



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y  
FARMACÉUTICAS  
ESCUELA DE POSTGRADO

MODIFICACIÓN DE NANOBARRAS DE ORO PARA  
AUMENTAR LA LLEGADA AL CEREBRO

Tesis para optar al grado de Doctora en Ciencias  
Farmacéuticas

**CAROLINA ANDREA VELASCO AGUIRRE**

Director de Tesis  
Marcelo J. Kogan

Santiago de Chile, año 2017

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN  
CS.FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN  
TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis presentada por la candidata:

**CAROLINA ANDREA VELASCO AGUIRRE**

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Doctora en Cs. Farmacéuticas, en el examen de defensa de Tesis rendida el día.... de ..... de 2017.

**Director de Tesis:**

Dr. Marcelo J. Kogan. \_\_\_\_\_

**Comisión Informante:**

Dr. Cristian Tapia \_\_\_\_\_

Dra. María Nella Gai \_\_\_\_\_

Dra. Alejandra Álvarez \_\_\_\_\_

Dr. Nicolás Yutronic \_\_\_\_\_

## **Agradecimientos**

Quisiera agradecer en primer lugar a Marcelo Kogan por brindarme la oportunidad de unirme a su grupo de investigación, por confiar en mí, y por ser un gran guía en todo momento.

A todo su grupo, Sujey, Pablo, Pancho, Valentina, Naty, Simón, Mariela y Claudia, gracias principalmente por su linda amistad, su ayuda incondicional, y por ser un equipo de trabajo maravilloso. Mención especial a Anita, por tu bella amistad y sabios consejos, y a Edison por ser un gran amigo, y por salvarme siempre cuando lo necesité.

A mis queridos amigos de la Dirección de Innovación de la VID, Edgardo, Caro, Joaquín, Carlos, Vary, Gise, Javi y Pancho. Gracias por su buena onda, compañerismo y enseñanzas.

A mis papás y hermano, por su esfuerzo, resiliencia, y su apoyo incondicional durante todo este proceso.

A mis suegros y cuñadas, por su gran cariño y apoyo.

A mis amigos, Sebastián, Fran, Alfredo y Yess, por siempre saber cuándo es momento de celebrar. Gracias por su eterna amistad.

Y al más importante, a Eduardo, por ser la hermosa persona que eres, por tus precisas palabras, y por tus grandes acciones. Gracias por apoyarme en todo lo que este trabajo significó. Contigo todo es mejor, y lo será eternamente.

Finalmente quiero agradecer la oportunidad que me brindó la Universidad de Chile de acceder a la educación superior. Este no tan simple hecho puede cambiar completamente el destino de una persona.

Espero de corazón que en el futuro se fortalezca la Educación pública, y que se pueda igualar la cancha para aquellos que tienen ganas de surgir. Espero de corazón que tengamos una educación más inclusiva, y que todos tengan derecho a una educación de calidad. Espero de corazón que en el futuro, no exista más segregación educacional, ni de ningún otro tipo en nuestro país.

# INDICE DE CONTENIDOS

Tabla Abreviaturas.....	8
Resumen.....	10
Abstract .....	12
Capítulo 1: Introducción, Objetivos e Hipótesis .....	14
1.1 Nanomedicina: Un campo promisorio para la biomedicina .....	15
1.2 Nanopartículas Plasmónicas para aplicaciones biomédica.....	19
1.3 Nanopartículas de oro para la cirugía molecular basada en fototerapia.....	21
1.4 Nanopartículas de oro para la entrega de fármacos .....	28
1.5 Nanopartículas de oro para la destrucción de agregados tóxicos de la proteína $\beta$ -amiloide.....	29
2. Conjugación de péptidos a nanopartículas para el reconocimiento de A $\beta$ ...32	
2.1 Uso de péptidos de la serie D para el reconocimiento de A $\beta$ .....	34
3. Modificaciones para aumentar la llegada al sistema nervioso central.....	36
3.1 Modificaciones de parámetros fisicoquímicos de las Nanopartículas para disminuir las interacciones inespecíficas.....	36
3.2 Utilización de mecanismos de ingreso intrínsecos para aumentar la llegada al sistema nervioso central .....	40
3.3 Proteínas 1 y 2 relacionadas con el receptor de lipoproteína de baja densidad (LRP-1 y 2).....	46
4. Síntesis y caracterización de Nanobarras de oro modificadas para potenciales aplicaciones en la EA, estudios <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....	49
Capítulo 2: Materiales y Métodos .....	54
2.1 Síntesis y caracterización de los péptidos Angiopep-2 y D1 .....	55
2.2 Síntesis de Nanobarras de oro, y su modificación con Polietilenglicol.....	58
Preparación del material.....	58
Síntesis de Nanobarras de oro .....	58
Espectrofotometría de Absorción Molecular .....	59
Dispersión Dinámica de la Luz.....	59
Potencial Z.....	60

Microscopía electrónica de Transmisión .....	60
Modificación de la superficie de las Nanobarras de oro con Polietilenglicol y con los péptidos Angiopep-2 y D1 .....	61
Cálculo de concentración de Nanobarras .....	62
Número de moléculas de péptido por Nanobarra multifuncionalizada .....	64
Estudio de estabilidad de Nanobarras de oro modificadas .....	65
2.3 Cultivo celular primario de endotelio de cerebro de rata RBMVEC y de la línea endotelial de cerebro de ratón inmortalizada bEnd.3.....	66
Ensayo de viabilidad para cultivo primario de endotelio de cerebro de rata RBMVEC y línea celular endotelial de cerebro de ratón bEnd.3.....	66
Cuantificación de oro en cultivo primario endotelial de cerebro de rata RBMVEC.....	68
Marcaje de Nanobarras modificadas con Angiopep-2 y con Rodamina .....	69
Evaluación de la internalización celular de Nanobarras-Angiopep-2(Rodamina) en línea celular bEnd.3 mediante microscopia confocal.....	70
2.4 Estudio de Farmacocinética de Nanobarras-modificadas en modelo murino de Sprague Dawley .....	71
2.5 Agregación del péptido A $\beta$ 1-42 en presencia de Nanobarras-modificadas con péptidos.....	71
2.6 Evaluación de la llegada de Nanobarras-D1/Angiopep-2 al cerebro de rata Sprague Dawley, modelo murino para la biodistribución de las nanopartículas .	73
2.7 Detección de Nanobarras-Angiopep-2/D1 en cerebro de rata Sprague Dawley por Microscopia Electrónica de Transmisión .....	74
2.8 Distribución de Nanobarras marcadas con Rodamina <i>ex vivo</i> .....	75
Capítulo 3: Resultados .....	76
3.1 Caracterización de Nanobarras de oro.....	77
3.2 Caracterización por Microscopía electrónica de Nanobarras de oro .....	78
3.3 Caracterización de Nanobarras de oro por dispersión dinámica de la luz y potencial zeta .....	80
3.4 Obtención y Caracterización de Nanobarras de oro estabilizadas con polietilenglicol (PEG).....	83
3.5 Caracterización de los conjugados de Nanobarras de oro estabilizados con Polietilenglicol, mediante Microscopia Electrónica de Transmisión.....	86
3.6 Obtención de péptidos Angiopep-2, Angiopep-2 (Rodamina) y D1.....	88
.....	89

3.7 Modificación de las Nanobarras de oro con péptidos funcionales: Angiopep-2 y D1.....	93
Capítulo 4: Evaluación de citotoxicidad e internalización celular de Nanobarras de Oro Modificadas,y su interacción con Péptido A $\beta$ .....	99
4.1 Efectos sobre la viabilidad y la penetración celular de las Nanobarras modificadas .....	100
4.2 Evaluar el efecto de las Nanobarras de oro modificadas (NR- Angiopep-2/D1) sobre los agregados de A $\beta$ <i>in vitro</i> .....	107
Capítulo 5: Farmacocinética y Distribución de Nanobarras de oro modificadas (NR-Angiopep-2/D1) en modelo animal.....	112
5.1 Farmacocinética de NR-Angiopep-2/D1.....	113
Capítulo 6: Discusión de Resultados y Conclusiones.....	127
6.1 Discusión de Resultados .....	128
6.2 Conclusiones.....	146
Referencias.....	148

## Tabla Abreviaturas

AAN: Análisis por activación neutrónica

ATA $\beta$ : Agregados tóxicos de la proteína  $\beta$ -amiloide

A $\beta$ : Péptido  $\beta$  amiloide

bEnd.3: Línea celular endotelial de cerebro murino

BHE: Barrera hematoencefálica

CCHEN: Comisión Chile de Energía Nuclear

CTAB: Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio

Dh: Diámetro hidrodinámico

DLS: Dispersión dinámica de la luz (*Dinamic light scattering*)

EA: Enfermedad de Alzheimer

EDC: 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide

FBS: Suero fetal bovino (del inglés *fetal bovine serum*)

HS-PEG: Polietilenglicol tiolado

HS-PEG-COOH: Carboxi-Polietilenglicol tiolado

HS-PEG-OMe: Metoxi-Polietilenglicol tiolado

LDH: Enzima Lactato deshidrogenasa

LRP: Proteínas relacionadas con el receptor de lipoproteína de baja densidad

LSPR: Resonancia de plasmón superficial(superficial (*Localized Surface Plasmon Resonance*))

NeO: Nanoesferas de oro



NHS: N-hydroxysuccinimide

NIR: Región del infrarrojo cercano (*Near-infrared region*)

NM: Nanomedicina

NP: Nanopartícula

NpO: Nanopartículas de oro

NPP: Nanopartícula plasmónica

NR: Nanobarras de oro

PBS: Buffer fosfato salino (del inglés *phosphate buffered saline*)

PEG: Polietilenglicol

pZ: Potencial Z

RBMVEC: Cultivo primario de células endoteliales de cerebro murino (*Rat Brain Microvascular Endothelial Cells*)

RES: Sistema de retículo endotelial (*Reticuloendothelial system*)

SDS: Dodecilsulfato sódico (del inglés *sodium dodecyl sulfate*)

SNC: Sistema nervioso central

STEM: Microscopía electrónica de transmisión y barrido (*Scanning and Transmission electronic microscopy*)

TA: Transcitosis adsortiva

TEM: Microscopía electrónica de transmisión (*Transmission electronic microscopy*)

TMR: Transcitosis mediada por receptor

TMT: Transcitosis mediada por transportador

## Resumen

Las nanobarras de oro son nanomateriales muy interesantes para su uso en la terapia de diferentes patologías como cáncer o la enfermedad de Alzheimer, ya que poseen la capacidad de absorber gran cantidad de energía en la región del infrarrojo cercano, en la cual los tejidos biológicos son transparentes a la radiación, y disiparla en forma de calor. No obstante para una eventual terapia, estos nanomateriales deben llegar a su blanco terapéutico que en el caso de la enfermedad de Alzheimer son los agregados tóxicos de la proteína  $\beta$  amiloide presentes en el cerebro.

Uno de los grandes desafíos de la nanomedicina para la terapia de enfermedades neurodegenerativas es el de lograr que los nanomateriales lleguen al sistema nervioso central.

Para estos propósitos, en esta tesis se multifuncionalizaron las Nanobarras de oro con el péptido Angiopep-2, que se utiliza como lanzadera de fármacos para favorecer el paso a través de la barrera hematoencefálica, y además con el péptido qshyrhispaqv (D1), el cual posee una afinidad en el rango sub-micromolar *in vitro* por los agregados del péptido  $\beta$  amiloide. Asimismo, las NR se conjugaron con dos tipos de polietilenglicol: Metoxi-Polietilenglicol tiolado que evita las interacciones inespecíficas, y Carboxi-Polietilenglicol tiolado que contiene un grupo carboxílico que permite la unión con un grupo amino terminal correspondiente a los péptidos, empleando agentes acoplantes.

Las nanopartículas obtenidas fueron caracterizadas por Microscopía Electrónica de Transmisión, Espectrofotometría UV-Visible, Potencial Zeta y Dispersión Dinámica de la luz. Adicionalmente fue evaluada la citotoxicidad, estabilidad y la penetración *in vitro* de Nanobarras modificadas en células endoteliales microvasculares de rata bEnd.3 y RBEMC, observándose la capacidad de ingresar al medio intracelular.

La capacidad de las Nanobarras modificadas de reconocer fibras de péptido  $\beta$  amiloide fue ensayada mediante una incubación con dichas fibras, y su posterior visualización por Microscopía electrónica de Transmisión. Por otra parte, se observó en cerebro de rata *ex vivo* la llegada al cerebro por fluorescencia, y se comprobó mediante cuantificación de oro.

Como resultado de esta tesis se puede concluir que el conjugado propuesto de Nanobarras de oro modificadas con los péptidos Angiopep-2 y D1, no presenta toxicidad celular, y además es capaz de llegar al cerebro en mayor proporción que su control, que corresponde a Nanobarras de oro no modificadas. Además, en ensayos *in vitro* se confirmó la capacidad de reconocer agregados de fibras de péptido  $\beta$ -amiloide.

De esta forma se espera poder contribuir al desarrollo de una estrategia para mejorar la llegada de las nanopartículas de oro al Sistema Nervioso Central, lo que representará un gran avance para una posible terapia de la enfermedad de Alzheimer.

## **Abstract**

Gold Nanorods are very interesting nanomaterials for use in the therapy of different pathologies such as cancer or Alzheimer's disease, since they have the capacity to absorb large amounts of energy and to dissipate it in the form of heat in the near infrared region, in which biological tissues are transparent to radiation. However for a possible therapy, these nanomaterials must reach their therapeutic target, which in the case of Alzheimer's disease are the toxic aggregates of the  $\beta$  amyloid protein present in the brain. One of the bigger challenges of nanomedicine for neurodegenerative disease therapy is that nanomaterials reach the central nervous system. For this purpose, Gold Nanorods were multifunctionalized with the peptide Angiopep-2, which is used as a drug shuttle to promote passage through the blood-brain barrier, and also with the peptide qshyrhispaqv (D1), which has an affinity in the sub-micromolar range in vitro by the amyloid aggregates. Also, the Gold Nanorods were conjugated to two types of polyethylene glycol: thiolated Methoxy-Polyethylene glycol avoiding non-specific interactions, and Carboxy-Polyethylene glycol containing a carboxylic group which allows attachment to a terminal amino group corresponding to the peptides using coupling agents. The nanoparticles obtained were characterized by Transmission Electron Microscopy, UV-Visible Spectrophotometry, Zeta Potential and Dynamic Light Scattering. In addition, cytotoxicity, stability and in vitro penetration in microvascular endothelial cells of

rat bEnd.3 and RBMVEC were evaluated, and the capacity to enter the intracellular medium was observed. The ability of the multifunctionalized Gold Nanorods to recognize  $\beta$  amyloid peptide fibers were assayed by incubation with said peptide and visualization by Transmission Electron Microscopy. On the other hand, the arrival to the brain was observed *ex vivo* by fluorescence, and was checked by quantification of gold. As a result of this thesis it can be concluded that the proposed conjugate does not present cytotoxicity, and is also able to reach the brain in a greater proportion than its control. In addition, the ability to recognize aggregates of  $\beta$  amyloid peptide fibers was confirmed in *in vitro* assays. In this way it is hoped to contribute to the development of a strategy to improve the arrival of gold nanoparticles to the Central Nervous System, which will represent a great advance for a possible therapy of Alzheimer's disease

## **Capítulo 1: Introducción, Objetivos e Hipótesis**

# Introducción

## 1.1 Nanomedicina: Un campo promisorio para la biomedicina

La nanotecnología es un campo emergente que se encuentra en constante expansión, siendo la nanomedicina (NM) una de sus sub-disciplinas más relevantes. Ésta, se define como la ciencia de diagnosticar, tratar y prevenir enfermedades con el uso de biología molecular y celular combinado con la nanotecnología. [1] Dentro de las principales aplicaciones médicas de la nanotecnología se pueden nombrar dos; su uso para la entrega de agentes terapéuticos, y su aplicación en la imagenología con fines de diagnóstico. Para este último propósito se han diseñado diversas sondas para ser utilizadas con técnicas como Ultrasonido, Rayos-X, Tomografía Computarizada, Tomografía de emisión de positrones, Resonancia de imagen Magnética y Espectroscopia Raman de Superficie Amplificada.[2] Para cualquiera de las técnicas nombradas, se hace uso generalmente de sistemas de entrega a escala nanométrica (preferentemente entre 1-100 nm) que contienen de forma encapsulada, dispersa, adsorbida o conjugada un principio activo o un agente para imagenología.[3-5]

Por otra parte, otra gran aplicación médica de la nanotecnología corresponde a la entrega de agentes terapéuticos o *drug delivery*. Esta representa un área de

investigación fascinante que ha captado la atención de los investigadores, ya que la llegada de un fármaco a un sitio de acción es una de las principales limitaciones que enfrenta la industria biotecnológica y farmacéutica ante el uso de nuevos fármacos o moléculas bioactivas. [6]

Haciendo uso de Nanopartículas (NP), se ha podido i) mejorar la llegada de fármacos que son poco solubles en agua; ii) direccionar la llegada de fármacos o moléculas bioactivas a un tejido específico o a un grupo de células de particular interés; iii) generar la transcitosis de fármacos a través de barreras endoteliales; iv) entrega de macromoléculas bioactivas a sitios de acción intracelulares; v) co-entrega de dos o más fármacos o moléculas bioactivas para una terapia combinatoria.[7]

El primer sistema de *drug delivery* nanotecnológico desarrollado fue uno basado en vesículas lipídicas, las cuales fueron descritas en los años 60, y tiempo después fueron conocidas como liposomas.[8]

Luego de este importante avance, se comenzaron a desarrollar distintos biomateriales, de naturaleza orgánica e inorgánica para aplicarse en *drug delivery*.

Por ejemplo, el primer sistema polimérico de liberación controlada de macromoléculas fue descrito en 1976.[9] Subsecuentemente, y ya en los años 80, se crearon sistemas de *drug delivery* mucho más complejos capaces de responder a cambios de pH para liberar el fármaco de interés.[10]



A medida que fue aumentando la investigación en esta área, se llegó a la evidencia para el uso del Polietilenglicol (PEG), el cual demostró aumentar el tiempo de circulación de liposomas [11], y nanopartículas poliméricas [12] en los años 90 y 94 respectivamente, lo cual fue de base para el subsecuente desarrollo y aprobación de Doxil® (liposomas de doxorubicina) en el año 1995, para tratar al sarcoma de Kaposi asociado a VIH.

Otro tipo de nanopartículas que ha despertado el interés científico para ser utilizado como vehículo en *drug delivery*, corresponden a las nanopartículas inorgánicas, cuya utilización ha ido rápidamente en aumento, debido a las diversas investigaciones que han permitido dar a conocer las características únicas que estos materiales poseen. Para estos también se ha estudiado su síntesis y modificación, lo cual es una característica relevante ya que les puede dar mayor versatilidad ante las posibles aplicaciones.[13-15] En dichos procesos, normalmente dos o más componentes pueden ser incorporados para otorgar capacidades multifuncionales a las nanopartículas inorgánicas. Un ejemplo de ello puede ser demostrado en nanomateriales de oro, donde la habilidad para controlar el tamaño y la forma de las partículas mediante su síntesis, y su posterior modificación de superficie con anticuerpos, ha permitido una identificación selectiva de células cancerosas. [16, 17]

Diversas nanopartículas inorgánicas han sido utilizadas para aplicaciones biológicas, por ejemplo las nanopartículas fluorescentes como los semiconductores *Quantum Dots*, que están comercialmente disponibles, y ofrecen una alternativa viable a las partículas fluorescentes.

Por otro lado tenemos a las nanopartículas magnéticas, como las nanopartículas de óxido de hierro, que han sido aprobadas por la *Food and Drug Administration* , para imagenología por resonancia magnética como agentes de contraste en humanos.[18]

Otro grupo novedoso en términos de su uso en biomedicina corresponde a las nanopartículas plasmónicas (NPP), las cuales ofrecen diversas ventajas en el campo de la investigación debido a sus características únicas, como lo es la manifestación de bandas de resonancia plasmónica de superficie localizada (LSPR, del inglés *localized surface plasmon resonance*) en el rango del espectro UV-Visible-Infrarojo cercano[19], capacidad de absorber radiación y liberar energía en forma de calor de manera localizada, su gran área superficial, la capacidad de poder ser modificadas en su superficie con diferentes tipos de moléculas, además la gran versatilidad en su síntesis para obtener variaciones de tamaño y forma.

## 1.2 Nanopartículas Plasmónicas para aplicaciones biomédica

Las NPP presentan propiedades ópticas, electrónicas y estructurales, relacionadas directamente con su tamaño nanométrico (entre 1-100 nm), que no se dan en los materiales a granel o *bulk*.

Las soluciones coloidales de estas NP (principalmente las de oro, plata y cobre), han llamado la atención desde hace muchos siglos debido al intenso color que éstas presentan. Ésta propiedad ha sido estudiada por muchos científicos, pero fue Gustav Mie quien resolviendo las ecuaciones de Maxwell, atribuyó este color observado a la interacción de estos nanomateriales con la radiación electromagnética.[20, 21]

NPP han demostrado ser versátiles y aplicadas en distintas áreas, gracias a la ingenierización de los nanomateriales que resulta como un andamio multidimensional. En general esto hace que sean tan atractivas para diversas aplicaciones biomédicas debido a que su tamaño y forma condicionan sus propiedades óptico-electrónicas.[22]

Por otro lado, el tamaño de estos nanomateriales provee de una gran área superficial en relación al volumen; cuando el tamaño de la partícula disminuye, la cantidad (o número) de átomos de superficie rápidamente aumenta.

Debido a estas extraordinarias propiedades, las nanopartículas resultan ser atractivas plataformas terapéuticas para aplicación clínica.[23]

Dentro del último siglo, se ha postulado que las NPP, como las Nanopartículas de Oro (NpO), pueden emplearse para la destrucción de tumores o agregados

tóxicos de proteínas a través la denominada “cirugía molecular” y el *drug delivery*. [4, 24]

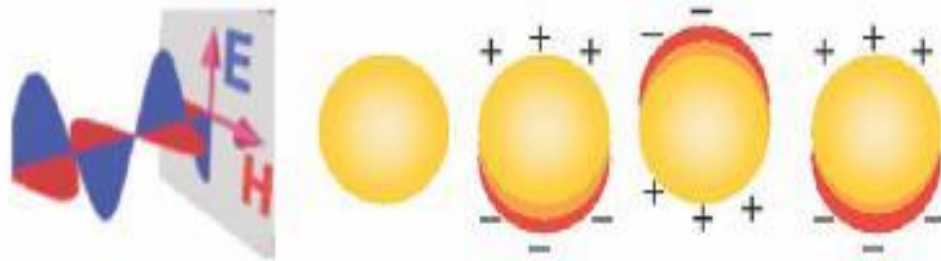
Estas características, han llamado ampliamente la atención de las NpO en el campo de la neurociencia, particularmente en enfermedades como Parkinson, Alzheimer (EA), Huntington y Esclerosis Amiotrófica Lateral, caracterizadas por una acumulación de agregados proteicos tóxicos que causan finalmente la muerte neuronal, y que sólo tienen en la actualidad tratamientos paliativos, y no una cura que detenga la progresión. Frente a esto, las NpO podrían presentar una gran alternativa para detener la progresión de la enfermedad [25].

En este contexto, la nanomedicina a lo largos de los últimos años ha demostrado contribuir exitosamente en el desarrollo de nuevas terapias o entrega de fármacos para el tratamiento de las nombradas enfermedades neurodegenerativas, que como se explica anteriormente, se caracteriza principalmente por la progresiva pérdida de la estructura o función de las neuronas, comúnmente asociadas a la muerte neuronal.

Para este fin, se han utilizado diversas NP como plataforma para la entrega de agentes bioactivos, con el fin de tratar, diagnosticar o paliar los síntomas de patologías como la enfermedad de Alzheimer (EA), Parkinson, Enfermedad Priónica, Esclerosis Amiotrófica Lateral, entre otras. [26, 27]

### 1.3 Nanopartículas de oro para la cirugía molecular basada en fototerapia

Las NPP como las de oro, plata y cobre 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 (Figura 1.1). Esta oscilación es conocida como resonancia de plasmón superficial (LSRP)[28], que da origen a una intensa banda de absorción detectable mediante espectrofotometría UV-Vis.

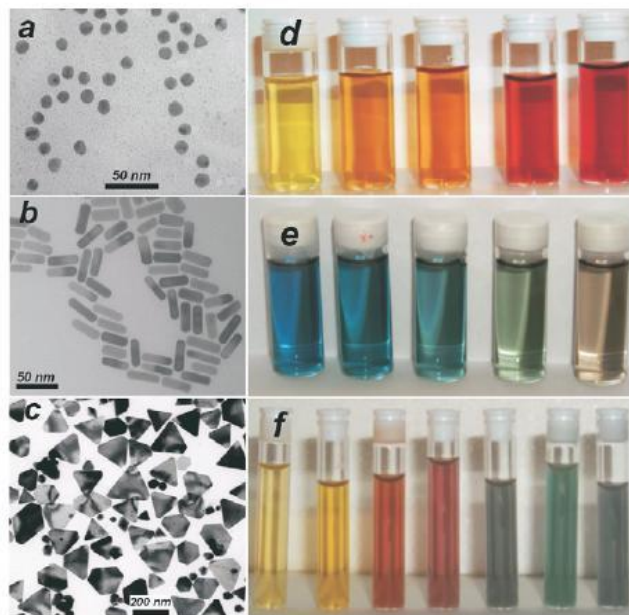


**Figura 1.1:** Esquema de la interacción de la radiación electromagnética con una NpO. Un dipolo inducido oscila en fase con el campo eléctrico de la luz incidente. Extraído de la referencia.[29]

Como se observa en la Figura 1.1, al interactuar un campo electromagnético con la NP, esta última se polariza generando oscilaciones del tipo dipolar y/o multipolar. El máximo de absorción de la LSPR es dependiente del tamaño de la NP. Así en NP con diámetros mayores a 20 nm la contribución de modos de mayor orden (dipolo, cuádruplo, etc.) generan un desplazamiento

batocrómico de la banda de absorción. Esto es debido a que las NP de mayor tamaño no pueden polarizarse homogéneamente. Para este tipo de NP el fenómeno de dispersión es importante siendo parte del proceso de extinción de la luz.

Además, la LSPR depende de la forma de las NP, del tamaño (Figura 1.2), de la composición del metal del cual están formadas y también de las propiedades del medio que las rodea. [30, 31]



**Figura 1.2:** Izquierda: micrográficas de microscopía electrónica de transmisión: a) Nanoesferas de oro obtenidas por reducción con citrato, b) Nanobarras de oro obtenidas mediante crecimiento por núcleos, c) Nanoprismas de plata obtenidos por reducción con dimetilformamida. Derecha: Fotografías de dispersiones coloidales d) aleaciones Au-Ag de nanopartículas con incremento en la concentración de oro e) Nanobarras de oro en creciente relación de aspecto y f) Nanoprismas de Ag con incremento en el tamaño lateral. Extraído de Referencia. [29]

Para las NPP, la frecuencia de LSPR es extremadamente sensible a cambios fisicoquímicos sutiles en el ambiente, por ejemplo, la distancia entre las NP [32], y además es una característica dependiente de su tamaño y forma.

Notablemente, en algunos casos el cambio del plasmón asociado es tan dramático que una variación de color en la solución puede ser observado a simple vista, sin requerir instrumentación sofisticada [33], como lo que se puede observar en la figura 1.2.

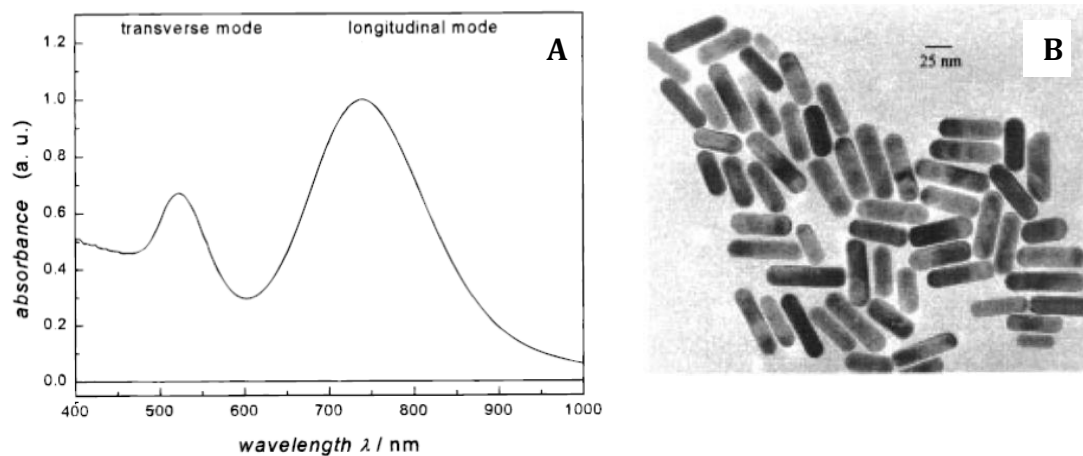
Las NPP son principalmente núcleos de Au, Cu y Ag, en distintas formas y tamaños, donde la química de superficie está bien descrita, y ampliamente estudiada. Así, la biofuncionalización puede ser efectivamente realizada.[34]

Por otra parte, su banda LSRP puede ser utilizada para detectar las células tumorales por la dispersión de la radiación, y también por efecto fototérmico se puede gatillar una liberación de compuesto activo, mediante la aplicación localizada de luz. [35]

Como se mencionó anteriormente, en teoría es sabido que la LSPR se desplaza a mayores longitudes de onda con un aumento en el tamaño de las NP. Link *et al.*1995, realizaron un estudio del desplazamiento del máximo de absorción de la LSPR a medida que se aumenta el tamaño de las nanoesferas de oro (NeO), verificando experimentalmente que a mayor tamaño de las mismas la banda se desplaza hacia el rojo.[36]

Sin embargo, es importante considerar que por un lado, la teoría de Mie fue desarrollada para partículas de forma esférica, y por otro que las NP metálicas pueden existir en diferentes formas. Para NP ovaladas o cilíndricas, como las Nanobarras de Oro (NR), Gans extendió la teoría de Mie, como bien lo explican Link y El Sayed. [37, 38] Esta forma de NP es caracterizada por su relación de aspecto definida como la razón largo/ancho. En el caso de NR, la LSPR se compone de dos bandas; La banda de mayor energía, cuyo máximo se centra cercano a los 510 nm, que corresponde a la oscilación de los electrones perpendicular al eje mayor de la NR y se designa como absorción de plasmón transversal, y la banda de menor energía, la cual se encuentra desplazada hacia la región del infrarrojo cercano (NIR, del inglés *Near-Infrared Region*) y se centra entre los 700-1000 nm, dependiendo de la relación de aspecto de la NR. Esta última es causada por la oscilación de los electrones a lo largo del eje mayor de la NR y es conocida como la absorción de plasmón longitudinal.[28] Debido a esta propiedad, las NR son caracterizadas mediante espectrofotometría de absorción como se observa en la Figura 1.3a. Asimismo, para determinar la relación de aspecto y estudiar su morfología, estos nanomateriales son caracterizados mediante Microscopia Electrónica de Transmisión o TEM (Figura 1.3b).



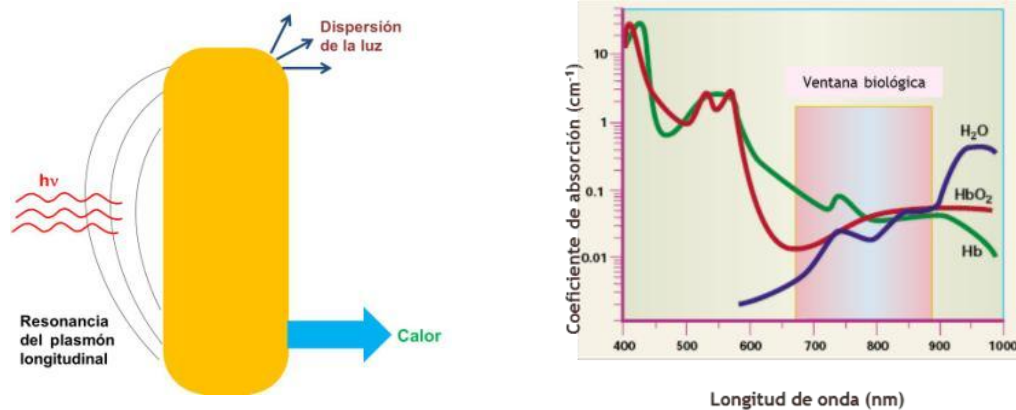


**Figura 1.3:** a) Espectro de absorción experimental de una muestra de NR con una relación de aspecto promedio de 3.3. La banda a 512 nm es referida a la resonancia de plasmón transversal, y la centrada a 740 nm es la llamada resonancia de plasmón longitudinal; b) Imagen de TEM de la misma solución. Extraído de la referencia.[37]

Además de las propiedades radiativas de las NP mencionadas anteriormente, estas poseen propiedades denominadas no radiativas. La energía absorbida por las NP al ser irradiadas, puede ser liberada como calor debido a la pérdida de fase de la excitación coherente, lo cual puede ser utilizado para la destrucción de células tumorales, así como también de agregados tóxicos de proteínas, proceso conocido como terapia fototermal. [28, 39] Particularmente, las NR poseen la capacidad de absorber grandes cantidades de energía en la región del infrarrojo cercano, dispersarla y/o liberarla como calor (Figura 1.4a). En esta región existe la llamada ventana biológica, donde moléculas como el agua, la hemoglobina y la oxihemoglobina poseen sus más bajos coeficientes

de absorción, por tanto los tejidos son “transparentes” en esta zona, comprendida entre los 700 y los 950 nm (figura 1.4b). [40, 41]

Debido a lo anterior, es posible pensar en una aplicación biológica de las NP, como lo puede ser la utilización de NR para tratar patologías como cáncer y EA, sin producir un daño al tejido al irradiarlas.



