

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS



“Implicancias Farmacéuticas de la Conjugación de Péptidos a Nanopartículas de Oro: efectos sobre la interacción con proteínas plasmáticas, la estabilidad, la toxicidad y la biodistribución”

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

Por:

SIMÓN JUAN GUERRERO RIVERA

Directores de Tesis

**Dr. Marcelo Javier Kogan (Director)
Dr. Fernando Albericio (Co-Director)**

**SANTIAGO- CHILE
2013**

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN
RESIDENCIA

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Residencia presentada por el candidato:

SIMÓN JUAN GUERRERO RIVERA

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Doctor en Farmacología, en el examen de defensa de Tesis rendido el día.....de de 2013.

Directores de Tesis:

Dr. Marcelo Javier Kogan _____

Dr. Fernando Albericio _____

Comisión Informante de Tesis:

Dr. Guillermo Díaz A. (Presidente) _____

Dra. M^a Antonieta Valenzuela P. _____

Dr. Carlos Díaz V. _____

Dr. Michael Seeger P. _____

Dr. Roberto Ebensperger G. _____

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría comenzar agradeciendo a mis Padres y mi hermana, a los cuales les debo todos mis logros, pues es gracias a su apoyo que he podido salir adelante.

Al Dr. Marcelo Kogan, por quien tengo un gran respeto y admiración, le debo mi formación como científico, al cual considero no solo mi mentor sino también un amigo y del cual he recibido un apoyo incondicional a todas mis decisiones profesionales desde que me integré a su grupo de investigación el 2007. Además no puedo dejar de agradecer al Dr. Fernando Albericio, al Dr. Ernest Giralt, a la Dra. Eliandre de Oliveira y a sus laboratorios por su acogida y apoyo brindando en Barcelona.

A todos mis compañeros de laboratorio con los cuales he compartido estos años, de los cuales he aprendido tanto en lo profesional como en lo personal, les agradezco haber sido parte de este proceso. Es precioso remarcar que he tenido la suerte de conocerlos, de compartir, convivir y llevarnos muy bien, los quiero y respeto a todos y les deseo lo mejor. Debo agradecer especialmente a mis amigos mas cercano Pola, Juan, Seba, Magda, Claudio, Ana, Nataly, Edy, Caro, Natalia por su amistad y apoyo.

Quiero agradecer a la comisión por todo el apoyo dado en estos años, realizando criticas constructivas y siempre con la mejor disposición por ayudarme.

Finalmente agradecer a todos los que de una u otra manera influyeron para estar donde estoy.

A todos ustedes muchas gracias.

El desarrollo de esta tesis de doctorado se realizó gracias al trabajo en colaboración entre los laboratorios de Nanobiotecnología y Nanotoxicología, Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica, Universidad de Chile (Dr. Marcelo Javier Kogan) y Química Combinatoria, Departamento de Química Orgánica, Universidad de Barcelona (Dr. Fernando Albericio)

FINANCIAMIENTO:

Este trabajo contó con el apoyo y financiamiento de los siguientes proyectos:

Beca CONICYT 2009-2012 (Simón Guerrero)

Beca apoyo tesis Doctoral CONICYT 24110109/2011 (Simón Guerrero)

Proyecto FONDECYT 113045 (Marcelo Kogan)

Proyecto AECl (Fernando Albericio-Marcelo Kogan)

Los resultados obtenidos en esta tesis se presentaron en los siguientes congresos:

- (2011) **Guerrero S.**, Salas E., Vera A. M., Eggeling C., Mena J., Adura C., Albericio F., Kogan M. J. "Implicancias Farmacéuticas de la Interacción de Conjugados de Péptidos-Nanopartículas de Oro con Proteínas Plasmáticas". Modalidad Poster en V Escuela de Nano Estructuras– 4 eNE'11 I Taller en Nanociencia, CHILE, Antofagasta, 2011
- (2011) Araya E., Prades R., **Guerrero S.**, Salas E., Molina C., Zurita E., Teixidó M., Giralt E., Kogan M. J. "Mejorando la llegada de Nanopartículas de oro al cerebro, un posible uso para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas". Modalidad Poster en XXIX jornadas de Química, CHILE, Linares, 2011
- (2012) **Guerrero S.**, Salas E., Diaz R., Oliveira E., Albericio F., Kogan M. J. "Identificación de proteínas plasmáticas de relevancia farmacocinética que conforman la Corona de proteínas sobre conjugados Péptido-NpO con potenciales aplicaciones en Alzheimer". Modalidad exposición en II Congreso de Nanotecnología, CHILE, Valparaíso, 2012
- (2012) **Guerrero S.**, Salas E., Diaz R., Oliveira E., Albericio F., Kogan M. J. "Relevancias farmacocinéticas de proteínas identificadas en la corona de proteínas sobre conjugados de Péptidos-Nanopartículas de Oro con potenciales aplicaciones en la enfermedad de Alzheimer". Modalidad exposición en 3ª Escuela Latinoamericana de nanomedicinas y 2º Simposio Latinoamericano de Nanomedicinas, Argentina, San Luis, 2012

De los resultados desprendidos de esta tesis se obtuvieron las siguientes publicaciones:

- (2010) "Improving the brain delivery of gold nanoparticles by conjugation with an amphipathic peptide". **Guerrero S.**, Araya E., Fiedler J.L., Arias J.I., Adura C., Albericio F., Giralt E., Arias J. L., Fernández M^a. S., Kogan M. J. *Nanomedicine*, 5(6):897-913
- (2012) "Delivery of gold nanoparticles to the brain by conjugation with a peptide that recognizes the transferrin receptor". Prades R, **Guerrero S.**, Araya E., Molina C., Salas E., Zurita E., Selva J., Egea G., López-Iglesias C., Teixidó M., Kogan M. J. *Biomaterials*, 33 (29):7194–7205
- (2012) "Synthesis and in vivo evaluation of the biodistribution of a 18F-labeled conjugate gold-nanoparticle-peptide with potential biomedical application". **Guerrero S.**, Herance J. R., Rojas S., Mena J. F., Gispert J. D., Acosta G. A., Albericio F., Kogan M. J. *Bioconjugate chemistry*, 23 (3):399-408.
- (2013) "Stable conjugates of peptides with gold nanorods for biomedical applications with reduced effects on cell viability". Adura C., **Guerrero S.**, Salas E., Medel L., Riveros A., Mena J. F., Arbiol J., Albericio F., Giralt E., Kogan M.J. *ACS applied materials & interfaces*, 5 (10):4076-4085.

TABLA DE CONTENIDOS°

		Página
	Tabla de contenidos	V
	Índice de Figuras	IX
	Índice de Tablas	XII
	Abreviaturas	XIII
	Resumen	XVI
	Summary	XVIII
1	Introducción	1
1.1	Generalidades	1
1.2	Nanomateriales y fototerapia, posibles aplicaciones en salud.	2
1.2.1	Obtención de NE y NV para fines biológicos.	4
1.2.2	Funcionalización y estabilización de NpO para usos farmacéuticos.	6
1.2.3	Caracterización de NpO y Conjugados: Tamaño y carga, Espectrofotometría UV-Vis, TEM, DLS, pot-Z.	10
1.3	La enfermedad de Alzheimer (EA) y el uso de NpO.	15
1.3.1	Estrategias para el tratamiento de la EA empleando péptidos	18
1.3.2	Entrega selectiva de NpO hacia los AT-A β mediante el uso de péptidos	18
1.4	Farmacocinética, estabilidad, toxicidad y penetración celular de las NpO.	21
1.4.1	Pasaje de NpO a través de la BHE.	24
1.4.3	Estrategias para aumentar la llegada de las NpO al Cerebro.	26
1.5	Toxicidad de NpO.	28
1.6	Interacción de nanopartículas con proteínas plasmáticas, formación de la CP y su efecto sobre la farmacocinética, estabilidad y toxicidad	29
1.6.1	Formación de la CP.	31
1.6.2	Efectos de la CP sobre la farmacocinética y la toxicidad	34
1.6.3	Posibles efectos de NM sobre la estructura y función de las proteínas.	39
2	Hipótesis	41
3	Objetivo general	41
4	Objetivos específicos	42
5	Materiales y Métodos	43
5.1	Síntesis de las secuencias CLPFFD, CALNNLPFFD, CALNN,	43

	CpegLPFFD, Cpeg, THRPPMWSPVWPCLPFFD.	
5.2	Caracterización de los péptidos CLPFFD, CALNNLPFFD, CpegLPFFD, CALNN, Cpeg y THRPPMWSPVWPCLPFFD.	44
5.2.1	Cromatografía líquida de alta eficiencia.	44
5.2.2	Espectrometría de masas desorción/ionización láser asistida por matriz.	45
5.2.3	Análisis de aminoácidos.	46
5.3	Síntesis de NE, NV, obtención de conjugados y caracterización.	47
5.3.1	Preparación del material	47
5.3.2	Síntesis de NE	47
5.3.3	Síntesis de NV	48
5.3.4	Obtención de conjugados de NE con péptidos CLPFFD, CALNNLPFFD, CpegLPFFD, CALNN, Cpeg y THRPPMWSPVWPCLPFFD.	49
5.3.5	Obtención de conjugados de NV con el péptido CLPFFD.	49
5.4	Caracterización de las NpO y de los Conjugados NpO-péptidos	49
5.4.1	Caracterización por Espectrofotometría de absorción molecular.	50
5.4.2	Microscopía electrónica de transmisión.	51
5.4.3	Dispersión dinámica de la luz.	51
5.4.4	Potencial Z.	52
5.4.5	Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X.	52
5.4.6	Estimación del número de moléculas de péptido por NpO (NE y NV).	52
5.4.7	Activación neutrónica para la determinación de oro.	53
5.4.8	Fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo, con detector de masa o acoplado a un espectrofotómetro de emisión óptica.	53
5.4.9	Estimación de la concentración molar de NE y NV.	54
5.4.10	Análisis de aminoácidos.	55
5.5	Estudio de estabilidad de NpO y sus conjugados en PBS y plasma.	55
5.6	Evaluación de efectos de las NpO sobre la estructura y actividad de proteínas debidos a la interacción de NpO-péptido.	56
5.6.1	Efectos de NpO sobre la estructura secundaria de la albumina estudiados por dicroísmo circular (CD).	56
5.6.2	Estudio de la formación de fibras del péptido A β 1-42 en presencia de NpO.	57
5.6.2.1	Estudio de agregación de A β en presencia de NpO mediante	58

	fluorescencia de Th-T.	
5.6.2.2	Estudio de agregación de A β en presencia de NpO mediante TEM.	58
5.7	Evaluación de la viabilidad celular en presencia de NpO.	59
5.8	Identificación de las proteínas de suero y plasma que interactúan con NpO-péptido (CP).	60
5.9	Distribución de NE-CLPFFD ex vivo.	61
5.9.1	Detección de NE-CLPFFD por cuantificación de oro	62
5.9.2	Detección de NE-CLPFFD por microscopía de fluorescencia.	63
5.9.3	Determinación de integridad de BHE.	65
5.10	Distribución de NE-CLPFFD in vivo.	66
5.10.1	Marcaje radioactivo de NE para estudios in vivo.	66
5.10.2	Detección y estudios de distribución in vivo de NE.	68
5.11	Mejora de la llegada al cerebro de NE empleando THRCLPFFD, Distribución de NE-THRCLPFFD ex vivo.	69
5.11.1	Detección de NE-THCLPFFD en cerebro por TEM.	70
5.12	Evaluación de la potencialidad de la incubación de NE-péptido con ApoE, posible estrategia para mejorar la llegada al cerebro.	70
6	Resultados y Discusión	73
6.1	Objetivo específico	73
6.1.1	Caracterización de NE y NV por espectrofotometría de absorción molecular	73
6.1.2	Caracterización de NE y NV por microscopía electrónica de transmisión.	74
6.1.3	Caracterización de NE y NV por dispersión dinámica de la luz y potencial zeta	75
6.1.4	Determinación de la concentración de NpO.	76
6.2	Objetivo específico 2.	77
6.2.1	Caracterización de los péptidos CLPFFD, CALNNLPFFD, CALNN, CpegLPFFD, Cpeg, THRPPMWSPCLPFFD	77
6.3	Objetivo específico 3	78
6.3.1	Caracterización de los conjugados NpO-Péptidos por Espectrofotometría UV-Vis-NIR.	78
6.3.2	Caracterización de los conjugados NpO-Péptidos por TEM.	79
6.3.3	Caracterización de los conjugados NpO-Péptidos por DLS y pot-Z.	80
6.3.4	Determinación de la relación de moléculas de péptido/nanopartícula.	82

6.3.5	Evaluación superficial de las NpO por XPS.	84
6.3.6	Obtención, caracterización de CK y funcionalización de NE	89
6.4	Objetivo específico 4	92
6.4.1	Estudio de la estabilidad de NpO	92
6.4.2	Formación de la CP.	94
6.5	Objetivo específico 5	97
6.5.1	Efectos de las NpO sobre la viabilidad celular.	97
6.6	Objetivo específico 6	99
6.6.1	Estudio de interacción de NpO con proteínas, efectos sobre la agregación de A β .	99
6.6.2	Efectos de las NpO sobre la estructura secundaria de la albumina.	102
6.7	Objetivo específico 7	104
6.7.1	Identificación de las proteínas del plasma que se unen a los conjugados NpO-péptido por electroforesis en 2-D y LC-MS/MS.	104
6.8	Objetivo específico 8	110
6.8.1	Determinación de niveles de oro en cerebros de rata en función del tiempo luego de la administración intraperitoneal (experimentos ex vivo).	110
6.8.2	Determinación y comparación relativa de los niveles de oro en encontrados en hígado, bazo y riñón respecto a los encontrados en cerebro.	111
6.8.3	Localización de NpO en el cerebro.	115
6.8.4	Evaluación de la integridad de la BHE.	116
6.8.5	Estudios in vivo de distribución de NE-CLPFFD.	117
6.8.6	Estudio de distribución in vivo de NE-CK/CLPFFD.	119
6.8.7	Determinación de la capacidad de las NE-THRCLPFFD de cruzar la NHE.	125
6.8.8	Localización de las NE-THRCLPFFD en cerebro.	127
6.8.9	Distribución de las NE-THRCLPFFD.	128
6.8.10	Mejora en la llegada al cerebro de NpO-péptido pre-incubados con ApoE	129
7	Discusión general y perspectivas.	133
8	Conclusiones Generales	139
9	Bibliografía	141
10	Anexo	151

INDICE DE FIGURAS

		Pagina
Figura 1	Potenciales aplicaciones de NpO en aplicaciones farmacéuticas; Absorción y disipación local de energía	3
Figura 2	Destrucción in vitro de AT-A β involucrados en la EA utilizando NpO	3
Figura 3	Modelo de formación de una NE a partir de una síntesis química; Simulación de nucleación y crecimiento de NE	4
Figura 4	Representación esquemática de las 2 estructuras comúnmente empleadas sobre superficie de NpO para aplicaciones en drug-delivery	7
Figura 5	Esquema de funcionalización de una NE con tiopronina como espaciador conjugada al péptido GRGDSP.[35] B) NE cubierta con EG3SH y monofuncionalizada con AMU	9
Figura 6	Esquema de una NV recubierta con una bicapa de CTAB	9
Figura 7	Síntesis de NV por crecimiento mediado por núcleos.	11
Figura 8	Concepto de pot-Z.	14
Figura 9	Modelo de EA en donde se representan las placas amiloides y los ovillos neurofibrilares	17
Figura 10	Esquema teórico de la formación de las diferentes especies a partir de monómeros de A β	17
Figura 11	Estructura secundaria del péptido A β B) Secuencia de A β .	19
Figura 12	La conjugación de NE con el péptido anfipático CLPFFD afecta la carga y estabilidad.	20
Figura 13	Esquema para relacionar el diseño del conjugado NE-THRCLPFFD con su función in vivo.	27
Figura 14	Representación esquemática del des plegamiento de proteínas que interactúan con la superficie de una NP.	31
Figura 15	Representación de la CP.	32
Figura 16	Interacción de NP con la superficie celular	37
Figura 17	Biodistribución de NP determinada por interacciones con proteínas plasmáticas	38
Figura 18	Espectro de absorción UV-Vis de NE.	73
Figura 19	Caracterización de NE y NV por microscopia electrónica de transmisión.	74
Figura 20	Microfotografía de TEM de NE y NV	74

Figura 23	Distribución de tamaños en diámetro según % de intensidad determinado mediante DLS para NE y NV	75
Figura 24	Espectro de absorción de conjugados a NE y NV.	79
Figura 25	Imágenes obtenidas por TEM de conjugados	80
Figura 26	Esquema de funcionalización de NE con los péptidos CLPFFD, CpegLPFFD, CALNNLPFFD, CALNN y THRCLPFFD.	84
Figura 27	Espectro generales de XPS para NE y NV	85
Figura 28	Espectros XPS de alta resolución para energías de unión de los electrones 4f del oro en NE y NV-CTAB	86
Figura 29	Espectros XPS de alta resolución para energías de unión de los electrones 2p del azufre en NE y NV-CTAB.	86
Figura 30	Espectros XPS de alta resolución de NV-CTAB	89
Figura 31	Espectro de absorción de conjugados de NE-CK/CLPFFD; micrografía TEM de NE-CK/CLPFFD	90
Figura 32	Espectro de absorción de conjugados de NE-CK/CLPFFD antes y después de la unión a N-succinimidil-4-fluorobenzoato	91
Figura 33	Estabilidad de NpO en PBS y medio de cultivo celular DMEM suplementado con 10% de suero fetal bobino	92
Figura 34	Estabilidad de NpO en plasma humano, seguimiento por espectrofotometría Uv-Vis	93
Figura 35	Imágenes obtenidas por TEM luego de la incubación de las NpO-péptido con plasma	95
Figura 36	Ensayo de viabilidad en células SH-SY5Y tratadas con NE	98
Figura 37	Ensayo de viabilidad en células SH-SY5Y tratadas con NV	99
Figura 38	Intensidad de Fluorescencia de Tioflavina-T para el seguimiento del crecimiento de fibras de A β en 24h incubadas con NpO	100
Figura 39	Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión luego de la incubación de las NpO junto con A β .	101
Figura 40	Elipticidad residual media de BSA en presencia de NpO.	104
Figura 41	Gel en 2-D de una muestra de plasma humano	106
Figura 42	Geles 2D de Separación de proteínas presentes en la CP de los conjugados NpO	107
Figura 53	Perfil de acumulación en el tiempo de oro en cerebro de rata luego de una administración intraperitoneal de NE y NE-CLPFFD	111
Figura 44	Perfil de distribución de NE y NE-CLPFFD en bazo, hígado, riñón y	112

cerebro luego de una administración intraperitoneal en ratas.

Figura 45	Distribución en el tiempo de NE-CLPFFD-carboxifluoresceína.	118
Figura 46	Análisis de la integridad de la barrera hematoencefálica luego de tratar ratas con NE-CLPFFD	119
Figura 47	Imágenes representativas de escáner PET a los 120min transcurrida una inyección en ratas por vía intravenosa de una solución de NE-CK/CLPFFD*SFB[18F]	120
Figura 48	Gráfico de curvas del % de la dosis inyectada (DI) normalizado en gramos de tejido (%DI/gr) en el tiempo para los diferentes órganos analizados y evaluados por PET	121
Figura 49	Grafico mostrando el % de dosis inyectada (DI) normalizado en gramos de tejido (%DI/gr) calculado a partir de corte y conteo y también por escáner PET	122
Figura 50	Proporción de radioactividad en sobrenadante (respecto de la suma total de la señal del pellet+ sobrenadante) de una muestra de NE-CK/CLPFFD*SFB[18F].	124
Figura 51	Perfil de contenido de oro en el tiempo determinado en cerebros de ratas tratadas con NE; NE-CLPFFD; NE-THR; NE-THRCLPFFD	126
Figura 52	Micrografías obtenidas por TEM de cortes de cerebro en las regiones de hipocampo y corteza para la detección de NE-THRCLPFFD	129
Figura 53	Imágenes de Fluorescencia de cerebros extraídos a 2 y 24 horas post inyección intraperitoneal de NE-CLPFFD; NE-THRCLPFFD y de NE-CLPFFD@ApoE; NE-THRCLPFFD@ApoE.	130
Figura 54	Determinación de fluorescencia ex vivo.	131
Figura 55	Determinación de oro por activación neutrónica ex vivo	131

INDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Cuantificación de oro en NE y NV.	77
Tabla 2	Caracterización de péptidos por Espectrometría de masa, HPLC-MS y MALDI-TOF/MS	78
Tabla 3	Datos obtenidos de DLS y pot-Z para las NE y NV y sus conjugados.	81
Tabla 4	Determinación del N° de moléculas de péptido unidas a cada NE determinado a partir de Análisis de Aminoácidos y concentración de NE y NV.	83
Tabla 5	Datos obtenidos por XPS para la energía de los electrones Au4f7/2, Au4f5/2, esperándose la aparición de doblete en estas regiones de energía y también se espera la aparición de la señal correspondiente a los electrones de azufre, S2p.	88
Tabla 6	Evaluación de la formación de la CP por cambios en los valores de del diámetro hidrodinámico de las NpO.	94
Tabla 7	Cuantificación de proteínas obtenidas de las NpO-conjugadas luego de ser incubadas por 24h.	96
Tabla 8	Estructura secundaria, (α -hélice, lámina- β y espiral al alzar (RC)), análisis para BSA en ausencia y presencia de NpO.	103
Tabla 9	Resumen de las proteínas mas relevantes en cada CP unida a los diferentes conjugado identificadas desde los geles bidimensionales por medio de LC/MC/MC.	108
Tabla 10	Contenido de oro en los órganos de ratas, obtención de la dosis inyectada.	113
Tabla 11	Radiactividad obtenida en sobrenadante y pellet de una muestra de orina recogida luego de 1h de la inyección de NE-CK/CLPFFD*SFB[18F].	123
Tabla 12	Contenido de oro en cerebro.	123
Tabla 13	Perfil de acumulación de oro en hígado y bazo después de la administración intraperitoneal de NE-THRCLPFFD a ratas.	129

ABREVIATURAS

Aa	Aminoácidos.
AAA	Análisis de aminoácidos.
AAN	Activación neutrónica.
ACN	Acetonitrilo.
AE	Azul de Evans.
AMQ	6-Aminoquinolina.
ApoE	Apolipoproteína E.
AQC	6-Aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato.
AT	Agregados tóxicos proteicos.
AT- A β	Agregados tóxicos del péptido β -amiloide.
A β	Péptido β -amiloide.
A β	Proteína/péptido β -amiloide.
BHE	Barrera Hematoencefálica.
BOC	Tert-butil-oxi-carbonilo.
BZL	Bencilo.
CChEN	Comisión Chilena de Energía Nuclear.
CEMC	Células endoteliales de los microvasos cerebrales.
Cf	Carboxifluoresceína
CO3	Componente 3 del complemento.
CO4	Componente 4 del complemento.
CP	Corona de Proteínas.
CTAB	Bromuro de Cetil-trimetil-amonio.
DCM	Diclorometano.
DHB	ácido 2,5-dihidrobencóico.
DI	Dosis inyectada.
DLS	Dispersión dinámica de la luz.
DLVO	Teoría clásica de Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek.
DMF	Dimetil formamida.
EA	Enfermedad de Alzheimer.
ES	Electro espray.
FBS	Suero fetal bovino.
FDA	Agencia del gobierno de los E.E.U.U, responsable de la regulación de Alimentos y Fármacos.
Fmoc	9-Fluorenilmetoxicarbonilo.
gp-P	Enzima glicoproteína P.
GSH	Glutación reducido.
HCCA	α -ciano-4-hidroxicinamico.
HFIP	1,1,1,3,3,3-hexafluoro- 2-propanol.
HOBT	Hidroxibenzotriazol.
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia.
HPLC/MS	Cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de masa.
HPLC/PDA	Cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodo.
iA β 5p	Nombre para la secuencia peptídica Ac-LPFFD-NH ₂ .
ICP/MS	Espectrometría de Masas con fuente de Plasma de Acoplamiento

	Inductivo.
ICP/OES	Espectrometría de Emisión Óptica con fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo.
IEF	Isoelectroenfoque.
Ig	Inmunoglobulina.
LC-MS/MS	Cromatografía líquida acoplada a detector de masas en tándem.
LCR	Líquido Cefalorraquídeo.
LDLR	Receptor de lipoproteínas de baja densidad.
MALDI/TOF-MS	Espectrometría de masa por desorción/ionización mediante laser asistida por matriz, acoplada a un analizador de tiempo de vuelo.
MAO	Mono amino Oxidasa.
mPEG-SH	Metoxi-polietilenglicol-tiolado
MRI	Resonancia magnética de imagen.
MS	Espectrometría de masa.
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio.
MWCO	Peso molecular de corte.
NE	Nanoesferas.
NIR	Infrarrojo cercano.
NM	Nanomateriales.
NP	Nanopartícula.
NPM	Nanopartículas magnéticas.
NpO	Nanopartículas de oro.
NT	Nanotecnología.
NV	Nanovarillas.
OI	Imagen óptica.
PBS	Tampón fosfato salino.
Pdi	Polidispersidad.
Peg/PEG	Polietilenglicol.
PET	Tomografía de emisión de positrones.
pl	Punto isoeléctrico.
PLGA	Ácido poli (láctico-co-glicólico).
PMS	Metosulfato de Fenazina.
Pntn	Penetratina.
Pot-Z	Potencial Z.
PPA	Proteína precursora de amiloides..
PVDF	Fluoruro de polivilideno.
QD	Quantum dots
RAGE	Receptores para los compuestos de glicosilación avanzada.
RCF	Fuerza centrífuga relativa.
ROI	Región de interés.
ROS	Especies reactivas de oxígeno.
RPS	Resonancia de plasmón superficial.
RSH	Grupos tioles.
SDS-PAGE	Dodecil sulfato de sodio-electroforesis en gel de poliacrilamida.
SEM	Desviación estándar de la muestra.

SFB	Succinimil-4-fluorobenzoato.
SFM	Sistema fagocítico mononuclear.
SNC	Sistema nervioso central.
SPFS	Síntesis de péptidos en fase sólida.
tBU	Tert-butilo.
TCAB	Bromuro de tetra-octil-amonio.
TEM	Microscopía electrónica de transmisión.
TFA	Acido trifluoroacético.
Th-T	Tioflavina T.
THR	Péptido THRPPMWSPVWP.
THRCLPFFD	Péptido THRPPMWSPVWPCLPFFD.
TIS	Triisopropilsilano.
TJ	Uniones estrechas.
Trt	Tritilo.
TU	Tiourea.
US	Ultrasonido.
UV-Vis	Espectroscopia en rango ultra violeta y visible.
VDW	Fuerzas atractivas de van der Waals.
XPS	Espectroscopia de fotoelectrones de rayos X.
τ	Proteína Tau.

RESUMEN

Implicancias Farmacéuticas de la Conjugación de Péptidos a Nanopartículas de Oro: efectos sobre la interacción con proteínas plasmáticas, la estabilidad, la toxicidad y la biodistribución.

Al exponer diferentes Nanomateriales (NM) al plasma sanguíneo estos son reconocidos por biomoléculas, formándose una nano-bio interface denominada corona de proteínas (CP), en la que se observan interacciones dinámicas debido a que los ambientes biológicos son transitorios y no homogéneos. Dichas interacciones pueden ser claves en la modulación de la biodistribución, eliminación, de las respuestas inmunes y de la metabolización de los NM. En este contexto se propone que la naturaleza de los NM influirán sobre las interacciones inespecíficas con los componentes biológicos, esperándose a futuro poder regular dichas interacciones según los intereses farmacéuticos.

En este proyecto de tesis se han obtenido conjugados de nanopartículas metálicas de oro (NpO) con péptidos como CLPFFD formando el conjugado NpO-CLPFFD, utilizados para destruir agregados proteicos amiloides ($A\beta$) involucrados en la Enfermedad de Alzheimer (EA) mediante la aplicación de radiación electromagnética. Dado que *in vivo* el conjugado NpO-CLPFFD llega en una muy baja proporción al cerebro respecto de la dosis inyectada (DI) se incorporó la secuencia peptídica THRPPMWSPVWP (THR), reconocida por el receptor de transferrina presente en la Barrera Hematoencefálica (BHE) con el fin de favorecer la transcitosis y el ingreso al sistema nervioso central. Es importante mencionar que una característica común de los conjugados es su gran acumulación en hígado y bazo, afectando así la llegada al cerebro. Esta elevada acumulación así como la penetración a través de la BHE esta relacionada con la formación de la CP que se forma al ponerse en contacto las nanopartículas con el plasma. Por lo cual, en este trabajo se realizó una caracterización

de la CP con el fin de comprender su posible influencia sobre el comportamiento farmacocinético de las NpO. Es así que se evaluó como la CP formada sobre los conjugados NpO péptidos puede modificarse tras incorporar secuencias peptídicas como THRPPMWSPVWP, CALNN o Cpeg a CLPFFD

En el desarrollo de esta tesis nanoesferas de oro (NE) se conjugaron con los péptidos CLPFFD, CALNNLPFFD, C-PEG-LPFFD, CALNN, C-PEG y THRPPMWSPVWPCLPFF (THRCLPFFD) y Nanovarillas de oro (NV) se conjugaron con CLPFFD. Los conjugados se caracterizaron por Espectroscopia UV-Vis, TEM, DLS, XPS y AAA y luego se emplearon para realizar estudios *in vitro e in vivo*. Posteriormente, los conjugados fueron incubados *in vitro* con plasma humano, evaluándose la estabilidad de los coloides por UV-Vis y el crecimiento del tamaño de las NpO por DLS debido a la presencia de la CP. Las proteínas de la CP fueron separadas e identificadas por geles SDS-Page, geles bidimensionales y por LC/MS/MS encontrando parámetros de comparación entre los conjugados.

Las NpO conjugadas con los péptidos estudiados son especies coloidales estables en el tiempo y la presencia de la CP produce un aumento del diámetro hidrodinámico que conlleva a estabilización estérica. Las proteínas que conforman la CP tienen relación directa con el destino de las mismas en el organismo. Así proteínas detectadas estarían asociadas al reconocimiento por el sistema fagocítico mononuclear (SFM), la acumulación en hígado y bazo, como son las proteínas Ig, CO3, CO4, entre otras. Otras proteínas como la ApoE y la albúmina actuarían favoreciendo el pasaje a través de la BHE tal como sucede con NE-THRCLPFFD y en menor proporción con NE-CLPFFD. En base a lo encontrado se recubrieron NE-CLPFFD y NE-THRCLPFFD con ApoE, para luego realizar estudios *in vivo*, observándose que existe un aumento en la llegada al cerebro. Esto indica la importancia de la naturaleza de las proteínas de la CP sobre la distribución de las NpO así como también la posibilidad de poder modular la misma para un eventual tratamiento basado en NpO.

SUMMARY

Pharmaceutical implications of the Conjugation of peptides with Gold Nanoparticles: effects on the interaction with plasma proteins, stability, cell viability and biodistribution.

By exposing different Nanomaterials (NM) with plasma, they are recognized by biomolecules conforming a nano-bio-interface called protein corona (CP), showing dynamics interactions because the biological environment is transient and not homogenous. These interactions could be the key in the modulation of the biodistribution, elimination, immune response and metabolization of NM. Suggesting that the features of NM has influence on non-specific interactions with biological components, It is expected in the future that they can such interactions be regulated according the pharmaceutical approach.

In this thesis were obtained conjugates of gold nanoparticles (NpO) with peptides as CLPFFD (NpO-CLPFFD). This last sequence can recognize protein aggregates of β -amyloid involved in Alzheimer's disease. Since *in vivo* the conjugates reach the brain in very low proportion, it was proposed to incorporate the peptide sequence THRPPMWSPVWP (THR), a sequence recognized by the transferrin receptors in endothelial cells of the blood brain barrier (BHE) promoting transcytosis of nanoparticles. However, we observed that all conjugates were accumulated in liver and spleen, interfering with arriving to brain. Therefore, the study for the interactions of NpO with the proteins conforming the CP helps us to understand and explain the pharmacokinetic behavior all them. In this work nanospheres (NE) were conjugated with the peptides CLPFFD, CALNNLPFFD, CpegLPFFD, CALNN, Cpeg and THRPPMWSPVWPCLPFFD (THRCLPFFD) and NpO as nanorods (NV) were conjugated with CLPFFD. Each conjugate obtained was characterized by UV-Vis spectroscopy, TEM, DLS, XPS and AAA. Then the conjugates were used to studies *in vitro* e *in vivo*. Next these conjugates

were incubated *in vitro* with human plasma, to evaluate the stability by UV-Vis, the size effect by DLS and by TEM. Finally, the proteins of the CP were separated and identified by electrophoresis SDS-PAGE and 2D, and by LC-MS/MS to find comparative parameters between conjugates.

The results obtained show that these conjugates are stable colloidal species in the time and the CP affects the diameter of the nanoparticles. A set of proteins found in the CP could determine the destiny of this NpO to will take in the organism. Thus proteins detected (as are the proteins Ig, CO3, CO4 and other) are associated with the recognition by the mononuclear phagocytic system (SFM) and their accumulation in liver and spleen. On the other proteins as ApoE or albumin that were detected in the CP of NE-THRCLPFFD and NE-CLPFFD favor the passage through the blood brain barrier.

Finally, due to these results, to corroborate the approach from the ability to modify the CP, we incubated NE-CLPFFD and NE-THRCLPFFD with ApoE, then these conjugates were used *in vivo*, observing an enhancement in the penetration into the brain. This indicates the importance of CP on distribution of NpO as well as the possibility of modulating it to a possible drug treatment based on NpO addressed to the central nervous system.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Generalidades.

En la actualidad el mayor desafío farmacéutico consiste en mejorar la acción selectiva de los diversos principios activos, adquiriendo una mayor importancia la búsqueda de nuevos enfoques farmacéuticos que permitan una acción selectiva.^[1] Es así como el avance a nivel mundial de la nanotecnología (NT) ha llevado al desarrollo y uso de una gran cantidad de nanomateriales (NM) con potenciales aplicaciones en áreas farmacéuticas y médicas.^[2]

Para que una terapia sea efectiva es necesario que el fármaco llegue al sitio de acción, siendo uno de los grandes desafíos farmacéuticos el de obtener formulaciones que faciliten su llegada al blanco terapéutico. Para lograr este propósito pueden emplearse NM para la entrega de fármacos ya que los mismos poseen un tamaño similar a la mayoría de moléculas y estructuras biológicas, permitiendo una interacción efectiva con los sitios de interés. Como ejemplo, puede mencionarse el uso de nanopartículas (NP) formadas por polímeros, dendrímeros, metales o lípidos (liposomas) que son efectivas para transportar drogas hacia diferentes sitios de acción.^[3] Otra de las aplicaciones interesantes de los NM es la denominada fototermia para lograr una especie de “cirugía molecular” en la que se destruya selectivamente el blanco terapéutico y no tejidos aledaños sanos.

Para los NM aún sigue sin conocerse a fondo el impacto que estos pueden tener en la salud, debido a que su interacción con los sistemas biológicos es muy compleja por la gran cantidad de interacciones con biomoléculas y células estableciendo una serie de interfaces biológicas dependientes de las interacciones bio-fisicoquímicas. Dichas interacciones pueden regular la biodistribución, aclaramiento, respuesta inmune y metabolismo de los NM, procesos que pueden llevarlos a ser biocompatibles o bioadversos. Asimismo, se debe considerar que estas interacciones pueden llevar a cambios estructurales de biomoléculas,

transformaciones de fase, liberación de energía libre, reestructuración y disolución en la superficie de los NM.^[4] *Llegar a comprender la relación entre las propiedades físicas y químicas de los NM y su conducta in vivo, contribuirá a interpretar su comportamiento biológico y así lograr una entrega selectiva.*^[2]

1.2. Nanomateriales y fototerapia, posibles aplicaciones en salud.

Las nanopartículas de oro (NpO) han emergido como un atractivo candidato para la entrega de fármacos o como vectores de genes en terapia génica.^[3] Al ser tan pequeñas tienen la propiedad de difundir a través de barreras biológicas, pudiendo llegar al sitio de interés (Figura 1.A).^[3] Por otra parte, las NpO pueden absorber energía de forma eficaz mediante la aplicación de campos magnéticos oscilantes o de radiación electromagnética y disiparla localmente (nanométricamente) como calor (Figura 1.B).^[5] Este efecto puede conducir a una especie de “*cirugía molecular*” que afecta localmente a la diana terapéutica y no a tejidos aledaños sanos.^[6] Este principio es utilizado para el tratamiento local de algunos tumores cancerígenos,^[5, 7, 8] así como también podría aplicarse a la desagregación de agregados tóxicos (AT) involucrados en enfermedades neurodegenerativas.^[9] En nuestro laboratorio se desarrollan NM para terapias de diferentes patologías como Alzheimer y Cáncer. Para que los mismos sean efectivos deben ser estables, de baja toxicidad y además llegar selectivamente a la diana terapéutica lo cual es crucial desde un punto de vista farmacéutico.

En este contexto puede mencionarse el uso de NpO de diversas formas como Nanoesferas (NE) y Nanovarillas (NV) para la destrucción de AT proteicos de la proteína β -amiloides (AT-A β) involucrados en patologías como la enfermedad de Alzheimer (EA).^[6, 9] En nuestro laboratorio se demostró que es posible destruir AT-A β mediante el uso de NpO luego de una irradiación con microondas de muy baja potencia (Figura 2).^[6] *Sin embargo,*

para que una terapia basada en NpO pueda ser efectiva las mismas deben dirigirse hacia los AT- A β presentes en cerebro.

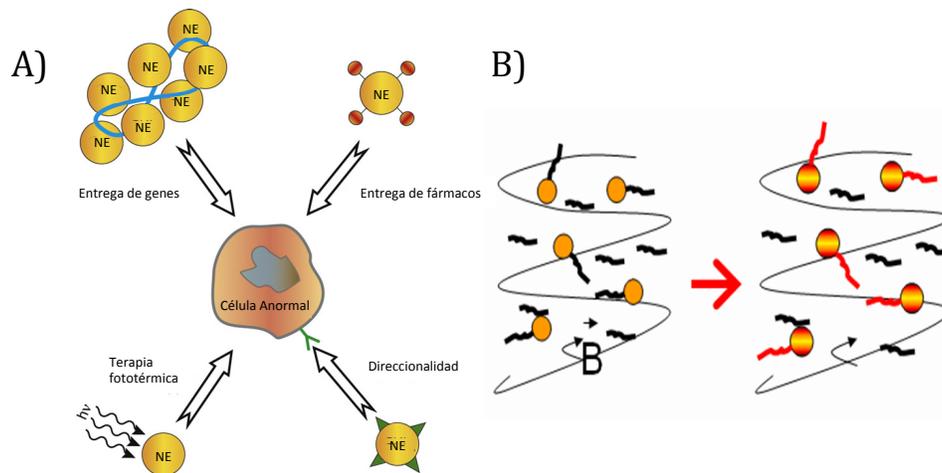


Figura 1: A) Potenciales aplicaciones de NpO en aplicaciones farmacéuticas.^[3] B) Absorción y disipación local de la energía hacia moléculas unidas a las NpO y no hacia moléculas libres.

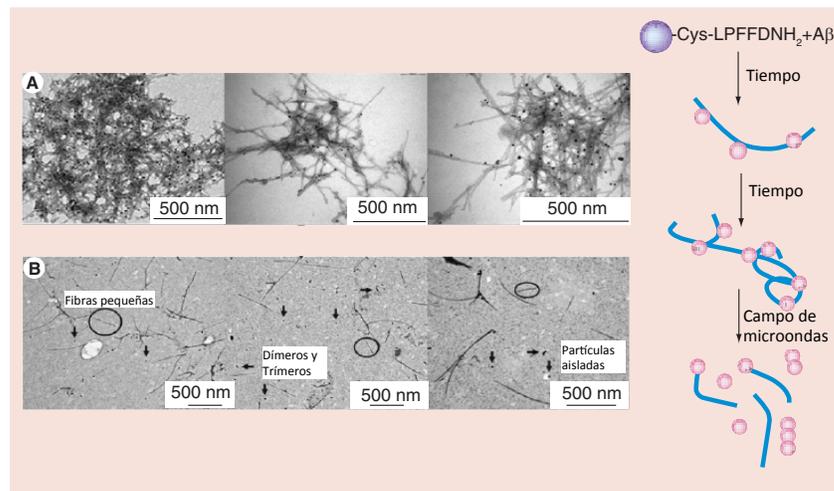


Figura 2: Destrucción in vitro de AT-A β involucrados en la EA utilizando NpO.^[6]

Asimismo, para terapia y diagnóstico de diferentes patologías se ha propuesto el uso de NV,^[7, 8] que absorben energía en el rango del infrarrojo cercano (a diferencia de las NE que absorben en el visible), siendo esta región transparente para la mayoría de los tejidos del organismo con una penetración de hasta varios cm, facilitándose de esta manera el proceso de irradiación y absorción de energía por parte de las nanopartículas.^[10]

1.2.1. Obtención de NE y NV para fines biológicos.

Existen numerosos protocolos de obtención de NpO dependiendo del tamaño y la forma que se pretenda obtener. Dependiendo de la forma y del tamaño de la partícula se producen cambios en la RPS lo que se refleja en variaciones en la coloración,^[11] Para obtener Nanoesferas (NE), uno de los métodos más utilizados es la síntesis química mediante la reducción de una sal áurica (AuCl_4^-) con citrato de sodio en presencia de calor, descrito inicialmente por Turkevich y cols.^[12] y modificado por Levy y cols.^[13] Las NE obtenidas poseen una gran homogeneidad y presentan tamaños homogéneos que pueden variar desde los 7 a los 100nm de diámetro lo que es dependiente de la relación de citrato/ HAuCl_4 empleada en la síntesis. En la formación de las NE se genera un centro teórico de nucleación, que adsorbe capas sucesivas de oro hasta alcanzar el tamaño esperado.^[14] La estabilidad de las nanopartículas obtenidas está dada por el recubrimiento de las NE con el citrato en solución, debido al alto potencial de superficie que éste posee.^[15] En la Figura 3 se observa la formación de un centro teórico de nucleación, sobre el cual se adsorberían capas sucesivas de átomos de Au (precipita Au^0 sobre los núcleos debido a la sobresaturación de la solución), hasta alcanzar el tamaño de partícula esperado.^[16]

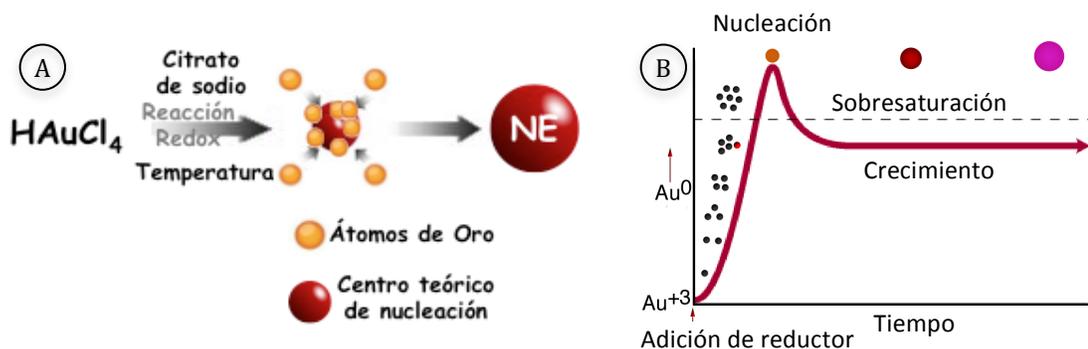


Figura 3: A) Modelo de formación de una NE a partir de una síntesis química (por Redox). Se esquematiza la formación de un centro teórico de nucleación sobre el cual se adsorberían los átomos de oro para dar origen a las NpO. Obtenido desde Referencia [16]. B) Simulación de la Nucleación y crecimiento de las NE en el tiempo.

Para el caso de las Nanovarillas de oro (NV) existen varias formas de obtención, se han descrito métodos electroquímicos utilizando celdas sumergidas en el surfactante catiónico CTAB (Bromuro de cetil-tri-metil-amonio) como electrolito soporte y estabilizador e inductor de la forma de las NV y el co-surfactante TCAB (bromuro de tetra-octil-amonio) que ayuda a la formación de micelas de CTAB para controlar la forma de las NV.^[17] Otros métodos consisten en la deposición de oro electroquímicamente sobre poros de una membrana de policarbonato o alúmina que actúan como moldes que inducen la formación de las mismas.^[18, 19] Sin duda la forma más usada de obtención de NV es el método químico de síntesis de crecimiento mediada por núcleos descrita inicialmente en el año 1989 y adaptado en el año 2001 por Jana y cols.^[20-22] El inconveniente de este protocolo es la alta cantidad de NE como contaminantes, a lo cual en el año 2003 Nikoobakht y El-Sayed desarrollaron una variación del método en la primera etapa consistente en la formación de los núcleos. Este método consiste en la preparación de núcleos de oro de diámetros de 3 a 5nm, obtenidos por la reducción de HAuCl_4 utilizando para esto el agente reductor NaBH_4 y como estabilizador CTAB. Luego que los núcleos son obtenidos se agregan a una solución de crecimiento que contiene CTAB como surfactante e inductor de la forma en presencia de AgNO_3 y ácido ascórbico como reductor débil enlenteciendo el proceso de reducción. Este último reduce el Au^{+3} a Au^+ y luego la reacción de Au^+ a Au^0 es catalizada por los núcleos para dar origen a la NV. El CTAB, como se mencionó anteriormente, induce la forma de varilla y estabiliza a la NV frente a la agregación coloidal. El AgNO_3 es utilizado para controlar la relación de aspecto de las NV y los núcleos preparados en una primera etapa se utilizan como centros de nucleación de la NV. La modificación dada en los núcleos consistió en reemplazar citrato por CTAB puesto que se podría unir a distintas caras cristalográficas de los núcleos permitiendo la interacción más eficiente en la solución de crecimiento con el cristal en formación. En los últimos años diferentes autores han ido

generando mejoras a la síntesis de NV descrita. Por ejemplo la adición de HCl a la solución lo cual lleva a un mejor control de la relación de aspecto posiblemente debido a que disminuye el poder reductor controlando mejor la formación de la NV.^[23] Es necesario considerar que la síntesis de NV resulta sensible a muchos factores que afectan la obtención reproducible de las mismas; estos son temperatura, agitación, tiempo de reacción, centrifugación; el tipo, la marca y el lote de surfactante utilizado.^[24, 25]

1.2.2. Funcionalización y estabilización de NpO para usos farmacéuticos.

Existen muchas formas de funcionalizar NE para darle una cierta actividad biológica. La funcionalización muchas veces llamada conjugación, se refiere a la unión de las NM a una molécula a nivel superficial lo que da origen a una nueva especie, lo cual le confiere nuevas propiedades al NM en cuestión. Para esta tesis, la conjugación se refiere a modificación superficial de NpO con péptidos, las cuales serán nombradas como NpO-Péptido.

Para utilizar las NpO en aplicaciones farmacéuticas por un lado se deben dirigir selectivamente a un blanco terapéutico determinado con una biocompatibilidad aceptable. Para esto se utilizan moléculas que reconozcan el sitio de acción e idealmente no se unan a otras macromoléculas biológicas.^[132] Se debe además considerar que las moléculas con las que se funcionalizan las NpO deben poseer la capacidad de mantener e inclusive aumentar la estabilidad de las soluciones coloidales de NpO en diferentes condiciones tanto biológicas como de almacenamiento. Algunos autores han agrupado en 2 tipos las diferentes modificaciones para las NpO dependiendo de la naturaleza del ligando, una llamada monocapa sintética y otra dada por el revestimiento biomolecular (Figura 4).^[26]

Los péptidos poseen excelentes propiedades que los llevan a participar en interacciones moleculares del tipo ligando-receptor y proteína-proteína haciéndolos candidatos para ser utilizados como moléculas para funcionalizar NpO.^[9, 27, 28] Así es como se ha demostrado

que NE pueden ser dirigidas a los agregados proteicos involucrados en la EA funcionalizándolas con el péptido CLPFFD que reconoce dichos agregados, mantiene la estabilidad coloidal de las NE y reduce su toxicidad respecto de las NE sin conjugar. Asimismo recientemente se demostró que dicho péptido mejora la estabilidad de NV y permite disminuir la toxicidad de las mismas al permitir eliminar una mayor cantidad de CTAB.^[29] Como se mencionó previamente en este capítulo, es la secuencia LPFFD quien reconoce el núcleo putativo de agregación ((aminoácidos 17 y 21) del péptido A β ₁₋₄₂^[30] además de impedir la agregación.

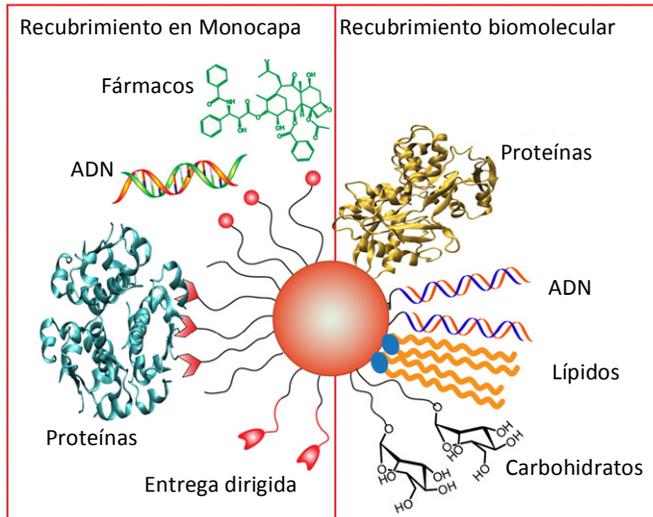


Figura 4. Representación esquemática de las 2 estructuras comúnmente empleadas sobre superficie de NPo para aplicaciones en *drug-delivery*.^[26]

Para anclar un péptido a la superficie de la NE, se requiere que el mismo reaccione con la superficie de la NE. Es sabido que ciertos grupos funcionales presentes en los péptidos pueden reaccionar con la superficie formando uniones fuertes o débiles. Los grupos tioles (RSH) pueden reaccionar espontáneamente quemisorbiéndose sobre la superficie de oro de las NE formando enlaces con una energía menor a un enlace covalente pero mayor que la de un enlace electrostático (4-7kcal/mol para enlace electrostático; 50-110kcal/mol para enlaces covalentes simples; RSH-Au \approx 25-45kcal/mol).^[31] Otros grupos funcionales

presentes en péptidos como grupos aminos y en menor medida grupos carboxílicos pueden reaccionar con la superficie de las NE estabilizándolas. Así es posible la conjugación de un péptido con actividad biológica a una NE mediante la reacción espontánea del grupo tiol presente en un residuo Cys contenido en la secuencia del péptido con la superficie de oro generando así una monocapa de péptido sobre la NE (Figura 4).^[26, 32] Es por esta razón que como estrategia se puede agregar una Cys a una secuencia peptídica, en una zona que no interfiera con la actividad del péptido y permitir así el anclaje del mismo a la superficie de NE. Pueden mencionarse diferentes ejemplos de funcionalización de NE con péptidos como la conjugación de NE al péptido CLPFFD, reportada por Kogan y cols.,^[33] la conjugación de NE con el péptido CALNN reportado por Levy y cols.,^[13] y recientemente la conjugación con el péptido THRCLPFFD que favorece la transcitosis a través de la BHE y a su vez reconoce los AT-A β , reportado por nuestro grupo por Prades y cols.^[34] Entre los diferentes diseños se han descrito otras estrategias como el diseño de una molécula con actividad biológica pero separada de la superficie de la NE mediante un espaciador bifuncional. En esta estrategia se realiza el recubrimiento de una NE con un espaciador bifuncional (contiendo un grupo RSH para unirse a la superficie de oro y otro grupo que permite el anclaje a la biomolécula). El mencionado RSH es inicialmente quemisorbido sobre la superficie de la NE dejando expuesto el otro grupo (ej. Carboxilo) para la unión a la molécula activa. Un ejemplo de esta estrategia es la funcionalización de NE con tiopronina, y la conjugación de éste conjugado con el péptido GRGDSP para terapia de cáncer (Figura 5.A).^[35] Otras estrategias descritas han señalado la utilización de PEG como agente espaciador. Un ejemplo de esto es el uso de ácido 11-mercaptoundecanóico (AMU) que posee el tiol y el ácido carboxílico terminal de AMU al cual se unen fragmentos de A β ₃₁₋₃₅ y A β ₃₂₋₃₅ provenientes del péptido A β que presentan afinidad por fibras amiloides (Figura 5.B).^[36] Existen muchísimas estrategias descritas empleando espaciadores que tienen como fin disminuir posibles interferencias en

el reconocimiento molecular provocadas por alteraciones en la estructura del péptido que se una a la NP interfiriendo con la exposición molecular hacia el blanco deseado. Es importante considerar que al existir un espaciador podrían generarse cambios en la estructura peptídica que conduzca a una pérdida de reconocimiento hacia el blanco lo que podría reducir la actividad biológica. Para lo cual luego de realizar modificaciones en los conjugados nanopartícula-péptido deben caracterizarse los nuevos conjugados obtenidos.

