

UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas



“Nanopartículas de oro multifuncionalizadas: Su interacción con membranas fosfolipídicas y sus efectos sobre la viabilidad celular”

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en Bioquímica área de especialización Bioquímica Toxicológica y Diagnóstico Molecular y Memoria para optar al Título de Bioquímico por:

Eduardo Ignacio Gallardo Toledo

Directores de Tesis:

Dr. Marcelo Javier Kogan Bocian

Dra. Claudia Yañez Soto

Santiago-Chile

Enero 2016

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN

TESIS DE MAGISTER

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

EDUARDO IGNACIO GALLARDO TOLEDO

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización Bioquímica Toxicológica y Diagnóstico Molecular, y Título de Bioquímico, en el examen público rendido el día_____de_____del 2016.

Directores de tesis:

Dr. Marcelo Javier Kogan Bocian. _____

Dra. Claudia Yañez Soto. _____

Comisión evaluadora de Tesis:

Dra. María Antonieta Valenzuela Pedevila. _____

Dra. María Nella Gai Hernández. _____

Dr. Paul Jara Vergara. _____

AGRADECIMIENTOS

Al profe Marcelo, por aceptarme en su laboratorio y aconsejarme durante la tesis. Por darme la oportunidad de desarrollarme como científico y tener la confianza en mí para realizar distintas actividades académicas.

A la profe Claudia, por permitirme hacer mis primeros trabajos en su laboratorio, orientarme y fomentar en mí el interés científico. Por su excelente disposición y siempre ayudarme cuando lo he necesitado.

A la comisión, por sus sugerencias y correcciones durante el desarrollo de esta tesis, que permitieron poder terminarla de la mejor manera.

A mis compañeros de laboratorio, por la buena onda, conversaciones y hacer que el día a día de laboratorio fuera mejor. A Nati y Anita por ayudarme y aconsejarme siempre cuando se los pedí. A Claudia, Mariela, Edy, Carlos, Julián y Rodrigos por la buena onda y tallas que se daban en los momentos de ocio.

A mis amigos de la u, Gran, Foncho, Vicho, Chahin, Gonzo, Noni, Nico, Pelao, Diegol, Mabe, Pau, Mel y Maca, por todos estos años de amistad, conversaciones, carretes, viajes, partidos, cumpleaños, taca-tacas. A todos por hacer que este largo camino haya sido lo mejor posible.

A mis amigos Rocky, Clau, Cami, Claudio y Javi, por tantos años de amistad y buena, por las juntas que se dan de vez en cuando, pero que siempre se pasa excelente y por apoyarme en mi tesis en alquimia y oro.

A Caro, que me ha acompañado durante todo este proceso, en los buenos momentos, pero por sobre todo en los malos. Por apoyarme siempre, por aconsejarme, y alentarme a seguir. De verdad que gracias, muchísimas

gracias, ya que por tu paciencia y ayuda, pude terminar esta tesis. Te amo mucho.

Finalmente, a mi familia. A mis padres por apoyarme siempre, por preocuparse y comprometerse con mi desarrollo para lograr que sea un profesional y una mejor persona. A mis hermanas, Javiera y Gabriela. A mí cuñado Cristián. A mis sobrinas Amelia, Laura y Jacinta, por ser las más lindas. Por estar siempre juntos, compartiendo distintas alegrías.

Muchas gracias.

FINANCIAMIENTO

Esta tesis fue desarrollada en el Laboratorio de Nanobiotecnología y Nanotoxicología y en el Laboratorio de Bioelectroquímica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. El trabajo fue financiado por el proyecto FONDECYT 1130425 (Dr. Marcelo Kogan) y FONDAP 15130011. Asimismo, se agradece al proyecto MECESUP 0811-UCH.

TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS.....	i
FINANCIAMIENTO.....	iii
TABLA DE CONTENIDO.....	iv
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMEN.....	xv
SUMMARY.....	xviii
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Nanopartículas de oro: características y aplicaciones.....	1
1.2 Uso de NPs metálicas para una posible terapia contra la enfermedad de Alzheimer.....	3
1.3 Estrategias para aumentar la llegada de las NPs hacia el cerebro.....	8
1.4 Importancia de las características fisicoquímicas en el comportamiento biológico de las NPs.....	12

1.5 Utilización de polietilenglicol en NPs como agente estabilizante.....	18
1.6 Uso de ciclodextrinas para la entrega de fármacos.....	21
PROPUESTA DE TRABAJO.....	24
HIPÓTESIS.....	25
OBJETIVO GENERAL.....	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
METODOLOGÍA.....	26
1. Síntesis de NPAu-e y funcionalización con polietilenglicol.....	26
2. Modificación con ciclodextrinas aminadas de las nanopartículas funcionalizadas con PEGs.....	28
3. Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas obtenidas.....	31
4. Evaluación de la permeabilidad de membranas.....	33
5. Evaluación de la penetración celular y efectos sobre la viabilidad celular.....	34
RESULTADOS.....	38
1. Sintetizar NPAu-e y funcionalizarlas con diferentes proporciones de HS- PEG-OMe/HS-PEG-COOH.....	38
2. Modificación con ciclodextrinas aminadas de las nanopartículas funcionalizadas con PEGs.....	47

3. Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas obtenidas.....	52
4. Evaluación de la permeabilidad de las NPAu funcionalizadas en modelos de membrana.....	60
5. Evaluación de la penetración celular y niveles de toxicidad de las nanopartículas.....	63
DISCUSIÓN.....	68
CONCLUSIONES Y PROYECCIONES.....	80
MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	82
BIBLIOGRAFÍA.....	83

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1. Efecto fototérmico en nanopartículas de oro.....	3
Figura 2. NPAu-e con CLPFFD degradan agregados $A\beta_{1-42}$ al ser irradiadas.....	5
Figura 3. Disposición de los péptidos en la superficie de oro.....	7
Figura 4. Mecanismos de transporte a través de la BHE.....	10
Figura 5. Efecto del tamaño de la NPAu sobre la interacción con la membrana celular y su posible internalización.....	14
Figura 6. Efectos de la carga superficial de las NPAu sobre la integridad de una bicapa lipídica.....	16
Figura 7. Efectos en la internalización y toxicidad celular dependiente de la carga superficial de la NPAu.....	17
Figura 8. Biodistribución de NPs dependiente de su interacción con proteínas plasmáticas.....	20
Figura 9. Resumen propuesta de trabajo.....	24
Figura 10. Espectro UV-Visible de NPAu-e estabilizadas en citrato.....	38
Figura 11. DLS de NPAu-e estabilizadas en citrato.....	39

Figura 12. Potencial Zeta NPAu-e estabilizadas en citrato.....	39
Figura 13. Espectros UV-Visible de NPAu-e funcionalizadas con PEGs.....	40
Figura 14. DLS de NPAu-e-S-PEG-OMe.....	41
Figura 15. DLS de NPAu-e-S-PEG-OMe/COOH.....	41
Figura 16. Potencial Zeta NPAu-e de NPAu-e funcionalizadas con PEGs.....	42
Figura 17. Estabilidad en el tiempo de DLS y potencial Zeta muestras distintas proporciones de HS-PEG-COOH.....	45
Figura 18. Estabilidad a pH 3, 7 y 9 de DLS y potencial Zeta muestras distintas proporciones de HS-PEG-COOH.....	46
Figura 19. Espectros UV-Visible de NPAu-e-S-PEG-OMe/COO-NH-CD.....	47
Figura 20. DLS y potencial Zeta de NPAu-e-S-PEG-OMe/COO-NH-CD.....	48
Figura 21. Reacción Fluorescamina.....	49
Figura 22. Curva de calibración CD-NH ₂	50
Figura 23. Grado de funcionalización de NPAu-e-S-PEG-OMe/COOH con CD- NH ₂	52
Figura 24. Espectros XPS correspondientes a la señal Au4f _{7/2} y Au4f _{5/2} del oro.....	54

Figura 25. Análisis por XPS de las contribuciones de carbono C1s.....	56
Figura 26. Análisis XPS de la energía de ligadura del S2p de los PEGs.....	58
Figura 27. Imágenes TEM de las distintas muestras estudiadas.....	60
Figura 28. Esquema ensayo PAMPA.....	61
Figura 29. Ensayo penetración celular en neuroblastoma SH-SY5Y.....	64
Figura 30. Ensayo MTS en neuroblastoma SH-SY5Y.....	66
Figura 31. Ensayo LDH en neuroblastoma SH-SY5Y.....	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Máxima absorbancia UV-Visible estabilidad en el tiempo.....	43
Tabla 2. Valores Uv-Visible, DLS y potencial Zeta estabilidad al variar la fuerza iónica.....	43
Tabla 3. Máxima absorbancia UV-Visible estabilidad a pH 3, 7 y 9.....	43
Tabla 4. Límite de detección y cuantificación ensayo fluorescamina.....	50
Tabla 5. Resumen valores UV-Visible, DLS y potencial Zeta de los distintos sistemas.....	53
Tabla 6. Diámetros observados en TEM de NPAu funcionalizadas.....	59
Tabla 7. Permeabilidad efectiva determinada por ensayo PAMPA.....	62
Tabla 1s. Valores fluorescencia CD-NH ₂ mediante fluorescamina.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS

Aβ Péptido	β -amiloide
ATAβ	Agregados tóxicos del péptido β - amiloide
BHE	Barrera hematoencefálica
CCHEN	Comisión Chilena de Energía Nuclear
CD	Ciclodextrina
CD-NH₂	Ciclodextrina monoamino
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio
DLS	Dispersión dinámica de la luz
DOX	Doxorrubicina
EA	Enfermedad de Alzheimer
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
EPR	Efecto de permeación y retención

HS-PEG-COOH	Polietilenglicol tiolado con terminal carboxi
HS-PEG-OMe	Polietilenglicol tiolado con terminal metoxi
LC	Límite de cuantificación
LD	Límite de detección
LDH	Lactato deshidrogenasa
MTS	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-5-[3- carboximetoxifenil]-2-[4-sulfofenil]-2H- tetrazolio
NHS	N-hidroxisuccinimida
NPAu	Nanopartícula de oro
NPAu-e	Nanopartícula de oro esférica
NPAu-e-S-PEG-OMe	Nanoesfera de oro funcionalizada con HS-PEG-OMe

NPAu-e-S-PEG-OMe/COOH	Nanoesfera de oro funcionalizada con HS-PEG-OMe y HS-PEG-COOH
NPAu-e-S-PEG-OMe/COO-NH-CD	Nanoesfera de oro multifuncionalizada con HS-PEG-OMe, HS-PEG-COOH y CD-NH ₂
NvAu	Nanovarilla de oro
P_e	Permeabilidad efectiva
PAMPA	Permeabilidad de membrana artificial en paralelo
PEG	Polietilenglicol
RES	Sistema retículo endotelial
SPR	Resonancia de plasmón superficial
TA	Transcitosis adsortiva
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
THR	Péptido THRPPMWSPVWP
TMR	Transcitosis mediada por receptores

TMT

Transcitosis mediada por transportador

XPS

Espectroscopía de fotoelectrones

generados por rayos X

RESUMEN

Nanopartículas de oro multifuncionalizadas: Su interacción con membranas fosfolipídicas y sus efectos sobre la viabilidad celular.

Las nanopartículas de oro (NPAu) han sido ampliamente utilizadas en el tratamiento de diferentes patologías como cáncer o enfermedades neurodegenerativas, ya que poseen distintas propiedades físicas y químicas, como una alta área superficial, el efecto de permeación y retención (EPR), y la resonancia plasmónica de superficie (SPR), entre otras. Dentro de las enfermedades neurodegenerativas, la enfermedad de Alzheimer (EA) es una de las más relevantes, siendo su principal blanco terapéutico los agregados tóxicos de la proteína β -amiloide (ATA β). Es por esto, que se busca llegar a estos ATA β y disgregarlos localmente a través del uso de NPAu mediante su capacidad de absorber grandes cantidades de energía y disiparlas en forma de calor, sin producir daño del tejido biológico. Estudios de biodistribución realizados *in vivo* en nuestro laboratorio demostraron que NPAu funcionalizadas con el péptido CLPFFD que reconoce a los ATA β , llegan al cerebro en una proporción muy baja en relación a la dosis inyectada (aproximadamente 0,05%), ya que quedan retenidas en el hígado y bazo posiblemente debido a su interacción con células del sistema retículo endotelial. Es por esto, que se hace imprescindible aumentar la biodisponibilidad de las NPAu para aumentar su llegada al cerebro. Para este propósito, nanopartículas esféricas de oro (NPAu-e) fueron

multifuncionalizadas con polietilenglicol (PEG) y ciclodextrinas aminadas (CD-NH₂), con el fin de obtener un nanosistema que penetre en modelos de membrana y que no poseyera efectos sobre la viabilidad celular.

Las NPAu-e fueron funcionalizadas con dos tipos de PEG; el HS-PEG-OMe, el cual evita interacciones inespecíficas y el HS-PEG-COOH, el cual posee un grupo carboxílico que permite la unión con el grupo amino terminal de CD-NH₂ empleando la reacción 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida/N-hidroxisuccimida (EDC/NHS). Las NPAu-es obtenidas fueron caracterizadas por dispersión dinámica de la luz (DLS), potencial Zeta, espectroscopía de fotoelectrones generados por rayos X (XPS) y microscopía electrónica de transmisión (TEM), observándose cambios en los parámetros fisicoquímicos que dan cuenta de la multifuncionalización de los nanosistemas. Además, se evaluó la estabilidad de los conjugados en el tiempo (7 días), a distintos pHs (3, 7, 9) y al cambiar la fuerza iónica (150 mM de NaCl) realizando variaciones en la proporción HS-PEG-OMe/HS-PEG-COOH, obteniéndose una proporción óptima. Se determinó mediante el ensayo de fluorescencia con fluorescamina el grado de funcionalización de las nanopartículas con CD-NH₂. Utilizando el ensayo *in vitro* de permeabilidad de membrana artificial en paralelo (PAMPA) y ensayos de penetración celular con la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y, se determinó si los cambios en las propiedades fisicoquímicas y la incorporación de CDs aumentan la permeabilidad de los conjugados a través de membranas. Además, mediante los ensayos de viabilidad celular MTS y LDH,

se evaluó si los nanosistemas utilizados durante esta tesis tenían efectos citotóxicos en la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y debido a los cambios en sus propiedades fisicoquímicas.

Los resultados obtenidos dan cuenta de que se obtuvo un sistema estable bajo las condiciones estudiadas (tiempo, pH y fuerza iónica), y que además dicha estabilidad está influenciada por la proporción entre los dos PEGs que se utilizaron durante esta tesis. Por otro lado, los nanosistemas no mostraron efecto citotóxicos bajo las condiciones estudiadas. Finalmente, no se observó un aumento en la permeabilidad de las NPAu-e al incorporar ciclodextrinas, tanto en el ensayo de modelos de membrana, ni en el ensayo de penetración celular.

SUMMARY

Multifunctionalized gold nanoparticles: Interaction with phospholipidic membranes and their effects on cell viability.

Gold nanoparticles (NPAu) have been used in the treatment of different pathologies as cancer and neurodegenerative diseases, due to their physical and chemical properties, like a high surface area, permeation and retention effect (EPR), and the surface plasmon resonance (SPR), among others. Within the neurodegenerative disorders, the Alzheimer's disease (EA) is one of the most relevant, being the β -amyloid protein toxic aggregates (ATA β) their principal therapeutic target. For this reason, its pretends to reach to these ATA β and locally disaggregate them through the use of NPAu and their capacity to absorb high amounts of energy and dispel it like heat, with no harm on biological tissue. *In vivo* biodistribution experiments in our laboratory demonstrated that NPAu functionalized with CLPFFD peptide, that recognized ATA β , reach the brain in a very low proportion compared to the injected dose (0,05% approximately), because they stay retained in liver and spleen for their interaction with endothelial reticular system cells. For this reason, its essential increase the NPAu's biodisponibility to enhance their brain delivery. For this purpose, spherical gold nanoparticles (NPAu-e) were multifunctionalized with polyethylenglycol (PEG) and amino-cyclodextrins (CD-NH₂) to obtain a

nanosystem that penetrate membrane models and do not have effects on cell viability.

NPAu-e were functionalized with two types of PEGs; HS-PEG-OMe, which avoid nonspecific interactions and HS-PEG-COOH, which has a carboxylic group that allow the amino group binding of CD-NH₂, using 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide/N-hydroxysuccinimide (EDC/NHS) reaction. NPAu were characterized by dynamic light scattering (DLS), Zeta potential, X-ray photoelectron microscopy (XPS) and transmission electron microscopy (TEM), showing changes in their physicochemical parameters that notice the multifunctionalization of the nanosystems. Further, the stability of the conjugates, with variable proportion of HS-PEG-OMe/HS-PEG-COOH, were evaluated in time (7 days), different pHs (3, 7, 9) and modifying ionic force (NaCl 150 nM). By fluorescamine assay, the degree of functionalization of NPAu with CD-NH₂ was determined. Using *in vitro* permeability assay PAMPA and cellular penetration assays, with SH-SY5Y neuroblastoma line cell, it was determined if the changes in the physicochemical properties and the incorporation of CDs enhance the permeability of the conjugates through membranes. Moreover, through MTS and LDH viability assays, it was evaluated if the changes in the physicochemical properties of the nanosystems used in this thesis had cytotoxic effects on SH-SY5Y cell lines.

Results obtained show that the nanosystem was stable under the studied conditions (time, pH, ionic force), and this stability is influenced by PEGs proportion used. On the other hand, the nanosystems did not show cytotoxic effects under the studied conditions. Finally, it was not observed an enhancement in the NPAu-e permeability in the membrane model and cellular penetration assays, when the cyclodextrin was incorporated.

Introducción

1.1 Nanopartículas de oro: características y aplicaciones.

La nanotecnología es un campo emergente que ofrece un enorme potencial para el desarrollo de terapias y metodologías de diagnóstico, tanto biológico como analítico. Entre los distintos tipos de nanopartículas, las nanopartículas de oro (NPAu) son ampliamente utilizadas en aplicaciones biomédicas, incluyendo imagenología (1, 2), biosensores (3, 4), entrega de genes (5, 6) y drogas (7). Lo anterior, debido a que poseen distintas propiedades físicas y químicas apropiadas (8), como por ejemplo el tener una alta área superficial, lo cual permite acoplar distintos agentes como fármacos, incrementando su solubilidad, estabilidad, los parámetros farmacocinéticos y posibilitar el direccionamiento hacia el blanco terapéutico (9). Por otro lado, las nanopartículas pueden atravesar membranas y penetrar las células por distintos mecanismos, lo que permite que su acción se ejerza en el interior de las mismas (5, 6) pudiendo también promover la entrega de fármacos o *drug delivery* (5, 8, 9). Además, se ha observado que se acumulan en grandes cantidades preferentemente en los tejidos tumorales en relación a los tejidos sanos, lo cual es debido al denominado efecto de permeación y retención (EPR) que se da en los tumores producto de irregularidades en el endotelio vascular (10). Las NPAu poseen propiedades ópticas que se dan por la interacción de la radiación electromagnética con los electrones confinados en la superficie de la partícula

produciendo el fenómeno de resonancia plasmónica de superficie (SPR). La mencionada interacción conlleva a una gran absorción y disipación local de energía que puede ser utilizada para la destrucción de células tumorales o de agregados tóxicos de proteínas como β -amiloide involucrados en la enfermedad de Alzheimer. Esto último es muy relevante para el desarrollo de sistemas con fines terapéuticos en cáncer o enfermedades neurodegenerativas. Asimismo, las NPAu al interactuar con la radiación producen dispersión de la misma pudiendo ser empleadas para la detección de células tumorales logrando aumentar la resolución de imágenes y así mejorar el diagnóstico (11).

La irradiación de nanopartículas con una longitud de onda significativamente mayor a su tamaño, produce una oscilación colectiva de electrones conocida como SPR (Figura 1) (11, 12). En el caso de las NPAu, la frecuencia de resonancia de esta oscilación colectiva se encuentra en el rango visible del espectro electromagnético (13). La radiación absorbida es liberada rápidamente como energía en forma de calor, provocando un incremento en la temperatura de manera localizada (11). La longitud de onda a la cual se produce el SPR depende del tamaño y forma de la partícula. En el caso de nanopartículas de oro esféricas (NPAu-e), a medida que aumenta el diámetro de la nanopartícula, hay un cambio en la banda del SPR hacia mayores longitudes de onda (1).

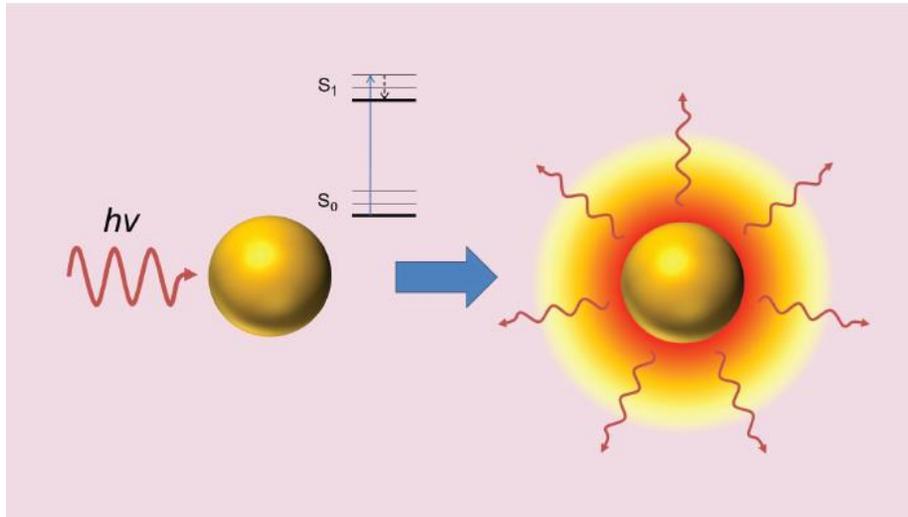


Figura 1: Efecto fototérmico en nanopartículas de oro. Al irradiar (radiación visible o cercana al infrarrojo dependiendo de la banda plasmónica de la NPAu), la nanopartícula de oro absorbe la luz ($h\nu$: fotón de luz). La absorción de energía lleva a una transición electrónica de los electrones de la superficie de un estado basal (S_0) a un estado excitado (S_1). La energía es disipada a los alrededores de la nanoestructura como calor local en todas las direcciones. Extraído de la referencia 12.

Un aspecto importante a tener en cuenta para el uso de nanopartículas son los potenciales efectos tóxicos que podrían presentar los nanomateriales los cuales están muy relacionados con sus propiedades fisicoquímicas (carga, tamaño, recubrimiento de la superficie, ligandos, etc.) (14-16).

1.2 Uso de NPs metálicas para una posible terapia contra la enfermedad de Alzheimer.

Dentro del área de la neurociencia, el uso de nanomateriales tiene como uno de sus objetivos contribuir al desarrollo de nuevas terapias para el tratamiento de

enfermedades neurodegenerativas, como lo son el Parkinson, la enfermedad de Alzheimer (EA), la esclerosis amiotrófica lateral, etc, las cuales tienen como característica principal su aparición tardía en la vida, anormalidades sinápticas, y la presencia de agregados de proteínas mal plegadas en el cerebro, lo cual se asocia a la extensiva pérdida neuronal (17).

El uso de nanopartículas como plataforma para el tratamiento, diagnóstico para diversas patologías aparece como un campo prometedor. En los últimos años, se ha propuesto que las propiedades físicas y químicas de las NPs metálicas, como lo son las NPAus, pueden emplearse para la destrucción de tumores o agregados proteicos tóxicos.

