



UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Química Farmacológica y
Toxicológica
Laboratorio de Toxicología

Recubrimiento de nanoesferas de oro conjugadas al péptido CLPFFD-NH₂ con poloxámeros para mejorar la penetración a través de membranas biológicas

PATROCINANTE
Dr. Marcelo J. Kogan
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
FARMACOLÓGICA Y
TOXICOLÓGICA

DIRECTOR DE MEMORIA
Dr. Marcelo J. Kogan
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
FARMACOLÓGICA Y
TOXICOLÓGICA

CO-DIRECTORA DE MEMORIA
Dra. Ana Riveros
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
FARMACOLÓGICA Y
TOXICOLÓGICA

Memoria para optar al Título de Químico Farmacéutico

Gustavo Adolfo Miranda Rojas

Santiago, Chile

2014

Agradecimientos

Si me pidieran definir en una sola palabra lo que ha significado mi vida durante estos últimos años, sin lugar a dudas sería “*progreso*”. Esta etapa pronto por superar me permitió avanzar, no solo en un punto de vista académico, sino también personal y espiritual. De esta manera, fácilmente podría describir un “antes” y un “después” de mi persona, logrando concluir felizmente, el maravilloso balance positivo que la vida me ha brindado. Indudablemente, esta difícil tarea para un ser humano no la he logrado por mí mismo. Esto es algo que me pone muy contento. Mi familia y amigos han estado siempre a mi lado incondicionalmente, para otorgarme el escalón que he necesitado para superar las barreras de mis defectos. Es por esta razón que le agradezco toda la ayuda, consejos y enseñanzas otorgadas por mi profesor Marcelo y mis compañeros de laboratorio, que a pesar de haber sido una difícil etapa para mí, siempre mostraron su apoyo incondicional para que siguiera adelante. A mi madre y a mi padre que me entregaron todas las herramientas necesarias para lograr mis metas, por su amor incondicional y cariño, por ser la luz guía en mis momentos más difíciles, les deberé por siempre todo mi ser. A mi hermano Sebastián, mi mentor en la vida, le agradeceré por el resto de mi vida su cariño, sus consejos y enseñanzas, elementos esenciales que me permitieron superar barreras que creía insuperables. A mi hermano Miguel, que a pesar de la lejanía, me demostró a través de su cariño incondicional que el amor no conoce distancias. A mis amigos y familiares, les agradezco todo el apoyo, compañía, paciencia, y sobretodo el haberme ayudado a olvidar el significado de la tristeza. Finalmente, a *esa persona* le agradezco desde el fondo de mi alma todo el amor, tiempo, cariño y todas aquellas enseñanzas que han permitido aflorar de mí el lado más humano. Son pocas las palabras que en definitiva podrían describir todos los sentimientos que en este momento me invaden. Es por eso mismo que le doy gracias a todos, por todo aquello que han provocado en mí. De esta manera seguiré superándome, ya que aquello demostrará que todo lo que me otorgan dará siempre un pequeño fruto dentro de mi corazón. Muchas gracias.

Se agradece a los proyectos FONDECYT 1130425, Fondap 15130011, Mecesup UCH-081 por el financiamiento de esta memoria.

Tabla de Contenidos

	Página
Agradecimientos.....	ii
Tabla de Contenidos.....	iii
Abreviaturas.....	vii
Resumen.....	viii
Summary.....	ix
Capítulo 1 – Introducción.....	1
1.1 La nanotecnología y su importancia en la biomedicina.....	2
1.2 Nanopartículas metálicas (NPM) para aplicaciones biomédicas.....	2
1.3 Enfermedades neurodegenerativas como principal blanco de las NPAu.....	5
1.4 Péptido CLPFFD-NH ₂ para funcionalización de las NPAu.....	6
1.5 Funcionalización de NPAu para la desagregación de los ATA β	7
1.6 Estrategias farmacéuticas para aumentar la biodisponibilidad hacia el sistema nervioso central (SNC).....	9
1.6.1 NPAu y los factores que influyen en su biodisponibilidad para llegar al SNC.....	9
1.6.2 Inhibición de mecanismos de eflujo para aumentar biodisponibilidad al SNC.....	10
1.7 Uso de copolímeros anfifílicos para mejorar la entrega de fármacos al SNC.....	11
1.8 Respecto a la síntesis de NPAu.....	15
1.9 Estudios en modelos de membranas biológicas.....	16
1.10 Respecto al análisis termogravimétrico.....	17
Hipótesis.....	18
Objetivo general.....	18
Objetivos específicos.....	18
Capítulo 2 - Materiales y métodos.....	19
2.1 Síntesis y caracterización de NPAu.....	20
2.1.1 Síntesis de NPAu de ~12 nanómetros.....	20
2.1.2 Caracterización de NPAu.....	20

2.1.2.1 Espectrofotometría de absorción molecular.....	20
2.1.2.2 TEM.....	21
2.1.2.3 DLS.....	21
2.1.2.4 Potencial zeta.....	21
2.2 Obtención y caracterización del conjugado de NPAu con el péptido CLPFFD-NH ₂	21
2.2.1 Preparación del conjugado NPAu-CLPFFD.....	21
2.2.2 Caracterización del conjugado NPAu-CLPFFD.....	22
2.2.2.1 Espectrofotometría de absorción molecular.....	22
2.2.2.2 TEM.....	22
2.2.2.3 DLS.....	22
2.2.2.4 Potencial zeta.....	23
2.3 Obtención y caracterización del nanocompuesto NPAu-CLPFFD recubierto con Pluronic [®] P85, F127 o L121.....	23
2.3.1 Preparación soluciones de Pluronic [®] P85, L121 y F127.....	23
2.3.2 Recubrimiento de NPAu y del conjugado NPAu-CLPFFD con Pluronic [®] P85, F127 o L121.....	24
2.3.3 Caracterización de los nanocompuestos.....	24
2.4 Determinación de la concentración de NPAu en las muestras.....	24
2.5 Análisis termogravimétrico.....	24
2.6 PAMPA.....	25
2.7 Estudio de alteraciones en permeabilidad y estabilidad de liposomas.....	27
2.7.1 Ensayo de permeabilidad de liposomas.....	27
2.7.1.1 Preparación de liposomas con CF encapsulada.....	27
2.7.1.2 Ensayo de fluorescencia de la CF liberada.....	29
2.7.2 Ensayo de estabilidad de liposomas e interacción con nanocompuestos....	30
2.8 Análisis estadístico.....	31
Capítulo 3 – Resultados.....	32
3.1. Caracterización de NPAu.....	33
3.1.1 Espectrofotometría de absorción molecular.....	33
3.1.2 DLS.....	33
3.1.3 Potencial zeta.....	34

3.1.4 TEM.....	34
3.2 Caracterización del conjugado NPAu-CLPFFD.....	35
3.2.1 Espectrofotometría de absorción molecular.....	35
3.2.2 DLS.....	36
3.2.3 Potencial zeta.....	37
3.2.4 TEM.....	37
3.3 Caracterización de los nanocompuestos.....	38
3.3.1 Espectrofotometría de absorción molecular.....	38
3.3.2 DLS.....	42
3.3.3 Potencial zeta.....	43
3.3.4 TEM.....	44
3.4 Determinación de la concentración de NPAu en las muestras.....	46
3.5 Termogravimetría.....	46
3.6 PAMPA.....	48
3.7 Estudio de alteraciones en la permeabilidad y estabilidad de liposomas.....	49
3.7.1 Ensayo de permeabilidad de liposomas.....	49
3.7.2 Ensayo estabilidad de liposomas e interacción con nanocompuestos.....	51
Capítulo 4 - Discusión de Resultados.....	56
4.1 Caracterización de las NPAu.....	57
4.1.1 Espectrofotometría de absorción molecular.....	57
4.1.2 DLS.....	57
4.1.3 TEM.....	57
4.1.4 Potencial zeta.....	58
4.2 Obtención y caracterización del conjugado de NPAu con el péptido CLPFFD-NH ₂	58
4.2.1 Preparación del conjugado NPAu-CLPFFD.....	58
4.2.2 Caracterización del conjugado NPAu-CLPFFD.....	58
4.2.2.1 Espectrofotometría de absorción molecular.....	58
4.2.2.2 DLS.....	59
4.2.2.3 TEM.....	59
4.2.2.4 Potencial zeta.....	59

4.3 Caracterización del conjugado NPAu-CLPFFD recubierto con Pluronic® P85, F127 o L121.....	60
4.3.1 Espectrofotometría de absorción molecular.....	61
4.3.2 DLS.....	62
4.3.3 Potencial zeta.....	63
4.3.4 TEM.....	64
4.4 Análisis termogravimétrico.....	65
4.5 PAMPA.....	67
4.6 Estudio de alteraciones en la permeabilidad y estabilidad de liposomas.....	69
4.6.1 Ensayo permeabilidad de liposomas.....	69
4.6.2 Ensayo estabilidad de liposomas.....	71
Capítulo 5 – Conclusiones.....	73
Bibliografía.....	75
Anexo.....	81

Abreviaturas

NPAu	:Nanopartícula esférica de oro
ATAβ	:Agregado tóxico de β -amiloide
EA	:Enfermedad de Alzheimer
CLPFFD-NH₂	:Péptido Cys-Leu-Pro-Phe-Phe-Asp
NPAu-CLPFFD	:Nanopartícula esférica de oro conjugada al péptido CLPFFD-NH ₂
BHE	:Barrera hemato-encefálica
HLB	:Balance hidrofílico-lipofílico
DLS	:Dispersión dinámica de la luz
TEM	:Microscopía electrónica de transmisión
PAMPA	:Ensayo de permeabilidad de membrana artificial en paralelo
NPM	:Nanopartícula metálica
RPS	:Resonancia plasmónica de superficie
λ	:Longitud de onda
Aβ	:Péptido β -amiloide
SNC	:Sistema nervioso central
SRE	:Sistema retículo endotelial
P-gp	:Glicoproteína P
ATP	:Adenosín Trifosfato
PEO	:Óxido de polietileno
PPO	:Óxido de polipropileno
CMC	:Concentración micelar crítica
MDR	:Células cancerosas resistentes a múltiples fármacos
Caco-2	:Células epiteliales intestinales polarizadas
BMVEC	:Células endoteliales de la microvasculatura cerebral
MRP	:Proteína asociada a la resistencia a múltiples fármacos
HAuCl₄	:Ácido tetracloraurico (III)
Na₃C₆H₅O₇ x 2H₂O	:Citrato trisódico dihidratado
FC	:Fosfatidilcolina
CF	:Carboxifluoresceína
T°	:Temperatura
DTA	:Análisis térmico diferencial
DSC	:Calorimetría diferencial de barrido
DH	:Diámetro hidrodinámico
IPD	:Índice de polidispersidad
>30% CMC	:Por sobre un 30% de la concentración micelar crítica
<30% CMC	:Por debajo de un 30% de la concentración micelar crítica
P_e	:Permeabilidad efectiva
LCF	:Liposomas de fosfatidilcolina con carboxifluoresceína encapsulada
TRIS	:Tris(hidroximetil)aminometano
SDS	:Dodecil sulfato de sodio
$\lambda_{Máx}$:Longitud de onda de máxima absorbancia
U.A.	:Unidades de absorbancia
TG	:Curva termogravimétrica
DTG	:Primera derivada de la curva termogravimétrica

Resumen

En la actualidad existe gran interés en el uso de nanopartículas esféricas de oro (NPAu) para aplicaciones biomédicas. Éstas presentan propiedades ópticas que permiten la absorción y disipación de energía de manera local en forma de calor luego de ser irradiadas, lo que puede ser utilizado para destruir células tumorales o disolver agregados tóxicos proteicos de β -amiloides (ATA β) involucrados en la enfermedad de Alzheimer (EA). En nuestro laboratorio se conjugaron las NPAu con el péptido CLPFFD-NH₂ el cual reconoce a estos ATA β , formando el conjugado NPAu-CLPFFD. Estos agregados pueden ser disueltos en presencia de este conjugado mediante la aplicación de microondas de baja potencia, reduciéndose su toxicidad. No obstante, el conjugado NPAu-CLPFFD atraviesa la barrera hemato-encefálica (BHE) en baja proporción con respecto a la dosis administrada. El enfoque principal de este estudio fue recubrir el conjugado NPAu-CLPFFD con copolímeros de carácter anfifílico como los poloxámeros (Pluronic[®]) para facilitar el pasaje a través de la BHE. Estos copolímeros han demostrado tener la capacidad tanto de inhibir transportadores de eflujo expresados en distintos tipos de células como también de modificar la fluidez de modelos de membranas. En este estudio se emplearon tres copolímeros los cuales difieren en sus propiedades estructurales: Pluronic[®] P85, F127 y L121, siendo sus balances hidrofílico-lipofílico (sigla en inglés HLB): 16, 22 y 1, respectivamente.

Los nanocompósitos se caracterizaron mediante espectrofotometría de absorción molecular, dispersión dinámica de la luz (sigla en inglés DLS), potencial zeta, microscopía electrónica de transmisión (sigla en inglés TEM) y termogravimetría. Se evaluó además *in vitro* las alteraciones en la estabilidad y permeabilidad de modelos de membranas debido a la interacción con los nanocompósitos, y la capacidad de estos de difundir pasivamente mediante el ensayo de permeabilidad de membrana artificial en paralelo (sigla en inglés PAMPA). Así, se logró determinar que estos nanocompósitos son capaces de modificar la estabilidad y permeabilidad de los modelos de membrana biológica, posiblemente debido a cambios en su organización. A pesar de esto, ninguno fue capaz de mejorar el traspaso mediante difusión pasiva de NPAu a través del modelo de membrana en el PAMPA.

Summary

Spherical gold nanoparticles conjugated with the CLPFFD-NH₂ peptide coated with poloxamers to improve the penetration through biological membranes.

Nowadays, there exists a great interest in the use of spherical gold nanoparticles (NPAu) for biomedical applications. NPAu have optical properties that allow the absorption and local dissipation of energy in the form of heating after being irradiated, which can be used to destroy tumoral cells or dissolve amyloid- β toxic protein aggregates (A β) that are involved in the Alzheimer disease (EA). In our laboratory, NPAu were conjugated with the CLPFFD-NH₂ peptide which recognizes A β , forming the NPAu-CLPFFD conjugate. These aggregates can be dissolved in the presence of NPAu-CLPFFD through the application of weak microwaves fields, decreasing their toxicity. However, the NPAu-CLPFFD conjugate crosses the blood brain barrier (BBB) in very small proportion with respect to the dose injected. The main focus of this study was the coating of NPAu-CLPFFD by amphiphilic polymers such as poloxamers (Pluronic®) to facilitate the cross throughout the BBB. These copolymers have demonstrated the capacity to inhibit efflux transporter expressed in different types of cells and also modify the fluidity of model membranes. In this study, three copolymers were used which differ in their structural properties: Pluronic® P85, F127 y L121, where their hydrophilic lipophilic balances (HLB) are 16, 22 and 1, respectively.

The nanocomposites were characterized through molecular absorption spectrophotometry, dynamic light scattering (DLS), zeta potential, transmission electronic microscopy (TEM) and thermogravimetry. Also, changes in the stability and permeability of membrane models due to the interaction with nanocomposites, and the capacity of these to cross passively through the parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA), were evaluated *in vitro*. In this way, it was determined that these nanocomposites are capable of modify biological membrane model stability and permeability possibly due to changes in their organization. Despite this, these systems were not capable to improve the cross of NPAu through passive diffusion in the PAMPA.

Capítulo 1

Introducción

1.1 La nanotecnología y su importancia en la biomedicina

La nanotecnología es un campo emergente que ofrece un enorme potencial para el desarrollo de terapias y metodologías de diagnóstico. Esta es una disciplina de las ciencias aplicadas dedicada al control de la materia a escala nanométrica, a través del uso de materiales cuyas dimensiones oscilan entre 1 y 100 nanómetros, los que se denominan nanomateriales.¹ Esta área de la ciencia busca manipular la materia, átomo por átomo, permitiendo actuar con una precisión nanométrica, siendo ésta la escala relevante para la manipulación y caracterización de biomoléculas y células a nivel individual. El prefijo “nano” indica una unidad de medida (la mil millonésima parte de un milímetro), por ello la nanotecnología se caracteriza por ser un campo multidisciplinario cohesionado exclusivamente por la escala de la materia con la que se trabaja.² En particular, la nanotecnología comprende el estudio, diseño, síntesis, manipulación controlada y aplicación de sustancias, materiales, dispositivos y sistemas funcionales. Indudablemente los avances en la nanotecnología han contribuido al desarrollo de diferentes herramientas en variados campos de la ciencia, especialmente en el área de la medicina, donde el uso de nanopartículas ha ido en aumento con importantes aplicaciones tanto en diagnóstico como en terapia.^{3,4} El término nanopartícula representa a todas aquellas partículas, independiente de su composición (metales, polímeros, liposomas, entre otros), cuyo tamaño es inferior a 1 μm . Incluso pueden llegar a medir unos pocos nanómetros, lo cual las sitúa en dimensiones que pueden ser más pequeñas que las células (10-100 μm), los virus (20-450 nm), las proteínas (5-50 nm), el diámetro de un eritrocito (10.000 nm), el de una bacteria (1.000nm) o el largo de una molécula de ácido desoxirribonucleico (2 nm de ancho por 10-100 nm de largo). Esta propiedad hace que las nanopartículas puedan interactuar con entidades biológicas de interés y si son conjugadas a moléculas específicas, pueden incluso ser dirigidas a blancos específicos de manera tal de regular su acción.

1.2 Nanopartículas metálicas (NPM) para aplicaciones biomédicas

Actualmente, las líneas de investigación de nuestro laboratorio están enfocadas principalmente en la aplicación de nanopartículas de oro, tanto en forma de NPAu como de nanobarras de oro. Estas NPM tienen prometedoras aplicaciones en relación

a la entrega de fármacos, como también en el diagnóstico y tratamiento de diversas patologías como cáncer y enfermedades neurodegenerativas.⁵ Estas NPM pueden portar gran cantidad de fármacos, por lo cual pueden ser utilizadas actualmente para la entrega de fármacos de bajo peso molecular y biomoléculas más grandes como péptidos, anticuerpos o genes.⁶⁻⁸ Su pequeño tamaño les confiere la capacidad de difundir a través de barreras biológicas y penetrar en células por distintos mecanismos. Se ha observado que pueden acumularse en grandes cantidades, preferentemente en los tejidos tumorales en relación a los tejidos sanos, lo cual es debido al efecto de incremento en la permeación y retención que se da en los tumores, debido a irregularidades en el endotelio vascular.⁹ Esta irregularidad comprende un aumento en la permeabilidad de la vasculatura del tumor, lo que conlleva a una mayor extravasación y acumulación de NPM en dicho tejido.⁹ Por otro lado, estas NPM pueden ser usadas en la construcción de biosensores, en fotocatalisis y para la preparación de materiales fotoelectroquímicos y, en el campo de la biomedicina, se han implementado en imagenología, en pruebas de diagnóstico y en procesos de regulación intracelular y terapia antiinflamatoria.¹⁰ Además, las NPAu pueden ser funcionalizadas con moléculas que contengan un grupo tiol, el cual es capaz de quimisorberse sobre la superficie de éstas, formando un enlace estable S-Au. Asimismo, la superficie de oro muestra algún grado de afinidad por grupos amino, fosfito y bisulfito.⁵

Particularmente, las NPAu presentan una amplia variedad de características que las hacen adecuadas para aplicaciones en biomedicina, como su sencilla preparación, estabilidad, capacidad de incorporar componentes secundarios y principalmente el poseer propiedades ópticas, electrónicas y estructurales especiales. Estas últimas están directamente relacionadas con su tamaño nanométrico, las cuales no se dan en los materiales a nivel macrométrico. Las NPAu al interactuar con un campo electromagnético generan una oscilación coherente (misma frecuencia), entre los electrones de la banda de conducción del metal y la radiación electromagnética incidente. Esta oscilación es conocida como el fenómeno de resonancia plasmónica de superficie (RPS),¹¹ que da origen a una intensa banda de absorción detectable mediante espectrofotometría UV-Vis en la zona visible (figura 1.1). Al interactuar un

campo electromagnético con la NPAu, ésta se polariza generando oscilaciones del tipo dipolar y/o multipolar.¹² El máximo de absorbancia de la RPS es dependiente del tamaño de la NPAu. Así en NPAu con diámetros mayores a 20 nm se genera un desplazamiento hacia mayores longitudes de onda (λ) en la banda de absorción. Esto se debe principalmente a que las NPAu de mayor tamaño no pueden polarizarse homogéneamente. Para este tipo de NPAu el fenómeno de dispersión es importante, siendo parte del proceso de extinción de la luz que puede ser utilizado para generar contraste en imagenología, lo cual puede aplicarse en diagnóstico por imagen.¹² Para NPAu de diámetro menor a los 20 nm el máximo de absorbancia también se ve afectado por el tamaño de la NPAu. A medida que disminuye el tamaño de la NPAu, la absorción de la RPS sufre un desplazamiento hacia menores λ .^{13, 14} En resumen, la RPS depende de la forma de las NPAu, del tamaño, composición y también de las propiedades del medio que las rodea.^{12,15,16}

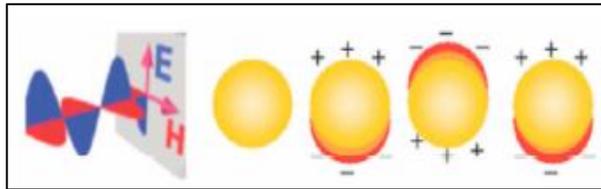


Figura 1.1: Esquema de la interacción de la radiación electromagnética con una NPAu. Un dipolo inducido oscila en fase con el campo eléctrico de la luz incidente. Extraído de la referencia 12.

Además de las propiedades radiativas de las NPAu, de diferentes formas y tamaños, estas poseen propiedades no radiativas. La radiación absorbida por las NPAu es liberada rápidamente como energía en forma de calor, debido a la pérdida de fase de la excitación coherente, provocando un incremento en la temperatura (T^0) de manera localizada.^{11,17} Así, y desde el punto de vista clínico, las NPAu han sido usadas en terapias para destruir células cancerígenas y tumores, a través de la aplicación de microondas o irradiación laser en la región del visible o infrarrojo cercano.⁵ Como se mencionó anteriormente, estas pueden responder a una radiación electromagnética con ventajosos resultados, debido a la transferencia de energía luego de ser irradiadas. De esta manera pueden calentarse permitiendo así la denominada “*cirugía molecular*”, en la que se destruyen selectivamente células tumorales o agregados tóxicos proteicos, como los involucrados en la EA.

1.3 Enfermedades neurodegenerativas como principal blanco de las NPAu

En el campo de la neurociencia, el uso de nanomateriales tiene como principales objetivos contribuir al desarrollo de nuevas terapias, también para mejorar la entrega de fármacos (en inglés *drug delivery*) y para el diagnóstico de ciertas patologías neurodegenerativas como el Parkinson, la EA y la esclerosis amitrófica lateral, entre otras. Dichas patologías se caracterizan principalmente por su aparición tardía en la vida, una extensiva pérdida neuronal, anormalidades sinápticas y la presencia de agregados de proteínas mal plegadas en el cerebro.¹⁸

La EA, principal causa de demencia en el mundo, es una enfermedad neurodegenerativa crónica y progresiva, que está descrita clínicamente como un impedimento en el aprendizaje y la memoria. Patológicamente se describe como una atrofia cerebral, indicativa por la pérdida neuronal. Las redes neurofibrilares formadas son un indicador de la EA, las cuales consisten en filamentos helicoidales intraneuronales de proteína *tau* hiperfosforilada y por placas extracelulares compuestas por el péptido β -amiloide ($A\beta$), el cual puede estar formado por 40 ó 42 residuos de aminoácidos, teniendo una elevada amiloidogénesis y toxicidad.¹⁹ Los monómeros inocuos de $A\beta$ se vuelven neurotóxicos una vez que se agregan,²⁰ dando origen a diferentes especies como oligómeros, protofibrillas, fibras amiloides, entre otras.²¹ La agregación de $A\beta$ es un proceso complejo de varios pasos, que se inicia con cambios conformacionales que incluyen agregados amiloidogénicos prefibrilares intermedios como las protofibrillas, amiloesferóides, fibras cortas, etc. Aunque se asume que la fibra madura (estado final en el proceso de agregación) es una especie tóxica, los agregados amiloidogénicos prefibrilares intermedios son aún más nocivos.²² Los agregados de $A\beta$ se generan cuando estos experimentan cambios conformacionales, que resultan en un incremento en la exposición de los residuos hidrofóbicos y, como consecuencia, reducen su solubilidad.²³ En este proceso, existe un equilibrio entre el monómero soluble y los agregados insolubles que van en crecimiento (fibrillas) y que finalmente precipitan, forzando el equilibrio hacia las formas agregadas. Aunque las mencionadas fibrillas son muy estables, es importante destacar que el proceso de agregación es de carácter reversible.²⁴ Numerosos estudios están enfocados en diagnosticar y tratar la EA a través de la detección y desagregación de agregados del

péptido A β , reduciendo su toxicidad por lo que lo convierte en un blanco terapéutico importante.

1.4 Péptido CLPFFD-NH₂ para funcionalización de las NPAu

Para que las NPAu sean efectivas desde el punto de vista clínico, deben llegar selectivamente a su blanco terapéutico, ya que de esto dependerá el éxito del tratamiento. Esto se puede lograr funcionalizando NPAu con vectores de diversos tipos, como por ejemplo proteínas, péptidos, anticuerpos o moléculas orgánicas que permitan dirigir y facilitar la llegada al blanco terapéutico. En el caso particular de la EA, es necesario dirigirlas hacia los ATA β a través de la funcionalización de estas. Entre los péptidos que permiten lo anterior se encuentran los inhibidores de la agregación, que presentan un reconocimiento por estos agregados. Estos poseen un fragmento que actúa como “elemento de reconocimiento” y un fragmento que actúa como “elemento disruptor”, lográndose así el reconocimiento y la inhibición o disrupción de la formación de agregados amiloides, para dar origen a especies no tóxicas.²⁵ Un ejemplo característico de estos péptidos es el LPFFD, denominado así por la secuencia de aminoácidos: Leu-Pro-Phe-Phe-Asp, introducido por Soto y cols.,²⁶ el cual es un derivado de la secuencia LVFFA (figura 1.2), postulada como uno de los núcleos putativos de agregación del péptido A β ₁₋₄₂ que está involucrado en el proceso de agregación.

H₂N-¹DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVI⁴²A-COOH

Figura 1.2: Secuencia peptídica de A β ₁₋₄₂. Núcleo hidrofóbico (KLVFF) señalado en verde. Extraído de la referencia 26.

El péptido LPFFD posee los residuos hidrofóbicos Leu (L), Phe (F) y Phe (F) que facilitan la interacción con el núcleo hidrofóbico de la proteína A β .⁵ A la secuencia nativa se le incorporó el aminoácido Asp, que aumenta la solubilidad del péptido en medio acuoso y le otorga anfipaticidad, debido a la presencia de un grupo polar cargado en la cadena lateral del residuo, seguido por una secuencia con residuos hidrofóbicos.⁵ Además se reemplazó la Val por la Pro con la finalidad de evitar la

formación de enlaces de hidrógeno, impidiendo así que la cadena peptídica adopte una estructura de lámina β .²⁶ Con la finalidad de conjugar las NPAu con este péptido, a la secuencia LPFFD se le incorporó una Cys en el extremo N-terminal, obteniendo el péptido final CLPFFD-NH₂.⁵ Este aminoácido permite la formación de un enlace estable con la superficie de oro a través de una quimisorción, formando el enlace S-Au.⁵ Es importante destacar que la conjugación de las NPAu con el péptido CLPFFD-NH₂, incrementa la estabilidad coloidal por efectos estéricos producidos por la disposición de las moléculas del péptido sobre la superficie de la nanopartícula (figura 1.3).⁵ Asimismo en la nanopartícula se reduce el potencial zeta de -46 mV a -39 mV, debido al reemplazo de moléculas de citrato (posee 3 cargas a pH 7,4) por moléculas del péptido que posee 1 carga a pH 7,4 (punto isoeléctrico 5,5)⁵.

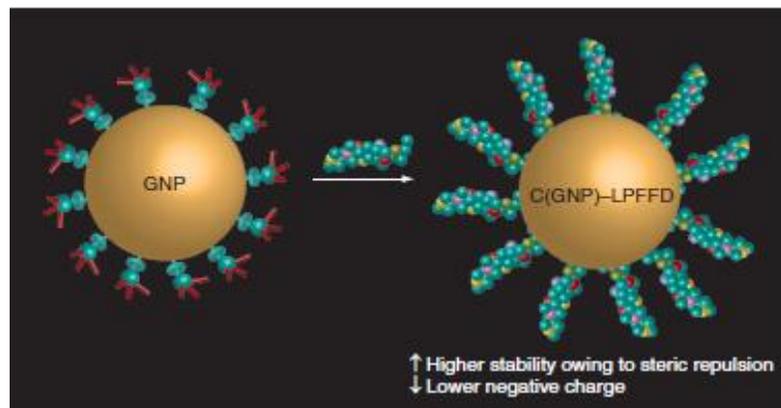


Figura 1.3: Efecto de la conjugación de la NPAu con el péptido anfipático CLPFFD-NH₂ en carga y estabilidad. Se representan moléculas de citrato recubriendo la NPAu antes de la conjugación (izquierda) y moléculas de péptido conjugadas a la NPAu luego de la conjugación (derecha). Átomos de azufre, oxígeno y carbono están representados en amarillo, rojo y azul, respectivamente. Extraído de la referencia 5.