Para el caso de las NV, muchas de las estrategias descritas para NE debiesen ser similares, pero se deben tener ciertas consideraciones, ya que para la síntesis de las NV, se requiere del uso de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) que actúa como un agente inductor de la forma y además como agente para la estabilización (Figura 6).^[25, 37, 38]

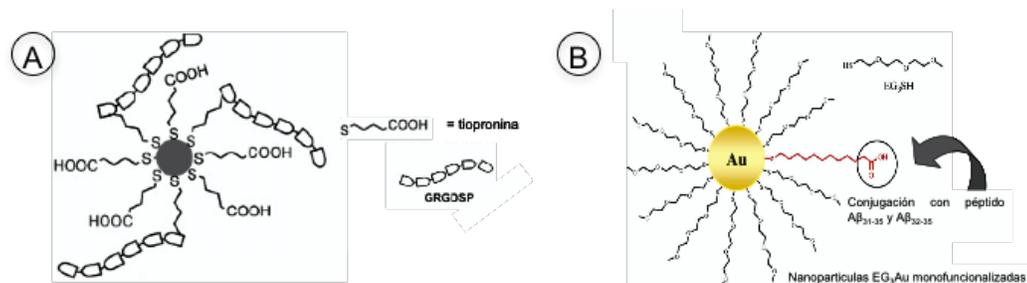


Figura 5. A) Esquema de la funcionalización de una NE con tiopronina como espaciador conjugada al péptido GRGDSP.^[35] **B)** NE cubierta con EG₃SH y monofuncionalizada con AMU.^[36]

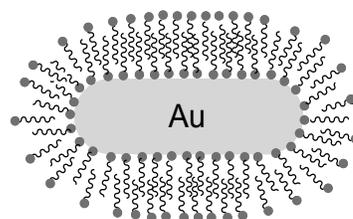


Figura 6. Esquema de una NV recubierta con una bicapa de CTAB (las cabezas de grupos amonio cuaternario del CTAB se representan en círculos negro y las colas en negro representan las cadenas hidrofóbicas). Esquema extraído de la referencia [39].

En el proceso de funcionalización de las NV es muy importante eliminar el CTAB para así conseguir la biocompatibilización.^[40] Liao y cols., desplazaron el CTAB adsorbido sobre las NV con metoxi-poli(etilenglicol)-tiolado (mPEG-SH). El mPEG-SH, es una molécula que se comporta como un espaciador bifuncional biocompatible que actúa tanto como estabilizante y como agente que expone un grupo funcional que puede ser posteriormente unido a una biomolécula.^[41] Otra estrategia descrita es la funcionalización de NV con fosfatidilcolina, con lo cual se ha visto una reducción de la citotoxicidad sin observar agregación.^[42] Otra forma de funcionalizar NV es mediante la técnica de deposición “capa por capa”^[43] que se basa en el agregado de capas de distintos polielectrolitos sobre la superficie cargada positivamente debido al CTAB de la NV para generar una carga superficial apropiada para unir alguna molécula biológica mediante interacciones electrostáticas.^[44] Como ejemplo también se ha descrito la utilización de péptidos modificados con Cys, como recientemente se ha reportado en nuestro laboratorio por Acura y cols.,^[29] en la que empleando CLPFFD es posible desplazar el CTAB, aumentando la estabilidad de las NV y disminuyendo considerablemente la toxicidad de las mismas.

1.2.3 Caracterización de NpO y Conjugados: Tamaño y carga, Espectrofotometría UV-Vis, TEM, DLS, pot-Z.

Una forma de caracterizar las NpO es por espectrofotometría UV visible, puesto que los coloides de oro se caracterizan por su intenso color rojo, presentando espectros característicos debido a que absorben a longitudes de onda (λ) en la región verde-azul del espectro, lo cual permite obtener datos sobre la concentración gracias a la ley de Beer existiendo una relación lineal entre la concentración y la absorbancia en el pico máximo de absorción, conocida como resonancia de plasmón superficial (RPS).^[16] Es posible tener una idea de los tamaños de las NE y NV determinando la posición del máximo de absorción que

es el RPS ya que la posición del mismo se correlaciona con el tamaño de las AuNP,^[45] así por ejemplo NE de ~12nm poseen un λ_{\max} de 520nm. Las NV por su parte poseen una RPS característica por poseer 2 picos, así NV con una relación de aspecto de 4:1 (40nm largo por 10nm de ancho), presentan un pico mayor, con una λ_{\max} cercana a 800nm, relacionado directamente con la relación de aspecto de los mismos y otro pico con una λ_{\max} cercana a 520nm como se aprecia en la Figura 7.^[46, 47] Asimismo el ancho del pico de absorción tiene relación con la homogeneidad de tamaño de las NpO. Otra técnica de caracterización ampliamente utilizada es la microscopía electrónica de transmisión (TEM), la cual permite obtener principalmente información acerca del tamaño y forma de las NpO, ya que la muestra es irradiada por un haz de electrones, lo que permite obtener una imagen aumentada producto del contraste de los electrones retenidos, absorbidos o dispersados por las NpO.^[14, 48]

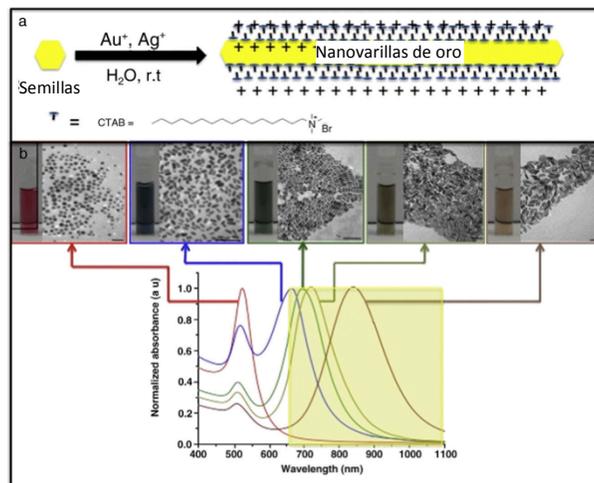


Figura 7. A) Síntesis de NV por crecimiento mediado por núcleos. En la síntesis se emplea CTAB como un agente direccionador de forma. Se muestra una representación de la bicapa final de CTAB. **B)** Correlación del espectro UV-Vis según micrografía TEM y fotografías de NV con diferente relación de aspecto (longitud/ancho). La relación de aspecto se incrementa de izquierda a derecha. Todas las barras de escala corresponden a 100nm. En el recuadro con sombra amarilla se refleja el área del espectro conocido como la ventana biológica. Extraído de referencia [47].

Otra estrategia estandarizada para la caracterización del tamaño de las NpO, es la determinación del diámetro hidrodinámico (DLS, del inglés *dynamic light scattering*), esta técnica, también es conocida como espectroscopia de correlación fotónica o dispersión de luz cuasi-elástica (DLS). Esta última técnica se utiliza para medir el tamaño de partículas de tamaño inferior a micras y se basa en la medición del movimiento browniano que se hace evidente por fluctuaciones de la dispersión de la luz por las NpO. Así, el tamaño de la partícula es calculado matemáticamente desde la ecuación Stokes-Einstein, en donde $d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D}$ (siendo $d(H)$ diámetro hidrodinámico; D el coeficiente de traslación de difusión, k la constante de Boltzman, T , la temperatura absoluta y η la viscosidad del medio).^[49]

El potencial Z (pot-Z), un dato que puede ser obtenido en conjunto al DLS, se relaciona con las propiedades en solución de las NpO, como la estabilidad coloidal, también considerado relevante para comprender las interacciones de las NpO con los sistemas biológicos. Dicho pot-Z es una medida de potencial eléctrico del sistema coloidal, siendo el valor de la diferencia de potencial entre el medio de dispersión y la capa estacionaria del mismo fluido que en teoría se encuentra unido a la partícula dispersada. Este valor indica de alguna forma el grado de repulsión entre partículas adyacentes en una dispersión. Así a mayor valor absoluto de pot-Z, mayor estabilidad debido a una estabilización por repulsión eléctrica mientras que al ser un pot-Z con un valor absoluto bajo, los coloides tienden a ser más inestables apreciándose coagulaciones y floculaciones en el tiempo. Contrariamente una partícula con mucha carga llevará a una menor biocompatibilidad en sistemas biológicos, por la gran cantidad de interacciones con biomoléculas influyendo sobre el comportamiento de la misma en el sistema. En el pot-Z la doble capa eléctrica es importante y el desarrollo de una carga neta en la superficie de la partícula afecta a la distribución de los iones en la región interface que la rodea, lo que resulta en un aumento de la concentración de iones libres, iones de carga opuesta a la de la partícula cerca de la

superficie. Así, la capa de líquido que rodea directamente a la partícula existe en dos partes: una zona interior (capa Stern), donde los iones están fuertemente unidos y una región externa (difusa) en el que se asocian con menos firmeza. Dentro de la capa difusa hay un límite teórico dentro de la cual los iones y partículas forman una entidad estable. El potencial en este límite (superficie de cizallamiento hidrodinámico) es el potencial zeta, como se aprecia en la Figura 8.A. En un equipo diseñado por Malvern, en donde es posible medir DLS, el pot-Z es el resultado de una medida electrocinética, en que la existencia de cargas eléctricas en la superficie de las partículas interactúan con un campo eléctrico aplicado del tipo electroforesis. En estas condiciones el movimiento de la partícula cargada está influenciado por el líquido en el cual está suspendida la partícula bajo la influencia de una carga eléctrica aplicada. Fuerzas de viscosidad actúan sobre la tendencia de las partículas oponiéndose al movimiento. Cuando se logra el equilibrio entre estas fuerzas opuestas, la partícula se mueve a una velocidad constante posible de ser detectado bajo una medida de dispersión estática de luz. En este caso la velocidad depende de la fuerza del campo eléctrico o del gradiente de voltaje de la constante dieléctrica del medio, de la viscosidad del medio y del pot-Z. Así la velocidad es una unidad de campo eléctrico referida como movilidad electroforética y el pot-Z está referido a esta según la ecuación de Henry:

$$U_E = \frac{2\varepsilon z f(\kappa a)}{3\eta}$$

(en donde U_E es la movilidad electroforética; z es el pot-Z; ε es la constante dieléctrica; η es la viscosidad y $f(\kappa a)$ es la función de Henry. En esta función, la unidad κ se denomina la longitud de Debye, en que por lo general κ^{-1} es la medida de espesor de la doble capa eléctrica, y el parámetro a es el radio de la partícula, por lo cual κa mide la relación entre radio de partícula y el espesor eléctrico de la doble capa. (Figura 8.B))

Si todas las partículas en suspensión tienen un gran pot-Z negativo o positivo, entonces tienden a repelerse entre sí y no habrá tendencia a que las mismas se agreguen. Sin embargo, si las partículas tienen valores de bajo pot-Z entonces no habrá ninguna fuerza para evitar que las partículas se adhieran y floculen.^[50]

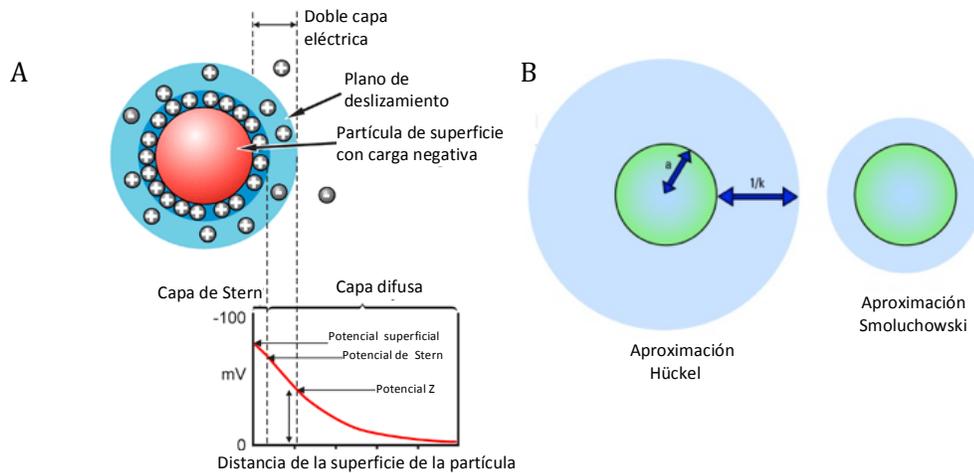


Figura 8: Concepto de pot-Z. **(A)** Representación esquemática del pot-Z **(B)** Función de Henry, aproximación Smoluchowski se considera para partículas pequeñas en medios acuosos en concentración moderada de electrolitos, $f(\kappa a) = 1.5$ y en una aproximación de Hückel, para partículas pequeñas en un medio con baja constante dieléctrica (no medio acuoso), $f(\kappa a) = 1$

Una manera de aumentar considerablemente la estabilidad de las nanoestructuras metálicas es la conjugación con moléculas biológicas como péptidos anfipáticos o proteínas que modifican las propiedades fisicoquímicas de la superficie disminuyendo además su toxicidad y aumentando el pasaje a través de membranas biológicas para llegar hacia el objetivo terapéutico deseado. Las NE provenientes de la síntesis son estabilizadas por aniones de citrato y al ser conjugadas con el péptido CLPFFD se produce un intercambio de los citratos por el péptido estabilizando las NpO por efectos estéricos. Por otra parte, el péptido CALNN es un péptido que confiere gran estabilidad a las NpO y puede actuar como un espaciador entre la superficie y la molécula activa permitiendo que esta última mantenga su estructura activa facilitando así la interacción con la diana. La estabilidad conferida

depende de la longitud de éste y de sus características de polaridad lo cual tiene influencia sobre la carga superficial.^[13]

En esta tesis se emplearán como espaciadores a la molécula de PEG de tres subunidades (Fmoc-PEG(3)-COOH/ácido 12-(9-Fluorenil-oxicarbonil-amino) y la secuencia peptídica CALNN de manera de aumentar la estabilidad y reducir las interacciones específicas. Se ha descrito que el recubrimiento con PEG de alto peso molecular (5kDa) disminuye el pot-Z de NpO a prácticamente niveles de neutralidad manteniendo la estabilidad de las partículas por impedimento estérico, esta disminución de carga es favorable para disminuir las interacciones inespecíficas aumentando así el tiempo de las NpO en la circulación.^[51]

Por su parte las NV obtenidas en una síntesis típica se encuentran estabilizadas por el detergente CTAB en concentraciones a las cuales se aprecian efectos tóxicos. Así, estrategias de funcionalización que generen impedimento estérico, permitirá eliminar el CTAB. Una estrategia para eliminar el detergente es modificar las NV con PEG que contiene en su extremo un tiol y presenta una gran biocompatibilidad.^[51] El PEG que contiene el tiol desplaza al CTAB de la superficie de la partícula produciéndose una quemisorción. Otros agentes estabilizantes son de naturaleza polimérica, como PLGA y quitosano, entre otros.^[13] Para esta tesis se empleará el péptido CLPFFD para estabilizar las NV y poder eliminar el CTAB.

1.3. La enfermedad de Alzheimer (EA) y el uso de NpO.

La enfermedad de Alzheimer (EA) fue descrita inicialmente por Alois Alzheimer en 1907. Es una enfermedad neurodegenerativa y considerada la base patológica de la demencia senil común, que se presenta como una degeneración neuronal progresiva generando una pérdida paulatina de habilidades cognitivas. Es la demencia más común en la tercera edad

por lo cual ha tomado protagonismo hoy en día a causa del incremento de las expectativas de vida en la población.^[52, 53] Se estima que actualmente cerca de un 13% de los individuos de 65 años y cerca de un 45% de aquellos mayores de 85 años padecen la EA.^[54, 55] En Estado Unidos de Norteamérica se estima que cerca de 5.4 millones de personas padecen de esta enfermedad, y en Chile cerca de 170.000 casos ya han sido reportados.^[56]

Es sabido que la EA involucra la formación de placas seniles a nivel extracelular que se componen en la periferia por prolongaciones neuronales (dendritas y axones) en degeneración y en la parte central por fibras amiloides. Estas últimas se forman por el depósito de agregados tóxicos del péptido β -amiloide (A β),^[52] que puede inducir la formación de ovillos neurofibrilares tóxicos de la proteína Tau (τ) a nivel intracelular (Figura 9). Tanto la formación de placas seniles a nivel extracelular como la de ovillos neurofibrilares a nivel intracelular son los agentes causantes de la EA según se ha propuesto en las dos últimas décadas.^[57, 58] Actualmente es aceptada la hipótesis del amiloide, que postula que el elemento principal y primario de la EA es el A β , que determina la disfunción sináptica y celular, el depósito de τ , la inflamación y finalmente la muerte neuronal.^[58] Cabe mencionar que también se ha planteado que el depósito de A β tendría un efecto protector, actuando como biofloculante que atrapa toxinas, especialmente iones metálicos, por lo que la acumulación de A β pudiera ser una respuesta fisiológica a una determinada injuria como modulador a los procesos inflamatorios, dada la acumulación de A β en el traumatismo craneoencefálico.^[58]

Aún cuando A β se encuentra fisiológicamente en el cerebro, en condiciones patológicas se auto agrega formando diferentes especies anómalas representadas en la Figura 10 que incluyen desde pequeños oligómeros hasta fibras, que finalmente derivan en los depósitos tóxicos ya mencionados.^[16]

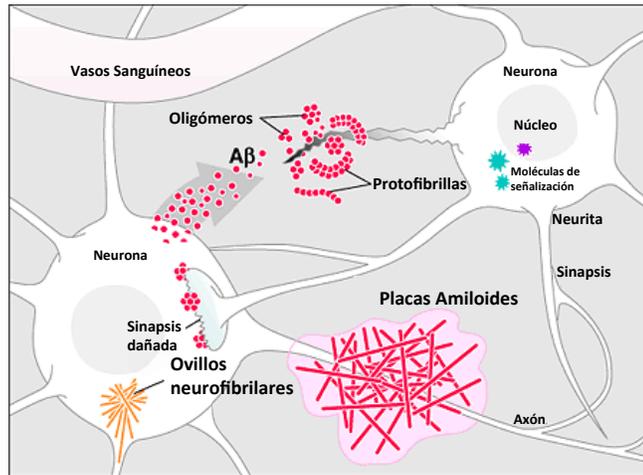


Figura 9: Modelo de EA en donde se representan las placas amiloides y los ovillos neurofibrilares.^[57]

El A β monomérico presente en condiciones fisiológicas consiste en una familia de péptidos hidrofóbicos de entre 39 a 43 aminoácidos (aa) que es codificado a partir del cromosoma humano 21, formando parte de una proteína más grande conocida como la proteína precursora del amiloide (PPA)^[54, 58] la cual es metabolizada por tres enzimas denominadas α , β , γ secretasas.^[59]

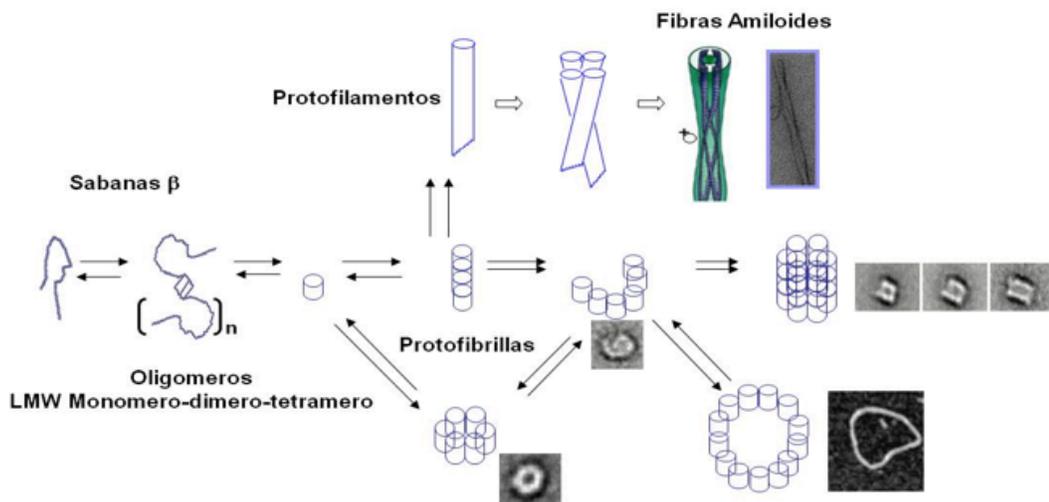


Figura 10: Esquema teórico de la formación de las diferentes especies a partir de monómeros de A β .^[16]

1.3.1. Estrategias para el tratamiento de la EA empleando péptidos.

Las investigaciones sugieren que las placas amiloides tienen un rol protagónico en la patogénesis de la enfermedad, para lo cual se han propuesto muchas estrategias de tratamiento basados sobre la inhibición de la cascada amiloidogénica, siendo una de éstas estrategias terapéuticas la de bloquear los pasos de despliegue y agregación de A β . Para ello se han diseñado péptidos cortos sintéticos capaces de unirse selectivamente a A β evitando la formación de AT-A β .^[54, 58]

Uno de estos péptidos es el inhibidor de agregación Ac-LPFFD-NH₂ (iA β 5p)^[30], el cual se diseñó a partir de la región central de A β formada por los aa 17-20 (LVFF) (Figura 11), uno de los núcleos putativos de agregación de A β . Para el diseño de la secuencia aa de iA β 5p se mantuvieron parte de los aa de la secuencia nativa (LVFF), los aa hidrofóbicos Leu (L) y Phe (F) que son cruciales para el anclaje permitiendo el reconocimiento de los agregados de A β . Se introdujo también el residuo Asp (D) en el extremo C-terminal que es de naturaleza hidrofílica y hace al péptido más soluble entregándole un carácter anfipático. Además se cambió el aa Val (V) que no es crucial para el reconocimiento por una Pro (P), un aa reconocido como disruptor de estructuras secundarias. Finalmente se modificó el extremo carboxilo terminal convirtiéndolo en amida para hacerlo más estable frente a la degradación por exopeptidasas.^[54, 58, 60] Sin embargo, el uso de este péptido no ha prosperado debido a su baja estabilidad *in vivo* y a la necesidad de emplear dosis muy elevadas que conducen a efectos tóxicos.

1.3.2 Entrega selectiva de NpO hacia los AT-A β mediante el uso de péptidos.

La clave para un tratamiento basado en el uso de NpO es poder dirigirlos selectivamente hacia la diana terapéutica. En el caso de los AT-A β en la EA, las NpO deben atravesar la BHE y llegar a las placas amiloides presentes en el cerebro. Una estrategia utilizada para

ello es unirlos a moléculas como péptidos, proteínas o moléculas orgánicas que faciliten la llegada al cerebro y que permitan la interacción con los AT-A β , como es el caso de iA β 5p,^[30, 50] evitando también fenómenos que puedan dificultar su llegada como la captación por el Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM).

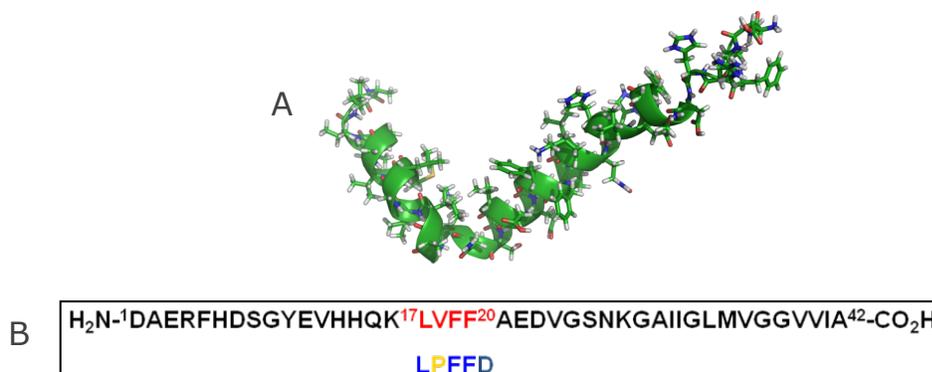


Figura 11: A) Estructura secundaria del péptido A β B) Secuencia de A β . En rojo se representan los aa hidrofóbicos que forman parte del núcleo putativo de agregación. Se muestra la secuencia de iA β 5p similar al fragmento 17-20 de A β , destacándose en azul los aa hidrofóbicos que se mantienen respecto a la secuencia original y en amarillo la prolina, un residuo disruptor de estructura secundaria.^[39]

Para poder efectuar el anclaje de iA β 5p a la superficie de las NpO, se requirió de una nueva modificación de la secuencia que consistió en la incorporación del residuo Cys (C) que contiene un tiol que se quémisorbe a la superficie de las NpO formando una unión Azufre-Oro estable.^[6, 33, 61, 62] Así la funcionalización de las NpO con el péptido CLPFFD (Figura 12) cambia las propiedades fisicoquímicas de la partícula produciendo una disminución del valor absoluto de la carga tras reemplazar el citrato (estabilizante de las NpO proveniente de la síntesis) por el péptido, aumentando la estabilidad del coloide por efectos estéricos (repulsión) (Figura 12).^[61] En conjunto a lo anterior, tras evaluar la biodistribución de las NpO-CLPFFD se demostró que el porcentaje que llega al cerebro es muy bajo respecto de la dosis inyectada (DI) por vía intraperitoneal (aprox. 0,05%) lo cual dificulta una posible terapia basada en el uso de las mismas.^[50] Por tanto, es necesario conocer los factores que tienen influencia directa sobre la biodisponibilidad para así poder

aumentarla. La llegada de NpO al cerebro y su farmacocinética en general se ven afectadas por diferentes factores como la interacción con proteínas del plasma, la captación por el SFM, la estabilidad de los coloides, la captación por otros órganos y la dificultad de atravesar la BHE.

La conjugación de las NE con el péptido CLPFFD provocó un incremento en la penetración respecto de las NE sin recubrir.^[50] Sin embargo, las causas por las cuales se incrementa la entrega de NpO recubiertas con CLPFFD hacia el cerebro no están claras. Un factor clave para explicar este hecho podría ser el rol que juega el recubrimiento con las proteínas plasmáticas o la unión a receptores de membrana presentes en la BHE que favorezcan la transitisión mediada por receptores, siendo estos factores claves en el proceso de biodistribución. En el presente proyecto se estudiará el efecto de la conjugación de NpO con péptidos sobre la interacción con proteínas plasmáticas, la estabilidad y la toxicidad.

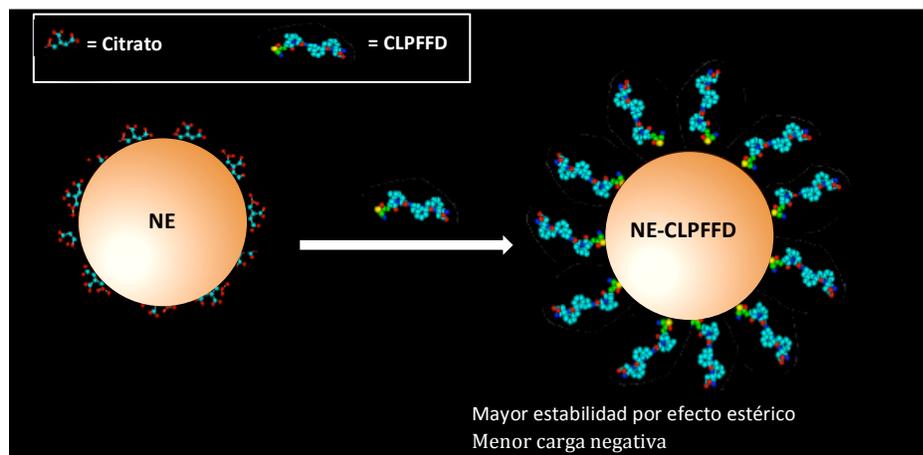


Figura 12. La conjugación de NE con el péptido anfipático CLPFFD afecta la carga y estabilidad. Las moléculas de citrato que recubren y estabilizan a las NE antes de la conjugación (izquierda) y las moléculas peptídicas después de la conjugación (derecha), se presentan según el modelo de bola y bastón en donde los átomos de azufre, oxígeno y carbono se representan amarillo, rojo y azul respectivamente.

1.4. Farmacocinética, estabilidad, toxicidad y penetración de las NpO.

Para aplicaciones farmacéuticas de las NpO se deben considerar factores como las vías de administración, farmacocinética, toxicidad y estabilidad siendo los mismos ampliamente dependientes de la composición, tamaño, carga superficial y recubrimiento.^[51, 61, 63]

En los estudios de biodistribución se deben considerar las variables fisiológicas, como el flujo sanguíneo, propiedades fisicoquímicas de la sustancia como tamaño, hidrofobicidad, liofilicidad, además la biocompatibilidad, y también el análisis del transporte a nivel de las barreras biológicas.^[64] Se ha descrito que la distribución de NpO en órganos es dependiente del tamaño,^[51] de la forma y del área superficial relativa al volumen, afectando en conjunto a la captación y al almacenamiento en tejidos.^[65]

Para el pasaje a través de barreras biológicas, el tamaño es un factor importante ya que la velocidad de penetración de una sustancia está inversamente relacionada con el tamaño molecular.^[14, 66] Por otra parte, los diversos estudios dan cuenta que la distribución de NpO en el organismo es mayor a medida que disminuye el tamaño. En este contexto Jong y cols., determinaron que NpO de 10 a 15nm administradas intravenosamente en ratón presentan una amplia distribución en órganos (hígado, sangre y bazo en elevadas proporciones, y en pulmón, riñón, corazón y cerebro en bajas proporciones).^[63] Por otra parte, Sonavene y cols. demostraron que NpO de hasta 50nm atraviesan la BHE llegando al cerebro.^[67] En estudios realizados en nuestro laboratorio se observó que NpO de 12,5nm administradas intraperitonealmente en ratón se distribuyen y acumulan en distintos órganos, atravesando la BHE y acumulándose así en cerebro no observándose evidencias de efectos tóxicos.^[68] Recientemente, se demostró que al conjugar las NpO al péptido CLPFFD se incrementan los niveles de oro en cerebro de ratas inyectadas intraperitonealmente en 4 veces con respecto a los encontrados para NpO sin funcionalizar.^[50] Asimismo, Niidome y cols. inyectaron por vía intravenosa NV de una relación aspecto (Largo/ancho) de

aproximadamente 6 y modificadas con PEG observando que las mismas permanecen en circulación más tiempo que las sin modificar por lo cual el PEG disminuye la acumulación de NV en hígado. Por otra parte, Wang y cols. evaluaron la distribución de NV de una relación de aspecto ~4,2 sin recubrir y encontrando también que las mismas se acumulan en hígado llegando también al cerebro.^[65]

Una de las razones de la alta acumulación de NpO en hígado y bazo, posiblemente se deba a la carga superficial de la partícula, referida al potencial Z (pot-Z) que estas poseen, pues se sabe que el SFM reconoce moléculas con un pot-Z negativo, como el que poseen las NE. Por esta razón es muy esperable una acumulación de NE en éstos órganos. Así, la carga superficial de los NM tiene influencia directa sobre la estabilidad, biocompatibilidad y distribución de estos, afectando directamente sobre la farmacocinética, a la captación y la viabilidad celular. Según lo cual en una NpO conjugada, la carga superficial puede variar teniendo diferentes efectos farmacocinéticos como es el caso del *clearance* sanguíneo.^[65] A raíz de esto resulta importante determinar la carga superficial de NM utilizados para fines farmacéuticos.

Las NpO en el plasma sanguíneo interaccionan con proteínas cubriéndose con éstas formando así la denominada CP que puede favorecer procesos de opsonización y llevan a su captación por el SFM impidiendo que éstas lleguen con niveles adecuados a los órganos de interés. Así, al momento de diseñar una NpO se debe lograr disminuir el carácter negativo del pot-Z sin afectar la estabilidad de las NpO lo que puede ser una estrategia interesante a desarrollar para disminuir su captación por el SFM.^[68]

Si la diana se encuentra en el cerebro, las NpO deben atravesar la BHE y además evitar unirse a moléculas biológicas que favorezcan la captura por otros órganos o sistemas como el SFM asociado a las células de Küppfer que pueden fagocitar NP cargadas negativamente, disminuyendo así la biodisponibilidad.^[51, 69] Lo cierto es que las NpO

obtenidas en una típica síntesis por reducción de oro con citrato^[12] se encuentran cargadas negativamente, lo que las hace más susceptibles a la captación por el SFM debido al recubrimiento con opsoninas como inmunoglobulinas, proteínas del complemento, fibrinógeno, entre otras.^[70] Existe una gran cantidad de alternativas a emplear para intentar mejorar la permeabilidad de las NpO al cerebro, entre estas se incluye la conjugación a moléculas anfipáticas que actúan como transportadores para mejorar el paso por la BHE,^[71] la conjugación con péptidos que disminuyan su carga negativa (aumentar el valor de pot-Z)^[61] logrando así reducir la captación por el SFM con lo cual puede aumentar la llegada al cerebro.^[51] Asimismo se puede lograr una reducción de la carga negativa de las NpO tras la funcionalización a moléculas biocompatibles como polietilenglicol, un polímero hidrofílico e inerte que disminuya la interacción con proteínas como las opsoninas lo que las hace "parcialmente invisibles" al SFM lo que conlleva a la disminución de su captación por el SFM aumentando así el tiempo de circulación,^[50, 67, 72] y reduciendo los posibles efectos inmunogénicos.^[73] Cualquier estrategia que permita acercarse a la neutralidad de carga ayudará a disminuir la captación de las NpO por el SFM.^[51] Tal como es el caso de la disminución de valor absoluto de pot-Z al conjugar las NpO con el péptidos CLPFFD.^[34, 50] No obstante es importante considerar que con la disminución de la carga también puede disminuir la estabilidad coloidal, lo cual a su vez también podría repercutir negativamente en la entrega de fármacos.^[74]

En resumen, tanto la forma, el tamaño y la carga tienen influencia sobre la farmacocinética de NpO aunque no se pueden obtener conclusiones generales debido a la existencia de poca información reportada.^[75]

1.4.1. Pasaje de NpO a través de la BHE.

Uno de los principales inconvenientes de la administración de fármacos que deben actuar sobre blancos terapéuticos que se encuentran en el sistema nervioso central (SNC), como son los AT-A β involucrados en la EA, es el pasaje de los mismos a través de la BHE. Esta barrera protege al SNC de sustancias extrañas, restringiendo también la entrega de medicamentos y la entrada de muchos potenciales agentes terapéuticos.^[76, 77] La BHE es el mayor obstáculo para el pasaje de moléculas desde la sangre al cerebro. En ella convergen células endoteliales, pericitos, astrocitos y microglia. En donde a su vez las células endoteliales de los microvasos cerebrales (CEMC), presentan uniones estrechas, ausencia de fenestraciones y una baja actividad pinocítica, lo cual ayuda a restringir el paso de compuestos desde la sangre al cerebro siendo este el mecanismo que impide la penetración de muchos agentes terapéuticos como oligonucleótidos, anticuerpos, péptidos y proteínas. Además las CMEC poseen una variedad de enzimas citosólicas sobre la membrana citoplasmática que también contribuyen a la naturaleza restrictiva. También se encuentra sobre la membrana plasmática luminal de CMEC la enzima glicoproteína P (gp-P), siendo esta proteína una bomba extractora dependiente de ATP que impide la acumulación intracelular de una gran variedad de agentes quimioterapéuticos y compuestos hidrofóbicos reduciendo así la eficacia de fármacos. Entre las proteínas que se encuentran en la membrana luminal del CMEC se aprecian proteínas receptoras, que favorecen procesos de transporte a través de la BHE (ej. transcitosis) como es el caso del receptor de transferrina y el receptor de Apolipoproteína E (ApoE) (este último mencionado en la Figura 10 en conjunto a la familia de receptores de lipoproteínas de baja densidad-LDLR), entre otros.^[76-79]

Recubrir NpO con moléculas que reconozcan dichos receptores o evitar que las partículas sean reconocidas por la gp-P ayudaría a aumentar el pasaje de las mismas a través de la BHE.

El tamaño de las sustancias es un factor crítico para el pasaje a través de la BHE, ya que la rapidez de penetración a través de barreras biológicas está inversamente relacionada con el mismo.^[14, 66] Aún cuando la BHE es relativamente impermeable a compuestos sobre una cierta masa o hidrofiliidad, aparenta tener una gran permeabilidad y una capacidad adsorbtiva suficiente para compuestos con superficie polar mayor a 270\AA^2 , un peso molecular mayor a 1000Da, una hidrofiliidad menor a -3.5 y una razón de equilibrio de concentración cerebro a sangre menor a 0,01.^[80]

Recientemente se ha propuesto que una de las estrategias para la liberación controlada de sustancias hacia el SNC es la utilización de nanopartículas de diversa naturaleza, en donde una forma no invasiva propuesta para la entrega de fármacos es utilizar portadores coloidales como micelas, emulsiones, liposomas y NP los que pueden incrementar la llegada de fármacos hacia células o tejidos como el SNC, al protegerlos de enzimas y mejorar su difusión a través de la BHE. Así se ha conseguido demostrar que NP de hasta 200nm cruzan la BHE de ratas posiblemente por endocitosis o transcitosis sin dañar el endotelio^[80] existiendo evidencias que NpO de 10 a 200nm se distribuyen *in vivo* atravesando la BHE y llegando al cerebro.^[51, 63, 80]

Tal como se ha descrito anteriormente, el conjugado NpO-CLPFFD puede cruzar la BHE y llegar al cerebro en mayor proporción que NpO sin recubrir, por esto el péptido es el responsable de dicho proceso, posiblemente debido a un mecanismo más específico para favorecer el cruce de la BHE como la endocitosis mediada por receptores.^[63, 81] En este sentido se ha propuesto que el péptido CLPFFD, al ser obtenido a partir de una porción del péptido β -amiloide, puede mantener la capacidad para ser reconocido por receptores a

nivel de BHE, involucrados en el transporte de A β desde la circulación al cerebro. Este péptido puede ingresar al SNC a través de una transcitosis mediada por los receptores para los compuestos de glicosilación avanzada (RAGE, del inglés), un receptor multiligando para IgG,^[82-85] que tal vez permita el cruce de las NE-CLPFFD a través de la BHE.^[9, 30, 50]

1.4.2. Estrategias para aumentar la llegada de las NpO al Cerebro.

Una de las mayores limitaciones para que los fármacos en general y las nanopartículas lleguen al sistema nervioso central esta dada por la BHE cuya principal función es regular el paso de especies hacia el cerebro. Actualmente existe gran interés en el desarrollo de nuevos compuestos para el tratamiento de enfermedades del SNC, sin embargo, se ha limitado debido a la presencia de la BHE.^[86] Se sabe que esta barrera no es impermeable y permite el paso selectivo de moléculas necesarias para mantener la integridad de las funciones. En el caso de las NpO-CLPFFD se ha observado que una pequeña porción respecto de la DI llega al cerebro (aprox. 0.05 %). Analizando en su conjunto los obstáculos que se pueden presentar para un fármaco antes de llegar al cerebro se puede mencionar: la interacción con proteínas, la estabilidad, la vía de administración y los mecanismo de eliminación, entre otros. No obstante es posible modificar la superficie de las NpO de manera de sortear los diversos obstáculos como ya se ha demostrado previamente tras modificar ésta con el péptido CLPFFD, con lo cual se ha logrado mejorar la permeabilidad respecto de las NpO sin funcionalizar. Posiblemente este efecto podría estar dado por el cambio en el valor de pot-Z (disminuye en valor absoluto acercándose mas a la neutralidad), la cual puede contribuir a un patrón de interacción diferente de adsorción de proteínas del plasma específico. El cambio de la carga puede producir diferencia en la adsorción de proteína modificando el reconocimiento por receptores a nivel de las membranas de las células endoteliales de la BHE, favoreciendo la transcitosis, y/o

disminuyendo la carga evitando la interacción con proteínas como opsoninas, minimizando así la retención por el SFM y aumentando la biodisponibilidad hacia el cerebro.^[34, 50, 51, 87]

Es posible aumentar los niveles de NpO en el cerebro, mejorando la penetración a través de la BHE empleando moléculas lanzadera. Actualmente en el diseño farmacéutico se intenta potenciar este tipo de vías de ingreso para favorecer la llegada al cerebro.^[88-91] Por lo que se diseñó el péptido THRPPMWSPVWPCLPFFD (THRCLPFFD) que es un constructo bifuncional, que además de poseer la secuencia CLPFFD capaz de reconocer al péptido β -amiloide (Enfermedad de Alzheimer), posee la secuencia THRPPMWSPVWP (THR) (Figura 13),^[92] que es una secuencia lanzadera que reconoce el receptor de transferrina presente en el endotelio de la BHE.^[34, 93, 94] Dicha molécula es transportada por transcitosis mediada por el receptor de transferrina presente en las células endoteliales de la microvasculatura de la BHE pudiendo actuar como una lanzadera hacia el sistema nervioso central. En esta tesis se ha logrado aumentar los niveles de NE unidas a THRCLPFFD respecto de las unidas a CLPFFD aumentándose también el tiempo de permanencia de las mismas en cerebro (Figura 13).^[34]

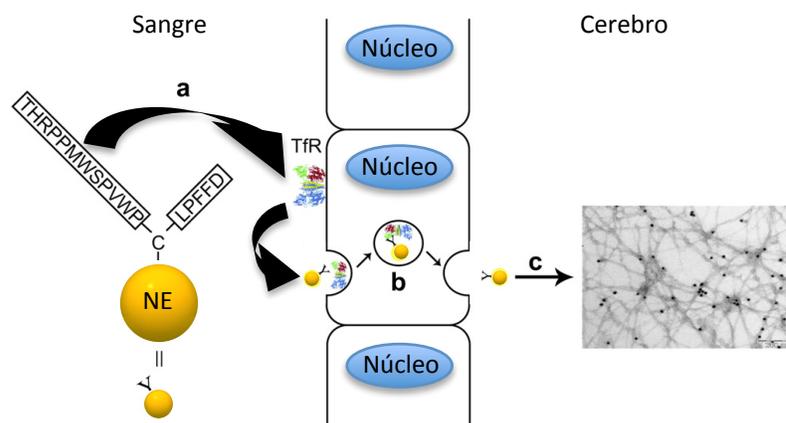


Figura 13. Esquema para relacionar el diseño del conjugado NE-THRCLPFFD con su función in vivo. (a) El péptido THRCLPFFD anclado a la superficie de las NE, le confiere al conjugado la capacidad de ser reconocido por el receptor de Transferrina (TfR). (b) Transporte mediado por receptor inducido por TfR, el cual consiste en una vesícula endocítica que permite el paso a través de las células endoteliales de la BHE. Y (c) LPFFD le confiere al conjugado la capacidad de reconocer y unirse a los AT-A β dentro del SNC. Figura extraída de la referencia [34].

1.5.1. Toxicidad de NpO.

Aun se desconoce el impacto y los riesgos biológicos de las terapias con NP, siendo latente un eventual almacenamiento de NP no degradables que conduzca a una acumulación lisosomal que conlleve a la muerte, como es el caso de una sobre exposición a NpO lo que conduciría a un daño hepático.^[65]

La toxicidad de las NpO depende ampliamente de su tamaño habiéndose reportado que NE de 4 a 100nm no poseen efectos citotóxicos aparentes en contraste a las de 1 a 2nm cuyos efectos son altamente tóxicos.^[95] Recientemente, se ha reportado que la exposición prolongada a altas concentraciones de NpO de 20nm conlleva a efectos tóxicos al producirse acumulación en los órganos como el hígado y el bazo, en donde se ha observado a su vez cambios en los patrones de expresión génica, activándose también vías tóxicas metabólicas.^[96] Asimismo, las NpO de 1,4nm son muy tóxicas al generar altos niveles de estrés oxidativo y al poder interactuar con el DNA llevando a efectos genotóxicos.^[97-99]

Los posibles efectos tóxicos de las NP metálicas pueden deberse al estrés oxidativo producto de los radicales libres propios del sistema celular de degradación y disolución de estas NPs, al ser posiblemente ionizadas en los distintos ambientes *in vivo* (jugos gástricos, lisosomas, etc.). Por su parte, el oro como Au (I), se utiliza como droga antitumoral, tras inducir apoptosis, al coordinarse con tioredoxina reductasa en la mitocondria o por daño de la membrana mitocondrial en su forma lipofílica y catiónica, tras liberar citocromo C. En su estado Au (III), no es estable y pasa a Au (I) *in vivo*. Es por esto que los estados de oxidación del Au son determinantes para los efectos negativos, lo cual puede resultar crucial para NpO en especial para las NV.^[65] Es importante destacar que en la superficie de las NV y NE se encuentran átomos de Au (I) que pueden dar origen a efectos tóxicos. En el caso de las NV y ciertas NE que contienen CTAB, su presencia puede ser un factor

determinante de toxicidad, tras observarse que en NV al reemplazar el CTAB por PEG se disminuye considerablemente la toxicidad.^[75, 100]

Sin duda, un factor importante es la interacción de las NpO con macromoléculas del medio biológico que pueden recubrirlas y modificando sus propiedades y dimensiones originales y modulando la farmacocinética, estabilidad, penetración y toxicidad.^[100]

1.6. Interacción de nanopartículas con proteínas plasmáticas, formación de la CP y su efecto sobre la farmacocinética, estabilidad y toxicidad.

Sin duda, uno de los factores que tienen influencia sobre la farmacocinética de los NM, como las NpO, es la interacción con biomoléculas (prioritariamente proteínas) de diferentes fluidos biológicos, las cuales recubren las NpO y forman la CP. Esta corona proteica que rodea los NM se forma rápidamente una vez que la partícula interactúa con el plasma u otro ambiente biológico. Dicha corona es la verdadera superficie interactiva que se une a biomoléculas, células y otras estructuras biológicas. Este fenómeno ha sido discutido durante los últimos años concordando en que estos cambios en la superficie de los NM producen efectos sobre las interacciones biológicas, aunque hasta el presente es poca la información existente al respecto de modificaciones de NpO con péptidos.^[4]

La conformación de la CP se vuelve una caja negra con muchas posibilidades de modulación de respuestas por lo cual elucidar esta puede ser clave en nuevas aplicaciones de NM, en pro a una mayor eficiencia en posibles terapias, y en el diseño posterior de nuevos fármacos derivados de NM. Actualmente las estrategias apuntan a evitar esas interacciones,^[101] pero dada la complejidad del sistema puede resultar más atractivo apuntar a favorecer ciertas interacciones que mejoren de alguna forma la farmacocinética, la penetración a dianas terapéuticas, y la posterior eliminación del sistema. Para el estudio de la formación de esta CP se incuban los NM con plasma por diferentes periodos de

tiempo que pueden variar desde segundos hasta días,^[102] dependiendo de las futuras aplicaciones farmacéuticas. Luego de la incubación las proteínas no unidas se separan de las unidas por centrifugación método que puede producir artefactos debido a que en el proceso pueden separarse proteínas unidas débilmente. Con el fin de evitar estos artefactos puede emplearse como alternativa la separación por cromatografía de exclusión molecular. Luego para la identificación de las proteínas puede emplearse diversos métodos como LC-MS/MS, geles bidimensionales, así como también Western Blot, entre otros.^[74]

Los NM interactúan con proteínas plasmáticas, inmunoglobulinas, albúminas, elementos del complemento, fibronectinas, entre otros, pudiendo facilitar el reconocimiento por células fagocíticas, influyendo sobre las respuestas inmune e inflamatoria y/o sobre la captura por otros órganos o sistemas como el SFM.^[51, 69] Procesos como la opsonización pueden determinar el destino de las nanopartículas administradas, como por ejemplo en el caso de NP con superficies hidrofóbicas que se pueden unir eficientemente a componentes del plasma pudiendo ser removidas de la circulación por macrófagos del hígado y del bazo (SFM). Contrariamente aquellas NP que son pequeñas y con superficie hidrofílica pueden escapar al menos parcialmente de este proceso y permanecer en la circulación por más tiempo.^[77, 103] Debido a esto el recubrimiento superficial es un factor a considerar, pues según la naturaleza química de las moléculas con las que se conjuguen, será la carga superficial final y la disposición que adopten las moléculas adsorbidas a las NP, afectando a la interacción con proteínas y modulando la biodisponibilidad y el reconocimiento del blanco terapéutico.^[51, 61]

La interacción de los NM con las proteínas puede producir plegamientos anómalos y agregación de proteínas pudiendo producir efectos tanto nocivos como beneficiosos para la salud. Es fundamental comprender el efecto de los NM sobre los procesos biológicos esenciales como el plegamiento de proteínas.^[104] Algunas proteínas pueden verse afectadas

provocando desdoblamiento y pérdida de la función.^[105] También se ha descrito que algunas proteínas mejoran su estabilidad aun en condiciones desnaturalizantes.^[106] La Figura 14 esquematiza el posible efecto de la interacción de la superficie de las NpO con la conformación de las proteínas con las que puede interactuar.

Sin duda no se deben olvidar a su vez las interacciones con aminotioles como el glutatión, en este contexto se ha determinado que el tiempo de recambio de tioles en superficie de la NpO es mayor a medida estas son de mayor tamaño, por lo cual esto podría inducir ciertos fenómenos no deseados, como disminuir la cantidad de GSH presente en el plasma, afectando procesos biológicos.^[107]

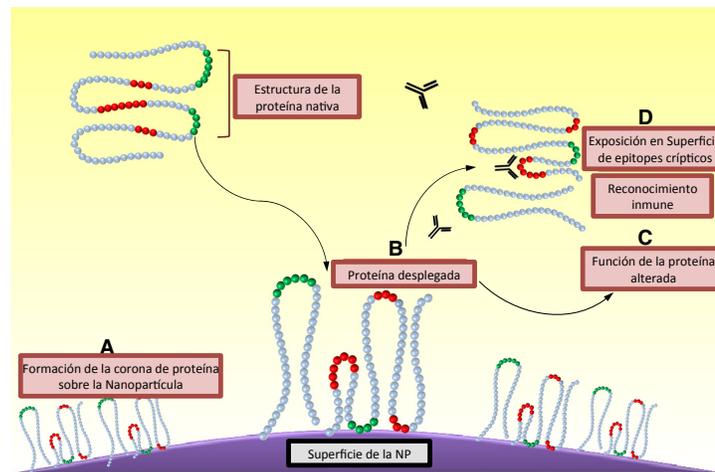


Figura 14: Representación esquemática del des plegamiento de proteínas que interactúan con la superficie de una NP. (A) Moléculas proteicas adsorbidas sobre la superficie de la NP, complejo llamado NP@CP. (B) La superficie de las NP puede inducir cambios conformacionales sobre la estructura nativa de las proteínas adsorbidas, causando cambios conformacionales de estas últimas. Cambios que pueden alterar la función de la estructura nativa de la proteína (C) o exponer regiones antes internas, que pueden en algunos caso ser epitopes ocultos, resultando en un reconocimiento inmunológico del complejo (D). Imagen extraída de la referencia [108].

1.6.1. Formación de la CP.

La CP es la consecuencia de un equilibrio y una competencia entre las distintas proteínas que se adsorben sobre la superficie de los NM. Este fenómeno es crucial para

determinar que superficie es presentada al sistema biológico y a la diana terapéutica. Por lo cual resulta importante conocer la cinética involucrada en la interacción de nanoestructuras y proteínas (Figura 15).^[2, 109]

Estas proteínas que interactúan pueden ser la clave en los fenómenos de toxicidad, biodistribución, biodisponibilidad y biocompatibilidad de las mismas. La interacción de proteínas con NM también podría traer consigo otros problemas asociados al efecto que estas NM pueden tener sobre la conformación de proteínas, pudiendo afectar su actividad positiva o negativamente, y en algunos casos podría tener repercusiones negativas por el efecto de los NM sobre las proteínas con las que interactúan.^[110]

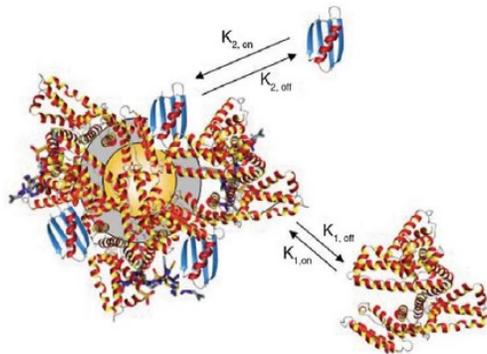


Figura 15: Representación de la CP. Procesos de intercambio y constantes de equilibrio de los mismos.^[52]

Se ha observado que las interacciones pueden ser de baja o de alta afinidad, aquellas de baja afinidad suelen estar en mayor proporción y se intercambian rápidamente, mientras que las de alta afinidad permanecen unidas más tiempo. Por lo que en el tiempo la capa de proteínas cambiará a medida que se distribuyen en los sistemas biológicos. Una manera de controlar las interacciones de alta o baja afinidad es manipular ciertos parámetros de la superficie de la nanopartícula como el balance de hidrofobicidad/hidrofilicidad y la carga determinando la naturaleza y la magnitud de la unión, sin descartar también el efecto que tiene la forma de las mismas.^[111, 112] Es necesario evaluar cada NM individualmente para

comprender como las proteínas determinan su destino en el organismo y poder comprender la respuesta biológica.^[105]

Según las características de la superficie de cada NM se espera que distintas proteínas tengan diferente afinidad por ellos. Esperándose a su vez, encontrar en periodos cortos que la albúmina y el fibrinógeno, se encuentren predominantemente sobre otras proteínas, por sus altos niveles en plasma. A su vez, la albúmina presenta una serie de sitios activos que le permitirían reconocer un mayor número de NM diferentes, con diferentes constantes de afinidad. Aquellas otras proteínas que presenten constantes de afinidad mayores, pero que se encuentren en bajas proporciones en plasma, se espera que en el tiempo consigan dominar sus interacciones por sobre otras proteínas mayoritarias. Conseguir evaluar esto a la fecha es un gran desafío debido a que la presencia de proteínas mayoritarias dificulta la detección de otras minoritarias. Lacerda y cols. han observado que NpO interactúan fuertemente con albúmina, fibrinógeno, γ -globulina, histonas e insulina, existiendo efectos sobre esta interacción al variar el tamaño de las NpO y el grosor de las capas proteicas que recubren la partícula.^[109] El tamaño es un factor crítico determinante para la interacción con diferentes proteínas.^[113]

Para comprender a fondo como se forma la CP se debe conocer no solo la composición de las proteínas unidas, sino también la cinética, la afinidad y la estequiometría de las proteínas asociadas y disociadas con los NM.^[114, 115] En este sentido en un área emergente como la medicina personalizada asociada con la nanomedicina será importante conocer el comportamiento de cada individuo frente al NM y en este caso la formación de la CP en un individuo para un NM.^[116]

Debido a lo mencionado es necesario evaluar la interacción de las NpO con el plasma para obtener un perfil proteico que será dependiente de la forma y tamaño de éstas y de su funcionalización con los péptidos.

