



RIDAA
Repositorio Institucional
Digital de Acceso Abierto de la
Universidad Nacional de Quilmes



Universidad
Nacional
de Quilmes

Igartúa, Daniela Edith

Nanotecnología farmacéutica basada en dendrímeros aplicada al tratamiento del Alzheimer



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Igartúa, D. E. (2019). Nanotecnología Farmacéutica basada en Dendrímeros aplicada al tratamiento del Alzheimer. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/1694>

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

Nanotecnología Farmacéutica basada en Dendrímeros aplicada al tratamiento del Alzheimer

TESIS DOCTORAL

Daniela Edith Igartúa

daniigartua@gmail.com

Resumen

La enfermedad de Alzheimer (EdA) es una enfermedad neurodegenerativa multifactorial, que no tiene cura ni tratamiento paliativo, por lo que es terminal. Además, es la forma más común de demencia y es el desorden que más afecta a los adultos mayores, siendo tan común como el paro cardiorrespiratorio. Asimismo, con el aumento de la expectativa de vida, se incrementa la prevalencia de la EdA, por lo que se generan impactos a nivel económico y sociopolítico que la han convertido en una prioridad de salud pública.

La etiología de la EdA es multifactorial y poco comprendida, existiendo diversas hipótesis para explicar la patogénesis de la enfermedad. Recientemente, varios autores propusieron una nueva mirada enfatizando dos cuestiones: (1) el desarrollo de la EdA resulta de los efectos colectivos de múltiples factores que no están restringidos a una o más de las hipótesis etiológicas específicas; y (2) cada individuo podría sufrir una combinación particular de factores etiológicos, por lo que el desarrollo y progresión de enfermedad en cada individuo sería también particular. Sumado a ello, enfatizaron la complejidad del diseño de terapias efectivas para desórdenes del sistema nervioso central, debido a que la mayoría de las drogas no pueden acceder al cerebro por la presencia de la barrera hematoencefálica. Es necesario evaluar entonces nuevas vías de administración y/o la utilización de sistemas de delivery de drogas.

En consecuencia, el objetivo general del presente trabajo ha sido diseñar y desarrollar terapias combinadas basadas en nanotecnología farmacéutica para el tratamiento de la EdA, con el fin de mejorar y potenciar el tratamiento actual.

Dentro de la diversidad de nanomateriales que se han diseñado y construido en la nanotecnología farmacéutica, en este trabajo se han utilizado a los dendrímeros. Los dendrímeros (D) son polímeros tridimensionales con características únicas en el campo de los nanomateriales, que incluyen: arquitectura simétrica, estable y bien definida; tamaño monodisperso en el rango de los nanómetros; estructura ramificada multivalente y multifuncional; grupos superficiales de tipo, carga y cantidad controlada; relación área/volumen extremadamente alta; y elevada solubilidad en agua.

Asimismo, han demostrado incrementar la solubilidad, estabilidad y biodisponibilidad de las drogas con las que interaccionan, por lo que se han convertido en sistemas de delivery de relevancia. Sumado a ello, los dendrímeros son el único tipo de nanopartículas con las características adecuadas para ser utilizados en una gran variedad de vías de administración, incluyendo la intravenosa, transdérmica, oral e intranasal. Particularmente, se utilizaron los dendrímeros PAMAM con core de etilendiamina de generación 4.0 (DG4.0) con grupos amino terminales, y de generación 4.5 (DG4.5) con grupos carboxílicos terminales. Además de sus características óptimas como nanotransportadores de drogas, los DG4.0 y DG4.5 han demostrado actuar como nanodrogas per se, presentando actividad como anti-bacterianos, como anti-virales, como inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa, como inhibidores de la agregación de proteínas y como anti-inflamatorios.

En este trabajo, con el objetivo de diseñar terapias multi-intervencionales para la EdA basadas en nanotecnología farmacéutica, se combinaron las drogas carbamazepina (CBZ, potenciador de la autofagia), tacrina (TAC, inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa) y curcumina (CUR, inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa y de la producción de β -amiloides, con propiedades anti-agregación de proteínas, anti-oxidante y anti-inflamatorias) con los dendrímeros DG4.0 y DG4.5 que actuarían como transportadores de las drogas mencionadas y como nanodrogas per se.

Los objetivos específicos de este trabajo incluyeron: (1) Diseñar protocolos sencillos que permitan preparar complejos estables entre los dos tipos de dendrímeros y las tres drogas; (2) Caracterizar los complejos dendrímero-droga obtenidos en cuanto a capacidad de carga, incremento de la solubilidad de las drogas, estabilidad en el tiempo, interacción droga-dendrímero, y perfil de liberación de la droga; (3) Caracterizar el perfil toxicológico de los complejos dendrímero-droga mediante estudios ex vivo (en glóbulos rojos humanos), in vitro (en cultivo de células Neuro-2a) e in vivo (en larvas de zebrafish).

Por un lado, se puso a punto un protocolo sencillo y reproducible, a través del cual se obtuvieron los complejos de DG4.0 o DG4.5 con CBZ, TAC o CUR. Por un lado, los DG4.0 y DG4.5 incorporaron alrededor de 20 moléculas de CBZ por dendrímero en sus bolsillos internos. Se encontró que los complejos DG4.0-CBZ y DG4.5-CBZ fueron estables durante 90 días a 37 °C y presentaron un perfil de liberación controlada del fármaco a pH fisiológico. Además, se estudió la nanotoxicidad de estos complejos. No se observó ningún efecto hemolítico en el modelo ex vivo.

En cuanto a la toxicidad in vitro, los complejos DG4.5-CBZ redujeron significativamente la toxicidad causada por el fármaco libre, y no causaron neurotoxicidad, cardiotoxicidad, ni hepatotoxicidad en las larvas de zebrafish.

Por otro lado, fue posible obtener suspensiones de DG4.0-TAC y DG4.5-TAC sin reducir la solubilidad del fármaco. Los estudios de FT-IR y de liberación in vitro confirmaron que la interacción entre la TAC y los DG4.5 fue de tipo electrostática. El perfil de toxicidad de la

administración de los complejos D-TAC se estudió en ensayos ex vivo, in vitro e in vivo. No se observaron efectos hemolíticos. En ensayos in vitro, los complejos DG4.5-TAC redujeron la toxicidad del fármaco libre en relación a la viabilidad celular y a los niveles de actividad metabólica. Además, la administración in vivo en larvas de zebrafish de los complejos DG4.0-TAC y DG4.5-TAC redujo los efectos cardiotoxicos, morfológicos y hepatotóxicos observados en el tratamiento con TAC libre.

Finalmente, la complejación con dendrímeros permitió incrementar la solubilidad de la CUR desde 1,6 μM (CUR libre) a $\sim 177 \mu\text{M}$ para los DG4.0-CUR y $\sim 105 \mu\text{M}$ para los DG4.5-CUR. Los complejos D-CUR presentaron una estabilidad aumentada respecto de la droga libre, tanto en solución acuosa como en estado sólido. Los estudios realizados permitieron comprobar que la CUR interaccionó tanto con los bolsillos internos de los dendrímeros como con sus grupos superficiales. No se observó ningún efecto hemolítico en el modelo ex vivo, así como tampoco se observaron efectos citotóxicos in vitro. Sin embargo, tanto la CUR como los complejos D-CUR produjeron efectos letales en concentraciones relativamente bajas en las larvas de zebrafish. Se ha reportado que los efectos tóxicos en este modelo animal se deben a la incapacidad de las larvas de metabolizar y eliminar la CUR, lo que da lugar a un proceso de bioacumulación.

En conclusión, a través de los estudios de complejación realizados con CBZ, TAC y CUR, se ha demostrado la capacidad de los dendrímeros DG4.0 y DG4.5 de incrementar la solubilidad de drogas hidrofóbicas y de interaccionar con drogas hidrofílicas. Además, se ha demostrado que la interacción depende tanto de las características del dendrímero como de las características del fármaco, dando lugar a distintos patrones de complejación (encapsulación y/o anclaje). Sumado a ello, si se toman en consideración todos los resultados obtenidos, podemos concluir que se han desarrollado dos sistemas estables de delivery, basados en la complejación con dendrímeros, que aumentaron la solubilidad y estabilidad de las drogas CBZ y CUR. Asimismo, se ha desarrollado una terapia combinada basada en la co-administración de TAC y dendrímeros, que redujo los efectos hepatotóxicos de dicho fármaco.

En este sentido, los resultados de este trabajo permitieron ampliar el conocimiento sobre la capacidad de los dendrímeros de actuar como nanotransportadores de distintos tipos de drogas, así como sobre los mecanismos que intervienen en su perfil toxicológico. Es decir, este trabajo podría funcionar como punto de partida para el diseño de terapias combinadas, basadas en dendrímeros capaces de actuar simultáneamente sobre varias hipótesis etiológicas de la EdA.

Universidad Nacional de Quilmes
Departamento de Ciencia y Tecnología
Laboratorio de Bio-Nanotecnología

Nanotecnología Farmacéutica basada en Dendrímeros aplicada al tratamiento del Alzheimer

Tesis presentada para optar por el título de Doctora en Ciencia y Tecnología
de la Universidad Nacional de Quilmes

Lic. Daniela Edith Igartúa

Directora: Dra. M. Jimena Prieto

Co-Directora: Dra. Silvia del V. Alonso



A mi familia...

“Dicen que antes de entrar en el mar, el río tiembla de miedo. Mira para atrás todo el camino recorrido, las cumbres, las montañas, el largo y sinuoso camino abierto a través de selvas y poblados, y ve frente a sí un océano tan grande, que entrar en él solo puede significar desaparecer para siempre. Pero no hay otra manera, el río no puede volver. Nadie puede volver. Volver atrás es imposible en la existencia. El río necesita aceptar su naturaleza y entrar en el océano. Solamente entrando en el océano se diluirá el miedo, porque solo entonces sabrá el río que no se trata de desaparecer en el océano, sino de convertirse en océano”.

Khalil Gibran



Publicaciones científicas	14
Abreviaturas	16

Capítulo 1 – Introducción General 21

1.1 Enfermedad de Alzheimer.....	21
1.1.1 Definición.....	21
1.1.2 Prevalencia e incidencia	22
1.1.3 Síntomas y diagnóstico.....	23
1.1.4 Hipótesis etiológicas y estrategias terapéuticas	25
1.1.4.1 Hipótesis de los neurotransmisores	26
1.1.4.2 Hipótesis tautológica.....	28
1.1.4.3 Hipótesis amiloide.....	29
1.1.4.4 Hipótesis mitocondrial o del estrés oxidativo.....	31
1.1.4.5 Hipótesis de la autofagia.....	31
1.1.4.6 Hipótesis inflamatoria.....	31
1.1.4.7 Hipótesis infecciosa y anti-microbiana	32
1.1.4.8 Hipótesis del microbioma intestinal	33
1.1.4.9 Hipótesis genética	34
1.1.5 Tratamiento actual y estrategias terapéuticas convencionales.....	35
1.1.6 Nuevas estrategias terapéuticas	36
1.2 Nanotecnología Farmacéutica	39
1.2.1 Nanotecnología y nanomateriales.....	39
1.2.2 Nanomedicina.....	42
1.2.3 Nanotecnología farmacéutica	44

1.2.4	Nanotoxicología	46
1.2.4.1	Ensayos <i>ex vivo</i> en glóbulos rojos	47
1.2.4.2	Ensayos <i>in vitro</i> en cultivo celular	48
1.2.4.3	Ensayos <i>in vivo</i> en embriones y larvas de <i>zebrafish</i>	49
1.3	Dendrímeros	51
1.3.1	Definición de los dendrímeros	51
1.3.2	Síntesis de los dendrímeros	55
1.3.2.1	Síntesis divergente	55
1.3.2.2	Síntesis convergente	56
1.3.2.3	Otros métodos de síntesis	57
1.3.3	Arquitectura de los dendrímeros	58
1.3.3.1	Core	58
1.3.3.2	Ramificaciones internas (generaciones)	59
1.3.3.3	Grupos superficiales	61
1.3.4	Aplicaciones de los dendrímeros	62
1.3.5	Dendrímeros como proteínas artificiales	63
1.3.6	Dendrímeros como nanotransportadores de drogas	64
1.3.6.1	Conjugación de drogas y ligandos	65
1.3.6.2	Complejación de drogas	66
1.3.7	Dendrímeros como nanodrogas	69
1.3.8	Toxicidad de los dendrímeros	71
1.3.8.1	Toxicidad <i>ex vivo</i> en glóbulos rojos	72
1.3.8.2	Toxicidad <i>in vitro</i> en cultivo celular	73
1.3.8.3	Biocompatibilidad <i>in vivo</i> en embriones y larvas de <i>zebrafish</i>	74
1.3.9	Vías de administración de dendrímeros	77

Objetivos	79
------------------------	-----------

Capítulo 2 – Materiales y Métodos	83
--	-----------

2.1 Materiales.....	83
2.2 Obtención de terapias combinadas (complejos dendrímeros-drogas).....	83
2.2.1 Obtención general de complejos entre las drogas y los dendrímeros.....	83
2.2.2 Obtención de complejos de CBZ con DG4.0 o DG4.5.....	84
2.2.3 Obtención de complejos de TAC con DG4.0 o DG4.5.....	85
2.2.4 Obtención de complejos de CUR con DG4.0 o DG4.5.....	85
2.3 Cuantificación de las drogas por absorbancia UV-Vis.....	85
2.3.1 Cuantificación de la CBZ.....	85
2.3.2 Cuantificación de la TAC.....	87
2.3.3 Cuantificación de la CUR.....	88
2.4 Caracterización de la estabilidad de las drogas en los complejos.....	91
2.4.1 Estabilidad de la CBZ en los complejos D-CBZ.....	91
2.4.2 Estabilidad de la TAC en los complejos D-TAC.....	93
2.4.3 Estabilidad de la CUR en los complejos D-CUR.....	93
2.5 Caracterización de la interacción entre las drogas y los dendrímeros.....	95
2.5.1 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR).....	95
2.5.2 Liberación <i>in vitro</i> de las drogas a partir de los complejos D-droga.....	96
2.5.2.1 Liberación <i>in vitro</i> de CBZ a partir de los complejos D-CBZ.....	98
2.5.2.2 Liberación <i>in vitro</i> de TAC a partir de los complejos D-TAC.....	98
2.6 Toxicidad <i>ex vivo</i> en glóbulos rojos humanos.....	99
2.6.1 Obtención de glóbulos rojos humanos.....	99
2.6.2 Tratamientos.....	99
2.6.3 Hemólisis.....	100
2.6.4 Estudio de cambios morfológicos de los glóbulos rojos.....	101
2.7 Toxicidad <i>in vitro</i> en cultivo celular de Neuro-2a.....	101
2.7.1 Línea celular.....	101
2.7.2 Tratamientos.....	101
2.7.3 Estudio de la viabilidad celular (tinción con cristal violeta).....	103
2.7.4 Estudio de la actividad metabólica (ensayo de reducción de MTT).....	104

2.7.5 Estudio de afección de membranas (ensayo de captura de rojo neutro)	105
2.8. Biocompatibilidad <i>in vivo</i> en larvas de <i>zebrafish</i>	107
2.8.1. Mantenimiento de los animales adultos y obtención de embriones	107
2.8.2 Tratamientos	108
2.8.3 Estudio de la viabilidad.....	110
2.8.4 Estudio del movimiento espontáneo: neurotoxicidad.....	111
2.8.5 Estudio del ritmo cardíaco: cardiotoxicidad	111
2.8.6 Estudio de los cambios morfológicos	111
2.8.7 Estudio de la hepatotoxicidad.....	112
2.9 Análisis estadístico	113

Capítulo 3 –Complejación de Carbamazepina..... 117

3.1 Introducción.....	117
3.2 Resultados y discusión	119
3.2.1 Obtención de los complejos D-CBZ.....	119
3.2.2 Estudios de estabilidad de la CBZ en los complejos D-CBZ.....	121
3.2.3 Estudios de la interacción D-CBZ por FT-IR y liberación <i>in vitro</i>	124
3.2.4 Estudios de la toxicidad <i>ex vivo</i> en glóbulos rojos humanos.....	131
3.2.5 Estudios de la toxicidad <i>in vitro</i> en cultivo celular Neuro-2a	133
3.2.6 Estudios de la biocompatibilidad <i>in vivo</i> en larvas de <i>Zebrafish</i>	136
3.3 Resumen de resultados y conclusiones parciales.....	141
Anexo del capítulo 3.....	142

Capítulo 4 –Complejación de Tacrina 147

4.1 Introducción.....	147
4.2 Resultados y Discusión	149
4.2.1 Obtención de los complejos D-TAC.....	149
4.2.2 Estudios de estabilidad de la TAC en los complejos D-TAC.....	150
4.2.3 Estudios de la interacción D-TAC por FT-IR y liberación <i>in vitro</i>	151

4.2.4 Estudios de la toxicidad <i>ex vivo</i> en glóbulos rojos humanos	156
4.2.5 Estudios de la toxicidad <i>in vitro</i> en cultivo celular Neuro-2a	157
4.2.6 Estudios de la biocompatibilidad <i>in vivo</i> en larvas de <i>Zebrafish</i>	160
4.3 Resumen de resultados y conclusiones parciales.....	166
<hr/>	
Capítulo 5 –Complejación de Curcumina	169
5.1 Introducción.....	169
5.2 Resultados y discusión.....	172
5.2.1 Obtención de los complejos D-CUR.....	172
5.2.2 Estudios de estabilidad de la CUR en los complejos D-CUR	178
5.2.2.1 Estabilidad en el tiempo de la CUR en los complejos D-CUR en suspensión	178
5.2.2.2 Estabilidad de los complejos D-CUR frente al proceso de liofilización	183
5.2.2.3 Estabilidad en el tiempo de la CUR en los complejos D-CUR reconstituidos	185
5.2.2.4 Estabilidad en el tiempo de la CUR en los <i>pellets</i> de complejos D-CUR.....	187
5.2.3 Estudios de la interacción D-CUR por FT-IR.....	191
5.2.4 Estudios de la toxicidad <i>ex vivo</i> en glóbulos rojos humanos	194
5.2.5 Estudios de la toxicidad <i>in vitro</i> en cultivo celular Neuro-2a	196
5.2.6 Estudios de la biocompatibilidad <i>in vivo</i> en larvas de <i>Zebrafish</i>	198
5.3 Resumen de resultados y conclusiones parciales.....	207
Anexo del capítulo 5.....	209
<hr/>	
Capítulo 6 –Conclusiones Generales y Perspectivas	213
<hr/>	
Referencias	221
Agradecimientos	237
<hr/>	



Publicaciones científicas

Parte de los resultados de este trabajo fueron publicados, en una revista internacional con referato, en el siguiente artículo científico:

- **Igartúa DE**, Martínez CS, Temprana CF, Alonso SdV, Prieto MJ. *PAMAM dendrimers as a carbamazepine delivery system for neurodegenerative diseases: a biophysical and nanotoxicological characterization*. International Journal of Pharmaceutics. Elsevier. **2018**. 544 (1), 191-202. ISSN 0378-5173. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.04.032.

Además, se encuentran en preparación los siguientes trabajos:

- **Igartúa DE**, Martínez CS, Alonso SdV, Prieto MJ. *Combined therapy for Alzheimer's disease treatment based on Tacrine and PAMAM dendrimers co-administration reduces the side effects of the drug*.
- **Igartúa DE**, Martínez CS, Chiaramoni NS, Alonso SdV, Prieto MJ. *Curcumin delivery system based on PAMAM dendrimers for Alzheimer's disease treatment*.

Asimismo, durante el periodo de tesis doctoral (abril de 2015 - actualidad), se colaboró en diversos trabajos de investigación que dieron lugar a las siguientes publicaciones científicas:

- ◆ **Igartúa DE**, Azcona PL, Martínez CS, Alonso SdV, Lassalle VL & Prieto MJ. *Folic acid magnetic nanotheranostics for delivering doxorubicin: Toxicological and biocompatibility studies on Zebrafish embryo and larvae*. Toxicology and applied pharmacology. **2018**. 358, 23-34. DOI: 10.1016/j.taap.2018.09.009
- ◆ Couto VM, Prieto MJ, **Igartúa DE**, Feas DA, Ribeiro LN, Silva CM, Castro SR, Guilherme VA, Dantzger DD, Machado D, Alonso SdV & de Paula E. *Dibucaine in ionic-gradient liposomes: biophysical, toxicological and activity characterisation*. Journal of pharmaceutical sciences. Elsevier. **2018**. 107 (9), 2411-2419. DOI: 10.1016/j.xphs.2018.05.010
- ◆ Martínez CS, Feas DA, Siri M, **Igartúa DE**, Chiaramoni NS, Alonso SdV, Prieto MJ. *In vivo study of teratogenic and anticonvulsant effects of antiepileptics drugs in zebrafish embryo and larvae*. Neurotoxicology and Teratology. Pergamon - Elsevier Science LTD. **2018**. 66, 17-24. ISSN 0892-0362. DOI: 10.1016/j.ntt.2018.01.008
- ◆ Feas DA, **Igartúa DE**, Calienni MN, Martínez CS, Pifano M, Chiaramoni NS, Alonso SdV, Prieto MJ. *Nutraceutical emulsion containing valproic acid (NE-VPA): a drug delivery system*

for reversion of seizures in zebrafish larvae epilepsy model. Journal of Pharmaceutical Investigation. 47: 429. **2017**. DOI:10.1007/s40005-017-0316-x

- ◆ Martinez CS, **Igartúa** DE, Calienni MN, Feas DA, Siri M, Montanari JA, Chiaramoni NS, Alonso SdV, Prieto MJ. *Relation between biophysical properties of nanostructures and their toxicity on zebrafish*. Biophysical Reviews. Springer. **2017**. ISSN 1867-2450. DOI: 10.1007/s12551-017-0294-2
- ◆ Calienni MN, Feas DA, **Igartúa** DE, Chiaramoni NS, Alonso SdV, Prieto MJ. *Nanotoxicological and teratogenic effects: A linkage between dendrimer surface charge and zebrafish developmental stages*. Toxicology and Applied Pharmacology. **2017**. 337, 1-11. DOI: 10.1016/j.taap.2017.10.003
- ◆ Temprana CF, Prieto MJ, **Igartúa** DE, Femia AL, Amor MS, Alonso SdV. *Diacetylenic lipids in the design of stable lipopolymers able to complex and protect plasmid DNA*. PloS one, **2017**. 12(10), e0186194. DOI: 10.1371/journal.pone.0186194

Finalmente, desde noviembre de 2017 a marzo de 2019, se codirigió una beca de entrenamiento en la investigación del Consejo Interuniversitario Nacional del estudiante de licenciatura David E. Ybarra, por su trabajo “Espectroscopia RAMAM aplicada a la caracterización de dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM)” (director: Dr. Fernando Alvira)



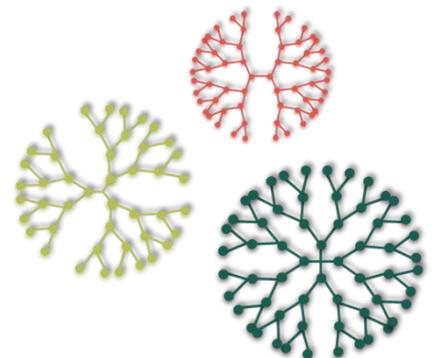
Abreviaturas

ACh	acetilcolina
AChE	enzima acetilcolinesterasa
ANOVA	análisis de varianza
APP	proteína precursora amiloide
ATR	reflectancia total atenuada
Aβ	β -amiloide
BHE	barrera hematoencefálica
CBZ	carbamazepina
CI₅₀	concentración inhibitoria del 50%
CL₅₀	concentración letal para el 50%
CUR	curcumina
CV	crystal violeta
D	dendrímico
DAB	diaminobutano
D-droga	complejos entre dendrímeros y drogas
DG4.0	dendrímico PAMAM generación 4.0 con <i>core</i> de etilendiamina
DG4.0-CBZ	complejos entre dendrímero PAMAM generación 4.0 y carbamazepina
DG4.0-CUR	complejos entre dendrímero PAMAM generación 4.0 y curcumina
DG4.0-TAC	complejos entre dendrímero PAMAM generación 4.0 y tacrina
DG4.5	dendrímico PAMAM generación 4.5 con <i>core</i> de etilendiamina
DG4.5-CBZ	complejos entre dendrímero PAMAM generación 4.5 y carbamazepina
DG4.5-CUR	complejos entre dendrímero PAMAM generación 4.5 y curcumina
DG4.5-TAC	complejos entre dendrímero PAMAM generación 4.5 y tacrina
DMSO	dimetilsulfóxido
dpf	días post-fecundación
EdA	enfermedad de Alzheimer
EDA	etilendiamina
EE.UU.	Estados Unidos de América
FDA	administración de alimentos y drogas de Estados Unidos
FT-IR	espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier
G	generación
Glu	glutamato

Gn.0	generación completa con n indicando el número de generación
Gn.5	generación intermedia con n indicando el número de generación
hpf	hora post-fecundación
hpi	hora post-incubación
MBI	microbioma intestinal
MEM	medio esencial mínimo
MRI	imagen de resonancia magnética
MTT	bromuro de 3-[4,5-dimetil-2-tiazolil]-2,5-difenil tetrazolio
NMDA	N-metil-D-aspartato
ONE-WAY ANOVA	análisis de varianza de un componente
PAMAM	poliamidoamina
PBS	buffer fosfato salino
PET	tomografía de emisión de positrones
PLL	poli-L-lisina
PPI	poli-propilenimina
p-TAU	proteína TAU hiperfosforilada
RN	rojo neutro
ROS	especies reactivas de oxígeno
SD	desvío estándar
SDS	dodecilsulfato de sodio
SFB	suero fetal bovino
t_{1/2}	tiempo de vida media
TAC	tacrina
TC	clorato de tiofosforilo
TWO-WAY ANOVA	análisis de varianza de dos componentes

Capítulo 1

Introducción General



Capítulo 1 – Introducción General

1.1 Enfermedad de Alzheimer

1.1.1 Definición

La enfermedad de Alzheimer (EdA) es una enfermedad neurodegenerativa multifactorial, caracterizada por el deterioro cognitivo, de la memoria y de otras capacidades mentales. No tiene cura ni tratamiento paliativo y suele ser terminal. Fisiológicamente, la enfermedad se caracteriza por una atrofia marcada del córtex cerebral y la pérdida de neuronas corticales ¹. Asimismo, se han identificado dos biomarcadores cerebrales que incluyen: la acumulación de la proteína β -amiloide ($A\beta$) en oligómeros tóxicos y placas fuera de las neuronas; y la acumulación de hebras torcidas de la proteína hiperfosforilada Tau (p-Tau) en neurofibrillas dentro de las neuronas (**Figura 1.1**) ²⁻⁴.

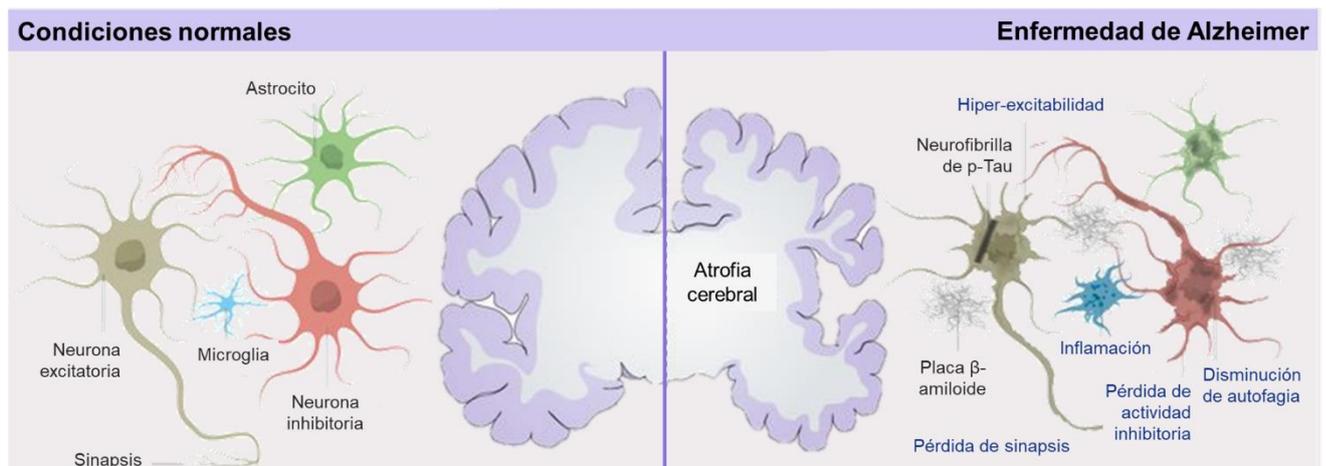


Figura 1.1 – Características cerebrales en la enfermedad de Alzheimer. La EdA se caracteriza por una marcada atrofia cerebral debida a la muerte neuronal, la presencia de placas β -amiloide y neurofibrillas de p-Tau, procesos de inflamación y cambios en los patrones de neurotransmisión.

Esta enfermedad fue descrita por primera vez en 1906 por el fisiólogo alemán Alois Alzheimer, sin embargo transcurrieron alrededor de 70 años antes de que se reconociera como una de las principales causas de demencia y muerte ⁵. Hoy en día, se reconoce que la EdA es la forma más común de demencia (60-70% de los casos) ^{2,6} y es el desorden que más afecta a los adultos, siendo 1,5 veces más común que el ataque cerebrovascular o la epilepsia, y tan común como el paro cardiorrespiratorio ¹. Asimismo, la cantidad de personas con la EdA aumenta dramáticamente con la edad, ocurriendo en el 3% de las personas con 65-74 años, 17% de las personas con 75-84 años

y 32% de las personas mayores a 85 años ⁷. En este sentido, el envejecimiento de la población es una tendencia global e irreversible; como la expectativa de vida se incrementa, la prevalencia de enfermedades crónicas también lo hace, generando impactos a nivel económico y sociopolítico ⁸. Debido a ello, la EdA se ha convertido en una prioridad de salud pública.

Las investigaciones a lo largo de todos estos años han demostrado que la EdA comienza mucho antes de que los síntomas de demencia se presenten en los pacientes. Por ello, el término “enfermedad de Alzheimer” es utilizado para referirse a todos los estadios de la enfermedad, mientras que el término “demencia debida a Alzheimer” o “demencia de Alzheimer” se utiliza para describir la última fase, momento donde usualmente se recibe el diagnóstico. El tiempo de vida medio entre el diagnóstico y la muerte es de 10 años, presentando un amplio rango que varía desde 3 a 20 años ⁶.

En la actualidad, 113 años después de su descripción, la EdA se presenta como una de las enfermedades neurodegenerativas más complejas y desafiantes. Mucho queda aún por estudiar y comprender sobre los cambios precisos que ocurren en las personas con la EdA que dan lugar a los síntomas de la demencia de Alzheimer, sobre por qué la enfermedad y los síntomas progresan más rápidamente en algunas personas, sobre cómo prevenir la enfermedad, sobre cómo diagnosticarla más efectivamente y antes de que ocurran los primeros síntomas, y sobre qué tratamientos utilizar para retrasar o detener su progresión.

Debido al elevado impacto económico y al incremento de la prevalencia de la enfermedad, es imperativo explorar nuevos tratamientos ⁹. Particularmente, en este trabajo se proponen tres tratamientos combinados basados en nanotecnología farmacéutica que podrían actuar como puntapié para el desarrollo de terapias diseñadas racionalmente, capaces de retrasar o detener la progresión de la enfermedad.

1.1.2 Prevalencia e incidencia

El término prevalencia se refiere a la cantidad de personas que viven con una determinada condición en un momento del tiempo dado, mientras que el término incidencia se refiere a la cantidad de nuevos casos de dicha condición por año. Los estudios epidemiológicos sobre la prevalencia de la EdA mostraron que en personas mayores de 60 años varía entre el 5 y el 7% en la mayoría de las regiones del mundo, con una menor prevalencia en las regiones africanas (2-4%) y una mayor prevalencia en América Latina (8,5%) ¹⁰. Por otro lado, estudios a nivel mundial sobre la prevalencia e incidencia informaron que 46,8 millones de personas vivían con la EdA en 2015, con cifras que se estiman, al considerar la incidencia 2014-2015, en 74,7 millones para 2030 y 131,5 millones para 2050 (**Figura 1.2**) ¹¹. Respecto de la incidencia, en Estados Unidos (EE.UU.),

se ha estimado que cada 65 segundos una persona desarrolla la EdA, y se estima que para el 2050 el tiempo se reducirá a 33 segundos ^{6,7}.

Sumado a ello, la cantidad de muertes por la EdA ha aumentado en los últimos años, mientras que la muerte por otras enfermedades, como cáncer de mama o de próstata, ha disminuido ⁶. Este hecho resalta la necesidad de nuevas investigaciones relacionadas con esta enfermedad.

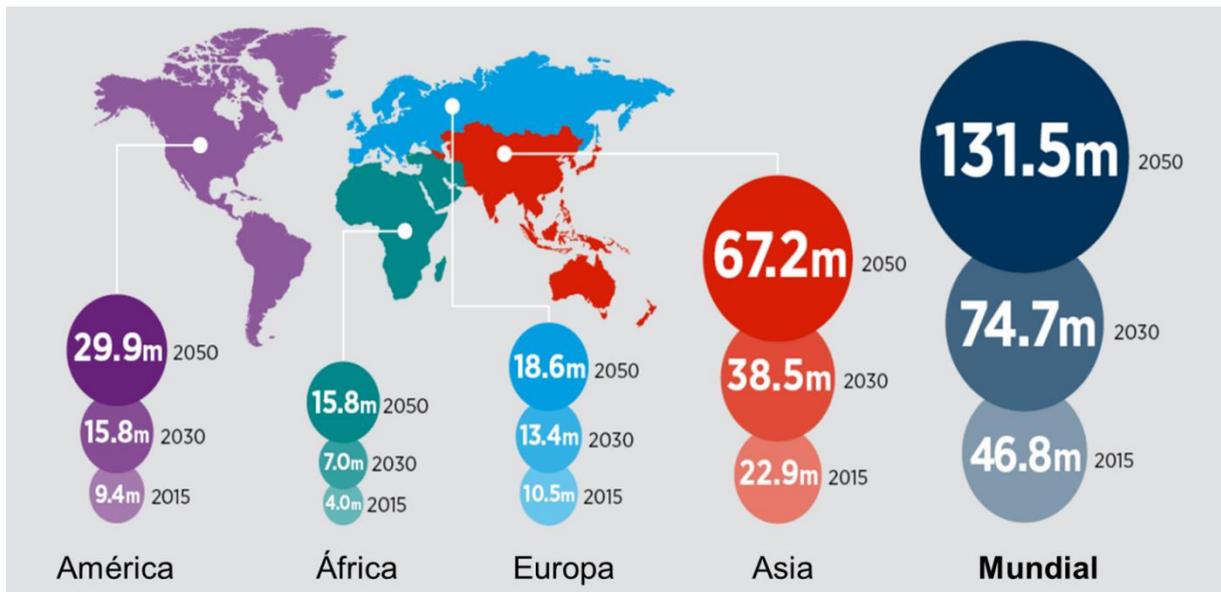


Figura 1.2 – Prevalencia e incidencia de la enfermedad de Alzheimer a nivel mundial. Se presenta la prevalencia de la enfermedad en 2015 y las estimaciones de la prevalencia en 2030 y 2050 considerando la incidencia entre 2014-2015. Imagen modificada de www.worldalzreport2015.org.

1.1.3 Síntomas y diagnóstico

Las personas con la EdA experimentan múltiples síntomas que cambian con los años y la progresión de la enfermedad, consecuencia del incremento en el grado de daño de las neuronas en las distintas zonas del cerebro. La Asociación de Alzheimer de EE.UU. ⁶ clasificó las fases sintomáticas en leves, moderadas y severas, según:

- En la etapa de síntomas leves las personas son capaces de actuar independientemente pero pueden necesitar asistencia para algunas actividades particulares. El primer síntoma común es la pérdida gradual de la capacidad para recordar nueva información, por ejemplo recordar conversaciones recientes, nombres o eventos. Los primeros síntomas suelen aparecer asociados a condiciones de depresión o apatía.
- En la etapa de síntomas moderados las personas presentan problemas para realizar algunas actividades de la vida diaria, dado que confunden quienes son o donde están y pueden presentar cambios en la personalidad, por lo que requieren asistencia parcial. Los síntomas de

esta etapa incluyen la pérdida de memoria a corto y largo plazo, cambios a nivel cognitivo, confusión de tiempo y lugar, problemas para relacionarse con otros individuos, problemas para hablar o escribir y cambios de humor.

- En la etapa de síntomas severos los individuos requieren asistencia médica continua, dado que pierden la capacidad de realizar las actividades diarias de manera autónoma, como bañarse, vestirse o comer. Con la progresión de la enfermedad los síntomas empeoran y, eventualmente, las personas pierden la capacidad de caminar, comunicarse e incluso deglutir.

Como se mencionó anteriormente, se ha demostrado que la EdA comienza muchos años antes de que los primeros síntomas se presenten en los pacientes. El diagnóstico de la enfermedad se produce una vez que comienzan los síntomas, en general, a través de la participación de un grupo multidisciplinario de médicos clínicos, neurólogos y gerontólogos que utilizan diversos enfoques para evaluar los síntomas y sus posibles causas. Es decir que no existe un único estudio para diagnosticar la demencia de Alzheimer, sino que se incluyen varios tipos de estudios cognitivos, físicos y neurológicos, además de análisis bioquímico de muestras de sangre y análisis de imágenes cerebrales ⁶. Por ejemplo, el Instituto Nacional del Envejecimiento de EE.UU. ha desarrollado un sistema de tres categorías (sistemas A/T/N) basado en la detección de los biomarcadores específicos (A por agregados A β y T por Tau) y no específicos (N) de la enfermedad, que incluye:

- Enfoque A: Tomografía de emisión de positrones (PET) para estudiar el depósito en el cerebro del paciente de placas A β y estudios bioquímicos en el fluido cerebroespinal para determinar de cantidad y tipo de A β .
- Enfoque T: PET cortical para estudiar la presencia de neurofibrillas de p-Tau y estudios bioquímicos en el fluido cerebroespinal para determinar de cantidad y tipo de Tau.
- Enfoque N: estudios bioquímicos de sangre para determinar niveles de marcadores no específicos (glucosa, colesterol, enzimas, entre otros), PET con fluorodeoxiglucosa para estudiar el estado metabólico e imágenes de resonancia magnética (MRI) para determinar el grado de atrofia cerebral.

Con estos enfoques, se busca descartar otras posibles causas de demencia, como tumores o deficiencia de vitaminas. Asimismo, es importante destacar que no existen métodos de diagnóstico capaces de detectar la EdA antes de que se presenten los síntomas y se ingrese en la fase de demencia. Por ello, las tendencias actuales en investigación sobre métodos de diagnóstico de la EdA han migrado hacia la realización de un diagnóstico temprano a través de biomarcadores en sangre o cerebro. Frisoni y col. (2017) han revisado los avances en dicho aspecto ¹².

1.1.4 Hipótesis etiológicas y estrategias terapéuticas

La etiología de la EdA es multifactorial y poco comprendida; muchas hipótesis han sido propuestas hasta la fecha para explicar la patogénesis de la enfermedad a nivel molecular. Cada una de estas hipótesis se centra en un mecanismo particular, al que postulan como la “causa primaria” y lo vinculan con el resto de los mecanismos conocidos. Entonces, el objetivo de las hipótesis propuestas es explicar el mecanismo central que da lugar a una cascada de eventos consecutivos que tienen fin en los síntomas de la demencia de Alzheimer.

Las hipótesis más antiguas son las relacionadas con la deficiencia de acetilcolina (ACh, por su abreviatura del inglés *acetylcholine*) debido a la degeneración de las neuronas colinérgicas, la acumulación progresiva de proteínas A β en oligómeros tóxicos y placas fuera de las células, y la acumulación de hebras torcidas en neurofibrillas de la proteína p-Tau dentro de las neuronas. En estas últimas hipótesis se propuso que la acumulación de los A β interfiere con la comunicación neurona-neurona, mientras que las neurofibrillas de p-Tau bloquean el transporte de nutrientes y otras moléculas esenciales a lo largo de los microtúbulos, contribuyendo ambas a la muerte celular. Una hipótesis más reciente centra la atención en la neuroinflamación crónica, y propone que la presencia de especies tóxicas de A β y p-Tau activan a los astrocitos y microglia, es decir al sistema inmune celular del cerebro, dando lugar a procesos inflamatorios. Sumado a estas, evidencias actuales sugieren que el estrés oxidativo es uno de los factores más importantes en la iniciación y progresión de la EdA. En esta hipótesis la presencia excesiva de especies reactivas de oxígeno, de óxido nítrico y de mediadores inflamatorios podría dar lugar a mecanismos como disfunción mitocondrial y acumulación aberrante de metales de transición, aumentar la producción y agregación de A β , y facilitar la fosforilación y polimerización de Tau, formando así un círculo vicioso donde se promueve la progresión de la enfermedad. Finalmente, desde el 2016, la atención se ha centrado en dos nuevas hipótesis conocidas como “anti-microbiana” y “del microbioma intestinal”; ambas serán luego abordadas.

Es de nuestro interés resaltar que, más allá de las hipótesis particulares, creemos que la EdA progresa a través de la interacción y retroalimentación de los distintos mecanismos propuestos, que ocurren todos simultáneamente, dando lugar a la demencia de Alzheimer. Es decir, que no existen un mecanismo iniciador o causa central de la enfermedad, sino que la misma surge de la interacción sinérgica entre las distintas vías patológicas. Una idea de ello se esquematiza en la **Figura 1.3**.

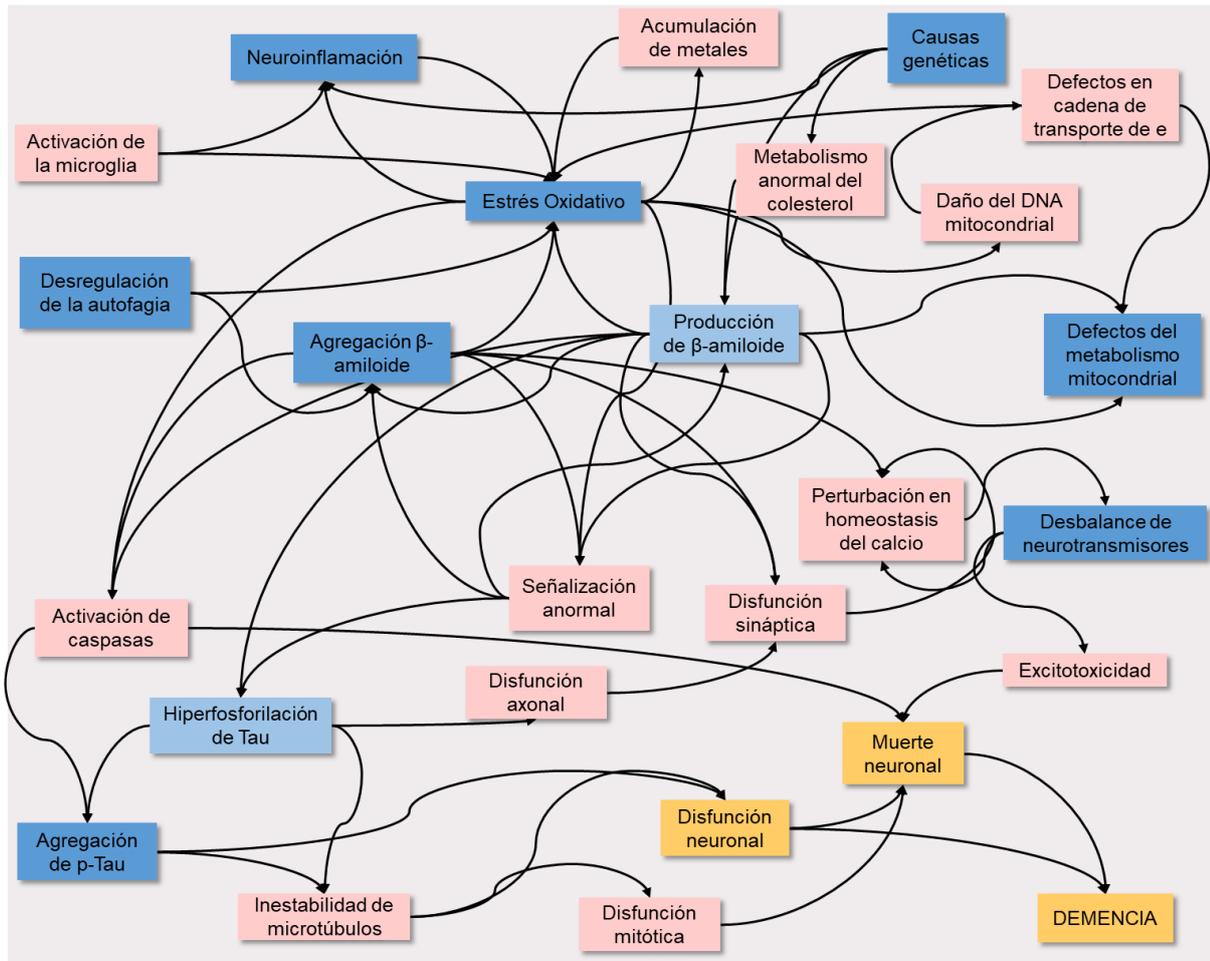


Figura 1.3 – Red de interacciones entre los diversos mecanismos que darían lugar a los síntomas de la demencia de Alzheimer. En recuadros celestes se presentan los mecanismos principales, mientras que en rosa se presentan mecanismos secundarios.

De todos modos, el estudio y entendimiento de cada hipótesis particular es necesario para construir esta red de interacciones, por lo que a continuación describiremos las hipótesis más aceptadas por la comunidad científica.

1.1.4.1 Hipótesis de los neurotransmisores

Un cerebro adulto sano posee alrededor de 100 billones de neuronas, todas con extensiones largas y ramificadas, que permiten la correcta conexión con otras neuronas a través de la sinapsis; un cerebro sano contiene 100 trillones de sinapsis. Para que ocurra la comunicación, la información fluye en forma de compuestos químicos llamados neurotransmisores, que son liberados por la neurona pre-sináptica y detectados por la neurona post-sináptica. La EdA está caracterizada por cambios degenerativos en varios sistemas de neurotransmisión, incluyendo los sistemas colinérgicos, glutamatérgicos, noradrenérgicos y serotoninérgicos, y los sistemas basados en

neuropéptidos ¹³. Los cambios cognitivos de la EdA se han asociado, sobre todo, con la degeneración de las neuronas colinérgicas y glutamatérgicas ^{14,15}.

La transmisión colinérgica tiene un rol vital en el desarrollo y actividad cortico-cerebral, en el flujo de sangre, en los ciclos de sueño-vigilia, en el aprendizaje, la memoria y la cognición. Las neuronas colinérgicas se ven sumamente degeneradas en la EdA, resultado en la depleción de la ACh ¹⁶. Por ello, las primeras drogas estudiadas y aprobadas para el tratamiento de la enfermedad se centraron en la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), con el objetivo de restablecer los niveles cerebrales de este neurotransmisor (**Figura 1.4**).

Por otro lado, el glutamato (Glu) es el principal neurotransmisor excitatorio y se ha demostrado que las personas con la EdA poseen un incremento en la cantidad del mismo, por lo que sus neuronas se encuentran constantemente activas, lo que da lugar a procesos de excitotoxicidad (**Figura 1.4**). En este sentido, se ha estudiado la utilización de antagonistas de los receptores de Glu como posible tratamiento para la enfermedad, siendo la última droga aprobada un antagonista del receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA) ¹³. Asimismo, se ha comprobado que los oligómeros de A β se unen a las neuronas y modifican la actividad de los receptores de Glu, potenciando las señales de neurotransmisión y la excitotoxicidad ¹³.

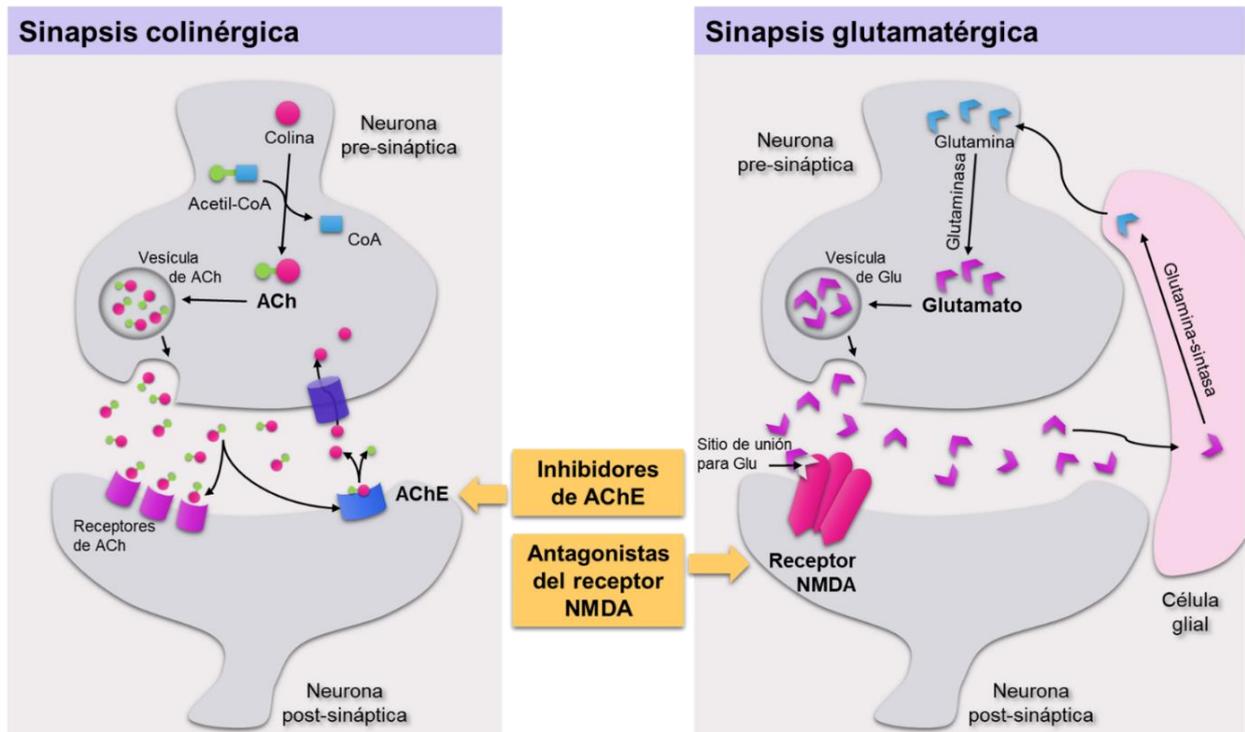


Figura 1.4 – Hipótesis de los neurotransmisores. En condiciones patológicas como la EdA se reportó una menor cantidad de acetilcolina (ACh) y una mayor cantidad de glutamato (Glu), por lo que se utilizaron estrategias terapéuticas basadas en inhibidores de AChE y antagonistas de los receptores de Glu.

1.1.4.2 Hipótesis tautológica

La proteína Tau es una proteína de unión a microtúbulos que, bajo condiciones fisiológicas, regula el ensamblaje, el comportamiento dinámico y la organización espacial de los mismos, por lo que modula la organización funcional de las neuronas (morfología axonal, crecimiento y polaridad). Esta proteína tiene múltiples sitios de fosforilación, y su capacidad de unión a microtúbulos depende del estado de fosforilación ¹⁷. La EdA es considerada una tautopatía, dado que en ella se incrementa la fosforilación de Tau, produciendo elevadas cantidad de p-Tau que pierde su afinidad por lo microtúbulos y se agrega formando estructuras fibrilares que se acumulan en el interior de las células, proceso asociado a la pérdida de neuronas y sinapsis (**Figura 1.5**) ¹⁸. Estudios recientes han demostrado que las lesiones causadas por la acumulación de p-Tau en el cerebro de personas con la EdA ocurren antes que la acumulación de la proteína A β , por lo que la progresión de la enfermedad está actualmente asociada a esta hipótesis ¹⁹.

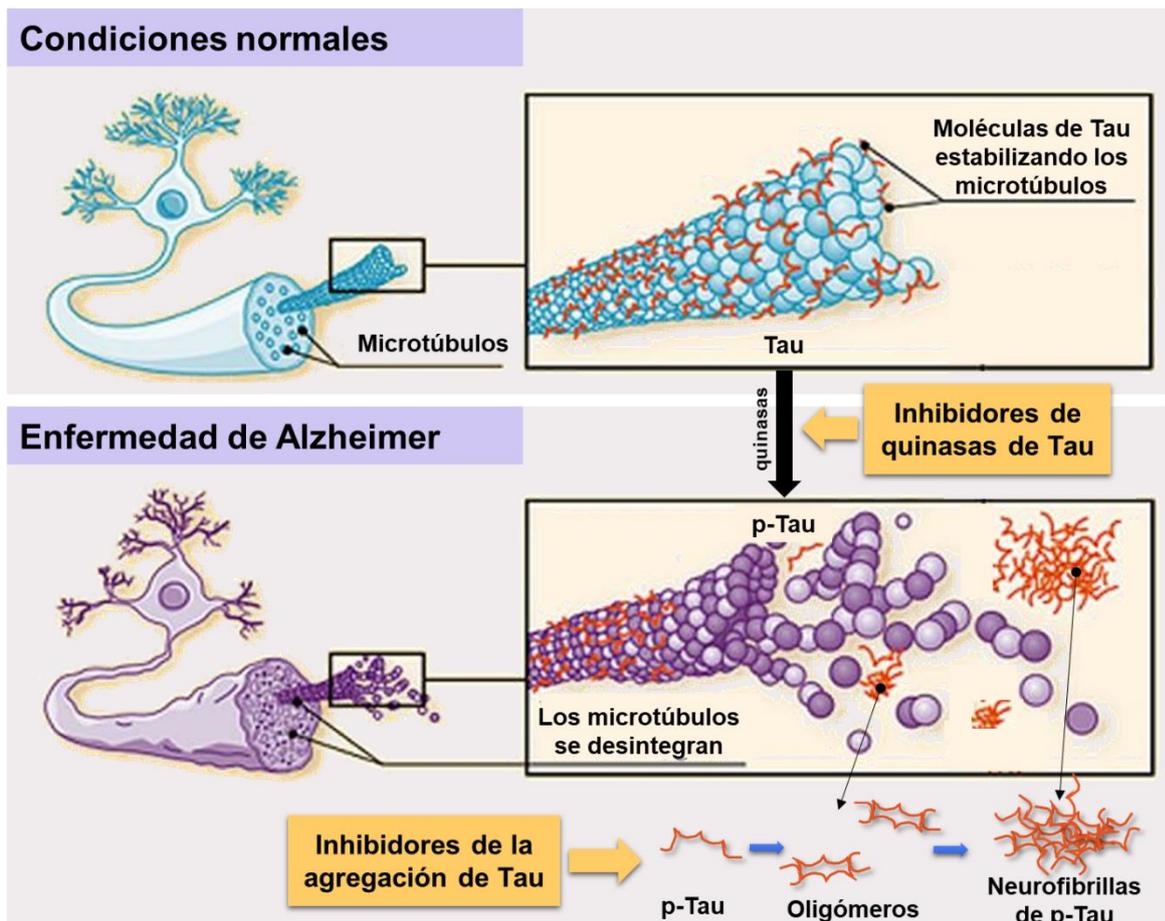


Figura 1.5 – Hipótesis tautológica. En condiciones patológicas como la EdA se reportó una hiperfosforilación de la proteína de unión a microtúbulos Tau, que en su forma p-Tau pierde la afinidad por los microtúbulos y se agrega formando neurofibrillas, por lo que se utilizaron estrategias terapéuticas basadas en inhibidores de las quinasas de Tau e inhibidores de la agregación.

Se han desarrollado diversas intervenciones terapéuticas basadas en considerar la EdA como una tautopatía. Principalmente, se han utilizado inhibidores de las quinasas de Tau (que incluyen a la GSK-3 β , CDK5 y MARK). También se ha estudiado la utilización de inmunoterapia para la generación de anticuerpos anti-p-Tau, de bloqueadores de la agregación de p-Tau y de estabilizadores de microtúbulos ²⁰.

1.1.4.3 Hipótesis amiloide

Los A β son péptidos de alrededor de 40 aminoácidos que se producen por el clivaje de la proteína precursora amiloide (APP, por sus siglas del inglés *amyloid precursor protein*) por la acción secuencial de la β -secretasa y la γ -secretasa (un complejo que contiene la proteína presenilina 1). En condiciones normales, APP es una proteína transmembrana asociada con el desarrollo neuronal, el crecimiento de neuritas y el transporte axonal, que es clivada principalmente por la α - y la γ -secretasa, y sus residuos son rápidamente degradados. Además, los A β se producen por acción de la β -secretasa en concentraciones picomolares, y han demostrado actuar como potenciadores presinápticos, del crecimiento de dendritas y de la supervivencia celular. Por otro lado, en condiciones patológicas, la capacidad metabólica de las células para degradar los residuos A β se ve afectada y los péptidos se acumulan. Particularmente los péptidos A β 40 y A β 42 que contienen 40 y 42 aminoácidos, respectivamente, son los que se acumulan en mayor medida. Un incremento en los niveles de A β 42 o en la relación A β 42:A β 40, induce la oligomerización y acumulación de los A β en placas seniles que causan neurotoxicidad y daño vascular (**Figura 1.6**) ^{2,3,18}. Sumado a ello, se demostró que la acumulación intracelular del fragmento C-terminal de APP (que se produce por la acción de la γ -secretasa), produciría defectos en el transporte axonal y en la sinapsis, induciendo la deslocalización de Tau de los microtúbulos y activando la hipótesis tautológica ¹⁸.

Según Morley y Farr (2014), el simple aumento de la concentración de A β activaría la enzima quinasa GSK-3 β de Tau (activando la vía de formación de neurofibrillas de p-TAU), produciría disfunción mitocondrial (aumentando las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno), activaría los receptores de Glu (activando la vía de excitación glutamatérgica), activaría la vía de NF κ B pro-inflamatoria (aumentando la producción y liberación de citoquinas) y disminuiría la función del péptido-1 relacionado a lipoproteína (produciendo daños en la barrera hematoencefálica) ⁴. Asimismo, según Ashraf y col. (2019) el incremento de A β activaría los macrófagos, la microglia, los linfocitos y astrocitos, quienes producirían mediadores pro-inflamatorios. En consecuencia, se establecería una interrelación entre las tres hipótesis etiológicas mencionadas hasta el momento, lo que actuaría como círculo vicioso propiciando la progresión de la enfermedad ²¹.

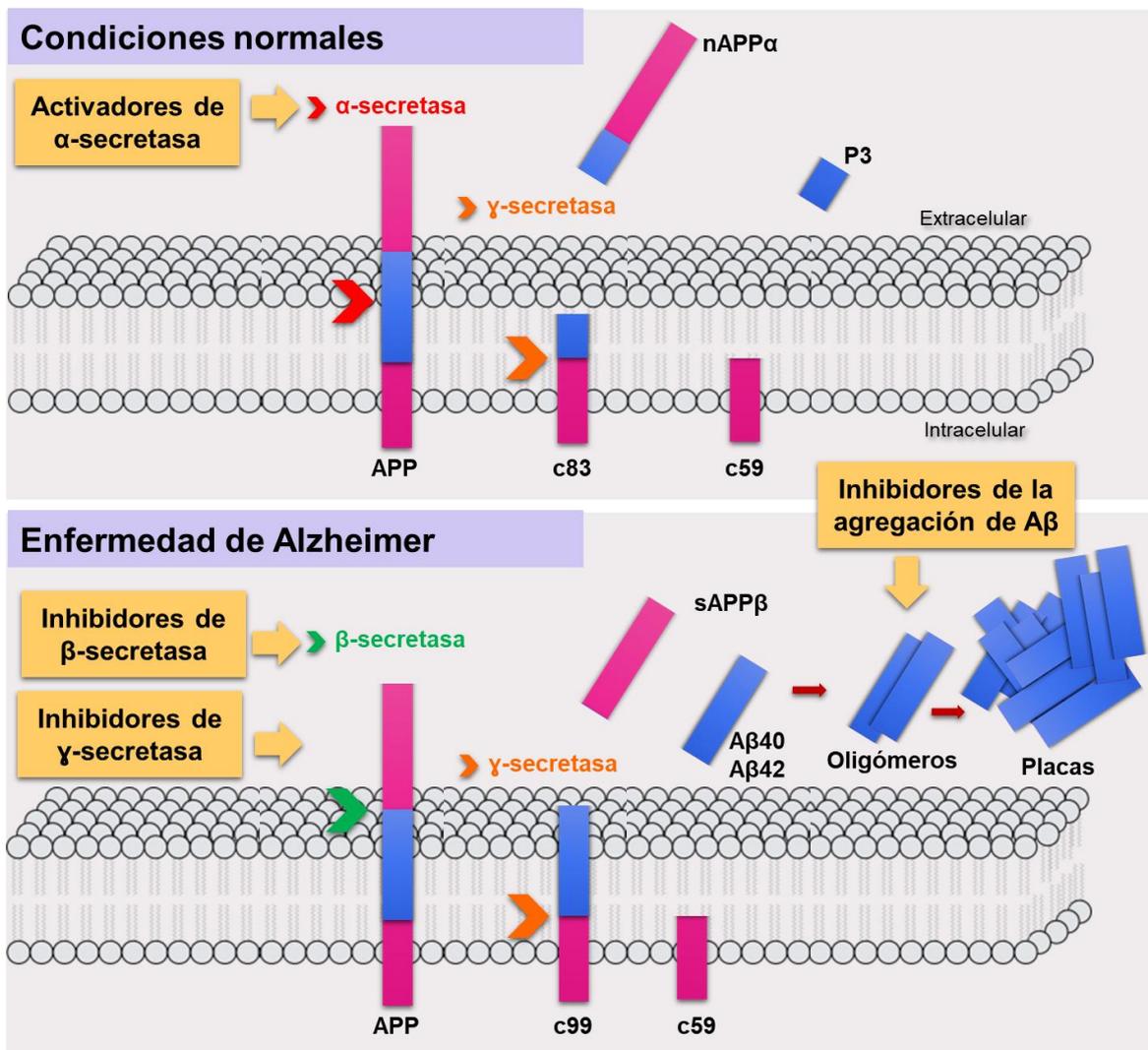


Figura 1.6 – Hipótesis amiloide. En condiciones patológicas como la EdA se reportó un incremento en la producción de A β , que se agregan formando placas seniles fuera de las neuronas, por lo se utilizaron estrategias terapéuticas basadas en activadores de la α -secretasa, inhibidores de la β - y γ -secretasa, e inhibidores de la agregación.

Los tratamientos desarrollados hasta el momento implicaban una estrategia directa en la reducción de A β , inhibiendo las enzimas β - y γ -secretasa que los producen, u activando la enzima α -secretasa que da lugar a péptidos no amiloides; sin embargo, estos tratamientos presentaron extensos efectos secundarios afectando respuestas biológicas esenciales. Otra estrategia que se ha evaluado fue la de impulsar la eliminación “natural” de los A β utilizando inmunoterapias; sin embargo varios anticuerpos han sido probados y han fallado en los estudios clínicos. Esto podría deberse a que aún no se conoce en totalidad el proceso de ensamblaje de los péptidos A β en las formas oligoméricas tóxicas y el proceso de metabolismo de los A β ²⁰. Una estrategia adicional que se ha estado evaluando es la utilización de bloqueadores de la agregación de péptidos amiloides.

1.1.4.4 Hipótesis mitocondrial o del estrés oxidativo

El cerebro es el tejido con mayor demanda de oxígeno por lo que presenta una exacerbada respiración mitocondrial, lo que potencia la exposición a especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas del inglés *reactive oxygen species*). De hecho, la EdA está asociada a un elevado estrés oxidativo, que se refleja en el aumento de la oxidación de proteínas, la nitración de proteínas, la glicooxidación y peroxidación de los lípidos, así como en la acumulación de A β ²². Las ROS son generadas como subproductos de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, siendo la fosforilación oxidativa mitocondrial la principal fuente de los radicales libres que reaccionan con lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos, moléculas esenciales para la estructura y funcionalidad de las neuronas ¹³. Basado en ello, se hipotetizó que el tratamiento con anti-oxidantes podría promover protección contra el estrés oxidativo. Sin embargo, debido a la compleja etiología de la enfermedad, los antioxidantes por si solos no lograron impedir el progreso de la misma ²⁰.

1.1.4.5 Hipótesis de la autofagia

La autofagia es el mecanismo catabólico más importante involucrado en la degradación de las proteínas; y puede ser dividida en tres componentes: macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas ²³. Reportes previos demostraron la pérdida de autofagia en el sistema nervioso central a causa de la neurodegeneración, reflejando el importante rol de este mecanismo en el homeostasis cerebral ²⁴. Asimismo, la pérdida de estructura, y acumulación anormal de proteínas es un factor común en enfermedades neurodegenerativas (como la EdA, de Parkinson, de Huntington y la esclerosis amiotrófica lateral), lo que refleja un problema en el sistema de autofagia ²⁵. Según lo expuesto, se cree que los potenciadores de la autofagia podrían incrementar la velocidad de eliminación de las proteínas en exceso (como A β y p-Tau) y las proteínas agregadas anormalmente (como los oligómeros y placas de A β y p-Tau). Hasta el momento no se han realizado estudios clínicos con estos tratamientos, pero se ha demostrado que la inducción de la autofagia disminuye la agregación de proteínas y los déficit en la memoria de modelos animales murinos ²⁴.