1.5 Funcionalización de NPAu para la desagregación de los ATA β

En nuestro laboratorio se han empleado NPAu para la destrucción de ATA β involucrados en la EA, mediante el calentamiento local producido por la liberación de calor por parte de estas nanopartículas, luego de ser irradiadas con láseres o con microondas.^{27, 28} Para dirigir selectivamente a las NPAu hacia los ATA β , estas fueron funcionalizadas con el péptido CLPFFD-NH₂. Este péptido reconoce selectivamente a estos agregados, incrementando además la estabilidad de las NPAu mediante un

efecto estérico y favoreciendo ligeramente el traspaso a través de la BHE por diferentes mecanismos.^{5, 27} En un estudio realizado por Kogan y cols.²⁷, el conjugado NPAu-CLPFFD fue incubado a una solución de péptido $A\beta_{1-42}$, obteniéndose así complejos de fibras amiloides unidas a las NPAu (figura 1.4, parte superior). Estos complejos fueron irradiados con microondas a muy baja potencia (0,1 W) produciéndose la desagregación (figura 1.4, parte inferior). Mediante este tratamiento se produjo la transferencia de energía por absorción y disipación local de la energía, produciendo la desagregación de los $ATA\beta$.²⁷ Las NPAu actuarían como una especie de antena que concentra localmente la energía en el blanco deseado sin producir un aumento significativo de la T^0 en el entorno.²⁷

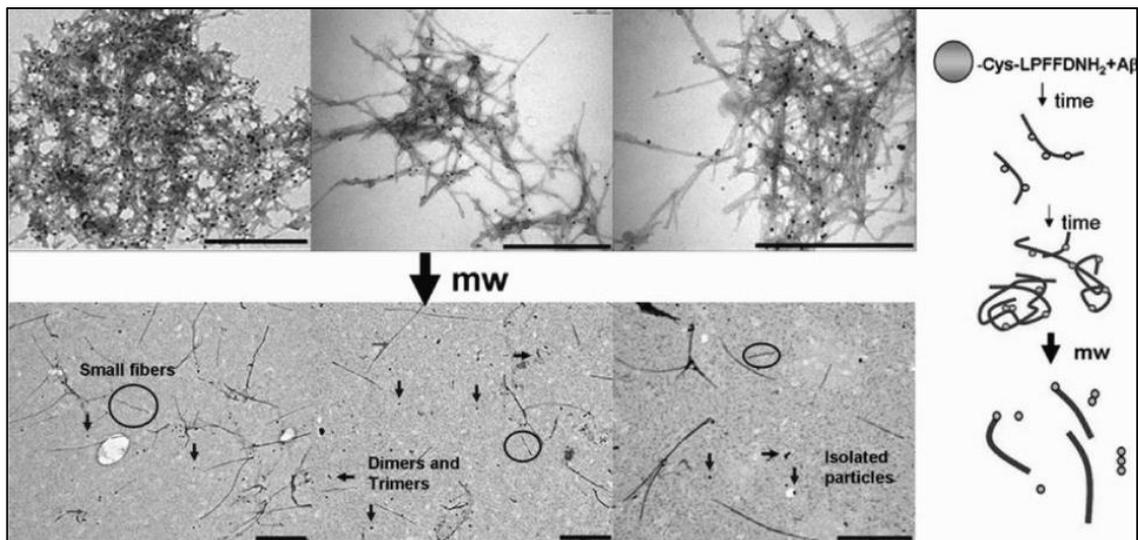


Figura 1.4: imágenes de TEM de muestras de $A\beta_{1-42}$ en presencia de NPAu-CLPFFD. A) Imágenes TEM de NPAu-CLPFFD después de la incubación del conjugado con $A\beta_{1-42}$ 10 μ M por 48 horas. B) Imágenes del conjugado anterior unido a $A\beta_{1-42}$ después de 8 horas de irradiación. Extraído de la referencia 27.

1.6 Estrategias farmacéuticas para aumentar la biodisponibilidad hacia el sistema nervioso central (SNC)

1.6.1 NPAu y los factores que influyen en su biodisponibilidad para llegar al SNC

Al referirse al uso de estas NPAu en aplicaciones farmacéuticas, se deben considerar diversos factores que puedan generar alguna interacción inespecífica que altere la penetración, biodisponibilidad y toxicidad de la nanopartícula. Además de la vía de administración y farmacocinética, la estabilidad de la NPAu en el organismo juega un rol primordial, debido a que la primera interacción entre la nanopartícula y los constituyentes de la membrana determinarán su tránsito hacia y dentro de las células. La estabilidad de la NPAu depende del tamaño, forma, carga y tipo de recubrimiento de ella. A su vez, el tamaño de la NPAu afecta tanto la velocidad como la vía de depuración desde el organismo. Por otro lado, tanto la hidrofobicidad como la carga negativa neta de las NPAu lleva a que éstas sean mayoritariamente retenidas por elementos celulares (ej. macrófagos) del sistema retículo endotelial (SRE), las que posteriormente son acumuladas en hígado y bazo, llevando a una disminución de la biodisponibilidad a nivel cerebral.⁵ Además, la carga superficial es determinante para su comportamiento biológico. Se ha descrito que las nanopartículas catiónicas son más citotóxicas e inducen efectivamente procesos de hemólisis y agregación plaquetaria, en comparación a las aniónicas o neutras.²⁹

La interacción de las NPAu con proteínas presentes en el medio (plasma o medio de cultivo celular) es un factor importante, en cuanto a la biodisponibilidad y es determinante en la formación de la “corona de proteínas”. Este concepto tiene una influencia en propiedades de superficie, carga, hidrofobicidad y estabilidad coloidal de las NPAu. Un ejemplo interesante que da cuenta de cómo la corona de proteínas puede afectar a la biodistribución, es a través de la conjugación de estas NPAu con el péptido CLPFFD-NH₂. Este conjugado llega al SNC en mayor proporción respecto de las NPAu recubiertas con citrato.⁵ Esto puede ser explicado en función de sus características fisicoquímicas: en primer lugar, la adsorción de proteínas plasmáticas específicas como por ejemplo Apolipoproteína E, contribuirían a la transcitosis mediada por receptores favoreciendo la llegada al cerebro; en segundo lugar, el aumento del

carácter anfílico de la partícula funcionalizada favorecería el paso a través de la BHE mediante difusión pasiva y en tercer lugar, la disminución en el valor absoluto del potencial zeta contribuiría a una reducción en la retención de la partícula por parte del SRE, incrementando la biodisponibilidad de estas NPAu.³⁰

1.6.2 Inhibición de mecanismos de eflujo para aumentar biodisponibilidad al SNC

Uno de los grandes desafíos con respecto al uso de agentes farmacéuticos en el tratamiento de la EA es sortear la BHE. Esta barrera es altamente selectiva y aísla al SNC del resto del organismo. Los capilares del cerebro que forman esta barrera tienen la función de restringir el movimiento de moléculas y células entre la sangre y el cerebro, brindando de esta manera una defensa natural frente a tóxicos o agentes infecciosos circulantes. Moléculas pequeñas con adecuada lipofilidad, peso molecular y carga, pueden difundir desde la sangre al SNC. Sin embargo, la mayoría de las moléculas pequeñas, proteínas y péptidos no son capaces de cruzarla.³¹

Esta barrera consta de células endoteliales del cerebro que recubren los microvasos cerebrales. Existen también otros tipos celulares rodeando al endotelio, como los astrocitos y los peritrocitos.³² La BHE es una barrera relativamente impermeable debido a la presencia de uniones estrechas (en inglés *tight junctions*), formadas por moléculas de adhesión celular entre las células endoteliales capilares. Las células endoteliales cerebrales además poseen algunas vías de transporte alternativo (ej., fenestraciones, canales transendoteliales, vesículas pinocíticas), que además expresan altas cantidades de transportadores de eflujo, como por ejemplo la glicoproteína P (P-gp). Además, esta barrera tiene sistemas enzimáticos que protegen al SNC de agentes externos a través de ecto y endo enzimas presentes dentro de las células endoteliales, las que degradan solutos que cruzan la membrana celular. De esta manera para atravesar esta barrera, la mayoría de las moléculas deben interactuar con transportadores específicos y/o receptores expresados en el lado luminal de las células endoteliales, o bien atravesarla por mecanismos pasivos.³³ Por otro lado, las células endoteliales cerebrales expresan una alta cantidad de transportadores de eflujo. La P-gp es uno de los principales exponentes de esta familia de transportadores y está involucrada en la regulación de la entrada de moléculas al cerebro, promoviendo la

liberación luminal de estos compuestos, convirtiéndolos en un constituyente importante en la remoción de sustancias dañinas para el SNC, disminuyendo el riesgo de potenciales efectos tóxicos.³⁴

Por lo tanto las estrategias existentes para la entrega de principios activos al SNC se basan en la modificación química de éstos, con el fin de aprovechar los sistemas de transporte que se encuentran en la BHE, como también eludiendo los sistemas de eflujo presentes en esta.

1.7 Uso de copolímeros anfifílicos para mejorar la entrega de fármacos al SNC

Con el propósito de ser utilizados en terapia y/o entrega de fármacos hacia el SNC, es necesario que las NPAu atraviesen la BHE. De hecho estas pueden cruzarla, pero en una muy pequeña proporción en relación a la dosis administrada, como fue demostrado en un estudio donde se utilizó NPAu de 12 nm de diámetro, administradas intraperitonealmente en ratón en nuestro laboratorio³⁵. En concordancia con lo mencionado, estudios realizados por otros autores que utilizaron NPAu de 10 o de 15 nm, revelaron que estas presentaban una distribución amplia en diferentes órganos luego de ser administradas, siendo en mayor concentración en hígado y bazo, encontrándose en menores proporciones en pulmón, riñón, corazón y cerebro.^{36,37} La baja proporción de NPAu que llega al SNC posterior a la administración, puede deberse a muchos factores y no sólo al traspaso a través de membranas. Como se mencionó anteriormente, uno de los factores que dificulta la entrega de NPAu al SNC, es su retención por el SRE, evitándose así que las mismas lleguen al órgano deseado. Por otro lado, la existencia de un transportador de eflujo transmembranal, que utiliza energía generada a partir de la hidrólisis de ATP, la P-gp, estaría involucrada en el impedimento de la llegada de las NPAu al SNC. La actividad de este transportador ha sido involucrada en reducir la exposición de un gran número de fármacos a la circulación sistémica y a órganos de importancia biológica como el cerebro³⁸. La inhibición de su actividad ha demostrado un incremento en la exposición de los fármacos en la circulación y en varios tejidos.^{39,40}

De esta forma, es de gran importancia encontrar un método viable y eficiente para mejorar la llegada de las NPAu al cerebro a través del paso por la BHE. Una estrategia emergente para aumentar la entrega de fármacos al SNC, es mediante la co-administración de un modulador farmacológico que inhiba los sistemas de transporte de eflujo, expresados en diversas células. Un ejemplo de lo anterior es el uso de copolímeros de carácter anfifílico, para los cuales se ha demostrado que tienen la capacidad de inhibir transportadores de eflujo expresados en distintos tipos de células, mejorando la acumulación de ciertos fármacos en su interior. Estos copolímeros son los poloxámeros, donde el Pluronic® (nombre comercial y propietario de los poloxámeros), copolímero lineal de 3 bloques compuestos por polioxietileno (sigla en inglés PEO) y polioxipropileno (sigla en inglés PPO), los cuales fueron el principal foco de este estudio (Figura 1.5).

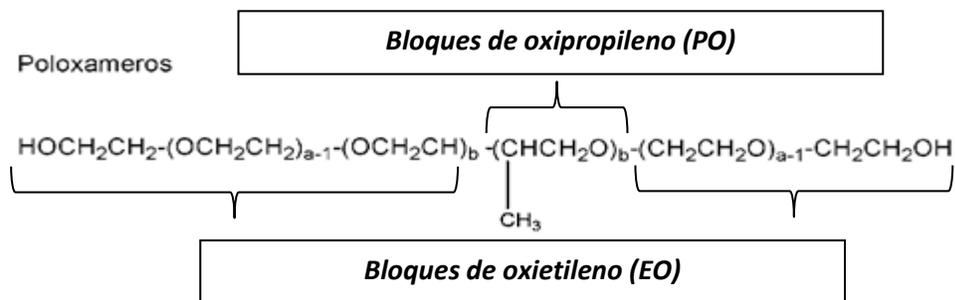


Figura 1.5: Estructura de los poloxámeros. Extraído de la referencia 41.

Dada su alta biocompatibilidad y aprobación de su uso por la *Food and Drug Administration* y la Agencia de Medicina Europea para dispositivos médicos y farmacéuticos, estos copolímeros han sido aplicados en el área de entrega de fármacos y en la ingeniería tisular.⁴¹

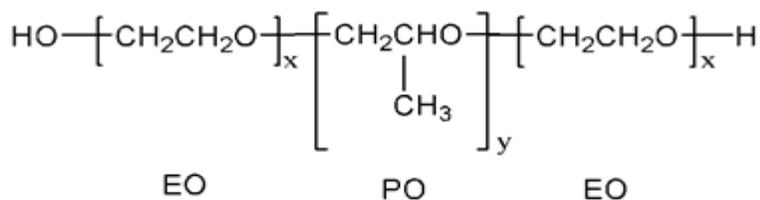
Asimismo los copolímeros anfifílicos son compuestos utilizados usualmente como excipientes para solubilizar y mejorar la entrega de fármacos.⁴²⁻⁴⁴ Además, presentan propiedades tensoactivas, incluyendo la habilidad de interactuar con superficies hidrofóbicas y membranas biológicas. Estos polímeros no iónicos han sido considerados adecuados para el uso como vehículos para la entrega de fármacos, gracias a su capacidad de formar micelas en el rango de los nanómetros, con la

ventaja de una mayor estabilidad termodinámica y cinética sobre otros surfactantes convencionales.⁴⁵

Los Pluronic[®] son compuestos anfífilos por naturaleza. Poseen una configuración A-B-A: EO_{n/2}-PO_m-EO_{n/2} (tabla 1), donde el bloque hidrofóbico PO (B) está flanqueado por dos bloques hidrofílicos EO (A).⁴⁶ El largo relativo de los bloques hidrofílicos e hidrofóbicos determina propiedades, tales como la concentración micelar crítica (CMC, concentración a la cual se comienzan a formar las micelas), balance hidrofílico-lipofílico (sigla en inglés HLB; balance del tamaño y fuerza de los grupos hidrofílicos y lipofílicos de un surfactante), número de agregación (número de moléculas de copolímero que forman una micela) y forma de las micelas (esféricas, cilíndricas, etc).^{46,47}

Pluronic [®]	Número promedio de unidades de EO	Número promedio de unidades de PO	Relación PO/EO	HLB	CMC (M)
L121	10,00	68,28	6,82	1	1,0x10 ⁻⁶
P85	52,27	39,66	0,76	16	6,5x10 ⁻⁵
F127	200,45	65,17	0,32	22	2,8x10 ⁻⁶

Tabla 1: Características fisicoquímicas de los Pluronic[®] obtenidos a partir de la referencia 44.



Poloxámero	Estructura	Peso molecular
Pluronic [®] L121	EO ₅ -PO ₆₈ -EO ₅	4400
Pluronic [®] P85	EO ₂₆ -PO ₄₀ -EO ₂₆	4600
Pluronic [®] F127	EO ₁₀₀ -PO ₆₆ -EO ₁₀₀	12600

↑
Aumento de la hidrofobicidad
(HLB disminuye)

Figura 1.6: Esquema de los poloxámeros a estudiar (Pluronic[®] L121, P85 y F127), los cuales contienen 2 bloques hidrofílicos EO y 1 bloque central hidrofóbico PO. Extraído de la referencia 44.

Estudios en células cancerosas resistentes a múltiples fármacos (con sigla en inglés MDR), células epiteliales intestinales polarizadas (Caco-2) y monocapas polarizadas de células endoteliales de la microvasculatura cerebral (sigla en inglés BMVEC), proveen la clara evidencia de que algunos Pluronic[®] son capaces de inhibir transportadores de eflujo.⁴⁸ Se ha encontrado que estos copolímeros aumentan la acumulación de la sonda fluoresceína en estas células, sugiriendo una posible inhibición de estos transportadores presentes en la BHE.⁴⁹ Por otra parte, estos estudios sugieren que la co-administración con estos copolímeros aumenta la permeabilidad de un amplio espectro de fármacos hacia la BHE. Los efectos producidos por estos copolímeros en transportadores de eflujo, como P-gp y en las proteínas asociadas a la resistencia a múltiples fármacos (sigla en inglés MRP), en BMVEC se presentaron principalmente a concentraciones por debajo de su CMC.^{48,50} Particularmente, la exposición de BMVEC a concentraciones de Pluronic[®] P85 bajo la CMC, resultó en un incremento en la acumulación intracelular de rodamina 123 (sustrato de la P-gp), consistente en la inhibición de la P-gp. Por otro lado, en el mismo estudio se observó que a concentraciones superiores a la CMC de Pluronic[®] P85, los niveles intracelulares de rodamina 123 no se vieron aumentados.⁴⁴ En base a estos antecedentes se sugirió que los monómeros son los responsables de la inhibición de los sistemas transportadores de eflujo de P-gp y MRP, y que las micelas formadas, cuando se utiliza una concentración por sobre la CMC, podrían estar involucradas en un atrapamiento de los principios activos, impidiendo que atraviesen la membrana hacia el espacio intracelular.

El grupo de Kabanov ha investigado intensamente la inhibición de diferentes transportadores de eflujo sobre-expresados en células MDR, con un amplio espectro de poloxámeros y han determinado las características estructurales que gobiernan el proceso de inhibición. Dos mecanismos son los principalmente involucrados, por una parte la marcada disminución de los niveles intracelulares de ATP, por la incorporación de las moléculas de copolímeros y la perturbación de diferentes vías metabólicas, y por otra la fluidificación y la disminución de la microviscosidad de la membrana, que altera la conformación de los transportadores como también su unión a ATP.⁵¹ Un estudio reciente confirmó que los poloxámeros cruzan rápidamente la membrana plasmática de células MDR, posteriormente localizándose en la mitocondria e inhibiendo etapas de la

cadena respiratoria y disminuyendo el consumo de oxígeno.⁴⁴ No obstante, el mecanismo de pasaje a través de la barrera no está claro, pudiendo ser por difusión pasiva o por endocitosis.⁵² *En la presente memoria se propuso como objetivo evaluar si los copolímeros que se encuentran recubriendo NPAu conjugadas al péptido CLPFFD-NH₂, aumentan el pasaje de las mismas a través de modelos de membranas biológicas y producen cambios en su permeabilidad.*

Las interacciones de tipo biofísicas entre los poloxámeros y las membranas biológicas son cruciales para el pasaje a través de ellas, tanto en procesos de difusión como para endocitosis. En estudios previos se ha demostrado que el número de unidades de PO, es el parámetro crítico que gobierna la asociación de los poloxámeros con las bicapas lipídicas.^{53,54} Monómeros de Pluronic® con bloques PO muy cortos (ej. F38 con 15 unidades de PO) y con un radio hidrodinámico más pequeño (7 Å) que las colas hidrofóbicas de la bicapa lipídica (aprox. 20 Å), probablemente se intercalan en la membrana celular, con sus dos bloques externos EO expuestos a la superficie.⁵⁵ Por otro lado en el mismo estudio, cuando se analizaron polímeros con un bloque PO más largo (ej. F88 con 39 unidades de PO y un radio hidrodinámico de aprox. 15 Å), los resultados sugirieron que las cadenas de copolímero abarcaban la bicapa lipídica.⁵⁵

En este estudio se analizaron tres copolímeros con diferentes relaciones PPO/PEO lo cual le brinda al polímero diferentes valores de HLB y CMC (ver tabla 1 y figura 1.6). Los resultados obtenidos pueden brindar información acerca de la relación entre sus características fisicoquímicas y la capacidad de producir efectos sobre modelos de membranas biológicas, lo cual podría contribuir a mejorar el pasaje de nanopartículas.

1.8 Respecto a la síntesis de NPAu

Las NPAu fueron sintetizadas mediante el método de reducción de ácido tetracloroaurico (III) (HAuCl₄) con citrato trisódico dihidratado (Na₃C₆H₅O₇ x 2H₂O) como agente reductor y estabilizante. Esta síntesis fue propuesta por Turkevich y col.⁵⁶ en el año 1951 y sigue siendo uno de los métodos más utilizados para obtener NPAu homogéneas en cuanto a tamaño y forma. En esta síntesis el citrato juega dos roles fundamentales, por una parte es el agente reductor y por otra es el agente

estabilizante. Kumar y cols.⁵⁷ propusieron un modelo para explicar el proceso de formación de las NPAu en presencia de citrato. En primer lugar destacaron la reducción en solución de Au^{+3} a Au^+ por el citrato, el cual oxida formando dicarboxicetona que a su vez forma grandes complejos multimoleculares con el Au^+ . Estos complejos dismutan para dar origen a Au^0 donde se adsorben iones de Au^+ , que son capaces de unirse a otras dicarboxicetonas que, en un segundo proceso de dismutación, forman complejos más grandes de átomos de oro. Estos agregados alcanzan un tamaño crítico al cual comienzan a formarse los núcleos de oro, paso identificado en la síntesis por el color azul al que se torna la solución a los pocos segundos de agregar el citrato. Finalmente las NPAu comienzan a crecer desde este núcleo adsorbiendo más átomos de Au^0 formados por dismutación.

1.9 Estudios en modelos de membranas biológicas

En general, estos estudios permiten determinar los efectos provocados sobre la integridad de estos modelos, en cuanto a alteraciones en su estabilidad y/o permeabilidad. Uno de estos métodos utiliza vesículas lipídicas unilamelares (liposomas).⁵⁸ El uso de fosfatidilcolina (FC) en estos estudios se considera adecuado, ya que asemeja a los fosfolípidos que integran los tejidos.⁵⁸ En particular, este método permite evaluar el efecto que ejercen los tensoactivos sobre la estabilidad y la permeabilidad de modelos de membranas biológicas. El hecho de que un tensoactivo altere la estabilidad de una membrana biológica puede asociarse a la solubilización de esta por la muestra. También se ha observado que algunos tensoactivos se incorporan en la membrana aumentando su permeabilidad, lo cual se asocia con la formación de agujeros hidrofílicos en las bicapas.⁵⁸ Carboxifluoresceína (CF) puede ser utilizado como marcador fluorescente para verificar alteraciones en la permeabilidad de estos modelos.⁵⁸ Antes de la incorporación del tensoactivo, la CF es inmovilizada dentro de los liposomas, reduciéndose la señal de fluorescencia debido al efecto de *quenching*. De esta manera, aumentos en la permeabilidad de la membrana significará un incremento en la intensidad de la fluorescencia, detectada dada por la salida de CF encapsulada en las vesículas. Debido a sus características anfífilas, a los poloxámeros se les asocian propiedades tensoactivas, lo que les permitiría modificar la estabilidad y/o permeabilidad de las membranas biológicas.⁴⁴

Por otro lado, existen métodos que permiten evaluar la permeabilidad de compuestos a través de modelos de membranas biológicas. El PAMPA es un método que permite predecir la permeabilidad de una muestra a través de barreras biológicas, utilizando estos modelos.⁵⁹ El PAMPA se caracteriza por ser un método sencillo, costo-eficaz y versátil con respecto a otros ensayos, pudiendo ser modificado de diferentes maneras para simular diversas barreras fisiológicas.⁶⁰ Debido a estas características, el PAMPA se ha convertido en un método muy utilizado en la industria farmacéutica, en cuanto al desarrollo de nuevas entidades farmacológicas.

1.10 Respecto al análisis termogravimétrico

Esta técnica mide el peso de una muestra frente al tiempo o a la T° , mientras se somete a un programa de T° controlada en una atmósfera específica.⁶¹ Además, sólo permite detectar procesos en los que se produce una variación de peso, asociada a procesos tales como descomposición, sublimación, reducción, desorción, absorción, etc.⁶¹ Para llevar a cabo estudios de estos procesos y así obtener una completa comprensión de lo que está ocurriendo, se requiere de análisis complementarios mediante técnicas adicionales. Para esto se combinan entre sí diferentes métodos térmicos, los cuales tienen similares programas de T° y control de atmósfera. Los métodos más utilizados de manera simultánea con la termogravimetría, son el análisis térmico diferencial (sigla en inglés DTA) y la calorimetría diferencial de barrido (sigla en inglés DSC), dando lugar a las técnicas TG-DTA y TG- DSC.^{61, 62} En esta memoria sólo se llevó a cabo análisis mediante termogravimetría.

Hipótesis:

El recubrimiento de nanopartículas esféricas de oro con copolímeros anfifílicos Pluronic[®] P85, F127 o L61, mejora su pasaje a través de modelos de membranas biológicas.

Objetivo general:

Recubrir nanopartículas esféricas de oro con copolímeros anfifílicos Pluronic[®] P85, F127 o L61, para mejorar su penetración a través de modelos de membranas biológicas.

Objetivos específicos:

- ✓ Sintetizar nanopartículas esféricas de oro de 12 nm.
- ✓ Sintetizar conjugados de nanopartículas esféricas de oro con el péptido CLPFFD-NH₂ para aplicación en Alzheimer.
- ✓ Recubrir nanopartículas esféricas de oro conjugadas con el péptido CLPFFD-NH₂ con copolímeros Pluronic[®] P85, F127 o L61.
- ✓ Caracterizar las NPAu conjugadas y recubiertas con los polímeros
- ✓ Evaluar la estabilidad y las alteraciones de permeabilidad de liposomas en presencia de los nanocompuestos (NPAu-CLPFFD/polímeros).
- ✓ Evaluar la difusión a través de membranas lipídicas por PAMPA.
- ✓ Estudiar la relación entre la estructura del polímero y su influencia en la difusión de nanopartículas a través de modelos de membrana biológica.

Capítulo 2

Materiales y métodos

2.1 Síntesis y caracterización de NPAu

2.1.1 Síntesis de NPAu de ~12 nanómetros

El material de vidrio utilizado para la síntesis fue previamente lavado con agua regia ($\text{HCl}:\text{HNO}_3 = 3:1$), para eliminar posibles trazas de metales que puedan interferir con la síntesis de NPAu. Posteriormente, el material fue enjuagado con suficiente agua Milli-Q para asegurar la eliminación total de trazas de ácidos. Para obtener NPAu de diámetro ~12 nm, se llevó a cabo una síntesis basada en el método propuesto por Turkevich y cols.⁵⁶ el cual consiste en la reducción de HAuCl_4 mediante $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$ como agente reductor y estabilizante.⁵ Un volumen de 50 mL de una solución acuosa 1 mM de HAuCl_4 , fue calentada entre 10-20 minutos hasta alcanzar un reflujo constante. Posteriormente, una alícuota de 5 mL de una solución acuosa de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 38,8 mM calentada entre 60-70°C, fue rápidamente adicionada a la solución de HAuCl_4 en reflujo, manteniendo siempre una agitación moderada y constante durante la reacción. Se dejó reaccionar durante 30 minutos. Finalizado este tiempo, se obtuvo una solución rojiza oscura, indicando la formación de las NPAu. La solución fue dejada a T° ambiente hasta enfriarse. Posteriormente, su pH fue ajustado a 7,4 con una solución de NaOH 0,2 M, filtrándose luego con filtros Millipore de acetato de celulosa 0,45 μm y conservándose a 4°C.

2.1.2 Caracterización de NPAu

2.1.2.1 Espectrofotometría de absorción molecular

Para observar la banda de RPS de las NPAu, fue llevada a cabo una caracterización mediante espectrofotometría de absorción molecular. El espectro de absorción UV-Vis de las NPAu fue obtenido a T° ambiente, con un espectrómetro Perkin Elmer modelo Lambda 25 UV/Vis. Se realizó un barrido entre 400 y 800 nm, utilizando cubetas de plástico desechable de 1 cm de paso óptico y empleándose citrato de sodio 1,2 mM como blanco en el espectrofotómetro de doble haz.

2.1.2.2 TEM

Para estudiar la morfología y homogeneidad de tamaño, las NPAu fueron caracterizadas a través de TEM realizado en un equipo JEOL JEM-1010. El espécimen fue preparado agregando 20 μL de la solución de NPAu en una rejilla de cobre recubierta con polímero *Formvar*, permitiendo posteriormente que se seque la muestra.

2.1.2.3 DLS

Las NPAu fueron caracterizadas a través de DLS, con el objetivo de determinar sus diámetros hidrodinámicos (DH) e Índices de polidispersidad (IPD). El DH y IPD fueron medidos por triplicado utilizando un equipo Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK), operando con una fuente de luz a una λ de 633 nm, a un ángulo de dispersión ajustado a 173° . Una alícuota de 1,0 mL de muestra fue colocada en una cubeta plástica de 1 cm de paso óptico (*clear disposable zeta cell*), para luego ser analizada. La medición fue realizada con un control preciso de la T° a 25°C .

2.1.2.4 Potencial zeta

La medición del potencial zeta de las NPAu fue realizada por triplicado utilizando el mismo equipo que para el DLS. Como las mediciones del potencial zeta fueron realizadas en solución acuosa, la aproximación Smolochowski fue utilizada para calcular este potencial a partir de la medición de la movilidad electroforética. La medición fue realizada con un control preciso de la T° a 25°C . Los análisis de los datos obtenidos, tanto para DLS como para potencial zeta, se llevaron a cabo usando una versión del programa *Zetasizer* facilitado por Malvern Instruments, England.