1.2.1 Funcionalización de NPAus con péptidos para destruir selectivamente agregados tóxicos de la proteína β -amiloide.

Recientemente en nuestro laboratorio se demostró que el uso de NPAu-e y nanovarillas de oro (NvAu) recubiertas con el péptido CLPFFD son útiles para la destrucción de agregados tóxicos de la proteína β -amiloide (ATA β), involucrados en la EA, a través de la liberación local de calor producida por parte de las NPAu luego de ser irradiadas con láseres o microondas (18, 19). El péptido anfipático CLPFFD, denominado así por la secuencia de sus aminoácidos (Cys-Leu-Pro-Phe-Phe-Asp), reconoce selectivamente los ATA β

(20, 21). Además, incrementa la estabilidad de las NPs mediante un efecto estérico y favorece el traspaso a través de la barrera hematoencefálica (BHE) (18, 22). La obtención de los complejos de fibras amiloides unidos a las NPAu-e se realizó mediante la incubación del conjugado NPAu-e-CLPFFD con una solución de $A\beta_{1-42}$ durante 7 días. Al ser irradiados estos complejos con microondas, se produjo una transferencia de energía por absorción, la cual se disipó localmente produciendo la destrucción de los $ATA\beta$, sin producir un aumento significativo de la temperatura en el entorno (Figura 2).

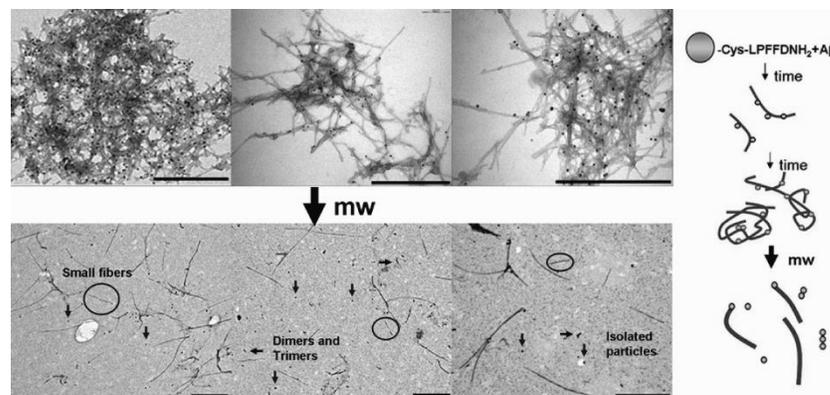


Figura 2: Imágenes de TEM antes y después de irradiar con microondas. Las NPAu-es funcionalizadas con CLPFFD se unen a los agregados de $A\beta_{1-42}$ que luego son desagregados por efecto de la irradiación con campos magnéticos oscilantes durante 8 hrs. Extraído de la referencia 18.

La principal causa de demencia en los adultos mayores es la EA, la cual es una enfermedad neurodegenerativa crónica y progresiva que está descrita clínicamente como un impedimento en el aprendizaje y en la memoria, y patológicamente como una atrofia cerebral, indicativa de pérdida neuronal. En la EA, se encuentran presentes en el cerebro dos estructuras patológicas como son los filamentos helicoidales intraneuronales de la proteína *tau*

hiperfosforilada y las placas extracelulares compuestas por el péptido β -amiloidé ($A\beta$) que puede contener en su secuencia de 40 hasta 42 residuos (H_2N -¹DAERFHDSGYEEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA⁴²- CO_2H) y que posee una elevada capacidad amiloidogénica y toxicidad (23). Se ha establecido que los monómeros inocuos de $A\beta$ se vuelven neurotóxicos una vez que se agregan (24), dando origen a diferentes especies como oligómeros, protofibrillas, fibras amiloides etc. (25). La agregación de $A\beta$ es un proceso complejo de varios pasos que se inicia con cambios conformacionales que incluyen agregados amiloidogénicos prefibrilares intermedios (PIAAs) como las protofibrillas, amiloesféroides, fibras cortas, etc. Aunque se asume que la fibra madura (estado final en el proceso de agregación) es una especie tóxica, los PIAAs son aún más nocivos (26). Es por esto que los estudios para tratar y diagnosticar la EA tienen como principal blanco terapéutico el $A\beta_{1-42}$ en todas sus formas de agregación.

En estudios realizados *in vitro* en nuestro laboratorio, se determinó la afinidad del conjugado NPAu-e por los $ATA\beta$ (27) observándose que la secuencia peptídica tiene una gran influencia sobre la afinidad por los mencionados agregados, sobre el grado de funcionalización de la superficie y sobre la estabilidad coloidal. Es así que al modificar la secuencia CLPFFD por CDLPFF se reduce el grado de funcionalización y disminuye la estabilidad coloidal (Figura 3), ya que al cambiar la posición del residuo D, cambia la disposición de

la molécula sobre la superficie de la nanopartícula de oro. *Por lo cual la funcionalización de las partículas determina las propiedades fisicoquímicas del coloide.*

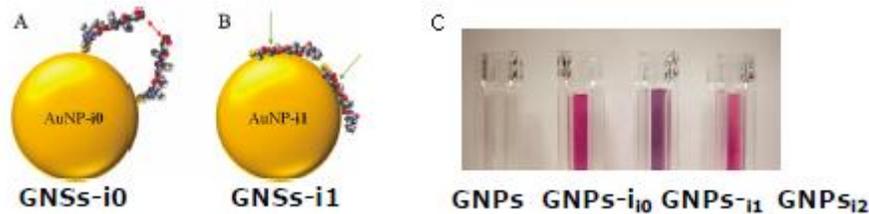


Figura 3: Disposición de los péptidos en la superficie de oro. Las moléculas del péptido i0 (a) están orientadas ortogonalmente, mientras que las i1 (b) están orientadas horizontalmente. NPAus después de congelar, y descongelar la solución estudiada (c). Las soluciones incoloras o moradas son inestables, mientras que las rojas son coloides estables (i0: CLPFFD, i1: CDLPFF, i2: CLPDDF). Extraído de la referencia 27.

Por otro lado, estudios realizados para determinar la biodistribución del conjugado NPAu-e-CLPFFD han demostrado que éste llega en muy baja proporción al cerebro en relación a la dosis inyectada (aprox. 0,05%) (21), lo cual es un punto importante debido a que el blanco terapéutico de estas NPAu para tratar la EA son los $ATA\beta$ presentes en el cerebro. La causa de que el conjugado llegue en baja cantidad al SNC se debe a que es retenido principalmente en el hígado y bazo, lo cual posiblemente es debido a su interacción con células del sistema del retículo endotelial (RES). *Es por esto que para que el uso de las NPAu sea efectivo, es necesario mejorar su llegada al cerebro, a través de estrategias que mejoren su biodisponibilidad hacia el sistema nervioso central.*

1.3 Estrategias para aumentar la llegada de las NPs hacia el cerebro.

1.3.1 Mecanismos de ingreso al cerebro de los xenobióticos a través de la barrera hematoencefálica.

En la actualidad los agentes farmacéuticos utilizados para el tratamiento de la EA tienen un uso limitado debido a la presencia de la BHE, la cual es una defensa única y altamente selectiva que aísla el sistema nervioso central de otras partes del cuerpo, proporcionando de esta manera un ambiente estable para la función neuronal. Es por esta barrera, que más del 98% de las moléculas pequeñas y el 100% de las moléculas grandes (peso molecular > 1kD) con fines farmacéuticos no pueden llegar al cerebro (28).

La BHE está formada por células endoteliales del cerebro que recubren los microvasos cerebrales. Además, la constituyen otros tipos celulares que rodean el endotelio, como los astrocitos y peritrocitos (29). La relativa impermeabilidad de la BHE es debido a la presencia de uniones estrechas o *tight junctions* entre las células endoteliales capilares, las cuales están formadas por moléculas de adhesión celular. Sumado a esto, la BHE tiene sistemas enzimáticos que protegen al cerebro, los cuales a través de ecto y endo enzimas presentes dentro de las células endoteliales, degradan los solutos que atraviesan la

membrana celular. Por lo tanto, para lograr cruzar la BHE y alcanzar el cerebro, la mayoría de las moléculas deben interactuar con transportadores específicos y/o receptores expresados en el lado luminal de las células endoteliales o también por mecanismos pasivos como la difusión a través de membranas (30). De esta manera, el ingreso de principios activos administrados por vía intravenosa (i.v.) para alcanzar el sistema nervioso central podría seguir alguno de los mecanismos descritos en la Figura 4:

a) Difusión pasiva: Es un mecanismo no saturable e independiente de energía. Muchos péptidos de gran tamaño ingresan mediante difusión, dependiente del gradiente de concentración entre ambos lados de la BHE, siendo utilizados como lanzaderas para el ingreso de fármacos (31, 32).

b) Transporte paracelular: Es un mecanismo pasivo utilizado por moléculas hidrofílicas. Es altamente regulado por las uniones estrechas o *tight junctions* presentes en las células que conforman la BHE, las cuales bloquean la entrada de moléculas solubles en agua, incluyendo fármacos polares (30, 31).

c) Transcitosis mediada por transportadores (TMT): Este proceso es dependiente de energía e involucra los transportadores de glucosa, aminoácidos catiónicos y neutros y bases purinas. Es sustrato selectiva y solo transportará moléculas que se parezcan al sustrato endógeno, por lo cual, está limitado por la competencia con sustratos endógenos. (33, 34).

d) Transcitosis adsortiva (TA): Es la ruta por la cual sustancias altamente catiónicas interactúan con ciertas zonas que presentan cargas negativas de la membrana plasmática (por ej. proteoglicanos) para ingresar al cerebro. Corresponde a un transporte activo y es utilizado por péptidos que penetran células (*cell-penetrating peptides* o CPPs) y no involucra ningún receptor de membrana. (34,35).

e) Transcitosis mediada por receptores (TMR): Es un proceso dependiente de energía e incluye receptores de transferrina, receptores de insulina, receptores de lipoproteína de baja densidad, y otros receptores similares, por lo que es uno de los mecanismos más prometedores para el transporte de moléculas a través de la BHE. Es un proceso de tres pasos: unión del ligando al receptor por el sector luminal y posterior endocitosis, movimiento través del citoplasma endotelial, y exocitosis del compuesto hacia el sector abluminal (cerebro) (36).

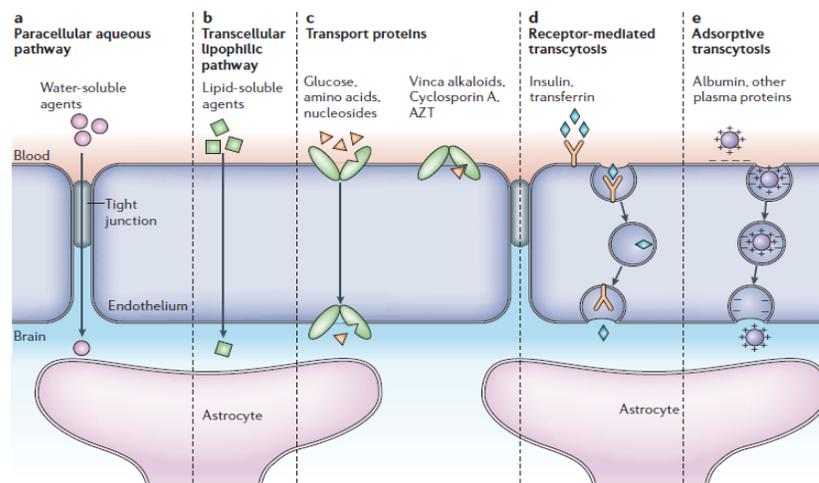


Figura 4: Mecanismos de transporte a través de la BHE. Tanto la vía paracelular (a) y la vía transcelular (b) son independientes de energía. Mientras que el transporte activo en la BHE es a través de TMT (b), TMR (c) y TA (e). Extraído de la referencia 30.

Además, las células endoteliales cerebrales expresan una alta cantidad de transportadores de eflujo como la glicoproteína P (P-gp). Estos últimos regulan la entrada de moléculas al cerebro promoviendo la liberación luminal de compuestos, siendo importantes en la remoción de sustancias dañinas al cerebro lo que conlleva a una reducción de posibles efectos tóxicos (37). Una estrategia para evitar la salida de fármacos del sistema nervioso central es la inhibición de las bombas de eflujo, siendo un claro ejemplo el efecto inhibitorio producido por los poloxámeros (38).

1.3.2 Estrategias para aumentar la entrega de NPs al cerebro.

Las estrategias existentes para la entrega de principios activos al sistema nervioso central se basan en la modificación química de éstos con el fin de aprovechar los sistemas de transporte que se encuentran en la barrera, o a través de la conjugación de ligandos que reconozcan los receptores expresados en la BHE. Dentro de este punto, es la transcitosis mediada por receptor la vía de transporte por la cual la comunidad científica ve una de las mayores probabilidades de tener éxito en traspasar dicha barrera (39).

Con el fin de mejorar la entrega al cerebro, nuestro grupo funcionalizó NPAu con un constructo peptídico formado por la secuencia CLPFFD (reconoce $\text{ATA}\beta$) y con la secuencia THRPPMWSPVWP (THR) (40). Esta última

secuencia peptídica interactúa con el receptor de transferrina presente en las células endoteliales microvasculares de la BHE, lo que resultó en un incremento en la permeabilidad del conjugado al cerebro tanto en experimentos *in vitro* como *in vivo*. El mecanismo por el cual el conjugado NPAu-THR-CLPFFD interactúa con la membrana celular es dependiente de su conformación y carga. La hidrofobicidad del péptido LPFFD permite que el conjugado se acerque a la membrana celular, y por ende, al receptor de transferrina. En este punto, el péptido THR interactúa con el receptor generando un mecanismo de transporte activo (probablemente TMR). Sin embargo, otro mecanismo donde el conjugado interactúe con proteínas plasmáticas, como resultado de la presencia de LPFFD, no puede ser descartado. Además, este conjugado incrementó el número de NPAu que selectivamente llegaron a los ATA β .

1.4 Importancia de las características fisicoquímicas en el comportamiento biológico de las NPs.

Para el posible uso farmacéutico de las NPAu es importante considerar los distintos factores que puedan generar alguna interacción inespecífica que altere la penetración, biodisponibilidad y toxicidad de la partícula. Además de la vía de administración y farmacocinética, la estabilidad de la NPAu juega un rol fundamental, la cual es dependiente del tamaño, forma, la carga y el recubrimiento de la partícula. Lo anterior, debido a que la interacción primaria

entre la NP y los constituyentes de la membrana determinarán su tránsito hacia el interior de las células.

Se ha demostrado que el tamaño de las NPAus juega un rol importante en su proceso de internalización celular (Figura 5) (14, 41). Las NPAu-es de 5 nm son internalizadas por difusión pasiva pudiendo difundir a través de poros transitorios sin que se produzca disrupción de la membrana celular. Las nanopartículas de tamaños más grandes, de 20 a 50 nm, son internalizadas por endocitosis, mientras que las NPAus de tamaños mayores a 70 nm no son internalizadas eficientemente. Por lo tanto, se puede decir que la internalización celular de las NPAus es inversamente proporcional a su tamaño. Sin embargo, es importante mencionar que la razón y alcance de internalización de la NP puede variar entre distintas líneas celulares (42). Asimismo, factores fisicoquímicos como la hidrofobicidad de las NPs lleva a que éstas sean retenidas por elementos celulares del sistema retículo endotelial (ej: macrófagos), siendo posteriormente acumuladas en el hígado y bazo, disminuyendo su llegada al sistema nervioso central. De esta manera las NPs son excretadas principalmente por vía biliar.

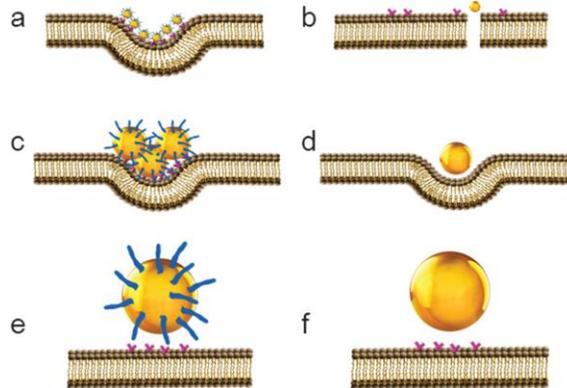


Figura 5: Representación esquemática del efecto del tamaño de la NPAu sobre la interacción con la membrana celular y su posible internalización. En los diagramas (a), (c) y (e) se ejemplifica como las NPAu cubiertas con transferrina son internalizadas a través de TMR. Los diagramas (b), (d) y (f) representan la interacción de NPAu de diferentes tamaños con la membrana celular. (a) y (b) corresponden a NPAu de 4 a 14 nm; (c) y (d) representan NPAu desde los 30 a 50 nm; (e) y (f) representan NPAu > 70 nm. Esquemas adaptados y modificados de las referencias 14 y 43.

La captura celular de NPs es también dependiente de la forma (14). Se ha observado que la captura de NvAu es menor que la de las NPAu-es para nanopartículas que poseen el mismo volumen. Una de las razones podría ser la diferencia en la curvatura de las distintas formas de las NPs. Por ejemplo, las NvAu pueden tener una mayor área de contacto con los receptores de la membrana celular que las nanoesferas cuando el eje longitudinal de la barra interactúa con los receptores. Esto podría reducir el número de receptores disponibles para la unión. Una segunda razón podría ser la cantidad de moléculas de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) presentes en la superficie de las NvAus durante su síntesis. Si el CTAB está presente en la superficie, las proteínas séricas no serán capaces de unirse a la superficie de la NP eficientemente. De esta manera, la cobertura de proteínas sobre la superficie de

la NvAu no será homogénea. En ambos casos, las proteínas de la superficie de las NvAu no se unirán a los receptores de la superficie celular de manera adecuada. Los datos experimentales muestran que mientras mayor es la relación de aspecto largo/ancho, menor es la captura respecto a NvAu que poseen relación de aspecto más pequeña (43).

Estudios recientes han demostrado que la captura celular de NPAus se ve significativamente afectada por la carga superficial de las NPs (44, 45, 46). La eficacia en la internalización de nanopartículas cargadas positivamente es mayor que para las cargadas negativamente o neutras. Las NPs cargadas negativamente tienden a ser retenidas más eficientemente por el RES y son removidas de la circulación sanguínea. Las NPs cargadas positivamente deberían adherirse a la membrana celular cargada negativamente y esto facilitaría su mayor captura celular. Un estudio de Cho *et al.* demuestra que la internalización de NPAu-es por células SK-BR-3 es dependiente de su densidad de carga superficial, donde las NPs cargadas positivamente exhiben una mayor internalización comparadas con las nanoesferas neutras o cargadas negativamente (44). Notablemente las NPs catiónicas pasan a través de la membrana celular mediante la generación de poros transitorios, un proceso que podría asociarse con la citotoxicidad (Figura 6), ya que también se ha visto que pueden inducir procesos de hemólisis y agregación plaquetaria.

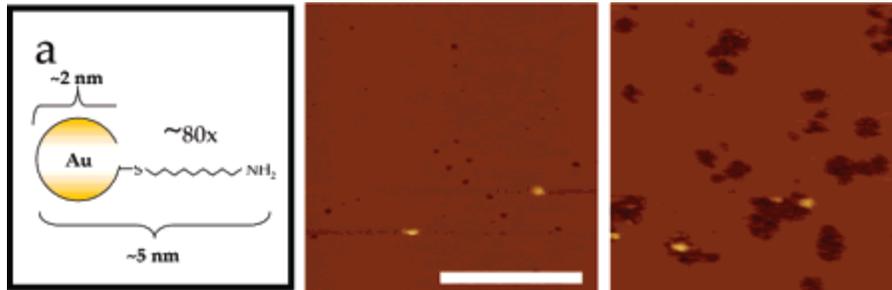


Figura 6: Imágenes de microscopía de fuerza atómica de una bicapa lipídica sobre una superficie de mica en presencia de NPAu-NH₂ (a). NPAu- NH₂ incubada en una bicapa lipídica (b). Después, las NPAus expandieron los agujeros pre-existentes (c). Escala de 500 nm. Extraído de la referencia 45.

Las interacciones con ciertas moléculas de superficie en la membrana celular serían las responsables de facilitar la captura de NPAus cargadas negativamente. Un cierto nivel de densidad superficial de carga de la NPAu proporcionaría un balance entre la internalización celular y la citotoxicidad para alcanzar una eficiencia de entrega óptima (Figura 7). Es por esto que resulta imprescindible determinar la carga superficial de la NP que se desea utilizar con fines terapéuticos. En el caso de que el blanco terapéutico sean los ATAβ, que se encuentran en el cerebro, la NPAu debe atravesar la BHE y además evitar unirse a moléculas biológicas que puedan favorecer su captura por otros órganos como el hígado, ya que las NPs cargadas negativamente son fagocitadas por las células de Küppfer, con lo cual disminuye su biodisponibilidad.

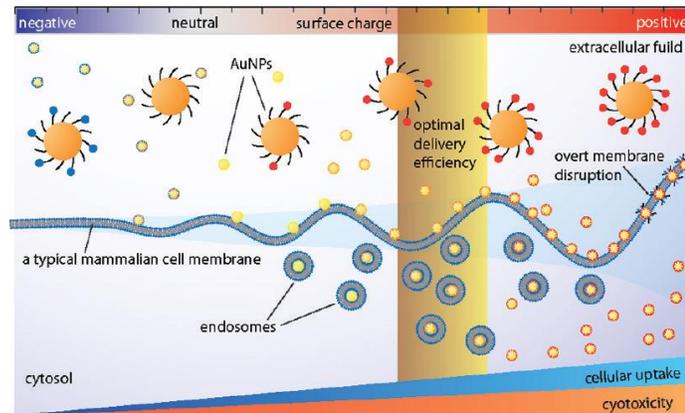


Figura 7: Ilustración esquemática que representa como la densidad en la carga superficial de las NPAu afecta su internalización celular y citotoxicidad en células de mamíferos. Las NPAus catiónicas interactúan con la membrana, mientras que las aniónicas e hidrofóbicas no pueden alcanzar la membrana de manera fácil. Al incrementar la carga superficial de la NPAu, se promueve la internalización pero también la citotoxicidad. Extraído de la referencia 46.

Para comprender de mejor manera el proceso de internalización celular de las NPAus, es necesario considerar los componentes biológicos en el medio que podrían interactuar con las NPs para formar la “corona de proteínas” (47). Este concepto es importante y puede influenciar las propiedades superficiales, carga, hidrofobicidad y estabilidad coloidal. Más aun, el “capping” de proteínas puede determinar la interacción de las NPs con las membranas y su subsecuente internalización. Lo anterior, ha sido investigado mediante la funcionalización de NPs con distintas proteínas (por ejemplo EGF, transferrina) y se encontró que estas proteínas unidas a las NPAus tienen propiedades similares en la internalización que las NP cubiertas con proteínas séricas (43). Sin embargo, la internalización de NPs funcionalizadas es menor que para las que están cubiertas con proteínas séricas, lo cual es consistente considerando, que por ejemplo, la transferrina representa solo un tipo de proteína en el medio celular y

las células presentan múltiples tipos de receptores, disminuyendo la densidad superficial de receptores de transferrina. Como resultado, los receptores de transferrina son rápidamente saturados por las NPAus cubiertas de transferrina mientras que para las nanopartículas cubiertas de proteínas séricas, la densidad superficial de receptores disponibles es mucho mayor, debido a que muchos tipos de receptores están disponibles. Después de cortos periodos de incubación, la corona proteica está constituida principalmente por fibrinógeno y albumina, los cuales se encuentran predominantemente en la sangre. Sin embargo, esto es dependiente de la funcionalización de la NP. Luego de largos períodos, las proteínas menos abundantes con mayor afinidad las desplazan. Esto es, la unión que podría promover la fagocitosis y retención mediada por receptores de células pertenecientes al RES. La eficacia en la internalización de NPs puede ser aumentada aprovechando la relación ligando-receptor para células que sobreexpresen un determinado tipo de receptor. *Es aceptado que la unión de proteínas plasmáticas tiene un efecto en la biodistribución de las nanopartículas in vivo (48).*

1.5 Utilización de polietilenglicol en NPs como agente estabilizante.

La estabilidad de las NPAus en un determinado medio, y el tiempo de circulación *in vivo*, puede ser incrementada utilizando distintos agentes como el polietilenglicol (PEG) (49), el ácido mercaptosuccinico, el ácido

mercaptopropionico, ADN, y varios otros polímeros. Mientras más pequeña, neutra y más hidrofílica es la superficie de la nanopartícula, mayor es la vida media en el plasma (48). Para partículas hidrofóbicas, muchos estudios han evaluado el desarrollo de la corona proteica, en donde la corona está formada por macromoléculas hidrofílicas que crean una capa de polímeros, actuando como una barrera estérica de superficie que estabiliza las nanopartículas y reduce la opsonización (Figura 8) (50). El PEG-tiolado (HS-PEG), el cual es un polímero hidrofílico, es uno de los ligandos de superficie más utilizados para incrementar la vida media de circulación de las NPs bloqueando la adsorción de proteínas séricas y el proceso de opsonización (48). El PEG separa las moléculas activas de la superficie de oro, permitiendo así un mejor reconocimiento molecular del blanco (51). Además, el recubrimiento con PEG disminuye el potencial zeta de las NPAu a niveles cercanos a la neutralidad, lo que disminuye las interacciones inespecíficas (52).