1.6.2. Efectos de la CP sobre la farmacocinética y la toxicidad.

Para anticiparse a los posibles efectos adversos que pueden generar los NM, es necesario comprender estos procesos de interacciones de los NM con fluidos biológicos y fundamentalmente con proteínas. Las NpO interactúan rápidamente con las proteínas presentes en fluidos biológicos como inmunoglobulinas, lipoproteínas, proteínas de fase aguda y proteínas involucradas en la vía del complemento y la coagulación. Las proteínas que son adsorbidas forman una capa dinámica que entra en contacto inmediatamente con los NM en los sistemas vivos y potencialmente gobiernan la biocinética de los nanomateriales y su destino *in vivo*. Estas interacciones contribuyen al tiempo de duración en la circulación sanguínea, pudiendo tener efectos importantes en la eficacia terapéutica. En condiciones fisiológicas muchos NM rápidamente se unen a proteínas séricas, por lo cual las células y tejidos nunca encuentran un NM desnudo. De esta manera algunas proteínas pueden permanecer asociadas a las NP durante el tiempo de vida de la terapia, definiendo así la respuesta biológica, influyendo sobre la captación celular, acumulación en órganos y ruta de *clearance*.^[117]

Recientemente se han identificado proteínas plasmáticas que se unen a la superficie de NpO estabilizadas con citrato, afectando el tamaño hidrodinámico de éstas, encontrándose entre ellas elementos de la coagulación, del sistema de complemento y algunas proteínas que se unen y pueden influir en el reconocimiento por células del sistema inmune y el SFM.

En esta interacción el tamaño también tiene un rol importante, pues NM de igual material pero distinto tamaño presentan diferentes perfiles de proteínas unidas en dicha corona, encontrándose diferencias en el rango, naturaleza y cantidad de éstas proteínas. En este contexto el pot-Z puede entregar mucha información, pues la mayoría de las proteínas identificadas en diferentes NM son de carácter neutro o parcialmente positivas a pH

fisiológico. Estas proteínas que se unen pueden llevar a activación de otras proteínas y resultar en respuestas como por ejemplo fenómenos inflamatorios.^[117]

Estudios realizados sobre NM en base a níquel, diamante y aluminio han identificado 69 proteínas del plasma que se unen a éstas.^[118] Otros grupos han detectado proteínas del complemento, fibrinógenos y otras 68 proteínas sobre NpO sin observar efectos sobre la agregación plaquetaria, cambios en la coagulación o activación del complemento.^[117] Las opsoninas presentes en la corona pueden crear una señal molecular, reconocida por el sistema inmune activando la internalización de partículas, pudiendo así ser claves en el destino de algunos NM.^[114] Pese a lo reportado no se debe descartar posibles efectos trombogénicos que puedan desencadenar ciertos NM con superficie polianiónica, que pueden activar los factores XII y XI, iniciadores de la cascada intrínseca de coagulación,^[74] por lo que al momento de diseñar un fármaco en base a NM se debe buscar cierta hemocompatibilidad para evitar estos posibles fenómenos.^[117, 119]

También algunas interacciones pueden ser ventajosas, pues la unión de apolipoproteínas con NpO,^[70] en especial ApoE, puede asistir en el traspaso de la BHE por transcitosis,^[105] siendo este factor determinante para terapias dirigidas al SNC.^[120, 121] Asimismo las interacciones con ciertas proteínas del plasma pueden ser ventajosas al aumentar la estabilidad de ciertos NM, dado por la estabilidad de las mismas proteínas en los distintos ambientes biológicos.^[122-124] Es el conjunto corona proteína-NM el que realmente determina la distribución dentro del organismo, resultando un nuevo paradigma en el transporte de fármacos y terapias.^[125] Así, la CP se convierte en la verdadera entidad biológica de las NP, afectando fenómenos de interacción celular, toxicidad, distribución en el organismos, captación celular y vías transporte a través de membranas y barreras biológicas (Figura 16). Por lo cual es posible hipotetizar que la NpO-CP, es la determinante

de la localización subcelular, así como a las distintas zonas donde puede acceder en el organismo, siendo un factor clave en el tratamiento y detección de enfermedades.

En la Figura 17 se esquematiza el concepto de cómo es posible modular la distribución según la naturaleza de la partícula, así una partícula sin mayor modificación superficial, expone una gran reactividad dependiendo de la naturaleza de la superficie, pudiendo unirse a muchas moléculas plasmáticas, como las opsoninas, por lo cual su acumulación se verá mayoritariamente relacionada a órganos vinculados con el SFM, (representado en verde). Una partícula modificada con PEG en superficie, disminuirá este tipo de interacciones, esperándose que éstas permanezcan mas tiempo en circulación, aumentando la disponibilidad para poder entregar fármacos a distintas dianas terapéuticas (representado en rojo). Finalmente, es posible por medio de modificaciones de la superficie de las NP modular el tipo de interacción con proteínas del plasma. Como ejemplo puede mencionarse el recubrimiento con polisorbato, con lo cual se puede inducir la interacción con ApoE y de esta manera favorecer el paso a órganos como el cerebro que presentan receptores a nivel de BHE para ApoE, (representado en azul).^[115]

Para el caso de NV y NE estabilizadas con el detergente CTAB al interaccionar con proteínas del plasma se produce una disminución de la toxicidad.^[104]

Interacciones con distintas proteínas como transferrina y ApoE, podrían modular el acceso a células tumorales que sobreexpresan receptores de transferrina y barreras biológicas como la BHE, donde se expresan receptores para ApoE facilitando así la transcitosis. Esto siempre que la interacción NP-proteína permita su reconocimiento por los distintos receptores para lo cual es necesario que las diferentes proteínas que conforman la corona proteica conserven su estructura, o parte de su estructura para favorecer el reconocimiento molecular.

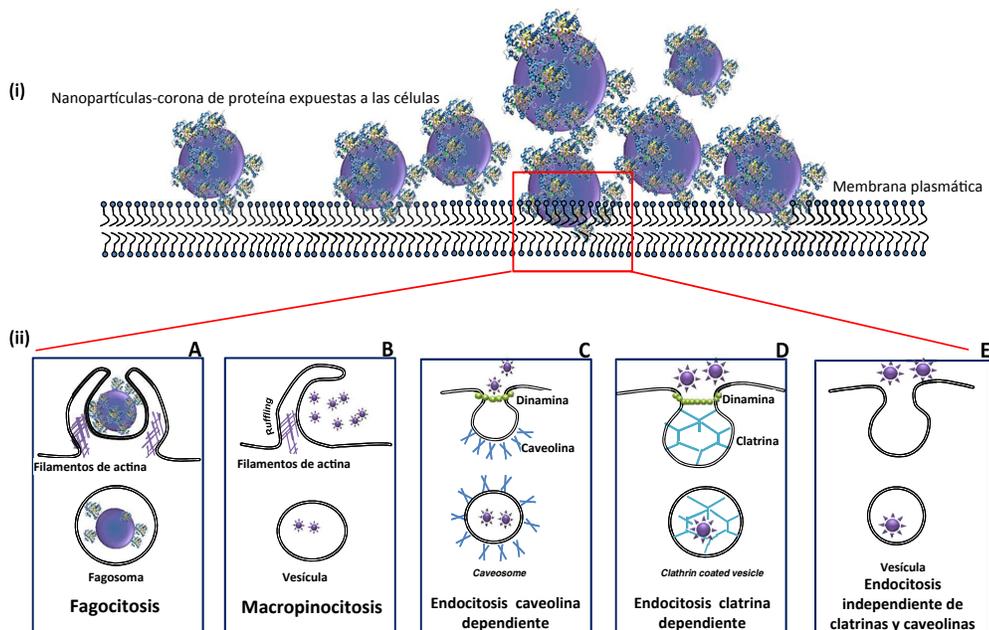


Figura 16: Interacción de NP con la superficie celular. Las NP interactúan con las células por medio de la CP. (A) Captura de complejos de NP-proteínas de gran tamaño, aglomeraciones de NP pueden ser internalizadas por células especializadas como macrófagos y neutrófilos por medio de fagocitosis, (B) Captura no específica de fluidos extracelulares conteniendo agregados de NP, por medio de macropinocitosis. La endocitosis de los complejos de NP@CP puede ser también por medio de receptores específicos involucrados en la formación de caveolas (C), clatrin (D) o por endocitosis independiente de clatrin o caveolinas (E). Imagen extraída de la referencia [108].

Las interacciones con opsoninas que pueden conducir a la captación por el SFM, pueden ser determinantes del tiempo que las NpO se mantienen en circulación.^[114, 126] Por su parte las opsoninas sobre NpO pueden tener influencia sobre la captación y el *clearance* teniendo repercusión en la distribución y llegada a los posibles blancos terapéuticos.^[119] Asimismo NpO de 50nm pueden interactuar con transferrina y así penetrar en diferentes células por endocitosis mediada por clatrin.^[127]

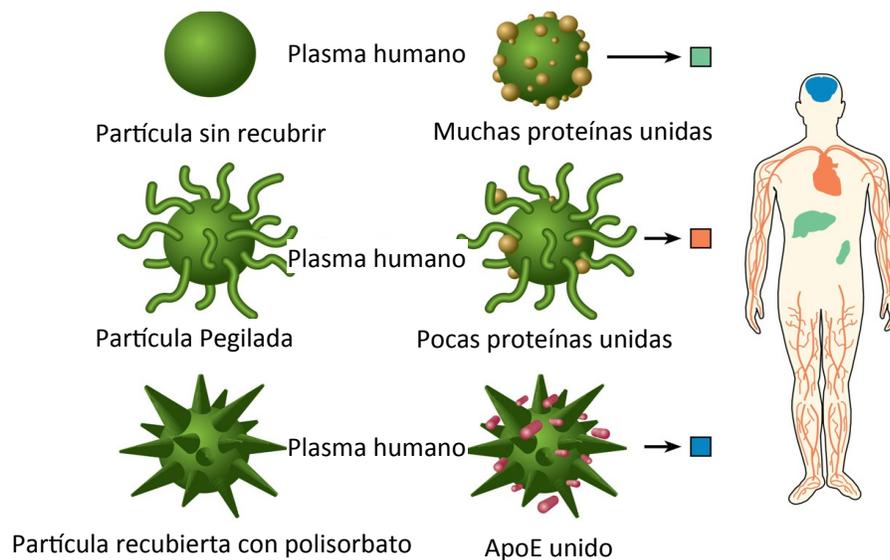


Figura 17: Biodistribución de NP determinada por interacciones con proteínas plasmáticas.^[49]

Aunque se han mencionado algunos ejemplos de los efectos de la corona sobre la farmacocinética, toxicidad y penetración celular, hasta el presente existen pocos estudios acerca de la composición de las proteínas que interactúan con los NM y su afinidad por los mismos. *Por lo cual, en el presente trabajo se estudió la interacción de proteínas del plasma con NpO funcionalizadas con péptidos.*

Finalmente es importante considerar cual es la conformación de las proteínas que forman la corona proteica ya que pueden existir cambios en sus actividades proteicas, debido a que se puede afectar a las estructuras nativas de las mismas (Figura 14), teniendo impacto biológico. La hemoglobina es un ejemplo, al interaccionar con *quantum dots* (QD), afecta su estructura secundaria produciéndose una pérdida de la actividad. Otro ejemplo es el de la albúmina también sufre cambios conformacionales al ser expuesta a NpO perdiendo su estructura nativa.^[115]

1.6.3 Posibles efectos de NM sobre la estructura y función de las proteínas.

En este complejo formado también es importante considerar cual es la conformación de las proteínas que forman la corona proteica ya que pueden existir cambios en sus actividades proteicas, debido a que se puede afectar a las estructuras nativas de las mismas (Figura 14) teniendo impacto biológico. La interacción de los NM con las proteínas puede producir plegamientos anómalos y agregación de proteínas pudiendo producir efectos tanto nocivos como beneficiosos para la salud. *Es fundamental comprender el efecto de los NM sobre los procesos biológicos esenciales como el plegamiento de proteínas que pueden llevar a posibles pérdidas de su función.*^[104, 105]

Existen pocos trabajos en la literatura en los que se estudie el efecto de los NM sobre la función de las proteínas. Por una parte, se ha descrito como NpO de 20nm pueden aumentar la actividad y estabilidad de la tripsina, posiblemente debido a que al interactuar con la superficie de NpO sufre pequeños cambios conformacionales, que conducen a un aumento de la actividad enzimática afectando en la interacción con inhibidores y a su vez protegiéndola de la degradación por autólisis.^[125, 128] Por otra parte, se han realizado estudios de interacción entre albúmina sérica humana y NPs poliméricas de gran hidrofobicidad empleando calorimetría diferencial encontrando que existe interacción entre las mismas no observándose cambios conformacionales de la proteína.^[125] En contraste, en estudios realizados con *quantum dots* (QD) y hemoglobina se determinó que existen cambios conformacionales observándose una disminución de conformaciones α -hélice al interactuar con la NP produciéndose una pérdida de la actividad.^[125] Existen indicios de que la superficie de las NpO determinada por la funcionalización y la carga, puede afectar a la estructura de las proteínas con las que interaccionan. Un ejemplo es el caso de la albúmina que sufre cambios conformacionales al ser expuesta a NpO perdiendo su estructura nativa y observándose que cuando la partícula es neutra no hay cambios significativos.^[115]

Finalmente, en este contexto resulta muy interesante conocer el posible efecto que pueda tener las NpO sobre la estructura del péptido A β . Recientemente, se ha determinado que NP magnéticas (NPM) de Fe₂O₃ no afectan al crecimiento y formación de las fibras, por lo que la presencia de las NPM no altera la agregación de A β .^[129] Así resulta crucial evaluar los efectos que puedan tener las NpO-péptido sobre la agregación y estructura de A β y si la presencia de un espaciador entre la partícula y el péptido LPFFD afecta a estos parámetros. Dichos estudios son muy relevantes considerando que las NpO podrían ser utilizadas para diagnóstico y terapia de la EA.

Actualmente dado los antecedentes que se manejan se puede pensar en realizar aproximaciones en base a modelos *in silico*, como el planteado en el trabajo de Dell'Orco y cols., en el cual se evalúa computacionalmente las posibles cinéticas que tendrían las interacciones con proteínas, según características de los NM como tamaño, carga, composición, entre otros, pudiendo así aproximarse a los pseudo estados de equilibrio que pueden presentar las interacciones entre los NM y las proteínas del plasma.^[130] Si bien aun la composición de la CP se muestra como una caja negra, mientras mayor sea la cantidad de información que se pueda obtener, modelos de este tipo tomarán mas importancia, para predecir fenómenos de estabilidad, toxicidad y también el comportamiento *in vivo*.

En el presente trabajo se estudiará el efecto de los conjugados NpO-péptido sobre la estructura y la agregación de algunas proteínas de gran relevancia biológica como albúmina, y la proteína β -amiloide respectivamente.

2. HIPÓTESIS.

La funcionalización de Nanoesferas de oro (NE) y Nanovarillas de oro (NV) con diferentes péptidos (CLPFFD, CALNNLPFFD, CALNN, C-PEG-LPFFD, C-PEG y THRPPMWSPVWPCLPFFD) reduce los efectos sobre la viabilidad celular, aumenta la estabilidad coloidal, modifica la estructura secundarias de la albúmina, el patrón de agregación de A β y la composición de la corona de proteínas plasmáticas relacionadas con el proceso de biodistribución.

La presencia de la secuencia peptídica LPFFD y THRPPMWSPVWP en los conjugados NpO-péptido aumenta la llegada de las NpO al cerebro *in vivo*.

3. OBJETIVO GENERAL.

Estudiar el efecto de la funcionalización de NE y NV con los péptidos CLPFFD, CALNNLPFFD, CALNN, C-PEG-LPFFD, C-PEG y THRPPMWSPVWPCLPFFD sobre la viabilidad celular, la estabilidad, la interacción con proteínas del plasma y la biodistribución.

Estudiar el efecto de los conjugados péptidos-nanopartículas sobre la estructura y función de proteínas como la albúmina y A β

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Sintetizar y caracterizar CLPFFD, CALNN, CALNNLPFFD, C-PEG-LPFFD, C-PEG, THRPPMWSPVWPCLPFFD
2. Sintetizar y caracterizar Nanoesferas de oro (NE) de aproximadamente 12nm y Nanovarillas de oro (NV) con relación de aspecto 4/1
3. Conjugar NE con CLPFFD, CALNN, CALNNLPFFD, C-PEG-LPFFD, C-PEG y THRPPMWSPVWPCLPFFD, y NV con CLPFFD.
4. Evaluar la estabilidad de NP funcionalizadas en presencia de plasma.
5. Evaluar toxicidad de los conjugados en líneas celulares SH-SY5Y de NM incubados y sin incubar en plasma.
6. Evaluar efectos sobre la estructura y actividad de proteínas (albúmina y A β) debidos a la interacción de NpO-péptido.
7. Identificar las proteínas del plasma que interactúan con NpO-péptido (corona de proteínas).
8. Estudiar la biodistribución de NpO-péptido (NE-CLPFFD; NE-THRCLPFFD y NE)

5. MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1. Síntesis de las secuencias CLPFFD, CALNNLPFFD, CALNN, CpegLPFFD, Cpeg, THRPPMWSPVWPCLPFFD.

La elongación del péptido en fase sólida fue llevada a cabo en jeringas de polipropileno equipadas con discos porosos de polietileno. Los solventes y reactivos solubles fueron removidos por succión utilizando una bomba de vacío. Los péptidos fueron sintetizados en fase sólida utilizando la estrategia Fmoc/tBu^[131] y obtenidos en su forma amino en el extremo C-terminal. Todos los aa utilizados fueron Fmoc protegidos y se utilizó como soporte polimérico la resina MBHA AM Fmoc Rink amida (Iris Biotech GmbH, grado de funcionalización de 0,72mmoles/g).

Antes de comenzar la síntesis, la resina depositada en la jeringa fue lavada con diclorometano (DCM; Merck, grado laboratorio, P.M. 84,93) (2 x 1min) para hincharla y luego con dimetilformamida (DMF; Merck, pro análisis. P.M. 73) (3 x 1min + 1 x 5min). La remoción del grupo Fmoc se realizó con piperidina (Aldrich, pro análisis P.M. 85,15) al 20% en DMF (1 vez x 1min, 2 veces x 10min). Finalmente se lavó con DCM (5 x 1min), para eliminar trazas de piperidina y evitar desprotecciones no deseadas. Posteriormente, se realizó el ensayo de ninhidrina para confirmar la desprotección del grupo amino de la resina.

Las reacciones de acoplamiento se llevaron a cabo con Fmoc-aminoácido (Iris Biotech GmbH) (4 equivalentes) y en el caso de PEG se empleó Fmoc-PEG(3)-COOH (ácido 12-(9-Fluorenil-oxicarbonil-amino)-4,7,10-trioxa-dodecanoico; Iris Biotech GmbH) (4 equivalentes), en donde cada residuo se debió emplear con su grupo carboxilo activado mediante carbodiimidas y un agente acoplante como HOAt (1-Hidroxi-7-Azabenzotriazol; Medialchem de 99% pureza y de P.M. 136,14) (12 equivalentes) y/o HOBt (hidroxibenzotriazol) según

fuera el caso y PyBOP (Iris Biotech GmbH, P.M. 520,30) (4 equivalentes), los cuales fueron secuencialmente agregados a la resina, y luego disueltos en 1mL de DMF, dejándose la mezcla reaccionar por 60min. Transcurrido dicho periodo se evaluó la efectividad del paso de acoplamiento mediante el ensayo de ninhidrina. A partir del resultado se continuó con la desprotección correspondiente para realizar el siguiente acoplamiento o bien se reacopló el aminoácido hasta obtener una reacción de ninhidrina negativa. Para realizar el reacople se repitió el mismo procedimiento. Los lavados entre desprotección, acoplamientos de aa y los subsecuentes pasos de desprotección, se llevaron a cabo con DMF (3 veces x 1min) y CH₂Cl₂ (3 veces x 1min), usando 5mL de solvente cada vez.^[132] La desprotección del grupo amino del aminoácido recién incorporado se realizó mediante la adición de piperidina-DMF al 20%. Finalmente se agregó la solución de clivaje (TFA 95%:H₂O 2,5%:TIS 2,5%; (TFA: Aldrich. Pureza 99%, P.M. 114,02; TIS: Fluka. Pureza 98%. P.M. 158,36) sobre la resina y se dejó reaccionar por 60min para producir la escisión del péptido desde la resina. Luego de evaporar el solvente con un *rotavapor*, fueron realizadas sucesivas precipitaciones con *tert*-butil-metil-eter (Fluka. Pureza 99%. P.M. 88,15) y subsecuentes centrifugaciones. Se eliminó el éter por evaporación con un flujo de nitrógeno gaseoso (N₂). Luego el péptido obtenido se resuspendió en una mezcla Acetonitrilo:H₂O (1:1) (Acetonitrilo (ACN):Merck. Pureza grado HPLC. P.M. 41,05). Posteriormente se procedió a congelar y a liofilizar.

5.2. Caracterización de los péptidos CLPFFD, CALNNLPFFD, CpegLPFFD, CALNN, Cpeg y THRPPMWSPVWPCLPFFD.

5.2.1 Cromatografía líquida de alta eficiencia.

(*High-performance liquid chromatography, HPLC*). Los crudos obtenidos de la síntesis en fase sólida se analizaron mediante cromatografía líquida de alta eficiencia para determinar su pureza. Para esto una pequeña cantidad de péptido (± 80 mg) se disolvió en 4mL de una

mezcla ACN: H₂O (1:1). Este se filtró en un filtro de PVDF de 0,4µm y del filtrado se depositaron 250µL en un vial plástico (diseñado para el carrusel del HPLC). El vial se colocó en el carrusel del equipo de HPLC/PDA, HPLC analítico Waters 1525 con detección UV, el cual se configuró luego para tomar solo 10µL y realizar la cromatografía sobre una columna Waters Sunfire (C18; 3,5µm; 4,6 x 100mm) Con este equipo se obtuvo un cromatograma dado por la absorbancia a 220nm, en donde absorbe el enlace peptídico. Se realizó un gradiente de 0 a 100% del eluyente ACN en H₂O obteniéndose a partir de éste, el tiempo de retención de los productos, y la polaridad adecuada del eluyente, puesto que en algunos péptidos se debió ajustar este parámetro para su mejor separación. Luego el vial empleado en este HPLC, se colocó en un siguiente HPLC que posee un detector de masa (HPLC/MS), el cual se configuró para tomar 5µL, con los cual se pudo pre-identificar cada producto utilizando el detector de masa, que correlacionó cada pico detectado por el detector UV-VIS. Posteriormente el péptido se purificó por HPLC semi-preparativo WATERS ALLIANCE, con una columna C18. Finalmente se obtuvieron los cromatogramas HPLC de los péptidos purificados.^[14]

5.2.2 Espectrometría de masas desorción/ionización láser asistida por matriz.

(*Matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI-TOF*). Los péptidos purificados fueron analizados mediante un equipo de espectrometría de masas desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF) Bruker model Biflex III, utilizando una matriz de ácido 2,5-dihidrobencóico (DHB; Fluka. Ultra Puro. P.M. 154,12) a una concentración de 10mg/mL en ACN/HCOOH 0,1% v/v (1:2). Para preparar la muestra se mezcló 1µL de la solución de péptido puro y 1µL de la matriz. Dicha mezcla se dejó secar sobre una placa porta muestra metálica *micro scout* que posteriormente fue irradiada dentro del equipo de MALDI-TOF.^[14]

5.2.3 Análisis de aminoácidos (AAA).

Para obtener la proporción de los aa que conforman el péptido, estos deben ser separados para analizarlos individualmente. Para esto se realizó una hidrólisis agregando HCl 6N y un patrón de concentración conocida (ácido aminobutírico) calentándose la muestra en un tubo cerrado a 110°C durante 72 horas. Posteriormente, se eliminó el ácido clorhídrico mediante evaporador rotatorio (hasta sequedad). El sólido obtenido fue resuspendido en 200µL de HCl 20mM, de los cuales se tomaron 20µL, a los cuales se le agregaron 60µL de tampón borato (reactivo comercializado junto al AccQ-Tag kit de Waters como AccQ-Fluor Borate buffer). Posteriormente la muestra se derivatizó agregando 20µL de 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato (AQC) (reactivo comercializado como AccQ-Fluor por Waters), el cual se dejó durante 1min a temperatura ambiente y luego 10min a 55°C, para permitir que reaccione con aminas primarias y secundarias, reacción que se describe en la Figura 1.25. Una vez realizado este proceso la muestra se inyectó en un equipo de HPLC-PDA conteniendo una columna AccQ-Tag, (C18; 4µm; 3,9x15mm) obteniéndose los picos correspondientes a los aa presentes en la muestra, para poder realizar la comparación se cuenta con un estándar de aa (pico-Tag comercializado junto al kit AccQ-Tag por Waters). Las áreas de los mismos se compararon frente a la de patrones de los aa, determinándose así el contenido de estos. Finalmente se determinó la proporción relativa de cada aminoácido en el péptido, con lo cual se puede corroborar si la secuencia es la correcta, por medio de estos resultados sumados a los obtenidos por la detección de masa se pudo corroborar que la secuencia deseada es la correcta y no un producto no deseado.

5.3. Síntesis de NE, NV, obtención de conjugados y caracterización.

5.3.1 Preparación del material.

Previo a la síntesis de nanopartículas, el material utilizado debe estar limpio y libre de interferentes, para ello se dejó en Extrán al 2% en H₂O destilada durante una noche, posteriormente se enjuagó con agua y se dejó en agua regia (3:1 HCl/HNO₃) durante 30 minutos, para finalmente realizar enjuagues sucesivos en agua Milli-Q (18,2MΩcm). A su vez, todas las soluciones necesarias se prepararon en agua Milli-Q.^[16, 133]

5.3.2. Síntesis de NE.

Para la obtención de NE de tamaños cercanos a 12nm, se desarrolló el protocolo descrito por Levy y cols.^[12, 13] Se preparó 100mL de una solución acuosa 1mM de HAuCl₄ (Aldrich, pureza 99,9%, P.M. 339,79). Esta solución se colocó en un balón de dos cuellos de 250mL. Sobre su cuello central se conectó un sistema de reflujo simple y un *septum* en el cuello lateral. El balón se dejó sobre un manto de calefacción con agitador magnético incorporado para lograr una mezcla continua y fue llevado a reflujo constante a ebullición durante 8min. Posteriormente se agregó rápidamente, por el cuello lateral del balón, 10mL de una solución acuosa 38,8mM de Na₃C₆H₅O₇*2H₂O (Fluka, pureza 99,5%, P.M. 294,1) a 60° C (calentado en microondas). Inmediatamente luego de agregada la solución apareció un color negro intenso en la mezcla, el cual transcurrido 3min pasó a un color rojo borgoña intenso, indicativo de la formación de las NE. Se dejó el sistema a reflujo por 30 minutos más y una vez terminado se dejó enfriar el balón a temperatura ambiente. Posteriormente se filtró la solución mediante un filtro de PVDF de 0,45μm y las NE obtenidas se almacenaron a 4°C.^[13, 14]

5.3.3. Síntesis de NV.

Las NV fueron sintetizadas químicamente mediante el método de crecimiento mediado por núcleos de oro de un tamaño de 3-5nm.^[23] Para obtener NV se comenzó con la preparación de la solución de núcleos de oro, para lo cual se adicionó 250µL de una solución de H_{AuCl}₄ 10mM sobre 9,5mL de una solución 0,1M de surfactante bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB). Como agente reductor se agregó una solución fresca fría de NaBH₄ 0,01M, observándose inmediatamente un cambio de coloración de amarillo a pardo. El sistema se mantuvo bajo agitación vigorosa durante 30min y se dejaron en reposo por 2h. Para utilizar los núcleos obtenidos en una segunda etapa. En esta segunda etapa se preparó la solución de crecimiento de las NV mezclando en un vial de vidrio 75µL de AgNO₃ 0,01M y 9,5mL de CTAB 0,1M y en presencia se una agitación suave se agregaron 500µL de H_{AuCl}₄ 0,01M. Rápidamente a esta solución se le agregaron 55µL de ácido ascórbico 0,1M como agente reductor, apreciándose una decoloración del amarillo de la solución quedando transparente, lo que indica que se ha producido la reducción del oro a Au⁺¹. Posteriormente se agregaron 250µL de HCl 0,1M y luego 12µL de la solución de núcleos preparada en la primera etapa. Se realizó una agitación muy rápida por pocos segundos y luego esta solución se dejó reaccionar por 10min a 27°C. Al cabo de los 10min, la solución fue centrifugada a 7030RCF durante 15min. Finalmente el *pellet* obtenido fue separado del sobrenadante y resuspendido en 4mL de una solución de CTAB 0,1M, o directamente en una solución acuosa conteniendo el péptido deseado para su funcionalización. Después de 72h la solución fue centrifugada a 1520RCF durante 60min y el *pellet* fue resuspendido en 4mL de CTAB 2,5x10⁻⁵ M, obteniéndose así una solución coloidal de NV estabilizadas con CTAB (NV-CTAB) o con el péptido deseado.^[29, 39]

5.3.4. Obtención de conjugados de NE con péptidos CLPFFD, CALNNLPFFD, CpegLPFFD, CALNN, Cpeg y THRPPMWSPVWPCLPFFD.

Las NE obtenidas fueron conjugadas con los péptidos CLPFFD, CALNNLPFFD, CpegLPFFD, CALNN, Cpeg y THRPPMWSPVWPCLPFFD, respectivamente. Se preparó una solución 1,5mM de cada péptido que se agregó a 20mL de NE (de concentración aproximada 8nM), previo a esto las NE fueron llevadas a un pH superior al del punto Isoeléctrico (pI) de cada péptido, con el fin de evitar agregación por carga, para lo cual se utilizó NaOH 0,1M. La mezcla anterior fue agitada durante la noche a temperatura ambiente para favorecer la quimisorción, luego se depositó la solución dentro de una membrana de diálisis (Spectrum Lab de diámetro 32mm, MWCO 6.000-8.000). La muestra fue dializada durante 3 días frente a 2L de una solución de citrato de sodio 1,2mM. La solución externa se renovó 1 vez por día en este período. Cada solución de NE-péptido fue conservada a 4°C hasta su posterior uso.

5.3.5 Obtención de conjugados de NV con el péptido CLPFFD.

Para obtener los conjugados NV-CLPFFD luego de la síntesis antes descrita de NV, una vez obtenido el *pellet*, éste fue resuspendido en una solución acuosa de péptido a una concentración de 0,088mM. Una vez homogeneizada la solución coloidal se dejó interaccionar durante 72h a 27°C. El paso final consistió en centrifugar a 1520RCF durante 60min y el *pellet* fue resuspendido en una solución acuosa de CTAB $2,5 \times 10^{-5}$ M.

5.4. Caracterización de las NpO y de los Conjugados NpO-péptidos.

Los conjugados fueron caracterizados por espectrofotometría UV-Vis-NIR, DLS, pot-Z, XPS, TEM y TEM de alta resolución así como espectroscopia electrónica de pérdida de energía (EELS). Asimismo, la relación de número de moléculas de péptido/nanopartícula se

determinó por activación neutrónica (AAN) o ICP/MS y AAA. Cada análisis realizado se llevó a cabo para 3 lotes obtenidos en diferente tiempo, de los cuales se informa el resultado promedio y su correspondiente desviación estándar.

5.4.1. Caracterización por Espectrofotometría de absorción molecular.

Una vez obtenidas las NE fueron caracterizadas mediante espectrofotometría de absorción molecular utilizando un espectrofotómetro Perkin Elmer modelo Lambda 25 UV, para observar la banda de resonancia del plasmón. Estas mediciones fueron realizadas en cubetas plásticas de 1cm de longitud en un rango de 400-800nm empleándose como blanco citrato de sodio 1,2mM en el espectrofotómetro de doble haz. Por su parte, las NV obtenidas también fueron caracterizadas mediante espectrofotometría de absorción molecular, con la finalidad de observar las dos bandas de plasmón características: la transversal aproximadamente en una λ de 510nm y la longitudinal en una λ que abarca desde los 600-1000nm, dependiendo de su relación de aspecto.^[134] En este caso particular, al ser las NV de una relación de aspecto ~ 4 , sus bandas características presentan λ cerca de los 510nm y los 800nm, respectivamente. Por su parte, una vez obtenidos los conjugados, estos fueron caracterizados mediante esta técnica bajo las mismas condiciones que NpO sin conjugar con el fin de detectar variaciones en la banda del plasmón después de la conjugación. Así, el ensayo se realizó en NE, NE-CLPFFD, NE-CALNNLPFFD, NE-CALNN, NE-CpegLPFFD, NE-Cpeg, NE-THRPPMWSPVWPCLPFFD así como también en NV y NV-CLPFFD. Es necesario señalar que las NE-CLPFFD(cf) y NE-THRCLPFFD(cf) (cf corresponde a carboxifluoresceína) fueron caracterizadas además por fluorescencia, empleando un espectrofluorímetro Perkin Elmer Luminance Spectroscopy LS50B. Para obtener el espectro de fluorescencia se excitó la muestra con una λ de 492nm, correspondiente al máximo de excitación de carboxifluoresceína, y se

obtuvo el espectro de emisión entre las λ 500-550nm, el máximo de emisión se espera en una λ de 517nm.

5.4.2. Microscopía electrónica de transmisión.

(*Transmission electron microscopy, TEM*). Esta técnica se ha descrito para estudiar la morfología y homogeneidad de tamaño de las NpO. Las imágenes obtenidas de NE y NV fueron realizadas en un equipo JEOL JEM-1010. Para realizar esta medición se depositó una gota de 20 μ L de la muestra sobre una rejilla de cobre de 200mesh recubierta con el polímero *formvar* que luego se dejó secar por al menos 1 hora. Finalmente se observó al microscopio empleando una aceleración de los electrones desde 120keV. En el caso de la NV, las rejillas fueron pre tratadas para aumentar la adhesión de las mismas por las NV. Estas fueron cargadas sometiéndolas a una luz ultravioleta durante 15s. Luego de este tratamiento, se siguió con el procedimiento descrito previamente de depósito de la muestra, secado y observación de la misma. Así, el ensayo se realizó en NE, NE-CLPFFD, NE-CALNNLPFFD, NE-CALNN, NE-CpegLPFFD, NE-Cpeg, NE-THRPPMWSPVWPCLPFFD así como también en NV y NV-CLPFFD

5.4.3. Dispersión dinámica de la luz.

(*Dynamic light scattering, DLS*). Las NpO, tanto NE como NV también fueron caracterizadas mediante DLS con el objetivo de determinar sus diámetros hidrodinámicos y su estabilidad coloidal. Estas mediciones fueron realizadas por triplicado en un equipo Malvern Instrument Zetasizer Nano ZS en cubetas plásticas de 1cm. Así, el ensayo se realizó en NE, NE-CLPFFD, NE-CALNNLPFFD, NE-CALNN, NE-CpegLPFFD, NE-Cpeg, NE-THRPPMWSPVWPCLPFFD así como también en NV y NV-CLPFFD.

5.4.4. Potencial Z.

(*Z potential, pot-Z*). Las NpO, tanto NE como NV también fueron caracterizadas según la carga aparente superficial, dada por la carga, con el objetivo de determinar posibles relaciones físicoquímicas que permitan predecir estabilidad así como también su incidencia biológica. Estas mediciones fueron realizadas por triplicado en un equipo Malvern Instrument Zetasizer Nano S90 en cubetas plásticas de 1cm.

5.4.5. Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X.

(*x-ray photoelectron spectroscopy, XPS*). Mediante espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS) se observaron las señales de los electrones $4f_{7/2}$ y $4f_{5/2}$ del oro para el caso de las NE y NV, para el caso de las NV también se observaron los electrones 3d del bromo proveniente del CTAB, y finalmente los electrones $3d_{5/2}$ y $3d_{7/2}$ de la plata, uno de los elementos fundamentales en la síntesis para controlar la relación de aspecto. Para el caso de los conjugados se observaron las señales de los electrones $S 2p_{3/2}$ y $S 2p_{1/2}$ del azufre proveniente de los péptidos para verificar la unión S-Au.

Las mediciones se realizaron en un equipo PHI Multitechnique 5500 con una fuente monocromática de rayos X (Al KR línea de 1486,6 eV de energía y W 350). La muestra es pulverizada y puesta en una cámara ultra alto de vacío entre 5×10^{-9} y 2×10^{-8} Torr.

5.4.6. Estimación del número de moléculas de péptido por NpO (NE y NV).

Los conjugados se dividieron en dos alícuotas. A una de ellas se le determinó el contenido de aa y a la otra el contenido de oro para obtener la concentración de NpO. Una alícuota fue de 200 μ L para cuantificación de oro y otra de 8mL de NE y sus conjugados así como 15mL de NV y sus conjugados para el AAA. De esta manera se estableció la relación moléculas de péptido/NpO.

5.4.7 Activación neutrónica para la determinación de oro.

En paralelo a lo anterior, alícuotas de 200µL de los conjugados fueron liofilizadas y en el residuo obtenido se determinaron los niveles de oro por AAN. Estas determinaciones se realizaron en la Comisión Chilena de energía Nuclear (CChEN). Las muestras fueron colocadas en un papel de aluminio. Estas se introdujeron en un reactor nuclear RECH-1 con un flujo de electrones de $2-4 \times 10^{13} \text{ n}/(\text{cm}^2 \text{xs})$ por un tiempo de alrededor de 15-25h iniciando así la conversión de ^{197}Au a ^{198}Au . Luego de 6-9 días de decaimiento, los rayos γ emitidos por la muestra fueron contados y ordenados por energías usando un detector de germanio acoplado a un espectrómetro de rayos γ multicanal. Los espectros γ fueron analizados con el *software* SAMPO90 Canberra. Una vez obtenida la concentración de oro presente en la muestra y conociendo el número de átomos por NE y NV así como la densidad de este elemento en el nanocrystal y el tamaño de las mismas mediante observaciones de TEM (realizando una estadística sobre 100 partículas de NE y NV) se determinó la concentración teórica molar de las NE y NV.^[50, 135] Finalmente conociendo la concentración de péptido en las NpO y la concentración de estas mismas partículas se determinó el número de moléculas de péptido por NpO.

5.4.8. Fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo, con detector de masa o acoplado a un espectrofotómetro de emisión óptica.

(Inductively coupled plasma ICP, mass spectrometry, ICP-MS and optical emission spectrometry, ICP-OES). En conjunto a la AAN, mediante ICP-OES e ICP-MS se puede determinar la cantidad de oro total de la muestra. Para tratar las muestras de NpO-péptido se tomaron 25mL de cada muestra que se depositaron en un reactor de teflón (el cual fue limpiado previamente con una solución de 3,5mL HNO_3 + 0,5mL HCl . Se dejó por 2h a 90°C) al que se le agregó 1mL de HNO_3 + 0,5mL de H_2O_2 + 0,5mL HCl . Se cerró el reactor

herméticamente y se dejó durante toda la noche a 90°C. Luego se dejó enfriar y se trasvasió toda la mezcla a un matraz aforado el cual se enrasó a 25mL con una solución de Tiourea (TU: 0,02% Tiourea en HCl 0,12M) (quedará al 2% de HNO₃ en TU). Posteriormente se inyectó en el equipo ICP-MS empleándose para la cuantificación soluciones patrón de Au de diferentes concentraciones (0; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2,5 y 5ppm). El detector de masa entregó un valor que debe ser integrado en la curva de calibración.

5.4.9. Estimación de la concentración molar de NE y NV.

Una vez obtenidos los datos de oro, se procedió a la estimación de la cantidad en concentración molar de las NpO, la cual es un valor teórico y sirve como una aproximación.

Para el caso de las NE, el proceso no es complejo y se refiere al uso de la ecuación 2.1 publicada por Liu y cols., que considera los datos de diámetro obtenidos por TEM y así al conocer la concentración de moles obtenidos de Oro se puede calcular a cuantos moles de NE equivalen.^[136]

Ecuación 2.1:

$$N_{NE} = \frac{\pi\rho D^3}{6MF_c} = 30,89602D^3$$

Donde:

N_{NE} : Numero de átomos de oro por NE

ρ : Densidad de una solución de oro (19,3 g/cm³)

M : Masa molecular del oro (196,97g/mol)

D : Diámetro de NE determinadas por TEM en nm

F_c : Factor de conversión de unidades

Para el caso de las NV, conociendo los datos de las cantidades en moles de oro y conociendo el largo y el ancho promedio de las NV (determinados ambos por TEM) se procedió a determinar la concentración (molar) de NV (C_{NV}) siguiendo la ecuación 2.2 publicada por Link y cols.^[137]:

Ecuación 2.2:

$$C_{NV} = \frac{4C_{Au}}{\rho\pi W^2L}$$

Donde:

C_{NV} : Concentración molar de NV

ρ : Densidad de átomos de oro en el bulk (59 átomos/nm³)

C_{Au} : Concentración de oro determinado

L : Largo de las NV determinadas por TEM

W : Ancho de las NV determinadas por TEM

5.4.10. Análisis de aminoácidos (AAA).

Al igual como se procedió con los péptidos puros, es necesario realizar la derivatización de cada aminoácido para poder identificarlo. Así, para conocer la fracción o porcentaje de péptido unido a las NpO (NE y NV) se realizaron AAA a los conjugados.

El proceso es muy similar al descrito para los péptidos puros. Para lo cual se liofilizaron 8mL de los conjugados tanto de NE, NE-CLPFFD, NE-CALNNLPFFD, NE-CALNN, NE-CpegLPFFD, NE-Cpeg, NE-THRPPMWSPVWPCLPFFD así como también 15mL de NV y NV-CLPFFD. Una vez obtenido el liofilizado, el procedimiento fue tal cual al descrito previamente en la caracterización de los péptidos. (sección 2.1.2.3)

5.5. Estudio de estabilidad de NpO y sus conjugados en PBS y plasma.

Para estas mediciones se incubaron los *pellets* resultantes de 10mL de cada solución de nanopartículas (luego de centrifugar por 16100RCF durante 15min) con 10mL de PBS 0,1M o 10mL de una solución de plasma humano diluido al 30% en agua ultra pura. Los mencionados *pellet* se resuspendieron empleando un vortex por 1min. Las muestras se dividieron en 10 alícuotas de 1mL cada una y se dejaron incubando por diferentes tiempos a 37°C. Para el caso de la medición por espectrofotometría UV-vis se midió directamente utilizando como blanco una solución equivalente de plasma sin NpO conjugadas. Para la determinación de tamaños por DLS, aquellas muestras incubadas en PBS se midieron sin problemas, mientras que aquellas incubadas en plasma, se debieron centrifugar pues la presencia del plasma generó interferencia en la señal. Para ello las muestras se centrifugaron a 16100RCF por 45min y los *pellet* obtenidos se resuspendieron en agua ultra pura. De la misma manera para realizar micrografía TEM se debió eliminar el plasma en exceso con el fin de intentar observar la posible CP sobre las NpO conjugadas.

5.6. Evaluación de efectos de las NpO sobre la estructura y actividad de proteínas debidos a la interacción de NpO-péptido.

Para evaluar los posibles efectos de las NpO sobre péptidos y proteínas, se propuso evaluar los efectos sobre la formación de fibras de β -amolide y sobre la estructura secundaria de la albúmina. Para obtener información acerca de la interacción de las NpO con las proteínas se puede realizar un espectro de absorción, en el cual se espera un cambio sobre la RPS de NpO.^[109] Los efectos sobre las proteínas pueden evaluarse determinado cambios en la actividad de las mismas, en cambios estructurales por dicroísmo circular.^[109]

5.6.1. Efectos de NpO sobre la estructura secundaria de la albúmina estudiados por dicroísmo circular (CD).

Para este fin se incubó 0,1mM de Albúmina con 0,4nM de conjugados, luego de lo cual, se colocó la suficiente muestra en una cubeta para CD, y empleando un equipo Jasco 815 de dicroísmo circular, se obtuvo el espectro entre 190 y 250nm, con un tiempo de respuesta de 2s y una velocidad de barrido de 100nm/min y una resolución de 0,5nm. Cada espectro es el resultado del promedio de 3 acumulaciones. Los espectros se graficaron según su elipticidad molar media $v/s \lambda$. Empleando estos datos se realizó el análisis determinándose los contenidos de las siguientes estructuras: % α -hélice, el % de lámina- β y el % de espirales al alzar. Para el análisis se empleó la base de datos Dichroweb (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/process.shtml>), con la cual es posible realizar la comparación para cada espectro, y así obtener el % de estructuras secundarias en cada caso.^[109]

5.6.2 Estudio de la formación de fibras del péptido A β ₁₋₄₂ en presencia de NpO.

Para estudiar la forma en que se agrega el péptido β -amiloide, se debe obtener una solución homogénea del mismo libre de agregados. Para lo cual una alícuota de 1mg de péptido A β (comercializado por r-peptide, USA) se suspende en agua (1mL). La solución es dividida en 10 alícuotas que posteriormente fueron liofilizadas y almacenadas a -20°C. Así previo cualquier ensayo con A β , una alícuota de 100 μ g, es disuelta en 200 μ g de 1,1,1,3,3,3-hexafluoro- 2-propanol (HFIP), condición en la que se mantiene por 30min a temperatura ambiente. Posteriormente la alícuota es nuevamente liofilizada, y una vez obtenida la muestra se disuelve en agua para obtener una solución 400 μ M de. De esta manera se forman los intermediarios prefibrilares para agregación amiloidogénica. Esta solución debe ser preparada y utilizada en el momento para comenzar los estudios posteriores.

Así para evaluar el comportamiento de A β en presencia de las NpO (NE; NE-CLPFFD; NE-THRCLPFFD; NV-CLPFFD y NV-CTAB), se empleó una concentración final de 1nM de nanopartículas. Así para 200 μ L se empleó un volumen de 25 μ L de NE y para el caso de las NV, la concentración final fue de 0,2nM, para lo cual se empleó 40 μ L de las NV siendo el volumen final de 200 μ L. A estas soluciones se les agregó A β (preparado como se indico en el párrafo anterior), para conseguir una concentración final de 100 μ M de A β . Así la solución es incubada a 37°C con agitación de 300rpm, durante el tiempo que tarda el ensayo, en nuestro caso el estudio se realiza para las primeras estadías del crecimiento, dado durante 24 horas. Durante el tiempo, la formación de fibra es monitoreada por el ensayo de tioflavina (Th-T) y el producto final se analiza por TEM para confirmar la presencia de las fibras.

5.6.2.1 Estudio de agregación de A β en presencia de NpO mediante fluorescencia de Th-T.

El seguimiento de la formación de fibras de A β se realizó por el test de fluorescencia de Th-T (450nm_{Ex}/480nm_{Em}) en presencia de fibras de A β . De esta manera se puede detectar la presencia de fibras como así también evaluar la desaparición o aumento de las mismas.^[138, 139] Así para llevar a cabo el ensayo, durante la incubación, 10uL de las muestras se depositaron en pocillos de placas de fondo negro Nunc F96 MicroWell™ Plates Polystyrene Black que contenían 80μL del buffer glicina 0,1M a pH 8,4 y segundos antes de realizar la medición se agregaron 10μL de Th-T 100μM a cada pocillo. Estos experimentos fueron realizados en un espectrofluorímetro de placas BioTek, modelo synergy MX, excitando a 450nm y leyendo la fluorescencia a 480nm. Todos los datos de fluorescencia de Th-T realizados en la presente tesis se expresaron como la media +/- SD (desviación estándar).

5.6.2.2. Estudio de agregación de A β en presencia de NpO mediante TEM.

Para evaluar la formación de las fibras se empleó TEM, para lo cual, se emplearon rejillas de Cu (200mesh recubiertas con una película de carbono formvar). Para la carga de la muestra, se depositan 20μL de muestra sobre una superficie muy limpia, se suele emplear un trozo de papel transparente parafilm para esto. Sobre esta gota, se deposita cuidadosamente la rejilla, cuidando de colocar la cara formvar en contacto con la muestra, el tiempo de contacto es de 2min, luego de los cuales la rejilla es tratada para disminuir el exceso de muestra. Para esto último se debe depositar la rejilla cargada sobre una gota de agua Milli-Q de 10μL durante 1min, proceso que debe ser repetido dos veces, se traspasa la rejilla sobre una gota de 20μL de acetato de uranilo al 2% y se deja durante 2min.

Finalmente se eliminó todo el exceso de líquido de la rejilla y se dejó secar durante al menos 2 horas para luego observar la rejilla por TEM.

5.7. Evaluación de la viabilidad celular en presencia de NpO.

Con el fin de evaluar el efecto de las NpO sobre la viabilidad celular, se realizó el ensayo de proliferación celular en solución acuosa (CellTiter 96[®] comercializado por Promega), conocido como MTS, es un ensayo colorimétrico, que permite determinar el número de células viables en ensayos de proliferación y de citotoxicidad. Este método está basado en la reducción de una sal de tetrazolio [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio, MTS] en presencia del reactivo acoplante electrónico metosulfato de fenazina; PMS).