2.2 Obtención y caracterización del conjugado de NPAu con el péptido CLPFFD-NH₂

2.2.1 Preparación del conjugado NPAu-CLPFFD

La conjugación de las NPAu con el péptido CLPFFD-NH₂ fue basada en la metodología propuesta por Guerrero y cols.⁵ La relación utilizada en esta conjugación fue 20 mL

NPAu/1 mg péptido. Esta representa un exceso de péptido para maximizar el número de éstos con cada NPAu.⁵ Un volumen de 1 mL de una solución acuosa de CLPFFD-NH₂ 2 mg/mL (pH 8) fue agregada a 40 mL de solución de NPAu (obtenidas de acuerdo a como se indicó en la sección 2.1.1). El tiempo de conjugación fue de 24 horas, manteniéndose una agitación moderada con agitador magnético para favorecer la quimisorción. El conjugado NPAu-CLPFFD obtenido fue purificado primero a través de filtros Millipore de acetato de celulosa 0,45 µm y luego por diálisis durante 3 días. La diálisis se llevó a cabo en una membrana Spectra/porMWCO 6-8000 frente a una solución de citrato de sodio 1,2 mM pH 8, con una agitación moderada y constante. La solución fue renovada 6 veces. La solución purificada fue retirada de la membrana de diálisis, filtrada nuevamente a través de filtros Millipore de acetato de celulosa 0,45 µm y conservada a 4°C.

2.2.2 Caracterización del conjugado NPAu-CLPFFD

2.2.2.1 Espectrofotometría de absorción molecular

El conjugado NPAu-CLPFFD fue caracterizado mediante espectrofotometría de absorción molecular, con el fin de detectar variaciones en la banda del plasmón superficial después de la conjugación. La caracterización mediante este método fue llevada a cabo como se describe en el punto 2.1.2.1.

2.2.2.2 TEM

Para estudiar la morfología y homogeneidad de tamaño del conjugado NPAu-CLPFFD, éste fue caracterizado a través de TEM siguiendo la misma metodología descrita en la sección 2.1.2.2. El material orgánico del espécimen fue teñido con acetato de uranilo al 1%.

2.2.2.3 DLS

La caracterización del conjugado NPAu-CLPFFD mediante DLS, fue llevada a cabo siguiendo la misma metodología descrita en la sección 2.1.2.3.

2.2.2.4 Potencial zeta

La medición del potencial zeta del conjugado NPAu-CLPFFD fue realizada siguiendo la misma metodología descrita en la sección 2.1.2.4.

2.3 Obtención y caracterización del nanocompósito NPAu-CLPFFD recubierto con Pluronic[®] P85, F127 o L121

2.3.1 Preparación soluciones de Pluronic[®] P85, L121 y F127

Para estudiar la presencia y las características de recubrimiento con diferentes Pluronic[®] a distintas concentraciones en medio acuoso, fueron preparadas soluciones con concentraciones 30% sobre (>30% CMC) y bajo (<30% CMC) la CMC. Estas concentraciones se encuentran descritas en la tabla 2.1. Las soluciones de Pluronic[®] F127 y Pluronic[®] P85 fueron preparadas en agua Milli-Q. Para la obtención de una solución acuosa *stock* de Pluronic[®] L121, fue utilizada una adaptación de la técnica de precipitación/evaporación de solvente descrita en la referencia 63: 30 mg de Pluronic[®] L121 fueron disueltos en 10 mL de tetrahidrofurano. Esta solución orgánica fue agregada gota a gota a 30 mL de agua Milli-Q, manteniendo una agitación moderada y constante. Posteriormente el tetrahidrofurano fue evaporado en su totalidad mediante un rotavapor (vacío, 150 rpm, 50 °C) por 30 minutos. La solución acuosa obtenida fue reconstituida con agua Milli-Q hasta completar 30 mL.

Pluronic [®]	CMC (M)	<30% CMC (M)	>30% CMC (M)
P85	$6,5 \times 10^{-5}$	$4,6 \times 10^{-5}$	$8,4 \times 10^{-5}$
F127	$2,8 \times 10^{-6}$	$2,0 \times 10^{-6}$	$3,6 \times 10^{-6}$
L121	$1,0 \times 10^{-6}$	$7,0 \times 10^{-7}$	$1,3 \times 10^{-6}$

Tabla 2.1: Concentraciones de soluciones de Pluronic[®] P85, F127, L121 utilizadas para los recubrimientos de las NPAu y su conjugado. Se prepararon soluciones por sobre y bajo un 30% CMC de los respectivos Pluronic[®].

2.3.2 Recubrimiento de NPAu y del conjugado NPAu-CLPFFD con Pluronic[®] P85, F127 o L121

Las NPAu y el conjugado NPAu-CLPFFD (obtenido según se indicó en la sección 2.1.1 y 2.2.1, respectivamente) fueron recubiertos con Pluronic[®] P85, L121 o F127 realizando el mismo protocolo descrito a continuación para los 3 casos, utilizando sólo soluciones >30% CMC en el caso de las NPAu (a concentraciones de polímero inferiores a la CMC las NPAu precipitaron) y soluciones por sobre y debajo 30% CMC en el caso del conjugado NPAu-CLPFFD. Un volumen de 15 mL de la solución de NPAu o NPAu-CLPFFD fue centrifugado por 30 minutos a 16100 g. Posteriormente el sobrenadante fue retirado y el *pellet* fue resuspendido con 15 mL de solución de Pluronic[®]. Finalmente los productos resultantes fueron dejados en reposo por 24 horas a T^o ambiente.

2.3.3 Caracterización de los nanocompuestos

Las muestras sometidas al recubrimiento con Pluronic[®] (según se describió en la sección anterior) fueron caracterizadas de la misma manera como se describió en la sección 2.2.2.

2.4 Determinación de la concentración de NPAu en las muestras

La concentración fue determinada a través de espectrofotometría de absorción molecular, considerando el coeficiente de extinción molar de las NPAu de $2,3 \times 10^8 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y en cubetas de plástico desechable de 1 cm de paso óptico.

2.5 Análisis termogravimétrico

El análisis termogravimétrico de las muestras fue realizado en un equipo Netzsch modelo IRIS TG 209 F1, utilizando termobalanzas de Al 203, a un barrido desde 25 °C hasta 600 °C, a un régimen de calentamiento de 10 °C/min y utilizando N₂ como atmósfera inerte. Para obtener la muestra en estado sólido, fue liofilizado un volumen de 10 mL de la solución de muestra.

2.6 PAMPA

Con el fin de determinar la capacidad de los nanocompósitos de atravesar la BHE mediante difusión pasiva, fue utilizado el modelo de membrana lipídica *in vitro* PAMPA descrito por Li Di y col.⁵⁹. Este ensayo consistió en el uso de una placa aceptora de 96 pocillos provistos de filtros hidrofóbicos de polifluoruro de vinilideno, con un tamaño de poro de 0,4 μm (*Millipore Multiscreen®*) y una placa plástica donora de 96 pocillos (figura 2.1). Un volumen de 4 μL de una solución de FC en dodecano 20 mg/mL fue depositado sobre el filtro de cada pocillo de la placa aceptora. Cinco minutos fueron necesarios para que se volatilizara completamente el dodecano, formándose así la membrana de fosfolípidos. Un volumen de 300 μL de muestra y en triplicado fue depositado en los pocillos del compartimento donador. Asimismo, un volumen de 300 μL de tampón fosfato salino 10 mM pH 7,4 fue depositado en los pocillos en el compartimento aceptor. Luego el sistema fue cuidadosamente ensamblado formando un “sándwich”, de tal forma que la placa donante con la muestra quedara en el fondo, la membrana fosfolipídica artificial en medio y la placa aceptora en la parte superior, procurando que la parte inferior del filtro estuviese en contacto con las muestras. Este sistema fue cubierto e incubado a T° ambiente en una atmosfera saturada de humedad durante 24 horas, bajo agitación mecánica orbital a 170 rpm. Transcurrido este tiempo, cantidades de 200 μL de muestra fueron tomados de cada compartimento (donor y aceptor), para luego determinar la concentración a través de espectrofotometría de absorción molecular. Tiopental y L-DOPA 200 $\mu\text{g/mL}$ fueron utilizados como control positivo y negativos de permeabilidad, respectivamente. Se construyó una curva de calibración para tiopental y L-DOPA (figura 2.2). Las mediciones se realizaron utilizando un espectrofotómetro Perkin Elmer modelo Lambda 25 UV/Vis a T° ambiente, utilizando cubetas de cuarzo de 1 cm paso óptico y empleándose tampón fosfato salino 10 mM pH 7,4, como blanco en el espectrofotómetro de doble haz. La medición de la absorbancia se realizó a una λ de 519 nm en el caso de las NPAu, 525 nm para el conjugado NPAu y los nanocompósitos, 288 nm para el tiopental y 280 nm para L-DOPA. Una medición de absorbancia a las soluciones de Tiopental y L-DOPA 200 $\mu\text{g/mL}$ fue realizada previo al ensayo. El coeficiente de extinción molar

considerado para determinar la concentración de NPAu presentes en las muestras fue de $2,266 \times 10^8 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

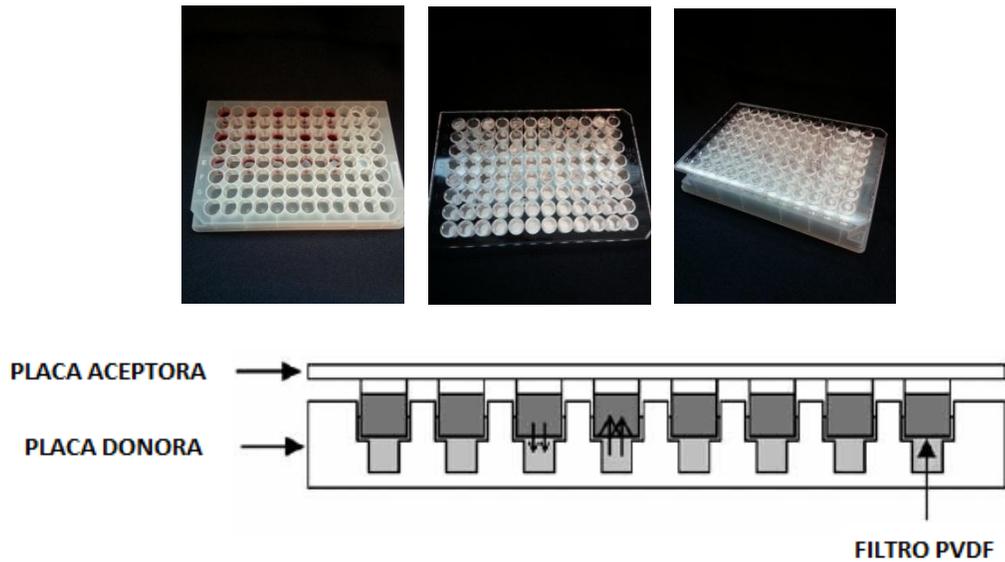


Figura 2.1: Sistema PAMPA. Parte superior: (izquierda) placa donora, (centro) placa aceptora y (derecha) sistema ensamblado. Parte inferior: esquema del sistema PAMPA.

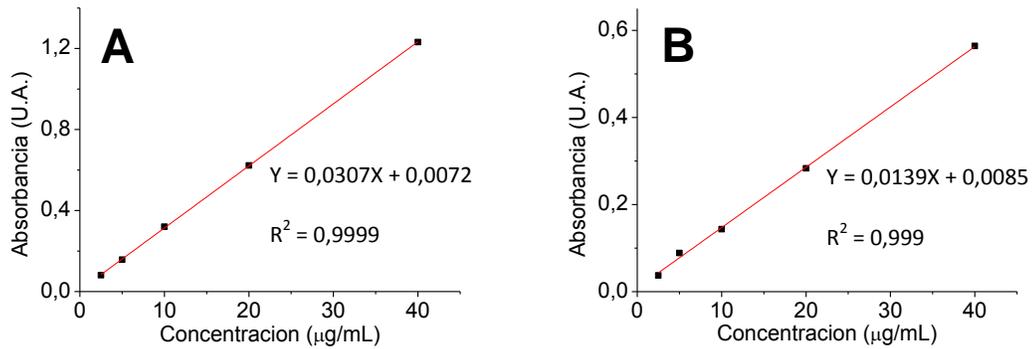


Figura 2.2: (A) Curva de calibración para tiopental. Medición por espectrofotometría a $\lambda=288 \text{ nm}$. (B) Curva de calibración para L-DOPA. Medición por espectrofotometría a $\lambda=280 \text{ nm}$.

Los cálculos de permeabilidad efectiva (P_e) se realizaron de acuerdo a lo descrito por Teixidó Turá M.⁶⁴, utilizando la ecuación N°1:

$$Pe = -\frac{218,3}{t} \times \text{Log} \left(1 - \frac{2 \times Ca(T)}{Cd(0)} \right) \times 10^{-6} \text{ cm/s}$$

Ecuación N°1

Donde t es el tiempo de incubación en horas, Ca es la concentración del compuesto en la placa aceptora al tiempo de incubación y Cd es la concentración del compuesto en la placa donora al tiempo cero (inicial).

El porcentaje de permeabilidad se determinó a partir de la ecuación N°2:

$$\% \text{ permeabilidad} = \frac{Ca}{Cd} \times 100$$

Ecuación N°2

2.7 Estudio de alteraciones en permeabilidad y estabilidad de liposomas

El estudio de la influencia que tienen los diferentes nanocompuestos, en cuanto a la permeabilidad y estabilidad de modelos de membrana lipídicas *in vitro*, fue realizado mediante un ensayo de fluorescencia utilizando CF encapsulada en liposomas de FC ($PM_{FC} = 768 \text{ g/mol}$) y un análisis mediante DLS, respectivamente.

2.7.1 Ensayo de permeabilidad de liposomas

2.7.1.1 Preparación de liposomas con CF encapsulada

Para preparar una dispersión de liposomas se debe conocer la T^0 de transición cristalina del fosfolípido, ya que es necesario trabajar por sobre esta T^0 . En el caso de la FC, su valor es de -15°C (menor a 25°C) por lo que fue posible trabajar a T^0 ambiente.

Los liposomas de FC con CF encapsulada (LCF) fueron obtenidos mediante hidratación de un film de FC, contenidos en un balón de vidrio de fondo redondo con 10

mL de una solución de CF 100 mM en tampón tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) (100 mM de NaCl, 5 mM TRIS, pH 7,4 ajustado con HCl 2 M). Agitación leve y sonicación fueron necesarios para disolver completamente el film y generar liposomas homogéneos.

El film fue formado por evaporación de una pequeña cantidad (2 mL aprox.) de mezcla homogénea e incolora de FC (~60 mg) en cloroformo utilizando un rotavapor por 1,5 - 2 horas, en un baño a 50°C, a una presión de 563 Torr y a 60 rpm. Posteriormente, para asegurar la completa evaporación del cloroformo, se dejó en desecadora al vacío durante 24 horas antes de ser hidratado.

La CF fue disuelta en NaOH 6 N. Posteriormente su pH fue ajustado a 8,3 - 8,5 con HCl 1 N, para luego ser purificada a través de una columna de separación, conteniendo Sephadex G-50 y tampón TRIS como fase móvil, con una razón de flujo constante de ~3 mL/minuto. La concentración final de la CF en tampón TRIS fue determinada por espectrofotometría de absorción molecular, considerando una λ de 492 nm y un coeficiente de extinción molar de 11600 Lmol⁻¹cm⁻¹, realizado por triplicado. La concentración de CF fue de 1,51 M.

Los LCF fueron extruidos a través de una columna de extrusión (holder 13 mm sst swinney syringe, MilliPore), para obtener tamaños de ~200 nm. Los liposomas fueron extruidos primero 10 veces por una membrana de policarbonato de 800 nm y luego por una de 200 nm del mismo material (Isopore membrane filters, filter type 0,8 μ m ATTP, 0,2 μ m GTTP, MilliPore). Con el fin de monitorear la homogeneidad de los liposomas luego de la extrusión por cada membrana, la dispersión resultante fue analizada mediante DLS. La medición fue realizada con un control preciso de la T^o a 25°C.

Con la finalidad de separar la CF libre de la encapsulada en los liposomas, fue necesaria una purificación de los LCF extruidos a través de una columna de separación conteniendo Sephadex LH-20, utilizando tampón TRIS como fase móvil con una razón de flujo constante de ~0,5 mL/minutos. Un volumen de 5,0 mL LCF fue agregado a la columna dejando que eluyera. Cantidades de 1 mL fueron recolectados y analizados por DLS (mismas condiciones del párrafo anterior), para determinar en qué fracciones

se encontraban los liposomas. Finalmente, fue recolectado un volumen de 10 mL LCF extruido y purificado.

Para determinar la concentración de los fosfolípidos, 100 μ L de LCF extruidos y purificados fueron liofilizados para luego calcular, por diferencia, la cantidad total de fosfolípidos presentes mediante la ecuación N°3:

$$\textit{masa fosfolípidos} = \textit{masa liofilizado} - \textit{masa sales tampón TRIS} - \textit{masa CF}$$

Ecuación N°3

La *masa liofilizado* corresponde a la masa del sólido obtenido por liofilización de la muestra, la *masa sales tampón TRIS* corresponde a la masa de las sales que componen el tampón, es decir TRIS y NaCl. Para liberar la CF de los liposomas y así determinar la *masa CF* en un determinado volumen de LCF, fue utilizado el surfactante dodecil sulfato de sodio (sigla en inglés SDS), empleado para solubilizar membranas lipídicas de células. Un volumen de LCF fue mezclado con SDS 10% (quedando este último al 3% en la mezcla). Posteriormente la absorbancia de la CF fue determinada por espectrofotometría de absorción molecular a una λ de 492 nm, para luego calcular la masa considerando un coeficiente de extinción molar de $11600 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y un peso molecular de CF de 582,32 g/mol, realizado por triplicado. Finalmente, la concentración de LCF extruidos y purificados fue ajustada a 5 mM de fosfolípido con tampón TRIS.

2.7.1.2 Ensayo de fluorescencia de la CF liberada

Todos los análisis fueron realizados luego de un periodo de incubación mayor a de 60 minutos. Luego de este periodo la liberación de la CF alcanza un *plateau*, permaneciendo estable por una semana.⁵⁸

Los LCF fueron mezclados de manera que se obtuviera una razón en concentración 500.000:1 (LCF : muestras) con respecto a las muestras de interés (solución de Pluronic[®] P85, F127 o L121, NPAu, NPAu-CLPFFD y nanocompuestos). Las intensidades de fluorescencia debidas a la salida de CF de los liposomas fueron medidas a 25°C con un espectrofluorímetro (SynergyMx, Biotek) a los 0, 30, 60, 180

minutos y 24 horas de incubación. A una excitación de 495 nm, fue obtenida una emisión máxima de fluorescencia de CF a 515,4 nm. Los resultados fueron obtenidos a través del programa Gen 5. Una placa de 96 pocillos de fondo oscuro para fluorescencia fue utilizada para cargar la muestra. Cada pocillo a utilizar fue cargado con 100 µL de mezcla y por triplicado. El porcentaje de liberación de CF fue determinado mediante la siguiente ecuación N°4:

$$\% CF liberada = \frac{I(t) - I(0)}{I(\infty) - I(0)} \times 100$$

Ecuación N°4

Donde $I(t)$ es la fluorescencia obtenida en el tiempo (LCF + Muestra), $I(0)$ es la fluorescencia inicial (sólo LCF) e $I(\infty)$ es la fluorescencia total (LCF + SDS, CF total de los liposomas). Para obtener $I(0)$, un pocillo fue cargado con una mezcla LCF más agua Milli-Q. Asimismo, para obtener $I(\infty)$, un pocillo fue cargado con LCF, agua Milli-Q y SDS al 3% para lisar los liposomas.

Para verificar si la CF presenta un fenómeno de *quenching* debido a la presencia de alguna de las muestras de interés, estas fueron incubadas con CF 100 mM. Una mezcla de CF 100 mM con agua Milli-Q fue utilizada como control. Posteriormente se prosiguió a realizar el ensayo de fluorescencia, como se describió previamente en esta sección.

2.7.2 Ensayo de estabilidad de liposomas e interacción con nanocompuestos

Alteraciones en la estabilidad de liposomas de FC e interacciones con los nanocompuestos fueron monitoreados por DLS. La medición fue realizada a través de un equipo Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK). Una alícuota de mezcla de liposomas con muestra de interés (solución de Pluronic® P85, F127 o L121, NPAu, NPAu-CLPFFD, nanocompuestos) a una razón de concentración 500000:1, fue cargada en una cubeta (*low volumen disposable sizing cuvette*) para luego ser analizada a los 0, 60, 180 minutos y a las 24 horas de incubación. La medición fue realizada con un control preciso de la T° a 25°C. El análisis de los datos se llevó a cabo

usando una versión del programa *Zetasizer* facilitado por Malvern Instruments, England.

2.8 Análisis estadístico

Todos los resultados están presentados como el promedio y su desviación estándar de las determinaciones realizadas. La información fue comparada mediante Prueba *t* de *Student* no pareada con la corrección de Welch (dos colas), usando el programa *Prism 5.0* (*GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA*). El criterio para la significancia estadística fue $p < 0,05$.

Capítulo 3

Resultados

3.1. Caracterización de NPAu

3.1.1 Espectrofotometría de absorción molecular

El espectro de absorción UV-Vis de las NPAu, obtenido por espectrofotometría de absorción molecular, se puede observar en la figura 3.1. Estas presentaron una longitud de onda de máxima absorbancia ($\lambda_{M\acute{a}x}$) de 519 nm, correspondiente a la banda del plasmón de resonancia característico para las NPAu de tamaños entre 10 y 20 nm.

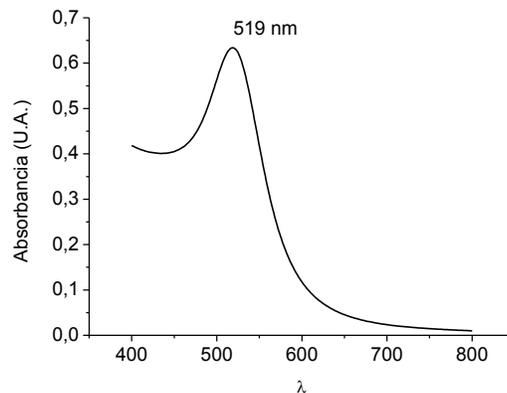


Figura 3.1: Espectro de absorción UV-Vis de NPAu estabilizadas con citrato. $\lambda_{M\acute{a}x}$ a 519 nm. Concentración de NPAu en la muestra ($n=5 \pm SD$): $2,5 \times 10^{-6} \pm 9,0 \times 10^{-7}$ mM

3.1.2 DLS

Análisis por DLS fue realizado para determinar el DH de las partículas en la dispersión coloidal, mediante fluctuaciones de la luz dispersada. En la figura 3.2 se observa el gráfico obtenido por el equipo al medir las NPAu. Se muestra además el DH promedio, la desviación estándar de las medidas y el IPD entre paréntesis. El valor promedio del DH de las NPAu fue de $20,6 \pm 0,3$ nm, con un IPD de 0,326.

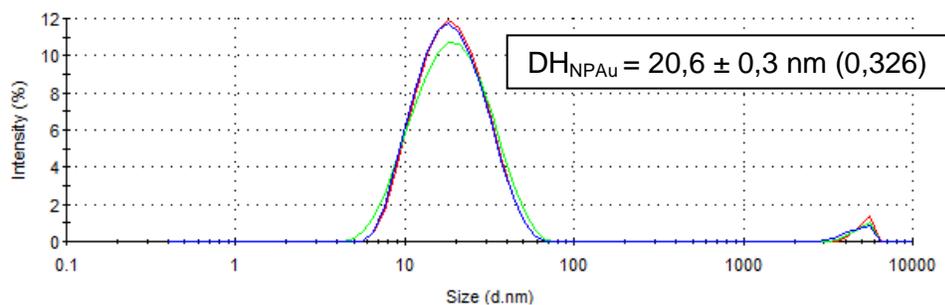


Figura 3.2: Gráficos de la distribución de tamaño de NPAu estabilizadas con moléculas de citrato determinadas mediante DLS. ($n=3 \pm DS$). Entre paréntesis el valor del IPD.

3.1.3 Potencial zeta

La siguiente caracterización de las NPAu fue la determinación de su potencial zeta a través de la determinación de la movilidad electroforética. En la figura 3.3 se presenta el gráfico del potencial zeta de tres mediciones y su desviación estándar. La carga superficial de la capa de contraiónes de las partículas, es decir el potencial zeta para estas NPAu, fue de $-45,4 \pm 0,9$ mV, siendo el pH de la solución 7,4.

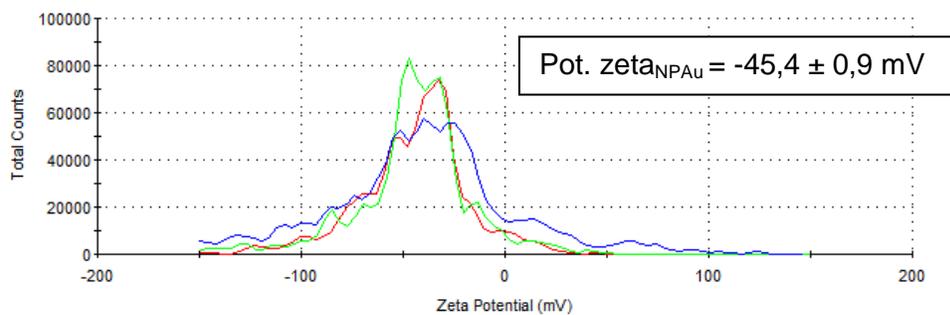


Figura 3.3: Gráficos del potencial zeta de NPAu estabilizadas con moléculas de citrato. $n=3 \pm DS$.

3.1.4 TEM

Una vez obtenido el espectro de absorción UV-Vis de las NPAu y verificada la existencia de éstas debido a la banda del plasmón característica, la muestra fue observada por TEM. En la figura 3.4 se observa una imagen de las NPAu obtenidas por este método. En el inserto se observa un histograma de tamaños realizado sobre una población de 176 partículas, donde se observa un diámetro promedio de $12,3 \pm 1,4$

nm. Como se aprecia en la misma imagen, las NPAu obtenidas fueron homogéneas en tamaño y forma.

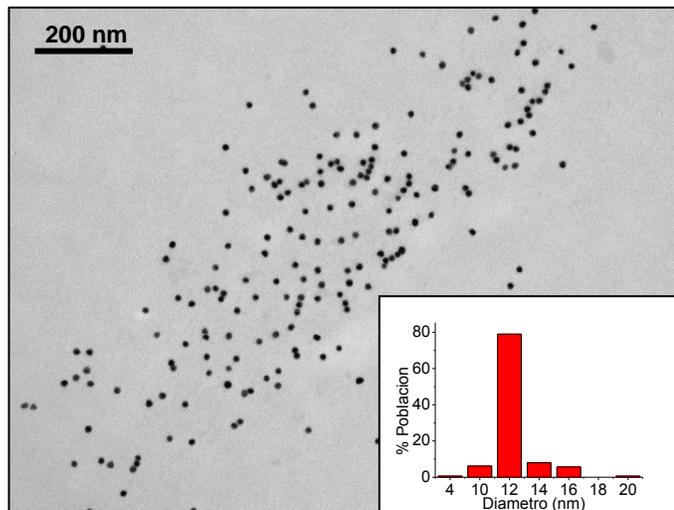


Figura 3.4: Imagen TEM de NPAu. En el inserto, un histograma de tamaños al medir el diámetro de una población de 176 partículas, obtenido de la imagen TEM.

3.2. Caracterización del conjugado NPAu-CLPFFD

3.2.1 Espectrofotometría de absorción molecular

Se observó un cambio en la banda de resonancia plasmónica hacia el infrarrojo (mayores λ), cuando las NPAu se conjugaron con el péptido CLPFFD-NH₂ (figura 3.5). En la figura 3.5 se muestran los espectros de absorción del conjugado NPAu-CLPFFD y NPAu a modo de comparación. Se observa un cambio en la $\lambda_{\text{Máx}}$ de 519 a 525 nm, correspondiente a la banda plasmónica de las NPAu y NPAu-CLPFFD, respectivamente.

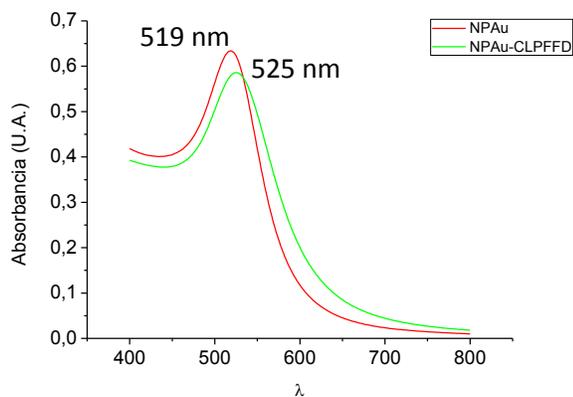


Figura 3.5: Espectro de absorción UV-Vis de NPAu (rojo), $\lambda_{M\acute{a}x}$ a 519 nm y NPAu-CLPFFD (verde), $\lambda_{M\acute{a}x}$ a 525 nm. Concentración de NPAu en las muestras ($n=5 \pm SD$): $2,5 \times 10^{-6} \pm 9,0 \times 10^{-7}$ mM

3.2.2 DLS

Este método fue utilizado para determinar el DH del conjugado NPAu-CLPFFD, mediante fluctuaciones de la luz dispersada de la dispersión coloidal. En la figura 3.6 se observa el gráfico obtenido por el equipo al medir el conjugado. Se muestra además el DH promedio, la desviación estándar de las medidas y el IPD entre paréntesis. El valor promedio del DH del conjugado NPAu-CLPFFD fue de $24,3 \pm 0,4$ nm. El DH obtenido para el conjugado fue significativamente mayor ($p < 0,05$) al obtenido mediante el mismo método, para las NPAu estabilizadas con citrato ($20,6 \pm 0,3$ nm).