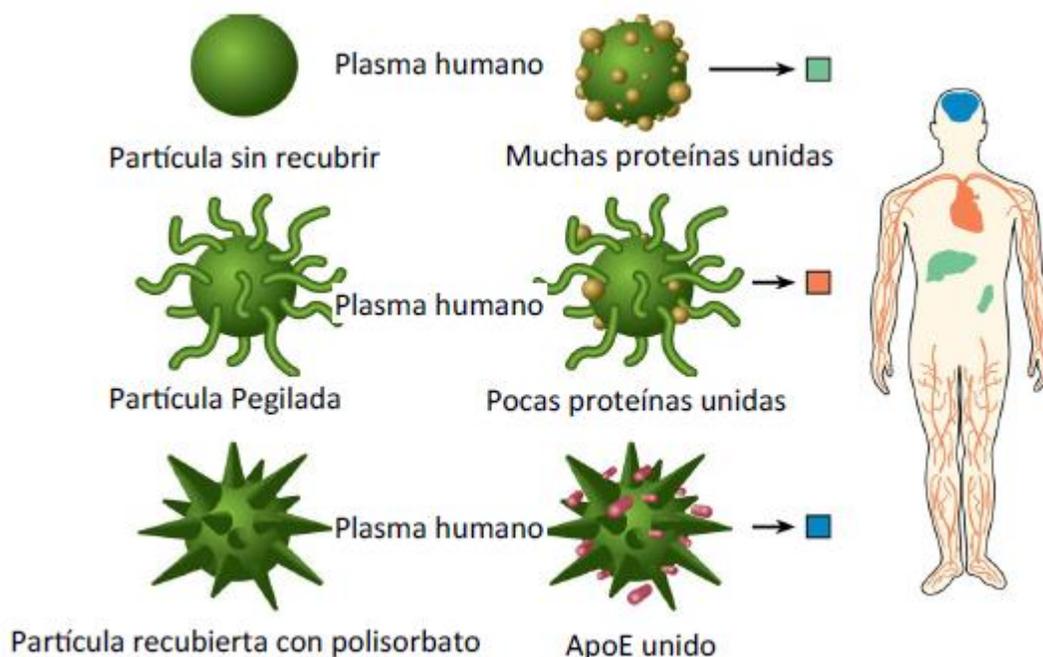


Figura 8. Biodistribución de NP determinada por su interacción con proteínas plasmáticas. Modulación de la distribución de una partícula sin mayor modificación superficial, pudiendo unirse a muchas moléculas plasmáticas, como las opsoninas, por lo cual su acumulación se verá mayoritariamente relacionada a órganos vinculados con el SRE (representado en verde). Una partícula modificada con PEG en superficie, disminuirá este tipo de interacciones, aumentando la disponibilidad para poder entregar fármacos a distintas dianas terapéuticas (representado en rojo). Finalmente, es posible modular el tipo de interacción con proteínas del plasma. Como ejemplo puede mencionarse el recubrimiento con polisorbato, con lo cual se puede inducir la interacción con ApoE y de esta manera favorecer el paso a órganos como el cerebro que presentan receptores a nivel de BHE para ApoE, (representado en azul. Extraído de la referencia 50.

A modo de ejemplo, Niidome *et al.* inyectaron por vía intravenosa NvAus modificadas con PEG, donde se observó que permanecen en circulación por un período de tiempo más largo que las NvAus sin modificar, lo que disminuye su acumulación en el hígado (53). Por otro lado, se ha observado que en liposomas recubiertos con PEG, el tiempo de circulación es aproximadamente

seis veces mayor que para liposomas sin este recubrimiento, mientras que la cantidad que fue captada por el RES fue tres veces menor (52).

Por último, es importante considerar que la presencia de muchas moléculas de PEG en la superficie de las NPAus podría influir en la interacción con otros grupos en la superficie a través de efectos estéricos, por lo que la densidad superficial de las macromoléculas es también un parámetro crítico.

En este trabajo, las NPAus serán funcionalizadas con PEG con el fin de reducir interacciones no específicas y aumentar la estabilidad de las NPs en el medio biológico. Además, se espera que por la reducción de la carga superficial exista una reducción en la citotoxicidad y en las interacciones con el RES.

1.6 Uso de ciclodextrinas para la entrega de fármacos.

En la actualidad, el estudio de NPs funcionalizadas con ciclodextrinas (CDs) ha sido desarrollado, tanto para usos farmacológicos (54), analíticos (55) o de diagnóstico (56). Las CDs son oligómeros cíclicos formados por unidades de α -D-glucopiranososa que poseen una cavidad central hidrofóbica y una superficie externa hidrofílica. Las más conocidas son las α -, β - y γ -CDs, con seis, siete u ocho unidades de glucosa, respectivamente (57). Estas cavidades son capaces de unir varias moléculas orgánicas o inorgánicas para formar complejos de inclusión estables o agregados supramoleculares sin formación de enlaces

covalentes. Las CDs son capaces de incrementar la biodisponibilidad de fármacos en los sistemas de células Caco-2. Arima *et al.* demostraron que la dimetil- β -CD (DM- β -CD) aumenta la biodisponibilidad del tacrolimus (58). Además, la HP- β -CD y la DM- β -CD incrementan 19 y 22 veces más, respectivamente, el coeficiente de permeabilidad del cosalano (un potente inhibidor del VIH) (59). Ambos trabajos concluyen que las CDs pueden promover el transporte al alterar la fluidez de membrana con una mínima disrupción en la barrera celular. Adicionalmente, se han realizado estudios para evitar posibles efectos tóxicos de las CDs que podría presentarse sobre la BHE (60). Asimismo, los polímeros basados en β -CD han sido ampliamente utilizados para la entrega de fármacos. En un trabajo reciente, nanopartículas poliméricas compuestas por β -CD y segmentos de poli β amino-éster han demostrado no afectar la integridad de modelos *in vitro* de la BHE y no ser citotóxicas (61). Además, demostraron tener un coeficiente de permeabilidad mayor que el obtenido para el dextrano, el cual es utilizado como control. Por otro lado, Gil *et al.* demostraron que la utilización de nanopartículas de β -CD que contienen grupos amonio cuaternario (QA β CD) poseen una gran penetración a través de la BHE facilitando el ingreso de doxorubicina (DOX), un fármaco anticancerígeno hidrofóbico (54). Los complejos DOX/QA β CD presentaron actividad antitumoral respecto de la línea U87 (glioblastoma humano) no mostrando efectos citotóxicos ni perforaciones a nivel de la BHE en modelos *in vitro* de monocapa de BBMVECs. Tilloy y cols. reportaron que la β -

CD y la β -CD metilada incrementan la permeabilidad de DOX (62). Sin embargo, los autores explican que este aumento en la permeabilidad se debe a la extracción de colesterol de las células de capilares endoteliales del cerebro debido al efecto de la β -CD, lo que provocaría un daño neuronal severo. Además, ciertos estudios han demostrado que las CDs pueden tener efectos tóxicos sobre las membranas (62, 63, 64). Utilizando modelos de BHE *in vitro*, Monnaert *et al.* (63) estudiaron la permeabilidad endotelial y toxicidad de γ -CD y de hidroxipropil- γ -CD (HP- γ -CD). Se observó que a mayores concentraciones de CD aumentaba la permeabilidad, pero el efecto se debía a una pérdida en la integridad de la membrana. Resultados similares se obtuvieron al determinar el umbral de toxicidad para distintas CDs (α -, β -, γ -CD), encontrándose que la pérdida de integridad en los modelos *in vitro* de BHE se debe a que las CDs remueven los componentes de la membrana (64), aunque no se pudo encontrar una relación estructura/permeabilidad en las distintas CDs estudiadas. Asimismo, los resultados anteriores pueden ser comparados con estudios realizados en monocapas de células Caco-2, las cuales son utilizadas para predecir la toxicidad o permeabilidad de una droga a través de la BHE.

En esta propuesta, las NPAus se modificarán con CDs con el fin de aumentar la permeabilidad celular de las mismas.

Propuesta de trabajo

En este proyecto NPAus serán multifuncionalizadas con PEGs y ciclodextrinas con el fin de generar nanopartículas estables que penetren en modelos de membrana y que no posean efectos sobre la viabilidad celular. A través del cambio de las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas mediante la funcionalización es posible controlar el grado de penetración a través de las membranas y los efectos sobre la viabilidad celular (Figura 9).

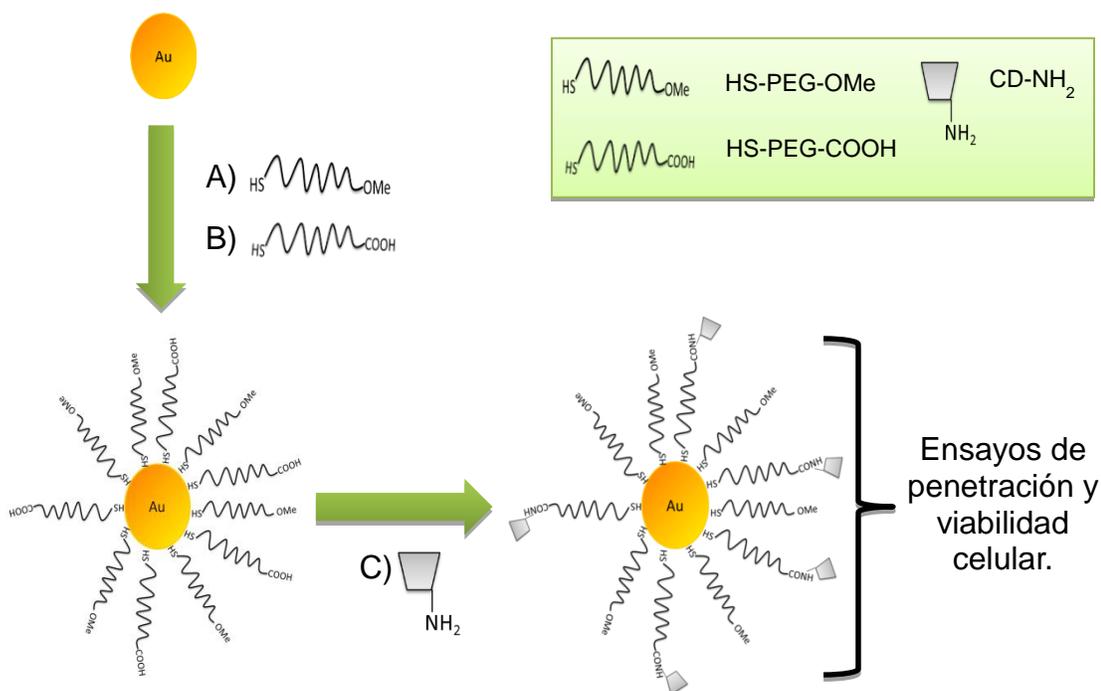


Figura 9. Resumen de la propuesta de trabajo. NPAu serán funcionalizadas con distintos PEGs (A y B). El grupo COOH de los HS-PEG-COOH serán modificados con CD-NH₂ (C) mediante la reacción 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida/N-hidroxisuccinimida (EDC/NHS) para obtener un enlace amida. Posterior a la obtención de las NPAus multifuncionalizadas, se procederá a: a) caracterización fisicoquímica, b) evaluación de permeabilidad en membranas, y c) ensayos de penetración y viabilidad celular.

Hipótesis

La multifuncionalización de Nanopartículas de oro con polietilenglicol y ciclodextrina modifica las propiedades fisicoquímicas generando cambios en la permeabilidad a través de membranas, no afectando la viabilidad celular.

Objetivos

1. Objetivo general

Multifuncionalizar NPAu-es con polietilenglicol y ciclodextrinas y estudiar sus propiedades fisicoquímicas, su permeabilidad celular y sus efectos sobre la viabilidad celular.

2. Objetivos específicos

- 1) Sintetizar NPAu-e y funcionalizarlas con diferentes proporciones de distintos PEG tiolados.
- 2) Modificar con ciclodextrinas aminadas las nanopartículas de oro funcionalizadas con PEG.
- 3) Caracterizar fisicoquímicamente las nanopartículas obtenidas.
- 4) Evaluar la permeabilidad en modelos de membrana fosfolipídicas.
- 5) Evaluar la penetración celular y los efectos sobre la viabilidad celular.

Metodología

1. Síntesis de NPAu-e y funcionalización con polietilenglicol.

Todo el material de vidrio utilizado se lavó previamente con agua regia

1.1) Síntesis de NPAu-e:

Para la obtención de NPAu-e, se utilizó la metodología descrita por Petkova y cols (65). Brevemente: NPAu-e son preparadas por reducción con citrato de H₂AuCl₄. Una solución acuosa de H₂AuCl₄ es llevada a reflujo y luego de 10 min se le agrega una solución acuosa de citrato de sodio 38,8 mM calentada entre 50 y 60°C. Se deja el sistema a reflujo en un balón de fondo redondo durante 30 minutos exactos hasta la obtención de una solución roja oscura. Una vez obtenidas las NPAu-e, el pH se ajusta entre 7-8 utilizando una solución de NaOH diluido. Estas nanopartículas se llevaron a una concentración final de 5 nM con citrato de sodio 1,2 nM:

1.2) Funcionalización de NPAu-e con PEG: Las NPAu-e fueron funcionalizadas con HS-(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂COMe (HS-PEG-OMe) y con HS-(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂COOH (HS-PEG-COOH), en ambos el n fue igual a 100. Estos PEGs contienen un grupo tiol que permite la quimisorción sobre la

superficie de oro. Para la obtención de NPAu-es modificadas con PEG se modificó el protocolo utilizado por Huang y cols (66).

En un vial de vidrio se colocaron 10 mL de la solución 5 nM de nanopartículas obtenidas en 1.1. Posterior a esto, se agregaron 50 μ L de una solución de HS-PEG-OMe a un 1 mg/200 μ L de agua, y se dejaron en agitación durante 10 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, el vial fue sonicado para desprender las NPAu-e adheridas en el vidrio y fue centrifugado durante una hora a 13.200 rpm (8404 g). El sobrenadante fue descartado, y el *pellet* fue resuspendido en 10 mL de agua. Se agregaron 300 μ L de una solución de HS-PEG-COOH a un 1 mg/200 μ L de agua y se dejó en agitación durante 1 hora. Luego, el vial fue sonicado y la solución fue centrifugada a 13.200 rpm (8404 g) durante una hora. Nuevamente se descartó el sobrenadante y el *pellet* fue concentrado y almacenado en 1 mL de agua a 4°C.

1.3) Estudios realizados con distintas proporciones de PEG: En el caso de los estudios que se realizaron con distintas proporciones de PEG, en todos los casos se mantuvo constante la cantidad de HS-PEG-OMe que se agregó (50 μ L a un 1 mg/200 μ L de agua). Las cantidades de HS-PEG-COOH que se agregaron en la segunda etapa fueron las siguientes: a) 0,01 mg/200 μ L b) 0,5 mg/ 200 μ L c) 1 mg/200 μ L d) 2 mg/200 μ L e) 5 mg/200 μ L de agua (muestras

A, B, C, D y E, respectivamente). Para todos los casos, se siguió el mismo protocolo que el descrito en el punto 1.2.

1.4) Estudios de estabilidad en función del tiempo, del pH y de la fuerza

iónica: Los estudios se realizaron en las muestras A, B, C, D y E descritas en el punto 1.3. En el caso de los estudios de estabilidad en el tiempo, las muestras resuspendidas en agua fueron almacenadas a temperatura ambiente durante el periodo de estudio. Los estudios de estabilidad a distintos pH se realizaron mediante la adición de HCl o NaOH (0,5 M) con el fin de obtener el pH deseado. Finalmente, en el caso de los estudios de fuerza iónica, se adicionó una solución de NaCl (3 M) a las distintas muestras con el fin de que la concentración final de NaCl en cada muestra fuera de 150 mM.

2. Modificación con ciclodextrinas aminadas de las nanopartículas funcionalizadas con PEGs.

2.1) Funcionalización de NPAus conjugadas con PEGs con CD-NH₂:

Mediante la reacción 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida/N-hidroxisuccinimida (EDC/NHS) se obtuvo el enlace amida que une el extremo carboxílico de la molécula PEG con el grupo NH₂ de la ciclodextrina (67). Para

activar los grupos carboxílicos del poliéter, se centrifugó durante una hora el conjugado NPAu-e-S-PEG-OME/COOH con el fin de concentrar la muestra. El sobrenadante fue descartado y el *pellet* fue activado mediante la adición de 100µL de una solución con 1mg de EDC y 2,5 mg de NHS en buffer MES pH 5,5. Luego la solución fue sonicada durante 15 minutos y se centrifugó durante una hora a 13.200 rpm (8404 g). El sobrenadante fue descartado, ya que contiene el exceso de EDC y NHS y luego se adicionó 500 µL de una solución de CD-NH₂ en agua. La solución fue agitada a temperatura ambiente durante toda una noche, y posterior a esto se centrifugó durante 1 hora y 50 minutos a 13.200 rpm (8404 g). El sobrenadante fue descartado y el *pellet* que corresponde a las NPAus funcionalizadas con CD-NH₂, fue resuspendido en 1 mL de agua y almacenado a 4°C.

2.2) Determinación del grado de funcionalización con CD-NH₂: Con el fin de evaluar el grado de funcionalización de las NPAu-e-S-PEG-OMe/COOH con CD-NH₂, se determinó la concentración de ciclodextrina monoamino en el sobrenadante mediante un ensayo de fluorescencia. Se utilizó el reactivo fluorescamina, el cual reacciona con aminas primarias dando un compuesto fluorescente en condiciones de pH básico (8-11). Se construyó una curva de calibración con un rango de concentración entre los 0,3 µM y 6 µM en amortiguador fosfato. El protocolo utilizado fue adaptado de Zhang y cols (68).

Brevemente, a 100 μL de una solución standard se le agregaron 5 μL de una solución de fluorescamina en acetona (5 mg/mL) en una placa negra opaca de 96 pocillos. Las soluciones fueron agitadas en la placa durante un minuto y luego de 15 minutos incubando en ausencia de luz, la fluorescencia se midió a una longitud de onda de excitación de 390 nm y una de emisión de 480 nm. Se realizaron 10 mediciones del blanco (100 μL amortiguador fosfato más 5 μL de fluorescamina) para determinar el límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC) mediante las siguientes fórmulas:

$$\text{LD} = \frac{(\text{Yb} + 3 \times \text{Sb})}{m} \quad \text{LC} = \frac{(\text{Yb} + 10 \times \text{Sb})}{m}$$

Donde Yb corresponde a la media del blanco, Sb a la desviación estándar del blanco y m a la pendiente de la curva de calibración.

En el caso de las muestras reales, las NPAu-e-S-PEG-OMe/COOH fueron conjugadas con 0.5, 1 y 2 mg/mL de CD-NH₂. El sobrenadante de estas muestras se llevó a una concentración de 3 μM y se realizó la medición de fluorescencia, interpolando el resultado dentro de la curva de calibración.

3. Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas obtenidas.

3.1) Espectrofotometría UV-Visible: Se determinó la banda del plasmón superficial de las NPAu-e mediante espectrofotometría y su desplazamiento luego de ser funcionalizadas con HS-PEG-OMe, HS-PEG-COOH y CD-NH₂. Las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro LAMBDA 25 UV/VIS (Perkin Elmer), realizando un barrido entre 400 a 800 nm.

3.2) Dispersión dinámica de la luz (DLS): El diámetro hidrodinámico de los distintos conjugados, se evaluó mediante DLS a 25°C utilizando un equipo Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments). En el caso de las NPAu-e el dispersante correspondía a citrato, mientras que para las demás muestras correspondía a agua milli-Q.

3.3) Potencial Zeta: La carga superficial de las nanopartículas fue determinada a 25°C utilizando un equipo Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) a través del modelo de Smoluchowski. El potencial zeta de las NPAu-e fue determinado en solución de citrato de sodio 1,2 mM, mientras que en el caso de los otros conjugados fue determinado en agua milli-Q.

3.4) Espectroscopía de fotoelectrones generados por rayos X (XPS): Para confirmar la conjugación del PEG con la nanopartícula (enlace S-Au) y la unión del grupo carbonilo del PEG con el grupo NH₂ de la ciclodextrina (enlace amida) se realizaron mediciones utilizando la técnica de espectroscopía de fotoelectrones generados por rayos X (XPS) en el laboratorio del Dr. José Francisco Marco, Departamento de Sistemas de Baja Dimensionalidad, Superficies y Materia Condensada. Instituto de Química Física “Rocasolano”, Madrid, España. Los datos de XPS se obtuvieron utilizando un analizador de electrones channeltron CLAM 2 y una radiación alfa de Mg K (1253,6 eV) bajo un vacío superior a 5×10^{-9} torr. Los espectros fueron obtenidos a una energía constante de 20 eV. La escala de energía de ligadura fue ajustada a la señal principal del C 1s, la cual está a 284,6 eV.

3.5) Microscopía electrónica de transmisión (TEM): Con el fin de evaluar la conjugación de las nanopartículas con los PEGs y la CD, y determinar el tamaño de los conjugados, las muestras fueron observadas mediante TEM. Las imágenes fueron obtenidas en el Institute for Research in Biomedicine (IRB), Barcelona, España, utilizando un microscopio JEOL JEM-1010. Las muestras NPAu-e, NPAu-e-S-PEG-OME, NPAu-e-S-PEG-OMe/COOH y NPAu-e-S-PEG-OME/COO-NH-CD fueron preparadas dejando secar una gota de solución con nanopartículas sobre microgrillas de cobre, a las cuales se les removió el

exceso de solución. Posterior a esto, se tiñeron las muestras con ácido fosfotúngstico al 1% y se dejaron secar a temperatura ambiente. Luego las muestras fueron observadas por TEM, con el fin de estudiar la morfología, homogeneidad de tamaño y presencia del halo de materia orgánica, indicativo de la funcionalización. Las imágenes fueron analizadas por medio del software ImageJ, con el fin de determinar el tamaño de las nanopartículas, así como también el tamaño del halo producido por la funcionalización.