El estudio de toxicidad se realizó en líneas celulares SH-SY5Y sembradas sobre placas de 96 pocillos, con una confluencia de 2500 células por pocillo. Una vez pegadas las células (5000 células) fueron tratadas con las NpO durante 24 hs. Las mismas fueron incubadas a 37°C y con 5% de CO₂. Luego de transcurrido el tiempo, se descartó el sobrenadante y se agregaron 100µL de medio DMEM+10%FBS, sobre los cuales se agregaron 20µL de la solución MTS/PMS (2mg/mL MTS y 0,046mg/mL PMS). La placa se incubó a 37°C y 5% de CO₂ por un período de tiempo entre 0,5-2 horas. De esta manera se reduce el del MTS dando un producto detectable por espectrofotometría a una λ de 490nm en un espectrofluorímetro de placas, empleando también un valor de referencia en los 655nm. El resultado corregido se entrega por la diferencia de la absorbancia medidas $Abs_{\lambda 490nm} - Abs_{\lambda 655nm}$. El ensayo de viabilidad se realizó en un triplicado por placa y un triplicado de placa, obteniéndose un n=9. Los datos se ajustan al control positivo referido como 100% de viabilidad. Los datos se entregan según la desviación estándar y se realiza una comparación según un análisis estadístico de varianza en una vía ANOVA, con una

corrección de tukey y un nivel de significancia, $\alpha=0.05$ (95% intervalo de confianza). ($p>0,05$ es ns; $p\leq 0,05$ *; $P<0,01$ ** y $p<0,001$ ***)

5.8. Identificación de las proteínas de suero y plasma que interactúan con NpO-péptido (CP).

Se realizó la incubación de las NpO-péptido con plasma, para ello se tomaron 20mL de cada NpO-péptido y se concentraron utilizando tubos de separación por centrifugación Amincon con un MWCO de 5000 para lo cual se centrifugaron durante 20min a 16100RCF (concentración final de las nanopartículas fue de 20nM). A la solución resultante se le agregaron 4mL de plasma (diluido al medio con PBS), obteniéndose un volumen final de 8mL. La solución resultante se incubó durante 24 horas a 37°C. Pasado el tiempo de incubación se procedió a la separación de las proteínas del plasma no unidas a los conjugados. Dicha separación se realizó en base a métodos no perturbadores para el complejo NM-proteína. Para ello se realizó una centrifugación a 16100RCF por 45min. El *pellet* se resuspendió en PBS 10mM, seguido de una nueva centrifugación bajo las mismas condiciones. El *pellet* resultante se resuspendió en H₂O nanopura y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Para la separación de las proteínas se empleó una solución desnaturalizante consistente en 8M Urea/2% CHAPS. Para lo cual se agregó 150uL de la mencionada solución al *pellet* obtenido en el paso anterior sonicándose luego por 30min. Posteriormente se dejó incubando la solución resultante por 2h luego de lo cual se realizó una centrifugación final, esta vez recuperando el sobrenadante que contenía las proteínas que interaccionan con las nanopartículas. La identificación de las mismas se realizó de acuerdo a Lundqvist y cols. empleando geles desnaturalizantes 2D SDS/PAGE.^[116] Para ello en primer lugar se cuantificaron las proteínas obtenidas y luego se sembraron en los geles exactamente 50mg de las proteínas totales sobre la tira de isoelectroenfóque (tiras

marca GE health & care, con un rango de pH de 3-10 no lineal). Así se realizó la corrida en la 1ª dimensión en un equipo de Isoelectroenfoque Ilphor GE. El programa de corrida se dividió en 4 pasos: el primero de 16 a 20 horas para el sembrado de la muestra, el segundo de 30min con una carga total de 500V, el tercero de 30min a 1000V y finalmente el cuarto de 1h 40min a 5000V hasta conseguir un total de 7500Vha. Posteriormente cada tira con la primera dimensión realizada se colocó en un gel de poliacrilamida SDS-Page desnaturalizante preparado al 10%, el cual se corrió a 120V con 20mA por gel. Una vez obtenido el gel en 2D, se realizó una escisión de los *spots* seleccionados, una digestión con tripsina, la muestra obtenida fue concentrada y purificada por medio de una columna C18 en fase reversa y eluida directamente sobre la placa de MALDI junto a 1µL de matriz ácida de α-ciano-4-hidroxicinámico (HCCA) (al 99%, Aldrich preparada 10mg/mL en 50% ACN/H₂O (v/v) y 0,1% de TFA), para así realizar el análisis de masas empleando para ello un espectrometro de masas MALDI-TOF-TOF 4700 proteomics analyzer (Applied Biosystems). Los datos de espectrometría de masas fueron empleados para identificar las proteínas de la base de datos NCBI primary sequence, utilizando como buscador el sistema MASCOT. En donde la identificación se realizó comparando espectros (MS/MS) de cada fragmento con un parámetro de búsqueda con un máximo de 2 fragmentos de corte perdidos. La tolerancia en el peso molecular fue de 70ppm y 0,25Da, para los espectros de MS y MS/MS respectivamente. En paralelo a esta estrategia de identificación de *spots*, se tomó una cantidad de las proteínas totales y fueron directamente digeridas para luego realizar LC-MS/MS del crudo de proteínas.^[116]

5.9. Distribución de NE-CLPFFD *ex vivo*.

Para llevar a cabo parte de los primeros estudios de distribución, se concentraron las soluciones coloidales obtenidas desde aprox. 8nM hasta soluciones 20nM. Las muestras se

obtuvieron por centrifugación en tubos de centrifuga Millipore, Amicon a 2800RCF por 15min extrayéndose el *pellet* y diluyéndolo hasta llegar al volumen deseado.

En el ensayo de distribución, se utilizaron ratas macho de entre 200 a 300g (cepa Sprague Dawley) suministradas por el bioterio de la Facultad Cs. Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, A las mismas se les inyectaron las soluciones de nanopartículas a una proporción de 1mL de conjugado por cada 100g de animal por vía intraperitoneal, para luego ser sacrificadas a distintos tiempos (1, 2, 4 y 24h) y obtener los órganos de interés. Los niveles de NE se determinaron a partir de la cuantificación *ex vivo* de oro en los órganos estudiados. Estos resultados se complementaron con observaciones por microscopía de fluorescencia de cortes de tejido. Para poder llevar a cabo la detección se empleó las NE-CLPFFD(cf). Asimismo, se realizó la evaluación de la integridad de la BHE luego del tratamiento con NE-CLPFFD.

5.9.1. Detección de NE-CLPFFD por cuantificación de oro.

transcurrido los distintos tiempos de estudio, se sacrificaron los animales tratados para lo cual se utilizó como sedante isoflurano (Neopharma, 100mL), anestésico por inhalación, el cual es evaporado con un equipo de anestesia OHIO Ohmeda Modulus II. Para anestesiarse a la rata se colocó en una cámara conectada al flujo de isoflurano por 5min. Luego el animal sedado se colocó sobre una mesa quirúrgica y se mantuvo con una máscara con anestésico durante todo el proceso. Así se procedió a realizar una perfusión suave, utilizando una pequeña cantidad de PBS [NaH_2PO_4 0,02M, Na_2HPO_4 0,08M y NaCl 0,15M (pH 7,4)] (1mL) y luego paraformaldehído al 2% en PBS (6mL) a un flujo controlado de 1mL por 1min con bomba peristáltica. Luego, se extrajo el hígado, riñón y cerebro, los cuales se colocaron en PBS durante el periodo de experimentación. Una vez obtenidos los órganos de interés, se congelaron en N_2 líquido para luego ser liofilizados a -50°C con una

presión de 0,137mBar. Una vez liofilizados, los órganos relativamente secos fueron molidos en un crisol de porcelana, para así homogeneizar las muestras y una vez molidas se colocaron en una estufa a 120° C hasta conseguir un peso constante.

Una vez obtenidos los órganos liofilizados y en su peso constante, se analizaron por AAN. Este análisis se realizó por la Comisión Chilena de Energía Nuclear (CChEN) en la planta nuclear de la Reina. Los datos obtenidos fueron a partir de 3 y 4 ratas por tratamiento. Las muestras fueron enviadas luego de una molienda homogenizada de cada órgano dentro de viales de polietileno libres de elementos. Estas se introdujeron en un reactor nuclear RECH-1 con un flujo de electrones de $0,25-1,3 \times 10^{13}$ n/cm²s con una fuente de poder de 5mW por un tiempo de alrededor de 17h iniciando así la conversión de ¹⁹⁷Au a ¹⁹⁸Au. Luego de 7-12 días de decaimiento, los rayos γ emitidos por la muestra fueron contados y ordenados por energías usando un detector de germanio acoplado a un espectrómetro de rayos γ multicanal. Los espectros γ fueron analizados con el *software* SAMPO90 Canberra. Una vez obtenida la concentración de oro presente en la muestra y conociendo el número de átomos por NE se determinó la cantidad de NE en cada órgano. Para evaluar los resultados entre los distintos tratamientos, los datos se entregan según la desviación estándar y se realiza una comparación según un análisis estadístico de varianza en una vía ANOVA, con una corrección de Tukey-Kramer y un nivel de significancia, $\alpha=0.05$ (95% intervalo de confianza). ($p>0,05$ es ns; $p\leq 0,05$ *; $P<0,01$ ** y $p<0,001$ ***)

5.9.2. Detección de NE-CLPFFD por microscopía de fluorescencia.

A un grupo de ratas tratadas de igual manera que para la detección de oro, se sacrificaron en los mismos periodos de tiempo, pero esta vez empleando como estrategia de anestesia, la inyección intraperitoneal de 1mL/kg de Ketamina/Xilacina (2:1; Ketamina, Ketonal 100. Ruchond vet S.A. 100mg/mL; Xilacina, Xylavet 2%, Agroland 20mg/mL). Una

vez anestesiadas las ratas, se les realizó una perfusión transcardial suave por 2 min con PBS y posteriormente con 4mL (flujo 1mL/1min) de paraformaldehído al 4% en PBS para la fijación. Luego se extrajeron los órganos de interés (hígado, riñón, cerebro), cuidando de mantener la integridad de cada órgano. Durante el proceso de extracción los órganos se mantuvieron en PBS. Posteriormente estos órganos se congelaron por inmersión en isopentano (2-Methylbutano, Sigma-Aldrich, Grado HPLC, P.M. 72,15) en un baño de N₂(l). Los órganos congelados fueron mantenidos a -80°C hasta la realización de cortes. Para los cortes, los órganos congelados fueron montados en OCT (embedding medium for frozen tissue specimens. Tissue-Tek) sobre el ultra-micrótopo MICROM HM5000 y así se procedió a realizar cortes de 20µm de grosor. Los cortes realizados al cerebro fueron del tipo sagital, coronal y longitudinal, mientras que para el riñón del tipo sagital y para el hígado del tipo longitudinal, sagital y transversal. Una vez obtenidos los cortes se adhirieron a un portaobjeto silanizado (superfrost plus. Organosilane coated glass slide for immunohistochemistry and in situ hybridization application). Una vez obtenidos los órganos adheridos, se fijaron en paraformaldehído (Fluka, pureza >95%, P.M. 30,03 como monómero) al 4% en PBS durante 30 min a 4°C. Luego se eliminó el exceso con un lavado de PBS 0,1 M durante 12 min a 4°C. Posteriormente se secaron y se montaron utilizando medio de montaje Dako (Dako fluorescent Mounting Médium, DakoCytomation) colocándose luego el cubreobjetos y finalmente sellándose con esmalte de uña y guardándose a 4° C hasta su visualización en microscopio. En conjunto se obtuvo a modo secuencial cortes para tinción, la cual se llevó a cabo en paralelo, para la detección de las zonas de los tejidos. La tinción en cerebro se realizó posterior al paso de fijación descrito en el punto anterior. Como los cortes de tejido se encuentran hidratados luego de la fijación, éstos se tiñeron con el colorante cresil violeta (Merck. Para microscopía Certistain. P.M. 321,33) por 5 a 30min (según preparación de colorante, se realizó una prueba para fijar el

tiempo correcto el cual fue de 25min). Luego se les realizó un lavado breve (*dipping*), primero 5 veces con H₂O destilada, luego 5 en alcohol 70° y finalmente 5 en alcohol 95°. Solo a aquellos cortes que estuvieron muy teñidos se les realizó una decoloración con solución diferenciadora [Etanol 95%- Acido acético 0,5%] por un *dipping*. Posteriormente se deshidrató el tejido utilizando una batería de alcoholes, primero alcohol 95° por 3min, luego alcohol 100° por 3min, y alcohol 100° por 3min y finalmente Xilol, 2 veces por 5min. Finalmente se utilizó como medio de montaje entellan, para así poder visualizar el tejido utilizando el microscopio.^[140] Del mismo modo se procedió con cortes de hígado y riñón, pero para la tinción se empleó azul de Toluidina (AT. Merck. Para microscopía Certistain. P.M. 305,83). Para el proceso de hidratación se repitió lo descrito en el párrafo anterior. Así a cada corte se le agregó AT y se mantuvo por 5min. Se lavó con H₂O, luego se deshidrató y se montó al igual que como se describe para cerebro.^[140]

Una vez obtenidos los cortes montados, estos fueron visualizados bajo un microscopio de fluorescencia Zeiss Axioplan y se recogieron las imágenes con una cámara Nikon coolpix ES400. Una vez obtenidas las imágenes estas fueron analizadas con programas como Metamorph e Image J, a partir de los cuales se pudo cuantificar la fluorescencia. Los datos fueron seleccionados a partir de 5 regiones de cada órgano y a su vez cada región a partir de 3 ratas por tratamiento. Para evaluar los resultados entre los distintos tratamientos, se realizó una comparación según un análisis estadístico de varianza en una vía ANOVA, con una corrección de Tukey-Kramer y un nivel de significancia, $\alpha=0.05$ (95% intervalo de confianza). ($p>0,05$ es ns; $p\leq 0,05$ *; $P<0,01$ ** y $p<0,001$ ***)

5.9.3. Determinación de integridad de BHE.

Para este estudio nuevamente inyectó un grupo de ratas con los conjugados. Transcurrido 4h cada rata se sedó inyectando intraperitonealmente ketamina-xilazina (2:1).

Luego se inyectó 0,3mL/100g animal de Azul de Evans (The Coleman & Bell CO) al 4% en solución de NaCl al 0,9% por vía cardiaca y transcurrido 10 min se realizó perfusión intracardiaca. Para poder analizar los resultados es necesario contar con un control negativo que consistió en una rata a la cual solo se administró el colorante, y un control positivo, dado por una rata a la que se le inyectó Manitol (25% en solución de NaCl al 0,9%). Este compuesto en altas dosis es capaz de desunir transitoriamente las uniones estrechas presentes en el endotelio. Así una vez obtenidos los cerebros, se procedió a la comparación de la tinción de cada cerebro.

5.10. Distribución de NE-CLPFFD *in vivo*.

Para llevar a cabo parte de los estudios de distribución *in vivo*, fue necesario el marcaje de las NpO, para lo cual se diseñó una estrategia de marcaje de las NE, con el fin de lograr esto fue necesaria la síntesis y caracterización previa del péptido CK, obtenido de acuerdo a la síntesis descrita en la sección 2.1.1 de este capítulo. La obtención de las NE-CK/CLPFFD, fue llevada a cabo de acuerdo a lo descrito en la sección 2.1.2 de este capítulo. Se conjugaron a las NE bajo una serie de proporciones CK/CLPFFD (4mM/1mM; 2mM/1mM; 1mM/1mM y 1mM/2mM respectivamente), de estas, finalmente la empleada para los estudios posteriores *in vivo* fue CK/CLPFFD en la proporción 4mM/1mM.

5.10.1. Marcaje radioactivo de NE para estudios *in vivo*.

Para el marcaje con N-succinimidil-4- ^{18}F -fluorobenzoato (^{18}F -SFB). Para esto fue necesaria la síntesis de ^{18}F -SFB, que fue llevada a cabo en un modulo Eckert & Ziegler, bajo la metodología descrita por Madıng y cols.^[141] El ^{18}F fue obtenido a partir del bombardeo de ^{18}O -H₂O con protones de alta energía (18 MeV) en el ciclotrón 18/9 IBA perteneciente al Parc de Recerca Biomédica de Barcelona- Hospital del Mar (PRBB). El

radioisótopo [^{18}F] fue enviado al módulo automático donde fue contenido en un cartucho QMA. El [^{18}F] se extrajo desde el reactor haciendo pasar una mezcla de 2mg de K_2CO_3 y 1,8mg of Kriptofix 222 in 0.8mL de $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (1:1) a través del cartucho de QMA. El reactor fue calentado a 100°C , luego se aplicó un flujo de $\text{He}_{(\text{g})}$ y vacío por 5 min para secar el [^{18}F]. Para asegurar un secado completo se agregó 1mL de CH_3CN anhidro, y se aplicó 5 min vacío. Al [^{18}F], se le agregó 5mg de 4-(tert-butoxicarbonilmetil)- feniltrimetilammonio trifluorometanosulfonato en 1mL de CH_3CN anhidro, se agitó 10min a 90°C , luego se agregó HCl 1M. Esta mezcla se calentó a 100°C por 5 min, se enfrió hasta los 25°C , para luego diluirla con 9mL de agua calidad Milli-Q y se pasó por un cartucho HELA C18 para extracción sólida. A los cuales se agregó 3mL of CH_3CN a través del cartucho, para que la solución se enviara a un segundo reactor. El eluato se trató con 20 mL de $(\text{CH}_3)_4\text{NOH}$ 25% en 500mL of CH_3CN . La mezcla de reacción se secó a 90°C por paso continuo de un flujo de $\text{He}_{(\text{g})}$ y vacío. Se agregaron 3mL más de CH_3CN anhidro. Luego se agregó una solución de 15mg of N,N,N',N'-tetrametil-O-(N-succinimidil) uronio tetrafluoroborato en 500mL de CH_3CN anhidro. Esta nueva mezcla se calentó a 90°C por 2 min, enfriada luego a 25°C y diluida con una solución de ácido acético al 5%. El producto crudo se purificó por HPLC semi preparativo empleando una columna Teknokroma Mediterranean Sea-18 (25 cm \times 1 cm, 5 mm) con una fase móvil compuesta de una proporción 42,5/57,5 de CH_3CN /formiato de amonio (3.15 g/1 L H_2O , pH = 5) con un flujo de 5mL/min. La pureza se monitoreó por un detector isotópico y UV-vis a 254nm. La fracción deseada se obtuvo entre 9 y 11min y fue recogida en 20 mL de solución salina al 0.9%. Esta solución se pasó por un cartucho C18, lavado con 20mL de agua, y extraído con 3mL de acetona anhidro. La solución se secó con $\text{N}_{2(\text{g})}$. La calidad se probó por HPLC empleando una columna Teknokroma Mediterranean Sea-18 (25mm \times 0,46cm, 5mm) en modo gradiente con flujo de 2mL/min empleando como fase móvil CH_3CN /formiato de amonio (3,15g/1L H_2O , pH = 5)

comenzando con una proporción 10/90 y alcanzando 40/60 en 10min. El eluyente se detectó empleando un detector isotópico y UV-vis a 254nm. El compuesto [^{18}F]-SFB deseado, eluyo a los 10,3min. Obteniéndose un 37% de rendimiento de [^{18}F]-SFB reacción y con una pureza de >99% y $110 \pm 15\text{GBq}/\mu\text{mol}$ de actividad específica.

Para la incubación de NE-CK/CLPFFD, se centrifugaron en tubos de centrifuga Millipore, Amicon a 2800RCF por 15 min. El *pellet* se mezcló con 20 μL de DMSO y 80 μL de citrato de sodio 1,2mM (pH = 10). A esta solución, se le agregó una cantidad de $4.44 \pm 1.11\text{GBq}$ de [^{18}F]-SFB. Esta mezcla fue agitada a 50 °C durante 1h. Posteriormente se agregaron 900 μL de citrato de sodio 1.2mM (pH = 10), esta solución se centrifugó empleando los tubos Amicon y el *pellet* se resuspendió nuevamente en citrato de sodio. Este proceso se repitió 3 veces para conseguir la eliminación de la radioactividad no reaccionante. Para el paso final, el *pellet* se disolvió en 2mL de citrato de sodio 1,2mM (pH = 10) y se le agregó 50 μL de Tween-80. Durante el proceso, se obtuvo un rendimiento final de $0.8 \pm 0.3\%$ de marcaje. La caracterización de las NE-CK/CLPFFD* $^{\text{SFB}[^{18}\text{F}]}$ se llevó a cabo por medio de las técnicas descritas en la sección 2.1.2 de esta capítulo.

5.10.2. Detección y estudios de distribución *in vivo* de NE.

En este estudio se emplearon ratas de $571 \pm 112\text{g}$ (Sprague Dawley, obtenidas de Charles River, España, n=3), Cada animal fue anestesiado empleando isoflurano vaporizado en $\text{O}_{2(\text{g})}$ luego de lo cual, se administró por vía intravenosa un bolus de $3.1 \pm 2.7\text{kBq}$ de CK/CLPFFD* $^{\text{SFB}[^{18}\text{F}]}$ (una cantidad similar en concentración molar al experimento realizado *ex vivo*, sección 2.5). Rápidamente el animal se dispuso en la unidad tomográfica específica para el estudio de animales por tomografía de emisión de positrones (microPET R4; Concorde, Siemens, Knoxville, TN, USA) para así comenzar con la adquisición dinámica de imágenes de todo el cuerpo del animal. Se obtuvieron imágenes

durante 120min, tiempo durante el cual el animal se mantuvo anestesiado por una mascara facial entregando 2.5% de isoflurano vaporizado en O_{2(g)}.

Las imágenes fueron reconstruidas con un tamaño de matriz de 128×128×63mm y un tamaño de voxel de 0,85 × 0,85 × 1,21mm³ con un algoritmo de retroproyección filtrada (FBP). Luego de la reconstrucción, los volúmenes de interés (VOI) fueron dibujados de forma manual en los diferentes órganos, para luego calcular las curvas de tiempo-actividad. La medida representativa de radiactividad en sangre se obtuvo por la disposición de uno de los VOI en la región del corazón. La concentración de radioactividad obtenida al final de la adquisición se empleó para calcular el porcentaje de la DI por cada gramo de tejido, basado en la información de PET. Los gráficos de actividad promedio de los 3 animales se calculó para cada órgano.

5.11. Mejora de la llegada al cerebro de NE empleando THRCLPFFD, Distribución de NE-THRCLPFFD *ex vivo*.

Para llevar a cabo este estudio, se empleó una estrategia de estudio muy similar a la descrita en la sección 2.5. Se emplearon ratas de características similares (Sprague Dawley de 180-200g, machos, obtenidas desde el centro experimental animal de la Universidad de Chile), se separaron en grupos de 4 ratas considerando un grupo control (tratas con citrato de sodio, vehículo de las NE). Las NE-THRCLPFFD se inyectaron por vía intraperitoneal, y las ratas fueron sacrificadas según lo descrito en la sección 2.4, a los tiempos de 0,5, 1, 2, 4 y 24h. Esta vez se administró 1mL de conjugado por 200g de peso de rata. Luego de transcurrido los tiempos, se les realizó una perfusión transcárdial de forma suave (2mL de PBS 0,1M a un flujo de 1mL/min) con la intención de eliminar el exceso de sangre. Se obtuvieron los órganos de interés, que fueron puestos en PBS, luego lavados, congelados

en N₂(l), liofilizados, molidos, homogenizados, y llevados a peso constante para así determinar los niveles de oro, en cerebro, hígado, bazo, por AAN, en la CChEN.

De igual manera como se describe en la sección 2.4 de este capítulo, se evaluó la fluorescencia en cortes de cerebro de ratas tratadas con NE-THRCLPFFD(cf) (n=3), siguiendo las mismas consideraciones de tratamiento de animales, y de obtención de cortes de tejido de 20µm de grosor. Los cortes se realizaron en secuencia, realizando una tinción con Nissl a cortes para poder determinar las zonas del tejido cerebral.

5.11.1 Detección de NE-THCLPFFD en cerebro por TEM.

Esta vez se empleó TEM para confirmar la presencia de NE en el cerebro. Para este fin, cerebros de ratas tratadas se fijaron en paraformaldehído al 2% con 2,5% de glutaraldehído en PBS 0,1M, en dichas condiciones se mantuvo por 24h a 4°C. Luego se lavó la muestra con PBS, se fijaron con 1% de tetróxido de osmio con 0,8% de ferrocianuro de potasio en PBS a 4°C, Luego la muestra se deshidrató en acetona, para luego infiltrarla con resina de Epon por 2 días, embebida en la misma resina, se polimerizó a 60°C por 48h, cortes ultra delgados se obtuvieron empleando un ultra-micrótomo Leica Ultracut UCT, y luego fueron montados en rejillas de Cu cubiertas con formvar. Finalmente las muestras fueron teñidas con acetato de uranilo al 2% en agua y citrato de plomo. Así las secciones fueron observadas por TEM para así obtener micrografías de los cortes.

5.12. Evaluación de la potencialidad de la incubación de NE-péptido con ApoE, posible estrategia para mejorar la llegada al cerebro.

Para llevar a cabo este estudio, se empleó una estrategia de estudio muy similar a la descrita en las secciones 2.5 y 2.7 de este capítulo. Se emplearon ratas (Sprague Dawley de 250-300g, machos, obtenidas desde el centro experimental animal de la Universidad de

Chile), se separaron en grupos de 3 ratas considerando un grupo control (tratas con citrato de sodio, vehículo de las NE-peptido). Para este ensayo, las NE-CLPFFD y NE-THRCLPFFD fueron determinadas en el organismo por AAN en la CChEN y por fluorescencia.

Para realizar los estudios de fluorescencia, las NE-CLPFFD y NE-THRCLPFFD se concentraron las NE empleando centrifugación llevándose a 40nM. Se tomaron 24mL de conjugados a 8nM que se centrifugaron a 16100RCF por 15min. El sobrenadante se descartó y el *pellet* (1mL) se incubó junto al fluoróforo AlexaFluor-750 (NHS-Esther, Invitrogen). Para lo cual se tomó una alícuota de fluoróforo de 100µg y se diluyó en 200µL DMF, la cual rápidamente se agregó sobre el *pellet* de NpO. Se incubó durante 2 horas bajo agitación constante y luego se llevó a un volumen de 6mL con citrato de sodio 1,2mM. Posteriormente se centrifugó a 16100RCF por 15 minutos y se llevó nuevamente a 6mL con citrato de sodio 1,2mM, este proceso se repitió 2 veces para eliminar el fluoróforo no unido. (Se espera que la unión del fluoróforo sea por los grupos aminos libres de los péptidos unidos a las NE, puesto que el fluoróforo tiene un grupo carboxilo unido a un grupo succinimidil, formando un succinimidil ester, un grupo altamente reactivo, y el grupo saliente en presencia de grupos aminos libre, por lo cual se espera la formación de un enlace amida por sustitución nucleofílica). Obtenidos los 6mL de conjugados marcados (NE-péptido-Alexa750), se dividió en 2 fracciones de 3mL, una de ellas fue incubada con 50µg Apolipoproteína E (ApoE3-human, expressed in *E. coli*, SIGMA) por 1mL de conjugado por 24 horas, para luego ser inyectada a cada animal como 1mL de (NE-péptido-Alexa750) o 1mL (NE-péptido-Alexa750@ApoE) para así poder realizar comparaciones respectivas. Una vez inyectadas en cada animal, estos fueron monitoreados por medio del equipo In vivo FX pro (Carestream/Bruker). Dada la baja fluorescencia, se procedió a la extracción de los órganos a los tiempos 2 y 24 horas (tiempos definidos por estudios anteriores) y se

determinó la señal de fluorescencia por medio del equipo In vivo FX pro (Carestream/Bruker) de cada órgano completo. Se determinó una región de interés (ROI) a la cual se midió la fluorescencia, obteniéndose la intensidad de fluorescencia. Los datos analizados corresponden a la intensidad promedio de las 3 ratas por ensayo, valor que es entregado como la intensidad promedio de la región de interés en comparación con la fluorescencia del control. Los datos son graficados como promedio de cada punto, con desviación estándar muestra, comparados según un análisis estadístico de varianza en una vía ANOVA, con una corrección de Tukey-Kramer y un nivel de significancia, $\alpha=0.05$ (95% intervalo de confianza). ($p>0,05$ es ns; $p\leq 0,05$ *; $P<0,01$ ** y $p<0,001$ ***)

Para confirmar los valores de fluorescencia, estos cerebros obtenidos, fueron tratados según se describe en la sección 2.5 y 2.7 para poder ser evaluados por AAN, en la CChEN y así obtener los niveles de oro en cada cerebro. Los datos de oro obtenidos, se muestran en un gráfico como promedio de cantidad de oro en cada tratamiento, mostrando la desviación estándar de la muestra ($n=3$), y se realiza una comparación según un análisis estadístico de varianza en una vía ANOVA, con una corrección de Tukey-Kramer y un nivel de significancia, $\alpha=0.05$ (95% intervalo de confianza) ($p>0,05$ es ns; $p\leq 0,05$ *; $P<0,01$ ** y $p<0,001$ ***)).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

6.1. Objetivo específico 1.

Sintetizar y caracterizar Nanoesferas de oro (NE) de aproximadamente 12nm y Nanovarillas de oro (NV) con relación de aspecto 4/1.

6.1.1 Caracterización de NE y NV por espectrofotometría de absorción molecular.

Las NE obtenidas presentaron un máximo de absorción cercano a los 520nm correspondiente a la banda del plasmón de resonancia característico para NE de tamaños de entre 10 y 20nm (Figura 18).

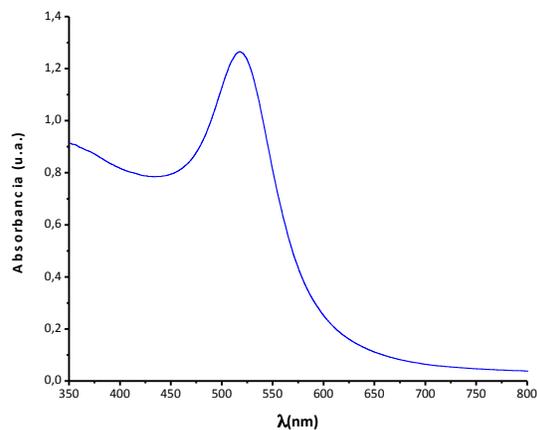


Figura 18. Espectro de absorción UV-Vis de NE. Se aprecia la absorbancia característica de las NE de un tamaño cercano a 12nm (concentración 4nM) debido al fenómeno RPS.

Para el caso de las NV, el espectro posee dos bandas dadas por los plasmones transversal y longitudinal, respectivamente. La banda correspondiente al plasmón longitudinal se encuentra en el infrarrojo cercano observándose un máximo a 800nm lo que se condice con una relación de aspecto largo/ancho de alrededor de 4, mientras que la banda correspondiente al plasmón transversal se centra en los 520nm (Figura 21).

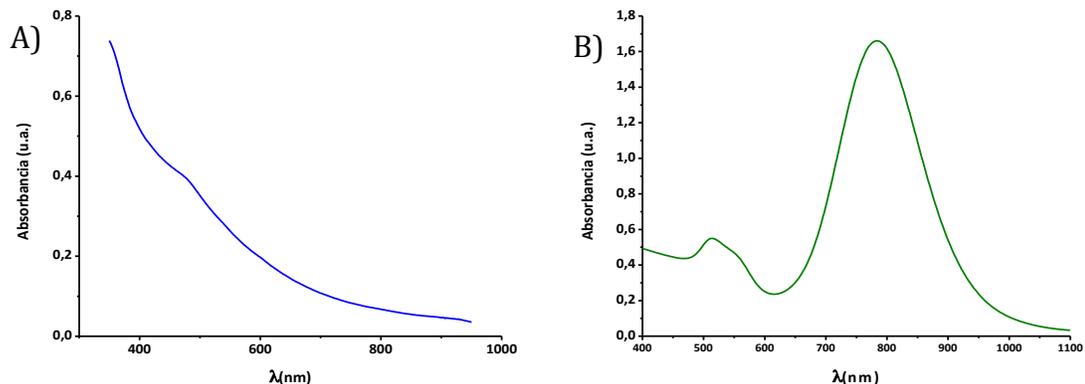


Figura 19: Espectro de absorción Vis-NIR de NV-CTAB. (A) Espectro obtenido de las Semillas previo crecimiento de NV. (B) Espectro de NV-CTAB luego del crecimiento cristalino

6.1.2. Caracterización de NE y NV por microscopía electrónica de trasmisión.

Para determinar el tamaño de las NP, se realizaron observaciones por TEM. Como se aprecia en la Figura 22.A, se pueden distinguir NE, y a partir de un estudio poblacional de 300 partículas, se determinó que las mismas poseen un tamaño promedio de 12 ± 1 nm (ver la distribución de tamaños en el inserto de la imagen). Como se observa en la Figura 22.A las NE obtenidas por este método son homogéneas en tamaño y forma.

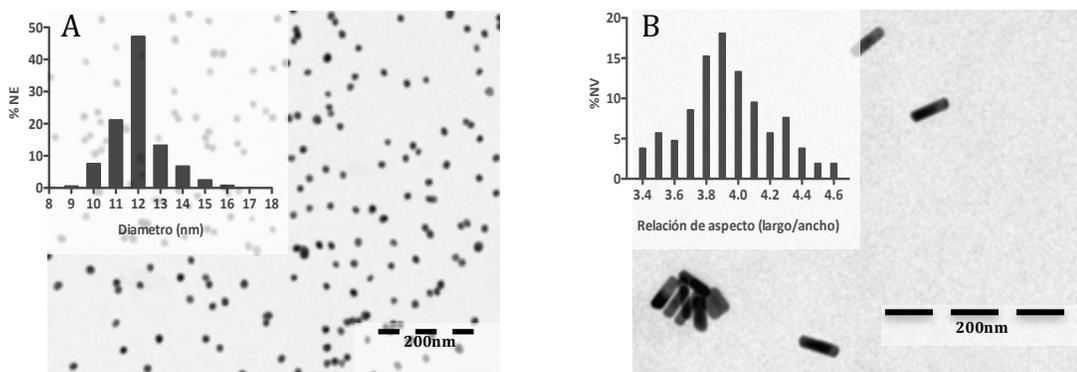


Figura 20 (A) Microfotografía de TEM de NE. En el inserto se muestra la distribución de tamaños de una población de 300 partículas obteniéndose un tamaño próximo a 12nm. **(B)** Microfotografía de TEM de NV-CTAB. El inserto muestra la relación de aspecto obtenida luego de analizar la morfología de un N° de 200 NV, obteniéndose una relación de $3,9 \pm 0,2$.

Al igual que las NE, las NV fueron observadas por TEM (Figura 22.B) con el fin de obtener información acerca de la morfología de las especies. Las partículas obtenidas presentaron forma de Nanovarillas con longitudes promedio de 45,8nm y anchos promedio de 11,8nm, dando así una relación de aspecto promedio de 3,9, valores obtenidos luego de analizar la morfología de 200 NV.

6.1.3 Caracterización de NE y NV por dispersión dinámica de la luz y potencial zeta.

Para evaluar características de las NP en solución, se empleó la técnica de DLS, determinándose el diámetro hidrodinámico de las partículas en suspensión, mediante la cual se espera un resultado coherente en relación a los tamaños obtenidos por TEM. En la Figura 23 se aprecian los resultados entregados por DLS de intensidad para diferentes muestras obtenidas de NE y NV.

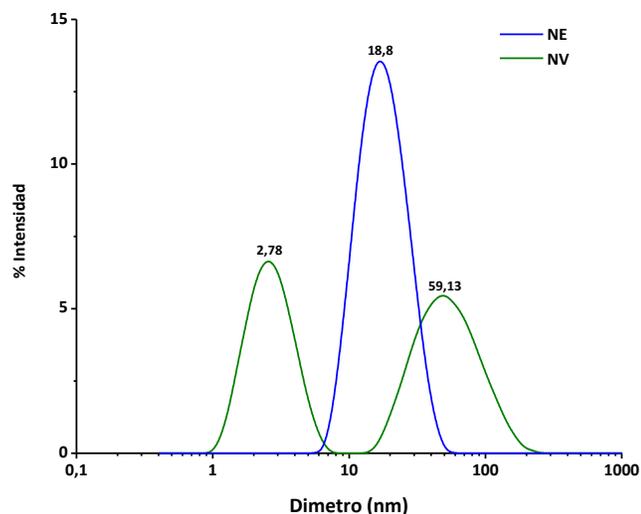


Figura 21. Distribución de tamaños en diámetro según % de intensidad determinado mediante DLS para NE (azul) y NV (verde). En cada máximo se indica el valores correspondiente de tamaño.

En la Figura 23 se aprecia más de una señal sobre el resultado entregado de DLS para NV en solución, posiblemente debido a la presencia de CTAB,^[29] que forma pequeñas micelas que interfieren en los datos por DLS,^[142] y según lo descrito en el capítulo 1 al

analizar el valor de % de intensidad los resultados obtenidos son consecuentes con la longitud de las NV. Este diámetro hidrodinámico es mayor que el obtenido por TEM debido a que las NV en solución se mantienen rotando y el equipo de DLS ajusta los valores de diámetro a los de esferas equivalentes aunque la forma de la partícula sea la de una barra. A este análisis se debe agregar la propuesta de Liu y cols.,^[143] quienes en su trabajo indican que esa señal observada entre 1 y 10nm no es solo dada por el CTAB, si no que también puede atribuirse a la difusión rotacional de las NV en lugar de una dimensión real de las mismas, indicando que dicho valor puede ir desde 3-7nm por NV de relación de aspecto que van desde 2,5 a 4.

El pot-Z es un dato que puede ser obtenido en el mismo equipo DLS y está muy relacionado a las propiedades en solución de las NP. El valor de pot-Z obtenido para las NE es de -46mV, un valor negativo debido posiblemente a que la partícula se encuentra recubierta por citrato adsorbido sobre la superficie de oro y que proviene de la síntesis. La estabilidad del coloide esta dada por repulsión electrostática. Contrariamente las NV poseen un pot-Z positivo de +52mV ya que se encuentran recubiertas con moléculas del surfactante catiónico CTAB.

6.1.4. Determinación de la concentración de NpO.

Para determinar la concentración de nanopartículas se realizó una cuantificación de oro en las muestras por AAN. Considerando la concentración de oro en conjunto con los tamaños obtenidos por TEM y aplicando las ecuaciones descritas en el capítulo 2 (ecuaciones 2.1 y 2.2), se determinaron las concentraciones de NE y NV, datos entregados en la Tabla 1

Tabla 1 Cuantificación de oro en NE y NV.

	Oro		NP	
	($\mu\text{g/g}$) $\pm\text{SD}$	μmol $\pm\text{SD}$	nmol $\pm\text{SD}$	nM $\pm\text{SD}$
NE	117,8 ($\pm 15,4$)	0,6 ($\pm 0,08$)	$1,1 \times 10^{-2}$ ($\pm 1,5 \times 10^{-3}$)	11,4 ($\pm 1,5$)
NV-CTAB	38,9 ($\pm 2,6$)	0,2 ($\pm 0,01$)	4×10^{-4} ($\pm 2 \times 10^{-5}$)	0,4 ($\pm 0,02$)

9. En cada caso los datos fueron obtenidos a partir de 3 lotes de NpO independientes.

6.2 Objetivo específico 2.

Sintetizar y caracterizar CLPFFD, CALNN, CALNNLPFFD, C-PEG-LPFFD.

6.2.1. Caracterización de los péptidos CLPFFD, CALNNLPFFD, CALNN, CpegLPFFD, Cpeg, THRPPMWSPCLPFFD.

Una vez obtenidos los péptidos según el protocolo experimental estos fueron analizados mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para determinar el grado de pureza de los mismos. En los cromatogramas HPLC de los tres péptidos purificados, en los cuales se observa el tiempo de retención en la columna cromatográfica de todos los componentes de la muestra, en donde para todos los casos la pureza fue superior al 90%. (Anexo Figura A1).

Asimismo, los péptidos obtenidos se caracterizaron por espectrometría de masa MALDI-TOF corroborándose la presencia de los correspondientes iones cuasi moleculares $[M+H]^+$; $[M+Na]^+$ y $[M+K]^+$ y por ES-MS HPLC, las correspondientes masas según la carga $M+1/Z$; $M+2/2Z$; $M+3/3Z$. La Tabla2 resume las señales correspondientes a las másas obtenidas desde los corresponde espectros de masa de CLPFFD (Figura Anexo 2), de CALNNLPFFD(Anexo Figura A3), de CpegLPFFD (Anexo Figura A4), de CALNN (Anexo Figura A5), de Cpeg (Anexo Figura A6) y de THRPPMWSPVWPCLPFFD (Anexo Figura A7).

Tabla 2: Caracterización de péptidos por Espectrometría de masa, HPLC-MS y MALDI-TOF/MS

	Masa teórica (g/mol)	MALDI-TOF/MS		HPLC-MS	
		Ion cuasi molecular	(g/mol)	Masa/Carga	(g/mol)
CLPFFD	739,9	[M+Na ⁺⁺] ⁺ [M+K ⁺⁺] ⁺	762,248 778,2223	M+1/Z M+2/2Z	740,4 371,2
CALNNLPFFD	1152,34	[M+Na ⁺⁺] ⁺ [M+K ⁺⁺] ⁺	1174,497 1190,4796	M+1/Z M+2/2Z	1152,5 576,8
CpegLPFFD	1041,8	[M+H ⁺⁺] ⁺ [M+K ⁺⁺] ⁺ [M+Na ⁺⁺] ⁺	1042,5735 1080,5157 1064,5360	M+1/Z M+2/2Z	1042,5 522
CALNN	532,62	M+H ⁺⁺ ⁺ [M+K ⁺⁺] ⁺ [M+Na ⁺⁺] ⁺	533,2823 571,2569 555,2576	M+1/Z	533,2
Cpeg	422,1	[M+H ⁺⁺] ⁺ [M+K ⁺⁺] ⁺ [M+Na ⁺⁺] ⁺	423,249 463,241 445,2362	M+1/Z M+2/2Z M+3/3Z 2M+1/Z	423,2 212,2 142,1 845,4
THRPPMWSPVWPCLPFFD	2212,63	[M+H ⁺⁺] ⁺ [M+K ⁺⁺] ⁺ [M+Na ⁺⁺] ⁺	2212,264 2250,2456 2235,2764	M+1/Z M+2/2Z M+3/3Z	2213,5 1107,3 738,7

6.3 Objetivo específico 3.

Conjugar NE con CLPFFD, CALNN, CALNNLPFFD, C-PEG-LPFFD y THRPPMWSPVWPCLPFFD, y NV con CLPFFD.

6.3.1 Caracterización de los conjugados NpO-Péptidos por Espectrofotometría UV-Vis-NIR.

En la Figura 24.A. se muestran los espectros de absorción de los conjugados observándose las bandas correspondientes al plasmón de resonancia de NE en comparación con NE-CLPFFD, NE-CALNNLPFFD, NE-CpegLPFFD, NE-CALNN, NE-Cpeg y NE-THRPPMWSPVWPCLPFFD, todas centradas en alrededor de los 520nm.

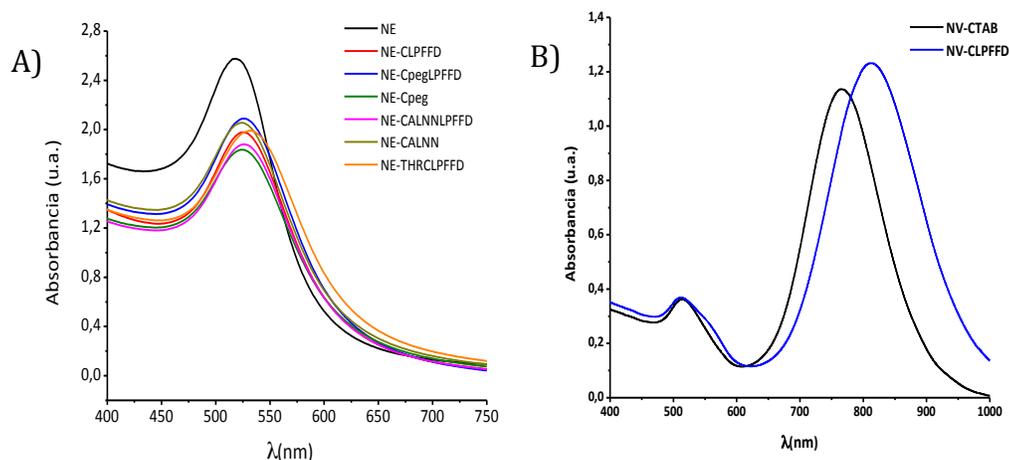


Figura 24. A) Espectro de absorción de conjugados a NE B) espectro de absorción de NV.

Luego de la conjugación con los péptidos se produce un desplazamiento batocrómico de la banda de la RPS debido a una modificación de la superficie metálica en la que se reemplazan las moléculas de citrato (estabilizante) por moléculas de péptido (Figura 24). Dicho desplazamiento se relaciona con un cambio en el índice de refracción en la nanopartícula.^[144] Para el caso de las NV también se produce un desplazamiento batocrómico debido a la quemisorción de las moléculas de péptido que desplazan a las moléculas de CTAB (Figura 24.B). La banda correspondiente al plasmón longitudinal de las NV-CTAB se encuentra entre los 750 y 790nm y al ser funcionalizadas se desplaza hacia el infrarrojo cercano, entre 800-815nm.

6.3.2. Caracterización de los conjugados NpO-Péptidos por TEM.

Al igual que para las NP sin funcionalizar, una vez obtenidos los espectros de absorción y corroborada la conjugación se realizaron micrografías TEM con el fin de evaluar que el corrimiento de la banda plasmónica no se relaciona con un crecimiento de las NP debido a posibles fenómenos de agregación. En las Figuras 25 se observa que las NP y NV se mantienen con un bajo grado de agregación. Asimismo, se puede observar que las NE

conjugadas a los péptidos mantienen su forma, tamaño y dispersión de tamaño respecto de las NE sin conjugar, al igual que lo que sucede con las NV que mantienen su relación de aspecto.

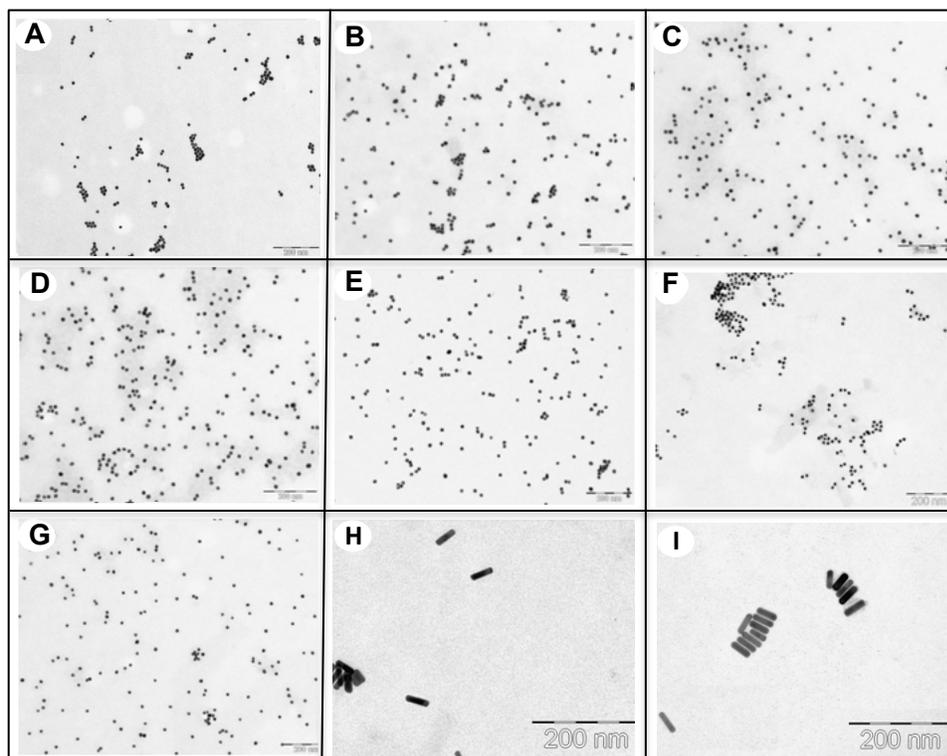


Figura 25. Imágenes obtenidas por TEM de conjugados: **A)** NE; **B)** NE-CLPFFD; **C)** NE-CALNNLPFFD; **D)** NE-CpegLPFFD; **E)** NE-CALNN; **F)** NE-Cpeg; **G)** NE-THRCLPFFD; **H)** NV-CTAB; **I)** NV-CLPFFD.

6.3.3 Caracterización de los conjugados NpO-Péptidos por DLS y pot-z.

En la Tabla 3 se resumen los valores obtenidos observados en los espectros de DLS y así como también los valores de pot-z.

Los diámetros hidrodinámicos de las NE conjugadas aumentan respecto al de las NE recubiertas con citrato. Esto se correlaciona con que en todos los casos las moléculas de péptido se encuentran recubriendo la partícula incrementando así el tamaño de las mismas.^[61, 145] Así mismo se observa un cambio en las NV-CLPFFD, esta vez el valor de DLS fue menor que para NV-CTAB, posiblemente esto se deba al desplazamiento del CTAB que se podría encontrar formando multicapas por el péptido quemisorbido formando

una monocapa. Es necesario considerar que el CTAB funciona como un agente caotrópico y posiblemente en la superficie de las NV se deposite en más de una capa como da cuenta Nikoobaskht y El-Sayed.^[146] Al estar presente el péptido tiolado luego de la quemisorción se desplaza el CTAB desde la superficie de las NV, así como se describe el desplazamiento de citrato desde la superficie de las NE,^[6, 9, 29, 33, 61] dada la unión muy favorable oro-tiol.^[147] En el caso del Pot-Z se aprecia un cambio en la carga dado por el desplazamiento de citrato en el caso de las NE por moléculas de péptido ya que al reemplazar una molécula de citrato que posee tres cargas negativas por una molécula de péptidos (posee una carga negativa neta a pH=7,4) se produce una reducción del valor absoluto de pot-Z (desde aprox. -46mV a aprox. -36mV), dicho efecto puede tener repercusión sobre las interacciones con los sistemas biológicos, pues es sabido que a mayor carga negativa, es mayor el reconocimiento por el SFM.^[108, 109, 114]

Tabla 3: Datos obtenidos de DLS y pot-Z para las NE y NV y sus conjugados.

	DLS (nm (PDI))	Pot-Z (mV (± SD))
NE	18,8 (0,2)	-46,5 (±1,3)
NE-CLPFFD	21,8 (0,3)	-36,5 (±1,6)
NE-CALNNLPFFD	21,5 (0,3)	-35,4 (±2,3)
NE-CpegLPFFD	20,2 (0,3)	-36,8 (±1,9)
NE-CALNN	22,1 (0,3)	-32,5 (±2,1)
NE-Cpeg	21,1 (0,3)	-35,4 (±2,8)
NE-THRCLPFFD	44,6 (0,3)	-42,2 (±1,4)
NV-CTAB	56,6 (0,3)	+52,9 (±5,6)
NV-CLPFFD	45,6 (0,4)	+55,5 (±2,7)

* En cada caso los datos fueron obtenidos a partir de 3 lotes de NpO independientes; el Pot-Z se entrega como promedio de 15 medidas para cada lote, con su correspondiente SD; en el caso del DLS, se entrega el valor dado por triplicado para cada lote, con un ajuste matemático entre los lotes para luego obtener el valor de la tabla junto al índice de Polidispersidad (PDI) dado para el total de las muestras.

6.3.4 Determinación de la relación de moléculas de péptido/nanopartícula.

El conocer el número de moléculas que se disponen sobre la superficie de una nanopartícula es crucial ya que este número se relaciona con la disposición de las moléculas sobre la superficie de la nanopartícula.^[9, 61, 148] Para determinar la relación moléculas de péptido por nanopartícula se realizaron dos análisis por separado y en paralelo. En primer lugar se sintetizó una cantidad de NP-péptido y sobre una alícuota (centrifugada) se realizó un AAA al *pellet* de las mismas y por otra parte, a otra alícuota de la misma preparación de conjugado se le realizó un análisis de oro, por ICP-MS o AAN. Con esto se obtuvo la concentración molar de péptido y de la NpO, respectivamente. Finalmente, la razón entre ambas indica el número de moléculas de péptido/NpO. Las concentraciones de NpO, péptido y el número de moléculas de péptido se muestran en la Tabla 4.

En base a todos los análisis realizados se puede concluir que en presencia de los diferentes péptidos, es posible detectar una gran cantidad de estos recubriendo a las NpO. En el caso de las NE-péptido el grado de funcionalización en presencia del espaciador Cpeg en la secuencia CpegLPFFD es el mayor respecto de los otros péptidos, lo cual podría relacionarse con que la presencia de Cpeg permite un mayor empaquetamiento hidrofóbico sobre la superficie metálica lo cual haría suponer que la disposición de moléculas de péptido es ortogonal respecto de la superficie. Por otra parte en presencia del espaciador CALNN se disminuye el grado de funcionalización disponiéndose posiblemente de un modo en que las moléculas se encuentran de forma horizontal sobre la superficie, lo cual posiblemente también se relacione con el grado determinado en aquellas NE-CALNN Figura 26.

Tabla 4: Determinación del N° de moléculas de péptido unidas a cada NE determinado a partir de Análisis de Aminoácidos y concentración de NE y NV (ND es no determinado)

	Moléculas péptido x NP (\pmSD)
NE	ND
NE-CLPFFD	927 (\pm 197)
NE-CALNNLPFFD	633 (\pm 156)
NE-CpegLPFFD	1158 (\pm 235)
NE-CALNN	512 (\pm 119)
NE-Cpeg	ND
NE-THRCLPFFD	337 (\pm 178)
NV-CTAB	ND
NV-CLPFFD	3025 (\pm 359)

* En cada caso los datos fueron obtenidos a partir de 3 lotes de NpO independientes, entregándose el valor promedio en cada caso y su correspondiente desviación estándar (\pm SD).

En el caso de THRCLPFFD el grado de funcionalización es mas bajo respecto a lo que sucede con CLPFFD lo cual puede atribuirse a que el péptido se quemisorbe disponiéndose sobre la superficie con un forma posiblemente de “Y”. (Figura 26)

Para el caso de las NV-CLPFFD, el grado de funcionalización es mayor, lo cual se debe a la mayor área que estas presentan.

Desde el punto de la posible aplicación de los conjugados, es interesante destacar que un mayor grado de funcionalización podría permitir una mayor interacción con los agregados de β -amiloide debido a la presencia de una mayor zona para el posible contacto.

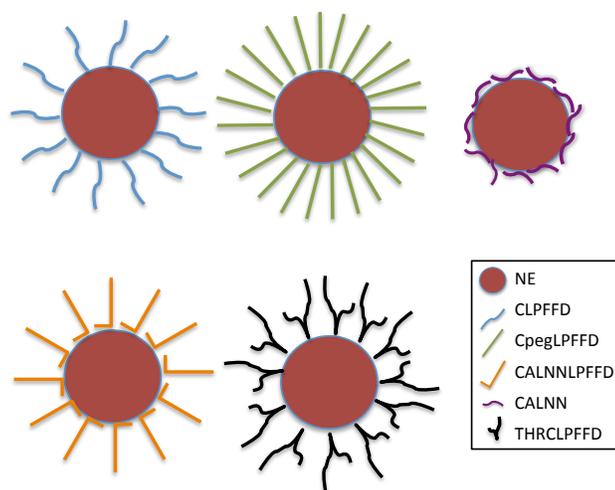


Figura 26. Esquema de funcionalización de NE con los péptidos CLPFFD, CpegLPFFD, CALNNLPFFD, CALNN y THRCLPFFD.