**Figura 1.4:** a) Esquema de los fenómenos de absorción, dispersión y liberación de calor por parte de una NR. b) Espectro de absorción de la ventana biológica. Extraído y adaptado de la referencia. [42]

### 1.3.1) Obtención de Nanobarras de oro

Por otro lado, un hecho importante a considerar en el contexto de este proyecto, es que para lograr obtener NR asimétricas se emplea el método químico de síntesis de crecimiento mediada por núcleos. Este se basa en la preparación de pequeños núcleos de oro de diámetros (~ 3-5 nm) estabilizados con citrato, los

cuales servirán como centros de nucleación para la posterior formación de las NR. Estos últimos se agregan a una solución de crecimiento que consiste en HAuCl<sub>4</sub>, bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), el cual es un surfactante que estabiliza la NR e induce la formación de éstas, AgNO<sub>3</sub> el cual es utilizado para controlar la relación de aspecto, y ácido ascórbico como reductor débil. Este último reduce el Au<sup>+3</sup> a Au<sup>+</sup>, para que luego la reacción de Au<sup>+</sup> a Au<sup>0</sup> sea catalizada por los núcleos que darán origen a los NR. [43]

El inconveniente de este método es que requiere del uso del surfactante CTAB, [44, 45] del cual se ha descrito que genera efectos citotóxicos a las concentraciones utilizadas en la síntesis, debido a que es un disruptor de membranas celulares [46, 47]. Es por ello, que se deben buscar estrategias que permitan eliminar este compuesto, y así evitar los mencionados efectos nocivos, sin afectar la estabilidad coloidal de las NR. Esto puede lograrse a través de un desplazamiento con moléculas biocompatibles que contengan grupos tioles, como los Polietilenglicol tiolados, las cuales se quémisorben sobre la superficie de oro, logrando así reducir los efectos tóxicos[48, 49] .

*En este trabajo de tesis se emplearon NR principalmente por sus propiedades no radiativas, como las de absorber energía en la zona NIR y poder disiparla en forma de calor. Además, debido a sus características químicas, los NR pueden ser empleados como vehículos para el transporte de diversos tipos de*

*moléculas, adsorbiendo agentes activos de interés en su superficie para el desarrollo de eventual terapia.*

#### **1.4 Nanopartículas de oro para la entrega de fármacos**

El tamaño característico de las NP les puede conferir la capacidad de difundir a través de barreras biológicas y penetrar en células por distintos mecanismos. Debido a esto, tienen la capacidad de acumularse preferentemente de forma pasiva en tejido tumoral, por sobre el tejido sano, gracias al efecto de incremento de permeabilidad y retención (EPR, del inglés *Enhanced Permeability and Retention*)[50], el cual es un fenómeno que se debe a la vasculatura hiperpermeable que presenta el tumor, lo que conlleva a una extravasación y acumulación de las NP en dicho tejido.

Las NpO pueden utilizarse tanto para la entrega de fármacos de bajo peso molecular, como de biomoléculas mucho más grandes como péptidos, anticuerpos y ácidos nucleicos, como ADN y ARN [51-57] .

Las NpO pueden ser funcionalizadas con moléculas que contengan en su estructura un grupo tiol (HS-), el cual es capaz de quemisorberse sobre la superficie de éstas, formando un enlace estable S-Au. También la superficie de oro muestra algún grado de afinidad por grupos amino y fosfatos.[58]

Además, debido a sus propiedades foto-física descrita anteriormente, se podría controlar de manera espacial y temporal la liberación de un fármaco o molécula

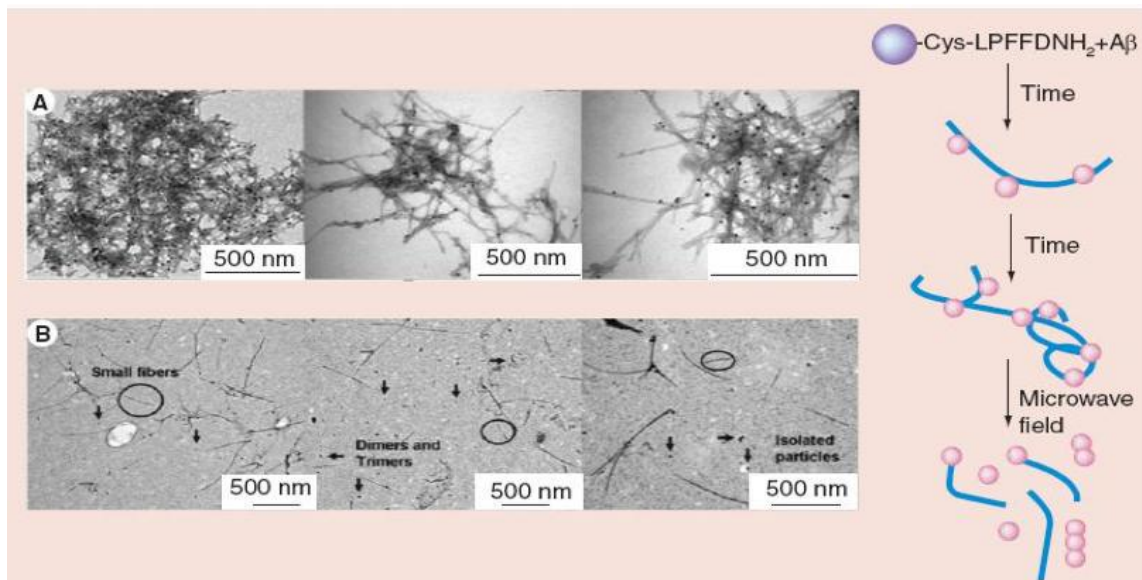
de interés mediante la irradiación con radiación electromagnética, como lo puede ser la utilización de un láser.

### **1.5 Nanopartículas de oro para la destrucción de agregados tóxicos de la proteína $\beta$ -amiloide**

En nuestro grupo de investigación se han empleado NpO para la destrucción de agregados tóxicos de la proteína  $\beta$ -amiloide (ATA $\beta$ ) involucrados en la EA, mediante el calentamiento local producido por el proceso fototérmico de las NeO luego de ser irradiadas con láseres o con microondas. Esto puede ser empleado para una potencial terapia de la mencionada enfermedad.

Para dirigir selectivamente las NeO hacia los ATA $\beta$ , las mismas fueron funcionalizadas con el péptido CLPFFD, denominado así por la secuencia de sus aminoácidos, C (cisteína), L (leucina), P (prolina), F (fenilalanina) y D (ácido aspártico). Este péptido reconoce selectivamente ATA $\beta$ . [59, 60]

El conjugado NeO-CLPFFD fue incubado por varios días con una solución de monómero de A $\beta$ <sub>1-42</sub> obteniéndose complejos de fibras amiloides unidas a las NeO (Figura 1.5a). Estos complejos fueron irradiados con microondas a muy baja potencia (0,1 W) produciéndose la desagregación. Mediante este suave tratamiento se produjo la transferencia de energía por absorción y disipación local de la energía destruyéndose así los ATA $\beta$  (Figura 1.5b), sin producir un aumento significativo de la temperatura en el entorno. [61, 62]



**Figura 1.5:** Imágenes de TEM antes y después de irradiar. **A)** Imágenes TEM de NeO funcionalizadas con CLPFFD unidas a agregados de A $\beta$ 1-42 después de la incubación del conjugado con A $\beta$ 1-42 10  $\mu$ M por 48 h. **B)** Imágenes del conjugado anterior unido a A $\beta$ 1-42 después de 8 h de irradiación. Extraído de la referencia. [62]

La EA es una enfermedad neurodegenerativa progresiva, que se caracteriza por una disfunción cognitiva y de memoria, y que actualmente afecta a más de 24 millones de personas en todo el mundo. El marcador neuropatológico de la EA son las redes neurofibrilares, que consisten en filamentos helicoidales intraneuronales de proteína tau hiperfosforilada y por placas extracelulares compuestas por péptido  $\beta$ -amiloide (A $\beta$ ), un fragmento que contiene 42 residuos, además de una elevada amiloidogénesis y toxicidad. Este fragmento se agrega dando origen a las fibrillas maduras que se acumulan en el cerebro, llevando a la formación de placas, lo cual es un proceso de múltiples pasos

iniciados por cambios conformacionales, que incluyen agregados intermediarios prefibrilares amiloidogénicos, como lo son las protofibrilas, amiloesferoides, fibras cortas, etc.

Estos pequeños agregados de A $\beta$  (Ligandos Difusibles Derivados de  $\beta$ -Amiloides o ADDLs) son actualmente considerados como los más dañinos, y los principales responsables del daño sináptico y déficit de memoria en la EA. [63]

Considerando que las NpO deben llegar a su blanco terapéutico, que en el caso de la EA son los ATA $\beta$  presentes en el cerebro, se ha estudiado la biodistribución del conjugado NeO-CLPFFD. Se ha observado que el conjugado llega al cerebro en una proporción muy baja con respecto a la dosis inyectada (aprox. 0.05 %) [64] [65], quedando gran parte de las NeO retenidas en hígado y bazo, posiblemente debido a su interacción con células pertenecientes al sistema retículo endotelial (RES, del inglés *Retículo Endotelial System*).

Por otra parte, en estudios realizados *in vitro*, se demostró que la afinidad del conjugado NeO-CLPFFD por los ATA $\beta$  es baja [66]. Es por esto que para que el uso de las NpO sea posible, es necesario mejorar su llegada al cerebro y aumentar la afinidad por los ATA $\beta$ .

En las siguientes secciones se discutirán aspectos relacionados con el uso de péptidos para aumentar la afinidad de los conjugados de NpO por los ATA $\beta$ , como también posibles estrategias para mejorar su biodisponibilidad a nivel central.

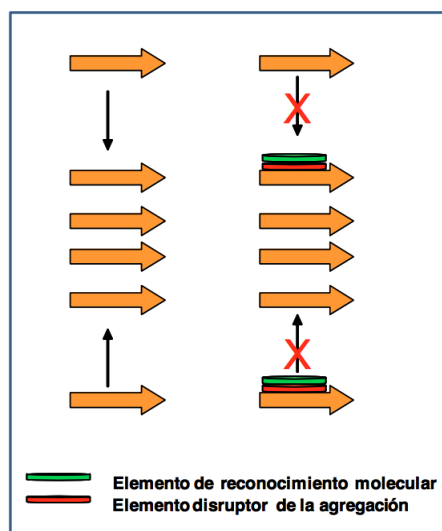
## 2. Conjugación de péptidos a nanopartículas para el reconocimiento de A $\beta$

La clave para el éxito de un tratamiento basado en el uso de NP, dependerá de la posibilidad de dirigirlas selectivamente hacia el blanco terapéutico de interés.

Una estrategia utilizada para este propósito es unirlas a proteínas, péptidos, anticuerpos o moléculas orgánicas que permitan dirigir y facilitar la llegada al cerebro, y posteriormente a los A $\beta$ .

En el caso de los péptidos, pueden mencionarse a los inhibidores de la agregación que presentan un reconocimiento selectivo por los A $\beta$ . El diseño de estos péptidos se fundamenta en emplear un fragmento de A $\beta$  que actúa como “elemento de reconocimiento” e introducir un “elemento disruptor” (Figura 2.1), lográndose conjuntamente el reconocimiento y la inhibición o disrupción de la formación de agregados amiloides para dar origen a especies no tóxicas.[60]

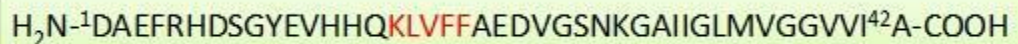
[67]



**Figura 2.1:** Péptidos inhibidores de la agregación de A $\beta$ . A la izquierda se representa el proceso de agregación de A $\beta$ . A la derecha se representa la inhibición de la agregación por un péptido inhibidor. El péptido inhibidor consta de un fragmento de A $\beta$  que sirve como “elemento de reconocimiento” (rojo) al que se le une, o bien forma parte del mismo, otro dominio el “elemento disruptor” (verde) que es introducido y cumple la función de obstaculizar el



Un ejemplo, es el uso del péptido LPFFD introducido por Soto *et al.*,[60] que es un derivado de la secuencia LVFFA postulada como uno de los núcleos de agregación de A $\beta$ <sub>1-42</sub> (Figura 2.2), la cual juega un rol importante en el proceso de agregación.



H<sub>2</sub>N-<sup>1</sup>DAEFRHDSGYEVHHQ**KLVFFA**EDVGSNKGAIIGLMVGGVVI<sup>42</sup>A-COOH

**Figura 2.2:** Secuencia peptídica de A $\beta$ . Núcleo hidrofóbico señalado en rojo.

El péptido LPFFD posee los residuos hidrofóbicos L, F y F que facilitan la interacción con el núcleo hidrofóbico de A $\beta$ . Asimismo, se incorporó el aminoácido Aspártico (D) que aumenta la solubilidad y se reemplazó una Valina (V) por una Prolina (P). La incorporación de este aminoácido impide que la cadena peptídica adopte una estructura de lámina  $\beta$ , y también la formación de enlaces de hidrógeno requeridos para crear la trama de láminas  $\beta$ , ya que no posee un hidrógeno en el N-amida del enlace peptídico.

En estudios *in vivo* e *in vitro* se ha demostrado que este péptido posee un efecto inhibitor del proceso de agregación, así como también un efecto disruptor en las fibras. Sin embargo, esto se da a concentraciones muy elevadas del péptido en proporciones que son equimolares con A $\beta$ . Por otra parte, para realizar la conjugación tanto con NeO, como con NR, se incorporó

una cisteína en el extremo N-terminal obteniéndose el péptido CLPFFD, que permite la formación de un enlace estable con la superficie del oro a través de una quimisorción. [68]

En nuestro grupo de investigación se ha demostrado que la funcionalización de NpO con el péptido CLPFFD-NH<sub>2</sub> mejora su paso a través de la barrera hematoencefálica (BHE), alcanzando niveles más altos de NpO a nivel cerebral en comparación con las NpO estabilizadas con citrato, aunque los niveles alcanzados en cerebro son muy bajos respecto a la dosis inyectada.

Es importante destacar que en los experimentos mencionados en el apartado anterior (Figura 1.5), las concentraciones de péptido empleadas en los conjugados NpO-CLPFFD son aproximadamente 10 veces menores que las necesarias para producir la inhibición de la agregación, por lo cual el efecto observado se debe a la irradiación.

## **2.1 Uso de péptidos de la serie D para el reconocimiento de A $\beta$**

Otra familia de péptidos que ha captado la atención para producir el reconocimiento selectivo a A $\beta$ , ha sido aquellos formados por aminoácidos de la serie D. Estos péptidos están constituidos por D-aminoácidos, los cuales son conocidos por ser menos sensibles a proteasas, más resistentes a la degradación en animales, y menos o incluso no inmunogénicos, en comparación con los péptidos con L-aminoácidos.[69-72]

Estos péptidos D son seleccionados mediante la metodología denominada “*mirror image phage display*” [73], que consiste en presentar una gran librería de distintos péptidos de configuración L (aprox. 10<sup>12</sup> péptidos distintos) expresados en la superficie de un bacteriófago M13, frente a una proteína blanco de interés que posee configuración D.

Esto ha sido empleado por Willbold *et al.*, quienes han utilizado D-enantiómeros de A $\beta$  (D-A $\beta$ ) como blanco, y una librería de péptidos de 12-mer distribuidos al azar, expuestos en la superficie de bacteriófagos, con el objetivo de ser reconocidos por el péptido D-A $\beta$ .

Por razones de simetría, el D-enantiómero del péptido seleccionado (12-mer), debería interactuar con A $\beta$  que contiene aminoácidos de configuración L (L-A $\beta$ ). Mediante el rastreo del péptido como blanco, se ha reportado un D-péptido que se une específicamente a A $\beta$ 1-42 con una gran afinidad, cuya constante de disociación se encuentra en el rango submicromolecular (0,4  $\mu$ M). Los autores lo han designado como “d-pep” o “D1”, y corresponde al péptido qshyrhispaqv (representado con letras minúsculas por tratarse de aminoácidos de configuración D) y presenta una afinidad mil veces mayor por A $\beta$  que el péptido LPFFD empleado por nuestro laboratorio para el desarrollo de nanobioconjugados para aplicaciones en la EA.

Por otra parte, en otros estudios se demostró que el péptido D1 atraviesa la BHE [74], lo cual es muy relevante para el objetivo del presente trabajo de dirigir las NR hacia el sistema nervioso central (SNC).

Esto demuestra que D1 podría ser apto para aplicaciones biomédicas, como una sonda para dirigir algún agente terapéutico hacia  $A\beta_{1-42}$ .

*Por lo tanto, las NR fueron conjugadas con el péptido D1, que presenta gran afinidad por  $ATA\beta$ , para aumentar la afinidad por dichos agregados, y así direccionar efectivamente la llegada de NR al blanco terapéutico.*

### **3. Modificaciones para aumentar la llegada al sistema nervioso central.**

#### **3.1 Modificaciones de parámetros fisicoquímicos de las Nanopartículas para disminuir las interacciones inespecíficas**

Para una aplicación farmacéutica de las NpO evitando posibles interacciones inespecíficas que reducen la biodisponibilidad, hay que considerar distintos factores, como la vía de administración, farmacocinética, toxicidad y estabilidad. Esto último es en gran parte dependiente del tamaño, la carga y el recubrimiento de la NP. El tamaño de la NP es un factor muy importante, ya que afecta tanto la velocidad como la vía de depuración desde el organismo.

En nuestro laboratorio, se ha demostrado que NeO de 12.5 nm son principalmente excretadas por vía biliar.[64] La hidrofobicidad de las NP lleva a que éstas sean retenidas por elementos celulares (ej: macrófagos) del RES [75] y son posteriormente acumuladas en hígado y bazo, lo que lleva a una disminución de la biodisponibilidad a nivel cerebral.[65]

La carga superficial es también determinante de su comportamiento biológico, ya que se ha descrito que las NP catiónicas presentan mayor citotoxicidad e inducen de manera más efectiva procesos de hemólisis y agregación plaquetaria que las NP aniónicas o neutras. Además, se ha observado que ciertos órganos como hígado, a través de la fagocitosis por las células de Küppfer, retienen preferentemente NP cargadas negativamente.

Es por esto que resulta imprescindible determinar la carga superficial de la NP que se desea utilizar para fines terapéuticos. Si el blanco terapéutico se encuentra en el cerebro, como sucede con los ATA $\beta$ , las NP deben atravesar la BHE y además unirse lo menos posible a moléculas biológicas que puedan favorecer la captura por otros, ya que dicho proceso disminuiría la biodisponibilidad de las NP.

En resumen, NP cargadas negativamente tienden a ser mayormente retenidas por el RES y subsecuentemente depuradas desde la sangre, tal como ha sido demostrado por Levchencoko *et al.* en un estudio realizado con liposomas. [76] Asimismo, la interacción de las NP con proteínas presentes en el medio (plasma o medio de cultivo celular) es un importante factor, ya que puede determinar la formación de la “corona de proteínas”. Este concepto es importante y tiene una influencia en propiedades de superficie, carga, hidrofobicidad y estabilidad coloidal.

Además, este “*capping*” de proteínas puede determinar la interacción de las NP con membranas y su subsecuente internalización celular. En este sentido, se ha descrito que después de cortos periodos de incubación de NP con plasma, la corona de proteínas se compone principalmente de fibrinógeno y albúmina, las cuales son predominantemente encontradas en la sangre.

Sin embargo, la composición de esta corona depende de la funcionalización de las NP. Luego de largos periodos de tiempo, menores cantidades de proteínas con alta afinidad y baja cinética pueden desplazar a las proteínas mencionadas. Un ejemplo interesante que da cuenta de cómo la corona de proteínas puede afectar a la biodistribución es el recubrimiento de la superficie de NpO con el péptido CLPFFD formando el conjugado NpO-CLPFFD.

Este conjugado llega al cerebro en una mayor proporción respecto de las NpO sin recubrir, lo cual puede ser explicado en función de sus características fisicoquímicas; i) La adsorción de proteínas plasmáticas específicas como ApoE para formar la corona de proteínas contribuirían a la transcitosis mediada por receptores favoreciendo la llegada al cerebro, ii) El aumento del carácter anfifílico de la NP funcionalizada favorecería el paso a través de la BHE mediante difusión pasiva, iii) La disminución en el valor absoluto de potencial Z (haciéndolo menos negativo) contribuiría a una reducción en la retención de la partícula por parte del RES, y de esta forma incrementando la biodisponibilidad de estas partículas.[66] Notablemente, en la corona de proteínas también se

encuentran proteínas como las inmunoglobulinas y el fibrinógeno que favorecen la captación por el RES quedando atrapadas las NP en hígado y bazo.

Una estrategia para aumentar el tiempo en circulación, evitando la captación por el RES, es funcionalizar las NpO con polímeros biocompatibles. Un ejemplo de lo anterior es la utilización de PEG, el cual corresponde a un polímero hidrofílico e inerte que disminuye la interacción de las NpO con proteínas como las opsoninas haciéndolas "invisibles" frente al RES, ya que disminuye la formación de la nombrada "corona de proteínas". [77]

El recubrimiento con PEG disminuye el potencial zeta de las NpO a niveles cercanos a la neutralidad, lo cual es favorable para disminuir las interacciones inespecíficas [78]. Además el PEG permite separar las moléculas activas desde la superficie de oro, y de esta manera permitir un mejor reconocimiento molecular del blanco. [79, 80]

En liposomas recubiertos con PEG, el tiempo de circulación es aproximadamente seis veces mayor en comparación a liposomas sin recubrir, y la cantidad que es captada por el RES, es tres veces menor. [78] Por otra parte, Niidome *et al.* inyectaron por vía intravenosa NR modificadas con PEG, donde se observó que éstas permanecen en circulación por un periodo más prolongado que las sin modificar, de esta manera disminuyendo la acumulación de NR en el hígado.

También, en el grupo de Wang *et al.* se evaluó la distribución de NR sin recubrir, donde se encontró que presentaban una alta acumulación a nivel

hepático. [81] Interesantemente, se encontró que NR con una relación de aspecto de 3 (largo/ancho) llegan al cerebro, aunque en muy baja proporción. [82]

El PEG-tiolado (HS-PEG) es el ligando de superficie más empleado para aumentar la vida media de las NP, ya que bloquea la adsorción de proteínas séricas y el proceso de opsonización, anteriormente mencionado. La quemisorción de HS-PEG en NR reemplaza al CTAB adsorbido, con lo cual se disminuye la citotoxicidad y se mantiene la estabilidad del coloide.

*En esta propuesta, NR fueron funcionalizadas con PEG para reducir las interacciones no específicas y obtener NR estables en el medio biológico. Se esperó obtener NR con valores absolutos de carga superficial relativamente bajos, estabilizadas mediante efecto estérico, con una reducida citotoxicidad.*

### **3.2 Utilización de mecanismos de ingreso intrínsecos para aumentar la llegada al sistema nervioso central**

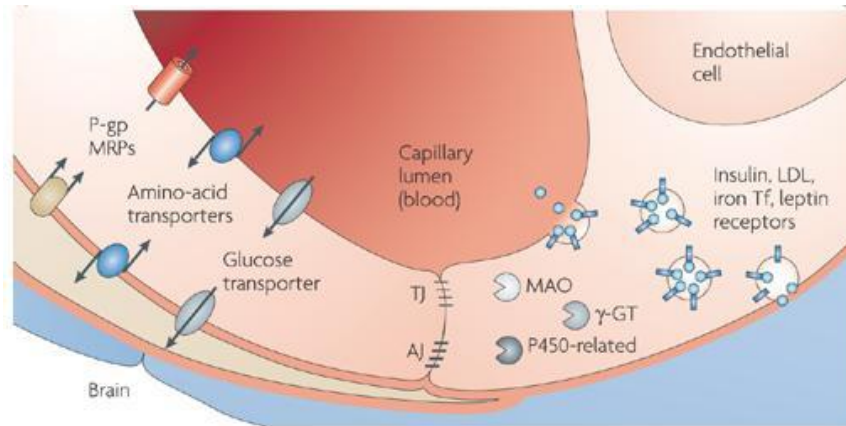
La idea de que una barrera segregaba la sangre y el cerebro fue planteada hace más de 100 años, basándose en la demostración de Ehrlich (1885). Él observó que la mayoría de los órganos podían ser teñidos por una solución de anilina y violeta de genciana, administrados por vía intravenosa, con la excepción del cerebro y la médula espinal.



Los capilares del cerebro 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. La relativa impermeabilidad de la BHE resulta de las uniones estrechas (*tight junctions*) entre las células endoteliales capilares, las cuales están formadas por moléculas de adhesión celular.

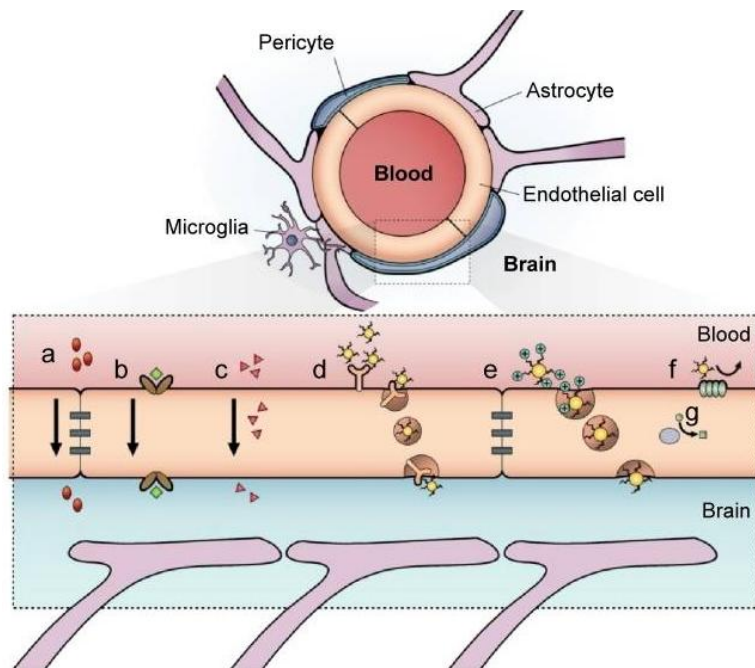
Además, las células endoteliales cerebrales poseen vías de transporte alternativo (ej. fenestraciones, canales transendoteliales, vesículas pinocíticas) y expresan altas cantidades de transportadores de eflujo, como la glicoproteína P (P-gp).

La BHE además tiene sistemas enzimáticos adicionales que sirven para proteger al cerebro. Los solutos que cruzan la membrana celular se ven expuestos a enzimas de degradación, ecto y endo enzimas, presentes en gran cantidad dentro de las células endoteliales que contienen un alto número de mitocondrias, organelos altamente activos metabólicamente (Figura 3.1).



**Figura 3.1:** Células endoteliales cerebrales de la BHE, las cuales forman “*tight junctions*” las cuales evitan cualquier paso paracelular, y hacen a la BHE prácticamente inaccesible a moléculas polares, a menos que sean transportadas a través de alguna otra vía presente en la BHE. Poseen enzimas intra y extracelulares, como monoamino oxidasa (MAO),  $\alpha$ -glutamyl transpeptidasa ( $\alpha$ -GT), fosfatasa alcalina, peptidasas, nucleotidasas y citocromo P450, lo cual le confiere una actividad metabólica. Moléculas como anticuerpos, lipoproteínas, y péptidos pueden ser transferidas al SNC mediante transcitosis mediada por receptor o por transcitosis adsorptiva no específica. Extraído de referencia. [83]

Algunas moléculas pequeñas con adecuada lipofilicidad, peso molecular y carga, pueden difundir desde la sangre al SNC. Sin embargo, la gran mayoría de moléculas pequeñas, proteínas y péptidos no son capaces de cruzar la BHE. Se ha reportado que aproximadamente el 98% de las moléculas pequeñas y casi todas las moléculas grandes (peso molecular > 1 kD), como proteínas recombinantes u oligonucleótidos, no son capaces de cruzar la BHE [83, 84]. Por lo tanto, para alcanzar el cerebro, la mayoría de las moléculas debe cruzar la BHE a través de interacciones con transportadores específicos y/o receptores expresados en el lado luminal (sangre) de las células endoteliales.



**Figura 3.2:** Esquema de la unidad neurovascular que constituye la BHE, la cual está formada por pericitos y astrocitos, y sus principales rutas de transporte celular. (a) Representación de las uniones estrechas o *tight junctions* que restringen el paso de moléculas o fármacos polares. (b) Transportadores para moléculas como glucosa, bases purinas, aminoácidos, entre otros. Algunos de estos transportes pueden ser dependientes de energía, como P-gp. (c) La vía difusiva que es utilizada principalmente para agentes solubles en lípidos. (d) Transcitosis mediada por receptor (TMR). (e) Moléculas catiónicas pueden interactuar con la membrana celular y ser transportadas a través de Transcitosis Adsorptiva (TA). (f) Bombas de eflujo expulsan moléculas de las células endoteliales hacia la sangre. (g) Enzima citocromo P450. Extraído de la referencia Velasco-Aguirre *et al.*, 2015.

Los principios activos que son inyectados por vía intravenosa (IV) podrían cruzar la BHE para llegar al sistema nervioso central por mecanismos de

transporte endógenos, debido a la gran vascularización existente en el cerebro (Figura 3.2).

Este ingreso puede estar mediado por:

i) Difusión pasiva: Muchos péptidos de gran tamaño pueden cruzar la BHE mediante difusión y han sido utilizados como lanzaderas para el ingreso de fármacos de uso terapéutico. [85-91]

ii) Transcitosis Mediada por Transportador (TMT): este proceso involucra a los transportadores de glucosa, aminoácidos catiónicos y neutros, y otros transportadores similares. Este mecanismo está limitado por la competencia con sustratos endógenos. [92-94]

iii) Transcitosis Adsorptiva (TA): Este mecanismo es usado por péptidos que penetran células (*cell-penetrating peptides* o CPPs) y otros compuestos catiónicos para sobrepasar la BHE, como ha sido previamente demostrado en nuestro laboratorio.

Este proceso no involucra ningún receptor de membrana, y a pesar que existe controversia en relación al mecanismo exacto de transcitosis hacia el SNC, es sabido que el proceso comienza con una interacción entre residuos catiónicos de un compuesto (por ej. CPPs) y las cargas negativas del área superficial de la membrana plasmática (por ej. Proteoglicanos). Esta interacción gatilla la endocitosis, la cual puede llevar a una transcitosis. Un marcaje específico por TA hacia el SNC no

es posible, debido a la falta de especificidad de los CPP que puede llevar a una amplia adsorción en distintos tejidos. [92-94]

iv) Transcitosis Mediada por Receptor (TMR): Este proceso es uno de los mecanismos más prometedores para el transporte de moléculas a través de la BHE. Este sistema incluye a los receptores de transferrina, de insulina, de lipoproteína de baja densidad (LRP), y otros receptores similares.

En general, la TMR ocurre en tres pasos: endocitosis del compuesto en el sector luminal (sangre) mediada por receptor, movimiento a través del citoplasma endotelial, y exocitosis del compuesto hacia el sector abluminal (cerebro) del endotelio capilar cerebral. [95-97]

v) Inhibición de las bombas de eflujo: Esta estrategia busca evitar la salida de los fármacos del sistema nervioso central a través de la inhibición de bombas de eflujo, como la P-gp. Un ejemplo de este tipo de inhibición es el producido por los poloxámeros. [98]

En resumen, las estrategias existentes para la entrega de principios activos al SNC consisten en la modificación química de estos, con el fin de aprovechar la ventana del sistema de transporte nativo que existe en la BHE, o mediante conjugación con ligandos que reconozcan a los receptores expresados en la BHE.