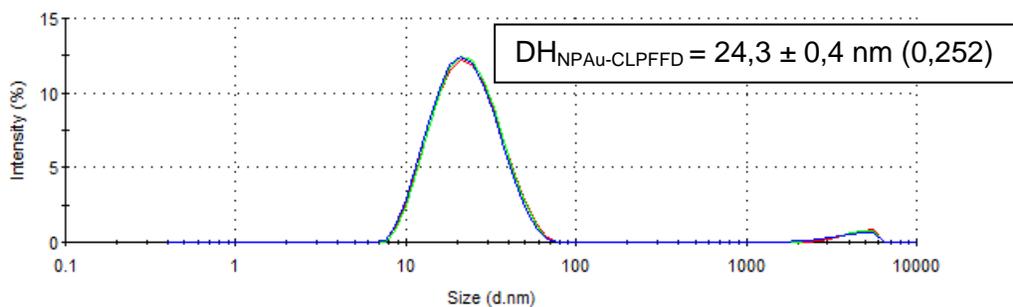


Figura 3.6: Gráficos de la distribución de tamaño del conjugado NPAu-CLPFFD determinados mediante DLS. Entre paréntesis el valor del IPD. $n=3 \pm DS$.

3.2.3 Potencial zeta

En la figura 3.7 se aprecia el gráfico del potencial zeta representativo de las mediciones realizadas a la muestra y su desviación estándar. El potencial zeta para este conjugado fue de $-39,1 \pm 0,2$ mV. La conjugación de las NPAu con el péptido CLPFFD-NH₂ redujo significativamente ($p < 0,05$) el potencial zeta promedio (en valor absoluto), con respecto a las NPAu estabilizadas con citrato (de $-45,4 \pm 0,9$ mV a $-39,1 \pm 0,2$ mV, respectivamente).

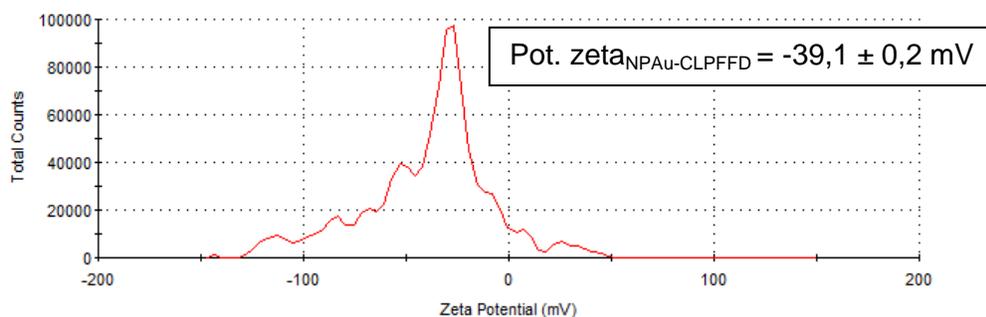


Figura 3.7: Gráfico representativo del potencial zeta del conjugado NPAu-CLPFFD. $n=3 \pm DS$.

3.2.4 TEM

Una vez obtenido el espectro de absorción UV-Vis del conjugado NPAu-CLPFFD, el DH y el potencial zeta, y posteriormente verificada la existencia de éstos, la muestra fue observada por TEM. En la figura 3.8 se muestra una imagen del conjugado NPAu-CLPFFD obtenida por este método. Se puede observar que las NPAu conjugadas al péptido CLPFFD-NH₂ mantuvieron su forma y tamaño con respecto a las NPAu. Se aprecia la ausencia de un halo teñido por acetato de uranilo al 1% alrededor de las NPAu.



Figura 3.8: Imagen representativa de TEM del conjugado NPAu-CLPFFD.

3.3 Caracterización de los nanocompuestos

En primer lugar se realizó la caracterización a través de UV-Vis, DLS, potencial zeta y TEM, de los nanocompuestos formados por las NPAu y el conjugado NPAu-CLPFFD recubiertos con Pluronic[®] P85, F127 o L121, utilizando soluciones de concentración >30% CMC. Asimismo, se caracterizaron los nanocompuestos formados por NPAu-CLPFFD empleando concentraciones de Pluronic[®] <30% CMC, mediante UV-Vis, DLS y potencial zeta (*véase siguiente sección*).

Posteriormente se realizó un análisis termogravimétrico de los nanocompuestos obtenidos del conjugado NPAu-CLPFFD, utilizando Pluronic[®] P85, F127 o L121 con concentraciones >30% CMC, ya que demostraron ser los más adecuados debido a su estabilidad y posible recubrimiento por estos copolímeros (*véase sección 4.3*). Estos mismos nanocompuestos fueron utilizados para estudiar la interacción con modelos de membranas biológicas, mediante el ensayo PAMPA y estudios de permeabilidad y estabilidad de liposomas de FC.

3.3.1 Espectrofotometría de absorción molecular

Una vez obtenidos los nanocompuestos del conjugado NPAu-CLPFFD con los diferentes Pluronic[®] en estudio, utilizando una concentración >30% CMC y

permitiendo que reposaran durante 24 horas, fue realizada una caracterización a través de espectrofotometría de absorción molecular para observar posibles cambios en la banda del plasmón superficial de los conjugados NPAu-CLPFFD, debido a una interacción entre estos poloxámeros, las nanopartículas y el péptido. En la figura 3.9 se presentan los espectros de absorción UV-Vis de las NPAu, NPAu-CLPFFD y NPAu-CLPFFD recubiertas con Pluronic[®] P85, F127 o L121, utilizando una concentración >30% CMC. De los resultados obtenidos podemos observar que para ningún caso se produjo un corrimiento de la banda plasmónica con respecto al conjugado sin recubrir ($\lambda_{M\acute{a}x}$ 525 nm). Cabe señalar que, aunque la concentración para todas las muestras era la misma ($2,5 \times 10^{-6} \pm 9,0 \times 10^{-7}$ mM), se presentó una disminución en la intensidad máxima de absorbancia (expresada en unidades de absorbancia, U.A) para los nanocompuestos, con respecto a las NPAu y su conjugado (figura 3.9 y tabla 3.1).

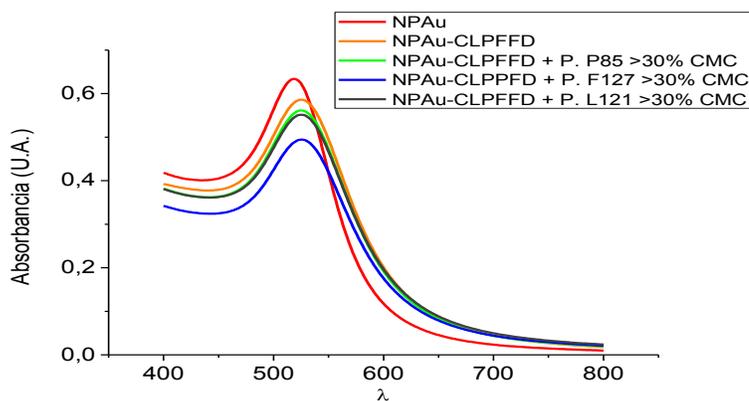


Figura 3.9: Espectros de absorción de NPAu (rojo), NPAu-CLPFFD (naranja), NPAu-CLPFFD + Pluronic[®] P85 (verde), F127 (azul) y L121 (negro), recubiertos con soluciones de Pluronic[®] con concentración >30% CMC. $\lambda_{M\acute{a}x}$ para NPAu: 519 nm. $\lambda_{M\acute{a}x}$ muestras: 525 nm. Concentración de NPAu en las muestras ($n=5 \pm SD$): $2,5 \times 10^{-6} \pm 9,0 \times 10^{-7}$ mM.

Muestra	$\lambda_{M\acute{a}x}$ (nm)	Absorbancia (U.A.)
NPAu	519	0,6339
NPAu-CLPFFD	525	0,5861
NPAu-CLPFFD + P. P85 >30% CMC	525	0,5614
NPAu-CLPFFD + P. F127 >30% CMC	525	0,4945
NPAu-CLPFFD + P. L121 >30% CMC	525	0,5516

Tabla 3.1: Resumen de la $\lambda_{M\acute{a}x}$ y absorbancia máxima (expresada en unidades de absorbancia, U.A.) para las NPAu, el conjugado NPAu-CLPFFD y para los recubrimientos con Pluronic[®] utilizando soluciones >30% CMC. $n=1$.

Fue realizada una caracterización de los nanocompositos formados por el conjugado utilizando Pluronic[®] con concentraciones por <30% CMC. En la figura 3.10 se pueden apreciar los espectros de absorción UV-Vis de estos nanocompositos, junto con los formados utilizando concentraciones por >30% CMC a modo de comparación. En ninguno de los casos se observa un corrimiento de la banda plasmónica con respecto al conjugado NPAu-CLPFFD, manteniéndose una $\lambda_{M\acute{a}x}$ de 525 nm. Es posible observar una disminución aparente en la absorbancia a la $\lambda_{M\acute{a}x}$ con respecto al conjugado (tabla 3.2).

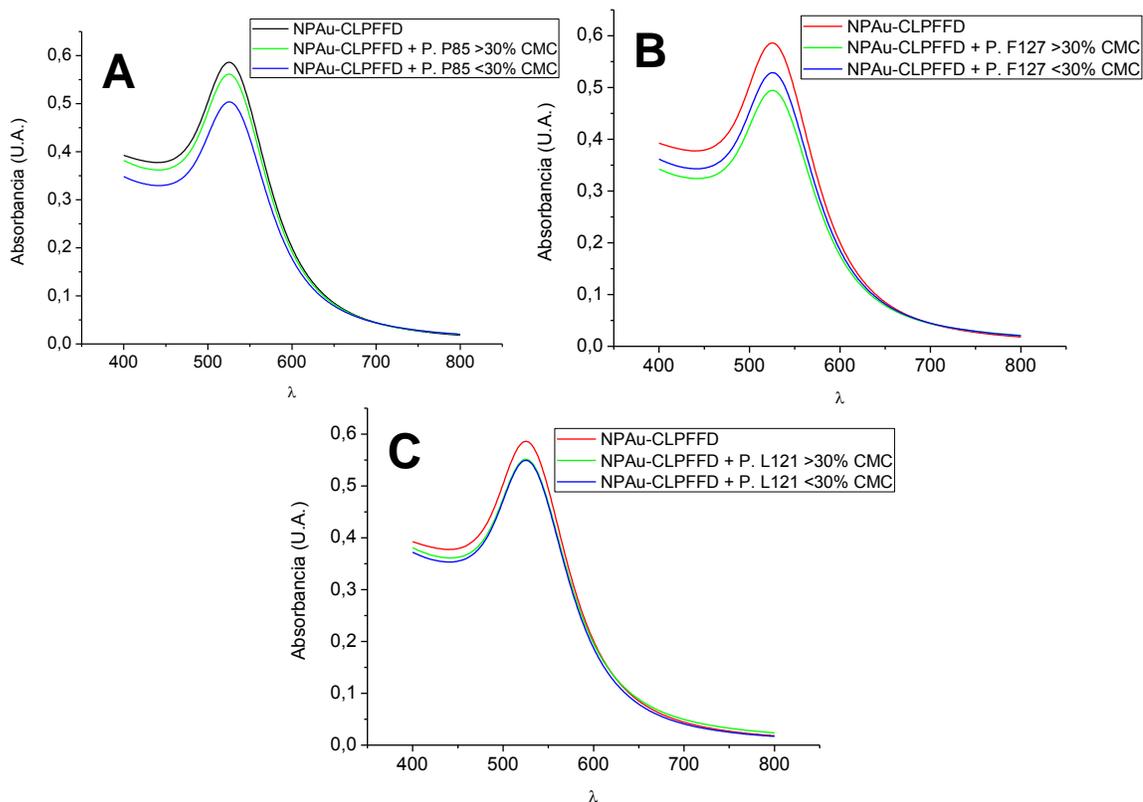


Figura 3.10: Espectros de absorción. (A) NPAu-CLPFFD (negro), NPAu-CLPFFD + Pluronic[®] P85 a una concentración por > (verde) y < (azul) 30% CMC. (B) NPAu-CLPFFD (negro), NPAu-CLPFFD + Pluronic[®] F127 a una concentración por > (verde) y < (azul) 30% CMC. (C) NPAu-CLPFFD (negro), NPAu-CLPFFD + Pluronic[®] L121 a una concentración por > (verde) y < (azul) 30% CMC. Concentración de NPAu en las muestras ($n=5 \pm SD$): $2,5 \times 10^{-6} \pm 9,0 \times 10^{-7}$ mM.

Muestra	$\lambda_{M\acute{a}x}$ (nm)	Absorbancia (U.A.)
NPAu-CLPFFD	525	0,5861
NPAu-CLPFFD + P. P85 <30% CMC	525	0,5036
NPAu-CLPFFD + P. F127 <30% CMC	525	0,5287
NPAu-CLPFFD + P. L121<30% CMC	525	0,5494

Tabla 3.2: Resumen de la $\lambda_{M\acute{a}x}$ y absorbancia máxima (expresada en unidades de absorbancia, U.A.) para los productos de recubrimiento con Pluronic[®] utilizando soluciones con concentración <30% CMC. n=1.

En la figura 3.11 se encuentran los espectros de absorción de las NPAu sometidas al proceso de recubrimiento con Pluronic[®], utilizando concentraciones >30% CMC. Se observa para los 3 casos, que al recubrir NPAu con Pluronic[®] se produce un corrimiento de la banda plamónica hacia mayores λ , con respecto a las NPAu estabilizadas con citrato. Se observa también para los tres casos una disminución importante en la absorbancia a la $\lambda_{M\acute{a}x}$ con respecto a las NPAu (tabla 3.3).

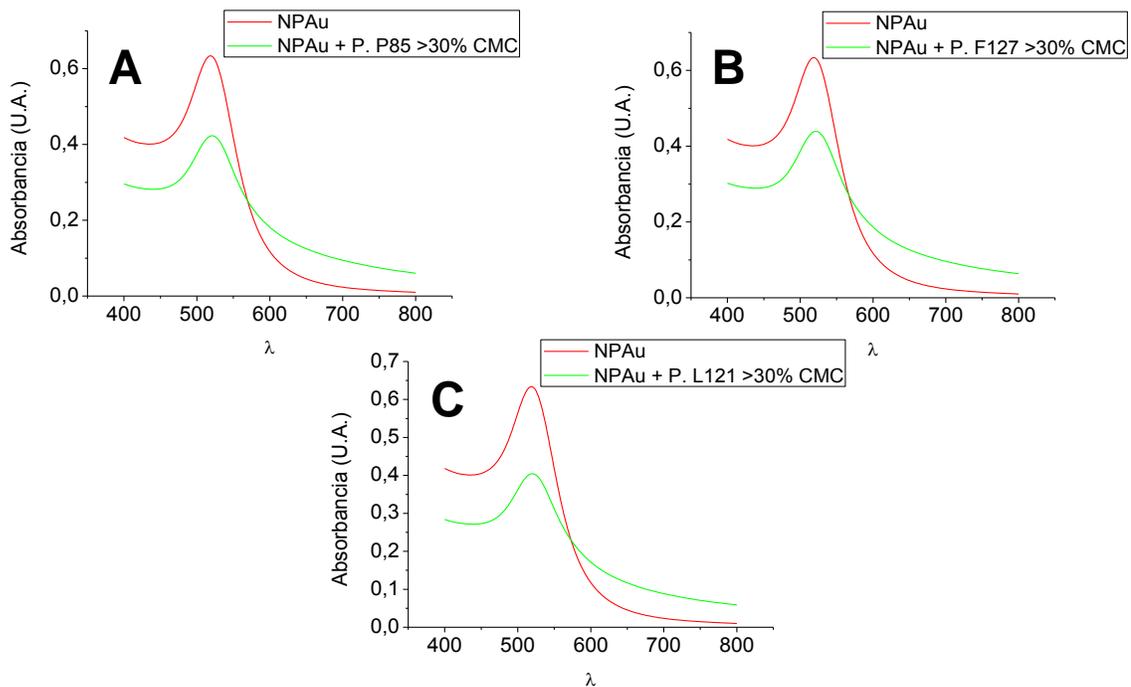


Figura 3.11: Espectros de absorción. (A) Espectros de NPAu (rojo) y NPAu + Pluronic[®] P85 (verde). (B) Espectros de NPAu (rojo) y NPAu + Pluronic[®] F127 (verde). (C) Espectros de NPAu (rojo) y NPAu-CLPFFD + Pluronic[®] L121 (verde). Para todos los casos se utilizó una solución de concentración >30% de Pluronic[®]. CMC Concentración de NPAu para la muestra NPAu (n=5 \pm SD): $2,5 \times 10^{-6} \pm 9,0 \times 10^{-7}$ mM. Concentración de NPAu para los nanocompuestos (n=5 \pm SD): $5,0 \times 10^{-6} \pm 9,0 \times 10^{-7}$ mM.

Muestra	$\lambda_{M\acute{a}x}$ (nm)	Absorbancia (U.A.)
NPAu	519	0,6339
NPAu + P. P85 >30% CMC	521	0,4230
NPAu + P. F127 >30% CMC	522	0,4391
NPAu + P. L121 >30% CMC	520	0,4044

Tabla 3.3: Resumen de la $\lambda_{M\acute{a}x}$ y absorbancia máxima (expresada en unidades de absorbancia U.A.) para NPAu y los productos de recubrimiento con Pluronic[®] de NPAu, utilizando soluciones con concentración >30% CMC. n=1.

3.3.2 DLS

Para detectar cambios en el DH al recubrir NPAu y su conjugado con Pluronic[®], fue llevado a cabo un análisis mediante DLS. Los gráficos correspondientes a la distribución del DH de NPAu-CLPFFD recubiertas con Pluronic[®] utilizando concentraciones >30% CMC, NPAu-CLPFFD recubiertas con Pluronic[®] utilizando concentraciones <30% CMC y NPAu recubiertas con Pluronic[®] utilizando concentraciones >30% CMC se presentan en la figura A.1, A.2 y A.3 (véase *anexo*), respectivamente. Se adjunta el DH promedio, la desviación estándar de las medidas y el IPD entre paréntesis a cada figura. Mediante los resultados obtenidos por DLS (tabla 3.4), se puede apreciar un aumento de tamaño significativo ($p < 0,05$) de todos los nanocompuestos con respecto al conjugado, utilizando tanto concentraciones por sobre como por debajo de un 30% CMC. El tamaño hidrodinámico del nanocompuesto NPAu-CLPFFD + Pluronic[®] F127 utilizando una concentración >30% CMC, alcanzó un tamaño significativamente mayor ($p < 0,05$), en comparación a todas las demás muestras de nanocompuestos compuestos por el conjugado NPAu-CLPFFD recubierto con Pluronic[®]. Todas las demás muestras (excluyendo a NPAu-CLPFFD + Pluronic[®] F127 utilizando una concentración >30% CMC) compuestas por el conjugado y Pluronic[®], no presentaron diferencias significativas entre ellas ($p < 0,05$).

Se observa de los resultados obtenidos para las NPAu recubiertas con Pluronic[®] P85, F127 o L121 a concentraciones >30% CMC la aparición de nanopartículas con un DH casi el doble de las NPAu estabilizadas con citrato, como también la aparición de nanopartículas más pequeñas (tabla 3.4, figura A.3 y A.10, véase *anexo*). Según los datos obtenidos por el equipo, estas nanopartículas de menor tamaño son las que se

encuentran en mayor proporción en comparación a las más grandes (Figura A.10, véase *anexo*).

Muestra	Concentración Pluronic® utilizada	DH (nm)	IPD
NPAu	-	20,6 ± 0,3	0,326 ± 0,043
NPAu-CLPFFD	-	24,3 ± 0,4	0,252 ± 0,006
NPAu-CLPFFD + P. P85	> 30% CMC	27,0 ± 0,2	0,244 ± 0,007
NPAu-CLPFFD + P. F127		32,4 ± 1,3	0,279 ± 0,036
NPAu-CLPFFD + P. L121		26,5 ± 0,1	0,315 ± 0,004
NPAu-CLPFFD + P. P85	<30% CMC	26,8 ± 0,4	0,236 ± 0,008
NPAu-CLPFFD + P. F127		26,4 ± 0,1	0,251 ± 0,004
NPAu-CLPFFD + P. L121		26,3 ± 0,5	0,258 ± 0,006
NPAu + P. P85	>30% CMC	50,7 ± 1,2 2,3 ± 0,4	0,648 ± 0,036
NPAu + P. F127		52,1 ± 2,3 3,0 ± 0,1	0,630 ± 0,041
NPAu + P. L121		61,1 ± 3,0 2,2 ± 0,3	0,546 ± 0,006

Tabla 3.4: Resumen de los DH de los productos del recubrimiento de NPAu y NPAu-CLPFFD con Pluronic®. n=3 ± DS.

3.3.3 Potencial zeta

El potencial zeta de una partícula se puede ver influenciado por diferentes condiciones del medio como por ejemplo pH, constante dieléctrica de la solución y modificación de la carga superficial por un recubrimiento. Debido a esto, un análisis del potencial zeta fue llevado a cabo a los diferentes nanocompuestos, con el fin de observar cambios en la magnitud del potencial de la capa de contracciones formada alrededor de las nanopartículas. En las figuras A.4, A.5 y A.6 (*véase anexo*) se muestran los gráficos obtenidos de potencial zeta de tres mediciones realizadas, correspondiente a NPAu-CLPFFD recubiertas con Pluronic®, utilizando concentraciones por sobre y por debajo un 30% CMC y NPAu recubiertas con Pluronic® utilizando concentraciones >30% CMC. Se adjunta el potencial zeta promedio y la desviación estándar de las medidas a cada figura. Según la tabla 3.5 se puede observar que para los nanocompuestos formados por NPAu-CLPFFD más Pluronic®, utilizando concentraciones >30% de la

CMC, existe una reducción significativa ($p < 0,05$) en el valor absoluto del potencial zeta para Pluronic® F127, con respecto al conjugado de $-39,1 \pm 0,2$ mV a $-33,5 \pm 0,2$ mV, no así para Pluronic® P85 ni L121, donde no se observaron cambios significativos ($p < 0,05$) en este potencial. Para los nanocompuestos formados por NPAu-CLPFFD más Pluronic® P85, F127 o L121 utilizando concentraciones $<30\%$ CMC, no se observaron cambios significativos ($p < 0,05$) del potencial zeta, con respecto al conjugado sin recubrir. En cuanto al recubrimiento de NPAu con Pluronic® P85, F127 o L121 utilizando concentraciones $>30\%$ CMC, se puede observar que se produjo una reducción significativa marcada ($p < 0,05$) en el potencial zeta (en valor absoluto) en comparación a su contraparte, las NPAu estabilizadas con citrato.

Muestra	Concentración Pluronic® utilizada	Potencial zeta (mV)
NPAu	-	$-45,4 \pm 0,9$
NPAu-CLPFFD	-	$-39,1 \pm 0,2$
NPAu-CLPFFD + P. P85	$> 30\%$ CMC	$-39,4 \pm 0,2$
NPAu-CLPFFD + P. F127		$-33,5 \pm 0,2$
NPAu- CLPFFD + P. L121		$-40,3 \pm 0,6$
NPAu- CLPFFD + P. P85	$<30\%$ CMC	$-39,2 \pm 0,8$
NPAu- CLPFFD + P. F127		$-39,0 \pm 0,9$
NPAu- CLPFFD + P. L121		$-40,0 \pm 0,4$
NPAu + P. P85	$>30\%$ CMC	$-18,6 \pm 0,5$
NPAu + P. F127		$-15,9 \pm 0,5$
NPAu + P. L121		$-29,2 \pm 0,2$

Tabla 3.5: Resumen de los potenciales zeta de los diferentes productos del recubrimiento con Pluronic®. $n=3 \pm DS$.

3.3.4 TEM

Cabe mencionar que las muestras con Pluronic® observadas por TEM fueron las NPAu y sus conjugados NPAu-CLPFFD recubiertos con Pluronic® P85, F127 y L121, utilizando soluciones con concentración $>30\%$ CMC (figura 3.12). Se puede observar que las NPAu conjugadas al péptido CLPFFD-NH₂ mantienen su forma y tamaño con

respecto a las NPAu. Las zonas oscuras corresponden a la tinción de material orgánico, producto de la incorporación de acetato de uranilo al 1% al momento de la preparación de la muestra. Es posible observar un pequeño halo alrededor de las NPAu de las micrografías 3.12-A y B, correspondientes a NPAu-CLPFFD recubiertas con Pluronic® P85 y F127 utilizando concentraciones >30% CMC. En las demás micrografías se puede apreciar la ausencia de este halo alrededor de las NPAu.

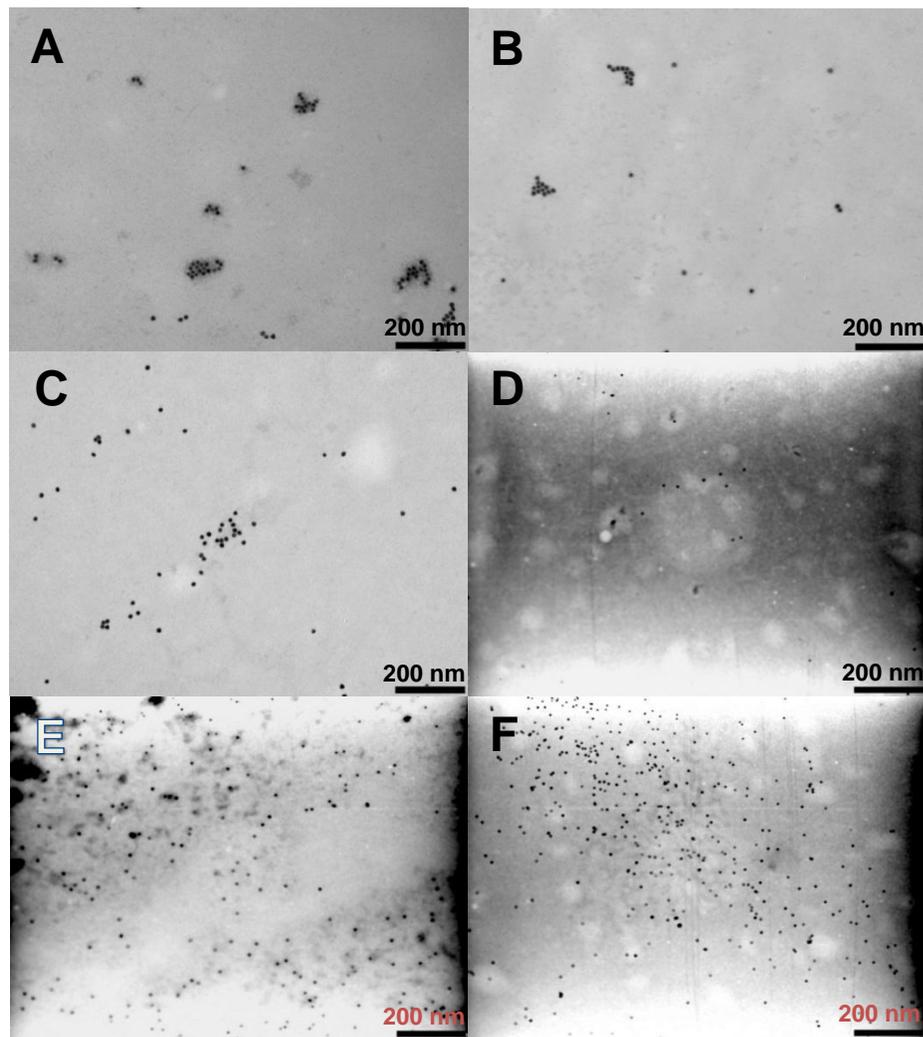


Figura 3.12: Imagen TEM representativa de (A) NPAu-CLPFFD + Pluronic® P85, (B) NPAu-CLPFFD + Pluronic® F127, (C) NPAu-CLPFFD + Pluronic® L121, (D) NPAu + Pluronic® P85, (E) NPAu + Pluronic® F127, (F) NPAu + Pluronic® L121, todas las muestras utilizando concentraciones >30% CMC de poloxámero. Las barras equivalen a 200 nm.

3.4 Determinación de la concentración de NPAu en las muestras

Véase sección 2.4 para más detalles respecto al método utilizado. La concentración promedio de NPAu para todas las muestras fue de $1,0 \times 10^{-5} \pm 9,0 \times 10^{-7}$ mM.

3.5 Termogravimetría

Las condiciones a las cuales se llevó a cabo el análisis termogravimétrico están descritas en la sección 2.5. En la figura 3.13 se encuentran los termogramas o curvas termogravimétricas (TG). También se representa la primera derivada de esta curva (DTG). Se indica además cada etapa correspondiente a la pérdida de masa asociada a un proceso en particular, junto a la T° a la cual se alcanza la máxima velocidad de reacción. Las etapas de las muestras correspondientes a NPAu, NPAu-CLPFFD y los nanocompuestos formados por el recubrimiento del conjugado NPAu-CLPFFD, utilizando Pluronic[®] P85, F127 y L121 a una concentración >30% CMC se encuentran descritas en la tabla 3.6. En la tabla 3.7 se describe en detalle la ETAPA 1 de cada muestra, la cual está asociada a la pérdida de agua por parte de ellas en función de la T° .