1.1.4.6 Hipótesis inflamatoria

En el cerebro de pacientes con la EdA se ha detectado un estado de neuroinflamación crónica y de gliolisis reactiva, por lo que se ha considerado a la microglia y los astrocitos como jugadores centrales en el desarrollo y progresión de la enfermedad ²⁶. Se hipotetizó que tras la acumulación de A β y p-Tau, las células de la microglia y los astrocitos reactivos se acumularían a su alrededor y secretarían gran cantidad de citoquinas pro-inflamatorias, dando lugar una neuroinflamación crónica, que sería la responsable de los síntomas de la enfermedad. En base a ello, se han utilizado anti-inflamatorios no esteroideos con el objetivo de reducir la inflamación, sin embargo estos no han mostrado efectos benéficos en los estudios clínicos al no inhibir la progresión de la enfermedad

²⁰. Esto podría deberse a que la relación entre la inmunidad innata y la patogénesis de la EdA es compleja y poco comprendida.

1.1.4.7 Hipótesis infecciosa y anti-microbiana

Además, se postuló que la neuroinflamación y otros síntomas relacionados con la EdA podrían deberse a infecciones crónicas en el sistema nervioso central, que darían lugar a la respuesta inmune celular (de microglia y astrocitos) y provocarían los ya mencionados efectos. En relación con ello, se ha demostrado que los péptidos A β presentan actividad anti-microbiana ²⁷, lo que dio lugar a la hipótesis de “protección anti-microbiana” donde se expone que la deposición de A β es parte de la respuesta inmune innata que normalmente protege al cerebro contra las infecciones microbianas (**Figura 1.7**) ^{28,29}.

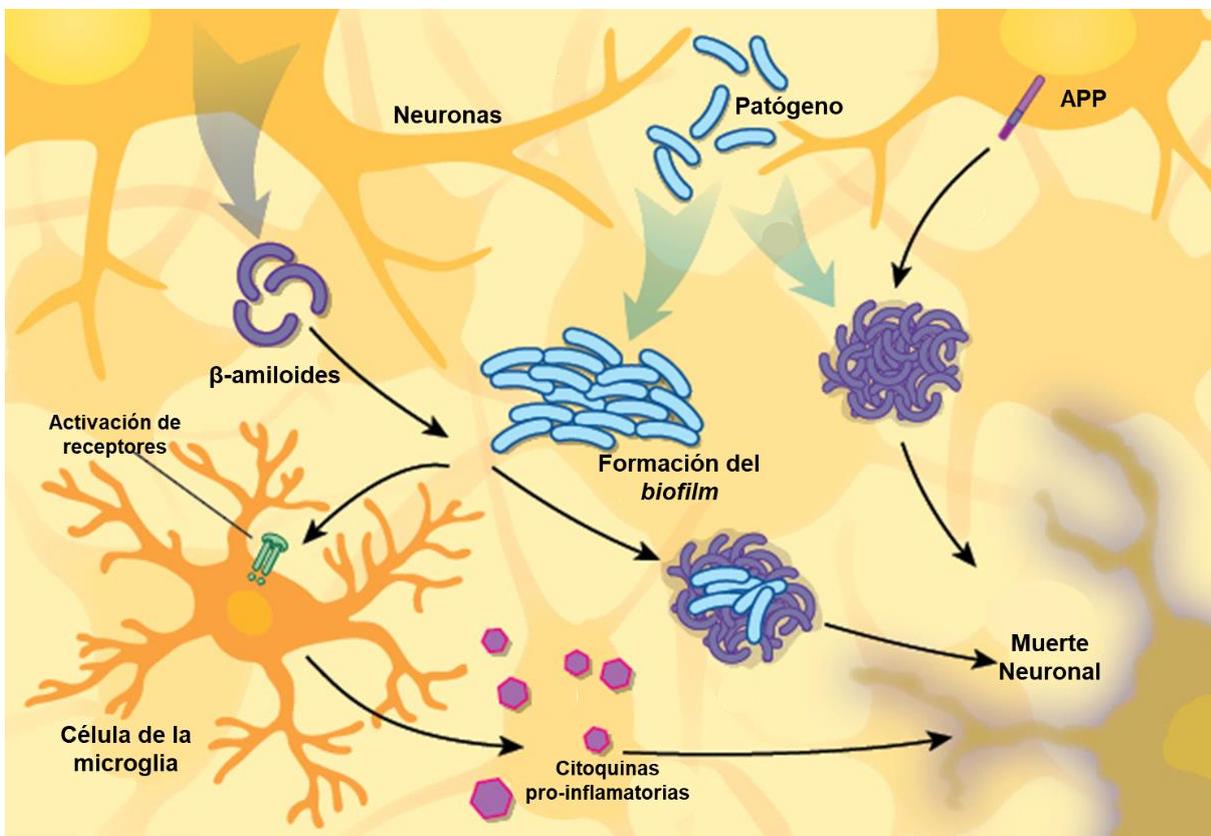


Figura 1.7 – Hipótesis infecciosa y anti-microbiana. Ante la presencia de patógenos en el sistema nervioso central las células podrían secretar A β como parte de un mecanismo de inmunidad innata y además de activarían las vías inflamatorias. Imagen modificada de www.the-scientist.com/features/do-microbes-trigger-alzheimers-disease-30999.

Hasta el momento, un amplio rango de patógenos se ha asociado con el desarrollo de la enfermedad, incluyendo ciertas bacterias (*Spirochetes*, *B. burgdorferi*, *C. pneumonia*, *T. pallidum*, *H. pylori*, *Actinomycetes* y *P. acnes*), hongos (*C. famata*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *P. betae* y *S.*

racemosun), protozoarios (*T. gondii*) y virus (virus de herpes simple 1 y 2, virus *Varicella-zoster*, virus de *Epstein-Barr*, virus de herpes 6, virus de la hepatitis C y citomegalovirus) ²¹. Debido a la novedad de esta hipótesis y a la imposibilidad de detectar sub-infecciones crónicas en el sistema nervioso central, aún no se han estudiado estrategias terapéuticas al respecto.

1.1.4.8 Hipótesis del microbioma intestinal

La última y más reciente hipótesis que se ha propuesto como causa de la EdA es la llamada “hipótesis del microbioma intestinal (MBI)”. Estudios en los últimos años han demostrado que el MBI tiene un profundo impacto en la formación de la barrera hematoencefálica (BHE), en el proceso de mielinización de la neuronas, en la neurogénesis y en la maduración de la microglia ^{30,31}. En particular, ciertos estudios han demostrado que el MBI modula varios aspectos relacionados con la patogénesis de la EdA, dado que influye en el cerebro a través de los metabolitos que produce y de la comunicación por el sistema inmune, el sistema endócrino y el nervio vago (**Figura 1.8**), siendo el responsable de la neuroinflamación crónica.

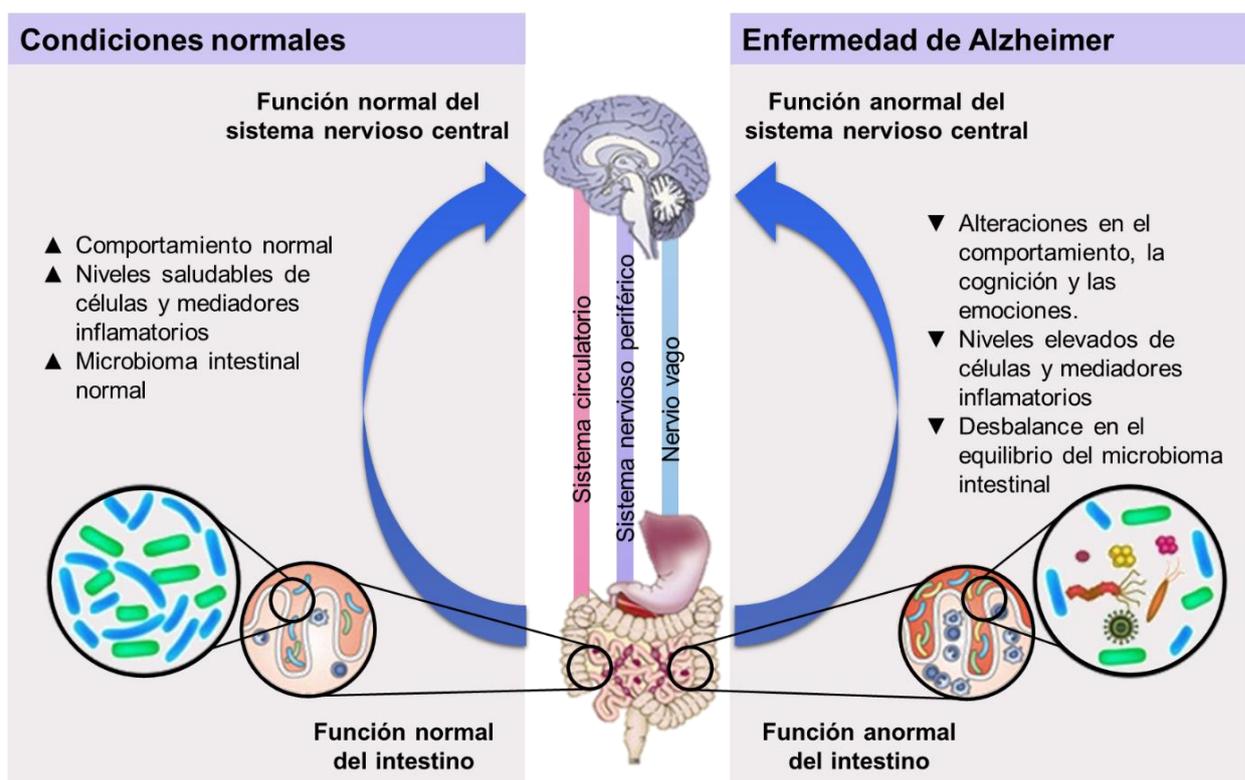


Figura 1.8 – Hipótesis del microbioma intestinal. Ante un desbalance en el equilibrio del microbioma intestinal, se produciría un incremento en los niveles de citoquinas inflamatorias y de hormonas particulares que sería el causante del estado de neuroinflamación crónica.

Por ejemplo, se ha demostrado que el MBI induce la secreción de citoquinas intestinales, que ingresan al sistema circulatorio, atraviesan la BHE y afectan directamente la función cerebral; que

el MBI produce metabolitos como ácidos grasos de cadena corta, ácido γ -aminobutírico y precursores de 5-HT, que también pueden viajar por el sistema circulatorio hacia el cerebro o que pueden activar el epitelio intestinal para producir citoquinas y neurotransmisores que a su vez activan el nervio vago; que el MBI activa las células entero-endócrinas para producir 5-HT u otras hormonas, como la corticoesterona y adrenal, afectando al cerebro a través de la vía neuroinmune; y que el MBI puede modificar la secreción de serotonina y regular la actividad emocional del cerebro^{20,32-34}.

1.1.4.9 Hipótesis genética

Un porcentaje pequeño de los casos de la EdA (<1%) ocurre como resultado de mutaciones en uno de tres genes específicos, que pueden ser el gen de la APP y los genes de las proteínas presenilina 1 (PSEN 1) y presenilina 2 (PSEN 2). Particularmente aquellas personas que presentan mutaciones en APP o PSEN1 tienen 100% de probabilidades de desarrollar la enfermedad, mientras que los que presentan mutaciones en PSEN2 tienen un 95% de probabilidades³⁵. Como las copias de estos genes son heredables, a esta variante de la enfermedad se la conoce como Alzheimer familiar. En estas personas, los síntomas aparecen entre los 30 y 65 años.

Por otro lado, las personas con síndrome de Down presentan una copia adicional del cromosoma 21 en donde se encuentra el gen codificante para APP, por lo que presentan una cantidad incrementada de A β . A la edad de 40, la mayoría de las personas con síndrome de Down presentan placas amiloides y neurofibrillas de p-Tau en sus cerebros³⁶. A la edad de 50, más del 50% de las personas con síndrome de Down desarrollan demencia de Alzheimer⁶.

Por otro lado, el gen APOE codifica para una proteína transportadora de colesterol en el flujo sanguíneo, y es heredado en una de las formas del gen e2, e3, e4 siendo el orden más común e3>e4>e2. La presencia del gen APOE-e4 incrementa el riesgo de desarrollar la EdA comparado con las forma e3 y e2. Específicamente, las personas que presentan un copia de la forma e4 tienen 3 veces más riesgo de desarrollar la EdA, mientras que en las personas con dos copias de la forma e4 el riesgo se incrementa 8-12 veces³⁷. Sumado a ello, un meta-análisis reportó que el 67% de las personas diagnosticadas con la EdA tienen al menos una copia de la forma APOE-e4³⁸.

En resumen, varias hipótesis se han desarrollado para explicar la patogénesis de la EdA, todas ellas basadas en estudios independientes que confirman su rol en la enfermedad. Sin embargo, ninguna de las hipótesis es capaz, por sí misma, de explicar todos los mecanismos que llevan al desarrollo y la progresión de la EdA. En consecuencia, son necesarias investigaciones profundas y estudios complejos que busquen relacionar estas hipótesis entre sí. Asimismo, a pesar de las décadas de estudios, se mantiene la incógnita de si estas hipótesis constituyen efectivamente la

causa de la enfermedad o si son consecuencias de una causa no descripta hasta el momento. Más allá de ello, estos son los mecanismos que hoy en día se conocen y a los que se puede apuntar con los tratamientos farmacológicos. En este sentido, Tang y col. (2019) proponen el entendimiento de la EdA como una enfermedad compleja donde interactúan múltiples hipótesis etiológicas para dar lugar a la patogénesis y sintomatología multifactorial ³⁹.

1.1.5 Tratamiento actual y estrategias terapéuticas convencionales

Hasta el momento, la Administración de Alimentos y Drogas (FDA, por sus siglas del inglés *Food and Drug Administration*) de EE.UU., aprobó cinco drogas para el tratamiento de la EdA que actúan a través de la hipótesis de los neurotransmisores:

- Donepezil, Galantamina, Rivastigmina y Tacrina: son inhibidores de la AChE, enzima que hidroliza la ACh, por lo que su acción se basa en restablecer los niveles de dicho neurotransmisor para disminuir los síntomas cognitivos relacionados con la EdA. De estos cuatro compuestos, la tacrina fue removida del mercado debido a su baja tolerabilidad, hepatotoxicidad y perfil farmacológico desfavorable.
- Memantina: es un antagonista de los receptores NMDA, por lo que su acción se basa en reducir la excitotoxicidad causada por un exceso de Glu. Además, la FDA aprobó una terapia combinada de memantina con donepezil.

Estos tratamientos promueven una mejora relativa de la capacidad cognitiva al aumentar los niveles de neurotransmisores en el cerebro y retardar el daño neuronal, pero ninguno de ellos detiene el avance de la EdA, lo que la hace una enfermedad mortal ⁶. Además, estos medicamentos se administran por vía oral, lo que genera efectos secundarios como resultado de su acción en los tejidos periféricos ². Asimismo, la efectividad de estos medicamentos varía de persona a persona y tiene una duración limitada ⁶. Estas son las razones por las que se requieren nuevos tratamientos efectivos, capaces de manejar esta enfermedad.

El trabajo de Cummings y col. (2014) reportó que entre 2002 y 2012 se llevaron a cabo 413 pruebas clínicas con 244 drogas potenciales para el tratamiento de la EdA, donde 124 estudios fueron de fase I, 206 fueron de fase II y 83 fueron de fase III ⁴⁰. Sin embargo, a pesar del gran esfuerzo y la costosa inversión en la búsqueda de nuevos candidatos efectivos, no se han aprobado nuevas drogas en el mercado. En esta misma línea, Bachurin y col. (2018) revisaron los compuestos utilizados en los ensayos clínicos para el tratamiento de la EdA hasta el 2016, obteniendo resultados similares ⁴¹. En el sitio web www.clinicaltrials.gov se pueden identificar los estudios clínicos que están siendo llevados a cabo o se han completado; al 1 de junio de 2019 se encontraron 117 estudios activos en fase clínica para el tratamiento de la EdA.

Las estrategias terapéuticas utilizadas para el diseño de dichas drogas se basaban en el ataque de una de las posibles vías etiológicas de la enfermedad, por lo que se han generado terapias basadas en moduladores de los neurotransmisores, en considerar a la enfermedad una tautopatía, en la vía amiloide, en la reducción del estrés oxidativo, en procesos anti-inflamatorios y anti-microbianos ^{16,42}, como fue mencionado previamente. Sin embargo, no se han desarrollado drogas o terapias considerando a la EdA como una enfermedad compleja. Dicha falta de consideración y de entendimiento de la naturaleza multifactorial y multimecanística de la enfermedad podría explicar el fracaso en el diseño de nuevas drogas. Otras cuestiones vinculadas podrían ser la falta de biomarcadores robustos y sensibles para el diagnóstico y el monitoreo de la respuesta en los estudios clínicos, el inadecuado diseño de las pruebas de fase clínica, la falta de modelos animales adecuados para la realización de los estudios pre-clínicos, entre otros ²⁰.

1.1.6 Nuevas estrategias terapéuticas

Recientemente, Gong y col. (2018) propusieron una nueva mirada sobre la EdA, enfatizando dos cuestiones: (1) el desarrollo de la EdA resulta de los efectos colectivos de múltiples factores que no están restringidos a una o más de las hipótesis etiológicas específicas; y (2) cada individuo podría sufrir una combinación particular de factores etiológicos, por lo que el desarrollo y progresión de enfermedad en cada individuo sería también particular ⁴³. Considerando estas ideas, Gong y col. (2018) y Bachurin y col. (2018) propusieron un desplazamiento en el paradigma del desarrollo de drogas para el tratamiento de la EdA y mencionaron tres estrategias interesantes para el diseño de nuevos tratamientos ^{41,43}:

1. Diseño y desarrollo de drogas *multi-target*: en esta estrategia se diseñan nuevas moléculas de drogas con el objetivo de que actúen sobre varios mecanismos etiológicos a la vez. Un enfoque sencillo y muy utilizado hasta el momento es la selección de dos o más sustancias de actividad conocida y la generación de nuevas moléculas por unión covalente de las seleccionadas. La tacrina es el fármaco más popular para el desarrollo de ligandos *multi-target*, debido a su elevada actividad anti-AChE y a la necesidad de reducir sus efectos tóxicos.
2. Terapia combinada (*cocktail therapy*): en esta estrategia se realiza el tratamiento simultáneo con dos o más drogas capaces de actuar a través de distintos mecanismos de acuerdo con la hipótesis multifactorial de la EdA. Este enfoque ha demostrado ser efectivo en la quimioterapia y en el tratamiento de las infecciones con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).
3. Reposicionamiento de drogas: en esta estrategia se estudia la utilización específica para el tratamiento de la EdA de drogas que fueron aprobadas y se encuentran en el mercado pero para el tratamiento de otra enfermedad. De esta manera se evita parte de los largos y costosos estudios de fase clínica.

Sumado a ello, Gartzandia y col. (2016) enfatizan la complejidad del diseño de terapias efectivas para desórdenes del sistema nervioso central, debido a que la mayoría de las drogas no pueden acceder al cerebro por la presencia de la BHE ⁴⁴. En consecuencia, es necesario evaluar nuevas vías de administración de compuestos y la utilización de sistemas de *delivery* de drogas. Los sistemas de *delivery* de drogas basados en nanotecnología serán explicados a continuación en este capítulo, por lo que ahora nos centraremos en las vías de administración.

Gartzandia y col. (2016) ⁴⁴ realizaron una revisión de las vías de administración utilizadas hasta el momento para tratamientos con destino en el sistema nervioso central (Figura 1.9).

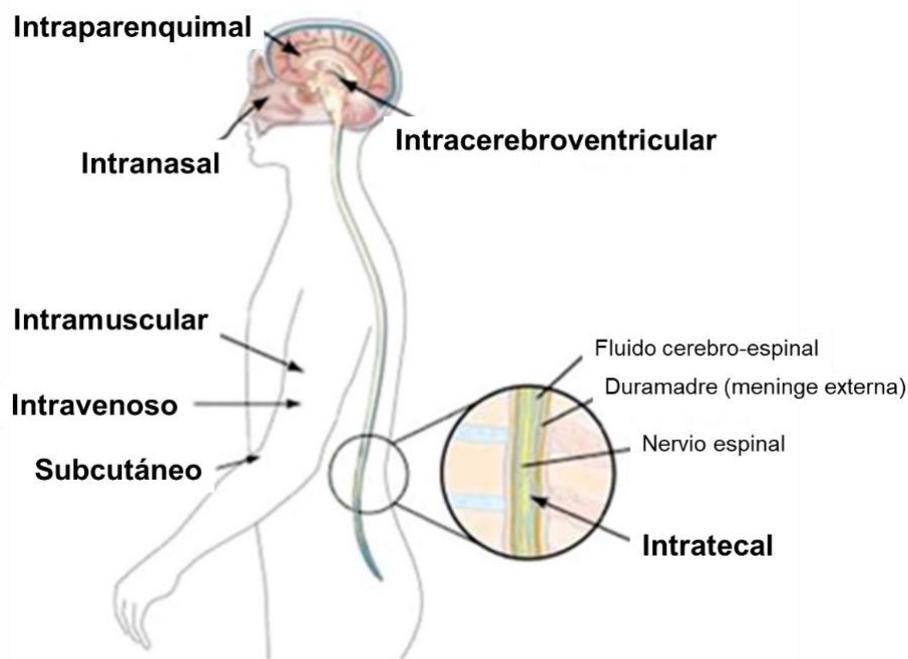


Figura 1.9 – Vías de administración de fármacos utilizadas para tratamientos con destino en el sistema nervioso central. Imagen modificada de ⁴⁴.

Las vías intracerebroventricular e intraparenquimal han sido utilizadas para administración directa en el ventrículo lateral del cerebro o en el parénquima, obteniendo elevadas concentraciones de droga sin necesidad de atravesar la BHE. Sin embargo, ambos son métodos muy invasivos y no aseguran la difusión de la droga desde el sitio de inyección hacia el sitio de acción por la complejidad del tejido cerebral.

La vía intratecal también evita la BHE por inyección directa en el espacio subaracnoide de la médula espinal, siendo menos invasivo que los métodos anteriores. Sin embargo, en esta ruta la efectividad de la droga se puede ver disminuida por la generación de anticuerpos, además de la dificultad para predecir la cantidad de droga que llegará a cerebro debido a las variaciones en el fluido cerebro-espinal.

Las vías parenterales (intravenosa, intramuscular y subcutánea) son rutas menos invasivas que también han sido empleadas, dado que evitan el primer paso metabólico por el hígado, permitiendo el ingreso de la droga directamente a la circulación sanguínea. Sin embargo, la limitante de estas vías es que la droga debe atravesar la BHE por mecanismos de difusión que dan lugar a escasa o nula concentración en el sitio de acción.

La vía intranasal ha sido recientemente estudiada debido a que es una vía rápida y no invasiva capaz de evadir la BHE y permitir la llegada de la droga al sistema nervioso central evitando el primer paso metabólico por el hígado. Luego de la administración intranasal, las drogas pueden acceder al cerebro por las vías olfativas o el nervio trigeminal. Además de los mencionados beneficios, esta vía no causa distrés en el paciente y tiene mínimos efectos secundarios debido a la baja absorción en circulación.

1.2 Nanotecnología Farmacéutica

1.2.1 Nanotecnología y nanomateriales

Según Sahoo y col. (2003), la nanotecnología es “el entendimiento y control de la materia en dimensiones de aproximadamente 1 a 100 nm, lo que genera nuevos usos de la materia” ⁴⁵. La nanotecnología, se refiere por tanto al diseño, construcción y utilización de nanomateriales, es decir estructuras, aparatos y sistemas, que posean tamaño en escala nanométrica, con nuevas propiedades funcionales derivadas de su tamaño. En 2011, la Comisión Europea definió a los nanomateriales como “material natural, generado o manufacturado que contiene partículas en estado libre o agregado, donde el 50% o más de las partículas en la distribución en número tiene un tamaño de 1-100 nm” ⁴⁶. Algunos ejemplos de bioestructuras y de materiales de tamaño nanométrico se presentan en la **Figura 1.10**.

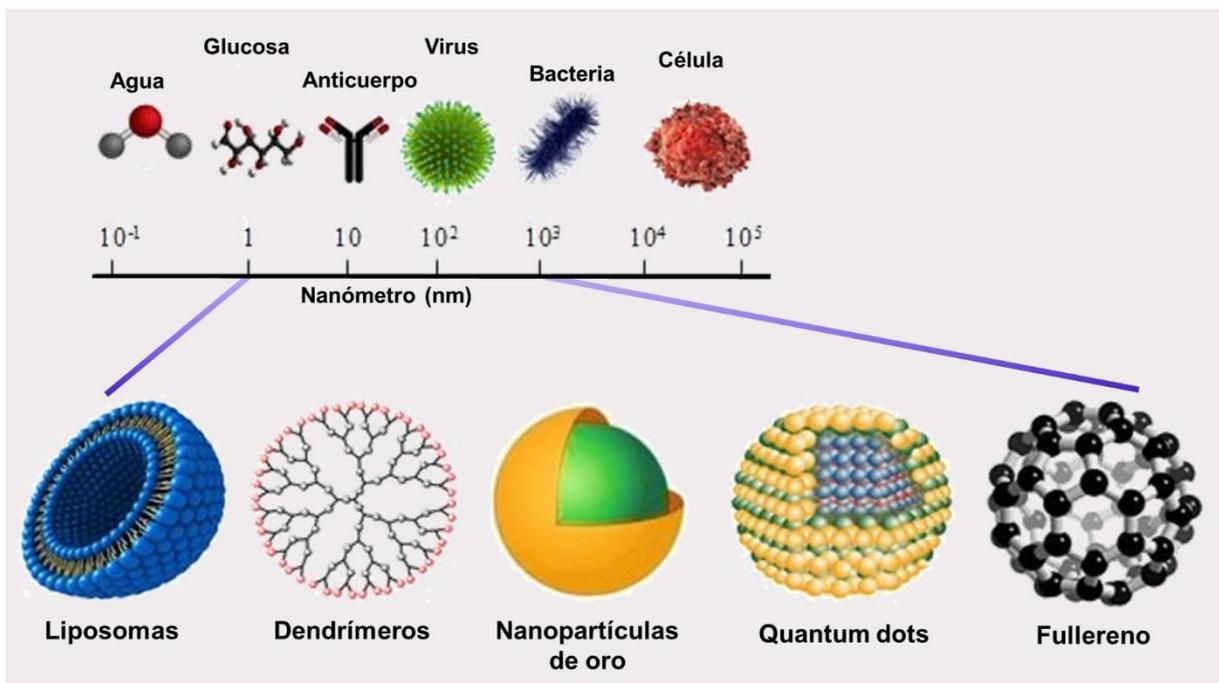


Figura 1.10- Escala nanométrica y ejemplos de nanoestructuras biológicas y nanotecnológicas.

Existen dos grupos de técnicas para construir nanomateriales, las técnicas *top-down* y las *bottom-up* (Figura 1.11). Las técnicas *top-down* permiten la producción de estructuras en la nanoescala a partir del material en escala macrométrica, utilizando técnicas como la litografía. Por otro lado, las técnicas *bottom-up* se refieren a la producción de nanoestructuras átomo por átomo, o molécula por molécula, generalmente utilizando propiedades de auto-asociación o auto-agregación de los componentes, y técnicas como la deposición atómica por capa, la nanofabricación sol-gel, la

deposición en fase vapor, entre otras ⁴⁷. Combinando los métodos *top-down* y *bottom-up*, se producen las alternativas híbridas que pueden soslayar los problemas técnicos de los otro dos enfoques ⁴⁸.

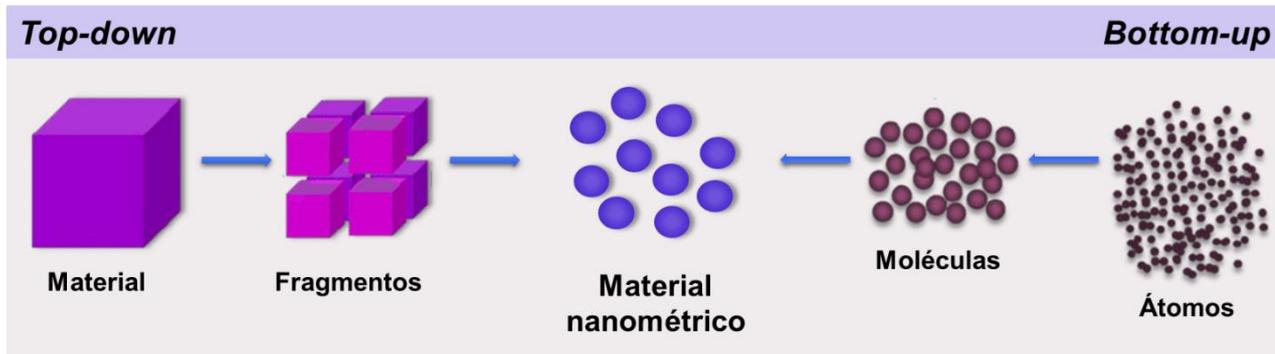


Figura 1.11 – Métodos utilizados para la obtención de nanomateriales. Los métodos *top-down* permiten la producción a partir del material en escala macrométrica, mientras que los *bottom-up* se refieren a la producción de nanoestructuras átomo por átomo o molécula por molécula.

Tanto en el método *top-down* como *bottom-up*, las propiedades de los materiales se transforman a medida que ingresan a la escala de tamaño nanométrica. De este modo, la nanotecnología nos permite modificar por ejemplo el punto de fusión, las propiedades magnéticas o el color del material sin cambiar la composición química ⁴⁹. Por ejemplo, el carbono en forma macroscópica de grafito (mina de lápiz) es blando, mientras que los nanotubos de carbono compuestos por láminas de grafito son más fuertes que el acero y más livianos.

Varios sistemas se han desarrollado para organizar y clasificar a los nanomateriales, incluyendo la caracterización por sus tamaños o su composición:

- En cuanto a la clasificación por tamaño, los nanomateriales se han dividido entre aquellos que poseen una dimensión (films, capas o superficies), dos dimensiones (nanocables o nanotubos), o tres dimensiones nanométricas (nanopartículas, liposomas, dendrímeros, *quantum dots*, entre otros) (**Figura 1.12**) ⁴⁸.
- En cuanto a su clasificación por composición se han dividido en orgánicos (dendrímeros, micelas de polímeros, liposomas, ferritinas, fullerenos, cristales líquidos, polímeros, hidrogeles, entre otros) o inorgánicos (*quantum dots*, nanopartículas de oro, de plata, entre otras) (**Figura 1.13**) ^{50,51}.

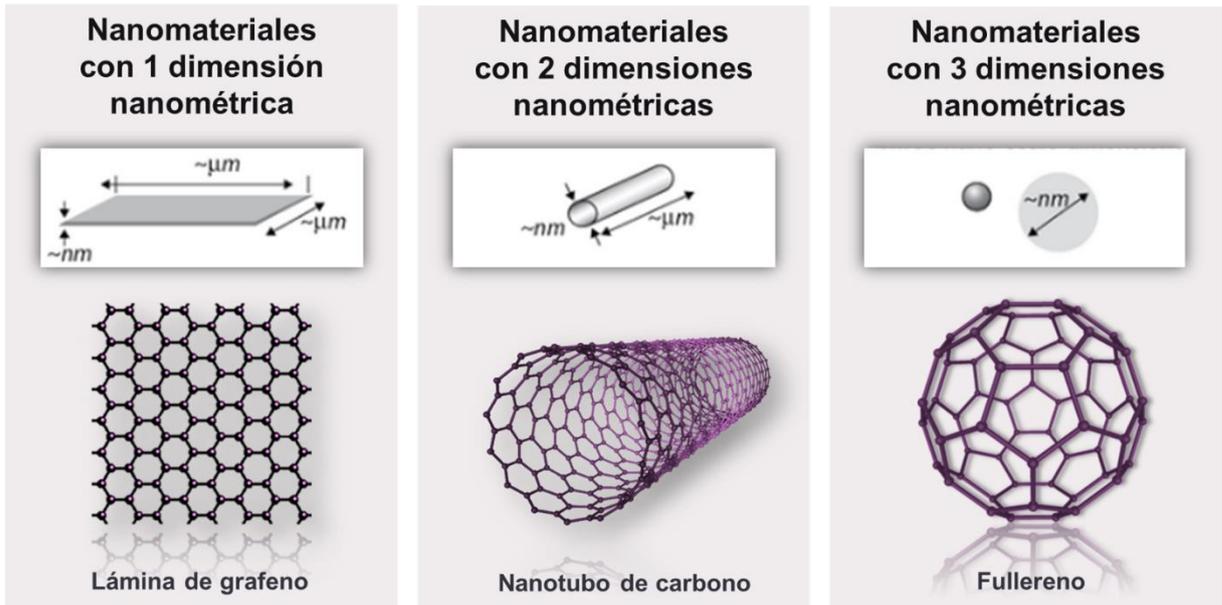


Figura 1.12 – Clasificación de los nanomateriales según sus dimensiones nanométricas.

Las aplicaciones de la nanotecnología son muchas y muy variadas, incluyendo la ciencia de los materiales, la medicina, la química, la física, la ciencias de los alimentos, las ingenierías (eléctricas, mecánicas, textil), la agricultura, la biología experimental y computacional, la ciencia de partículas entre otras ^{48,51}. En este trabajo haremos particular hincapié en la aplicación de la nanotecnología a la medicina.

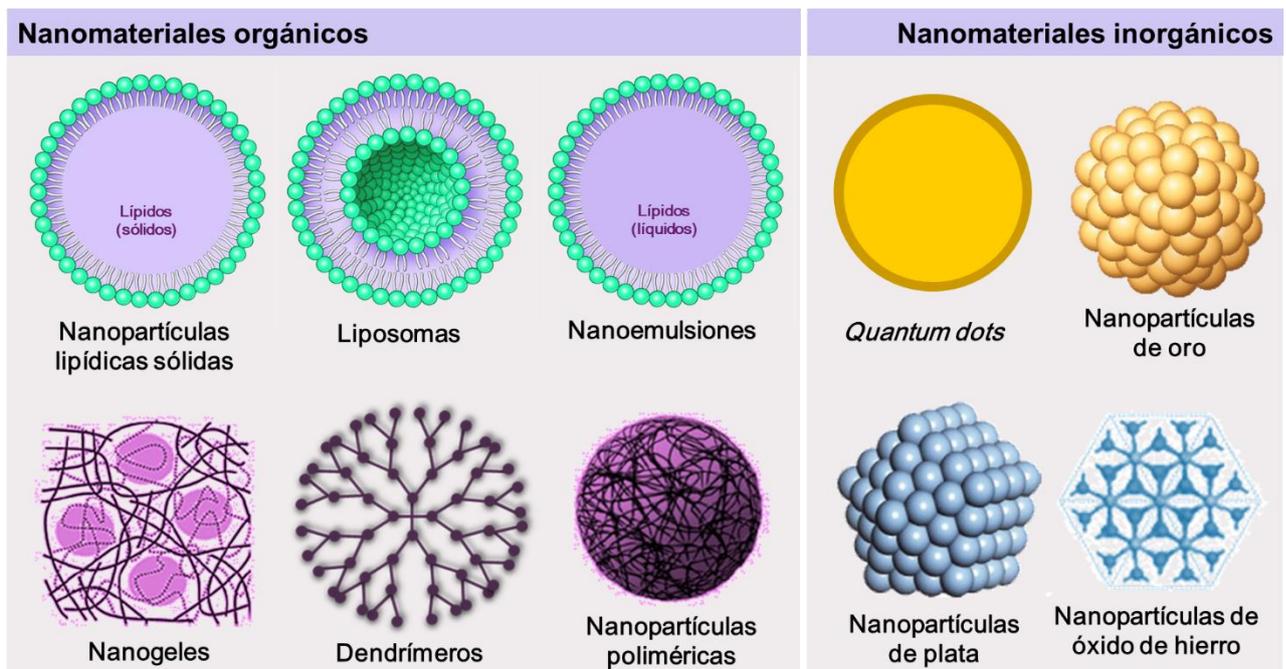


Figura 1.13 – Clasificación de los nanomateriales según su composición.

1.2.2 Nanomedicina

La nanomedicina es un campo relativamente nuevo y en constante evolución, donde se combinan la nanotecnología con las ciencias biomédicas y farmacéuticas ⁵². La Fundación Europea de Ciencias definió a la nanomedicina como “la ciencia y tecnología aplicada al diagnóstico, tratamiento y prevención de enfermedades y aflicciones traumáticas, disminución del dolor y conservación y mejora de la salud humana, utilizando herramientas moleculares y el conocimiento molecular del cuerpo humano” ⁵³. En un sentido amplio, podemos decir que la nanomedicina se refiere al uso de nanotecnología para mejorar el diagnóstico, la prevención y el tratamiento de enfermedades.

Aunque la aplicación de nanotecnología a la medicina parezca ser una tendencia relativamente nueva, el uso de nanotecnología en aplicaciones médicas se remonta a varias décadas. El primer ejemplo de vesículas lipídicas de tamaño nanométrico, que más tarde se llamaron liposomas, se describió en 1965 ⁵⁴, el primer sistema polimérico de liberación controlada de macromoléculas se describió en 1976 ⁵⁵, la primera nanopartícula polimérica biodegradable con elevado tiempo de circulación en sangre en 1994 ⁵⁶ y el primer *quantum dot* bioconjugado para diagnóstico por imágenes en 1998 ⁵⁷.

Hasta el momento, se han identificado cinco áreas importantes de trabajo en el amplio campo que abarca la nanomedicina ^{58,59}:

1. Diseño y desarrollo de nanotransportadores o nanosistemas de *delivery* de drogas: Incluye el uso de diferentes nanomateriales para la construcción de sistemas para el transporte y la liberación controlada de drogas, péptidos, ácidos nucleicos y agentes para imágenes. En los últimos años se ha estudiado el uso de una gran variedad de nanopartículas, como liposomas, niosomas, nanopartículas lipídicas sólidas, dendrímeros y nanocápsulas.
2. Desarrollo de técnicas de nano-imágenes: Comprende el estudio y desarrollo de nuevas técnicas que permitan monitorear en tiempo real los procesos celulares y moleculares *in vivo*, con mayor sensibilidad y resolución. Este enfoque podría ser aplicable tanto al estudio de compartimentos subcelulares como a la detección de enfermedades en estadios tempranos.
3. Puesta a punto de técnicas analíticas y desarrollo de herramientas de diagnóstico *ex vivo* o *in vitro*; por ejemplo para el análisis de tejidos normales o patológicos, así como para mejorar el entendimiento de la iniciación y progreso de las enfermedades.
4. Generación de nanomateriales y nanodispositivos para bioingeniería. Incluye el estudio de materiales con propiedades novedosas y el desarrollo de sistemas multifuncionales para utilizar como implantes activos *per se* o como transportadores de otras moléculas bioactivas.
5. Transferencia del laboratorio a la clínica. Incluye el escalaje industrial, validación de métodos, revisión de aspectos regulatorios y evaluación de seguridad (nanotoxicología).

Es menester destacar que la nanomedicina tiene implicancias particulares en el tratamiento y diagnóstico de la EdA. Brambilla y col. (2011) revisaron la utilización de nanotecnología para el diagnóstico de la EdA y describieron, por ejemplo, que nanopartículas de óxido de hierro han sido aprobadas por la FDA como agentes de contraste para imágenes de MRI en métodos *in vivo*, mientras que nanopartículas de oro se han utilizado para generar sistemas de detección de biomarcadores de la enfermedad en métodos de diagnóstico *ex vivo*⁶⁰. Sumado a ello, Nazem y col. (2014) describieron que la mayoría de las vías etiológicas de la EdA podrían ser abordadas para su tratamiento con nanomateriales (**Figura 1.14**)⁶¹. Por ejemplo, el fullereno es uno de los nanomateriales con mejores propiedades anti-oxidantes, debido a su capacidad de captar radicales libres, que pueden ser funcionalizado para mejorar su compatibilidad. Finalmente, además de actuar como moduladores de la enfermedad, los nanomateriales podrían actuar como nanotransportadores de drogas a través de la BHE, cuestión que fue revisada por Dong (2018)⁶².

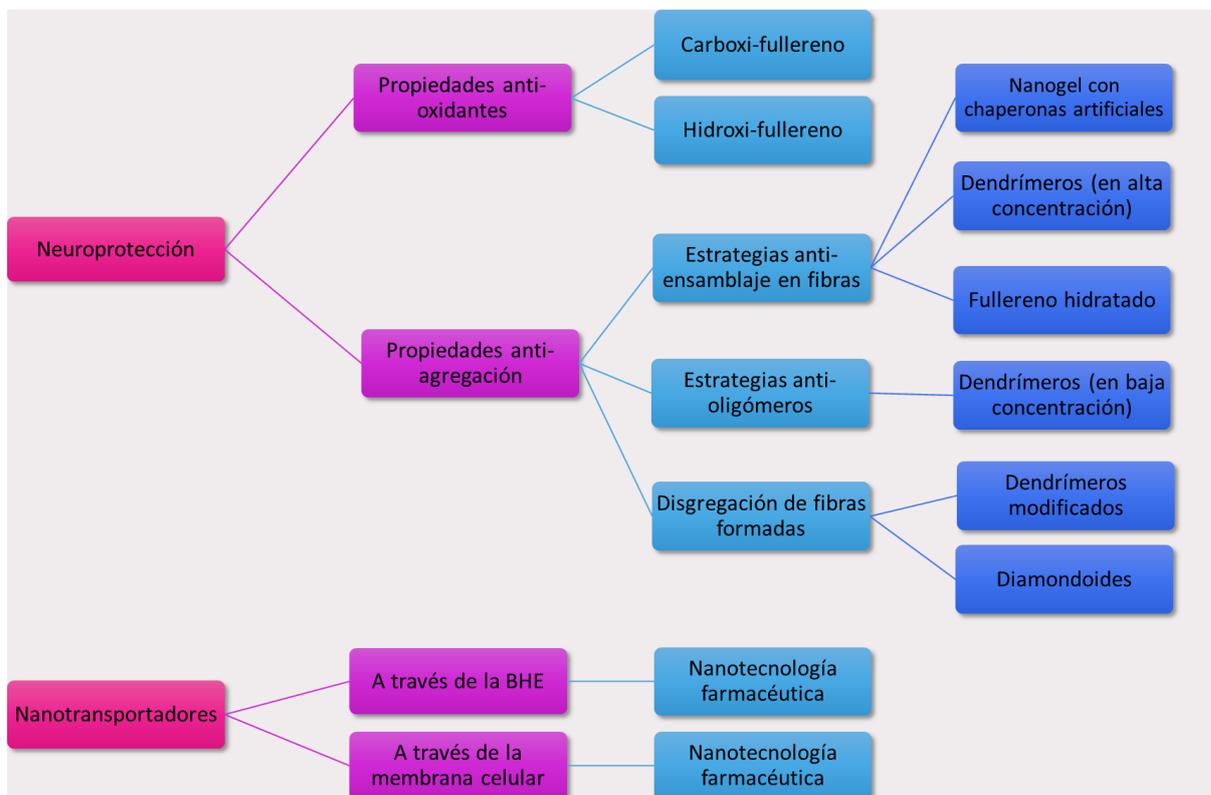


Figura 1.14 – Implicancias de los nanomateriales en la EdA. Modificada de ⁶¹.

La nanomedicina aplicada al transporte de drogas es una categoría muy diversa y compleja que incluye el uso de materiales en la nanoescala capaces de potenciar la seguridad, eficacia o actividad de las drogas que transportan ⁵⁹. A esta aplicación particular de la nanomedicina se la conoce también como nanotecnología farmacéutica, y nos centraremos en su discusión en la próxima sección.

1.2.3 Nanotecnología farmacéutica

El término nanotecnología farmacéutica fue acuñado por José Luis Vila-Jato, académico de la Real Academia Nacional de Farmacia de España y presidente de la Sección de Tecnología Farmacéutica, según: “ciencia y tecnología de los sistemas nanoparticulados farmacéuticos teniendo una base científica que se apoya en los nuevos aspectos biofarmacéuticos que están relacionados fundamentalmente con su pequeño tamaño y la interacción con las células, lo que incluye aspectos como la interacción con la membrana celular, el tráfico de los sistemas en el interior celular, el acceso al citoplasma, el paso a través de la membrana nuclear, entre otros”⁶³. En términos amplios, se podría decir que la nanotecnología farmacéutica es la aplicación de la nanomedicina al ámbito farmacéutico, con una base especial en el entendimiento molecular de las interacciones a escala nanométrica. En esta nueva área es necesaria la estrecha colaboración interdisciplinaria, entre la biología, la bioquímica, la farmacia, la matemática, la química y la ingeniería.

Se prevé que la nanotecnología farmacéutica sea el área de la nanomedicina con mayor impacto a corto plazo, debido al alto grado de avance actual. Particularmente, la FDA definió que los productos surgen de la nanotecnología farmacéutica si están preparados con nanopartículas en el rango de 1 a 100 nm y que, debido a su pequeño tamaño y elevada relación área/superficie, exhiben diferencias respecto del material original, o con materiales cuyo tamaño no se encuentran dentro del rango de 1 a 100 nm, pero que exhiben propiedades dependientes de su dimensión⁵². Desde 1990 las autoridades regulatorias han aprobado varios productos basados en nanotecnología farmacéutica, la mayoría de ellos para terapias anti-tumorales, entre los que se hallan liposomas convencionales (DaunoXome® y AmBisome®), liposomas cubiertos con polietilenglicol (Doxil® y Caelyx®), drogas poliméricas (Capoxome®), conjugados polímero-proteínas (Oncaspar®) y nanopartículas de albúmina con paclitaxel (Abraxane®). De acuerdo con Bobo y col. (2016), 51 nanomedicinas fueron aprobadas por la FDA, y 77 productos ingresaron en ensayos clínicos, con ~40% de ellos comenzando entre 2014 y 2015⁶⁴. La mayoría de estos materiales fueron nanocompuestos poliméricos, liposomas o nanocristales⁴⁸.

El desarrollo de nanosistemas de *delivery* o nanotransportadores de drogas permiten que el bioactivo que llevan asociado pueda atravesar diferentes barreras biológicas del organismo, lo que no se podría realizar con los sistemas convencionales ya que en estos las propiedades fisicoquímicas de la droga son las que condicionan su efectividad, absorción y biodistribución. Una de las principales diferencias entre un nanotransportador y un microtransportador (sistema de *delivery* de drogas a escala micrométrica), es que, merced su tamaño, los primeros poseen una alta actividad superficial; lo que les confiere la capacidad única de interactuar con su entorno y cruzar barreras biológicas. Por otro lado, mientras los sistemas micrométricos permanecen en el

exterior celular y liberan la droga con un determinado perfil, que luego debe ingresar al interior celular por sus propios medios (en general por difusión), los nanotransportadores pueden ser capturados por las células y con ellos la droga transportada. Esto genera mayores concentraciones de droga en el interior celular, donde en general se hallan los blancos terapéuticos.

Además de las ventajas respecto de los microtransportadores, los nanotransportadores ofrecen beneficios importantes respecto de los tratamientos con las drogas libres, entre ellas: transporte de elevadas cantidades de droga, aumento de la solubilidad de drogas insolubles, protección de la droga de los ambientes desfavorables (como el estómago o los lisosomas) y de las enzimas degradativas, incremento de la vida media de las drogas en sangre, liberación controlada de las drogas y posibilidad de transportar varias drogas a la vez ^{51,52}. Por ejemplo, se ha observado que menos del 0,01% de la cantidad de droga inyectada en su tamaño de angstrom se acumula en la región terapéutica, comparado con un 1-5% de acumulación para las drogas administradas con nanopartículas ⁵². Es decir que los nanotransportadores pueden impartir beneficios en los perfiles farmacocinéticos, de eficiencia, de toxicidad y de direccionamiento de los compuestos bioactivos que transporten.

El cerebro es un órgano esencial que está aislado y protegido del entorno por la BHE. Los mismos mecanismos que impiden la entrada de sustancias extrañas nocivas evitan el acceso a medicamentos terapéuticos. Por lo tanto, es importante diseñar nanotransportadores que sean capaces de dirigir de forma masiva el fármaco al cerebro, especialmente en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como la EdA ⁶⁵. En general, se espera que un nanotransportador sea biodegradable, fácil de preparar y relativamente de bajo costo, que tenga un tamaño pequeño, una gran capacidad de carga, circulación prolongada e idealmente que proporcionen una acumulación específica en el sitio del cuerpo requerido y no en otros lugares, reduciendo los efectos secundarios al disminuir el acceso a otros tejidos u órganos donde no tienen el efecto terapéutico ⁶⁶.

Un nanotransportador debe estar pensado desde múltiples aspectos incluyendo el tamaño de partícula, la carga superficial, el tipo de superficie química, entre otras, dependiendo del tipo de droga a transportar. Asimismo, se debe considerar el tipo de transporte a realizar, diferenciándose los transportes pasivos y activos. Los transportes pasivos aseguran la acumulación del nanotransportador desde la sangre al sitio de interés de acción, mientras que el transporte activo aumenta la internalización de las drogas en las células de destino. La internalización suele ocurrir por varias vías endocíticas dependientes de energía. En general, las partículas grandes (250 nm o más) son internalizadas por fagocitosis luego de haber sido opsonizadas por las inmunoglobulinas, las proteínas del suero o los componentes del complemento. Las nanopartículas de menor tamaño (100 nm) son internalizadas por un proceso similar llamado macropinocitosis, donde la partícula sin

opsonizar es internalizada en una vesícula. La internalización de partículas de menor tamaño (menor a 100 nm) pueden ser además internalizadas por endocitosis mediada por clatrina o caveolina, cuando hay interacción ligando-receptor específico en la membrana celular ⁵¹. Además del tamaño, la carga superficial juega un papel importante en la internalización de nanopartículas. La membrana celular está cargada negativamente, por lo que las nanopartículas catiónicas pueden ingresar más rápidamente a las células gracias a la interacción electrostática con la membrana. Por otro lado, las nanopartículas aniónicas, deben interactuar con zonas cargadas positivamente de receptores de membrana para ser internalizadas. Finalmente, las nanopartículas hidrofóbicas pueden aumentar la internalización debido a la afinidad con el interior de la membrana ⁵¹.

Entre los nanotransportadores de drogas más estudiados hasta el momento se encuentran los liposomas, las micelas, las nanopartículas poliméricas, las nanopartículas sólidas lipídicas, las ciclodextrinas y los dendrímeros (**Figura 1.13**). Las aplicaciones y características de estos nanotransportadores se han revisado anteriormente en profundidad ^{67,68}. Nuestro interés se centra, por tanto, en los dendrímeros que son polímeros tridimensionales sintetizados químicamente formados por capas ramificadas alrededor de un núcleo central. En los últimos años, los dendrímeros se han convertido en nanotransportadores muy atractivos para la entrega de drogas debido a su tamaño controlado en la nanoescala y la amplia posibilidad de funcionalización. Más adelante en este capítulo revisaremos las propiedades y aplicaciones particulares de los dendrímeros.

1.2.4 Nanotoxicología

La nanotoxicología es definida como el estudio de las interacciones entre los nanomateriales y los sistemas biológicos, con un énfasis particular en establecer la relación, si existe, entre las características fisicoquímicas del nanomaterial y su efecto toxicológico ⁴⁶.

Es importante resaltar que la toxicidad de un nanomaterial no se puede inferir a partir de datos de toxicidad del material a escala micrométrica o no particulado, dado que, como se describió previamente, los nanotransportadores poseen alta actividad superficial con numerosos grupos funcionales expuestos, lo que es una de las principales ventajas pero también puede resultar en consecuencias adversas. Por otro lado, también se debe considerar que un nanotransportador puede cambiar la estabilidad, solubilidad, biodisponibilidad, farmacocinética y biodistribución de la droga que transporta, y por ende también puede producir cambios en el perfil de toxicidad de la misma.

Es crucial distinguir entonces la nanotoxicología de la toxicología, dado que los ensayos de toxicidad estándar son en general inadecuados en presencia de nanopartículas. Esto se debe a

que mientras la mayoría de los compuestos químicos inducen daños a través de la interacción específica con biomoléculas, cada nanotransportador puede causar toxicidad por varias mecanismos a la vez, como por ejemplo inducción de generación de ROS, genotoxicidad, modificaciones morfológicas, fenómenos de degradación, efectos inmunológicos, entre otros. Factores importantes en este sentido son la elevada relación superficie/volumen, la elevada reactividad superficial y la susceptibilidad a la degradación. Además, muchas nanopartículas son inestables en dispersión, por lo que tienden a aglomerarse, agregarse o sedimentar, lo que modifica la captura y toxicidad ⁴⁶. En este sentido, los estudios nanotoxicológicos deben implicar el estudio simultáneo de varios efectos tóxicos.

Sumado a ello, la nanotoxicidad puede ser entendida como un efecto adverso no específico que puede darse en células, órganos o un organismo completo. Por otro lado, el termino biocompatibilidad se refiere a la habilidad de un nanotransportador de interactuar con un organismo completo sin producir efectos adversos y de generar una respuesta apropiada en el hospedador para una aplicación específica. Es por ello, que en el campo de la nanotecnología farmacéutica es importante estudiar la biocompatibilidad de los nanotransportadores en sí mismos y de los sistemas nanotransportadores de drogas desarrollados

Con el objetivo de estudiar la nanotoxicidad y biocompatibilidad de los sistemas de *delivery* de drogas, en este trabajo proponemos la realización de tres tipos de estudios: (1) estudios *ex vivo* en glóbulos rojos; (2) estudios *in vitro* en cultivo celular; y (3) estudios *in vivo* en el modelo animal de *zebrafish*.

1.2.4.1 Ensayos *ex vivo* en glóbulos rojos

Es de importancia evaluar la actividad hemolítica debido a que, tras una administración parenteral, el dolor puede ser atribuido a la hemólisis causada por el tratamiento, que resulta en la liberación de la hemoglobina de los eritrocitos al plasma. Esta liberación puede resultar en la irritación vascular, anemia, flebitis, ictericia, insuficiencia renal aguda, y en algunos casos, la muerte. Estos mismos efectos también se pueden observar cuando los nanocompuestos llegan a la sangre por otra vía de administración ⁶⁹. En ello radica la importancia de evaluar la actividad hemolítica no solo de las drogas a administrar, sino también de los nanotransportadores y de los sistemas nanotransportador-droga, previo a su utilización en cualquier modelo animal o estudio clínico. Además, los estudios de hemólisis y cambios morfológicos en glóbulos rojos son métodos simples ampliamente utilizados para analizar la interacción entre las membranas biológicas y los nanomateriales ⁷⁰.

En la mayoría de los estudios *ex vivo* de hemólisis, se detecta espectrofotométricamente la hemoglobina liberada en plasma tras la incubación de la muestra de sangre con las nanopartículas

y la separación de las células no dañadas por centrifugación. Luego, a partir de un control positivo, se calcula el porcentaje de hemólisis ⁷¹. El método de incubación, el tiempo, las condiciones de almacenamiento, la velocidad de centrifugación, la longitud de onda a la que se cuantifica la hemoglobina, y la muestra de sangre utilizada (por ejemplo, el uso de eritrocitos purificados en lugar de sangre entera o la inclusión de varios anticoagulantes) varían significativamente de un estudio a otro, por lo que en general es complicado realizar comparaciones con otros estudios. En este aspecto, Dobrovolskaia y col. (2008) explicaron que es importante definir los parámetros del ensayo y mantenerlos constantes para poder realizar la comparación de resultados entre muestras diversas, sobre todo si incluyen nanomateriales. Asimismo, estos autores recomendaron la utilización de controles positivos y negativos y varias concentraciones del tratamiento a analizar, con el fin de evitar falsos negativos ⁷².

En este trabajo se propone la evaluación nanotoxicológica sobre glóbulos rojos humanos, no solo a través de estudios de hemólisis (liberación de hemoglobina), sino también a partir del estudio sobre la morfología de los eritrocitos, utilizando microscopia óptica y la tinción de Giemsa para aumentar el contraste.

1.2.4.2 Ensayos *in vitro* en cultivo celular

Como los nanotransportadores interactúan directamente con las células y las biomoléculas, es imperativo estudiar *in vitro* los efectos adversos que podrían tener, antes de realizar estudios clínicos. Los ensayos *in vitro* basados en cultivo celular son relativamente rápidos, convenientes, baratos y sin restricciones éticas, por lo que suelen ser la primera opción para estudiar los nanomateriales ⁷³. La mayoría son realizados en cultivos clásicos de dos dimensiones de líneas celulares tumorales, aunque el uso de *stem cells* y cultivo primario se está incrementando en los últimos años. La selección del tipo celular en general depende del órgano target *in vivo* o de la aplicación particular de las nanopartículas que se estén estudiando ⁴⁶.

Para evitar la subestimación o la sobreestimación de la toxicidad de un nanotransportador, es necesario realizar ensayos con varias concentraciones del nanomaterial, en distintos tiempos de incubación y utilizando diversos métodos de detección. Además, si es posible, se debe determinar si los efectos ocurren sobre una organela específica o si es producto de una toxicidad generalizada ⁷⁴. Según bibliografía, se han utilizado extensamente los métodos para detectar daños en las membranas (como LDH) y en el metabolismo celular (como MTT) ⁷³.

En el presente trabajo, se propone la evaluación nanotoxicológica a partir del estudio de los efectos sobre: la viabilidad, por la tinción con cristal violeta (CV), la actividad metabólica celular, mediante el ensayo MTT, y el nivel de afección de membranas, por el ensayo de captura de rojo neutro (RN). Cada uno de estos ensayos analiza distintos parámetros involucrados en el mecanismo de toxicidad

celular. El ensayo de MTT se basa principalmente en la reducción del MTT por enzimas mitocondriales, mientras que el ensayo de RN permite medir la captación del colorante por los lisosomas funcionales y el grado de afectación de las membranas lisosomales y plasmática, y la tinción con CV mide la captación del colorante por células viables unidas al sustrato ⁷⁴.

1.2.4.3 Ensayos *in vivo* en embriones y larvas de *zebrafish*

Si bien un análisis inicial de la nanotoxicidad puede realizarse *in vitro*, la extrapolación a modelos *in vivo* sigue siendo un desafío ⁴⁶. Sumado a ello, el estudio de la nanotoxicidad debe diferenciarse del estudio de la nanobiocompatibilidad, como antes mencionamos, en donde se deben utilizar organismos enteros para evaluar la respuesta biológica al nanomaterial. En dicho aspecto, mamíferos pequeños (roedores) suelen ser los modelos más utilizados para estudiar la distribución y biocompatibilidad de los nanomateriales ⁷⁵. Sin embargo, en los últimos años, el modelo animal *zebrafish* (*Danio rerio*) ha ganado relevancia para el estudio de los nanomateriales, por ser un modelo rápido, barato y fácil de manipular cuyos resultados podrían extrapolarse a los observados en humanos ⁷⁶.

Específicamente, los *zebrafish* son peces originarios del sureste de Asia y fueron introducidos como organismos modelo por George Streisinger a fines de los años 80 ⁷⁷. Estos teleósteos son organismos vertebrados que presentan una homología genética del 80% con los humanos, además de similitudes moleculares y fisiológicas con los mamíferos, incluyendo la BHE, las células endoteliales, las respuestas inmunes, entre otras. Asimismo, los *zebrafish* presentan muchas ventajas que los convierten en un interesante modelo intermedio entre estudios citotóxicos *in vitro* y estudios *in vivo* en modelos murinos.

Algunas de las características de los embriones y larvas de *zebrafish* son que tienen tamaño pequeño, bajo costo de mantenimiento, gran producción de huevos transparentes, y rápido desarrollo embrionario externo (los sistemas de órganos principales se desarrollan completamente en menos de una semana) ⁷⁸. Al quinto día post-fecundación (dpf) son funcionales el corazón, el cerebro, el hígado, el páncreas, los riñones, el intestino, los músculos y los sistemas sensoriales de las larvas de *zebrafish*; mientras que al décimo dpf se completa y vuelve funcional la BHE ⁷⁹. Sumado a ello, los tejidos se vuelven opacos cuando ocurre la muerte celular, lo que permite estudiar la toxicidad fenotípica semicuantitativamente. Dichas características permiten que el análisis del desarrollo de los peces sea adaptable para la detección de biocompatibilidad de alto rendimiento.

En consecuencia, en muchos campos de la investigación biomédica, los embriones y larvas de *zebrafish* han emergido como un modelo poderoso y alternativo al uso de roedores ⁸⁰. En este

sentido, es de interés resaltar que la realización de ensayos en *zebrafish* cumple con el principio de las 3R para la investigación con animales (reducir, refinar y reemplazar) ⁸¹.

En este trabajo, se propone la evaluación de la nanobiocompatibilidad en larvas de *zebrafish* de 5 dpf, estudiando los efectos sobre la viabilidad, la morfología (toxicidad generalizada), el ritmo cardíaco (cardiotoxicidad), el movimiento espontáneo (neurotoxicidad) y el estado del hígado (hepatotoxicidad).

1.3 Dendrímeros

1.3.1 Definición de los dendrímeros

Los dendrímeros, también conocidos como moléculas en cascada, son polímeros tridimensionales obtenidos por síntesis orgánica que consisten en un *core* central, ramificaciones unidas covalentemente al *core* que crecen radialmente formando generaciones (G) y una superficie con múltiples grupos terminales (**Figura 1.15**). El término “dendrímero” surge de las palabras griegas *dendron* y *meros*, que significan árbol y partes, respectivamente, haciendo referencia a la estructura ramificada de estas macromoléculas ⁸². Los dendrímeros podrían ser definidos entonces como macromoléculas sintéticas y complejas, con una estructura ramificada, una forma tridimensional controlada y un tamaño en el rango nanométrico ⁵⁸.

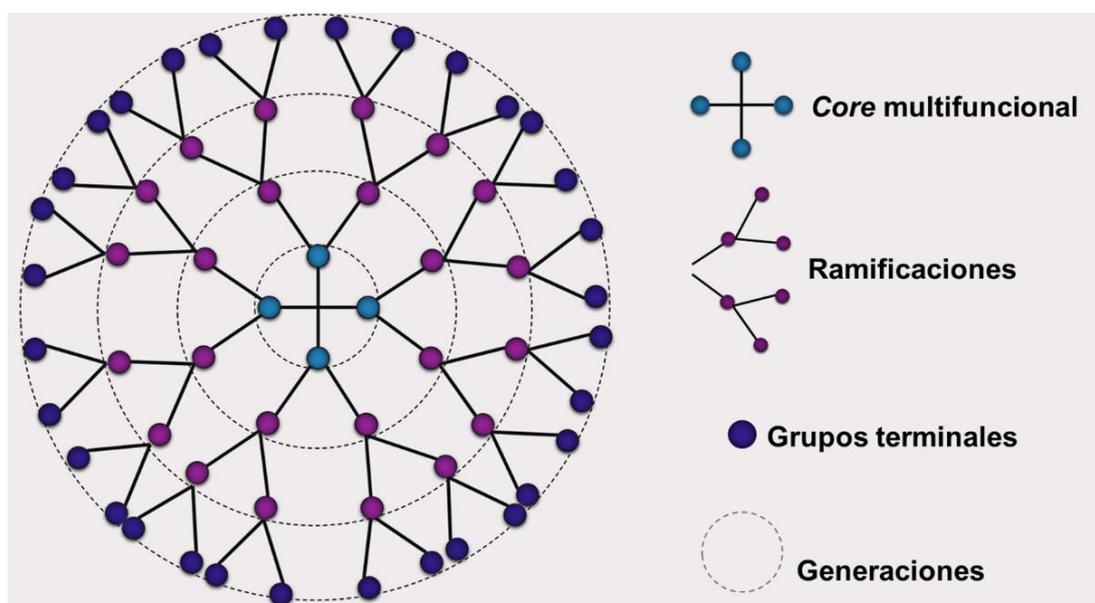


Figura 1.15 – Representación en dos dimensiones de un dendrímero. Se puede observar el crecimiento radial, a partir del *core* multifuncional, de las ramificaciones que dan lugar a las distintas generaciones.

Estas macromoléculas fueron sintetizadas por primera vez en los 1980s por el grupo de Donald Tomalia ⁸³, e independientemente por el grupo de George Newkome ⁸⁴. Particularmente, los dendrímeros, sus propiedades y sus posibles aplicaciones se volvieron un campo de investigación interesante en 1983, cuando Donald Tomalia describió por primera vez la síntesis de estos polímeros en la *Winter Polymer Gordon Conference*. Este investigador y su grupo sintetizaron la primera familia de dendrímeros a partir de un *core* de etilendiamina al que fueron adicionando cadenas ramificadas de poliamidoamina (PAMAM) desde la generación cero (G0) hasta la G10. Estos dendrímeros se conocen como dendrímeros PAMAM o Starburst ® ⁸³, y son uno de los

múltiples tipos de dendrímeros que se han sintetizado hasta el momento con distintos *core*, tipos de ramificaciones y grupos terminales.