Lo anterior, podría resultar en su transporte a través de dicha barrera mediante la TMR, la cual es reconocida por la comunidad científica como uno de los mecanismos de transporte con mayor probabilidad de tener éxito. [99]

*En esta tesis nos enfocamos en la transcitosis mediada por receptores como mecanismo para poder cruzar la BHE.*

### **3.3 Proteínas 1 y 2 relacionadas con el receptor de lipoproteína de baja densidad (LRP-1 y 2)**

Las proteínas relacionadas con el receptor de lipoproteína de baja densidad 1 y 2 (LRP-1 y 2) han sido ampliamente estudiadas debido a su capacidad de transportar múltiples ligandos a través de las células endoteliales de la BHE. Algunos transportes endoteliales dependientes de LRP conocidos son el de lactoterrina, proteína asociada a receptor (RAP), activador de plasminógeno tisular (tPA), y proteína precursora de amiloides (APP). Una característica muy importante de los LRP es su rápida velocidad de endocitosis; la mitad de los receptores en la superficie de la célula pueden ser internalizados en 30 segundos [100, 101]. LRP-1 se encuentra altamente expresado en neuronas, principalmente en la corteza entorrinal, hipocampo, cerebelo, astrocitos activados y microglia. [102]

Además, cabe destacar que LRP-1 se expresa en diferentes tipos de células del SNC, como en la unidad neurovascular, que incluye células endoteliales cerebrales, células musculares de vasculatura lisa y pericitos, y además se expresan en el plexo coroide de la BHE.

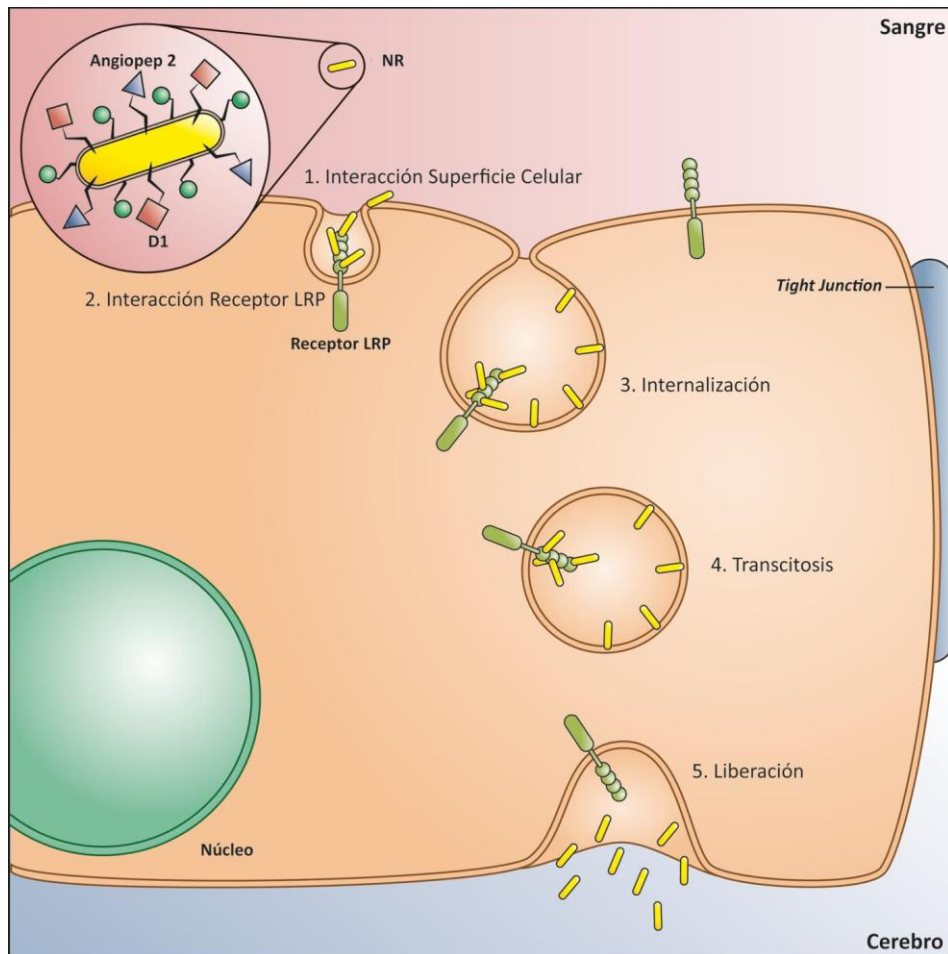
Particularmente, LRP-1 ha sido explorado como una vía para la llegada al cerebro [100, 103], ya que recientemente se ha desarrollado una nueva familia de péptidos derivados del dominio de Kunitz de Aprotinina y otras proteínas humanas, los cuales se han visto que son capaces de cruzar de manera eficiente la BHE mediante TMR vía LRP-1.

A estos péptidos de 19 aminoácidos Demeule *et al.*, les denominó Angiopep.

Uno de ellos corresponde al péptido Angiopep-2 (TFFYGGSRGKRNNFKTEEY), que es capaz de ser reconocido por LRP-1, y posteriormente endocitado, funcionando como una lanzadera para transportar fármacos a través de la BHE. Esta nueva plataforma es aplicable a moléculas grandes y pequeñas, en el rango de tamaño de 500 a 150 Da, incluyendo por ejemplo: ADN, anticuerpos, liposomas y dendrímeros.

Un ejemplo de nanomateriales utilizados con estos fines corresponde al uso de nanotubos de carbono oxidados de pared múltiple (O-MWNT), los cuales fueron modificados con Angiopep-2, PEG y doxorubicina. El objetivo de este trabajo era desarrollar un tratamiento efectivo para el glioblastoma, mejorar su entrega, biodisponibilidad a nivel cerebral, y disminuir los efectos adversos relacionados con el fármaco.[104]

En esta tesis Nanobarras de oro fueron funcionalizados con Angiopep-2, para promover su penetración en la BHE a través de un mecanismo de TMR.



**Figura 3.3.:** Modelo y Propuesta del paso a través de la BHE de NR conjugado con PEGs -COOH y PEG-O-Metilo, y péptidos Angiopep-2 y D1 unidos a través de enlace amida entre PEG-COOH y NH<sub>2</sub>-Péptidos. La transcitosis comienza con la i), ii) interacción del péptido angiopep-2 ubicado en la superficie de NR con el receptor LRP-1. Posteriormente iii) comienza la internalización del receptor LRP-1, y la subsecuente iv) transcitosis del NR a través del citoplasma, v) finalizando con la liberación de NR en el medio extracelular del SNC.



#### **4. Síntesis y caracterización de Nanobarras de oro modificadas para potenciales aplicaciones en la EA, estudios *in vitro* e *in vivo***

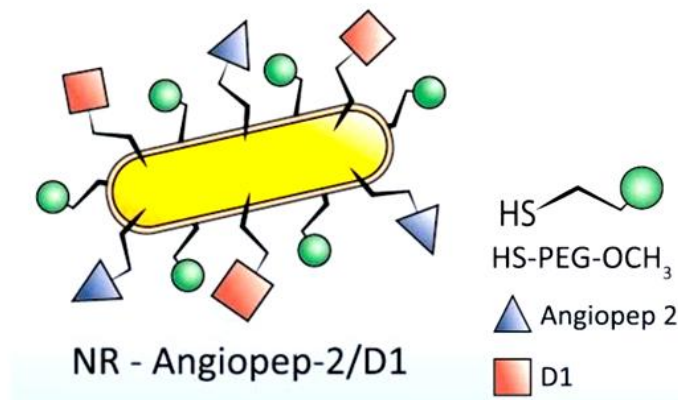
En esta tesis, las NR fueron modificadas con PEG-tiolados, Angiopep-2 y el péptido D1, con el objetivo de generar NpO que crucen las membranas pertenecientes a células endoteliales mediante TMR y para unirse con alta afinidad a  $\text{ATA}\beta$ , presentando bajos niveles de citotoxicidad.

Las NR cubiertas con CTAB se obtuvieron mediante síntesis de crecimiento mediado por semillas (explicado en el apartado 1.2).

Posteriormente las NR fueron funcionalizadas con una mezcla de PEG: HS-( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ) $_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$  (HS-PEG-OMe) y HS-( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ) $_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$  (HS-PEG-COOH)  $n=100$ , con el objetivo de aumentar la estabilidad del coloide, favorecer la interacción de los péptidos con sus respectivos blancos, y reducir la interacción con las proteínas plasmáticas. Ambos PEG contienen un grupo tiol que permite la quimisorción a la superficie de oro, favoreciendo de esta manera el desplazamiento de CTAB, un tensoactivo empleado para la síntesis de NR.

El HS-PEG-COOH, contiene un grupo carboxílico que permite el acople con los péptidos Angiopep-2 y péptido D1, mediante el uso de los agentes acoplantes N-(3-dimetilamino propil) N'-etil carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccimida (NHS).

Una vez que se obtuvieron las NR modificadas, se evaluó la influencia de la multifuncionalización sobre la penetración en células endoteliales de cerebro de rata, como así también se llevaron a cabo estudios de viabilidad celular en estas células. Asimismo, se esperó el mecanismo de ingreso a las mismas involucrara la endocitosis mediada por el receptor LRP1. Una vez establecido el efecto de la multifuncionalización sobre la penetración celular, se realizaron estudios de biodistribución *in vivo* en ratas.



**Figura 4.:** Modelo de Nanobarra modificada con metoxi-polietilenglicol (HS-PEG-OCH<sub>3</sub>) y carboxi-polietilglicol tiolado. Los péptidos son acomplados en la superficie de los NR a través de un enlace amida, formado entre el grupo -COOH del carboxi-polietilenglicol y la amina primaria presente en los ambos péptidos Angiopep-2 y D1.

## **2. Hipótesis de Trabajo**

La multifuncionalización de Nanobarras de oro con el péptido Angiopep-2 y con el péptido D1, favorece el traspaso de la BHE *in vivo*, y la interacción con el agregado del péptido A $\beta$ .

A fin de obtener las evidencias experimentales que permitan apoyar o desestimar la hipótesis de trabajo, se plantean los siguientes objetivos:

### **3. Objetivo General**

Multifuncionalizar Nanobarras de oro modificadas con Polietilenglicol, con los péptidos Angiopep-2 y D1, con el fin de favorecer el paso a través de la barrera hematoencefálica, e interactuar con agregados del péptido A $\beta$ .

#### 4. Objetivos Específicos

1. Sintetizar y caracterizar Nanobarras de oro, y los péptidos Angiopep-2 y D1.
2. Modificar y caracterizar físico-químicamente las Nanobarras de oro conjugadas con los péptidos Angiopep-2 y péptidos D1.
3. Evaluar la citotoxicidad y el grado de internalización de las Nanobarras de oro modificadas, utilizando para este propósito células endoteliales.
4. Evaluar la interacción *in vitro* de las Nanobarras de oro modificadas con péptido A $\beta$  y sus agregados tóxicos.
5. Evaluar la llegada al cerebro de ratas de las Nanobarras modificadas, mediante administración por vía intravenosa.

# Capítulo 2: Materiales y Métodos

## 2.1 Síntesis y caracterización de los péptidos Angiopep-2 y D1

Para la síntesis de los péptidos Angiopep-2 (TFFYGGSRGKRNNFKTEEY-NH<sub>2</sub>), Angiopep-2(Rhodamina) (H-Cys-K(Rhodamine b)-Peg TFFYGGSRGKRNNFKTEEY-NH<sub>2</sub>) y D1 (qshyrhispaqv-NH<sub>2</sub>) se siguió un protocolo de síntesis en fase sólida (resina H-Rink-Amide-Chem-MATRIX) empleando una estrategia Fmoc/tBu. [64]

La síntesis de los péptidos en fase sólida fue realizada en jeringas de polipropileno, en cuya base presentan discos porosos de polietileno. Los solventes y reactivos solubles fueron removidos con vacío. Los péptidos fueron obtenidos en su forma amida en el extremo C-terminal. Todos los aminoácidos utilizados se encontraban Fmoc (9-Fluorenylmethoxycarbonyl) protegidos y se utilizó como soporte polimérico la resina MBHA AM Fmoc Rink amida (Iris Biotech GmbH, grado de funcionalización de 0,72mmoles/g).

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

ensayo de ninhidrina para confirmar la desprotección del grupo amino de la resina.

Las reacciones de acoplamiento se llevaron a cabo con Fmoc-aminoácido (Iris Biotech GmbH) (4 equivalentes), en donde cada residuo se debió emplear con su grupo carboxilo activado mediante carbodiimidas y un agente acoplante como HOAt (1-Hidroxi-7-Azabenzotriazol; Medalschem de 99% pureza y de P.M. 136,14) (12 equivalentes) y/o HOBt (hidroxibenzotriazol) según fuera el caso y PyBOP (Iris Biotech GmbH, P.M. 520,30) (4 equivalentes), los cuales fueron secuencialmente agregados a la resina, y luego disueltos en 1mL de DMF, dejándose la mezcla reaccionar por 60 min. Transcurrido dicho periodo se evaluó la efectividad del paso de acoplamiento mediante el ensayo de ninhidrina.

A partir del resultado se continuó con la desprotección correspondiente para realizar el siguiente acoplamiento, o bien se reacopló el aminoácido hasta obtener una reacción de ninhidrina negativa. Para realizar el reacople se repitió el mismo procedimiento.

Los lavados entre desprotección, acoplamientos de aminoácidos y los subsecuentes pasos de desprotección, se llevaron a cabo con DMF (3 veces x 1min) y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 veces x 1min), usando 5mL de solvente cada vez.[65] La desprotección del grupo amino del aminoácido recién incorporado se realizó mediante la adición de piperidina-DMF al 20%. Finalmente se agregó la



solución de clivaje (TFA 95%:H<sub>2</sub>O 2,5%: TIS 2,5%; (TFA: Aldrich. Pureza 99%, P.M. 114,02; TIS: Fluka. Pureza 98%. P.M. 158,36) sobre la resina y se dejó reaccionar por 60 min para producir la escisión del péptido desde la resina. Luego de evaporar el solvente con un rotavapor, fueron realizadas sucesivas precipitaciones con *tert*-butil-metil-eter (Fluka. Pureza 99%. P.M. 88,15) y subsecuentes centrifugaciones. Se eliminó el éter por evaporación con un flujo de nitrógeno gaseoso (N<sub>2</sub>). Luego el péptido obtenido se resuspendió en una mezcla Acetonitrilo: H<sub>2</sub>O (1:1) (Acetonitrilo (ACN) Merck. Pureza grado HPLC. P.M. 41,05). Posteriormente se procedió a congelar y a liofilizar.

La caracterización de los péptidos fue realizada por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) y *Electrospray*.

Para el caso de caracterización mediante HPLC, el crudo obtenido de la síntesis en fase sólida se analizó para determinar su pureza. Para esto una pequeña cantidad de péptido se disolvió en agua con gotas de ACN y fue inyectada en el equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia analítico Waters 1525, con detección UV, en una columna Waters Sunfire C18; 3,5 µm; 4,6 x 100 mm.

Posteriormente, se analizó mediante *Electrospray*. Para esto los péptidos fueron analizados mediante un equipo ESI-MS de masas Waters system Alliance 2695, photodiode detector Waters 2998, ESI-MS model Micromass ZQ y Masslynx 4.1 *software* (Waters). SunFire™ C18 column, 3.5 µm, 2.1x100 mm. Los solventes utilizados fueron ACN (0.007% ácido fórmico) y H<sub>2</sub>O (0.1% ácido fórmico).

## **2.2 Síntesis de Nanobarras de oro, y su modificación con Polietilenglicol**

### **Preparación del material**

Previo a la síntesis de NR, el material a utilizar debe libre de interferentes, para lo cual, se dejó en Extrán al 2% con H<sub>2</sub>O destilada *overnight*.

Posteriormente se enjuagó con agua destilada y se dejó en agua regia (3:1 HCl/HNO<sub>3</sub>) durante 30 minutos. Finalmente se realizaron enjuagues sucesivos en agua Milli-Q (18,2MΩcm). Cabe destacar que todas las soluciones necesarias para la síntesis de NR se prepararon con agua Milli-Q.

### **Síntesis de Nanobarras de oro**

Las NR fueron sintetizadas usando el método mediado por semillas, en el cual se forman en una primera etapa pequeñas esferas (aprox.2-3 nm) y a partir de ellas se produce el crecimiento de la NR. [105]

En un primer paso, se preparó una solución de semillas reduciendo 250 µl de HAuCl<sub>4</sub> con 9,75 ml de CTAB 0,1 M y 600 µl de borohidruro de sodio (0,01 M) preparado en frío. Las semillas se mantuvieron a 27°C por dos horas antes de ser usadas. A continuación se preparó una solución de crecimiento en la cual se le agregaron 55 µl de ácido ascórbico 0,1 M, 75 µl AgNO<sub>3</sub> 0,01 M, 9,5 ml de CTAB 0,1 M y 500 µl de HAuCl<sub>4</sub> 0,01 M. Luego se agregaron 250 µl de HCl 0,1 M y 12 µl de la solución de semillas preparadas previamente. La solución se dejó reaccionar por 10 minutos a 27°C para luego centrifugar a 7030 g por 15

minutos. Luego de la centrifugación, el sobrenadante fue descartado, y el *pellet* fue resuspendido en agua Milli Q.

### **Espectrofotometría de Absorción Molecular**

Los NR fueron caracterizadas mediante espectrofotometría de absorción molecular a temperatura ambiente utilizando un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25 para realizar un espectro, con la finalidad de observar las dos bandas de absorción de los plasmón característicos de las NR, el transversal aproximadamente en 520 nm y el longitudinal que va desde los 700 a los 1000 nm, dependiendo de su relación de aspecto. [38, 105]

### **Dispersión Dinámica de la Luz**

Las NR también fueron caracterizadas mediante dispersión dinámica de la luz (DLS) con el objetivo de determinar sus diámetros hidrodinámicos y su estabilidad coloidal. Estas mediciones fueron realizadas por triplicado en un equipo Zeta *sizer* 3000 de Malvern Instruments y se usó una celda capilar plegada desechable (DTS1070), dispersante agua a 25°C y el índice de refracción usado fue 1,332.

Además se determinó el Índice de Polidispersidad (PDI), parámetro obtenido de manera simultánea con el tamaño de partícula. Este índice provee información sobre la muestra: valores cercanos a 0 indican que la muestra es monodispersa

así como valores cercanos a la unidad indican que la muestra presenta gran variedad de tamaños.

### **Potencial Z**

La medición de potencial Z (pZ) (Zeta sizer 3000, Malvern Instruments, UK) de nanopartículas consiste en 3 repeticiones de cada solución de NR. Dado que las mediciones del potencial zeta es realizada en agua, la aproximación de Smoluchowski [106] ha sido usada para calcular el pZ a partir de la movilidad electroforética de la nanopartícula en solución. Las determinaciones electroforéticas de potencial zeta fueron comúnmente realizadas en medio acuoso y una solución moderada de electrolitos, a 25°C y se usa un índice de refracción de 1,332. Se empleó una celda capilar plegada desechable (DTS1070).

### **Microscopía electrónica de Transmisión**

Los NR fueron observadas por microscopía electrónica usando un microscopio electrónico de barrido con módulo de transmisión electrónica (STEM) FEI Inspect F50.

Las muestras fueron preparadas depositando una gota de una suspensión de NR sobre grillas de cobre tratadas con *Formvar* carbón y dejándolas secar. Las muestras con fibras del péptido A $\beta$ , se prepararon de la misma manera,

añadiendo un último paso de tinción con ácido fosfotúngstico 1% por dos minutos. Mediante esta técnica se determinó su tamaño y la relación de aspecto (largo/ancho) mayoritaria para la población de NR.

Para obtener datos poblacionales se midieron 100 nanopartículas empleando el programa ImageJ, representándose los datos como histogramas de frecuencia versus relación de aspecto.

### **Modificación de la superficie de las Nanobarras de oro con Polietilenglicol y con los péptidos Angiopep-2 y D1**

Los péptidos Angiopep-2 y D1 fueron conjugados a NR en un procedimiento de tres pasos: En primer lugar, 50  $\mu$ l de una solución de HS-PEG-OMe 1 mM fue agregada a 10 ml de una suspensión de NR-CTAB 1 nM, y la solución se dejó reaccionar bajo agitación magnética durante 10 minutos. En esta etapa, HS-PEG-OMe desplaza el CTAB de la superficie de los NR, debido a la afinidad del grupo tiol por el oro. Los NR-PEG-OMe obtenidos fueron centrifugados a 20800 g por 10 minutos y luego el sobrenadante fue descartado. El *pellet* fue resuspendido en 10 ml de agua Milli Q.

Posteriormente, se agregó a la suspensión de NR-PEG-OMe, 300  $\mu$ l de una solución de HS-PEG-COOH 1 mM y se dejó reaccionar durante una hora con agitación mecánica, resultando en una capa mixta de PEG-OMe y PEG-COOH sobre la superficie de NR (NR-PEG).

La suspensión obtenida en la etapa anterior fue luego centrifugada a 20800 g por 10 minutos y el sobrenadante fue descartado. Posteriormente el *pellet* fue resuspendido en 100  $\mu$ l de la solución amortiguadora MES 0,1M pH 5,5. A continuación de la etapa descrita, se agregaron 0,2 mg de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y 0,5 mg de sulfo N-hidroxisuccinimida (Sulfo-NHS), para activar los grupos carboxílicos libres pertenecientes a los PEG-COOH adsorbidos en la superficie de los NR.. Estos agentes acoplantes fueron incubados con la suspensión de NR-PEG (-OMe y -COOH) por 15 minutos, para lograr la completa activación de los grupos carboxílicos. Finalmente, el exceso de EDC/Sulfo-NHS fue removido posteriormente por centrifugación a 20800 g por 10 minutos.

Los NR-PEG (-OMe y -COOH) activados fueron mezclados con los péptidos, en una relación 1:9 de D1 y Angiopep-2 respectivamente, en la solución amortiguadora PBS pH 7,4 en una relación NR:péptido 1:1000. La solución se mantuvo en agitación suave durante 2 horas a temperatura ambiente y fue guardada a 4°C. Previo a su uso, las NR-péptidos fueron centrifugadas a 20800 g por 10 minutos para eliminar los péptidos no unidos.

### **Cálculo de concentración de Nanobarras**

Una alícuota de un volumen conocido de una suspensión de NR fue liofilizada y el contenido de oro (CAu) fue determinado por activación neutrónica en la

Comisión Chilena de Energía Nuclear (CCHEN) .Las muestras fueron selladas y expuestas por 17 horas a un flujo de neutrones de 0.25–1.3 n/cm<sup>2</sup>s con un poder de 5 mW usando un reactor RECH-1 en la Comisión Chilena de Energía Nuclear, CCHEN, generando la conversión de <sup>197</sup>Au a <sup>198</sup>Au.

Después de 7-12 días de bombardeo con neutrones, los rayos  $\gamma$  emitidos por las muestras fueron contados y separados por energía usando un detector de germanio acoplado espectrómetro multicanal de rayos  $\gamma$  acoplado a un computador.

El espectro de rayos  $\gamma$  fue analizado usando el *software* SAMPO90 Canberra.

Una vez obtenida la concentración de oro presente en la muestra y conociendo el número de átomos por NR así como la densidad de este elemento en el nanocrystal y el tamaño de las mismas mediante observaciones de TEM (realizando una estadística sobre 100 NR) se determinó la concentración molar de las NpO siguiendo la ecuación publicada por Link *et al.* [107]

**Ecuación:**

$$C_{AuNV} = \frac{4 \times C_{Au}}{\rho_{Au} \times \pi \times W^2 \times L} ; \text{Dónde:}$$

$\rho_{Au}$ : densidad de átomos de oro en el bulk (59 átomos/nm<sup>3</sup>)

$C_{Au}$ : concentración de oro determinada por activación neutrónica (CCHEN)

L: largo de las NV determinadas por TEM

W: ancho de las NV determinadas por TEM

### **Número de moléculas de péptido por Nanobarra multifuncionalizada**

Para estimar el número de moléculas de péptido acopladas a cada NR modificado se hizo un análisis de los aminoácidos presentes en las muestras de NR.

Se realizó una hidrólisis de los NR-modificados agregando HCl 6N y un patrón de concentración conocida (ácido aminobutírico) calentándose la muestra en un tubo cerrado a 110°C durante 72 h. Posteriormente, el tubo se enfrió eliminándose todo el ácido clorhídrico mediante evaporación rotatoria (hasta sequedad).

El sólido obtenido fue resuspendido en 200 µl de HCl 20 mM. Posteriormente, se tomaron 20µl, a los cuales se le agregaron 60µl de tampón borato (reactivo comercializado junto al AccQ-Tag *kit* de Waters como AccQ-Fluor Borate buffer).

Posteriormente, la muestra se derivatizó agregando 20µl de 6- aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato (AQC) (reactivo comercializado como AccQ-Fluor por Waters), el cual se dejó durante 1min a temperatura ambiente y luego 10 min a 55°C. Una vez realizado este proceso la muestra se inyectó en un equipo de HPLC-PDA conteniendo una columna AccQ-Tag, (C18; 4µm; 3,9 x 15mm) obteniéndose los picos correspondientes a los aminoácidos presentes en la muestra, para poder realizar la comparación se cuenta con un estándar de aminoácidos (pico-Tag comercializado junto al *kit* AccQ-Tag por Waters).



Finalmente, siguiendo un aminoácido que sea único para cada péptido, se determinó la concentración que hay del mismo. Al conocer la cantidad de NR que se utilizó en un inicio se puede determinar la relación péptido/NR.

### **Estudio de estabilidad de Nanobarras de oro modificadas**

Para estas mediciones se utilizaron las NR resultantes de la conjugación con ambos péptidos. Posteriormente se procedió a resuspender el *pellet* obtenido en la etapa anterior en agua Milli-Q, empleando para esto un *vortex* por 1min. De la muestra obtenida se tomó una alícuota de 1mL, se dejó incubando por un periodo de 30 días a 4°C para evaluar su estabilidad en dichas condiciones. Los parámetros a evaluar con este fin fueron plasmón de resonancia superficial (UV-Vis), tamaño (DLS), y carga superficial (Potencial Z).

Para el caso de la medición por espectrofotometría UV-Vis se midió directamente utilizando como blanco una solución equivalente de Agua Milli-Q sin NR conjugados. Para la determinación de tamaños por DLS, y Potencial Z, las muestras fueron medidas directamente en el equipo. Todas las mediciones se realizaron a Temperatura ambiente (25°C).

### **2.3 Cultivo celular primario de endotelio de cerebro de rata RBMVEC y de la línea endotelial de cerebro de ratón inmortalizada bEnd.3**

El cultivo primario RBMVEC y la línea bEnd.3 fueron mantenidas en DMEM alto en glucosa (Gibco) suplementado con 10% de SFB inactivado, 2 mM de glutamina, 50 U/mL de penicilina y 0,05 g/mL de estreptomina. Las células se hicieron crecer y se mantuvieron a 37 °C en atmosfera de CO<sub>2</sub> al 5%.

### **Ensayo de viabilidad para cultivo primario de endotelio de cerebro de rata RBMVEC y línea celular endotelial de cerebro de ratón bEnd.3**

Los estudios de citotoxicidad se llevaron a cabo en RBMVEC y bEnd.3 sembradas sobre placas de 96 pocillos. Una vez adheridas las células (10000 células/pocillo para bEnd.3 y 5000 células/pocillo para RBMVEC) fueron tratadas con los NR-Angiopep-2/D1 durante 24 hs a 37°C y con 5% de CO<sub>2</sub>.

El primer ensayo fue el de MTS, el cual permite determinar la disrupción de una función bioquímica crítica. Este ensayo cuantifica la actividad mitocondrial mediante la formación de un producto de formazán color azul, el cual se genera mediante la reducción de el anillo tetrazólico del MTS.

Se sabe que la reducción del MTS ocurre principalmente en la mitocondria, a través de la acción de succinato deshidrogenasa, por lo que puede proveer de una medida de la muerte mediada por apoptosis. [108]

Luego de transcurrido el tiempo de incubación, se descartó el sobrenadante y se agregaron 100µL de medio DMEM+10% FBS, sobre los cuales se agregaron 20µL de la solución MTS/PMS (2mg/mL MTS y 0,046mg/mL PMS). La placa se incubó a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> por un periodo de tiempo entre 0,5-2 horas. De esta manera se reduce el del MTS dando un producto detectable por espectrofotometría a una  $\lambda$  de 490nm en un espectrofluorímetro de placas, empleando también un valor de referencia en los 655nm. El resultado corregido se entrega por la diferencia de la absorbancia medidas  $Abs \lambda 490nm - Abs \lambda 655nm$ . El ensayo de viabilidad se realizó en un triplicado por placa y un triplicado de placa, obteniéndose un n=9. Los datos se ajustan al control positivo referido como 100% de viabilidad.

En este ensayo se utilizaron como controles células incubadas con medio (control de vida) e incubadas con SDS 10%, además de un control del vehículo utilizado (PBS).

Por otro lado, se determinó la muerte celular mediante el ensayo de integración de membrana CytoTox-ONE™, el cual evalúa la liberación de LDH, la cual es una enzima citosólica estable, que está presente en todo tipo de células, y cuya rápida liberación al medio de cultivo supone un daño en la membrana plasmática. [109]

La actividad de LDH es determinada mediante un test, el cual en un primer paso comprende la reducción de NAD<sup>+</sup> a NADH/H<sup>+</sup> mediante la conversión catalítica de lactato a piruvato. En una segunda etapa, se transfiere H/H<sup>+</sup> de NADH/H<sup>+</sup> a

una sal de tetrazolio (2-(4-iodophenyl)- 3-(4-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium chloride (INT)), la cual es reducida a rojo formazán. [110]

Debido a su rapidez y precisión, este es un método comúnmente utilizado para estudiar la pérdida de integridad de membrana celular, mediante la medición de liberación hacia el medio celular de la enzima citosólica Lactato deshidrogenasa (LDH), y que puede dar cuenta de la muerte celular mediante necrosis. [111]

La cantidad de células por pocillo, el medio utilizado, las muestras y sus respectivas concentraciones, fueron las mismas que las utilizadas en el ensayo de MTS. Una vez agregado el tratamiento, las células se incubaron durante 24 horas a 37°C. Transcurrido el tiempo de ensayo, se agregaron 4 µL de solución de lisis en los pocillos correspondientes al control (máxima liberación de LDH). Luego, se tomaron 50 µL de cada pocillo y se agregaron a una placa negra de 96 pocillos, seguido de 50 µL del reactivo CytoTox-ONE™ y se dejó reaccionar durante 10 minutos. Se llevó la placa a un lector de placa, y se determinó la fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 560 nm y una de emisión de 590 nm. En el caso de ambos ensayos, se utilizaron controles de vida y de muerte, además de controles de *background*.

### **Cuantificación de oro en cultivo primario endotelial de cerebro de rata RBMVEC**

Las células endoteliales fueron sembradas en una placa de 12 pocillos a una densidad de 60.000 células por pocillo, luego mantenidas con medio DMEM

suplementado. Las células fueron incubadas con NR-Angiopep-2/D1, NR-Peg-Ome, NR-Angiopep-2 (0,4 nM) al tiempo de 24 h. Luego fueron lavadas cinco veces con una solución amortiguadora salina de fosfato (PBS) pH 7,4 y tratadas con tripsina al 1% para recolectarlas luego en 200  $\mu$ L de PBS.

Luego la solución correspondiente a cada muestra fue liofilizada y el contenido de oro fue determinado por el análisis de activación neutrónica en la Comisión Chilena de Energía Nuclear.

### **Marcaje de Nanobarras modificadas con Angiopep-2 y con Rodamina**

Con el fin de poder detectar una señal fluorescente que permita la visualización del nanosistema en los sistemas biológicos, los NR conjugados con PEG fueron acoplados con el péptido Angiopep-2(RodaminaB): H-Cys-K(Rhodamine b)-Peg TFFYGGSRGKRNNFKTEEY-NH<sub>2</sub>, el cual posee una Rodamina-B en la cadena lateral del aminoácido lisina, un PEG espaciador, además modificado con una Cisteína para aumentar la probabilidad de modificación de la superficie del péptido mediante el enlace S-Au entre en tiol de dicho aminoácido y la superficie de la NR. Por otra parte, al igual que los demás péptidos, posee un grupo amida en el grupo carboxílico terminal con el fin de darle mayor estabilidad al péptido. Como los demás péptidos, este se acopló mediante la formación de enlace amida entre la función amina del péptido y el grupo carboxílico de PEG, y mediante un enlace S-Au.