6.3.5. Evaluación superficial de las NpO por XPS.

En este trabajo de tesis se realizaron espectros XPS de las diversas NpO. Por medio de la técnica de XPS, se puede obtener información de los átomos presentes en la superficie de las NpO, pudiendo evaluarse cambios luego de la funcionalización.

Modificaciones en las señales entregadas por los electrones Au4f del Au y los electrones S2p del S, podrían indicar la existencia del enlace Au⁰-S correspondiente a la posterior unión del péptido a la superficie de oro. En una primera etapa se realizaron los espectros generales para detectar los átomos presentes en la superficie de las NE y las NV (Figura 27).

En los espectros presentados en la Figura 27 se observa un grupo de señales característico de las NE y que se diferencia de las NV en que esta última muestra, posee señales que corresponden a Ag y Br. Luego de realizar el barrido general que va desde 0 a 550eV, se realizaron espectros a mayor resolución en las zonas de interés donde es posible analizar en detalle cada señal. De esta manera es posible asociarlas a tipos de electrones específicos y además atribuirles a determinados grupos funcionales.

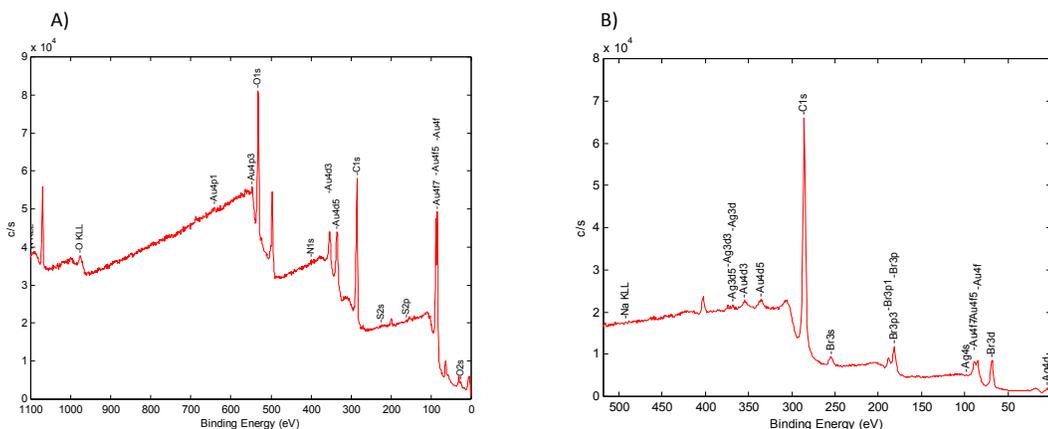


Figura 27. Espectro generales de XPS para NE (A) y NV (B)

El primer elemento analizado es el oro. En la Figura 28 se observa el espectro de alta resolución para este elemento en NE-Citrato y NV-CTAB, respectivamente observándose que la señal de oro en ambas NpO poseen dos picos, en el caso de NE uno a 83,8eV y otro a 87,5eV y para el caso de NV-CTAB uno a 83,3eV y otro a 87,1eV. En ambos casos estos están asociados a los electrones del oro $Au4f_{7/2}$ y $Au4f_{5/2}$, respectivamente.^[149, 150] Al funcionalizar, se espera que estas señales tengan pequeñas variaciones, correspondientes a la formación de enlaces entre el oro y las moléculas que se emplearán para la funcionalización.

El siguiente elemento analizado fue el Azufre y al no estar funcionalizadas las NpO se esperaba no estuviese presente. En la Figura 29 se observa la zona del azufre en NE y NV-CTAB, las cuales se utilizaron como un control para descartar la presencia de tioles u otras especies azufradas provenientes de otra fuente que no fueran los péptidos. En ambos espectros no se observa ninguna señal dada por el S, con lo cual se puede concluir que la aparición de señal en esta zona, se puede relacionar con una posible conjugación.

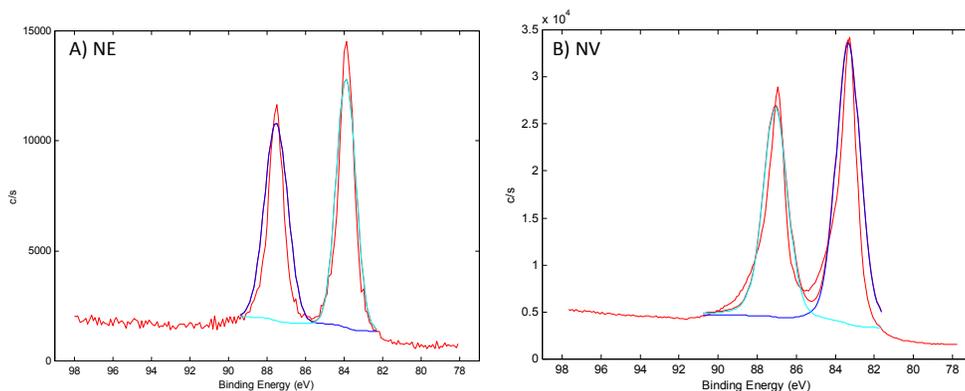


Figura 28. Espectros XPS de alta resolución para energías de unión de los electrones 4f del oro en (A)NE y (B)NV-CTAB. En rojo se muestra el espectro original, en azul el ajuste del mismo.

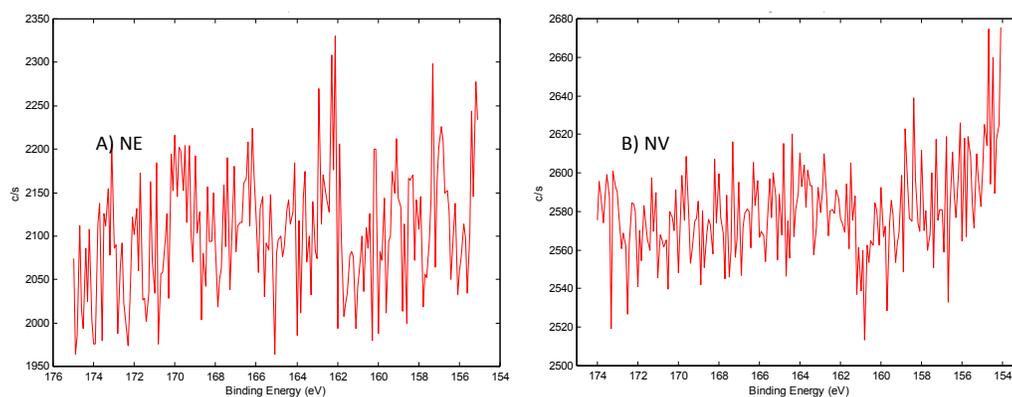


Figura 29. Espectros XPS de alta resolución para energías de unión de los electrones 2p del azufre en (A) NE y (B) NV-CTAB.

La aparición de energía correspondientes al S proviene del residuo de Cys quemisorbida sobre la superficie de oro y se puede tener información acerca de la interacción del péptido con la superficie de oro. Así, para confirmar la presencia de S, se debe evaluar la energía asociada a los electrones S2p.^[151-153]

En sí la interacción oro-tiol presente en las NpO, ha sido de gran interés en los últimos tiempos y aún no existe certeza de la reacción que ocurre cuando un átomo de S se enlaza a una superficie de Au⁰. Se estima que la reacción que toma lugar es la siguiente:^[152, 154]



Como se ha descrito en cálculos teóricos de teoría funcional de la densidad DFT (*Density functional theory*) la energía de este enlace estaría alrededor de las 50kcal/mol, estudios experimentales han demostrado que la energía es cercana a -25kcal/mol,^[31, 155] lo cual hace considerar este enlace casi como del tipo covalente.^[156]

Así, para el análisis de esta posible interacción, los espectros de XPS pueden resultar determinantes, así los valores analizados son los entregados por cambios en los electrones Au4f y los electrones S2p, esperándose señales doblete en el caso de Au4f, como se muestra en la Tabla 5. Eventualmente estos valores permiten un análisis más profundo de cómo estos elementos se pueden encontrar. Análisis mas exhaustivos pueden indicar la presencia de tioles no unidos a la superficie de oro lo cual podría deberse a que puede existir una interacción de los aminos libres de los péptidos.^[157] Sin embargo, aun cuando las energías indican una interacción de carácter covalente, no se debe descartar la posibilidad de fenómenos dinámicos que puedan en cierto momento exponer los tioles con lo cual se pueda generar una posible oxidación. A partir de los resultados de XPS, se observan picos cercanos a 162,7eV, que pueden relacionarse con la interacción Au-S.

Como parte de la caracterización de las NV-CTAB por XPS es necesario detectar la presencia de Ag, Br que se encuentran presentes en las muestras. Asimismo, es importante evaluar la presencia de CTAB que es una de las impurezas presentes provenientes de la síntesis. Así, en las Figuras 37.A se observa el espectro de alta resolución para Ag presente en las NV-CTAB, apreciándose dos picos de energía a 373,3eV y 367,3eV concordantes con los electrones Ag3d_{5/2} y Ag3d_{3/2}, respectivamente. Estos electrones no juegan un papel en la conjugación posterior, como lo demuestra C. Adura en su tesis de doctorado,^[39] en donde los mismos electrones se observan para NV-péptidos, entre los que se encuentra las NV-CLPFFD de nuestro interés, con energías de 376,6eV y 367,4eV, respectivamente asociados a Ag⁺, por lo cual en un análisis para evaluar la funcionalización

estos electrones no permiten distinguir diferencias. Otra zona ampliada es la correspondiente al Bromo. En la síntesis de NV el surfactante catiónico CTAB es utilizado como *templado* para inducir la forma de varilla en el nanomaterial. Este surfactante está compuesto por una cadena de 16 carbonos, con una cabeza hidrofílica de un amonio cuaternario y como contra ión posee un Br⁻.^[39] Es entonces, por este motivo que es esperable encontrar trazas de bromo en las muestras de NV-CTAB y también un cierto efecto en aquellas NV conjugadas. En la Figura 30.B se observan los espectros XPS de alta resolución en la zona del Br. Según lo descrito por C. Adura, la energía cercana a 67eV se relaciona a la señal de Br- libre, mientras que una energía cercana a 68eV se espera para Br- unido a las NV.^[39] Al Analizar el espectro de NV-CTAB en la Figura 30.B se encontró la señal correspondiente a Br unido a la superficie de Au de 67,8 eV. Así se concluye que para el caso de NV-CTAB se encuentra el Br⁻ unido a la superficie del Au.

Tabla 5: Datos obtenidos por XPS para la energía de los electrones Au4f_{7/2}, Au4f_{5/2}, esperándose la aparición de doblete en estas regiones de energía y también se espera la aparición de la señal correspondiente a los electrones de azufre, S2p

	Au4f _{7/2} (eV)	Au4f _{5/2} (eV)	S2p (eV)
NE	83,46	87,17	ND
NE-CLPFFD	82,49-83,68	85,51-86,89	163, 3
NE-CALNNLPFFD	82,9-84,04	85,28-86,83	162,11
NE-CpegLPFFD	82,78-83,46	86,48-87,53	162,58
NE-CALNN	82,96-83,1	86,54-87,01	162,97
NE-Cpeg	83,11-83,96	86,26-87,51	161,83
NE-THRCLPFFD	82,87-83,11	86,6-88,18	163,11
NV-CTAB	83,3-83,59	86,33-87,3	ND
NV-CLPFFD	83,42	87,23	161,75

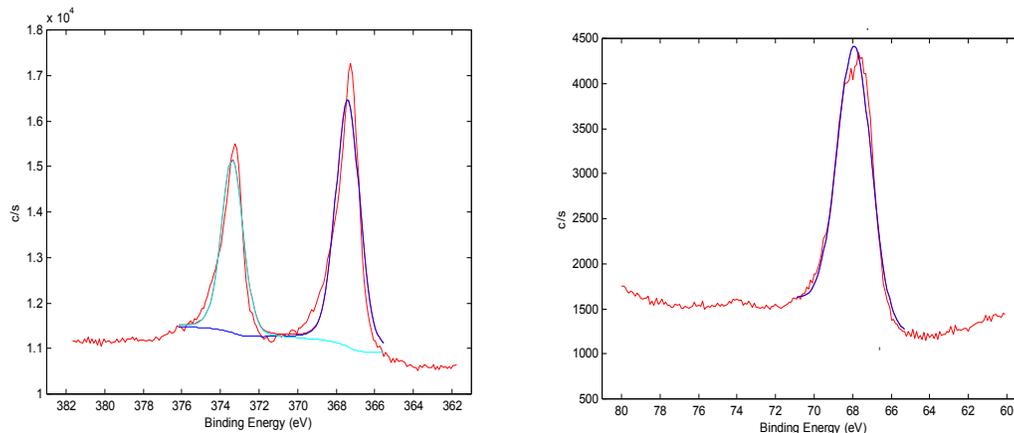


Figura 30. Espectros XPS de alta resolución de NV-CTAB. A) espectro para energías de unión de los electrones 3d de Ag en NV-CTAB. En rojo se muestra el espectro original, en azul el ajuste del mismo. B) espectro para energías de unión de los electrones 3d del Br en NV-CTAB. En rojo se muestra el espectro original, en azul el ajuste del mismo.

6.3.6. Obtención, caracterización de CK y funcionalización de NE.

Con el fin de poder marcar radioactivamente las NE, para emplear estas en el seguimiento *in vivo*, se diseñó un dipéptido, que pueda ser unido a las NE y luego facilite la unión de un marcador. El dipéptido empleado, fue CK, de manera de obtener NE multifuncionalizadas con este péptido y CLPFFD. De esta manera se aumentarán los grupos amino disponibles para una posterior interacción con el marcador. En el Anexo Figura A8 se muestra el cromatograma de HPLC obtenido para CK.

El dipéptido CK fue caracterizado por medio de MALDI-TOF (Anexo Figura A9), observándose el ion cuasi molecular esperado de $[M+H]^+$ 249,143g/mol, equivalente a la masa teórica para dicha secuencia de 248,331g/mol.. Obtenido y caracterizado, CK se empleó en conjunto a CLPFFD para funcionalizar NE obteniéndose la forma NE-CK/CLPFFD. En la Figura 31 se muestran los espectros UV-Vis de NE-CK/CLPFFD empleando para la conjugación diferentes proporciones de los péptidos CK y CLPFFD. La imagen TEM, corresponde a la proporción finalmente empleada, que equivale a 4mM de CK y 1mM de CLPFFD incubados con las NE. Dicha proporción por AAA dio cuenta de una

cantidad real cercana 1,6 moléculas de CK por 1 de CLPFFD en la superficie de las NE. (aproximadamente 624 moléculas de CK por 416 de CLPFFD). Estas NE-CK/CLPFFD (4:1) presentan un diámetro hidrodinámico de 21,3nm con un índice de poli-dispersión de 0,295, y un pot-Z de -40,3mV, lo cual da cuenta de que son adecuadas para los estudios de biodistribución, y están bajo parámetros similares a las NE y NE-CLPFFD.

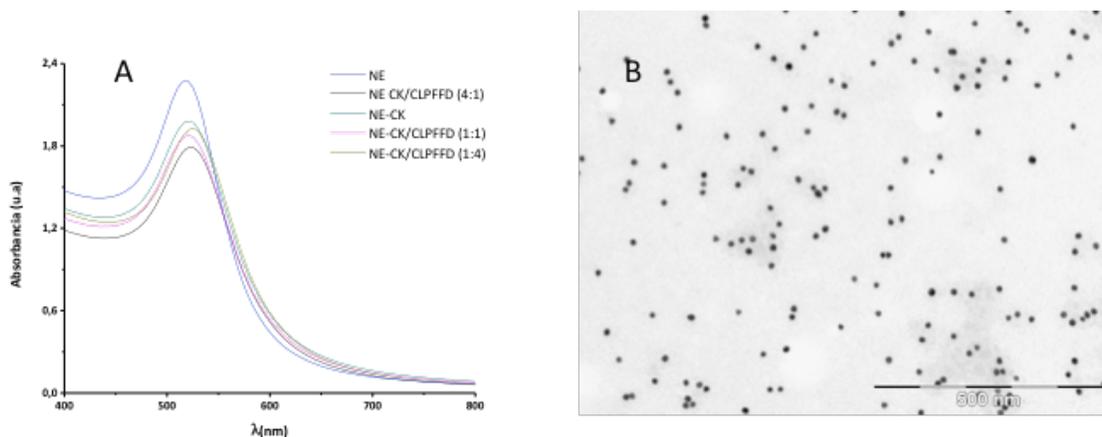


Figura 31. A) Espectro de absorción de conjugados de NE-CK/CLPFFD en diferentes proporciones B) micrografía TEM de NE-CK/CLPFFD (proporción 4:1)

Una vez obtenida la forma NE-CK/CLPFFD, y gracias a los grupos amino aportados por K, es posible la formación de un enlace amida empleando para estos ésteres de succinimidias, permitiendo el anclaje de una serie de marcadores, algunos de tipo fluorescentes, actualmente en el mercado, otros como succinimil-4-fluorobenzoato (SFB), el cual puede marcarse con un isótopo radioactivo del Flúor, ^{18}F . Siendo posible así el marcaje radioactivo, obteniéndose $\text{NE-CK/CLPFFD}^{\text{SFB-}[^{18}\text{F}]}$.

En la Figura 32 se muestra un espectro realizado con la molécula apreciándose una banda plasmónica desplazada de 524 a 525nm dando cuenta de la unión de SFB. Al evaluar estos últimos por DLS se observó un diámetro hidrodinámico de 33,7nm con un índice de poli-dispersión de 0,398, dando cuenta de un cambio respecto de la NE inicial.

Así es posible por medio de la misma forma obtener las NE marcadas radioactivamente, dando cuenta de una señal equivalente a una marca por NE cercana a un $0,8 \pm 0,3\%$ de las posibles interacciones teóricas, lo que corresponde a un valor de 27 átomos de ^{18}F por NpO marcados. El rendimiento del radiomarcaje fue corregido y calculado durante todo el proceso desde el contenido del $[^{18}\text{F}]$ -SFB puro que se agregó a la reacción.

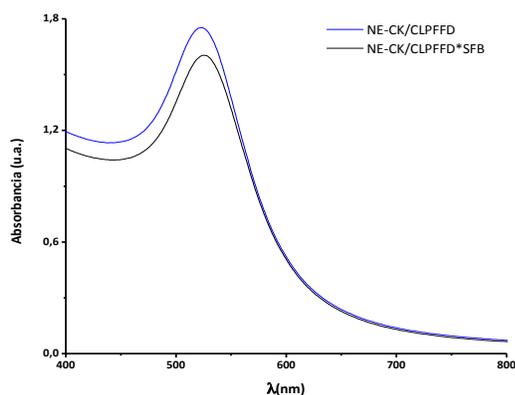


Figura 32. A) Espectro de absorción de conjugados de NE-CK/CLPFFD (proporción 4:1) antes y después de la unión a N-succinimidil-4-fluorobenzoato (SFB).

A partir de la información obtenida por medio de las diferentes técnicas empleadas en este capítulo es posible dar cuenta que las NpO obtenidas, en presencia de péptidos tiolados, interactúan funcionalizándose debido la unión muy favorable oro-tiol, descrita hoy en día como una clásica vía de funcionalización de NpO.^[147] Así estas NpO probablemente funcionalizadas, pueden ser empleadas en los experimentos siguientes.^[29, 34, 50, 158]

6.4. Objetivo específico 4.

Evaluar la estabilidad de NP funcionalizadas en presencia de plasma.

6.4.1 Estudio de estabilidad de NpO.

Se evaluó la estabilidad de diferentes NpO obtenidas en tampón PBS 10mM y en medio de cultivo celular DMEM suplementado con suero fetal bovino (Figura 33). Para evaluar la estabilidad se midió la absorbancia de la banda plasmónica de las muestras incubadas por diferentes tiempos observándose que no hay variaciones que puedan correlacionarse con pérdida de la estabilidad dando origen a agregados que produzcan efectos sobre la intensidad de la banda plasmónica.

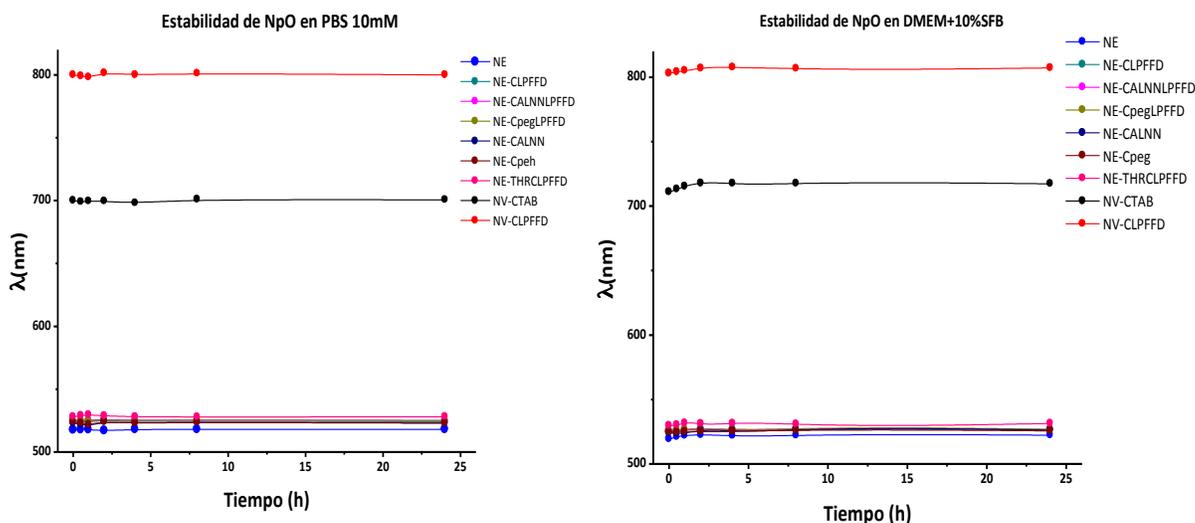


Figura 33. Estabilidad de NpO en PBS y medio de cultivo celular DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), seguimiento por espectrofotometría UV-Vis. Se grafica la absorbancia a la longitud de onda en nm de la banda plasmónica en función del tiempo de incubación.

En la Figura 34.A se aprecian los resultados obtenidos para la estabilidad de las nanopartículas en plasma humano evaluado por espectrofotometría UV-vis. En los espectros presentados en la Figura 34.B se aprecia un perfil de absorbancia característico de cada NpO, pero sin embargo, al comparar estos espectros con los de la misma muestra,

sin incubarse en plasma, se aprecia que hay un leve corrimiento de la banda RPS (Figura 34.B), corrimiento que se aprecia desde que se comienza el estudio y se mantiene constante. Estos desplazamientos batocrómicos podrían atribuirse al recubrimiento de las partículas por proteínas del plasma.^[61]

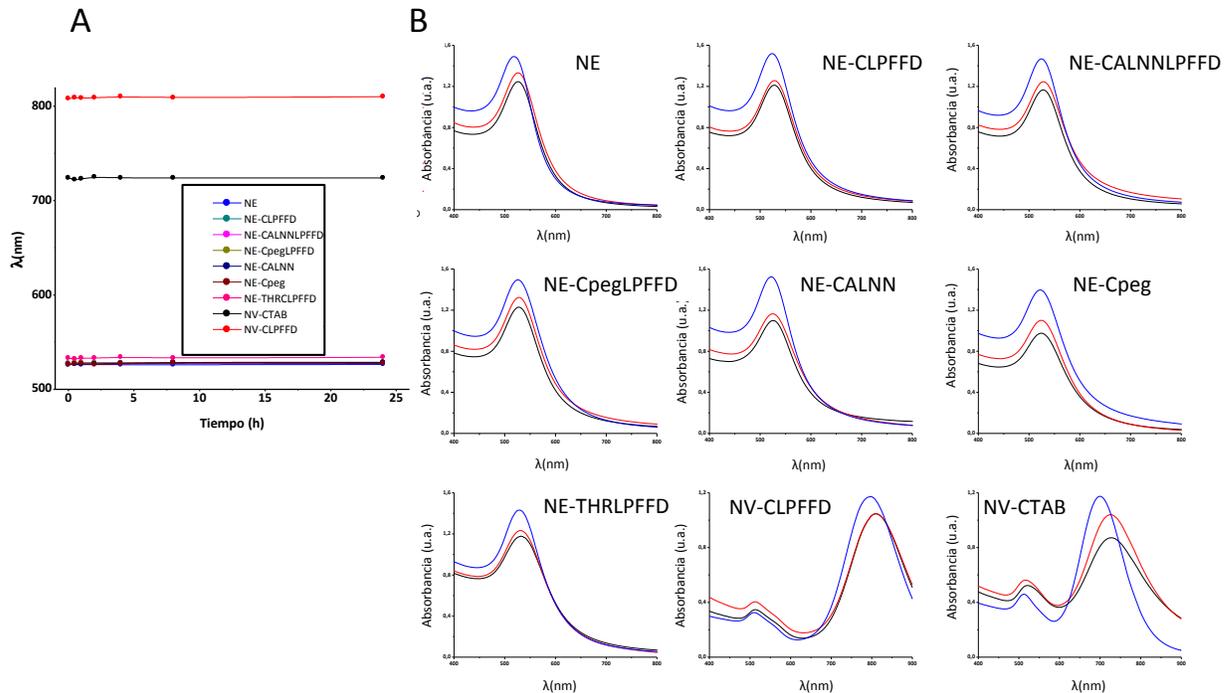


Figura 34. Estabilidad de NpO en plasma humano, seguimiento por espectrofotometría Uv-Vis. A) Máximo de absorbancia vs tiempo para cada NpO evaluada; B) perfil de absorbancia de las NpO en presencia de plasma humano, comparación de los máximos de absorbancia de cada muestra incubada con y sin plasma humano. Se aprecia un cambio en el máximo de absorbancia en cada muestra estudiada. En negro NpO sin incubarse en plasma, en azul incubado a tiempo 0 y en rojo incubado a 24 horas.

Con el fin de determinar si el corrimiento del plasmón superficial podría atribuirse a un crecimiento de las partículas por la formación de la CP se evaluó el efecto por DLS (Tabla 6). A partir de estos datos se aprecia un crecimiento del diámetro hidrodinámico considerable en todas las NpO. Este cambio podría ser causado por un efecto de agregación de nanopartículas, o por alteración de la superficie producida por ejemplo por la formación de la CP.^[125, 159, 160] Para determinar si se trata de agregación de nanopartículas o de la

formación de la CP. Se estudió la morfología de las nanopartículas por TEM realizándose una tinción negativa lo que permite visualizar la presencia de la CP (Figura 35). Las partículas aparentemente mantienen su morfología y al ser observadas empleando tinción negativa con acetato de uranilo se detecta la presencia de un halo que podría ser atribuible a la presencia de la CP sobre las NpO.^[160]

Tabla 6: Evaluación de la formación de la CP por cambios en los valores de del diámetro hidrodinámico de las NpO.

	DLS (nm (Pdi))	DLS Incubado en plasma 24h (nm (Pdi))
NE	18,8 (0,151)	41,25 (0,466)
NE-CLPFFD	21,75 (0,341)	57,57 (0,523)
NE-CALNNLPFFD	21,52 (0,271)	58,72 (0,475)
NE-CpegLPFFD	20,24 (0,259)	59,51 (0,487)
NE-CALNN	22,09 (0,282)	53,91 (0,614)
NE-Cpeg	21,09 (0,264)	51,05 (0,489)
NE-THRCLPFFD	44,62 (0,293)	110,26 (0,559)
NV-CTAB	56,59 (0,330)	108,9 (0,823)
NV-CLPFFD	45,56 (0,359)	80,63 (0,981)

* En cada caso los datos fueron obtenidos a partir de 3 lotes de NpO independientes. Se entrega el valor dado por triplicado para cada lote, con un ajuste matemático entre los lotes para luego obtener el valor de la tabla junto al índice de Polidispersidad (PDI) dado para el total de las muestras.

6.4.2 Formación de la CP.

Para corroborar que la naturaleza del recubrimiento de las nanopartículas incubadas con plasma es proteica, se realizó un tratamiento desnaturizante al *pellet* resultante luego de realizada la incubación y el posterior lavado con PBS para separar las proteínas que se encontraban formando la denominada CP.

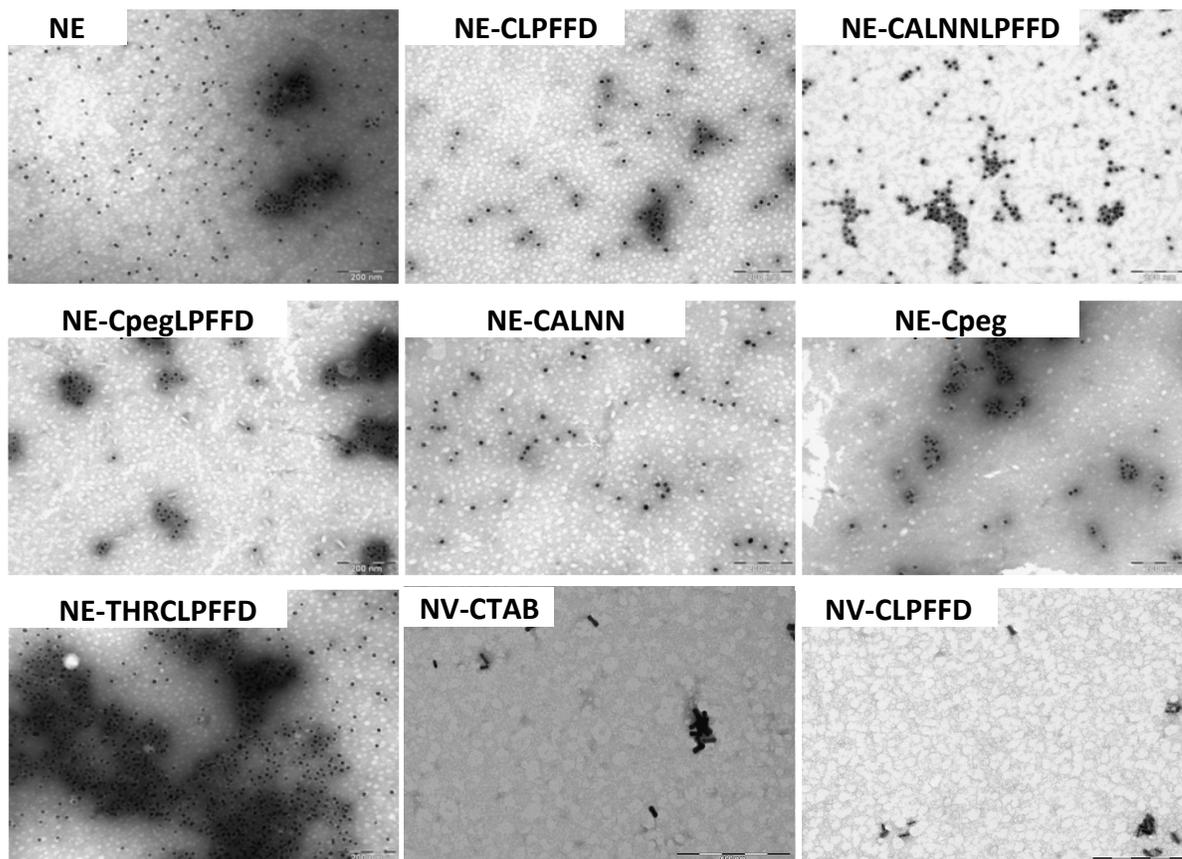


Figura 35. Imágenes obtenidas por TEM luego de la incubación de las NpO-péptido con plasma. Luego de una incubación por 24h a 37°C, la escala equivale a 200nm en NE y 500nm en NV.

Al realizar la posterior cuantificación de proteínas se apreció una cantidad muy similar de proteínas adheridas para todas las nanopartículas (Tabla 7). No obstante es interesante destacar que el conjugado NE-THRCLPFFD así como NV-CLPFFD y NV-CTAB interacciona con una mayor cantidad de proteínas, posiblemente debido a la naturaleza del péptido en el caso de THRCLPFFD que tiene una forma de “Y” con lo cual tendría una mayor interacción y al mayor tamaño en el caso de las NV. Para caracterizar el perfil proteico correspondiente a las proteínas presentes en la CP las mismas se cargaron en un gel en 1D SDS-Page (Anexo Figura A10). Para el caso de NE-CLPFFD; NE-CALNNLPFFD y NE-CpegLPFFD se observaron patrones similares, posiblemente debido a que exponen

una región similar del péptido LPFFD. Sin embargo, dada la gran complejidad que presenta este tipo de muestras, las posibles diferencias sutiles detectadas son solo predictivas y requieren de ensayos mas selectivos como los que se discutirán en el desarrollo del objetivo específico 7, entre las diferencia sutiles es posible decir que las NE aparentemente no se comportan de igual manera determinándose una sutil mayor diversidad de proteínas que se adhieren a la superficie, posiblemente debido a que las mismas son mas reactivas que las nanopartículas funcionalizadas con péptido. Por otra parte, NE-CALNN y NE-Cpeg se comportan de una manera algo diferente, pero también adhieren proteínas.

Tabla 7: Cuantificación de proteínas obtenidas de las NpO-conjugadas luego de ser incubadas por 24h, datos ajustado de acuerdo a la concentración en nmol de NpO.

	Concentración µg de proteína/ul (±SD)	Concentración µg de proteina/nmol de NpO (±SD)
NE	0,68 (±0,115)	34 (±5,7)
NE-CLPFFD	0,84 (±0,246)	42 (±12,3)
NE-CALNNLPFFD	0,99 (±0,105)	49,5 (±5,25)
NE-CpegLPFFD	0,78 (±0,219)	39 (±10,95)
NE-CALNN	0,67 (±0,078)	33,5 (±3,9)
NE-Cpeg	0,83 (±0,197)	41,5 (±9,85)
NE-THRCLPFFD	1,32 (±0,214)	66 (±10,7)
NV-CTAB	0,54 (±0,307)	108 (±23,35)
NV-CLPFFD	0,72 (±0,234)	144 (±15,35)

* En cada caso los datos fueron obtenidos a partir de 3 lotes de NpO independientes. Resultados corresponden al promedio de cada lote evaluado, junto a la desviación estándar (±SD) en cada caso.

6.5 Objetivo específico 5.

Evaluar toxicidad de los conjugados NpO-péptido en líneas celulares SH-SY5Y de NM incubados y sin incubar en plasma.

6.5.1. Efectos de las NpO sobre la viabilidad celular.

Para emplear NM *in vivo*, es necesario evaluar en primer lugar los posibles efectos sobre la viabilidad *in vitro*. En la Figura 36 se muestran los resultados obtenidos en los ensayos de MTS realizados luego de incubar NE con células de neuroblastoma SH-SY5Y. Tal como puede apreciarse no se observan efectos significativos en los rangos de concentraciones de nanopartículas probadas.

En el caso de las NV, se ha descrito que la presencia de CTAB, es un factor determinante que puede inducir toxicidad. Para eliminar la mayor cantidad posible de CTAB del medio se realizó una centrifugación y reconstitución del *pellet* en diferentes soluciones: CTAB a una baja concentración (2,5mM), plasma y DMEM. Es importante destacar que en las NV-CTAB no se puede eliminar completamente el CTAB debido a la inestabilidad coloidal que da origen a la agregación de las nanopartículas.

En la Figura 37 se observan los resultados de toxicidad evaluados en cada NV luego de realizar centrifugaciones y resuspensiones en los diferentes medios. Lo mismo se realizó con el conjugado NV-CLPFFD. Al analizar el perfil de viabilidad se aprecia que las NV-CLPFFD producen un efecto menor sobre la viabilidad celular en comparación con lo observado para NV-CTAB. Posiblemente esto se deba a que las NV-CTAB de por sí llevan una mayor cantidad de CTAB. C. Adura y cols., reportaron que al cuantificar los niveles de CTAB remanente luego de una primera centrifugación, en las muestras NV-CTAB el CTAB cuantificado corresponde a 0,5mM y en las NV-CLPFFD corresponde a 50µM,^[29] por lo cual la mayor toxicidad de las primeras respecto de las últimas puede ser atribuida al CTAB

remanente, que se liberaría tras reconstituir estas en medio de cultivo, lo cual previamente también ha sido reportado por Alkilany y cols.^[29, 161]

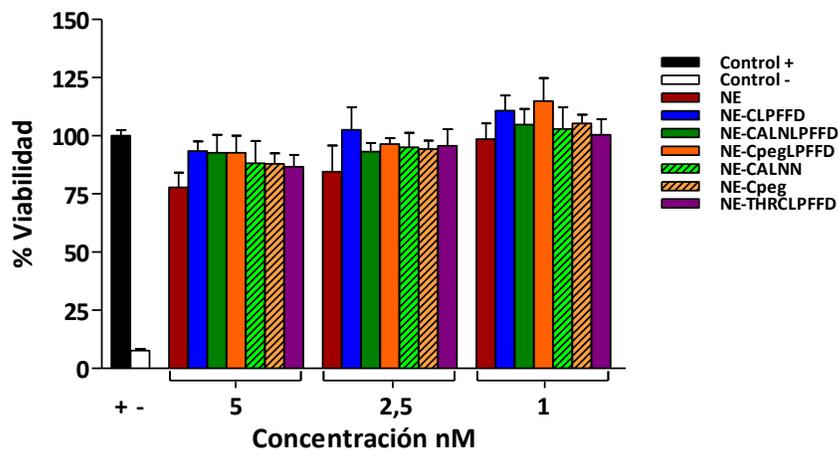


Figura 36. Ensayo de viabilidad en células SH-SY5Y tratadas con NE, se realizó un análisis de varianza ANOVA-tukey, al comparar el control positivo(C+) y los diferentes ensayos empleando NE, se aprecia que no hay diferencias significativas. Los resultados fueron expresados en porcentaje de viabilidad respecto al control, representados como el promedio junto a su desviación estándar de 3 experimentos independientes de 6 repeticiones (n=18). Se compararon contra las células no tratadas.

La CP se ha descrito que también influye sobre la toxicidad de los NM aumentando o disminuyendo los efectos.^[117] Para estudiar el posible efecto de la mencionada corona se incubaron las NV en plasma humano, y DMEM+10%SFB, luego se centrifugaron y se resuspendieron en medio DMEM (Figura 37). Al existir proteínas en el medio fue posible realizar dos centrifugaciones sucesivas ya que la CP estabiliza las nanopartículas permitiendo así la eliminación de mayores cantidades de CTAB. Empleando una doble centrifugación, se pudo disminuir el efecto sobre la viabilidad de las NV siendo mas notorio el efecto en aquellas NV-CLPFFD (como se observa en la Figura 37). Si bien aquellas NV-CTAB presentan aun toxicidad, que posiblemente se atribuya a la liberación de CTAB, es bastante menor a la observada empleando una sola centrifugación (Figura 37). La formación de una CP aumenta la estabilidad de las NV permitiendo realizar una mayor cantidad de centrifugaciones, reduciéndose los niveles de CTAB y concomitantemente la toxicidad.^[29]

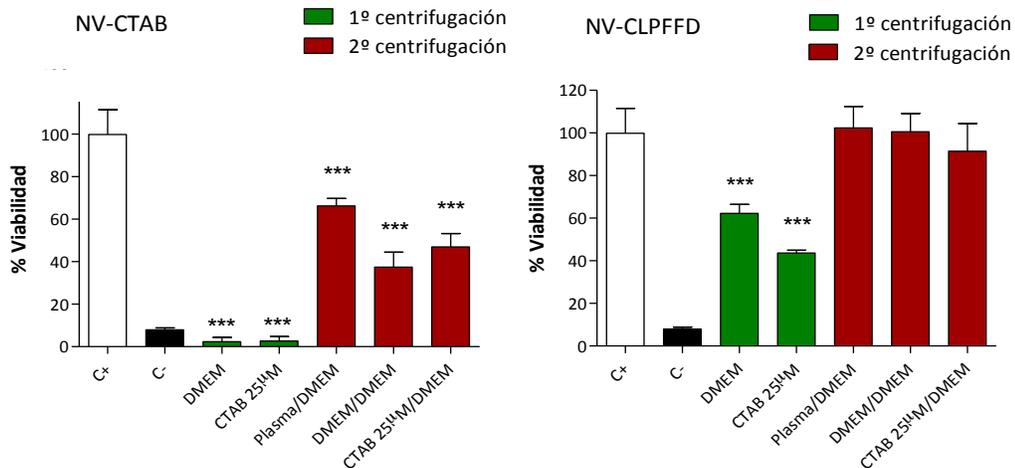


Figura 37: Ensayo de viabilidad en células SH-SY5Y tratadas con NV, Los resultados fueron expresados en porcentaje respecto del control de vida (+), representados como el promedio junto a su desviación estándar de 3 experimentos independientes de 6 repeticiones (n=18). Se compararon contra las células no tratadas. Se realizó un análisis de varianza ANOVA-Tukey (***) P < 0.001). SDS se empleó como C-, y DMEM como C+. En el eje x, DMEM y CTAB 25µM se refieren a las muestra centrifugada y redisuelta en dichos medios; por su parte Plasma/DMEM, DMEM/DMEM y CTAB 25µM/DMEM, se refiere a las muestras que pasaron por una segunda centrifugación. Luego de la primera centrifugación se incuban en plasma, DMEM o CTAB 25µM, respectivamente, y luego de la segunda centrifugación se redisuelve en DMEM.

6.6 Objetivo específico 6.

Evaluar efectos sobre la estructura y actividad de proteínas (albúmina y Aβ) debidos a la interacción de NpO-péptido.

6.6.1 Estudio de interacción de NpO con proteínas, efectos sobre la agregación de Aβ.

Para evaluar el efecto de las NpO sobre el crecimiento de las fibras amiloides se realizó el ensayo de fluorescencia de tioflavina (Th-T) que es un compuesto que se une a las fibras incrementando la señal de fluorescencia. Así en la Figura 38 se representa la señal de intensidad de fluorescencia de Th-T debido a la formación de fibras amiloides.

Al evaluar los resultados se observa una tendencia de las NE y NE-CLPFFD de inducir un mayor crecimiento de las fibras, posiblemente debido a la capacidad que tienen las superficies de las NpO para aumentar el crecimiento de las fibras favoreciendo las interacciones de las mismas. Por el contrario, las NE-THRCLPFFD generan una tendencia a un crecimiento menor, posiblemente esto se deba a la presencia de la secuencia THR, la cual en su estructura presenta una gran cantidad de Pro (P), lo que podría afectar a la estructura secundaria y reducir el crecimiento de las fibras. Para el caso de las NV-CLPFFD, posiblemente la disminución en el crecimiento de las fibras se deba a la presencia de CTAB, similar a lo observado por C. Adura en su tesis doctoral.^[39] Aun cuando en el caso de las NE-CLPFFD exista una tendencia a un mayor crecimiento de fibras, al efectuar la irradiación de este sistema, se destruyen las fibras y estas no vuelven a crecer.^[33]

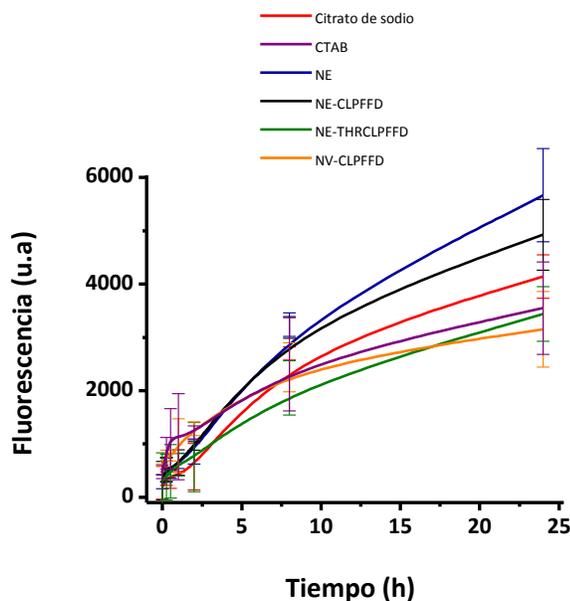


Figura 38: Intensidad de Fluorescencia de Tioflavina-T para el seguimiento del crecimiento de fibras de A β en 24h incubadas con NpO. Resultado mostrado como el promedio y graficado según su desviación estándar. (n=3)

Este hecho da cuenta que las NpO si pueden interferir con propiedades de agregación de las proteínas y sus reconocimiento,^[108, 162] en este caso con A β .^[163] existe una serie de

evidencias que NP pueden acelerar procesos de formación de fibras al favorecer el proceso de nucleación y en contraparte se ha descrito que modificando la superficie de estas es posible disminuir la formación de fibras de algún tipo de proteínas.^[104]

Para evaluar la formación de las fibras, se tomó una serie de micrografías por TEM, como se aprecia en la Figura 39, lo que da cuenta de la formación de las fibras al cabo de 24 horas.

Considerando los posibles efectos de las NpO sobre otras proteínas se han realizado algunos ensayos sobre el efecto en la albúmina, proteína mayoritaria del plasma. Se tiene referencia que las NpO al interactuar con proteínas del plasma pueden modificar su actividad, como es el caso de la quimiotripsina que aumenta su actividad enzimática.^[108, 125]

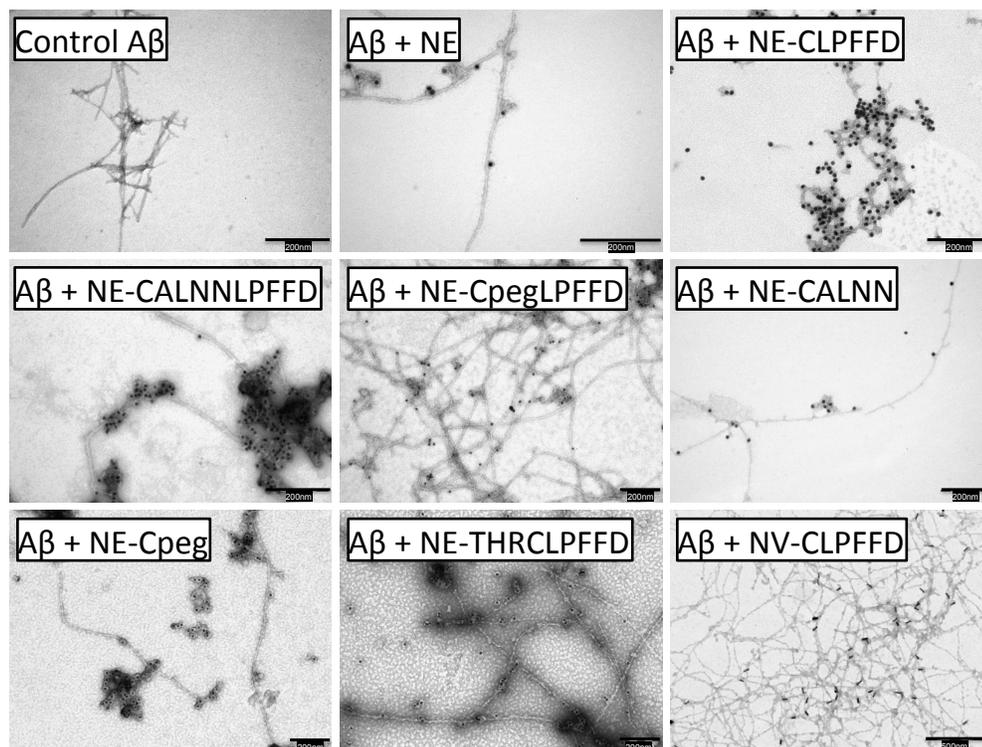


Figura 39: Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión luego de la incubación de las NpO (4nM de NE y 1nM de NV) junto con A β (12,5 μ M), también se muestra una imagen solo de A β , correspondiente al control. La escala equivale a 200nm en NE y 500nm en NV.

6.6.2 Efectos de las NpO sobre la estructura secundaria de la albúmina.

Para evaluar el efecto de las NpO sobre la albúmina se llevó a cabo un estudio de dicroísmo circular de la albúmina incubada con NpO. Como se aprecia en la Tabla 8 y en la Figura 40, existen ciertos cambios conformacionales en presencia de las NpO, lo cual indica que hay una cierta interacción de BSA con las NpO, llevando a cambios conformacionales de la proteína. Se observa que las NE y las NV no recubiertas con péptido disminuye el % de α -hélice, indicando un posible efecto sobre las estructuras α -hélice. En relación a estos realizados por Shang y cols., que dan cuenta que luego de conjugar BSA a NE (desnudas), se aprecia una disminución del % de α -hélice y un aumento del % de lámina- β .^[164] Así de acuerdo a lo observado en los resultados evaluados para NE se estarían conjugando con BSA, posiblemente por el único tiol libre presente en BSA en el residuo Cys34, presente en una hendidura de 6Å, siendo este residuo el responsable de la agregación de BSA bajo condiciones experimentales de estrés.^[165] Para el caso de las NV-CTAB, que puede ser funcionalizada, también se aprecia una disminución del % de α -hélice, pero no un aumento del % de lámina- β . Posiblemente este tipo de NpO también esté funcionalizándose, pero dada la presencia de CTAB un surfactante iónico que se ha descrito interacciona con BSA por medio de interacciones electrostáticas y también en regiones hidrofóbicas presentes en la superficie de BSA. Así la presencia de CTAB sobre las NV podría generar otro tipo de modificaciones de BSA que interfiera en las observaciones, dificultando predecir una posible funcionalización.^[166]

Por su parte los datos obtenidos de la incubación con BSA con NE-CLPFFD y NV-CLPFFD tienen poco efecto sobre las estructuras de tipo lámina- β y un marcado efecto hacia las conformaciones α -hélice. Por su parte las NE-THRCLPFFD, aparentemente aumentan las conformaciones de tipo lámina- β y α -hélice, lo que revelaría que posiblemente el péptido afecta dichas estructuras. Posiblemente estas últimas interaccionen

mejor con BSA por la presencia del péptido THRCLPFFD. Sin embargo, es complejo dar cuenta de esto, puesto que BSA es una proteína con múltiples dominios los cuales mayoritariamente están conformados por estructuras tipo α -hélice, las cuales pueden interactuar con diferentes estructuras moleculares. Es sabido que BSA interactúa con alta afinidad con estructuras hidrofóbicas, y moléculas cargadas negativamente, por lo cual la alteración en el % de α -hélice, puede dar cuenta de posibles interacciones a este nivel. Se debe tener en cuenta también que dada la alta cantidad de Lys (K) expuestas en la superficie de BSA (60 residuos), también pueden esperarse interacciones de tipo electrostática con motivos cargados negativamente presentes en moléculas como las NE. Si bien, posiblemente este tipo de interacciones no afecte las estructuras secundarias de BSA, si puede favorecer al reconocimiento y luego favorecer la interacción con otras moléculas en el plasma.^[167]

Tabla 8: Estructura secundaria, (α -hélice, lámina- β y espiral al alzar (RC)), análisis para BSA en ausencia y presencia de NpO. Obtenidos a partir del análisis de la elipticidad residual media por el programa dichroweb

	% α -hélice	lámina- β	% RC
BSA	55,4 ($\pm 1,1$)	10,4 (± 1)	34,2 ($\pm 1,2$)
BSA+NE	50,6 ($\pm 2,4$)	11,1 ($\pm 0,3$)	38,3 ($\pm 2,1$)
BSA+NE-CLPFFD	57,5 ($\pm 0,6$)	7,4 ($\pm 2,7$)	35,1 ($\pm 3,4$)
BSA+NE-THRCLPFFD	56,9 ($\pm 0,7$)	15,5 ($\pm 1,5$)	27,6 ($\pm 1,8$)
BSA+Nv CTAB	52,1 ($\pm 0,2$)	8,9 ($\pm 0,4$)	39 ($\pm 1,3$)
BSA+Nv-CLPFFD	60,7 ($\pm 2,2$)	6,4 ($\pm 2,8$)	32,9 ($\pm 2,9$)

* En cada caso los datos fueron obtenidos a partir de 3 lotes de NpO independientes.

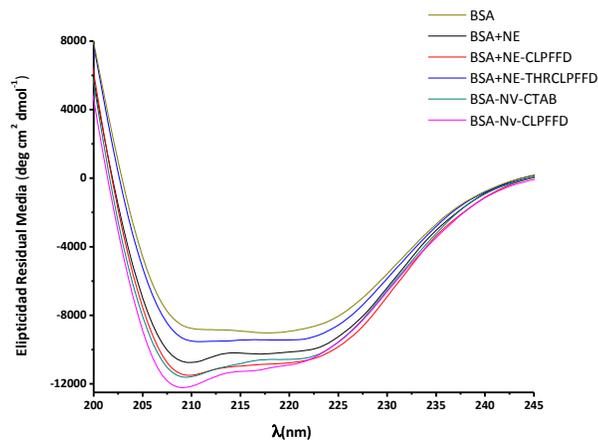


Figura 40: Elipticidad residual media de BSA en presencia de NpO.

6.7 Objetivo específico 7.

Identificar las proteínas del plasma que interactúan con NpO-péptido (corona de proteínas).

6.7.1 Identificación de las proteínas del plasma que se unen a los conjugados NpO-péptido por electroforesis en 2-D y LC-MS/MS.

