartícula. Energía de enlace = 86 Kcal/mol.

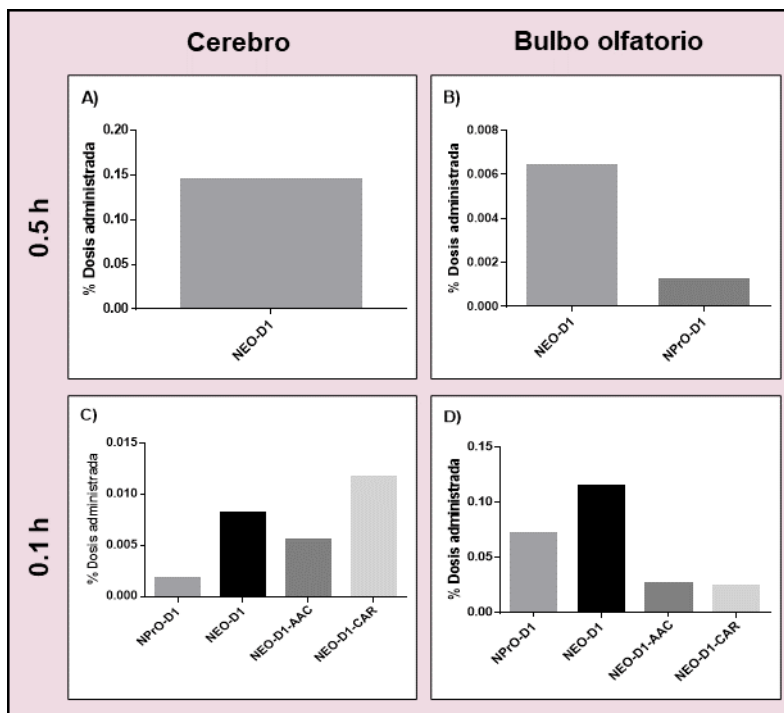


Fig. S.2. Porcentaje de dosis en ensayos preliminares de administración intranasal. Porcentaje de dosis administrada hallada en cerebro (A y C), y bulbo olfatorio (B y D) a 0.5 y 1 h post administración, respectivamente. Pevio a la remoción de los órganos, los animales fueron perfundidos con PBS. Las muestras fueron digeridas y analizadas mediante ICP-MS. n = 1. Dosis utilizada de 4.5×10^{11} nanopartículas/kg de peso animal.