4. Evaluación de la permeabilidad de membranas

4.1) Modelos de membranas fosfolipídicas: Se utilizó el ensayo *in vitro* de permeabilidad de membrana artificial en paralelo (PAMPA) descrito por Di y colaboradores (69). Brevemente: 300 μ L de una solución de Tiopental (Control positivo), Azul de Evans (Control negativo), NPAu-e desnudas, NPAu-e-S-PEG-OME, NPAu-e-S-PEG-OMe/COOH y NPAu-e-S-PEG-OME/COO-NH-CD se añadieron al compartimento donador. La membrana que actúa como filtro fue cubierta con 4 μ L de fosfatidilcolina disueltos en dodecano (20 mg/mL) y en el compartimento aceptor se adicionaron 300 μ L de la misma solución, pero sin nanopartículas. Luego se formó un “sándwich”, que consiste en la solución donante con las NPAu en el fondo, la membrana lipídica artificial al medio, y la solución aceptora arriba, y se dejó a temperatura ambiente durante 24 h con

agitación mecánica orbital de 180 rpm. Se determinó el T_{0h} y el T_{24h} , los cuales corresponden a la absorbancia de cada muestra a tiempo 0 y luego de 24 horas, respectivamente. La absorbancia de las NPAu y los controles en los pocillos aceptores y de referencia se determinó mediante espectrofotometría UV-Visible. La permeabilidad efectiva (P_e) se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$P_e = \frac{-218,3}{t} \times \log \left[1 - \frac{2 \times C_A(t)}{C_D(0)} \right] \times 10^{-6} \text{ cm/s}$$

Dónde:

t = tiempo de medición en horas

C_A = concentración placa aceptora a tiempo t

C_D = concentración placa dadora a tiempo 0.

5. Evaluación de la penetración celular y efectos sobre la viabilidad celular.

5.1) Ensayos de penetración celular: Mediante activación neutrónica se determinó la cantidad de oro correspondiente a nanopartículas que

interaccionaron y/o penetraron en células de neuroblastoma de la línea celular SH-SY5Y. Se sembraron 60.000 células por pocillo, y una vez que éstas se encontraran estiradas en la placa, se procedió a agregar el tratamiento correspondiente. En el ensayo se evaluaron por triplicado soluciones de NPAu-e-S-PEG-OME, NPAu-e-S-PEG-OMe/COOH y NPAu-e-S-PEG-OME/COO-NH-CD a una concentración final de 0.5 nM por pocillo, además de un control con medio, lo cual se realizó con un $n = 3$. Luego de 2,5 horas de ensayo, se procedió a lavar cada pocillo 5 veces con PBS, con el fin de eliminar las nanopartículas que no interaccionaron con las células. Posterior a esto, se agregaron 50 μL de Tripsina 1X a cada pocillo, y se dejó incubando a 37°C durante 4 minutos, con el fin de desprender las células de la placa. Se recolectaron las alícuotas de cada pocillo, y se agregaron 50 μL de PBS (x3) por pocillo, con el fin de arrastrar el resto de las células, obteniendo un volumen final de 200 μL de muestra por pocillo. Posterior a esto, las muestras fueron liofilizadas para ser evaluadas en el Departamento de Aplicaciones Nucleares, de la Comisión Chilena de Energía Nuclear (CCHEN), mediante activación neutrónica. El total de masa de nanopartículas fue irradiada por 22 horas, a un flujo neutrónico térmico de aproximadamente $4.6 \times 10^{12} \text{ n} \cdot \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$. Las muestras fueron medidas, dependiendo de su radiactividad, por 15 a 60 minutos, en un sistema de espectrometría gamma de alta resolución, después de 7 a 11 días de haber sido irradiadas. Las soluciones correspondientes al blanco fueron irradiadas conjuntamente con la muestra y medidas por 15 a 60 minutos según

su radiactividad. Para lo anterior, se utilizó un sistema de Espectrometría gamma N°2, el cual está compuesto por un detector de Ge hiperpuro de 25% de eficiencia relativa y de 1,8 Kev de resolución para el fotopico de 1332,5 Kev del ^{60}Co , electrónica asociada, de una tarjeta multicanal Canberra S100 y de un generador de pulso también Canberra. Los espectros de cada muestra fueron resueltos usando el software de Canberra Genie 2000. Los resultados de masa total de los elementos fueron determinados con su incertidumbre asociada, calculada con un factor de cobertura igual a 2, lo que equivale a aproximadamente a un nivel de confianza del 95%. Los resultados fueron expresados en nanogramos totales.

5.2) Ensayos de viabilidad celular: Mediante la reducción de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboximetoxifenil]-2-[4-sulfofenil]-2H-tetrazolio (MTS), en presencia de PMS, a formazán, se evaluó la viabilidad de la línea celular SH-SY5Y en presencia de NPAu-e-S-PEG-OME, NPAu-e-S-PEG-OME/COOH y NPAu-e-S-PEG-OME/COO-NH-CD a distintas concentraciones (0,05, 0,125 y 0,5 nM). Se agregaron 10.000 células por pocillo en una multiplaca de 96 pocillos y se utilizó como medio de cultivo DMEM/F12 con 1% de suero fetal bovino (SFB). El ensayo se realizó durante 24 horas desde que se agregó el tratamiento, dejando las células en una incubadora a 37°C. Transcurrido el tiempo de ensayo, se descartó el medio y se incubaron las células con 80 μL de

DMEM/F12 incoloro y 20 μ L de solución MTS/PMS en cada pocillo durante 1 hora a 37°C. La medición colorimétrica se realizó a 490 y 655 nm. Por otro lado, se determinó la muerte celular mediante el ensayo de integración de membrana CytoTox-ONE™, el cual evalúa la liberación de LDH (muerte celular). 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 μ L de solución de lisis en los pocillos correspondientes al control (máxima liberación de LDH). Luego, se tomaron 50 μ L de cada pocillo y se agregaron a una placa negra de 96 pocillos, seguido de 50 μ L 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*.

Resultados

1. Sintetizar NPAu-e y funcionalizarlas con diferentes proporciones de HS-PEG-OMe/HS-PEG-COOH.

1.1) Síntesis de NPAu-e: Se obtuvieron NPAu-e a través de la reducción de HAuCl_4 con citrato, descrita por Petkova y cols (65). Estas nanopartículas fueron caracterizadas por espectrofotometría UV-Visible presentando un plasmón característico de nanopartículas con un tamaño de entre 10 y 20 nm a 518 nm (Figura 10). Mediante DLS se determinó que las nanopartículas presentan un diámetro hidrodinámico de 21 ± 1 nm (Figura 11) y un potencial Zeta cercano a -46 ± 3 mV (Figura 12).

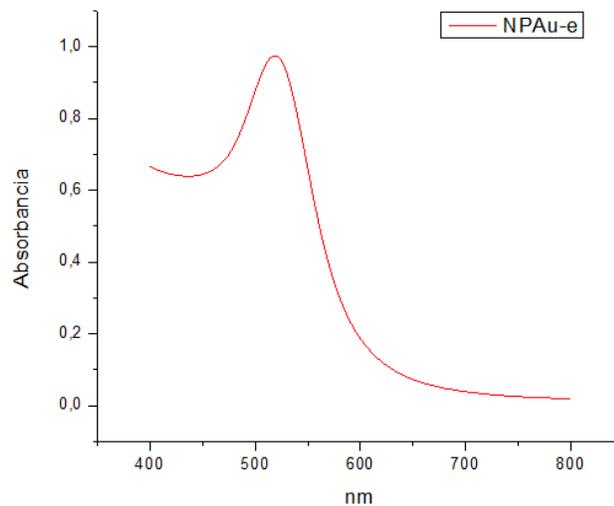


Figura 10. Espectro de absorción UV-Visible de las NPAu-e, presentando un máximo de absorbancia a 518 nm.

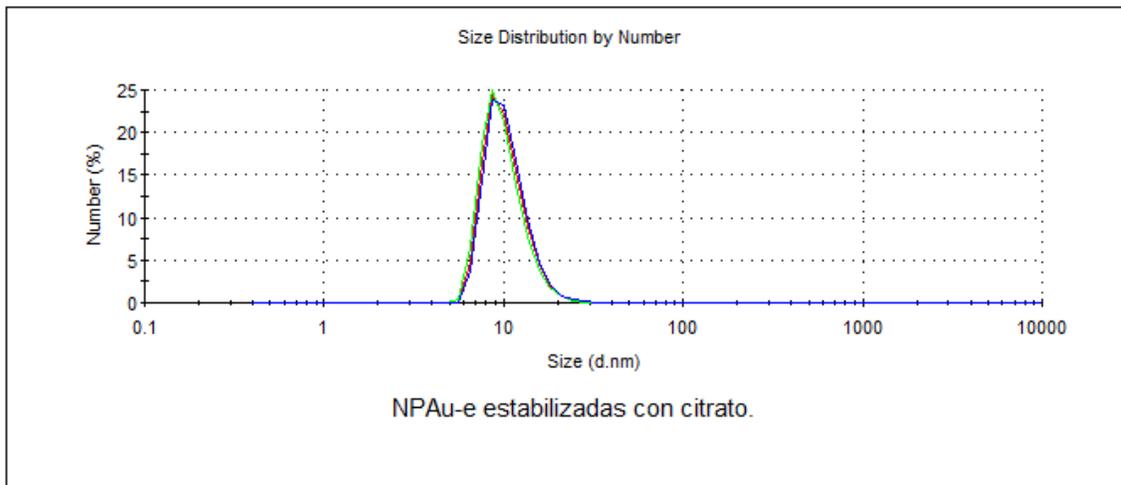


Figura 11. Distribución de tamaños por número de las NPAu-e, en la cual se aprecia un diámetro hidrodinámico promedio de 11 nm (21 nm por intensidad) (Polidispersidad: 0.316)

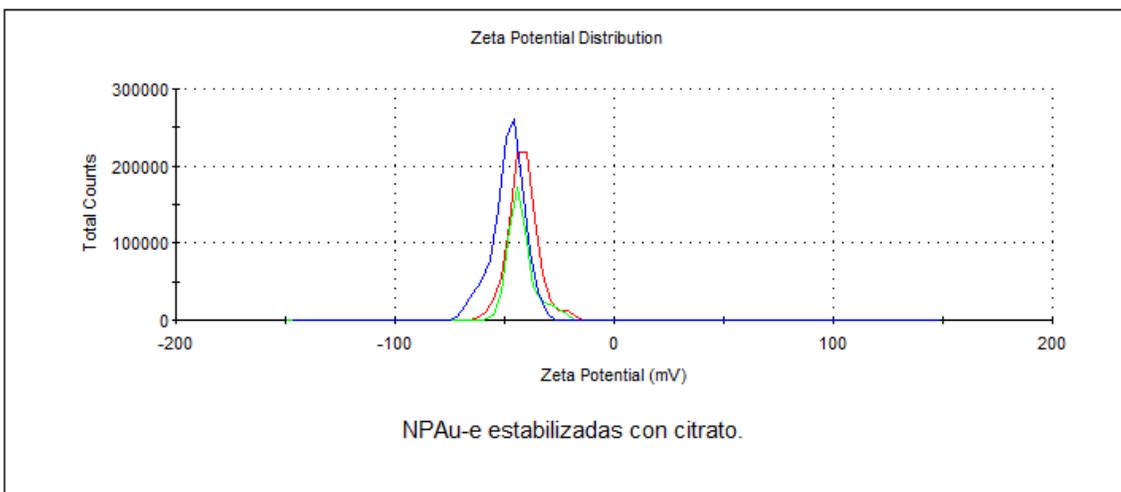


Figura 12. Gráfica de potenciales Zeta de las NPAu-e, cuyo valor es cercano a -46 mV.

1.2) Funcionalización de NPAu-e con PEG: Tanto las NPAu-e obtenidas en la primera etapa (NPAu-e-S-PEG-OMe) como las obtenidas posteriormente (NPAu-e-S-PEG-OMe/COOH) fueron caracterizadas por espectrofotometría UV-Visible, DLS y potencial Zeta. En ambos casos se observó un

desplazamiento del plasmón hacia el infrarrojo que se correlaciona con un proceso de quemisorción que conduce a un cambio del índice de refracción y a un desplazamiento de la banda plasmónica hacia la región infrarroja (Figura 13), a un aumento en el diámetro hidrodinámico (Figuras 14 y 15) y a una disminución en los valores absolutos de potencial Zeta (Figura 16), con respecto al observado para las NPAu-e estabilizadas con citrato. El aumento del diámetro hidrodinámico puede atribuirse a la quemisorción de las moléculas de PEG sobre la nanopartícula y el cambio de los potenciales zeta puede atribuirse a que al reemplazarse una molécula de citrato que presenta tres cargas negativas por un molécula de PEG neutra como HS-PEG-OMe o con solo una carga negativa, HS-PEG-COOH, se disminuya la carga total de la partícula.

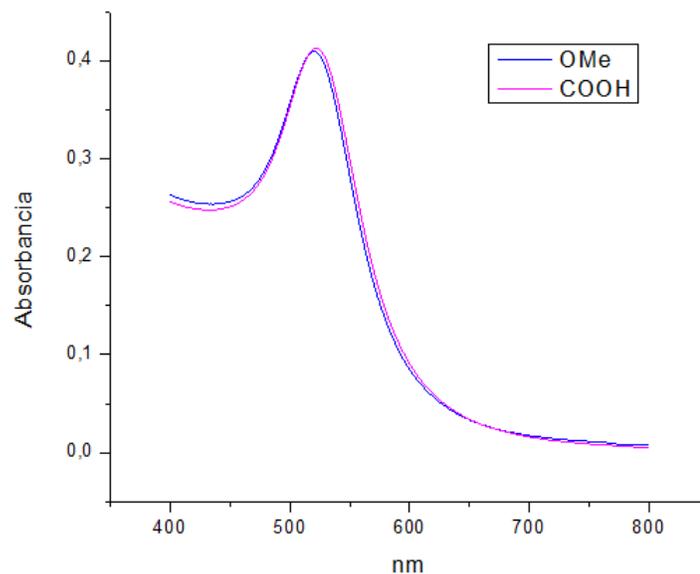


Figura 13. Espectros de absorción UV-Visible de NPAu-e-S-PEG-OMe (OMe) y NPAu-e-S-PEG-OMe/COOH (COOH), presentando un máximo de absorbancia de 520 y 521 nm, respectivamente.

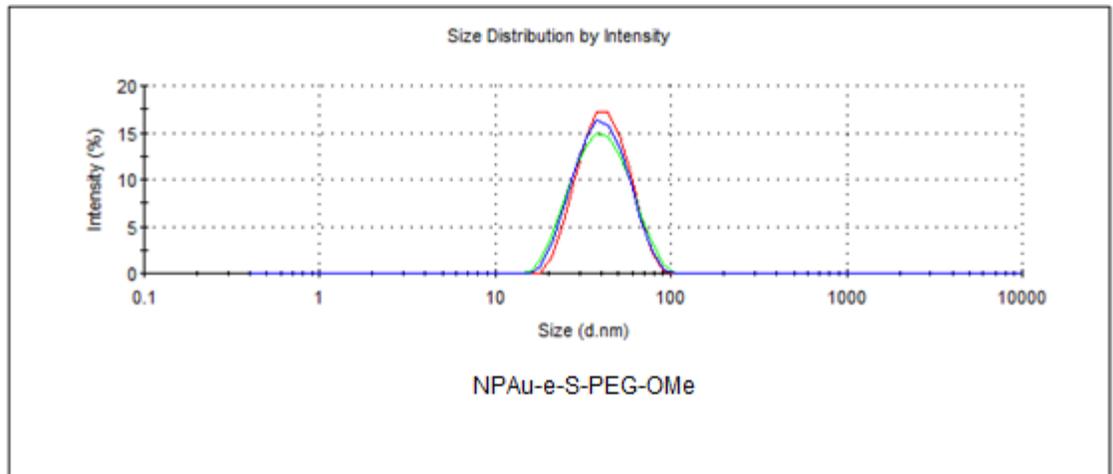


Figura 14. Distribución de tamaños de NPAu-e-S-PEG-OMe, cuyo diámetro hidrodinámico promedio es de 38 nm (Polidispersidad: 0.288)

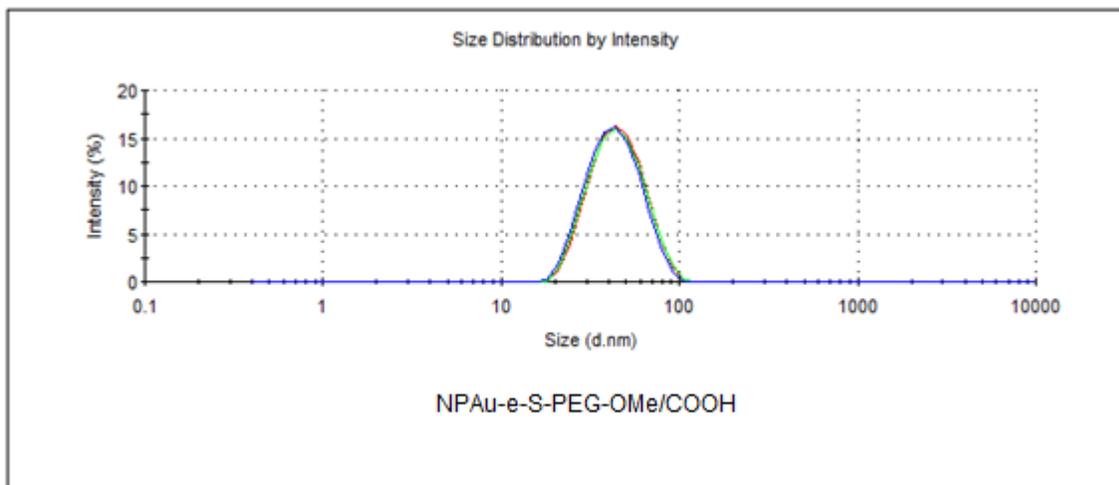


Figura 15. Distribución de tamaños de NPAu-e-S-PEG-OMe/COOH, cuyo diámetro hidrodinámico promedio es de 40nm (Polidispersidad: 0.178)

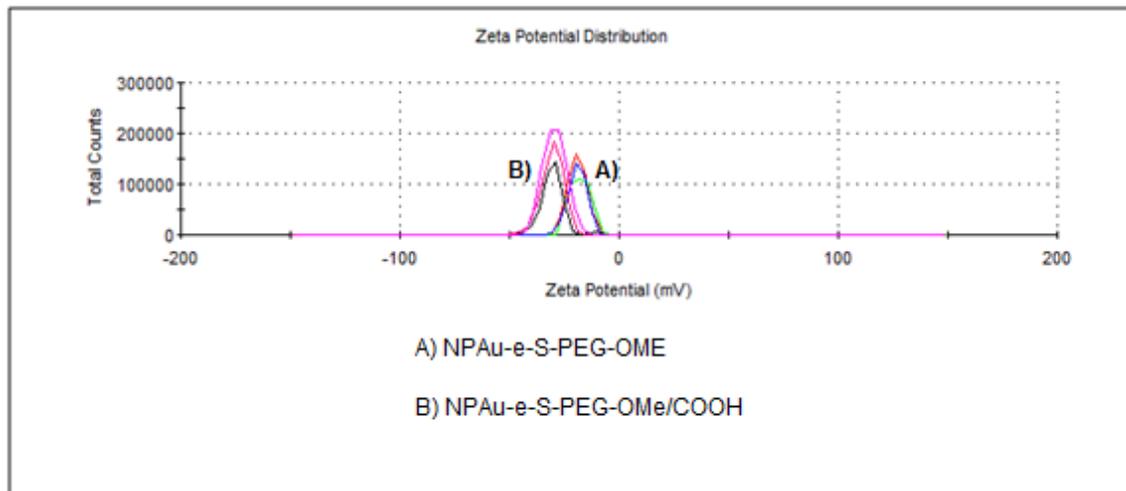


Figura 16. Gráfica de potenciales Zeta de NPAu-e-S-PEG-OMe (A) y NPAu-e-S-PEG-OMe/COOH (B), cuyos valores son -19 y -30 mV, respectivamente.

1.3) Funcionalización de NPAu-e con variación en la proporción de HS-PEG-COOH: Manteniendo el protocolo anteriormente utilizado en el punto 1.2, se realizaron conjugaciones de las NPAu-e recubiertas con HS-PEG-OMe y distintas proporciones de HS-PEG-COOH. De esta manera, se prepararon muestras con las siguientes proporciones de PEG carboxílico: (A) 0,01 mg/200 μ L (B) 0,5 mg/200 μ L (C) 1 mg/200 μ L (D) 2 mg/200 μ L y (E) 5 mg/200 μ L de agua.

Además, se estudió la estabilidad de los diferentes sistemas en el tiempo, a distintos pH (3, 7 y 9) y variando la fuerza iónica (de 0 a 150 mM de NaCl). Los cambios en sus características fisicoquímicas fueron evaluados mediante espectrofotometría UV-Visible, DLS y potencial Zeta.

Los resultados se resumen en las tablas 1, 2 y 3 y en las figuras 17 y 18.

Tabla 1. Estudio de estabilidad de las muestras A (0,01 mg/200 μ L), B (0,5 mg/200 μ L), C (1 mg/200 μ L), D (2 mg/200 μ L) y E (5 mg/200 μ L) midiendo la longitud de onda en donde ocurre la máxima absorbancia en función del tiempo (1, 2, 3 y 7 días). N = 1.

Día \ Muestra	1	2	3	7
A	521	521	522	521
B	521	521	521	521
C	521	521	520-522	521
D	520-522	521	521	520-521
E	521	521	521	520-521

Tabla 2. Resumen de las propiedades fisicoquímicas de las muestras A (0,01 mg/200 μ L), B (0,5 mg/200 μ L), C (1 mg/200 μ L), D (2 mg/200 μ L) y E (5 mg/200 μ L) cambiando la fuerza iónica (150 mM NaCl). * = no se pudo determinar el potencial zeta a la fuerza iónica estudiada. N = 1. PDI: Poldispersidad.

Muestra	UV-Visible λ (nm)		Diámetro Hidrodinámico (nm)		PDI		Potencial Zeta (mV)	
	T0h	T1h	T0h	T1h	T0h	T1h	T0h*	T1h*
A	521	521	39,7 \pm 0,1	36,1 \pm 0,5	0,27 \pm 0,04	0,23 \pm 0,01	-	-
B	521	521	37,3 \pm 0,4	37,8 \pm 0,2	0,20 \pm 0,01	0,21 \pm 0,01	-	-
C	521	521	37,1 \pm 0,2	37,5 \pm 0,5	0,16 \pm 0,01	0,23 \pm 0,01	-	-
D	521	521	37,7 \pm 0,7	37,5 \pm 0,4	0,20 \pm 0,02	0,19 \pm 0,01	-	-
E	521	521	36,6 \pm 0,6	39,2 \pm 0,2	0,16 \pm 0,01	0,23 \pm 0,01	-	-

Tabla 3. Efecto del pH 3, 7 y 9 sobre el plasmón (en nm, medido por UV-Visible) de la muestra A (0,01 mg/200 μ L), B (0,5 mg/200 μ L), C (1 mg/200 μ L), D (2 mg/200 μ L) y E (5 mg/200 μ L). N = 1.

pH \ Muestra	3	7	9
A	522	520-521	521
B	522	520	521
C	522	521	521
D	522	520-522	521
E	521-522	521	519-520

Se puede observar que los resultados de estabilidad en el tiempo obtenidos para las distintas proporciones de HS-PEG-COOH muestran que todas las

muestras no presentaron cambios en la longitud de onda donde ocurre la máxima absorbancia (Tabla 1). Además, tampoco se observaron grandes variaciones en relación a sus diámetros hidrodinámicos durante los 7 días (Figura 17.A). Sin embargo, en relación al potencial zeta, se observó que la muestra A (0,01 mg/200 μ L) presentó una disminución en los valores absolutos de su potencial zeta, llegando a valores cercanos a cero al día 7 (Figura 17.B). Este comportamiento no se observó en el resto de las muestras estudiadas. En la Tabla 2 se resumen los parámetros fisicoquímicos de las distintas proporciones estudiadas al someterlas a un cambio en la fuerza iónica (150 mM de NaCl), durante un periodo de 1 hora, no observándose cambios en el máximo de absorbancia, ni en el diámetro hidrodinámico de las 5 muestras. No obstante, en ninguno de los casos se pudo determinar el potencial zeta de las muestras debido a la cantidad de NaCl presente en solución. Finalmente, los resultados de estabilidad a distintos pHs, muestran que todas las muestras presentan una absorbancia máxima a 522 nm a pH 3, la cual varió a medida que aumento el pH (Tabla 3). La muestra C (1 mg/200 μ L) es la única muestra que presentó el mismo máximo a pH 7 y 9 (521 nm). En relación a los diámetros hidrodinámicos (Figura 18.A), las muestras B y D presentaron un aumento de éste cuando fueron sometidas a pH 3, mientras que solo la muestra B presentó un incremento en este parámetro a pH 9. En todas las muestras se observó que a pH 3 el potencial zeta llegó a valores cercanos a 0 mV (Figura 18.B). La muestra con la menor proporción de HS-PEG-COOH (muestra A), obtuvo los

valores menos negativos a pH 7 y 9, en relación a las otras proporciones estudiadas (valores cercanos a los -30 mV). Además, las muestras B y E, y de menor manera la muestra D, presentaron una disminución en el valor absoluto de sus respectivos potenciales zetas a pH 9, en relación a sus valores a pH 7. La muestra C no presentó variaciones entre estos pHs.