Muestra	m_0 (mg)	ETAPA	T_i (°C)	T_f (°C)	$T_{Máx}$ (°C)	Δm (%)
NPAu	6,522	1	38,2	198,2	88,5	9,5
		2	243,2	310,7	285,3	9,2
		3	373,2	493,2	431,9	7,2
NPAu-CLPFFD	2,769	1	30,2	205,2	73,1	22,4
		2	247,7	302,7	287,6	7,1
		3	350,2	432,2	385,2	4,5
NPAu-CLPFFD + P. P85 >30% CMC	0,792	1	27,9	135,4	74,4	20,8
		2	227,9	305,4	288,8	25,7
		3	317,9	410,4	359,2	38,4
NPAu-CLPFFD + P. P85 >30% CMC	0,723	1	28,0	158,0	59,0	20,8
		2	283,0	390,5	339,1	21,3
NPAu-CLPFFD + P. P85 >30% CMC	3,675	1	28,3	193,3	76,0	14,8
		2	245,8	313,3	285,0	10,9
		3	365,8	513,3	447,0	9,1

Tabla 3.6: Descripción de las etapas de cada termograma. m_0 : masa inicial de la muestra. T_i : T° inicial del proceso. T_f : T° final del proceso. $T_{Máx}$: T° de máxima velocidad de reacción. Δm : diferencia porcentual de masa. n=1.

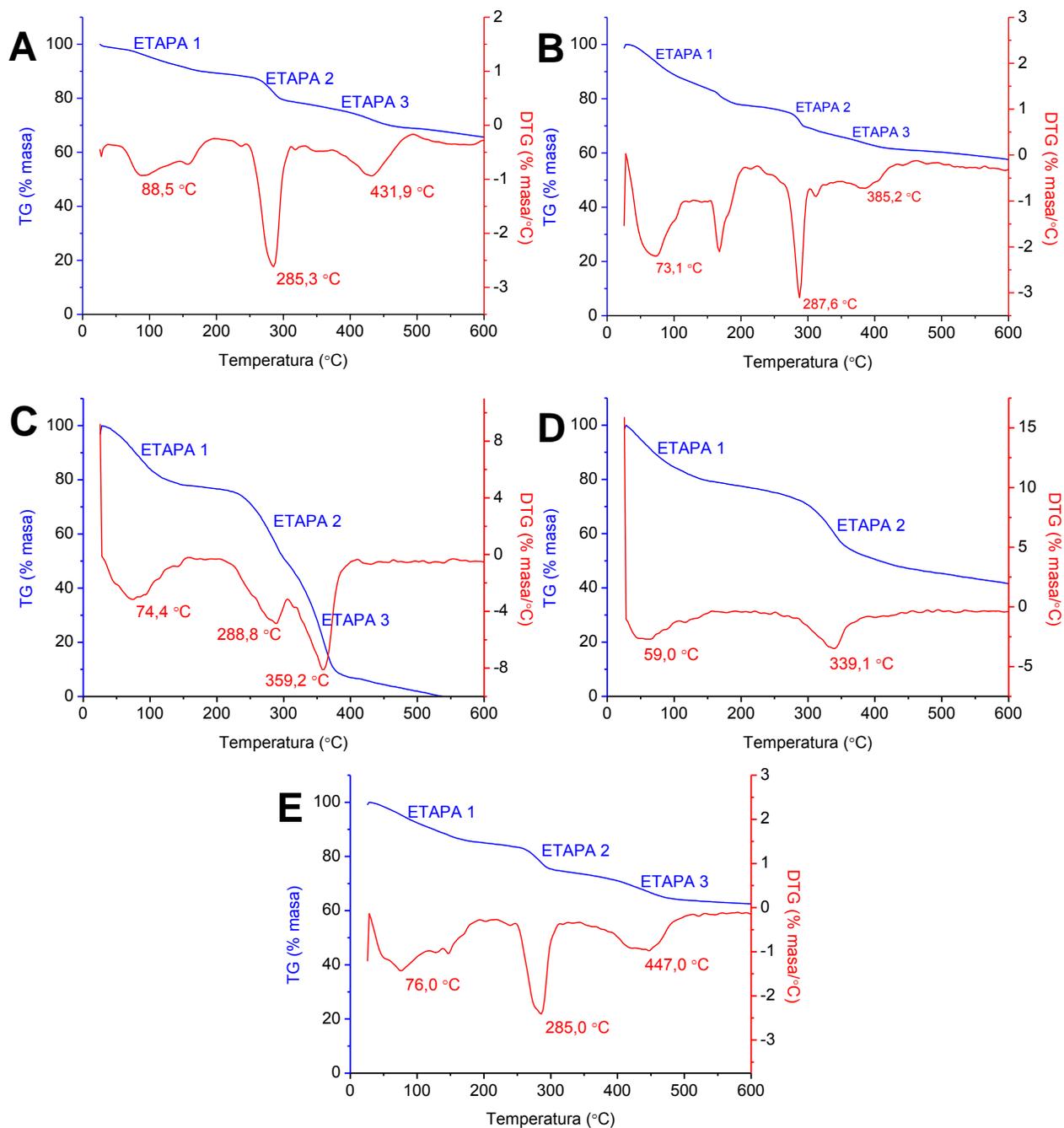


Figura 3.13: TG (azul) y DTG (rojo) de (A) NPAu, (B) NPAu-CLPFFD, (C) NPAu-CLPFFD + Pluronic® P85, (D) NPAu-CLPFFD + Pluronic® F127 y (E) NPAu-CLPFFD + Pluronic® L121. Todos los nanocompuestos se formaron utilizando concentraciones de Pluronic® >30% CMC. Se presenta en cada gráfico las etapas de pérdida de masa asociada a un proceso en particular y las T⁰ de máxima velocidad de reacción para cada una de ellas. Los rangos de las etapas se encuentran descritos en la tabla 3.6.

Muestra	ETAPA	Rango T _i -T _f (°C)	Δm (%)	m ₀ (mg)	Masa H ₂ O (mg)	Nº Moléculas de H ₂ O (x10 ¹⁹)	Nº Moléculas H ₂ O/m ₀ (x10 ¹⁹ /mg)
NPAu	1	38,2 - 198,2	9,5	6,522	0,620	2,074	0,318
NPAu-CLPFFD	1	30,2 - 205,2	22,4	2,769	0,620	2,074	0,749
NPAu-CLPFFD + P. P85 >30% CMC	1	27,9 - 135,4	20,8	0,792	0,165	0,552	0,697
NPAu-CLPFFD + P. F127 >30% CMC	1	28,0 - 158,0	20,8	0,723	0,150	0,502	0,694
NPAu-CLPFFD + P. L121 >30% CMC	1	28,3 - 193,3	14,8	3,675	0,544	1,819	0,495

Tabla 3.7: Descripción detallada de la ETAPA 1 para cada muestra. Se muestra el número de moléculas de agua pérdidas durante este proceso. m₀: masa inicial de la muestra. T_i: Tº inicial del proceso. T_f: Tº final del proceso. Δm: diferencia porcentual de masa. Peso molecular H₂O: 18 g/mol. N_A (número de Avogadro): 6,02 x 10²³ moléculas/mol.

3.6 PAMPA

Las muestras de NPAu, NPAu-CLPFFD y los nanocompósitos recubiertos con Pluronic® P85, F127 o L121 utilizando concentraciones >30% CMC y los controles tiopental y L-DOPA fueron depositadas en los pocillos donores. Se dejó el sistema en agitación mecánica orbital a 170 rpm, a Tº ambiente y en una atmosfera saturada de humedad. Transcurrido 24 horas de la incubación del sistema PAMPA, 200 µL fueron recolectados de cada uno de los pocillos de las placasceptoras y donoras. No se recolectó muestra de los pocillos correspondientes a las NPAu debido a que se generó un fenómeno de agregación. Posteriormente, fueron realizadas mediciones espectrofotométricas según las especificaciones indicadas en la sección 2.4. En la figura 2.2 A y B se presentan respectivamente las curvas de calibración para el tiopental y L-DOPA obtenidas (véase sección 2.6). L-DOPA (control negativo) presentó un nulo traspaso a través de la membrana mientras que tiopental (control positivo) presentó una P_e de 16,7 ± 1,9 cm/s luego de las 24 horas de incubación (ver tabla 3.8 parte superior). En la tabla 3.8, parte inferior, se muestran los resultados de P_e y % permeabilidad de cada muestra. No se observó traspaso de NPAu a través de la membrana fosfolipídica de FC para ninguna de las muestras en estudio.

Muestra	A _D (U.A)	A _A (U.A)	C _D (µg/mL)	C _A (µg/mL)	P _e (cm/s)	Porcentaje permeabilidad (%)
L-DOPA (control negativo)	2,754 ± 0,009	0	197,5 ± 0,7	0	0	0
Tiopental (control positivo)	5,899 ± 0,022	2,906 ± 0,017	191,9 ± 0,7	94,4 ± 0,6	16,7 ± 1,9	49,2 ± 0,4

Muestra	A _D (U.A)	A _A (U.A)	C _D (mM)	C _A (mM)	P _e (cm/s)	Porcentaje permeab. (%)
NPAu	-	-	-	-	-	-
NPAu-CLPFFD	2,342 ± 0,262	0	1,0 x 10 ⁻⁵ ± 1,0 x 10 ⁻⁶	0	0	0
NPAu-CLPFFD + P. P85 > 30% CMC	2,190 ± 0,472	0	1,0 x 10 ⁻⁵ ± 2,0 x 10 ⁻⁶	0	0	0
NPAu-CLPFFD + P. F127 > 30% CMC	1,986 ± 0,073	0	8,8 x 10 ⁻⁶ ± 3,0 x 10 ⁻⁷	0	0	0
NPAu-CLPFFD + P. L121 > 30% CMC	2,145 ± 0,057	0	9,5 x 10 ⁻⁶ ± 2,0 x 10 ⁻⁷	0	0	0

Tabla 3.8: Absorbancias y concentraciones promedios obtenidas del compartimento donador y receptor, P_e y % permeabilidad para las distintas muestras (parte inferior) y controles (parte superior). A_D: absorbancia compartimento donador. A_A: Absorbancia compartimento receptor. C_D: Concentración compartimento donador luego de 24 horas de incubación. C_A: Concentración compartimento receptor luego de 24 horas de incubación. P_e: Permeabilidad efectiva. n=3 ± SD.

3.7 Estudio de alteraciones en la permeabilidad y estabilidad de liposomas

3.7.1 Ensayo de permeabilidad de liposomas

Para determinar el efecto producido sobre la permeabilidad de membranas biológicas de los diferentes nanocompuestos, es decir NPAu-CLPFFD recubiertos con Pluronic[®] P85, F127 o L121 utilizando concentraciones >30% CMC, fue llevado a cabo un ensayo que permite evaluar cambios en la permeabilidad de la membrana a través de la liberación de CF hacia el exterior de LCF. En la figura 3.14 se muestran los gráficos % fluorescencia (respecto del total liberado al solubilizar los liposomas en ausencia de nanocompuesto, polímero o nanopartícula) vs tiempo, de las diferentes muestras de interés. En la tabla A.1 (véase *anexo*) se resumen los resultados obtenidos para este ensayo.

Según los resultados obtenidos, en ningún caso la presencia de nanopartículas produjo disminución de la intensidad de fluorescencia (*quenching*) al realizar la incubación de CF con las nanopartículas (resultados no mostrados). NPAu y NPAu-CLPFFD no presentaron señal de fluorescencia durante el ensayo. Asimismo, estas nanopartículas con LCF no provocaron liberación de CF durante el tiempo estudiado (resultados no mostrados). Los tres polímeros en solución produjeron un aumento de la liberación de CF, lo cual puede relacionarse con cambios en la permeabilidad. Cabe señalar que los nanocompuestos produjeron menor porcentaje de liberación de CF, con respecto a las correspondientes soluciones de Pluronic[®]. Notablemente, para los tres nanocompuestos, el porcentaje de fluorescencia inicial fue significativamente menor ($p < 0,05$) que para los polímeros en solución (tiempo 0, figura 3.14). Se observa además de la figura 3.14, que la permeabilidad en todos los casos (nanocompuestos y polímeros en solución) aumentó con el tiempo y que la pendiente de las curvas para cada muestra de nanocompuesto, fue similar a su correspondiente solución de polímero a todo tiempo de ensayo.

Durante las 3 primeras horas se alcanzó la mayor pendiente graficada para todas las muestras de nanocompuestos y soluciones de polímeros (figura 3.14). Luego de este tiempo, la pendiente disminuyó estabilizándose hasta las 24 horas. Después de los 30 minutos, NPAu-CLPFFD recubierto con Pluronic[®] P85 o F127 utilizando concentraciones $>30\%$ CMC liberó porcentajes similares de CF (diferencias no significativas, $p < 0,05$), mayores que para los nanocompuestos recubiertos con L121 a la misma concentración, a todo tiempo de ensayo.

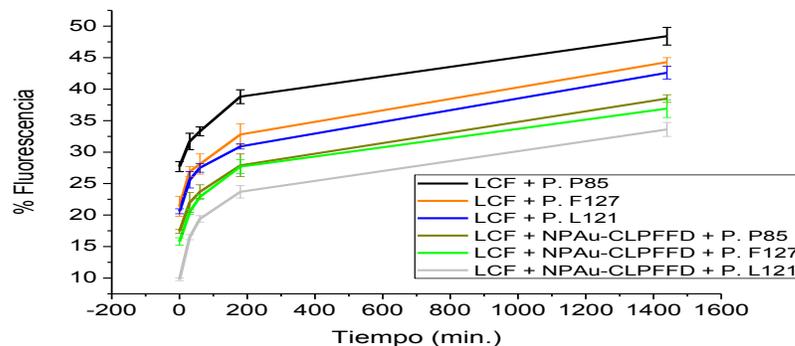


Figura 3.14: Cuantificación de la fluorescencia emitida por CF liberada de LCF con respecto al tiempo, debido a la interacción con NPAu-CLPFFD + Pluronic® P85, NPAu-CLPFFD + Pluronic® F127, NPAu-CLPFFD + Pluronic® L121, Pluronic® P85, Pluronic® F127 y Pluronic® 121, todas las muestras utilizando concentraciones >30% CMC de polímero. LCF: Liposoma de FC con CF encapsulada. El porcentaje (%) de fluorescencia fue calculado mediante la cuantificación de la fluorescencia a los tiempos indicados con respecto a la fluorescencia total obtenida al solubilizar el liposoma por completo empleando SDS (véase sección 2.7.1.2).

3.7.2 Ensayo estabilidad de liposomas e interacción con nanocompuestos

Para observar modificaciones en la estabilidad de liposomas de FC se realizó un estudio de DLS, determinándose los cambios en los DH de estos en función del tiempo. Asimismo, para estudiar la interacción liposoma-muestra se empleó esta misma metodología. En la figura 3.15 se muestran gráficos que representan los DH promedio de los liposomas a los distintos tiempos de incubación de estos con las muestras. En la figura 3.16 se muestran los gráficos de distribución de tamaño a los distintos tiempos de incubación, obtenidos a partir de los datos entregados por el equipo. En la tabla A.2 (véase *anexo*) se resumen los resultados obtenidos por este ensayo. Fueron estudiados los nanocompuestos de NPAu-CLPFFD recubiertos con Pluronic® P85, F127 o L121 utilizando concentraciones por >30% CMC, liposomas solos (control), liposomas + NPAu, liposomas + NPAu-CLPFFD y liposomas + soluciones de Pluronic® P85, F127 o L121 a una concentración >30% CMC,.

Con respecto a la figura 3.15-A, en donde se incubó liposomas con soluciones de Pluronic® a una concentración >30% CMC, se pudo observar que a la primera hora

ninguna de las soluciones produjeron cambios significativos ($p < 0,05$) en el DH promedio de los liposomas, con respecto a los controles. A la tercera hora se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) en el tamaño de los liposomas, cuando estos estaban en contacto con Pluronic[®] F127, mientras que P85 y L121 no presentaron cambios significativos ($p < 0,05$). A las 24 horas los 3 casos presentaron un aumento significativo ($p < 0,05$) del DH promedio de los liposomas. También fueron realizados estudios de NPAu y/o NPAu-CLPFFD más liposomas (figura 3.15-C). A la primera hora, el control con NPAu tendió a la agregación, formando un agregado sólido en el fondo de la cubeta. La inestabilidad de las NPAu estabilizadas sólo con citrato frente al tampón TRIS pudo haber provocado este fenómeno. El control de liposomas con NPAu-CLPFFD permaneció estable, sin agregación y manteniendo el DH promedio de los liposomas durante todo el ensayo (figuras 3.15-C y 3.16-A).

Como se puede observar en la figura 3.15-B, el nanocompósito formado por NPAu-CLPFFD + Pluronic[®] F127 fue el único que produjo un aumento significativo ($p < 0,05$) del DH promedio de los liposomas, con respecto a los liposomas control al inicio del ensayo (tiempo 0). Posteriormente, se registró a la primera hora de ensayo una disminución del DH promedio de los liposomas en contacto con este nanocompósito, aunque el tamaño siguió siendo significativamente mayor ($p < 0,05$) en comparación al control (figura 3.15-B). A la tercera hora de incubación, la muestra con este nanocompósito siguió presentando una disminución en el DH promedio de los liposomas, incluso llegando a ser significativamente ($p < 0,05$) más pequeños que el control (figura 3.15-B). Este tamaño se mantuvo sin cambios significativos ($p < 0,05$) hasta las 24 horas de incubación. Asimismo, en la figura 3.16-C que corresponde a la distribución de población de tamaños para el nanocompósito NPAu-CLPFFD + Pluronic[®] F127, se puede apreciar la disminución del DH de los liposomas con un aumento concomitante de la intensidad del pico en función del tiempo. Además, es posible observar que el pico correspondiente al nanocompósito (20 nm), también presentó un incremento aparente en la intensidad registrada a las 24 horas.

A diferencia del nanocompósito anterior, para el nanocompósito formado por NPAu-CLPFFD + Pluronic[®] L121 a la primera hora, no se observaron cambios significativos ($p < 0,05$) en el DH promedio de los liposomas (figura 3.15-B). Sin embargo, a la tercera

hora del ensayo se produce un incremento significativo ($p < 0,05$) en el DH de los liposomas incubados con este nanocompósito. Este incremento continua hasta las 24 horas de incubación. En relación a esto, en la figura 3.16-D se observa que la intensidad del pico correspondiente a los liposomas aumenta y el de los nanocompuestos disminuye en función del tiempo. Como se logra observar de la misma figura, a la tercera hora la intensidad del pico correspondiente a los liposomas se ensancha, se desplaza hacia mayores tamaños y aumenta en intensidad con respecto a la primera hora. A las 24 horas se observa tanto una disminución en la intensidad del pico de liposomas, como también un acercamiento de este hacia el pico de nanocompuestos (figura 3.16-D y E).

Para los liposomas incubados con el nanocompósito formado por NPAu-CLPFFD + Pluronic[®] P85 (figura 3.15-B), se produce una reducción significativa ($p < 0,05$) del tamaño detectable a las 24 horas de incubación. Según se observa en la figura 3.16-B, recién a las 24 horas se observa un aumento en la intensidad del pico correspondiente a los liposomas y una disminución de intensidad del pico correspondiente a los nanocompuestos.

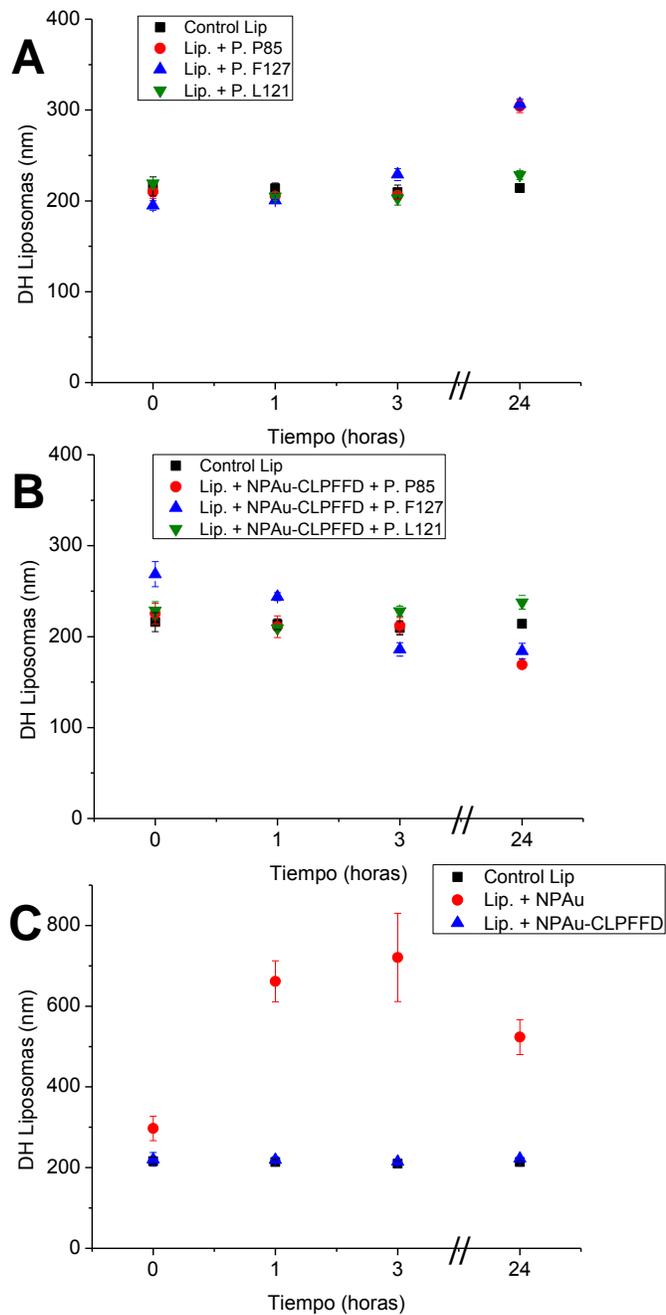


Figura 3.15: Gráficos representando los DH de los liposomas de FC a las 0, 1, 3 y 24 horas de incubación: (A) Lip. + P. P85, Lip. + P. F127, Lip. + P. L121 (B) Lip. + NPAu-CLPFFD + P. P85, Lip. + NPAu-CLPFFD + P. F127, Lip. + NPAu-CLPFFD + P. L121. (C) Lip. + NPAu, Lip. + NPAu-CLPFFD. Concentración de Pluronic® >30% CMC para todas las muestras. Como control se usó liposomas de FC. n=3 ± SD.

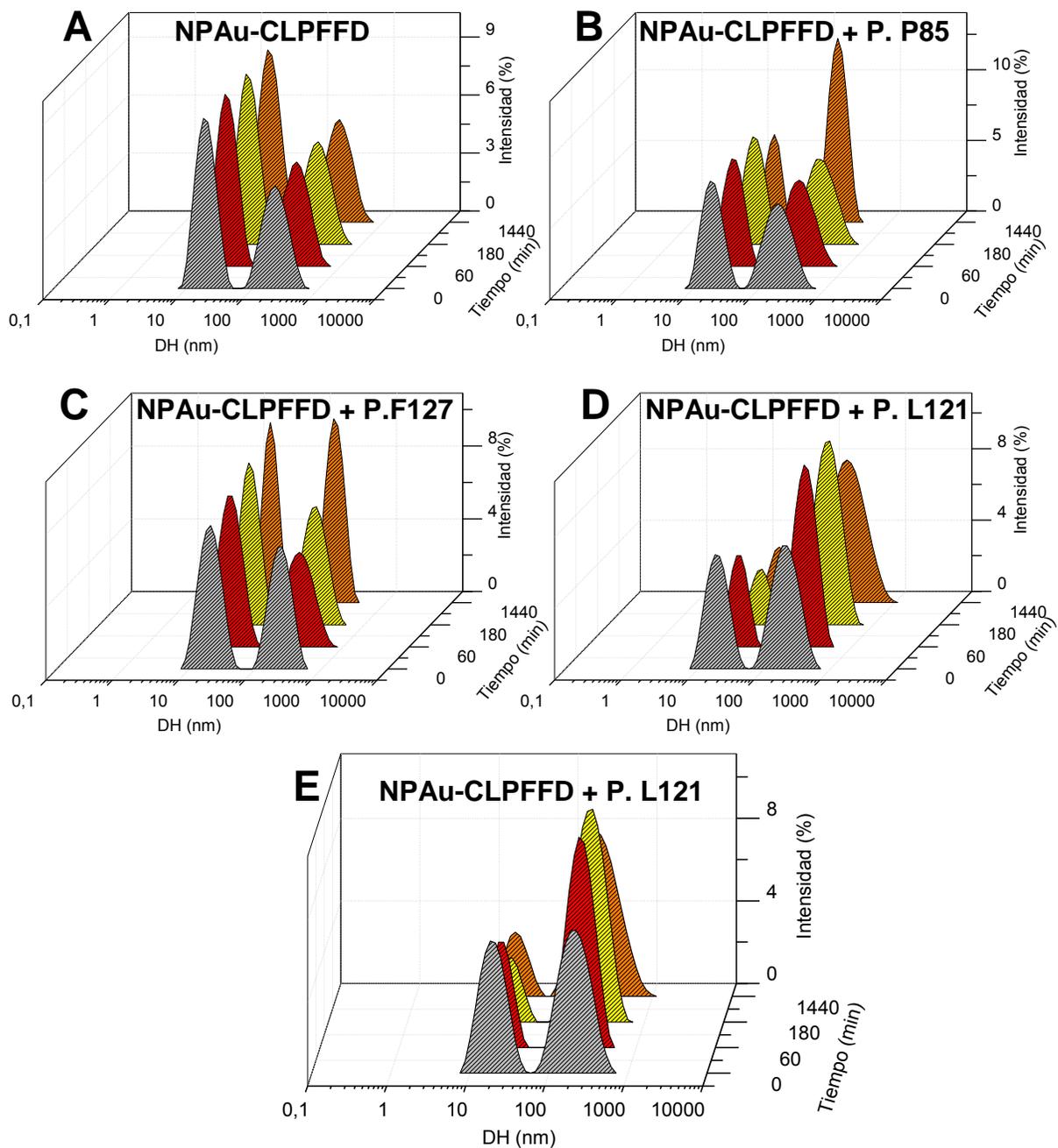


Figura 3.16: Gráficos representativos de la distribución de tamaños obtenidos de los datos entregados por el DLS. Se presenta la distribución de tamaño de las muestras a las 0, 1, 3 y 24 horas de incubación: (A) Lip. + NPAu-CLPFFD, (B) Lip. + NPAu-CLPFFD + P. P85, (C) Lip. + NPAu-CLPFFD + P. F127 y (D) Lip. + NPAu-CLPFFD + P. L121, (E) Lip. + NPAu-CLPFFD + P. L121 (diferente perspectiva de (D)). Concentración de Pluronic® >30% CMC para todas las muestras.

Capítulo 4

Discusión de resultados

4.1 Caracterización de las NPAu

4.1.1 Espectrofotometría de absorción molecular

Mediante la caracterización de NPAu estabilizadas con citrato a través de espectrofotometría de absorción molecular, se obtuvo una banda correspondiente al plasmón superficial característica para tamaños entre 10 y 20 nm,⁵ dando como resultado una $\lambda_{M\acute{a}x}$ de 519 nm (figura 3.1). Este resultado es indicativo de una correcta síntesis de NPAu, que según la banda de plasmón superficial obtenida, presentaron tamaños adecuados para las aplicaciones biológicas propuestas. Cabe señalar que el valor de $\lambda_{M\acute{a}x}$ obtenido es indicativo de la ausencia de agregación por parte de estas NPAu, ya que no se observó un corrimiento hacia mayores λ con respecto a 519 nm.⁵

4.1.2 DLS

Los resultados obtenidos mediante DLS (figura 3.2) indicaron que el DH que presentaron las NPAu fue de $20,6 \pm 0,3$ nm (IPD de 0,326). El valor obtenido del DH por DLS puede ser superior al observado por TEM, debido a que por esta técnica de microscopía se observa la estructura metálica correspondiente al conjugado y por DLS se determina el radio hidrodinámico que involucra la esfera de hidratación y la capa difusa de la nanoestructura. Por lo tanto, fue necesario realizar una caracterización mediante TEM (*siguiente sección*), la cual permitió complementar los resultados obtenidos por DLS, obteniéndose promedios de tamaños menores ($12,3 \pm 1,4$ nm).

4.1.3 TEM

Tanto para complementar los resultados obtenidos mediante DLS como también observar las características morfológicas que presentaron las NPAu, estas fueron caracterizadas mediante TEM (figura 3.4). Los resultados obtenidos mediante este método sumado a los obtenidos mediante UV-Vis y DLS, corroboraron la existencia de NPAu homogéneas en tamaño y forma y con un bajo grado de agregación.

4.1.4 Potencial zeta

Un análisis del potencial zeta fue llevado a cabo con el fin de determinar la carga superficial promedio de las NPAu (figura 3.3). La magnitud del potencial zeta obtenido para estas fue de $-45,4 \pm 0,9$ mV, valor negativo debido a las moléculas de citrato que estabilizan a las NPAu. Estas moléculas de citrato poseen 3 grupos carboxílicos cargados negativamente a pH 7,4, las cuales estarían contribuyendo a este potencial.⁵ Es importante resaltar que en estos sistemas de coloides dispersos, se requiere que las NPAu posean una carga superficial alejada de la neutralidad (distinta de cero), para favorecer la repulsión electrostática entre ellas y así mejorar los parámetros de estabilidad de la dispersión.