En todos los tipos, a medida que el dendrímero crece desde el *core* hacia la superficie, por adición progresiva de las capas conocidas como generaciones, el tamaño se incrementa gradualmente (aproximadamente 1 nm/G) y también se incrementa el número de grupos internos y superficiales (**Figura 1.16**). Además, a medida que se incrementa el número de generaciones, los dendrímeros se vuelven más esféricos y la densidad de grupos superficiales se incrementa ⁸⁵. Por ejemplo, los dendrímeros PAMAM con *core* de etilendiamina incrementan su tamaño de 1,1 a 12,4 nm desde la G1 a la G10, mientras que el número de grupos terminales aumenta de 8 a 16384.

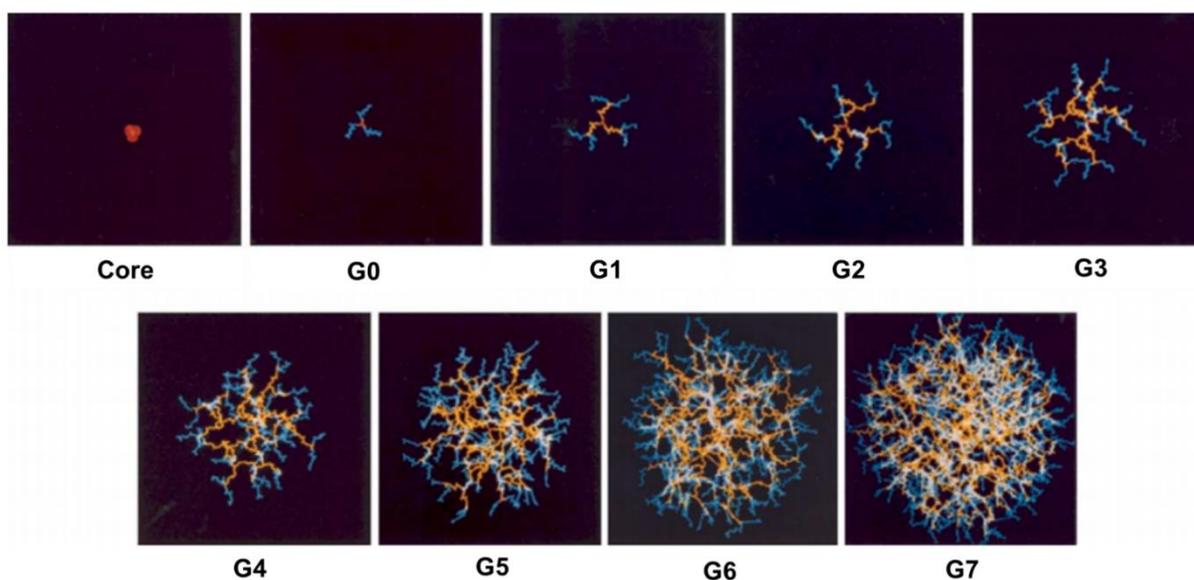


Figura 1.16 – Representación en tres dimensiones de un dendrímero desde el *core* a la G7. Se puede observar que a mayores generaciones hay un incremento gradual del tamaño, de la cantidad de grupos superficiales, de la forma esférica y de la densidad de empaquetamiento. Imagen tomada de ⁸⁶.

Ciertas propiedades fisicoquímicas de los dendrímeros, como la solubilidad o la reactividad, están determinadas por la naturaleza de sus grupos terminales superficiales. A diferencia de los polímeros convencionales, con solo dos extremos terminales, el número de grupos superficiales en los dendrímeros se incrementa exponencialmente con la generación, por lo que se convierte en una interfase entre el dendrímero y su entorno. Asimismo, en contraste con el crecimiento teóricamente infinito de los polímeros lineales, el crecimiento de los dendrímeros está matemáticamente limitado. Durante la síntesis, el número de unidades monoméricas aumenta exponencialmente en cada generación, mientras que el volumen disponible solo crece proporcionalmente al cubo del radio del dendrímero. Cuando se alcanza el punto crítico, el dendrímero ya no puede crecer debido a un impedimento estérico, fenómeno que se conoce como

“*starburst effect*”. En el caso de los dendrímeros PAMAM, el efecto se observa a partir de la G10⁸⁷.

Los dendrímeros de generaciones pequeñas (G 0-3) toman conformaciones asimétricas y abiertas, los de G medias (G 4-6) son estructuras semi-rígidas capaces de albergar moléculas tanto en su interior como unidas a su superficie, mientras que los dendrímeros de G mayores (G 7-10) son esferas rígidas incapaces de aceptar moléculas en su interior y con gran impedimento estérico en su superficie (**Figura 1.17**)^{86,88,89}. Como se mencionó anteriormente, esto se debe a que a medida que se incrementa la generación del dendrímero, se incrementan proporcionalmente el tamaño, la forma globular, la rigidez de la estructura, la densidad de grupos terminales en la superficie y la densidad de grupos internos⁸⁶. Asimismo, por el método controlado de síntesis, además de las generaciones completas (Gn o Gn.0), también se pueden obtener productos intermedios, que se denominan de generación intermedia (Gn.5)⁹⁰.

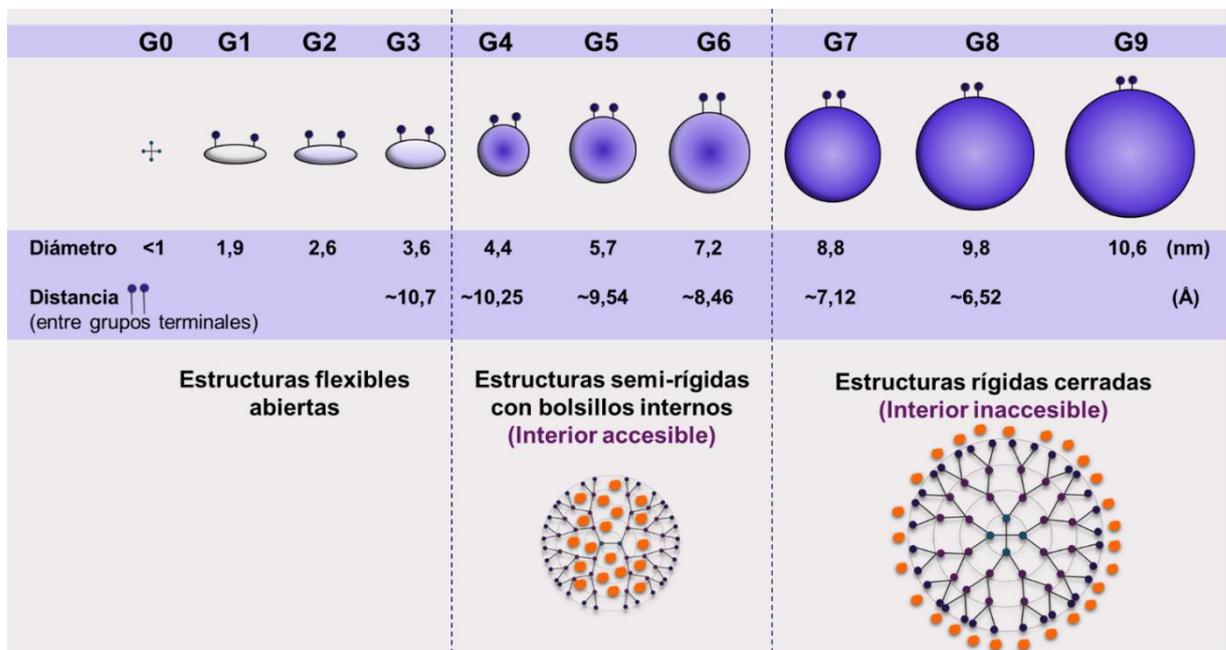


Figura 1.17 – Representación estructural de dendrímeros PAMAM desde la G0 a G10. Se puede observar el incremento gradual en el tamaño de los dendrímeros y la disminución en la distancia entre sus grupos superficiales (aumenta la densidad en la superficie junto con la G).

A partir de su descubrimiento, los dendrímeros emergieron en los múltiples campos de aplicación de la nanotecnología, sobre todo como prometedores sistemas de *delivery* de drogas, debido a sus propiedades controladas, como bajo índice de polidispersidad y selección de los grupos superficiales^{50,82}. Si bien se han sintetizado infinidad de tipos de dendrímeros hasta el momento, los más utilizados en la nanomedicina son los dendrímeros PAMAM y los dendrímeros de polipropilenimina (PPI)⁸⁷.

Particularmente, en este trabajo se utilizaron los dendrímeros PAMAM con *core* de etilendiamina de la G4.0, con grupos amino terminales, y de la G4.5, con grupos carboxílicos terminales (**Figura 1.18**). Esta selección se basó en que estos dendrímeros serían óptimos como nanotransportadores de drogas ya que pueden incorporar moléculas de fármaco en sus bolsillos internos, o bien anclarlos a sus grupos de superficie mediante interacciones iónicas o covalentes ⁵⁸. Además, en trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación, en el área de nanotecnología farmacéutica, se demostró que los dendrímeros PAMAM G4.0 y G4.5 fueron capaces de incorporar moléculas de sulfadiazina y risperidona, aumentando su solubilidad en agua y la llegada al cerebro ⁹¹⁻⁹⁴.

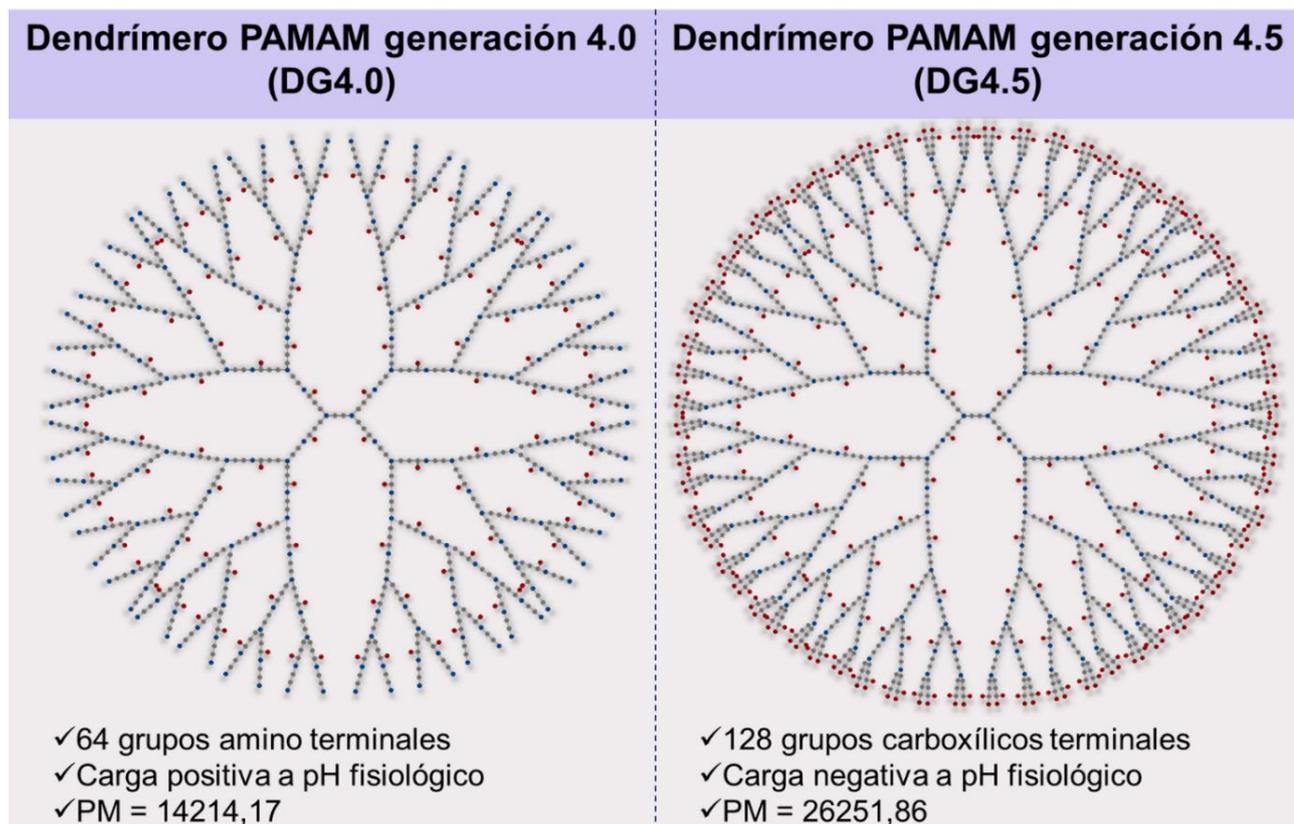


Figura 1.18 - Representación de los dendrímeros PAMAM generación 4.0 y 4.5. Cada tipo de átomo se representa con un color (celeste: nitrógeno, rojo: oxígeno, gris: carbono, no se representan los átomos de hidrógeno). Se puede observar el crecimiento radial desde el *core* de etilendiamina, dando lugar a cadenas con enlaces amidas y ramificaciones con aminas terciarias. Como grupos terminales, los DG4.0 presentan aminas primarias y los DG4.5 ácidos carboxílicos.

Justificado en esta elección, más allá de las descripciones generales sobre los dendrímeros, en esta sección de la introducción haremos hincapié en los dendrímeros PAMAM y sus particularidades.

1.3.2 Síntesis de los dendrímeros

La síntesis orgánica de estas macromoléculas permite controlar casi a la perfección los parámetros moleculares como tamaño, forma, química del interior y de la superficie, flexibilidad, topología, entre otros ⁹⁵, dando lugar a estructuras controladas y monodispersas similares a las observadas en los sistemas biológicos. Inicialmente se describieron dos métodos de síntesis para la obtención de dendrímeros. El grupo de Tomalia y el grupo de Newkome, ambos en 1985, describieron la obtención de dendrímeros por métodos divergentes; mientras que el grupo de Hawker y Fréchet en 1990 describieron un método de síntesis convergente ^{83,84,96}. En la actualidad se han desarrollado múltiples métodos de producción de dendrímeros, sin embargo las vías divergentes y convergentes son aún las más utilizadas.

1.3.2.1 Síntesis divergente

En el método de síntesis divergente (*bottom-up*), la construcción del dendrímero comienza a partir del *core* multifuncional, al cual se le unen un número determinado de ramificaciones dependiendo de la valencia del mismo (por ejemplo para un *core* con dos extremos reactivos se adicionarán cuatro ramas, mientras que para un *core* de cuatro extremos se adicionaran ocho ramas). En la siguiente etapa, se funcionalizan los extremos de las ramas adicionadas, lo que posibilita la próxima etapa de crecimiento ramificado, dependiente del número de puntos ramificables ⁷⁰. Luego, se unen nuevas ramas cuyos extremos se funcionalizan y así continua progresivamente hasta alcanzar la generación deseada (**Figura 1.19**). Es decir que para dar lugar a cada una de las generaciones, se realizan dos reacciones consecutivas; en la primera se adicionan las ramas y en la siguiente se funcionalizan los extremos.

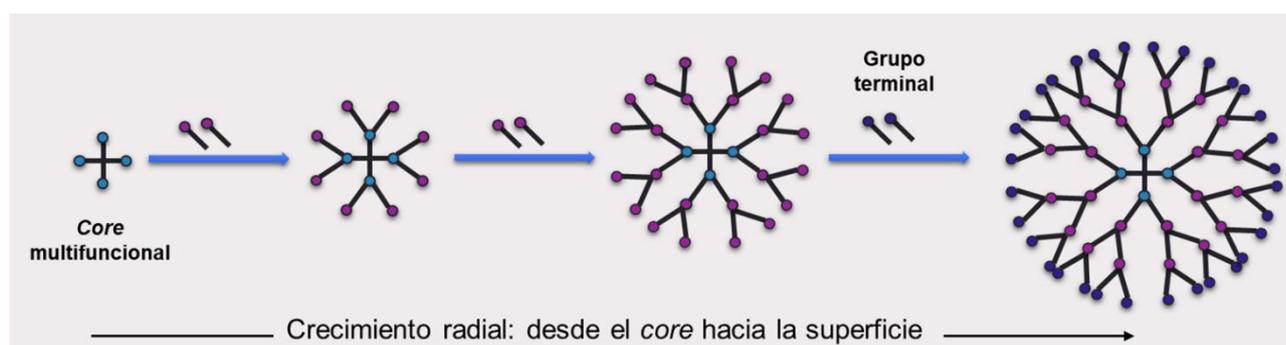


Figura 1.19 – Método divergente de síntesis de dendrímeros. El crecimiento ocurre radialmente desde el *core* hacia la superficie, por adición progresiva de ramas y puntos de ramificación.

Las limitaciones de este método de síntesis incluyen que se debe utilizar un exceso de monómero en cada reacción y se requieren extensas separaciones cromatográficas para purificar las distintas generaciones de dendrímeros.

Particularmente, la síntesis divergente de los dendrímeros Starburst® comienza a partir del *core* de etilendiamina, que posee dos extremos ramificables amina primaria. Al mismo se adicionan, en dos reacciones sucesivas, capas de metacrilato y de etilendiamina, lo que da lugar a cadenas de carbono con enlaces amidas internos y a extremos de amina primaria. Estos extremos con grupos aminos actúan como puntos de ramificación para la adición de otras capas de metacrilato y etilendiamina, lo que da lugar a la formación de aminas terciarias internas (**Figura 1.20**). Dichas aminas terciarias en el interior del dendrímero son los puntos de ramificación a partir de los cuales crece la estructura generación tras generación ^{86,90}. En las generaciones intermedias de los dendrímeros PAMAM, como es el caso del DG4.5, a partir del DG4.0 solo se adiciona una capa de metacrilato, que se modifica para dejar expuestos ácidos carboxílicos terminales.

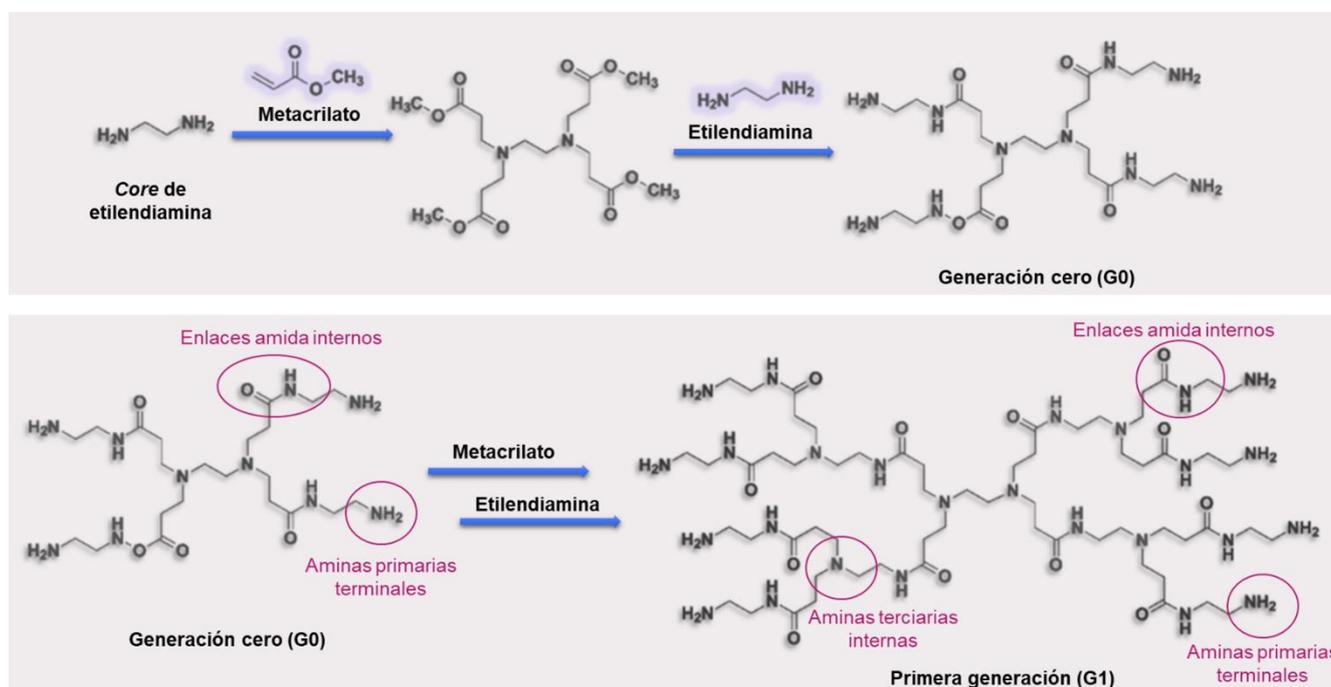


Figura 1.20 – Síntesis divergente de dendrímeros PAMAM con *core* de etilendiamina (Starburst®). A partir del *core* de etilendiamina se adicionan, en reacciones sucesivas, capas de metacrilato y etilendiamina. Se obtienen dendrímeros con enlaces amida y amina terciaria internos (de allí el nombre poliamidoamina).

1.3.2.2 Síntesis convergente

En el método de síntesis convergente, la construcción comienza generando unidades ramificadas llamadas dendrones, que se unen en un último paso al *core* multifuncional para dar lugar a los dendrímeros ⁷⁰. El crecimiento de los dendrones comienza desde los grupos terminales hacia el interior, contrariamente a lo que ocurre en el método divergente. Sin embargo, al igual que en el otro método, el crecimiento de cada generación implica dos pasos de reacción consecutivos; en

este caso, primero se funcionalizan los grupos terminales para que sean ramificables, y luego se los unen para formar las ramificaciones (Figura 1.21).

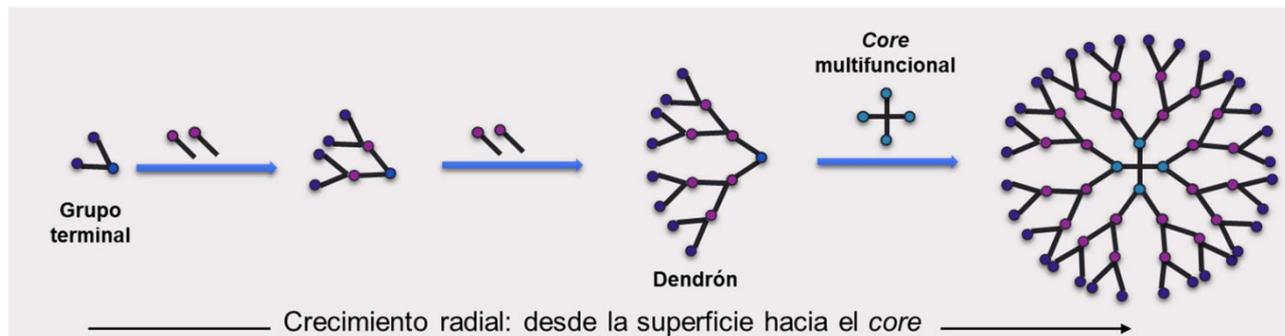


Figura 1.21 – Método convergente de síntesis de dendrímeros. El crecimiento ocurre radialmente desde el la superficie hacia el interior de los dendrones, que luego se unen a un *core* multifuncional.

La ventaja de este método es que se obtienen dendrímeros con menos errores, dado que se seleccionan y utilizan solo los dendrones correctamente formados para la unión al *core*. Sin embargo, está limitado a la producción de generaciones pequeñas debido a los inconvenientes estéricos a nanoescala que se presentan cuando se unen dendrones de gran tamaño a un único *core* central.

1.3.2.3 Otros métodos de síntesis

Uno de los principales desafíos para el uso y aplicación de los dendrímeros es la simplificación de sus métodos de síntesis. En la actualidad, el objetivo es aumentar las cantidades producidas para su comercialización masiva y, además, para disminuir los costos de producción. En la búsqueda de nuevos métodos de síntesis, se han combinado las estrategias divergentes y convergentes, se han implementado estrategias de auto-ensamblaje, y se han desarrollado técnicas completamente novedosas ⁹⁷. Sowinska y col. (2014) realizaron una revisión al respecto, en donde se profundizan los métodos conocidos como hipercore, hipermonómeros, doble exponencial, ortogonal, click y lego ⁹⁸.

De acuerdo con lo descripto, independientemente del método, la síntesis se puede realizar a partir de elementos naturales o de elementos sintéticos. Además, las superficies de los dendrímeros pueden ser posteriormente modificadas con otras moléculas. Por ejemplo, moléculas responsables del reconocimiento de motivos celulares, radioisótopos, marcadores fluorescentes, polímeros, entre otras ⁷⁰. Por tanto, la síntesis de dendrímeros puede dar a la formación de múltiples tipos de estructuras, todas ellas con características controladas particulares.

1.3.3 Arquitectura de los dendrímeros

La arquitectura de los polímeros macromoleculares se podía clasificar en lineal, entrecruzada o ramificada. A partir de la síntesis de los dendrímeros, la arquitectura dendrítica se ha desplegado como la cuarta familia de arquitecturas macromoleculares (**Figura 1.22**). Dentro de la arquitectura dendrítica se incluyen a los polímeros hiperramificados, a los *dendrigrfts*, a los dendrones y a los dendrímeros ⁹⁷.

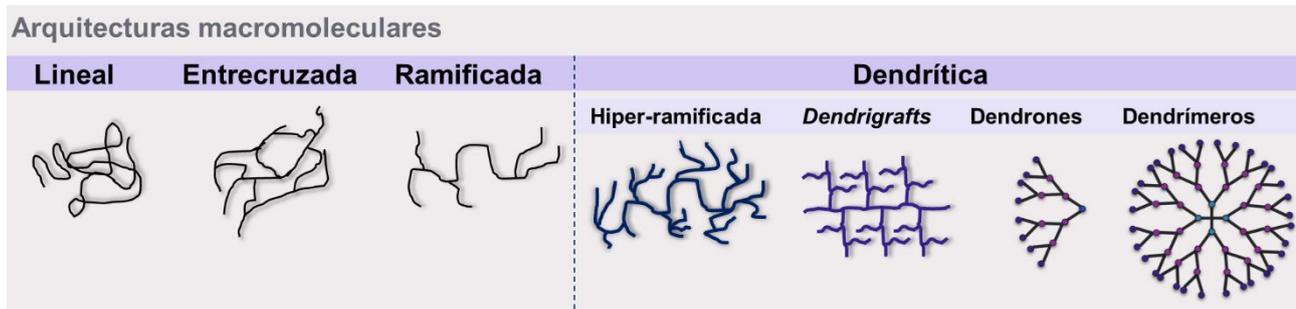


Figura 1.22 – Representación de las arquitecturas macromoleculares. Los polímeros pueden ser clasificados en lineales, entrecruzados, ramificados o dendríticos.

La arquitectura dendrítica es una de las topologías biológicas más conservada, dado que puede ser encontrada en los sistemas biológicos en todas las escalas de tamaño. Por ejemplo, esta arquitectura se puede encontrar en la escala del metro, en las ramas de los árboles o en sus raíces; en la escala de los centímetros y milímetros en las topologías de la circulación del cuerpo humano, sobre todo en los pulmones, el hígado y el riñón; o en la escala de los micrómetros en las neuronas y sus dendritas. También se puede encontrar en la escala del nanómetro a nivel molecular, por ejemplo en la estructura del glucógeno, la amilopectina y los proteoglicanos. La existencia de estos patrones dendríticos en diferentes escalas biológicas deja en evidencia que las estructuras altamente ramificadas ofrecen ventajas únicas a nivel funcional.

Particularmente, la arquitectura de los dendrímeros tiene tres dominios distinguibles: el *core* iniciador, las capas interiores (generaciones) compuestas por unidades que se adicionan radial y ramificadamente desde el *core*, y los grupos funcionales terminales que forman la superficie del dendrímero ^{82,87,99}.

1.3.3.1 Core

El *core* es una molécula multifuncional que actúa como núcleo de la arquitectura del dendrímero. Estas moléculas se caracterizan por tener grupos reactivos que funcionan como puntos de ramificación iniciales a partir de los cuales se despliega la estructura dendrítica. Se pueden clasificar en bi-, tri-, y tetra-funcionales, según presenten dos, tres o cuatro grupos ramificables, respectivamente (**Figura 1.23**).

Para la producción de dendrímeros se han utilizado distintos tipos de *core*, siendo los reactivos bifuncionales más utilizados la etilendiamina (EDA) y butilendiamina (DAB, por diaminobutano); de los trifuncionales, el amoníaco y la triazina; y de los tetrafuncionales, el clorato de tiofosforilo (TC) y el tetrametilsilano ⁸⁷.

Dentro de una misma familia, el tipo de *core* modificará las propiedades del dendrímero. Por ejemplo, la longitud de *core* puede afectar la capacidad de encapsular moléculas, debido a que modificará la densidad del empaquetamiento de las generaciones que crecen a partir de él ⁸⁶. Del mismo modo, la funcionalidad del *core* determinará la cantidad de ramificaciones y de grupos terminales para una misma generación de dendrímero (Figura 1.23).

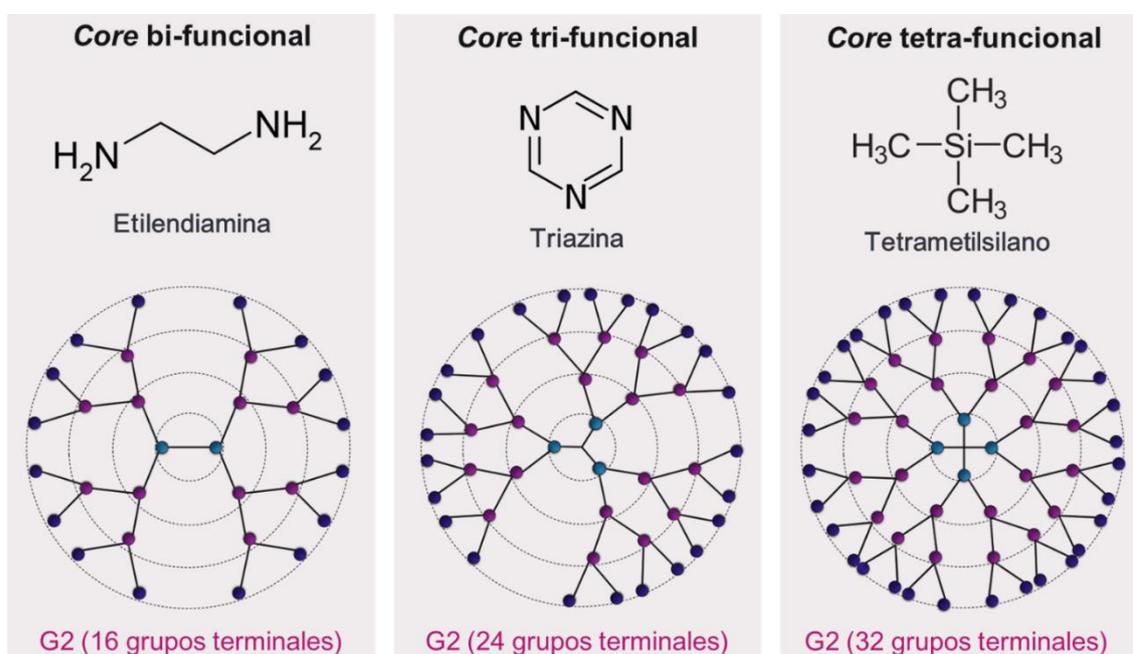


Figura 1.23 – Clasificación de los *core* según cantidad de grupos funcionales. Se presentan tres moléculas ejemplo de cada tipo de *core*, y se muestra como la funcionalidad del *core* afecta a la densidad de ramificaciones y a la cantidad de grupos terminales para una misma G de dendrímeros.

1.3.3.2 Ramificaciones internas (generaciones)

Las capas repetitivas que se presentan radial y ramificadamente desde el *core* iniciador se llaman generaciones. Las características químicas (tipo de átomos y enlaces) que dan lugar a estas ramificaciones son las que determinan el tipo de dendrímero o la nomenclatura general que se le atribuye a esa familia de polímeros. Por ejemplo, cuando estas ramificaciones son grupos de poliamidoamina, los dendrímeros se conocen como PAMAM, independientemente de la molécula que forme el *core*.

Como se mencionó, se han sintetizado diversos tipos de dendrímeros, pero los más estudiados son los dendrímeros PAMAM, PPI, de poli-L-lisina (PLL), de poliéster, de poliglicerol, de triazina, los fosfodendrímeros y los glicodendrímeros (Figura 1.24) ^{2,58}.

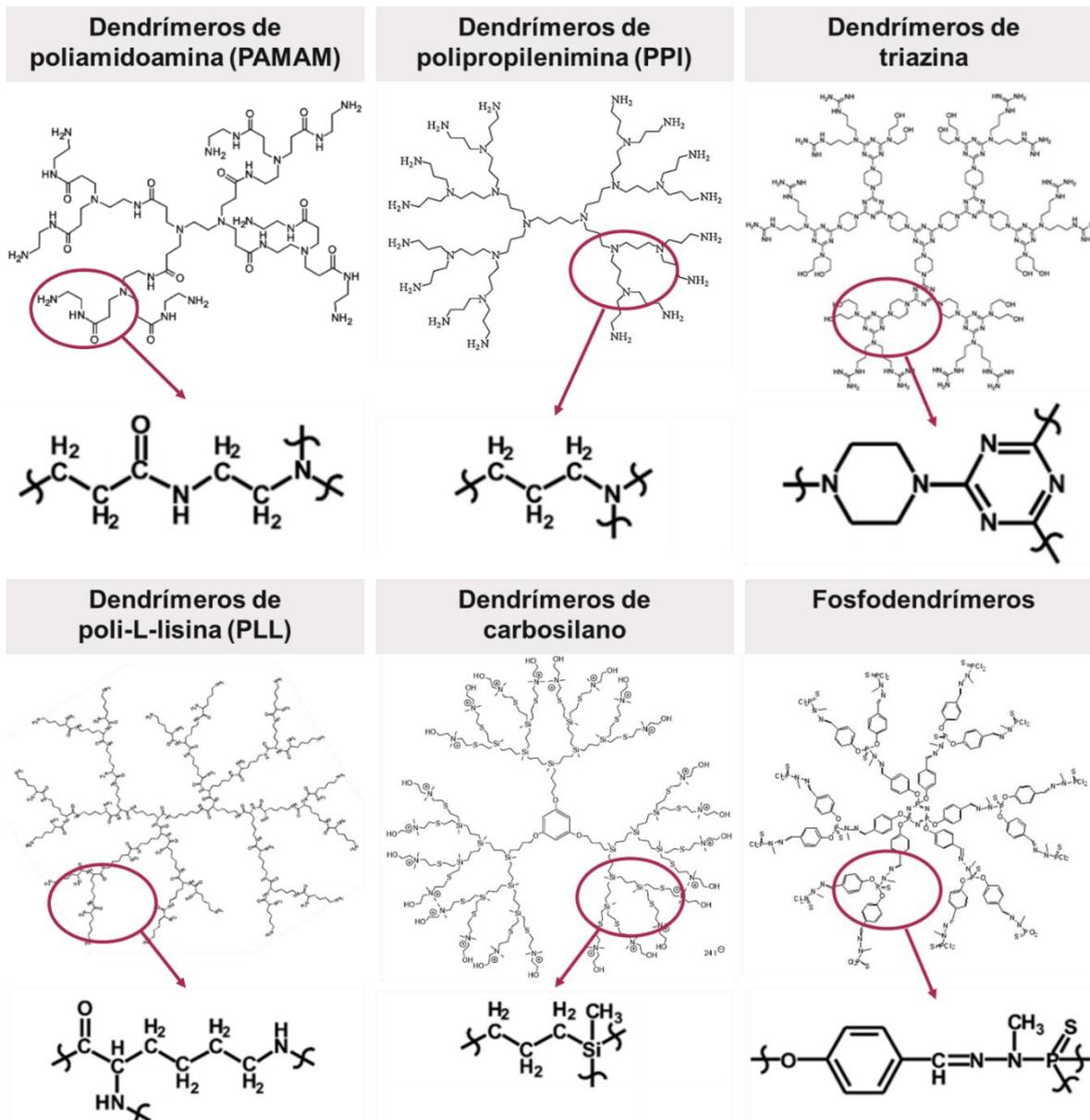


Figura 1.24 – Clasificación del tipo de dendrímero según sus ramificaciones. Se presentan algunos ejemplos de dendrímeros y la estructura química de sus ramificaciones.

Nuevamente, a medida que se incrementa la generación del dendrímero, se incrementa el número de ramificaciones, el tamaño, la cantidad de grupos superficiales, la cantidad de grupos internos, la forma esférica y la densidad de empaquetamiento (interna y superficial). Tanto la generación (cantidad de ramificaciones), como la química de la unidad repetitiva que se utilizó para generar las ramificaciones serán determinantes de las propiedades funcionales del dendrímero.

1.3.3.3 Grupos superficiales

En la superficie de los dendrímeros se encuentran los grupos terminales, cuyas características químicas, junto con las del *core* y las ramificaciones, terminarán de determinar las propiedades particulares de cada dendrímero. Por ejemplo, estos grupos superficiales son los que determinan la solubilidad de los dendrímeros y su carga en distintas condiciones de pH ⁵⁸. Debido al método controlado de síntesis, una misma familia de dendrímeros puede obtenerse con distintos grupos terminales. En general, los grupos más utilizados son aldehído, alcohol, amina primaria, ácido carboxílico, ácido succínico y aminoetanol (**Figura 1.25**), lo que permite clasificar a los dendrímeros en aniónicos, catiónicos o neutros a pH fisiológico ⁸⁷.

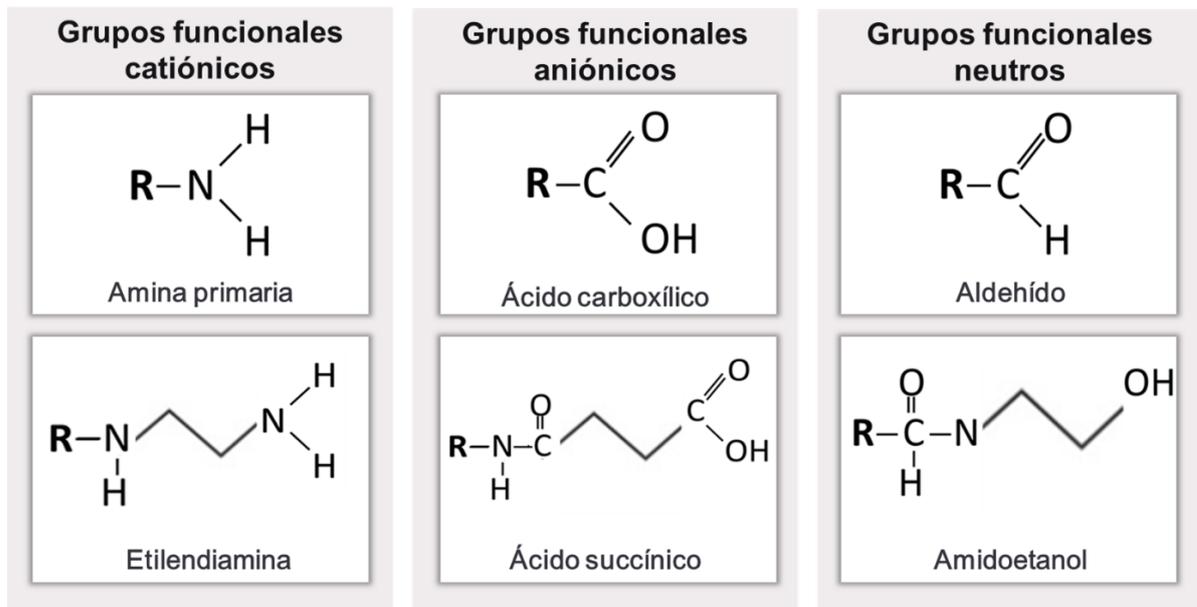


Figura 1.25 – Clasificación de los dendrímeros según sus grupos funcionales terminales. Se presentan ejemplos de grupos terminales que dan lugar a dendrímeros catiónicos, aniónicos o neutros a pH fisiológico.

Modificando los tres dominios de la arquitectura de los dendrímeros (*core*, ramificaciones y grupos terminales), se pueden diseñar y sintetizar dendrímeros para propósitos específicos, como dendrímeros con propiedades anti-virales o anti-bacterianas, o dendrímeros para transportar drogas a sitios particulares. La modificación de los grupos superficiales permite tanto seleccionar las características de carga y funcionalidad del dendrímero, como la adición de moléculas de reconocimiento o de moléculas bioactivas (drogas); mientras que la modificación de la generación permite determinar la proximidad entre los grupos superficiales y la conformación del dendrímero.

1.3.4 Aplicaciones de los dendrímeros

Las características únicas de esta clase de nanomateriales permiten su aplicación en múltiples y diversos campos del conocimiento, como la biomedicina, la química, las ciencias biológicas, la ciencia de los materiales, la ingeniería y la electrónica ⁸². Por ejemplo, en el área de la electrónica, los dendrímeros se han utilizado para diseñar sensores ópticos, *displays* y dispositivos de recolección de luz ⁸⁵. Particularmente en el campo de la nanomedicina, las características determinantes de la utilización de los dendrímeros son ^{97,100}:

- Arquitectura simétrica, estable y bien definida.
- Tamaño monodisperso y controlado en el rango de los nanómetros.
- Estructura ramificada multivalente y multifuncional.
- Grupos superficiales de tipo, carga y cantidad controlada.
- Relación área/volumen extremadamente alta.
- Gran reactividad química y solubilidad en agua.
- No modifican significativamente la viscosidad de la suspensión, en comparación con los polímeros lineales del mismo peso molecular.
- Estructura multifuncional que permite la interacción cooperativa de varias sustancias a la vez (o de una sustancia y membranas biológicas).
- La formación de bolsillos internos permite su utilización como encapsuladores de moléculas.

Dichas características dieron lugar a la aplicación de los dendrímeros como ¹⁰¹⁻¹⁰⁵:

- Sistemas de *delivery* de drogas (nanotransportadores de drogas).
- Sistemas de *delivery* de genes (terapia génica *in vivo* y transfección *in vitro*). Dos productos basados en dendrímeros ya se encuentran en el mercado como agentes de transfección *in vitro*: PolyFect® y Superfect®.
- Aditivos en la industria farmacéutica (como adyuvantes en vacunas) y cosmética (como potenciadores de la penetración en sistemas tópicos).
- Agentes de contraste (imágenes medicinales y diagnóstico temprano).
- Agente fotodinámicos (terapia fotodinámica y fototérmica).
- Agentes con acción catalítica.
- Agentes en inmunoensayos. Dos productos basados en dendrímeros se encuentran en el mercado: Stratus® para la detección de biomarcadores cardíaco y Alert Ticket® para la detección de ántrax.

A continuación nos centraremos en las características de los dendrímeros que los convirtieron en nanomateriales ideales para aplicaciones en nanotecnología farmacéutica.

1.3.5 Dendrimeros como proteínas artificiales

Muchas veces se han referido a los dendrimeros como proteínas artificiales, debido a sus dimensiones nanométricas, monodispersidad y otras propiedades biomiméticas ¹⁰⁶. Estas propiedades de los dendrimeros han llevado a que los mismos sean utilizados como reemplazo de proteínas en técnicas de inmunodiagnóstico y aplicaciones de expresión genética *in vitro* ⁸⁸. Sobre todo los dendrimeros PAMAM están estrechamente emparentados en tamaño y forma con muchas proteínas globulares importantes (**Figura 1.26**); por ejemplo los dendrimeros PAMAM G3.0, G4.0 y G5.0 son de aproximadamente el mismo tamaño y forma que la insulina (3 nm), el citocromo C (4 nm) y la hemoglobina (5,5 nm), respectivamente. Del mismo modo, los dendrimeros G5.0 y G6.0 tienen diámetros equivalentes a la bicapa lipídica de las membranas biológicas. Por otro lado, los dendrimeros PAMAM G7.0 a G10.0 presentan forma y tamaño similar a las histonas, proteínas capaces de formar complejos estables con el DNA, lo que explica la extraordinaria estabilidad de los complejos DNA-PAMAM y su utilización como sistemas de *delivery* genético ^{86,88,107}.

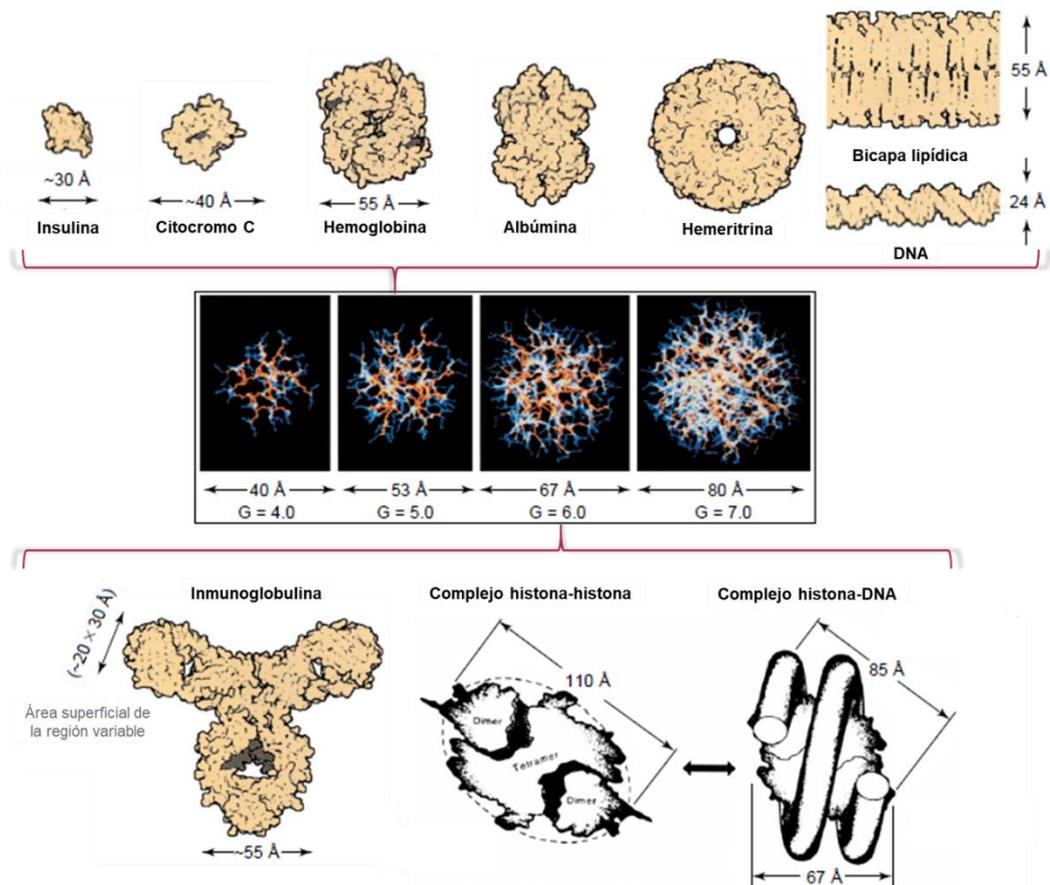


Figura 1.26 – Comparación del tamaño de los dendrimeros PAMAM con proteínas globulares y otros componentes celulares. Modificada de ⁸⁸.

Además de por su tamaño, las características químicas de las ramificaciones de los dendrimeros PAMAM permitirían considerarlos como derivados oligoméricos del aminoácido β -alanina ¹⁰⁸. Si

bien existen muchas similitudes, es importante resaltar las diferencias. Las proteínas globulares son estructuras terciarias resultado del plegado de estructuras lineales, que tienen, en general, interiores densamente empaquetados y superficies con dominios de funcionalidad y polaridad diferentes (algunas zonas hidrofóbicas y otras hidrofílicas). Por su parte, los dendrímeros presentan formas globulares debido a su estructura ramificada, pero su interior suele no estar densamente empaquetado sino que posee bolsillos internos acuosos y su superficie es homogénea con propiedades definidas por el tipo de grupo terminal ⁸⁶.

1.3.6 Dendrímeros como nanotransportadores de drogas

Un área de gran interés es el estudio de la interacción entre drogas y dendrímeros ⁸⁵. Particularmente, los dendrímeros han demostrado incrementar la solubilidad, estabilidad y biodisponibilidad de las drogas con las que interactúan ⁸². Asimismo, modifican el perfil de liberación de las drogas, por ello se han convertido en una plataforma interesante para el desarrollo de sistemas de *delivery*. Los dendrímeros aportan propiedades únicas a este campo, ya que tienen características relevantes como polidispersidad mínima, estructura de superficie definida, elevada solubilidad en agua y tamaño muy pequeño y controlado en el rango de nanómetros ^{86,97,100,109}. El perfecto sistema de *delivery* de drogas basado en dendrímeros debería aumentar la solubilidad de la droga en agua (con una elevada capacidad de carga), aumentar la estabilidad de la droga en el tiempo, presentar baja o nula toxicidad, ser biodegradable, presentar características favorables de retención y biodistribución en el organismo, y no ser inmunogénico ⁵⁸.

Los mecanismos por los cuales los dendrímeros pueden solubilizar las drogas, estabilizarlas y actuar como nanotransportadores se han clasificado (**Figura 1.27**) como:

- **Conjugación:** la interacción dendrímero-droga está mediada por enlaces covalentes entre la droga y la superficie y/o el interior de los dendrímeros. Los conjugados dendrímero-droga se obtienen por reacción química, por lo que sus características dependerán del método de conjugación. La unión de la droga puede ocurrir directamente al dendrímero o a través de una molécula que actúa como *linker*.
- **Complejación:** la interacción dendrímero-droga es de tipo no covalentes, pudiendo involucrar interacciones electrostáticas, de puente de hidrógeno, hidrofóbicas o de *van der Waals*. En los complejos dendrímero-droga el tipo de interacción establecida dependerá de las características del dendrímero (generación y tipo de *core*, de ramificaciones y de grupos superficiales), de las características de la droga y de las condiciones fisicoquímicas del medio (pH, temperatura, fuerza iónica, tipo de solvente, entre otras). Se han diferenciado dos tipos de mecanismos de complejación dependiendo del sitio donde ocurra la interacción, según:

- Encapsulación dentro de la arquitectura del dendrímero: las drogas se incorporan en los bolsillos internos de los dendrímeros.
- Anclaje en la superficie de los dendrímeros: las drogas interactúan con los grupos terminales de los dendrímeros.

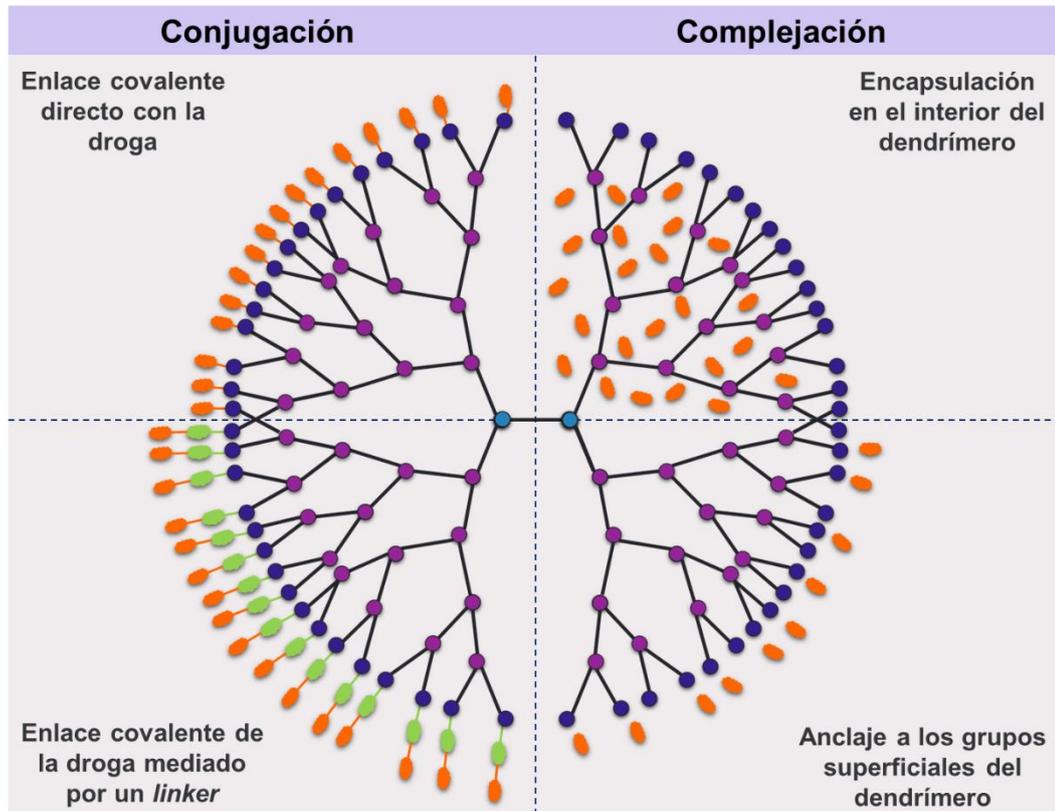


Figura 1.27 – Mecanismos de interacción entre drogas y dendrímeros. Los mecanismos se dividen en conjugación (mediados por enlaces covalentes) y complejación (mediados por interacciones no covalentes) dentro de los bolsillos internos y/o en la superficie del dendrímero.

1.3.6.1 Conjugación de drogas y ligandos

La superficie de los dendrímeros brinda una gran cantidad de grupos funcionales para la unión covalente de las moléculas de droga de interés y, además, de otra variedad de ligandos específicos. Asimismo, los grupos internos de los dendrímeros pueden actuar como sitios de conjugación, pero las reacciones químicas necesarias son más complejas que para modificar los grupos superficiales expuestos.

La unión covalente al dendrímero se puede realizar directamente a su estructura, o se puede establecer a través de *linkers* con propiedades particulares. Por ejemplo, *linkers* biodegradables o *linkers* hidrolizables en el sitio-específico de acción, lo que ofrece la oportunidad de mejorar el perfil de liberación de las drogas ^{85,110}.

Los dendrímeros PAMAM se han utilizado para generar conjugados con diversas moléculas de drogas, entre ellas: ibuprofeno, propranolol, metotrexato, dexametasona, paclitaxel, cisplatino, penicilina y venlafaxina ^{87,109,111}. En estos trabajos se reflejan las potencialidades del uso de conjugados dendrímero-droga para aumentar la solubilidad en agua y la estabilidad química de las moléculas de droga.

Además, los dendrímeros PAMAM se han modificado con una multiplicidad de otras moléculas, tales como ligandos de receptores de membrana celular, modificadores de la solubilidad, moléculas que reducen la interacción con macromoléculas del sistema inmunológico y marcados radiactivos, entre otras. La molécula más utilizada en bibliografía para modificar la superficie de los dendrímeros es el ácido fólico, debido a que los receptores de folato se sobreexpresan en la membrana plasmática de las células cancerígenas; por lo tanto, se espera que los dendrímeros modificados con folato funcionen como *delivery* selectivo de drogas al interior de las células tumorales ¹¹². Por otro lado, los hidratos de carbono constituyen otra clase importante de moléculas de reconocimiento biológico que se han utilizado para modificar la superficie de los dendrímeros. Específicamente, para que la unión entre los oligosacáridos y sus receptores de membrana pueda concertarse, los ligandos deben estar presentes formando clústeres, por lo tanto la superficie de los dendrímeros podría funcionar como plataforma óptima para tales presentaciones ¹¹³. Por ejemplo, se han utilizado multiplicidad de glicodendrímeros como agentes de diagnóstico o en la generación de vacunas ¹¹⁴.

1.3.6.2 Complejación de drogas

La complejación de drogas en los dendrímeros puede ocurrir por dos mecanismos: encapsulación en sus bolsillos internos y/o anclaje en sus grupos superficiales. La encapsulación involucra interacciones no covalentes con la estructura interna de los dendrímeros; mientras que el anclaje requiere de la interacción no covalente con los grupos superficiales ⁸⁵.

Los factores que modifican la capacidad de los dendrímeros para actuar como complejadores de drogas incluyen cuestiones relacionadas con el dendrímero en sí (generación, naturaleza de la superficie del dendrímero, de las ramificaciones y del *core*, y concentración) o con el medio (pH de la solución, naturaleza del solvente, presencia de sales y temperatura) ¹¹⁵.

En primer lugar, la capacidad de encapsulación de moléculas en el interior dependerá de la generación del dendrímero. Como se mencionó anteriormente, las generaciones pequeñas (<G3.5) son estructuras abiertas incapaces de retener moléculas de droga, mientras que en las generaciones grandes (>G7.0) el congestionamiento de grupos superficiales no permite el ingreso de moléculas al interior. Por lo tanto, las generaciones G4.0 a G6.5 serían las indicadas para

incorporar moléculas en su interior, debido a que poseen una estructura semi-rígida con cavidades internas acuosas ⁵⁸.

En segundo lugar, la presencia de cavidades internas está íntimamente relacionada con el estado conformacional del dendrímero, lo que depende de las condiciones del medio (como pH, fuerza iónica y tipo solvente) y las características químicas del dendrímero (pKa de sus grupos funcionales, hidrofobicidad de los bolsillos, impedimentos estéricos de la superficie y rigidez de sus ramificaciones). Se ha descrito que, dependiendo de las condiciones en que se encuentran, los dendrímeros podrían adoptar diferentes conformaciones que producirían cambios en el empaquetamiento de sus grupos internos y terminales. Por ejemplo, los dendrímeros PAMAM de generación completa (como los DG4.0) exhiben conformaciones abiertas a bajo pH debido a la repulsión electrostática entre las aminas terciarias internas y las aminas primarias externas, ambas protonadas, lo que rigidiza las ramas del dendrímero y las fuerza a alejarse del interior. Por otro lado, a pH básico, las ramas se retraen como consecuencia de los puentes de hidrógeno entre las aminas terciarias del interior y las aminas primarias de la superficie, ambas desprotonadas, proceso que se conoce como *back-folding* y resulta en una estructura compacta (**Figura 1.28**) ¹¹⁶. En concordancia con el estado de protonación, se ha demostrado que el agua tiene capacidad para ingresar a los dendrímeros y dicha capacidad es dependiente del pH ⁹⁰. Estos cambios conformacionales relacionados con el pH dependen del pKa de los grupos terminales y de los grupos del interior del dendrímero. Por ello, los dendrímeros PAMAM de generaciones intermedias (como los DG4.5 con grupos carboxílicos terminales), muestran conformaciones abiertas tanto a pH ácido como básico, pero una estructura más compacta a pH fisiológico (**Figura 1.28**).

En tercer lugar, la polaridad y la pureza del solvente afecta la conformación de los dendrímeros debido al proceso de *back-folding* de los grupos terminales ¹¹⁷. Particularmente, a una menor capacidad de solvatación del medio, mayor *back-folding* de los dendrímeros. En estudios de resonancia magnética nuclear se observó que dendrímeros polares en solventes no polares tienen mayores interacciones intra- e inter-moleculares, lo que resulta en un interior compacto y en la agregación de los dendrímeros ⁹⁰, mientras que en solventes polares tienen una estructura abierta. Estos cambios conformacionales dependiendo del solvente serán inversos en el caso de dendrímeros no polares.

En cuarto lugar, los dendrímeros pueden modificar la solubilización de las drogas de manera concentración-dependiente; se ha demostrado que al aumentar la concentración de dendrímero se incrementa la concentración de droga de manera lineal ¹¹⁸⁻¹²⁰.

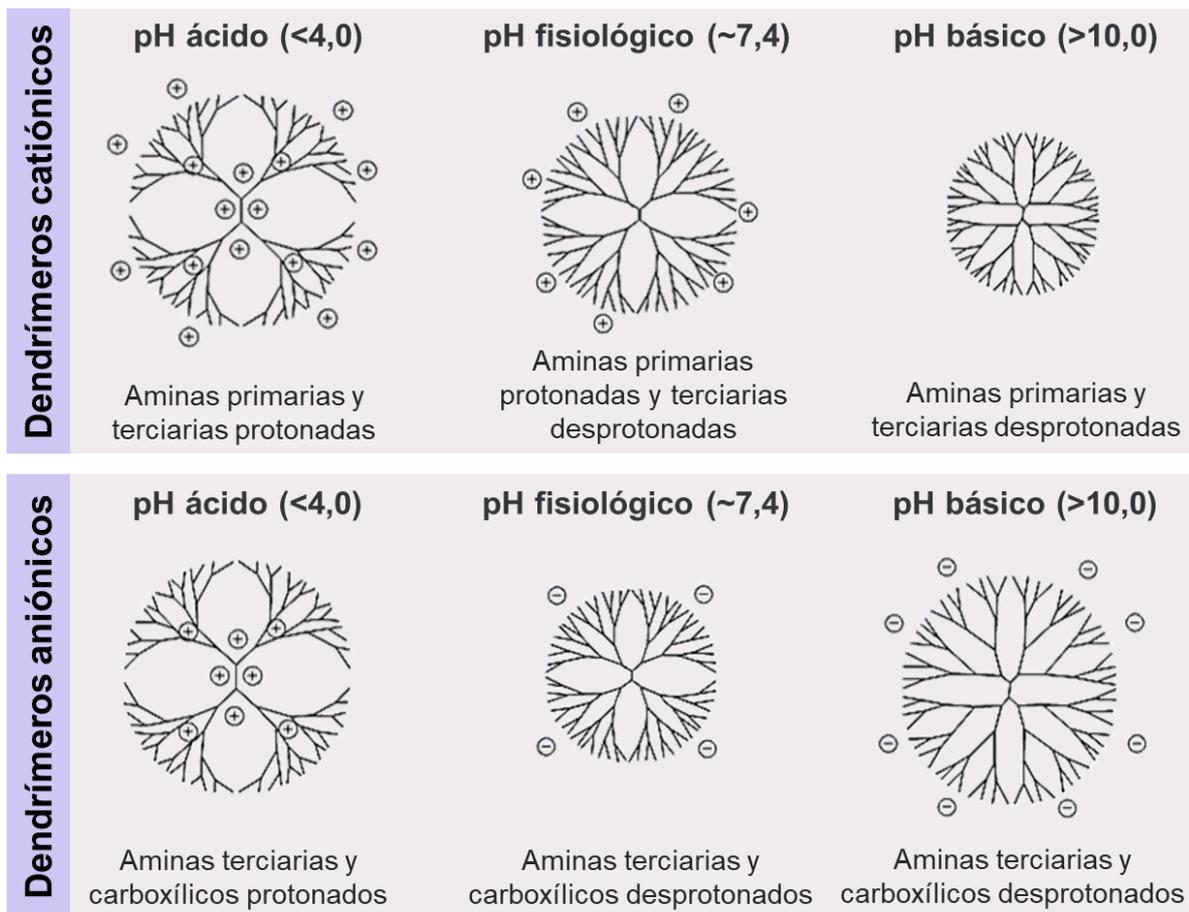


Figura 1.28 – Conformación estructural de los dendrímeros PAMAM en función del pH. El estado de protonación de los grupos funcionales internos y terminales depende del pH. La conformación de los dendrímeros depende del estado de protonación de dichos grupos.

Si bien el número de moléculas de drogas que se pueden encapsular en los dendrímeros está restringida por el tamaño y conformación de los bolsillos internos, la capacidad de carga se ve drásticamente incrementada si se pueden formar complejos por interacción con los grupos superficiales de los dendrímeros. Por ejemplo, los dendrímeros PAMAM G4.0 con *core* de EDA tienen 64 grupos amina primaria terminales con carga positiva a pH fisiológico, que podrían interactuar con moléculas de drogas que presenten carga negativa en dichas condiciones; mientras que los dendrímeros PAMAM G4.5 con *core* de EDA tienen 128 grupos carboxílicos terminales con carga negativa a pH fisiológico, que podrían interactuar con moléculas de droga que presenten carga positiva. Obviamente, las interacciones electrostáticas establecidas entre los grupos terminales de los dendrímeros y las moléculas de droga dependerán del pH del medio y del pKa de los grupos ionizables.

Gracias a sus propiedades como complejadores de drogas, los dendrímeros en general han sido utilizados como solubilizadores y estabilizadores de bioactivos con diferentes enfoques terapéuticos, por ejemplo como nanotransportadores de compuestos anti-cáncer, anti-malaria, anti-

virales, anti-tuberculosis, anti-microbianos, anti-inflamatorios, anti-hipertensivos, entre otros ⁹⁷. En particular, los dendrímeros PAMAM se han utilizado para complejar diversas moléculas de drogas, entre ellas: indometacina, metotrexato, doxorubicina, ibuprofeno, SN-38, 5-fluorouracilo, nadifloxacina, nitrato de pilocarpina, flurbiprofeno, naproxeno, indometacina, ketoprofeno, piroxicam, tamsulosina, aceclofenaco, amfotericina B, haloperidol y risperidona ^{87,115,121}. En estos trabajos se resalta la capacidad de los dendrímeros de complejar drogas, aumentando su solubilidad y su estabilidad en medios acuosos, sin la necesidad de reacciones químicas entre la droga y el nanotransportador que podrían modificar las propiedades particulares de cada uno.

1.3.7 Dendrímeros como nanodrogas

Los dendrímeros han sido estudiados como drogas *per se*, debido a sus propiedades antibacterianas, anti-priones, anti-virales, anti-coagulantes, anti-oxidantes, anti-inflamatorias, y anti-agregación de proteínas, entre otras. Estas propiedades se han estudiado y revisado extensamente ^{109,122-124}.