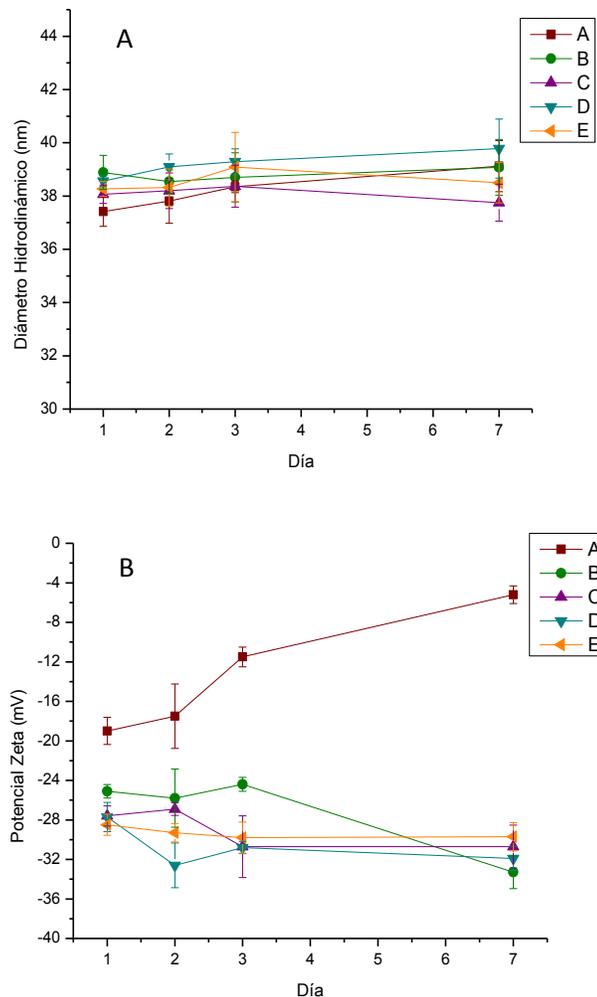


Figura 17. Estudios de estabilidad vs tiempo realizados a temperatura ambiente durante un periodo de 7 días. A) Variación en el diámetro hidrodinámico (DLS) de las distintas muestras con mediciones durante el día 1, 2, 3 y 7. B) Mediciones de potencial Zeta durante los días 1, 2, 3 y 7 de las muestras estudiadas. A (0,01 mg/200 μ L), B (0,5 mg/200 μ L), C (1 mg/200 μ L), D (2 mg/200 μ L) y E (5 mg/200 μ L). N = 1.

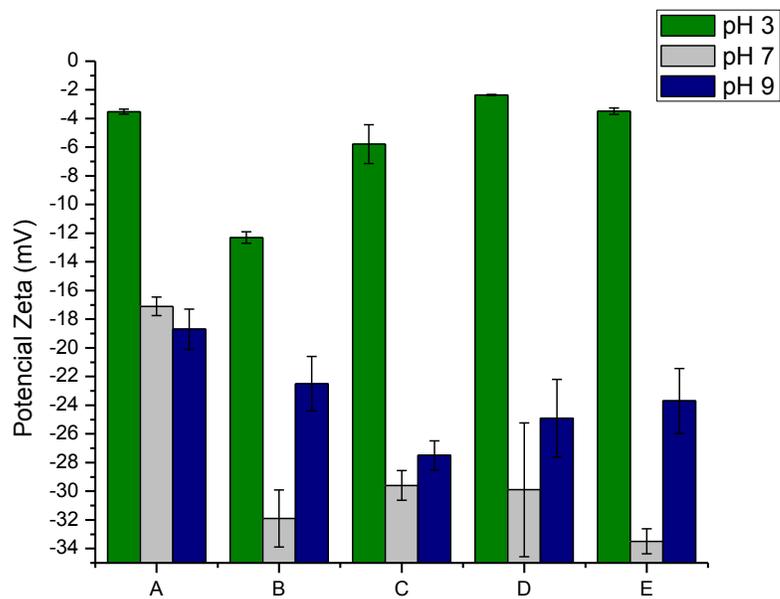
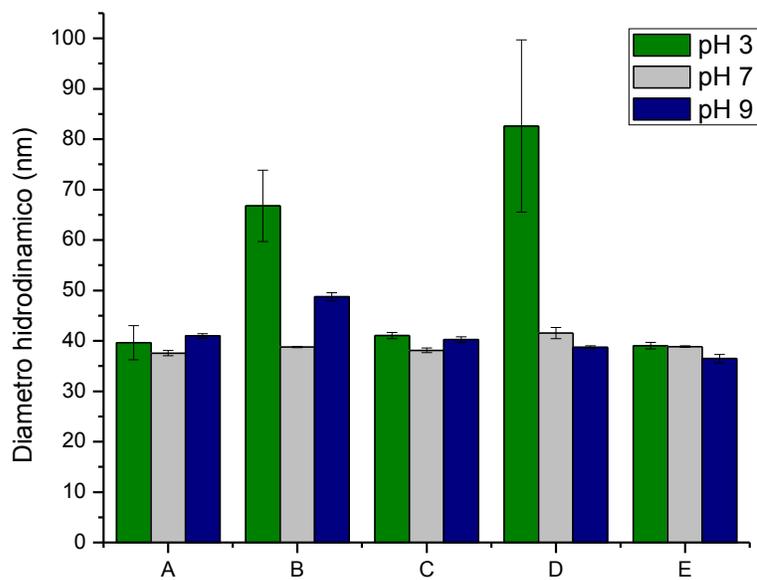


Figura 18. Estudios de estabilidad a pH 3, 7 y 9. A) Variación en el diámetro hidrodinámico de las distintas muestras al someterlas a los pH en estudio. B) Potencial Zeta de las muestras estudiadas al variar sus pH. Muestra A (0,01 mg/200 μ L), B (0,5 mg/200 μ L), C (1 mg/200 μ L), D (2 mg/200 μ L) y E (5 mg/200 μ L). N = 1.

2. Modificación con ciclodextrinas aminadas de las nanopartículas funcionalizadas con PEGs.

2.1) **Funcionalización de NPAu-e-S-PEG-OMe/COOH con CD-NH₂:** Los cambios en las características fisicoquímicas de la NPAu-e multifuncionalizadas fueron evaluados mediante espectrofotometría UV-Visible, DLS y potencial zeta (Figuras 19 y 20, respectivamente).

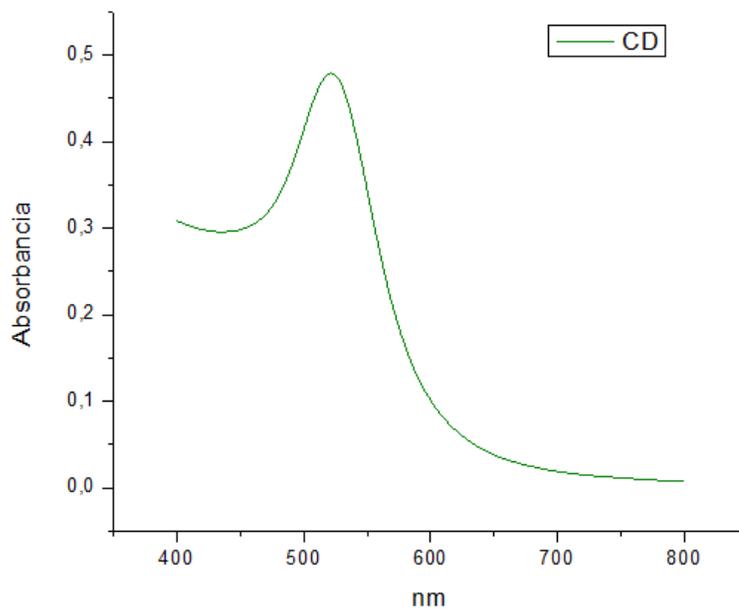


Figura 19. Espectro de absorción UV-Visible NPAu-e-S-PEG-OMe/COO-NH-CD, presentando un máximo de absorbancia de 522nm.

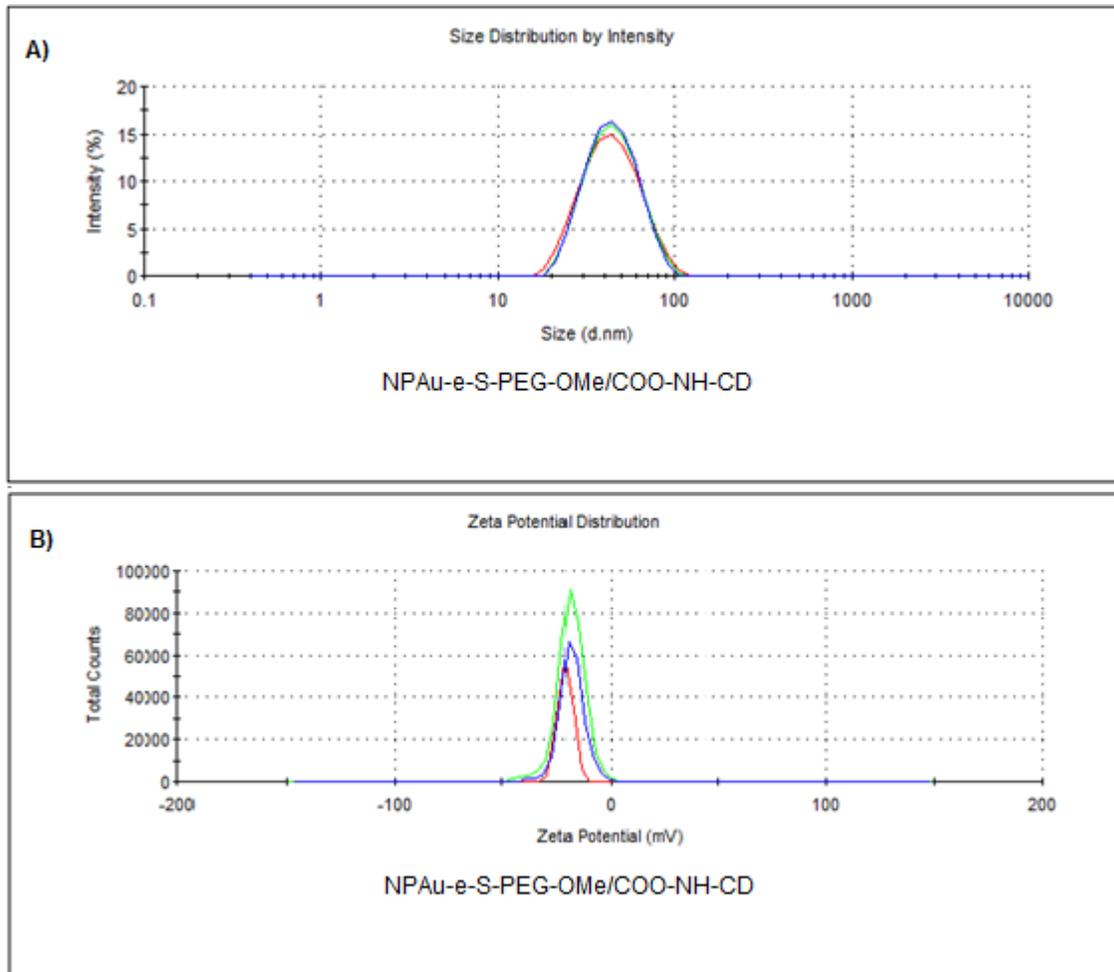


Figura 20. A) Distribución de tamaños de NPAu-e-S-PEG-OMe/COO-NH-CD, cuyo diámetro hidrodinámico promedio es de 38 nm (PDI: 0.176). B) Gráfica de potenciales Zeta de NPAu-e-S-PEG-OMe/COO-NH-CD, cuyo valor es -19 mV.

Los resultados obtenidos muestran un desplazamiento de la banda plasmónica de 521 a 522 al incorporar CD al sistema (Figura 19). Además, se observa un cambio en el potencial zeta en la figura 20.B, el cual posee un valor de -19 mV. No se observan cambios en el diámetro hidrodinámico, lo cual es esperable debido a las dimensiones de la ciclodextrinas.

2.2) Determinación grado de funcionalización con CD-NH₂: Se determinó la concentración de ciclodextrina monoamino presente en el sobrenadante luego de seguir el protocolo descrito en la sección 2.1. Para esto se utilizó fluorescamina, la cual reacciona con aminas primarias generando un compuesto fluorescente (Figura 21) luego de 15 minutos incubando en oscuridad en condiciones de pH básico (8-11) (68).

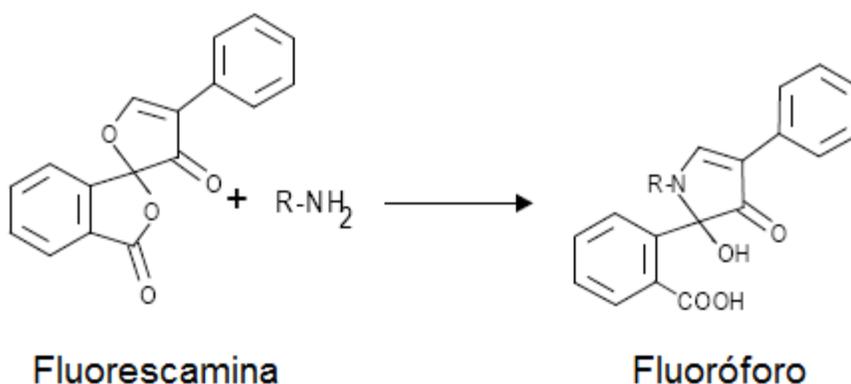


Figura 21. Reacción fluorescamina con una amina primaria para generar un compuesto fluorescente (excitación a 390 nm y emisión a 480 nm). La reacción se debe llevar a cabo en oscuridad y a pH básico (8-11).

2.2.1) Curva de calibración, límite de detección y límite de cuantificación:

Se construyó una curva de calibración de CD-NH₂, utilizando un rango de concentración desde los 0,3 μM a los 6 μM. En la Tabla 1s (Material Suplementario) se muestran los valores de fluorescencia para cada concentración de estándar, con su respectiva desviación estándar y coeficiente de variación. La gráfica de la curva de calibración se obtuvo con un R² = 0,998 (Figura 22).

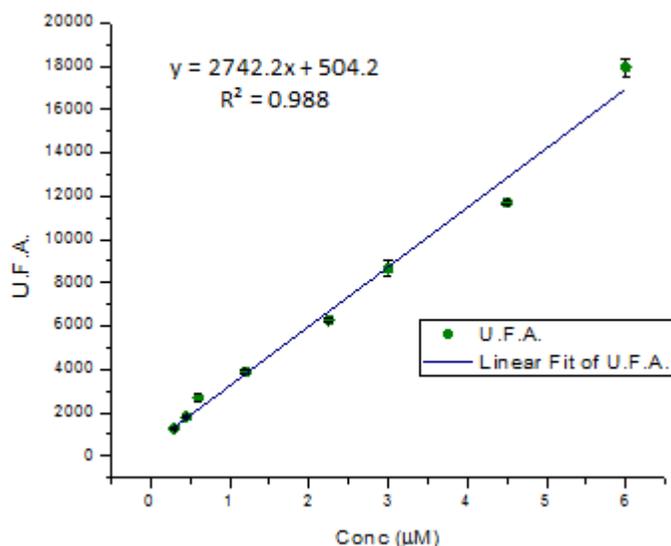


Figura 22. Curva de calibración obtenida a partir de los datos mostrados en la Tabla 1s. Los datos de fluorescencia fueron medidos utilizando una sensibilidad de 100 y con un $n = 3$. El $R^2 = 0,988$, con una pendiente igual a $2742,2 \mu\text{M}^{-1}$ y un intercepto de $504,2 \mu\text{M}$.

El límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC) fue determinado realizando 10 mediciones del blanco, el cual corresponde a $100 \mu\text{L}$ de amortiguador fosfato. Las fórmulas utilizadas se encuentran descritas en la sección de metodología en el punto 2.2. Los valores del LD y del LC se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Valores obtenidos para el límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC).

Parámetro	Conc (μM)
LD	0,27
LC	0,31

2.2.2) Análisis de muestras reales y del grado de funcionalización: Con el fin de determinar el grado de funcionalización del sistema NPAu-e-S-PEG-OMe/COOH con CD-NH₂, se escogieron 3 cantidades distintas (0,5, 1 y 2 mg/mL) de ciclodextrina monoamina para realizar la funcionalización. Es importante mencionar en este punto, que la proporción de HS-PEG-COOH escogida fue de 1 mg/mL (muestra C), ya que en relación a los estudios realizados en el objetivo 1, presentaron la mayor estabilidad alcanzando el máximo valor de potencial zeta (-30 mV) que se pudo obtener y manteniendo el diámetro hidrodinámico a distintos pHs. El sobrenadante de cada una de las muestras con CD-NH₂ se llevó a una concentración de 3 µM en amortiguador fosfato. Lo anterior se calculó asumiendo que la cantidad de ciclodextrina en el sobrenadante es igual a la cantidad agregada al momento de la funcionalización, por lo cual la diferencia que se observaría al momento de realizar la medición de fluorescencia correspondería a la CD-NH₂ que se unió al grupo COOH formando un enlace amida. Luego de realizar el ensayo con fluorescamina y determinar la fluorescencia de cada muestra, los resultados se interpolaron en la curva de calibración y se obtuvieron las concentraciones de CD-NH₂ en el sobrenadante. Con estos datos se calculó el número de moléculas de ciclodextrina por NPAu-e (Figura 23).

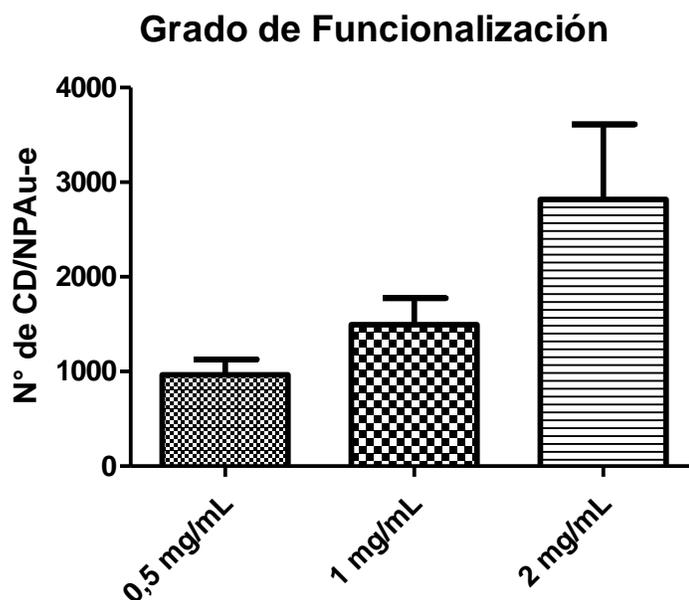


Figura 23. Grado de funcionalización de NPAu-e-S-PEG-OMe/COOH con CD-NH₂. Número de moléculas de CD-NH₂ por nanopartícula, al ser conjugadas con 0,5, 1 y 2 mg/mL de ciclodextrina monoamino.

Se observa que a pesar de que existe una tendencia al aumento del número de ciclodextrina por nanopartícula al aumentar la cantidad de 0,5 a 2 mg/mL CD, no existe una diferencia estadísticamente significativa en los resultados obtenidos.

3. Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas obtenidas.

3.1) Espectrofotometría UV-Visible, Dispersión dinámica de la luz (DLS) y

Potencial Zeta: En la tabla 5 se resumen los cambios en el plasmón superficial, diámetro hidrodinámico y potencial zeta de las NPAus luego de ser

funcionalizadas con los PEGs y la CD-NH₂, los cuales dan cuenta de la multifuncionalización de las nanopartículas.

Tabla 5. Tabla resumen con los valores obtenidos para UV, DLS y Potencial Zeta de los distintos sistemas. Las muestras corresponden a NPAu-e desnudas (NPAu-e), NPAu-e-S-PEG-OMe (OMe), NPAu-e-S-PEG-OMe/COOH (COOH), NPAu-e-S-PEG-OMe/COO-NH-CD (CD). Muestras medidas a pH 7. PDI: Polidispersidad.

Muestra	UV	DLS		Zeta (mV)
	λ (nm)	DH (nm)	PDI	
NPAu-e	518	20,8 ± 0,9	0,32 ± 0,01	-45,8 ± 3,0
OMe	520	38,5 ± 0,4	0,29 ± 0,02	-18,9 ± 0,6
COOH	521	40,3 ± 0,4	0,18 ± 0,02	-30,1 ± 0,5
CD	522	38,4 ± 1,1	0,18 ± 0,02	-19,1 ± 1,6

3.2) Espectroscopía de fotoelectrones generados por rayos X (XPS): Con el fin de confirmar la formación del enlace S-Au entre la nanopartícula y el PEG tiolado, y la formación del enlace amida entre el grupo carboxílico del PEG y el grupo amina de la ciclodextrina, se utilizó la técnica XPS. Las muestras analizadas corresponden a NPAu-e, NPAu-e-S-PEG-OMe/COOH y NPAu-e-S-PEG-OMe/COO-NH-CD, y un disco de oro. Para llevar a cabo las mediciones, las muestras fueron liofilizadas hasta obtener una cantidad aproximada de 4 mg cada una, las cuales fueron analizadas en el laboratorio del Dr. José Francisco Marco, en el Departamento de Sistemas de Baja Dimensionalidad, Superficies y Materia Condensada, Instituto de Química Física “Rocasolano”, Madrid, España (Figuras 24 y 25). Además, se analizaron de manera individual el HS-PEG-OMe y el HS-PEG-COOH, con el fin de detectar la señal del grupo tiol (Figura 26).