Se procedió a identificar que tipos de proteínas conforman la CP luego de la incubación de las mismas con plasma humano. Luego de la incubación se separaron las proteínas unidas a las NpO según se describe en el capítulo 2, y se procedió a su identificación, para lo cual se realizaron geles de poliacrilamida bidimensionales. En la Figuras 51 y 52 se muestran los geles en 2-D obtenidos a partir de las proteínas separadas para cada NpO incubada con plasma. Dada la gran complejidad de las muestras, se empleó como referencia desde la base de datos ExPASy, la información de proteómica que se tiene del plasma humano, (Figura 41). Esto con el fin de pre identificar una serie de *spots*, para así centrar el interés en ciertas proteínas que podrían estar relacionadas con el cruce a través de la BHE y con la captación por el SFM. Seleccionado los *spots*, se extrajeron y se

analizaron por LC-MS/MS, a partir de lo cual se identificaron las proteínas (Tabla 9). Dada la gran cantidad de proteínas en el plasma y la complejidad de los geles obtenidos, también se realizó la identificación de proteínas totales a partir del crudo de proteínas obtenido (Anexo Tabla A1).

Para complementar los datos se realizó una identificación de las proteínas totales a partir del *pull* de proteínas unidas y posteriormente separadas desde la superficie de las NpO. Como se esperaba se identificaron las proteínas ya detectadas por la identificación de las manchas en los geles bidimensionales y se observaron muchas otras proteínas que también están presentes en la CP, dando cuenta de la complejidad de la CP. En la Tabla A1 del anexo se detallan la proteína totales identificadas de las CP de las muestras de NpO.

Estos resultados pretenden servir a modo de observación general, a partir del cual es necesario plantear la posibilidad de conseguir favorecer ciertas interacciones, y disminuir otras para mejorar la entrega de las NpO, este principio es el que se aborda en la última parte de esta tesis. Algunas observaciones generales luego de identificadas las proteínas pueden destacarse de los geles obtenidos. Interesantemente, en que aquellas proteínas mayoritarias del plasma (ver Figura 41, Tabla 9) están presentes en todas las muestras tales como inmunoglobulinas, albúmina, fibrinógeno, proteínas del complemento entre otras. Pero una observación no menor se relaciona con la albúmina, pues pese a que es la proteína mayoritaria del plasma, no es la que se encuentra más abundante en las muestras.

Es interesante destacar que gran número de opsoninas (proteínas como Ig, proteínas del complemento, fibrinógeno, etc) se unen indiscriminadamente a las NpO, dato que posiblemente se relacione con lo observado *in vivo* para las NE, NE-CLPFFD y NE-THRCLPFFD, en los cuales puede relacionarse con la acumulación mayoritaria observada en órganos no deseados como hígado y bazo, tal como se demostró por nuestro grupo en

estudios previos *in vivo*,^[4,5] (capítulo 5). Si bien existen diferencias en la funcionalización entre las diferentes NE, al realizar su caracterización presentan ciertas similitudes, como tamaño y pot-Z. No obstante, aunque cambia el recubrimiento las interacciones con las denominadas opsoninas no son dependientes de la estructura de los péptidos que se encuentran recubriendo las NpO. Asimismo, los cambios de forma y de carga tampoco tienen una gran influencia en la interacción con las opsoninas.

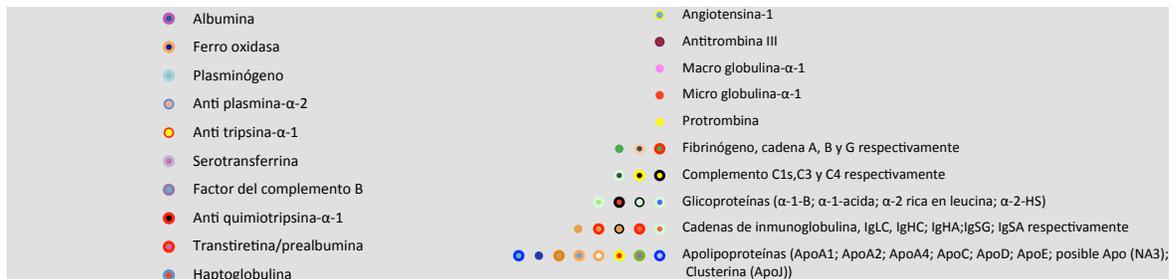
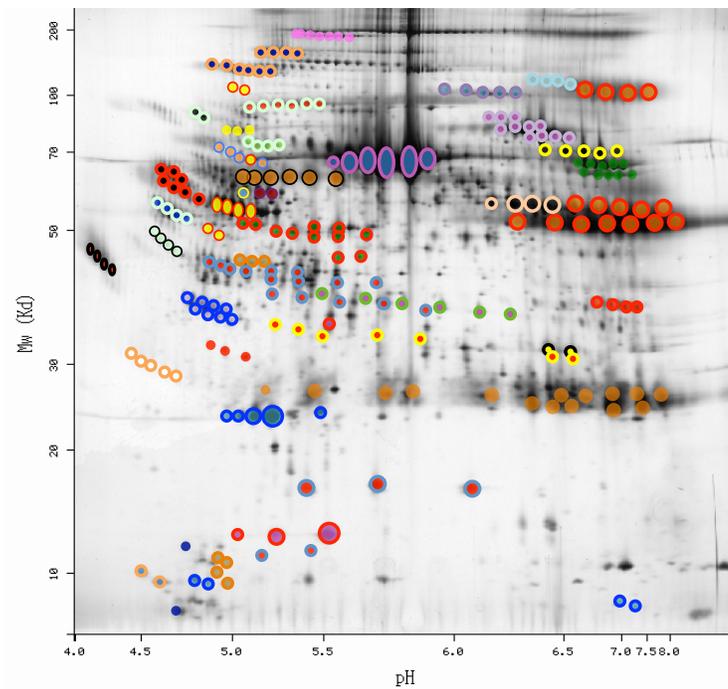


Figura 41 : Gel en 2-D de una muestra de plasma humano, obtenido a partir de la base de datos de Expsy <http://swissmodel.expasy.org>, se indican las proteínas presentes en el gel.

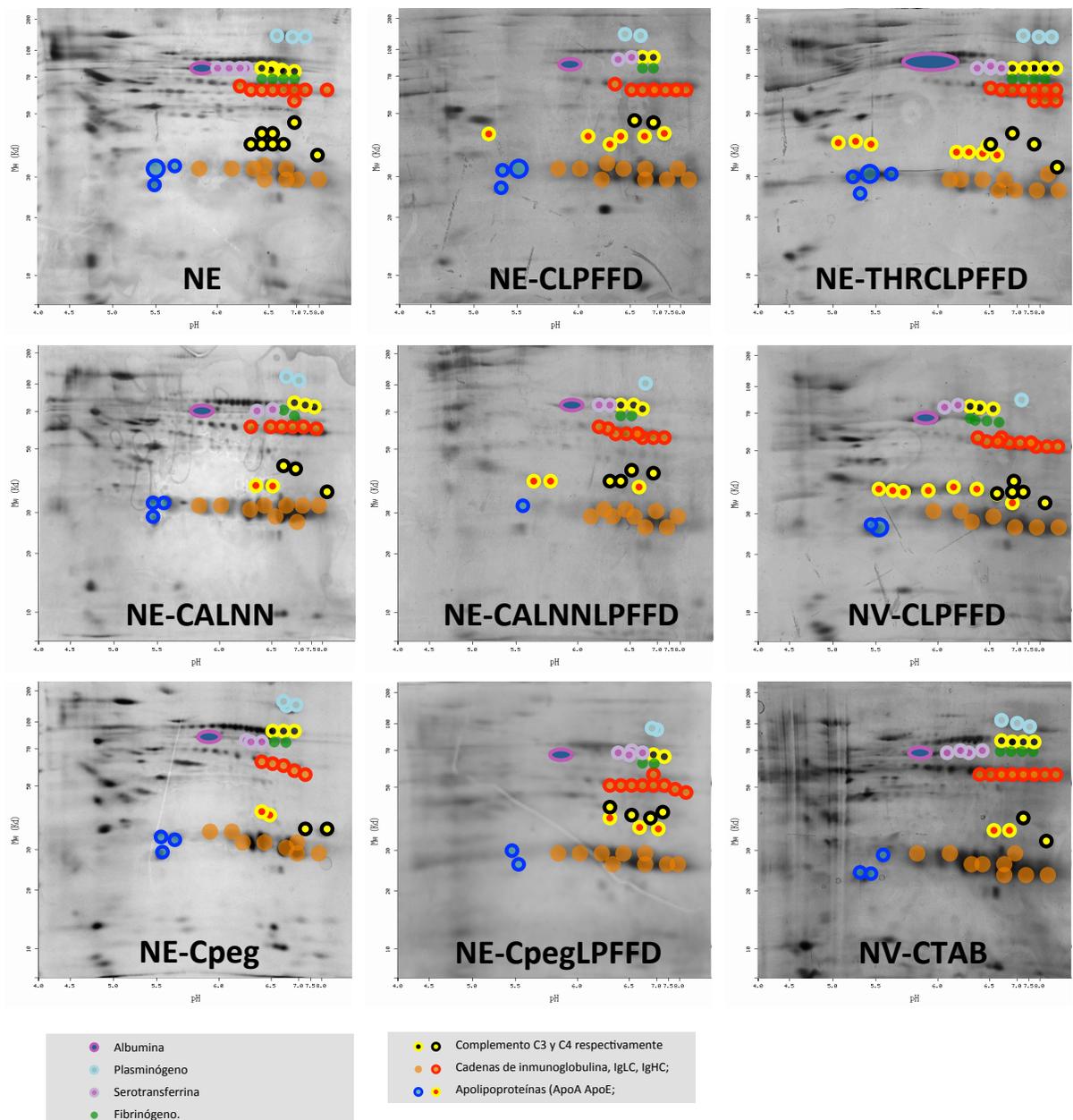


Figura 42 : Geles 2D de Separación de proteínas presentes en la CP de los conjugados NpO. Comparativa de geles en 2D a partir de Np conjugadas por 24h. Se aprecia el patrón proteico según su punto isoeléctrico y tamaño de las proteínas. Se representan algunas de las proteínas identificadas y relacionadas con la distribución *in vivo*.

Tabla 9: Resumen de las proteínas mas relevantes en cada CP unida a los diferentes conjugado identificadas desde los geles bidimensionales por medio de LC/MC/MC:

	NE	NE-CLPFFD	NE-CALNNLPFFD	NE-CpegLPFFD	NE-CALNN	NE-Cpeg	NE-THRCLPFFD	NV-CTAB	NV-CLPFFD
inmunoglobulinas	**	**	**	**	***	**	**	***	**
Fibrinógeno	***	**	*	*	*	*	**	***	**
CO3	**	*	*	*	*	*	***	*	*
Albúmina	*	*	*	*	*	*	***	*	*
Serotransferrina	***	*	*	**	*	*	***	**	*
Plasminógeno	**	*	*	*	*	**	**	***	*
ApoE		**	*	*	*	*	***	*	***
NA3(possible APO)	*	*	*	*					
CO4	**	*	**	**	**	*	**	*	**
ApoA4	**	**	*	*	**	**	***	*	*
ApoA1	**	*	*	*	**	**	**	**	**
Alfa-Globulinas (A2MG/A1G/A2AP/ANGT)	**	**	**	*	*	*	**	*	*
protrombina	*	*	*	*		*	**		
Antitrombina III	*	**		*	*	*	*		*

Los valores *,**,*** solo son de carácter cualitativo y reflejan las cantidades relativas de dichas proteínas en las muestras evaluadas según la intensidad de las bandas de los geles. 2D.

En la Figura 42 y en la Tabla 9, es posible apreciar ciertos patrones similares entre las diferentes muestras, en donde se marcan algunas de las proteínas relacionadas con la distribución a modo de comparación. Así al comparar los geles obtenidos de aquellas NE con la secuencia CLPFFD (NE-CLPFFD; NE-CALNNLPFFD; NE-CpegLPFFD), se presenta un patrón proteico que posee cierta similitud, mayor que la determinada por otras NpO. Siguiendo con las observaciones generales de los geles la ausencia de CLPFFD (NE; NE-CALNN; NE-Cpeg) produce cambios en los patrones proteicos de las CP de las NE. Así, espaciadores CALNN y Cpeg (NE-CALNNLPFFD; NE-CpegLPFFD) aparentemente no son determinantes en el patrón proteico en presencia de CLPFFD, pero si generan diferencias

al estar expuestos en ausencia de este péptido. Por otra parte para el caso de las NV-CLPFFD se obtiene un patrón con una serie de similitudes respecto de NE-CLPFFD. Y puede mencionarse que las muestras como NE; NE-CALNN; NE-Cpeg; NV-CTAB y NE-THRCLPFFD que sin tener un factor común en superficie, tienden a unir otras proteínas y a tener patrones de unión a proteínas diferenciales. Estas observaciones solo son comparativas y no permiten determinar diferencias reales, dada la gran cantidad de posibles isoformas que pueden tener las proteínas. Dado lo cual solo da cuenta de parámetros a ser considerados para los estudios posteriores.

Las NE-THRCLPFFD, NV-CTAB y NV-CLPFFD a diferencia de los otros conjugados unen una mayor cantidad de proteínas por nmol de NpO (capítulo 4). Entre las proteínas mayoritarias observadas en el gel de NE-THRCLPFFD (Figura 42) y luego detectadas por LC-MS/MS (Tabla 9) se encuentran la albúmina y las proteínas del complemento. Además se observa una alta densidad de proteínas en la región de las apolipoproteínas (Apolipoproteína A y E). Tanto la presencia de albúmina como de apolipoproteínas podrían ser factores que favorezcan el paso a través de la BHE por transcitosis absorptiva o mediada por receptores, respectivamente. La albúmina podría estar promoviendo una transcitosis absorptiva y la ApoE podría promover el paso a través del receptor LRP1.^[76-79, 105, 115, 120, 121]

La presencia de elevados niveles de proteínas de la CP sobre conjugados como NE-THRCLPFFD y dada la gran cantidad de proteínas detectadas (objetivo 4), puede ejercer efectos sobre el reconocimiento por los receptores para THR, ya que podría darse un ocultamiento del péptido lanzadera por la mencionada corona. Al analizar en conjunto a los resultados del último objetivo (objetivo 8), los resultados *in vivo*, se aprecia durante periodos cortos de tiempo 0 a 1h que NE-THRCLPFFD logra aumentos notorios en los niveles cerebrales respecto de NE-CLPFFD, sin embargo, a las 2 horas, no es tan considerable la mejora respecto a los conjugados NE-CLPFFD. Posiblemente la llegada mas temprana del

primero al cerebro se deba a la interacción con los receptores de transferrina que favorecen la transcitosi. Si bien NE-CLPFFD se unen en menor medida a albúmina y ApoE, posiblemente este factor sea la causa mas relevante del paso a través de la BHE, dejándose en segundo plano el cruce de la BHE por medio del receptor de Transferrina para el caso de las NE-THRCLPFFD, que posiblemente esté restringido dada la gran cantidad de proteínas que pueden estar conformando la CP. Por último se tiene que las NE unen una menor cantidad aparente de albúmina respecto de otras proteínas, y posiblemente esto sea causa de que se observen ciertos niveles de NE-citrato (desnudas) en el cerebro.

6.8. Objetivo específico 8.

Estudiar la biodistribución de NpO-péptido (NE-CLPFFD; NE-THRCLPFFD y NE)

6.8.1. Determinación de niveles de oro en cerebros de rata en función del tiempo luego de la administración intraperitoneal (experimentos *ex vivo*).

Luego de inyectar las NE a una rata se determinaron los niveles de oro a diferentes tiempos post administración en cerebro, resultados que se muestran en la Figura 43 y en la Tabla 10.

De los resultados se pudo apreciar que los niveles de oro determinados en aquellas ratas tratadas con NE-CLPFFD fueron mayores a los de las ratas tratadas con NE (sin funcionalizar). A partir de los resultados observados se determinó que a las 2 horas post inyección se detectaron los mayores niveles de oro observándose luego una disminución de los mismos hasta llegar a los niveles basales luego de 24h post administración. Esto da cuenta de una posible remoción de las NE desde el cerebro al menos durante las 24 horas post inyección, disminuyendo así posibles efectos no deseados, en el sistema nervioso central. Si bien los niveles de oro son muy bajos respecto de la DI (Tabla 10) se aprecia

que aquellas NE-CLPFFD, llegan en una mayor proporción respecto de las NE (sin funcionalizar).^[50]

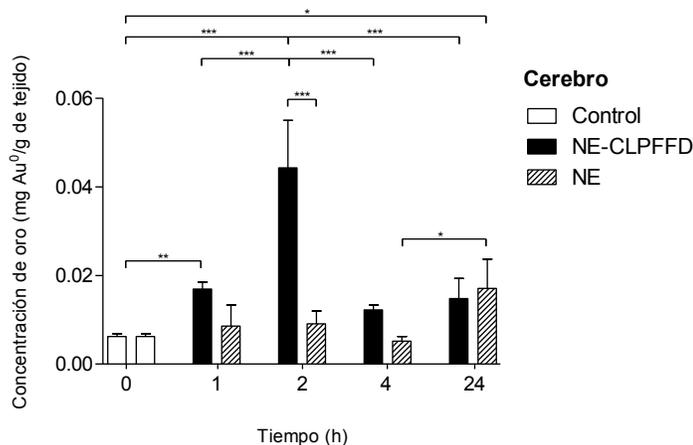


Figura 43. Perfil de acumulación en el tiempo de oro en cerebro de rata luego de una administración intraperitoneal de NE y NE-CLPFFD. El experimento se realizó por cuadruplicado. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$.

6.8.2 Determinación y comparación relativa de los niveles de oro encontrados en hígado, bazo y riñón respecto a los encontrados en cerebro.

La funcionalización de NE con CLPFFD conlleva a cambios en las interacciones con biomoléculas respecto de las NE sin funcionalizar tal como se demostró tras realizar el objetivo 7. Es por eso que se espera un efecto sobre la distribución diferencial entre NE-CLPFFD y NE (sin funcionalizar) al igual que lo observado en cerebro. Para esto se determinaron los niveles de oro en órganos como el hígado, el bazo y los riñones (Figura 44 y Tabla 10). Los elevados niveles de oro detectados en los órganos estudiados, indican que las NE llegaron a la circulación y se distribuyeron en el organismo. Luego de 24 horas las NE-CLPFFD se encontraron mayoritariamente a nivel de hígado y bazo (52% y 2% respectivamente de las DI) y en un menor nivel en los riñones (0,2% de la DI). Los niveles de NE fueron mas variables, encontrándose 29%, 0,7% y 0,1% en hígado, bazo y riñones, respectivamente (Tabla 10). Asimismo, se determinó que el contenido de oro en cerebro

fue 10 veces menor al detectado en riñones. Luego de 24 horas los mayores niveles se detectaron a nivel del hígado. Interesantemente el recubrimiento con CLPFFD disminuyó la captación de NE a nivel del bazo durante las primeras 2 horas respecto a lo observado en las NE estabilizadas con citrato.^[50]

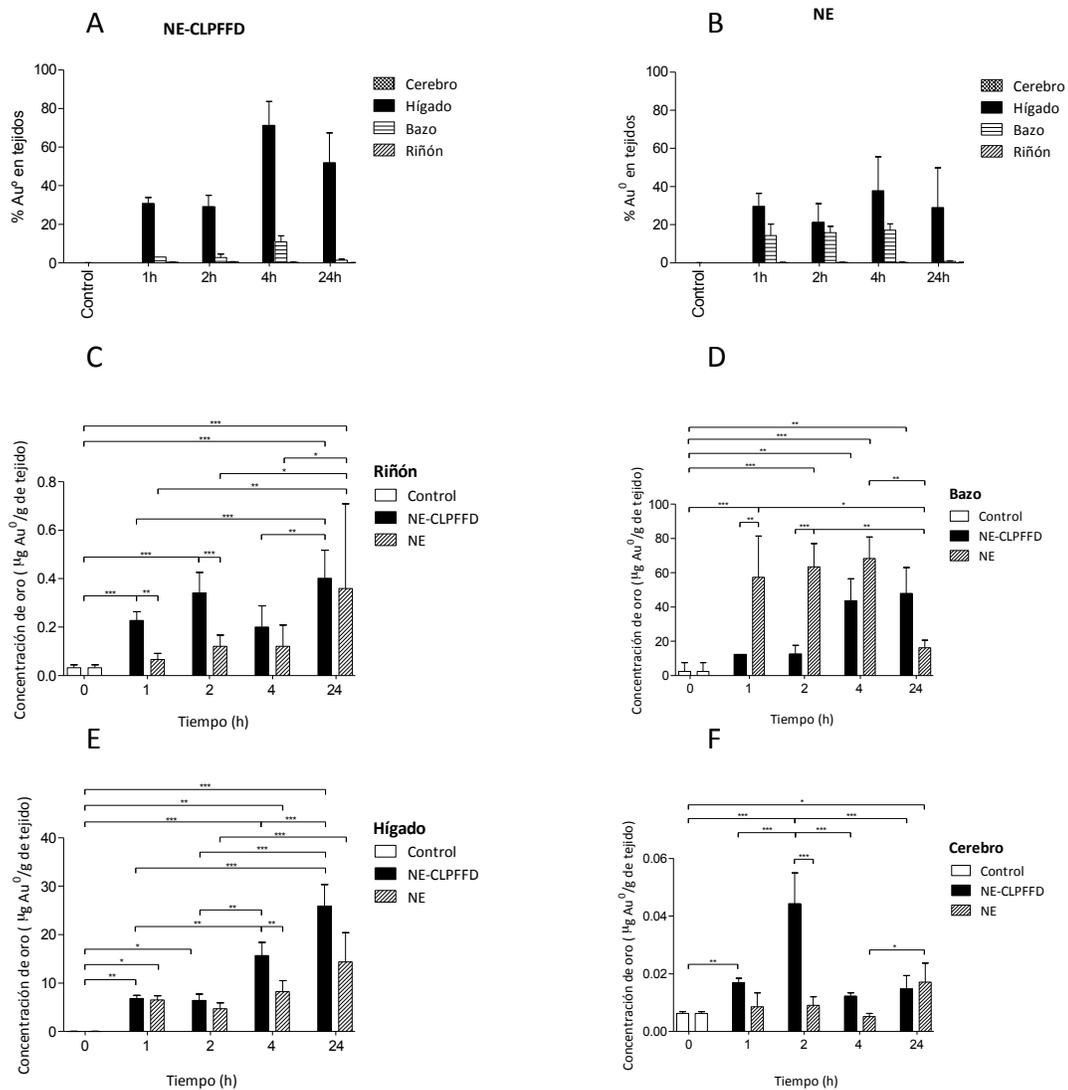


Figura 44. Perfil de distribución de NE y NE-CLPFFD en bazo, hígado, riñón y cerebro luego de una administración intraperitoneal en ratas. (A-B) porcentaje de oro determinado en cada órgano respecto de la DI. (C-F) Perfil de concentración de oro en los diferentes órganos estudiados. El experimento se realizó por cuadruplicado. *p<0,05; **p<0,001; ***p<0,0001.

Tabla 10. Contenido de oro en los órganos de ratas, obtención de la DI

Órgano	Tiempo	NE-CLPFFD			NE		
	horas	µg/g ([±] SD)	µg ([±] SD)	% ([±] SD)	µg/g ([±] SD)	µg ([±] SD)	% ([±] SD)
Cerebro	0.5	0,012 ([±] 0,01)	0,023 ([±] 0,019)	0,003 ([±] 0,003)	0,007 ([±] 0,01)	0,013 ([±] 0,011)	0,002 ([±] 0,002)
	1	0,017 ([±] 0,002)	0,034 ([±] 0,003)	0,005 ([±] 0,0004)	0,009 ([±] 0,002)	0,02 ([±] 0,004)	0,002 ([±] 0,0006)
	2	0,045 ([±] 0,011)	0,09 ([±] 0,02)	0,012 ([±] 0,003)	0,009 ([±] 0,003)	0,018 ([±] 0,006)	0,002 ([±] 0,0008)
	4	0,012 ([±] 0,001)	0,024 ([±] 0,002)	0,003 ([±] 0,0003)	0,005 ([±] 0,001)	0,0102 ([±] 0,002)	0,001 ([±] 0,0003)
	24	0,015 ([±] 0,008)	0,03 ([±] 0,015)	0,003 ([±] 0,002)	0,02 ([±] 0,01)	0,034 ([±] 0,023)	0,004 ([±] 0,003)
Hígado	1	6,81 ([±] 0,67)	102,15 ([±] 9,98)	13,68 ([±] 1,33)	6,5 ([±] 1,48)	97,5 ([±] 22,2)	13,06 ([±] 2,98)
	2	6,45 ([±] 1,27)	96,75 ([±] 19,05)	10,41 ([±] 2,55)	4,7 ([±] 2,13)	70,5 ([±] 31,95)	9,45 ([±] 5,18)
	4	15,7 ([±] 2,72)	235,5 ([±] 40,8)	31,55 ([±] 5,46)	8,3 ([±] 3,88)	124,5 ([±] 58,28)	16,68 ([±] 7,8)
	24	25,88 ([±] 7,69)	388,2 ([±] 115,4)	51,98 ([±] 15,45)	14,39 ([±] 10,43)	215,95 ([±] 156,6)	28,92 ([±] 20,97)
Riñón	1	0,227 ([±] 0,036)	0,795 ([±] 0,13)	0,106 ([±] 0,02)	0,067 ([±] 0,03)	0,24 ([±] 0,086)	0,03 ([±] 0,012)
	2	0,341 ([±] 0,084)	1,194 ([±] 0,3)	0,159 ([±] 0,04)	0,12 ([±] 0,05)	0,42 ([±] 0,18)	0,05 ([±] 0,024)
	4	0,2 ([±] 0,087)	0,7 ([±] 0,31)	0,09 ([±] 0,09)	0,12 ([±] 0,09)	0,42 ([±] 0,32)	0,05 ([±] 0,041)
	24	0,40 ([±] 0,12)	1,41 ([±] 0,40)	0,19 ([±] 0,05)	0,36 ([±] 0,35)	0,84 ([±] 1,13)	0,112 ([±] 0,15)
Bazo	1	12,46 ([±])	3,99 ([±])	0,53 ([±])	57,33 ([±] 24,09)	18,35 ([±] 7,71)	2,46 ([±] 1,03)
	2	12,68 ([±] 4,96)	4,06 ([±] 1,59)	0,54 ([±] 0,21)	63,5 ([±] 13,44)	20,32 ([±] 4,3)	2,72 ([±] 0,558)
	4	43,73 ([±] 12,75)	13,99 ([±] 4,08)	1,88 ([±] 0,55)	68,4 ([±] 13,43)	21,9 ([±] 4,29)	2,93 ([±] 0,58)
	24	48,01 ([±] 25,96)	15,36 ([±] 8,31)	2,05 ([±] 1,11)	16,29 ([±] 7,51)	5,21 ([±] 2,41)	0,7 ([±] 0,321)

* Solo el cerebro se analizó por AAN a las 0,5 horas

** A partir de los órganos extraídos, peso cerebro seco promedio fue de 0,35g, hígado 1,8g, riñón 0,5g y bazo 0,085g. Se empleó una cantidad de 3 animales por tiempo analizado (n=3)

En las Figura 43 y 54 y en la Tabla 10 se aprecia como es posible aumentar en 4 veces la cantidad de NE en el cerebro modificando la superficie de las nanopartículas reduciendo la carga y aumentando el carácter lipofílico de éstas. También queda claro que esta modificación lleva a una reducción de la retención de NE por el bazo a 1 y 2 horas luego de la inyección. Transcurridas las 24 horas, se aprecia que los conjugados han sido parcialmente extraídos del cerebro y otros órganos para acumularse mayoritariamente en hígado. La acumulación en hígado, es similar a la observada en un trabajo previo, en que el

grupo de Semmler-Behnke y cols., inyectaron NpO intravenosamente en ratas y al cabo de 24h se encontraron mayoritariamente en hígado.^[50, 98] En este sentido se ha encontrado que las NE (sin funcionalizar) presentan un pot-Z con mayor valor absoluto negativo que las NE-CLPFFD, y con la funcionalización con el péptido anfipático CLPFFD se incrementa la penetración de las NE posiblemente debido a la reducción de la carga negativa que reduciría la interacción con opsoninas y la consecuente captación por el SFM como también por un aumento del carácter hidrofóbico que contribuye a un aumento de la penetración a través de membranas.^[34, 72, 77, 114]

A partir de la información de las NE y su comportamiento, sería posible dar cuenta de que la carga negativa de las mismas conlleva a procesos de opsonización, no deseados, que inducen a la retención de las NE por el SFM, disminuyéndose así su llegada al cerebro.^[50, 72, 77, 109] Según esto, el desafío es lograr aumentar aun más los niveles de NE en el cerebro. Para ello podrían considerarse diferentes parámetros como la vía de administración intravenosa y/o una modificación de la superficie de las NpO en el orden de incrementar su lipofilicidad y reducir su carga negativa.

Aun cuando en este trabajo no se estudió el *clearance* de NE, se podría especular que por el tamaño de las NE se vea dificultada su excreción a través de los riñones, ya que se ha descrito que el tamaño de corte de excreción por riñón es cercano a los 5,5nm, lo cual se observado para QD.^[168] Por lo cual el mecanismo presumible para las NE estudiadas en este trabajo sería la excreción por vía hepatobiliar, como lo ha propuesto Sonavane y cols., y Semmler-Behnke y cols., en un estudio realizado para NE de tamaño similar.^[50, 67, 98]

En cuanto a la llegada de NE al cerebro otros autores también demostraron que las mismas cruzan la BHE luego de la administración intraperitoneal de NE de 12-13nm. Esto da cuenta que las NE pueden sortear numerosas barreras y el efecto de primer paso para

conseguir llegar al cerebro tal como lo describieron, previamente Hillyer y Albertch, empleando otras NE.^[50, 169, 170]

El paso al cerebro de las NE-CLPFFD, posiblemente esté relacionado con algún tipo de receptor que pueda reconocer CLPFFD a nivel de BHE, como el receptor RAGE e inducir la transcitosis de las NpO desde la sangre al cerebro al igual que ocurre con A β .^[82-85] Otra posibilidad demostrada en el capítulo 4, es la capacidad de interactuar con proteínas, entre las que pueden estar Albúmina, que favorecería la transcitosis, mediada por la interacción de la membrana. Asimismo la unión a otra proteína como la ApoE, una proteína que es reconocida por los receptores de LDL, podría favorecer la transcitosis. La naturaleza anfipática de CLPFFD, posiblemente también ayude al anclaje de la membrana de las NpO, lo cual facilitaría las posibilidades de reconocimiento.

6.8.3 Localización de NpO en el cerebro.

En relación a los niveles de NE y NE-CLPFFD detectados en el cerebro, se intentó localizar en que región se acumulan las diferentes NE. Con el fin de detectar los conjugados se empleó marcaje con carboxifluoresceína, con la cual por medio de microscopia de fluorescencia podría ser detectada siempre que los niveles de señal observada en el parénquima cerebral fuesen mayores a los niveles de fluorescencia de los controles. Para este fin, el cerebro fue dividido en cortes de 20 μ m y las áreas del cerebro se detectaron por tinción de Nissl de regiones paralelas a las analizadas, como muestra la Figura 55. En una condición similar a la cuantificación de oro, luego de 2 horas se observó una mayor acumulación en la zona del hipocampo. La señal de fluorescencia decayó al cabo de 4h como se aprecia en la Figura 45. Estos resultados se correlacionan con el perfil dado por los niveles de oro obtenidos a las 2h post inyección, a partir de lo cual se puede inferir que el péptido se mantuvo unido a la superficie de la NE, sin embargo, no se descarta una

hidrólisis parcial del péptido *in vivo*. Pero a través de estos estudios no es posible descartar una eventual hidrólisis del péptido pues el marcaje se ubicó en extremo N-terminal del péptido, justamente más cercano a la superficie de la NE. A las 4h post inyección los niveles de fluorescencia decayeron en conjunto a los niveles de oro, lo cual da cuenta de un eventual *clearance* desde el cerebro, correlacionado con un aumento en los niveles en hígado. En estos experimentos no se evaluaron mecanismos de *clearance*, pero se propone que posiblemente las NE-CLPFFD fueron extraídas desde el cerebro tras pasar desde del parénquima cerebral al líquido cefalorraquídeo (LCR), para ser luego exportadas desde el SNC a la circulación venosa. Posiblemente las NE podrían ser exportadas en el LCR por el transporte de fluidos y otros elementos mediados por vacuolas de fluidos a través de la vellosidad de las células (mecanismo empleado por ejemplo por bacterias y células de la sangre). El LCR se mueve a lo largo de un gradiente de presión desde un punto de alta presión (espacio subaracnóideo) a un punto de menor presión (senos venosos), pudiendo así transportar las NE hacia la circulación a través de las estructuras de las vellosidades aracnoides, adaptadas para el transporte de LCR desde el espacio subaracnóideo a la circulación venosa. ^[34, 50, 171, 172]

6.8.4 Evaluación de la integridad de la BHE.

Para descartar que la presencia de las NE en la circulación no tiene un efecto negativo en la integridad de la BHE y que los niveles detectados en el cerebro no se deban a un daño en la BHE se empleó azul de Evans (AE) inyectado por vía intravenosa, el cual se une a la albúmina y se convierte en un marcador de extravasación.^[173] Si existiese daño a nivel de la BHE se espera que el cerebro se tiña de color azul fenómeno que se observa en un control positivo empleando manitol en concentraciones hiperosmolares (al 25% en solución salina al 0,9%) que produce disrupción en la BHE observándose permeabilidad de albúmina

marcada con AE (Figura 46). En el caso de las ratas tratadas con NE-CLPFFD, no se observó tinción con AE en el cerebro (Figura 46)

6.8.5 Estudios *in vivo* de distribución de NE-CLPFFD.

Según se demostró en el objetivo 3, el diseño experimental involucra el marcaje de NE con ^{18}F , para así tener una marca que puede ser detectada por PET con una alta sensibilidad. Para lograr esta marca, se multifuncionalizaron NE con dos péptidos el péptido CK y el CLPFFD. De esta forma se aumentaron los grupos aminos disponibles, esperándose que al reaccionar de manera de favorecer la reacción con la sonda SFB- ^{18}F y formar las nanopartículas multifuncionalizadas NE-CK/CLPFFD $^{*\text{SFB}[^{18}\text{F}]}$ con un porcentaje de marcación adecuado para realizar los estudios *in vivo* por PET en una rata viva. Las NE-CLPFFD/CK y NE-CK/CLPFFD $^{*\text{SFB}[^{18}\text{F}]}$ fueron obtenidas y caracterizadas de acuerdo a los objetivos 1, 2 y 3.^[145]

En estos estudios se emplearon ratas macho Sprague Dawley tratadas con un bolus intravenoso de partículas radiomarcadas (con un nivel de $3.1 \pm 2.7 \text{ kBq}$ relacionado con los niveles de oro inyectados en los trabajos anteriores). Luego de lo cual se comenzó con la adquisición de imágenes tomográficas por un periodo de 120min. En el capítulo 2 se detalla en mayor profundidad la metodología empleada.^[145]

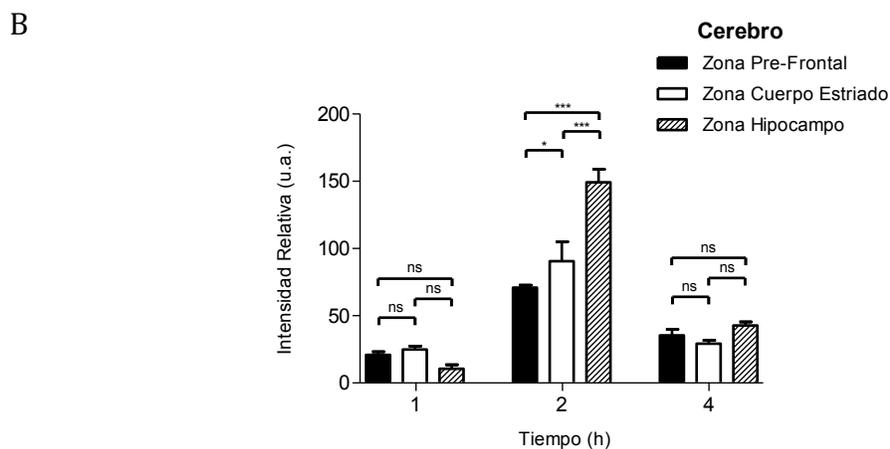
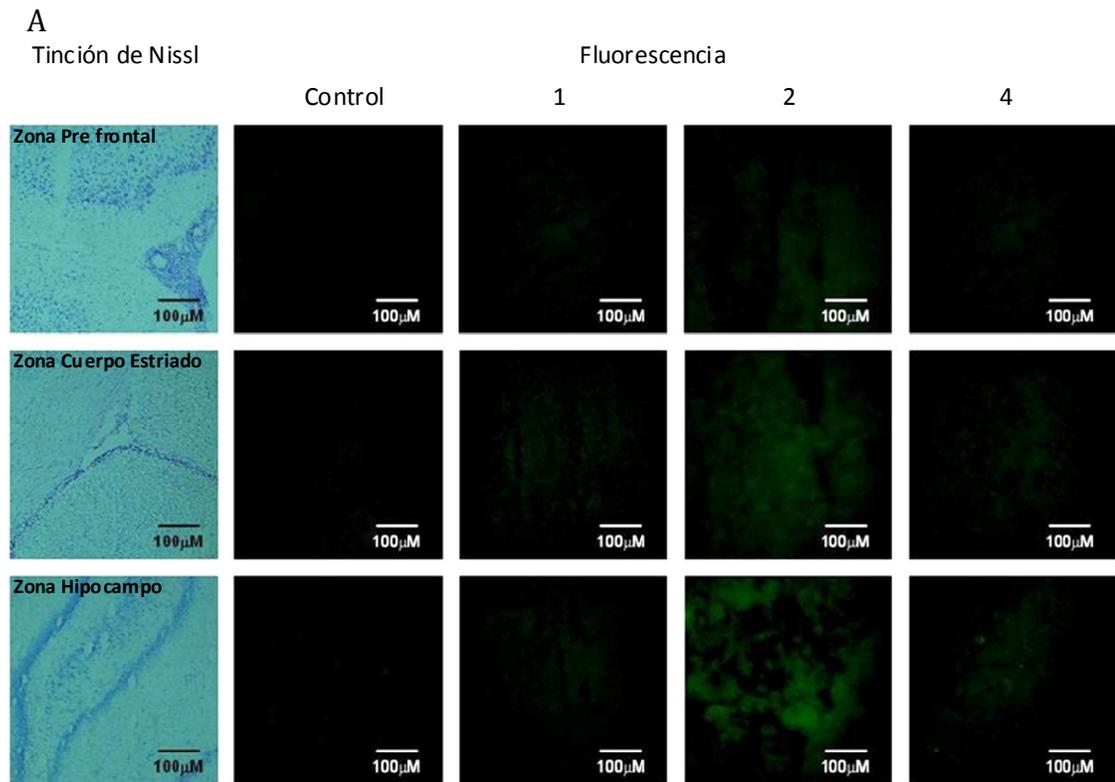


Figura 45. Distribución en el tiempo de NE-CLPFFD-carboxifluoresceína. (A) Imágenes de microscopía óptica (izquierda) y Microscopía de fluorescencia (centro y derecha) de cortes a distintos niveles del cerebro de forma secuencial desde la zona pre-frontal, cuerpo estriado e hipocampo. (B) Perfil en el tiempo de la señal de fluorescencia en las diferentes regiones del cerebro estudiadas. Las imágenes son representativas a un promedio de una serie de 3 cortes de la misma región, los datos graficados fueron obtenidos de la serie de cortes y el experimento fue repetido empleando 4 animales. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$; ns sigla de no significativo. El microscopio fue calibrado a la fluorescencia basal, la cual fue considerada como la fluorescencia de las muestras control.

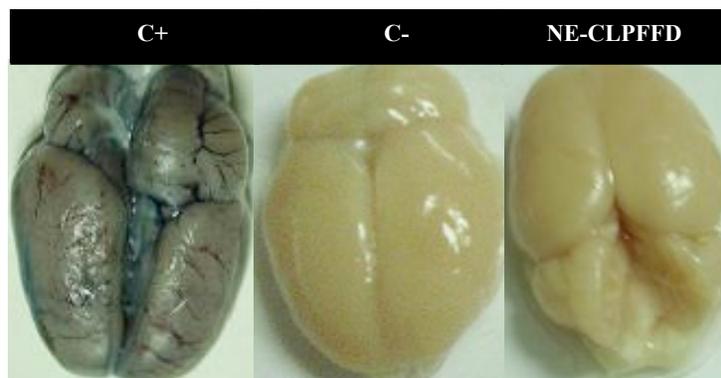


Figura 46. Análisis de la integridad de la BHE luego de tratar ratas con NE-CLPFFD. 5min previo a la administración de las NE-CLPFFD, se administró a cada rata por vía intravenosa Azul de Evans. Se esperaron 30 minutos y transcurrido ese tiempo, las ratas se sacrificaron y perfundieron, para luego remover el cerebro, y continuar con los análisis posteriores. En la imagen se muestran 3 cerebros: control positivo (izquierda, C+), una rata tratada con una solución hiperosmolar de manitol, para generar daño en la BHE, control negativo (centro, C-), ratas que fueron tratadas con una solución de citrato de sodio 1,2mM (solución en que se encuentran inmersas las NE) y cerebro de una rata tratada con NE-CLPFFD.

6.8.6 Estudio de distribución *in vivo* de NE-CK/CLPFFD.

La distribución de las NE-CK/CLPFFD^{*SFB-[18F]} se monitoreó por PET a diferentes tiempos luego de la administración intravenosa. La Figura 47 da cuenta de las imágenes obtenidas por PET luego de 120 minutos de la inyección, mostrando que existe una elevada concentración de radiactividad en torno a los riñones, hígado, bazo e intestino.^[158]

El bazo, uno de los órganos mas visibles en las imágenes de todos los animales, da cuenta de la captura de las NE por el SFM, resultado consistente con lo evaluado previamente *ex vivo* en este capítulo. Este estudio permitió también determinar que órganos como el pulmón muestran alto nivel de retención de radiactividad, lo que posiblemente pueda estar relacionado con una acumulación de NE-péptidos en el lecho vascular de este órgano. Notablemente en el mencionado lecho podrían acumularse especies de gran tamaño cercanos a 500nm, por lo cual posiblemente se deba a posibles interacciones de las NE interactuando con estructuras mayores como células o macromoléculas. Este

estudio también permite apreciar que vasos de gran tamaño son visibles en las diferentes imágenes, lo cual puede indicar una cierta unión de los compuestos marcados al endotelio vascular. Aquellas imágenes podrían representar también el volumen de sangre de los vasos producido por la permanencia de las NE en la sangre durante el intervalo de tiempo en que se realizó el experimento. Los vasos supra aórticos fueron visibles en las imágenes indicando la presencia del marcador en el endotelio vascular. Otros órganos incluyendo el cerebro presentaron bajos niveles de radiactividad, lo cual podría ser atribuido a la baja penetración de las nanopartículas al cerebro.^[158]

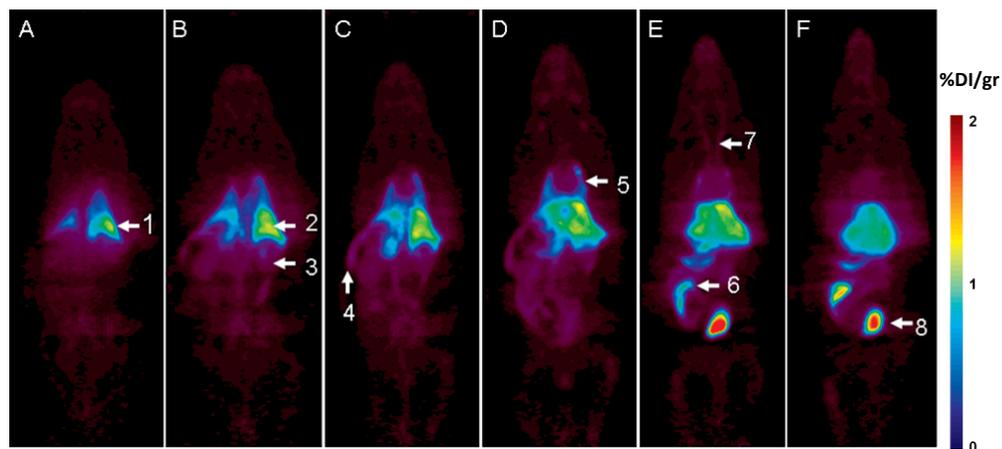


Figura 47. Imágenes representativas de escáner PET a los 120min transcurrida una inyección en ratas por vía intravenosa de una solución de NE-CK/CLPFFD*^{SFB}[^{18F}] (5,2nM). Se muestra una serie de imágenes tomográficas obtenidas a partir de secciones coronales. Las imágenes indican diferentes zonas, en A se muestra un animal desde el lado dorsal hasta F que es el lado ventral. Se pudo apreciar acumulación de fluorescencia, en hígado, el cual está presente en todas las secciones de imágenes, las flechas 1 y 2 da cuenta de la posición del hígado. Los pulmones pueden visualizarse en las imágenes A-E, indicando su posición con la flecha 5. Los riñones y el bazo pueden visualizarse en las imágenes B y C, indicados con las flechas 3 y 4 respectivamente. La vejiga se aprecia en la tomografías E y F, señaladas con la flecha 8 y la flecha 6 corresponde al intestino. Interesantemente, los vasos supra aórticos pueden ser visualizados en la imagen E, denotado como flecha 7.

Al analizar las curvas del gráfico de la Figura 48, las cuales muestran los valores de radiactividad obtenidos por PET en el tiempo, indican que la mayor concentración encontrada fue en la vejiga, lo cual da cuenta de una excreción urinaria del marcaje que

puede ser atribuido a las NE. En el intestino también se acumuló radiactividad de forma progresiva, compatible con una posible excreción biliar de los conjugados. A nivel del bazo, la evaluación de la radiactividad en el tiempo señala que los niveles fueron altos al comienzo del estudio y se incrementaron ligeramente con el tiempo. Esto da cuenta de un posible patrón compatible con la fagocitosis en éste órgano de las NE que circulan junto a componentes del SFM, posiblemente ya opsonizados. Al observar los datos se puede apreciar que existe también una fuerte correlación entre la rápida disminución de la marca desde la sangre con el incremento de la marca en la orina, reflejando la rapidez con la cual posiblemente se excretan estas NE, luego de esta rápida disminución inicial, la disminución es mas lenta, al igual que la señal en hígado, pulmones y riñones. En el estudio, los niveles en cerebro siempre se mantuvieron con una baja señal. Todos los niveles fueron disminuyendo con el tiempo lo cual da cuenta del *clearance* del compuesto desde el compartimento vascular.^[158]

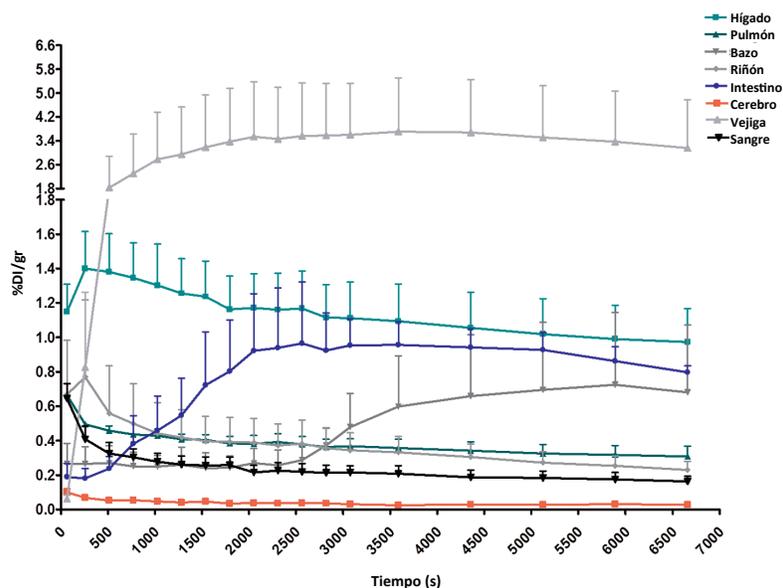


Figura 48. Gráfico de curvas del % de la dosis inyectada (DI) normalizado en gramos de tejido (%DI/gr) en el tiempo para los diferentes órganos analizados y evaluados por PET. Las barras representan la desviación estándar. La radiactividad acumulada en vejiga e intestinos, reflejan un mecanismo de excreción dual de NE.

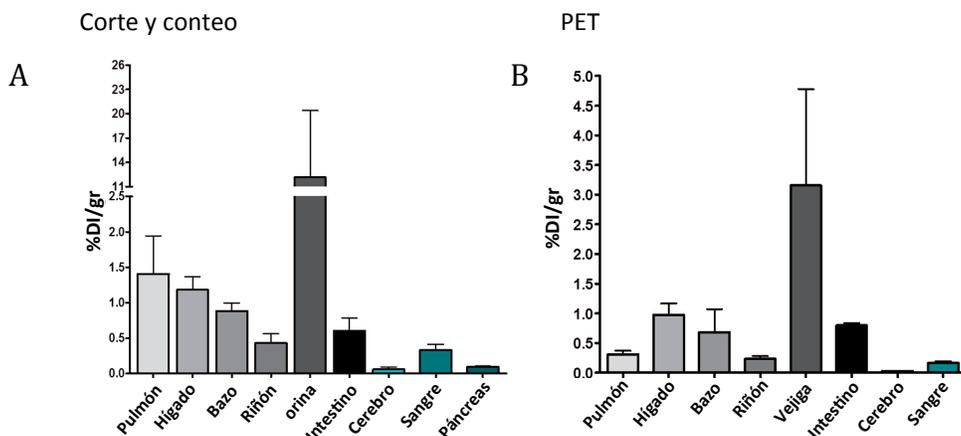


FIGURA 49. Grafico mostrando el % de dosis inyectada (DI) normalizado en gramos de tejido (%DI/gr) calculado a partir de corte y conteo (A) y también por escáner PET (B).

Con el fin de evaluar los niveles de radiactividad acumulada a los 120min obtenido por PET, determinados como porcentaje de DI por cada gramo de tejido por PET en un animal *in vivo*, y por la detección *ex vivo* del porcentaje de la DI por gramo obtenido por el corte de cada tejido y conteo (Figura 49). Nuevamente estos datos revelaron que la orina mantenía una gran concentración de los compuestos radiomarcados (considerar que se grafica % DI por gr de órgano, en el caso de la orina, de ésta). Por lo cual surgió la interrogante si esto correspondía a la excreción de NpO o a metabolitos radiactivos, producidos por un eventual intercambio superficial sobre las NpO de los péptidos radiactivos anclados por otras moléculas presentes en el organismo que son tioladas como péptidos y proteínas. Para resolver esta duda se inyectaron 2 animales recogiendo su orina luego de 1 hora post inyección. Estas muestras fueron centrifugadas y se evaluó el nivel de radiactividad del sobrenadante resultando en un 0,02% de radiactividad (Tabla 11) permaneciendo prácticamente el total de la radiactividad en el *pellet*, lo cual da una posible cuenta de que la señal corresponde a la NE-CK/CLPFFD*^{SFB}[¹⁸F] y no a un ligando desorbido de las nanopartículas ya que las NE sedimentan en el *pellet*. Pero este no es un resultado

absoluto, pues el riñón puede eliminar los metabolitos libres, lo cual llevó a realizar estudios *in vitro* de estabilidad en plasma. Estos estudios se llevaron a cabo a 37°C en que se incubándose las NE-CK/CLPFFD*^{SFB[18F]} con plasma de rata y tomándose muestras durante 3 horas. Estas se centrifugaron para separar posibles productos de degradación presentes en sobrenadantes del plasma luego de la centrifugación. Entonces se realizó un conteo de radioactividad del sobrenadante y del *pellet*, como se muestra en la Figura 50. La fracción de radioactividad detectada en el sobrenadante podría corresponder a metabolitos libres o a una fracción de NE-CK/CLPFFD*^{SFB[18F]} que no sedimentó luego de la centrifugación. Esto debido a que las NE en plasma podrían encontrarse en diferentes estados de agregación. En base a los resultados obtenidos puede suponerse que existe un cierto % de remoción del péptido marcado desde la superficie que podría ser excretados por vía renal. Por lo cual una fracción de la marca radioactiva observada en la orina podría corresponder al péptido libre que se desorbió de la superficie por intercambio con otras moléculas biológicas presentes en el medio.^[158]

Tabla 11. Radiactividad obtenida en sobrenadante y *pellet* de una muestra de orina recogida luego de 1h de la inyección de NE-CK/CLPFFD*^{SFB[18F]}, la cual se centrifugó a 16200RCF durante 10 minutos.