Los dendrímeros anti-bacterianos poseen, en general, grupos catiónicos en su superficie, como grupos aminas o tetralquilamonio. Esta carga positiva les permite interactuar con las membranas bacterianas aniónica y dañarla, causando la lisis bacteriana ^{125,126}. Por ejemplo, los dendrímeros PPI con grupos tetralquilamonio en la superficie han demostrado ser potentes agentes antibacterianos contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas ¹²⁷, mientras los dendrímeros PLL con grupos manosil superficiales fueron eficientes inhibidores del crecimiento de *E. Coli* ¹²⁸. Por otro lado, Calabretta y col. (2007) demostraron que los dendrímeros PAMAM G5.0 fueron tóxicos contra *P. aeruginosa* y *S. aureus* de manera concentración dependiente ¹²⁹. Recientemente, Holmes y col. (2019) observaron que mientras los dendrímeros PAMAM catiónicos presentaron efectos anti-microbianos generación-dependiente, los dendrímeros PAMAM aniónicos no actuaron como anti-microbianos, presumiblemente debido a que no interaccionan con la membrana bacteriana ¹³⁰. Estos mismos autores demostraron que los dendrímeros PAMAM catiónicos fueron más efectivos contra bacterias Gram-negativas (como *E. coli*) que Gram-positivas (*S. aureus*).

Por otro lado, los dendrímeros con propiedades anti-virales poseen grupos aniónicos en su superficie, como sulfonatos o ácido siálico. Esta carga negativa les permite interactuar con los virus y competir en el proceso de fijación del virus a la superficie celular. Se ha reportado que dendrímeros de PLL modificados con grupos naftol o sulfonato en la superficie inhibieron la propagación *in vitro* del virus herpes simple, al impedir la entrada del virus a las células y su posterior replicación ¹³¹. Del mismo modo, dendrímeros PAMAM modificados con naftol-sulfonato mostraron efectos similares contra el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) ¹³². La empresa australiana Starpharma ha desarrollado el producto VivaGel ®, un gel de carbopol cuyo

componente activo son dendrímeros polianiónicos con un *core* de bencilhidramina-amida-lisina y 32 grupos naftaleno-disulfonato superficiales ¹³³, y han demostrado que estos dendrímeros se unen a la proteína gp120 del VIH e impiden su fijación a los receptores CD4 celulares, por lo que previene/reduce la transmisión sexual del VIH y de otras enfermedades virales de transmisión sexual. Este producto fue aprobado por la FDA en 2008 para su empleo en humanos; desde entonces ha demostrado ser eficiente además contra la propagación de los virus de herpes simple y de la hepatitis B, y contra la bacteria que produce clamidia ¹¹¹.

Además, se ha reportado que los dendrímeros pueden actuar como inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), propiedad con implicancia directa en el tratamiento de la EdA. Particularmente, Klajnert y col. (2004) estudiaron el efecto de dendrímeros PAMAM G4.0 sobre la actividad de la AChE en membranas de glóbulos rojos, demostrando que los dendrímeros catiónicos inhibieron a la enzima ¹³⁴. Los autores propusieron que la inhibición ocurrió por dos procesos concomitantes: los dendrímeros se unen directamente a la enzima y modifican su estructura, impidiendo su acción catalítica, y los dendrímeros se unen a la membrana de los glóbulos rojos, generando cambios conformacionales en todas las enzimas transmembrana. Sin embargo, Shcharbin y col. (2006) estudiaron los efectos de los dendrímeros PAMAM G3.5 y G4.0 sobre la AChE comercial (en condiciones de no membrana), y los dendrímeros efectivamente redujeron la actividad enzimática de modo concentración-dependiente. En este trabajo, se confirmó que los dendrímeros catiónicos y aniónicos se unen a la enzima y modifican su estructura, actuando como inhibidores no competitivos ¹³⁵.

Por otro lado, también relacionado con la etiología y progresión de la EdA, los dendrímeros se han estudiado *in vitro* e *in vivo* en modelos animales por sus propiedades intrínsecas para prevenir la agregación y fibrilación de las proteínas A β , PrP y α -sinucleína ². Por ejemplo, Wasiak y col. (2012 y 2015) demostraron que fosfodendrímeros de G3.0 y G4.0 con grupos terminales catiónicos impidieron la formación de fibras a partir de monómeros de A β 28 y de Tau (ambos relacionados con la etiología de la EdA) ^{136,137}. Por su parte, estudios realizados por Klajnert y col. (2006) han demostrado la capacidad de los dendrímeros PAMAM G3.0, G4.0 y G5.0 para impedir la agregación y formación de estructuras fibrilares amiloides a partir del péptido A β 28 y del péptido PrP (relacionado con enfermedades priónicas). En estos estudios también demostraron que los dendrímeros PAMAM pueden interactuar con las proteínas amiloides combinando dos estrategias de inhibición de la fibrilación: la unión a las proteínas directamente, impidiendo la formación de nuevas fibras, y la unión a fibras pre-existentes, favoreciendo la ruptura de las mismas e impidiendo su crecimiento ¹³⁸. En esta misma línea, Patel y col. (2007) estudiaron la acción de los dendrímeros PAMAM G3.0 y G4.0 con grupos de ácido siálico terminales, demostrando que los mismos atenuaron la toxicidad inducida por el péptido A β en cultivo celular ¹³⁹. Finalmente, Milowska y col.

(2011) estudiaron los efectos de los dendrímeros PAMAM G3.5 y G4.0 sobre la formación de fibras α -sinucleína, y observaron que solo los dendrímeros catiónicos presentaron un efecto inhibitor de la fibrilación ¹⁴⁰.

Sumado a las características mencionadas, se ha demostrado que los dendrímeros PAMAM poseen propiedades anti-inflamatorias ¹⁴¹. Chauhan y col. (2009) reportaron que los dendrímeros PAMAM G4.0 presentaron actividad anti-inflamatoria en cultivo celular, incluso en mayor medida que la droga indometacina ¹⁴². Por otro lado, Neibert y col. (2013) demostraron las propiedades anti-inflamatorias de los dendrímeros PAMAM G0 y G1.0 en células de microglia estimuladas con lipopolisácarido; cuyos resultados sugieren que estos dendrímeros podrían actuar como inhibidores de las enzimas óxido nítrico sintasa y la ciclooxigenasa-2, ambas mediadoras del proceso inflamatorio ¹⁴³.

De aquí la importancia de considerar a los dendrímeros PAMAM no solo como sistemas de *delivery* de drogas sino como fármacos terapéuticos *per se*, que podrían ser utilizados en el tratamiento de la EdA o como potenciadores de los tratamientos pre-existentes en la generación de terapias combinadas, por sus propiedades anti-AChE, anti-agregación de proteínas y anti-inflamatorias.

1.3.8 Toxicidad de los dendrímeros

Debido a su tamaño nanométrico, los dendrímeros pueden interaccionar con los componentes celulares, como la membrana plasmática, las organelas (endosomas, mitocondrias, núcleo) y las proteínas (como enzimas o receptores de membrana), así como con el resto de los componentes celulares que también tienen un tamaño nanométrico. Es decir que pueden tener una interacción no-selectiva, lo que los hace potencialmente tóxicos ⁸².

Particularmente en el caso de los dendrímeros PAMAM, la gran densidad de grupos superficiales (1 grupo amino/nm² para los DG4.0 y 1,6 grupos carboxílicos/nm² para los DG4.5) combinado con su pequeño tamaño (4,5 y 5 nm, respectivamente) da lugar a una elevada relación área/volumen, lo que les confiere una capacidad inusual para establecer interacciones superficiales con las membranas celulares. Además, los dendrímeros PAMAM no solo interaccionan con los lípidos de las membranas sino que también pueden modificar la conformación de las proteínas e interactuar con otros componentes celulares, por lo que es fundamental estudiar sus efectos tóxicos en distintos sistemas biológicos.

En este trabajo propusimos que un análisis completo de la nanotoxicidad debería incluir instancias del estudio *ex vivo*, *in vitro* e *in vivo*, por lo que nos centraremos en recuperar la información acerca del efecto de los dendrímeros PAMAM en los tres sistemas mencionados.

1.3.8.1 Toxicidad *ex vivo* en glóbulos rojos

En general, los efectos deletéreos sobre los glóbulos rojos se realizan a partir de la cuantificación de hemoglobina liberada en función del tipo de nanopartícula, la concentración y el tiempo de incubación. Utilizando estos estudios, se ha demostrado que los dendrímeros catiónicos PAMAM, PPI y PLL causan hemólisis de manera generación-dependiente ⁷⁰. Particularmente, Malik y col. (2000) hallaron que todos los dendrímeros PAMAM catiónicos (excepto G1) en concentraciones mayores a 1 mg/mL producen hemólisis de modo generación-dependiente luego de 1 h de incubación; mientras que los dendrímeros PAMAM aniónicos (G3.5 a G9.5) no produjeron efectos hemolíticos incluso en concentraciones de 2 mg/mL ¹⁴⁴. Por su parte, Bhadra y col. (2003) y Asthana y col. (2005) también reportaron efectos hemolíticos en concentraciones superiores a 1 mg/mL para los dendrímeros catiónicos ^{145,146}. Sumado a ello, Domanski y col. (2004) observaron que luego de 1 h de incubación a concentraciones no hemolíticas de 10 µg/mL, los dendrímeros PAMAM catiónicos dieron lugar a agregados de glóbulos rojos con apariencia redondeada, debido a su capacidad para deformar membranas y de actuar como entrecruzantes (**Figura 1.29**) ¹⁴⁷.

Además de causar hemólisis de los glóbulos rojos, los tratamientos con elevadas concentraciones de dendrímeros catiónicos han reportado cambios en la morfología de los glóbulos blancos, el nivel de hemoglobina total, hematocrito y hemoglobina corpuscular. Cabe destacar que hasta el momento, los dendrímeros no mostraron tener efectos inmunotóxicos.

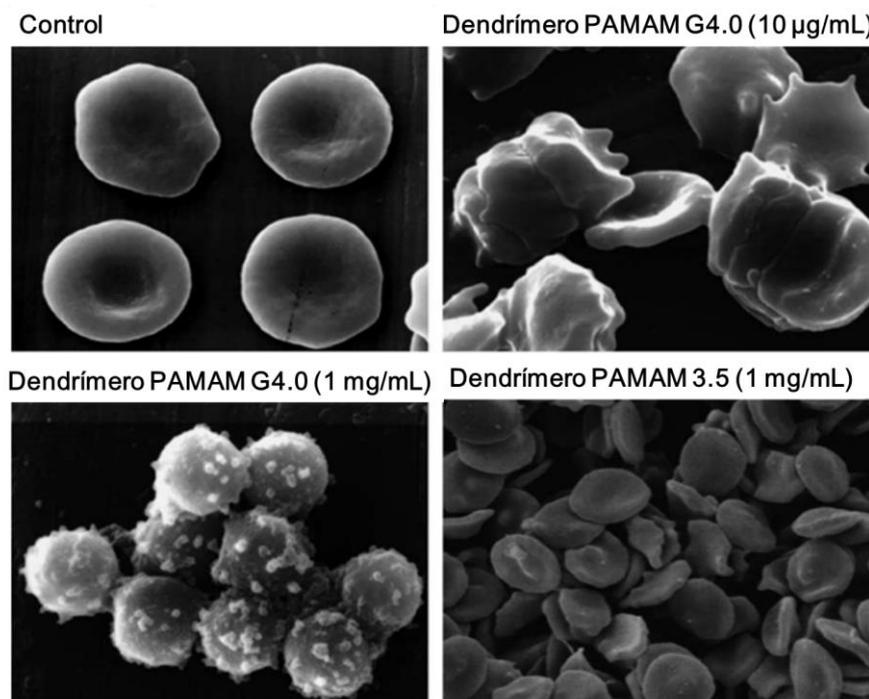


Figura 1.29 – Efectos de los dendrímeros en los glóbulos rojos humanos. Se presentan micrografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido de glóbulos rojos tratados por 1 h con dendrímeros PAMAM G3.5 y G4.0. Imagen tomada de ⁷⁰.

1.3.8.2 Toxicidad *in vitro* en cultivo celular

Existen numerosos trabajos en donde se estudiaron los efectos tóxicos *in vitro* de los dendrímeros, utilizando diferentes líneas celulares, tiempos de incubación y métodos de detección. Debido a que estos efectos se encuentran extensamente revisados ^{70,148}, solo presentaremos las conclusiones principales que se desprenden de un análisis global:

- Los dendrímeros catiónicos muestran una toxicidad concentración- y generación-dependiente (a mayores generaciones y concentraciones de dendrímero, mayores efectos tóxicos).
- Los dendrímeros catiónicos de generación igual o mayor G7.0, tienen la capacidad de formar hoyos en las membranas celulares, de 15-40 nm, lo que produce la liberación de contenido intracelular y consecuente efecto tóxico irreversible; mientras que los dendrímeros de generación igual o menor a G5.0, solo pueden expandir hoyos de los defectos pre-existentes y sus efectos son reversibles.
- Los dendrímeros aniónicos y neutros no presentan efectos tóxicos en concentraciones equivalentes a las que los dendrímeros catiónicos si son tóxicos. Esto da un inicio de que la toxicidad de los dendrímeros es fuertemente dependiente del tipo de grupo funcional terminal.
- La toxicidad de los dendrímeros depende del *core*. En las generaciones pequeñas, donde el *core* se encuentra más accesible a las células, se ha observado que la naturaleza del mismo modifica el perfil de toxicidad.
- La toxicidad de los dendrímeros depende del tipo de dendrímero (es decir, de sus ramificaciones). Se ha demostrado que para una misma generación y tipo de grupo terminal, los dendrímeros de distinto tipo presentan patrones diferenciales de toxicidad.

Es de interés resaltar que los efectos tóxicos de los dendrímeros no solo estarán mediados por su capacidad de interaccionar con las membranas celulares, sino también por su capacidad de ingresar a las células a través de distintas vías y por la ruta intracelular de transporte y exocitosis que realice. Diversos trabajos sugieren que los dendrímeros pueden ingresar a las células por vías endocíticas y hacer transcitosis a través del tejido epitelial ^{149,150}. Profundizando estos estudios, Perumal y col. (2008) reportaron que los dendrímeros aniónicos suelen ser capturados por endocitosis mediada por caveolina, mientras que los catiónicos y neutros por un mecanismo independiente de caveolina ¹⁵¹. Recientemente, Zhang y col. (2016) estudiaron en detalle la captación, el tráfico intracelular y la exocitosis de dendrímeros PAMAM G4.0 en células de cáncer de mama (MCF-7/ADR). Según los resultados obtenidos por este grupo, los mecanismos involucrados en la captación y en el transporte intracelular son los presentados en la **Figura 1.30** ¹⁵². El ingreso a las células ocurriría a través de mecanismos de macropinocitosis, de endocitosis mediada por clatrina y/o por penetración directa. Una vez en el interior de las células, los dendrímeros se transportarían a través de macropinosomas o endosomas hacia los lisosomas,

donde se acumularían. Si la concentración de dendrímeros dentro de los lisosomas no fuera lo suficientemente elevada, la maquinaria lisosomal podría actuar degradando los dendrímeros. Por el contrario, si la concentración en el interior de los lisosomas fuera elevada, los dendrímeros podrían romper la membrana lisosomal y liberarse al citoplasma. Se hipotetizó que, debido al pH ácido de los lisosomas, los dendrímeros catiónicos se protonarían completamente (tanto sus aminas primarias como sus aminas terciarias internas), por lo que actuarían como una esponja de protones generando un desbalance osmótico, que podría culminar en la ruptura de la membrana lisosomal y liberación del dendrímero ¹⁵³. Una vez fuera de los lisosomas, los dendrímeros podrían interactuar con todos los otros componentes celulares o podrían ser transportados al medio extracelular a través de complejos de proteínas transmembrana o de la vía núcleo-vesicular que atraviesa el retículo endoplásmico y complejo de Golgi.

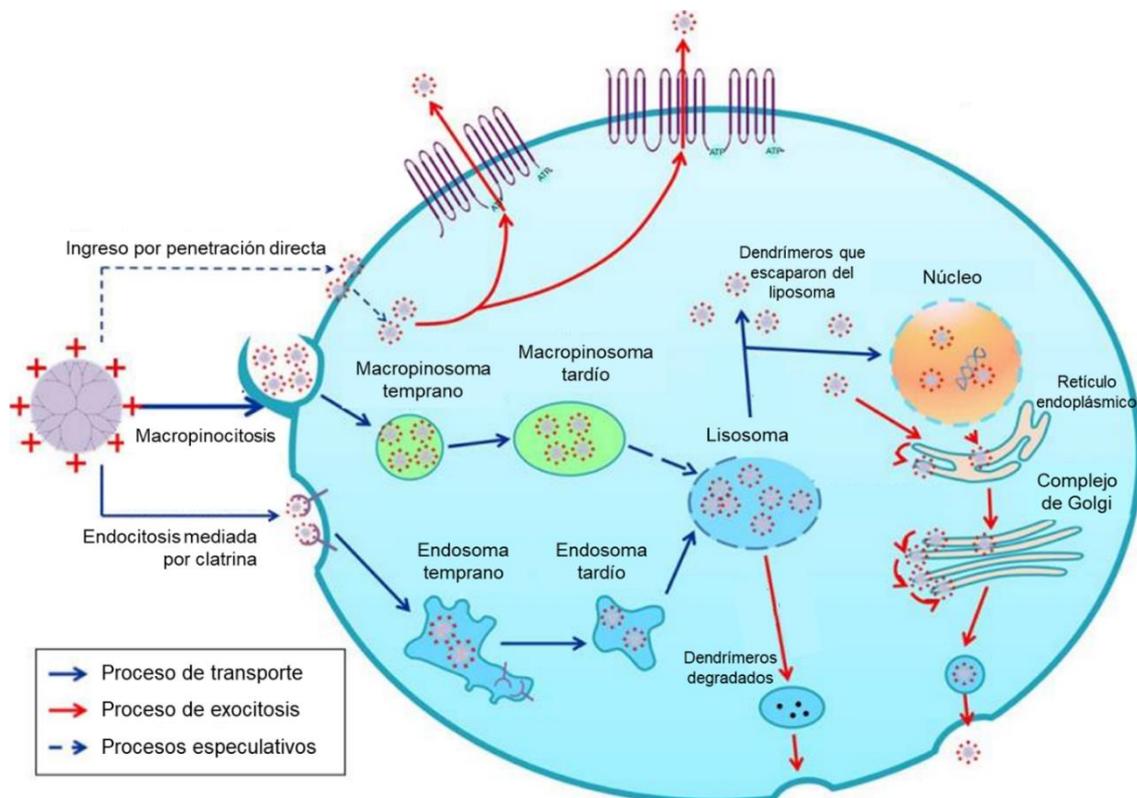


Figura 1.30 – Mecanismos de internalización, transporte y exocitosis de dendrímeros catiónicos. En el diagrama se presentan los procesos de internalización, transporte intracelular y exocitosis confirmados para los dendrímeros catiónicos y también los procesos especulativos. Imagen modificada de ¹⁵².

1.3.8.3 Biocompatibilidad *in vivo* en embriones y larvas de zebrafish

En la actualidad, solo cinco trabajos científicos utilizaron el modelo de *zebrafish* para estudiar la toxicidad de distintos tipos de dendrímeros, cuyos resultados principales se resumen en la **Tabla 1.1**. En los primeros cuatro trabajos se utilizaron embriones de *zebrafish* ^{154–157} y solo en uno de ellos se compararon los efectos sobre embriones y larvas de *zebrafish* ¹⁵⁸. En otros dos trabajos,

se estudió la toxicidad de complejos entre drogas y dendrímeros utilizando larvas de *zebrafish*^{93,94}. Los últimos tres trabajos mencionados corresponden a publicaciones de nuestro grupo de trabajo.

Tabla 1.1 – Estudios de toxicidad de dendrímeros en embriones de *zebrafish*. Se estudiaron los efectos de dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM), de tiofosforilo (fosfodendrímeros) o de polipropilenimina (PPI), con *core* de etilendiamina (EDA), diaminobutano (DAB) o clorato de tiofosforilo (TF). Los embriones, con o sin corion, se expusieron en distintas horas post-fecundación (hpf) y se determinó la concentración que fue letal para el 50% de la población (CL₅₀) luego de distintos tiempos de incubación.

Referencia	Tipo de dendrímero	Core	G	Grupos superficiales		Carga	Peso Molar	Exposición		CL ₅₀ (ppm)			
				Tipo	N°			hpf	corion	24 hpf	48 hpf	72 hpf	120 hpf
Heiden y col. (2007)	PAMAM	EDA	3.5	Carboxilato	64	-	12931	6	+	>2845		>2845	>2845
		EDA	4.0	Amino	64	+	14215	6	+	14,2		8,5	5,7
Oliveira y col. (2014)	PAMAM	EDA	3.0	Amino	32	+	6909	1	+		1,8		
		EDA	4.0	Amino	64	+	14215	1	+		2,3		
Pryor y col. (2014)	Fosfo-dendrímero	TF	0.5	Aldehído	3	0	426	8	+				>250
		TF	1.5	Aldehído	6	0	1422	8	+				>250
		TF	2.5	Aldehído	12	0	3417	8	+				>250
		TF	3.5	Aldehído	24	0	7405	8	+				>250
		TF	5.0	Tiol	48	0	23108	8	+				>250
	PAMAM	DAB	3.0	Amino	32	+	6937	8	+				2
		DAB	4.0	Amino	64	+	14242	8	+				6,4
		DAB	5.0	Amino	128	+	28853	8	+				4,5
		DAB	5.0	Succinato	128	-	41662	8	+				>250
		DAB	6.0	Amino	256	+	58074	8	+				18
		DAB	6.0	Succinato	256	-	83693	8	+				>250
		DAB	6.0	Amidoetanol	256	0	58326	8	+				>250
	Bodewein y col. (2016)	PPI	DAB	3.0	Amino	16	+	1687	1	-	0,6	0,4	
DAB			4.0	Amino	32	+	3514	1	-	1,1	1,0		
DAB			5.0	Amino	64	+	7168	1	-	4,2	2,6		
PAMAM		EDA	3.0	Amino	32	+	6909	1	-	2,6	1,5		
		EDA	3.5	Carboxilato	64	-	12931	1	-	>647	>647		
		EDA	4.0	Amino	64	+	14215	1	-	3,1	2,3		
		EDA	4.5	Carboxilato	128	-	26258	1	-	>1313	>1313		
		EDA	5.0	Amino	128	+	28825	1	-	47,4	16,1		
Calienni y col. (2017)	PAMAM	EDA	4.0	Amino	64	+	14215	1	+	4,8	3,0		
		EDA	4.5	Carboxilato	128	-	26258	1	+	>788	>788		

En Heiden y col. (2007), se expusieron embriones de *zebrafish* de 6 h post-fecundación (hpf) a dendrímeros PAMAM G3.5 y G4.0. Según sus resultados, la toxicidad de los dendrímeros en *zebrafish* depende fuertemente de su grupo terminal (tipo y carga), tal como ocurre en cultivo celular¹⁵⁴. Por otro lado, Oliveira y col. (2014) estudiaron el efecto de dendrímeros PAMAM G3.0 y G4.0, ambos con grupos aminos terminales, en embriones de *zebrafish* de 1 hpf. Este trabajo añade la idea de que además del grupo terminal, la generación del dendrímero juega un rol importante en la toxicidad en *zebrafish*¹⁵⁵. En el trabajo de Pryor y col. (2014), los embriones de *zebrafish* de 8 hpf se expusieron a dendrímeros PAMAM G3.0, G4.0, G5.0 y G6.0 con grupos amino terminales, a dendrímeros PAMAM G5.0 and G6.0 con ácido succínico como grupos terminales, a dendrímeros PAMAM G6.0 con amidoetanol como grupos terminales, a dendrímeros de tiofosforilo G0.5, G1.5, G2.5 and G3.5 con grupos aldehído terminales y a dendrímero de tiofosforilo G5.0 con diclorofosfinotiol como grupo terminal. En este caso, los dendrímeros neutros o aniónicos no causaron efectos letales o subletales en ninguna de las concentraciones testeadas, mientras que los dendrímeros catiónicos causaron mortalidad, cambios en la función cardíaca y presencia de edemas pericardiales¹⁵⁶. Además, contrariamente a lo que ocurre en cultivo celular, se observó que una mayor generación de dendrímero causa una menor toxicidad en embriones. Más recientemente, en Bodewein y col. (2016) estudiaron el efecto de dendrímeros PAMAM G3.0, G3.5, G4.0, G4.5 y G5.0, y de dendrímeros PPI G3.0, G4.0 y G5.0, en embriones de *zebrafish* decorionados (sin corion) de 1 hpf. Nuevamente los dendrímeros de menor generación y con carga positiva fueron más tóxicos para los embriones. Además, este último trabajo demuestra el efecto protector del corion en la viabilidad de los embriones, dado que las CL₅₀ fueron menores en los embriones decorionados respecto de los embriones con corion¹⁵⁷. Finalmente, en nuestro laboratorio estudiamos el efecto en embriones de 1 hpf y en larvas de 4 días post-fecundación (dpf) de los dendrímeros PAMAM G4.0 y G4.5, en concentraciones desde 0,031 a 20 µM¹⁵⁸. Los resultados en embriones coincidieron con los reportados por otros autores. Por otro lado, en las larvas de *zebrafish* se observó que los dendrímeros catiónicos indujeron una disminución del movimiento espontáneo en concentraciones de 0,5 µM, mientras que los aniónicos no causaron alteraciones en el movimiento incluso en 20 µM. Asimismo, 0,5 µM de dendrímero catiónico causó una disminución del ritmo cardíaco y cambios en la morfología y organización de las células del hígado, del cerebro y de la espina de las larvas; mientras que los dendrímeros aniónicos no presentaron dichos efectos tóxicos subletales. En este trabajo se demostró que los dendrímeros catiónicos resultaron tóxicos tanto en embriones como en larvas, mientras que los aniónicos no resultaron tóxicos.

Por otro lado, en nuestro laboratorio se estudiaron los efectos de complejos entre dendrímeros PAMAM G4.5 y risperidona en larvas de *zebrafish* a los 4 dpf^{93,94}. Los resultados obtenidos

sugieren que los dendrímeros tuvieron un efecto protector respecto de la toxicidad causada por la droga libre. Este trabajo enfatiza la importancia de utilizar larvas de *zebrafish*, en lugar de embriones, dado que el uso de larvas permite realizar un estudio órgano-específico, en lugar de solo evaluar la toxicidad generalizada.

Tomando estos resultados en conjunto, el tipo y carga de los grupos terminales de los dendrímeros son determinantes del efecto tóxico en embriones de *zebrafish*. Los dendrímeros aniónicos o neutros no resultaron tóxicos; en contraste, los dendrímeros catiónicos presentaron efectos letales y subletales que fueron dependientes de la concentración y de la generación. Se observa que generaciones pequeñas resultan más tóxicos en embriones de *zebrafish* que generaciones grandes. Este resultado se opone a los reportados para cultivo celular, donde hay una relación directa entre la generación y la toxicidad de los dendrímeros. Esta diferencia puede deberse a que, en cultivo celular, los dendrímeros catiónicos se unen a las membranas celulares cargadas negativamente y las desestabilizan, formando poros y llevando a la lisis celular, esta formación de poros es más eficiente cuanto mayor es la generación del dendrímero ^{159,160}. Por otro lado, los embriones de *zebrafish* son organismos con una mayor complejidad y el mecanismo por el cual los dendrímeros serían incorporados aún se desconoce. Entonces, se podría hipotetizar que los dendrímeros de menor tamaño pueden ser capturados más eficientemente, dando lugar a una mayor concentración efectiva que podría interferir en las posteriores cascadas de desarrollo, mientras los dendrímeros de mayor generación no ingresarían tan eficientemente y por ello tendrían menores efectos tóxicos.

1.3.9 Vías de administración de dendrímeros

Se ha reportado que los dendrímeros pueden administrarse por diversas vías, incluyendo la intravenosa, intraperitoneal, ocular, transdérmica, oral, intranasal, pulmonar, intravaginal y transmucosa ¹⁶¹. Según nuestro entendimiento, los dendrímeros son el único tipo de nanopartículas con las características adecuadas para ser utilizados en esta gran variedad de vías de administración.

Los dendrímeros han sido administrados por vía intravenosa en la mayoría de los estudios realizados en modelos animales murinos. Si bien esta vía de administración permitiría el acceso directo del nanotransportador al órgano o tejido blanco, es una ruta relativamente invasiva, sobre todo cuando se desarrollan tratamientos a largo plazo. Por ejemplo, se ha demostrado que conjugados de dendrímeros con la droga anti-tumoral doxorubicina fueron menos tóxicos y presentaron una mayor vida media en circulación que la droga libre ¹⁶². Por otro lado, Asthana y col. (2005) detectaron que la administración de complejos entre dendrímeros PAMAM G4.0 y el fármaco anti-inflamatorio flurbiprofeno en ratas albinas, generó un aumento del efecto anti-

inflamatorio respecto del producido por la droga libre ¹⁴⁶. Pensando en rutas menos invasivas, se ha estudiado la potencialidad de los dendrímeros para ser administrados por la vía oral. En general, se ha encontrado que los dendrímeros PAMAM catiónicos fueron más permeables y capaces de atravesar la barrera intestinal, en comparación con dendrímeros aniónicos o neutros de la misma generación ^{163–166}. Por ejemplo, estudios *in vivo* demostraron que la biodisponibilidad del 5-fluorouracilo y la doxorubicina aumentaron 1,7 y 200 veces, respectivamente, al administrarla por vía oral con dendrímeros PAMAM catiónicos ^{119,167}.

Sumado a lo descripto, los dendrímeros PAMAM se han utilizado para el suministro transdérmico de moléculas bioactivas. Este es un método no invasivo, que permitiría mantener los niveles de droga en sangre relativamente estables, sin que ocurra el primer paso metabólico en el hígado. Por ejemplo, estudios *in vivo* demostraron que dendrímeros PAMAM G5.0 facilitaron la penetración en piel de ketoprofeno y diflunisal, mientras que dendrímeros G4.0 y G4.5 aumentaron 1,6 veces la permeabilidad de indometacina ^{118,168}. Por otro lado, se ha demostrado que el pre-tratamiento de la piel con dendrímeros da lugar a una mayor permeabilidad del 5-fluorouracilo ¹⁶⁹. El incremento en la permeabilidad mediada por dendrímeros resultó ser carga- y generación-dependiente: los dendrímeros catiónicos y pequeños fueron más efectivos que los aniónicos y de mayores generaciones.

La administración intranasal de sistemas de *delivery* de drogas se ha vuelto un medio prometedor, debido a que la nariz tiene una gran superficie epitelial expuesta donde la droga se puede absorber. Además, la capa subepitelial se encuentra muy vascularizada y la sangre venosa que pasa por la nariz va directamente a la circulación sistémica, evitando el primer paso metabólico en el hígado. Sumado a ello es un método no invasivo y puede maximizar la complacencia del paciente ¹⁷⁰. Estudios *in vivo* reportaron una absorción nasal incrementada de insulina, calcitonina y haloperidol tras la administración con dendrímeros PAMAM catiónicos ^{170,171}. Además, otro estudio reportó que los dendrímeros PAMAM G4.0 llegaron a cerebro tras la administración intranasal en ratones BALB/c ¹⁷².

Otras vías se han utilizado para la administración de dendrímeros, pero con el objetivo de estudiar la biodistribución de los mismos, más que su efecto en el transporte de drogas. Por ejemplo, Albertazzi y col. (2012) estudiaron la biodistribución de los dendrímeros PAMAM G4.0 marcados con el fluoróforo Alexa647 y reportaron que los dendrímeros fueron capaces de atravesar la barrera ependimal para llegar al parénquima cerebral luego de una inyección intraventricular ¹⁷³. Sumado a ello, Srinageshwar y col. (2017) estudiaron la biodistribución en ratones de dendrímeros PAMAM G4.0 conjugados con FTIC tras la administración intracraneal y por inyección en la carótida (menos invasivo). En este caso, los dendrímeros atravesaron la BHE cuando fueron inyectados en la carótida y fueron localizados en el interior de las neuronas y las células gliales ¹⁷⁴.



Objetivos

Como se ha fundamentado, es necesario explorar nuevas estrategias terapéuticas para la EdA considerando su naturaleza multifactorial. Por ello, el **objetivo general** del presente trabajo ha sido diseñar y desarrollar terapias combinadas basadas en dendrímeros para el tratamiento de la EdA, con el fin de mejorar y potenciar el tratamiento actual.

En este sentido, se propuso la combinación de las drogas carbamazepina (potenciador de la autofagia), tacrina (inhibidor de la AChE) o curcumina (inhibidor de la AChE y de la producción de A β , con propiedades anti-agregación de proteínas, anti-oxidantes y anti-inflamatorias) con los dendrímeros PAMAM con core de EDA generación 4.0 (DG4.0) o 4.5 (DG4.5) que actuarían como nanotransportadores de las drogas mencionadas y como nanodrogas *per se* (por sus propiedades anti-bacterianas, anti-inflamatorias, anti-agregación de proteínas y anti-AChE) (**Figura 1.31**).

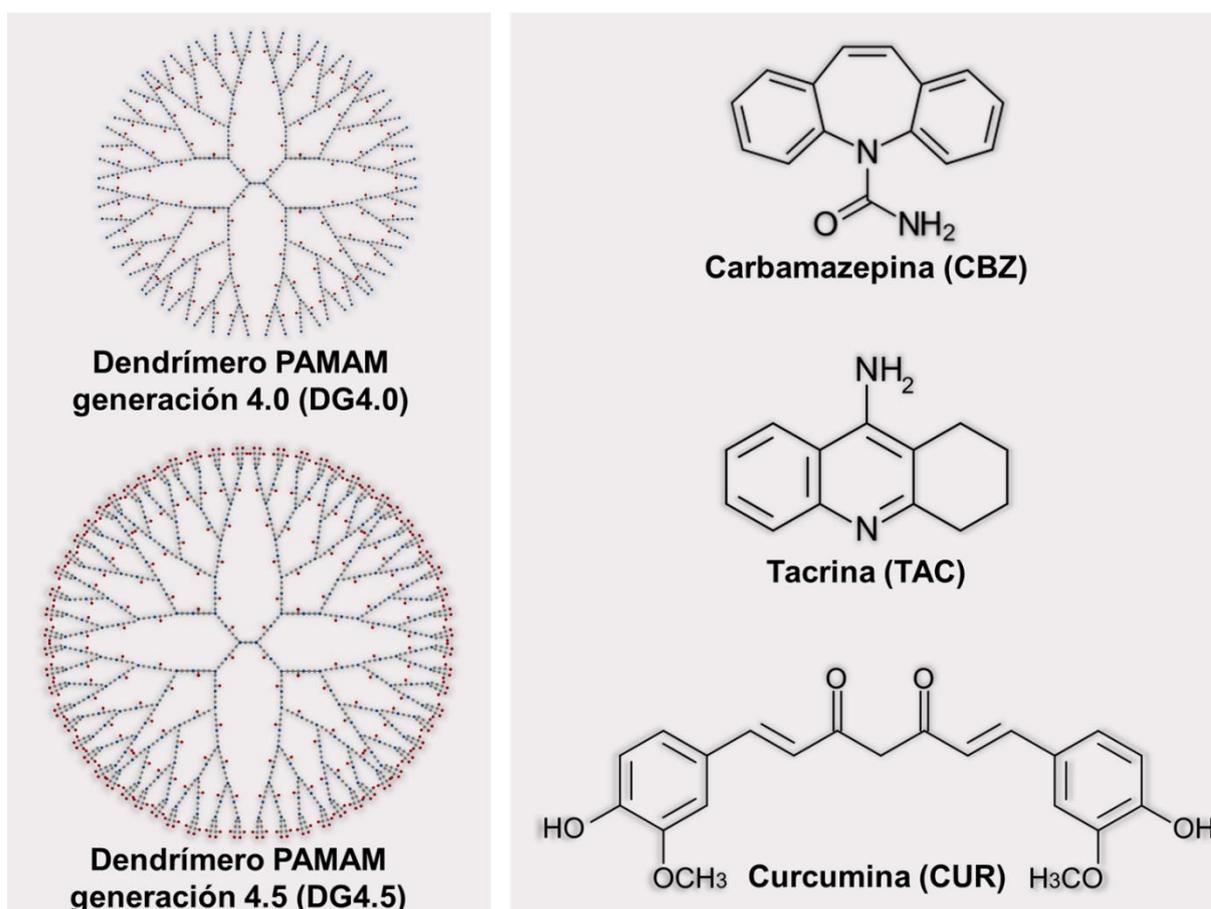


Figura 1.31 – Estrategias terapéuticas diseñadas en este trabajo. Se propone la combinación de dendrímeros PAMAM G4.0 o G4.5 con las drogas carbamazepina, tacrina o curcumina para generar terapias combinadas para la enfermedad de Alzheimer.

Es de interés resaltar que la droga carbamazepina es un antiepiléptico aprobado y actualmente en el mercado que se reposiciona en este trabajo por sus propiedades potenciadoras de la autofagia; mientras que la tacrina es un inhibidor de la AChE aprobado para el tratamiento de la EdA con la necesidad de reducir sus efectos secundarios; y la curcumina es un polifenol natural aceptado por la comunidad mundial que podría actuar a través de varias vías etiológicas en la lucha contra la EdA. Las particularidades de cada una de las terapias combinadas diseñadas en este trabajo se discuten en los capítulos 3, 4 y 5.

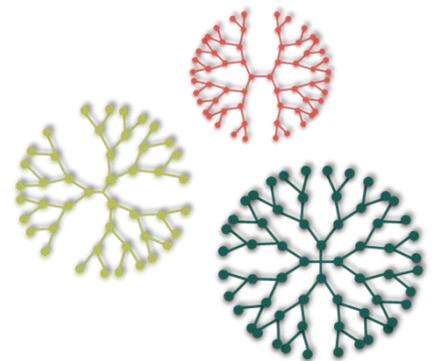
Los **objetivos específicos** fueron:

- ✓ Diseñar protocolos sencillos que permitan preparar complejos estables entre los dos tipos de dendrímeros y las tres drogas.
- ✓ Caracterizar los complejos dendrímero-droga obtenidos en cuanto a capacidad de carga, incremento de la solubilidad de las drogas, estabilidad en el tiempo, interacción droga-dendrímero, perfil de liberación de la droga.
- ✓ Caracterizar el perfil toxicológico de los complejos dendrímero-droga mediante estudios *ex vivo* (en glóbulos rojos humanos), *in vitro* (en cultivo de células Neuro-2a) e *in vivo* (en larvas de *zebrafish*).

Los resultados de este trabajo permitirán ampliar el conocimiento sobre la capacidad de los dendrímeros de actuar como nanotransportadores de distintos tipos de drogas, así como sobre los mecanismos que intervienen en su perfil toxicológico. Sumado a ello, los resultados de este trabajo funcionarán como punto de partida para el diseño de terapias combinadas basadas en dendrímeros capaces de actuar sobre varias hipótesis etiológicas de la EdA.

Capítulo 2

Materiales y Métodos



Capítulo 2 – Materiales y Métodos

2.1 Materiales

Los dendrímeros (D) de poliamidoamina (PAMAM), con núcleo de etilendiamina, generación 4.0 (PM = 14214 g/mol, 64 grupos amina terminales, CAS N° 412449) (**DG4.0**) y generación 4.5 (PM = 26251 g/mol, 128 grupos carboxílicos terminales, CAS N° 470457) (**DG4.5**) se adquirieron en Sigma-Aldrich (MERCK, Argentina). La carbamazepina (**CBZ**), 5H-dibenzo-[b, f]-azepina-5-carboxamida (C₁₅H₁₂N₂O - PM = 236,27 g/mol), fue donada generosamente por la Dra. Albertina Moglioni del Instituto de Química y Metabolismo de las Drogas (IQUIMEFA-CONICET) (Buenos Aires, Argentina). La tacrina (**TAC**), clorhidrato de 9-amino-1,2,3,4-tetrahidro-acridina (C₁₃H₁₄N₂·HCl·H₂O, PM = 234,72 g/mol, CAS N° A3773), fue adquirida en Sigma-Aldrich (MERCK, Argentina). La curcumina (**CUR**), 1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadien-3,5-diona (C₁₂H₂₀O₆, PM = 368,38 g/mol, CAS N° 458377), de la empresa ChemCruz fue adquirida en TecnoLab (Buenos Aires, Argentina). La sal de tetrazolio MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetil-2-tiazolil]-2,5-difenil tetrazolio) de USB Corporation, el medio esencial mínimo (MEM) para cultivo celular de HyClone y las soluciones de antibiótico-antimicótico 100X y de tripsina 10X de Gibco fueron adquiridos en Thermo Fisher Scientific (Buenos Aires, Argentina). El suero fetal bovino (SFB) fue de Internegocios S.A. (Buenos Aires, Argentina). El cristal violeta (CV) fue adquirido en Sigma-Aldrich (MERCK, Argentina) y el rojo neutro (RN) en BioPack (Buenos Aires, Argentina). El reactivo de tinción de Giemsa fue de BioPur diagnostics (Rosario, Argentina). Los restantes reactivos fueron de grado analítico.

2.2 Obtención de terapias combinadas (complejos dendrímeros-drogas)

2.2.1 Obtención general de complejos entre las drogas y los dendrímeros

Para la obtención de los complejos, las drogas se combinaron con una cantidad constante de dendrímero (DG4.0 o DG4.5) en solución metanólica. Las mezclas se incubaron en agitación constante y oscuridad durante 24 h a 28 °C y, a continuación, se evaporó el metanol a 25 °C en el concentrador SpeedVac SAVANT® AES1010 (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.). Los residuos sólidos obtenidos se resuspendieron a temperatura ambiente en 0,1 mL de buffer fosfato salino (PBS, por sus siglas del inglés *phosphate buffer saline*) 10 mM a pH = 7,4, con utilización de un *vortex*. Las muestras se centrifugaron a 10.000 rpm durante 5 minutos para separar los complejos D-droga de la droga insoluble no incorporada en dendrímeros. Se tomaron los sobrenadantes

donde se encuentran los complejos D-droga en suspensión. En la **Figura 2.1** se presenta un diagrama del método descrito para la obtención de complejos.

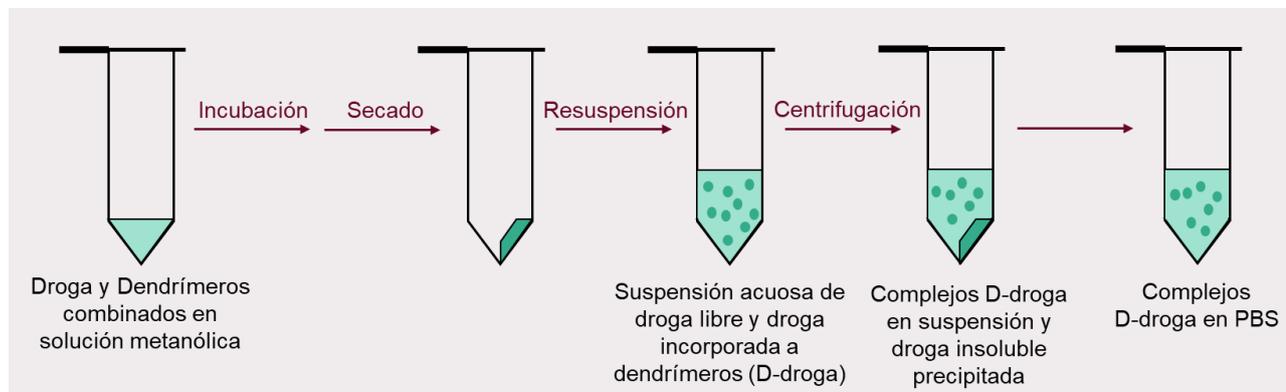


Figura 2.1 – Esquema de obtención de complejos dendrímero-droga. Las distintas drogas fueron combinadas con los DG4.0 o DG4.5 en solución metanólica, e incubadas por 24 h. Luego se evaporó el metanol y los residuos sólidos obtenidos se resuspendieron en PBS. La suspensión obtenida se centrifugó para separar los complejos de la droga insoluble no incorporada.

Las suspensiones obtenidas en PBS luego del proceso de complejación fueron denominadas en función de los componentes que se combinaron en metanol al inicio del mismo, según:

- ✓ Droga: muestra obtenida luego del proceso realizado por incubación metanólica de droga en ausencia de dendrímeros (es un control del protocolo de complejación).
- ✓ Dendrimeros (DG4.0 y DG4.5): muestras obtenidas luego del proceso realizado por incubación metanólica de dendrímeros en ausencia de droga (es un control del protocolo de complejación).
- ✓ Complejos D-droga (DG4.0-droga o DG4.5-droga): muestras obtenidas luego del proceso realizado por combinación metanólica de las drogas y los dendrímeros.

2.2.2 Obtención de complejos de CBZ con DG4.0 o DG4.5

Con el objetivo de determinar la relación óptima D:CBZ en la obtención de estos complejos, se combinaron diferentes cantidades de CBZ con una cantidad constante de DG4.0 o DG4.5 en solución metanólica. Las relaciones molares utilizadas fueron 1:5, 1:10, 1:25, 1:50, 1:100, 1:150 y 1:200 de D:CBZ; correspondientes a 0,024 mM de D y 0,12, 0,24, 0,6, 1,2, 2,4, 3,6 o 4,8 mM de CBZ, respectivamente. Luego, se siguió el protocolo detallado en la sección 2.2.1. Las suspensiones obtenidas se llamaron CBZ, DG4.0-CBZ, DG4.5-CBZ, DG4.0 o DG4.5, dependiendo de los componentes que se combinaron al inicio del proceso. A partir de los resultados obtenidos al variar la relación D:CBZ, se seleccionó la relación molar que dio lugar a una mayor solubilidad de la droga en medios acuosos, y se repitió el protocolo de complejación (n=18) con el objetivo de estudiar la reproducibilidad del mismo.

2.2.3 Obtención de complejos de TAC con DG4.0 o DG4.5

La TAC fue combinada con los dendrímeros en solución metanólica en una relación constante D:TAC 1:200, correspondiente a 0,024 mM de D y 4,8 mM de TAC. Luego, se siguió el protocolo detallado en la sección 2.2.1. Las suspensiones obtenidas después del proceso de complejación se llamaron TAC, DG4.0-TAC, DG4.5-TAC, DG4.0 o DG4.5, dependiendo de los componentes que se combinaron al inicio del proceso. Este protocolo se repitió (n=70) con el objetivo de analizar su reproducibilidad.

2.2.4 Obtención de complejos de CUR con DG4.0 o DG4.5

Con el objetivo de determinar la relación óptima D:CUR, se combinaron diferentes cantidades de CUR con una cantidad constante de DG4.0 o DG4.5 en solución metanólica. Las relaciones molares utilizadas fueron 1:2, 1:5, 1:10, 1:25, 1:50, 1:100 y 1:150 D:CUR; correspondientes a 0,024 mM de D y 0,048, 0,12, 0,24, 0,6, 1,2, 2,4 y 3,6 mM de CUR, respectivamente. Luego, se siguió el protocolo detallado en la sección 2.2.1. Las suspensiones obtenidas se llamaron CUR, DG4.0-CUR, DG4.5-CUR, DG4.0 o DG4.5, dependiendo de los componentes que se combinaron al inicio del proceso. A partir de los resultados obtenidos al variar la relación D:CUR, se seleccionó la relación molar que dio lugar a una mayor solubilidad de la droga en medios acuosos, y se repitió el protocolo de complejación (n=16) con el objetivo de estudiar la reproducibilidad del mismo.

2.3 Cuantificación de las drogas por absorbancia UV-Vis

2.3.1 Cuantificación de la CBZ

Para la cuantificación de la CBZ se utilizó el espectrofotómetro UV-Vis NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, EE. UU). Inicialmente, se preparó una solución stock de CBZ en PBS 10 mM pH=7,4 con 10% (v/v) de etanol, debido a la insolubilidad de la droga en medios puramente acuosos, y se determinó que en dichas condiciones la CBZ presentó un máximo de absorbancia a 284 nm. Posteriormente, a partir de la solución stock, se realizaron diluciones seriadas en PBS sin adición de solvente orgánico, y se midieron los espectros de absorbancia de cada dilución. No se observaron corrimientos en el máximo de absorbancia en ausencia de solvente orgánico. Se determinó la absorbancia a $\lambda_{\text{máx}}=284$ nm en función de la concentración de CBZ y, por regresión lineal, se obtuvo la ecuación de la curva de calibración, que fue lineal en un rango de concentración de 0,41-211 μM ($R^2=0,9994$) (**Figura 2.2 A**). La curva de calibración obtenida fue resultado de la medida de absorbancia de seis muestras diferentes para cada dilución, en distintos días de ensayo y a partir de distintas soluciones stock.

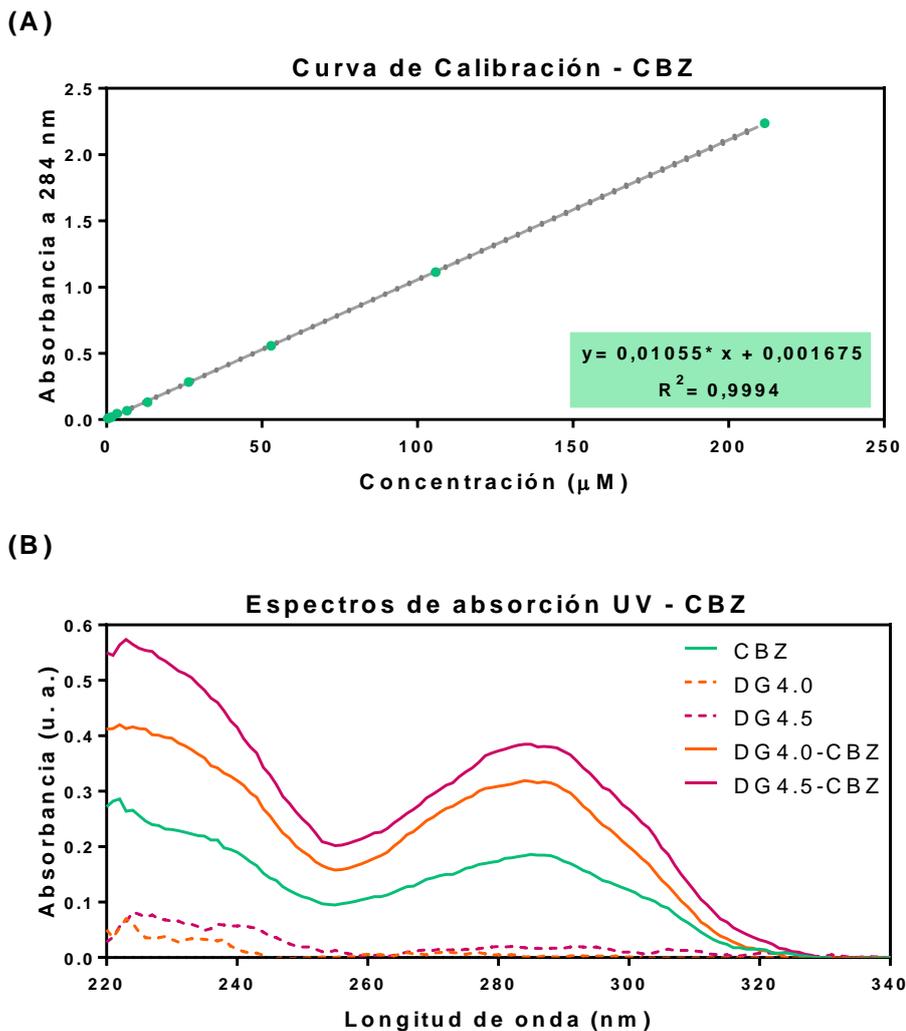


Figura 2.2 – Cuantificación de CBZ por espectroscopia UV-Vis. (A) Curva de calibración de CBZ en PBS 10 mM pH=7,4, obtenida por regresión lineal de la absorbancia a 284 nm de soluciones en un rango de concentración de 0,41–211 μM . **(B)** Espectros de absorbancia UV de la CBZ, los dendrímeros y los complejos D-CBZ luego del proceso de complejación utilizando una relación molar 1:150 D:CBZ. Los dendrímeros no presentan absorbancia significativa a 284 nm, donde la CBZ presenta su máximo de absorbancia.

Para la cuantificación de la CBZ incorporada en los dendrímeros, los complejos D-CBZ se obtuvieron en PBS 10 mM pH=7,4 tal como se detalló en la sección 2.2. Como los dendrímeros no presentaron absorbancia a 284 nm en las condiciones y concentraciones utilizadas, la absorbancia de los complejos D-CBZ es atribuida a la droga (**Figura 2.2 B**). La intensidad de absorbancia a $\lambda_{\text{máx}} = 284 \text{ nm}$ se correlacionó con la curva de calibración obtenida previamente y se determinó la cantidad de CBZ en suspensión. Es importante resaltar que la cantidad total de CBZ, presente en la suspensión luego del proceso de complejación, corresponde tanto a la CBZ soluble no incorporada como a la CBZ incorporada en los complejos D-CBZ. Por ello, se determinó la cantidad de droga

soluble presente en el control de CBZ que fue sometido al protocolo de complejación pero en ausencia de dendrímeros. La cantidad de CBZ soluble en el control se restó de la cantidad de CBZ determinada en los complejos D-CBZ, para calcular la cantidad de CBZ complejada. Dado que los dendrímeros son considerados infinitamente solubles en agua y que la concentración en suspensión es conocida (0,024 mM), las relaciones D:CBZ se expresaron como el número de moles de CBZ incorporados por mol de dendrímero.

2.3.2 Cuantificación de la TAC

Para la cuantificación de la TAC se utilizó el espectrofotómetro NanoDrop 1000. Inicialmente, se preparó una solución stock de TAC en PBS 10 mM pH=7,4, y se determinó que en dichas condiciones la droga presentó un máximo de absorbancia a 240 nm. Posteriormente, a partir de la solución stock, se realizaron diluciones seriadas en PBS y se midieron los espectros de absorbancia de cada dilución, a partir de los cuales se determinó la absorbancia a 240 nm en función de la concentración de TAC. Por regresión lineal se obtuvo la ecuación de la curva de calibración, que fue lineal en un rango de concentración de 0,759–194 μM ($R^2=0,9772$) (**Figura 2.3 A**). La curva de calibración obtenida fue resultado de la medida de absorbancia de seis muestras diferentes para cada dilución, en distintos días de ensayo y a partir de distintas soluciones stock.

Para la cuantificación de la TAC incorporada en los dendrímeros, los complejos D-TAC se obtuvieron en PBS 10 mM pH=7,4 tal como se detalló en la sección 2.2. Como los dendrímeros no presentaron absorbancia a 240 nm en las condiciones y concentraciones utilizadas, la absorbancia de los complejos D-TAC es atribuida a la TAC (**Figura 2.3 B**). La intensidad de absorbancia a $\lambda_{\text{máx}}=240$ nm se correlacionó con la curva de calibración obtenida previamente y se determinó la cantidad de TAC en suspensión. La cantidad total de TAC presente en la suspensión luego del proceso de complejación corresponde tanto a la TAC soluble no incorporada en dendrímeros como a la TAC incorporada en los complejos D-TAC. Por ello, se determinó la cantidad de droga soluble presente en el control de TAC que fue sometido al protocolo de complejación en ausencia de dendrímeros. La cantidad de TAC soluble en el control de complejación se restó de la cantidad de TAC determinada en los complejos, para calcular la cantidad de TAC complejada. Dado que los dendrímeros son considerados infinitamente solubles en agua y que la concentración en suspensión es conocida (0,024 mM), las relaciones D:TAC se expresaron como el número de moles de TAC incorporados por mol de dendrímero.

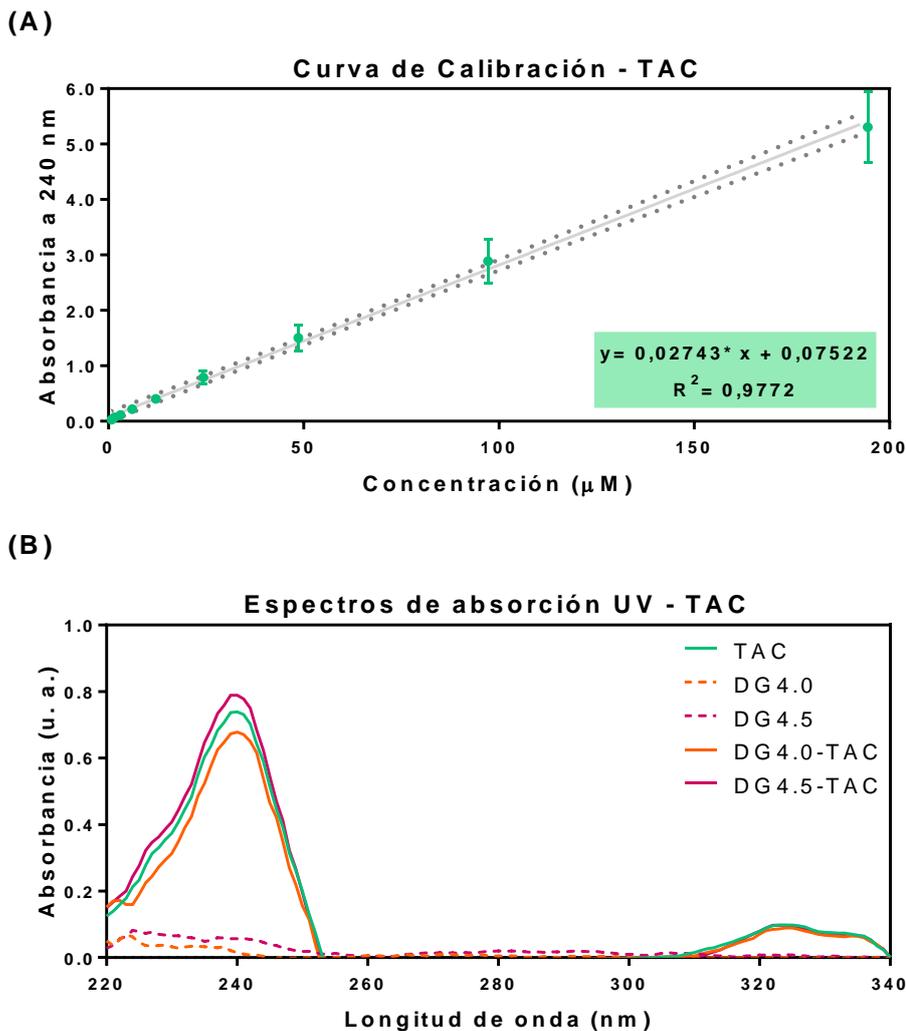


Figura 2.3 – Cuantificación de TAC por espectroscopia UV-Vis. (A) Curva de calibración de TAC en PBS 10 mM pH=7,4, obtenida por regresión lineal de la absorbancia a 240 nm de soluciones en un rango de concentración de 0,759–194 μM . (B) Espectros de absorbancia UV de la TAC, los dendrímeros y los complejos D-TAC luego del proceso de complejación utilizando una relación molar 1:200 D:TAC. Los dendrímeros no presentan absorbancia significativa a 240 nm, donde la droga presenta su máximo de absorbancia.

2.3.3 Cuantificación de la CUR

Para la cuantificación de la CUR se utilizó el espectrofotómetro Cytation 5 (BioTek Instruments, EE. UU.). Inicialmente, se preparó una solución stock de CUR en dimetilsulfóxido (DMSO), debido a la insolubilidad de la droga en medios acuosos, y se determinó que en dichas condiciones la CUR presentó un máximo de absorbancia a 424 nm. Posteriormente, a partir de la solución stock, se realizaron diluciones seriadas en DMSO, y se midieron los espectros de absorbancia de cada dilución, determinando la absorbancia a $\lambda_{\text{máx}}=424$ nm de función de la concentración de CUR. Por regresión lineal se obtuvo la ecuación de la curva de calibración, que fue lineal en un rango de

concentración de 1,02-530 μM ($R^2=0,9928$) (Figura 2.4 A). La curva de calibración obtenida fue resultado de la medida de absorbancia de seis muestras diferentes para cada dilución, en distintos días de ensayo y a partir de distintas soluciones stock.

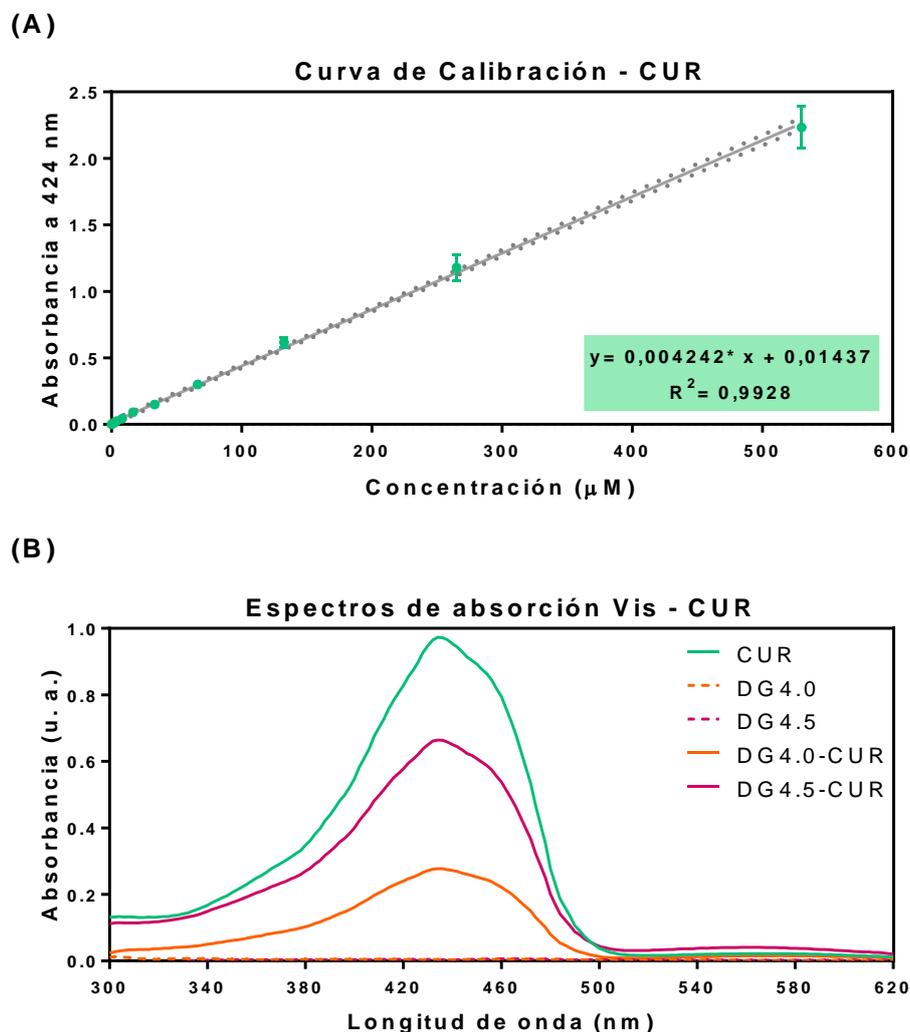


Figura 2.4 – Cuantificación de CUR por espectroscopia UV-Vis. (A) Curva de calibración de CUR en DMSO, obtenida por regresión lineal de la absorbancia a 424 nm de soluciones en un rango de concentración de 1,02-530 μM . (B) Espectros de absorción de los residuos de complejación de CUR, dendrímeros y D-CUR; dichos residuos fueron reconstituidos en DMSO. Como los dendrímeros se solubilizan con el PBS y no quedan en el precipitado de la complejación, la absorbancia observada corresponde a la de CUR remanente no incorporada en dendrímeros.

Los complejos D-CUR se obtuvieron en PBS 10 mM pH=7,4 tal como se detalló en la sección 2.2. Como la CUR es insoluble en medios acuosos, no se observó absorbancia en el control de droga que fue sometido al protocolo de complejación en ausencia de dendrímeros. Este hecho impidió la determinación de CUR incorporada en los complejos D-CUR utilizando el mismo método que para

la CBZ y la TAC. Por ello, la cuantificación de la CUR incorporada en los dendrímeros se realizó por un método indirecto (**Figura 2.5**). Para esto, los residuos de CUR insoluble no incorporados en dendrímeros obtenidos luego de la centrifugación de los complejos (último paso del protocolo de complejación), se reconstituyeron en DMSO y se midió su espectro de absorbancia UV-Vis. Como los dendrímeros no precipitan durante la centrifugación y no presentan absorbancia a 424 nm (**Figura 2.4 B**), la intensidad de absorbancia obtenida a dicha longitud de onda es atribuida a la CUR. Entonces, la absorbancia a $\lambda_{m\acute{a}x}=424$ nm se correlacionó con la curva de calibración obtenida en DMSO; lo que permitió determinar la cantidad de CUR remanente luego del proceso de complejación. La concentración inicial de CUR en el proceso de complejación es conocida, por lo que la diferencia entre la concentración inicial y la concentración remanente se consideró como la concentración de CUR en los complejos obtenidos luego del proceso completo de complejación. Además, como la concentración de dendrímeros en suspensión es conocida (0,024 mM), las relaciones D:CUR se expresaron como el número de moles de CUR incorporados por mol de dendrímero.