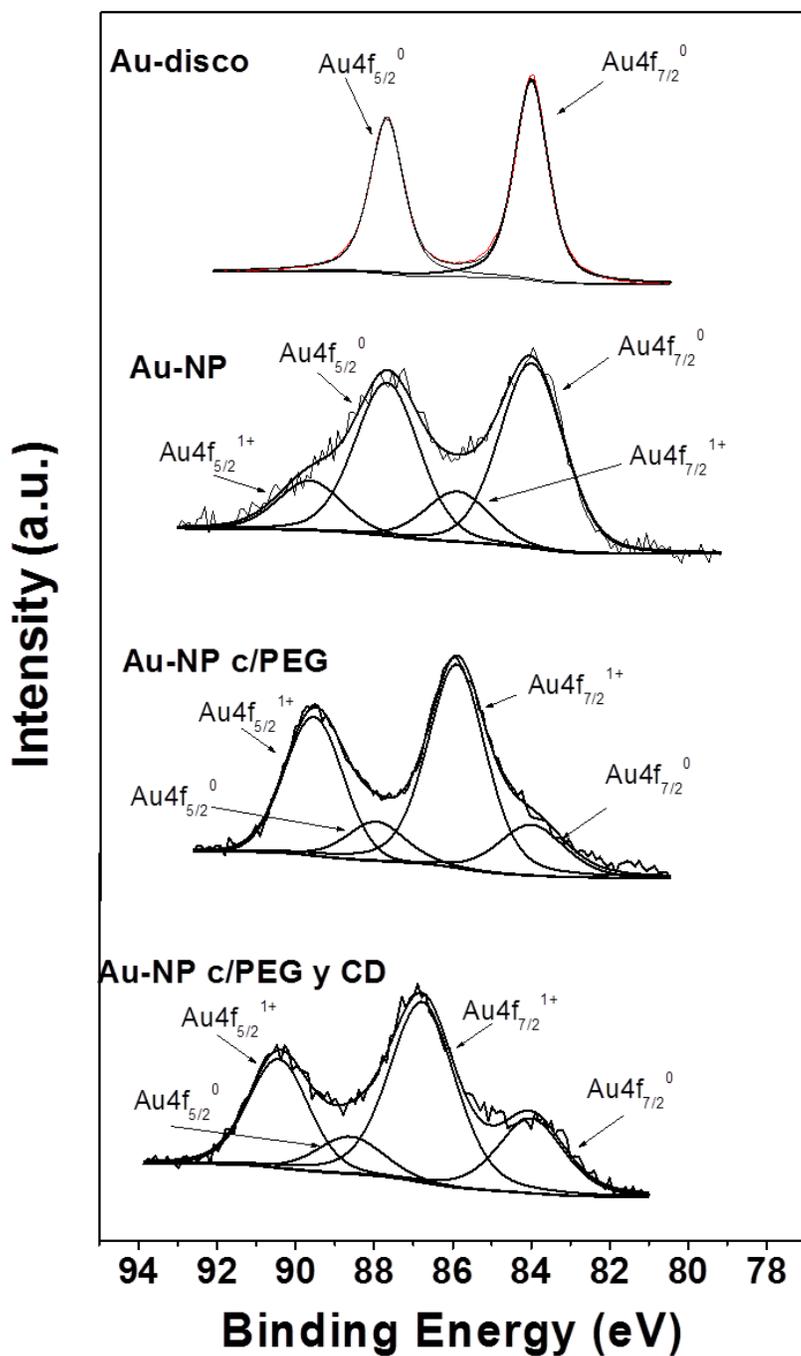


Figura 24. Espectros XPS correspondientes a la señal Au4f_{7/2} y Au4f_{5/2} del oro. Los distintos sistemas estudiados corresponden a: Disco de oro (Au-disco), NPAu-e Citrato (Au-NP), NPAu-e-S-PEG-OMe/COOH (Au-NP c/PEG) y NPAu-e-S-PEG-OMe/COO-NH-CD (Au-NP c/PEG y CD). Los superíndices 0 y 1+, corresponden a oro elemental y oro en estado de oxidación +1, respectivamente.

La figura 24 muestra el análisis y comparación de las señales obtenidas para diferentes sistemas, en relación a las señales de oro. Mediante un programa

computacional se ajustan las curvas experimentales a una suma de curvas gaussianas mediante mínimos cuadrados, lo que permitió evaluar las contribuciones correspondientes en cada señal. Primero, se utilizó un disco de oro (Au-disco), como control de las energías de ligadura que se obtienen para el oro elemental (Au^0), analizando las señales correspondientes a $\text{Au}4f_{7/2}$ y $\text{Au}4f_{5/2}$, las cuales poseen una energía de ligadura alrededor de 84 y 87 eV, respectivamente. Al analizar la muestra de NPAu, estabilizadas con citrato (Au-NP), se observan las mismas señales que en Au-disco y además, señales correspondientes a $\text{Au}4f_{7/2}$ y $\text{Au}4f_{5/2}$ de Au^{+1} . Lo descrito anteriormente, también se observa cuando las NPAu se encuentran conjugadas con ambos PEGs (Au-NP c/PEG) y multifuncionalizadas con CD- NH_2 (Au-NP c/PEG y CD). Sin embargo, se observa que en ambos casos existe una disminución en la intensidad de las señales correspondientes a Au^0 , en relación a la muestra Au-NP.

Por otro lado, se realizó el análisis de la señal C1s correspondiente al carbono (energía de ligadura de 284,6 eV), debido a que se utiliza para normalizar el resto de las señales, y por otro lado, en el caso de este sistema, por el hecho de que puede entregar información respecto a la presencia de PEG y CD, debido a la contribución en la señal C1s por su esqueleto carbonado (Figura 25).

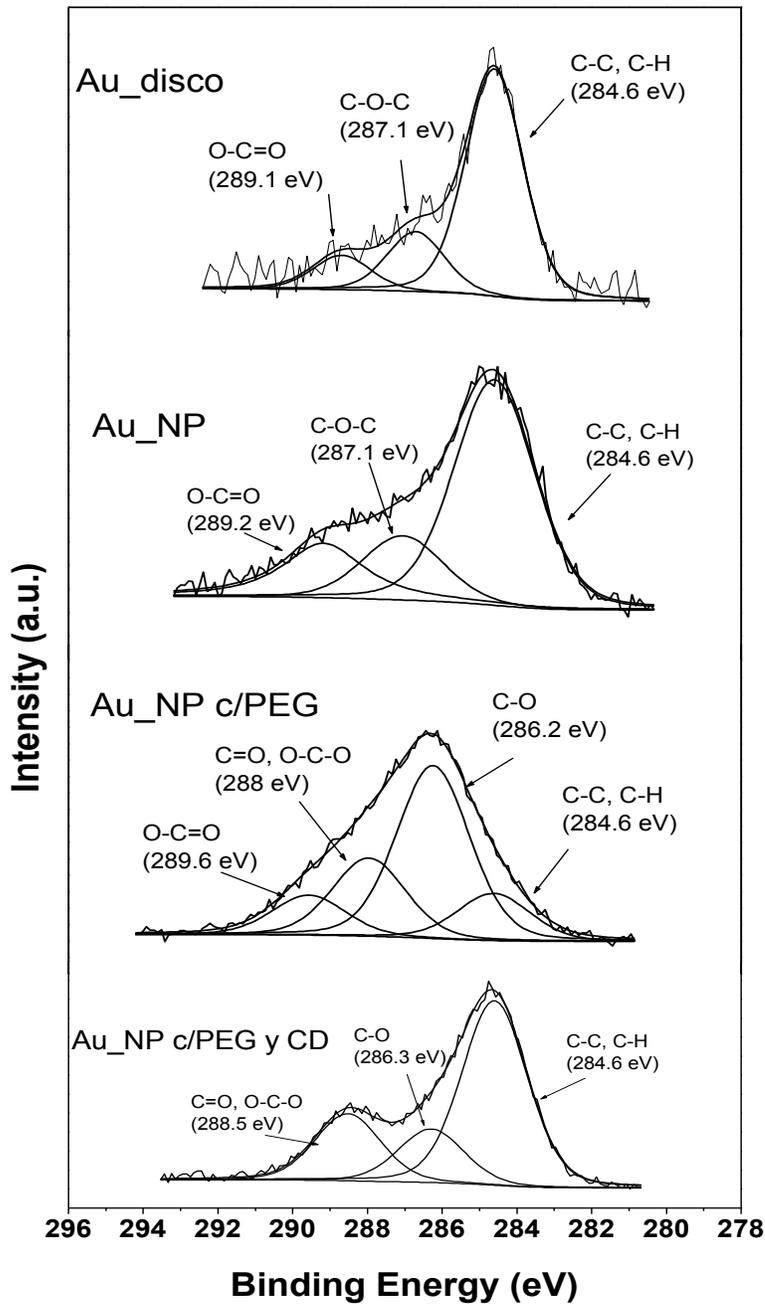


Figura 25. Análisis por XPS de las contribuciones de carbono C1s. Las muestras analizadas corresponden a: Disco de oro (Au-disco), NPAu-e Citrato (Au-NP), NPAu-e-S-PEG-OMe/COOH (Au-NP c/PEG) y NPAu-e-S-PEG-OMe/COO-NH-CD (Au-NP c/PEG y CD).

En el caso de Au-disco, a pesar de que corresponde a una superficie de oro ausente de moléculas orgánicas, se puede observar señales correspondientes al carbono. Lo anterior, se puede explicar debido a que es recurrente que en los

análisis de XPS exista una contaminación de CO_2 en las muestras que han sido expuestas a la atmósfera. Además de la señal de $\text{C}1s$, se pueden observar las correspondientes a C-O-C y O-C=O , a una energía de ligadura de 287,1 y 289,1 eV, respectivamente. La muestra Au-NP, presenta las mismas contribuciones que las observadas en el caso anterior, las cuales muestran una mayor intensidad debido a la presencia de citrato. Las muestras de NPAu conjugadas con PEG (Au-NP c/PEG), así como las multifuncionalizadas con CD (Au-NP c/PEG y CD), presentaron las mismas contribuciones de energías de ligadura, con diferencia en las intensidades de éstas, ya que existe un cambio en la cantidad de grupos presentes. Lo anterior confirmaría la presencia de los PEGs y los PEGs y CD, en las distintas muestras.

Con el fin de confirmar la conjugación de los PEGs a la superficie de las NPAu, se analizó la presencia de la señal correspondiente a la energía de ligadura de $\text{S}2p$. Previamente, se determinó la presencia del grupo tiol en ambos PEGs por separado (reactivos puros), observándose la señal correspondiente al $\text{S}2p$ a una energía de ligadura de 163 eV (Figura 26). Sin embargo, en ambos casos la intensidad de la señal fue muy baja, cercana al ruido. A pesar de realizar un análisis exhaustivo de las NPAu-e-S-PEG-OMe/COOH y NPAu-e-S-PEG-OMe/COO-NH-CD, no fue posible determinar la presencia de la señal $\text{S}2p$, lo cual puede explicarse debido a la baja resolución que presenta. Tampoco fue posible determinar la señal de N, que puede dar cuenta del enlace amida entre el grupo carboxilo del PEG y la amina de la CD, debido a la baja concentración

en la que se encuentra comparado con el resto de las contribuciones en el sistema.

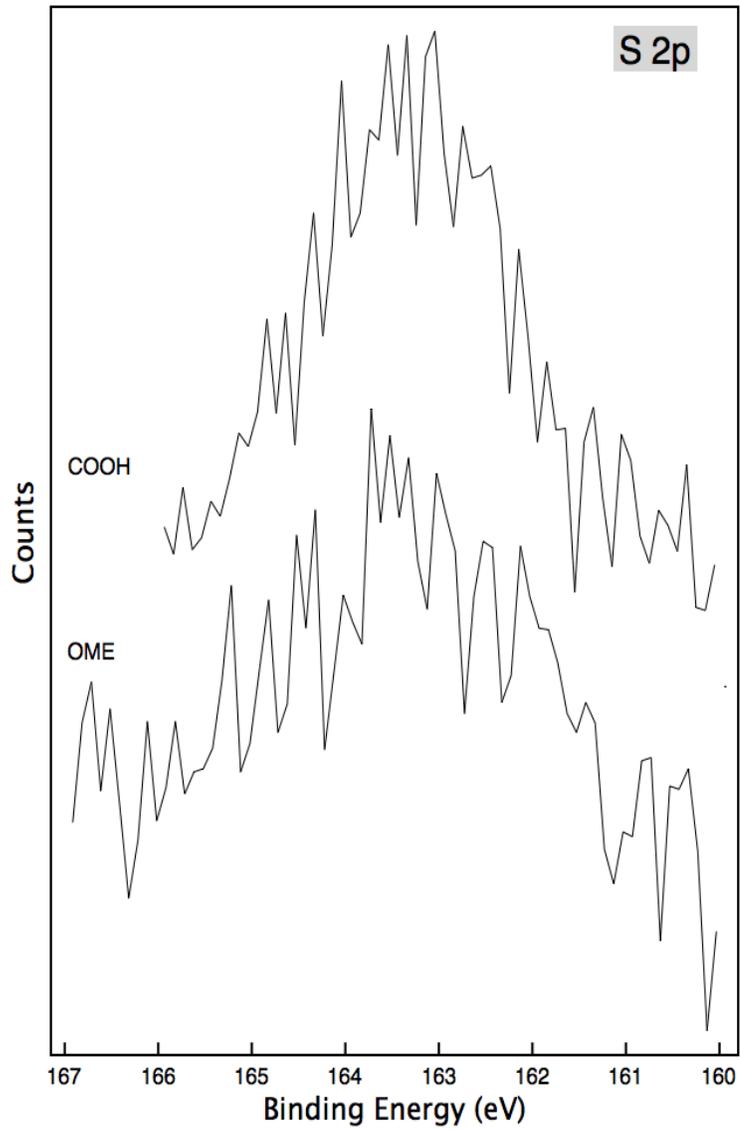


Figura 26. Análisis de la energía de ligadura del S2p del grupo tiol de las muestras HS-PEG-OME (OME) y de HS-PEG-COOH (COOH).

3.3) Microscopía electrónica de transmisión (TEM): Se prepararon grillas con NPAu-e con citrato, funcionalizadas con ambos PEGs y multifuncionalizadas con CDs, las cuales fueron teñidas con ácido fosfotúngstico al 1% y evaluadas mediante microscopía electrónica de transmisión (Barcelona, España), con el fin de detectar la presencia del halo producido por la funcionalización de PEGs y CDs, así como también evaluar el diámetro real de las NPAu-e y su tamaño cuando fueron funcionalizadas (Tabla 6). En la figura 25 se pueden apreciar las imágenes obtenidas para NPAu-e estabilizadas con citrato (Fig. 27A), mientras que en el panel B) y C) de la figura 27, se pueden observar las imágenes de NPAu-e funcionalizadas con ambos PEGs y multifuncionalizadas con CDs, respectivamente. Se puede observar un halo que se relaciona con la presencia de PEG quemisorbido sobre las NPAu.

Tabla 6. Tabla resumen con los valores de diámetro (nm) obtenidos para los distintos sistemas mediante TEM. Las muestras corresponden a NPAu-e estabilizadas con citrato (NPAu-e), NPAu-e-S-PEG-OMe/COOH (COOH) y NPAu-e-S-PEG-OMe/COO-NH-CD (CD).

Muestra	Diámetro promedio (nm)
NPAu-e	13 ± 1
COOH	31 ± 3
CD	31 ± 3

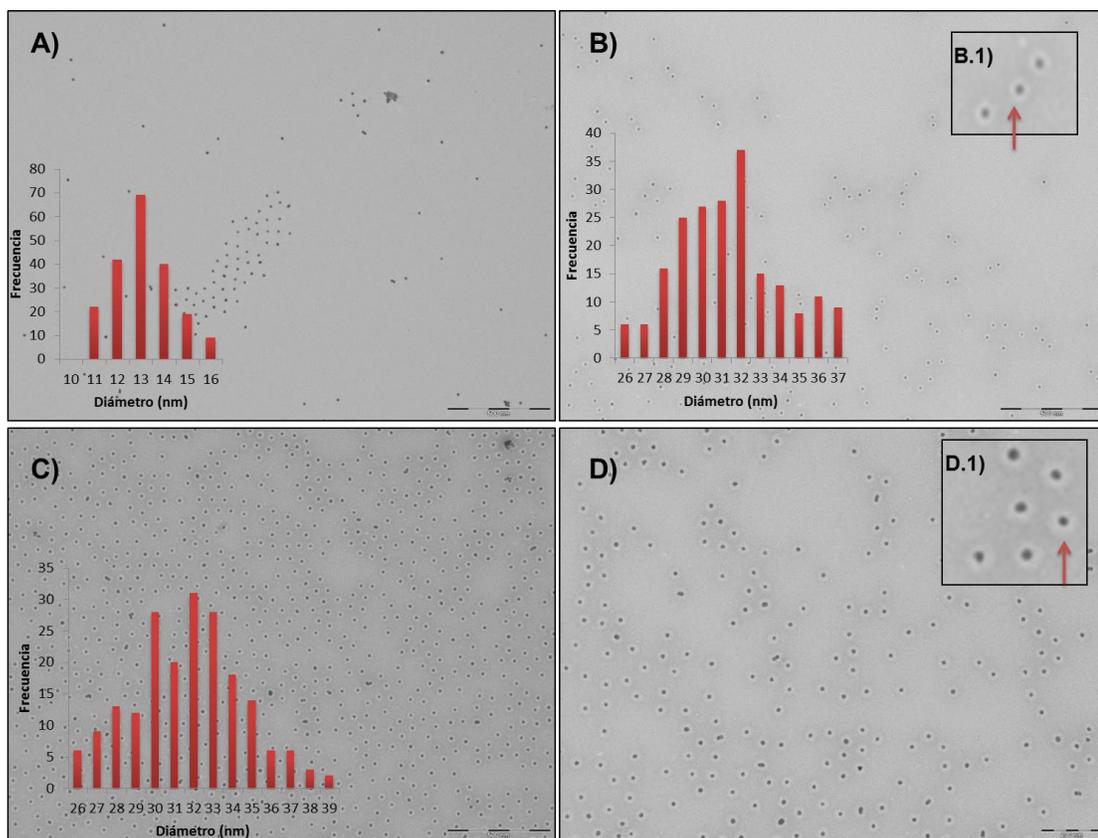


Figura 27. Imágenes obtenidas por TEM para las distintas muestras estudiadas, con sus respectivos histogramas A) NPAu-e estabilizadas en citrato, imagen ajustada a una escala de 500 nm. B) NPAu-e-S-PEG-OMe/COOH, imagen ajustada a una escala de 500 nm. (B.1) Magnificación en la que se indica el halo con flecha. C) NPAu-e-S-PEG-OMe/COO-NH-CD, imagen ajustada a una escala de 500 nm. D) Imagen ajustada a una escala de 200 nm, para la muestra NPAu-e-S-PEG-OMe/COO-NH-CD. (D.1) Magnificación en la que se indica el halo con flecha. Para cada muestra y su respectivo histograma se contaron $n = 120$ nanopartículas.

4. Evaluación de la permeabilidad de las NPAu funcionalizadas en modelos de membrana.

4.1) Modelos de membranas fosfolipídicas: Utilizando el ensayo *in vitro* de permeabilidad de membrana artificial en paralelo (PAMPA) se determinó si las

NPAu-e modificadas tenían la capacidad de atravesar una membrana artificial por difusión pasiva. Las muestras analizadas corresponden a NPAu-e, NPAu-e-S-PEG-OMe, NPAu-e-S-PEG-OMe/COOH y NPAu-e-S-PEG-OMe/COO-NH-CD, las cuales se encontraban disueltas en PBS y se añadieron al compartimiento donador, mientras que en el compartimiento aceptor se agregó solo PBS. La membrana que actúa como filtro fue cubierta con 4 μL de fosfatidilcolina disueltos en dodecano (20 mg/mL), y el ensayo se llevó a cabo con una agitación mecánica orbital de 180 rpm a temperatura ambiente, durante un periodo de 24 horas (Figura 28). En la tabla 7 se muestra la permeabilidad efectiva (P_e) de cada muestra, además de la del Tiopental (control positivo) y Azul de Evans (control negativo).

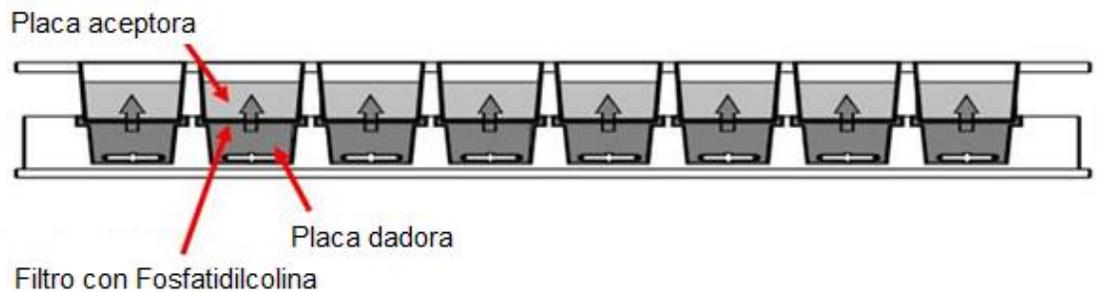


Figura 28. Esquema ensayo PAMPA. Se observa la placa dadora y aceptora, una vez que el sistema se encuentra montado para realizar los estudios de permeabilidad de membranas,

Tabla 7. Permeabilidad efectiva (P_e) de las muestras estudiadas y de los controles (Tiopental y Azul de Evans). Las muestras corresponden a NPAu-e desnudas (NPAu-e), NPAu-e-S-PEG-OMe (OMe), NPAu-e-S-PEG-OMe/COOH (COOH), NPAu-e-S-PEG-OMe/COO-NH-CD (CD), Tiopental (TP) y Azul de Evans (A. de E.). El ensayo fue realizado en triplicado. Se incluye el promedio de la permeabilidad efectiva (\bar{X}) y su respectiva desviación estándar (SD).

Muestras	P_e (cm/s)			\bar{X} (cm/s)	SD (cm/s)
NPAu-e	$2,63 \times 10^{-7}$	$2,24 \times 10^{-7}$	0	$1,12 \times 10^{-7}$	$1,58 \times 10^{-7}$
OMe	$6,61 \times 10^{-7}$	0	$4,02 \times 10^{-8}$	$2,34 \times 10^{-7}$	$3,71 \times 10^{-7}$
COOH	$4,41 \times 10^{-7}$	$4,41 \times 10^{-7}$	$5,24 \times 10^{-7}$	$4,69 \times 10^{-7}$	$4,81 \times 10^{-8}$
CD	$1,82 \times 10^{-7}$	$2,24 \times 10^{-7}$	$3,79 \times 10^{-7}$	$2,62 \times 10^{-7}$	$1,04 \times 10^{-7}$
Tiopental	$2,03 \times 10^{-4}$	$2,64 \times 10^{-4}$	$1,33 \times 10^{-4}$	$2,00 \times 10^{-4}$	$6,58 \times 10^{-5}$
A. Evans	$6,59 \times 10^{-7}$	$7,95 \times 10^{-7}$	0	$4,85 \times 10^{-7}$	$4,25 \times 10^{-7}$

Los resultados resumidos en la Tabla 7, muestran que los distintos nanosistemas analizados no son capaces de difundir a través de la membrana de fosfatidilcolina. Lo anterior se ve reflejado en sus valores de P_e , los cuales son del mismo orden de magnitud que en el caso del Azul de Evans (control negativo). Por otro lado, el Tiopental (control positivo), si tiene la capacidad de difundir a través de la membrana en las condiciones estudiadas.

5) Evaluación de la penetración celular y niveles de toxicidad de las nanopartículas.