Animal	Sobrenadante de orina (Cpm)	Pellet de Orina (Cpm)	%Cpm sobrenadante de orina
1	33559	2774246,4	0,01195
2	47841,7	2822304,5	0,01667

Estos resultados dan cuenta de una posible remoción de NE por *clearance* renal. Y si bien se ha descrito que este proceso es eficiente para aquellas NE con diámetros menores a 5,5nm,^[174] también hay evidencia de NP de mayor tamaño que pueden ser eliminadas por riñón, como nanopartículas de diamante o nanotubos de carbono, lo cual da cuenta que la eliminación de NE como las estudiadas, de un diámetro promedio de 12nm también pueden

ser eliminadas por esta vía.^[175, 176] La marca detectada en el intestino da cuenta de una doble eliminación, no solo renal si no también por vía biliar. Existen evidencias que la vía hepática es también una ruta de excreción de NE, la cual ocurre por medio del paso de NE a través de los hepatocitos hacia la vía de producción biliar. En este sentido se ha descrito que los hepatocitos también pueden fagocitar las NE en conjunto a las células de Kupffer, indicando que la eliminación de NE se puede dar por más de una vía.^[177-179]

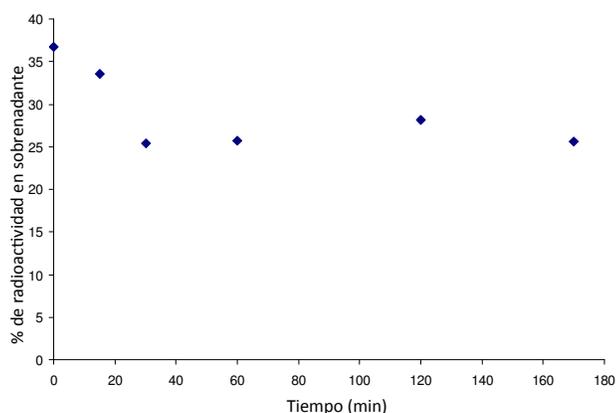


Figura 50. Proporción de radioactividad en sobrenadante (respecto de la suma total de la señal del *pellet* + sobrenadante) de una muestra de NE-CK/CLPFFD*^{SFB[18F]}. Muestra incubada con plasma a 37°C.

De lo observado en las Figuras 5.6 y 5.7, el hígado, el bazo y los pulmones, son los órganos con mayores niveles de radioactividad por gr de tejido. Niveles menores de radioactividad se encuentran en la vejiga, intestino, riñón y sangre siendo los órganos de menor acumulación de marcaje radioactivo el páncreas, y el cerebro. De los datos obtenidos se puede señalar que los conjugados se acumulan en hígado y bazo, como se ha observado en los experimentos *ex vivo*, (sección 5.1 y Figura 49) y como otros autores lo han indicado.^[63, 67, 68, 98, 169] Lo cual se ha relacionado a la carga superficial negativa expuesta por los conjugados que favorecen el reconocimiento de éstas por el SFM. Al ingresar las NE-CK/CLPFFD*^{SFB[18F]}, las NE-CLPFFD, y posiblemente alguna otra NE-péptido con características similares, se unirán rápidamente a proteínas del plasma que las

recubrirán dándole una nueva identidad, definida por las proteínas que estarán unidas en la superficie de las NpO conformando la CP. Esta CP puede influir en la biodistribución así como en el reconocimiento por la superficie celular entre las cuales se espera algunas sean opsoninas llevando a procesos de retención por el SFM que conducen a una acumulación en hígado y bazo consiguiendo una disminución significativa de los niveles de NE en circulación.^[50, 158]

Potenciar el uso de imagenología *in vivo* por PET, puede ayudar a comprender los fenómenos *in vivo* de las NpO así como otros NM de una forma bastante poco invasiva y muy sensible, permitiendo a su vez emplear menos animales necesarios que para los estudios *ex vivo*

6.8.7 Determinación de la capacidad de las NE-THRCLPFFD de cruzar la NHE.

Para este estudio se administró intraperitonealmente en diferentes ratas los conjugados NE-THR-CLPFFD, NE-CLPFFD, NE-THR y NE y transcurridos diferentes tiempos post inyección se sacrificaron los animales y se extrajeron los cerebros y otros órganos, como hígado, bazo, riñón, para así por AAN determinar los niveles de oro.^[180]

De los resultados analizados, la incorporación de THR a CLPFFD y la posterior conjugación a las NE conlleva a un cambio en el perfil de los niveles de oro en el cerebro, observándose un incremento en la concentración de oro al cabo de 1h de la administración de NE-THRCLPFFD, niveles que se mantuvieron en cerebro por al menos un intervalo de 1h (entre 1h y 2h post inyección, ver Figura 51). Este intervalo de tiempo podría ser adecuado para una posible terapia de irradiación con microondas o radiación laser para propósitos terapéuticos. Continuando con el análisis de los niveles de oro, se aprecia que al cabo de 4 horas post inyección de NE-THRCLPFFD, los niveles de oro disminuyeron desde aproximadamente 0,3µg en cerebro de rata a 0,11µg en cerebro de rata, y transcurrido 24

horas los niveles son aún menores, 0,07 μ g en cerebro de rata, ver Tabla 12.

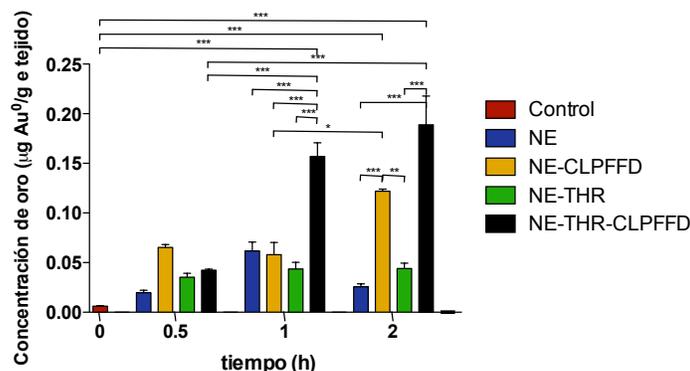


Figura 51. Perfil de contenido de oro en el tiempo determinado en cerebros de ratas tratadas con NE; NE-CLPFFD; NE-THR; NE-THRCLPFFD. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$.

Comparando la penetración al cerebro *in vivo* de NE-THR respecto de NE-THRCLPFFD, esta fue menor inclusive respecto de la observada para NE-CLPFFD, la razón de esto podría deberse a la disposición del péptido lanzadera THR sobre la superficie de la NE que al estar colocada en forma adyacente a la superficie de oro con lo que se impide el reconocimiento por el receptor de transferrina disminuyéndose la internalización al sistema nervioso central.^[34]

Por otra parte es importante mencionar que las NpO se depuran del cerebro por lo cual puede plantearse un mecanismo *clearance* de NE, en donde la disminución de los niveles de oro desde el cerebro se deba a que las NE pasan desde el parénquima cerebral hacia el LCR, exportándose así desde el SNC hacia la circulación tal como se describió en la sección 5.1.^[34, 50, 171, 172]

Tabla 12. Contenido de oro en cerebro, determinación del porcentaje de oro respecto de la dosis inyectada luego de una administración intraperitoneal en ratas.

Muestra	Tiempo	Contenido de oro		
	(h)	µg (SEM)	µg/g de tejido (SEM)	% DI
NE	0.5	0.038 (\pm 0.01)	0.02 (\pm 0.007)	0,009 (\pm 0,004)
	1	0.117 (\pm 0.05)	0.062 (\pm 0.03)	0,029 (\pm 0,013)
	2	0.049 (\pm 0.02)	0.026 (\pm 0.01)	0,021 (\pm 0,004)
	4	0.023 (\pm 0.002)	0.012 (\pm 0.001)	0,006 (\pm 0,001)
	24	0.028 (\pm 0.015)	0.015 (\pm 0.008)	0,007 (\pm 0,026)
NE-CLPFFD	0.5	0.124 (\pm 0.015)	0.065 (\pm 0.009)	0,031 (\pm 0,004)
	1	0.11 (\pm 0.07)	0.058 (\pm 0.037)	0,028 (\pm 0,017)
	2	0.232 (\pm 0.013)	0.122 (\pm 0.007)	0,058 (\pm 0,003)
	4	0.01 (\pm 0.002)	0.005 (\pm 0.01)	0,003 (\pm 0,001)
	24	0.033 (\pm 0.022)	0.017 (\pm 0.011)	0,008 (\pm 0,005)
NE-THR*	0.5	0.067 (\pm 0.023)	0.035 (\pm 0.012)	0,017 (\pm 0,006)
	1	0.083 (\pm 0.038)	0.044 (\pm 0.02)	0,021 (\pm 0,01)
	2	0.084 (\pm 0.031)	0.044 (\pm 0.02)	0,021 (\pm 0,008)
NE-THRCLPFFD	0.5	0.081 (\pm 0.006)	0.043 (\pm 0.003)	0,02 (\pm 0,004)
	1	0.298 (\pm 0.079)	0.157 (\pm 0.042)	0,075 (\pm 0,02)
	2	0.306 (\pm 0.21)	0.161 (\pm 0.11)	0,077 (\pm 0,05)
	4	0.113 (\pm 0.10)	0.059 (\pm 0.054)	0,028 (\pm 0,026)
	24	0.067 (\pm 0.02)	0.04 (\pm 0.01)	0,017 (\pm 0,005)

*NE-THR solo se estudió a los tiempos 0,5, 1 y 2 horas. Se empleó un total de 3 animales por tiempo y muestra

6.8.8 Localización de las NE-THRCLPFFD en cerebro.

Una de las interrogantes al estudiar si las NE llegan al cerebro es la de determinar si las mismas se encuentran en el parénquima cerebral o en el endotelio de la BHE. Con el fin de identificar la zona en donde se encuentran las NE-THRCLPFFD en el cerebro, los conjugados fueron marcados con carboxifluoresceína (NE-THRCLPFFD(cf)) y se inyectaron en ratas con el fin de localizar éstas en los tejidos por medio de microscopía de fluorescencia. Luego de 2 horas de la inyección, las ratas fueron sacrificadas, perfundidas intracardialmente con PBS, fijadas con paraformaldehído y sacrificadas para luego extraer

sus cerebros. Una vez extraídos los mismos fueron divididos en cortes de 20µm que fueron realizados en serie, separándose intercaladamente cortes para evaluar fluorescencia y cortes para hacer tinción de Nissl con el fin de identificar regiones en el cerebro. En la Figura A11 (anexo) se observa la fluorescencia en varias regiones del cerebro siendo la señal en aquellos cortes de cerebros de ratas tratadas, mayor a la fluorescencia basal detectada en ratas control, con lo cual esta fluorescencia puede atribuirse a las NpO. De esta manera puede corroborarse que las mismas atraviesan la BHE. Además por medio de estos estudios se descarta que pueda haber una acumulación en capilares pertenecientes a la BHE que puedan alterar los resultados posteriores de cuantificación.^[34] En conjunto a lo observado en la Figura A11(Anexo) la fluorescencia se observa difusa no ajustándose del todo a lo esperado para las nanopartículas marcadas (fluorescencia localizada en puntos específicos de la célula debido a procesos de endocitosis). No pudiendo descartarse que exista una posible separación del marcaje de cf desde la superficie de NE en las células endoteliales del cerebro y luego ser expulsado al tejido cerebral.^[34]

6.8.9 Distribución de las NE-THRCLPFFD.

La evaluación de los niveles de oro en otros órganos de las ratas tratadas con NE-THRCLPFFD relacionados con el SFM, como el hígado y el bazo, permite determinar el comportamiento de las mismas *in vivo*. Debido a eso también se cuantificaron los niveles de oro en hígado (Tabla 13). A las 0,5h post inyección se observó una acumulación del 38% de la DI en hígado y un 18% en bazo. Estos altos niveles se relacionan directamente con la carga negativa y el tamaño de la partícula, que favorecen a la captación por esos órganos, como da cuenta Levchenko y cols.^[181] Estos resultados concuerdan con los altos niveles observados en las ratas tratadas con NE-CLPFFD y NE que también presentan carga negativa.^[34, 50]

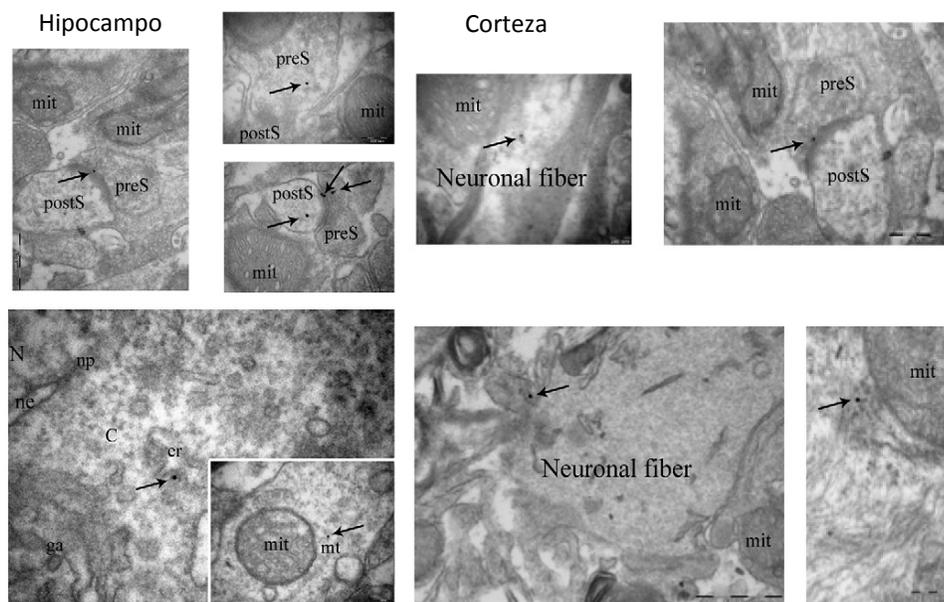


Figura 52. Micrografías obtenidas por TEM de cortes de cerebro en las regiones de hipocampo y corteza para la detección de NE-THRCLPFFD. preS indica el compartimento pre sináptico; postS da cuenta del compartimento post sináptico, N es el núcleo celular, ne demarca el recubrimiento nuclear, np corresponde a los poros nucleares, C es el citoplasma, ga el aparato de Golgi, er se refiere al retículo endoplásmico, mit a la mitocondria, mt corresponde los microtubulos y las flechas dan cuenta de las NE identificadas.

Tabla 13. Perfil de acumulación de oro en hígado y bazo después de la administración intraperitoneal de NE-THRCLPFFD a ratas.

Órgano	Tiempo (h)	% DI
Hígado	0,5	38,5
	1	17,3
	2	40,2
Bazo	0,5	18,0
	1	2,7
	2	3,5

6.8.10. Mejora en la llegada al cerebro de NpO-péptido pre-incubados con ApoE.

Según las proteínas identificadas, posiblemente sea ApoE una de las proteínas que contribuyan a aumentar la llegada al cerebro (objetivo 7). Así para demostrar esta nueva

hipótesis, se administraron intraperitonealmente a ratas AuNP-CLPFFD y AuNP-THRCLPFFD marcados con AlexaFluo 750 con y sin incubar con ApoE. Posteriormente, se determinó la fluorescencia *ex vivo* en cada caso y se cuantificó el oro en las muestras obtenidas (metodología detallada en el capítulo 3). En la Figura 53 se aprecian imágenes obtenidas *ex vivo* de los cerebros obtenidos a partir de las ratas según los diferentes tratamientos, a tiempos de 2 y 24 horas. En las fotografías pueden apreciarse cambios en los niveles de fluorescencia en los diferentes tratamientos con respecto a los controles en los cuales solamente se inyectó el vehículo de las nanopartículas (solución de citrato), la Figura 54 da cuenta de los niveles de fluorescencia.

Complementariamente a los resultados de fluorescencia, se determinaron los niveles de oro en el cerebro de ratas tratadas con NE-CLPFFD y NE-THRCLPFFD con y sin incubar con ApoE por AAN, los cuales se visualizan en la Figura 55.

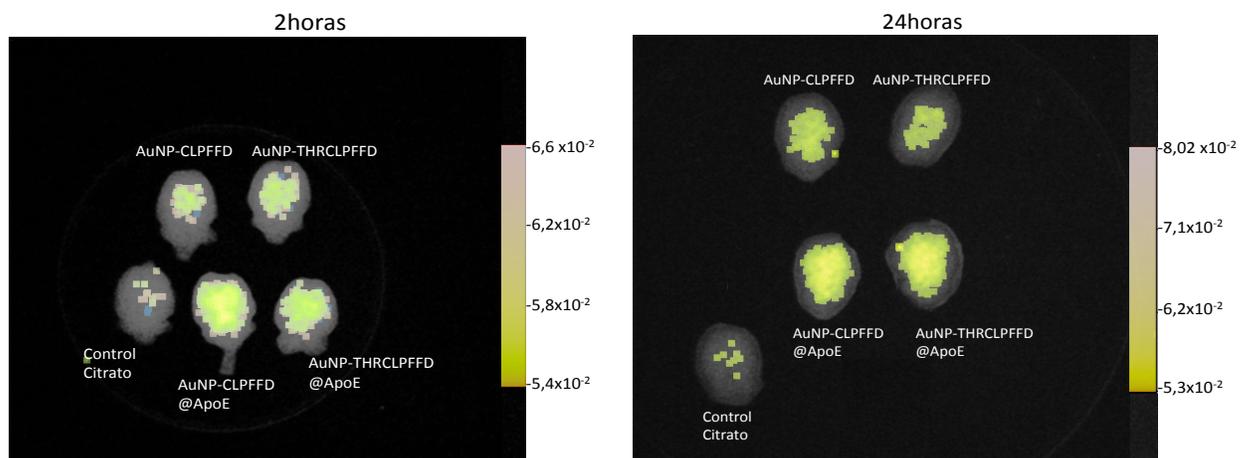


Figura 53. Imágenes de Fluorescencia de cerebros extraídos a 2 y 24 horas post inyección intraperitoneal de NE-CLPFFD; NE-THRCLPFFD y de NE-CLPFFD@ApoE; NE-THRCLPFFD@ApoE. Las muestras fueron marcadas con el fluoróforo comercial Alexa fluor 750.

Como se aprecia en los resultados en las Figuras 65 y 66 existe una diferencia al emplear ApoE sobre las NE estudiadas. Es posible indicar que el hecho de emplear ApoE contribuye a mejorar la llegada de NE al cerebro, indicando a su vez que es posible

modificar la CP. A partir de estos datos se puede indicar que es posible la capacidad de poder modular la distribución modificando la CP. Así la CP es relevante y debe considerarse al momento de diseñar nuevos fármacos basados en NM.

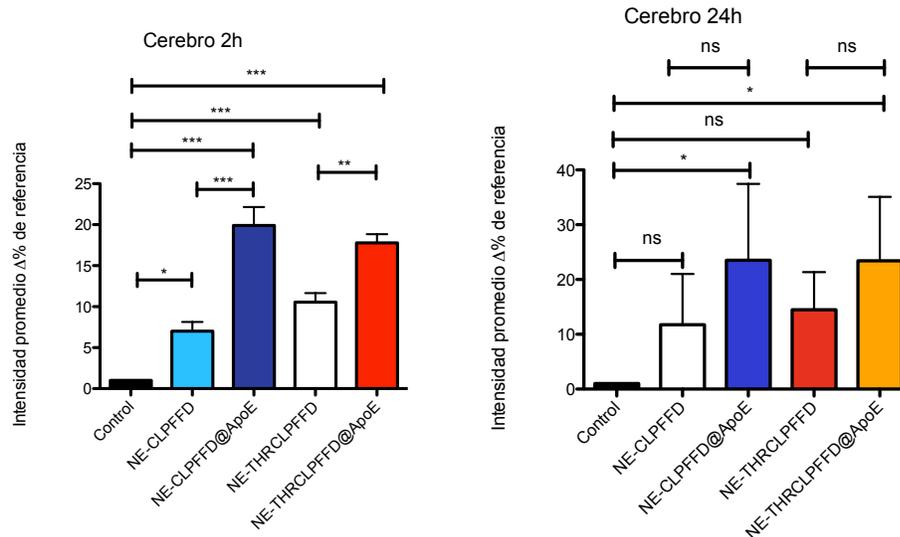


Figura 54. Determinación de fluorescencia *ex vivo*. Comparativa de fluorescencia entre cerebros de ratas con diferentes tratamientos y ratas control inyectadas con citrato. Intensidades obtenidas a las 2h y a las 24h luego de la administración (A y B, respectivamente). Numero de animales por experimento=3, se grafica la desviación estandar muestral, * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$.

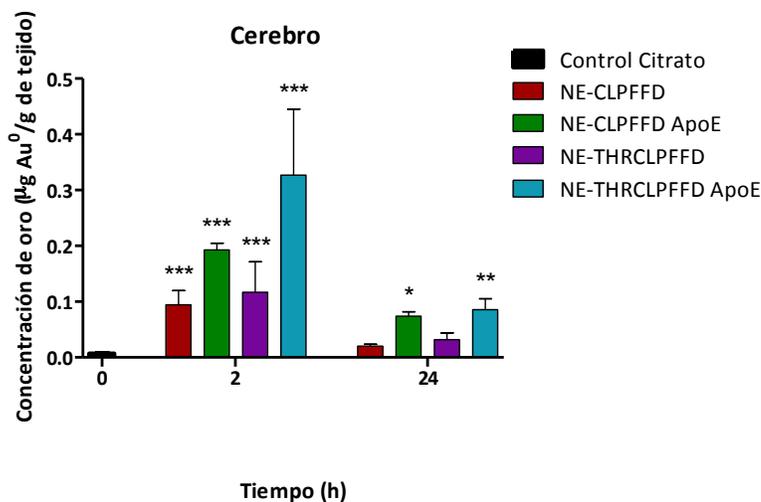


Figura 55. Determinación de oro por activación neutrónica *ex vivo*. Comparativa de niveles de oro entre cerebros de ratas con diferentes tratamientos. A 2h y 24h luego de la administración. Numero de animales por experimento=3, se grafica la desviación estandar muestral, * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$.

Al considerar este último punto, sobre los resultados obtenidos *in vivo* posiblemente sea una interacción diferencial con proteínas presentes en el plasma las responsables de facilitar el transporte a través de la BHE determinado en ciertas NpO, lo cual da cuenta que posiblemente la CP pueda estar implicada en nuevas vías de transporte a través de la BHE mediada por receptores que inducen transcitosis para alguna de estas proteínas, como por ejemplo receptores de LDL. Así estos últimos resultados permiten apoyar la hipótesis de que el cruce de la BHE por las NpO-péptido está mediado por la interacción con proteínas del plasma como se planteó inicialmente.^[34, 50, 158]

7. DISCUSIÓN GENERAL Y PERSPECTIVAS.

La obtención adecuada de NpO-péptidos conlleva a considerar la caracterización con gran relevancia, así, la síntesis de NpO, de péptidos y la posterior funcionalización se hace crucial. Así considerando los resultados obtenidos, se observa que los péptidos obtenidos presentan una pureza superior al 95% y según su masa corresponden al péptido deseado, dicha pureza resulta adecuada para su posterior utilización en aplicaciones biológicas. Las NpO obtenidas en paralelo se observaron por TEM, DLS y según su RSP poseen una dispersión de tamaño, carga y homogeneidad adecuada para los estudios posteriores. La posterior conjugación NpO-Péptidos fue demostrada bajo una serie de experimentos como XPS, AAA, DLS, TEM, UV-vis, pot-Z, resultados que confirman la obtención de estos últimos, los cuales presentan características aptas para los ensayos biológicos. De estos conjugados, a excepción de NE-THRCLPFFD presentan diámetros hidrodinámicos muy similares. Mientras que las NV-CLPFFD por su parte presentan un DLS asociado a su componente longitudinal. A su vez se aprecia que los valores de pot-Z para los conjugados de NE son muy similares y diferentes a los obtenidos por NV.

Para el caso de las NE, posiblemente el recubrimiento de péptidos se da por el grado de empaquetamiento que los péptidos puedan tener en la superficie. Aparentemente el espaciador PEG favorecería este empaquetamiento para la secuencia CLPFFD. Mientras que el constructo de THRCLPFFD al disponerse en forma de Y, disminuye el grado de funcionalización de la partícula. Por su parte los datos de XPS indicarían que la funcionalización es adecuada y el tipo de interacción entre la superficie del oro y los péptidos se debe posiblemente una reacción con el grupo Tiol.

Empleando estos conjugados, *in vitro* se aprecia que las NpO se mantienen estables luego de incubarlas en plasma observándose un desplazamiento del máximo de absorbancia dado por la RSP en los espectros UV-vis así como las imágenes TEM y los

datos obtenidos por DLS indicarían un efecto sobre la superficie de las NpO, no atribuible a agregaciones y posiblemente dados por la formación de la CP.

Las NE funcionalizadas son compuestos que presentan un comportamiento adecuado *in vitro* en células, no muestran toxicidad aparente en los ensayos de toxicidad llevados a cabo, dando cuenta que dichas NE no son tóxicas en el rango de concentraciones ensayadas. En el caso de las NV estudiadas, es posible disminuir la toxicidad, la cual está relacionada con la presencia de CTAB. El CTAB puede eliminarse luego funcionalizar las NV con péptidos sin que se pierda estabilidad coloidal.

Entre los ensayos *in vitro*, aquellos ensayos preliminares de incubación de NpO con proteínas como A β y albúmina, dan cuenta de efectos de las mismas, en interacciones, actividad y también en conformación, dando cuenta de cambios que pueden tener repercusión y que deben ser considerados junto a muchos otros cambios que pueden presentar las proteínas que interactúen con las NpO en el organismo. Se hace importante considerar dichos cambios que pueden tener repercusiones a largo plazo por el empleo de NpO.

Si bien las NpO estudiadas en el desarrollo de esta tesis, se obtuvieron sin observarse efectos no deseados a nivel celular no deben descartarse otros efectos a nivel molecular, como por ejemplo a nivel de la actividad de proteínas o enzimas, por cambios conformacionales que puedan tener repercusión en la actividad proteica.

Dado que la hipótesis plantea que modificaciones sobre la superficie de las NpO puede llevar a patrones diferenciales de la CP que afecten a la distribución, al analizar los resultados, es interesante destacar que al evaluar los geles bidimensionales, la primera observación es que la totalidad de los conjugados se unieron a las proteínas mayoritarias del plasma, obteniéndose un patrón de bandeo muy robusto entre los mismos, por lo cual posiblemente estas interacciones solo son inespecíficas y no se dan según las propiedades

de las NpO y claramente muchas de estas interacciones inespecíficas sobre las NE empleadas *in vivo*, dan cuenta de la explicación de la gran acumulación de las mismas en órganos como el hígado y el bazo, así proteínas como opsoninas (Ig, proteínas del complemento, fibrinógeno) se relacionan con la acumulación observada en órganos no deseados como hígado y bazo. Sin embargo, se debe considerar otras interacciones con proteínas como las ApoE, que interesantemente se detectan en las muestras de NE-THRCLPFFD, NV-CLPFFD y en una menor proporción en NE-CLPFFD, posiblemente sean candidatos para conseguir que estas NpO penetren la BHE por receptores como LRP1 favorecidas por la ApoE. Otra proteína interesante es la albúmina, si bien la cantidad de dicha proteína unida a los conjugados es muy baja, no lo es en aquellas NE-THRCLPFFD. Así, posiblemente la mayor penetración al cerebro observada en los estudios de biodistribución se deba también al recubrimiento con esta proteína.

Dados los estudios *in vivo* considerados en el objetivo 8, es destacable considerar como es posible lograr que las NE lleguen al cerebro al modificar su superficie. De los resultados expuestos, las modificaciones como CLPFFD, permiten mejoras respecto de las NE para llegar al cerebro. Asimismo, la incorporación de la secuencia THR, permite aumentar los niveles de NE en cerebro, dando cuenta de las posibilidades que las mismas presentan.

Los estudios con NE-CK/CLPFFD^{*SFB[¹⁸F]} permiten dar cuenta de las potencialidades de las NE para ser multifuncionalizadas, la capacidad que estas poseen para estudios *in vivo* en diagnóstico. En este contexto también es importante mencionar que las NE se pueden excretar tanto por vía renal como biliar. Sin embargo, hay que considerar que la señal del marcador radiactivo (SFB[¹⁸F]) que una cierta cantidad de marcaje puede ser removida desde la superficie de las NE, indicando que pueden existir cinéticas de intercambio de moléculas en la superficie de las NE

Al analizar los datos de las interacciones con proteínas del plasma del objetivo 7 es

posible dar cuenta de lo evaluado anteriormente *in vivo*, indicando los efectos de las interacciones sobre el destino que las NpO pueden tener en el organismo. Por medio de este tipo de estudios es posible predecir el destino de aquellas NpO con similitudes. Así, al realizar una comparación de los geles en 2D se pudo apreciar un bandeo similar de proteínas totales para aquellos conjugados que presentan la secuencia LPFFD, lo cual puede indicar que esta secuencia podría estar relacionada con determinadas interacciones que pueden predecir el destino *in vivo*.

En relación a la hipótesis, la última parte del desarrollo del objetivo 8 se centró en demostrar como es posible modificar la CP, y de esta manera afectar la distribución mejorando considerablemente los niveles de NpO en cerebro. De esta manera se demostró que pequeños cambios sobre la CP conducen a cambios importantes en la distribución de las NpO, lo cual abre las puertas a nuevos estudios que permitan modular la CP considerando nuevas aplicaciones farmacéuticas. Esto último también se complementa con el efecto que tiene ApoE de mejorar la llegada de las NpO al cerebro. Dado dichos resultados, el plantear la posibilidad de conseguir favorecer ciertas interacciones, y disminuir otras para mejorar la entrega de las NE al cerebro puede ser una estrategia interesante para mejorar la llegada de NM al cerebro.

Entre las diferentes consideraciones que se deben tener en cuenta al momento del diseño de una molécula con aplicación biomédica, es necesario conocer las limitaciones de las mismas. Una consideración es la limitación de concentración a la cual se puede trabajar con las NE. Existen concentraciones críticas a las cuales las NE podrían agregarse, por pérdida de estabilidad. Se debe considerar que la carga que de alguna forma mantiene a las NE estables en solución lo que puede llevar consigo a cambios no esperados *in vivo*, en donde las interacciones con biomoléculas se vuelven más complejas. En este sentido el recubrimiento de NpO con péptidos como CLPFFD, cf-CLPFFD, THR-CLPFFD, llevan

consigo cambios en las propiedades fisicoquímicas de las mismas como por ejemplo un cambios en los valores de pot-Z .^[61] Es sabido que las NE (funcionalizadas o sin funcionalizar) forman complejos con proteínas y moléculas biológicas, permaneciendo estables en medios biológicos como por ejemplo en plasma, pero esto lleva consigo a una nueva entidad que no se sabe cual será su comportamiento o su efecto sobre la biodistribución. En gran parte la CP es la responsable de la distribución, como por ejemplo en el caso de las opsoninas que llevan a una acumulación en hígado y bazo y eso puede ser atribuido al recubrimiento con las mencionadas opsoninas que reconocen cargas negativas, como es el caso de las NE. Asimismo, otras proteínas que puedan interactuar con NE pueden favorecer la entrega de estas a otros órganos como es el caso de las interacciones con especies anfipáticas como las apolipoproteínas, como por ejemplo ApoB y ApoE presentes en la sangre, mediando así el reconocimiento de receptores de lipoproteínas, lo cual puede favorecer mecanismos de transcitosis a través de barreras como la BHE. Considerando que CLPFFD es anfipático, puede favorecer este tipo de interacciones que pueden llevar a mejorar el paso de la BHE respecto de las NE. Otras proteínas que pueden ser reconocidas por receptores que median la transcitosis mediada por receptores son la transferrina, la insulina, y también otras proteínas como albúmina que pueden inducir otro tipo de transcitosis. Saber que las NE interactúan con proteínas del plasma abre muchas posibilidades para comprender la distribución de las mismas.^[109, 182]

Si bien CLPFFD se menciona que puede ser reconocido por el receptor RAGE, tal vez esté involucrado en permitir que NE-CLPFFD cruce la BHE en mayor proporción respecto a las NE,^[82-85] lo cual debe ser probado en futuros trabajos. Sin embargo, dados los resultados obtenidos, es más probable que sea la interacción con proteínas del plasma las que contribuyan en gran medida a cruzar la BHE.

Otra consideración no menor, es el efecto de eflujo de la BHE, dado principalmente por

el transporte relacionado al transportador de glicoproteína-P (P-gp), el cual está constantemente previniendo la acumulación significativa de sustancias ajenas al cerebro. Por lo cual es valido considerar para estudios posteriores, el emplear estrategias quimioterapéuticas para prevenir el reconocimiento de las NpO por P-gp, posiblemente los péptidos evaluados en estos estudios actúen evitando el efecto eflujo que si puede presentar la NE sin funcionalizar. O quizá dicho eflujo sea inducido y esa sea una de las razones por la cual no hubo mayor acumulación en cerebro. A futuro será necesario evaluar este tipo de interacciones y proponer estrategias como emplear polisorbato 80, que permitan evitar estos posibles eflujos no deseados.^[124, 183-186]

Si bien los resultados expuestos dan un indicio de que una pequeña cantidad de NpO a nivel del cerebro, enfermedades como la EA en estadios mas avanzados presentan comportamientos inflamatorios, lo que lleva a una vascularización del cerebro algo mas permisiva, contexto en donde posiblemente exista un mayor ingreso de NpO al cerebro lo que posiblemente permitirá un mejor acceso para una posible terapia empleando NM.^[187]

Se espera a futuro poder predecir el comportamiento *in vivo* que puedan tener los diferentes NM, en este caso NpO con diferentes moléculas en superficie y así según el tipo de interacción con las proteínas plasmáticas explicar su farmacocinética. Asimismo, se propone como una posibilidad para nuevos estudios desarrollar estrategias para controlar estas interacciones según el blanco terapéutico deseado. Para lo cual es necesario plantear la posibilidad de favorecer ciertas interacciones, y disminuir otras para mejorar la entrega de las nanopartículas selectivamente hacia el blanco terapéutico deseado. A estos estudios resultarán complementarios otros estudios biofísicos que se lleven a cabo con modelos de membrana y paralelamente con la evaluación de la interacción con la CP lo que paralelamente contribuirá a explicar el comportamiento de las NpO *in vivo*.

A partir de los datos obtenidos la interacción inespecífica con ApoE puede mejorar la penetración al cerebro y posiblemente otras proteínas como albúmina, estén implicadas en otras vías para mejorar su llegada al cerebro. Por lo mismo resultará interesante evaluar el comportamiento de las NpO incubada con esta u otras proteínas *in vivo*, para determinar otras interacciones que pueden favorecer la llegada al cerebro.

A su vez resultará interesante analizar si existe alguna estrategia que permita disminuir las interacciones que pueden traer consigo repercusiones negativas, como por ejemplo el recubrimiento con PEG de alto peso molecular.

8. CONCLUSIONES GENERALES.

Los péptidos obtenidos presentan una pureza superior al 95% tal como se determinó por HPLC confirmándose su identidad por Espectrometría de Masas MALDI-TOF/MS y ES-MS/HPLC

-Se obtuvieron NE y NV con un tamaño y relación de aspecto deseados, como se aprecia al evaluar la señal dada por la resonancia de plasmón superficial, las imágenes TEM y los datos de DLS.

-Las NE y NV funcionalizadas con los péptidos son estables en diferentes medios.

-Para todas las NpO estudiadas se forma la corona de proteínas que contribuye a estabilizar las NpO.

-Para las NE no se observan efectos sobre la viabilidad celular a las dosis ensayadas.

-La funcionalización de NV con péptidos aumenta la estabilidad de las mismas reduciendo los niveles de CTAB y los efectos sobre la viabilidad celular.

-Se observan pocos efectos sobre la estructura secundaria de la Albumina en presencia de NpO-péptido, Sin embargo, el cambio en la elipticidad observado en la albúmina en

presencia de NE y NV podría atribuirse a la quimisorción de la Cys34 presente en la Albumina sobre la superficie de las NpO. Por lo cual el recubrimiento con péptidos podría estar disminuyendo los efectos sobre la estructura de las proteínas.

-Existe una alta acumulación en hígado y bazo, lo cual se debe al Sistema fagocítico mononuclear debido al recubrimiento con proteínas como Inmunoglobulinas y proteínas del complemento.

-Las NE-CLPFFD llegan al cerebro, lo que puede deberse a receptores que median la transcitosis a través de la BHE como el receptor RAGE o al recubrimiento con proteínas como ApoE, Albúmina, transferrina que favorecen la transcitosis a través de la BHE.

-La incorporación de la secuencia THR a LPFFD permite una mayor permanencia de las NE en cerebro lo cual puede representar una ventaja para una aplicación terapéutica.

-Es posible mejorar la llegada de NE al cerebro luego de incubar estas con ApoE. Por lo que se demostró que es posible modificar dicha corona de proteínas y así modificar la distribución de NpO

-En relación a lo determinado en los estudios llevados a cabo en el desarrollo de esta tesis, el recubrimiento de las NpO con péptidos, conduce a cambios que permiten una mayor estabilidad, disminuir potenciales efectos citotóxicos y mejorar la biocompatibilización de los mismos.

-La composición de la corona de proteínas está ligada al comportamiento de las NpO *in vivo*, promoviendo la acumulación en hígado, bazo y otros órganos como cerebro, lo que permitiría el diseño de nuevas estrategias para modular su distribución.

-La modificación de la corona de NpO con proteínas como ApoE conduce a un aumento de la llegada de las NpO al cerebro lo que representa una herramienta para posibles aplicaciones farmacéuticas.

9. BIBLIOGRAFÍA.

1. Blynskaya, E., et al., *Perspectives of the development of pharmaceutical nanotechnology*. Russian Journal of General Chemistry, 2012. **82**(3): p. 519-526.
2. Fischer, H.C. et al., *Nanotoxicity: the growing need for in vivo study*. Curr Opin Biotechnol, 2007. **18**(6): p. 565-571.
3. Ghosh, P., et al., *Gold nanoparticles in delivery applications*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2008. **60**(11): p. 1307-1315.
4. Nel, A.E., et al., *Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface*. Nat Mater, 2009. **8**(7): p. 543-557.
5. Hamad-Schifferli, K., et al., *Remote electronic control of DNA hybridization through inductive coupling to an attached metal nanocrystal antenna* Nature, 2002. **415**: p. 152-155.
6. Kogan, M.J., et al., *Nanoparticle-mediated local and remote manipulation of protein aggregation*. Nano Lett, 2006. **6**(1): p. 110-115.
7. Zharov, V.P., et al., *Synergistic enhancement of selective nanophotothermolysis with gold nanoclusters: potential for cancer therapy*. Lasers Surg Med, 2005. **37**(3): p. 219-226.
8. Zharov, V.P., et al., *Photothermal nanotherapeutics and nanodiagnostics for selective killing of bacteria targeted with gold nanoparticles*. Biophys J, 2006. **90**(2): p. 619-627.
9. Kogan, M.J., et al., *Peptides and metallic nanoparticles for biomedical applications*. Nanomed, 2007. **2**(3): p. 287-306.
10. Weissleder, R., *A clearer vision for in vivo imaging*. Nat Biotechnol, 2001. **19**(4): p. 316-317.
11. Eustis, S. and M.A. el-Sayed, *Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes*. Chem Soc Rev, 2006. **35**(3): p. 209-217.
12. Turkevich, J., et al., *Nucleation and growth process in synthesis of colloidal gold*. Discuss Faraday Society, 1951. **11**: p. 55-75.
13. Levy, R., et al., *Rational and combinatorial design of peptide capping ligands for gold nanoparticles*. J Am Chem Soc, 2004. **126**(32): p. 10076-10084.
14. Olmedo Alegria, I.O., *Obtención de Conjugados Péptidos Nanopartículas Metálicas con Potenciales Aplicaciones Biomédicas*, in *Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas*, 2007, Universidad de Chile: Santiago, Chile.
15. Kooij, E.S., et al., *Formation and optical characterisation of colloidal gold monolayers*. Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 2003. **222** p. 103-111.
16. Medina Consuegra, G.E., *Estudios preliminares de permeabilidad, estabilidad y toxicidad de nanopartículas metálicas conjugadas a péptidos*, in *Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas*, 2006, Universidad de Chile: Santiago, Chile. .
17. Yu, Y.Y., et al., *Gold nanorods: Electrochemical synthesis and optical properties*. Journal of Physical Chemistry B, 1997. **101**(34): p. 6661-6664.
18. Martin, C.R., *Membrane-based synthesis of nanomaterials*. Chemistry of Materials, 1996. **8**(8): p. 1739-1746.
19. Hulteen, J.C. and C.R. Martin, *A general template-based method for the preparation of nanomaterials*. Journal of Materials Chemistry, 1997. **7**(7): p. 1075-1087.

20. Jana, N.R., et al., *Seed-mediated growth approach for shape-controlled synthesis of spheroidal and rod-like gold nanoparticles using a surfactant template*. *Advanced Materials*, 2001. **13**(18): p. 1389-1393.
21. Murphy, C.J. and N.R. Jana, *Controlling the aspect ratio of inorganic nanorods and nanowires*. *Advanced Materials*, 2002. **14**(1): p. 80-82.
22. Murphy, C.J., et al., *An improved synthesis of high-aspect-ratio gold nanorods*. *Advanced Materials*, 2003. **15**(5): p. 414-416
23. MacQueen, A., *Factors that Affect the Synthesis of Gold Nanorods*. The 2007 NNIN REU Research Accomplishments, 2007: p. 32-33.
24. Pileni, M.P. and X.C. Jiang, *Gold nanorods: Influence of various parameters as seeds, solvent, surfactant on shape control*. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*, 2007. **295**(1-3): p. 228-232.
25. Korgel, B.A. and D.K. Smith, *The importance of the CTAB surfactant on the colloidal seed-mediated synthesis of gold nanorods*. *Langmuir*, 2008. **24**(3): p. 644-649.
26. Rana, S., et al., *Monolayer coated gold nanoparticles for delivery applications*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2012. **64**(2): p. 200-216.
27. Mandal, D., et al., *Cellular uptake of gold nanoparticles directly cross-linked with carrier peptides by osteosarcoma cells*. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, 2009. **20**(1): p. 347-350.
28. Rotello, V.M., et al., *Gold nanoparticles in delivery applications*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008. **60**(11): p. 1307-1315.
29. Adura, C., et al., *Stable conjugates of peptides with gold nanorods for biomedical applications with reduced effects on cell viability*. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2013. **5**(10): p. 4076-4085.
30. 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. 822-826.
31. Lin, S.-Y., et al., *Two-Step Functionalization of Neutral and Positively Charged Thiols onto Citrate-Stabilized Au Nanoparticles*. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2004. **108**(7): p. 2134-2139.
32. Ulman, A., *Formation and structure of self-assembled monolayers*. *Chemical Reviews*, 1996. **96**(4): p. 1533-1554.
33. Araya, E., et al., *Gold Nanoparticles and Microwave Irradiation Inhibit Beta-Amyloid Amyloidogenesis*. *Nanoscale Research Letters*, 2008. **3**(11): p. 435-443.
34. 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.
35. de la Fuente, J.M., et al., *Nanoparticle targeting at cells*. *Langmuir*, 2006. **22**(7): p. 3286-3293.
36. Huo, Q., et al., *Photothermal ablation of amyloid aggregates by gold nanoparticles*. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 2008. **63**(2): p. 200-208.
37. 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.
38. Murphy, C.J., et al., *The Many Faces of Gold Nanorods*. *Journal of Physical Chemistry Letters*, 2010. **1**(19): p. 2867-2875.

39. Adura, C., *Obtención de nanoesferas y nanovarillas de oro con péptidos para potenciales bioaplicaciones*, in *Facultad de Química y Biología*, 2011, Universidad de Santiago de Chile: Santiago.
40. Connor, E.E., et al., *Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity*. *Small*, 2005. **1**(3): p. 325-327.
41. Hafner, J.H. and H.W. Liao, *Gold nanorod bioconjugates*. *Chemistry of Materials*, 2005. **17**(18): p. 4636-4641.
42. Niidome, Y., et al., *Modification of gold nanorods using phosphatidylcholine to reduce cytotoxicity*. *Langmuir*, 2006. **22**(1): p. 2-5.
43. Murphy, C.J. and A. Gole, *Polyelectrolyte-coated gold nanorods: Synthesis, characterization and immobilization*. *Chemistry of Materials*, 2005. **17**(6): p. 1325-1330.
44. Chan, W.C.W., et al., *Assessing the effect of surface chemistry on gold nanorod uptake, toxicity, and gene expression in mammalian cells*. *Small*, 2008. **4**(1): p. 153-159.
45. Lee, K.-S. and M.A. El-Sayed, *Gold and Silver Nanoparticles in Sensing and Imaging: Sensitivity of Plasmon Response to Size, Shape, and Metal Composition*. *J. Phys. Chem. B.*, 2006. **110**: p. 19220-19225.
46. Thaxton, C.S., et al., *Gold nanoparticle probes for the detection of nucleic acid targets*. *Clin Chim Acta*, 2006. **363**(1-2): p. 120-126.
47. Alkilany, A.M., et al., *Gold nanorods: Their potential for photothermal therapeutics and drug delivery, tempered by the complexity of their biological interactions*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2012. **64**(2): p. 190-199.
48. Bhattacharya, S. and A. Srivastava, *Synthesis of gold nanoparticles stabilised by metal-chelator and the controlled formation of close-packed aggregates by them*. *Proc. Indian Acad. Sci. (Chem. Sci.)*, , 2003. **115**(5 & 6): p. 613-619.
49. Pecora, R., *Dynamic Light Scattering Measurement of Nanometer Particles in Liquids*. *Journal of Nanoparticle Research*, 2000. **2**(2): p. 123-131.
50. 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.
51. Li, S.D. and L. Huang, *Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles*. *Mol Pharm*, 2008. **5**(4): p. 496-504.
52. Funke, S.A., et al., *Single particle detection of Aβ aggregates associated with Alzheimer's disease*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. **364**(4): p. 902-907.
53. Selkoe, D.J., *Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy*. *Physiol Rev*, 2001. **81**(2): p. 741-766.
54. Soto, C., *Desentrañando los misterios del mal de Alzheimer: una enfermedad relacionada a alteraciones en la conformación de proteínas*. *Ciencia al Día*, 1999. **1**(2): p. 1-13.
55. Cruz Gatell, M., et al., *Diseño, síntesis y evaluación de inhibidores de la proteína beta-amiloide : desarrollo de un modelo de fibrilogénesis*2003. XII, 305 p.
56. Alzheimer's, A., *2012 Alzheimer's disease facts and figures*. *Alzheimers Dement*, 2012. **8**(2): p. 131-168.
57. Hoozemans, J.J., et al., *Always around, never the same: pathways of amyloid beta induced neurodegeneration throughout the pathogenic cascade of Alzheimer's disease*. *Curr Med Chem*, 2006. **13**(22): p. 2599-2605.

58. Behrens, P.M. and E.F. Vergara, *One hundred years of Alzheimer's disease: Immunotherapy a hope?*. Rev Med Chil, 2007. **135**(1): p. 103-110.
59. Menéndez, S.G., et al., *Péptido Beta Amiloide, Proteína Tau, y enfermedad de Alzheimer*. Rev Cubana Invest Biomed 2002. **21**(4): p. 253-261.
60. Adessi, C., et al., *Pharmacological profiles of peptide drug candidates for the treatment of Alzheimer's disease*. J Biol Chem, 2003. **278**(16): p. 13905-13911.
61. 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. 1154-1163.
62. Bellino, S., et al., *Relationships of age at onset with clinical features and cognitive functions in a sample of schizophrenia patients*. J Clin Psychiatry, 2004. **65**(7): p. 908-914.
63. De Jong, W.H., et al., *Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration*. Biomaterials, 2008. **29**(12): p. 1912-1919.
64. Motl, S., et al., *Pharmacokinetic considerations in the treatment of CNS tumours*. Clin Pharmacokinet, 2006. **45**(9): p. 871-903.
65. Wang, L., et al., *Characterization of gold nanorods in vivo by integrated analytical techniques: their uptake, retention, and chemical forms*. Anal Bioanal Chem, 2010. **396**(3): p. 1105-1114.
66. Tirelli, N., *(Bio)Responsive nanoparticles*. Curr Opin Colloid Interface Sci, 2006. **11**: p. 210-216.
67. Sonavane, G., et al., *Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous administration: effect of particle size*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2008. **66**(2): p. 274-280.
68. Lasagna-Reeves, C., et al., *Bioaccumulation and toxicity of gold nanoparticles after repeated administration in mice*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **393**(4): p. 649-655.
69. Sadauskas, E., et al., *Kupffer cells are central in the removal of nanoparticles from the organism*. Part Fibre Toxicol, 2007. **4**: p. 10.
70. Fischer, H., et al., *Permeation of permanently positive charged molecules through artificial membranes. Influence of physico-chemical properties*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2007. **31**(1): p. 32-42.
71. Lockman, P.R., et al., *Nanoparticle technology for drug delivery across the blood-brain barrier*. Drug Dev Ind Pharm, 2002. **28**(1): p. 1-13.
72. Calvo, P., et al., *Long-circulating PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles as new drug carrier for brain delivery*. Pharm Res, 2001. **18**(8): p. 1157-1166.
73. Devalapally, H., A. Chakilam, and M.M. Amiji, *Role of nanotechnology in pharmaceutical product development*. J Pharm Sci, 2007. **96**(10): p. 2547-2565.
74. Gonzalez, I., et al., *Effects of beta-amyloid peptide on the density of M2 muscarinic acetylcholine receptor protein in the hippocampus of the rat: relationship with GABA-, calcium-binding protein and somatostatin-containing cells*. Neuropathol Appl Neurobiol, 2008. **34**(5): p. 506-522.
75. Niidome, T., et al., *PEG-modified gold nanorods with a stealth character for in vivo applications*. J Control Release, 2006. **114**(3): p. 343-347.
76. Kreuter, J., *Application of nanoparticles for the delivery of drugs to the brain* International Congress Series., 2005. **1277** p. 85-94.
77. Garcia-Garcia, E., et al., *Colloidal carriers and blood-brain barrier (BBB) translocation: a way to deliver drugs to the brain?* Int J Pharm, 2005. **298**(2): p. 274-292.

78. Banerjee, S. and M.A. Bhat, *Neuron-glia interactions in blood-brain barrier formation*. Annu Rev Neurosci, 2007. **30**: p. 235-258.
79. Cecchelli, R., et al., *Modelling of the blood-brain barrier in drug discovery and development*. Nat Rev Drug Discov, 2007. **6**(8): p. 650-661.
80. Fagerholm, U., *The highly permeable blood-brain barrier: an evaluation of current opinions about brain uptake capacity*. Drug Discov Today, 2007. **12**(23-24): p. 1076-1082.
81. Costantino, L., et al., *Peptide-derivatized biodegradable nanoparticles able to cross the blood-brain barrier*. J Control Release, 2005. **108**(1): p. 84-96.
82. Deane, R., et al., *RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain*. Nat Med, 2003. **9**(7): p. 907-913.
83. Deane, R., et al., *RAGE (yin) versus LRP (yang) balance regulates alzheimer amyloid beta-peptide clearance through transport across the blood-brain barrier*. Stroke, 2004. **35**(11 Suppl 1): p. 2628-2631.
84. Deane, R., et al., *Clearance of amyloid-beta peptide across the blood-brain barrier: implication for therapies in Alzheimer's disease*. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2009. **8**(1): p. 16-30.
85. Weiss, N., et al., *The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1788**(4): p. 842-857.
86. Pardridge, W.M., *Blood-brain barrier delivery*. Drug Discov Today, 2007. **12**(1-2): p. 54-61.
87. Giljohann, D.A., et al., *Oligonucleotide loading determines cellular uptake of DNA-modified gold nanoparticles*. Nano Lett, 2007. **7**(12): p. 3818-3821.
88. Pardridge, W.M., J. Eisenberg, and J. Yang, *Human blood-brain barrier transferrin receptor*. Metabolism, 1987. **36**(9): p. 892-895.
89. Pardridge, W.M., et al., *Vector-mediated delivery of a polyamide ("peptide") nucleic acid analogue through the blood-brain barrier in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(12): p. 5592-5596.
90. Shi, N., et al., *Receptor-mediated gene targeting to tissues in vivo following intravenous administration of pegylated immunoliposomes*. Pharm Res, 2001. **18**(8): p. 1091-1095.
91. Zhang, Y.F., et al., *Absence of toxicity of chronic weekly intravenous gene therapy with pegylated immunoliposomes*. Pharm Res, 2003. **20**(11): p. 1779-1785.
92. Lee, J.H., et al., *Receptor mediated uptake of peptides that bind the human transferrin receptor*. European Journal of Biochemistry, 2001. **268**(7): p. 2004-2012.
93. Ponka, P. and C.N. Lok, *The transferrin receptor: role in health and disease*. Int J Biochem Cell Biol, 1999. **31**(10): p. 1111-1137.
94. Lo, S.L. and S. Wang, *An endosomolytic Tat peptide produced by incorporation of histidine and cysteine residues as a nonviral vector for DNA transfection*. Biomaterials, 2008. **29**(15): p. 2408-2414.
95. Yen, H.J., et al., *Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes*. Small, 2009. **5**(13): p. 1553-1561.
96. Balasubramanian, S.K., et al., *Biodistribution of gold nanoparticles and gene expression changes in the liver and spleen after intravenous administration in rats*. Biomaterials, 2010. **31**(8): p. 2034-2042.
97. Tsoli, M., et al., *Cellular uptake and toxicity of Au55 clusters*. Small, 2005. **1**(8-9): p. 841-844.