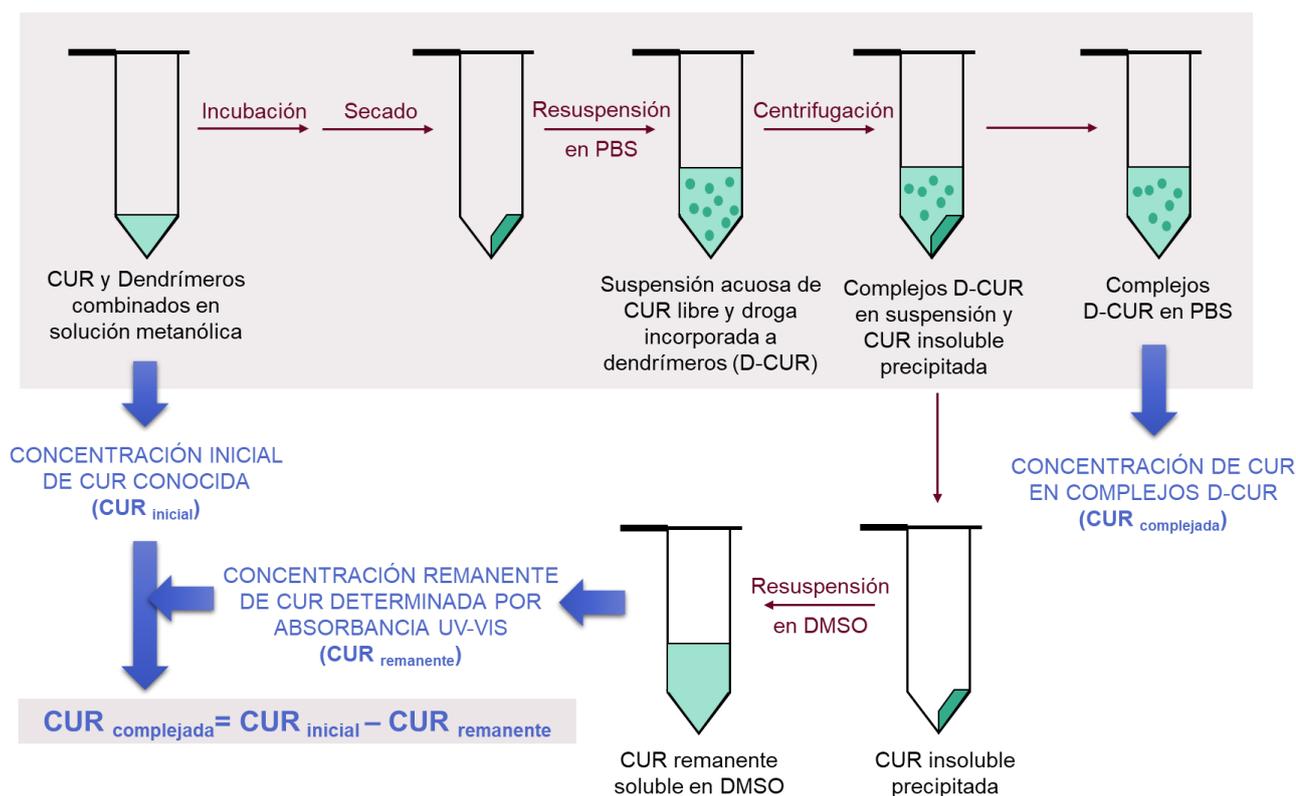


Figura 2.5 – Cuantificación de CBZ incorporada en dendrímero por un método indirecto. Debido a la insolubilidad de la CUR en medios acuosos, la concentración de CUR incorporada en los complejos D-CUR se cuantificó indirectamente por diferencia entre la cantidad de droga inicial y la cantidad de droga remanente luego del proceso de complejación. Como control se realizó el mismo proceso para las muestras de CUR en ausencia de dendrímeros (CUR libre).

2.4 Caracterización de la estabilidad de las drogas en los complejos

La estabilidad de las drogas en los complejos D-droga fue estudiada en el tiempo. Para ello, se prepararon muestras de droga y complejos D-droga, siguiendo los protocolos de complejación detallados en la sección 2.2. Estas muestras se almacenaron en distintas condiciones. A tiempos pre-determinados durante el almacenamiento, se realizaron observaciones macroscópicas y se midieron los espectros de absorbancia. En las observaciones macroscópicas se evaluó la aparición de precipitados, turbidez, cristalización, cambios en el color o en la consistencia de las muestras. Los espectros de absorbancia se utilizaron para determinar la cantidad de droga soluble (a través de las curvas de calibración) y evaluar si hubo corrimientos en los máximos de absorbancia, lo que podría correlacionarse con cambios químicos o en el entorno de las drogas. En algunos casos, también se estudió la estabilidad de los complejos D-droga frente al proceso de liofilización (sublimación del agua en condiciones de baja presión). La exhaustividad de los ensayos realizados para cada uno de los complejos D-droga dependió de las características fisicoquímicas de la droga complejada.

2.4.1 Estabilidad de la CBZ en los complejos D-CBZ

Durante el almacenamiento, la CBZ puede sufrir procesos de degradación y/o cristalización; además, la droga incorporada en los complejos D-CBZ podría liberarse y precipitar debido a su baja solubilidad. Por ello, en primer lugar, se estudió la estabilidad de la CBZ en los complejos D-CBZ a través del tiempo en distintas condiciones de almacenamiento. Para ello, se almacenaron suspensiones de CBZ, DG4.0-CBZ y DG4.5-CBZ a 4, 25 o 37 °C. A los 0, 1, 7, 14, 21, 28, 35 y 90 días luego de la complejación se realizaron las observaciones macroscópicas y se determinó la cantidad de CBZ en las suspensiones por espectroscopia UV-Vis (**Figura 2.6**), tomando una alícuota del sobrenadante, se observara o no precipitado. La CBZ soluble presente en el control de complejación sin dendrímeros se utilizó para establecer el 100% y todos los datos se relativizaron a dicho valor. Este ensayo se realizó por triplicado, a partir de muestras obtenidas en distintos procesos de complejación.

En segundo lugar, se estudió la estabilidad de estos complejos frente al proceso de liofilización. Para ello, suspensiones de CBZ, DG4.0-CBZ y DG4.5-CBZ se congelaron en ausencia de crioprotectores en freezer a -80 °C durante una noche. Las muestras se liofilizaron durante 24 h en el liofilizador LABCONCO Freezone® 4.5 (LABCONCO Corporation, EE. UU.), previamente enfriado a -50 °C, manteniendo la presión del proceso dentro del rango de 33×10^{-3} a 65×10^{-3} mbar. Los residuos sólidos obtenidos se reconstituyeron en PBS 10 mM pH=7,4 y la cantidad de CBZ se cuantificó por espectroscopia UV-Vis, como se describe en la sección 2.3.1. Utilizando los datos de la concentración de CBZ en las muestras antes y después del proceso de liofilización, se calculó el

porcentaje de droga remanente según indica la **Ecuación 2.1**. El porcentaje de CBZ remanente es un parámetro de la capacidad de los complejos de retener la droga incorporada frente al proceso de liofilización y reconstitución (**Figura 2.6**).

$$CBZ \text{ remanente } (\%) = \frac{\text{Concentración de CBZ luego de la liofilización}}{\text{Concentración de CBZ antes de la liofilización}} \times 100 \quad \text{Ecuación 2.1}$$

En tercer lugar, se estudió la estabilidad en el tiempo de la CBZ en los complejos D-CBZ reconstituidos luego del proceso de liofilización. Para ello, muestras liofilizadas de CBZ, DG4.0-CBZ y DG4.5-CBZ se reconstituyeron en PBS y se almacenaron a 25 °C. A los 0, 7, 14, 21, 28, 60 y 90 días después de la reconstitución se realizaron las observaciones macroscópicas y se determinó la cantidad de CBZ por espectroscopia UV-Vis (**Figura 2.6**). Este ensayo se realizó por triplicado, a partir de muestras obtenidas en distintos procesos de liofilización.

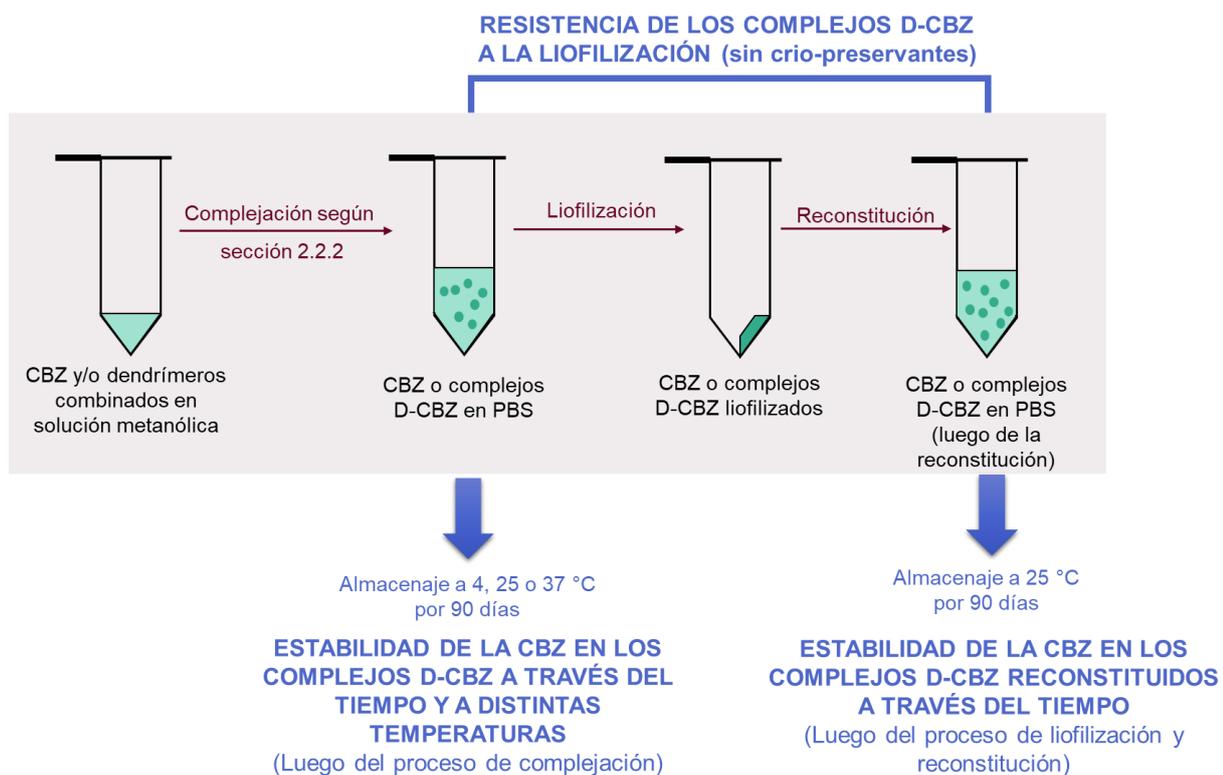


Figura 2.6 – Esquema del estudio de estabilidad de la CBZ en los complejos D-CBZ. La estabilidad se caracterizó desde tres enfoques: (1) Seguimiento de la CBZ en suspensión luego del proceso de complejación en muestras almacenadas a distintas temperaturas; (2) Resistencia de los complejos al proceso de liofilización; y (3) Seguimiento de la CBZ en suspensión luego del proceso de liofilización y reconstitución.

2.4.2 Estabilidad de la TAC en los complejos D-TAC

La TAC es una droga relativamente estable en solución acuosa que, debido a su elevada solubilidad, no tenderá a cristalizar y/o precipitar. Por ello, en este caso, solo se estudió la estabilidad de la TAC en los complejos D-TAC a través del tiempo en distintas condiciones de almacenamiento. Para ello, se almacenaron suspensiones de TAC, DG4.0-TAC y DG4.5-TAC a 4, 25 o 37 °C. A los 0, 1, 7, 14, 21, 28 y 60 días luego de la complejación se realizaron las observaciones macroscópicas y se determinó la cantidad de TAC en las suspensiones por espectroscopia UV-Vis (**Figura 2.7**). La TAC soluble presente en el control se utilizó para establecer el 100% y todos los datos se relativizaron a dicho valor. Este ensayo se realizó por triplicado, a partir de muestras obtenidas en distintos procesos de complejación.

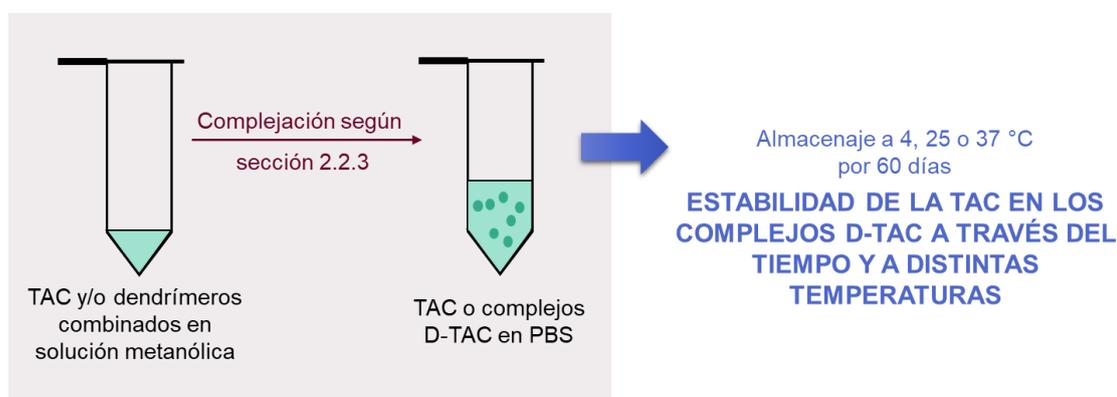


Figura 2.7– Esquema del estudio de estabilidad de la TAC en los complejos D-TAC. La estabilidad de la TAC en los complejos D-TAC se estudió por seguimiento de la cantidad de droga en suspensión luego del proceso de complejación en muestras almacenadas a distintas temperaturas.

2.4.3 Estabilidad de la CUR en los complejos D-CUR

La CUR se caracteriza por tener un tiempo de vida media muy corto en solución acuosa, siendo tendiente a sufrir procesos de degradación y/o precipitación, debido a su baja solubilidad. La CUR incorporada en los complejos D-CUR podría liberarse y degradarse/precipitar, por lo que resultó interesante estudiar la estabilidad de la droga en estos complejos desde diversos enfoques.

En primer lugar, se estudió la estabilidad de la CUR en los complejos D-CUR a través del tiempo en distintas condiciones de almacenamiento. Para ello, se almacenaron suspensiones de CUR, DG4.0-CUR y DG4.5-CUR a -20, 4 o 25 °C. A los 0, 1, 3, 7, 15 y 30 días luego de la complejación se realizaron las observaciones macroscópicas y se determinaron los espectros UV-Vis de las suspensiones (**Figura 2.8**), tomando una alícuota del sobrenadante, se observara o no precipitado. Este ensayo se realizó por triplicado, a partir de muestras obtenidas en distintos procesos de complejación.

En segundo lugar, se estudió la estabilidad de estos complejos frente al proceso de liofilización. Para ello, suspensiones de CUR, DG4.0-CUR y DG4.5-CUR en ausencia de crioprotectores se congelaron en freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante una noche. Las muestras se liofilizaron durante 24 h en el liofilizador LABCONCO Freezone® 4.5, previamente enfriado a $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$, manteniendo la presión del proceso dentro del rango de 33×10^{-3} a 65×10^{-3} mbar. Los residuos sólidos obtenidos se reconstituyeron en PBS 10 mM pH=7,4. Se midieron los espectros UV-Vis de las muestras reconstituidas y, utilizando los datos de absorbancia a 424 nm de la CUR en las muestras antes y después del proceso de liofilización, se calculó el porcentaje de droga remanente según indica la **Ecuación 2.2**. La cantidad de CUR remanente es un parámetro de la capacidad de los complejos de retener la droga durante el proceso de liofilización y reconstitución (**Figura 2.8**).

$$CUR \text{ remanente } (\%) = \frac{\text{Absorbancia a } 424 \text{ nm luego de la liofilización}}{\text{Absorbancia a } 424 \text{ nm antes de la liofilización}} \times 100 \quad \text{Ecuación 2.2}$$

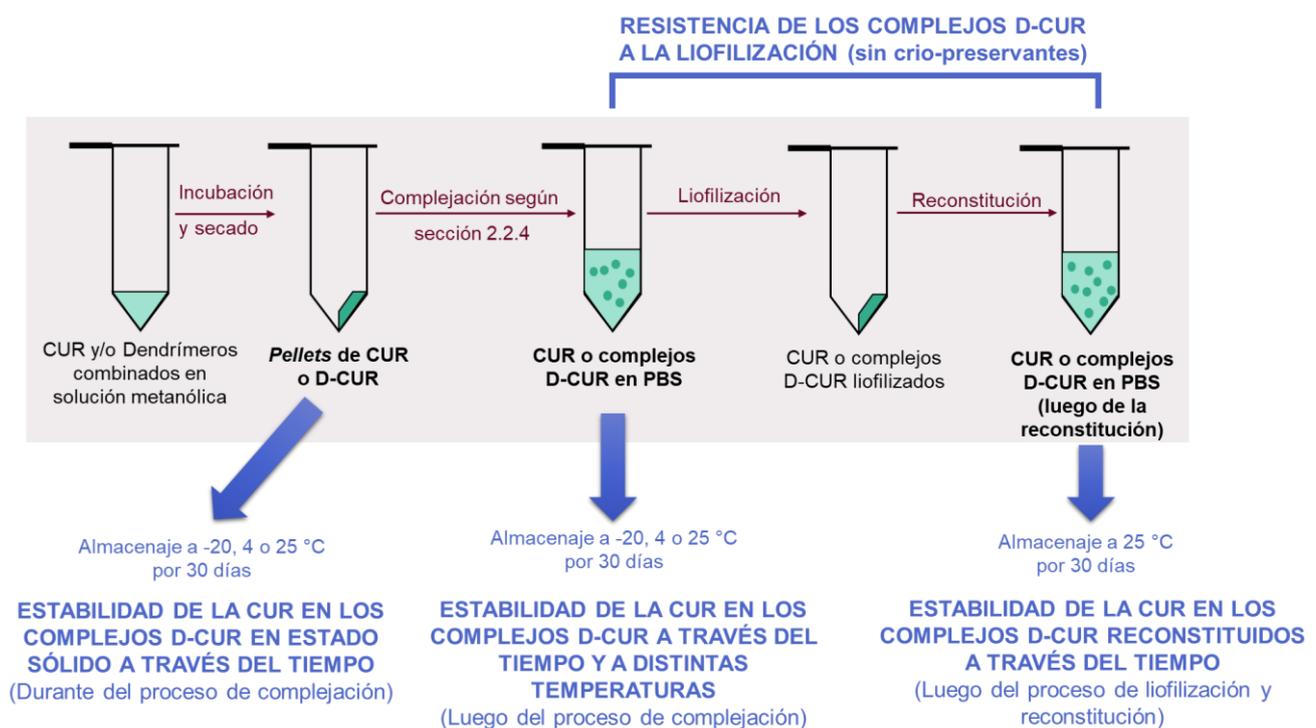


Figura 2.8 – Esquema del estudio de estabilidad de CUR en los complejos D-CUR. La estabilidad se caracterizó desde cuatro enfoques: (1) Seguimiento de la CUR en suspensión luego del proceso de complejación en muestras almacenadas a distintas temperaturas; (2) Resistencia de los complejos al proceso de liofilización; (3) Seguimiento de la CUR en suspensión luego del proceso de liofilización y reconstitución; y (4) Estabilidad de la CUR en los residuos sólidos obtenidos durante el proceso de complejación almacenados a distintas temperaturas.

En tercer lugar, se estudió la estabilidad en el tiempo de la CUR en los complejos D-CUR reconstituidos luego del proceso de liofilización. Para ello, muestras liofilizadas de CUR, DG4.0-CUR y DG4.5-CUR se reconstituyeron en PBS y se almacenaron a 25 °C. A los 0, 1, 7, 15 y 30 días después de la reconstitución se realizaron las observaciones macroscópicas y se determinaron los espectros UV-Vis de las suspensiones (**Figura 2.8**). Este ensayo se realizó por triplicado, a partir de muestras obtenidas en distintos procesos de liofilización.

En cuarto lugar, justificado en la mencionada inestabilidad de esta droga, se estudió la estabilidad de la CUR en los *pellets* obtenidos durante el proceso de complejación. Para ello, se inició el protocolo de complejación descrito en la sección 2.2, solo hasta obtener los residuos sólidos luego de la evaporación del metanol. Estos *pellets* se almacenaron protegidos de la luz a -20, 4 o 25 °C, y se resuspendieron en PBS (para continuar con el protocolo de complejación) a los 1, 3, 7, 15 y 30 días luego del secado (**Figura 2.8**). Se determinó la concentración de CUR en los complejos obtenidos a partir de los distintos *pellets* por el método indirecto, como se explicó en la sección 2.3.3. Este ensayo se realizó por triplicado, a partir de muestras obtenidas en distintos procesos de complejación.

2.5 Caracterización de la interacción entre las drogas y los dendrímeros

2.5.1 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

Para estudiar la interacción dendrímero-droga y los posibles cambios estructurales en los complejos con respecto a los dendrímeros libres, se utilizó la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR, por sus siglas del inglés *Fourier Transform Infrared spectroscopy*). Esta técnica se fundamenta en la absorción de la radiación de la luz infrarroja por las moléculas. Cuando la energía (asociada a una longitud de onda) del haz incidente es igual a la necesaria para que se produzca una transición energética, los enlaces covalentes de una molécula comienzan a vibrar. Existen distintos tipos de vibraciones, entre las que se destacan las de tensión y flexión. Las primeras hacen referencia a cambios en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace entre dos átomos, mientras que las vibraciones de flexión se originan por cambios en el ángulo que forman dos enlaces. En la zona del espectro infrarrojo medio, comprendido entre 4000 y 1300 cm^{-1} , se suelen observar una serie de bandas de absorción provocadas por las vibraciones entre dos átomos de la molécula. Estas vibraciones derivan de enlaces covalentes (simples, dobles o triples) y su posición depende de varias cuestiones, una de ellas es el momento dipolar que se establece en el enlace y que puede ser parcialmente afectado por el entorno. En el infrarrojo lejano, comprendido entre 1300 y 400 cm^{-1} , la asignación de las bandas de absorción es más difícil de realizar y se la denomina zona de la “huella dactilar”, dado que cada compuesto presenta un espectro particular en dicha zona ^{175,176}.

Los espectros FT-IR se determinaron en muestras sólidas obtenidas por liofilización, utilizando el espectrómetro Nicolet 8700 FTIR (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.). Las muestras sólidas de PBS, drogas (CBZ, TAC y CUR), dendrímeros (DG4.0 y DG4.5) y complejos D-droga (DG4.0-CBZ, DG4.5-CBZ, DG4.0-TAC, DG4.5-TAC, DG4.0-CUR y DG4.5-CUR) se prepararon por liofilización, como se describió en la sección 2.4. Los espectros FT-IR se obtuvieron colocando los residuos sólidos en la placa de cristal diseñada para medir la reflectancia total atenuada (ATR, por sus siglas del inglés *attenuated total reflectance*) (Figura 2.9). Se realizaron 64 escaneos en el rango de número de onda de 400 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} , con una resolución de 2 cm^{-1} .

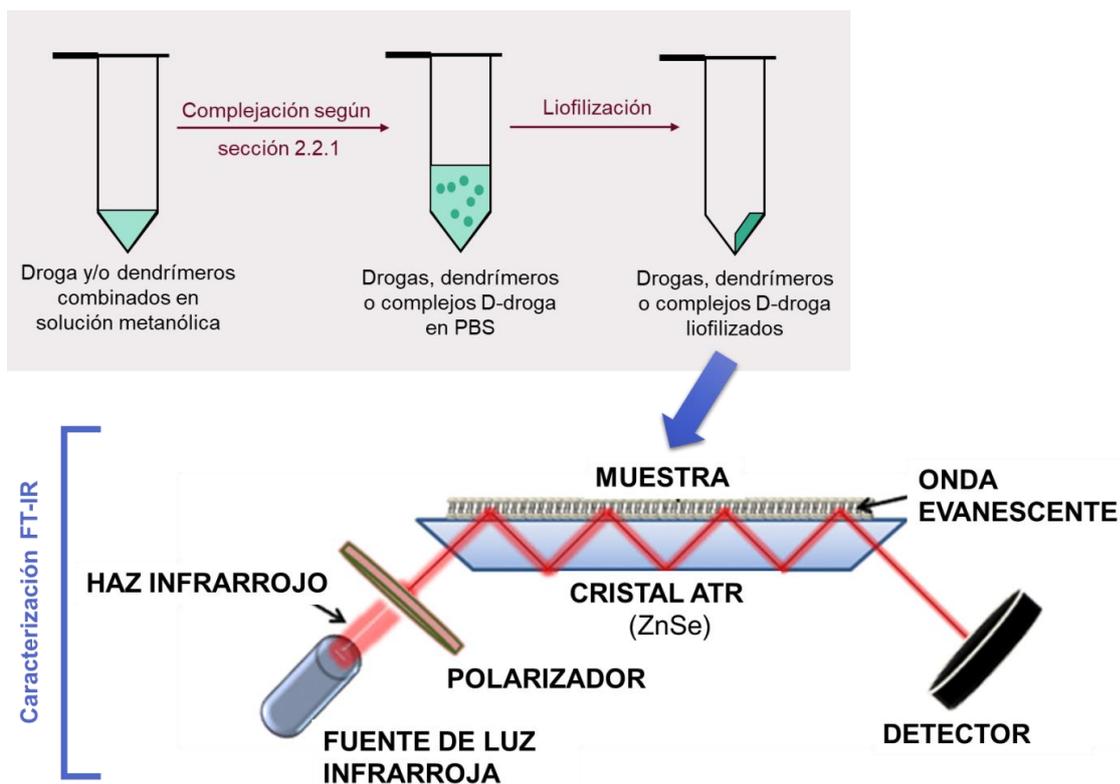


Figura 2.9 – Esquema de la caracterización de los complejos por FT-IR. Las muestras liofilizadas fueron depositadas en la placa de cristal para medir la reflectancia total atenuada de la muestra. Es este tipo de espectroscopia, la muestra es irradiada con haces de luz infrarroja de distinto número de onda (rango 400 a 4000 cm^{-1}), que atraviesan el cristal permitiendo al haz de luz entrar en contacto con la muestra en múltiples ocasiones antes de llegar al detector. Dicho detector es un interferómetro, por lo que el software obtiene un interferograma que es interpretado a través de la transformada de Fourier.

2.5.2 Liberación *in vitro* de las drogas a partir de los complejos D-droga

Con el objetivo de profundizar el estudio de la interacción dendrímero-droga, se determinaron los perfiles de liberación *in vitro* de las drogas a partir de los complejos D-droga en diferentes condiciones, utilizando una técnica de microdiálisis para volúmenes pequeños diseñada *ad hoc*¹⁷⁷.

Para ello, se removió la tapa interna superior de un tubo de centrifuga tipo *Eppendorf* de 1,5 mL y se la reemplazó por la membrana de diálisis previamente activada (peso molecular de corte: 12000 Da, CAS N° D9277, Sigma-Aldrich-Merck, Argentina) ¹⁷⁸. Dentro de cada tubo se depositaron las suspensiones de droga o los complejos D-droga, obtenidos luego del proceso de complejación descrito en la sección 2.2, y se expusieron a un volumen determinado de PBS bajo agitación continua a 37 °C, a través de la membrana de diálisis. En la **Figura 2.10** se esquematiza el sistema de microdiálisis. El diseño experimental consistió en recoger alícuotas de 100 µL del medio de incubación a intervalos de tiempo pre-determinados (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 24 y 28 h). Cada alícuota retirada se reemplazó por un volumen igual de medio fresco para mantener el volumen constante durante el experimento. La cantidad de droga en cada alícuota retirada se determinó por espectroscopia UV-Vis. El porcentaje de droga liberada acumulada se expresó respecto del contenido inicial de droga en cada muestra a dializar. En la **Figura 2.11** se presentan las correcciones realizadas para obtener el porcentaje de liberación acumulada a partir de las determinaciones realizadas en cada alícuota.

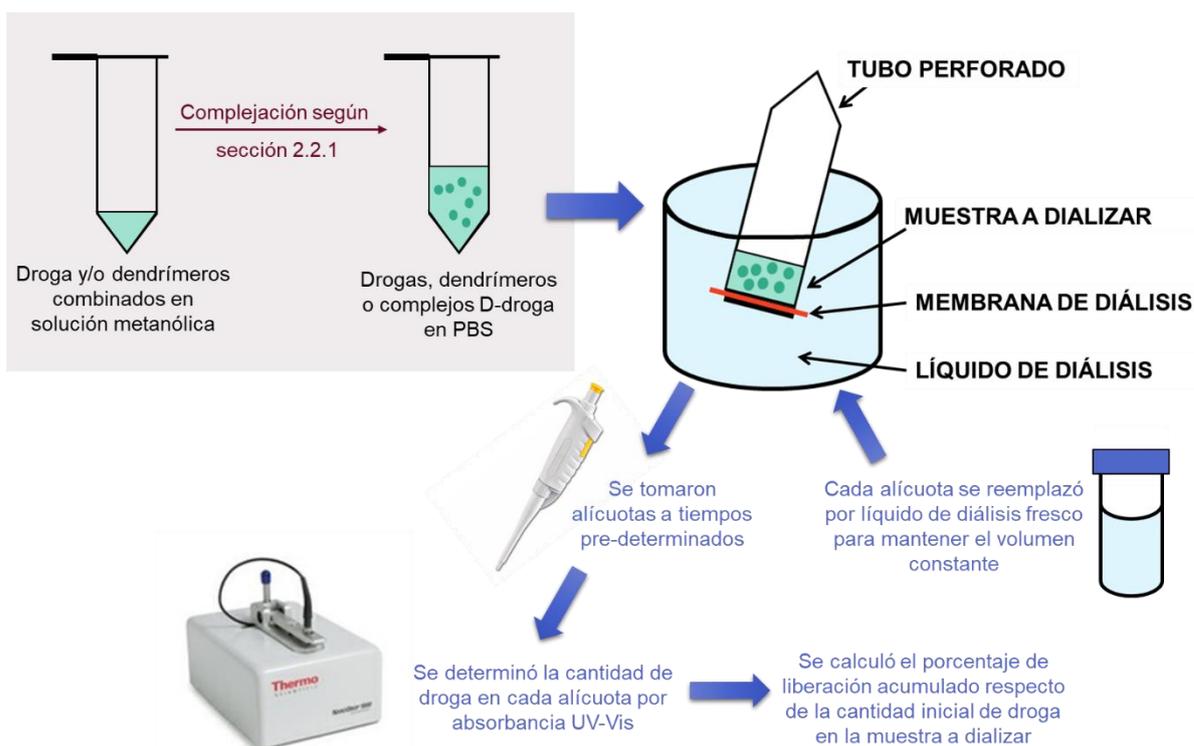


Figura 2.10 – Esquema del estudio de liberación *in vitro*. Las muestras a dializar se depositaron en un tubo al cual se le removió la tapa superior y se la reemplazó por una membrana de diálisis. Dichas muestras se depositaron en un contenedor, para entrar en contacto con el líquido de diálisis a través de la membrana. Este sistema se mantuvo en agitación constante a 37 °C. A tiempos pre-determinados se retiraron 100 µL del líquido de diálisis para cuantificar la droga liberada por absorbancia UV-Vis. Cada alícuota retirada fue reemplazada por el mismo volumen de líquido de diálisis fresco.

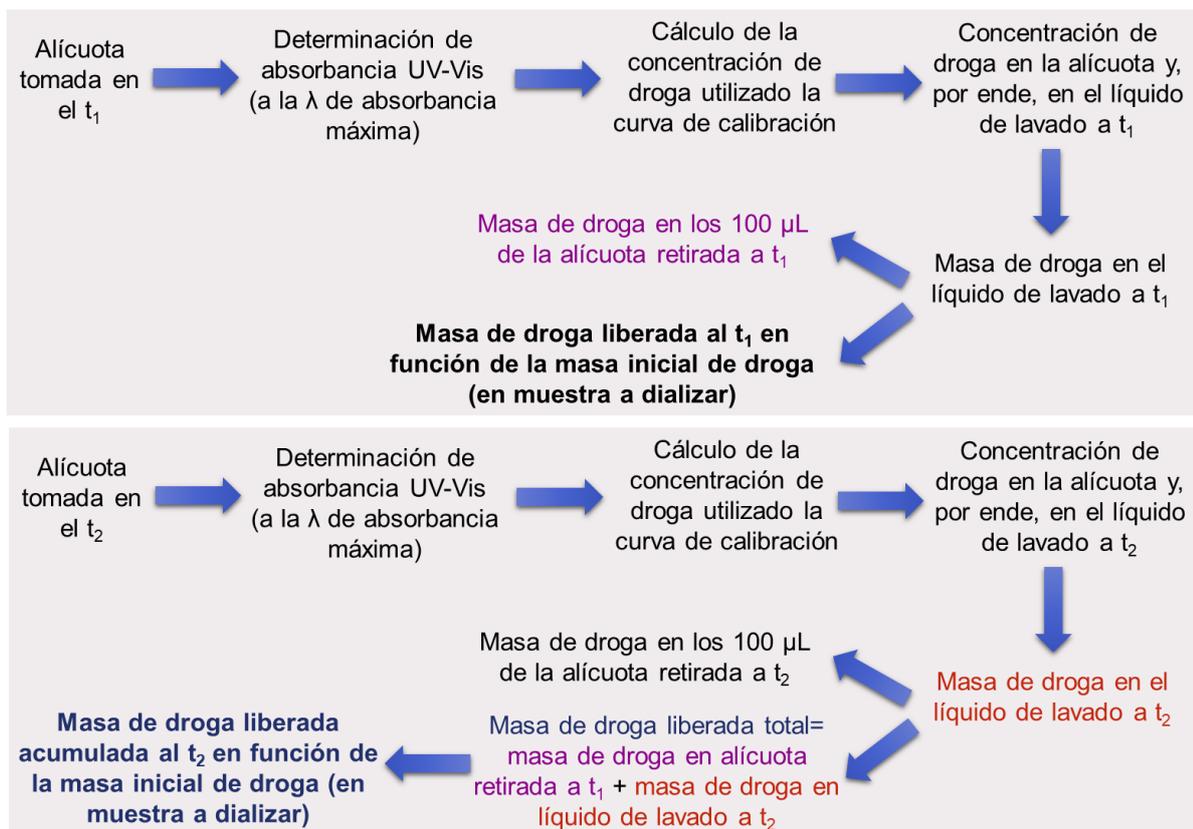


Figura 2.11 – Cálculos realizados para determinar el porcentaje de liberación acumulada. Cálculos realizados para determinar el porcentaje de liberación en el tiempo inicial (t_1) y en los tiempos subsiguientes (t_2 , t_3 , etc.), a partir de los cuales se confeccionaron los perfiles de liberación. De este modo, se realizó la corrección por la masa de droga eliminada del líquido de diálisis en cada alícuota retirada.

2.5.2.1 Liberación *in vitro* de CBZ a partir de los complejos D-CBZ

En este caso, 50 μL de muestras de CBZ, DG4.0-CBZ y DG4.5-CBZ se expusieron a un volumen 100 veces mayor (5 mL) de PBS a pH ácido (pH= 2,2), fisiológico (pH= 7,4) o básico (pH= 12,6), a través de la membrana de diálisis. La diálisis de cada muestra se realizó por sextuplicado, en cada condición evaluada (distintos pH).

2.5.2.2 Liberación *in vitro* de TAC a partir de los complejos D-TAC

En este caso, 50 μL de muestras de TAC, DG4.0-TAC y DG4.5-TAC se expusieron a un volumen 50 (2,5 mL) o 100 (5 mL) veces mayor de PBS 10 mM pH= 7,4, a través de la membrana de diálisis. La diálisis de cada muestra se realizó por sextuplicado, en cada condición evaluada (distintas diluciones).

2.6 Toxicidad *ex vivo* en glóbulos rojos humanos

2.6.1 Obtención de glóbulos rojos humanos

La toxicidad *ex vivo* de muestras de droga, dendrímeros y complejos D-droga se determinó mediante el ensayo de hemólisis y el estudio de los posibles cambios morfológicos en glóbulos rojos humanos ^{71,91}. Estos estudios se realizaron en acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki y fueron aprobado por el Comité de Ética de la Universidad Nacional de Quilmes (Buenos Aires, Argentina; ética CE-UNQ No 2/2014). La/el participante (donante de sangre) proporcionó un consentimiento informado por escrito antes de su participación en el estudio.

Para la obtención de los glóbulos rojos, 10 mL de la muestra de sangre, extraída del donante sano, se acondicionaron con 1 mL de solución al 3% (p/v) de citrato de sodio como anticoagulante. La muestra se centrifugó a 6.000 rpm por 10 minutos, se descartó el plasma y la fase de glóbulos rojos se resuspendió en PBS 10 mM pH 7,4 estéril hasta alcanzar el volumen original (**Figura 2.12**).

2.6.2 Tratamientos

La suspensión de glóbulos rojos obtenida previamente se separó en alícuotas de 180 μ L, a las cuales se le adicionaron 20 μ L de los distintos tratamientos (**Figura 2.12**). Las concentraciones finales de drogas, dendrímeros y complejos D-droga evaluados fueron:

- ✓ CBZ en el rango de 0,3–30 μ M
- ✓ Complejos D-CBZ en el rango de 0,012–1,2 μ M de dendrímeros y 0,3–30 μ M de CBZ
- ✓ DG4.0 y DG4.5 en el rango de 0,012–1,2 μ M (control de complejos D-CBZ)

- ✓ TAC en el rango de 0,3–30 μ M
- ✓ Complejos D-TAC en el rango de 0,0018–0,18 μ M de dendrímeros y 0,3–30 μ M de TAC
- ✓ DG4.0 y DG4.5 en el rango de 0,0018–0,18 μ M (control de complejos D-TAC)

- ✓ CUR en el rango de 2,5–10 μ M
- ✓ DG4.0-CUR en el rango de 0,35–1,4 μ M de dendrímero y 2,5–10 μ M de CUR
- ✓ DG4.5-CUR en el rango de 0,6–2,4 μ M de dendrímero y 2,5–10 μ M de CUR
- ✓ DG4.0 en el rango de 0,35–1,4 μ M (control de complejos DG4.0-CUR)
- ✓ DG4.5 en el rango de 0,6–2,4 μ M (control de complejos DG4.5-CUR)

En todos los casos se realizaron dos controles: los glóbulos rojos se incubaron con PBS (10 mM pH=7,4) como control negativo y con dodecilsulfato de sodio (SDS) al 2% (p/v) como control positivo de hemólisis. Además, como las muestras de CUR libre se obtuvieron a partir de un stock concentrado en DMSO, debido a la insolubilidad de la droga en agua; se adicionó un control de

DMSO al 0,1% (v/v) en PBS, que iguala a la concentración máxima de DMSO a la que se expusieron los glóbulos rojos cuando se incubaron con la mayor concentración de CUR. Es importante resaltar que los complejos D-CUR y los dendrímeros control estuvieron solubilizados en PBS, sin DMSO.

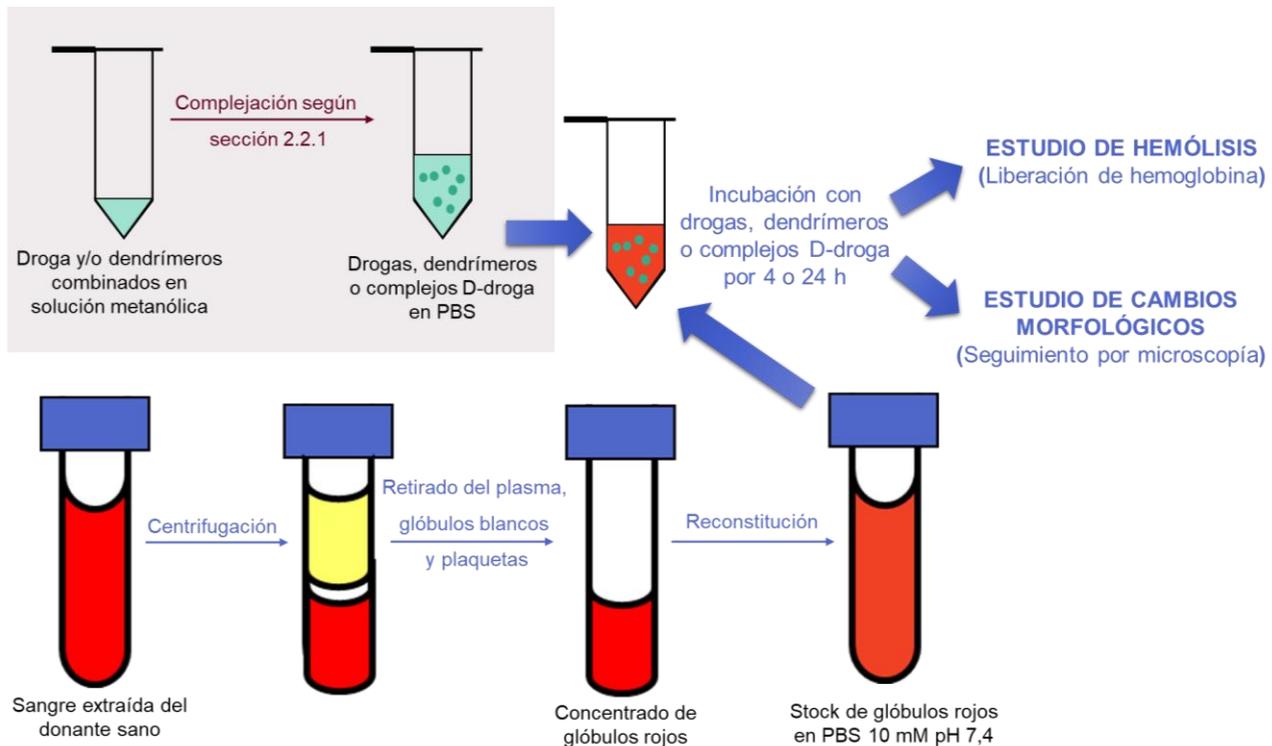


Figura 2.12 – Esquema del estudio de toxicidad *ex vivo* en glóbulos rojos humanos. La muestra de sangre extraída del donante sano se acondicionó con citrato de sodio como anticoagulante y se centrifugó con el objetivo de separar los glóbulos rojos de los glóbulos blancos y el plasma. Estos últimos fueron retirados, y el concentrado de glóbulos rojos se reconstituyó en PBS estéril. Alícuotas de esta suspensión de glóbulos rojos se incubaron a 37 °C con las drogas, los dendrímeros y los complejos D-droga. Como control negativo se utilizó PBS, mientras que como control positivo se utilizó el detergente hemolítico SDS. Después de 4 o 24 h de incubación se realizaron los estudios de hemólisis y de cambios morfológicos.

2.6.3 Hemólisis

Después de 4 o 24 h de incubación con los distintos tratamientos, las muestras se centrifugaron a 2.000 rpm durante 10 minutos, se tomaron los sobrenadantes y se midieron las intensidades de absorbancia de los mismos a 414 nm con el espectrofotómetro UV-Vis NanoDrop1000. A dicha longitud de onda absorbe la hemoglobina liberada de los glóbulos rojos, en caso de existir proceso hemolítico. El porcentaje de hemólisis de cada muestra se calculó considerando a la liberación de

hemoglobina inducida por el control positivo de SDS como el 100%. Este ensayo se realizó por triplicado, a partir de tres muestras de sangre, utilizando complejos obtenidos en distintos procesos de complejación.

2.6.4 Estudio de cambios morfológicos de los glóbulos rojos

Los posibles cambios morfológicos en los glóbulos rojos se determinaron mediante microscopía óptica. Para ello, se realizaron extendidos de las células luego de las 4 o 24 h de incubación con las concentraciones más elevadas de cada uno de los tratamientos descriptos anteriormente. Estos extendidos se fijaron con metanol frío por 2 minutos, se tiñeron con Giemsa durante 20 minutos para aumentar el contraste y se lavaron con agua corriente por 2 minutos para retirar el excedente de colorante. Finalmente, los extendidos se fotografiaron con un microscopio Leica DMI 6000 B (Leica Microsystems, EE. UU.).

2.7 Toxicidad *in vitro* en cultivo celular de Neuro-2a

2.7.1 Línea celular

Para estudiar los posibles efectos tóxicos *in vitro* de las distintas drogas y los complejos D-droga, se utilizó la línea celular Neuro-2a. Esta línea de neuroblastoma de ratón es de rápido crecimiento en monocapa y se ha utilizado ampliamente para estudiar la diferenciación neuronal, el crecimiento de las neuritas, la sinaptogénesis y la vía de señalización^{179,180}. Asimismo, las células Neuro-2a se han utilizado para estudiar la neurotoxicidad de distintos tratamientos y como modelo de la EdA^{181,182}. Esta línea celular fue generosamente donada por el banco de células del Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE), La Plata, Buenos Aires, Argentina. Para el mantenimiento de las células, se utilizó MEM suplementado con 10% SFB y 1% antibiótico-antimicótico en una atmósfera con 5% de CO₂.

2.7.2 Tratamientos

Las células se repicaron y se sembraron a una densidad de 7000 células por pocillo en placas de 96 pocillos de fondo plano; se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂. Después de 24 h, el medio de cada pocillo se reemplazó con 90 µL de MEM fresco (con 10% SFB) y se le agregaron 10 µL de diluciones seriadas en PBS de cada tratamiento. Las concentraciones finales de drogas, dendrímeros y complejos D-droga evaluados fueron:

- ✓ CBZ en el rango de 3×10^{-3} –30 µM
- ✓ Complejos D-CBZ en el rango de $1,2 \times 10^{-4}$ –1,2 µM de dendrímeros y 3×10^{-3} –30 µM de CBZ
- ✓ DG4.0 y DG4.5 en el rango de $1,2 \times 10^{-4}$ –1,2 µM (control de complejos D-CBZ)

- ✓ TAC en el rango de 0,03–300 μM
- ✓ Complejos D-TAC en el rango de $1,8 \times 10^{-4}$ –1,8 μM de dendrímeros y 0,03–300 μM de TAC
- ✓ DG4.0 y DG4.5 en el rango de $1,8 \times 10^{-4}$ –1,8 μM (control de complejos D-TAC)

- ✓ CUR en el rango de 0,625–10 μM
- ✓ DG4.0-CUR en el rango de 0,084–1,4 μM de dendrímero y 0,625–10 μM de CUR
- ✓ DG4.5-CUR en el rango de 0,15–2,4 μM de dendrímero 0,625–10 μM de CUR
- ✓ DG4.0 en el rango de 0,084–1,4 μM (control de complejos DG4.0-CUR)
- ✓ DG4.5 en el rango de 0,15–2,4 μM (control de complejos DG4.5-CUR)

En todos los ensayos se utilizaron dos controles: como control del tratamiento se utilizaron células incubadas solo con PBS, mientras que como control de tinción/reacción se utilizaron pocillos sin células. Además, como las muestras de CUR libre se obtuvieron a partir de un stock concentrado en DMSO, se adicionó un control de DMSO al 0,1% (v/v) en PBS, que iguala a la concentración máxima de DMSO a la que se expusieron las células cuando se incubaron con la mayor concentración de CUR.

Después de 4 o 24 h de incubación, los tratamientos se retiraron y se reemplazaron por los reactivos requeridos de acuerdo con cada método implementado (**Figura 2.13**). La citotoxicidad se determinó mediante tres métodos colorimétricos: ensayo de viabilidad por tinción con cristal violeta (CV), ensayo de actividad metabólica por la reacción de MTT y ensayo de afección de membranas por de captación de rojo neutro (RN).

Para cada ensayo, se utilizaron ocho réplicas técnicas y tres réplicas biológicas para cada dilución ($n = 24$). Con réplicas técnicas nos referimos a la cantidad de pocillos utilizados para el mismo tratamiento en una misma placa, mientras que con réplicas biológicas nos referimos a la cantidad de placas distintas que se utilizaron (cada placa de sembró con células en distinto número de pasaje, obtenidas por repiques en distintos días de ensayo).

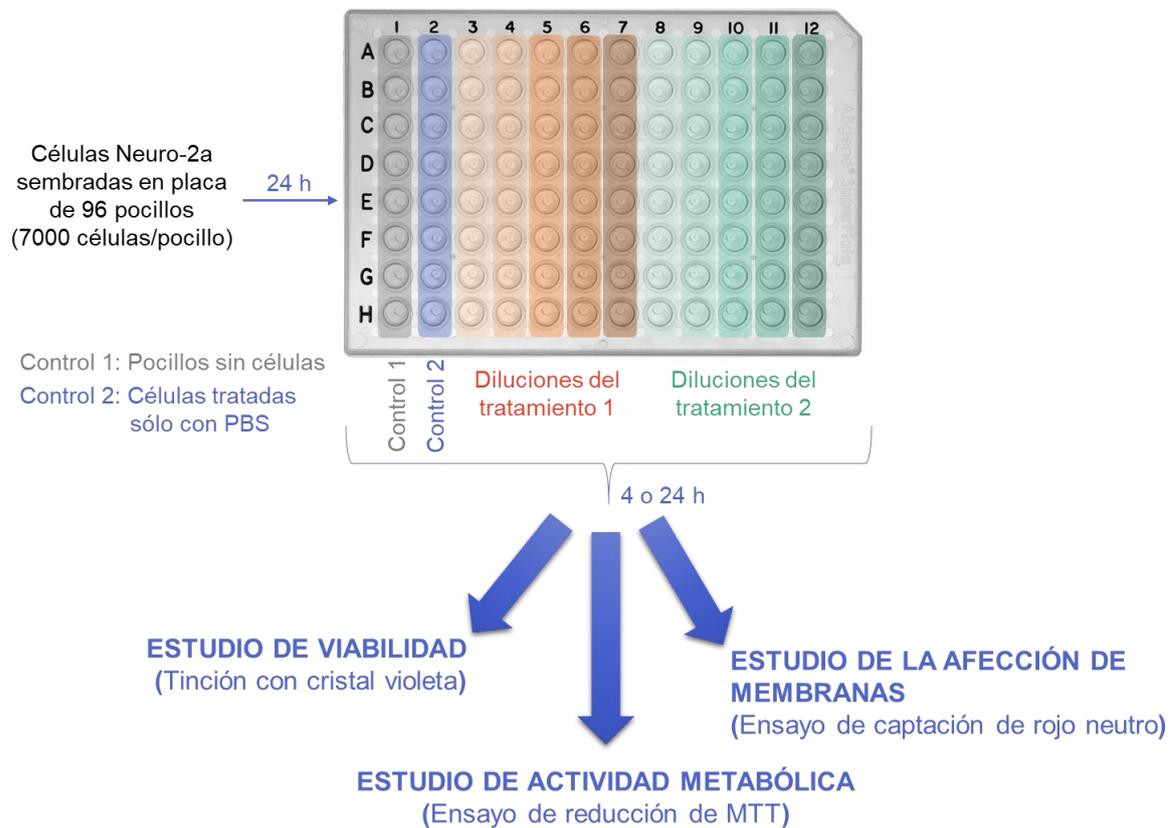


Figura 2.13 – Esquema del tratamiento y ensayos realizados en cultivo celular. Las células Neuro-2a fueron tratadas con distintas concentraciones de drogas, dendrímeros o complejos D-droga por 4 o 24 h. Luego de dicho periodo de incubación se estudió la viabilidad celular, la actividad metabólica y la afección de las membranas.

2.7.3 Estudio de la viabilidad celular (tinción con cristal violeta)

La línea celular Neuro-2a está compuesta por células que crecen adheridas a la base de la placa de cultivo formando una monocapa. Cuando ocurre la muerte celular, las células se desprenden de la placa y quedan en suspensión, por lo que la determinación de la cantidad de células unidas al sustrato es un parámetro de la viabilidad celular. Un método sencillo para detectar células unidas implica la tinción con cristal violeta (CV), un colorante que se une a las proteínas y al ADN¹⁸³. El ensayo de CV se basa en el protocolo descrito por Gillies y col. (1986) con las modificaciones propuestas en Gasparri y col. (2011)^{184,185}.

Luego 4 o 24 h de incubación, los tratamientos se reemplazaron por 100 µL de solución CV a una concentración final de 0,1% (p/v) en una mezcla 1:4 de metanol:agua. Las placas se incubaron durante 5 minutos en cámara húmeda para favorecer la permeabilización y tinción del colorante. Luego, se eliminó la solución de CV y se realizó un lavado con agua desionizada para eliminar los restos de solución de tinción. Finalmente, se agregaron 100 µL de solución al 30% (v/v) de ácido acético para permeabilizar las células y solubilizar al colorante (**Figura 2.14**). La absorbancia a 530

nm se determinó utilizando el lector de microplacas Cytation5 (BioTek Instruments, EE. UU.). Dicho parámetro es proporcional a la cantidad de células vivas unidas a la placa. La absorbancia obtenida en los pocillos control, con células incubadas solo con PBS, se utilizó para establecer el 100% de la viabilidad celular y los resultados de los demás tratamientos se relativizaron a este valor.



Figura 2.14 – Esquema de la determinación de viabilidad celular por tinción con cristal violeta. Las células se incubaron con una solución de CV en cámara húmeda. Las monocapas teñidas se lavaron con agua desionizada. Luego, se agregó una solución de ácido acético para permeabilizar las células y solubilizar el colorante. Finalmente, se determinó la absorbancia a 530 nm, parámetro que es proporcional a la cantidad de células unidas a la placa.

2.7.4 Estudio de la actividad metabólica (ensayo de reducción de MTT)

El reactivo MTT es una sal de tetrazolio soluble en agua, que es transformado en un formazan púrpura insoluble por la enzima succinato deshidrogenasa dentro de las mitocondrias celulares. El producto formazan es impermeable a las membranas celulares y, por lo tanto, se acumula dentro de las células metabólicamente activas. El ensayo de MTT se basa en el protocolo descrito por primera vez por Mosmann en 1983¹⁸⁶.

Después de 4 o 24 h de incubación, los tratamientos se reemplazaron por 100 µL de una solución 0,5 mg/mL de MTT en medio de cultivo. Las placas se incubaron a 37 °C por el tiempo necesario para que ocurra la reacción, es decir hasta observar un puntillado púrpura en la monocapa celular. Luego, las monocapas se lavaron con PBS, para eliminar los restos de la solución de MTT. Posteriormente, el PBS se reemplazó por 100 µL de DMSO para permeabilizar las células y

solubilizar los cristales de formazan que se acumularon en su interior. La absorbancia a 570 nm se determinó utilizando el lector de microplacas Cytation5 (Figura 2.15). Dicho parámetro es proporcional a la actividad metabólica celular. La absorbancia obtenida en las células control incubadas solo con PBS, se utilizó para establecer el 100% de la actividad metabólica, y los resultados de los demás tratamientos se relativizaron a dicho valor.

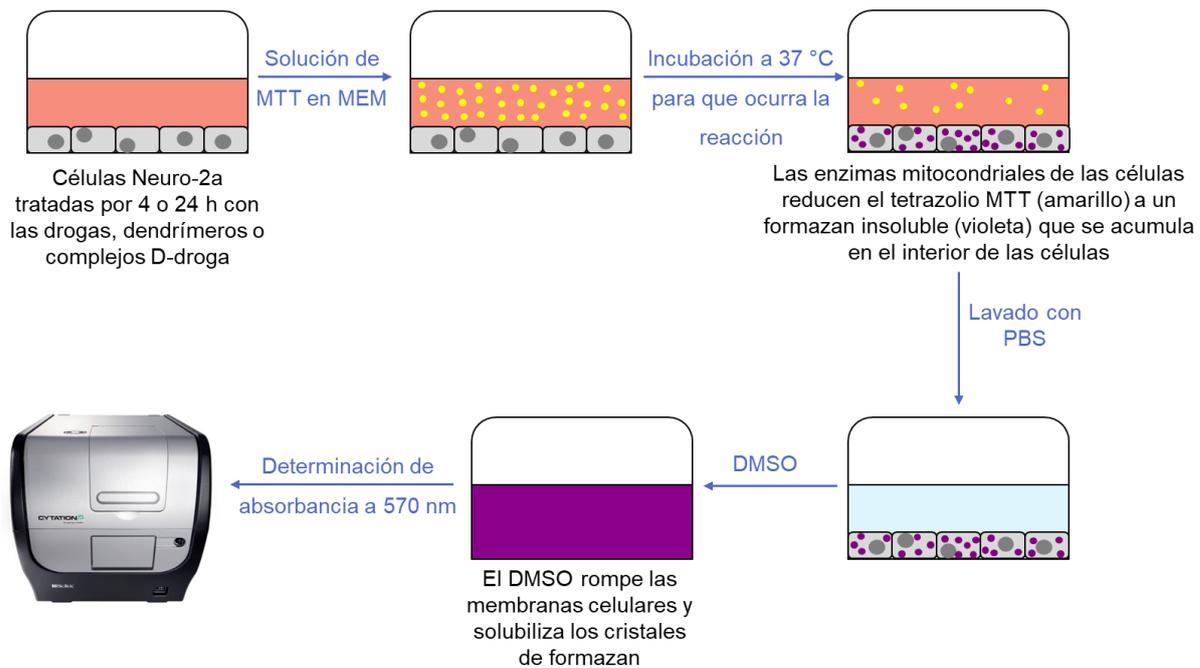


Figura 2.15 – Esquema de la determinación de la actividad metabólica celular por el ensayo de MTT. Las células se incubaron con una solución de MTT a 37 °C por el tiempo necesario para que ocurra la reacción. Luego, se realizó un lavado con PBS, seguido de la adición de DMSO para permeabilizar las células y solubilizar los cristales de formazan. Finalmente, se determinó la absorbancia a 570 nm, parámetro que es proporcional a la actividad metabólica celular.

2.7.5 Estudio de afeción de membranas (ensayo de captura de rojo neutro)

Los colorantes catiónicos como el rojo neutro (RN) tienen la capacidad de ingresar en las células vivas por difusión pasiva. Una vez dentro de las células, el colorante puede interactuar por uniones electrostáticas con sitios aniónicos ricos en tensioactivos de la matriz lisosomal. Por lo tanto, si la membrana plasmática y las membranas lisosomales de las células no están dañadas, el compuesto catiónico se concentrará dentro de los lisosomas ⁷⁴. Las sustancias que dañan las membranas celulares resultarán en el decremento de la captura y unión del RN. Es por ello, que la medida de la captación de RN es un parámetro que hace referencia al estado de las membranas celulares. El ensayo de RN utilizado en este trabajo se basa en el protocolo descrito por Borenfreund y Puerner en 1985 ¹⁸⁷.

Luego de la incubación por 4 o 24 h, los tratamientos se reemplazaron por 100 μL de una solución 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de RN en MEM. Las placas se incubaron a 37 °C durante el tiempo necesario para que ocurra la captación del colorante, es decir hasta observar un puntillado rojo sobre la monocapa celular. Luego, se eliminó la solución de RN y las células se incubaron con 100 μL de una mezcla con 1% (v/v) formaldehído y 1% (p/v) carbonato de sodio, para eliminar el colorante no incorporado y, simultáneamente, promover la adhesión de las células al sustrato. Posteriormente, las células se lavaron con 100 μL de solución salina 0,9% (p/v) de NaCl para eliminar los restos de formaldehído. Se retiró la solución salina y se agregaron 100 μL en cada pocillo de una mezcla con 1% (v/v) ácido acético y 50% (v/v) etanol, seguido de una agitación suave durante 10 minutos, con el objetivo de permeabilizar las células y solubilizar completamente el colorante RN. La absorbancia a 540 nm se determinó utilizando el lector de microplacas Cytation5 (Figura 2.16). La absorbancia en las células control incubadas solo con PBS, se utilizó para establecer el 100% de captación de NR, y los resultados de los demás tratamientos se relativizaron a dicho valor.

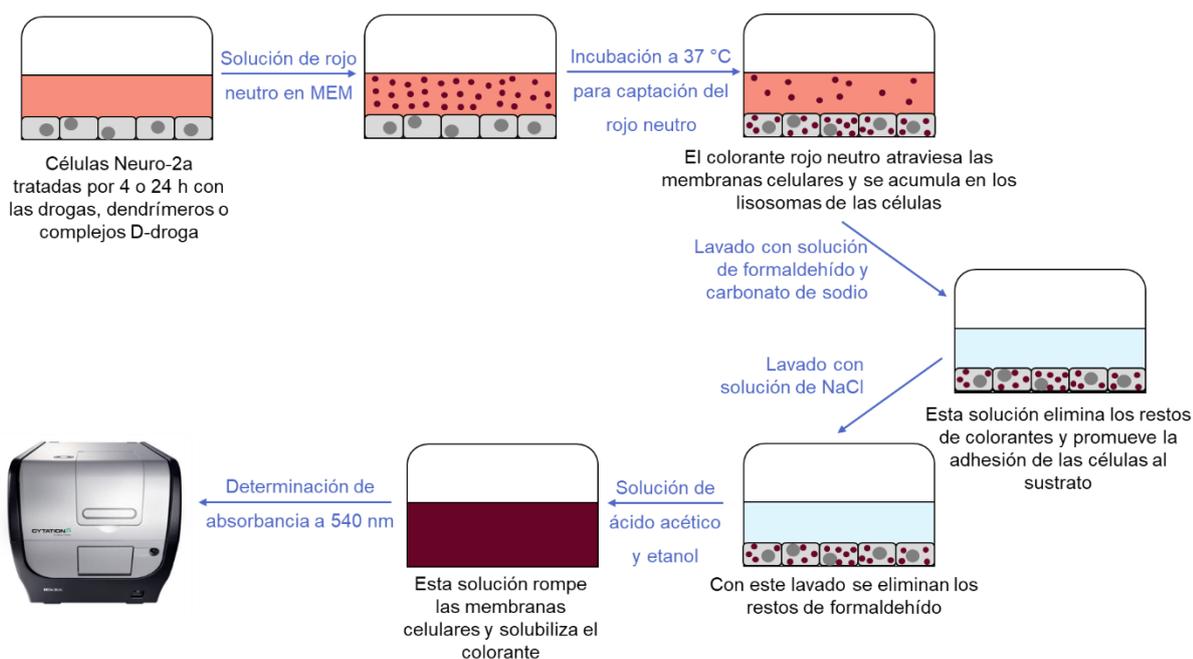


Figura 2.16 – Esquema de la determinación de afectación de las membranas celulares por el ensayo de captación de rojo neutro. Las células se incubaron con una solución de RN a 37 °C por el tiempo necesario para que ocurra la captación del colorante. Luego, las monocapas se lavaron con una mezcla de formaldehído y carbonato de sodio, y después con una solución salina. Finalmente, se agregó una solución de ácido acético y etanol con el objetivo de permeabilizar las células y extraer el colorante. Finalmente, se determinó la absorbancia a 540 nm, parámetro que puede referirse al estado de las membranas celulares.

2.8. Biocompatibilidad *in vivo* en larvas de *zebrafish*

2.8.1. Mantenimiento de los animales adultos y obtención de embriones

Los *zebrafish* (*Danio rerio*) han emergido como un modelo poderoso y alternativo al uso de roedores⁸⁰, que cumplen con el principio de las 3R para la investigación con animales (reducir, refinar y reemplazar)⁸¹. Por ello, en este trabajo, se propuso la realización de los estudios de nanobiocompatibilidad en larvas de *zebrafish* desde el 5 día post-fecundación (dpf), hasta el 7 dpf.

Los *zebrafish* adultos (2 a 24 meses de edad) se mantuvieron a 28 ± 1 °C en peceras con un ciclo de 14 h de luz - 10 h de oscuridad, como se describió anteriormente^{188,189}. Fueron alimentados con escamas secas (TetraMin PRO®) tres veces al día y con alimento vivo (larvas de artemia) una vez al día. El agua de las peceras se mantuvo constantemente aireada y en el rango de pH 7,0-8,0.

Para la obtención de embriones por apareamiento natural (**Figura 2.17**), la noche anterior al día de desove, se seleccionaron hembras y machos sexualmente activos (8 a 16 meses de edad) y se separaron en trampas hechas de malla de plástico dentro de la misma pecera. A la mañana siguiente, se mezclaron hembras y machos para que naturalmente se produzca el desove y posterior fecundación. Luego de 1 h post-fecundación, se colectaron los embriones (huevos) y se mantuvieron en medio E3 a 28 ± 1 °C con el mismo ciclo de luz-oscuridad. El medio E3 estuvo compuesto por NaCl 5 mM, KCl 0,17 mM, CaCl₂ 0,33 mM y MgSO₄ 0,33 mM en agua desionizada con 500 ppb de azul de metileno como fungicida. Las características de los huevos se determinaron con un estereomicroscopio Nikon SMZ800 (Nikon, EE. UU). Los huevos fertilizados y en buenas condiciones se seleccionaron y mantuvieron para los posteriores tratamientos.

En este trabajo, nos referimos como embriones a los *zebrafish* de 0 a 3 dpf y como larvas a los animales de 3 a 60 dpf. Los estudios de biocompatibilidad fueron realizados en el estadio larvario. Todos ellos fueron realizados en estricta concordancia con guía del Instituto Nacional para el cuidado y mantenimiento de los animales de EE.UU. (*National Institute of Health guidelines for animal care and maintenance*). Además, los protocolos de trabajo fueron aprobados por el Comité Institucional del Cuidado Animal de la Universidad Nacional de Quilmes (CE-UNQ 2/2014) y el Comité Institucional para el cuidado y uso de animales de laboratorio (CICUAL) de la Universidad Nacional de Quilmes (CICUAL-UNQ 013-15 and 014-15).