5.1) Evaluación de la penetración celular: Se evaluó la capacidad de los distintos conjugados de NPAu-e de penetrar neuroblastomas pertenecientes a la línea celular SH-SY5Y a través de cuantificación de Au por activación neutrónica. Para lo anterior, se utilizaron los conjugados NPAu-e-S-PEG-OMe, NPAu-e-S-PEG-OMe/COOH y NPAu-e-S-PEG-OMe/COO-NH-CD a una concentración de 0,5 nM, y un control de células solo con medio de cultivo (DMEM F12 + 1% suero fetal bovino). Los cultivos fueron realizados en placas de 48 pocillos, agregando una cantidad de 180.000 células por pocillo con 200 μ L de medio. Una vez que las células se encontraran extendidas sobre la superficie del pocillo, se procedió a reemplazar 20 μ L de medio, por 20 μ L de la solución con el tratamiento a una concentración de 5 nM, mientras que en el control se reemplazó por 20 μ L de medio fresco. Las células fueron incubadas durante 2,5 horas, para luego detener la exposición a los distintos tratamientos a través de la remoción de los 200 μ L de medio más tratamiento de cada pocillo. Posterior a esto, se realizaron 5 lavados consecutivos con PBS en cada pocillo, con el fin de remover NPAu-e que no hayan interactuado con las células. Luego, las células fueron separadas de la placa por incorporación de 50 μ L de Tripsina, siendo recolectadas en tubos eppendorfs, junto con un volumen de 150 μ L de PBS correspondientes a 3 lavados (50 μ L) consecutivos con PBS,

con el fin de arrastrar el contenido celular. Una vez recolectadas las muestras, estas fueron liofilizadas y enviadas a la Comisión Chilena de Energía Nuclear (CCHEN), con el fin de cuantificar la cantidad de oro por muestra a través de activación neutrónica. Los datos obtenidos fueron graficados (Figura 29) como cantidad de oro (μg) v/s tratamiento.

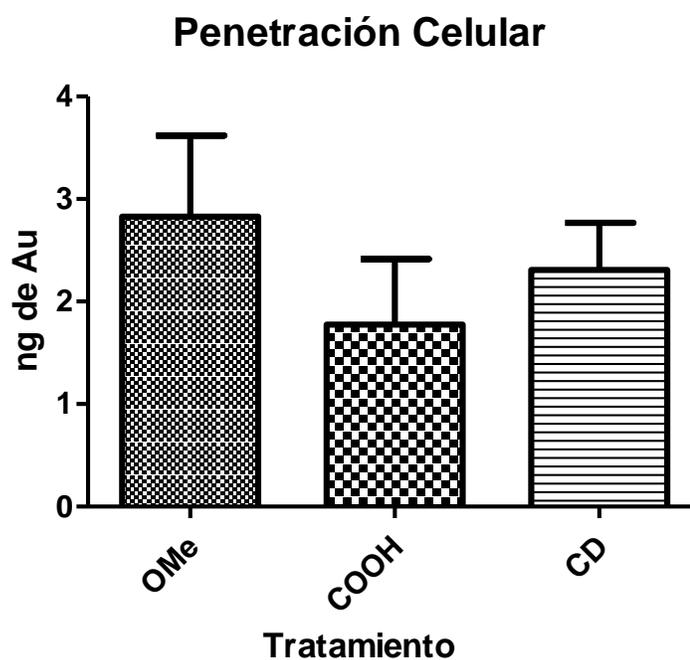


Figura 29. Ensayo penetración celular en neuroblastoma SH-SY5Y a 2,5 horas con distintos tratamientos. Los tratamientos corresponden a NPAu-e-S-PEG-OMe (OMe), NPAu-e-S-PEG-OMe/COOH (COOH) y NPAu-e-S-PEG-OMe/COO-NH-CD (CD). Los experimentos fueron realizados en triplicado con un $n = 3$. No existe diferencia significativa entre los resultados, $P < 0.05$, Kruskal-Wallis.

En la Figura 29 se puede apreciar que los resultados obtenidos para los ensayos de penetración celular no presentan diferencia significativa entre los sistemas NPAu-e-S-PEG-OMe (OMe), NPAu-e-S-PEG-OMe/COOH (COOH) y NPAu-e-S-PEG-OMe/COO-NH-CD (CD) a un tiempo de ensayo de 2,5 horas.

5.2) Ensayos de viabilidad celular: Utilizando la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y, se determinó si el grado de funcionalización de las NPAu-e tienen efectos sobre la viabilidad celular. Para ello, se realizaron los ensayos MTS y liberación de LDH. En el caso del primero, se correlacionó la viabilidad a través de la actividad mitocondrial, produciéndose un compuesto coloreado (formazán). Por otro lado, en el caso del segundo ensayo, 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. En ambos ensayos se utilizaron 10.000 células por pocillo, y concentraciones de 0,05, 0,125 y 0,5 nM para los distintos tratamientos, que corresponden a NPAu-e-S-PEG-OME, NPAu-e-S-PEG-OMe/COOH y NPAu-e-S-PEG-OME/COO-NH-CD. En el caso del MTS (Figura 30), se utilizaron como controles células incubadas con medio (control de vida) e incubadas con SDS (control de muerte), además de un control del vehículo utilizado (agua). El control de viabilidad y del vehículo utilizado en el ensayo de LDH (Figura 31) 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 $n = 3$.

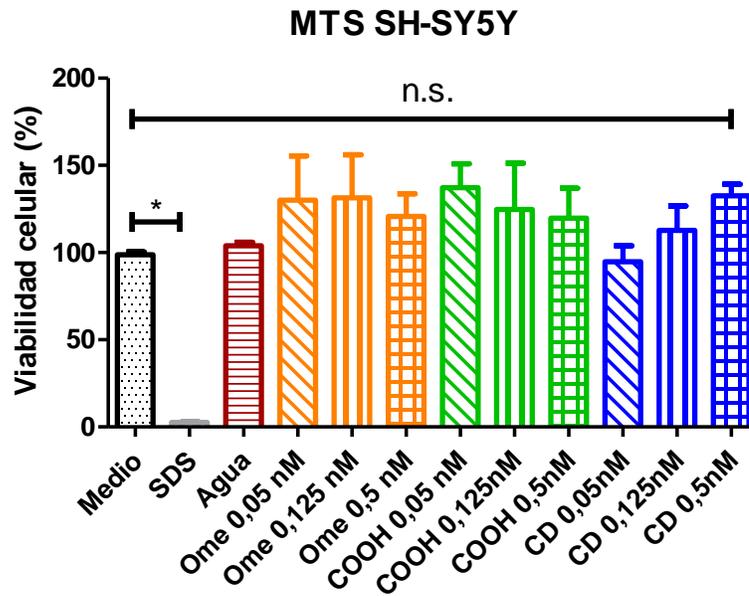


Figura 30. Ensayo MTS de viabilidad celular en neuroblastoma SH-SY5Y con distintos tratamientos. Los tratamientos corresponden a NPAu-e-S-PEG-OMe (OMe), NPAu-e-S-PEG-OMe/COOH (COOH) y NPAu-e-S-PEG-OMe/COO-NH-CD (CD), a concentraciones de 0,05, 0,125 y 0,5 nM cada uno, Los experimentos fueron realizados en triplicado con un $n = 3$. * $P < 0,05$, Kruskal-Wallis.

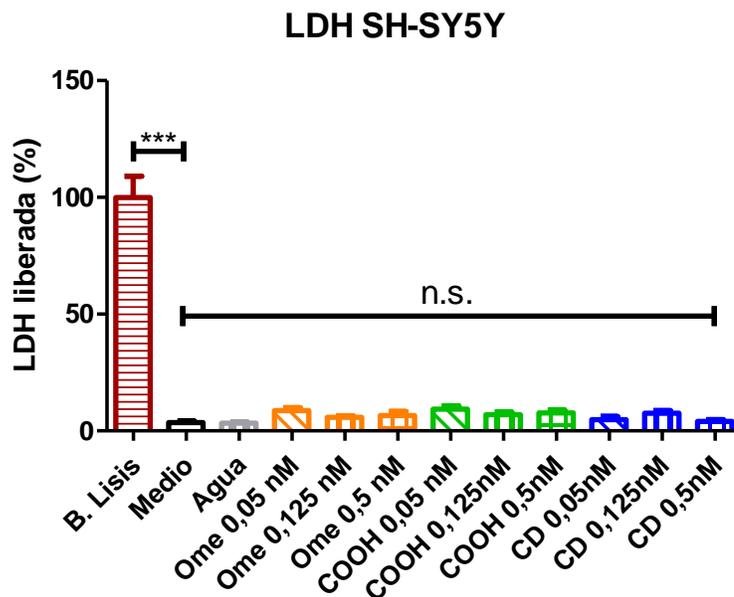


Figura 31. Ensayo de viabilidad celular por medio de liberación de LDH en neuroblastoma SH-SY5Y con distintos tratamientos. Los tratamientos corresponden a NPAu-e-S-PEG-OMe (OMe), NPAu-e-S-PEG-OMe/COOH (COOH) y NPAu-e-S-PEG-OMe/COO-NH-CD (CD), a concentraciones de 0,05, 0,125 y 0,5 nM cada uno, Los experimentos fueron realizados en triplicado con un $n = 3$. *** $P < 0,05$, Kruskal-Wallis.

El análisis de los ensayos de viabilidad celular muestra que los sistemas NPAu-e-S-PEG-OMe (OMe), NPAu-e-S-PEG-OMe/COOH (COOH) y NPAu-e-S-PEG-OMe/COO-NH-CD (CD) no presentan toxicidad en las células de neuroblastoma 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.

Discusión

La tesis desarrollada tenía como objetivo general evaluar si la modificación de las propiedades físico-químicas de nanopartículas esféricas, a través de la funcionalización con PEGs tiolados y ciclodextrinas, afectaba la estabilidad coloidal, así como también mejorar la permeabilidad de estos conjugados a través de membranas, sin afectar la viabilidad celular.

Evaluación de los cambios en las propiedades físico-químicas.

Respecto a la funcionalización de NPAu-e con HS-PEG-OMe y HS-PEG-COOH se puede observar un desplazamiento de la banda plasmónica hacia el infrarrojo conforme se realizan las conjugaciones, partiendo de un valor de 518 nm para las nanopartículas recubiertas con citrato (NPAu-e), pasando a 520 nm al funcionalizarlas con HS-PEG-OMe y quedando en 521 nm finalmente al agregar el PEG carboxílico. Este desplazamiento del plasmón se correlaciona con el proceso de quemisorción que conduce a un cambio del índice de refracción y consecuentemente a un desplazamiento de la banda plasmónica hacia la región infrarroja.

Por otro lado, considerando que una molécula de PEG con un peso molecular de 5000 Da completamente extendida posee una longitud de 27 nm (70), se

observa un aumento en el diámetro hidrodinámico de las NPAu-e-S-PEG-OMe/COOH (40 nm) con respecto a las NPAu-e (20 nm), lo que se debería a la quémisorción de los PEGs sobre la superficie de oro de la nanopartícula. La diferencia de 7 nm que se observa entre los 27 nm de la molécula de PEG y el aumento de 20 nm en las NPAu-e se puede deber a la flexibilidad que posee la molécula y que esta no se encuentre completamente estirada sobre la superficie de la nanopartícula (71).

Es importante destacar, que el aumento de tamaño va acompañado de una disminución en la polidispersidad (PDI), el cual es un índice de la homogeneidad de tamaño de las nanopartículas en solución. En relación al potencial Zeta, primero se observa una disminución en el valor de las NPAu-e-S-PEG-OMe (-19 mV), con respecto a las NPAu-e (-45 mV), lo cual es esperable debido al remplazo del citrato, el cual posee 3 cargas negativas puntuales, por el HS-PEG-OMe que no posee cargas formales. Posterior a esto, al agregar el HS-PEG-COOH se ve nuevamente un aumento en el potencial zeta (-30 mV), lo cual se condice con la capacidad del ácido carboxílico de desprotonarse y, por lo tanto, da cuenta de la funcionalización con HS-PEG-COOH.

La multifuncionalización de las NPAu-e-S-PEG-OMe/COOH con CD-NH₂ produce cambios en las características fisicoquímicas del sistema. Se observa

un desplazamiento de 521 a 522 nm del plasmón superficial de la NPAu-e al agregar la ciclodextrina monoamino. También se observa una disminución en el potencial zeta (valor absoluto), desplazándose de -30 mV a -19 mV. Esta disminución puede ser atribuida a la modificación de los grupos carboxilo del PEG con las ciclodextrinas monoamino a través de la reacción EDC/NHS formando así enlaces amida (entre el grupo amino de la ciclodextrina y el carboxilo del PEG). Se observa una leve disminución del diámetro hidrodinámico de estas nanopartículas modificadas con ciclodextrinas, comparado con el sistema NPAu-e-S-PEG-OMe/COOH (de 40 nm a 38 nm), sin embargo, no es una variación estadísticamente significativa considerando la desviación estándar de las mediciones (Tabla 6) y las dimensiones de las β -ciclodextrinas, las cuales son aproximadamente de 1,53 nm x 0,78 nm (ancho x largo) (57).

Aunque los análisis mediante XPS no son concluyentes respecto a la confirmación del enlace covalente Au-S entre las NPAu-e y el grupo tiol de los PEGs ni tampoco del enlace amida que se forma entre el grupo COOH y el NH₂ de la ciclodextrina, los resultados obtenidos dan cuenta de la modificación que sufre la superficie de Au de las nanopartículas con los grupos tioles de los PEGs (Au-S) y con la posterior modificación con las CDs. Para el análisis de los datos, las señales fueron normalizadas en relación a las señales del Au4f_{7/2} y

C1s, las cuales fueron ajustadas 84.0 y 284.6 eV, respectivamente (72, 73). El análisis de las señales de Au entre NPAu estabilizadas con citrato y Au-disco (Figura 24), muestra que poseen las mismas señales, y que la primera muestra además presenta señales de $Au4f_{7/2}$ y $Au4f_{5/2}$ de Au^{+1} . Lo anterior, puede deberse a que parte de los átomos de oro confinados en la superficie de la nanopartícula experimentan cambios en su estado de oxidación durante su síntesis (74). Al comparar las señales de Au de NPAu-e estabilizadas con citrato (Figura 24) con las obtenidas para las nanopartículas conjugadas con los PEGs y multifuncionalizadas con las CDs, se puede observar que existe una disminución en la intensidad de las señales correspondientes al estado de oxidación cero ($Au4f_{5/2}^0$ y $Au4f_{7/2}^0$), acompañado de un incremento en las señales correspondientes al estado de oxidación +1 ($Au4f_{5/2}^{+1}$ y $Au4f_{7/2}^{+1}$). Lo anterior podría ser explicado por dos fenómenos. El primero, es que se produzca simplemente un cambio en el estado de oxidación del Au en la superficie de las NPAu-e, lo cual llamaría la atención ya que al estar recubiertas con PEGs, deberían estar menos sujetas a oxidación. La otra posibilidad es que la muestra se haya cargado producto de una prolongada irradiación (16 hrs) realizada con el fin de obtener una mejor resolución de los espectros de las muestras funcionalizadas. Esto podría producir el desdoblamiento de la señal de Au4f (en estado de oxidación cero), la cual se suma a la señal de Au4f en estado de oxidación +1, produciéndose un aumento en la intensidad en las dos muestras funcionalizadas (75). Por otro lado, al analizar las señales

correspondientes a C1s, se pueden observar las contribuciones de esta señal en todos los sistemas analizados. La señal de carbono se observa también en el disco de Au debido a la contaminación por CO₂ existente al analizar las muestras por XPS y que no puede ser eliminada a pesar de trabajar en condiciones de ultra-alto vacío (73). Las señales de las NPAu-e con citrato presentan mayor intensidad, lo que se relaciona con la presencia de citrato, mientras que las nanopartículas funcionalizadas poseen casi las mismas contribuciones, pero existe un cambio en las intensidades ya que cambian los grupos presentes, lo que podría dar cuenta de la presencia de los grupos PEG y CDs. Sin embargo, en estas muestras no se observa la señal característica del azufre (energía de ligadura ~ 163 eV, S 2p), la cual es esperable considerando la quimisorción (enlace Au-S). El análisis de muestras sólidas puras de PEGs, tanto el -OMe como el -COOH revela que la intensidad de la señal azufre (señal 2p) perteneciente al grupo tiol es prácticamente nula con una resolución muy baja (Figura 26), mientras que las señales de oxígeno y carbono son intensas y bien definidas. Esto puede deberse a que la mayoría de los átomos presentes en las muestras corresponden a C y O, y solo existe un átomo de S por molécula de polietilenglicol tiolado, por lo que la señal pierde resolución. Finalmente, no se observa la aparición del nitrógeno del enlace amida, que posiblemente, al igual que en el caso de los grupos tioles, su señal es muy baja en comparación a los otros átomos presentes.

A través de las imágenes obtenidas mediante TEM, se pudo determinar el diámetro de las NPAu-e, así como su tamaño al ser funcionalizadas con los PEGs y CD-NH₂, los cuales son menores en relación a los tamaños obtenidos por DLS (Tablas 6 y 7). Estos resultados correlacionan bien ya que mediante DLS se obtiene el diámetro hidrodinámico de las partículas, el cual corresponde al diámetro de la partícula más una doble capa que se adhiere a la superficie de esta. Además, mediante la tinción con ácido fosfotúngstico, se pudo observar la presencia de un halo alrededor de los sistemas funcionalizados tanto con los PEGs, como con los multifuncionalizados con CD. Dicho halo está ausente en las NPAu-e estabilizadas con citrato, lo cual es prueba de la funcionalización de las nanopartículas.

Estudios de estabilidad.

Al realizar los estudios de estabilidad en función del tiempo para las muestras funcionalizadas con las distintas proporciones de HS-PEG-COOH se puede observar que la mayoría de las muestras estudiadas presentan estabilidad durante los 7 días. Cabe destacar, que las mayores diferencias se observan en los valores de potencial Zeta (figura 17.B). En el caso de la muestra A, se observó que el potencial Zeta no sufre variación con respecto a la nanopartícula conjugada con solo el PEG metilado (día 1) y que a medida que transcurre el tiempo existe una disminución considerable del valor absoluto de este

parámetro llegando a valores cercanos a la neutralidad (día 7), lo que nos da cuenta de una muestra poco estable. Por otro lado se observa que para la muestra C no hay un aumento del potencial zeta (-30 mV) a valores más negativos, aunque se siga aumentando la proporción de HS-PEG-COOH (muestra D y E), lo que puede dar cuenta de una saturación de éste en el sistema. Además se puede notar que la muestra C presenta estabilidad en todos sus parámetros durante los 7 días. La estabilidad de este sistema puede atribuirse a un efecto estérico producido por las moléculas de PEG sobre la superficie de las nanopartículas y electrostático atribuible a la carga negativa del ion carboxilato del HS-PEG-COOH (76).

En relación a la estabilidad al modificar la fuerza iónica, se observa que todas las muestras analizadas conservan sus diámetros hidrodinámicos al cabo de una hora de ser tratadas con cloruro de sodio. Sin embargo, al aumentar la concentración de NaCl a 150 mM (fuerza iónica similar a la del plasma) no fue posible determinar el potencial zeta debido a su interferencia en las mediciones. Finalmente, los resultados de los estudios realizados al modificar el pH de la solución (3, 7 y 9) indican un cambio en el potencial zeta (disminución en el valor absoluto) de todas las muestras, tomando como referencia los valores obtenidos a pH 7. A pH=3 se observan los valores más cercanos a la neutralidad, debido a que se produce una neutralización de los grupos carboxilos, dado que el pKa de los ácidos carboxílicos es cercano a 5 (76). Por otro lado, al analizar los resultados a pH 9, solo la muestra C (1 mg/200 µL)

presenta un potencial Zeta similar a pH 7, mientras que en el caso de las otras muestras se observa un valor menor al obtenido a pH neutro.

La muestra C utilizó 1 mg/200 μ L de HS-PEG- COOH para la funcionalización, es la muestra que presenta mayor estabilidad en los parámetros analizados (poca variación del diámetro hidrodinámico vs el pH) y, por ende, la seleccionada para proseguir con la modificación con CD-NH₂.

Grado de funcionalización con CD-NH₂.

La determinación del grado de funcionalización se llevó a cabo mediante el ensayo de fluorescamina (68). La curva de calibración, realizada entre 0,3 y 6 μ M, presentó un $R^2 = 0,988$; el LD es menor a la concentración más baja utilizada (0,27 μ M) y que el límite de cuantificación es levemente superior (0,31 μ M). El grado de funcionalización pudo ser determinado mediante esta metodología, observándose una tendencia al aumento del número de ciclodextrinas por nanopartícula a medida que se aumenta la cantidad de ciclodextrina inicial al momento de la conjugación (Figura 23). Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas.

Permeación a través de modelos de membrana.

Mediante el ensayo PAMPA se puede determinar *in vitro* si un compuesto tiene la capacidad de permear por difusión pasiva. Este ensayo es ampliamente utilizado en la industria farmacéutica y tiene una buena correlación con ensayos celulares, como lo es el de monocapas de células Caco-2 (69). El parámetro que se utiliza para determinar si un compuesto puede o no atravesar una membrana es la permeabilidad efectiva (Pe), la cual se calcula mediante la fórmula descrita en la sección 4.1 de metodologías. Se considera que un compuesto es permeable cuando tiene una Pe del orden de 10^{-6} cm/s o mayor. En el caso de las muestras analizadas, el Tiopental (control positivo) presenta la mayor Pe (2×10^{-4} cm/s), lo que se debe a que a pH 7.4 la molécula no se encuentra ionizada, lo que permite que pueda atravesar la membrana de fosfatidilcolina. Por otro lado, el Azul de Evans (control negativo), se encuentra ionizado a pH 7.4, por lo que es incapaz de atravesar la membrana artificial (Pe = 4.85×10^{-7} cm/s). Al observar la Pe efectiva de las muestras con nanopartículas, en todas existe una permeabilidad efectiva del orden de 10^{-7} cm/s, por lo que ninguna de ellas se puede considerar permeable. Sin embargo, es importante considerar que si bien se ha descrito que las ciclodextrinas aumentan la permeabilidad de agentes terapéuticos, esto se debería a la interacción de las ciclodextrinas con el colesterol que se encuentra en la membrana (62). En el caso del ensayo PAMPA realizado, la membrana se encuentra formada por fosfatidilcolina, por lo que posiblemente la interacción de

ésta con la CD sea nula o no lo suficiente para mejorar la permeabilidad de la nanopartícula de oro. No obstante, es importante destacar que es difícil que nanopartículas de los tamaños obtenidos puedan difundir a través de la membrana plasmática si es que ésta se encuentra intacta, es decir, sin perforaciones.

Estudios de penetración y viabilidad celular.