4.2 Obtención y caracterización del conjugado de NPAu con el péptido CLPFFD-NH₂

4.2.1 Preparación del conjugado NPAu-CLPFFD

Las NPAu fueron conjugadas al péptido CLPFFD-NH₂ según se describió en la sección 2.2.1. La conjugación de las NPAu con este péptido se realizó con la finalidad de aumentar la estabilidad del coloide debido a repulsiones estéricas y electrostáticas, reducir su retención por el SRE del organismo al disminuir (en valor absoluto) el potencial zeta de las NPAu, cuando se conjugan y favorecer la interacción de estas con ATA β formados en la EA.⁵

4.2.2 Caracterización del conjugado NPAu-CLPFFD

4.2.2.1 Espectrofotometría de absorción molecular

Mediante caracterización UV/Vis del conjugado NPAu-CLPFFD fue posible observar un corrimiento de la banda de resonancia plasmónica superficial hacia el infrarrojo con respecto a las NPAu estabilizadas con citrato (de 519 a 525 nm, figura 3.5). Este fenómeno podría atribuirse a una modificación de la superficie metálica por las moléculas de péptido conjugadas a las NPAu. Este proceso consiste en el reemplazo de las moléculas de citrato por moléculas de péptido, debido a una competencia de

afinidad por la superficie de la NPAu. El péptido CLPFFD-NH₂ posee un residuo de Cys que contiene un grupo tiol, el cual permite una interacción fuerte de tipo covalente con la superficie de oro, a diferencia de la interacción electrostática producida con las moléculas de citrato.⁵ Esta interacción del grupo tiol con la superficie de la NPAu se hace aditiva a la de la amina primaria que se encuentra en la parte N-terminal, debido a que los grupos aminos son conocidos por tener interacciones fuertes con superficies de oro.⁵

4.2.2.2 DLS

Según la figura 3.6 correspondiente al análisis mediante DSL, se obtuvo que el DH del conjugado fue de $24,3 \pm 0,4$ nm (IDP de 0,252). El tamaño obtenido para el conjugado fue significativamente mayor ($p < 0,05$) que para las NPAu estabilizadas con citrato ($20,6 \pm 0,3$ nm), lo cual puede indicar la existencia de cambios en el entorno, o más bien de la superficie de las NPAu al ser conjugadas.⁵ En un estudio realizado por Kogan y cols.³⁰, propusieron que el péptido adquiere una disposición espacial orientada ortogonalmente con respecto a la superficie de la NPAu (figura 1.3). Esta disposición podría estar involucrada en el aumento del DH del conjugado.

4.2.2.3 TEM

De la micrografía obtenida para el conjugado (figura 3.8) se puede observar que las NPAu mantienen su forma, tamaño y homogeneidad luego de la conjugación con el péptido CLPFFD-NH₂. Lo anterior podría ser indicativo de que el proceso de conjugación no afecta la estabilidad de las NPAu. Notablemente, aunque se realizó una tinción con acetato de uranilo al 1%, no se pudo verificar la presencia de la capa de péptido posiblemente debido al pequeño espesor de la misma (aproximadamente 1,2 nm).

4.2.2.4 Potencial zeta

La disminución en el potencial zeta (en valor absoluto) observada del conjugado con respecto a las NPAu (de $-45,4 \pm 0,9$ mV a $-39,1 \pm 0,2$ mV, respectivamente) puede ser atribuida al reemplazo de los iones citrato, que contienen tres cargas negativas

formales a pH 7,4 por moléculas de péptido CLPFFD-NH₂ que contienen sólo una carga formal negativa a este mismo pH.⁵

4.3 Caracterización del conjugado NPAu-CLPFFD recubierto con Pluronic® P85, F127 o L121

Los nanocompósitos utilizados para los estudios de termogravimetría, PAMPA y los ensayos de permeabilidad y estabilidad de liposomas, fueron los recubiertos con soluciones de Pluronic® P85, F127 o L121 a una concentración >30% CMC. Esta concentración fue escogida con la finalidad de normalizar las concentraciones utilizadas y así establecer correctos criterios de comparación entre los copolímeros utilizados. Además, a concentraciones por sobre la CMC se alcanza una máxima cantidad de monómeros, pudiendo optimizar la cantidad disponible para recubrir cada NPAu.

La cantidad de unidades monoméricas de los poloxámeros permanece constante y en equilibrio con las micelas formadas a concentraciones superiores a la CMC. Toda unidad copolimérica agregada a la solución por sobre esta concentración crítica, pasará a formar parte de micelas para mantener condiciones energéticas favorables para el sistema.⁴⁴ De esta manera se barajarían 2 hipótesis preliminares, con respecto al mecanismo de recubrimiento al utilizar concentraciones por sobre la CMC. Por un lado, el recubrimiento ocurre por interacción entre el monómero y la superficie conjugada de la NPAu, y por otro, el recubrimiento ocurre por la formación de micelas las cuales secuestran a las NPAu.

Para esclarecer si el mecanismo de recubrimiento del conjugado NPAu-CLPFFD con estos copolímeros se debe a una interacción de la unidad monomérica con el péptido alojado en la superficie de la NPAu, logrando así recubrirla, y no a la encapsulación de este conjugado por las micelas formadas, fueron realizados estudios preliminares. Estos estudios consistieron en la caracterización de NPAu estabilizadas con citrato sometidas al proceso de recubrimiento con Pluronic® P85, F127 o L121, utilizando una concentración >30% CMC, y NPAu-CLPFFD sometidas al mismo proceso con estos copolímeros, utilizando una concentración <30% CMC. El primer estudio daría indicios

preliminares del tipo de interacción del polímero con la NPAu y el segundo daría luces de la implicancia de las micelas en el proceso de recubrimiento.

4.3.1 Espectrofotometría de absorción molecular

Los resultados obtenidos mediante caracterización por UV/Vis pueden ser indicativos de que el proceso de recubrimiento no produce desestabilización del conjugado (agregación), ni alteración en la unión del péptido con la NPAu. Por otro lado, se observa de la figura 3.9 y la tabla 3.1, una disminución aparente de los valores de absorbancia obtenidos a $\lambda_{M\acute{a}x}$ con respecto al conjugado NPAu-CLPFFD. Siendo que la concentración de NPAu para todas las muestras es la misma, esta disminución podría atribuirse a cambios en el índice de refracción del medio, debido a la presencia de copolímeros en solución, o bien a un posible apantallamiento producido por el recubrimiento con los diferentes Pluronic[®]. De la misma manera, puede observarse una disminución aparente de la absorbancia a $\lambda_{M\acute{a}x}$ cuando la NPAu es conjugada al péptido CLPFFD-NH₂, lo cual también puede ser atribuible a modificaciones en el medio y/o a la nanopartícula.

Resultados similares a los descritos en el párrafo anterior fueron obtenidos al recubrir el conjugado NPAu-CLPFFD con Pluronic[®] P85, F127 o L121, utilizando concentraciones <30% CMC (figura 3.10). Esto puede ser indicativo de que no ocurrió desestabilización de las NPAu, ni alteración en el conjugado durante el proceso de recubrimiento. También es posible observar una disminución aparente en la absorbancia a la $\lambda_{m\acute{a}x}$ de los nanocompuestos, con respecto al conjugado. Esto podría ser atribuido a un cambio en el índice de refracción del medio y/o a modificaciones en la NPAu de la misma manera descrita en el párrafo anterior.

Las NPAu estabilizadas con citrato sufrieron un fenómeno de precipitación cuando se intentaron recubrir con Pluronic[®], utilizando concentraciones por <30% CMC, mientras que las recubiertas con Pluronic[®], utilizando concentraciones >30% CMC presentaron una inestabilidad que se corroboró mediante DLS (véase *anexo* figura A.3 y A.10) y UV/Vis (figura 3.11). Los fenómenos observados de la figura 3.11, es decir el corrimiento de la banda plasmónica hacia mayores λ como también la disminución en

las U.A. correspondientes a la $\lambda_{\text{Máx}}$ para los 3 casos, podrían deberse a procesos de agregación de NPAu, a modificaciones en el medio, o a una mezcla de ambos.

4.3.2 DLS

Los aumentos registrados en el DH de los nanocompuestos mediante DLS (tabla 3.4) podrían atribuirse a cambios en el medio donde se encuentran inmersas o bien a cambios en el entorno próximo a ellas. Teniendo en cuenta que las micelas de los Pluronic[®] poseen un DH promedio entre 20 a 80 nm,⁴⁴ existe la posibilidad de que estas sean capaces de “secuestrar” NPAu dentro de ellas. Análisis detallados de la información obtenida mediante DLS permitió descartar esta posibilidad, debido a que cuando se observa el número de partículas vs el DH obtenido (figura A.7-A.9, véase *anexo*), en todos los casos sólo es apreciable el pico correspondiente a los nanocompuestos (tamaño que bordea los 11-13 nm). Esto indicaría que la cantidad de micelas, en comparación con los nanocompuestos, se vuelve imperceptible para el equipo. Lo anterior, sumado al aumento significativo del DH del nanocompuesto formado por Pluronic[®] F127 utilizando una concentración >30% CMC, permitiría deducir que el mecanismo de recubrimiento se atribuye a la interacción de los monómeros con el conjugado NPAu-CLPFFD. Esto se confirma además por el hecho de que en todos los casos, el conjugado NPAu-CLPFFD recubierto con Pluronic[®] utilizando concentraciones <30% CMC mostraran un aumento significativo del DH, con respecto al conjugado sin recubrir, a pesar de que la concentración no es suficiente para la aparición de micelas.

El fenómeno observado para las NPAu recubiertas con Pluronic[®] P85, F127 o L121 a concentraciones >30% CMC, es decir la aparición de NPAu de diferentes tamaños, puede ser atribuido a un proceso de agregación debido a la falta de estabilidad por parte de las NPAu frente al proceso de centrifugación, requerido para la formación de los nanocompuestos (véase *sección 2.3.2*). Esto estaría indicando, por lo tanto, que el proceso de conjugación de la NPAu podría otorgarle una mayor estabilidad, la cual sería suficiente para mantener a las nanopartículas estables frente al proceso de recubrimiento, evitándose un grado mayor de agregación. Un análisis mediante TEM fue necesario para complementar la información obtenida por DLS.

4.3.3 Potencial zeta

Una caracterización a través del potencial zeta fue realizada a los diferentes nanocompuestos, para verificar cambios en la carga superficial luego de someter las NPAu y su conjugado al proceso de recubrimiento con los poloxámeros en estudio. Se observa de los resultados obtenidos mediante este método (tabla 3.5), una disminución significativa (de $-39,1 \pm 0,2$ mV a $-33,5 \pm 0,2$ mV) en valor absoluto del potencial zeta del conjugado NPAu-CLPFFD recubierto con Pluronic[®] F127 utilizando una concentración $>30\%$ CMC, en comparación al conjugado sin recubrir. Esto podría atribuirse a los cambios producidos en el entorno próximo al conjugado. Modificaciones de la capa de contraiónes debido a la presencia de monómeros de copolímero de características no iónicas en el entorno próximo a la NPAu, podría estar reduciendo (en valor absoluto) el potencial zeta de la nanopartícula. Existe la posibilidad de que esta modificación dependa de cómo los monómeros se posicionan sobre la partícula, afectando de diferente forma el potencial zeta de la NPAu. Para lo anterior, son necesarios estudios posteriores con respecto a la disposición y cantidad del recubrimiento para el completo entendimiento de este fenómeno. Es importante recalcar que este Pluronic[®] puede ser útil para disminuir el secuestro de NPAu por el SER, aumentando la biodisponibilidad a nivel de SNC debido a la reducción significativa del potencial zeta registrada.

En cuanto a los demás nanocompuestos formados por NPAu-CLPFFD recubiertos con Pluronic[®], utilizando concentraciones por sobre o debajo de un 30% CMC, no se observan cambios significativos del potencial zeta con respecto al conjugado sin recubrir. Esto podría indicarnos que estos Pluronic[®], a las concentraciones indicadas, no son capaces de recubrir la NPAu completamente, no modificando este potencial.

Se puede observar de la tabla 3.5 que el recubrimiento de NPAu con Pluronic[®] P85, F127 o L121 utilizando concentraciones $>30\%$ CMC, produjo una reducción significativa en el potencial zeta (en valor absoluto) en comparación a su contraparte, las NPAu estabilizadas con citrato. Esta reducción podría atribuirse a la aparición de NPAu de menor tamaño (figura A.10, véase *anexo*). La disminución en el tamaño observado mediante DLS y TEM (figura 3.12) estaría reduciendo el área superficial de

las NPAu, lo cual conllevaría a una disminución en el número de moléculas de citrato, estabilizando la NPAu. Lo anterior sumado a cambios en el entorno producido por la incorporación de poloxámeros al medio, podría estar dando como resultado la disminución en el potencial zeta (en valor absoluto) registrado.

4.3.4 TEM

Con el fin de caracterizar y complementar los resultados obtenidos por DLS, fueron obtenidas micrografías TEM de nanocompuestos. Al observar las micrografías A y B de la figura 3.12, correspondientes a los nanocompuestos formados por NPAu-CLPPFD recubiertos con Pluronic® P85 y F127 utilizando concentraciones >30% CMC respectivamente, se notó la presencia de un pequeño halo teñido alrededor de las NPAu. Esta tinción sería indicativa de la presencia de material orgánico rodeando la nanopartícula. Esto no ocurre en el caso de NPAu-CLPFFD + Pluronic® L121 a la misma concentración (figura 3.12-C). De la figura 3.12-C se observa la ausencia de material orgánico rodeando las NPAu, indicando la posibilidad de que este poloxámero no es capaz de recubrirla, o bien el recubrimiento no es apreciable mediante TEM. Para Pluronic® P85 y F127, estos resultados se condicen con el aumento de tamaño significativo detectado por DLS, con respecto al conjugado. Cabe mencionar que existiría la posibilidad de que el halo de tinción formado, pueda atribuirse a que el polímero haya adoptado una distribución alrededor de la partícula al momento de la preparación de la muestra, siendo este un artefacto.

Para obtener mayor información acerca de la interacción del poloxámero con la superficie de la nanopartícula, fueron obtenidas micrografías por TEM de NPAu sometidas al proceso de recubrimiento con Pluronic® P85, F127 o L121 utilizando concentraciones >30% CMC (Figura 3.12 D, E y F). De estas micrografías se puede observar la ausencia de un halo de tinción alrededor de nanopartículas individuales o grupales.

Estos resultados indicarían la necesidad de un componente sobre la superficie de la NPAu, a modo de anclaje para los monómeros de Pluronic®. En este caso en particular, el péptido CLPFFD-NH₂ de carácter anfifílico conjugado a la superficie de la

nanopartícula interactuaría con estos monómeros, los cuales también poseen características anfipáticas. Sin embargo, se observa que no todos los poloxámeros serían capaces de interactuar con el péptido CLPFFD-NH₂ ubicado en la superficie de la NPAu. En concordancia con lo anterior, se observa que el Pluronic[®] L121 no interactuaría con estas nanopartículas, posiblemente atribuible a las marcadas características hidrofóbicas que posee (HLB de 1), no así para Pluronic[®] P85 y F127 que poseen características más hidrofílicas (HLB de 16 y 22, respectivamente). El Pluronic[®] L121 posee dentro de su cadena polimérica una relación PPO/PEO de ~7, lo cual significaría que de cada 7 unidades centrales PPO hidrofóbicas, posee ~2 unidades PEO hidrofílicas a sus extremos.⁴⁴ Por otro lado, el aminoácido que se encuentra en el extremo contrario al anclaje del péptido a la NPAu es el Asp, aminoácido hidrofílico, con un grupo polar cargado a pH 7,4 ubicado en la cadena lateral. Como consecuencia de lo anterior, la interacción del péptido con moléculas hidrofóbicas, como es el caso del Pluronic[®] L121, sería energéticamente desfavorable, impidiendo el recubrimiento. Los Pluronic[®] P85 y F127 poseen relaciones PPO/PEO de ~0,8 y ~0,3, respectivamente.⁴⁴ Esto significaría que por cada 1 unidad central PPO se tienen ~2 unidades PEO, para el primer caso, y por cada 1 unidad central PPO se tienen ~6 unidades PEO, para el segundo. De esta manera, el acercamiento del monómero hacia la NPAu conjugada con el péptido anfifílico CLPFFD-NH₂, podría estar favorecido en una primera instancia por interacciones de tipo hidrofílicas de estas grandes cadenas PEO, con el residuo aminoacídico Asp ubicado en el extremo contrario al sitio de conjugación con la NPAu, para luego recubrir la NPAu a través de interacciones de tipo anfifílicas, entre el monómero y el péptido CLPFFD-NH₂.

4.4 Análisis termogravimétrico

Por lo general, la primera etapa de pérdida sustancial de masa observada en una TG se debe principalmente a pérdida de agua por evaporación.^{61,62} A pesar de haber recurrido a la liofilización para la preparación de la muestra, este método no elimina las moléculas de agua en su totalidad. Podemos observar de las figuras 3.13 A-E y de las tablas 3.6 y 3.7 que la ETAPA 1, proceso correspondiente a la pérdida de agua por parte de ellas, se inicia poco después de comenzado el programa de calentamiento. La explicación a la pérdida temprana de masa podría encontrarse en el tamaño

nanométrico que poseen las NPAu, su conjugado y nanocompuestos. Una consecuencia a la reducción de tamaño, en comparación a los materiales en estado *bulk*, es una mayor área superficial con respecto a este último. Esto se debe a que al reducir el tamaño de un material, el área superficial disminuye más lentamente en comparación al volumen. Así, para materiales nanométricos, la razón área superficial/volumen es mucho mayor que para los materiales *bulk*. Una mayor área de exposición presente en las NPAu, significaría una mayor área para la transferencia de energía entre los átomos expuestos en la superficie de la nanopartícula. Además, este tipo de nanomaterial posee un empaquetamiento denso, que estaría favoreciendo la transferencia de calor y por lo tanto el calentamiento y evaporación de agua a T° bajo 100°C registradas por el equipo. Es importante señalar que en estos tipos de experimentos no es posible conocer de forma precisa la T° de la muestra, de la misma forma que no se puede conocer el gradiente de T° dentro de la misma^{61, 62}. Por lo tanto la T° registrada es la que alcanza el equipo, y la que alcance la muestra dependerá de distintas variables experimentales, como lo son el material del portamuestra, velocidad de calentamiento, la atmósfera, las propiedades físicas (tamaño, densidad, etc.) y cantidad de la muestra.

El conjugar las NPAu con el péptido CLPFFD-NH₂, produjo que NPAu-CLPFFD presentara una mayor pérdida aparente de moléculas de agua, con respecto a las NPAu estabilizadas con citrato (tabla 3.7). El mismo efecto se presentó para los nanocompuestos en estudio, posiblemente atribuido a que son productos de recubrimiento del conjugado. La presencia de moléculas de péptido en la superficie de la NPAu, podría haber favorecido la retención de moléculas de agua en ella al momento de la liofilización, aumentando el porcentaje de agua en la muestra. Esta retención de agua podría deberse justamente al carácter anfipático que presenta el péptido, el que podría estar relacionado con una mayor interacción con las moléculas de agua, respecto a lo que sucede en una NPAu no recubierta, la cual posee un carácter hidrofóbico. Se observa de la tabla 3.7 que el nanocompuesto formado por NPAu-CLPFFD utilizando concentraciones >30% CMC de Pluronic[®] L121, presenta una pérdida de moléculas de agua menor con respecto a los otros nanocompuestos. Esto podría atribuirse a las características altamente hidrofóbicas de este poloxámero,

que contribuiría a una mayor resistencia a la pérdida de agua durante el calentamiento. La ETAPA 2 se presentó en todas las muestras (figura 3.13 A-E) y podría corresponder a la descomposición del citrato, que podría estar presente en diferentes grados en las muestras, con la concomitante liberación de CO₂. De esta manera, es necesario un futuro análisis mediante métodos simultáneos, como por ejemplo TG-DTA y TG-DSC para complementar la información obtenida mediante termogravimetría y atribuir con mayor seguridad las reales causas a cada proceso.

En general, el recubrimiento con Pluronic[®] del conjugado NPAu-CLPFFD mantuvo su estabilidad térmica en un amplio rango de T^o (25-200°C), donde sólo se puede observar pérdida de masa asociada a la evaporación de agua. Cabe mencionar que pasados los 227,9°C, la muestra correspondiente a NPAu-CLPFFD recubierta con Pluronic[®] P85 utilizando concentraciones >30% CMC, presentó una marcada pérdida de masa, perdiendo un 100% de la masa a los ~535,4°C. Esta pérdida abrupta de masa a altas T^o podría atribuirse a una desestabilización térmica de la NPAu, debido al recubrimiento con poloxámero, o bien a un error en la medición, lo cual debe corroborarse en experimentos posteriores.

Las muestras de NPAu, su conjugado NPAu-CLPFFD y NPAu-CLPFFD recubiertas con Pluronic[®] L121 utilizando concentraciones >30% CMC, presentan similares perfiles termogravimétricos entre 25-600°C, en donde se observa la presencia de 3 etapas con rangos de T^o y pérdidas de masa aparentemente similares (figuras 3.13-A, B y E). Esto podría estar reafirmando la hipótesis establecida en la sección 4.3.3.4, en la que se propone que Pluronic[®] L121 no es capaz de recubrir el conjugado NPAu-CLPFFD. Por lo tanto, al observar la figura 3.13-E (TG de NPAu-CLPFFD con Pluronic[®] L121) sólo estaríamos frente a un perfil termogravimétrico con características similares al perfil de la figura 3.13-B (TG de NPAu-CLPFFD).

4.5 PAMPA

El ensayo PAMPA tiene como finalidad determinar la capacidad que poseen los nanocompuestos de atravesar la BHE mediante sólo difusión pasiva. Cualquier otro mecanismo diferente a este (ej. transporte activo mediado por transportadores), no

puede determinarse por esta metodología. Este método *in vitro* posee una excelente correlación *in vivo*, en cuanto al estudio de fármacos y su capacidad de atravesar diferentes barreras lipídicas de relevancia biológica, como lo es la BHE mediante difusión pasiva.⁵⁹ Además se caracteriza por ser un método sencillo y rápido de llevar a cabo, poseyendo una excelente relación costo-eficacia.

Como control positivo se utilizó tiopental, fármaco anticonvulsivante que presenta un LogP de 2,3, con gran carácter lipofílico, indicativo de que puede atravesar membranas lipídicas con facilidad. La P_e calculada para este compuesto fue de $16,7 \pm 1,9 \times 10^{-6}$ cm/s lo que se condice con los valores obtenidos por Li Di et al,⁵⁹ donde la P_e para esta molécula fue de 18×10^{-6} cm/s. De acuerdo a la tabla 4.1, elaborada a partir de valores de P_e para la predicción de la capacidad de presentar transporte pasivo *in vivo*, de diferentes compuestos a través de la BHE,⁶² el tiopental presenta buen transporte por difusión pasiva a través de esta barrera. El bajo porcentaje de permeabilidad (menor al 50%) obtenido para tiopental en este ensayo (tabla 3.8, parte superior), se puede atribuir a la alta concentración utilizada (200 $\mu\text{g/mL}$) y al tiempo de ensayo (24 horas). Esta alta concentración fue necesaria para facilitar la medición mediante espectrofotometría de absorción molecular luego de realizar el ensayo.

P_e (cm/s)	Transporte a través de la BHE
$> 4,0 \times 10^{-6}$	Alta permeabilidad
$4,0 \times 10^{-6} - 2,0 \times 10^{-6}$	Permeabilidad intermedia
$< 2,0 \times 10^{-6}$	Baja permeabilidad

Tabla 4.1: Predicción de transporte *in vivo* a partir de valores de P_e para el ensayo PAMPA.

Como control negativo se utilizó L-DOPA, pro-fármaco que en el organismo se metaboliza a dopamina. Esta molécula atraviesa la BHE a través de mecanismos facilitados, lo cual explicaría su nula P_e obtenida en este ensayo.

Ninguna de las muestras estudiadas fue detectada en el compartimento aceptor luego de 24 horas de incubación. Estos resultados indicarían que el recubrimiento con Pluronic[®] no mejora el traspaso a través de modelos de membrana biológica, mediante difusión pasiva, con respecto al conjugado NPAu-CLPFFD en este tiempo. Esta observación nos permitiría inferir que ningún nanocompósito posee la capacidad de

facilitar el cruce de la BHE, a través de mecanismos de difusión pasiva para el caso de las NPAu. Cabe señalar que existe la posibilidad de que los nanocompuestos hayan quedado retenidos en la membrana de fosfolípidos, por lo cual son necesarios futuros análisis de la membrana al concluir el ensayo, para verificar esta hipótesis.

4.6 Estudio de alteraciones en la permeabilidad y estabilidad de liposomas

4.6.1 Ensayo permeabilidad de liposomas

Los cambios en la permeabilidad de los liposomas de FC fueron detectados por el incremento en la intensidad de la fluorescencia, debido a la liberación de CF atrapada en estas vesículas. La figura 3.14 muestra el porcentaje de CF liberada en función del tiempo, debido a la interacción de los liposomas con los nanocompuestos (NPAu-CLPFFD recubiertos con Pluronic[®] P85, F127 o L121 utilizando concentraciones >30% CMC) o sus correspondientes controles (soluciones de Pluronic[®] con concentración >30% CMC). La mayor pendiente graficada en la figura 3.14 durante las primeras 3 horas de ensayo para los 3 nanocompuestos y sus controles, podría indicar que la interacción inicial del poloxámero en la superficie de la NPAu y/o en solución produce una alteración en la membrana, promoviendo la formación de agujeros hidrofílicos similares a los descritos por otros tensoactivos.⁶⁵ La presencia de estos agujeros favorece la liberación de CF hacia el exterior del liposoma, aumentando la fluorescencia. No obstante al cabo de tres horas la membrana se estabiliza (se cierran los agujeros) y la velocidad de salida de la CF es similar a la de los controles. Lo anterior indicaría que la interacción entre la muestra y la membrana, y su posible inclusión entre ella y los fosfolípidos, necesita unas 3 horas de incubación.

Se puede observar en la figura 3.14 que después de los 30 minutos, el conjugado NPAu-CLPFFD recubierto con Pluronic[®] P85 o F127 libera porcentajes similares de CF, los cuales son mayores que para los nanocompuestos recubiertos con Pluronic[®] L121 durante todo el periodo de incubación. Esto se relaciona con una mayor capacidad para modificar la permeabilidad por parte de los Pluronic[®] P85 y F127. Notablemente, estos polímeros al estar formando el nanocompuesto mantienen dicho comportamiento. Esto posiblemente se atribuye a sus características principalmente hidrofílicas,

otorgadas por la presencia de grandes cadenas compuestas por bloques hidrofílicos PEO, lo cual facilitaría una primera interacción con la membrana y su posterior distribución en ella. Por otro lado, Pluronic® L121 posee principalmente bloques hidrofóbicos PPO, que podrían estar comprometiendo la interacción de las NPAu con la membrana.

Cabe señalar que se observa en la figura 3.14 un menor porcentaje de fluorescencia para todos los nanocompuestos, con respecto a los polímeros en solución, a todos los tiempos de incubación. Esto podría deberse a un “atrapamiento” de los monómeros por parte de las NPAu en su superficie o bien una competencia por parte de la nanopartícula y los monómeros por la superficie del liposoma. En general, la interacción de las muestras y controles con la membrana lipídica incrementa la permeabilidad de esta, posiblemente debido a cambios en su organización por la presencia de estos poloxámeros.

Para el conjugado NPAu-CLPFFD recubierto con Pluronic® F127 utilizando una concentración >30% CMC, al igual que para algunos tensoactivos típicos, el aumento de permeabilidad se acompañó por un aumento de tamaño de los liposomas hasta la primera hora (Figura 3.14 y 3.15-B).⁶⁶ Luego, entre la primera y tercera hora, existe aumento de la permeabilidad pero acompañada de una disminución de tamaño, lo cual puede ser atribuido a alteraciones en la estabilidad del liposoma, como se observa en la figura 3.15-B (*explicado en la siguiente sección*). En el caso del conjugado NPAu-CLPFFD recubierto con Pluronic® P85 o L121, utilizando concentraciones >30% CMC, no se observan cambios de tamaños antes de la primera hora (figura 3.15-B), por lo cual el aumento de permeabilidad puede ser atribuido a cambios en la composición de la bicapa, por la presencia de las muestra en ella. Estos poloxámeros pueden inducir defectos en la membrana y así incrementar su permeabilidad, cambios que no necesariamente están asociados a modificaciones en el tamaño del liposoma. A las 24 horas y para los 3 nanocompuestos, el aumento de permeabilidad podría estar asociado a alteraciones en el tamaño, debido a alteraciones en la estabilidad de los liposomas.

4.6.2 Ensayo estabilidad de liposomas

Mediante DLS se evaluó la estabilidad de liposomas de FC, por la interacción con los nanocompuestos de NPAu-CLPFFD recubiertos con Pluronic[®] P85, F127 o L121 utilizando concentraciones >30% CMC. Además se evaluó mediante la misma metodología muestras de liposomas, liposomas + NPAu, liposomas + NPAu-CLPFFD y liposomas + soluciones de Pluronic[®] P85, F127 o L121 a una concentración >30% CMC.

Tal como se describió en la sección 3.7.2 (figura 3.15-A), se produce un aumento del DH promedio de los liposomas luego de la incubación con los polímeros solos en solución, lo que puede atribuirse a una interacción entre ambas especies. Las cadenas hidrofílicas PEO (véase *figuras 1.5 y 1.6*) de los Pluronic[®] podrían estar favoreciendo un primer acercamiento hacia las cabezas polares de los fosfolípidos que constituyen el liposoma. Luego la interacción pasaría a ser predominantemente hidrofóbica entre los bloques PPO y las cadenas fosfolípicas de las vesículas. Claramente, la intensidad de esta interacción está dominada por las cantidades relativas de los bloques hidrofílicos PEO y los bloques hidrofóbicos PPO de cada Pluronic[®].