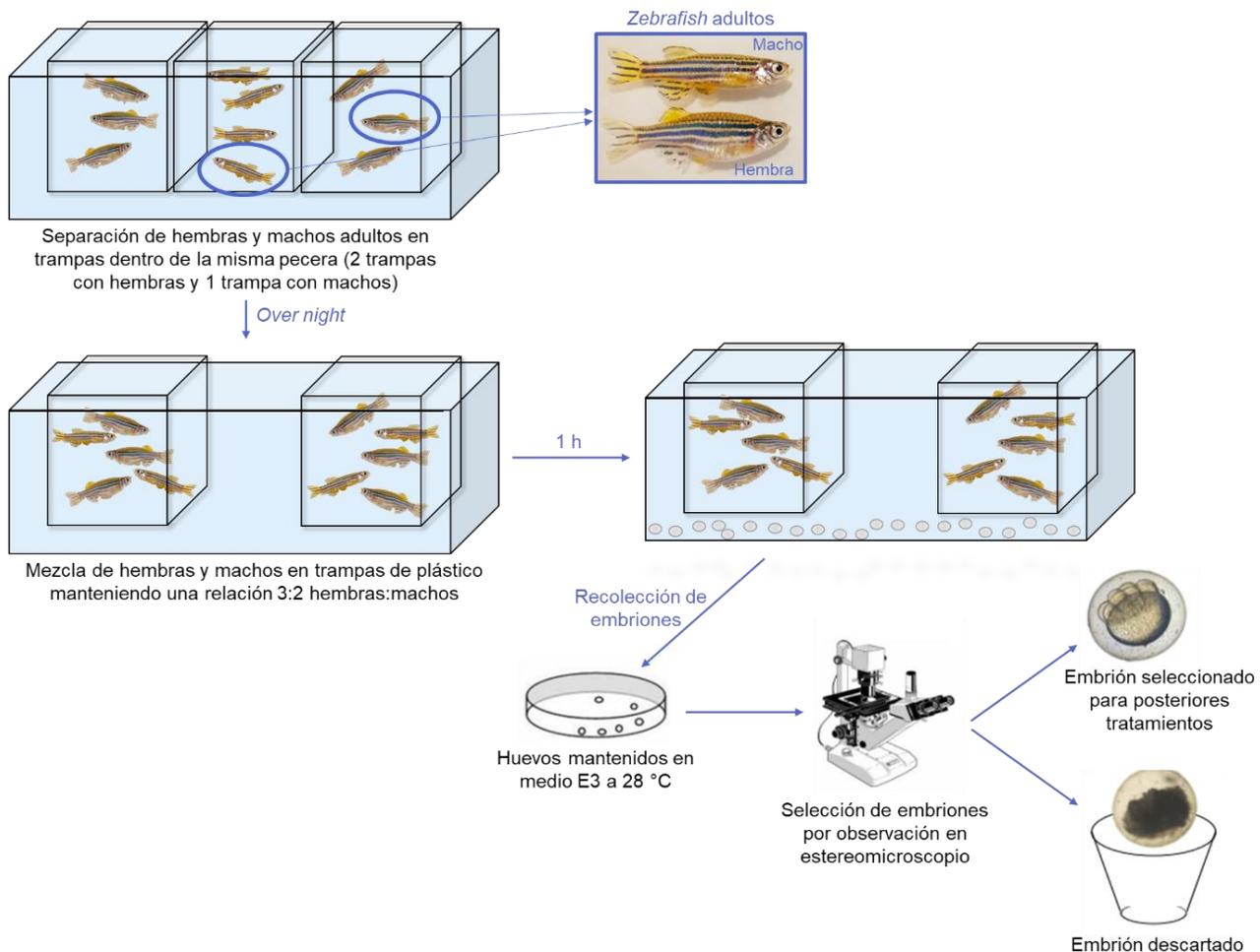


Figura 2.17 – Esquema de obtención y selección de embriones de *zebrafish*. Los embriones de *zebrafish* se obtuvieron por apareamiento natural de hembras y machos adultos sexualmente activos. Una vez recolectados, se mantuvieron en medio E3 a 28 °C hasta la selección de los embriones en buenas condiciones para posteriores tratamientos.

2.8.2 Tratamientos

A los 5 dpf, el cerebro, el corazón, el hígado, el páncreas, los riñones, el intestino y los sistemas sensoriales de las larvas son completamente funcionales⁷⁹. Por lo tanto, la administración de un tratamiento antes de los 5 dpf podría utilizarse para evaluar los efectos de dicho tratamiento en la formación de órganos (estudios de teratogenicidad); de lo contrario, una administración en el 5 dpf o posterior permitiría el estudio del efecto sobre órganos ya formados y funcionales (estudio de la biocompatibilidad). En este trabajo realizamos la administración de los tratamientos en el 5 dpf (Figura 2.18).

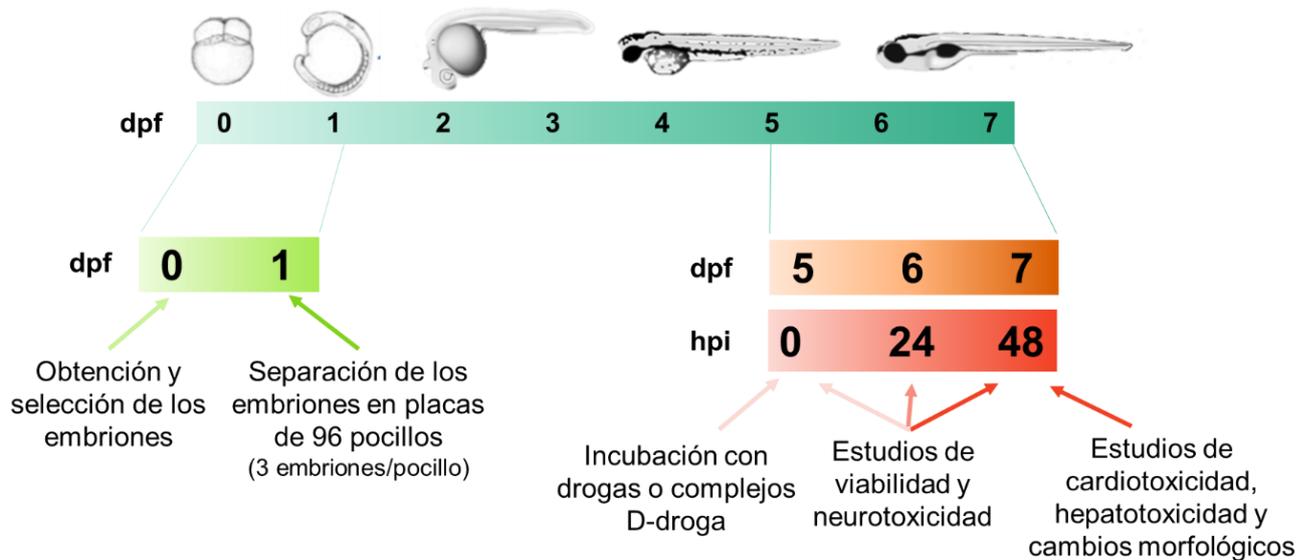


Figura 2.18 – Esquema del desarrollo de los *zebrafish* y de los ensayos de biocompatibilidad *in vivo*.

Al 1 dpf, se seleccionaron los huevos fertilizados y se traspasaron a placas de 96 pocillos con medio E3. Al 5 dpf, las larvas fueron incubadas con las drogas o complejos D-droga. Entre el 5 y 7 dpf se realizaron los estudios de biocompatibilidad en las distintas h post-incubación (hpi).

Los embriones se obtuvieron por apareamiento natural, como se describió previamente. Al 1 dpf los embriones fertilizados y en buenas condiciones fueron seleccionados y separados en placas de 96 pocillos (3 embriones/pocillo) con medio E3. Estas placas se incubaron a 28 ± 1 °C durante 4 días adicionales, bajo un ciclo de 14 h luz – 10 h oscuridad. Durante este período ocurre la eclosión de todos los embriones para pasar al estado larvario. Al 5 dpf, el medio se reemplazó por 225 μ L de medio E3 fresco y se le adicionaron 25 μ L de diluciones seriadas en PBS de los distintos tratamientos. Las concentraciones finales evaluadas fueron:

- ✓ CBZ en el rango de 0,3–30 μ M
- ✓ Complejos D-CBZ en el rango de 0,012–1,2 μ M de dendrímeros y 0,3–30 μ M de CBZ

- ✓ TAC en el rango de 0,3–30 μ M
- ✓ Complejos D-TAC en el rango de 0,0018–0,18 μ M de dendrímeros y 0,3–30 μ M de TAC

- ✓ CUR en el rango de 0,625–10 μ M
- ✓ DG4.0-CUR en el rango de 0,084–1,4 μ M de dendrímero y 0,625–10 μ M de CUR
- ✓ DG4.5-CUR en el rango de 0,15–2,4 μ M de dendrímero 0,625–10 μ M de CUR

Como control negativo se utilizaron larvas incubadas solo con PBS (Figura 2.19). En este ensayo no se realizaron los correspondientes controles con dendrímeros libres dado que los efectos de estos en las larvas de *zebrafish* fueron estudiados por nuestro grupo de investigación con

anterioridad ¹⁵⁸. Además, como las muestras de CUR libre se obtuvieron a partir de un stock concentrado en DMSO, debido a la insolubilidad de la droga en agua; se adicionó un control de DMSO al 0,1% (v/v) en PBS, que iguala a la concentración máxima de solvente a la que se expusieron las larvas cuando se incubaron con 10 μ M de CUR.

Las placas con larvas tratadas se mantuvieron en incubadora con el mismo ciclo luz-oscuridad. Estos tratamientos se realizaron en tres réplicas biológicas; es decir que se realizaron en tres ocasiones con embriones obtenidos a partir de distintos padres (de este modo se incrementa la variabilidad genética del ensayo). A partir de cada placa de larvas tratadas se realizaron todos los estudios de biocompatibilidad (viabilidad, neurotoxicidad, cardiotoxicidad, hepatotoxicidad y cambios morfológicos), con el objetivo de correlacionar los efectos observados. Los métodos utilizados para cada una de estas determinaciones de biocompatibilidad se explican a continuación.

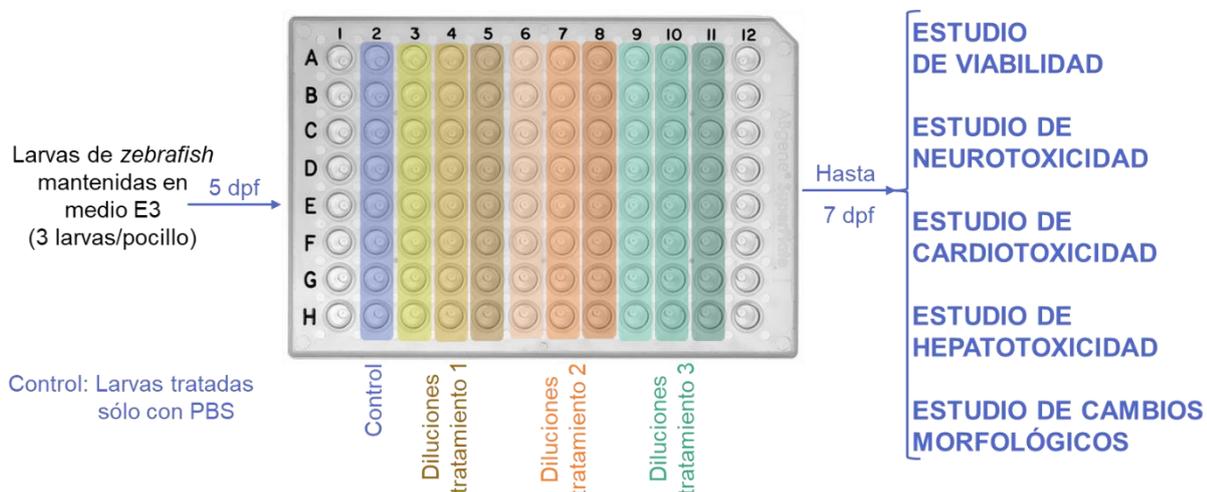


Figura 2.19 – Esquema del tratamiento y ensayos realizados en larvas de *zebrafish*. Las larvas de 5 dpf fueron incubadas con las drogas y los complejos D-droga. Estas larvas se mantuvieron hasta el 7 dpf. A las 1, 4, 24 y 48 h post-incubación (hpi) se determinó la viabilidad y la actividad de nado espontáneo (parámetro de neurotoxicidad). A las 48 hpi (7 dpf), se realizaron los estudios de cardiotoxicidad, hepatotoxicidad y cambios morfológicos.

2.8.3 Estudio de la viabilidad

La viabilidad de las larvas tratadas se estudió a las 1, 4, 24 y 48 h post-incubación (hpi) utilizando un estereomicroscopio. Se consideró que las larvas estaban muertas cuando no se observó latido cardíaco. La viabilidad se expresó como el porcentaje de larvas vivas respecto del total de larvas por tratamiento. Este estudio incluyó 24 réplicas técnicas y 3 réplicas biológicas para cada dilución testeada (n=72). Con réplicas técnicas nos referimos a la cantidad de pocillos que se utilizaron en cada réplica biológica (8 pocillos con 3 larvas/pocillo).

2.8.4 Estudio del movimiento espontáneo: neurotoxicidad

El movimiento espontáneo de las larvas se estudió con un sistema multicanal automatizado acoplado a un conversor analógico/digital (WMicrotracker, Designplus SRL, Argentina), tal como se describió previamente en Igartúa y col. (2015) ¹⁷⁸. Este sistema cuenta con un haz de luz infrarroja que atraviesa cada pocillo de una placa de 96 pocillos; cuando el haz de luz es interrumpido por el movimiento de una larva, se produce una interrupción en la señal considerada como un evento de actividad. De este modo, el equipo permite determinar el número de eventos de actividad en cada pocillo de una placa de 96 pocillos durante un periodo de tiempo determinado. Para este ensayo, los eventos de actividad se analizaron a temperatura ambiente durante 15 minutos a las 1, 4, 24 y 48 hpi. El movimiento espontáneo de cada tratamiento se expresó como un porcentaje respecto del promedio de eventos de actividad en el grupo de larvas control, tratadas solo con PBS. Los cambios en el movimiento espontáneo podrían deberse a efectos neurotóxicos del tratamiento ^{190,191}, a cambios morfológicos que afecten el nado de las larvas, o a efectos letales. Este estudio incluyó 8 réplicas técnicas y 3 réplicas biológicas para cada dilución testeada (n=24).

2.8.5 Estudio del ritmo cardíaco: cardiotoxicidad

El estudio del ritmo cardíaco de las larvas se realizó a las 48 hpi (7 dpf). Para ello, las larvas fueron transferidas individualmente a un portaobjeto, inmovilizadas con una suspensión de carboximetilcelulosa sódica, y observadas en un estereomicroscopio trinocular acoplado a una cámara Microsoft. Se grabaron videos de las larvas durante 15 segundos, a partir de los cuales se realizó, posteriormente, el conteo manual del número de latidos y se expresó como latidos por minuto. El conteo manual se realizó tres veces a partir de cada video, con el objetivo de disminuir el error de esta medida. Este experimento se realizó en 8 larvas de cada una de las 3 réplicas biológicas para cada dilución testeada (n=24). Nuevamente, los resultados de cada tratamiento se expresaron como un porcentaje respecto del promedio de latidos de las larvas control. Las diferencias en el ritmo cardíaco de las larvas tratadas respecto de las larvas control puede considerarse un efecto cardiotoxico ¹⁹².

2.8.6 Estudio de los cambios morfológicos

Las 8 larvas de cada una de las 3 réplicas biológicas (n=24) que se utilizaron para determinar el ritmo cardíaco, fueron posteriormente fotografiadas para analizar sus cambios morfológicos. Cada una de estas larvas recibió un puntaje en función de la cantidad de malformaciones que presentara, según:

- 0 (sin cambios)= para las larvas que no presentaron cambios morfológicos
- 1 (cambios menores)= para las larvas que presentaron 1 o 2 anomalías morfológicas
- 2 (cambios moderados)= para las larvas que presentaron 3 o 4 anomalías morfológicas

- 3 (cambios graves)= para las larvas que presentaron más de 4 anomalías
- 4 (muerte)= para las larvas que no presentaron latido cardíaco

Este sistema de puntuación resultó de la adaptación de un método propuesto por Fako y Furgeson (2009) ⁷⁵. Los cambios morfológicos que se consideraron en este estudio incluyeron la presencia de columna doblada, malformación de mandíbula, malformación de cola, malformación de cabeza, necrosis en la región de la cabeza, necrosis hepática, necrosis del saco vitelino, vitelo no consumido, vejiga natatoria desinflada y presencia de edemas (Figura 2.20). A partir del puntaje obtenido para cada larva, se calculó el promedio de cambios morfológicos de cada tratamiento estudiado.

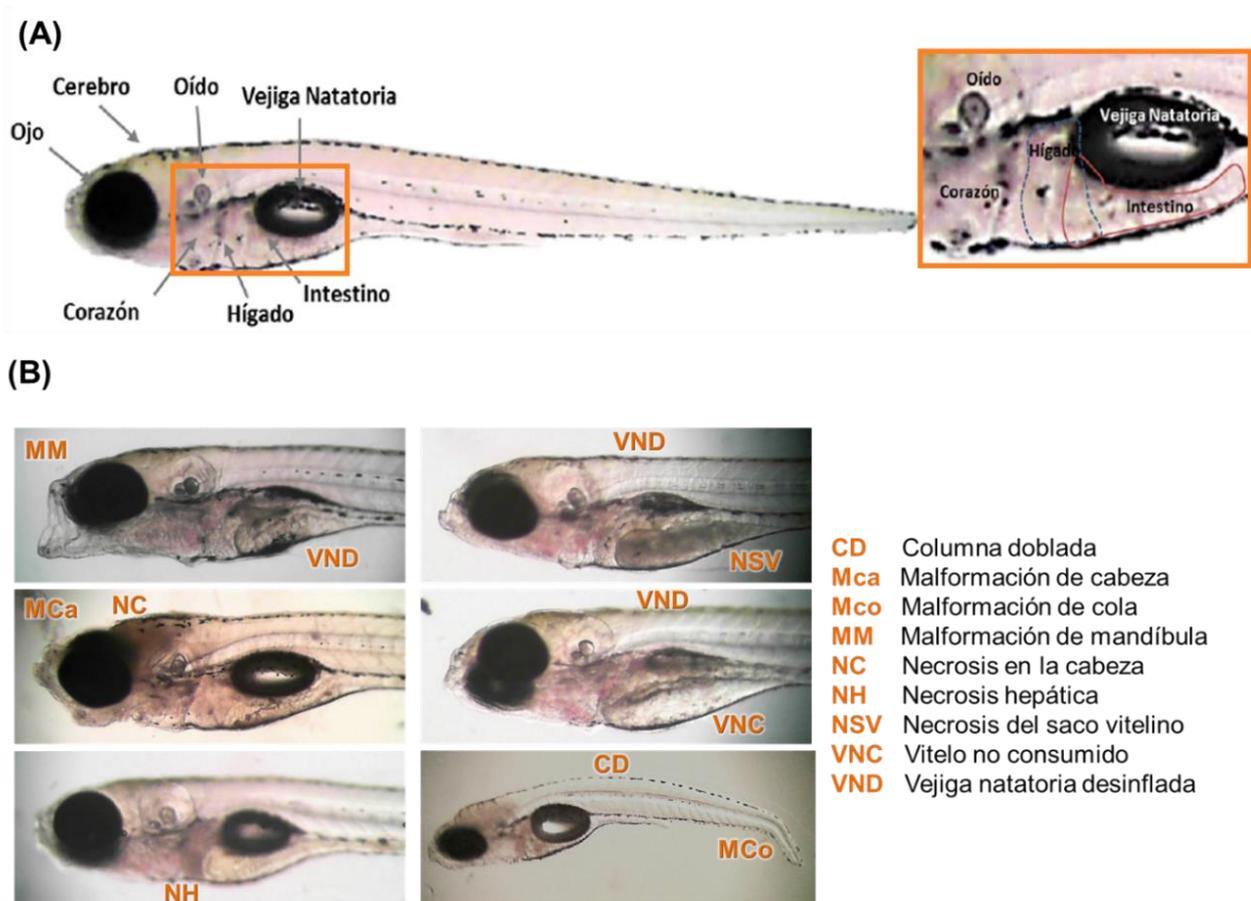


Figura 2.20 – Morfología de larvas de *zebrafish*. (A) Morfología de una larva de *zebrafish* control de 7 días post-fecundación (dpf) en posición dorsolateral. (B) Fotografías ejemplificando las anomalías que se pueden observar en las larvas a los 7 dpf, y que fueron analizadas en el sistema de puntuación de cambios morfológicos.

2.8.7 Estudio de la hepatotoxicidad

Utilizando las fotografías realizadas para analizar los cambios morfológicos de las larvas, y el método validado por He y col. (2013), se analizó el estado del hígado de las larvas control y de las

larvas tratadas con las drogas y los complejos D-droga. El hígado está situado en la zona posterior al pericardio y anterior al intestino, y puede ser observado cuando la larva se encuentra en posición dorsolateral. Un hígado sano se ve claro y translúcido, mientras que un hígado dañado se vuelve oscuro y opaco (**Figura 2.21**), indicando la degeneración y/o necrosis del tejido ¹⁹³. Por lo tanto, cada una de las 8 larvas de las tres réplicas biológicas (n=24) fue observada y se determinó si su hígado presentaba signos de degeneración o necrosis. Los resultados se expresaron como el porcentaje de larvas que presentaban el hígado opaco respecto del total de larvas por tratamiento.

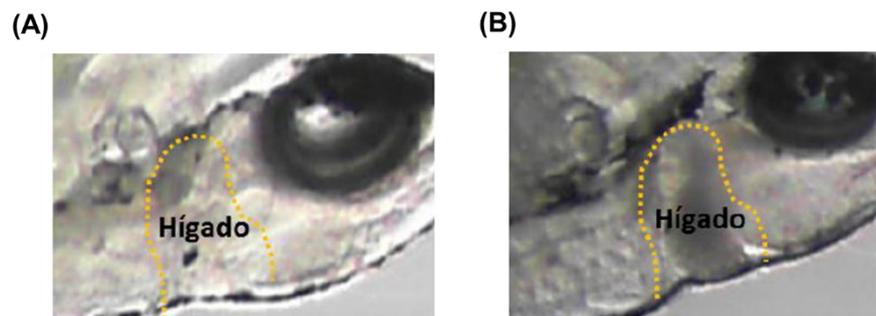


Figura 2.21 – Morfología del hígado de larvas de *zebrafish*. (A) Morfología del hígado de una larva de *zebrafish* de 7 días post-fecundación (dpf). Cuando no hay degeneración/necrosis, el hígado se ve claro y translúcido. (B) Morfología del hígado de una larva de *zebrafish* de 7 dpf luego del tratamiento con una droga hepatotóxica. Cuando hay degeneración o necrosis, el hígado se vuelve oscuro y opaco.

2.9 Análisis estadístico

Todos los resultados se expresaron como el promedio \pm el desvío estándar (SD, por sus siglas del inglés *standard deviation*) de los datos obtenidos. El análisis estadístico fue realizado utilizando el programa Graph Pad Prism v6.0.

Dependiendo del diseño experimental empleado en cada ensayo y de la naturaleza de los datos obtenidos, se utilizaron los siguientes análisis estadísticos:

- Prueba T de Student (*T-test*), cuando se compararon dos poblaciones de datos entre sí.
- Análisis de varianza de un componente (ONE-WAY ANOVA), cuando se compararon más de dos poblaciones de datos entre sí, existiendo un único componente de variabilidad entre dichas poblaciones (por ejemplo: efecto de distintos tratamientos).
- Análisis de varianza de dos componentes (TWO-WAY ANOVA), cuando se compararon más de dos poblaciones de datos entre sí, existiendo dos componentes de variabilidad entre dichas poblaciones (por ejemplo: efecto de distintos tratamientos en varios tiempos de ensayo).

Si estos análisis de varianza reportaron diferencias entre las poblaciones de datos comparadas, posteriormente se realizaron los análisis de múltiples comparaciones (*post-test*) para determinar los grados de significancia. Dependiendo del diseño experimental, se utilizaron los siguientes análisis de múltiples comparaciones:

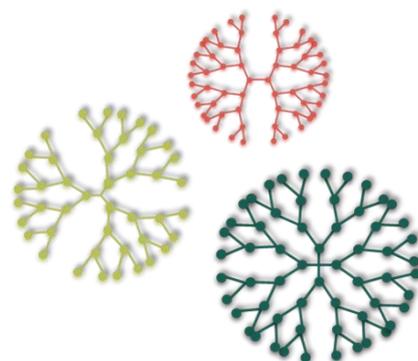
- *Post-test* de Dunnett, cuando se determinó una población de datos como muestra control y todas las demás poblaciones se compararon solo con dicho control. Este *post-test* se utilizó a continuación de ambos ONE-WAY y TWO-WAY ANOVA.
- *Post-test* de Tukey, cuando cada población de datos se comparó con todas las otras poblaciones de datos. Este *post-test* se utilizó a continuación de ambos ONE-WAY y TWO-WAY ANOVA.
- *Post-test* de Sidak, cuando dos poblaciones de datos se compararon entre sí. Se utilizó únicamente a continuación del TWO-WAY ANOVA.

En todos los casos, las diferencias se consideraron significativas solo cuando el valor p fue menor a 0,05. Los distintos grados de significancia obtenidos se representaron con asteriscos, siendo:

- * $p < 0,05$
- ** $p < 0,01$
- *** $p < 0,001$
- **** $p < 0,0001$
- ns: no significativo

Capítulo 3

Complejación de Carbamazepina



Capítulo 3 – Complejación de Carbamazepina

3.1 Introducción

El plegamiento incorrecto y la agregación anormal de proteínas específicas están implicados en los trastornos neurodegenerativos más prevalentes, incluyendo la enfermedad de Alzheimer (EdA), la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington. La generación de pequeños oligómeros, fibrillas y grandes agregados con propiedades amiloides altamente difusibles están implicados en estos procesos anormales ²⁵. Últimamente, los potenciadores del proceso de autofagia natural se han vuelto atractivos como tratamiento para la EdA, debido a la degradación selectiva de las proteínas anormalmente plegadas por la vía lisosómica y la interrupción de la agregación de proteínas ^{23,25,194,195}.

Más recientemente, se ha encontrado que la carbamazepina (CBZ), un fármaco anticonvulsivo y estabilizador del estado de ánimo aprobado por la FDA tiene un potente efecto incrementador de la autofagia ^{23,195}, reduciendo la acumulación y los efectos tóxicos de proteínas propensas a la agregación en modelos celulares *in vitro* y protegiendo contra la neurodegeneración *in vivo* ^{24,196–198}. Particularmente Li y col. (2013) estudiaron el efecto de la administración de CBZ en un ratón transgénico modelo de la EdA (APP^{swe}/PS1^{deltaE9}), y después de tres meses examinaron la función cognitiva, la neuropatología asociada a la EdA y el nivel de autofagia en el ratón. Los resultados más importantes encontrados por este grupo incluyen que la administración a largo plazo de CBZ regeneró las funciones relacionadas con la memoria y el aprendizaje espacial de los ratones, así como también redujo el número de placas seniles y los niveles de A β 42, y potenció los procesos de autofagia por una vía independiente de mTOR, sin afectar a vía dependiente de mTOR ²⁴. Por ello, en este trabajo se reposiciona el uso de este antiepiléptico para el tratamiento de la EdA.

La CBZ se administra tradicionalmente en su forma sólida o como suspensión por la vía oral, pero debido a su escasa solubilidad en agua (120 μ g/mL, 500 μ M, a 25 °C) ^{199–201}, tiene una absorción gastrointestinal lenta e irregular, lo que lleva a una biodisponibilidad incompleta del fármaco ^{202–204}. Además, esta solubilidad reducida no permite su incorporación en dosis terapéuticas en soluciones acuosas para inyección intravenosa ²⁰⁵. Asimismo, la farmacocinética de la CBZ es compleja porque no existe una relación directa entre la dosis oral administrada y la concentración del fármaco que se encuentra en el plasma ^{206,207}. Por lo tanto, es necesario usar una dosis alta (800-1.200 mg/día) para alcanzar la concentración terapéutica de CBZ, que se ha estimado en 0,004-0,012 mg/mL

^{208,209}. Además, la CBZ experimenta un extenso metabolismo hepático e inducción enzimática que resulta en fluctuaciones plasmáticas erráticas e inesperadas, que requieren ajustes sucesivos de la dosis ^{205,210}.

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, incrementar la solubilidad de la CBZ podría aumentar la velocidad de absorción, aumentar la biodisponibilidad oral y permitir la reducción de la dosis necesaria para lograr concentraciones terapéuticas. Por lo tanto, la incorporación de CBZ en dendrímeros, como sistema de *delivery*, podría mejorar la eficacia del tratamiento actual

Los dendrímeros PAMAM de generación 4.0 y 4.5 actuarían como nanotransportadores capaces de incorporar moléculas de droga en sus bolsillos internos o de anclarlas a sus grupos superficiales. Además, actuarían como nanodrogas *per se*. Entonces, en esta primera propuesta terapéutica tenemos el objetivo de desarrollar y caracterizar un sistema de *delivery* de CBZ basado en dendrímeros PAMAM, capaces de actuar como terapia combinada en el tratamiento de la EdA.

3.2 Resultados y discusión

3.2.1 Obtención de los complejos D-CBZ

Se ha reportado que los dendrímeros tienen la capacidad de aumentar la solubilidad y estabilidad de compuestos bioactivos. Esta solubilización y estabilización mediada por dendrímeros depende de varios factores, incluyendo factores relacionados con el nanomaterial (tipo, generación, tamaño, *core* y grupos funcionales que posea el dendrímero), con las condiciones del medio (pH, temperatura, fuerza iónica) y con el bioactivo (particularmente con la afinidad de interacción entre el fármaco y el dendrímero). Además, se ha descrito que los dendrímeros PAMAM generación 4.0 (DG4.0) y generación 4.5 (DG4.5) pueden tanto encapsular moléculas de fármacos en sus bolsillos interno, como anclarlas en sus grupos funcionales terminales. El fármaco complejado adquirirá las propiedades fisicoquímicas de los dendrímeros, que pueden aumentar significativamente su solubilidad en un medio acuoso y proporcionar un perfil de liberación controlada. En este sentido, la CBZ es poco soluble en agua (120 µg/mL, 500 µM, a 25 °C), por lo que resulta interesante estudiar su incorporación a dendrímeros.

En primer lugar, se evaluó la capacidad de ambos dendrímeros (DG4.0 y DG4.5) de formar complejos con la CBZ, por lo que se expusieron diferentes cantidades de droga a una cantidad constante de dendrímero, con el objetivo de estimar el número máximo de moléculas de CBZ que se pueden incorporar a cada molécula de dendrímero. Las relaciones molares teóricas estudiadas fueron 5, 10, 25, 50, 100, 150 y 200 moles de CBZ por mol de DG4.0 o DG4.5. Luego del protocolo de complejación, se determinó la cantidad de CBZ soluble y las relaciones molares experimentales obtenidas (**Figura 3.1**).

Cuando la relación molar fue 1:10 o superior, la CBZ soluble presente en los complejos D-CBZ fue significativamente mayor que la CBZ presente en el control de la droga en ausencia de dendrímeros (CBZ libre). Además, a medida que se incrementó la concentración de CBZ, se produjo un incremento en la cantidad de CBZ soluble en los complejos D-CBZ. Estos resultados confirman la interacción de la CBZ con los DG4.0 y DG4.5. En principio, como no se observaron diferencias significativas en la solubilización de la CBZ por los complejos DG4.0-CBZ y DG4.5-CBZ en la mayoría de las relaciones D:CBZ, suponemos que la interacción de la droga con los dendrímero se produce a través de la complejación dentro de los bolsillos internos de los dendrímeros, que son químicamente idénticos y tienen un tamaño similar.

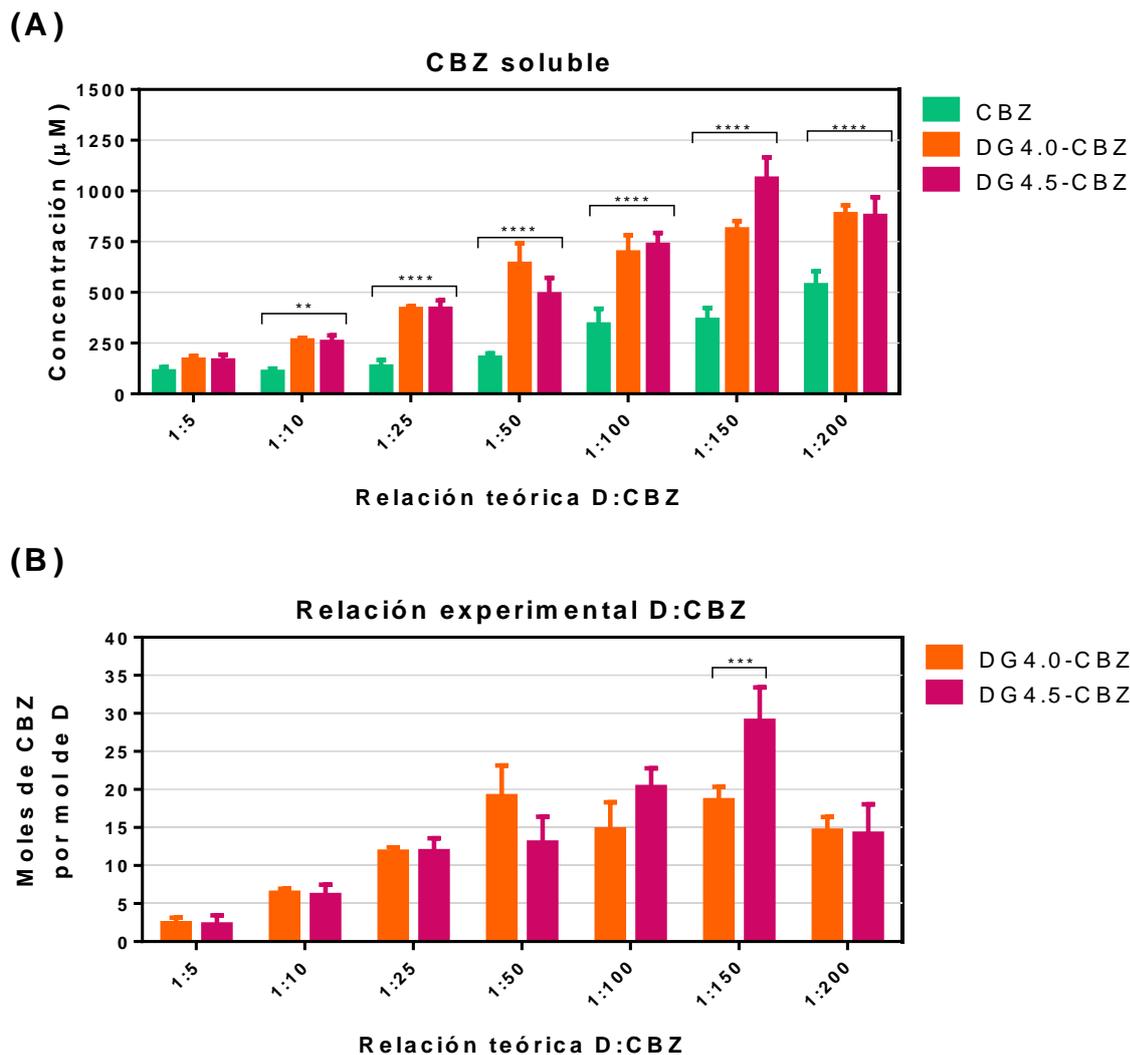


Figura 3.1 – Optimización de la relación molar D:CBZ utilizada para obtener los complejos D-CBZ. La CBZ y los dendrímeros combinaron en distintas relaciones molares teóricas D:CBZ. (A) Concentración de CBZ soluble luego del proceso de complejación. (B) Moles de CBZ por mol de DG4.0 o DG4.5 obtenidos luego del proceso de complejación.

En las relaciones molares superiores a 1:50, se alcanzó la saturación de los dendrímeros, dado que una mayor cantidad de CBZ disponible no se asoció con una cantidad significativamente mayor de CBZ complejada soluble. Sin embargo, particularmente en la relación molar 1:150, se observó una tendencia a una mayor cantidad de CBZ soluble en el complejo DG4.5-CBZ que en el complejo DG4.0-CBZ; por lo que dicha relación molar se utilizó para estudiar la reproducibilidad del protocolo de complejación.

Los resultados obtenidos al utilizar la relación teórica 1:150 D:CBZ (**Figura 3.2**) demuestran que, al formar complejos con dendrímeros, la solubilidad de CBZ aumentó significativamente en medios acuosos. En el control de CBZ libre se obtuvo una resuspensión promedio de $322,2 \pm 52,7 \mu\text{M}$,

mientras que en los complejos DG4.0-CBZ la resuspensión fue de $834,8 \pm 187,2 \mu\text{M}$ y en los DG4.5-CBZ de $898,7 \pm 279,4 \mu\text{M}$. De este modo, se logró triplicar la cantidad de CBZ soluble, a través de la complejación de un promedio de 21 ± 7 y 24 ± 11 moles de CBZ por mol de DG4.0 y DG4.5, respectivamente. Si bien se volvió a observar la tendencia hacia una mayor resuspensión de CBZ en los complejos DG4.5-CBZ respecto de los DG4.0-CBZ, la diferencia no fue significativa, posiblemente debido a la gran dispersión de los resultados. En este sentido, la relación 1:150 fue la utilizada para generar todos los complejos utilizados en los ensayos a continuación descriptos, y debido a la variabilidad observada, la cantidad de CBZ soluble se cuantificó en todas las muestras utilizadas.

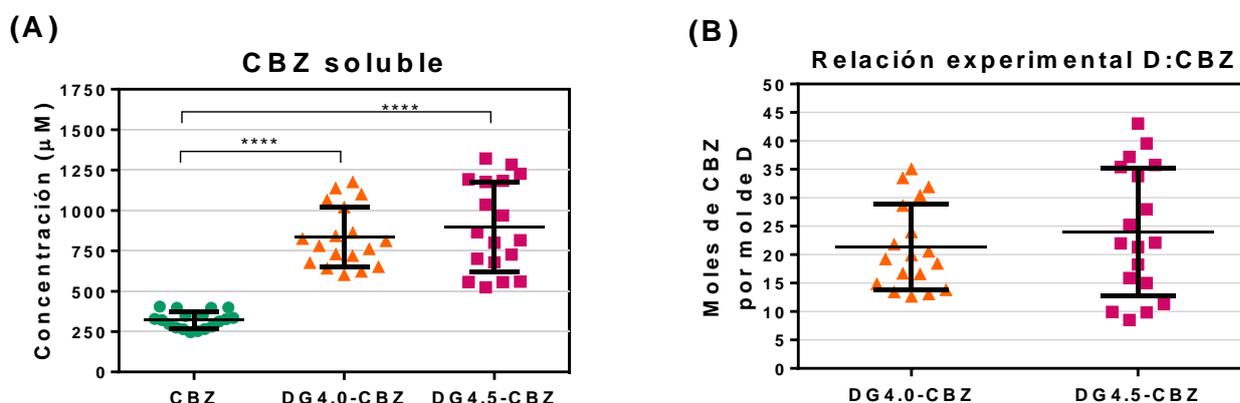


Figura 3.2 – Obtención de complejos utilizando la relación molar 1:150 D:CBZ. El protocolo de complejación se repitió ($n=18$) utilizando la relación 1:150 D:CBZ para estudiar su reproducibilidad. (A) Concentración de CBZ soluble luego del proceso de complejación. (B) Moles de CBZ por mol de DG4.0 o DG4.5 obtenidos luego del proceso de complejación.

3.2.2 Estudios de estabilidad de la CBZ en los complejos D-CBZ

Como se mencionó anteriormente, los dendrímeros tienen la capacidad de aumentar la solubilidad de los compuestos bioactivos y, también, su estabilidad en medios acuosos. Por ello, en este trabajo se estudió la estabilidad de la CBZ en los complejos D-CBZ desde tres enfoques distintos.

En primer lugar, la estabilidad en el tiempo de la CBZ en los complejos DG4.0-CBZ y DG4.5-CBZ se evaluó en diversas condiciones de temperatura (4, 25 y 37 °C) manteniéndose en la oscuridad durante 90 días luego de la complejación (Figura 3.3). A tiempos predeterminados se realizaron observaciones macroscópicas y determinaciones de la CBZ soluble. Los resultados obtenidos demostraron que las formulaciones almacenadas a 37 °C fueron las más estables, presentando una apariencia física constante (sin aparición de turbidez o precipitados) y con una cantidad constante de CBZ soluble, que fue significativamente mayor en los complejos DG4.0-CBZ y DG4.5-CBZ con respecto a la CBZ libre durante el período analizado de 90 días. Por otro lado, se evidenció

que las formulaciones almacenadas a 25 °C retuvieron la CBZ solo durante siete días después de la complejación, mientras que las almacenadas a 4 °C no retuvieron la CBZ soluble. En las muestras almacenadas a 25 y 4 °C se observó la aparición de un precipitado blanco con el correr de los días. Ante lo expuesto, la liberación de la CBZ desde los complejos y la cristalización de la CBZ insoluble fueron mínimas a 37 °C y máximas a 4 °C.

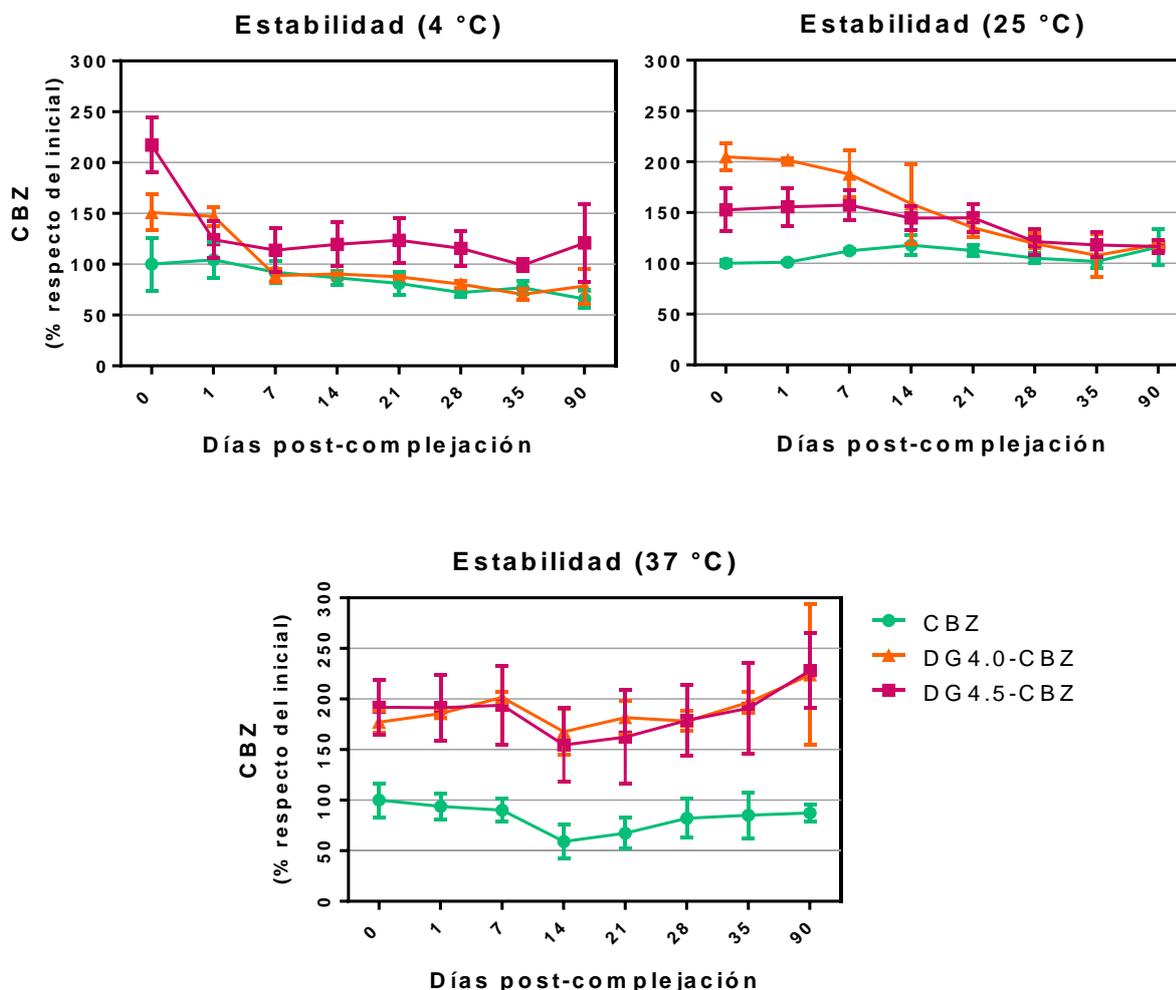


Figura 3.3 – Estabilidad de la CBZ en los complejos D-CBZ durante el almacenamiento a distintas temperaturas. La estabilidad de la CBZ libre o en los complejos D-CBZ se estudió durante el almacenamiento a 4, 25 o 37 °C. En los gráficos se presentan los porcentajes de CBZ (con respecto a la concentración inicial en el control de CBZ libre) en los distintos tiempos después de la complejación. Debido a que la representación de las diferencias significativas encontraría dificultaría la interpretación de los gráficos, los resultados estadísticos se presentan en la Tabla A3.1 del Anexo de este capítulo.

Es importante resaltar que en ninguna de las condiciones de almacenamiento estudiadas se evidenció degradación o modificación química de la CBZ, dado que el control de CBZ libre se mantuvo estable durante los 90 días estudiados (100% de droga soluble) y que no se observaron corrimientos en los espectros de absorbancia. La disminución de la CBZ soluble en los complejos

D-CBZ se debería entonces a la liberación de la droga y a la precipitación del exceso de esta por encima de su límite de solubilidad en las temperaturas estudiadas. Asimismo, podrían existir cambios en la estructura de los dendrímeros debidos a la temperatura de almacenamiento. Estos cambios conformacionales podrían modificar el tamaño de los bolsillos internos y podrían inducir la liberación de la droga.

En segundo lugar, se estudió la estabilidad de los complejos D-CBZ frente al proceso de liofilización en ausencia de crioprotectores (**Figura 3.4 A**), con el objetivo de evaluar si luego del proceso de liofilización y reconstitución los complejos mantenían la CBZ retenida y soluble. Por lo que sabemos, este es el primer trabajo en donde se estudia la incorporación de la CBZ a los dendrímeros y la estabilidad frente a la liofilización de complejos droga-dendrímeros. En este ensayo, observamos que las formulaciones fueron parcialmente estables al proceso de liofilización. En todas las formulaciones se observó una reducción de la cantidad de droga soluble luego de la liofilización, siendo los porcentajes de CBZ remanentes de 73,8%, 73,9% y 72,7% para el control de CBZ libre, los complejos DG4.0-CBZ y los complejos DG4.5-CBZ, respectivamente. Dado que los porcentajes de droga remanente fueron similares entre sí, podemos interpretar que la reducción en la cantidad de CBZ soluble se debería a un proceso degradativo de la droga soluble o a la pérdida ocasionada por la manipulación propia de la muestra. Si bien los dendrímeros no lograron evitar dicho proceso degradativo, las muestras reconstituidas presentaron una concentración significativamente mayor de CBZ respecto del control de droga libre, por lo que los complejos se mantuvieron estables y la droga degradada/perdida podría corresponder a la CBZ libre soluble no incorporada en dendrímeros.

En tercer lugar, se estudió la estabilidad en el tiempo de la CBZ en los complejos D-CBZ luego del proceso de liofilización y reconstitución (**Figura 3.4 B**). Para ello, las muestras se almacenaron a 25 °C durante 90 días luego de la reconstitución. En este caso, la CBZ complejada en dendrímeros se mantuvo estable hasta los 60 días post-reconstitución, siendo significativamente mayor a la concentración de CBZ libre. El aumento de la estabilidad del material liofilizado a 25 °C con respecto a los complejos no liofilizados (que solo retuvieron la droga soluble por 7 días) podría deberse a que durante el proceso de sublimación del solvente las interacciones droga-dendrímero se maximizan, dando lugar a complejos capaces de retener la CBZ soluble por un mayor periodo de tiempo.

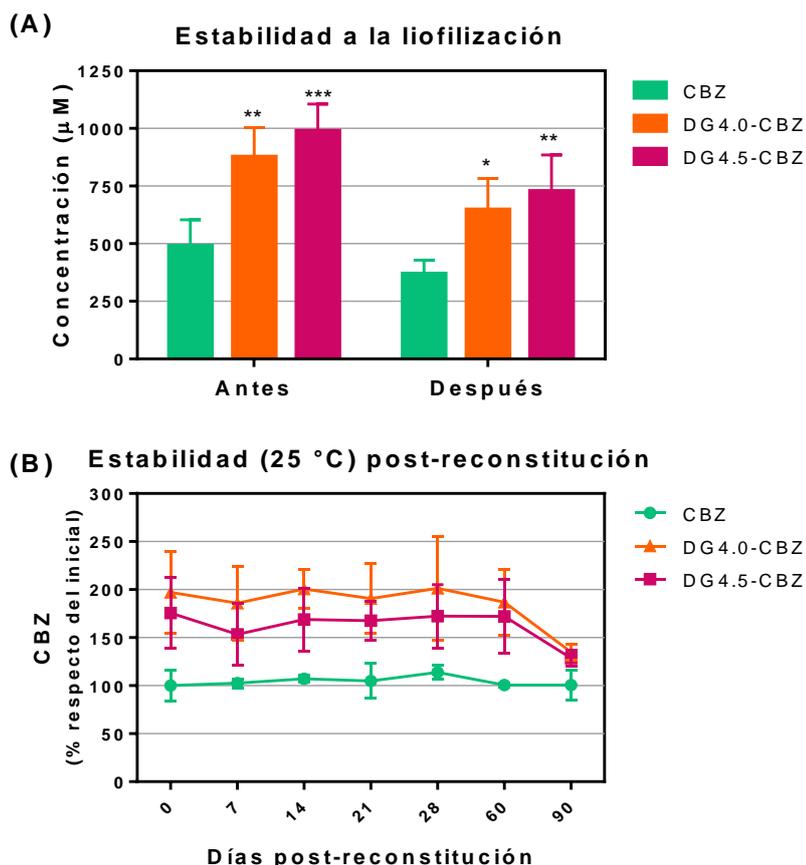


Figura 3.4 – Estabilidad de los complejos D-CBZ frente al proceso de liofilización. (A) Concentración de CBZ soluble antes y después del proceso de liofilización. **(B)** Porcentaje de droga soluble (con respecto a la concentración inicial en el control de CBZ libre) a distintos tiempos durante el almacenamiento a 25 °C, después de la liofilización y reconstitución. Debido a que la representación de las diferencias encontradas dificultaría la interpretación de los gráficos, los resultados estadísticos se presentan en la Tabla A3.2 del Anexo de este capítulo.

3.2.3 Estudios de la interacción D-CBZ por FT-IR y liberación *in vitro*

Como los dendrímeros DG4.0 y DG4.5 encapsularon una cantidad similar de CBZ y presentaron perfiles similares de estabilidad a lo largo del tiempo, se refuerza nuestra hipótesis de que la interacción droga-dendrímero se produce en los bolsillos internos. Estos son químicamente idénticos en ambos dendrímeros, mientras que los grupos terminales son diferentes ($-\text{NH}_3^+$ para el DG4.0 y $-\text{COO}^-$ para el DG4.5, a pH fisiológico). Con el objetivo de confirmar nuestra hipótesis se estudió la interacción entre la CBZ y los dendrímeros utilizando la espectroscopia FT-IR y estudios de liberación *in vitro*.

La espectroscopia infrarroja es un método no destructivo, muy utilizado debido a que la absorción específica de una sustancia en la región de "huella dactilar" permite el reconocimiento de varias especies químicas e incluso de los isómeros estructurales. El espectro FT-IR de la CBZ sólida

(Figura 3.5 A) mostró todas las bandas de absorción específicas del fármaco ^{211,212}, incluidas las bandas de estiramiento del -NH a 3460 cm⁻¹, la vibración del enlace -CO-R - a 1670 cm⁻¹, y las vibraciones de deformación de los enlaces -C=C-, -C=O y N-H a 1590 cm⁻¹. El espectro FT-IR del PBS liofilizado (Figura 3.5 B y C) se incluyó como un control interno de nuestro ensayo porque las formulaciones de D-CBZ se disolvieron en *buffer* antes de la liofilización y las sales del mismo permanecerían en las formulaciones sólidas. En este control, se encontró que las bandas de absorción a 528, 548, 668, 861, 949, 1074, 1163, 2341 y 2359 cm⁻¹ corresponden a las vibraciones de los grupos fosfato de las sales del *buffer*. En este caso, la mayoría de las bandas del PBS se encontraron en la región de “huella dactilar”, lo que impidió una correcta asignación de los picos en zonas inferiores a los 1300 cm⁻¹ para el resto de las formulaciones caracterizadas. Posibles formas de solucionar este problema serían liofilizar las muestras en agua (en lugar de en *buffer*), o realizar el FT-IR de muestras líquidas en agua deuterada; sin embargo, en ambos casos, los complejos obtenidos en esos medios no serían exactamente los mismos que se obtienen en PBS, cuyas características fisiológicas permitirían la utilización de los complejos en los ensayos *ex vivo*, *in vitro* e *in vivo*. En consecuencia, el análisis de los espectros FT-IR de los dendrímeros y complejos D-CBZ se realizó particularmente en la región de 4000 a 1300 cm⁻¹.

En el espectro FT-IR del DG4.0 (Figura 3.5 B) se observaron las vibraciones de estiramiento de los enlaces C-H y N-H del interior del dendrímero a 2917 y 2849 cm⁻¹; la vibración de deformación de los grupos -NH terminales a 1651 cm⁻¹; y las vibraciones de estiramiento de los enlaces C-C y C-N en el interior del dendrímero a 1557 cm⁻¹ ^{50,153,213,214}. En el espectro FT-IR del complejo DG4.0-CBZ, se observó la desaparición de las bandas de absorción a 2917 y 2849 cm⁻¹ y el desplazamiento de otra banda de 1651 a 1692 cm⁻¹. Dado que las dos primeras señales corresponden a grupos internos del DG4.0 y la tercera a las aminas terminales, las moléculas de CBZ podrían estar interactuando tanto con los bolsillos internos del DG4.0 como con sus grupos amino terminales.

Por otro lado, el espectro FT-IR del DG4.5 (Figura 3.5 C) mostró la vibración de flexión de los enlaces N-H de las amidas del interior de dendrímero a 3299 cm⁻¹ y a 1642 cm⁻¹; las vibraciones de estiramiento de los enlaces C-H y N-H también del interior del dendrímero a 2915 y 2849 cm⁻¹; la vibración de estiramiento del -C=O de los grupos terminales a 1730 cm⁻¹; y la vibración simétrica del -COO⁻ del grupo terminal a 1393 cm⁻¹ ^{94,153}. En el espectro FT-IR del complejo DG4.5-CBZ, se observó la desaparición de las bandas de absorción a 2915, 2849 y 1730 cm⁻¹ y el desplazamiento de las bandas a 3332 y 1652 cm⁻¹. Como estas señales corresponden a los grupos internos y terminales del DG4.5, las moléculas de CBZ podrían estar interactuando tanto con los bolsillos internos del DG4.5 como con sus grupos carboxílicos terminales.

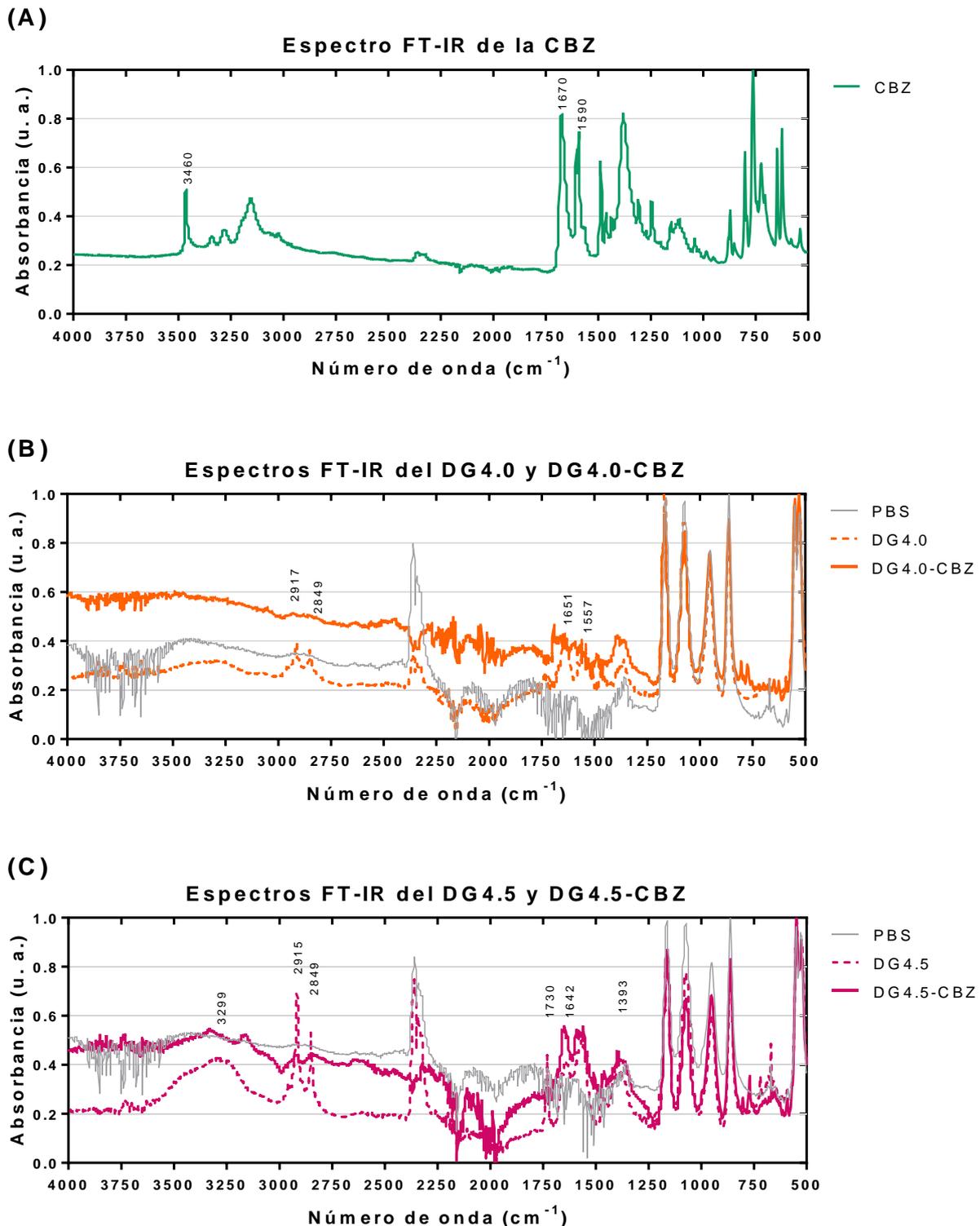


Figura 3.5 – Estudio de la interacción entre la CBZ y los DG4.0 o DG4.5 por análisis FT-IR. (A) Espectro FT-IR de la CBZ sólida; **(B)** Espectros FT-IR de liofilizados del DG4.0, los complejos DG4.0-CBZ y el control de PBS; **(C)** Espectros FT-IR de liofilizados del DG4.5, los complejos DG4.5-CBZ y el control de PBS. **(B y C)** Se incluyó un control de PBS liofilizado dado que los complejos y los dendrímeros se liofilizaron a partir de las suspensiones en dicho *buffer*, y las sales de fosfato tienen una señal fuerte en FT-IR.

Considerando los resultados obtenidos, donde se demostró que todas las bandas de absorción correspondientes a los grupos de los bolsillos internos sufrieron modificaciones en las formulaciones de D-CBZ respecto de los dendrímeros libres, podemos confirmar nuestra hipótesis de que la CBZ interactúa con el interior de ambos dendrímeros. Sin embargo, también se observaron modificaciones en las bandas de absorción de los grupos terminales de ambos dendrímeros. En ese caso, es importante remarcar que las formulaciones D-CBZ obtenidas luego del protocolo de complejación presentan tanto CBZ libre (hasta el límite de solubilidad de la droga a dicha temperatura) como CBZ complejada en los dendrímeros (droga solubilizada por complejación en los bolsillos internos de los dendrímeros). Cuando estas formulaciones D-CBZ se liofilizan, las interacciones entre la CBZ (tanto libre como en complejo) y los dendrímeros se maximizan, debido a la ausencia del solvente. Asimismo, se maximizan las interacciones entre moléculas adyacentes de dendrímeros. Estas interacciones mediadas por el proceso de liofilización podrían ser las responsables de los cambios en las señales de los grupos terminales.

Otra posible explicación de estas interacciones observadas entre la droga y los grupos terminales de los dendrímeros podría deberse al grupo amida que posee la CBZ, capaz de interactuar por puente de hidrógeno (como dador o receptor) con los grupos amino o carboxilos terminales no ionizados de ambos dendrímeros. Asimismo, la CBZ podría interactuar con los grupos terminales en estado ionizado mediante interacciones del tipo ion-dipolo. Además de la posible interacción con la droga o entre moléculas adyacentes de dendrímeros, se ha reportado por Maiti y col. (2004) que los grupos superficiales de los dendrímeros pueden sufrir el proceso de *back-folding* en condiciones de bajo solvente. Según este trabajo, los grupos terminales son lo suficientemente flexibles como para interpenetrar la propia molécula e interactuar con los grupos de los bolsillos internos (aminas terciarias)⁹⁵. De esta manera, también se podrían explicar los cambios en las señales de los grupos funcionales terminales.

En este sentido, lo ideal sería caracterizar a las muestras líquidas en PBS, tal cual se obtienen luego del proceso de complejación. Sin embargo, las señales FT-IR propias de las vibraciones de la molécula de agua, sumadas a la de las sales fosfato, nos impidió realizar esta determinación adecuadamente.

Por otro lado, la caracterización de la interacción droga-dendrímero se profundizó al estudiar la resistencia y estabilidad de los complejos DG4.0-CBZ y DG4.5-CBZ por ensayos de liberación *in vitro* de la CBZ. El perfil de liberación frente a una dilución 1/100 se estudió mediante microdiálisis en tres condiciones de pH: ácido (pH 2,2), fisiológico (pH 7,4) y básico (pH 12,6) (Figura 3.6). El objetivo de este estudio en distintas condiciones de pH fue determinar si el estado de protonación de los dendrímeros podría modificar el perfil de liberación de la CBZ a partir de los complejos D-CBZ.

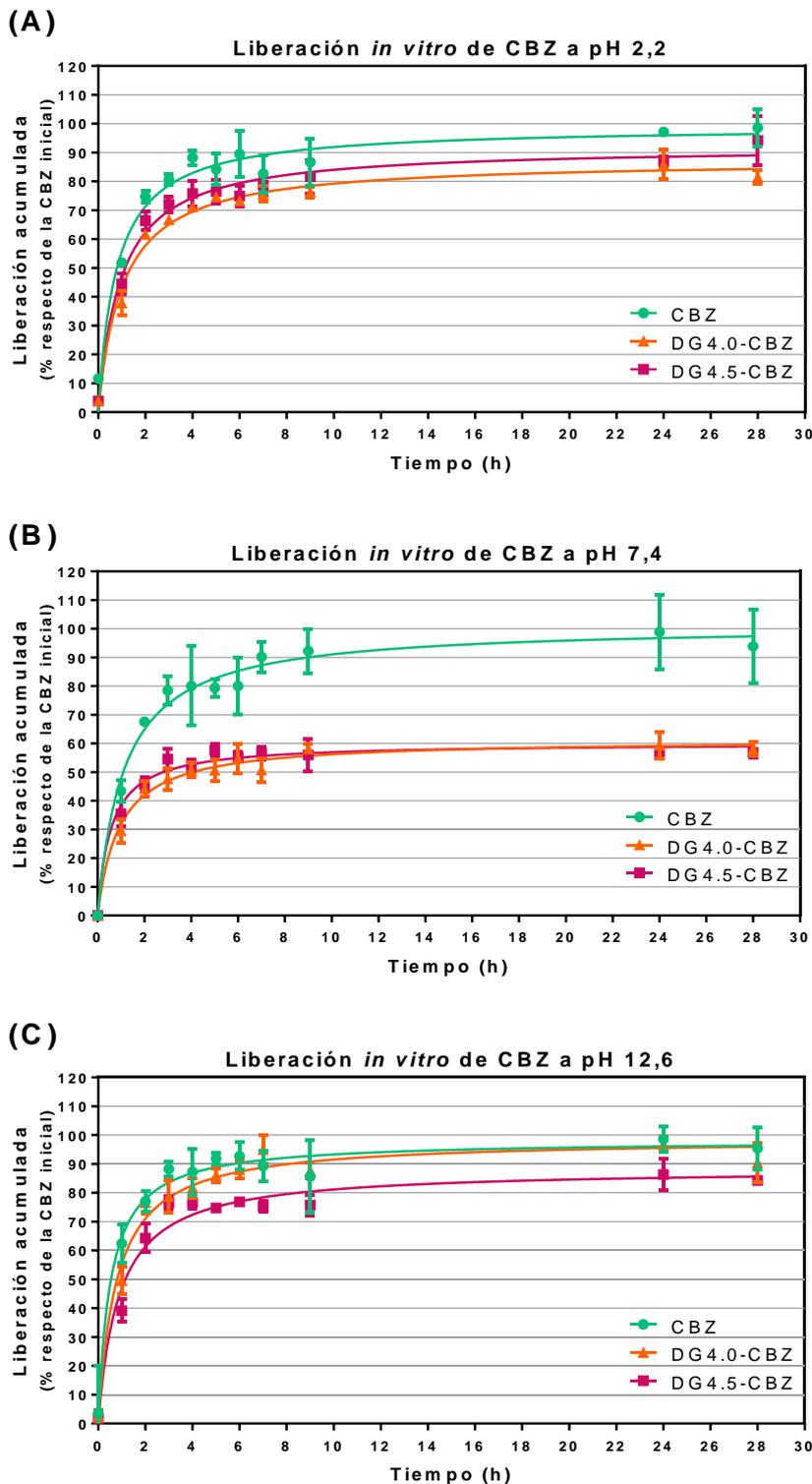


Figura 3.6 – Liberación *in vitro* de CBZ a partir de complejos D-CBZ en distintas condiciones de pH. La liberación *in vitro* de CBZ a partir de complejos D-CBZ se estudió frente a PBS con (A) pH 2,2; (B) pH 7,4 y (C) pH 12,6. Para ello se utilizó la técnica de microdiálisis desarrollada *ad hoc*. No se encontraron diferencias significativas respecto del control de CBZ libre para los complejos a pH ácido y básico, pero sí a pH fisiológico. Debido a que la representación de las diferencias encontradas a pH 7,4 dificultaría la interpretación de los gráficos, los resultados estadísticos se presentan en la Tabla A3.3 del Anexo de este capítulo.