Luego de la conjugación de los NR con Angiopep-2(Rodamina), el *pellet* fue lavado con agua Milli-Q, y luego centrifugado (20800 g por 10 minutos) 3 veces para eliminar el exceso de péptido libre marcado remanente del proceso de conjugación. Una vez obtenido el sistema modificado con el péptido fluorescente, se almacenó protegido de la luz a 4°C.

Posterior a la obtención de los NR conjugados con el péptido, se evaluó la presencia de la sonda fluorescente mediante la realización de un barrido entre 555 nm y 580 nm, que corresponde al espectro de excitación y emisión para la Rodamina B en agua. Esto se realizó en un espectrofluorímetro de placas BioTek, modelo synergy MX

### **Evaluación de la internalización celular de Nanobarras-Angiopep-2(Rodamina) en línea celular bEnd.3 mediante microscopia confocal**

Las células bEnd.3 se sembraron a una densidad de 40.000 células por pocillo una placa de 24 pocillos y luego de 24 horas de cultivo éstas formaron una monocapa confluyente. Luego, las células fueron incubadas con NR-Angiopep-2(Rodamina) a una concentración de 0,04 nM por 2 y 24 horas a 37°C.

Luego de eso, las células fueron fijadas con paraformaldehído 4%, permeabilizadas con tritón x100 0,1%, y bloqueadas con BSA 3%. Todas estas soluciones fueron preparadas en PBS.

Las células tratadas fueron incubadas con *Hoechst* y luego montadas en medio de montaje DAKO. Las imágenes fueron capturadas con un microscopio Nikon C2 confocal utilizando a 63x/1.4 aceite DIC objetivo. Las imágenes fueron deconvolucionadas con el programa Image J.

#### **2.4 Estudio de Farmacocinética de Nanobarras-modificadas en modelo murino de Sprague Dawley**

Se utilizaron 3 ratas Sprague Dawley macho, de peso 250-300 g. Estas fueron inyectadas por la vena de la cola con NR-Angiopep-2/D1 (1.86 mg oro/kg peso). El volumen de la inyección se ajustó a 0,5 mL/200 g de peso de rata. Se tomaron muestras de sangre a los tiempos 5 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 5 h y 24 h, y fueron analizadas mediante AAN. Los datos de oro obtenidos fueron analizados mediante OriginPro 8.

#### **2.5 Agregación del péptido A $\beta$ 1-42 en presencia de Nanobarras-modificadas con péptidos**

Para la formación de las fibras del péptido A $\beta$ , alícuotas de 0,05 mg del péptido A $\beta$  se trataron con HFIP (1, 1, 1, 3, 3, 3-Hexafluoro-2-propanol) durante 30 min a temperatura ambiente. Luego las muestras fueron liofilizadas y resuspendidas

en 28  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  milli Q y se incubaron a  $4^\circ\text{C}$  toda la noche. Luego se agregaron los NR (resuspendidas en agua) quedando a una concentración de 0,48 nM.

La concentración final del péptido  $\text{A}\beta$  fue de  $20\mu\text{M}$  en todos los casos. El péptido fue incubado durante 48 horas a  $37^\circ\text{C}$  con agitación mecánica de 300 rpm. A las fibras ya crecidas se les realizó el test de fluorescencia de ThT.

Esta sonda emite fluorescencia a 480 nm al ser excitado a 450 nm en presencia de fibras de  $\text{A}\beta$ , siendo la intensidad de fluorescencia emitida por esta molécula directamente proporcional a la cantidad de fibras de  $\text{A}\beta$  presentes. De esta manera se detectó la presencia de fibras como así también se pudo evaluar la desaparición o aumento de las mismas.[112, 113] Después de la incubación, 25  $\mu\text{l}$  de las muestras se depositaron en pocillos de placas de fondo negro Nunc® MaxiSorp™ 384 well plates, que contenían 20  $\mu\text{l}$  del buffer glicina 0,1 M a pH 8,4 y en el momento antes de realizar la medición se agregaron 5  $\mu\text{l}$  ThT 100  $\mu\text{M}$  a cada pocillo.

Estos experimentos fueron realizados en un espectrofluorímetro de placas BioTek, modelo synergy MX, excitando a 450 nm y leyendo la fluorescencia a 480 nm.

Todos los datos de fluorescencia de ThT realizados en esta tesis se expresan como porcentaje con respecto a un control de fibras de  $\text{A}\beta$  sin tratamiento de NR, solamente con el vehículo (100%). Las diferencias significativas entre el conjunto de datos contables y los experimentos fueron determinados utilizando



la prueba de Student para muestras no pareadas. El índice de significancia de un 95%, ( $p < 0,05$ ), fue considerado estadísticamente significativo.

## **2.6 Evaluación de la llegada de Nanobarras-D1/Angiopep-2 al cerebro de rata Sprague Dawley, modelo murino para la biodistribución de las nanopartículas**

En este estudio se emplearon ratas Sprague Dawley, a las cuales se les administró vía intravenosa, por la vena de la cola, 500  $\mu$ l de una suspensión 10 nM de NR-Angiopep-2/D1, NR-Angiopep-2, NR-D1 ó NR-Peg-Ome (1.86 mg oro/kg peso). Luego de 90 minutos post inyección, el animal fue anestesiado con ketamina xilazina (40mg/kilo y 15mg/kilo respectivamente) administrada por vía intraperitoneal, para posteriormente ser perfundido con PBS. Luego de la perfusión, se extrajeron los órganos de interés: cerebro e hígado, y se congelaron en nitrógeno líquido para luego ser liofilizados a  $-50^{\circ}\text{C}$  con una presión de 0,137 mBar.

Una vez liofilizados, los órganos secos fueron molidos en un crisol de porcelana, para así homogeneizar las muestras y una vez molidas se ubicaron en una estufa a  $120^{\circ}\text{C}$  hasta conseguir un peso constante.

Una vez obtenidos los órganos liofilizados y en su peso constante, se analizaron por activación neutrónica (AAN). Este análisis se realizó por la

Comisión Chilena de Energía Nuclear (CCHEN) en la planta nuclear de la Reina.

## **2.7 Detección de Nanobarras-Angiopep-2/D1 en cerebro de rata Sprague Dawley por Microscopia Electrónica de Transmisión**

Para confirmar la presencia de NR en el cerebro del animal luego de una administración intravenosa, se analizó el tejido cerebral mediante microscopía electrónica. El animal al cual se le administró NR-Angiopep-2/D1, a las 1.5 h horas post inyección fue perfundido con PBS, para posteriormente ser nuevamente perfundido con una solución de paraformaldehído al 2% con 2,5% de glutaraldehído en buffer fosfato de sodio 0,1M. Luego se extrajo el cerebro del animal y se aisló el hipocampo, el cual fue fijado por inmersión con una solución al 1% de tetróxido de osmio durante 1 hora. Posteriormente la muestra se lavó 3 veces en buffer fosfato de sodio por 10 minutos y luego se deshidrata la muestra en etanol siguiendo la secuencia: 30%-50%-70%-90%-96% 7 minutos en cada paso, para lavar luego dos veces en etanol 100% y 2 veces más con acetona para luego infiltrarla con resina de Epon por 2 días, embebida en la misma resina, se polimerizó a 70°C por 48h. Se realizaron cortes de 1µ (Ultramicrótomo Sorvall Porter Blum) que fueron teñidos con azul de toluidina 1% en borato de sodio 1% para localizar área de corte fino.

Cortes ultra delgados de 60 nm se obtuvieron empleando el mismo ultra microtomo, y luego fueron montados en rejillas de Cu cubiertas con *formvar*.

Finalmente las muestras fueron teñidas con acetato de uranilo al 2% en agua y citrato de plomo. Posteriormente se obtuvieron micrografías mediante STEM/TEM.

## **2.8 Distribución de Nanobarras marcadas con Rodamina *ex vivo***

En este estudio se emplearon ratas Sprague Dawley, a las cuales se les administró vía intravenosa, por la vena de la cola, 500  $\mu$ l de una suspensión 10 nM de NR- Angiopep-2(Rodamina-b). Luego de 120 minutos y 24 h post inyección, los animales fueron anestesiados con isoflurano (Neopharma, 100mL), anestésico por inhalación, el cual es evaporado con un equipo de anestesia Bruker.

Para anestesiarse a la rata se colocó en una cámara conectada al flujo de isoflurano por 5 min., para posteriormente ser perfundido con PBS. Luego de la perfusión, se extrajeron los órganos de interés: cerebro, riñones e hígado.

Una vez extraídos, se lavaron 5 veces con PBS y depositaron en una placa de cultivo. Posteriormente, los órganos fueron analizados en un equipo *In-Vivo F PRO imaging system*.

# Capítulo 3: Resultados

### 3.1 Caracterización de Nanobarras de oro

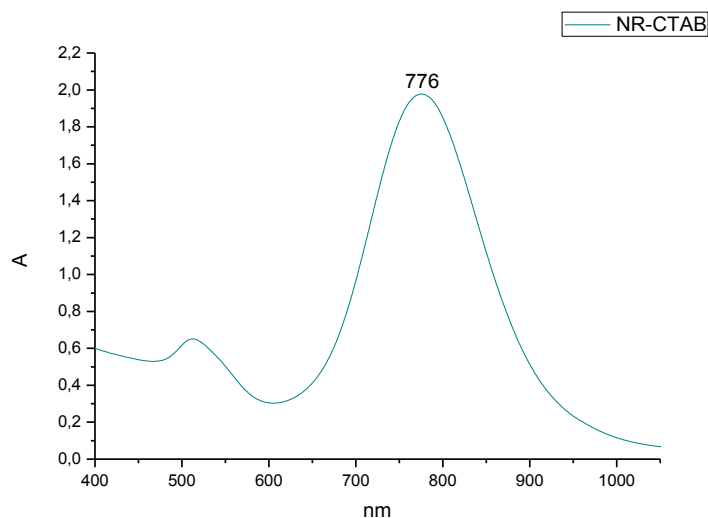
Para la obtención de NR con una relación de aspecto cercana a 4, se realizó una síntesis mediada por semillas previamente descrita en “metodología”. [105] Como se detalló, primero se sintetizaron las semillas de oro o núcleos, para lo cual la sal áurica fue reducida con  $\text{NaBH}_4$  en frío y en presencia de CTAB. Posteriormente, se preparó la solución de crecimiento con sal áurica ( $\text{H}_4\text{ClAu}$ ), CTAB, ácido ascórbico y  $\text{AgNO}_3$ . Posteriormente, a esta solución se le agregó la solución de semillas para obtener NR. Para eliminar el CTAB en exceso se realizó una centrifugación a 4000 g durante 10 min. [82] Las NR se caracterizaron por: a) Espectrofotometría UV-visible, b) Microscopía electrónica de transmisión, c) Potencial Z y d) Dispersión dinámica de la luz.

Para determinar la concentración molar de NR se liofilizó un volumen de solución de NR y se cuantificó el oro mediante activación neutrónica de oro en la Comisión Chilena de Energía Nuclear, CCHEN.

El primer paso en la etapa de caracterización fue evaluar la presencia de las bandas correspondientes al plasmón de superficie en NR estabilizadas con CTAB (NR-CTAB) mediante espectrofotometría de absorción molecular. Mediante esta técnica se observaron los dos picos característicos, presente en formas irregulares como las NR.

Uno de ellos corresponde al plasmón de superficie transversal a 512 nm, y el segundo pico corresponde a la señal de plasmón longitudinal alrededor de 776 nm (Fig.3.1).

Estos picos de absorción son característicos en NR con una relación de aspecto (largo:ancho) cercano a 4.[114]

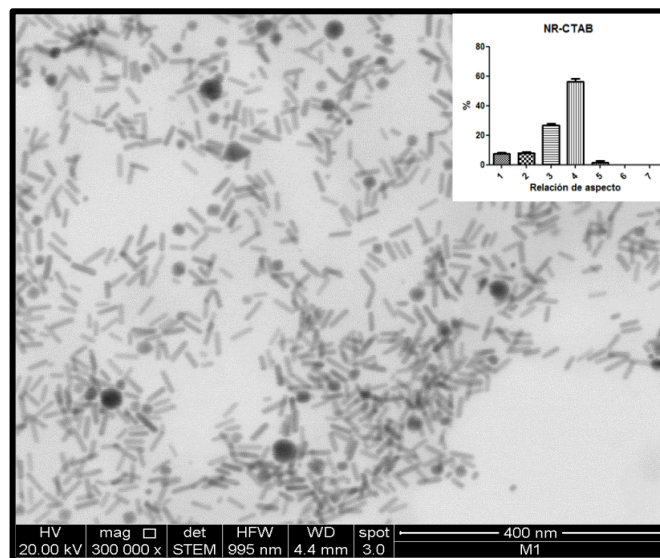


**Fig. 3.1** Espectro de absorción Vis-NIR de Nanobarras de oro estabilizadas con CTAB (NR-CTAB) en un barrido entre 400 y 1000 nm de longitud de onda. Absorbancia entre 0-2,2 A.

### 3.2 Caracterización por Microscopía electrónica de Nanobarras de oro

Para confirmar la forma característica de estas nanopartículas asimétricas, y determinar sus dimensiones (largo/ancho), se observaron por STEM. Como se aprecia en la imagen de la Fig.3.2, se observa una población mayoritaria de NR con diferentes relaciones de aspecto, y con alta presencia además de NeO de distintos tamaños.

A partir de una población de 100 nanopartículas, se determinó que la relación de aspecto largo/ancho promedio, corresponde a 4 (distribución de tamaños). Se observa en el Histograma de relación de aspectos (largo/ancho) realizado sobre una población de 100 nanopartículas de la Figura 3.2, que aproximadamente el 60% de la población tiene una relación de aspecto de 4, seguido por un 20% de la población con relación de aspecto de 3, y finalmente existen poblaciones minoritarias de relación de aspecto 1,2 y 5. En la imagen STEM de la Figura 3.2 se observa una población representativa de NR-CTAB con la cual se determinó además que el largo promedio es  $40 \pm 5$  nm y el ancho promedio  $11 \pm 1$  nm.

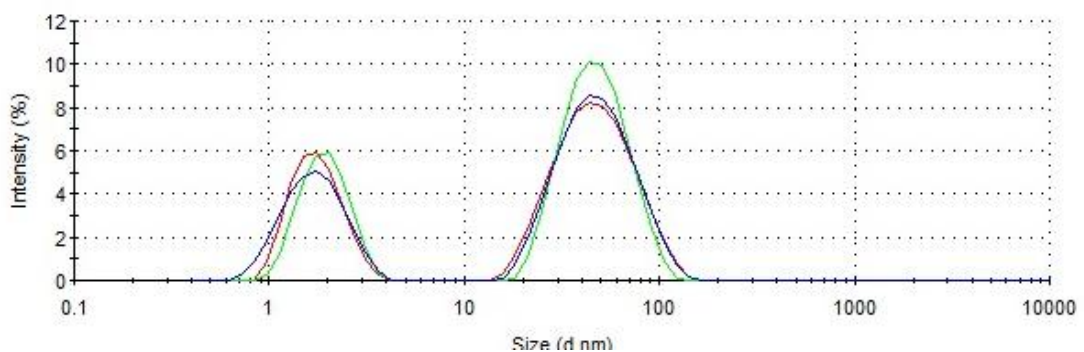


**Fig.3.2** Microfotografía de STEM de Nanobarras de oro estabilizadas con CTAB (NR-CTAB). El inserto muestra la relación de aspecto obtenida luego de analizar la morfología de un N° de 100 NR, obteniéndose una relación de aspecto mayoritaria de 4.

### 3.3 Caracterización de Nanobarras de oro por dispersión dinámica de la luz y potencial zeta

Otra técnica utilizada para la caracterización de los nanomateriales, corresponde a Dispersión Dinámica de la Luz. Esta se utilizó para caracterizar a las NR en solución, donde se determinó el diámetro hidrodinámico (Dh) de las partículas en suspensión mediante fluctuaciones de la luz dispersada por las nanopartículas coloidales.

Con esta técnica se espera tener resultados acordes con los obtenidos previamente mediante STEM. Se observa en la Figura 3.3 los resultados entregados por DLS de intensidad, donde aparecen dos poblaciones, una de aproximadamente 2 nm correspondiente a la zona transversal de la NR, y la segunda de aproximadamente 50 nm correspondiente a la dimensión longitudinal.



**Fig. 3.3** Distribución de tamaños en diámetro según porcentaje (%) de intensidad determinado mediante DLS para Nanobarras de oro estabilizadas con CTAB (NR-CTAB). Las mediciones se realizaron en triplicado, en medio acuoso a 25°C.



La señal de menor tamaño que se evidencia en la Figura 3.3, se puede atribuir también a la presencia de CTAB, el cual por su naturaleza anfipática, forma pequeñas micelas que interferirían en los datos entregados por DLS. [115]

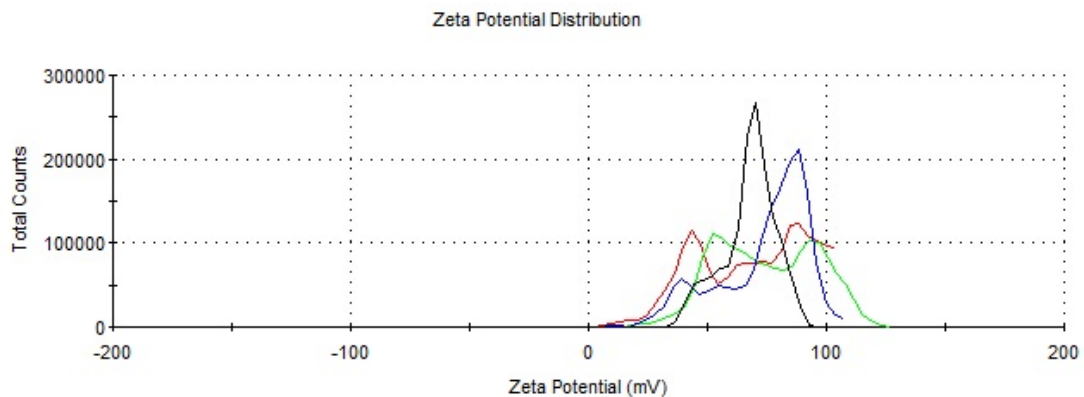
Al continuar con el análisis del valor de % de intensidad, el resultado obtenido para el segundo pico se debe a la dimensión longitudinal de las NR. Se observa que este es un valor de diámetro hidrodinámico mayor que el obtenido por STEM (40 nm v/s 50 nm). Esto se debe a que las NR en solución se mantienen rotando, y el equipo interpreta estos valores como un diámetro de una esfera equivalente, a pesar que es una varilla.

A este análisis se debe agregar la propuesta de Liu *et al* [116] quienes en su trabajo indican que esa señal observada entre 1 y 10 nm no es solo dada por el CTAB, sino que también puede atribuirse a la difusión rotacional de las NR en lugar de una dimensión real de las mismas, indicando que dicho valor puede estar comprendida entre 3-7 nm para NR de relación de aspecto que van desde 2,5 a 4.

Otra caracterización realizada a las NR-CTAB fue la determinación del potencial Z (pZ). Esta es una medida indirecta de la carga superficial, ya que se determina a través de la movilidad electroforética de la nanopartícula, y además es un valor que está relacionado con las propiedades en solución de los nanomateriales.

La estabilidad de este coloide está dada por su repulsión electrostática. Las NR-CTAB poseen un pZ positivo de +75 mV, el cual se evidencia en la Fig.3.4, ya

que se encuentran recubiertas con moléculas del surfactante catiónico CTAB, que posee un grupo amonio en un extremo. Los valores de pZ obtenido poseen una alta dispersión de datos, con una desviación estándar de aproximadamente 15 mV. Esto se debe principalmente a la alta concentración de CTAB presente en la solución, necesaria para mantener la estabilidad de las Nanobarras de oro.



**Fig. 3.4** Distribución de cargas de Nanobarras de oro estabilizadas con CTAB (NR-CTAB) en agua Milli-Q. Las mediciones se realizaron en cuadruplicado, en medio acuoso a 25°C .Índice de refracción de 1,332. Celda capilar plegada desechable (DTS1070).

El potencial zeta, al arrojar una medida cercana del potencial de superficie en solución, puede ser un indicador de modificación, ya que un cambio en la naturaleza del ligando de superficie llevará consigo un cambio en el pZ. Por lo tanto, este parámetro servirá de indicador para confirmar el cambio o modificación de los ligandos adsorbidos en las NR, en las diferentes etapas próximas.

*En esta tesis, el potencial Z es de utilidad en las etapas de modificación de la superficie, donde por un lado se busca desplazar el CTAB tóxico presente, y por otro modificarlas con moléculas que le confieran estabilidad estérica, y una nueva funcionalidad.*

### **3.4 Obtención y Caracterización de Nanobarras de oro estabilizadas con polietilenglicol (PEG)**

Una vez sintetizadas y caracterizadas las NR-CTAB, se procedió a modificar la superficie para hacerlas más biocompatibles, particularmente debido a que el estabilizante CTAB es un surfactante altamente tóxico. [117] Por esta razón, es necesario desplazar estas moléculas con otras que le den biocompatibilidad a las nanopartículas y a la vez que mantengan su estabilidad coloidal.

Las NR se modificaron con polietilenglicol (PEG), el cual es un poli-éter que se comporta como un material biocompatible y es altamente utilizado como ligando de superficie, principalmente porque se ha demostrado que aumenta el tiempo de circulación en sangre de nanopartículas [118] , y la disminución de la captación de estas por células del sistema reticuloendotelial, que conllevan a una acumulación en el tejido hepático [119], debido al impedimento de adsorción de proteínas séricas (formación corona de proteínas) u opsoninas.

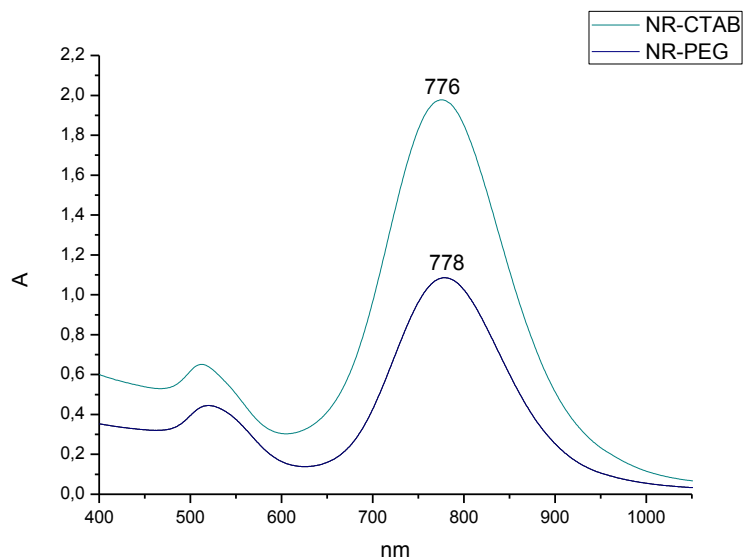
En esta tesis se utilizaron dos tipos de PEG tiolados, los cuales por medio del grupo tiol (-SH) en un extremo pueden quemisorberse en la superficie de la

nanopartícula de oro, formando un enlace pseudo-covalente[120]. Ambos PEG tienen un peso molecular de 5000 kDa, que es el que ha reportado las características mencionadas. [121, 122]

Uno de los tipos de PEG utilizados en esta tesis posee en su extremo terminal un grupo metoxi (HS-PEG-OMe). Su función es darle estabilidad estérica a la nanopartícula de oro, y además disminuir las interacciones con proteínas presentes en los medios biológicos. [123] El segundo PEG utilizado posee un grupo carboxílico en su extremo terminal (HS-PEG-COOH), el cual se utilizará posteriormente para unir péptidos mediante un enlace amida. [124] Este último, se utiliza en una mayor proporción, aumentando el número de moléculas peptídicas que puedan conjugarse a la NR.

Se realizó la reacción de conjugación de las NR con los PEG en una proporción de 1/6000(HS-PEG-OMe/ HS-PEG-COOH). Para esto en una primera etapa 50  $\mu$ l de una solución de SH-PEG-OMe 1 mM fue agregada a 10 ml de una suspensión de NR-CTAB 1 nM, y la solución se dejó reaccionar bajo agitación magnética durante 10 minutos. Las NR-PEG-OMe obtenidas fueron centrifugadas a 20800 g por 10 minutos y luego el sobrenadante fue descartado. El *pellet* fue resuspendido en 10 ml de agua mili Q. Posteriormente, se agregó a la suspensión de NR-PEG-OMe obtenida, 300  $\mu$ l de una solución de HS-PEG-COOH 1 mM y se dejó reaccionar durante una hora en agitación mecánica, resultando en una capa mixta de PEG-OMe y PEG-COOH sobre la superficie de NR (NR-PEG).

Luego de la conjugación con los PEG se produce un desplazamiento batocrómico de la banda de plasmón superficial debido a una modificación de la superficie metálica en la que se reemplazan las moléculas de CTAB por moléculas de PEG (Figura 3.5). Dicho desplazamiento se relaciona con un cambio en el índice de refracción en la nanopartícula. [125] La banda correspondiente al plasmón longitudinal de las NR-CTAB se encuentra en 776 y al ser funcionalizadas se desplaza hacia el infrarrojo cercano a 778 nm.

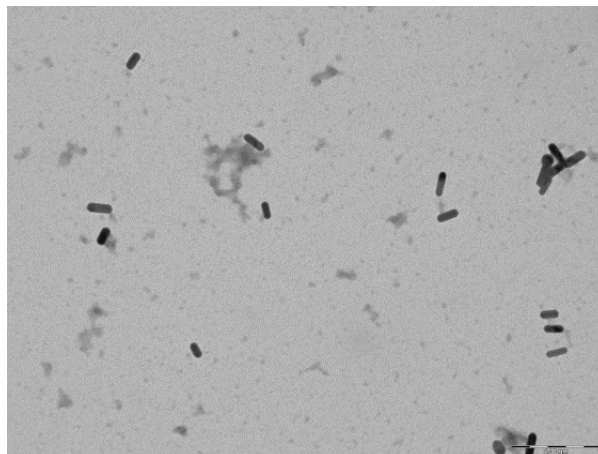


**Fig.3.5** Espectro de absorción molecular de NR-CTAB y NR-PEG. Barrido entre 400 y 1000 nm de longitud de onda. Absorbancia entre 0-2,2 A.

### 3.5 Caracterización de los conjugados de Nanobarras de oro estabilizados con Polietilenglicol, mediante Microscopia Electrónica de Transmisión

Al igual que para las NR-CTAB, una vez obtenidos los espectros de absorción y corroborada la conjugación, se realizaron imágenes TEM con el fin de evaluar que el corrimiento de la banda plasmónica no se relaciona con un crecimiento de las NP debido a posibles fenómenos de agregación.

En las Figuras 3.6 se observa que las NR se mantienen con un bajo grado de agregación. Asimismo, se puede observar que las NR-PEG mantienen su forma y tamaño.

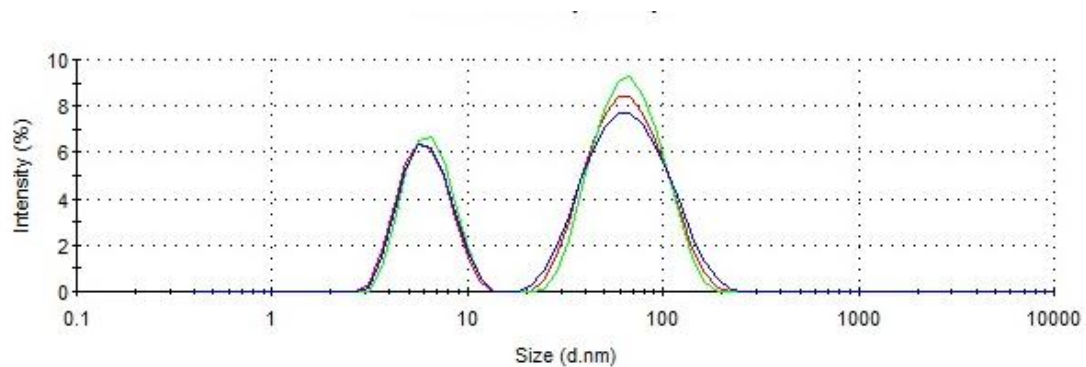


**Fig.3.6** Imágenes obtenidas por TEM de conjugados: Nanobarras de oro modificadas con Polietilenglicol (NR-PEG).

Continuando con el análisis, se evaluó el diámetro hidrodinámico, en donde se evidenció un aumento de dicho parámetro entre las NR-CTAB y las NR-PEG.

En la figura 3.7 se pueden apreciar dos picos correspondientes a NR-PEG, uno en 6.4 nm y el otro en 72 nm, a diferencia de las NR-CTAB donde las mismas señales daban en 2 y 51 nm.

Para ambos picos se observa un desplazamiento a la derecha, lo cual se relaciona con la modificación del tamaño debido a las moléculas de PEG quemisorbidas.

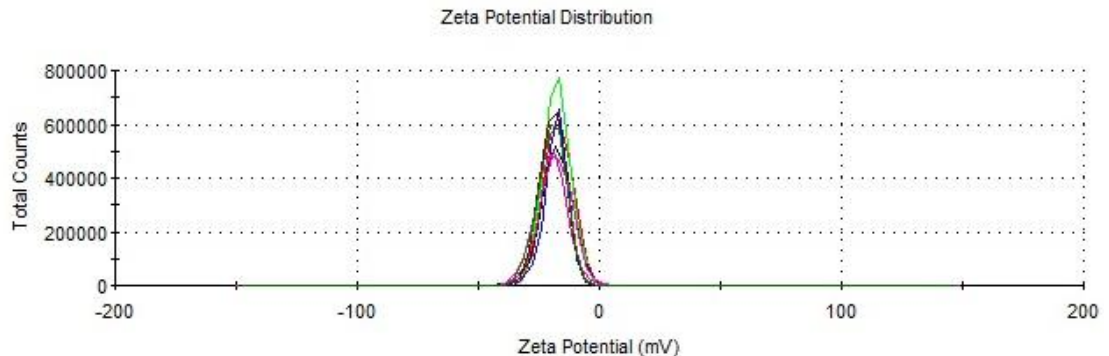


**Fig.3.7** Distribución de tamaños determinada mediante DLS de Nanobarras de oro modificadas con Polietilenglicol (NR-PEG). Las mediciones se realizaron en cuadruplicado, en medio acuoso a 25°C

Además del cambio en el  $D_h$ , se estudió el potencial de superficie, donde se esperaba un drástico cambio en dicho potencial debido a la carga negativa que posee uno de los PEG. En la figura 3.8 se observa la distribución de cargas para NR-PEG, donde hay una inversión de la carga de +75 a -19 mV, lo que confirma que gran parte del CTAB de carga positiva ha sido intercambiado por moléculas de PEG-COOH de carga negativa y PEG-OMe que no posee carga formal.

Como se puede observar en la Fig. 3.8, el pico de potencial Z para las Nanobarras modificadas con Polietilenglicol (NR-PEG), es mucho más definido

y reproducible en comparación con el pico de potencial Z obtenido en las NR con CTAB en su superficie (Fig.3.4), debido a la ausencia del surfactante catiónico.



**Fig.3.8** Distribución de cargas determinadas mediante pZ de Nanobarras modificadas con PEG. Mediciones realizada en medio acuoso a 25°C. Índice de refracción de 1,332. Celda capilar plegada desechable (DTS1070). Mediciones realizadas en triplicado.