Para el caso de los nanocompuestos formados por NPAu-CLPFFD con los Pluronic[®] F127 y P85, el comportamiento del DH promedio de los liposomas fue diferente que para los polímeros en solución, observándose a las 24 horas de incubación una reducción de tamaño (Figura 3.15-A y B). Esto podría ser atribuido a la disposición espacial que adoptan los monómeros de Pluronic[®], al encontrarse interactuando con el péptido CLPFFD-NH₂ alojado en la superficie de la NPAu, tal como se discutió en la sección 4.3.4.

Notablemente, para el caso del nanocompuesto recubierto con Pluronic[®] F127 durante la primera hora de incubación, se observó un aumento del DH promedio de los liposomas (Figura 3.15-B). Esto podría atribuirse a una interacción del liposoma con el nanocompuesto que produce un recubrimiento de la bicapa de la vesícula, que al cabo de tres horas da origen a una desestabilización del sistema, formándose estructuras liposomales de menor tamaño. Por otro lado, para el caso del nanocompuesto formado

por Pluronic® P85, no se observó un aumento del DH promedio inicial de los liposomas, pero si una disminución de tamaño al cabo de 24 horas (Figura 3.15-B). Esto podría ser atribuido a una interacción similar a la del nanocompuesto formado por el recubrimiento con Pluronic® F127 pero de menor intensidad, la cual no generaría un aumento de tamaño a las primeras horas, pero si una desestabilización del liposoma en función del tiempo.

A diferencia de lo que sucede para los nanocompuestos recubiertos con Pluronic® P85 o F127, el recubierto con Pluronic® L121 produjo al cabo de 3 horas de incubación un aumento del DH promedio de los liposomas, siendo este comportamiento similar al del polímero correspondiente en solución (figura 3.15-A y B). Según se discutió en la sección 4.3.4, este poloxámero podría no estar recubriendo al conjugado NPAu-CLPFFD debido a su carácter marcadamente hidrofóbico (HLB de 1), por lo tanto el fenómeno aquí descrito podría ser atribuido al efecto del polímero en solución. Interesantemente, a las 24 horas de incubación se observó una disminución del área del pico correspondiente a los nanocompuestos y una distribución más heterogénea de los tamaños (picos con distribución más ancha) del liposoma (figura 3.16-D y E), lo que podría estar relacionado con un atrapamiento de nanopartículas por el complejo liposoma-Pluronic® L121.

Capítulo 5

Conclusiones

- ✓ Según los resultados obtenidos, sólo los Pluronic[®] P85 y F127 (cuando se utilizaron concentraciones por >30% CMC) podrían estar recubriendo al conjugado NPAu-CLPFFD, debido posiblemente a sus propiedades hidrofílicas en comparación al Pluronic[®] L121. Estas propiedades les permitirían a dichos Pluronic[®] interactuar con las moléculas de péptido CLPFFD-NH₂ alojadas en la superficie de la NPAu.
- ✓ Estudios utilizando modelos de membranas biológicas permitieron determinar que estos nanocompósitos son capaces de modificar la estabilidad y permeabilidad de las membranas, posiblemente debido a cambios en su organización. Dichas modificaciones se encuentran relacionadas con sus propiedades fisicoquímicas y estructurales.
- ✓ A pesar de las modificaciones en cuanto a permeabilidad y estabilidad provocadas por estos nanocompósitos en las vesículas de FC, ninguno fue capaz de mejorar el traspaso mediante difusión pasiva, a través del modelo de membrana biológica en el ensayo PAMPA al tiempo estudiado (24 horas). Por lo tanto estos nanocompósitos son capaces de modificar la permeabilidad y estabilidad de estos modelos de membrana biológica, pero no mejoran el traspaso de NPAu a través estos mediante difusión pasiva.
- ✓ Los estudios de caracterización realizados permitieron el inicio del desarrollo de nuevos sistemas de *drug delivery*, en donde cada resultado obtenido dio luces acerca de las características adquiridas por el sistema. La determinación del tamaño hidrodinámico, banda del plasmón superficial, potencial zeta, morfología y estabilidad térmica fueron útiles para guiar el comienzo del desarrollo de estos nuevos sistemas, que se basan principalmente en mejorar los ya existentes.
- ✓ Debido a las promisorias propiedades inhibitorias de la P-gp por parte de los Pluronic[®] y a la propuesta del desarrollo de estos nuevos sistemas de *drug delivery* compuestos por el conjugado NPAu-CLPFFD recubierto por estos poloxámeros, futuros estudios celulares *in vitro* y estudios en animales *in vivo* utilizando estos nanocompósitos son necesarios para determinar su real efectividad, en cuanto a su capacidad de mejorar la llegada de NPAu al SNC para aplicaciones en la EA.

Bibliografía

- 1- Coppo J. Nanotecnología, medicina veterinaria y producción agropecuaria. *Rev. Vet.* 1, 61–71 (2009).
- 2- Waldner J. Wiley & Sons. *Nanocomputers and swarm intelligence.* 172 (2008).
- 3- Kogan M., Olmedo I., Hosta L., Guerrero A., Cruz L. & Albericio F. Peptides and metallic nanoparticles for biomedical applications. *Nanomed.* 2, 287–306 (2007).
- 4- De la Fuente J., & Berry C. Tat peptide as an efficient molecule to translocate gold nanoparticles into the cell nucleus. *Bioconj. Chem.* 16, 1176–1180 (2005).
- 5- Guerrero S., Araya E., Fiedler J., Arias J., Adura C., Albericio F., Giralt E., Arias J., Fernández M. & Kogan M. Improving the brain delivery of gold nanoparticles by conjugation with an amphipathic peptide. *Nanomed.* 5(6), 897–913 (2010).
- 6- Panyam J., Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55, 329–347 (2003).
- 7- Yang P., Sun X., Chiu J., Sun H., He Q. Transferrin-mediated gold nanoparticle cellular uptake. *Bioconj. Chem.* 16, 494–496 (2005).
- 8- Chen J., Wiley B., Li Z. et al. Gold nanocages: engineering their structure for biomedical applications. *Adv. Mat.* 17, 2255–2261 (2005).
- 9- Iyer A., Khaled G., Fang J., Maeda H. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug Discov. Today.* 11, 812-8 (2006).
- 10- Pan Y., Neuss S.. Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small* 3(11), 1941-1949 (2007).
- 11- Link S. & El-Sayed M. Optical properties and ultrafast dynamics of metallic nanocrystals. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 331-366 (2003).
- 12- Liz-Marzán L. Nanometals: Formation and color. *Materials Today* 7, 26-31 (2004).
- 13- Pinchuck A., Kreibig U., & Hilger A. Optical properties of metallic nanoparticles: influence of interface effects and interband transitions. *Surf. Sci.* 557, 269-280 (2004).
- 14- El-Sayed M. & Link S. Size and temperature dependence of the plasmon absorption of colloidal gold nanoparticles. *J. Phys. Chem. B.* 103, 4212-4217 (1999).
- 15- Zhong C., Njoki P., Lim I., Mott D., Park H. Y., Khan B., Mishra S., Sujakumar R., & Luo J. Size correlation of optical and spectroscopic properties for gold nanoparticles. *J. Phys. Chem. C.* 111, 14664-14669 (2007).

- 16- Schatz G., Kelly K., Coronado E., & Zhao L. The optical properties of metal nanoparticles: The influence of size, shape, and dielectric environment. *J. Phys. Chem. B.* 107, 668-677 (2003).
- 17- Gobin A., Watkins E., Quevedo E., Colvin V. & West J. Near-infrared-resonant gold/gold sulfide nanoparticles as a photothermal cancer therapeutic agent. *Small.* 6, 745-52 (2010).
- 18- Soto C. Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 49-60 (2003).
- 19- Morley J. & Hurtig H. Current understanding and management of Parkinson disease: five new things. *Neurology* 75, S9-15 (2010).
- 20- Pike C., Walencewicz A., Glabe C. & Cotman CW. In vitro aging of beta-amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity. *Brain Res.* 563, 311-4 (1991).
- 21- Lorenzo A. & Yankner B. Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 12243-7 (1994).
- 22- Ittner L. & Götz J. Amyloid- β and tau--a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 12(2), 65-72 (2011).
- 23- Stefani M. & Dobson C. Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *J. Mol. Med.* 81, 678-699 (2003).
- 24- Harper J., Wong S., Lieber C. & Lansbury P. Assembly of amyloid protofibrils: an in vitro model for a possible early event in Alzheimer's disease. *Biochem.* 38, 8972-8980 (1999).
- 25- Bieler S. & Soto C. Beta-Sheet breakers for Alzheimer's disease therapy. *Current Drug Targets* 5 (6), 553-558 (2004).
- 26- Soto C., Sigurdsson E., Morelli L., Kumar R., Castaño E. & Frangione B. beta-sheet breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis: Implications for Alzheimer's therapy. *Nat. Med.* 4, 822-826 (1998).
- 27- Kogan M., Bastus N., Amigo R., Grillo-Bosch D., Araya E., Turiel A., Labarta A., Giralt E., & Puntès V. Nanoparticle-mediated local and remote manipulation of protein aggregation. *Nano Lett.* 6, 110 (2006).
- 28- Adura C., Guerrero S., Salas E., Medel L., Riveros A., Mena J., Arbiol J., Albericio F., Giralt E. & Kogan M. Stable conjugates of peptides with gold nanorods for

biomedical applications with reduced effects on cell viability. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 5, 4076-85 (2013).

29- Lin J., Zhang H., Chen Z. & Zheng Y. Penetration of lipid membranes by gold nanoparticles: Insights into cellular uptake, cytotoxicity, and their relationship. *ACS Nano* 4, 5421 (2010).

30- Olmedo I., Araya E., Sanz F., Medina E., Arbiol J., Toledo P., Alvarez-Lueje A., Giralt E. & Kogan M. J. 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. *Bioconj. Chem.* 19, 1154–1163 (2008).

31- Pardridge W. Blood-brain barrier delivery. *Drug Discov. Today* 12, 54-61 (2007).

32- Spuch C. & Navarro C. Transport Mechanisms at the Blood-Cerebrospinal-Fluid Barrier: Role of Megalin (LRP2). *Rec. Pat. Endoc. Metab. Immun. Drug Discov.* 4, 190-205 (2010).

33- Abbott N., Rönnbäck L. & Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 41-53 (2006).

34- Abbott N. Prediction of blood-brain barrier permeation in drug discovery from in vivo, in vitro and in silico models. *Drug Discov. Today Tech.* 1, 337-463 (2004).

35- Lasagna-Reeves C., Gonzales-Romero D. & Barria M. et al. Bioaccumulation and toxicity of gold nanoparticles after repeated administration in mice. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 393, 649–655 (2010).

36- De Jong W., Hagens W., Krystek P., Burger M., Sips A. & Geertsma R. Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Biomater.* 29, 1912–1919 (2008).

37- Sonavane G., Tomoda K. & Makino K. Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous administration: effect of particle size. *Colloids Surf. B. Biointer.* 66, 274–280 (2008).

38- Shaik N., Giri N. & Elmquist F. Investigation of the Micellar Effect of Pluronic P85 on P-glycoprotein Inhibition: Cell Accumulation and Equilibrium Dialysis Studies. *J. Pharm. Sciences* 98, N° 11 (2009).

39- Choo E., Leake B., Wandel C., Imamura H., Wood A., Wilkinson G. & Kim R. Pharmacological inhibition of P-glycoprotein transport enhances the distribution of HIV-1 protease inhibitors into brain and testes. *Drug Metab. Dispos.* 28, 655–660 (2000).

- 40- Bardelmeijer H., Ouwehand M., Beijnen J., Schellens J. & van Tellingen O. Efficacy of novel P-glycoprotein inhibitors to increase the oral uptake of paclitaxel in mice. *Invest. New Drugs* 22, 219–229 (2004).
- 41- Alvarez C., Rey A., Brea J., Loza M., Concheiro A., Sosnik A. Inhibition of P-glycoprotein pumps by PEO–PPO amphiphiles: branched versus linear derivatives. *Nanomed.* 5(9), 1371–1383 (2010).
- 42- Dordunoo S., Jackson J., Arsenault L., Oktaba A., Hunter W. & Burt H. Taxol encapsulation in poly(epsilon-caprolactone) microspheres. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 36, 279–282 (1995).
- 43- Ameller T., Marsaud V., Legrand P., Gref R., Barratt G. & Renoir J. Polyester-poly(ethylene glycol) nanoparticles loaded with the pure antiestrogen RU58668: Physicochemical and opsonization properties. *Pharm. Res.* 20, 1063–1070 (2003).
- 44- Kabanova A., Batrakovaa E. & Alakhovb V. Pluronic ® block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. *J. Cont. Rel.* 82, 189–212 (2002).
- 45- Allen C., Maysinger D. & Eisenberg A. Nanoengineering block copolymer aggregates for drug delivery. *Colloids Surfaces B. Biointer.* 16, 3–27 (1999).
- 46- Kabanov A. & Alakhov V. Pluronic block copolymers in drug delivery: From micellar nanocontainers to biological response modifiers. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 19, 1–72 (2002).
- 47- Batrakova E., Li S., Li Y., Alakhov V., Elmquist W. & Kabanov A. Distribution kinetics of a micelle-forming block copolymer Pluronic P85. *J. Cont. Rel.* 100, 389–397 (2004).
- 48- Batrakova E., Han H., Miller D. & Kabanov A. Effects of pluronic P85 unimers and micelles on drug permeability in polarized BBMEC and Caco-2 cells. *Pharm. Res.* 15, 1525–1532 (1998).
- 49- Miller D., Batrakova E. & Kabanov A. Inhibition of multidrug resistance-associated protein (MRP) functional activity with pluronic block copolymers. *Pharm. Res.* 16(3), 396–401(1999).
- 50- Miller D., Batrakova E., Waltner T., Alakhov V., Kabanov A. Interactions of pluronic block copolymers with brain microvessel endothelial cells: evidence of two potential pathways for drug absorption. *Bioconjug. Chem.* 8(5), 649–657 (1997).

- 51- Kabanov A., Batrakova E. & Alakhov V. Pluronic® block copolymers for overcoming drug resistance in cancer. *Adv. Drug Del. Rev.* 54, 759–779 (2002).
- 52- Alakhova D., Rapoport N. & Batrakova E. et al. Differential metabolic responses to Pluronic in MDR and non-MDR cells: a novel pathway for chemosensitization of drug resistant cancers. *J. Cont. Rel.* 142, 89–100 (2010).
- 53- Firestone M., Wolf A. & Seifert S. Smallangle X-ray scattering study of the interaction of poly(ethylene oxide)-b-poly(propylene oxide)-b-poly(ethylene oxide) triblock copolymers with lipid bilayers. *Biomacrom.* 4, 1539–1549 (2003).
- 54- Lee B. & Firestone M. Electron density mapping of triblock copolymers associated with model biomembranes: insights into conformational states and effect on bilayer structure. *Biomacrom.* 9, 1541–1550 (2008).
- 55- Sosnik A., Leung B., McGuigan A., Sefton M. Collagen/poloxamine hydrogels: cytocompatibility of embedded HepG2 cells and surface attached endothelial cells. *Tissue Eng.* 11, 1807–1816 (2005).
- 56- Turkevitch J., Stevenson P. & Hillier J. Nucleation and Growth Process in the Synthesis of Colloidal Gold. *Discuss. Faraday Soc.*, 11, 55-75 (1951).
- 57- Kumar S., Gandhi K. S. & Kumar R. Modeling of formation of gold nanoparticles by citrate method. *Ind. Eng. Chem. Res.* 46, 3128-3136 (2007).
- 58- Kogan M., López O., Cocera M., López-Iglesias C., De la Maza A. & Giralt E. Exploring the Interaction of the Surfactant N-Terminal Domain of γ -Zein with Soybean Phosphatidylcholine Liposomes. *Biopol.* 73, 258–268 (2004).
- 59- Di L., Kerns E H., Fan K., McConnell O J. & Carter G T. High throughput artificial membrane permeability assay for blood–brain barrier. *Eur. J. Med. Chem.* 38(3), 223-232 (2003).
- 60- Faller B. Artificial Membrane Assays to Assess Permeability. *Current Drug Metab.* 9, 886-892 (2008).
- 61- Thermal Analysis. Wesley Wm. Third Edition. Wendlandt Wiley ISBN 0-471- 88477-4 (1986)
- 62- Thermal Analysis. Fundamentals and applications to polymer science. T. Hatakeyama & F.X. Qinn. 2nd Edition. John Wiley and Sons Ltd (1999).
- 63- Yanga T., Chenb C., Chena M., Laic C., Lianga H. & Sunga H. Shell-crosslinked Pluronic L121 micelles as a drug delivery vehicle. *Biomat.* 28, 725–734 (2007).

- 64- Merixell T. Tesis (Doctorado en Química Orgánica). Barcelona, España. Universidad de Barcelona, Facultad de Química, 2005. pp. 155-166.
- 65- Lasic D. Liposomes: from Physics to Applications. Elsevier Science Publishers BV. Amsterdam. Chap 2 (1993).
- 66- López O., De la Maza A., Coderch L., Lopez-Iglesias C., Wehrli E. & Parra J. L. Direct formation of mixed micelles in the solubilization of phospholipid liposomes by Triton X-100. FEBS Lett. 1998, 426, 314–318.

Anexo

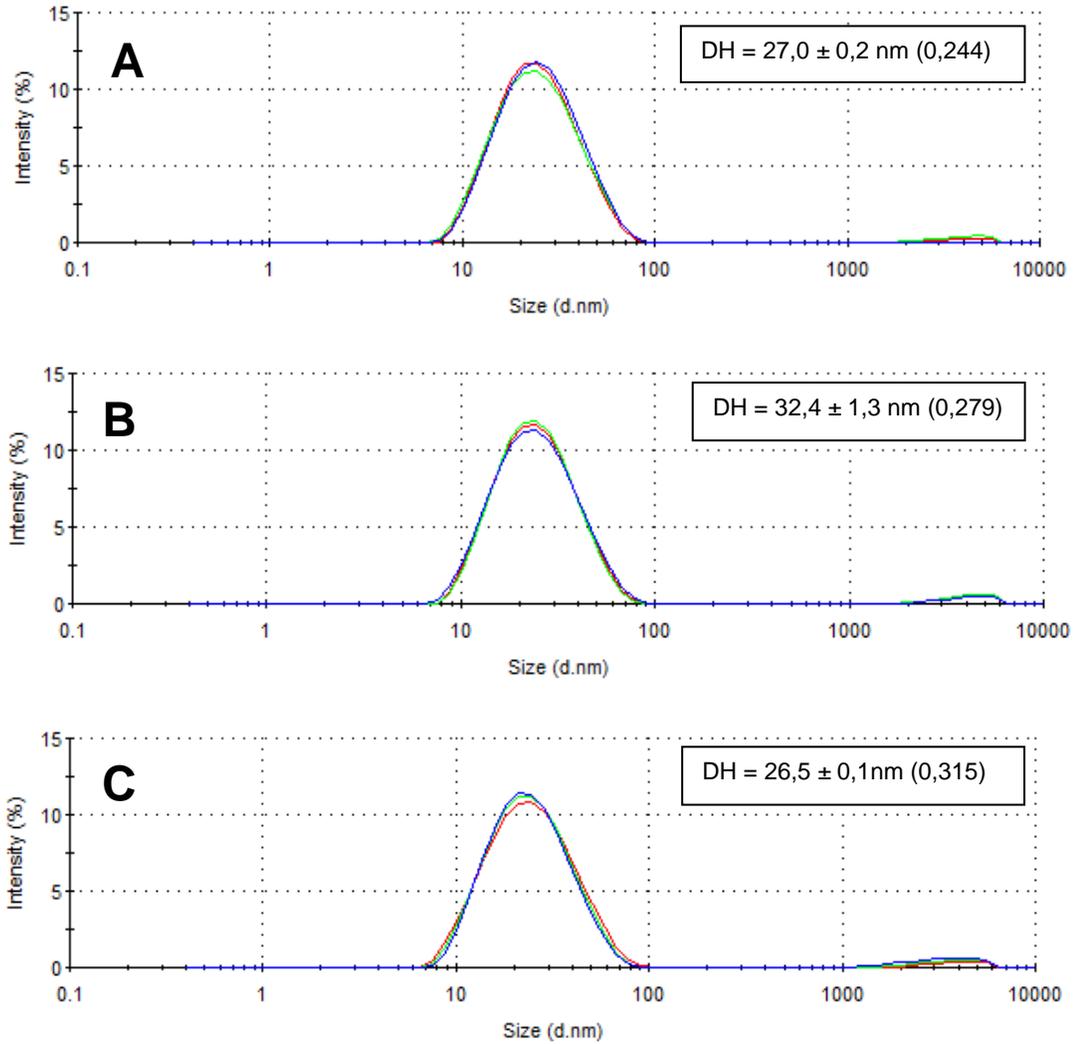


Figura A.1: Gráficos de la distribución de tamaño del conjugado NPAu-CLPFFD recubiertos con: (A) Pluronic® P85, (B) Pluronic® F127 y (C) Pluronic® L121 utilizando en los 3 casos, soluciones con concentración >30% CMC. Entre paréntesis el valor del IPD. $n=3 \pm DS$.

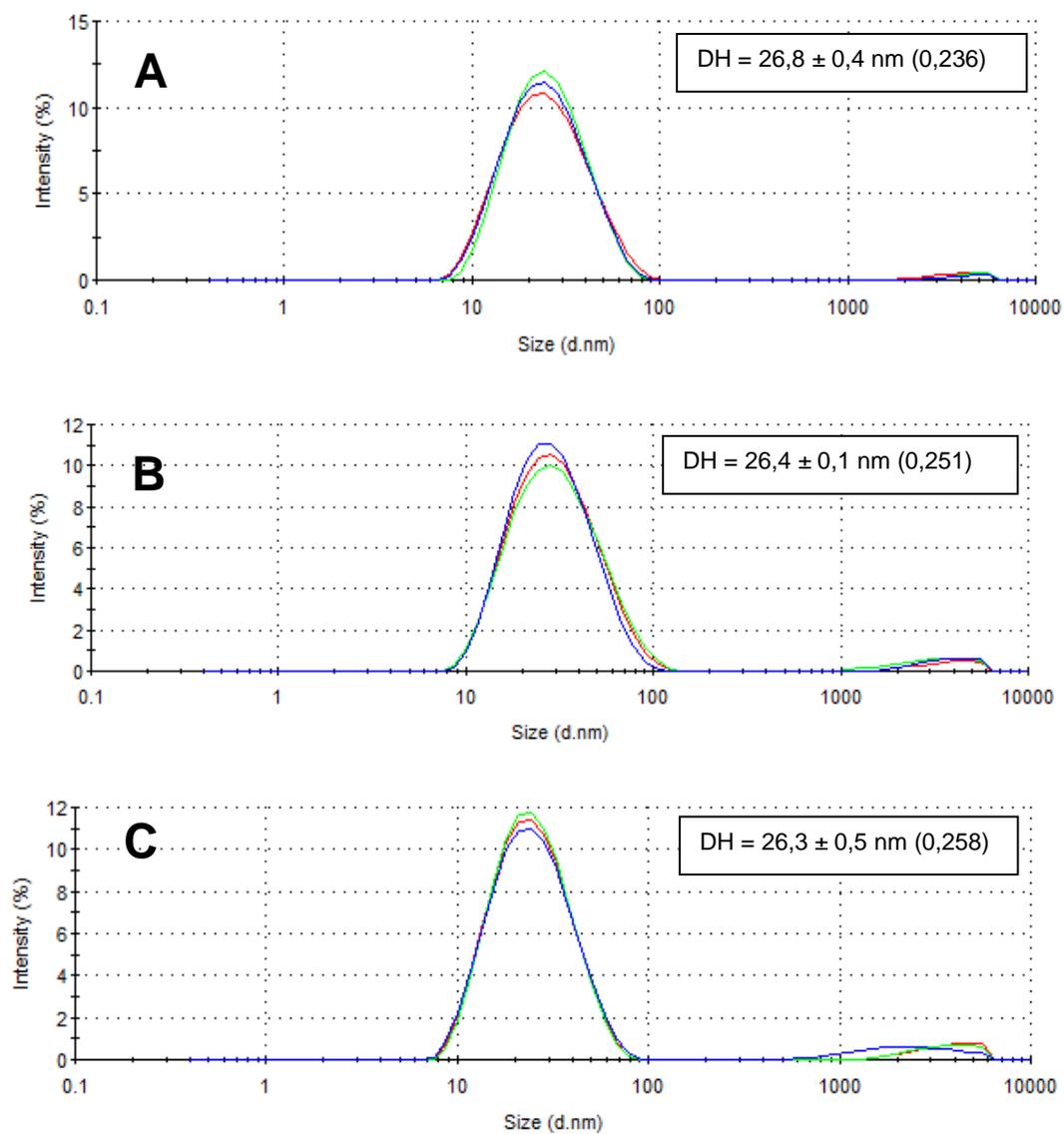


Figura A.2: Gráficos de la distribución de tamaño del conjugado NPAu-CLPFFD recubiertos con: (A) Pluronic® P85, (B) Pluronic® F127 y (C) Pluronic® L121 utilizando en los 3 casos, soluciones con concentración <30% CMC. Entre paréntesis el valor del IPD. $n=3 \pm DS$.

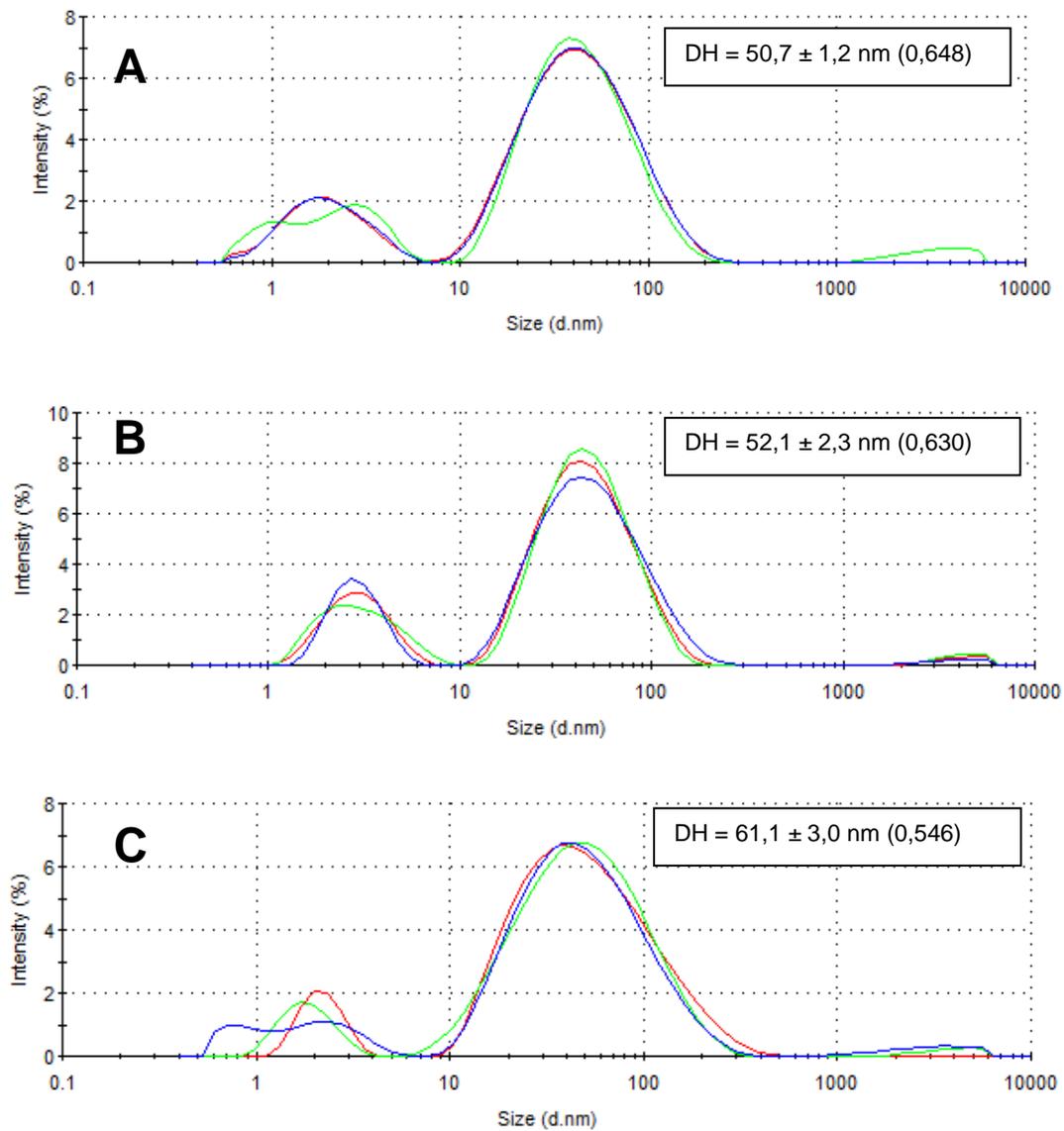


Figura A.3: Gráficos de la distribución de tamaño de NPAu recubiertas con: (A) Pluronic® P85, (B) Pluronic® F127 y (C) Pluronic® L121 utilizando en los 3 casos, soluciones con concentración >30% CMC. Entre paréntesis el valor del IPD. n=3 ± DS.