La CBZ es una molécula con anillos hidrofóbicos y una región polar debida a la presencia de un grupo amida. Bajo condiciones no catalizadoras y a pH básicos extremos, la CBZ puede formar una amida cargada negativamente (pKa del grupo amida 13,9) ²¹⁵. Es importante aclarar entonces que, en pH menores a 12,9, la CBZ se encontraría como una molécula no cargada. Por otro lado, los dendrímeros poseen grupos ionizables cuyo estado de protonación dependerá del pH del medio. Trabajos teóricos, a través de simulaciones y cálculos matemáticos, determinaron los rangos esperados de pKa para cada grupo ionizable, reportando un pKa 8-10 para las aminas primarias terminales de los DG4.0, un pKa 4-6 para las aminas terciarias internas de los DG4.0, un pKa 4-5 para los ácidos carboxílicos terminales de los DG4.5, y un pKa 3-6 para las aminas terciarias internas de los DG4.5 ^{117,216}. Por otro lado, un trabajo experimental determinó los valores de pKa para los grupos ionizables de los DG4.0, reportando un pKa de 9,2 para las aminas primarias terminales y un pKa de 6,3 para las aminas terciarias internas ²¹⁷. Considerando estos valores de pKa se procedió a realizar el análisis de los resultados de liberación *in vitro* de CBZ.

A pH ácido (pH=2,2), las aminas terciarias internas de ambos dendrímeros se encuentran protonadas; esta carga positiva excesiva en el interior daría lugar a la repulsión entre cadenas adyacentes y a una conformación extendida, impidiendo la formación de bolsillos en el interior de los dendrímeros. Estudios computacionales reportaron que a pH <4,0, el tamaño de los DG4.0 aumentó un 30-40% respecto de una condición sin solvente, como así también la cantidad de moléculas de agua que penetraron en el interior de la macromolécula (~325 por dendrímero) ¹¹⁷. Estos cambios estructurales y conformaciones extendidas a pH ácido serían las responsables de la liberación completa de CBZ a partir de complejos D-CBZ (**Figura 3.6 A**).

A un pH básico (pH=12,6), las aminas terciarias internas de ambos dendrímeros se encuentran desprotonadas, al igual que los grupos terminales -NH₂ del DG4.0 y -COO⁻ del DG4.5. La neutralización de las aminas terciarias internas daría lugar a una conformación globular compacta que impediría la retención de los compuestos bioactivos. Sin embargo, Maiti y col. (2005) reportaron por estudios computacionales que a pH >12,0 y en presencia de un disolvente como el agua, el tamaño del DG4.0 aumentó un 10-15% respecto de una condición sin solvente. A dicho pH básico se registró un aumento en la difusión rotacional y traslacional de las moléculas de agua, debido a una conformación menos rígida de las ramas del DG4.0 debido a la neutralización de las cargas internas ¹¹⁷. Aproximadamente 138 moléculas de agua se encontraron en el interior de cada dendrímero en estas condiciones. Es decir, que a pH básico, si bien las ramas internas del dendrímero poseen las aminas desprotonadas y podrían interaccionar entre sí, también son menos rígidas por lo que hay más libertad de movimiento. Independientemente del grado de ionización y de la conformación que adoptarían los dendrímeros en estas condiciones, la CBZ se liberó completamente de ambos complejos DG4.0-CBZ y DG4.5-CBZ (**Figura 3.6 C**).

En condiciones fisiológicas (pH=7,4), las aminas terciarias internas de ambos dendrímeros se neutralizan formando los bolsillos internos, mientras que los grupos terminales adquieren cargas positivas $-NH_3^+$ para el DG4.0 o cargas negativas $-COO^-$ para el DG4.5. En estas condiciones se obtendrían estructuras con bolsillos internos neutros y superficies cargadas, capaces de encapsular moléculas en su interior. Como se reportó anteriormente ¹¹⁷, a pH neutro, no hubo un cambio significativo en el tamaño del dendrímero respecto de una condición sin solvente, por lo que se mantienen los bolsillos internos que incorporaron ~ 201 moléculas de agua por molécula de dendrímero. En estas condiciones, las moléculas de CBZ podrían interactuar de forma hidrofóbica o por enlaces de hidrógeno con el núcleo de los dendrímeros, lo que resultó en una liberación controlada en el tiempo (**Figura 3.6 B**). Después de 2 h de diálisis, la droga presente en el control de CBZ libre se liberó en un 70%, mientras que la droga de los complejos D-CBZ en un 45%. Después de 24 h de diálisis, la droga presente en el control de CBZ libre se liberó completamente (100%), mientras que los complejos D-CBZ retuvieron el 40% del fármaco, dando lugar a una diferencia significativa en los perfiles de liberación.

En concordancia con nuestros resultados, la capacidad de retención de fármacos de ambos dendrímeros en condiciones fisiológicas se había observado previamente para la risperidona y el ibuprofeno ^{50,91,218}. Además, se demostró que la interacción entre los dendrímeros y la CBZ es altamente dependiente del pH, como así también lo fue con otros fármacos. Por ejemplo, Devarakonda y col. (2007) reportaron que la liberación de la furosemida a partir de DG2.5 y DG3.0 fue dependiente del pH, existiendo liberación total a pH 1,2 y 5,8, y procesos de liberación controlada a pH 7,4 ²¹⁶.

En resumen, se incrementó la solubilidad de la CBZ a través de la complejación con dendrímeros, obteniendo complejos con un promedio de 21 ± 7 y 24 ± 11 moles de CBZ por mol de DG4.0 y DG4.5, respectivamente. Estos complejos retuvieron la CBZ soluble a 37 °C durante 90 días, y fueron parcialmente resistentes a la liofilización. Los complejos D-CBZ liofilizados y reconstituidos presentaron una estabilidad incrementada, siendo capaces de retener la CBZ soluble por 60 días a 25 °C. Además, por FT-IR se demostró que la interacción principal entre la droga y los dendrímeros ocurrió en los bolsillos hidrofóbicos de estos últimos. Asimismo, los complejos D-CBZ demostraron tener la capacidad de liberar controladamente la droga en condiciones fisiológicas, liberándola completamente en condiciones de pH extremos.

Una vez finalizada esta caracterización fisicoquímica, se procedió a realizar los estudios de nanotoxicidad y biocompatibilidad de las formulaciones obtenidas. Para el tratamiento actual de la epilepsia, la concentración terapéutica de CBZ se ha estimado en 0,004-0,012 mg/mL, que corresponde a 17 μM -50 μM ²⁰⁹. Sin embargo, la incorporación de fármacos en dendrímeros permitiría reducir las dosis actuales manteniendo su acción terapéutica. Por lo tanto, decidimos

utilizar una concentración dentro del rango terapéutico estimado (30 μM de CBZ) y concentraciones más bajas para asegurar que no tengan efectos tóxicos.

3.2.4 Estudios de la toxicidad *ex vivo* en glóbulos rojos humanos

Los estudios de hemólisis y cambios morfológicos en glóbulos rojos humanos son métodos simples ampliamente utilizados para analizar la interacción entre las membranas biológicas y los polímeros, y para determinar la toxicidad *ex vivo*. Se han reportado efectos hemolíticos causados por dendrímeros catiónicos y aniónicos dependientes de la generación y de la concentración; sin embargo, no se ha reportado hemólisis en bajas concentraciones de dendrímeros. Por ejemplo, no se han reportado efectos hemolíticos en concentraciones menores a 1 mg/mL para el DG4.0 ($\sim 70 \mu\text{M}$) o a 2 mg/mL para el DG4.5 ($\sim 78 \mu\text{M}$)^{144–146}. De todos modos, se ha reportado que los DG4.0 en concentración 10 μM producen la agregación de los glóbulos rojos, por ello es importante estudiar también los efectos a niveles morfológicos¹⁴⁷. Asimismo, es importante estudiar el efecto hemolítico de los complejos D-CBZ obtenidos, ya que se ha reportado que el tratamiento con CBZ puede inducir anemia hemolítica^{219–221}.

En este trabajo, evaluamos los efectos hemolíticos y los posibles cambios morfológicos en glóbulos rojos humanos después de 4 y 24 h de incubación con CBZ libre, dendrímeros y complejos D-CBZ. Como se puede observar en las **Figuras 3.7** y **3.8**, no se observaron efectos hemolíticos o cambios morfológicos significativos en comparación con los glóbulos rojos incubados con el *buffer* isotónico (control negativo de PBS) para ninguno de los tratamientos evaluados, en ninguno de los periodos de incubación. Estos resultados dan un indicio de que los complejos D-CBZ obtenidos podrían ser administrados por vía intravenosa.

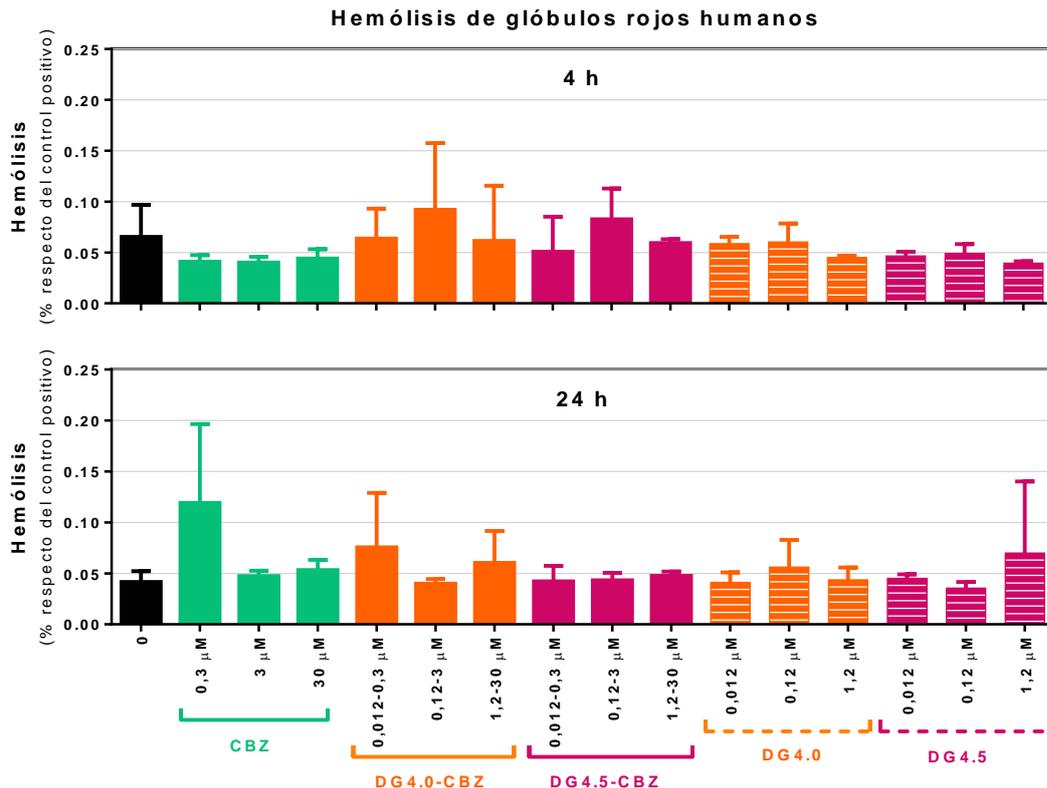


Figura 3.7 – Toxicidad *ex vivo* estudiada por hemólisis en glóbulos rojos humanos. Hemólisis después de 4 o 24 h de tratamiento con CBZ, dendrímeros o complejos D-CBZ. La hemólisis se expresó como un porcentaje respecto de la liberación de hemoglobina inducida por el control positivo de SDS (100% hemólisis). No se encontraron diferencias significativas del control negativo de PBS.

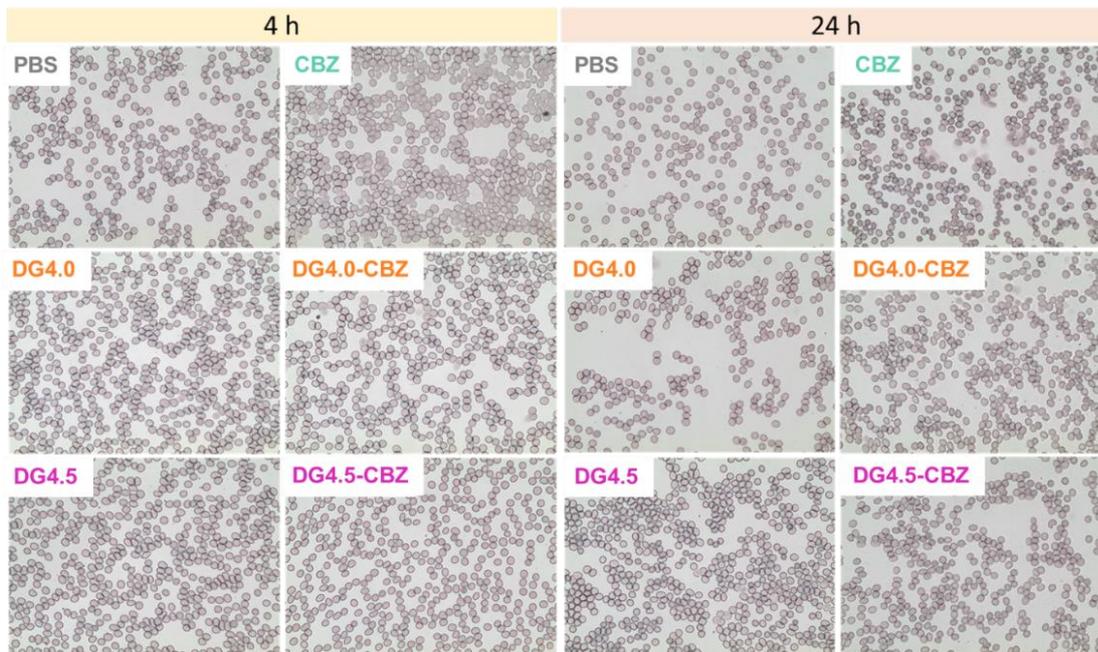


Figura 3.8 – Análisis morfológico de los glóbulos rojos humanos. Luego de 4 o 24 h de tratamiento con CBZ (30 μ M), dendrímeros (1,2 μ M) o complejos D-CBZ (1,2 μ M de D con 30 μ M de CBZ), los glóbulos rojos humanos se tiñeron con Giemsa y se observaron por microscopia óptica. No se observaron cambios morfológicos en las células asociados con toxicidad *ex vivo* luego de los tratamientos.

3.2.5 Estudios de la toxicidad *in vitro* en cultivo celular Neuro-2a

A pesar de las amplias aplicaciones farmacéuticas y biomédicas de los dendrímeros, se han reportados efectos citotóxicos, hecho que podría restringir su uso como sistemas de *delivery* de drogas. Por lo tanto, es imperativo evaluar la citotoxicidad de los dendrímeros y los complejos obtenidos. La citotoxicidad de los dendrímeros depende del *core* y la generación, pero principalmente de la naturaleza de sus grupos superficiales. Además, se encontró que la citotoxicidad depende de la concentración, del tiempo de incubación y del tipo de línea celular utilizada. Es importante recordar que los DG4.0 son dendrímeros catiónicos a pH fisiológico que pueden causar efectos citotóxicos marcados respecto de los dendrímeros aniónicos DG4.5. Por ejemplo, en las líneas celulares Vero y J774, el DG4.0 presentó citotoxicidad a una concentración de 3 μM después de 24 h ⁹¹, mientras que el DG4.5 no presentó citotoxicidad hasta concentración de 33 μM ¹⁵³. Estas observaciones se deben a la capacidad de los dendrímeros catiónicos para interactuar con la membrana plasmática cargada negativamente, generando poros de desestabilización que resultan finalmente en la lisis celular ⁸².

Si bien la mayoría de los compuestos químicos causan daño celular a través de la interacción con biomoléculas específicas, las nanopartículas pueden causar toxicidad a través de una combinación de diferentes mecanismos, tales como la inducción de ROS, de genotoxicidad, modificaciones morfológicas y efectos inmunológicos al mismo tiempo ⁴⁶. Por lo tanto, es importante estudiar el efecto de los dendrímeros y los complejos en cultivo celular mediante varios métodos ⁷⁴. En el presente trabajo, estudiamos los efectos de la CBZ, los dendrímeros y los complejos D-CBZ en la línea celular Neuro-2a después de 4 y 24 h de tratamiento sobre la viabilidad por la tinción con cristal violeta (CV); sobre la actividad metabólica celular mediante el ensayo MTT; y sobre el nivel de afección de membranas por el ensayo de captura de rojo neutro (RN).

Después de 4 h de tratamiento (**Figura 3.9**), no se observó reducción en la viabilidad de las células Neuro-2a (tinción CV) en ninguna de las concentraciones y ni tratamientos evaluados, así como tampoco se observaron efectos concentración-dependientes sobre la actividad metabólica (ensayo MTT). Sin embargo, el tratamiento con 1,2 μM del DG4.0 causó una reducción del ~20% en la captación de RN, lo que podría estar relacionado con el efecto tóxico de los dendrímeros catiónicos en las membranas celulares, particularmente en la membrana lisosomal que debería retener este colorante. El efecto tóxico del DG4.0 se vio reflejado en la incubación con los complejos DG4.0-CBZ a concentraciones 1,2 μM de DG4.0 y 30 μM de CBZ. Es interesante evaluar que ocurre, entonces, en periodos más largos de incubación; dado que un daño extendido en la membrana plasmática limitaría la aplicación biomédica de estos complejos.

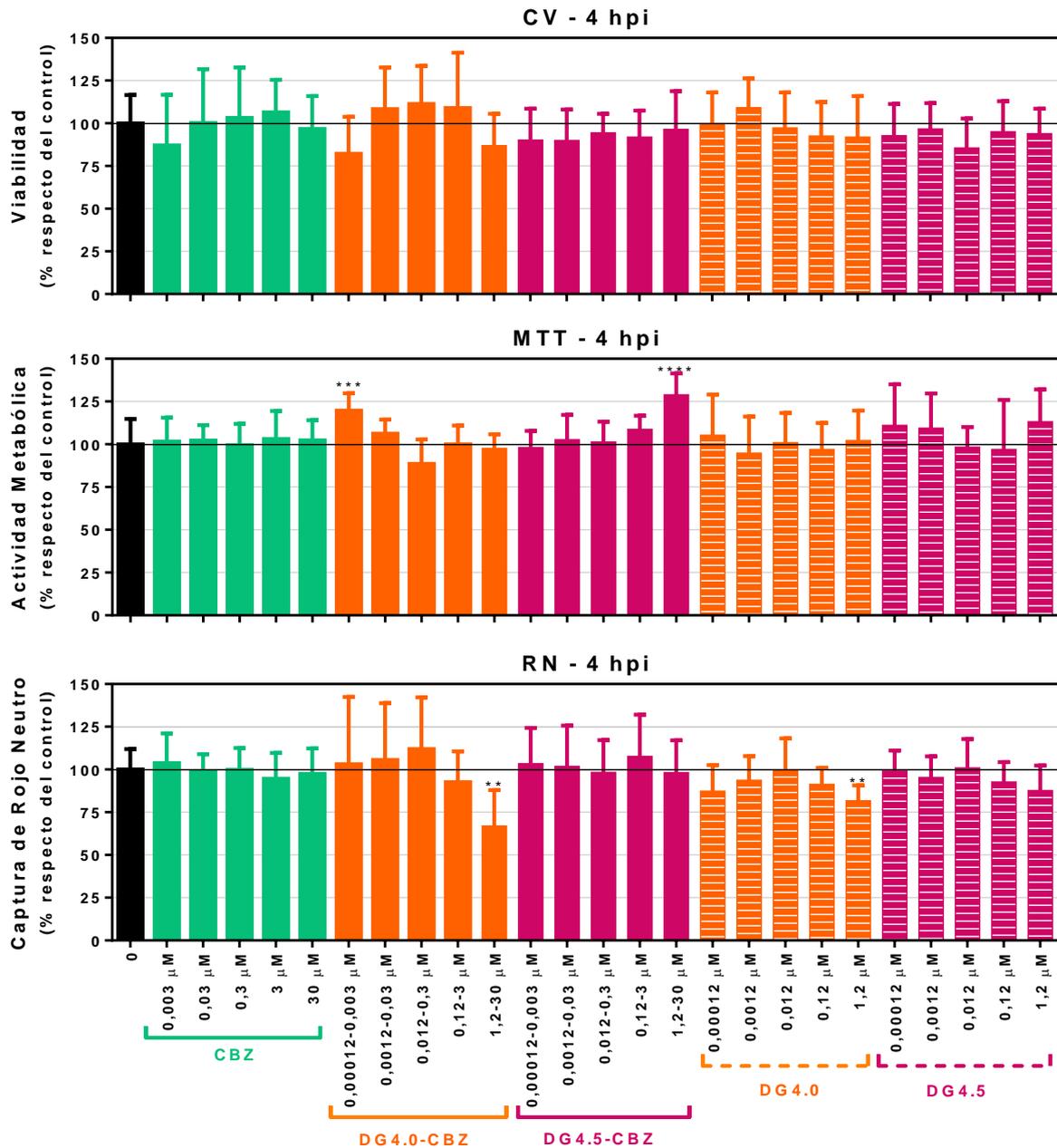


Figura 3.9 – Toxicidad *in vitro* en cultivo de células Neuro-2a por métodos colorimétricos luego de 4 h de tratamiento. La citotoxicidad luego de 4 h de tratamiento con CBZ, dendrímeros o complejos D-CBZ se determinó mediante el estudio de la viabilidad por tinción con cristal violeta (CV), de la actividad metabólica mediante el ensayo MTT y de la afcción de membranas mediante la captación de rojo neutro (RN). Todos los datos se expresaron como un porcentaje con respecto al control de células no tratadas, que se consideró como el 100% de viabilidad, actividad metabólica o captación de rojo neutro.

Después de 24 h de tratamiento (Figura 3.10), la tinción con CV reveló que los tratamientos con 0,03 y 0,003 μ M de CBZ redujeron la viabilidad celular en un 30% y 40% respectivamente. Esta reducción de la viabilidad a bajas concentraciones de fármaco podría estar relacionada con el hecho de una mayor permeabilización e ingreso a las células, dado que a concentraciones más

elevadas la droga podría interactuar consigo misma, en lugar de localizarse en el ambiente hidrofóbico de la membrana plasmática. El complejo DG4.5-CBZ evitó este efecto citotóxico mediado por la CBZ, mientras que el DG4.0-CBZ no lo hizo. Con respecto a la actividad metabólica (ensayo MTT), ninguna de las formulaciones en las concentraciones evaluadas produjo cambios significativos respecto del control.

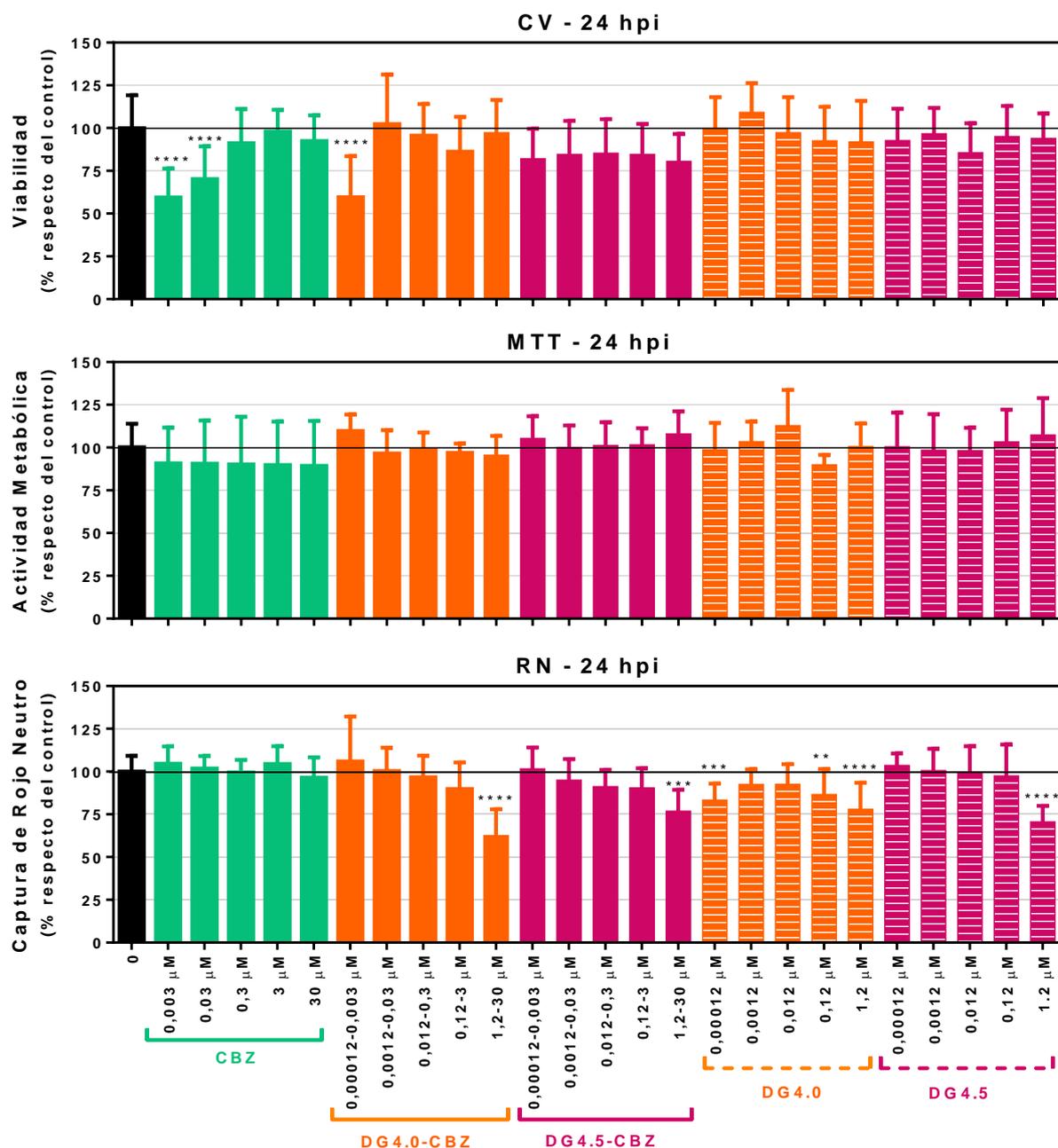


Figura 3.10 –Toxicidad *in vitro* en cultivo de células Neuro-2a por métodos colorimétricos luego de 24 h de tratamiento. La citotoxicidad luego de 24 h de tratamiento con CBZ, dendrímeros o complejos D-CBZ se determinó mediante el estudio de la viabilidad por tinción con cristal violeta (CV), de la actividad metabólica mediante el ensayo MTT y de la afección de membranas mediante la captación de rojo neutro (RN). Todos los datos se expresaron como un porcentaje con respecto al control de células no tratadas, que se consideró como el 100% de viabilidad, actividad metabólica o captación de rojo neutro.

Finalmente, con respecto a la afeción de las membranas, se observó una reducción de la captación de RN en los tratamientos con las mayores concentraciones de dendrímeros y complejos D-CBZ. Estos efectos a nivel de membrana fueron descritos para los dendrímeros anteriormente por Mukherjee y col. (2010), quienes determinaron que el efecto citotóxico determinado por el método de RN se incrementó a medida que se incrementó la generación del dendrímero ²²². Asimismo, como se esperaba, el efecto tóxico fue más significativo y se reflejó a tiempos más cortos para el DG4.0 que para el DG4.5. Finalmente, estos resultados concuerdan por los reportados recientemente por Zhang y col. (2016), quienes demostraron que los dendrímeros se acumulan en el interior de los lisosomas de las células y son capaces de romper sus membranas liberándose nuevamente al citoplasma ¹⁵².

En conclusión, el uso de distintos métodos, concentraciones y tiempos de incubación para estudiar los efectos tóxicos en las células Neuro-2a, permitió demostrar que los complejos DG4.5-CBZ presentaron una toxicidad reducida con respecto al otro complejo (DG4.0-CBZ) y a la CBZ libre.

3.2.6 Estudios de la biocompatibilidad *in vivo* en larvas de *Zebrafish*

El término "toxicidad" se refiere a los efectos no específicos y no deseados de un fármaco o nanopartícula sobre un sistema *ex vivo*, *in vitro* o *in vivo*, mientras que el término "biocompatibilidad" es más amplio y se refiere a la capacidad de un fármaco o nanopartícula de estar en contacto con un organismo vivo sin producir efectos adversos ²²³. Por lo tanto, es crítico estudiar los efectos de los complejos D-CBZ en un organismo vivo. En este trabajo, elegimos trabajar con larvas de *zebrafish*, un modelo que ofrece información sobre biocompatibilidad en un animal entero y sobre nanotoxicidad órgano-específica.

En un pre-ensayo se estudió el efecto de diluciones seriadas 1/10 de CBZ desde 30 a 0,003 μM (las mismas concentraciones que se evaluaron en cultivo celular). Como los tratamientos con 0,03 y 0,003 μM de CBZ no redujeron la viabilidad de las larvas luego de 48 h de tratamiento, todos los ensayos de biocompatibilidad se realizaron tras la incubación con 30, 3 o 0,3 μM de CBZ libre o en complejos D-CBZ.

Luego de los tratamientos, se estudiaron los efectos sobre la viabilidad (**Figura 3.11**), sobre la actividad de nado espontáneo (**Figura 3.12**), sobre el ritmo cardíaco (**Figura 3.13**), sobre el estado del hígado y sobre el desarrollo morfológico general (**Figura 3.14 y 3.15**) de las larvas.

Ni la CBZ libre ni los complejos DG4.5-CBZ produjeron mortalidad, malformaciones, cambios en la frecuencia cardíaca, en el estado del hígado o en el movimiento espontáneo, en las concentraciones utilizadas durante las 48 h evaluadas. Estos resultados reflejan la biocompatibilidad el tratamiento combinado DG4.5-CBZ propuesto en este trabajo.

Por otro lado, cuando se administraron altas concentraciones del complejo DG4.0-CBZ (30 μ M de CBZ encapsulado en 1,2 μ M de DG4.0), se redujo la viabilidad de las larvas significativamente (Figura 3.11). Luego de 4 y 24 h de tratamiento se observó un 68 y 57% de viabilidad, respectivamente. A las 48 h de tratamiento, la viabilidad se mantuvo al 57%.

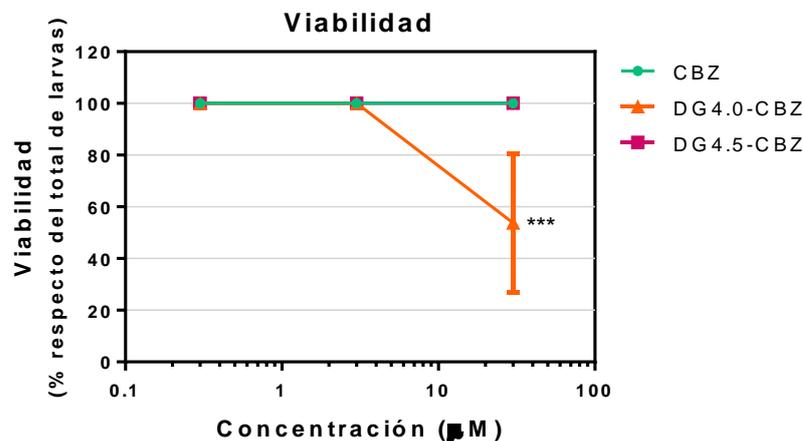


Figura 3.11 – Biocompatibilidad *in vivo* en larvas de *zebrafish*: Viabilidad. Viabilidad de larvas al 7 dpf después de 48 h de tratamiento con CBZ o complejos D-CBZ. La viabilidad se expresó como el porcentaje de larvas vivas con respecto al total de larvas tratadas.

En cuanto a la actividad de nado espontáneo (Figura 3.12), se puede observar que ninguno de los tratamientos presentó diferencias significativas respecto del control sin tratar. Sin embargo, la administración de la mayor concentración de DG4.0-CBZ redujo la viabilidad de las larvas al 57%, por lo que si el movimiento se mantuvo cercado al 100%, significa que las larvas que no murieron presentaron una actividad de nado incrementada. Es decir que se produjo un balance entre la disminución del movimiento por la muerte de las larvas y el incremento del movimiento por efectos neurotóxicos, dando lugar a un promedio de movimiento similar al del grupo control.

En cuanto al ritmo cardíaco (Figura 3.13), no se observaron cambios significativos respecto del control para ninguno de los tratamientos, excepto para la concentración más elevada de DG4.0-CBZ. Sin embargo, en este caso, no se refiere a un efecto cardiotóxico, sino al efecto puramente letal de la administración de estos complejos, dado que las larvas vivas presentaron un ritmo cardíaco similar al del control.

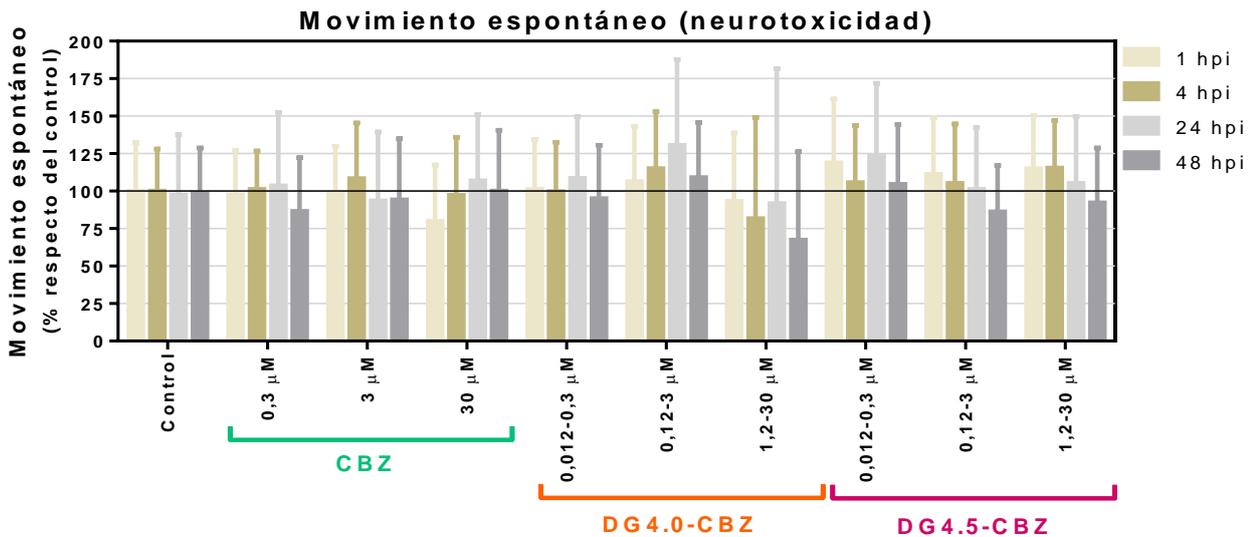


Figura 3.12 – Biocompatibilidad *in vivo* en larvas de *zebrafish*: Neurotoxicidad. Movimiento espontáneo de larvas de *zebrafish* después de 1, 4, 24 y 48 h de tratamiento con CBZ o complejos D-CBZ. El movimiento espontáneo se expresó como un porcentaje con respecto al movimiento en el control de larvas no tratadas. No se encontraron diferencias significativas con respecto al control de larvas no tratadas.

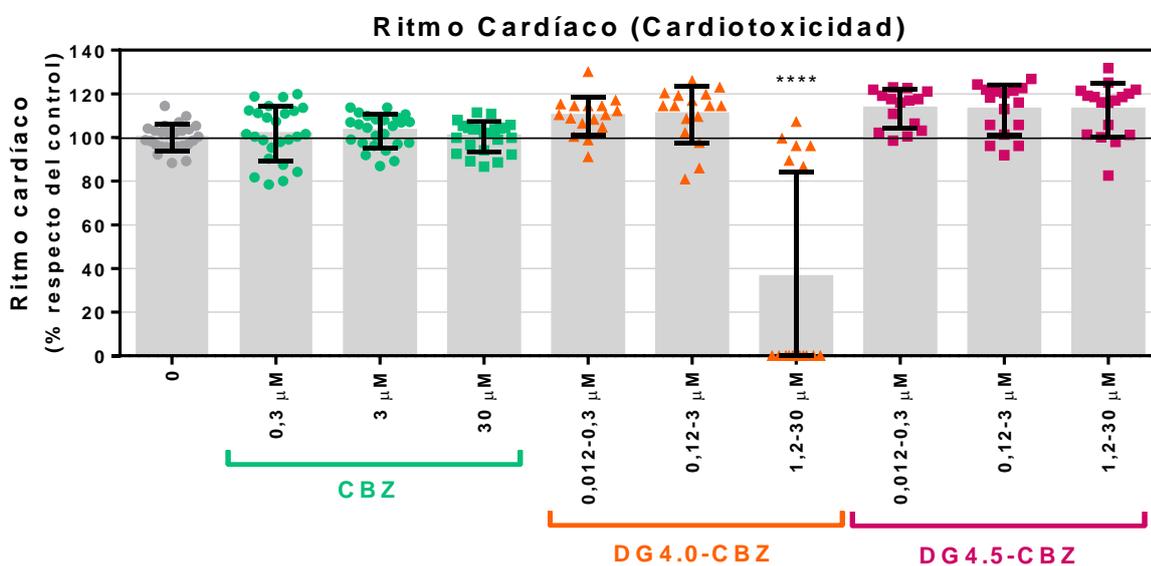


Figura 3.13 – Biocompatibilidad *in vivo* en larvas de *zebrafish*: Cardiotoxicidad. Ritmo cardíaco de larvas al 7 dpf después de 48 h de tratamiento con CBZ o complejos D-CBZ. El ritmo cardíaco se expresó como el porcentaje de latidos en las larvas tratadas con respecto a los latidos en el control de larvas no tratadas.

Sumado a lo mencionado, la elevada dosis de DG4.0-CBZ produjo cambios morfológicos significativos (Figuras 3.14 y 3.15), como vejiga natatoria desinflada, necrosis del saco vitelino y vitelo no consumido, pero no se encontraron efectos hepatotóxicos (cambios en el color o morfología del hígado).

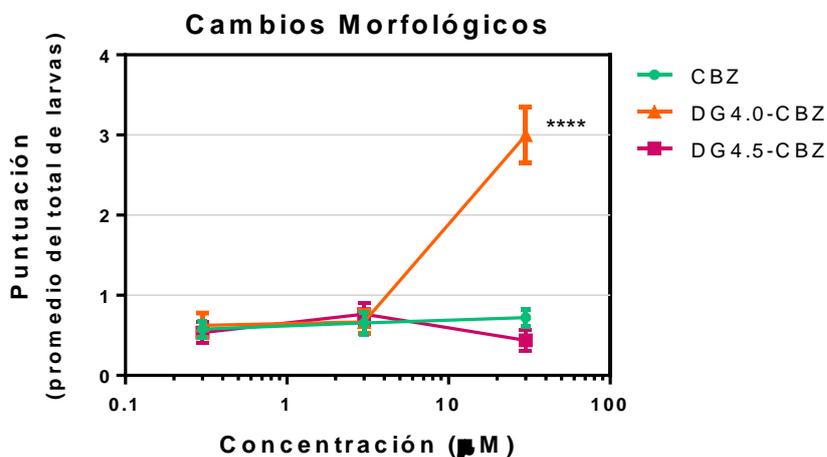


Figura 3.14 – Biocompatibilidad *in vivo* en larvas de *zebrafish*. Puntuación de cambios morfológicos. Los cambios morfológicos se puntuaron según el grado de anomalías de las larvas de *zebrafish* a los 7 dpf, después de 48 h de tratamiento con CBZ o complejos D-CBZ.

En las dosis no letales de DG4.0-CBZ (3 y 0,3 μM de CBZ encapsulada en 0,12 y 0,012 μM de DG4.0, respectivamente), los complejos no causaron ningún efecto tóxico. Estos resultados son consistentes con los obtenidos anteriormente por nuestro grupo de trabajo, donde reportamos que el DG4.0 fue letal para las larvas de *zebrafish* en concentraciones superiores a 0,5 μM¹⁵⁸.

Teniendo en cuenta estos resultados, y los obtenidos previamente en los estudios *ex vivo* e *in vitro*, podemos concluir que los complejos DG4.5-CBZ presentaron una citotoxicidad reducida y resultaron biocompatibles en las concentraciones evaluadas, siendo potenciales candidatos para tratamientos terapéuticos combinados para la EdA, presentando ventajas en comparación a los tratamientos con CBZ libre o con los complejos DG4.0-CBZ.

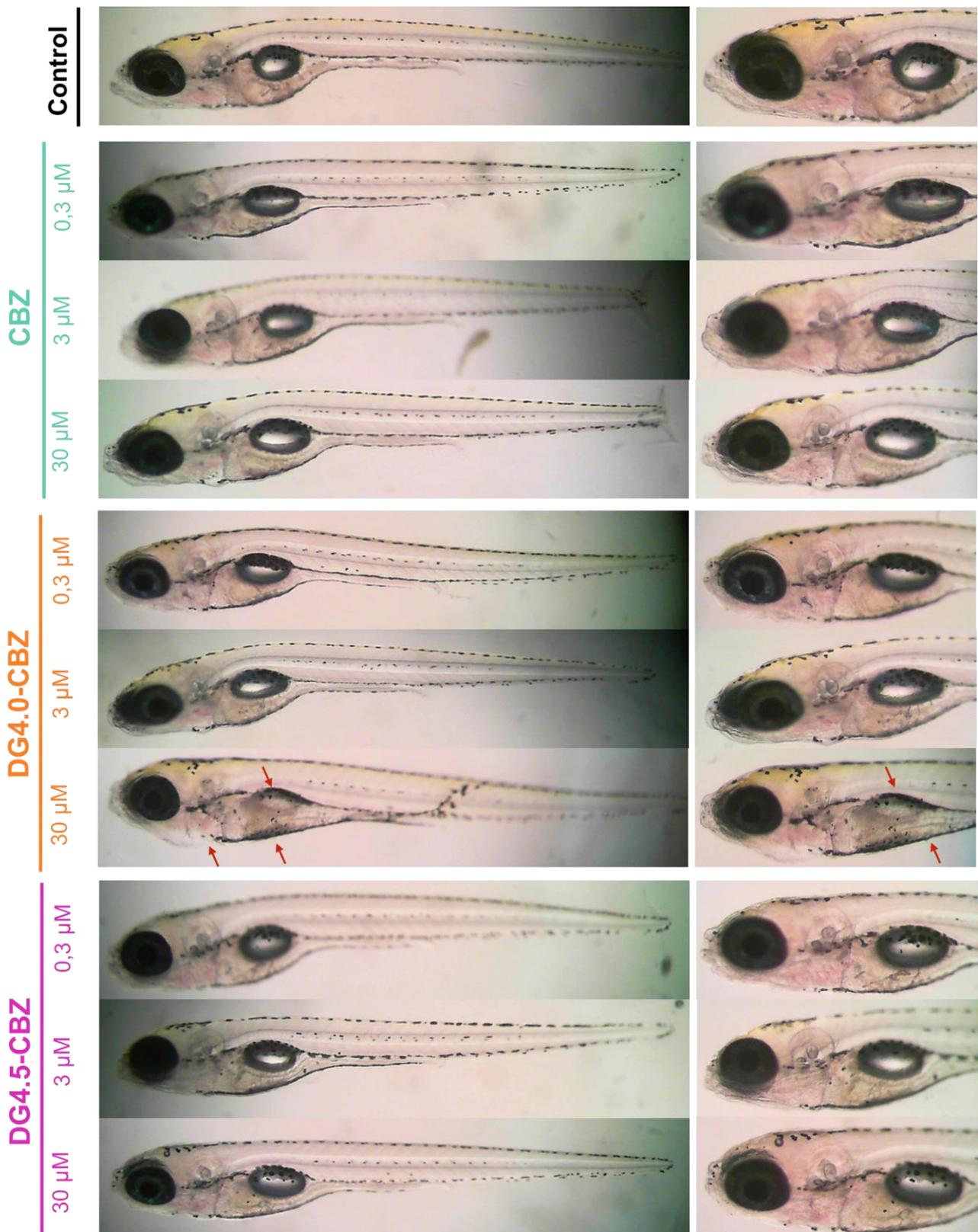


Figura 3.15 – Biocompatibilidad *in vivo* en larvas de *zebrafish*. Cambios morfológicos. Fotografías representativas de las larvas de *zebrafish* a los 7 dpf, luego de 48 h de tratamiento con CBZ o complejos D-CBZ. Los cambios morfológicos significativos se indicaron con flechas rojas.

3.3 Resumen de resultados y conclusiones parciales

- Se ha desarrollado un sistema estable de *delivery* del fármaco antiepiléptico carbamazepina (CBZ), basado en la complejación con dendrímeros PAMAM de generación 4.0 y 4.5 (DG4.0 y DG4.5).
- A través de dicha complejación, se incrementó la solubilidad de la CBZ en medios acuosos, obteniendo complejos con un promedio de 21 ± 7 y 24 ± 11 moles de CBZ por mol de DG4.0 y DG4.5, respectivamente.
- Ambos complejos, DG4.0-CBZ y DG4.5-CBZ, retuvieron la CBZ soluble durante 90 días a 37 °C y durante 7 días a 25 °C.
- Los complejos fueron parcialmente resistentes a la liofilización, pero luego de la reconstitución presentaron una estabilidad incrementada, siendo capaces de retener la CBZ soluble por 60 días a 25 °C.
- Las interacciones estabilizadoras de los complejos D-CBZ ocurrieron mayoritariamente en los bolsillos internos de los dendrímeros.
- Ambos complejos, en condiciones fisiológicas, liberaron la CBZ de forma controlada en el tiempo, y la liberaron completamente en condiciones de pH extremo (ácido o básico).
- Los complejos obtenidos no fueron hemolíticos ni causaron cambios morfológicos en los ensayos *ex vivo* en glóbulos rojos humanos, por lo que se podrían administrar por vía intravenosa, así también como por vías no convencionales (transdérmica o intranasal).
- La citotoxicidad *in vitro* del fármaco en cultivo celular se redujo cuando la CBZ se incorporó en los DG4.5. Además, los complejos DG4.5-CBZ presentaron toxicidad reducida con respecto al otro complejo (DG4.0-CBZ).
- Respecto de los estudios *in vivo* en larvas de *zebrafish*, ni la CBZ libre ni los complejos DG4.5-CBZ produjeron mortalidad, malformaciones, cambios en la frecuencia cardíaca, en el estado del hígado o en el movimiento espontáneo, en las concentraciones utilizadas durante las 48 h evaluadas. Los complejos DG4.0-CBZ no resultaron biocompatibles en la concentración más elevada debido a los efectos del dendrímero catiónico *per se*.
- Este trabajo destaca la ventaja de usar dendrímeros PAMAM con carga negativa al diseñar sistemas de *delivery* de drogas estables y no tóxicos.

Se desprenden de estas conclusiones las siguientes perspectivas:

- ✓ Explorar la capacidad de los complejos DG4.5-CBZ para reducir la agregación anormal de proteínas β -amiloides en cultivo celular y en modelos mamíferos, comparándola con el efecto de la droga y los dendrímeros libres.

Anexo del capítulo 3

Tabla A3.1 – Análisis estadístico de la estabilidad de la CBZ en los complejos D-CBZ durante el almacenamiento a distintas temperaturas. Las diferencias significativas con respecto al control de CBZ libre se analizaron mediante TWO-WAY ANOVA seguido del post-test de comparaciones múltiples de Dunnett (*p<0,05; **p<0,01; ***p 0,001; ****p<0,0001; ns: no significativo).

Día post-complejación	Test de múltiples comparaciones de Dunnett	4 °C		25 °C		37 °C	
		Significancia	Valor de p ajustado	Significancia	Valor de p ajustado	Significancia	Valor de p ajustado
0	CBZ vs. DG4.0-CBZ	***	0,0008	***	0,0001	***	0,0005
1	CBZ vs. DG4.0-CBZ	**	0,0049	****	< 0,0001	***	0,0002
7	CBZ vs. DG4.0-CBZ	ns	0,9562	***	0,0009	****	< 0,0001
14	CBZ vs. DG4.0-CBZ	ns	0,9422	ns	0,0538	***	0,0003
21	CBZ vs. DG4.0-CBZ	ns	0,8385	*	0,0173	***	0,0003
28	CBZ vs. DG4.0-CBZ	ns	0,768	ns	0,3052	***	0,0003
35	CBZ vs. DG4.0-CBZ	ns	0,8385	ns	0,3007	****	< 0,0001
90	CBZ vs. DG4.0-CBZ	ns	0,5383	ns	0,9977	****	< 0,0001
0	CBZ vs. DG4.5-CBZ	****	< 0,0001	****	< 0,0001	**	0,0032
1	CBZ vs. DG4.5-CBZ	ns	0,2498	****	< 0,0001	***	0,0005
7	CBZ vs. DG4.5-CBZ	ns	0,1945	****	< 0,0001	****	< 0,0001
14	CBZ vs. DG4.5-CBZ	*	0,0315	**	0,0025	****	< 0,0001
21	CBZ vs. DG4.5-CBZ	**	0,005	ns	0,114	****	< 0,0001
28	CBZ vs. DG4.5-CBZ	**	0,004	ns	0,3926	***	0,0003
35	CBZ vs. DG4.5-CBZ	ns	0,1783	ns	0,8372	****	< 0,0001
90	CBZ vs. DG4.5-CBZ	***	0,0003	ns	0,9677	****	< 0,0001

Tabla A3.2 – Análisis estadístico de la estabilidad de la CBZ en los complejos D-CBZ liofilizados y reconstituidos durante el almacenamiento a 25 °C. Las diferencias significativas con respecto a la CBZ libre se analizaron mediante TWO-WAY ANOVA seguido del post-test de comparaciones múltiples de Dunnett (*p<0,05; **p<0,01; ***p 0,001; ****p<0,0001; ns: no significativo).

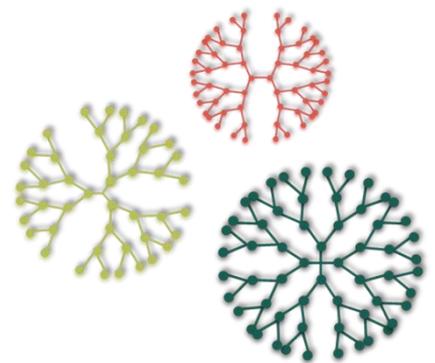
Día post-reconstitución	Test de múltiples comparaciones de Dunnett	25 °C	
		Significancia	Valor de p ajustado
0	CBZ vs. DG4.0-CBZ	**	0,0041
7	CBZ vs. DG4.0-CBZ	*	0,0127
14	CBZ vs. DG4.0-CBZ	**	0,0068
21	CBZ vs. DG4.0-CBZ	*	0,0170
28	CBZ vs. DG4.0-CBZ	*	0,0295
60	CBZ vs. DG4.0-CBZ	**	0,0026
90	CBZ vs. DG4.0-CBZ	ns	0,1307
0	CBZ vs. DG4.5-CBZ	***	0,0010
7	CBZ vs. DG4.5-CBZ	*	0,0314
14	CBZ vs. DG4.5-CBZ	**	0,0090
21	CBZ vs. DG4.5-CBZ	*	0,0159
28	CBZ vs. DG4.5-CBZ	*	0,0130
60	CBZ vs. DG4.5-CBZ	**	0,0030
90	CBZ vs. DG4.5-CBZ	ns	0,2913

Tabla A3.3 – Análisis estadístico de la liberación *in vitro* de la CBZ a partir de los complejos D-CBZ a pH fisiológico (pH 7,4). Las diferencias significativas con respecto al control de CBZ libre se analizaron mediante TWO-WAY ANOVA seguido del post-test de comparaciones múltiples de Dunnett (*p<0,05; **p<0,01; ***p 0,001; ****p<0,0001; ns: no significativo).

Horas	Test de múltiples comparaciones de Dunnett	Significancia	Valor de p ajustado
0	CBZ vs. DG4.0-CBZ	ns	> 0,9999
1	CBZ vs. DG4.0-CBZ	ns	0,1341
2	CBZ vs. DG4.0-CBZ	**	0,0068
3	CBZ vs. DG4.0-CBZ	***	0,0003
4	CBZ vs. DG4.0-CBZ	***	0,0007
5	CBZ vs. DG4.0-CBZ	***	0,0008
6	CBZ vs. DG4.0-CBZ	**	0,0034
7	CBZ vs. DG4.0-CBZ	****	< 0,0001
9	CBZ vs. DG4.0-CBZ	****	< 0,0001
24	CBZ vs. DG4.0-CBZ	****	< 0,0001
28	CBZ vs. DG4.0-CBZ	****	< 0,0001
0	CBZ vs. DG4.5-CBZ	ns	> 0,9999
1	CBZ vs. DG4.5-CBZ	ns	0,4901
2	CBZ vs. DG4.5-CBZ	*	0,0122
3	CBZ vs. DG4.5-CBZ	**	0,0058
4	CBZ vs. DG4.5-CBZ	**	0,0013
5	CBZ vs. DG4.5-CBZ	*	0,0124
6	CBZ vs. DG4.5-CBZ	**	0,0042
7	CBZ vs. DG4.5-CBZ	****	< 0,0001
9	CBZ vs. DG4.5-CBZ	****	< 0,0001
24	CBZ vs. DG4.5-CBZ	****	< 0,0001
28	CBZ vs. DG4.5-CBZ	****	< 0,0001

Capítulo 4

Complejación de Tacrina



Capítulo 4 – Complejación de Tacrina

4.1 Introducción

La etiología de la enfermedad de Alzheimer (EdA) es multifactorial y poco comprendida. Una de las primeras hipótesis que surgieron para explicarla fue la deficiencia de acetilcolina (ACh). En ella se basaron los tratamientos actuales con inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), como donezepil, galantamina, rivastigmina y tacrina (TAC). Si bien estos tratamientos mejoraron las habilidades cognitivas de los pacientes, al incrementar la concentración del neurotransmisor en el cerebro, no fueron capaces de detener el avance de la enfermedad. Sumado a ello, la administración oral de las drogas es conveniente para muchos pacientes, pero genera efectos secundarios como resultado de la acción en tejidos periféricos. Asimismo, la efectividad de estas drogas varía persona a persona y es de duración limitada. Estas son algunas de las razones por las que son necesarios nuevos tratamientos, capaces de actuar simultáneamente en varias vías etiológicas de la enfermedad y de ser administradas por vías no tradicionales (transdérmica o intranasal). En consecuencia, en esta segunda propuesta tenemos el objetivo de generar una terapia combinada entre la TAC y los dendrímeros PAMAM para el tratamiento de la EdA.

La TAC fue el primer inhibidor de AChE autorizado para el tratamiento de la EdA por la FDA en 1993²²⁴. Este bioactivo es un inhibidor reversible capaz de penetrar las membranas celulares en el tejido cerebral y formar un complejo estable con AChE²²⁵. Además, se ha demostrado que la TAC bloquea canales de potasio, incrementando la duración de los potenciales de acción y aumentando la liberación de ACh²²⁶. De hecho, la TAC es el inhibidor de AChE más potente y clínicamente eficaz¹⁵ y tiene una buena permeabilidad intestinal debido a su configuración y lipofilicidad media^{227,228}. Sin embargo, se ha demostrado que tras la administración oral su vida media en sangre es corta (1,4-3,6 h) y su biodisponibilidad es de aproximadamente $17 \pm 13\%$, debido a un primer paso metabólico en el hígado en donde se modifica la droga^{226,229-231}. Asimismo, se ha reportado que los tratamientos con TAC produjeron hepatotoxicidad y otros efectos secundarios periféricos^{228,232}. Debido a ello, su uso clínico ha sido limitado. Sin embargo, Patocka y col. (2008) propusieron que la hepatotoxicidad de la TAC está mediada por un metabolito secundario que se produce luego del primer paso metabólico en el hígado²³³. Por lo que es esencial explorar nuevas rutas de administración en donde se disminuya la metabolización hepática.

La TAC se ha utilizado ampliamente para diseñar drogas *multi-target* con el objetivo de combinar su potente efecto inhibitor de la AChE con otras propiedades farmacológicas. Como consecuencia, se han sintetizado varios derivados de TAC, y se ha estudiado su hepatotoxicidad y propiedades colinérgicas ^{15,234,235}. Por otro lado, no se han reportado estudios integrales sobre la incorporación de TAC en sistemas de *delivery* con el objetivo de mejorar su biodisponibilidad y reducir sus efectos secundarios. Asimismo, el uso de otras vías de administración tampoco fueron estudiadas en profundidad. Dos de las posibles vías alternativas para la administración de TAC son la transdérmica e intranasal. La administración transdérmica de TAC podría minimizar el primer paso metabólico, proporcionar niveles sanguíneos constantes durante un período prolongado y reducir los efectos secundarios asociados con la administración oral, como la hepatotoxicidad ^{231,236,237}. Por otro lado, la administración intranasal de TAC podría sortear la BHE, proporcionar niveles terapéuticos de droga en el cerebro y evitar el efecto del primer paso hepático. Además, la vía intranasal ofrece una ruta simple, práctica, no invasiva, conveniente, rentable y alternativa para la administración rápida de fármacos al cerebro ^{232,238,239}.

Como se mencionó en el capítulo anterior, los dendrímeros PAMAM de generación 4.0 y 4.5 pueden actuar como nanotransportadores y como nanodrogas. Además, pueden ser administrados por las vías intraperitoneal, ocular, transdérmica, oral, intravaginal e intranasal, presentando beneficios en el perfil farmacocinético de las drogas que transportan. Por todo lo mencionado, en este capítulo estudiaremos la interacción entre la TAC y los dendrímeros PAMAM, y el perfil toxicológico de la administración combinada en modelos *ex vivo*, *in vitro* e *in vivo*.

4.2 Resultados y Discusión

4.2.1 Obtención de los complejos D-TAC

La interacción entre los fármacos y los dendrímeros podría ocurrir por encapsulación en los bolsillos internos de estos últimos (donde predominan las interacciones hidrofóbicas o puente de hidrógeno) o por anclaje a los grupos terminales funcionales (mediado por interacciones electrostáticas). Los dendrímeros PAMAM generación 4.0 (DG4.0) y generación 4.5 (DG4.5) tienen bolsillos internos químicamente idénticos, formados por ramificaciones de cadenas nitrocarbonadas con enlaces amido-amina no ionizadas en condiciones fisiológicas. Además, a pH fisiológico, los DG4.0 tienen grupos amino terminales cargados positivamente ($-\text{NH}_3^+$) mientras que los DG4.5 tienen grupos carboxílicos cargados negativamente ($-\text{COO}^-$), que hacen posible el anclaje de los fármacos a través de interacciones electrostáticas. En este sentido, la TAC es una base con pKa de 9,85^{225,240} y una solubilidad en agua de $22,25 \pm 0,87$ mg/mL (~ 95 mM)²⁴¹. Por lo tanto, la TAC estaría protonada a pH fisiológico y podría interactuar electrostáticamente con los grupos carboxílicos terminales del DG4.5. Asimismo, debido a la elevada solubilidad en agua de la TAC, es poco probable que ocurran interacciones a nivel de los bolsillos internos. Es por ello que cabe destacar que el objetivo de este capítulo no es incrementar la solubilidad o estabilidad del compuesto bioactivo, sino disminuir su toxicidad y proponer nuevas vías de administración.

La combinación de la TAC con los DG4.0 o DG4.5 se estudió en la relación molar 1:200 D:TAC (0,024 mM de dendrímero con 4,8 mM de TAC). Al utilizar esta elevada relación, cada molécula de dendrímero tendría disponible 200 moléculas de TAC, por lo que la interacción dendrímero-droga podría ser detectada. Para estudiar la reproducibilidad se realizaron 70 repeticiones del protocolo de complejación (**Figura 4.1**).

El control de TAC en ausencia de dendrímeros resultó en la solubilización de 3878 ± 513 μM del fármaco, de los 4800 μM iniciales, mientras que la presencia del DG4.0 dio lugar a una solubilización promedio de 4050 ± 438 μM y la presencia del DG4.5 a un promedio de 4435 ± 444 μM de TAC (**Figura 4.1 A**). El análisis estadístico demostró que la TAC soluble fue significativamente mayor cuando el proceso de complejación ocurrió en presencia del DG4.5, por lo que la hipótesis de que la interacción entre el fármaco y este dendrímero se produciría por interacciones electrostáticas se refuerza. Sin embargo, la elevada variabilidad en los resultados no permite efectuar reflexiones concluyentes. Del mismo modo, los complejos DG4.0-TAC resultaron en una solubilización similar a la del control de TAC libre, por lo que el dendrímero no afectó la solubilidad del fármaco y permitió una correcta combinación de los tratamientos. Cabe destacar que, a pesar de que los valores corresponden a los promedios de todas las repeticiones realizadas del proceso

de complejación, dentro de cada réplica hubo una tendencia hacia una mayor solubilidad de la droga en presencia de ambos dendrímeros respecto de la TAC libre.

La cantidad total de TAC en las formulaciones después del proceso de complejación corresponde tanto a la TAC soluble no incorporada a dendrímeros como a la TAC complejada (en complejos D-TAC). Por ello, la cantidad de TAC presente en el control de droga libre de cada réplica del protocolo de complejación se restó de la cantidad total de TAC en los complejos D-TAC para calcular la cantidad de TAC complejada por dendrímero (**Figura 4.1 B**). Se calcularon un promedio de 15 ± 12 y 28 ± 20 moles de TAC por mol de DG4.0 y DG4.5, respectivamente. Sin embargo, en ambos casos se observó una gran dispersión en los resultados por lo que, luego de cada proceso de complejación, se cuantificó la cantidad de TAC soluble en todas las muestras obtenidas antes de ser utilizadas en cada uno de los ensayos realizados.

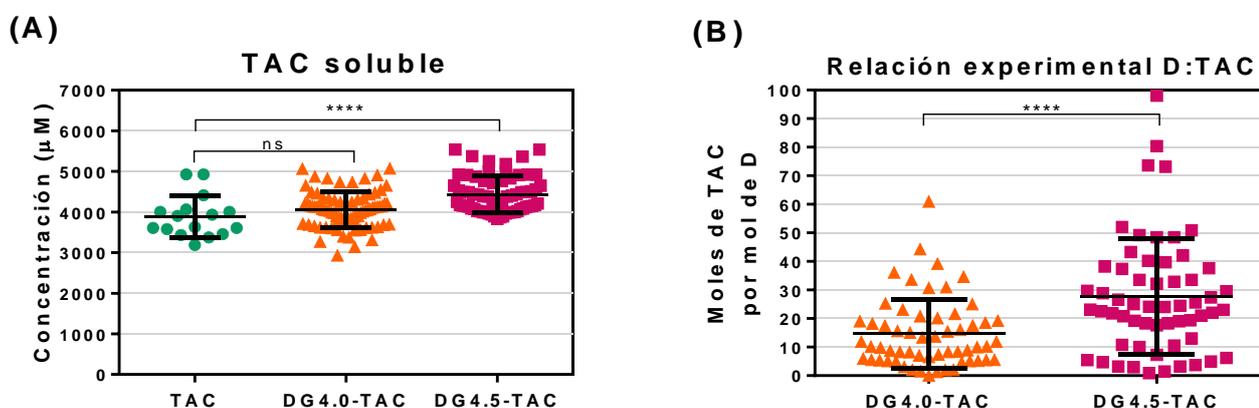


Figura 4.1 – Obtención de complejos D-TAC utilizando la relación molar 1:200 D:TAC. El protocolo de complejación se repitió ($n=70$) utilizando la relación 1:200 D:TAC para estudiar su reproducibilidad. **(A)** Concentración de TAC soluble luego del proceso de complejación. **(B)** Moles de TAC por mol de DG4.0 o DG4.5 obtenidos luego del proceso de complejación.