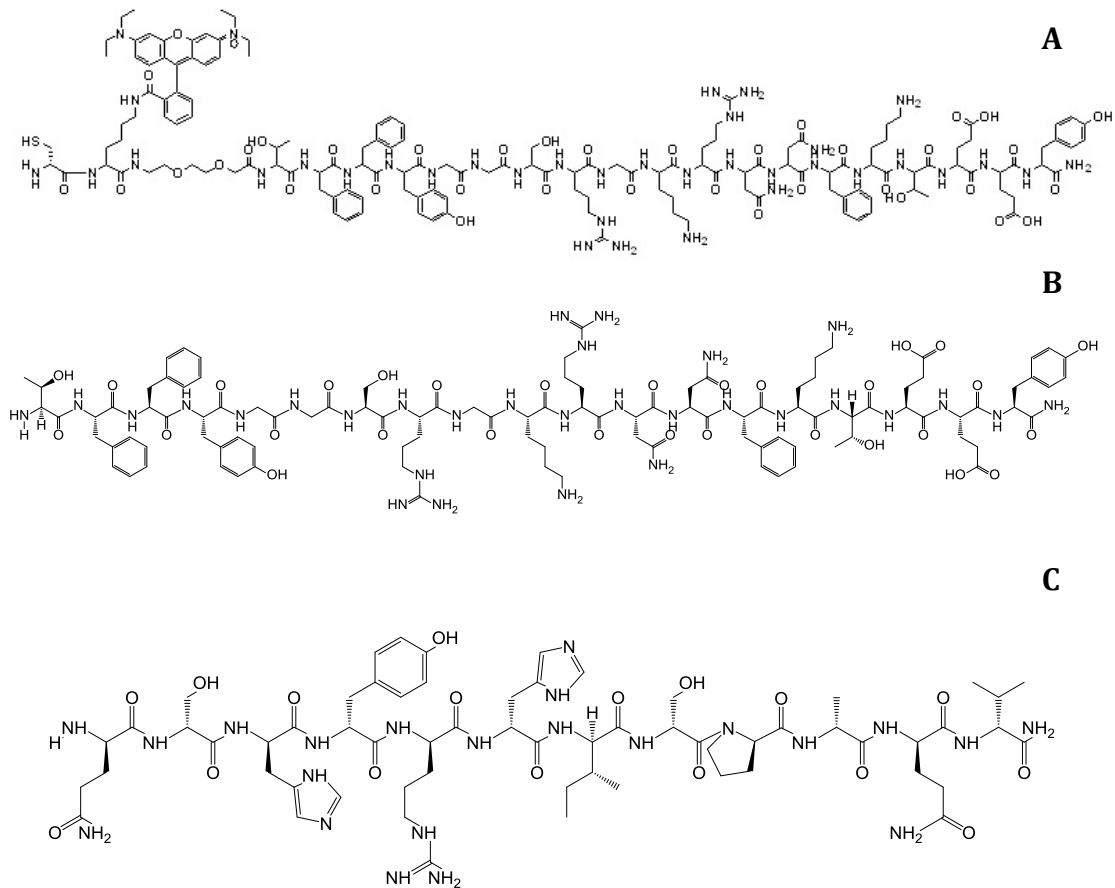
### 3.6 Obtención de péptidos Angiopep-2, Angiopep-2 (Rodamina) y D1

Según se ha descrito en esta tesis, se utilizarán dos péptidos funcionales, Angiopep-2 y D1. Como el objetivo de esta tesis es evaluar la llegada de las NR funcionalizadas con los péptidos, también se marcaron las nanoparticulas funcionalizadas con una sonda fluorescente que ayude a visualizar *ex vivo* su llegada al cerebro y también en cultivos celulares su internalización celular. Es por esto que se sintetizó el derivado de Angiopep-2 con una molécula de rodamina en su cadena lateral, unido a un residuo de lisina. Otra modificación importante que se realizó fue la presencia de un espaciador de PEG de 2



unidades para alejar la secuencia de Angiopep-2 de la rodamina y así no interferir con el reconocimiento del receptor, y en su extremo N-terminal se unió un residuo de cisteína (Fig.3.13 a).

Otra modificación importante que se realizó fue la presencia de un espaciador de PEG de 2 unidades y en su extremo N-terminal se unió un residuo de cisteína (Fig.3.13 a).

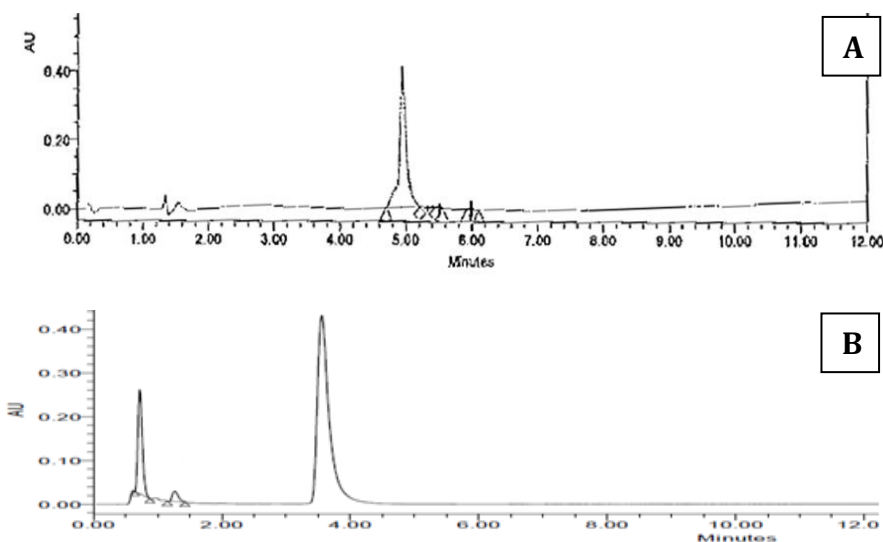


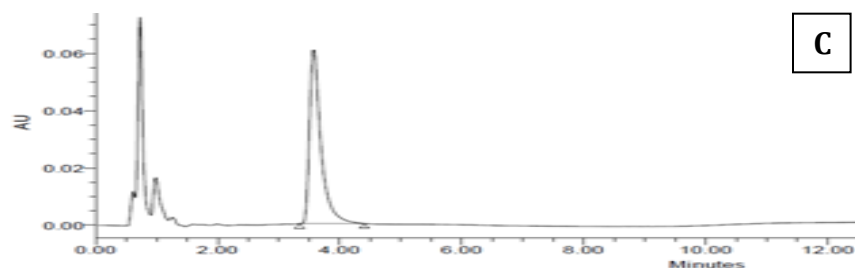
**Fig.3.13** A) Estructura de Angiopep-2(Rodamina): H-Cys-K(Rhodamine b)-Peg-TFFYGGSRGKRNNFKTEEY-NH<sub>2</sub>; B) Estructura de Angiopep-2: TFFYGGSRGKRNNFKTEEY-NH<sub>2</sub>; C) Estructura de péptido D1: qshyrhispaqv-NH<sub>2</sub>

La estructura original del péptido Angiopep-2 corresponde a la secuencia TFFYGGSRGKRNNFKTEEY, con una longitud de 19 aminoácidos y una carga neta de +3 (a pH=7.4) (Fig.3.13 b).

Por otro lado, la secuencia del péptido D1, constituido por péptidos de configuración d, posee la secuencia qshyrhispaqv con una carga neta de +2 (a pH=7.4) (Fig.3.13 c). Cabe destacar que los 3 péptidos fueron sintetizados con un grupo amida en lugar de un grupo carboxílico terminal.

Una vez obtenidos los péptidos según el protocolo experimental [65] estos fueron analizados mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para determinar el grado de pureza de los mismos. En los cromatogramas HPLC de los tres péptidos purificados, en los cuales se observa el tiempo de retención en la columna cromatográfica de todos los componentes de la muestra, en donde para todos los casos la pureza fue superior al 90% (Fig 3.14).





**Fig.3.14** Cromatogramas de péptidos Angiopep-2 y D1, luego de su síntesis en fase sólida, realizado en un gradiente 0% a 100% de B en A donde B: acetonitrilo y A: agua. Tiempo del gradiente: 12 minutos, flujo: 1,2 ml/minuto, columna C18 a temperatura ambiente, inyección 4  $\mu$ L.  $\lambda$  de detección 214 nm. A) Angiopep-2-Rodamina, B) Angiopep-2, C) D1

Asimismo, los péptidos obtenidos se caracterizaron por Espectrometría de masas por Electrospray, corroborándose la presencia de las correspondientes relaciones masa/carga para cada uno de los péptidos. La Tabla 3 resume las señales correspondientes a las masas obtenidas desde los corresponde espectros de masa de Angiopep-2, Angiopep-2(Rodamina) y D1.

**TABLA 3** Resumen de caracterización de péptidos sintetizados, donde se detalla peso molecular, pureza aproximada calculada por HPLC, y fragmentos de masa característicos

	Angiopep-2	Angiopep-2(Rodamina)	D1
Peso molecular	2.300.496	3102.50	1422.5
Pureza HPLC	92.01%	95.51%	90.51%

HPLC-MS*	(M+2H/2)= 1.151	(M+ 4H/4)+=776.47	(M+H/Z): 1423.95
	(M+3H/3)=767.6	(M+ 5H/5)+=621.33	(M+2H/2Z): 712.25
		(M+6H/6)+=518.04	

Los péptidos *Angiopep-2*, *Angiopep-2(Rodamina)* y *D1* fueron sintetizados exitosamente en fase sólida, utilizando resina Rink Amida. Esta última permitió la obtención por tanto de los péptidos con una amida C-terminal. Una vez obtenidos los péptidos según el protocolo experimental, estos fueron analizados mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para determinar el grado de pureza de los mismos, obteniéndose una pureza aproximada mayor al 90%.

En paralelo, se sintetizaron NR de relación de aspecto cercana a 4. Una vez caracterizados fisicoquímicamente, se realizó la conjugación con los péptidos previamente sintetizados.

Mediante seguimiento por DLS, STEM y pZ, se pudo ir monitorizando la modificación superficial de estas nanopartículas, llegando finalmente a valores esperables según la literatura.

### **3.7 Modificación de las Nanobarras de oro con péptidos funcionales:**

#### **Angiopep-2 y D1**

Posteriormente a la modificación de NR-CTAB con PEG, se volvieron a modificar finalmente con los dos péptidos, Angiopep-2 y D1, los cuales les otorgan a las nanopartículas la funcionalidad necesaria para una posible aplicación terapéutica en la enfermedad de Alzheimer (EA).

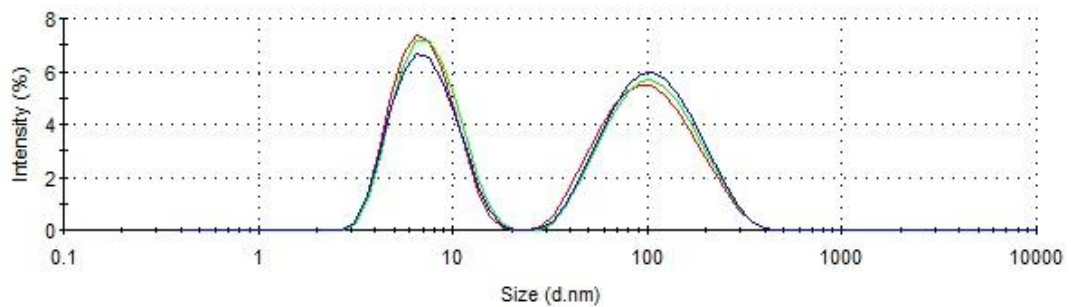
Uno de estos péptidos corresponde al péptido Angiopep-2 (TFFYGGSRGKRNNFKTEEY), el cual favorece el paso a través de la barrera hematoencefálica (BHE) mediante transcitosis mediada por receptores, particularmente mediante el receptor LRP1. [126-128]

Su función es primordial, ya que pensando en una aplicación terapéutica, es necesario que estas nanopartículas sean capaces de llegar al cerebro donde se desarrolla EA.

Una vez en el sistema nervioso central, es necesario que estas nanopartículas reconozcan específicamente el blanco terapéutico, el cual para la EA corresponden a los agregados del péptido  $A\beta$ , que se acumulan en medio extracelular. [129] Para este fin, el péptido D1 que posee la secuencia aminoacídica qshyrhispaqv, y se compone de aminoácidos de la serie D, tiene una alta afinidad por el péptido  $A\beta$ , y además debido a la configuración de sus aminoácidos es resistente a proteasas. [73, 130]

Ambos péptidos se acoplaron a las NR-PEG mediante la formación de un enlace amida entre su grupo amino terminal y el grupo carboxílico de los PEG-COOH presentes en la superficie.

Posterior a la modificación final de las NR-PEG con ambos péptidos, se procedió a caracterizar como en los casos anteriores, mediante DLS, espectroscopia de absorción molecular, microscopia electrónica de transmisión y pZ.



**Fig.3.9** Distribución de tamaños determinada mediante DLS de Nanobarras de oro modificadas con péptidos Angiopep-2 y D1 (NR-Angiopep-2/D). Las mediciones se realizaron por triplicado, en medio acuoso a 25°C

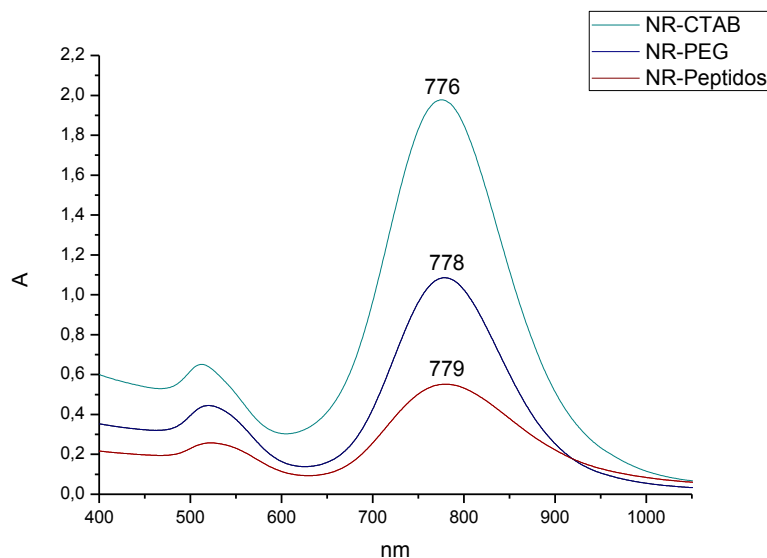
Los diámetros hidrodinámicos de las NR modificadas con ambos péptidos aumentan respecto al de las NR recubiertas con PEG, de 6 y 72 a 7 y 119 nm, respectivamente.

Esto se correlaciona con que las moléculas de péptido se encuentran recubriendo la partícula incrementando así el tamaño de las mismas. [131, 132]

Sin embargo, el tamaño de los péptidos es pequeño (aprox. 7nm) en comparación con el largo de las cadenas de PEG (aprox.30 nm), por lo que el

tamaño final obtenido puede deberse a la formación de multicapas de péptidos con PEG residual, en lugar de una monocapa.

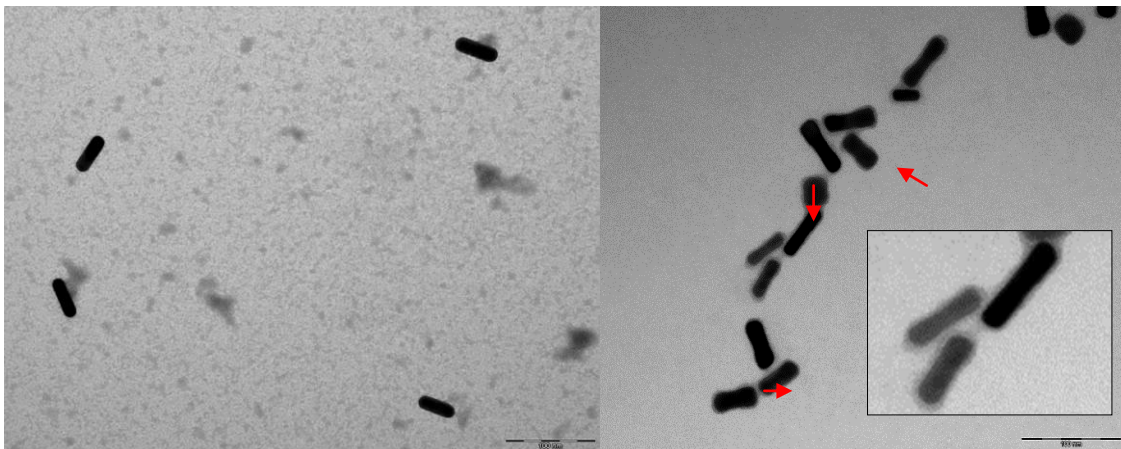
En la figura 3.11 se pueden observar las NR teñidas con acetato de uranilo. En estas imágenes podemos ver un tenue halo alrededor de la nanobarra modificada con ambos péptidos (aprox.0.7 nm), y la ausencia de este en las nanobarras estabilizadas con CTAB, lo cual daría cuenta de la modificación de la superficie con las moléculas orgánicas de polietilenglicol y ambos péptidos.



**Fig.3.10** Espectro de absorción molecular de Nanobarras de oro estabilizadas con CTAB (NR-CTAB), modificadas con Polietilenglicol (NR-PEG) y modificadas con péptidos Angiopep-2 y D1. NR-Angiopep-2/D1. Medición se realizó a temperatura ambiente.

El análisis mediante espectrofotometría de absorción molecular muestra que prácticamente no hay variaciones en el plasmón longitudinal luego de acoplar ambos péptidos a las cadenas de PEG-COOH, manteniéndose en alrededor de 778 nm (Fig.3.5).

Continuando con la correspondiente caracterización, también se midió el pZ para estas nanopartículas finales. En la figura 3.12 se observa la distribución de cargas para este sistema final, el cual nos muestra que el pZ está en torno a los -11 mV. Este potencial final es muy importante ya que es determinante en el comportamiento que tendrá la nanopartícula en los sistemas biológicos, pues es sabido que a mayor carga negativa, es mayor el reconocimiento por el RES. [133, 134]

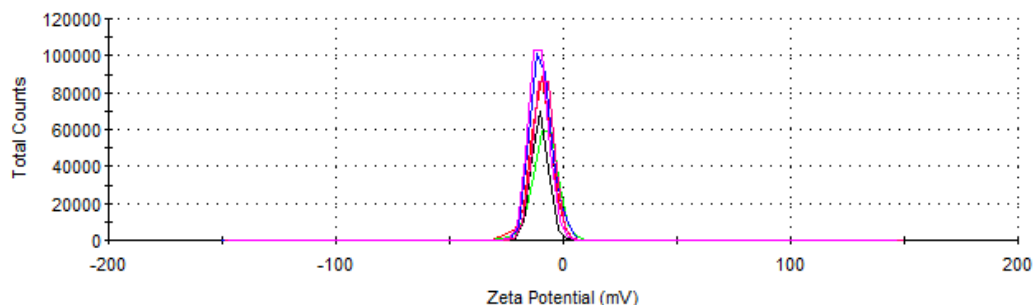


**Fig.3.11** Imágenes obtenidas por TEM de Nanobarras de oro modificadas con péptidos Angiopep-2 y D1,(NR-Angiopep-2/D1)(derecha), y Nanobarras de oro estabilizadas con CTAB(izquierda), ambas con tinción de acetato de uranilo 2%. Flechas rojas indican presencia de halo alrededor de nanobarras modificadas con ambos péptidos, lo que confirmaría la presencia de una modificación de superficie con moléculas orgánicas. En recuadro, una ampliación de parte la imagen, donde se observan con mejor definición el recubrimiento.

En comparación con las NR-PEG, puede observarse que hay un leve desplazamiento a valores menos negativos. Esto se puede explicar por la carga neta positiva de los péptidos (punto isoeléctrico 10.38 y 11.12 para Angiopep-2 y D1, respectivamente), y debido a la menor cantidad de grupos carboxílicos



expuestos en la superficie debido a la formación del enlace amida con los péptidos, lo que produce una reducción del valor absoluto de pZ de -19 a -10 mV.



**Fig.3.12** Distribución de cargas determinadas mediante pZ de Nanobarras de oro modificadas con péptidos Angiopep-2 y D1 (NR-Angiopep-2/D1). Las mediciones se realizaron en quintuplicado, en medio acuoso a 25°C

**Tabla 1: Datos obtenidos de Plasmón, DLS y pZ para la NR y sus conjugados\***

	UV-vis	$\lambda_{max}$ (nm)	DLS DH (nm)	DLS DH (nm)	PDI	pZ (mV)
NR-CTAB	517	776	2	51	0.6	+68
NR-PEG	518	778	6	72	0.5	-20
NR-PEG-Angio/D1	518	779	8	119	0.5	-11

\* En cada caso los datos fueron obtenidos a partir de 3 lotes de NR independientes; el pZ se entrega como promedio de 15 medidas para cada lote; en el caso del DLS, se entrega e valor dado por triplicado para cada lote. \*PDI: índice de polidispersidad.

El conocer el número de moléculas que se disponen sobre la superficie de una nanopartícula es crucial ya que este número se relaciona con la orientación de

las moléculas sobre la superficie de la nanopartícula, la cual es relevante para el reconocimiento de los receptores.[135] Para determinar la cantidad de moléculas de péptido por nanopartícula y para conocer la relación de péptidos unidos a la superficie (Angiopep-2/D1), se realizó un análisis de aminoácidos. Dicho análisis permite estimar la cantidad total de péptidos por NR, cuantificando un aminoácido particular presente y que sea diferente para cada péptido.

En primer lugar se sintetizó una cantidad de NR-Angiopep-2/D1, y sobre una alícuota (centrifugada) se realizó un análisis de aminoácidos (AAA) al *pellet*.

Para determinar la cantidad de D1 se identificó el aminoácido Valina, y para el péptido Angiopep-2 el aminoácido treonina ya que dichos aminoácidos se encuentran exclusivamente en los respectivos péptidos.

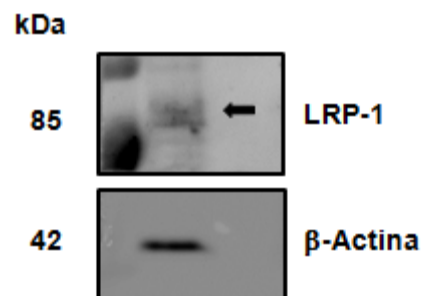
Por otra parte, a otra alícuota de la misma preparación de conjugado se le realizó un análisis de oro, por Activación neutrónica (AAN). Con esto se obtuvo la concentración molar de péptido y de la NpO, respectivamente. Finalmente, la razón entre ambas indica el número de moléculas de péptido/NR. De esta manera se pudo confirmar la presencia de los péptidos sobre la superficie de la NR, comprobando la correcta modificación de las nanopartículas. El número de péptidos por NR fue determinado por análisis de aminoácidos, obteniéndose  $439 \pm 23$  péptidos D1 y  $173 \pm 36$  péptidos Angiopep-2 por unidad de NR.

## **Capítulo 4: Evaluación de citotoxicidad e internalización celular de Nanobarras de Oro Modificadas, y su interacción con Péptido A $\beta$**

#### 4.1 Efectos sobre la viabilidad y la penetración celular de las Nanobarras modificadas

Como se postula en la introducción de esta tesis, las NR podrían ser un eficaz tratamiento para la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, para que esto llegue a concretarse es necesario pasar por rigurosas pruebas clínicas que garanticen la seguridad de estos nanomateriales para un futuro posible tratamiento en humanos. Es por eso que el paso siguiente a la síntesis y caracterización química, corresponde realizar los ensayos de citotoxicidad.

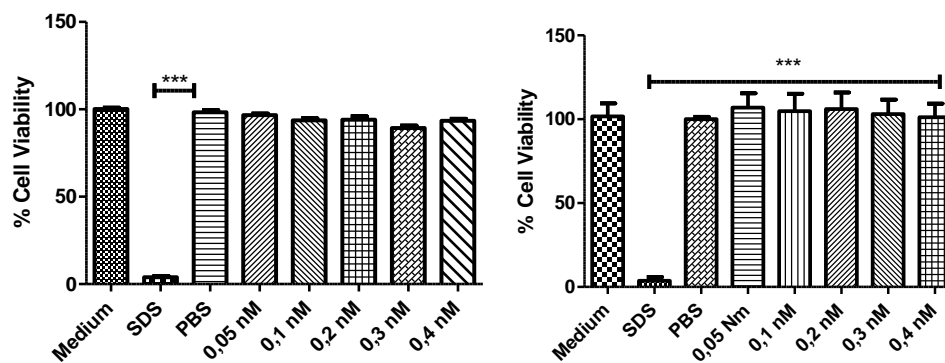
Por un lado se utilizó una línea celular endotelial neurovascular de cerebro de rata bEnd.3, y por el otro un cultivo primario de células endoteliales cerebrales microvasculares de rata RBMVEC. Ambos modelos celulares se caracterizan por su capacidad de incorporar lipoproteínas. Para bEnd.3 se ha reportado la presencia del receptor LRP-1, el cual es de nuestro interés [136]. Para el cultivo primario RBMVEC, debido a la poca claridad de su presencia en la literatura, se confirmó la expresión de dicho receptor mediante Western Blot (Fig.4.1).



**Figura 4.1** .WB que confirma presencia de receptor LRP-1 en células endoteliales. Se utilizó como control de carga la proteína beta-actina (banda inferior).

Para evaluar la citotoxicidad se realizó el ensayo MTS, con el fin de conocer los efectos sobre la viabilidad celular. Este ensayo mide la actividad mitocondrial, produciéndose un compuesto coloreado (formazán), el cual se correlaciona con la cantidad de células vivas.

Normalmente, las NR (estabilizadas con CTAB) son tóxicas a concentraciones mayores a 0,1 nM en líneas SH-SY5Y [114]. Esto se debe principalmente por la alta concentración de CTAB presente en las NR, el cual debido a su naturaleza anfipática tiene un efecto disruptor en las membranas células, produciendo lisis de estas. [47] Sin embargo, para el sistema propuesto en esta tesis (NR-Angiopep-2/D1), no se observó disminución (respecto al control) de la viabilidad celular para ninguna de las líneas celulares ensayadas (Fig 4.2), lo que puede relacionarse con la remoción de CTAB en las nanopartículas que conlleva a un aumento de las biocompatibilidad del sistema. Sin embargo, no puede asegurarse que se haya eliminado completamente.

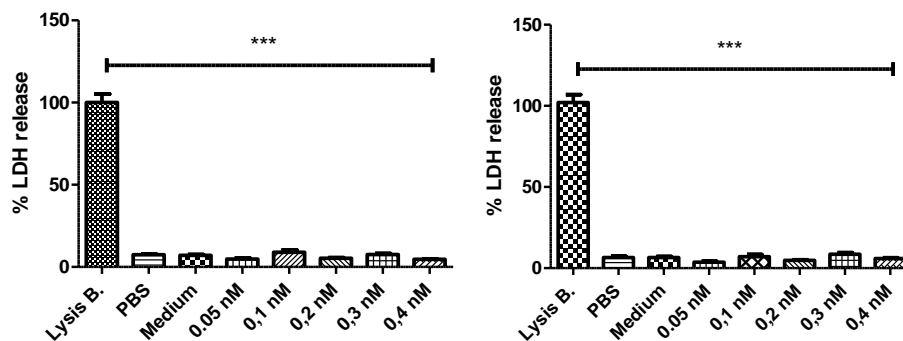


**Figura 4.2** Ensayo de viabilidad celular MTS, en línea celular endotelial de cerebro bEnd.3 (izquierda) y cultivo primario RBMVEC (derecha) .Se incubaron las células con Nanobarras de oro modificadas con péptidos Angiopep-2 y D1(NR-Angiopep-2/D1) a concentraciones 0,1, 0,2 y 0,4 nM, por 24 horas a 37°C.

El control medio correspondió a las células en el medio de cultivo y el control muerte a células incubadas con SDS 10%. Ensayos realizados por triplicado. \*\*\* P < 0,05, Kruskal-Wallis.

El ensayo de citotoxicidad en cultivo primario RBMVEC es buen modelo para evaluar toxicidad, debido a que al ser un cultivo primario no ha sufrido mutaciones ni modificaciones, y es menos resistente a citotóxicos en comparación a líneas celulares inmortalizadas o derivadas de células cancerígenas.

También se realizó un segundo ensayo para evaluar la citotoxicidad, donde se determinó la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH), la cual en condiciones normales solo se encuentra dentro de la célula, por lo cual su presencia se explica por una ruptura de la membrana, lo cual se relaciona con muerte celular. El control de viabilidad y del vehículo utilizado en el ensayo de LDH (Figura 4.3) son los mismos que los utilizados en el ensayo MTS, sin embargo, el control de muerte corresponde a la adición de un amortiguador de lisis (máxima liberación de LDH). Ambos ensayos se realizaron por triplicado con un n = 3.



**Figura 4.3.** Ensayo de viabilidad celular por medio de liberación de LDH bEnd.3 (izquierda) y RBMVEC (derecha). El tratamiento corresponde a Nanobarras de oro modificadas con Angiopep-2 y D1 (NR-

Angiopep-2/D1), a concentraciones de 0,05, 0,1, 0,2, 0,3 y 0,4 nM. Los experimentos fueron realizados en triplicado con un n = 3. \*\*\* P < 0,05, Kruskal-Wallis.

El análisis de ambos ensayos de citotoxicidad muestra que las NR-Angiopep-2/D1 no presentan citotoxicidad mediante necrosis o apoptosis en la línea celular bEnd.3 o en el cultivo primario de células RBMVEC, a las concentraciones ensayadas durante un periodo de tratamiento de 24 horas. Lo anterior se puede observar debido a que no existen diferencias significativas entre el control de viabilidad y las muestras estudiadas, tanto en el ensayo de MTS y LDH, existiendo diferencia significativa solo con el control de muerte (SDS) en ambos ensayos.

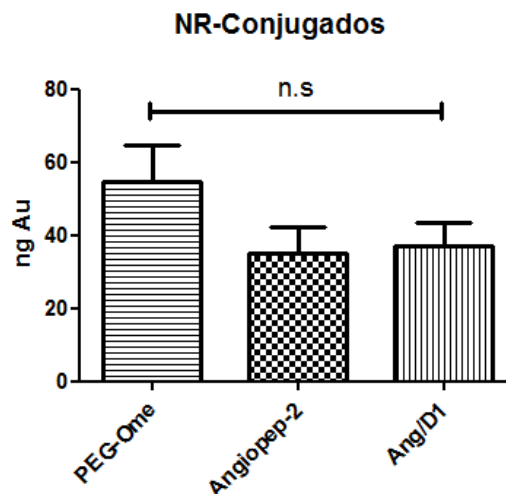
Luego de haber evaluado la citotoxicidad de NR-Angiopep-2/D1, se ensayó la capacidad del conjugado para penetrar células endoteliales microvasculares pertenecientes al cultivo primario celular RBMVEC, a través de cuantificación de Au por activación neutrónica. Esta capacidad de internalización en dichas células es clave ya que el primer paso *in vivo* para el cruce de la barrera hematoencefalica implica una endocitosis en las células endoteliales de dicha barrera.

Se ensayó en dicho cultivo primario debido a que como se ha discutido en esta tesis, la presencia del péptido Angiopep-2 serviría de lanzadera a través de la BHE para llegar al SNC, y como se describió previamente, RBMVEC expresan el receptor LRP1 que es reconocido por el péptido Angiopep-2. Por esto, es que

la internalización celular se probó en células endoteliales microvasculares de rata, como un pre-modelo de BHE.

En la figura 4.4 se muestra la incorporación de oro en células RBMVEC a las 24 h, expuestas a una concentración de 0,4 nM de NR-Angiopep-2/D1. Los datos obtenidos fueron graficados como cantidad de oro ( $\mu\text{g}$ ) v/s tratamiento.

El número de células por pocillo fue de 60000 y la determinación de oro fue realizada por activación neutrónica en la Comisión Chilena de Energía Nuclear (CCHEN) a partir de los extractos liofilizados de estas.



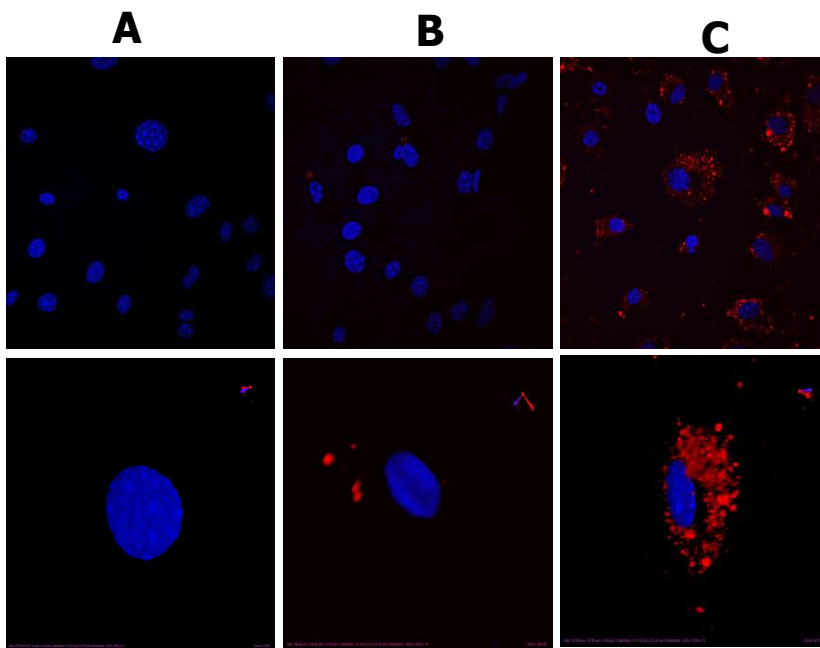
**Figura 4.4.** Gráfico de barras de la incorporación de oro en células RBMVEC incubadas con Nanobarras de oro modificadas con Polietilenglicol (NR-PEG-OMe), Nanobarras de oro modificadas con péptido Angiopep-2 (NR-Angiopep-2), NR-Angiopep-2/D1, al tiempo 24 h. Para todas las nanopartículas se utilizó una concentración de 0,4 nM. Ensayo realizado por triplicado.