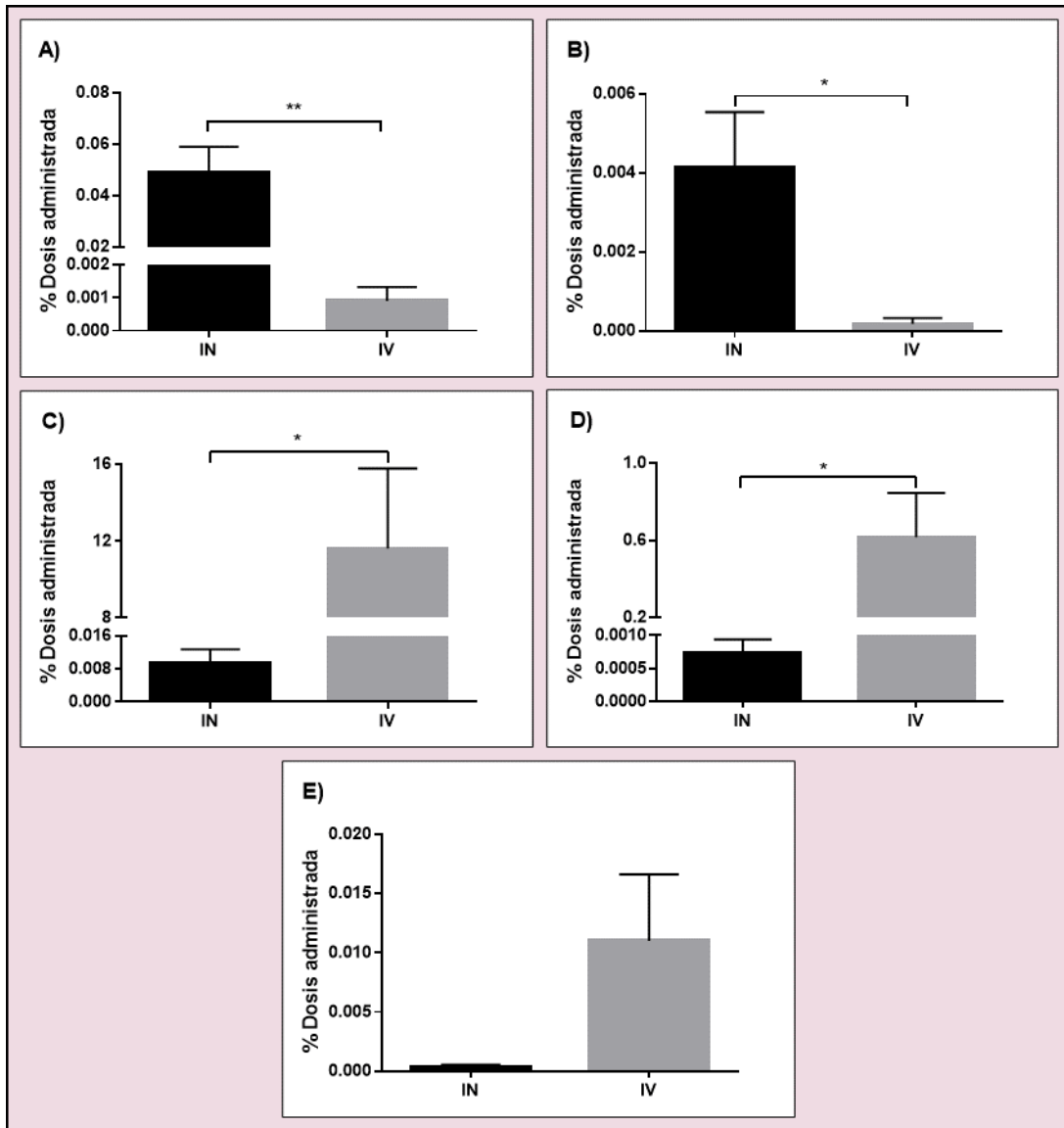


Fig. S.3. Porcentaje de dosis 0.75 h post administración IN e IV de NEO-D1. Se comparó el % de dosis en cerebro (A), bulbo olfatorio (B), hígado (C), bazo (D), y pulmones (E). Para cerebro $p < 0.01$, y para el resto $p < 0.05$, prueba de t de Student, $n = 3$. Los resultados se muestran como promedio \pm ES. Dosis utilizada de 4.5×10^{11} nanopartículas/kg de peso animal.

Tabla S.1. Distribución de NEO-D1 0.75 h post administración IN o IV. Regiones específicas del cerebro donde los cúmulos de oro fueron encontrados mediante microscopía óptica, con sus respectivos porcentajes.

| Región | % IN | % IV |
|---|------|------|
| <i>Área entorrinal dorsal-intermedia</i> | 0.7 | 0.5 |
| <i>Área entorrinal dorsal-lateral</i> | 0.2 | 0.2 |
| <i>Área entorrinal ventral-intermedia</i> | 1.6 | 0.2 |
| <i>Bulbo olfatorio</i> | 9.2 | 3.4 |
| <i>Capa gris superficial del colículo superior</i> | 1.1 | 0.3 |
| <i>Capa molecular del cerebelo</i> | 2.3 | 3.3 |
| <i>Capas profundas del colículo superior</i> | 3.2 | 1.4 |
| <i>Cerebelo profundo</i> | 3.0 | 3.6 |
| <i>Corteza</i> | 27.4 | 33.2 |
| <i>Corteza cingulada, área 2</i> | 0.5 | 0.5 |
| <i>Corteza perirrinal</i> | 1.8 | 0.7 |
| <i>Cuerpo calloso y materia blanca subcortical asociada</i> | 4.8 | 5.2 |
| <i>Cuerpo estriado</i> | 6.2 | 6.0 |
| <i>Fimbria del hipocampo</i> | 2.3 | 1.2 |
| <i>Formación hipocampal</i> | 4.6 | 7.0 |
| <i>Globo pálido</i> | 0.2 | 0.7 |
| <i>Núcleo trigémino-espinal</i> | 0.9 | 0.5 |
| <i>Pedúnculo cerebeloso inferior</i> | 0.7 | 0.7 |
| <i>Región hipotalámica</i> | 0.5 | 0.7 |
| <i>Región del prosencéfalo basal</i> | 3.9 | 6.5 |
| <i>Sistema ventricular</i> | 1.8 | 1.0 |
| <i>Subículo</i> | 7.6 | 1.4 |
| <i>Sustancia gris central</i> | 2.1 | 0.3 |
| <i>Sustancia negra</i> | 0.2 | 0.5 |
| <i>Tálamo</i> | 1.6 | 7.0 |
| <i>Tronco encefálico</i> | 10.1 | 9.8 |
| <i>Vías corticofugales</i> | 1.4 | 4.1 |