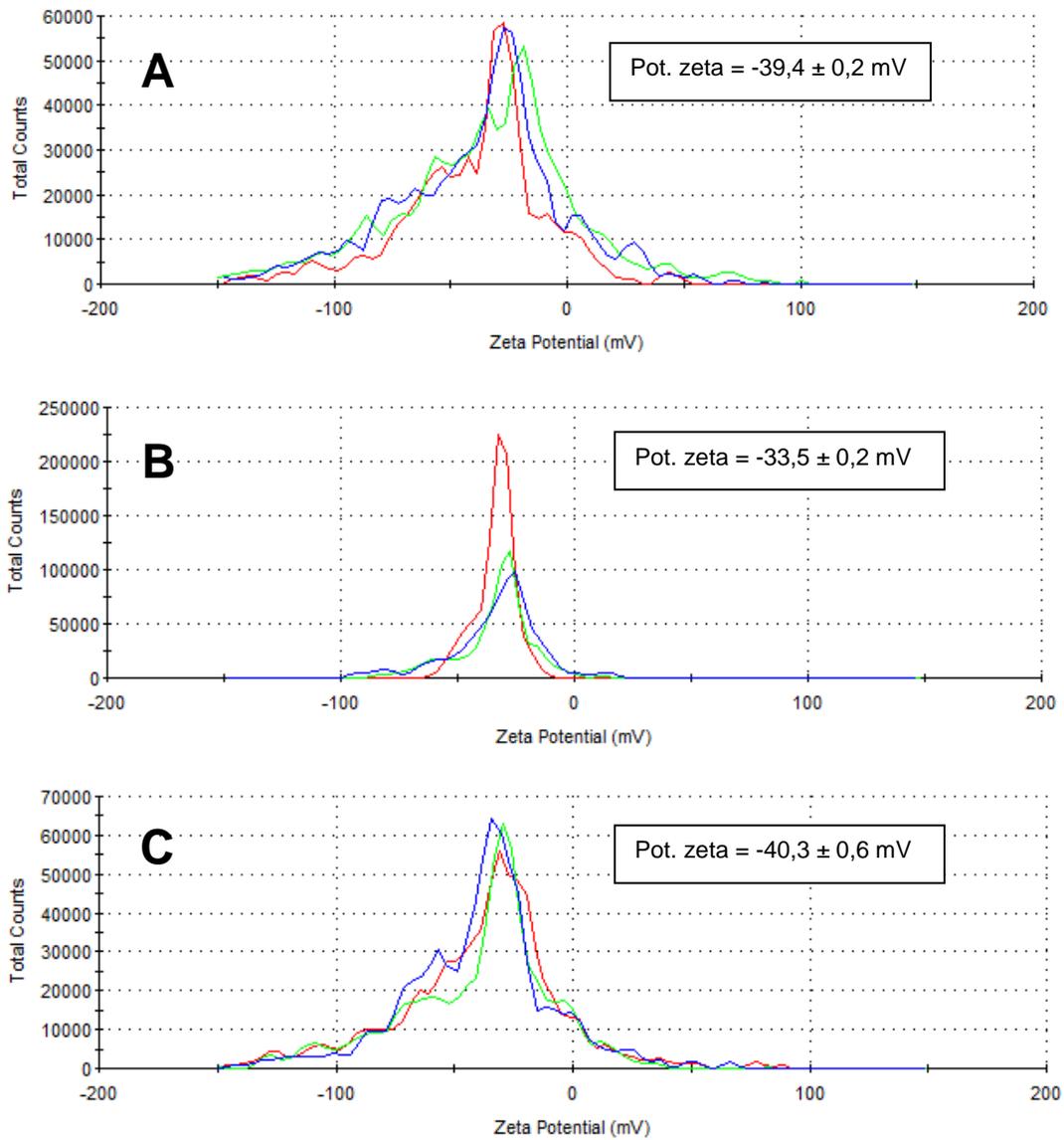


Figura A.4: Gráficos del potencial zeta del conjugado NPAu-CLPFFD recubiertos con: (A) Pluronic® P85, (B) Pluronic® F127 y (C) Pluronic® L121 utilizando en los 3 casos, soluciones con concentración >30% CMC. n=3 ± DS.

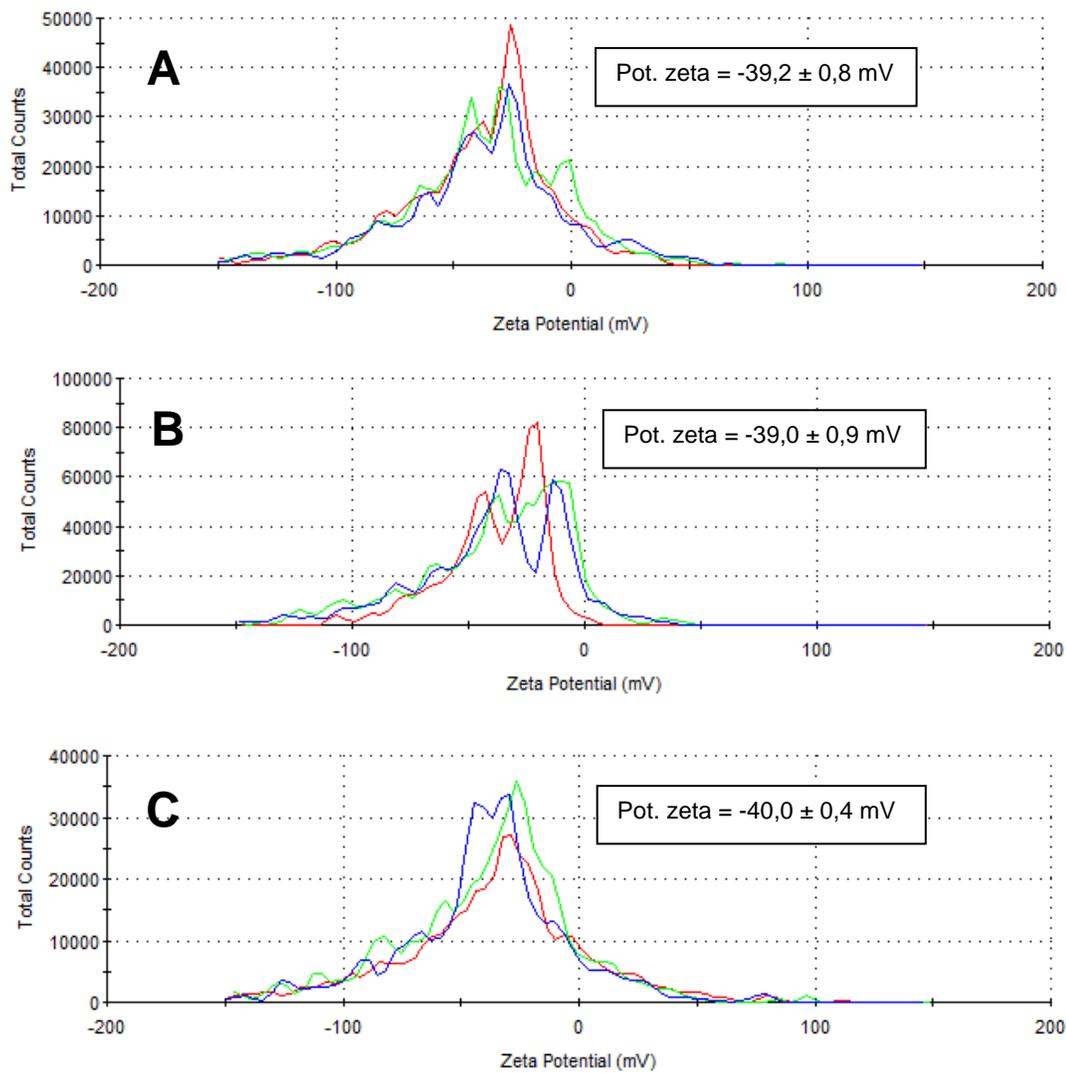


Figura A.5: Gráficos del potencial zeta del conjugado NPAu-CLPFFD recubiertos con: (A) Pluronic[®] P85, (B) Pluronic[®] F127 y (C) Pluronic[®] L121 utilizando en los 3 casos, soluciones con concentración <30% CMC. n=3 ± DS.

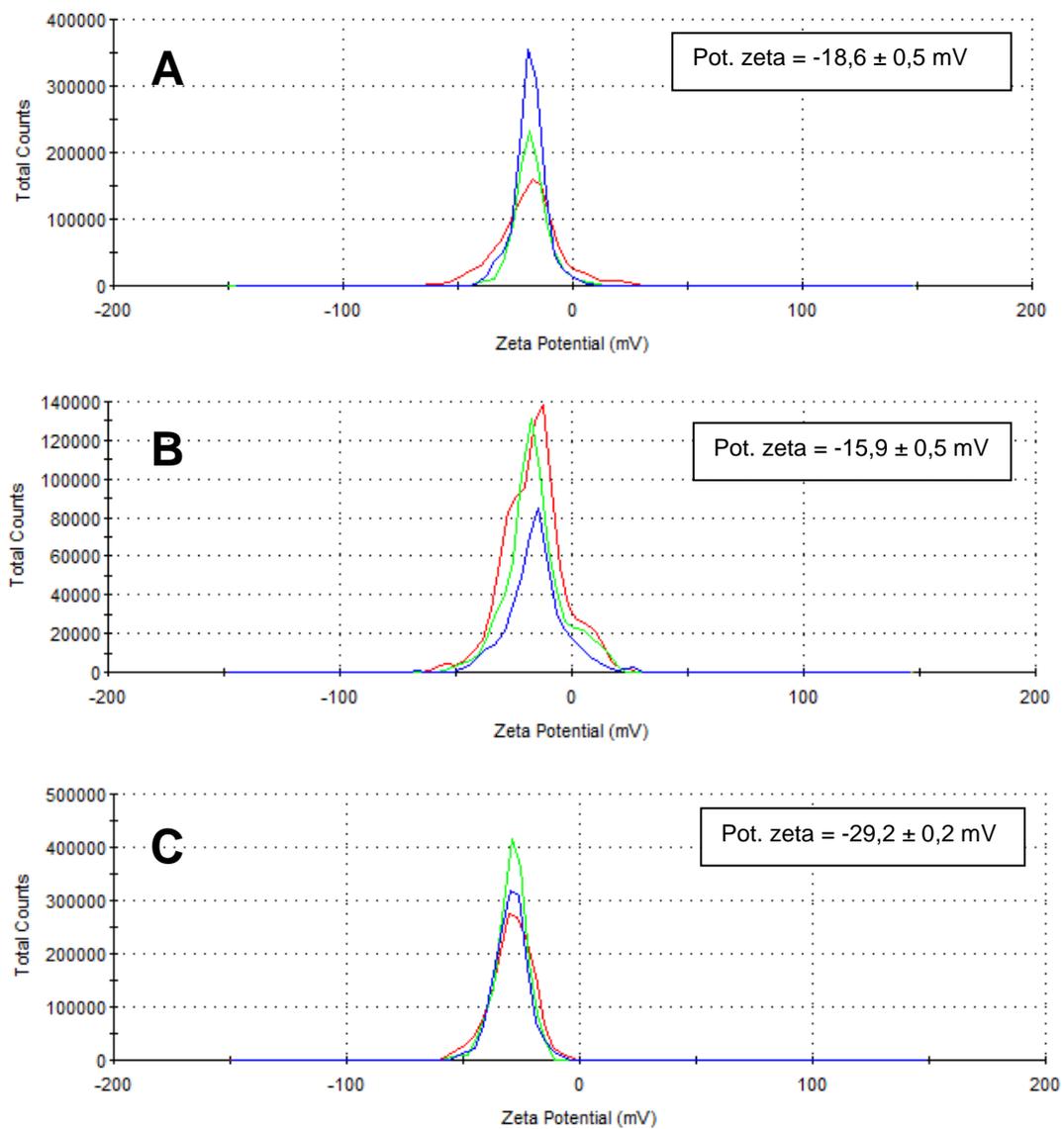


Figura A.6: Gráficos del potencial zeta de NPAu recubiertas con: (A) Pluronic® P85, (B) Pluronic® F127 y (C) Pluronic® L121 utilizando en los 3 casos, soluciones con concentración >30% CMC. $n=3 \pm \text{DS}$.

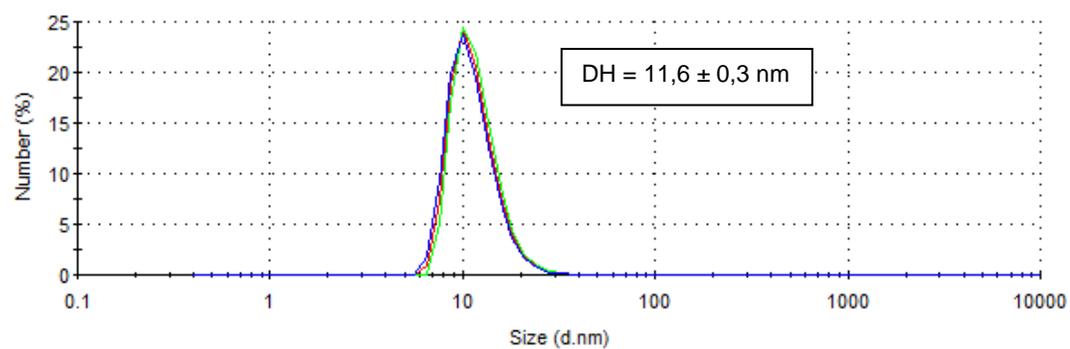


Figura A.7: Gráficos Número (%) vs Tamaño (nm) de NPAu-CLPFFD. $n=3 \pm DS$.

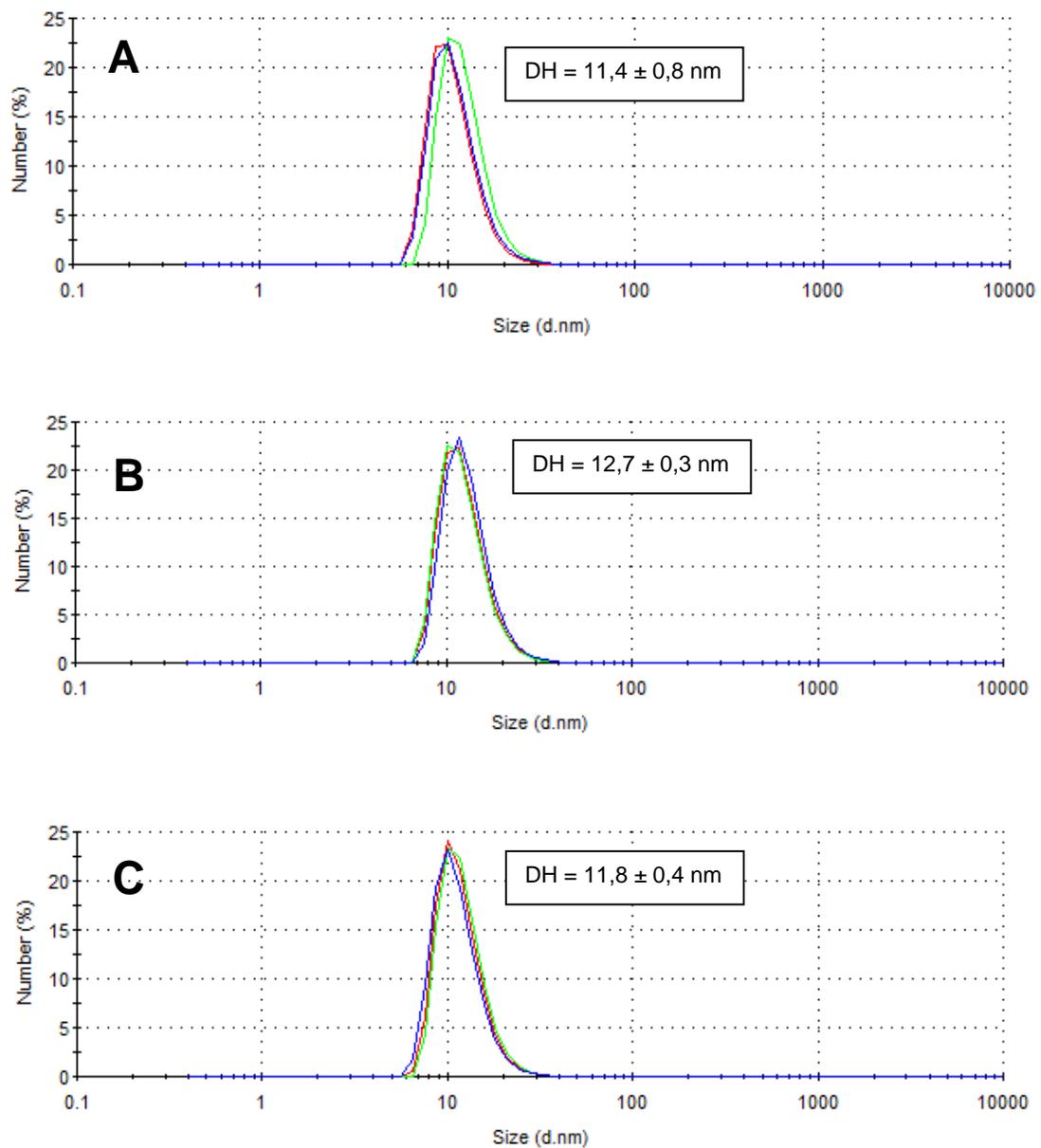


Figura A.8: Gráficos Número (%) vs Tamaño (nm) de NPAu-CLPFFD recubiertas con: (A) Pluronic® P85, (B) Pluronic® F127 y (C) Pluronic® L121 utilizando en los 3 casos, soluciones con concentración >30% CMC. $n=3 \pm DS$.

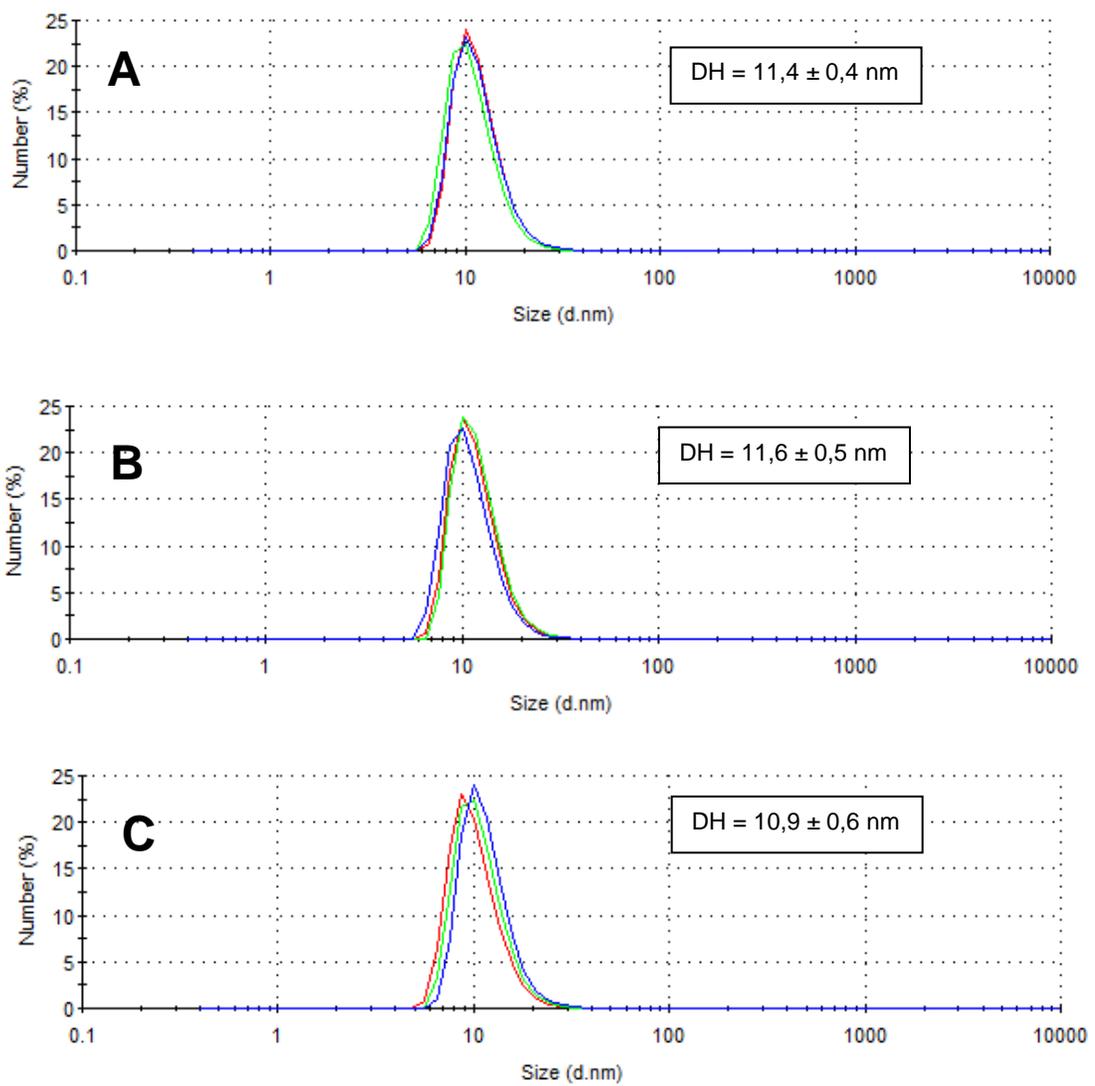


Figura A.9: Gráficos Número (%) vs Tamaño (nm) de NPAu-CLPFFD recubiertas con: (A) Pluronic® P85, (B) Pluronic® F127 y (C) Pluronic® L121 utilizando en los 3 casos, soluciones con concentración <30% CMC. n=3 ± DS.

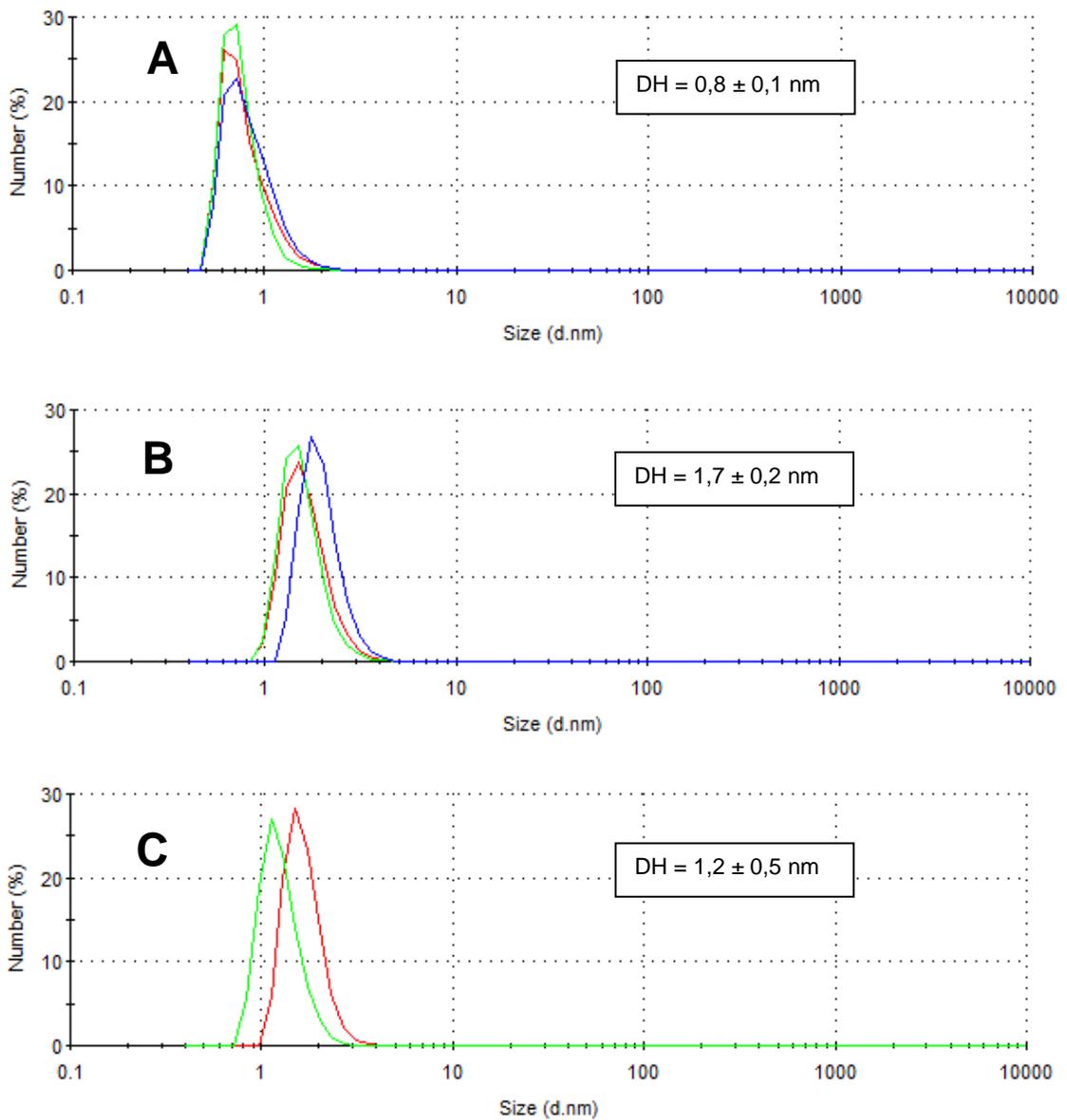


Figura A.10: Gráficos del número de NPAu recubiertas con: (D) Pluronic[®] P85, (E) Pluronic[®] F127 y (F) Pluronic[®] L121 utilizando en los 3 casos, soluciones con concentración >30% CMC. $n=3 \pm DS$.

Tiempo (min.)	% Fluorescencia		
	LCF + NC + P.P85 >30%CMC	LCF + NC + P.F127 >30%CMC	LCF + NC + P. L121 >30%CMC
0	17,4 ± 0,3	15,8 ± 0,6	9,8 ± 0,2
30	22,0 ± 1,6	20,5 ± 0,4	16,5 ± 0,4
60	23,7 ± 1,1	22,9 ± 0,4	19,4 ± 0,5
180	27,9 ± 1,8	27,7 ± 1,1	23,7 ± 1,0
1440	38,5 ± 0,6	36,9 ± 1,4	33,6 ± 1,1

Tiempo (min.)	% Fluorescencia						
	LCF + P. P85 >30%CMC	LCF + P. F127 >30%CMC	LCF + P. L121 >30%CMC	LCF + NPAu	LCF + NC	NPAu	NC
0	27,7 ± 0,8	21,4 ± 1,6	20,6 ± 0,4	0	0	0	0
30	31,7 ± 1,3	26,9 ± 0,8	25,6 ± 1,3	0	0	0	0
60	33,3 ± 0,7	28,1 ± 1,6	27,5 ± 0,7	0	0	0	0
180	38,8 ± 1,1	32,8 ± 1,7	30,9 ± 0,4	0	0	0	0
1440	48,4 ± 1,4	44,3 ± 0,7	42,6 ± 1	0	0	0	0

Tabla A.1: Datos obtenidos por el ensayo permeabilidad de liposomas. Parte superior: % fluorescencia de las muestras de interés a los distintos tiempos de incubación. Parte inferior: % fluorescencia de los controles para el ensayo a los distintos tiempos de incubación. Concentración de Pluronic® >30% CMC para todas las muestras. NC: NPAu-CLPFFD. LCF: liposomas de FC con CF encapsulada. n=3 ± SD.

Muestra	Tiempo (horas)			
	0	1	3	24
Lip	216,0 ± 10,4 (0,208)	213,8 ± 5,8 (0,251)	209,6 ± 7,8 (0,203)	214,0 ± 3,1 (0,241)
Lip + SDS	3,0 ± 0,1 283,0 ± 101,5 (0,199)	3,2 ± 0 374,4 ± 31,8 (0,251)	3,2 ± 0,0 226,7 ± 39,8 (0,219)	3,3 ± 0,1 92,5 ± 3,7 (0,306)
Lip. + P. P85	209,8 ± 7,0 (0,229)	205,1 ± 2,5 (0,203)	206,2 ± 4,4 (0,271)	304,0 ± 6,8 (0,264)
Lip. + P. F127	195,0 ± 5,2 (0,284)	200,5 ± 1,2 (0,297)	229,0 ± 6,6 (0,264)	306,6 ± 5,9 (0,269)
Lip. + P. L121	219,1 ± 2,3 (0,222)	204,8 ± 2,3 (0,191)	202,7 ± 7,4 (0,285)	228,4 ± 4,9 (0,300)
Lip. + NPAu-CLPFFD + P. P58	225,3 ± 11,4 (0,717)	210,9 ± 11,9 (0,778)	212,1 ± 8,9 (0,667)	169,2 ± 3,4 (0,611)
Lip. + NPAu-CLPFFD + P. F127	268,7 ± 13,8 (0,729)	244,0 ± 4,3 (0,615)	185,9 ± 7,4 (0,642)	184,1 ± 8,5 (0,451)
Lip. + NPAu-CLPFFD + P. L121	228,6 ± 9,9 (0,591)	209,2 ± 3,3 (0,876)	228,0 ± 5,5 (0,682)	237,7 ± 7,6 (0,728)
Lip. + NPAu	297,2 ± 30,5 (0,216)	661,6 ± 50,7 (0,605)	720,7 ± 109,4 (0,656)	523,4 ± 43,1 (0,749)
Lip. + NPAu-CLPFFD	220,4 ± 16,9 (0,406)	219,4 ± 7,6 (0,726)	214,7 ± 4,6 (0,764)	222,5 ± 2,3 (0,532)

Tabla A.2: Resumen de los DH obtenidos por DLS para los tiempos de incubación 0, 1, 3 y 24 horas. Todos los datos están en nm. Concentración de Pluronic® >30% CMC para todas las muestras. Entre paréntesis el IPD. n=3 ± DS.