En la figura 4.4 se observa que existe una internalización de NR en las condiciones ensayadas, sin diferencia significativa entre los distintos tratamientos al tiempo ensayado. En promedio, aproximadamente un 20% de lo entregado es internalizado por las células en las condiciones ensayadas.

Si bien este ensayo es un indicativo de internalización, también puede estar dando cuenta de otro fenómeno, por ejemplo de adsorción en la superficie celular.

Para evaluar la internalización celular, se realizó un ensayo en donde las NR se marcaron con Angiopep-2(Rodamina), la cual es fluorescente. Con esto se confirmó la internalización celular mediante microscopía de fluorescencia en células bEnd.3, en las mismas condiciones del experimento con las células RBMVEC (24 h a 0,4 nM) (Fig.4.5). Se puede observar de la presencia de la marca fluorescente (en rojo) a las 24 horas en el mismo plano del núcleo celular (en azul), de la reconstrucción 3D realizada en las imágenes inferiores, lo que confirmaría su presencia en el citoplasma de las células. Cabe destacar que la cuantificación de la internalización en esta línea celular ha sido ya estudiada en nuestro laboratorio (*Tesis Francisco Morales-Zavala 2016*), donde se observa un comportamiento similar al del cultivo primario RBMVEC.



**Fig.4.5** Imagen de microscopia confocal de células bEnd.3 incubadas con Nanobarras de oro modificadas con péptido Angiopep-2(Rodamina) (NR-Angiopep-2 (Rodamina), [0,4 nM].A) Control (no hay señal), B) 2 horas incubación con tratamiento (señal fluorescente roja), C) 24 horas incubación con tratamiento (señal fluorescente roja). El núcleo fue teñido con Hoechst (azul). La fila debajo muestra una sola célula representativa en 3-dimensiones, lo que demuestra una localización intracelular para NR-Angiopep-2(Rodamina).

Encontrar las NR-Angiopep-2 dentro de la células resulta coherente con la estrategia de usar Angiopep-2 para dirigir la nanopartícula, ya que como se ha mencionado Angiopep-2 es reconocido por LRP1 y se ha descrito que la endocitosis mediada por el receptor LRP1 lleva a la internalización celular. En la tesis de laboratorio de Francisco Morales, se describe la presencia de nanopartículas en cuerpos multivesiculares, lo cual se condice con lo observado mediante la microscopia confocal de fluorescencia.[137]

## **4.2 Evaluar el efecto de las Nanobarras de oro modificadas (NR- Angiopep-2/D1) sobre los agregados de A $\beta$ *in vitro***

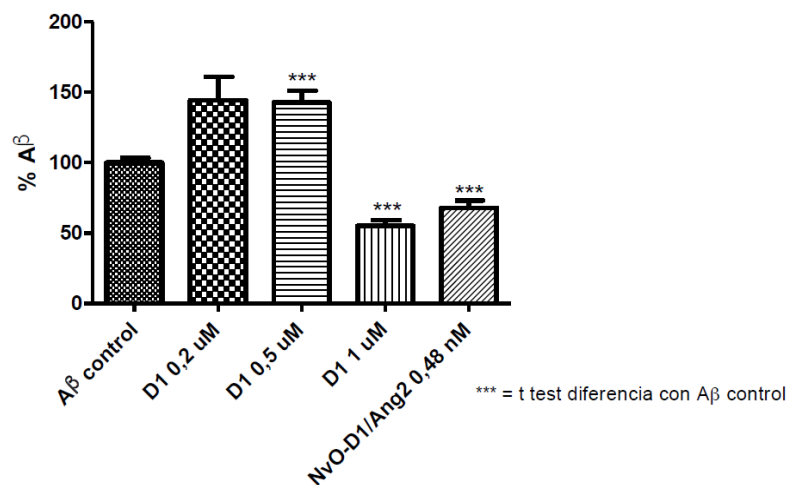
Con el fin de evaluar el efecto de las NR-Angiopep-2/D1 sobre el crecimiento de las fibras de A $\beta$  *in vitro*, estas se incubaron con las nanopartículas. La formación de las fibras fue evaluada mediante el ensayo de fluorescencia de Thioflavina T (ThT), que es un compuesto que se une a las fibras incrementando la señal de fluorescencia, por lo que la cantidad de fibras amiloides en suspensión puede ser cuantificado por la intensidad de la señal fluorescente, la cual es proporcional a la cantidad o largo e las fibras que se forman. [114]

La figura 4.6 muestra el porcentaje de intensidad de fluorescencia de las muestras tratadas con NR-Angiopep-2/D1 y el péptido D1, con respecto al grupo control el cual es el 100%.

Se observa una inhibición en la formación de fibras con el tratamiento de NR-Angiopep-2/D1 con una inhibición cercana al 40%. Para este ensayo también se probaron tres concentraciones del péptido D1 (0,2, 0,5 y 1  $\mu$ M) y tomando en cuenta el número de moléculas de D1 por NR la concentración equivalente de D1 en la muestra de NR-Angiopep-2/D1 es 0,2  $\mu$ M. La concentración final del péptido A $\beta$  para los ensayos fue 20  $\mu$ M siendo importante mencionar que para este ensayo las relaciones molares de D1/A $\beta$  fueron 0.01/1, 0.025/1 y 0.05/1 para las concentraciones 0,2, 0.5 y 1  $\mu$ M, respectivamente.

La mencionada relación es muy relevante para entender los efectos sobre el crecimiento de las fibras de A $\beta$ . [138]

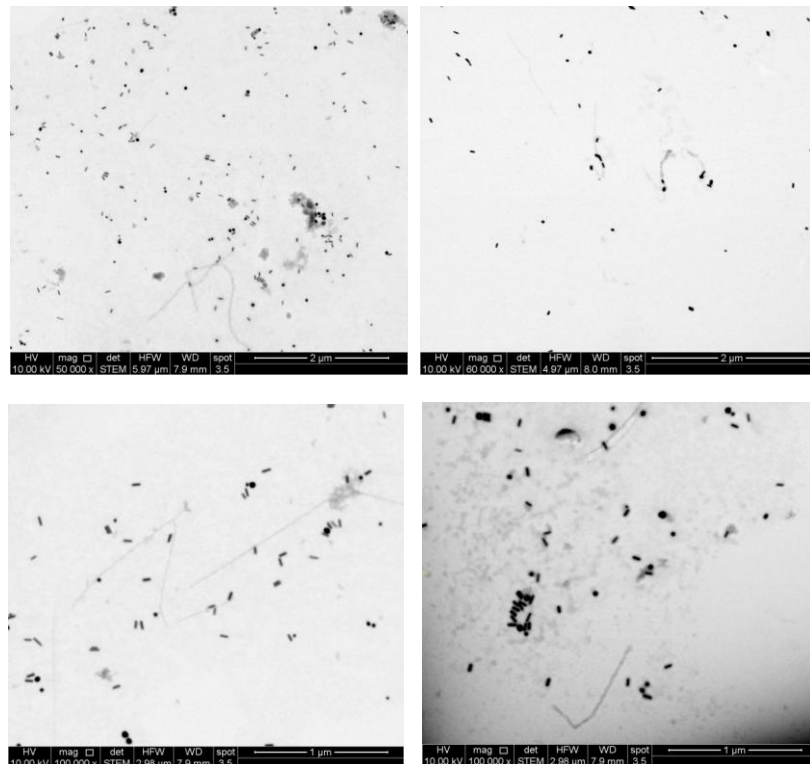
Para las muestras tratadas con el péptido D1 se observan diferentes comportamientos. Para la concentración 1  $\mu$ M se observa una inhibición en el crecimiento de las fibras cercana al 50%, pero a menores concentraciones del péptido D1 se observa un aumento en la intensidad de la fluorescencia cercana al 30%.



**Figura 4.6** Resultados del ensayo de ThT. Intensidad de la señal fluorescente de las muestras de fibras de A $\beta$  en presencia de Nanobarras de oro modificadas con péptidos Angiopep-2 y D1 (NR-Angiopep-2/D1) y el péptido D1. Los resultados son expresados como porcentaje con respecto al A $\beta$  control. Ensayo realizado por triplicado. \*\*\* t test diferencia con A $\beta$  control.

Además se realizó microscopía electrónica de barrido en modo STEM de las fibras incubadas con NR-Angiopep-2/D1 con el fin de evaluar si al final del proceso de crecimiento de las fibras, éstas se encontraban interactuando con

las nanopartículas. En la figura 4.7 se observa la presencia de NR en zonas donde aparecen fibras formadas.

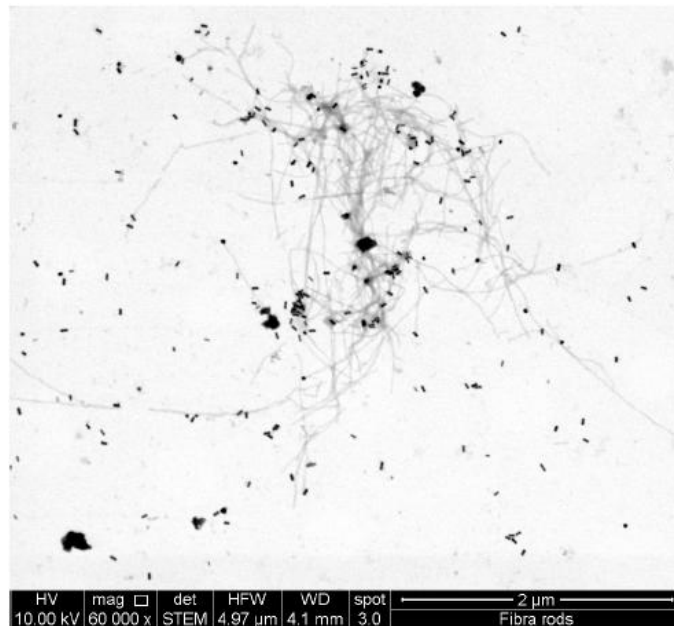


**Figura 4.7** Imagen de microscopía electrónica de transmisión de fibras de A $\beta$  incubadas con Nanobarras de oro modificadas con péptido Angiopep-2 y D1 (NR-Angiopep-2/D1) durante su proceso de formación de fibras

Se observa en las imágenes de la figura 4.7 que hay pocas fibras largas, y mayoritariamente pequeños fragmentos de fibras, los cuales se encuentran interactuando con las NR.

Sin embargo, para un posible tratamiento es necesario determinar si existe reconocimiento y unión de las NR a las fibras A $\beta$  ya formadas. Es por esto que

se evaluó mediante STEM la interacción de fibras ya crecidas con el sistema NR-Angiopep-2/D1. Esto realizó mediante crecimiento de fibras y posterior adición del tratamiento a la suspensión. Se evidencia en la imagen de la figura 4.8 la unión de las NR-Angiopep-2/D1 con las fibras amiloides.



**Figura 4.8** Imagen de microscopía electrónica de transmisión de fibras de A $\beta$  incubadas con Nanobarras modificadas (NR-Angiopep-2/D1) posterior a su proceso de formación (extraído de tesis de Francisco Morales 2016)

*En resumen, una vez obtenidos los conjugados de NR y los respectivos péptidos, se procedió a ensayar su citotoxicidad, con el fin de conocer su biocompatibilidad.*

*Los ensayos realizados para esto, MTS y liberación de LDH, dan prueba de su baja toxicidad celular, lo que hace de estos sistemas, interesantes candidatos para seguir con ensayos de avalen su seguridad. Posteriormente, se comprobó*

*la capacidad del conjugado de poder ingresar a las células a través del receptor LRP-1, mediante la participación del péptido Angiopep-2.*

*Por otra parte, se ensayó la capacidad de reconocer las fibras A $\beta$ , las cuales serían el blanco de interés en una futura terapia. Se pudo comprobar mediante su interacción y afinidad de estos conjugados con las fibras incubadas, y mediante ensayos de tioflavina la capacidad de inhibir la formación de fibras en un 40%.*

## **Capítulo 5: Farmacocinética y Distribución de Nanobarras de oro modificadas (NR-Angiopep-2/D1) en modelo animal**



## 5.1 Farmacocinética de NR-Angiopep-2/D1

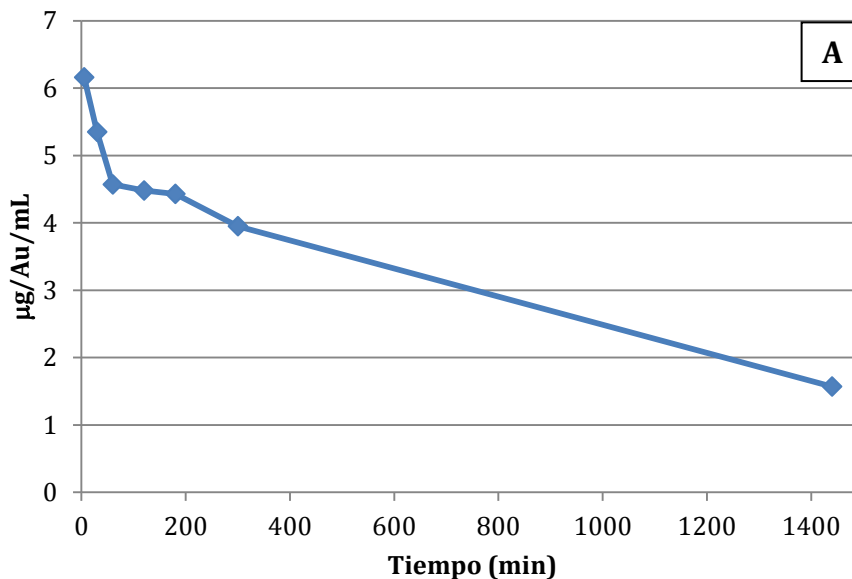
La farmacocinética es la expresión, en términos cuantitativos, de los principales procesos que experimentan los medicamentos luego de su administración al organismo. Se caracteriza por el proceso A.D.M.E (Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción).

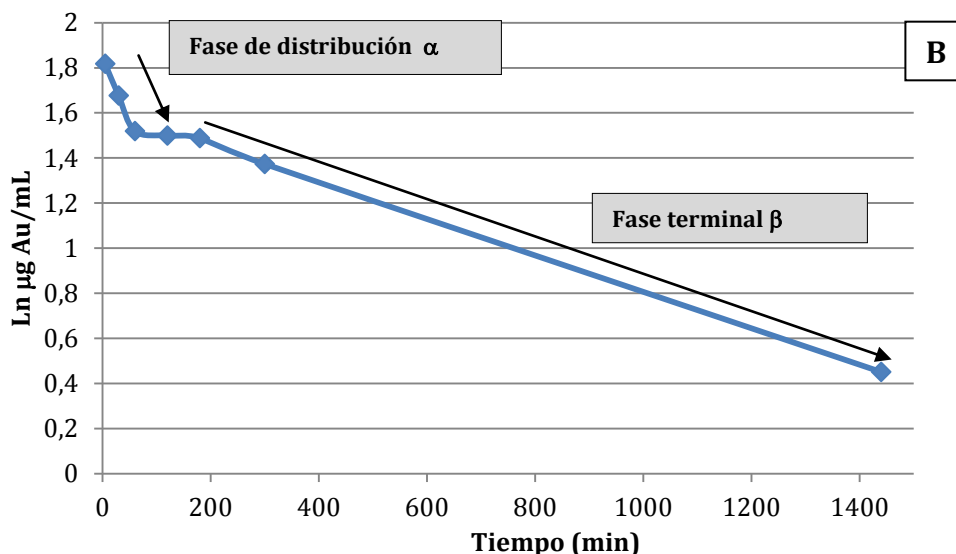
Debido a las ventajas que presentan las nanopartículas de oro, como la capacidad para atravesar las barreras biológicas para alcanzar el órgano, tejido o grupo celular diana donde la molécula debe ejercer su acción, estas pueden alcanzar compartimentos extra e intracelulares. Por lo anterior es necesario determinar y analizar los parámetros farmacocinéticos, para que posteriormente con estos datos obtenidos se puedan diseñar estudios en la fase preclínica y eventualmente se pueda escalar a fase clínica con el fin de realizar ajustes de dosis.

Por lo tanto, con el fin de conocer el comportamiento de las NR al ingresar al organismo se realizó un estudio farmacocinético, con el cual pudimos conocer diversos parámetros relevantes para cualquier agente terapéutico.

Su importancia radica en que la llegada de NR al cerebro y su farmacocinética en general se ven afectadas por diferentes factores como la interacción con proteínas del plasma, la captación por el sistema fagocítico mononuclear (SFM), la estabilidad de los coloides, la captación por otros órganos y la dificultad de atravesar la BHE.

Para la realización de este estudio se administraron NR-modificadas, mediante un bolus intravenoso por la vena de la cola de ratas Sprague-Dawley, y se tomaron muestras de sangre a los tiempos 5, 30, 60, 120, 180, 300, 1440 minutos. Posteriormente fueron analizadas mediante activación neutrónica con el fin de determinar la concentración de oro presente en sangre a través del tiempo. Hay que destacar que las muestras analizadas fueron sangre y no plasma. Esto debido a que no se encontró diferencia significativa en la medición de una concentración de oro conocida en sangre y luego en su mismo plasma. En la Fig. 5.1 A) se detalla la curva de concentración de oro en el tiempo, donde puede observarse la disminución progresiva en la concentración sanguínea de NR en función del tiempo. La última determinación de oro se realizó a las 24 horas posteriores a la administración.





**Fig.5.1** Curvas farmacocinética de bolus I.V. de Nanobarras modificadas con péptidos Angiopep-2 y D1 (NR-Angiopep-2/D1) hasta las 24 h. A) Curva de concentración sangre v/s tiempo B) Representación en escala logarítmica de Curva mencionada en A. Las flechas indican el cambio de pendiente en la curva. Modelo de 2 compartimentos. Mediciones realizadas por triplicado.

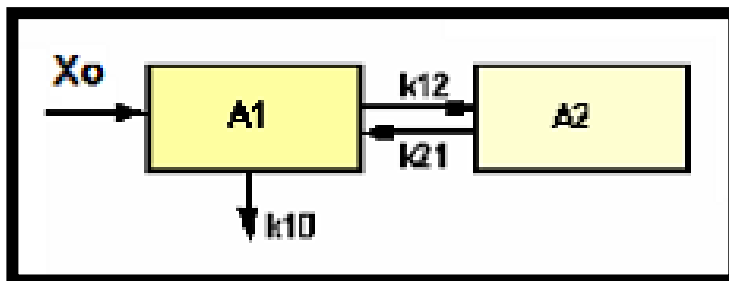
Para realizar el análisis de datos, y estudiar a qué modelo compartimental se ajusta la curva, se procedió a linealizar los valores obtenidos, obteniéndose la curva que se muestra en la Fig. 5.1 B). Observando a simple vista esta última figura, se evidencia que los datos se ajustan a un modelo de dos compartimentos (2C), debido a que se evidencia la existencia de dos fases de la curva de niveles plasmáticos, por lo que podemos decir que las NR se comportan como bicompartimental.

En el modelo de 2C, posteriormente al ingreso por circulación sistémica, se requiere de un tiempo para distribuirse en todo el cuerpo. Primero se puede identificar una Fase de distribución o disposición ( $\alpha$ ), en la cual las

concentraciones de NR en la sangre disminuyen más rápidamente que en la fase posterior a la distribución, lo cual correspondería a la primera recta en la Fig.5.1 B.

En esta primera etapa, las NR se distribuyen en un Compartimento central, el cual incluiría órganos y tejidos altamente irrigados, y posteriormente de una manera más lenta se equilibraría en forma más lenta con el Compartimento periférico (Fig5.1.2). El paso de la NR al este último compartimento dependerá del grado de irrigación que posea el tejido y de las características físico-químicas.

En todo el proceso, está presente la eliminación desde el compartimento central ( $k_{10}$ ), el cual predomina después de la fase de distribución.



**Fig 5.1.2** Esquema del Modelo de dos compartimentos, donde  $X_0$  corresponde a la dosis administrada mediante el bolus IV, el cual se distribuye en una primera etapa rápida en un compartimento central (A1), y posteriormente alcanza un equilibrio con un compartimento periférico (A2), donde  $k_{12}$  y  $k_{21}$  corresponden a las constantes de velocidad de distribución intercompartimentales.  $k_{10}$  se define como la constante de velocidad de eliminación de primer orden desde el compartimento central.

Al tratarse de una curva biexponencial, nuestro análisis comenzó por la fase terminal de la curva, y luego se procedió a calcular las concentraciones extrapoladas a partir de la misma.

Para determinar las concentraciones residuales, se restaron las concentraciones extrapoladas de la fase terminal ( $\beta$ ) a las plasmáticas detectadas en los primeros tiempos. En la Fig.5.1 B) puede observarse que los últimos 4 puntos (entre 300 y 1440 minutos) forman una línea recta que representa la fase de disposición lenta (fase  $\beta$ ), mientras que los cuatro primeros representan la fase de distribución rápida (fase  $\alpha$ ).

En una primera etapa se procedió a calcular la recta de regresión para los últimos puntos, y se obtuvieron los siguientes resultados de la recta obtenida para la de disposición lenta (Fig.5.1.3 A).

Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

**Datos plasmáticos de últimos cuatro puntos de curva**

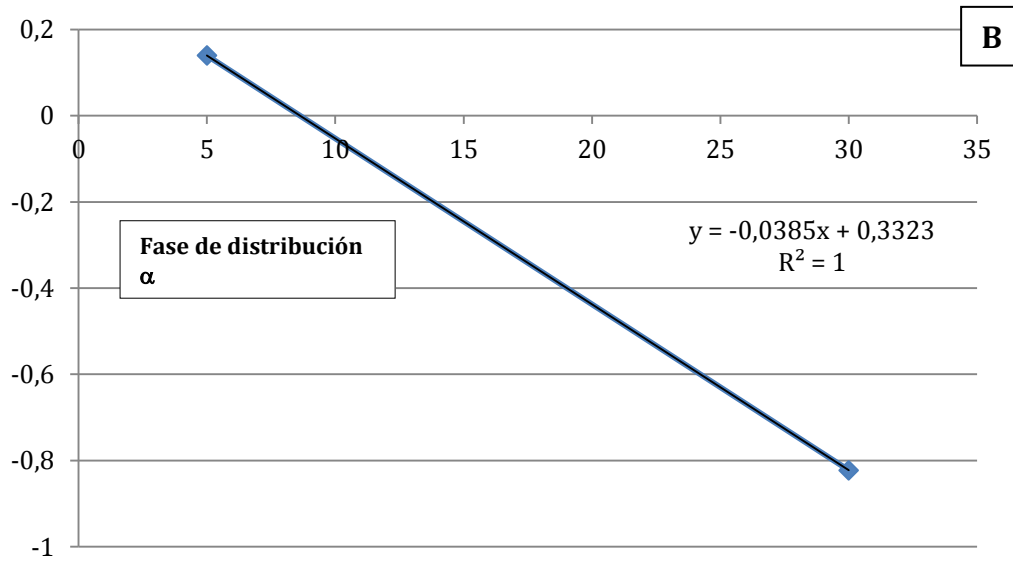
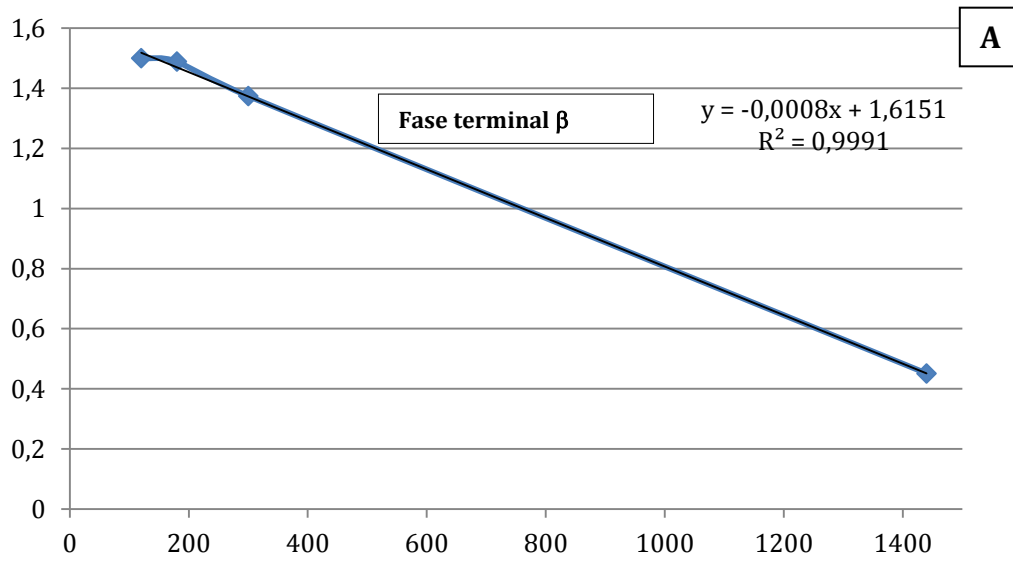
tiempo (min)	$\mu\text{g Au/mL}$ sangre	$\ln C$
120	4,48	1,49962305
180	4,43	1,48839958
300	3,95	1,37371558
1440	1,57	0,45107562

### Ecuación de la recta de los datos plasmáticos

$$y = -0,0008x + 1,6151$$

Beta	0,0008	min <sup>-1</sup>
B	5,02839074	μg/ml

$$R^2 = 0,9991$$



**Fig.5.1.3.** Regresiones lineales para últimos puntos de fase terminal  $\alpha$  (A), y de Fase de distribución  $\beta$  para los primeros puntos (B)

Una vez determinada la ecuación de la recta para estos puntos, se utilizó el método de los residuales para resolver la fase de disposición rápida o distribución ( $\alpha$ ), donde se con la ecuación de la recta obtenida para la fase terminal ( $\beta$ ) calculamos la concentración extrapolada para los primeros puntos de la curva de datos. Posteriormente, calculamos la concentración residual como la resta entre la concentración de la curva y la concentración extrapolada. Obtenidos estos datos, se procede a calcular la recta de regresión para estos puntos residuales (Fig5.1.3 B), con lo cual se obtuvo la siguiente ecuación:

tiempo (min)	$\mu\text{g}$ Au/mL sangre	ln C	Cres	Ln Cres
5	6,16	1,81807678	1,15	0,13983134
30	5,35	1,67709656	0,44	-0,8226117

$$y = -0,0385x + 0,3323$$

$$R^2 = 1$$

Alfa	-0,0385
A	1,39417104

Con los datos determinados, la ecuación que define el modelo farmacocinético para NR-modificadas es la siguiente:

$$C = A \times e^{-\alpha t} + B \times e^{-\beta t}$$

$$C = 1,39 \times e^{-0,0385t} + 5,03 \times e^{-0,0008t}$$

A partir de estos resultados, se calcularon los parámetros farmacocinéticos para las NR-modificadas:

ABC	6323,6039	μg*min/ml	
Co	6,42	μg/ml	
Vcentral	12,46	ml	Dosis/A+B
Vd area	15,81	ml	Dosis/β*ABC
Vdss	15,73	ml	Vc +V periférico
Vperiferico	3,26	ml	
k21	0,0303	min-1	1,8203 h-1
k10	0,0010	min-1	0,0609 h-1
k12	0,0079	min-1	0,4768 h-1
Cl	0,01265	ml/min	Vd area*Beta
t1/2	14,4	h	0,693/β



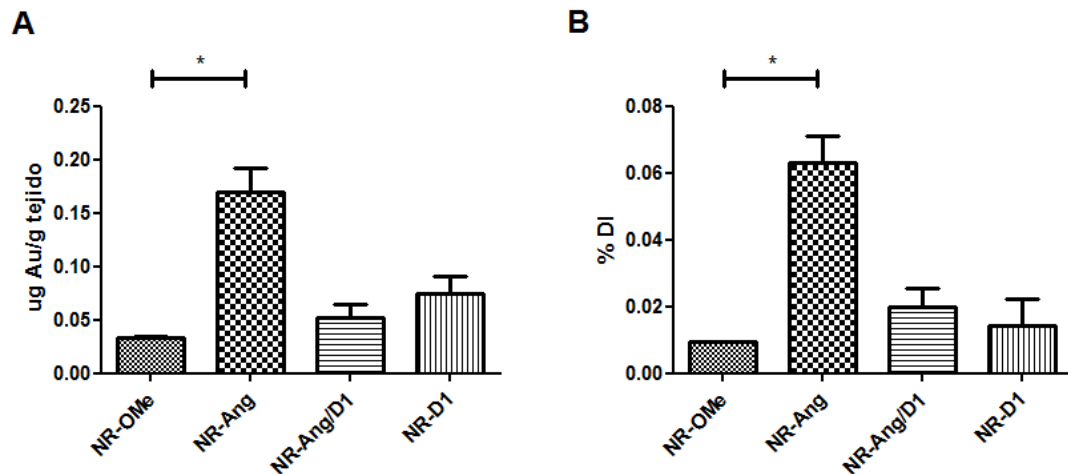
## 5.2 Distribución de NR-Angiopep-2/D1

Para evaluar el paso a través de la BHE se evaluó la llegada de las nanopartículas al cerebro en modelo animal de rata *Sprague Dawley*

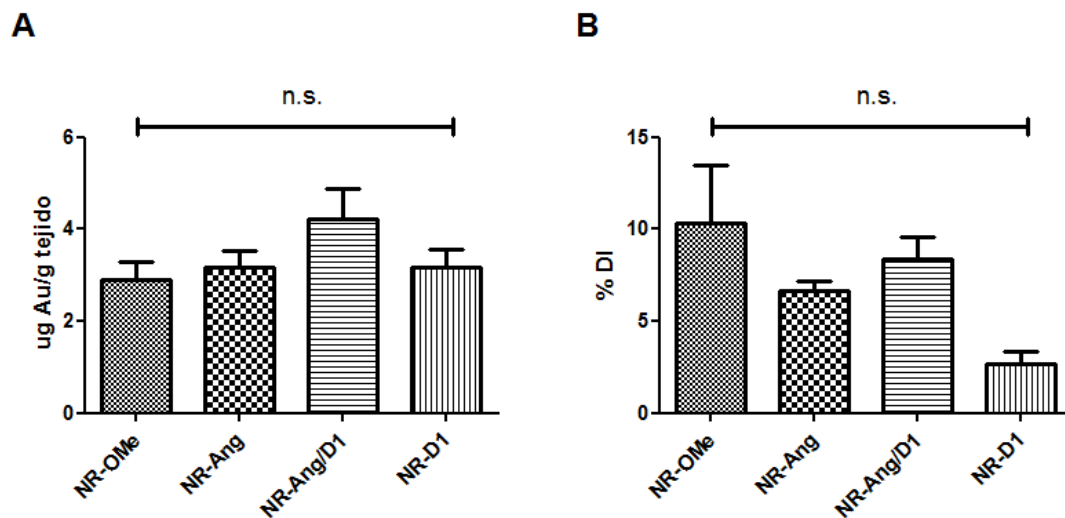
Para esto se administró por vía intravenosa (vena de la cola) 200  $\mu$ l de una suspensión de NR-Angiopep-2/D1 a una concentración 10 nM. Pasados 90 minutos, se anestesió al animal para posteriormente perfundirlo con el objetivo de eliminar la sangre residual y cuantificar el oro en cerebro e hígado mediante activación neutrónica. Luego se procedió a calcular el porcentaje de la dosis que llega a éstos órganos. El control utilizado para la llegada fue NR-PEG.