98. Semmler-Behnke, M., et al., *Biodistribution of 1.4- and 18-nm gold particles in rats*. *Small*, 2008. **4**(12): p. 2108-2111.
99. Aillon, K.L., et al., *Effects of nanomaterial physicochemical properties on in vivo toxicity*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009. **61**(6): p. 457-466.
100. Alkilany, A.M., et al., *Cellular uptake and cytotoxicity of gold nanorods: molecular origin of cytotoxicity and surface effects*. *Small*, 2009. **5**(6): p. 701-708.
101. Wang, Y., et al., *Comparison of anionic and lewis acid stabilized N-heterocyclic oxoboranes: their facile synthesis from a borinic acid*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2011. **50**(12): p. 2816-2819.
102. Devadasu, et al., *Can Controversial Nanotechnology Promise Drug Delivery?* *Chemical Reviews*, 2012. **113**(3): p. 1686-1735.
103. Kommareddy, S. and M. Amiji, *Biodistribution and pharmacokinetic analysis of long-circulating thiolated gelatin nanoparticles following systemic administration in breast cancer-bearing mice*. *J Pharm Sci*, 2007. **96**(2): p. 397-407.
104. Fei, L. and S. Perrett, *Effect of nanoparticles on protein folding and fibrillogenesis*. *Int J Mol Sci*, 2009. **10**(2): p. 646-655.
105. Deng, Z.J., et al., *Differential plasma protein binding to metal oxide nanoparticles*. *Nanotechnology*, 2009. **20**(45): p. 455101.
106. Boado, R.J., et al., *Genetic engineering, expression, and activity of a fusion protein of a human neurotrophin and a molecular Trojan horse for delivery across the human blood-brain barrier*. *Biotechnol Bioeng*, 2007. **97**(6): p. 1376-1386.
107. Greenwald, R.B., et al., *A new aliphatic amino prodrug system for the delivery of small molecules and proteins utilizing novel PEG derivatives*. *J Med Chem*, 2004. **47**(3): p. 726-734.
108. Saptarshi, S.R., et al., *Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle*. *J Nanobiotechnology*, 2013. **11**: p. 26.
109. Lacerda, S.H., et al., *Interaction of gold nanoparticles with common human blood proteins*. *ACS Nano*, 2010. **4**(1): p. 365-379.
110. Klein, J., *Probing the interactions of proteins and nanoparticles*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(7): p. 2029-2030.
111. Khan, M.S., et al., *Gold nanoparticles: A paradigm shift in biomedical applications*. *Adv Colloid Interface Sci*, 2013. **200**: p. 44-58.
112. Chanda, N., et al., *Radioactive gold nanoparticles in cancer therapy: therapeutic efficacy studies of GA-198AuNP nanoconstruct in prostate tumor-bearing mice*. *Nanomedicine*, 2010. **6**(2): p. 201-209.
113. Dobrovolskaia, et al., *Evaluation of nanoparticle immunotoxicity*. *Nat Nanotechnol*, 2009. **4**(7): p. 411-414.
114. Aggarwal, P., et al., *Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2009. **61**(6): p. 428-437.
115. Cedervall, T., et al., *Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(7): p. 2050-2055.

116. Lundqvist, M., et al., *Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(38): p. 14265-14270.
117. Dobrovolskaia, M.A., et al., *Interaction of colloidal gold nanoparticles with human blood: effects on particle size and analysis of plasma protein binding profiles*. Nanomedicine, 2009. **5**(2): p. 106-117.
118. Wasdo, S.C., et al., *Differential binding of serum proteins to nanoparticles*. International Journal of Nanotechnology, 2008. **5**(1): p. 92-115.
119. 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. 487-495.
120. Minchin, R.F. and D.J. Martin, *Nanoparticles for molecular imaging--an overview*. Endocrinology, 2010. **151**(2): p. 474-481.
121. Zhou, L., et al., *Palladium-catalyzed oxidative cross-coupling of N-tosylhydrazones or diazoesters with terminal alkynes: a route to conjugated enynes*. Angew Chem Int Ed Engl, 2011. **50**(15): p. 3510-3514.
122. Nativo, P., I.A. Prior, and M. Brust, *Uptake and intracellular fate of surface-modified gold nanoparticles*. ACS Nano, 2008. **2**(8): p. 1639-1644.
123. Li, Y., et al., *Rhodium-catalyzed direct addition of aryl C-H bonds to N-sulfonyl aldimines*. Angew Chem Int Ed Engl, 2011. **50**(9): p. 2115-2119.
124. Schinkel, A.H., et al., *P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs*. J Clin Invest, 1996. **97**(11): p. 2517-2524.
125. Lynch, I. and K.A. Dawson, *Protein-nanoparticle interactions*. Nano Today, 2008. **3**(1-2): p. 40-47.
126. Dutta, D., et al., *Adsorbed proteins influence the biological activity and molecular targeting of nanomaterials*. Toxicol Sci, 2007. **100**(1): p. 303-315.
127. Chithrani, B.D., et al., *Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells*. Nano Lett, 2006. **6**(4): p. 662-668.
128. Lv, M., et al., *Trypsin-gold nanoparticle conjugates: binding, enzymatic activity, and stability*. Prep Biochem Biotechnol, 2009. **39**(4): p. 429-438.
129. Skaat, H. and S. Margel, *Synthesis of fluorescent-maghemite nanoparticles as multimodal imaging agents for amyloid-beta fibrils detection and removal by a magnetic field*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **386**(4): p. 645-649.
130. Paukner, S., et al., *Bacterial ghosts as novel advanced drug delivery systems: antiproliferative activity of loaded doxorubicin in human Caco-2 cells*. J Control Release, 2004. **94**(1): p. 63-74.
131. Andraeu, D. and L. Rivas, *Péptidos en biología y biomedicina*, ed. C.S.d.I. Científicas1997, Madrid.
132. Dirscherl, G., et al., *Solid-phase synthesis of metal-complex containing peptides*. Tetrahedron, 2007. **63**: p. 4918-4928.
133. Medina Consuegra, E.D., *Obtención de conjugados péptidos-nanopartículas metálicas para el desarrollo de una estrategia terapéutica para la enfermedad de Alzheimer*, in Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, 2006, Universidad de Chile: Santiago, Chile.

134. Link, S. and M.A. El-Sayed, *Optical properties and ultrafast dynamics of metallic nanocrystals*. Annual Review of Physical Chemistry, 2003. **54**: p. 331-366.
135. Huo, Q., et al., *Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands*. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, 2007. **58**(1): p. 3-7.
136. Liu, X., et al., *Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2007. **58**(1): p. 3-7.
137. Link, S. and M.A. El-Sayed, *Spectroscopic determination of the melting energy of a gold nanorod*. Journal of Chemical Physics, 2001. **114**(5): p. 2362-2368.
138. Sabate, R. and J. Estelrich, *Stimulatory and inhibitory effects of alkyl bromide surfactants on beta-amyloid fibrillogenesis*. Langmuir, 2005. **21**(15): p. 6944-6949.
139. Sabate, R. and S.J. Saupe, *Thioflavin T fluorescence anisotropy: an alternative technique for the study of amyloid aggregation*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **360**(1): p. 135-138.
140. Lopez, M., et al., *Técnicas de Histología y Citología*, . 2º edición ed, ed. f.d.M. Depto. de Biología Celular y Genética, Universidad de Chile 1982, Satiango: Librería Cristian Talleres.
141. Mading, P., et al., *Module-assisted synthesis of the bifunctional labelling agent N-succinimidyl 4-[(18)F]fluorobenzoate ([18)F]SFB*. Appl Radiat Isot, 2005. **63**(3): p. 329-32.
142. Movchan, T.G., et al., *Dynamic light scattering study of cetyltrimethylammonium bromide aqueous solutions*. Colloid Journal, 2012. **74**(2): p. 239-247.
143. Liu, H., et al., *Dynamic light scattering for gold nanorod size characterization and study of nanorod-protein interactions*. Gold Bulletin, 2012. **45**(4): p. 187-195.
144. Kelly, K.L., et al., *The optical properties of metal nanoparticles: The influence of size, shape, and dielectric environment*. Journal of Physical Chemistry B, 2003. **107**(3): p. 668-677.
145. Melo, F., et al., *Exploring the Surface Charge on Peptide-Gold Nanoparticle Conjugates by Force Spectroscopy*. Langmuir, 2010. **26**(14): p. 12026-12032.
146. Nikoobakht, B. and M.A. El-Sayed, *Evidence for Bilayer Assembly of Cationic Surfactants on the Surface of Gold Nanorods*. Langmuir, 2001. **17**(20): p. 6368-6374.
147. Vigderman, L., et al., *Functional gold nanorods: synthesis, self-assembly, and sensing applications*. Adv Mater, 2012. **24**(36): p. 4811-4841.
148. Guerrero, A.R., et al., *Exploring the Surface Charge on Peptide-Gold Nanoparticle Conjugates by Force Spectroscopy*. Langmuir, 2010. **26**(14): 12026-32.
149. Hubert, F., et al., *Cetyltrimethylammonium bromide silver bromide complex as the capping agent of gold nanorods*. Langmuir, 2008. **24**(17): p. 9219-9222.
150. Brust, M., et al., *Synthesis of Thiol-Derivatized Gold Nanoparticles in a 2-Phase Liquid-Liquid System*. Journal of the Chemical Society-Chemical Communications, 1994(7): p. 801-802.
151. Lau, K.H.A., et al., *Direct adsorption and monolayer self-assembly of acetyl-protected dithiols*. Langmuir, 2006. **22**(7): p. 2968-2971.
152. Vericat, C., et al., *Thiol-capped gold: from planar to irregular surfaces*. Journal of Physics-Condensed Matter, 2008. **20**(18): p. 184004.
153. Jiang, P., et al., *The stability of self-organized 1-nonanethiol-capped gold nanoparticle monolayer*. Journal of Physics D-Applied Physics, 2001. **34**(15): p. 2255-2259.
154. Love, J.C., et al., *Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology*. Chemical Reviews, 2005. **105**(4): p. 1103-1169.

155. Liu, Y., et al., *Nanomedicine for drug delivery and imaging: A promising avenue for cancer therapy and diagnosis using targeted functional nanoparticles*. International Journal of Cancer, 2007. **120**(12): p. 2527-2537.
156. Tielens, F. and E. Santos, *AuS and SH Bond Formation/Breaking during the Formation of Alkanethiol SAMs on Au(111): A Theoretical Study*. Journal of Physical Chemistry C, 2010. **114**(20): p. 9444-9452.
157. Phonthammachai, N., et al., *Synthesis of contiguous silica-gold core-shell structures: Critical parameters and processes*. Langmuir, 2008. **24**(9): p. 5109-5112.
158. Guerrero, S., et al., *Synthesis and in vivo evaluation of the biodistribution of a 18F-labeled conjugate gold-nanoparticle-peptide with potential biomedical application*. Bioconjug Chem, 2012. **23**(3): p. 399-408.
159. Casals, E., et al., *Time evolution of the nanoparticle protein corona*. ACS Nano, 2010. **4**(7): p. 3623-3632.
160. Schaffler, M., et al., *Serum protein identification and quantification of the corona of 5, 15 and 80 nm gold nanoparticles*. Nanotechnology, 2013. **24**(26): p. 265103.
161. Alkilany, A.M., et al., *Cation exchange on the surface of gold nanorods with a polymerizable surfactant: polymerization, stability, and toxicity evaluation*. Langmuir, 2010. **26**(12): p. 9328-9333.
162. Colvin, V.L. and K.M. Kulinowski, *Nanoparticles as catalysts for protein fibrillation*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. **104**(21): p. 8679-8680.
163. Zhang, M., et al., *Nanomaterials for reducing amyloid cytotoxicity*. Adv Mater, 2013. **25**(28): p. 3780-3801.
164. Shang, L., et al., *pH-Dependent Protein Conformational Changes in Albumin:Gold Nanoparticle Bioconjugates: A Spectroscopic Study*. Langmuir, 2007. **23**(5): p. 2714-2721.
165. Brahma, A., C. Mandal, and D. Bhattacharyya, *Characterization of a dimeric unfolding intermediate of bovine serum albumin under mildly acidic condition*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics, 2005. **1751**(2): p. 159-169.
166. Yasseen, Z., *On the Interactions of Bovine Serum Albumin with Some Surfactants: New Insights from conductivity Studies*. J. Chem. Pharm. Res., 2012. **4**(7): p. 3361-3367.
167. Brewer, S.H., et al., *Probing BSA Binding to Citrate-Coated Gold Nanoparticles and Surfaces*. Langmuir, 2005. **21**(20): p. 9303-9307.
168. Choi, H.S., et al., *Renal clearance of quantum dots*. Nat Biotechnol, 2007. **25**(10): p. 1165-1170.
169. Hillyer, J.F. and R.M. Albrecht, *Gastrointestinal persorption and tissue distribution of differently sized colloidal gold nanoparticles*. J Pharm Sci, 2001. **90**(12): p. 1927-1936.
170. Hillyer, J.F. and R.M. Albrecht, *Correlative Instrumental Neutron Activation Analysis, Light Microscopy, Transmission Electron Microscopy, and X-ray Microanalysis for Qualitative and Quantitative Detection of Colloidal Gold Spheres in Biological Specimens*. Microsc Microanal, 1998. **4**(5): p. 481-490.
171. Weller, R.O., et al., *Pathways of fluid drainage from the brain--morphological aspects and immunological significance in rat and man*. Brain Pathol, 1992. **2**(4): p. 277-284.
172. Johnston, M. and C. Papaiconomou, *Cerebrospinal Fluid Transport: a Lymphatic Perspective*. Physiology, 2002. **17**(6): p. 227-230.
173. Kim, J.S., et al., *Toxicity and tissue distribution of magnetic nanoparticles in mice*. Toxicol Sci, 2006. **89**(1): p. 338-347.

174. Zhang, Y., et al., *Ionic liquids as hypergolic fuels*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2011. **50**(41): p. 9554-9562.
175. Ambrosini, V., et al., *PET/CT with 68Gallium-DOTA-peptides in NET: an overview*. *Eur J Radiol*, 2011. **80**(2): p. 116-119.
176. Lacerda, L., et al., *Dynamic Imaging of Functionalized Multi-Walled Carbon Nanotube Systemic Circulation and Urinary Excretion*. *Advanced Materials*, 2008. **20**(2): p. 225-230.
177. Yamago, S., et al., *In vivo biological behavior of a water-miscible fullerene: 14C labeling, absorption, distribution, excretion and acute toxicity*. *Chem Biol*, 1995. **2**(6): p. 385-389.
178. Cho, M., et al., *The impact of size on tissue distribution and elimination by single intravenous injection of silica nanoparticles*. *Toxicol Lett*, 2009. **189**(3): p. 177-183.
179. Furumoto, K., et al., *Biliary excretion of polystyrene microspheres depends on the type of receptor-mediated uptake in rat liver*. *Biochim Biophys Acta*, 2001. **1526**(2): p. 221-226.
180. Khlebtsov, N. and L. Dykman, *Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: a review of in vitro and in vivo studies*. *Chem Soc Rev*, 2011. **40**(3): p. 1647-1671.
181. Levchenko, T.S., et al., *Liposome clearance in mice: the effect of a separate and combined presence of surface charge and polymer coating*. *Int J Pharm*, 2002. **240**(1-2): p. 95-102.
182. Kreuter, J., *Influence of the surface properties on nanoparticle-mediated transport of drugs to the brain*. *J Nanosci Nanotechnol*, 2004. **4**(5): p. 484-488.
183. Gottesman, M.M. and I. Pastan, *Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter*. *Annu Rev Biochem*, 1993. **62**: p. 385-427.
184. Feng, S.-S. and S. Chien, *Chemotherapeutic engineering: Application and further development of chemical engineering principles for chemotherapy of cancer and other diseases*. *Chemical Engineering Science*, 2003. **58**(18): p. 4087-4114.
185. Alyautdin, R.N., et al., *Delivery of loperamide across the blood-brain barrier with polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles*. *Pharm Res*, 1997. **14**(3): p. 325-328.
186. Gulyaev, A., et al., *Significant Transport of Doxorubicin into the Brain with Polysorbate 80-Coated Nanoparticles*. *Pharmaceutical Research*, 1999. **16**(10): p. 1564-1569.
187. Quaegebeur, A., C. Lange, and P. Carmeliet, *The neurovascular link in health and disease: molecular mechanisms and therapeutic implications*. *Neuron*, 2011. **71**(3): p. 406-24.

10. ANEXOS:

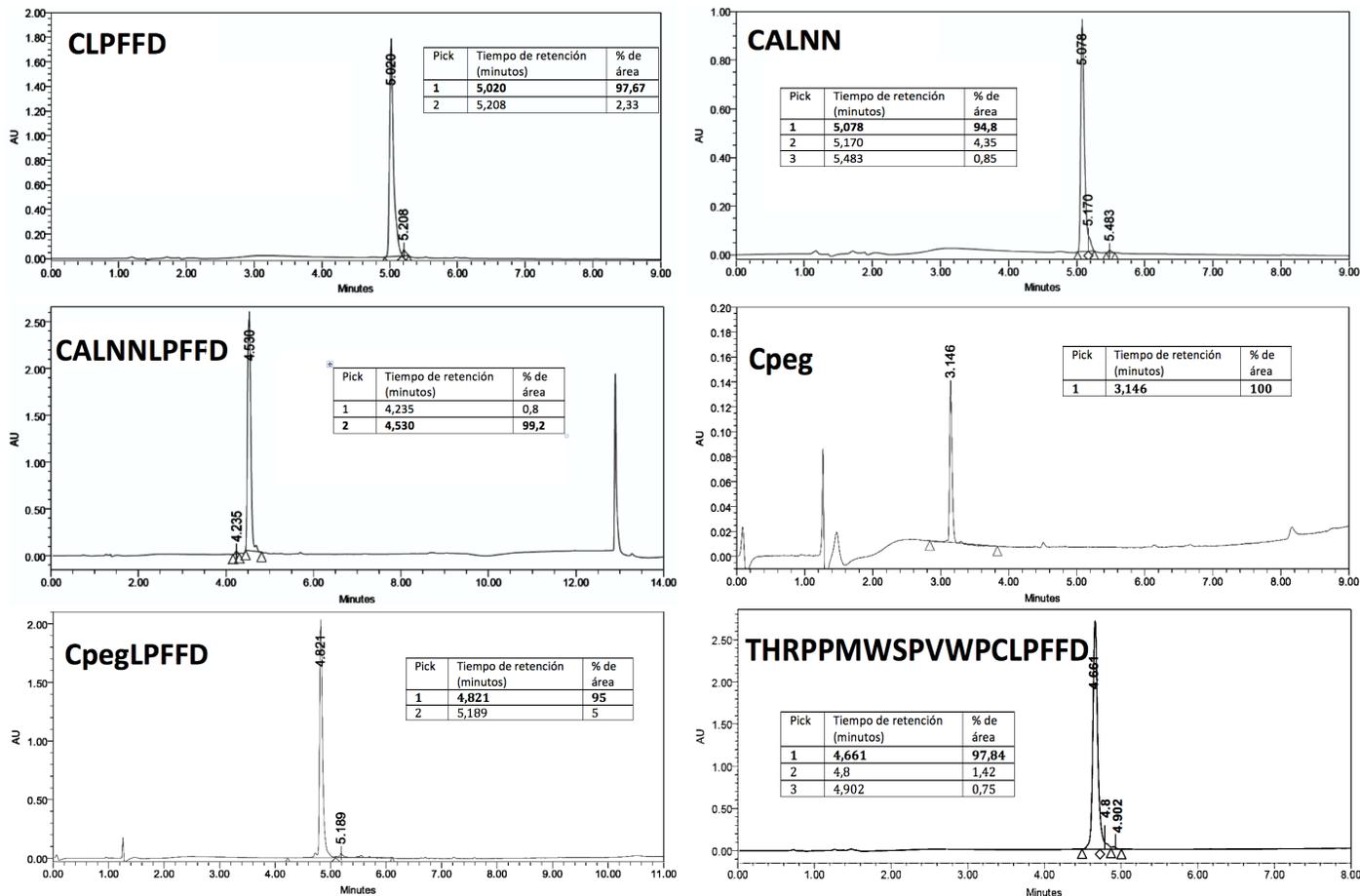


Figura A1. Cromatograma HPLC para los péptidos CLPFFD; CALNNLPFFD; CpegLPFFD; CALNN; Cpeg; THRPPMWSPVWPCLPFFD. Realizado en un gradiente 5% a 100% de B en A donde B: ACN con 0,036% de TFA y A: agua con 0,045% de TFA. Tiempo del gradiente: 8 minutos, flujo: 1,2 ml/minuto, columna C18 a temperatura ambiente, inyección 4 μ L. λ de detección 220nm.

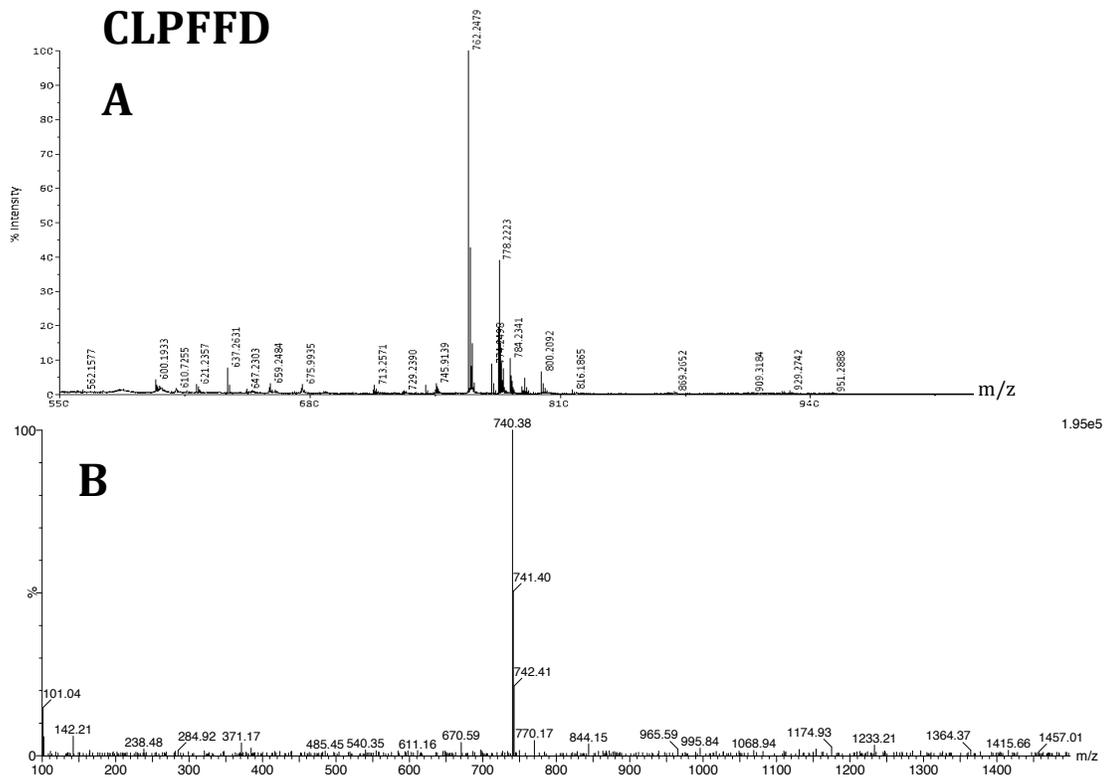


Figura A2. Caracterización por masa de CLPFFD, peso molecular teórico 739,873g/mol A) Espectro MALDI-TOF del péptido CLPFFD. Matriz de ácido 2,5-dihidrobencóico (DHB) a una concentración de 10mg/mL en ACN/ácido fórmico 0,1% v/v (1:2); $[M+Na]^+$ 762,2479 y $[M+K]^+$ 778,2223 B) Espectro ESI-MS del péptido CLPFFD; $M+1/Z$ 740,4 y $M+2/Z$ 371,2

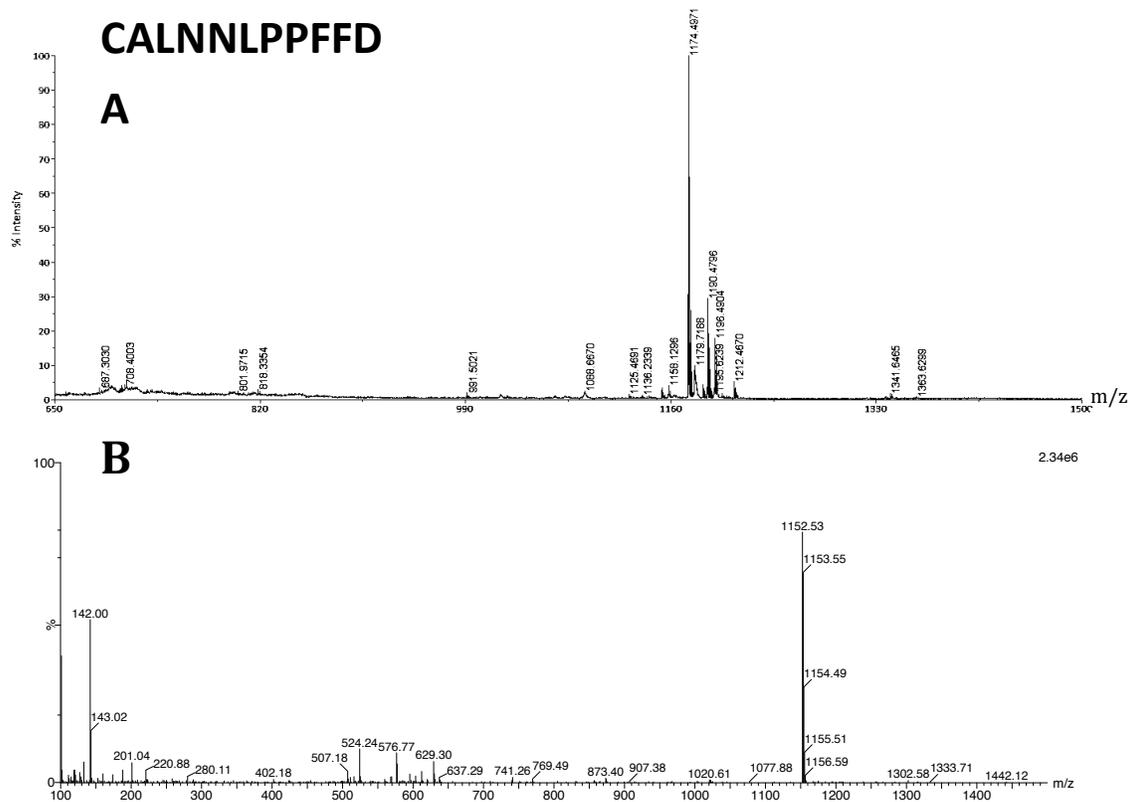


Figura A3. Caracterización por masa de CALNNLPFFD, peso molecular teórico 1152.318g/mol A) Espectro MALDI-TOF del péptido CALNNLPFFD. Matriz de ácido 2,5-dihidrobencóico (DHB) a una concentración de 10mg/mL en ACN/ácido fórmico 0,1% v/v (1:2); $[M+Na]^+$ 1174,497 y $[M+K]^+$ 1190,4796 B) Espectro ES-MS del péptido CALNNLPFFD. $M+1/Z$ 1152,5 y $M+2/2Z$ 576,8

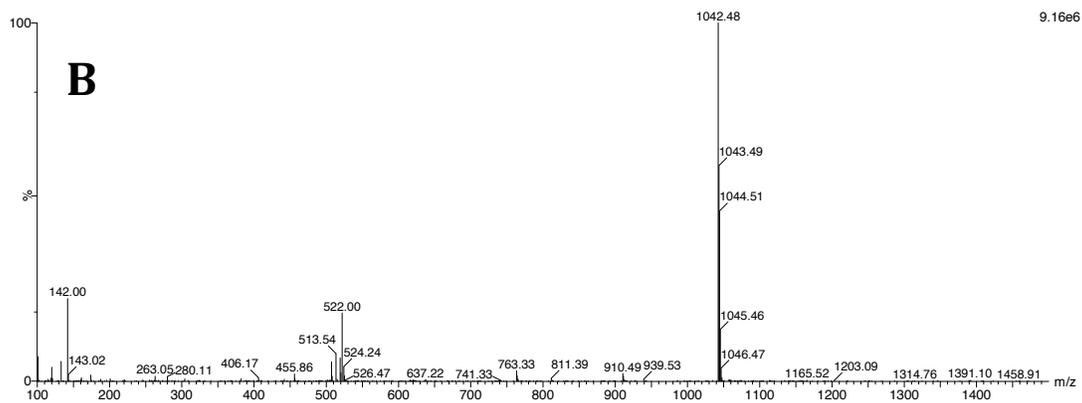
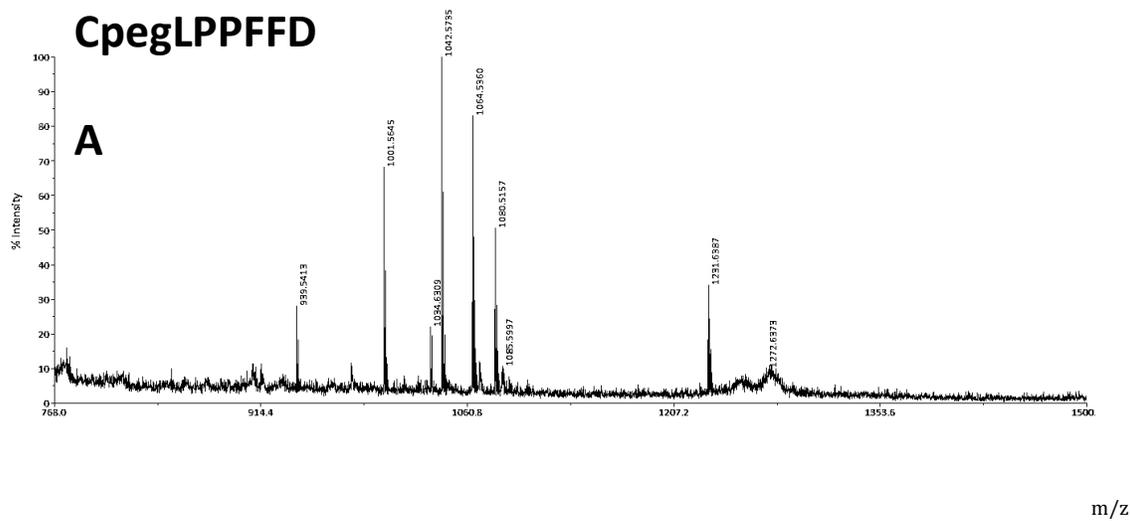


Figura A4. Caracterización por masa de CpegLPFFD, peso molecular teórico 1041.973g/mol A) Espectro MALDI-TOF del péptido CpegLPFFD. Matriz de ácido 2,5-dihidrobencóico (DHB) a una concentración de 10mg/mL en ACN/ácido fórmico 0,1% v/v (1:2); $[M+H]^+$ 1042,5735, $[M+Na]^+$ 1064,5360 y $[M+K]^+$ 1080,5157 B) Espectro ES-MS del péptido CpegLPFFD. $M+1/Z$ 1042,5 y $M+2/2Z$ 522

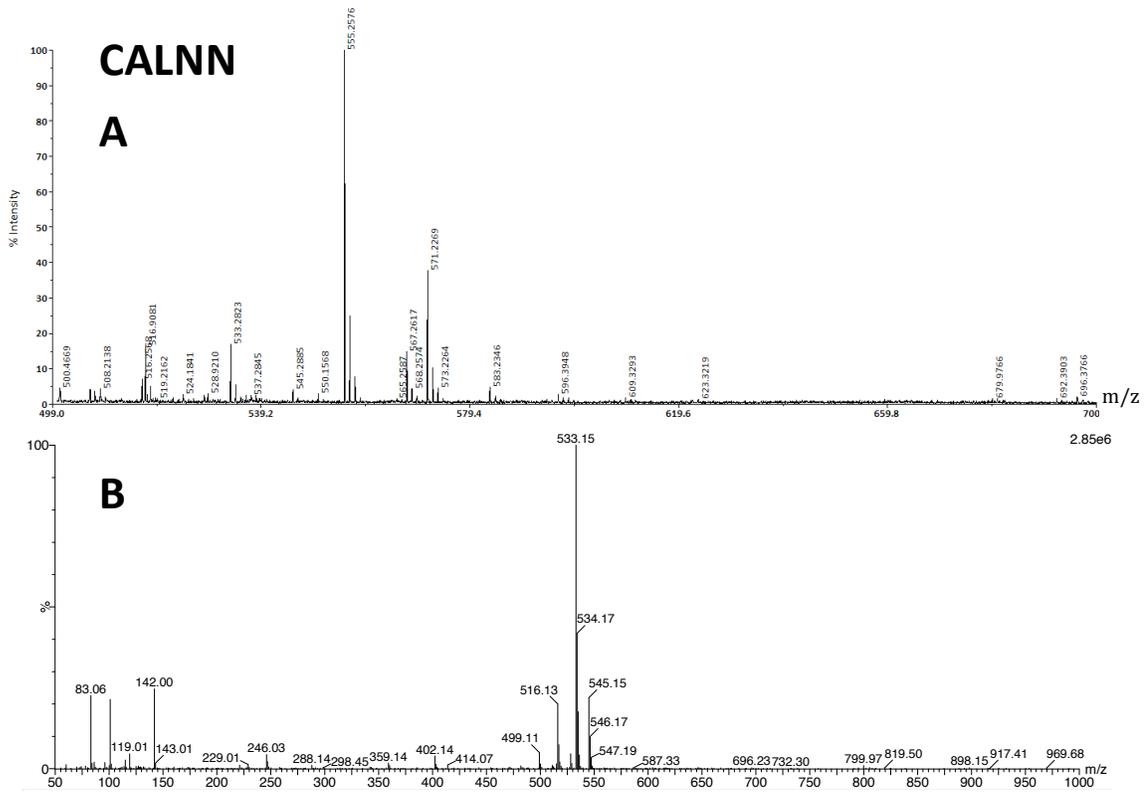


Figura A5. Caracterización por masa de CALNN, peso molecular teórico 532.603g/mol A) Espectro MALDI-TOF del péptido CALNN. Matriz de ácido 2,5-dihidrobenzóico (DHB) a una concentración de 10mg/mL en ACN/ácido fórmico 0,1% v/v (1:2); $[M+H]^+$ 533,2823 $[M+Na]^+$ 555,2576 y $[M+K]^+$ 571,2569 B) Espectro ES-MS del péptido CALNN. $M+1/Z$ 533,2

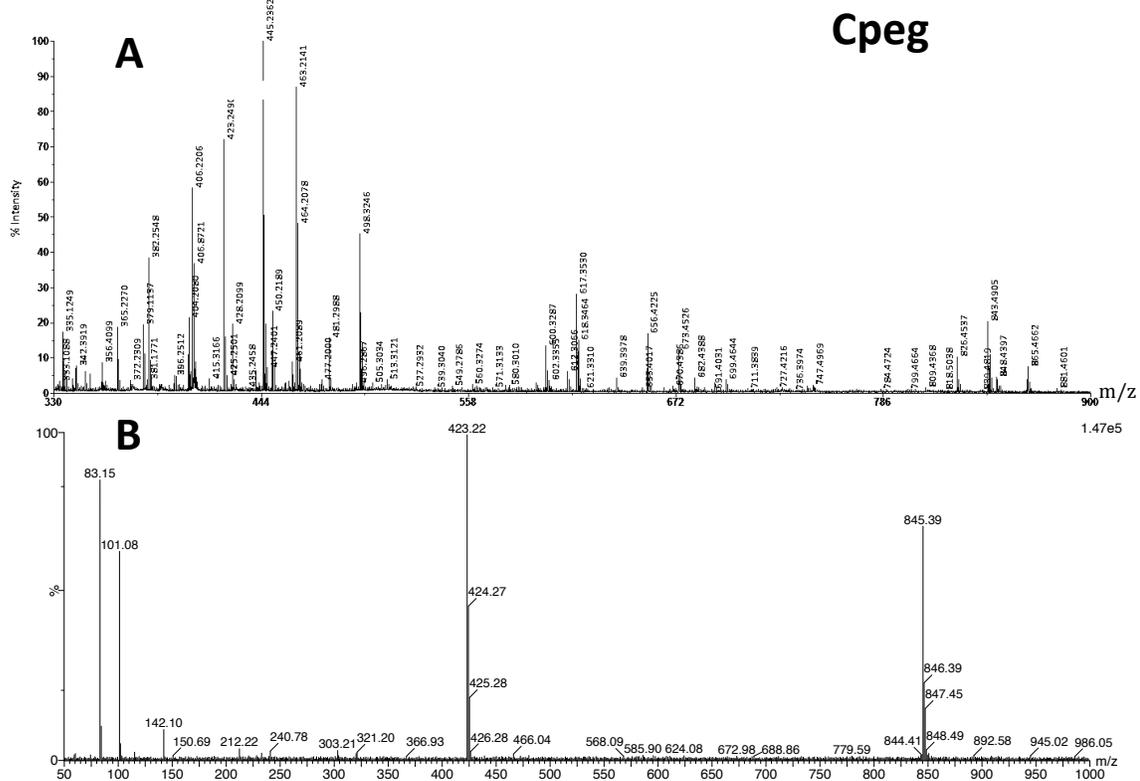


Figura A6. Caracterización por masa de Cpeg, peso molecular teórico 422,157g/mol A) Espectro MALDI-TOF del péptido Cpeg. Matriz de ácido 2,5-dihidrobencóico (DHB) a una concentración de 10mg/mL en ACN/ácido fórmico 0,1% v/v (1:2); $[M+H]^+$ 423,249 $[M+Na]^+$ 445,2362 y $[M+K]^+$ 463,241 B) Espectro ES-MS del péptido Cpeg. $M+1/Z$ 423,2, $M+2/2Z$ 212,2, $M+3/3Z$ 142,1 y posiblemente un dímero $2M+1/Z$ 845,4

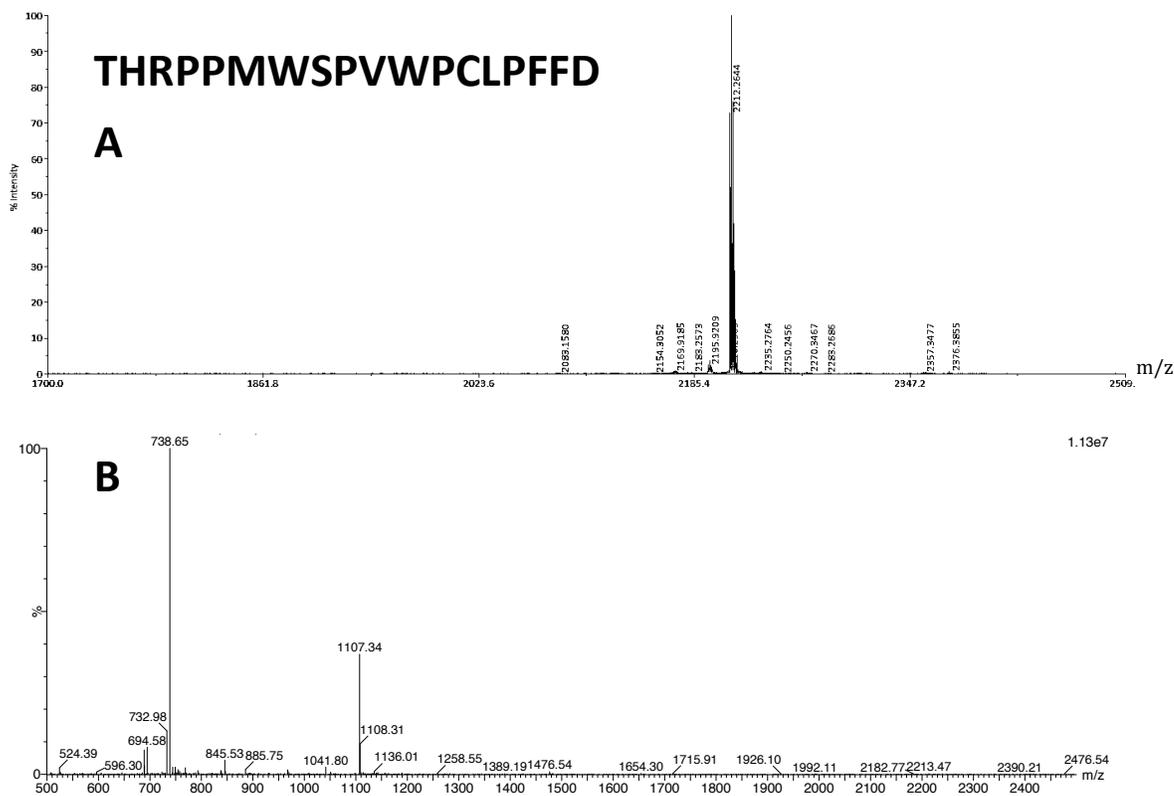


Figura A7. Caracterización por masa de THRPPMWSPVWPCLPFFD, peso molecular teórico 2212,603g/mol
 A) Espectro MALDI-TOF del péptido Cpeg. Matriz de ácido 2,5-dihidrobenzóico (DHB) a una concentración de 10mg/mL en ACN/ácido fórmico 0,1% v/v (1:2); $[M+H]^+$ 2212,264 $[M+Na]^+$ 2235,2764 y $[M+K]^+$ 2250,2456 B) Espectro ES-MS del péptido Cpeg. $M+1/Z$ 2213,5, $M+2/Z$ 1107,3 y $M+3/Z$ 738,7

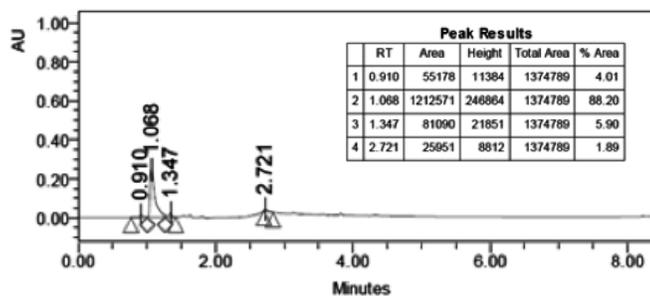


Figura A8. Cromatograma HPLC para el péptido CK. Realizado en un gradiente 0% a 100% de B en A donde B: ACN con 0,036% de TFA y A: agua con 0,045% de TFA. Tiempo del gradiente: 8 minutos, flujo: 1,2 ml/minuto, columna C18 a temperatura ambiente, inyección 4 μ L. λ de detección 220nm.

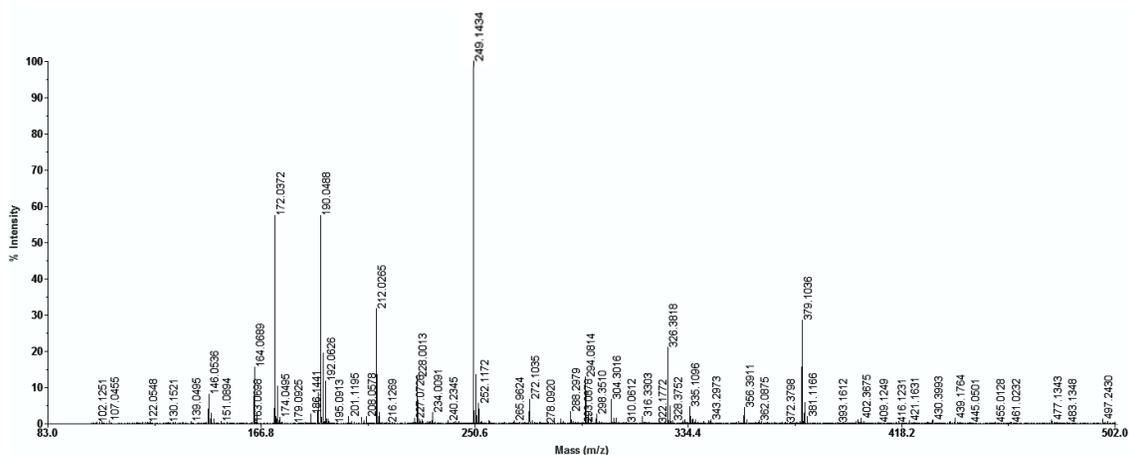


Figura A9. Caracterización por masa de CK, masa molecular teórica 248.331g/mol. Matriz de ácido 2,5-dihidrobencóico (DHB) a una concentración de 10mg/mL en ACN/ácido fórmico 0,1% v/v (1:2); **[M+H]⁺ 249,143.**

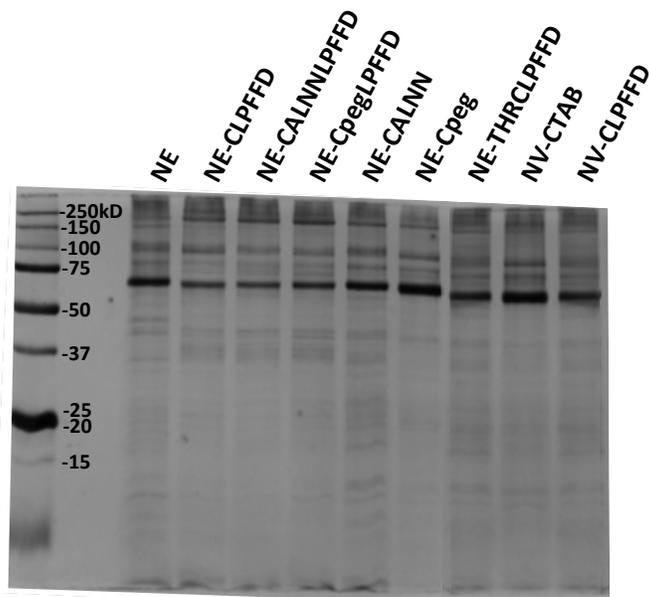


Figura A10: Proteínas separadas de la superficie de las NpO-péptido vistas por Geles en 1D SDS-Page. Gel de poliacrilamida al 10% y marcado con plata, las muestras corresponden a las proteínas cuantificadas y cargadas a 20µg por muestra.

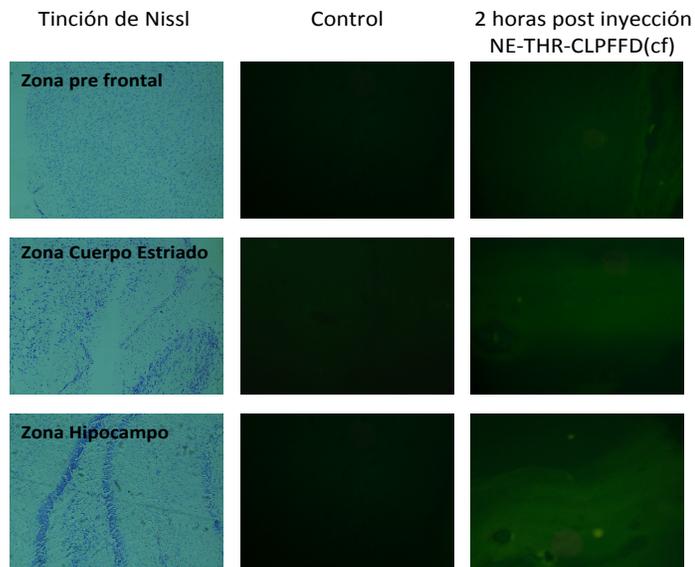


Figura A11. Localización de NE-THRCLPFFD(cf) en cortes de cerebros de ratas tratadas intraperitonealmente con NpO-péptido. El cerebro fue seccionado en cortes de 20mm, las áreas del cerebro fueron identificadas por tinción de Nissl.

Tabla A1: Proteínas y subunidades proteicas identificadas a partir de una muestra de proteínas totales desde las proteínas separadas de la CP por LC-MS/MS, los valores corresponden al entregado por el programa MASCOT, correspondientes en cada caso a la mayor probabilidad obtenida a partir de los fragmentos que pudieron ser identificados para dicha proteína.

Descripción	NE	NE-CLPFFD	NE-THRCLPFF	NV-CLPFFD	NV-CTAB
Alcohol dehydrogenase 1B			52,59		
Alpha-1-acid glycoprotein					71,05
Alpha-1-antitrypsin		232,72	85,62		200,95
Alpha-actinin-1		95,12	70,06		
Apolipoprotein A-I		197,85	391,58	236,6	1124,17
Apolipoprotein A-II		210,22	72,7	88,92	410,04
Apolipoprotein A-IV					256,45
Apolipoprotein B-100		316,28		72,55	1309,12
Apolipoprotein C-I					48,22
Apolipoprotein C-II				31,43	358,88
Apolipoprotein C-III		63,28	51,19		1174,79
Apolipoprotein D					52,11
Apolipoprotein E		656,91	445,12	681,25	931,34
Apolipoprotein F					124,21
Apolipoprotein M					90,45
Beta-2-glycoprotein 1	24,89	58,39	70,54		40,44
Beta-parvin		125,05			
C4b-binding protein alpha chain	366,42	114,67	131,65		
Ceruloplasmin		94,4			29
Clusterin	147,42		187,13	149,3	402,4
Coagulation factor V		120,55	370,13		
Coagulation factor XI		152,21			
Complement C1q subcomponent subunit A			33,92		
Complement C1q subcomponent subunit B			186,6		
Complement C1q subcomponent subunit C		51,77	72,87		
Complement C1r subcomponent		102,02	137,44		
Complement C1s subcomponent	169,89	90,49	232,96		
Complement C3	133,5	107,73	389,47	98,09	326,56
Complement C4-A	1011,73	381,65	372,11	299,57	476,43
Complement C4-B	373,55	421,23	1104,84		
Complement factor H	135,31	222,38	511,85		340,37
Complement factor H-related protein 1		60,92	147,08		

Erythrocyte band 7 integral membrane protein		36,52	51,26		
Fibrinogen alpha chain	108,14	89,48	59,78		120,74
Fibrinogen beta chain	45,98	156,3	124,49		111,96
Fibrinogen gamma chain	154,41	229,4	77,75	35,67	98,55
Fibulin-1	117,18		79,37		
Filamin-A			30,49		
Galectin-3-binding protein					125,54
Gelsolin			53,75		
Haptoglobin					139,96
Hemopexin					80,72
Histidine-rich glycoprotein	140,99	420,02	1075,81		111,01
HLA class I histocompatibility antigen, B-58 alpha chain		98,34	109,21		
Hyaluronan-binding protein 2					30,73
Ig alpha-1 chain C region		86,6	51,32		266,02
Ig gamma-1 chain C region	104,05	207,61	239,13	63,91	383,53
Ig gamma-2 chain C region			108,4		
Ig gamma-3 chain C region	174,95	145	104,99		278,02
Ig gamma-4 chain C region					221,35
Ig heavy chain V-III region BRO			147,5		
Ig kappa chain C region	196,25	216,26	482,43	78,39	717,18
Ig kappa chain V-III region B6			80,64		
Ig kappa chain V-III region HAH			77,97		
Ig kappa chain V-III region SIE			122,9		
Ig lambda-1 chain C regions	46,05	194,31	138,91		
Ig lambda-2 chain C regions		101,19	199,01		462,99
Ig lambda-6 chain C region		127,56	223,39		
Ig mu chain C region		338,1	273,31		93,6
Ig mu heavy chain disease protein	78,01	47,47			
Insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile subunit	98,2	79,35			
Integrin alpha-IIb	119,41	365,13	386,41	139,98	
Integrin beta-3		47,76	45,53		
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1		48,12			
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2		80,67			120,31
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	199,65	466,92	393,75		
Keratin, type I cytoskeletal 10			94,76		
Keratin, type I cytoskeletal 9	78,77				38,87
Keratin, type II cytoskeletal 1	90,24	61,84	84,65	113,58	144,05
Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	75,82				
Keratin, type II cytoskeletal 75				122,39	
Kininogen-1		96,61			

Lipopolysaccharide-binding protein			73,22		
Lumican					76,55
Multimerin-1		22,7	38,89		
Myosin-9	199,13	104,94	113,68		
Plasma kallikrein		52,72			
Plasma protease C1 inhibitor			74,13		
Plasminogen		40,15	183,71		319,1
Platelet basic protein		22,1			
Platelet factor 4			70,77		36,59
Platelet glycoprotein 4			60,83		
POTE ankyrin domain family member E	80,52		93,31		
POTE ankyrin domain family member F			119,91		
POTE ankyrin domain family member J		29,66			
Prothrombin					33,39
Ras-related protein Rap-1b-like protein	63,22	88,77			93,45
Retinol-binding protein 4		45,15			127,74
Serotransferrin	134,56	607,8	456,89	304,56	508,94
Serum albumina	298,05	922,04	733,6	803,46	2159,5
Talin-1		79	113,6		72,82
Thrombospondin-1		54,98	61,6		
Transthyretin		38,62		75,93	493,67
Tubulin alpha-1C chain		83,15			
Tubulin beta-1 chain		51,23			
Tubulin beta-2A chain		48,92	41,69		
Vitamin K-dependent protein S	130,62	56,94	117,13		
Vitronectin	137,56	86,53	502,26	120,62	249,87
von Willebrand factor		51,77			