Utilizando la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y, se determina como los distintos sistemas afectan la viabilidad celular, y la capacidad de estos mismos de penetrar las células. En relación a lo primero, se utilizaron 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. En el caso del ensayo MTS, se evalúa la formación de un compuesto coloreado (formazán) producto de la actividad de enzimas presentes en la mitocondria (77), cuya actividad se relaciona con la viabilidad celular. 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. Por otro lado, el ensayo de de LDH, determina el porcentaje de esta enzima liberada de los cultivos, lo cual se relaciona con la muerte celular. La LDH corresponde a una

enzima que solo se encuentra a nivel intracelular, por lo que su presencia fuera de la célula se da cuando existe daño celular (78). Los resultados obtenidos, muestran que a las distintas concentraciones ensayadas (0,05, 0,125 y 0,5 nM) no existe efecto de los conjugados NPAu-e-S-PEG-OMe, NPAu-e-S-PEG-OMe/COOH y NPAu-e-S-PEG-OMe/COO-NH-CD sobre la viabilidad celular en ambos ensayos al compararlos con el control de sobrevivencia (células incubadas con medio). A partir de los resultados obtenidos en estos experimentos, se determinó la capacidad de estos conjugados de penetrar la membrana celular y de ser internalizadas por las células. Para lo anterior, se utilizó la concentración más alta ensayada (0,5 nM) en las pruebas de citotoxicidad, utilizando un tiempo de exposición al tratamiento de 2,5 horas. Los resultados obtenidos dan cuenta de que existe una tendencia de las muestras NPAu-e-S-PEG-OMe y NPAu-e-S-PEG-OMe/COO-NH-CD de presentar una mayor penetración celular comparado con la muestra NPAu-e-S-PEG-OMe/COOH. Lo anterior se explicaría por el hecho de que las muestras funcionalizadas con solo el PEG metoxi y con CDs, poseen un potencial zeta más cercano a la neutralidad (-20 mV), por lo que podría estar favorecida su interacción con las membranas comparado con las NPAu-e-S-PEG-OMe/COOH, que poseen un carácter más negativo (-30 mV). A pesar de que estos resultados darían cuenta de que no existe un mejoramiento del sistema en su capacidad de atravesar la membrana debido a la inclusión de ciclodextrinas, es importante tomar en cuenta que solo se evaluó esta interacción en un determinado tiempo (2,5 horas), y que es

posible que a mayores tiempos exista una mayor penetración de este sistema en relación a los otros, por lo cual se debe considerar la futura evaluación de dicho proceso a tiempos más largos. Por otro lado, una de las limitaciones del ensayo, es que a pesar de los reiterados lavados y precauciones para eliminar las NPAus que no se encontraban dentro de las células, existe la posibilidad de que la determinación del oro total también contemple nanopartículas que se encontraran interactuando con la membrana celular, pero no que se encontraran específicamente dentro de ellas. Asimismo, es importante considerar las posibles interacciones existentes entre las proteínas que se encuentran en el medio de cultivo y las diferentes nanopartículas que se utilizaron, lo cual da origen a la denominada corona de proteínas. Dicho fenómeno puede gobernar el proceso de internalización celular favorecida por la endocitosis mediada por receptores (79, 80). La obtención de imágenes a través de TEM de muestras de cultivo celular en presencia de estos tratamientos, podría dar luces de lo que realmente ocurre.

Conclusiones y Proyecciones

Mediante el trabajo experimental desarrollado durante esta tesis, se logró obtener un sistema estable (tiempo 7 días, pHs 3, 7 y 9 y fuerza iónica 150 mM NaCl) y se pudo determinar que la proporción 1 mg/200 μ L es la adecuada para la funcionalización con los polietilenglicoles empleados, que permitieron la posterior incorporación de las ciclodextrinas al sistema. Se determinó la importancia de la relación entre los PEGs y como estos cambios en las proporciones de ellos afectan de manera directa sobre la estabilidad de las nanopartículas. Los cambios fisicoquímicos en el sistema en las distintas etapas de funcionalización dan cuenta del éxito en las metodologías utilizadas en la multifuncionalización de las NPAu, lo cual fue observado a través de cambios en el diámetro hidrodinámico y potencial Zeta, espectroscopía UV-Visible, microscopía electrónica de transmisión, y en menor medida, a través de espectroscopía de rayos X. Aunque no se pudo observar un aumento en la permeabilidad del sistema al utilizar el ensayo *in vitro* PAMPA, ni tampoco una mejora en la permeabilidad celular al incorporar CDs al sistema y exponerlo a células durante 2.5 horas, la funcionalización de las nanopartículas de oro no produjo efectos sobre la viabilidad celular de las células SH-SY5Y (MTS y liberación de LDH).

Son necesarios ensayos con mayores tiempos de exposición a células para lograr dar una respuesta a la hipótesis propuesta en esta tesis. Evaluar la permeabilidad celular a mayores tiempos o con células pertenecientes a la barrera hematoencefálica, podría dilucidar si efectivamente estos cambios en las propiedades fisicoquímicas en el sistema, así como la incorporación de las CDs, inciden en una mayor entrada de las NPAu-es a las células. Además, la incorporación de sondas fluorescentes en el sistema, así como la obtención de imágenes a través de TEM, podrían otorgar mayor información respecto a la entrada de estos sistemas a nivel celular. Por último, es importante considerar las posibles interacciones que tienen las nanopartículas con el medio que las rodea, específicamente con las proteínas del suero, las cuales a través de la formación de la corona de proteína gobiernan la interacción y la entrada de estos sistemas con la membrana celular, incidiendo directamente en los resultados obtenidos.

Material Suplementario

Tabla 1s. Valores de fluorescencia obtenidos para las concentraciones de CD-NH₂ estudiadas. Se presenta el promedio (X), desviación estándar (SD) y el coeficiente de variación (%CV).

Conc μM	Sens 100		
	X	SD	CV %
0.3	1271.33333	61.3704598	4.82725169
0.45	1813	73.5391052	4.05621099
0.6	2692	171.350518	6.36517526
1.2	3895.66667	99.3243844	2.54961199
2.25	6263.33333	68.2373309	1.08947309
3	8650.33333	341.778193	3.95104073
4.5	11691.3333	69.923768	0.59808207
6	17939.3333	391.681418	2.18336663

Bibliografía

- (1) El-Sayed, I. H.; Huang, X. H.; El-Sayed, M. A. Surface plasmon resonance scattering and absorption of anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles in cancer diagnostics: applications in oral cancer. *Nano Lett.* 2005, 5, 829–834.
- (2) Yguerabide, J.; Yguerabide, E. E. Resonance light scattering particles as ultrasensitive labels for detection of analytes in a wide range of applications. *J. Cell Biochem.* 2001, 84, 71–81.
- (3) Karhanek, M.; Kemp, J. T.; Pourmand, N.; Davis, R. W.; Webb, C. D. Single DNA molecule detection using nanopipettes and nanoparticles. *Nano Lett.* 2005, 5, 403–407.
- (4) Taton, T. A.; Lu, G.; Mirkin, C. A. J. Two-color labeling of oligonucleotide arrays via size-selective scattering of nanoparticle probes. *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 123, 5164–5165.
- (5) Kohler, N.; Sun, C.; Wang, J.; Zhang, M. Methotrexate-modified superparamagnetic nanoparticles and their intracellular uptake into human cancer cells. *Langmuir.* 2005, 21, 8858–8864.

- (6) Yang, P. H.; Sun, X. S.; Chiu, J. F.; Sun, H. Z.; He, Q. Y. Transferrin-mediated gold nanoparticle cellular uptake. *Bioconjugate Chem.* 2005, 16, 494–496.
- (7) Hirsch, L. R.; Stafford, R. J.; Bankson, J. A.; Sershen, S. R.; Rivera, B.; Price, R. E.; Hazle, J. D.; Halas, N. J.; West, J. L. Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003, 100, 13549–13554.
- (8) Bergen, J.M.; van Recum, H.A.; Goodman, T.T.; Massey, A.P.; Pun, S.H. Gold nanoparticles as a versatile platform for optimizing physicochemical parameters for targeted drug delivery. *Macromol. Biosci.* 2006, 6, 506–516.
- (9) Ghosh, P.; Han, G.; De, M.; Kim, C.K.; Rotello, V.M. Gold nanoparticles in delivery applications. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2008, 60, 1307-1315.
- (10) Iyer, A.K.; Khaled, G.; Fang, J.; Maeda, H. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug. Discov. Today.* 2006, 11, 812-818.
- (11) Gobin, A.M.; Watkins, E.M.; Quevedo, E.; Colvin, V.L.; West, J.L. Near-infrared-resonant gold/gold sulfide nanoparticles as a photothermal cancer therapeutic agent. *Small.* 2010, 6, 745-752.

- (12) Guerrero, A.R.; Hassan, N.; Escobar, C.A.; Albericio, F.; Kogan, M.J.; Araya, E. Gold nanoparticles for photothermally controlled drug release. *Nanomedicine (Lond)*. 2014, 13, 2023-2039.
- (13) El-Sayed, M.A. Some interesting properties of metals confined in time and nanometer space of different shapes. *Acc. Chem. Res.* 2001, 34, 257-264.
- (14) Chithrani, B.D.; Ghazani, A.A.; Chan, W.C. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett.* 2006, 6, 662-668.
- (15) Jiang, W.; Kim, B.Y.; Rutka, J.T.; Chan, W.C. Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nat. Nanotechnol.* 2008, 3, 145-150.
- (16) Lewinski, N.; Colvin, V.; Drezek, R. Cytotoxicity of nanoparticles. *Small.* 2008, 4, 26-49.
- (17) Soto, C. Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.* 2003, 4, 49-60.
- (18) Kogan, M. J.; Bastus, N. G.; Amigo, R.; Grillo-Bosch, D.; Araya, E.; Turiel, A.; Labarta, A.; Giralt, E.; Puntès, V. F. Nanoparticle mediated local and remote manipulation of protein aggregation. *Nano Lett.* 2006, 6, 110-115.
- (19) Adura, C.; Guerrero, S.; Salas, E.; Medel, L.; Riveros, A.; Mena, J.; Arbiol, J.; Albericio, F.; Giralt, E.; Kogan, M.J. Stable conjugates of peptides with gold

nanorods for biomedical applications with reduced effects on cell viability. *ACS Appl. Mater. Inter.* 2013, 5, 4076-4085.

(20) Hetenyi, C.; Kortvelyesi, T.; Penke, B. Mapping of possible binding sequences of two beta-sheet breaker peptides on beta amyloid peptide of Alzheimer's disease, *Bioorgan. Med. Chem.* 2002, 10, 1587-1593.

(21) Soto, C.; Sigurdsson, E. M.; Morelli, L.; Kumar, R. A.; Castano, E. M.; Frangione, B. Beta-sheet breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis: Implications for Alzheimer's therapy, *Nat. Med.* 1998, 4, 822-826.

(22) Guerrero, S.; Araya, E.; Fiedler, J. L.; Arias, J. I.; Adura, C.; Albericio, F.; Giralt, E.; Arias, J. L.; Fernández, M. S.; Kogan, M. J. Improving the brain delivery of gold nanoparticles by conjugation with an amphipathic peptide. *Nanomedicine.* 2010, 5, 897-913.

(23) Morley, J.F.; Hurtig, H.I. Current understanding and management of Parkinson disease: five new things. *Neurology.* 2010, 75, 9-15.

(24) Pike, C.J.; Walencewicz, A.J.; Glabe, C.G.; Cotman, C.W. In vitro aging of beta-amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity. *Brain Res.* 1991, 563, 311-314.

- (25) Lorenzo, A.; Yankner, B.A. Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994, 91,12243-12247.
- (26) Ittner, L.M.; Götz, J. Amyloid- β and tau--a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 2011, 12, 65-72.
- (27) Olmedo, I.; Araya, E.; Sanz, F.; Medina, E.; Arbiol, J.; Toledo, P.; Alvarez-Lueje, A.; Giralt, E.; Kogan, M. J. How changes in the sequence of the peptide CLPFFD-NH₂ can modify the conjugation and stability of gold nanoparticles and their affinity for beta-amyloid fibrils. *Bioconjugate Chem.* 2008, 19, 1154–1163.
- (28) Pardridge, W.M. Blood-brain barrier delivery. *Drug Discov. Today.* 2007, 12, 54-61.
- (29) Spuch, C.; Navarro, C. Transport Mechanisms at the Blood-Cerebrospinal-Fluid Barrier: Role of Megalin (LRP2). *Rec. Pat. Endoc. Metab. Immun. Drug Discov.* 2010, 4, 190-205.
- (30) Abbott, N.J.; Rönnbäck, L.; Hansson, E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* 2006, 7, 41-53.
- (31) Cecchelli, R.; Berezowsky, V.; Lundquist, S.; Culot, M.; Renftel, M.; Dehouck, M.P.; Fenart, L. Modelling the BBB in drug Discovery and development. *Nat. Rev. Drug Discover.* 2007, 6, 650-661.

- (32) Dogrukol-Ak, D.; Banks, W.A.; Tuncel, N.; Tuncel, M. Passage of vasoactive intestinal peptide across the blood brain barrier. *Peptides*. 2003, 24, 437-444.
- (33) van Rooy, I.; Cakir-Tascioglu, S.; Hennink, W.E.; Storm, G.; Schiffelers, R.M.; Mastrobattista, E. In vivo methods to study uptake of nanoparticles into the brain. *Pharm. Res.* 2011; 28, 456-471.
- (34) Fernandez-Carneado, J.; Kogan, M.J.; Castel, S.; Giralt, E. Potential Peptide Carriers: Amphipathic Proline-Rich Peptides Derived from the N-Terminal Domain of γ -Zein. *Angewandte. Chemie. International Edition*. 2004, 43, 1811-1814.
- (35) Deguchi, Y.; Naito, T.; Yuege, T.; Furukawa, A.; Yamada, S.; Patridge, W.M.; Kimura, R. Blood-brain barrier transport of ^{125}I -labeled Basic fibroblast growth factor. *Pharm. Res.* 2000, 17, 63-69.
- (36) Patridge, W.M. The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx*. 2005, 2, 3-14.
- (37) Abbott, N.J. Prediction of blood-brain barrier permeation in drug discovery from in vivo, in vitro and in silico models. *Drug. Discov. Today: Technologies*. 2004, 1, 407-416.

(38) Batrakova, E.V.; Han H.Y.; Miller, D.W.; Kabanov, A.V. Effects of pluronic P85 unimers and micelles on drug permeability in polarized BBMEC and Caco-2 cells. *Pharm. Res. (NY)*. 1998, 15, 1525–1532.

(39) Wang, Y.Y.; Lui, P.C.; Li, J.Y. Receptor-Mediated Transport of Drugs Across the BBB. *Immunotherapy*. 2009, 1, 983-993.

(40) Prades, R.; Guerrero, S.; Araya, E.; Molina, C.; Salas, E.; Zurita, E.; Selva, J.; Egea, G.; López-Iglesias, C.; Teixidó, M.; Kogan, M.J.; Giralt, E. Delivery of gold nanoparticles to the brain by conjugation with a peptide that recognizes the transferrin receptor. *Biomaterials*. 2012, 33, 7194-7205.

(41) Arnida; Malugin, A.; Ghandehari, H. Cellular uptake and toxicity of gold nanoparticles in prostate cancer cells: a comparative study of rods and spheres. *J. Appl. Toxicol.* 2010, 30, 212-217.

(42) Cartiera, M.S.; Johnson, K.M.; Rajendran, V.; Caplan, M.J.; Saltzman, W.M. The uptake and intracellular fate of PLGA nanoparticles in epithelial cells. *Biomaterials*. 2009, 30, 2790-2798.

(43) Chithrani, B.D.; Chan, W.C. Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano Lett.* 2007, 7, 1542-1550.

(44) Cho, E.C.; Xie, J.; Wurm, P.A.; Xia, Y. Understanding the role of surface charges in cellular adsorption versus internalization by selectively removing gold

nanoparticles on the cell surface with a I₂/KI etchant. *Nano Lett.* 2009, 9, 1080-1084.

(45) Leroueil, P.R.; Berry, S.A.; Duthie, K.; Han, G.; Rotello, V.M.; McNerny, D.Q.; Baker, J.R.; Orr, B.G.; Holl, M.M.B.. Wide varieties of cationic nanoparticles induce defects in supported lipid bilayers. *Nano Lett.* 2008, 8, 420-424.

(46) Lin, J.; Zhang, H.; Chen, Z.; Zheng, Y. Penetration of lipid membranes by gold nanoparticles: Insights into cellular uptake, cytotoxicity, and their relationship. *ACS Nano.* 2010, 4, 5421-5429.

(47) Moghimi, S.M.; Hunter, A.C.; Murray, J.C. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol. Rev.* 2001, 53, 283-318.

(48) Duguet, E.; Vasseur, S.; Mornet, S.; Devoisselle, J.M. Magnetic nanoparticles and their applications in medicine. *Nanomedicine (Lond).* 2006, 1, 157-168.

(49) Tsai, D.H.; DelRio, F.W.; MacCuspie, R.I.; Cho, T.J. Zachariah, M.R.; Hackley, V.A. Competitive adsorption of thiolated polyethylene glycol and mercaptopropionic acid on gold nanoparticles measured by physical characterization methods. *Langmuir.* 2010, 26, 10325-10333.

(50) Aggarwal, P.; Hall, J.B.; McLeland, C.B.; Dobrovolskaia, M.A.; McNeil, S.E. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle

biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2009, 61, 428-437.

(51) Oh, E.; Delehanty, J.B.; Sapsford, K.E.; Susumu, K.; Goswami, R.; Blanco-Canosa, J.B.; Dawson, P.E.; Granek, J.; Shoff, M.; Zhang, Q.; Goering, PL.; Huston, A.; Medintz, I.L. Cellular uptake and fate of PEGylated gold nanoparticles is dependent on both cell-penetration peptides and particle size. *ACS Nano.* 2011, 5, 6434-6448.

(52) Li, S.D.; Huang, L. Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles. *Mol. Pharm.* 2008, 5, 496-504.

(53) Niidome, T.; Yamagata, M.; Okamoto, Y.; Akiyama, Y.; Takahashi, H.; Kawano, T.; Katayama, Y.; Niidome, Y. PEG-modified gold nanorods with a stealth character for in vivo applications. *J. Control Release.* 2006, 114, 343-347.

(54) Gil, E.S.; Li, J.; Xiao, H.; Lowe, T.L. Quaternary ammonium beta-cyclodextrin nanoparticles for enhancing doxorubicin permeability across the in vitro blood-brain barrier. *Biomacromolecules.* 2009, 10, 505-516.

(55) Li, M.; Tarawally, M.; Liu, X.; Liu, X.; Guo, L.; Yang, L.; Wang, G. Application of cyclodextrin-modified gold nanoparticles in enantioselective monolith capillary electrochromatography. *Talanta.* 2013, 109, 1-6.

- (56) Lin, D.; Wu, J.; Ju, H.; Yan, F. Signal amplification for electrochemical immunosensing by in situ assembly of host-guest linked gold nanorod superstructure on immunocomplex. *Biosens. Bioelectron.* 2013, 45, 195-200.
- (57) Szejtli, J. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chem. Rev.* 1998, 98, 1743-1754.
- (58) Arima, H.; Yunomae, K.; Hirayama, F.; Uekama, K. Contribution of P-glycoprotein to the enhancing effects of dimethyl-beta-cyclodextrin on oral bioavailability of tacrolimus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2001, 297, 547-555.
- (59) Udata, C.; Patel, J.; Pal, D.; Hejchman, E.; Cushman, M.; Mitra, A.K. Enhanced transport of a novel anti-HIV agent--cosalane and its congeners across human intestinal epithelial (Caco-2) cell monolayers. *Int. J. Pharm.* 2003, 250, 157-168.
- (60) Binkowski-Machut, C.; Hapiot, F.; Martin, P.; Cecchelli, R.; Monflier, E. How cyclodextrins can mask their toxic effect on the blood-brain barrier. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006, 16, 1784-1787.
- (61) Gil, E.S.; Wu, L.; Xu, L.; Lowe, T.L. β -cyclodextrin-poly(β -amino ester) nanoparticles for sustained drug delivery across the blood-brain barrier. *Biomacromolecules.* 2012, 13, 3533-3541.
- (62) Tilloy, S.; Monnaert, V.; Fenart, L.; Bricout, H.; Cecchelli, R.; Monflier, E. Methylated beta-cyclodextrin as P-gp modulators for deliverance of doxorubicin

across an in vitro model of blood-brain barrier. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006, 16, 2154-2157.

(63) Monnaert, V.; Betbeder, D.; Fenart, L.; Bricout, H.; Lenfant, A.M.; Landry, C.; Cecchelli, R.; Monflier, E.; Tilloy, S. Effects of gamma- and hydroxypropyl-gamma-cyclodextrins on the transport of doxorubicin across an in vitro model of blood-brain barrier. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2004, 311, 1115-1120.

(64) Monnaert, V.; Tilloy, S.; Bricout, H.; Fenart, L.; Cecchelli, R.; Monflier, E. Behavior of alpha-, beta-, and gamma-cyclodextrins and their derivatives on an in vitro model of blood-brain barrier. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2004, 310, 745-751.

(65) Petkova, G.A.; Záruba, C.K.; Zvátora, P.; Král, V. Gold and silver nanoparticles for biomolecule immobilization and enzymatic catalysis. *Nanoscale Res. Lett.* 2012; 7, 287.

(66) Huang, X.; Peng, X.; Wang, Y.; Wang, Y.; Shin, D.M.; El-Sayed, M.A.; Nie, S. A reexamination of active and passive tumor targeting by using rod-shaped gold nanocrystals and covalently conjugated peptide ligands. *ACS Nano.* 2010, 4, 5887-5896.

(67) Staros, J.V.; Wright, R.W.; Swingle, D.M. Enhancement by N-hydroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. *Anal. Biochem.* 1986, 156, 220-222.

- (68) Zhang, Y.; Pan, H.; Zhang, P.; Gao, N.; Lin, Y.; Luo, Z.; Li, P.; Wang, C.; Liu, L.; Pang, D.; Cai, L.; Ma, Y. Functionalized quantum dots induce proinflammatory responses in vitro: the role of terminal functional group-associated endocytic pathways. *Nanoscale*. 2013, 5, 5919-5929.
- (69) Di, L.; Kerns, E.H.; Fan, K.; McConnell, O.J.; Carter, G.T. High throughput artificial membrane permeability assay for blood-brain barrier. *Eur. J. Med. Chem.* 2003, 38, 223-232.
- (70) Cauda, V.; Argyo, C.; Bein, T. Impact of different PEGylation patterns on the long-term bio-stability of colloidal mesoporous silica nanoparticles. *J. Mater. Chem.* 2010, 20, 8693-8699.
- (71) Steinmetz, N.F.; Manchester, M. PEGylated viral nanoparticles for biomedicine: the impact of PEG chain length on VNP cell interactions in vitro and ex vivo. *Biomacromolecules*. 2009, 10, 784-792.
- (72) Jin, R.; Sun, S.; Yang, Y.; Xing, Y.; Yu, D.; Yu, X.; Song, S. Size-dependent catalytic properties of Au nanoparticles supported on hierarchical nickel silicate nanostructures. *Dalton Trans.* 2013, 42, 7888-7893.
- (73) Shchukarev, A.V.; Korolkov, D.V. XPS Study of Group IA Carbonates. *CEJC*. 2004, 2, 347-362.

- (74) Sylvestre, J.P.; Poulin, S.; Kabashin, A.; Sacher, E.; Meunier, M.; Luong, J.H. Surface Chemistry of Gold Nanoparticles Produced by Laser Ablation in Aqueous Media. *J. Phys. Chem. B.* 2004, 108, 16864–16869.
- (75) Skinner, W.; Prestidge, C.; Smart, R. Irradiation Effects During XPS Studies of Cu(II) Activation of Zinc Sulphide. *SIA.* 1996, 24, 620-626.
- (76) Ryman-Rasmussen, J.P.; Riviere, J.E.; Monteiro-Riviere, N.A. Penetration of intact skin by quantum dots with diverse physicochemical properties. *Toxicol. Sci.* 2006, 91, 159-165.
- (77) Riss, T.; Moravec, R.; Niles, A.; Benink, H.; Worzella, T.; Minor, L.; Storts, D.; Reid, Y. *Cell Viability Assays. Assay Guidance Manual.* 2013.
- (78) Chan, F.K.; Moriwaki, K.; De Rosa, M.J. Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. *Methods Mol. Biol.* 2013, 979, 65-70.
- (79) Cheng, X.; Tian, X.; Wu, A.; Li, J.; Tian, J.; Chong, Y.; Chai, Z.; Zhao, Y.; Chen, C.; Ge, C. Protein Corona Influences Cellular Uptake of Gold Nanoparticles by Phagocytic and Nonphagocytic Cells in a Size-Dependent Manner. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2015, 7, 20568-20575.
- (80) Kamath, P.; Fernandez, A.; Giralt, F.; Rallo, R. Predicting Cell Association of Surface-Modified Nanoparticles Using Protein Corona Structure - Activity Relationships (PCSAR). *Curr. Top. Med. Chem.* 2015, 15, 1930-1937.