En la figura 5.2 se gráfica el porcentaje de la dosis que llega al cerebro para el grupo experimental NR-Angiopep-2/D1, NR-Angiopep-2, NR-D1 y el control NR-PEG. Para el primer grupo se observa un porcentaje de aproximadamente 0,2. Para el caso de nanopartículas recubiertas solamente con Angiopep-2, observamos que este porcentaje aumenta 3 veces, llegando a 0,6%. Esta tendencia, a pesar de no tener diferencias significativas, es esperable debido a que se conoce la capacidad de Angiopep-2 como lanzadera a través de la BHE, por lo que se esperaría que a mayor cantidad de este péptido en la superficie, mayor sea la llegada al cerebro debido a la mayor disposición para ser reconocido por los receptores LRP-1. Por otra parte, se evidencia la diferencia significativa observada correspondiente a NR-PEG comparada con NR-Angiopep-2, donde el porcentaje de la dosis aumenta aproximadamente de 0,01

a 0,06, lo que es esperable por la funcionalidad de este péptido para ser reconocido por receptores de la BHE.



**Fig. 5.2** Comparación de llegada a cerebro de Nanobarras con distintas modificaciones. B) Porcentaje de la dosis que llega a cerebro. Ratas Sprague Dawley, tiempo 1,5 horas, inyección por vena de la cola 10 nM. Nanobarras de oro modificadas con Polietilenglicol ((NR-OMe); Nanobarras de oro modificadas con péptido Angiopep-2 (NR-Ang);; Nanobarras de oro modificadas con péptidos Angiopep-2 y D1 (NR-Ang/D1). El estudio de se realizó por triplicado. \*\*\* P < 0,05, Kruskal-Wallis.



**Fig.5.3** Comparación de llegada a hígado de Nanobarras con distintas modificaciones B) Porcentaje de la dosis que llega a cerebro. Ratas Sprague Dawley, tiempo 1,5 horas, inyección por vena de la cola. Nanobarras de oro modificadas con Polietilenglicol (NR-OMe), Nanobarras de oro modificadas con péptido

Angiopep-2 (NR-Ang): Nanobarras de oro modificadas con péptidos Angiopep-2 y D1 (NR-Ang/D1). Es estudio se realizó por triplicado. \*\*\*  $P < 0,05$ , Kruskal-Wallis.

Este resultado nos indica que NR-Angiopep-2 llegarían en mayor cantidad al cerebro en el tiempo ensayado, en comparación con las nanopartículas recubiertas sólo con PEG. Como se explicó anteriormente, este es un resultado esperable.

En el tejido hepático (Fig.5.3A) los niveles de oro cuantificados no mostraron diferencias significativas entre el grupo control y los grupos experimentales, en los cuales se observó un porcentaje de retención de la dosis de un valor de 10 (Fig5.3 B).

A su vez, se puede evidenciar, que al modificar las nanobarras con ambos péptidos, la cantidad que alcanza el cerebro disminuye considerablemente. Esto puede estar relacionado con la mejor cantidad de Angiopep-2 conjugado, y que es reemplazado por el péptido D1 (figura 5.2).

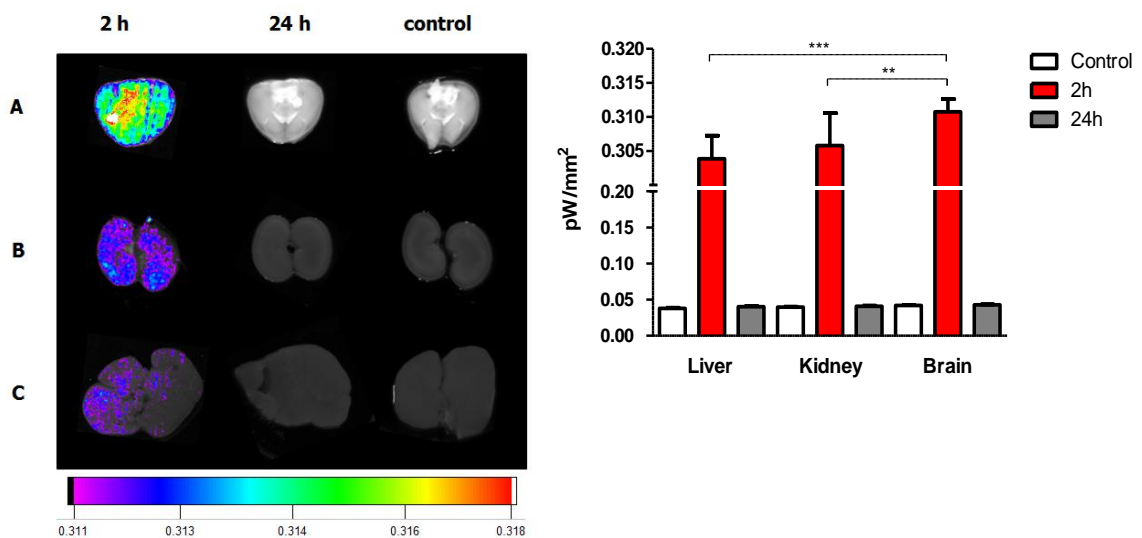
Posteriormente a la determinación de la llegada al cerebro del NR, se evaluó la presencia de estas en dicho órgano últimas mediante visualización *ex vivo* de cortes en el equipo *in vivo* F-PRO, con el cual se puede apreciar la señal de fluorescencia en los órganos y tejidos.

Para esto se modificó la NR como se describe en el capítulo 3, con la diferencia que un porcentaje del péptido Angiopep-2 está marcado con una molécula de Rodamina b, la cual es una sonda fluorescente que se excita a los 550 nm y

emite a los 700 nm. Luego se administró por vía intravenosa y luego de 90 minutos el animal fue anestesiado, perfundido y sacrificado.

Se extrajo el cerebro, el hígado y los riñones a las 2 y 24 horas, fueron lavados 5 veces con PBS y observados en el equipo.

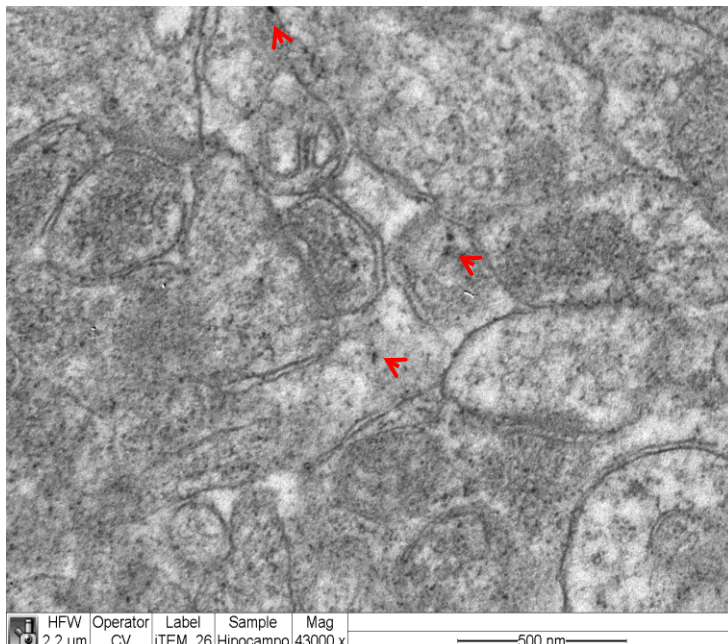
En la figura 5.4 se observa la señal fluorescente de la rodamina a las 2 horas post administración, y la ausencia de esta señal para la imagen tomada a las 24 horas. Esta imagen cualitativa se complementó con el análisis cuantitativo de las intensidades de fluorescencia por  $\text{mm}^2$  (Fig.5.4), donde se observa la misma tendencia que la imagen anterior, que a las 2 horas existe mayor fluorescencia en todos los órganos en comparación al control o a la administración por 24 horas.



**Fig.5.4** Imagen *ex vivo* de fluorescencia de A) cerebro, B) Riñones, C) hígado a las 2 y 24 horas (izquierda). Cuantificación de intensidad de fluorescencia (pico Watts/ $\text{mm}^2$ ) en los órganos estudiados a los diferentes tiempos (derecha). Ratas *Sprague Dawley*, inyección por vena de la cola de Nanobarras modificadas con Angiopep-2(Rodamina) (NR-Angiopep-2(Rodamina)). \*\*\*  $P < 0,05$ , Kruskal-Wallis.

Finalmente, la presencia de NR-Angiopep-2/D1 se evaluó en el cerebro, particularmente en el hipocampo mediante TEM.

Para esto a una rata *Sprague Dawley* se le administró NR como se ha descrito previamente, y a las 2 horas se anestesió y perfundió con PBS, y posteriormente con una solución de glutaraldehído con paraformaldehído llamada Karnovsky. Posteriormente se extrajo el cerebro y se obtuvo el hipocampo, el cual se procesó en la Unidad de Microscopía Electrónica del Centro de Equipamiento y Servicios de Apoyo Tecnológico (CESAT) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, donde fue procesado por la Profesora Marta Gacitúa, Jefa de Unidad de Microscopía Electrónica en Facultad de Medicina, quien montó las grid finales para ser observadas por TEM.



**Figura 5.5** Imágenes obtenidas por TEM de cortes de cerebro en las regiones de hipocampo para la detección de Nanobarras de oro modificadas con péptidos Angiopep-2 y D1 (NR-Angiopep-2/D1).

En la Figura 5.5 se observan imágenes de TEM de hipocampo de rata inyectada con NR-Angiopep-2/D1, en donde se logran observar la presencia de NR

*Según los ensayos realizados, se pudo comprobar la capacidad del conjugado de llegar al cerebro en ensayos in vivo. Esto fue avalado mediante la visualización de NR en el hipocampo, y además con la cuantificación del oro total en el cerebro.*

*Por otra parte, se obtuvieron datos importantes en relación a la farmacocinética, donde el modelo que mejor describe el comportamiento de estos conjugados es el de 2 compartimentos.*

**Capítulo 6: Discusión de Resultados y Conclusiones**

## 6.1 Discusión de Resultados

La obtención de NR-Angiopep-2/D1 conlleva a considerar la caracterización con gran relevancia, ya que considerando una potencial aplicación biomédica es necesario conocer los parámetros fisicoquímicos con certeza, y que estos sean reproducibles lote a lote.

Por lo que todas las etapas, ya sea síntesis de NR, de péptidos y de funcionalización con los ligandos, son etapas cruciales donde hay que tener el mayor control de los parámetros posibles.

En la síntesis de NR se obtienen estas estabilizadas con CTAB, un tensoactivo catiónico que le confiere de carga positiva a las nanopartículas. Esto se evidencia por el pZ obtenido de +67 mV.

Basados en diversos protocolos, pero con mayor énfasis en el de El Sayed *et al* [82] se fue comprobando el éxito de cada una de las etapas sucesivas de modificación y desplazamiento de CTAB.

Para desplazar dicho tensoactivo con PEG (mediante quimisorción del tiol en el oro), una solución de HS-PEG-OMe fue adicionada a una solución de NR.

Luego de mezclar, se procedió a centrifugar y resuspender las NR en agua con el fin de eliminar el PEG en exceso. En este paso las NR no se agregan como lo harían normalmente NR recubiertas sólo con CTAB. Esto ocurre porque las moléculas de PEG-OMe adsorbidas le confieren a las nanopartículas de estabilidad estérica, impidiendo la agregación a pesar de centrifugarlas a 20800 g. Posterior a este paso, se adicionó el segundo polietilenglicol: HS-PEG-



COOH, con el fin de obtener NR-S-PEG-OMe/S-PEG-COOH. Al igual que el paso anterior, se centrifugó y resuspendió para eliminar el PEG en exceso.

En esta etapa, se considera crítico el paso de adición de PEG-COOH, debido a que su adsorción conlleva a una inversión completa del potencial de superficie de NR.

Al caracterizar en este punto a las NR, se puede observar que el pZ se ha revertido, pasando de +67 a -19 mV (Fig. 3.4 y 3.12), lo cual concuerda con lo descrito en la literatura, donde por ejemplo se observa un cambio de potencial de NR de +40 mV para NR-CTAB, a -25 mV para NR-PEG-COOH [82].

El cambio de carga observado en este trabajo de tesis se explica al desplazamiento CTAB, y a la quimisorción de PEG-COOH, el cual le confiere de carga negativa debido al grupo carboxílico terminal ( $pK_a < 5$ ), el cual al pH de trabajo (5.5- 6) se encuentra desionizado.

En relación a los tamaños, se pudo observar que a medida que se modificando la superficie, el tamaño mediante DLS va aumentando, pasando de 50 nm para el segundo pico de NR-CTAB a 72 nm para NR-PEG (Fig 3.3 y 3.7). El aumento de 30 nm en este paso está acorde con la literatura, y se justifica por el tamaño que tendrían estas cadenas de polietilenglicol que extendidas pueden llegar a 50 nm. [139]

Finalmente, al activar los grupos carboxílicos de las cadenas de PEG con EDC/NHS para acoplar los péptidos, se pudo observar que el tamaño aumenta hasta 118 nm para el segundo pico en el gráfico de distribución de tamaño

(Fig.3.9). Si bien, el tamaño de los péptidos extendidos no superaría los 16 nm, el mayor aumento de lo esperado, puede deberse a que en la superficie de la NR se formaron multicapas de péptido, donde por interacciones electroestáticas se mantuvieron alrededor de la nanopartícula a pesar de la centrifugación.

Las NR finales obtenidas se observaron por TEM, donde la modificación de la superficie pudo observarse en las imágenes obtenidas, donde mediante la tinción con acetato de uranilo 2% se pudo observar la capa orgánica de PEG y péptidos.

En la imagen de NR-CTAB, no se observa un halo alrededor. Esto se debe a que si bien su superficie está modificada con una molécula como CTAB, esta no está presente en tan alta densidad como lo están las moléculas de Polietilenglicol.

En el trabajo realizado por Niidome *et al* , donde se utilizó un PEG de 5K, se puede observar la modificación de superficie mediante imágenes de TEM, donde una capa gris de aproximadamente 10 nm rodea a las NR.[140] Este halo difiere con lo obtenido en este trabajo de tesis, donde el resultado obtenido fue de un halo de alrededor de 0,7 nm. Esto puede deberse al recubrimiento menos compacto obtenido en nuestra síntesis, lo cual impide visualizar la modificación de superficie mediante tinción negativa por microscopía electrónica. Por otra parte, el valor del halo obtenido mediante TEM es un bastante menor al tamaño de recubrimiento obtenido mediante DLS, el cual

indicaría que el tamaño del recubrimiento sería aproximadamente 68 nm. Esta diferencia se explica porque ambas técnicas de medición son diferentes y tienen distintos parámetros que las influyen. Por ejemplo, en la medición por microscopía la muestra se deja secar, y el recubrimiento se observa sólo por la tinción con acetato de uranilo.

En cambio, en DLS, lo que se mide es el diámetro de la nanopartícula con su capa de solvatación, donde todos los ligandos se encuentran interactuando con el medio, y pudiendo adquirir distintas conformaciones.

Posterior a la modificación con PEG, se procedió a acoplar dos péptidos de interés a través de los PEG. Ambas secuencias peptídicas con las que se modificaron finalmente las NR, corresponden a péptidos funcionales que fueron sintetizadas para probar por un lado la capacidad de penetrar la BHE, tanto *in vivo* como en modelos celulares, y por otro lado, evaluar la capacidad de reconocer los agregados  $\beta$ -amiloides.

En los resultados de esta tesis se obtuvo una pureza superior al 90% en la síntesis de péptidos, cuya identidad fue confirmada mediante HPLC-MS, obteniéndose los fragmentos esperados según su peso molecular.

En el plasma o el suero, muchos péptidos cortos son degradados principalmente por exopeptidasas. La mayoría de los péptidos compuestos de

L-amino ácidos terminados en N- y C- son degradados rápidamente, y en general en pocos minutos. Una forma de proteger los péptidos es mediante su modificación al final de la cadena, por vía de una amidación C-terminal.

El soporte polimérico usado en esta tesis H-Rink-Amide-Chem-MATRIX, permite la obtención de un grupo amida terminal en los péptidos. Dicho grupo funcional ha demostrado conferir mayor estabilidad *in vivo* en comparación con los péptidos terminados en grupo carboxílico. Es por esto que todos los péptidos de esta tesis se sintetizaron con dicho grupo funcional terminal.

La modificación química, como lo discuten Adessi *et al*, es una estrategia requerida para cambiar potenciales sitios de escisión enzimática, lo que puede llevar a un aumento notable en la estabilidad del péptido, lo que es esencial en el diseño de fármacos basados en cadenas polipeptídicas.[141]

Para el péptido Angiopep-2, Angiopep-2(Rodamina), y D1 se obtuvo los fragmentos esperados, y que permiten confirmar el peso molecular y su identidad (TABLA 3).

La finalidad de esta tesis es sentar las bases de un posible tratamiento futuro para el desarrollo de un tratamiento para la enfermedad de Alzheimer. En este contexto, los ensayos *in vitro* de citotoxicidad pueden ser utilizados para predecir en parte la toxicidad en humanos. [142, 143]

Para evaluar la citotoxicidad *in vitro* de NR, se realizaron los ensayos MTS y liberación de LDH. La razón de utilizar dos ensayos se debe a la

complementariedad de los resultados obtenidos en cada uno de ellos, debido a las limitaciones que presenta cada uno de estos ensayos.

Ambos son métodos aceptados para detectar la toxicidad general, aunque por separado pueden no ser completamente precisas para nanomateriales, debido a que las nanopartículas pueden interferir adsorbiendo el colorante generado en la reacción, generar auto fluorescencia o incluso ser coloreados e interferir en la medición[144-146]. Para evitar estos problemas, se realizaron los controles respectivos en cada uno de los ensayos, y también se realizaron dos pruebas basadas en distintos principios para validar y asegurar la compatibilidad celular de estas nanopartículas. Uno de ellos fue el ensayo MTS (Fig.4.2), para determinar la actividad metabólica celular mediante la función mitocondrial, formándose un compuesto coloreado (formazán) producto de la actividad de enzimas presentes en la mitocondria, cuya actividad se relaciona directamente con la viabilidad celular, y podría ser un indicativo de muerte celular por apoptósis. Sin embargo, compuestos que afecten la actividad mitocondrial, ya sea aumentándola o disminuyéndola, pueden afectar la interpretación de los resultados debido a una pérdida en la correlación entre la aparición del formazán y la viabilidad celular.

El segundo ensayo realizado corresponde a la detección de Lactato Deshidrogenasa (LDH) (Fig.4.3), enzima que solo se encuentra a nivel intracelular, el cual permite evaluar la integridad de la membrana mediante

porcentaje de esta enzima liberada en el medio extracelular, lo cual se relaciona con el daño y muerte celular por necrosis.

Se ha reportado de nanopartículas que pueden influir en los resultados de esta última técnica, mediante interacción directa con la LDH, afectando su actividad y llevando a conclusiones inválidas [144], por lo cual se destaca la importancia de la realización de al menos dos ensayos complementarios, y la realización de los respectivos controles.

Diversos grupos han intentado disminuir o eliminar la citotoxicidad que poseen intrínsecamente las NR, debido al CTAB que poseen en su superficie. Una de las técnicas utilizadas ha sido la de Yamada *et al* , quienes propusieron el intercambio del tensoactivo CTAB por una molécula biocompatible como lo es la fosfatidilcolina [49], observándose una baja citotoxicidad luego de la modificación de la superficie.

El grupo de Liu *et al* también postularon la modificación de superficie para generar una mayor compatibilidad con células. Para esto utilizaron PEG para desplazar el tensoactivo. Sus resultados demostraron un aumento de la viabilidad celular en comparación con las NR sin modificar, comprobando la biocompatibilidad del sistema NR-PEG.[147]

En relación a los tipos de muerte celular existentes, podemos diferenciar por un lado a la necrosis, la cual está morfológicamente caracterizada por una

hinchazón y ruptura de organelos intracelulares, que eventualmente puede llevar a la disrupción de la membrana plasmática [111] . Dicha ruptura de células necróticas causa la liberación del contenido celular entre el medio extracelular. Por lo tanto, la muerte por necrosis evoca una respuesta inflamatoria. Esta muerte celular por necrosis es evaluada mediante la determinación de daño de la membrana plasmática. Para este propósito, en esta tesis se realizó el ensayo de citotoxicidad de LDH, el cual se basa en la medición de la liberación de esta enzima intracelular al medio extracelular, atribuida al daño de la membrada celular.

Otro método ensayado en esta tesis, y que es utilizado para determinar la disrupción de una función bioquímica crítica, es el ensayo de MTS. Este cuantifica la actividad mitocontrial mediante la formación de un producto de formazán color azul, el cual se genera mediante la reducción de el anillo tetrazólico del MTS.

Se piensa que la reducción del MTS ocurre principalmente en la mitocondria, a través de la acción de succinato deshidrogenasa, por lo que puede proveer de una medida de la función mitocontrial.[148]

Un paso crítico para diversas vías apoptóticas es la liberación de proteínas como citocromo c y AIF (apoptosis-inducing factor) desde la mitocondria. Esto último lleva a la activación de cisteína proteasas específicas, denominadas caspasas.[149] Estas caspasas clivan diversas proteínas nucleares y

citósicas, llevando a su inactivación o inhibición, y eventualmente a su muerte mediante apoptosis. [150] Esto sugiere que el daño mitocondrial es un paso temprano en el proceso apoptótico.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis muestran que a las distintas concentraciones ensayadas no existe un efecto necrótico o apoptótico del conjugado NR-Angiopep-2/D1 sobre las células endoteliales, ya que no se observó una diferencia significativa de los tratamientos versus el control en el ensayo de medición de liberación LDH y de formación de formazán (Fig.4.2 y 4.3).

Esto se fue posible debido al desplazamiento y reemplazo de las moléculas de CTAB y su reemplazo con moléculas de PEG, para las cuales se ha reportado su biocompatibilidad [118]. Además, cumplen la función de dar estabilidad estérica a las NR, evitando su agregación.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Adura *et al* [114] ,donde ensayaron viabilidad celular de NR conjugados con el péptido CLPFFD en la línea de neuroblastoma SH-SY5Y, demostrándose la baja citotoxicidad de los NR conjugados versus los NR-CTAB.

Antes de comenzar a evaluar la internalización celular de las nanopartículas, se le realizó un Western blot al cultivo primario RBMVEC para el receptor LRP-1.



En el caso de las células bEnd.3, no se realizó Western blot, debido a que Wagner *et al* reportaron la presencia del receptor LRP-1 en dichas células. [136]

Luego de visualizada la presencia del receptor de interés, se realizó el ensayo de internalización celular. Puede apreciarse que los 3 sistemas, NR-PEG, NR-Angiopep-2 y NR-Angiopep-2/D1, ingresan a las células, sin diferencia significativa entre ellas. Esto se explica porque sólo se incubó a un tiempo (24 h), lo que llevó a que las NR ingresaran mediante distintos mecanismos al interior de la célula, no diferenciándose a las 24 qué ingreso a través del receptor LRP-1 o a través de otro mecanismo, alcanzándose un equilibrio a las 24 horas. Esto concuerda con lo descrito por Huff *et al*, donde se estudió la velocidad de internalización y movimiento intracelular de los NR. Según este trabajo, los NR internalizados no eran completamente eliminados de la célula, llegando así a un equilibrio con el medio extracelular. Se observó que los NR podían generar agregados dentro de las células, que no afectaban su viabilidad.[151] Es por esto que en un futuro, sería óptimo probar tiempos menores de incubación de NR con las células de interés, con el fin de asegurarse de no llegar al equilibrio descrito.

Sin embargo, este resultado obtenido mediante cuantificación de oro es concordante con lo encontrado mediante microscopia confocal, en donde es posible observar a las 24 horas una gran intensidad correspondiente a la presencia de nanopartículas marcadas con una sonda fluorescente, NR-

Angiopep-2/D1 (rodamina) en las imágenes 3D en *stack* en el eje z adquirida con microscopio confocal.

Estos datos coinciden con el reciente trabajo publicado por nuestro laboratorio, donde mediante citometría de flujo se evaluó la internalización a 2 horas de NR modificadas y marcadas Alexa 647. En este trabajo se observa que la cantidad de NR modificadas con el péptido Angiopep-2 y D1 es significativamente mejor en comparación con el ingreso de NR modificadas sólo con PEG.[152]

Además se evaluó el efecto de NR-Angiopep-2/D1 sobre la agregación del péptido A $\beta$ , observándose una disminución en la intensidad de la fluorescencia de la señal de ThT para la concentración 1  $\mu$ M de D1 (D1/A $\beta$ : 0.05/1). Este resultado puede deberse a un menor crecimiento de las fibras mediante inhibición del péptido D1, lo que ha sido previamente descrito para una mayor razón entre el péptido D1 y el péptido A $\beta$ . Contrariamente, cuando la razón D1/A $\beta$  disminuye hay un aumento en la señal de fluorescencia de ThT posiblemente debido a la formación de un mayor número de fibras, pero más cortas, lo cual puede atribuirse a un efecto de nucleación producido por el péptido D1 (Wiesehan,Stohr *et al.* 2008).

Sin embargo, para una concentración de 0.48 nM de NR Angiopep-2/D1 (equivalente a 0.2  $\mu$ M del péptido D1 teniendo en cuenta el grado de funcionalización) se observa una disminución en la señal de ThT, donde el efecto de estas sería en la disminución de formación de fibras amiloides. Este

resultado puede ser atribuido a un efecto sinérgico de nucleación entre el péptido D1 y la NR.[153]

Asimismo, se realizó incubación de NR-Angiopep-2/D1 con fibras ya formadas de A $\beta$ , observándose mediante TEM la interacción entre estas nanopartículas y las fibras. Estos resultados sugieren que este tratamiento se podría llegar a emplear tanto para el reconocimiento de las placas amiloides y tratamiento, y además como profilaxis para evitar su aparición. Sin embargo, es importante destacar que para que una molécula llegue a ser un medicamento es necesario que pase ensayos pre-clínicos y clínicos, con el fin de garantizar la eficacia y seguridad. Por esto, los resultados obtenidos en esta tesis, a pesar de ser alentadores, no garantizan que las nanopartículas no puedan generar otros efectos a nivel molecular.

En la última etapa de esta tesis, se evaluó el conjugado NR-Angiopep-2/D1 en un modelo de rata *in vivo*, con el fin de evaluar la farmacocinética de estas nanopartículas y la llegada de estas al cerebro.

Cabe destacar que no existen estudios farmacocinéticos de NR conjugadas con péptidos.

Los datos farmacocinéticos obtenidos sugieren que las NR modificadas se definen en ratas por un modelo de 2 compartimentos. Esto se observa en la curva de datos linealizados, donde vemos que hay 2 pendientes que definen el modelo. En primer lugar hay una distribución rápida en un compartimento

central en órganos y tejidos altamente irrigados, que podría ser el cerebro e hígado, y luego una distribución lenta periférica, donde la distribución dependerá del grado de irrigación y las características físico-químicas de la molécula inyectada.

En el trabajo realizado por De Jong *et al*[154], se estudió el comportamiento farmacocinético para NR estabilizadas con CTAB (NR-CTAB) versus NR modificadas con PEG (NR-PEG). En este estudio, se reporta que los niveles en sangre son detectados hasta las 48 h post inyección para NR-PEG, mientras que para el caso de NR-CTAB son completamente eliminadas de la circulación luego de 15 minutos post inyección.

Además se reporta que para NR-PEG, el modelo que se ajusta a los datos obtenidos corresponde al de 1 compartimento, y los parámetros farmacocinéticos descritos son  $k: 0,036/h$ , vida media en sangre  $t_{1/2} = \ln(2)/k$  de 19 h.

Estudios han demostrado para diferentes tipos de nanopartículas, incluyendo las de oro [155, 156], que al ser incubadas con sangre, la superficie de la nanopartícula es cubierta con numerosas proteínas, incluyendo inmunoglobulinas, las cuales pueden incrementar su reconocimiento y captación por células del SFM. En el caso de los datos descritos por De Jong *et al.*, en las NR-CTAB forman inmediatamente una “corona de proteínas” séricas [157], que comprenden opsoninas, las cuales inician mecanismos de

reconocimiento e internalización por parte de los componentes del SFM. Esto explica por qué el *clearance* de las NR-CTAB sea mayor en comparación con el sistema modificado. Para nuestro sistema NR-Angiopep-2/D1 se obtuvo una vida media de valor intermedio de 14 h, muy superior a lo reportado para el sistema de NR-CTAB, el cual sólo se encuentra en circulación por breves minutos post inyección, siendo prácticamente indetectable en plasma luego de los 15 minutos, debido a la alta retención hepática que presentan.

La mayor vida media obtenida tiene relación con la modificación de la superficie de la NR. Cuando NR-CTAB son incubadas con Polietilenglicol tiolado (HS-PEG-OMe y HS-PEG-COOH), una fuerte unión entre el azufre y oro causa un desplazamiento o reemplazo de la bicapa superficial de CTAB [158], lo cual como se explicó con anterioridad, es la razón del cambio del potencial Z desde valores positivos hacia valores negativos. Este recubrimiento por cadenas hidrofílicas y neutras de PEG, previenen o disminuyen la adsorción de proteínas séricas[119] , y además disminuyen la interacción con los receptores de macrófagos, por lo que así el sistema modificado con dicho polímero presenta mayor permanencia en la sangre, y que es acorde con los datos obtenidos para nuestro sistema final.

Los grupos de Von Malzahn *et al.*[159] y De Jong *et al.*[154] han reportado para NR-PEG, vidas medias de 17 h y 19 h respectivamente, lo que difiere de nuestro dato obtenido de 14 h. Sin embargo, esto es algo esperado, ya que ambos grupos evaluaron la farmacocinética de NR sólo recubiertas con Polietilenglicol-

O-metilado, el cual lleva el potencial Z de sus nanosistemas cercanos a la neutralidad, donde existe baja interacción adsorción de proteínas séricas y reconocimiento por parte de los macrófagos. En nuestro caso, el sistema final obtenido además de contar con cadenas de PEG, también posee los péptidos Angiopep-2 y D1, los cuales le confieren una carga superficial debido a la presencia de aminoácidos cargados como Arginina, Acido aspártico, Lisina, y a las cadenas de PEG carboxílico que no fueron unidas a ningún péptido. Todo esto lleva a que el potencial Z final del sistema de NR-Angiopep-2/D1 sea de -10 mV, lo cual lo hace susceptible de reconocimiento por parte de proteínas séricas, y explicaría su menor vida media en comparación con las NR modificadas sólo con PEG neutro. Sumado a lo anterior, cabe destacar que el sistema propuesto en esta tesis fue modificado con el péptido Angiopep-2, el cual tiene como objetivo aumentar la llegada al cerebro, y fue demostrado con éxito en este trabajo de al comparar la llegada de NR-PEG v/s NR-Angiopep-2 en cerebro de rata. Por otra razón, la menor  $K_e$  puede ser explicada por una mayor afinidad de NR-Angiopep-2/D1 v/s NR-PEG por el tejido cerebral, lo que lleva a un aumento en el Volumen de distribución y una consecuente disminución en la vida media, de 19 a 14 h.

Otro punto interesante a considerar corresponde al modelo compartimental obtenido. En la literatura donde se ha estudiado la farmacocinética de NR

modificadas con PEG, el modelo que mejor ha definido su comportamiento ha sido el de un compartimento.[154]

En nuestro caso, nuestras NR-modificadas están definidas por un modelo de dos compartimentos, lo cual podríamos explicar debido a la modificación superficial de la NR, específicamente con el péptido angiopep-2. Dicho péptido es reconocido por el receptor LRP-1, el cual presente se sobreexpresa en endotelio cerebral y también se expresa en neuronas, músculo liso, astrocitos, macrófagos, fibroblastos y hepatocitos. Se encuentra en dos formas: unido a membrana (LRP1) y en forma soluble (sLRP1), el cual se encuentra en el plasma (Sagare, Deane *et al.* 2012). Este péptido podría ser el responsable de que en una primera etapa se distribuya de manera rápida a tejidos con mayor afinidad, y que posteriormente de una manera más lenta ( $K_{12} 0,0079 \text{ min}^{-1}$ ) se vaya distribuyendo al compartimento periférico, del cual vuelve con mayor velocidad nuevamente al compartimento central ( $k_{21} 0,0303 \text{ min}^{-1}$ ), lo que tendría relación con la afinidad del péptido por los receptores presentes en el compartimento central.

Para evaluar la capacidad del conjugado NR-Angiopep-2/D1 de atravesar la BHE y alcanzar el parénquima cerebral se utilizó el modelo de rata Sprague Dawley. En este modelo se pudo determinar que la llegada de las NR-Angiopep-2/D1 es cerca de 2 veces mayor que el control, NR-PEG, y cerca de 6 veces mayor en el caso de NR-Angiopep-2. Esto es esperable, ya que como se

ha descrito previamente, el péptido Angiopep-2 es el utilizado como lanzadera para cruzar la BHE, por lo que una completa modificación sólo con este péptido llevaría a un mayor reconocimiento por parte del receptor LRP-1 en comparación con NR-Angiopep-2/D1 que tienen menor cantidad de este péptido en la superficie.

La llegada de NR-Angiopep-2 al cerebro también fue evaluada *ex vivo*, mediante la modificación de las nanopartículas con el péptido marcado con Rodamina, corroborándose su llegada a las 2 horas además en riñón e hígado. La alta señal de rodamina observada a las dos 2h concuerda con lo obtenido mediante el análisis farmacocinético, ya que a las 2 horas de la administración el sistema se encuentra en la fase de distribución rápida, donde las NR modificadas se distribuyen rápidamente a un compartimento central, el cual podría ser en este caso el cerebro.

También se observó que a las 24 horas no existe señal de fluorescencia, lo que concuerda con los datos farmacocinéticos obtenidos, donde a las 24 horas post administración, los valores plasmáticos de NR-Angiopep-2/D1 son muy bajos. Este último dato a las 24 horas concursa con los datos farmacocinéticos, donde a las 24 h la concentración en sangre disminuye a un 16%, lo cual es representativo de lo que ocurre en todo el organismo al encontrarse en un equilibrio de distribución.

Finalmente la llegada de las NR-Angiopep-2/D1 al cerebro (hipocampo) fue comprobada por imágenes de TEM. Hay que mencionar que el contorno de las



NR puede verse alterado en la imagen, con una forma ovalada, debido a la gran cantidad de proteínas adsorbidas a la superficie. Este resultado, sumado a los datos de oro y las imágenes de fluorescencia, confirma la llegada de las NR-Angiopep-2/D1 al cerebro del animal.

## 6.2 Conclusiones

- Se obtuvieron NR con relación de aspecto cercano a 4, funcionalizados con los péptidos Angiopep-2 y D1 que son estables en medios de relevancia biológica.
- Los conjugados NR-Angiopep-2/D1 no mostraron efectos citotóxicos en cultivo primario y línea celular de células endoteliales microvasculares de cerebro de rata, a las concentraciones y tiempos utilizados. Sin embargo, es necesario realizar otros estudios de toxicidad con el fin de poder confirmar su inocuidad.
- Los conjugados NR-Angiopep-2/D1, NR-Angiopep-2 y NR-PEG son internalizados en la misma proporción por células RBMVEC a las 24 h, cuantificando oro por activación neutrónica. Sin embargo, actualmente se están llevando a cabo experimentos a tiempos cercanos a las 2 horas de incubación para detectar diferencias de internalización entre los conjugados.
- NR-Angiopep-2/D1 y NR-PEG interacciona con agregados de A $\beta$ , lo cual comprueba la hipótesis planteada.
- A diferencia de las NR-PEG las NR-Angiopep-2/D1 su distribución en ratas se ajusta a un modelo de 2 compartimentos, cuya ecuación es

$$C: 1,39 \times e^{-0,0385t} + 5,03 \times e^{-0,0008t} .$$

- NR-Angiopep-2 llega 6 veces más al cerebro que NR-PEG en modelo de rata Sprague-Dawley, lo que podría atribuirse al péptido angiopep-2. En futuros estudios se evaluará la llegada de las NR en animales transgénicos.
- NR-Angiopep-2/D1 llega 2 veces más al cerebro que NR-PEG en modelo de rata Sprague-Dawley.

## Referencias

1. Chen, G., et al., *Nanochemistry and Nanomedicine for Nanoparticle-based Diagnostics and Therapy*. Chem Rev, 2016. **116**(5): p. 2826-85.
2. Berezin, M.Y., *Nanotechnology for biomedical imaging and diagnostics: from nanoparticle design to clinical applications*. 2014: John Wiley & Sons.
3. Yih, T. and M. Al-Fandi, *Engineered nanoparticles as precise drug delivery systems*. Journal of cellular biochemistry, 2006. **97**(6): p. 1184-1190.
4. Xia, Y., et al., *Nanoparticulate Contrast Agents for Multimodality Molecular Imaging*. Journal of Biomedical Nanotechnology, 2016. **12**(8): p. 1553-1584.
5. Posadas, I., S. Monteagudo, and V. Ceña, *Nanoparticles for brain-specific drug and genetic material delivery, imaging and diagnosis*. Nanomedicine, 2016. **11**(7): p. 833-849.
6. Wang, B., L. Hu, and T.J. Siahaan, *Drug delivery: principles and applications*. 2016: John Wiley & Sons.
7. Ferrari, M., *Cancer nanotechnology: opportunities and challenges*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(3): p. 161-71.
8. Bangham, A.D., M.M. Standish, and J.C. Watkins, *Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids*. J Mol Biol, 1965. **13**(1): p. 238-52.
9. Langer, R. and J. Folkman, *Polymers for the sustained release of proteins and other macromolecules*. Nature, 1976. **263**(5580): p. 797-800.
10. Yatvin, M.B., et al., *pH-sensitive liposomes: possible clinical implications*. Science, 1980. **210**(4475): p. 1253-5.
11. Klibanov, A.L., et al., *Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes*. FEBS Lett, 1990. **268**(1): p. 235-7.
12. Gref, R., et al., *Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres*. Science, 1994. **263**(5153): p. 1600-3.
13. Georganopoulou, D.G., et al., *Nanoparticle-based detection in cerebral spinal fluid of a soluble pathogenic biomarker for Alzheimer's disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(7): p. 2273-6.
14. Gao, X., et al., *In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots*. Nat Biotechnol, 2004. **22**(8): p. 969-76.
15. Lee, J.H., et al., *Artificially engineered magnetic nanoparticles for ultra-sensitive molecular imaging*. Nat Med, 2007. **13**(1): p. 95-9.
16. Huang, X., et al., *Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods*. J Am Chem Soc, 2006. **128**(6): p. 2115-20.

17. Chen, J., et al., *Immuno gold nanocages with tailored optical properties for targeted photothermal destruction of cancer cells*. *Nano Lett*, 2007. **7**(5): p. 1318-22.
18. Wang, Y.-X.J., S.M. Hussain, and G.P. Krestin, *Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging*. *European Radiology*, 2001. **11**(11): p. 2319-2331.
19. Garcia, M.A., *Surface plasmons in metallic nanoparticles: fundamentals and applications*. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2011. **44**(28): p. 283001.
20. Jain, P.K., I.H. El-Sayed, and M.A. El-Sayed, *Au nanoparticles target cancer*. *nano today*, 2007. **2**(1): p. 18-29.
21. Mie, G., *Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen*. *Annalen der physik*, 1908. **330**(3): p. 377-445.
22. Arvizo, R.R., et al., *Intrinsic therapeutic applications of noble metal nanoparticles: past, present and future*. *Chem Soc Rev*, 2012. **41**(7): p. 2943-70.
23. Bhattacharyya, S., et al., *Inorganic nanoparticles in cancer therapy*. *Pharmaceutical research*, 2011. **28**(2): p. 237-259.
24. Daraee, H., et al., *Application of gold nanoparticles in biomedical and drug delivery*. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2016. **44**(1): p. 410-22.
25. Spuch, C., O. Saida, and C. Navarro, *Advances in the treatment of neurodegenerative disorders employing nanoparticles*. *Recent Pat Drug Deliv Formul*, 2012. **6**(1): p. 2-18.
26. Reynolds, J.L. and R.I. Mahato, *Nanomedicines for the Treatment of CNS Diseases*. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 2017. **12**(1): p. 1-5.
27. Li, X., et al., *Nano carriers for drug transport across the blood-brain barrier*. *J Drug Target*, 2017. **25**(1): p. 17-28.
28. Link, S. and M.A. El-Sayed, *Optical properties and ultrafast dynamics of metallic nanocrystals*. *Annu Rev Phys Chem*, 2003. **54**: p. 331-66.
29. Liz-Marzán, L.M., *Nanometals: formation and color*. *Materials today*, 2004. **7**(2): p. 26-31.
30. Njoki, P.N., et al., *Size correlation of optical and spectroscopic properties for gold nanoparticles*. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2007. **111**(40): p. 14664-14669.
31. Kelly, K.L., et al., *The optical properties of metal nanoparticles: the influence of size, shape, and dielectric environment*. 2003, ACS Publications.
32. Jain, P.K. and M.A. El-Sayed, *Plasmonic coupling in noble metal nanostructures*. *Chemical Physics Letters*, 2010. **487**(4-6): p. 153-164.
33. Song, Y., W. Wei, and X. Qu, *Colorimetric Biosensing Using Smart Materials*. *Advanced Materials*, 2011. **23**(37): p. 4215-4236.
34. Fratila, R.M., et al., *Strategies for the biofunctionalization of gold and iron oxide nanoparticles*. *Langmuir*, 2014. **30**(50): p. 15057-71.
35. Lee, S.M., et al., *Drug-loaded gold plasmonic nanoparticles for treatment of multidrug resistance in cancer*. *Biomaterials*, 2014. **35**(7): p. 2272-82.

36. Link, S. and M.A. El-Sayed, *Size and temperature dependence of the plasmon absorption of colloidal gold nanoparticles*. The Journal of Physical Chemistry B, 1999. **103**(21): p. 4212-4217.
37. Link, S., M. Mohamed, and M. El-Sayed, *Simulation of the optical absorption spectra of gold nanorods as a function of their aspect ratio and the effect of the medium dielectric constant*. The Journal of Physical Chemistry B, 1999. **103**(16): p. 3073-3077.
38. Link, S. and M. El-Sayed, *Simulation of the optical absorption spectra of gold nanorods as a function of their aspect ratio and the effect of the medium dielectric constant*. The Journal of Physical Chemistry B, 2005. **109**(20): p. 10531-10532.
39. Huang, X., S. Neretina, and M.A. El-Sayed, *Gold nanorods: from synthesis and properties to biological and biomedical applications*. Adv Mater, 2009. **21**(48): p. 4880-910.
40. Tong, L., et al., *Gold nanorods as contrast agents for biological imaging: optical properties, surface conjugation and photothermal effects*. Photochemistry and photobiology, 2009. **85**(1): p. 21-32.
41. Stolik, S., et al., *Measurement of the penetration depths of red and near infrared light in human "ex vivo" tissues*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2000. **57**(2): p. 90-93.
42. Weissleder, R., *A clearer vision for in vivo imaging*. Nat Biotechnol, 2001. **19**(4): p. 316-7.
43. Jana, N.R., L. Gearheart, and C.J. Murphy, *Seed-mediated growth approach for shape-controlled synthesis of spheroidal and rod-like gold nanoparticles using a surfactant template*. Advanced Materials, 2001. **13**(18): p. 1389.
44. Murphy, C.J., et al., *The many faces of gold nanorods*. The Journal of Physical Chemistry Letters, 2010. **1**(19): p. 2867-2875.
45. Smith, D.K. and B.A. Korgel, *The importance of the CTAB surfactant on the colloidal seed-mediated synthesis of gold nanorods*. Langmuir, 2008. **24**(3): p. 644-9.
46. Wang, S., et al., *Challenge in understanding size and shape dependent toxicity of gold nanomaterials in human skin keratinocytes*. Chemical physics letters, 2008. **463**(1): p. 145-149.
47. Alkilany, A.M., et al., *Cellular uptake and cytotoxicity of gold nanorods: molecular origin of cytotoxicity and surface effects*. Small, 2009. **5**(6): p. 701-8.
48. Niidome, T., et al., *PEG-modified gold nanorods with a stealth character for in vivo applications*. Journal of Controlled Release, 2006. **114**(3): p. 343-347.
49. Takahashi, H., et al., *Modification of gold nanorods using phosphatidylcholine to reduce cytotoxicity*. Langmuir, 2006. **22**(1): p. 2-5.
50. Greish, K., *Enhanced permeability and retention of macromolecular drugs in solid tumors: a royal gate for targeted anticancer nanomedicines*. J Drug Target, 2007. **15**(7-8): p. 457-64.

51. Chen, C.C., et al., *DNA-gold nanorod conjugates for remote control of localized gene expression by near infrared irradiation*. J Am Chem Soc, 2006. **128**(11): p. 3709-15.
52. Wijaya, A., et al., *Selective release of multiple DNA oligonucleotides from gold nanorods*. ACS Nano, 2009. **3**(1): p. 80-6.
53. Lee, S.E., et al., *Biologically functional cationic phospholipid-gold nanoplasmonic carriers of RNA*. J Am Chem Soc, 2009. **131**(39): p. 14066-74.
54. Huang, X., et al., *Cancer cells assemble and align gold nanorods conjugated to antibodies to produce highly enhanced, sharp, and polarized surface Raman spectra: a potential cancer diagnostic marker*. Nano Lett, 2007. **7**(6): p. 1591-7.
55. Tkachenko, A.G., et al., *Multifunctional gold nanoparticle-peptide complexes for nuclear targeting*. J Am Chem Soc, 2003. **125**(16): p. 4700-1.
56. Dreaden, E.C., et al., *Tamoxifen-poly(ethylene glycol)-thiol gold nanoparticle conjugates: enhanced potency and selective delivery for breast cancer treatment*. Bioconjug Chem, 2009. **20**(12): p. 2247-53.
57. Grace, A.N. and K. Pandian, *Antibacterial efficacy of aminoglycosidic antibiotics protected gold nanoparticles—A brief study*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2007. **297**(1): p. 63-70.
58. Daniel, M.-C. and D. Astruc, *Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology*. Chemical reviews, 2004. **104**(1): p. 293-346.
59. Hetenyi, C., T. Kortvelyesi, and B. Penke, *Mapping of possible binding sequences of two beta-sheet breaker peptides on beta amyloid peptide of Alzheimer's disease*. Bioorg Med Chem, 2002. **10**(5): p. 1587-93.
60. Soto, C., et al., *Beta-sheet breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis: implications for Alzheimer's therapy*. Nat Med, 1998. **4**(7): p. 822-6.
61. Bastus, N.G., et al., *Gold nanoparticles for selective and remote heating of  $\beta$ -amyloid protein aggregates*. Materials Science and Engineering: C, 2007. **27**(5): p. 1236-1240.
62. Kogan, M.J., et al., *Nanoparticle-mediated local and remote manipulation of protein aggregation*. Nano Lett, 2006. **6**(1): p. 110-5.
63. Ittner, L.M. and J. Gotz, *Amyloid-beta and tau--a toxic pas de deux in Alzheimer's disease*. Nat Rev Neurosci, 2011. **12**(2): p. 65-72.
64. Guerrero, S., et al., *Synthesis and in vivo evaluation of the biodistribution of a  $^{18}F$ -labeled conjugate gold-nanoparticle-peptide with potential biomedical application*. Bioconjug Chem, 2012. **23**(3): p. 399-408.
65. Prades, R., et al., *Delivery of gold nanoparticles to the brain by conjugation with a peptide that recognizes the transferrin receptor*. Biomaterials, 2012. **33**(29): p. 7194-205.

66. Olmedo, I., et al., *How changes in the sequence of the peptide CLPFFD-NH<sub>2</sub> can modify the conjugation and stability of gold nanoparticles and their affinity for beta-amyloid fibrils.* Bioconjug Chem, 2008. **19**(6): p. 1154-63.
67. Bieler, S. and C. Soto, *Beta-sheet breakers for Alzheimer's disease therapy.* CURRENT DRUG TARGETS., 2004. **5**: p. 553-558.
68. Guerrero, S., et al., *Improving the brain delivery of gold nanoparticles by conjugation with an amphipathic peptide.* Nanomedicine (Lond), 2010. **5**(6): p. 897-913.
69. Zawadzke, L.E. and J.M. Berg, *A racemic protein.* Journal of the American Chemical Society, 1992. **114**(10): p. 4002-4003.
70. Van Regenmortel, M.H. and S. Muller, *D-peptides as immunogens and diagnostic reagents.* Current opinion in biotechnology, 1998. **9**(4): p. 377-382.
71. Findeis, M.A., et al., *Modified-peptide inhibitors of amyloid beta-peptide polymerization.* Biochemistry, 1999. **38**(21): p. 6791-800.
72. Dintzis, H.M., et al., *A comparison of the immunogenicity of a pair of enantiomeric proteins.* Proteins, 1993. **16**(3): p. 306-8.
73. Schumacher, T.N., et al., *Identification of D-peptide ligands through mirror-image phage display.* SCIENCE-NEW YORK THEN WASHINGTON-, 1996: p. 1854-1857.
74. Liu, H., S.A. Funke, and D. Willbold, *Transport of Alzheimer disease amyloid- $\beta$ -binding D-amino acid peptides across an in vitro blood-brain barrier model.* Rejuvenation research, 2010. **13**(2-3): p. 210-213.
75. Bastus, N.G., et al., *Peptides conjugated to gold nanoparticles induce macrophage activation.* Mol Immunol, 2009. **46**(4): p. 743-8.
76. Levchenko, T.S., et al., *Liposome clearance in mice: the effect of a separate and combined presence of surface charge and polymer coating.* Int J Pharm, 2002. **240**(1-2): p. 95-102.
77. Jokerst, J.V., et al., *Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy.* Nanomedicine (Lond), 2011. **6**(4): p. 715-28.
78. Li, R., J.S. Eun, and M.K. Lee, *Pharmacokinetics and biodistribution of paclitaxel loaded in pegylated solid lipid nanoparticles after intravenous administration.* Arch Pharm Res, 2011. **34**(2): p. 331-7.
79. Choi, J., et al., *Specific near-IR absorption imaging of glioblastomas using integrin-targeting gold nanorods.* Advanced Functional Materials, 2011. **21**(6): p. 1082-1088.
80. Oh, E., et al., *Cellular uptake and fate of PEGylated gold nanoparticles is dependent on both cell-penetration peptides and particle size.* Acs Nano, 2011. **5**(8): p. 6434-6448.
81. Wang, L., et al., *Characterization of gold nanorods in vivo by integrated analytical techniques: their uptake, retention, and chemical forms.* Anal Bioanal Chem, 2010. **396**(3): p. 1105-14.



82. Huang, X., et al., *A reexamination of active and passive tumor targeting by using rod-shaped gold nanocrystals and covalently conjugated peptide ligands*. ACS nano, 2010. **4**(10): p. 5887-5896.
83. Pardridge, W.M., *Blood-brain barrier delivery*. Drug Discov Today, 2007. **12**(1-2): p. 54-61.
84. Pardridge, W.M., *CNS drug design based on principles of blood-brain barrier transport*. J Neurochem, 1998. **70**(5): p. 1781-92.
85. Cecchelli, R., et al., *Modelling of the blood–brain barrier in drug discovery and development*. Nature Reviews Drug Discovery, 2007. **6**(8): p. 650-661.
86. Gray, R.A., et al., *Delta-sleep-inducing peptide: solution conformational studies of a membrane-permeable peptide*. Biochemistry, 1994. **33**(6): p. 1323-1331.
87. Abbruscato, T.J., et al., *Blood-brain barrier permeability and bioavailability of a highly potent and  $\mu$ -selective opioid receptor antagonist, CTAP: comparison with morphine*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1997. **280**(1): p. 402-409.
88. Banks, W.A., et al., *Permeability of the murine blood-brain barrier to some octapeptide analogs of somatostatin*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1990. **87**(17): p. 6762-6766.
89. Kastin, A.J., et al., *Phe13, Tyr19-Melanin-Concentrating Hormone and the Blood—Brain Barrier*. Journal of neurochemistry, 2000. **74**(1): p. 385-391.
90. Dogrukol-Ak, D., et al., *Passage of vasoactive intestinal peptide across the blood-brain barrier*. Peptides, 2003. **24**(3): p. 437-44.
91. Kastin, A.J. and V. Akerstrom, *Orexin A but not orexin B rapidly enters brain from blood by simple diffusion*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1999. **289**(1): p. 219-223.
92. Tsuji, A. and I. Tamai, *Carrier-mediated or specialized transport of drugs across the blood–brain barrier*. Advanced drug delivery reviews, 1999. **36**(2): p. 277-290.
93. Fernandez-Carneado, J., et al., *Potential peptide carriers: amphipathic proline-rich peptides derived from the N-terminal domain of gamma-zein*. Angew Chem Int Ed Engl, 2004. **43**(14): p. 1811-4.
94. Pujals, S., et al., *Mechanistic aspects of CPP-mediated intracellular drug delivery: relevance of CPP self-assembly*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1758**(3): p. 264-79.
95. Deguchi, Y., et al., *Blood–brain barrier transport of a novel  $\mu$ 1-specific opioid peptide, H-Tyr-d-Arg-Phe- $\beta$ -Ala-OH (TAPA)*. Journal of neurochemistry, 2003. **84**(5): p. 1154-1161.
96. Pardridge, W.M., *The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development*. NeuroRx, 2005. **2**(1): p. 3-14.
97. Shibata, M., et al., *Clearance of Alzheimer's amyloid- $\beta$  1-40 peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier*. The Journal of clinical investigation, 2000. **106**(12): p. 1489-1499.

98. Batrakova, E.V., et al., *Effects of pluronic P85 unimers and micelles on drug permeability in polarized BBMEC and Caco-2 cells*. *Pharm Res*, 1998. **15**(10): p. 1525-32.
99. Feng, J.-M., P.C. Lui, and J.Y. Li, *Receptor-Mediated Transport of Drugs Across the BBB*. *Drug Delivery to the Central Nervous System*, 2010: p. 15-34.
100. Bell, R.D., et al., *Transport pathways for clearance of human Alzheimer's amyloid  $\beta$ -peptide and apolipoproteins E and J in the mouse central nervous system*. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 2007. **27**(5): p. 909-918.
101. Li, Y., et al., *The YXXL motif, but not the two NPXY motifs, serves as the dominant endocytosis signal for low density lipoprotein receptor-related protein*. *Journal of Biological Chemistry*, 2000. **275**(22): p. 17187-17194.
102. Arélin, K., et al., *LRP and senile plaques in Alzheimer's disease: colocalization with apolipoprotein E and with activated astrocytes*. *Molecular brain research*, 2002. **104**(1): p. 38-46.
103. Demeule, M., et al., *Identification and design of peptides as a new drug delivery system for the brain*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2008. **324**(3): p. 1064-1072.
104. Ren, J., et al., *The targeted delivery of anticancer drugs to brain glioma by PEGylated oxidized multi-walled carbon nanotubes modified with angiopep-2*. *Biomaterials*, 2012. **33**(11): p. 3324-33.
105. Nikoobakht, B. and M.A. El-Sayed, *Preparation and growth mechanism of gold nanorods (NRs) using seed-mediated growth method*. *Chemistry of Materials*, 2003. **15**(10): p. 1957-1962.
106. Sze, A., et al., *Zeta-potential measurement using the Smoluchowski equation and the slope of the current-time relationship in electroosmotic flow*. *Journal of colloid and interface science*, 2003. **261**(2): p. 402-410.
107. Link, S. and M. El-Sayed, *Spectroscopic determination of the melting energy of a gold nanorod*. *The Journal of Chemical Physics*, 2001. **114**(5): p. 2362-2368.
108. Lobner, D., *Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis?* *Journal of neuroscience methods*, 2000. **96**(2): p. 147-152.
109. Korzeniewski, C. and D.M. Callewaert, *An enzyme-release assay for natural cytotoxicity*. *Journal of immunological methods*, 1983. **64**(3): p. 313-320.
110. Decker, T. and M.-L. Lohmann-Matthes, *A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity*. *Journal of immunological methods*, 1988. **115**(1): p. 61-69.
111. Chan, F.K.-M., K. Moriwaki, and M.J. De Rosa, *Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity*. *Immune Homeostasis: Methods and Protocols*, 2013: p. 65-70.

112. Sabaté, R. and J. Estelrich, *Evidence of the existence of micelles in the fibrillogenesis of  $\beta$ -amyloid peptide*. The Journal of Physical Chemistry B, 2005. **109**(21): p. 11027-11032.
113. Sabaté, R. and S.J. Saupe, *Thioflavin T fluorescence anisotropy: an alternative technique for the study of amyloid aggregation*. Biochemical and biophysical research communications, 2007. **360**(1): p. 135-138.
114. Adura, C., et al., *Stable conjugates of peptides with gold nanorods for biomedical applications with reduced effects on cell viability*. ACS Appl Mater Interfaces, 2013. **5**(10): p. 4076-85.
115. Burrows, N.D., et al., *Surface Chemistry of Gold Nanorods*. Langmuir, 2016. **32**(39): p. 9905-9921.
116. Liu, H., N. Pierre-Pierre, and Q. Huo, *Dynamic light scattering for gold nanorod size characterization and study of nanorod-protein interactions*. Gold Bulletin, 2012. **45**(4): p. 187-195.
117. *The source of toxicity in CTAB and CTAB-stabilized gold nanorods*. 2013.
118. Milla, P., F. Dosio, and L. Cattel, *PEGylation of proteins and liposomes: a powerful and flexible strategy to improve the drug delivery*. Current drug metabolism, 2012. **13**(1): p. 105-119.
119. Soenen, S.J., et al., *The cellular interactions of PEGylated gold nanoparticles: effect of PEGylation on cellular uptake and cytotoxicity*. Particle & Particle Systems Characterization, 2014. **31**(7): p. 794-800.
120. Jadzinsky, P.D., et al., *Structure of a thiol monolayer-protected gold nanoparticle at 1.1 Å resolution*. Science, 2007. **318**(5849): p. 430-3.
121. Xiao, K., et al., *The effect of surface charge on in vivo biodistribution of PEG-oligocholeic acid based micellar nanoparticles*. Biomaterials, 2011. **32**(13): p. 3435-3446.
122. Zhang, Y., et al., *Bioactivity and circulation time of PEGylated NELL-1 in mice and the potential for osteoporosis therapy*. Biomaterials, 2014. **35**(24): p. 6614-6621.
123. Choi, C.H.J., et al., *Mechanism of active targeting in solid tumors with transferrin-containing gold nanoparticles*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010. **107**(3): p. 1235-1240.
124. Vasconcelos, A., et al., *Conjugation of cell-penetrating peptides with poly (lactic-co-glycolic acid)-polyethylene glycol nanoparticles improves ocular drug delivery*. International journal of nanomedicine, 2015. **10**: p. 609.
125. Ferrier Jr, R.C., et al., *Tuning Optical Properties of Functionalized Gold Nanorods through Controlled Interactions with Organic Semiconductors*. The Journal of Physical Chemistry C, 2015. **119**(31): p. 17899-17909.
126. Demeule, M., et al., *Involvement of the low-density lipoprotein receptor-related protein in the transcytosis of the brain delivery vector angiopep-2*. J Neurochem, 2008. **106**(4): p. 1534-44.

127. Regina, A., et al., *Antitumour activity of ANG1005, a conjugate between paclitaxel and the new brain delivery vector Angiopep-2*. Br J Pharmacol, 2008. **155**(2): p. 185-97.
128. Ruan, S., et al., *Tumor microenvironment sensitive doxorubicin delivery and release to glioma using angiopep-2 decorated gold nanoparticles*. Biomaterials, 2015. **37**: p. 425-35.
129. Murpy, M. and H. LeVine III, *Alzheimer's disease and the  $\beta$ -amyloid peptide*. J Alzheimers Dis, 2010. **19**(1): p. 311-323.
130. Funke, S.A. and D. Willbold, *Mirror image phage display—a method to generate D-peptide ligands for use in diagnostic or therapeutical applications*. Molecular bioSystems, 2009. **5**(8): p. 783-786.
131. Matea, C.T., et al., *Rational design of gold nanocarrier for the delivery of JAG-1 peptide*. Journal of nanobiotechnology, 2015. **13**(1): p. 41.
132. Xia, X., et al., *Quantifying the coverage density of poly (ethylene glycol) chains on the surface of gold nanostructures*. ACS nano, 2011. **6**(1): p. 512-522.
133. Needham, D. and A. Ponce, *Nanoscale drug delivery vehicles for Solid tumors, Nanotechnology for cancer therapy*. 2002, CRC Press, Taylor & Francis.
134. Honary, S. and F. Zahir, *Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review (Part 2)*. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2013. **12**(2): p. 265-273.
135. Kogan, M.J., et al., *Peptides and metallic nanoparticles for biomedical applications*. Nanomedicine (Lond), 2007. **2**(3): p. 287-306.
136. Wagner, S., et al., *Uptake mechanism of ApoE-modified nanoparticles on brain capillary endothelial cells as a blood-brain barrier model*. PloS one, 2012. **7**(3): p. e32568.
137. Morales Zavala, F., *Nanopartículas de oro modificadas con péptidos: biodistribución y efectos sobre la agregación de [beta]-amiloide*. 2016.
138. Wiesehan, K., et al., *Inhibition of cytotoxicity and amyloid fibril formation by a D-amino acid peptide that specifically binds to Alzheimer's disease amyloid peptide*. Protein engineering design and selection, 2008. **21**(4): p. 241-246.
139. Choi, C.H.J., et al., *Targeting kidney mesangium by nanoparticles of defined size*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011. **108**(16): p. 6656-6661.
140. Akiyama, Y., et al., *Conversion of rod-shaped gold nanoparticles to spherical forms and their effect on biodistribution in tumor-bearing mice*. Nanoscale Res Lett, 2012. **7**(1): p. 565.
141. Adessi, C. and C. Soto, *Converting a peptide into a drug: strategies to improve stability and bioavailability*. Current medicinal chemistry, 2002. **9**(9): p. 963-978.
142. Fotakis, G. and J.A. Timbrell, *In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride*. Toxicology Letters, 2006. **160**(2): p. 171-177.

143. Scheers, E., B. Ekwall, and P. Dierickx, *In vitro long-term cytotoxicity testing of 27 MEIC chemicals on Hep G2 cells and comparison with acute human toxicity data*. *Toxicology in vitro*, 2001. **15**(2): p. 153-161.
144. Monteiro-Riviere, N., A. Inman, and L. Zhang, *Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line*. *Toxicology and applied pharmacology*, 2009. **234**(2): p. 222-235.
145. Soenen, S.J. and M. De Cuyper, *Assessing cytotoxicity of (iron oxide-based) nanoparticles: an overview of different methods exemplified with cationic magnetoliposomes*. *Contrast media & molecular imaging*, 2009. **4**(5): p. 207-219.
146. Soenen, S.J. and M. De Cuyper, *How to assess cytotoxicity of (iron oxide-based) nanoparticles. A technical note using cationic magnetoliposomes*. *Contrast media & molecular imaging*, 2011. **6**(3): p. 153-164.
147. Liu, X., et al., *Multidentate polyethylene glycol modified gold nanorods for in vivo near-infrared photothermal cancer therapy*. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2014. **6**(8): p. 5657-68.
148. Wang, P., S.M. Henning, and D. Heber, *Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols*. *PloS one*, 2010. **5**(4): p. e10202.
149. Mignotte, B. and J.L. Vayssiere, *Mitochondria and apoptosis*. *The FEBS Journal*, 1998. **252**(1): p. 1-15.
150. Tang, D. and V.J. Kidd, *Cleavage of DFF-45/ICAD by multiple caspases is essential for its function during apoptosis*. *Journal of Biological Chemistry*, 1998. **273**(44): p. 28549-28552.
151. Huff, T.B., et al., *Controlling the cellular uptake of gold nanorods*. *Langmuir*, 2007. **23**(4): p. 1596-9.
152. Velasco-Aguirre, C., et al., *Improving gold nanorod delivery to the central nervous system by conjugation to the shuttle Angiopep-2*. 2017.
153. Morales-Zavala, F., et al., *Peptide multifunctionalized gold nanorods decrease toxicity of  $\beta$ -amyloid peptide in a *Caenorhabditis elegans* model of Alzheimer's disease*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2017. **13**(7): p. 2341-2350.
154. Lankveld, D.P., et al., *Blood clearance and tissue distribution of PEGylated and non-PEGylated gold nanorods after intravenous administration in rats*. *Nanomedicine*, 2011. **6**(2): p. 339-349.
155. Schottler, S., et al., *Protein adsorption is required for stealth effect of poly(ethylene glycol)- and poly(phosphoester)-coated nanocarriers*. *Nat Nanotechnol*, 2016. **11**(4): p. 372-7.
156. Settanni, G., et al., *Protein corona composition of poly(ethylene glycol)- and poly(phosphoester)-coated nanoparticles correlates strongly with the amino acid composition of the protein surface*. *Nanoscale*, 2017. **9**(6): p. 2138-2144.

157. Walkey, C.D., et al., *Protein corona fingerprinting predicts the cellular interaction of gold and silver nanoparticles*. ACS nano, 2014. **8**(3): p. 2439-2455.
158. Pensa, E., et al., *The chemistry of the sulfur-gold interface: in search of a unified model*. Acc Chem Res, 2012. **45**(8): p. 1183-92.
159. von Maltzahn, G., et al., *Computationally guided photothermal tumor therapy using long-circulating gold nanorod antennas*. Cancer research, 2009. **69**(9): p. 3892-3900.