4.2.2 Estudios de estabilidad de la TAC en los complejos D-TAC

La TAC es un compuesto bioactivo soluble en agua y con una elevada estabilidad química, por lo que los estudios de estabilidad de la TAC en los complejos D-TAC se realizaron con el objetivo de asegurar que, en las muestras obtenidas del protocolo de complejación, los dendrímeros no afectaran la estabilidad de la TAC durante el almacenamiento a distintas temperaturas (4, 25 y 37 °C) (**Figura 4.2**).

En ninguno de los casos se observaron cambios a nivel macroscópico ni en los máximos en el espectro de absorbancia, así como tampoco en la cantidad de TAC soluble. Es por ello que podemos concluir que los dendrímeros no modificaron el perfil de estabilidad de la droga en medios acuosos durante los 60 días de estudio.

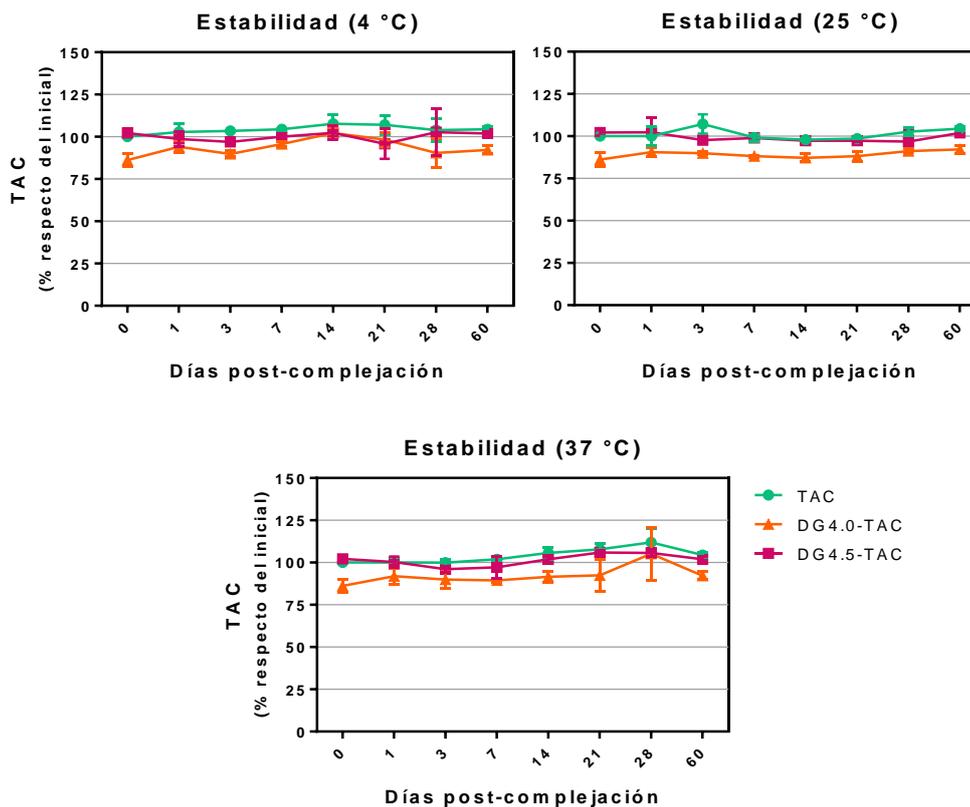


Figura 4.2 – Estabilidad de la TAC en los complejos D-TAC durante el almacenamiento a distintas temperaturas. La estabilidad de la TAC libre o en los complejos D-TAC se estudió durante el almacenamiento a 4, 25 o 37 °C. En los gráficos se presentan los porcentajes de TAC (con respecto a la concentración inicial en el control de TAC libre) en los distintos tiempos después de la complejación. No se encontraron diferencias significativas con respecto al control de TAC libre.

4.2.3 Estudios de la interacción D-TAC por FT-IR y liberación *in vitro*

Los DG4.5 presentaron una tendencia a incrementar la solubilidad de la TAC, mientras que los DG4.0 no lo hicieron, por lo que se reforzó la hipótesis de que la interacción DG4.5-TAC podría estar ocurriendo electrostáticamente. Para confirmar esta hipótesis, se estudiaron las interacciones D-TAC mediante espectroscopia FT-IR y estudios de liberación *in vitro*.

En primer lugar, se determinaron los espectros FT-IR de muestras liofilizadas de TAC, DG4.0, DG4.0-TAC, DG4.5, DG4.5-TAC y PBS. El espectro FT-IR del PBS liofilizado (**Figura 4.3 A**) se incluyó como un control interno de nuestro ensayo porque las muestras de TAC y D-TAC se prepararon en este *buffer* en el protocolo de complejación, por lo que las sales del mismo permanecen en las formulaciones sólidas obtenidas por liofilización. En este control, se encontró que las bandas de absorción a 528, 548, 668, 861, 949, 1074, 1163, 2341 y 2359 cm^{-1} corresponden a las vibraciones de los grupos fosfato de las sales del *buffer*. Como la mayoría de estas bandas

de absorción se localizan en la región de la “huella dactilar”, el análisis de los otros espectros se realizó en la región de 4000 a 1300 cm^{-1} .

El espectro FT-IR de la TAC liofilizada (**Figura 4.3 A**) mostró todas las bandas de absorción específicas del fármaco, incluidas las bandas de vibración del grupo $-\text{NH}_2$ a 3329 y 1272 cm^{-1} , las bandas de vibración de estiramiento del $-\text{CH}$ a 2918 y 2821 cm^{-1} , y la vibración característica de los anillos aromáticos entre 1600 y 1400 cm^{-1} ^{232,242}.

El espectro FT-IR del DG4.0 (**Figura 4.3 B**) mostró las vibraciones de estiramiento de los enlaces C-H y N-H del interior del dendrímero a 2917 y 2849 cm^{-1} ; la vibración de deformación de los grupos $-\text{NH}$ terminales a 1651 cm^{-1} ; y los enlaces de estiramiento de los enlaces C-C y C-N del interior del dendrímero a 1557 cm^{-1} ^{50,153,213,214}. En el espectro FT-IR del complejo DG4.0-TAC, se observó la desaparición de las bandas en 2917 y 2849 cm^{-1} correspondientes a los grupos internos del dendrímero, lo que podría reflejar un proceso de encapsulación. Sin embargo, las bandas de absorción correspondientes a la TAC no se vieron afectadas, y de existir encapsulación se esperarían ver corrimientos en los grupos interaccionantes de ambos compuestos. En este aspecto, es esencial tener en cuenta que estas muestras se liofilizaron y, durante este proceso de extracción del disolvente, se podrían maximizar las interacciones, tanto entre las propias moléculas de dendrímero, como entre la droga y el dendrímero.

Por otro lado, el espectro FT-IR del DG4.5 (**Figura 4.3 C**) mostró la vibración de flexión en los enlaces N-H de las amidas del interior del dendrímero a 3240 cm^{-1} y a 1642 cm^{-1} ; las vibraciones de estiramiento de los enlaces C-H y N-H también del interior del dendrímero a 2915 y 2849 cm^{-1} ; la vibración de estiramiento del $-\text{C}=\text{O}$ de los grupos $-\text{COOH}$ terminales a 1730 cm^{-1} ; y la vibración simétrica del $-\text{COOH}$ del grupo terminal a 1393 cm^{-1} ^{153,218}. En el espectro FT-IR del complejo DG4.5-TAC, se observaron la desaparición de las bandas a 2915, 2849 y 1730 cm^{-1} y el desplazamiento de la banda a 1393 cm^{-1} . Como las dos primeras bandas de absorción corresponden a grupos internos de los dendrímeros y las dos últimas bandas corresponden a las señales de los grupos carboxílicos terminales, las moléculas de TAC podrían estar interactuando tanto con los bolsillos internos del DG4.5 como con sus grupos terminales. Sumado a esto, el máximo a 1272 cm^{-1} correspondiente a la vibración $-\text{NH}_2$ de la TAC no se detectó en el espectro de los complejos, lo que confirma la interacción electrostática entre el fármaco y los carboxílicos terminales del DG4.5.

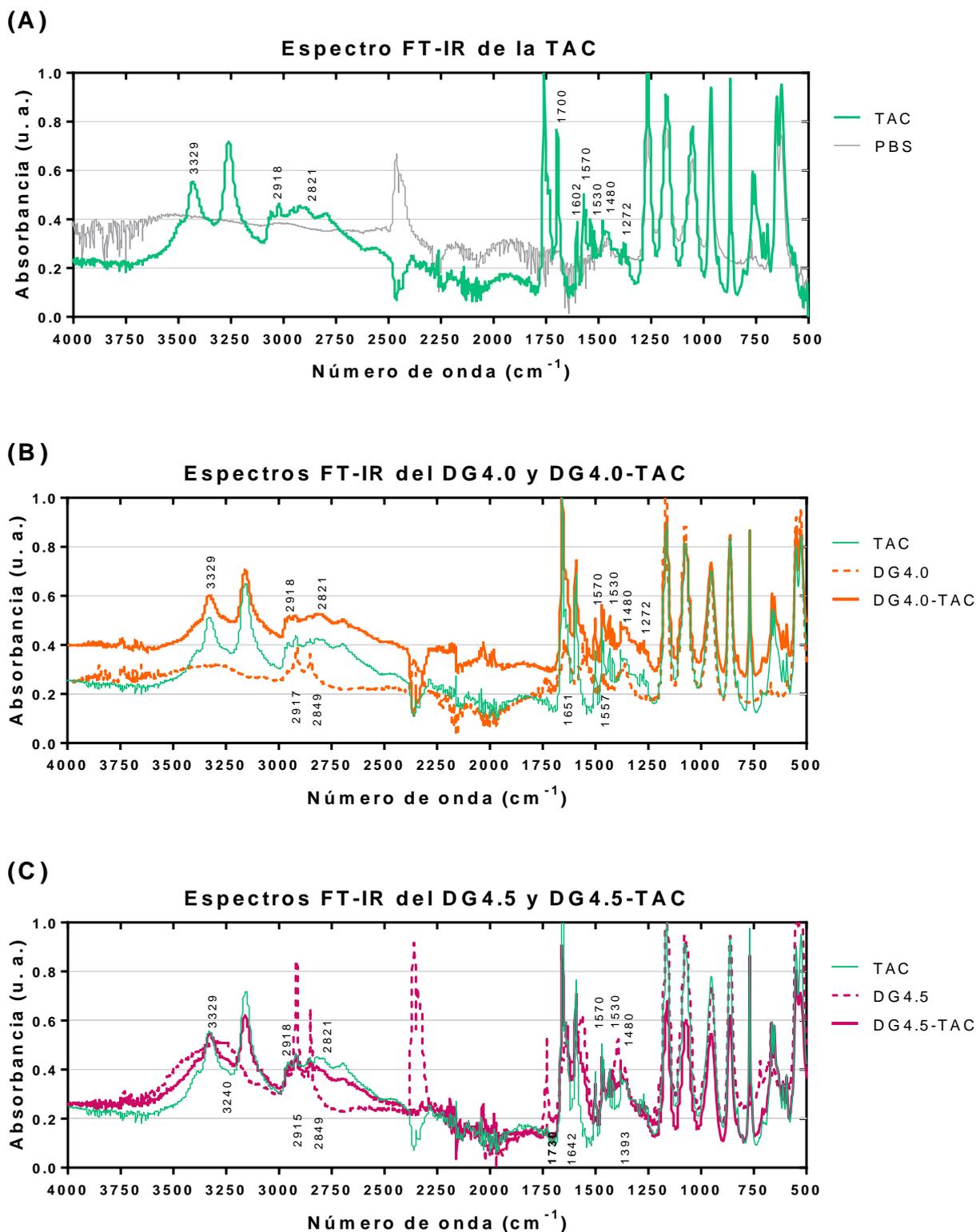


Figura 4.3 – Estudio de la interacción entre la TAC y los dendrímeros por análisis FT-IR. (A) Espectros FT-IR de la TAC liofilizada y del PBS liofilizado. En este ensayo se incluyó un control de PBS porque los complejos y dendrímeros se liofilizaron a partir de las suspensiones en dicho *buffer*, y las sales de fosfato tienen una fuerte señal en FTIR. (B) Espectros FT-IR de liofilizados del DG4.0 y los complejos DG4.0-TAC. (C) Espectros FT-IR de liofilizados del DG4.5 y los complejos DG4.5-TAC.

Considerando los resultados obtenidos, esta técnica confirmaría que la TAC interacciona con los DG4.5 electrostáticamente, y no lo hace con los DG4.0. Al igual que con los complejos D-CBZ discutidos en el capítulo 3, lo ideal sería caracterizar a los complejos D-TAC en suspensión acuosa tal cual se obtienen del protocolo de complejación. De este modo, se podrían confirmar o descartar las interacciones de la droga dentro de los bolsillos internos de los dendrímeros.

En segundo lugar, la estabilidad de los complejos obtenidos con esta droga se caracterizaron utilizando ensayos de liberación *in vitro*. Particularmente, se estudió la liberación acumulada de la TAC a partir de los complejos DG4.0-TAC y DG4.5-TAC frente a diluciones 1/50 y 1/100 en PBS 10 mM pH 7,4 (Figura 4.4).

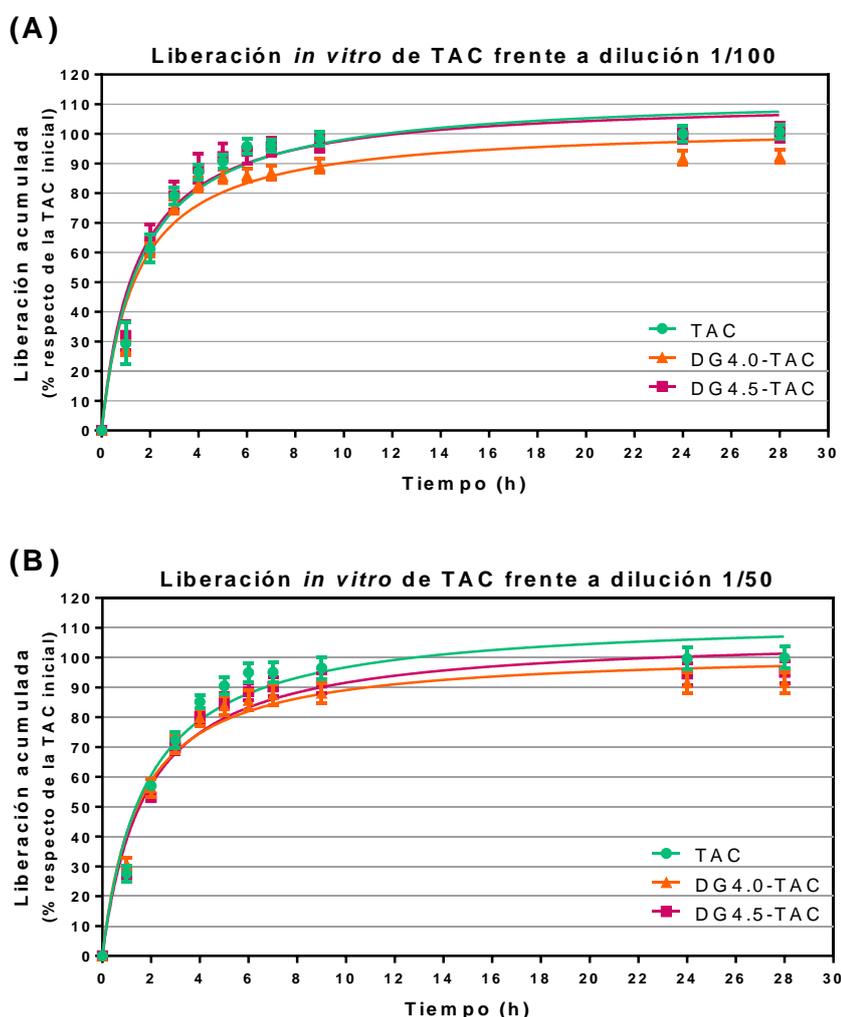


Figura 4.4 –Liberación *in vitro* de TAC a partir de complejos D-TAC en distintos factores de dilución. La liberación *in vitro* de la TAC a partir de los complejos D-TAC se estudió frente a (A) una dilución 1/100 y (B) una dilución 1/50 en PBS (10 mM pH 7,4). No se encontraron diferencias significativas en las muestras D-TAC con respecto al control de TAC libre en ninguno de los tiempos estudiados.

La utilización de distintos factores de dilución permite evaluar qué tan fuertes son las interacciones dendrímero-droga. Por ejemplo, si un complejo presentará un perfil de liberación controlada al utilizar un factor de dilución bajo (1/10 o 1/50), pero no liberará controladamente la droga frente a un factor de dilución alto (1/100 o 1/200), las interacciones que se establecen en dicho complejos no serían lo suficientemente fuertes; mientras que si un complejo presentará un perfil de liberación controlada en un amplio rango de factores de dilución, las interacciones establecidas serían fuertes. En los complejos D-TAC, utilizando ambos factores de dilución (1/50 y 1/100), se observó una liberación completa de la droga a partir de los complejos, con perfiles de liberación similares a los obtenidos para el control de TAC libre. Este hecho demuestra que las interacciones que existen en los complejos DG4.5-TAC son débiles.

Estos resultados fueron predecibles debido a que la TAC es una droga ionizada, en condiciones fisiológicas, y altamente soluble en agua, por lo que tenderá a liberarse de cualquier sistema donde no se encuentre anclada por interacciones fuertes (o enlaces covalentes). En ese aspecto, nuestros resultados concuerdan con los obtenidos previamente por Wilson y col. (2010), quienes reportaron que la liberación de la TAC a partir de nanopartículas de quitosano presentó el mismo perfil que el control de droga libre, sin demostrar procesos de liberación controlada en el tiempo ²²⁶. Por otro lado, nuestros resultados mostraron perfiles de liberación similares para la TAC libre y la complejada, mientras que los resultados presentados por Vihola y col. (2002) mostraron una liberación más rápida de la TAC a partir de partículas de PVCL con respecto al control de TAC libre ²⁴³.

En resumen, hemos demostrado que es posible combinar en solución acuosa a la TAC y los dendrímeros, sin reducir la solubilidad de la droga y que dicha solubilidad puede incrementarse levemente mediante interacciones electrostáticas con los DG4.5. Además, los complejos obtenidos fueron estables en solución manteniendo las características macro y microscópicas durante 60 días. Finalmente, la presencia de dendrímeros no modificó el perfil de liberación de la TAC, sugiriendo que el fármaco se mantiene “biodisponible” en estas formulaciones.

Finalizados los estudios de caracterización, se procedió con los estudios toxicológicos *ex vivo*, *in vitro* e *in vivo*. Los ensayos en humanos, previos al retiro de la TAC del mercado, demostraron que la concentración terapéutica variaba de 6 a 50 ng/mL ²⁴⁴, que corresponde a un rango de 25 a 213 μ M. Es de interés resaltar que, incluso en las concentraciones terapéuticas más bajas dentro de dicho rango, la TAC presentó efectos adversos a nivel hepático. Por otro lado, los dendrímeros *per se* demostraron tener un efecto inhibitor de la AChE, por lo que actuarían sinérgicamente con la TAC, permitiendo reducir la dosis de fármaco administrada. Ante estos datos, las caracterizaciones toxicológicas se realizaron en un amplio rango de concentraciones de TAC (0,03 a 300 μ M de TAC

en los estudios de toxicidad *in vitro* y 0,3 a 30 μM de TAC en los estudios de toxicidad *ex vivo* e *in vivo*).

4.2.4 Estudios de la toxicidad *ex vivo* en glóbulos rojos humanos

Los efectos hemolíticos y sobre la morfología de los glóbulos rojos humanos para los tratamientos con dendrímeros se describieron y se abordaron en el capítulo 3. Sin embargo, es de interés evaluar la toxicidad *ex vivo* de la TAC libre y de los complejos D-TAC obtenidos, dado que no existen reportes en la literatura en donde se los haya estudiado.

Por lo tanto, en este trabajo evaluamos los posibles efectos hemolíticos y morfológicos sobre glóbulos rojos humanos después de 4 o 24 h de tratamiento con TAC, dendrímeros o D-TAC (**Figura 4.5 y 4.6**). No se observaron efectos hemolíticos ni cambios morfológicos significativos respecto de los eritrocitos incubados con el control negativo (*buffer* isotónico) en ninguno de los tratamientos. Estos resultados confirman que, de ser necesario, los complejos obtenidos podrían ser administrados por vía intravenosa, además de por la vía transdérmica o nasal.

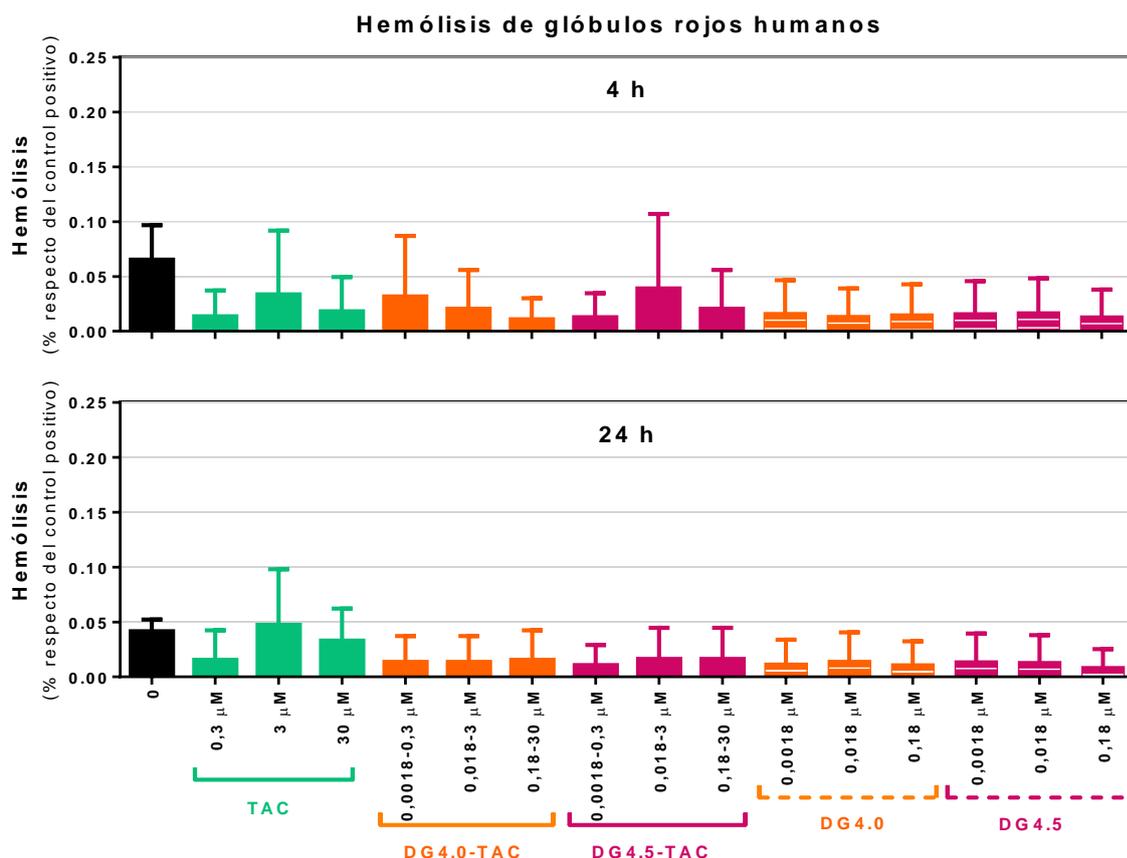


Figura 4.5 – Toxicidad *ex vivo* estudiada por hemólisis en glóbulos rojos humanos. Hemólisis después de 4 o 24 h de tratamiento con TAC, dendrímeros o complejos D-TAC. La hemólisis se expresó como un porcentaje respecto de la liberación de hemoglobina inducida por el control positivo de SDS (100% hemólisis). Los tratamientos no reportaron diferencias significativas respecto del control negativo.

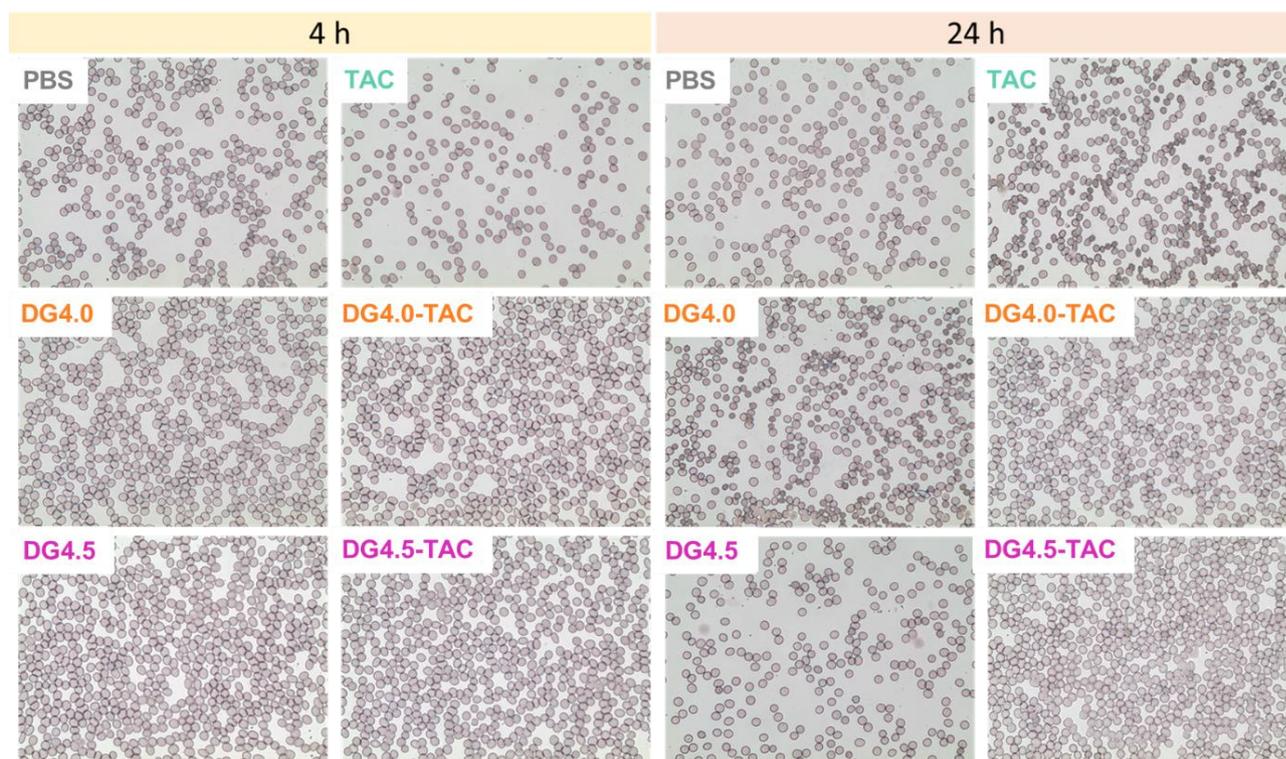


Figura 4.6 – Análisis morfológico de los glóbulos rojos humanos. Luego de 4 o 24 h de tratamiento con TAC (30 μM), dendrímeros (0,18 μM) o complejos D-TAC (0,18 μM de dendrímero con 30 μM de TAC), los glóbulos rojos humanos se tiñeron con Giemsa y se observaron por microscopía óptica. No se observaron cambios morfológicos en las células.

4.2.5 Estudios de la toxicidad *in vitro* en cultivo celular Neuro-2a

Como se explicó anteriormente, es de relevancia estudiar los efectos de los complejos obtenidos en cultivo celular, utilizando diversos métodos colorimétricos con el fin de identificar los posibles mecanismos toxicológicos. En el presente capítulo, estudiamos los efectos de la TAC libre, los dendrímeros y los complejos D-TAC en la línea celular Neuro-2a después de 4 o 24 h de tratamiento. Los parámetros determinados fueron la viabilidad por tinción con cristal violeta (CV); la actividad metabólica mediante el ensayo de MTT; y el nivel de afección de las membranas por el ensayo de captura de rojo neutro (RN).

Después de 4 h de incubación (**Figura 4.7**), el tratamiento con 300 μM de TAC libre causó una reducción significativa de la viabilidad celular (al ~75%) y en la captura de RN (al ~60%). La administración conjunta de TAC con los dendrímeros, en los complejos D-TAC, logró reducir los efectos a nivel de la viabilidad celular, restaurándola a valores cercanos al 100%. Sin embargo, no se lograron revertir los efectos a nivel de membrana. En este sentido, la administración de 1,8 μM de DG4.0 o DG4.5 (sin fármaco) por un corto periodo de tiempo no redujo significativamente la captación del RN, por lo que los efectos de los complejos D-TAC se deberían exclusivamente a la acción de la droga. En resumen, a las 4 h de tratamiento, la administración conjunta de TAC con

dendrimeros redujo la citotoxicidad del fármaco en la viabilidad celular, pero no logró reducir los efectos a nivel de membrana. Es esperable entonces que ocurran efectos tóxicos drásticos a largo plazo, por lo que también estudiamos la citotoxicidad después de 24 h de tratamiento.

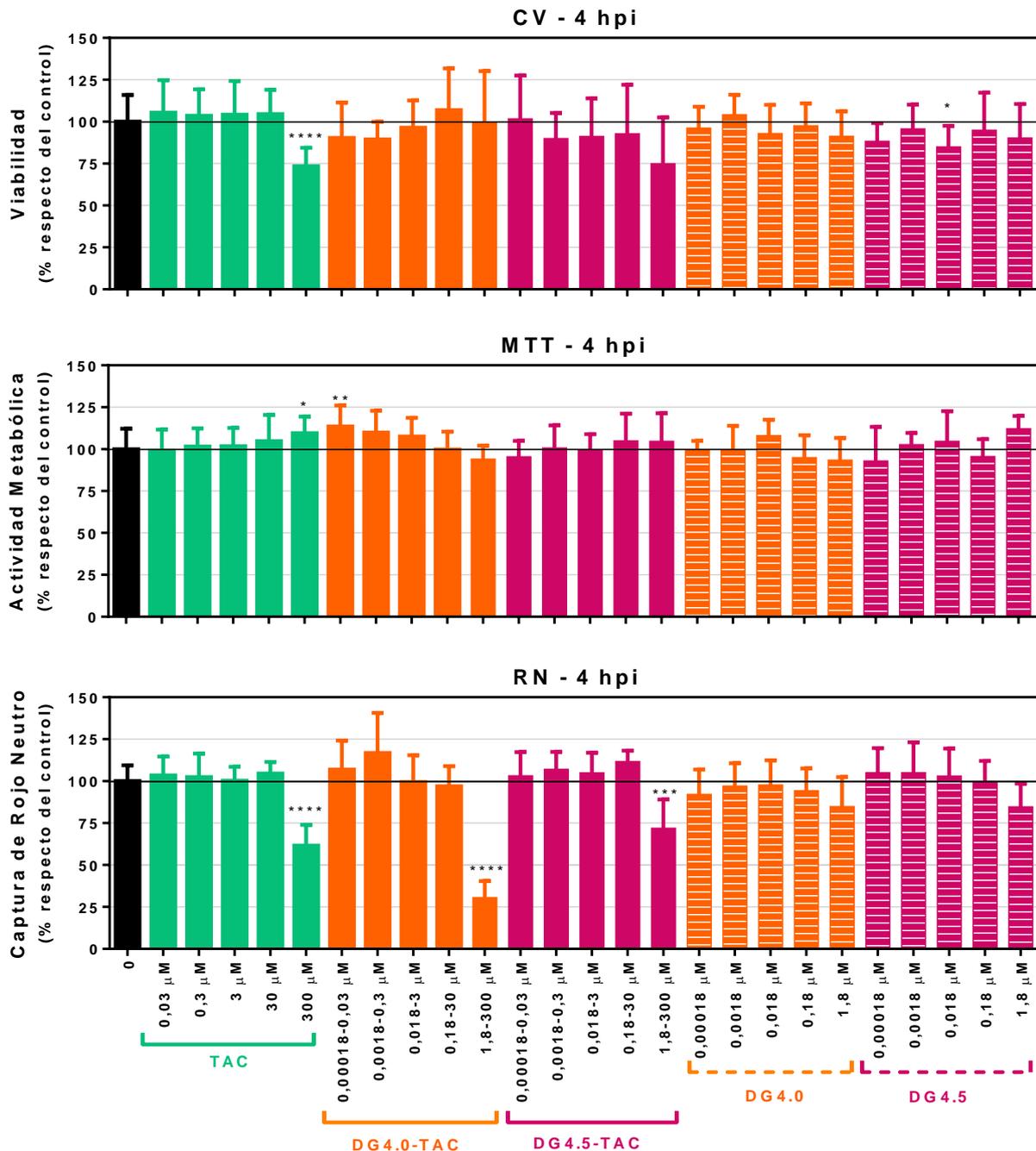


Figura 4.7 – Toxicidad *in vitro* en cultivo de células Neuro-2a por métodos colorimétricos luego de 4 h de tratamiento. La citotoxicidad luego de 4 h de tratamiento con TAC, dendrimeros o complejos D-TAC se determinó mediante el estudio de la viabilidad por tinción con cristal violeta (CV), de la actividad metabólica mediante el ensayo de MTT y de la afición de membranas mediante la captura de rojo neutro (RN). Todos los datos se expresaron como un porcentaje con respecto al control de células no tratadas, que se consideró como 100% de viabilidad, de actividad metabólica y de captura de RN.

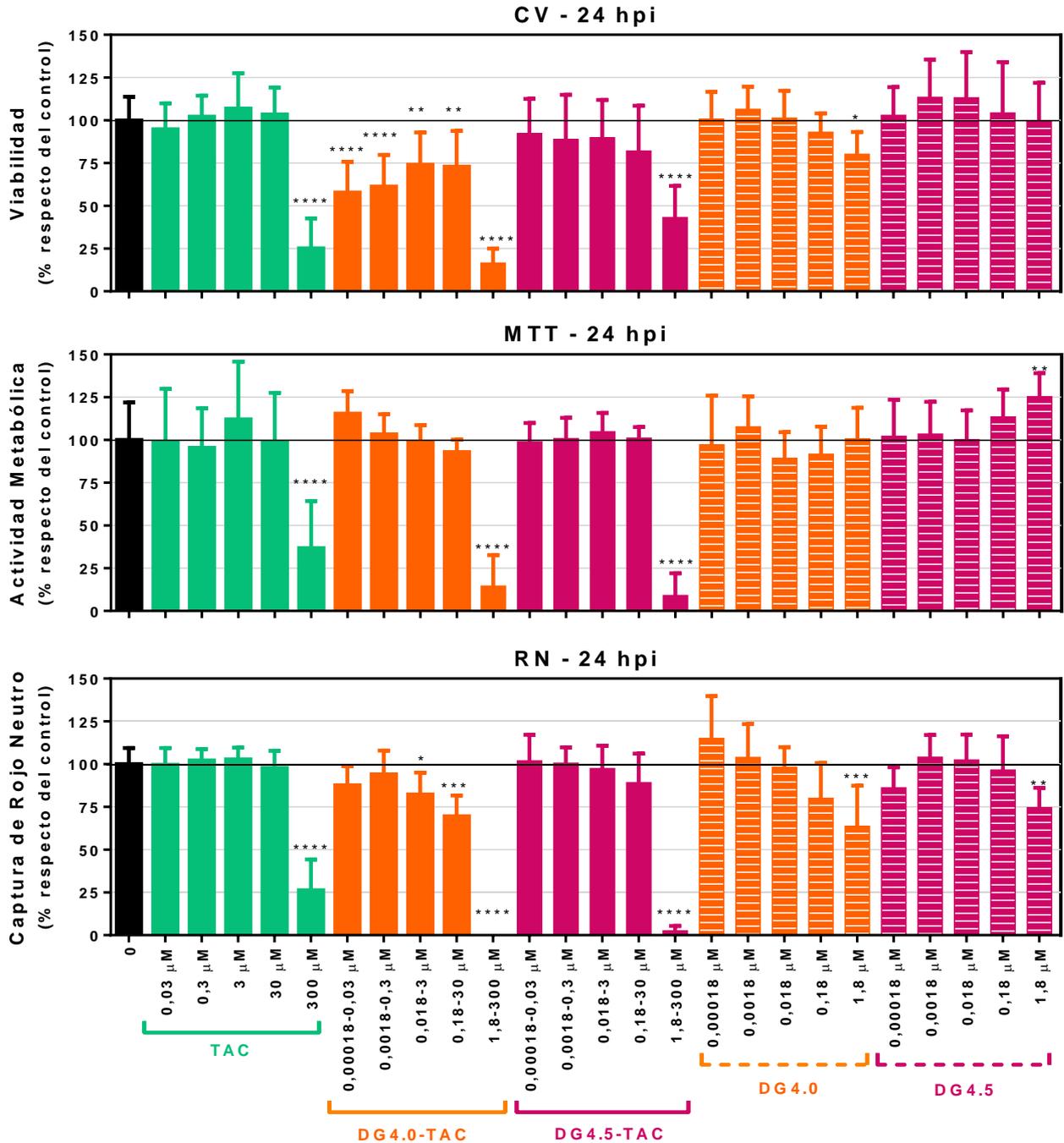


Figura 4.8 –Toxicidad *in vitro* en cultivo de células Neuro-2a por métodos colorimétricos luego de 24 h de tratamiento. La citotoxicidad luego de 24 h de tratamiento con TAC, dendrímeros o complejos D-TAC se determinó mediante el estudio de la viabilidad por tinción con cristal violeta (CV), de la actividad metabólica mediante el ensayo de MTT y de la afección de membranas mediante la captura de rojo neutro (RN). Todos los datos se expresaron como un porcentaje con respecto al control de células no tratadas, que se consideró como 100% de viabilidad, de actividad metabólica y de captura de RN.

Después de 24 h de tratamiento (Figura 4.8), la administración de 300 μM de TAC libre causó una reducción significativa en la viabilidad celular (al ~25%), en la actividad metabólica (al ~40%) y en

la captura de RN (al ~25%). La administración conjunta de TAC con DG4.0 o DG4.5, en los complejos D-TAC, no logró revertir estos efectos; la administración de DG4.0-TAC incluso aumentó la citotoxicidad, mostrando efectos a concentraciones menores de fármaco. Esto podría estar relacionado con una mayor captación del fármaco por parte de las células Neuro-2A, hecho que estaría mediado por los dendrímeros, pero no lo podemos afirmar sin la realización de estudios adicionales. Los resultados obtenidos son consistentes con los reportados en el capítulo 3, donde se observó que 1,2 μM de DG4.0 generó efectos citotóxicos medidos por el método de RN tras 24 h de tratamiento; en este caso, se trabajó con 1,8 μM de dicho dendrímero y se observaron efectos magnificados respecto del tratamiento con menor concentración.

Más allá de los efectos observados tras el tratamiento con 300 μM de TAC, la administración de concentraciones iguales o menores a 30 μM de droga libre o en el complejo DG4.5-TAC no exhibió efectos tóxicos por ninguno de los métodos en los tiempos de incubación estudiados. En consecuencia, el ajuste de la dosis será importante para la implementación de la administración de los complejos DG4.5-TAC. Por el contrario, la administración de 30 μM de TAC en los complejos DG4.0-TAC, redujo la viabilidad celular y provocó daños en las membranas medidos como una disminución en la captación de RN, luego de 24 h de tratamiento.

En conclusión, el uso de diferentes métodos para estudiar los efectos tóxicos en las células Neuro-2a, permitió demostrar que los complejos DG4.5-TAC presentaron una toxicidad *in vitro* reducida con respecto a la otra formulación (DG4.0-TAC) y a la TAC libre. Es importante tener en cuenta que, según estos resultados, en los tres casos se podrían realizar ajustes de la dosis para asegurar la compatibilidad de los tratamientos y así evitar los efectos secundarios.

4.2.6 Estudios de la biocompatibilidad *in vivo* en larvas de *Zebrafish*

En función de los resultados obtenidos en cultivo celular, y por lo anteriormente mencionado sobre los posibles efectos tóxicos de la TAC y de los dendrímeros, es fundamental estudiar la biocompatibilidad de los complejos D-TAC en un organismo vivo, como las larvas de *zebrafish*. Por lo que sabemos, este es el primer trabajo en el que se estudia la biocompatibilidad y toxicidad del TAC en este modelo animal.

En un pre-ensayo se estudió el efecto de diluciones seriadas 1/10 de TAC libre desde 300 a 0,03 μM (las mismas concentraciones que las evaluadas en cultivo celular). El tratamiento con 300 μM de TAC redujo la viabilidad a un 45,8% a las 4 h de tratamiento y conllevó la muerte del 100% de las larvas luego de 24 h de tratamiento. Por el contrario, el tratamiento con 0,03 μM de TAC no modificó la viabilidad de las larvas luego de 48 h de tratamiento. Es por ello que se decidió seguir trabajando con un rango acotado de concentraciones entre 30 y 0,3 μM de TAC para el resto de los estudios de biocompatibilidad. Luego de la administración de la TAC libre o en complejos D-TAC

se estudió la viabilidad (**Figura 4.9**), la actividad de nado espontáneo (**Figura 4.10**), el ritmo cardíaco (**Figura 4.11**), los cambios morfológicos generales (**Figuras 4.12 y 4.13**) y los daños a nivel hepático (**Figura 4.14**).

En este rango de concentraciones, ninguna de las formulaciones presentó efectos letales durante las primeras 24 h. Sin embargo, a las 48 h de tratamiento, la administración de 30 μM de TAC libre y de 30 μM de TAC con 0,18 μM de dendrímero en los complejos D-TAC, causaron la mortalidad del ~20% de las larvas (**Figura 4.9**). Si bien se observa una tendencia hacia una reducción de la viabilidad, los resultados obtenidos no fueron significativos cuando se compararon con el control de larvas sin tratar (incubadas solo con PBS) que reportaron el 100% de viabilidad.

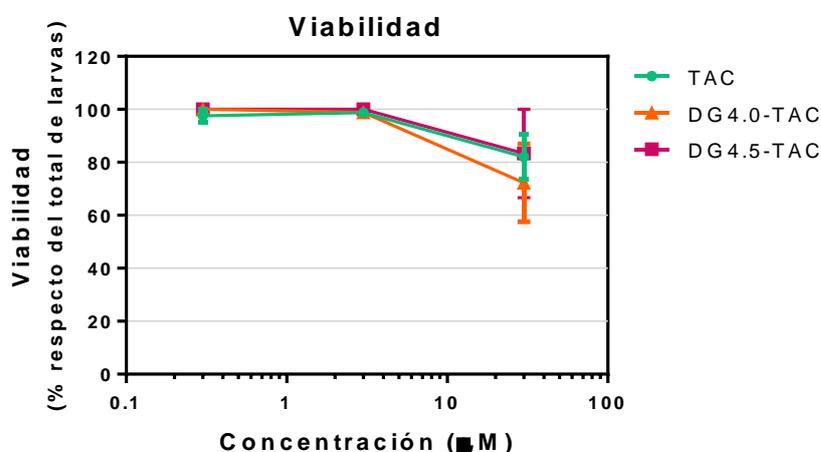


Figura 4.9 – Biocompatibilidad *in vivo* en larvas de *zebrafish*. Viabilidad. Viabilidad de larvas al 7 dpf después de 48 h de tratamiento con TAC o complejos D-TAC. La viabilidad se expresó como el porcentaje de larvas vivas con respecto al total de larvas tratadas.

Por otro lado, ninguno de los tratamientos en las concentraciones evaluadas presentó efectos significativos a nivel de la actividad de nado espontáneo de las larvas, por lo que no se observaron indicios de efectos neurotóxicos (**Figura 4.10**). Sin embargo, la administración de 30 μM de TAC libre o en complejos D-TAC redujo significativamente la frecuencia cardíaca en comparación con el control de larvas sin tratar, denotando efectos cardiotóxicos (**Figura 4.11**). Mientras que la administración de 30 μM de TAC libre redujo la frecuencia cardíaca en un ~55%, el tratamiento con DG4.5-TAC lo redujo en un ~50% y con DG4.0-TAC en un ~37%. En este sentido, la presencia de dendrímeros en la administración de la TAC presentó una tendencia hacia menores efectos a nivel cardíaco. Se podría considerar que este efecto cardiotóxico se debe únicamente al accionar de la TAC, dado que se informó anteriormente que los dendrímeros PAMAM no tienen efectos cardiotóxicos sobre las larvas de *zebrafish* en las concentraciones aquí utilizadas. En particular, nuestro grupo de trabajo informó que los DG4.0 fueron tóxicos para las larvas en concentraciones superiores a 0,5 μM , mientras que los DG4.5 no fueron tóxicos hasta 20 μM ¹⁵⁸.

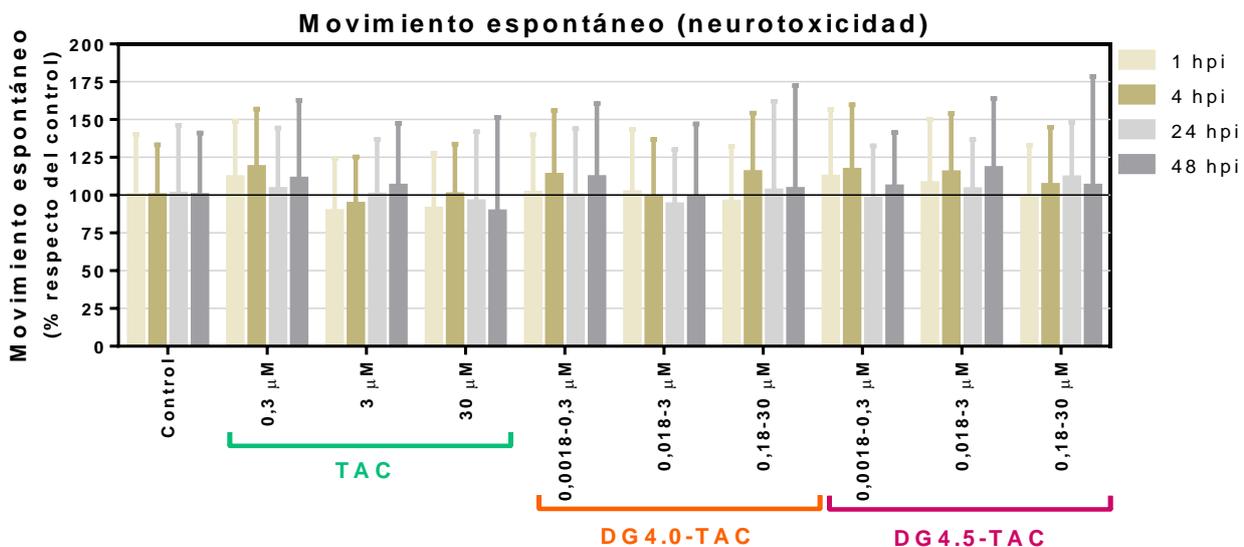


Figura 4.10 – Biocompatibilidad *in vivo* en larvas de *zebrafish*. Neurotoxicidad. Movimiento espontáneo de larvas de *zebrafish* después de 1, 4, 24 y 48 h de tratamiento con TAC o complejos D-TAC. El movimiento espontáneo se expresó como un porcentaje con respecto al movimiento en el control de larvas no tratadas. No se encontraron diferencias significativas con respecto a dicho control.

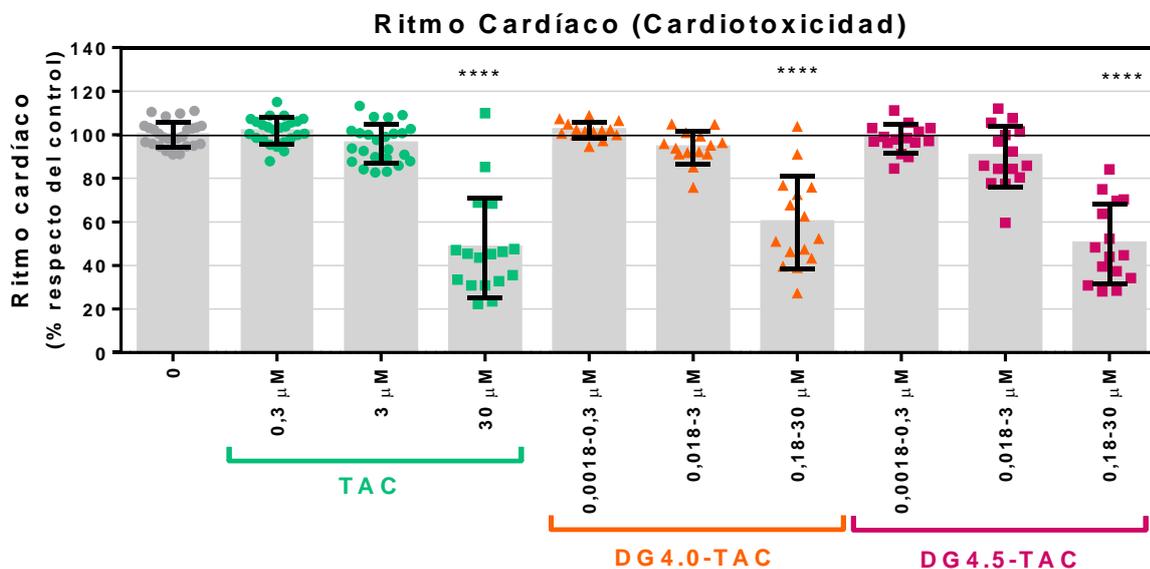


Figura 4.11 – Biocompatibilidad *in vivo* en larvas de *zebrafish*. Cardiotoxicidad. Ritmo cardíaco de larvas al 7 dpf después de 48 h de tratamiento con TAC o complejos D-TAC. El ritmo cardíaco se expresó como el porcentaje de latidos en las larvas tratadas con respecto a los latidos en el control de larvas no tratadas.

Sumado a esto, la administración de 30 μM de TAC libre o en complejos D-TAC dio lugar a cambios morfológicos significativos (Figura 4.12 y 4.13), tales como columna vertebral doblada, vejiga

natatoria desinflada, necrosis en la región de la cabeza, necrosis del saco vitelino y malformación de la cola. Las larvas fueron puntuadas según la cantidad de malformaciones que presentaron, lo que permitió determinar un promedio de cambios morfológicos. El tratamiento con 30 μM de TAC presentó un promedio de 1,8, mientras que los tratamientos con complejos D-TAC presentaron un promedio de 1,3. A pesar de no reducir significativamente los efectos de la TAC, la administración de los complejos D-TAC presentó una tendencia hacia menores daños morfológicos. Asimismo, las malformaciones observadas tras la administración de complejos no fueron letales, mientras que las observadas en el tratamiento con TAC libre incluyeron necrosis en varios tejidos, que constituyen cambios morfológicos más severos.

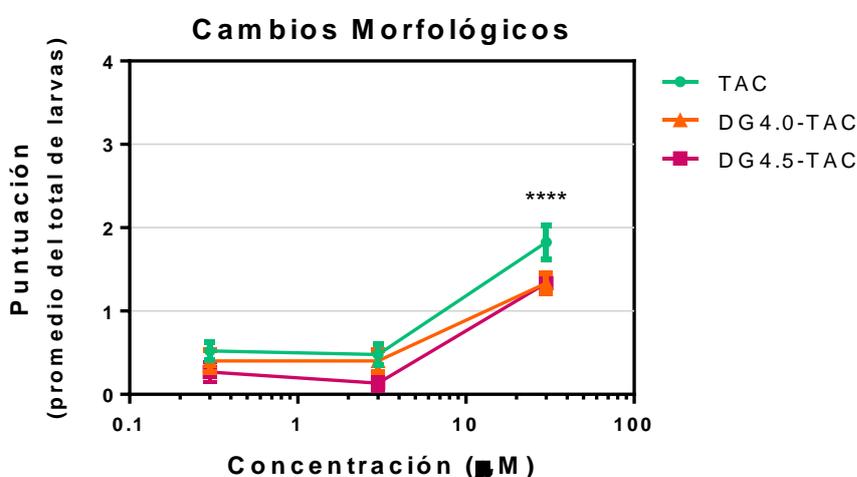


Figura 4.12 – Biocompatibilidad *in vivo* en larvas de *zebrafish*. Puntuación de cambios morfológicos. Los cambios morfológicos se puntuaron según el grado de anomalías de las larvas de *zebrafish* a los 7 dpf, después de 48 h de tratamiento con TAC o complejos D-TAC.

Finalmente, en cuanto a los efectos hepáticos (**Figura 4.14**), el 66,7% de las larvas tratadas con 30 μM de TAC presentaron hígado necrosado (oscuro y opaco), mientras que solo el 46,7% de las larvas tratadas con DG4.5-TAC presentaron este efecto. Sorprendentemente, el tratamiento con DG4.0-TAC solo causó hepatotoxicidad en el 26,7% de las larvas. Estos resultados demuestran que la presencia de dendrímeros en la administración de TAC tiene un efecto hepático disminuido, reportando mejoras respecto del tratamiento actual con TAC libre. Las larvas tratadas con concentraciones iguales o menores a 3 μM de TAC, tanto libre como en complejos D-TAC, no presentaron indicios de hepatotoxicidad.

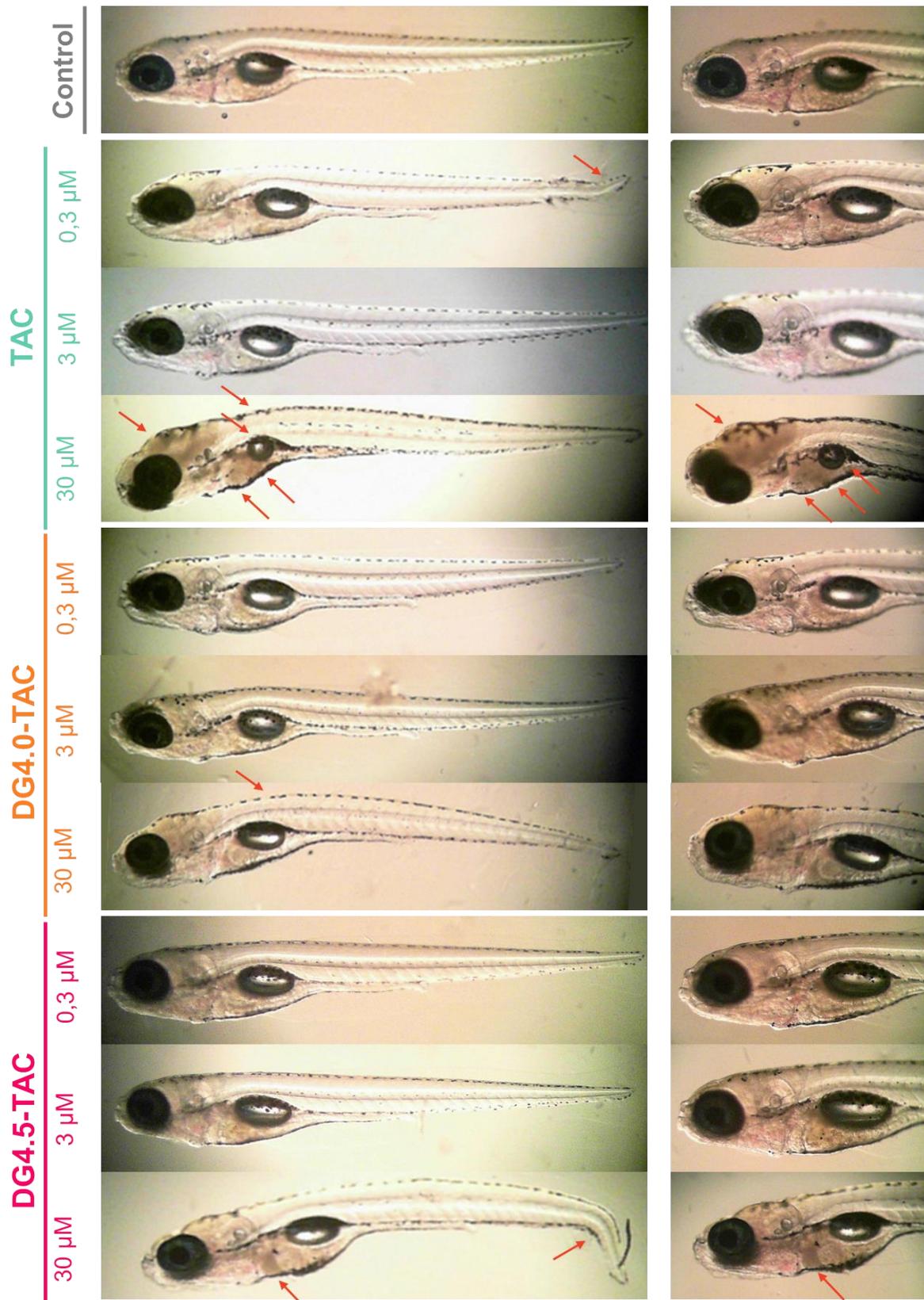


Figura 4.13 – Biocompatibilidad *in vivo* en larvas de *zebrafish*. Cambios morfológicos. Fotografías representativas de las larvas de *zebrafish* a los 7 dpf, luego de 48 h de tratamiento con TAC o complejos D-TAC. Los cambios morfológicos significativos se indicaron con flechas rojas.

Hepatotoxicidad
(% de larvas con daño hepático respecto el total de larvas)

TAC		66,7%
DG4.0-TAC		26,7%
DG4.5-TAC		46,7%

Figura 4.14 – Biocompatibilidad *in vivo* en larvas de *zebrafish*. Hepatotoxicidad. Fotografías representativas del hígado de larvas después de 48 h de tratamiento con TAC (30 μ M) o complejos D-TAC (0,18 μ M de dendrímero con 30 μ M de TAC) y hepatotoxicidad expresada como el porcentaje de larvas con daño hepático respecto del total de larvas analizadas.

Nuevamente, es importante resaltar que la administración de TAC libre o en complejos D-TAC en dosis sub-letales no produjo ningún efecto tóxico en larvas de *zebrafish*. Teniendo en cuenta estos resultados y los obtenidos previamente en ensayos *ex vivo* e *in vitro*, podemos concluir que la administración conjunta de TAC con DG4.0 o DG4.5 fue más biocompatible y menos tóxica que la de TAC libre, siendo necesario el ajuste de las dosis a administrar en todos los casos. Las terapias combinadas DG4.0-TAC y DG4.5-TAC se presentan entonces como alternativas novedosas al tratamiento actual.

4.3 Resumen de resultados y conclusiones parciales

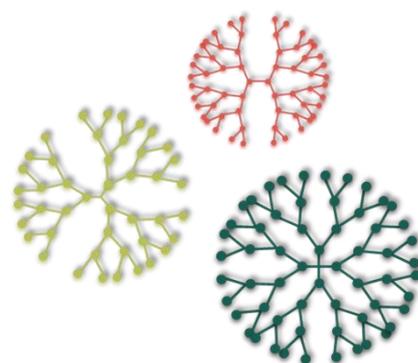
- Se ha propuesto la co-administración de TAC con dendrímeros PAMAM, con el objetivo de reducir los efectos tóxicos de la droga y potenciar el efecto anti-AChE para el tratamiento de la EdA.
- La presencia de dendrímeros no afectó la solubilidad del fármaco y permitió una correcta combinación de los tratamientos. Se calcularon un promedio de 15 y 28 moles de TAC por mol de DG4.0 y DG4.5, respectivamente. Sin embargo, los resultados presentaron una variabilidad elevada.
- Los dendrímeros no modificaron el perfil de estabilidad de la TAC en medios acuosos por al menos 60 días, cuando fueron almacenados a 4, 25 y 37 °C.
- La TAC interaccionó con los grupos superficiales de los DG4.5 a través de interacciones electrostáticas, sin embargo la fuerza de interacción no fue suficiente para retenerla frente a una dilución y generar un perfil de liberación controlada.
- Los complejos obtenidos DG4.0-TAC y DG4.5-TAC no fueron hemolíticos ni causaron cambios morfológicos en los ensayos *ex vivo* en glóbulos rojos humanos, por lo que se podrían administrar por vía intravenosa, así también como por vías no convencionales (transdérmica o intranasal).
- La citotoxicidad *in vitro* del fármaco en cultivo celular se redujo cuando la TAC se incorporó en los dendrímeros, pero solo en tiempos cortos de incubación (4 h). Después de 24 h de tratamiento, los complejos no lograron reducir completamente la toxicidad de la droga libre. De todos modos, los complejos DG4.5-TAC presentaron toxicidad reducida con respecto al otro complejo (DG4.0-TAC).
- Respecto de los estudios *in vivo* en *zebrafish*, la TAC libre presentó efectos sobre la viabilidad de las larvas, disminuyó el ritmo cardiaco, produjo cambios morfológicos severos y necrosis en el tejido hepático. La administración de la TAC con dendrímeros presentaron efectos tóxicos reducidos, siendo el complejo DG4.0-TAC el que presentó un menor efecto a nivel hepático.
- Tanto en los ensayos *in vitro* como *in vivo*, se observó que las concentraciones más bajas de TAC libre o complejada con dendrímeros no presentaron efectos tóxicos, por lo que el ajuste de la dosis será importante para la administración de estas terapias combinadas.

Se desprenden de estas conclusiones las siguientes perspectivas:

- ✓ Explorar la capacidad de los complejos DG4.0-TAC y DG4.5-TAC para transportar la TAC por vías no tradicionales de administración (transdérmica o nasal).
- ✓ Estudiar la capacidad de los complejos para inhibir sinérgicamente la AChE.

Capítulo 5

Complejación de Curcumina



Capítulo 5 – Complejación de Curcumina

5.1 Introducción

La curcumina (CUR) es un polifenol natural derivado de la planta herbácea *Curcuma longa*, nativa del sureste de Asia. Junto con otros curcuminoides conforman las sustancias bioactivas de esta raíz ²⁴⁵. Químicamente, la CUR es un polifenol que posee dos hidroxilos fenólicos y un dominio β -dicetona- α - β -insaturado en su estructura. Este último dominio presenta equilibrio ceto-enólico en solución acuosa, pudiendo encontrarse tres tautómeros: diceto (dos grupos cetonas), ceto-enol (un grupo cetona y un grupo alcohol) y dienol (dos grupos alcohol) (**Figura 5.1**) ^{246–248}. Los tautómeros presentes en mayor proporción son el diceto y el ceto-enol, aunque su contribución relativa depende de varios factores como las características del solvente y la temperatura ²⁴⁹.

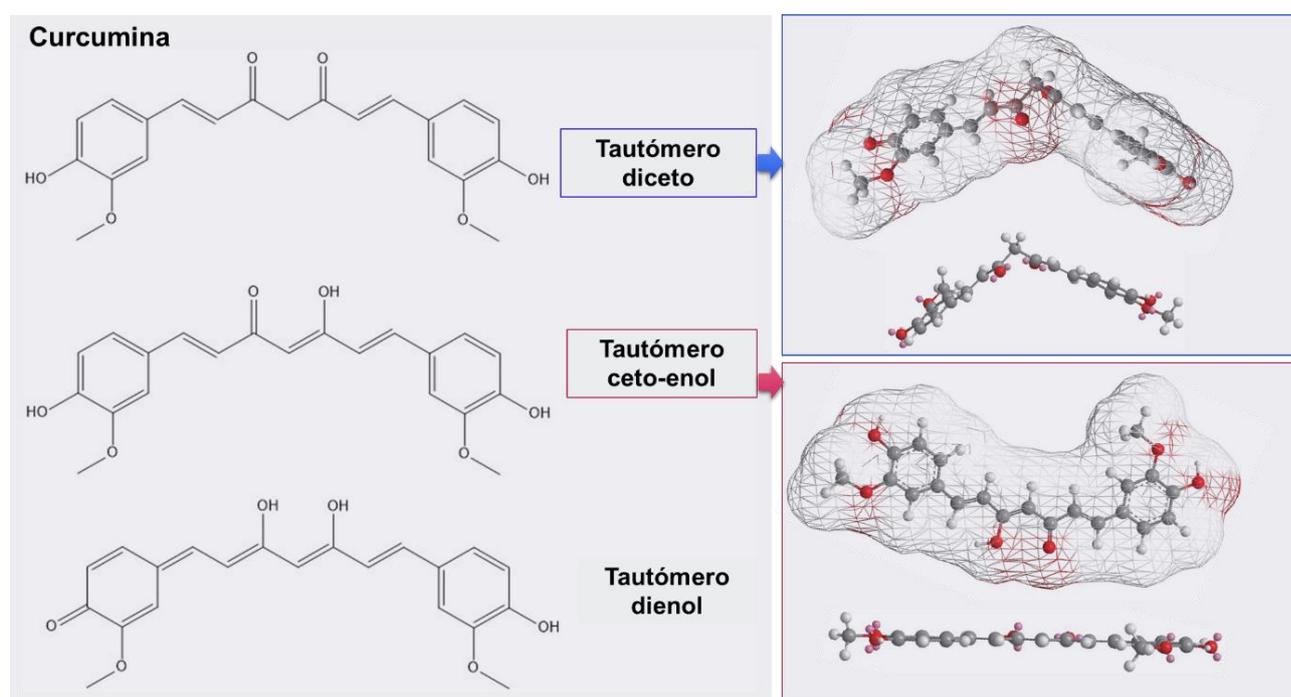


Figura 5.1 – Estructura química de los tautómeros de la curcumina. La curcumina sufre equilibrio ceto-enólico en solución acuosa, dado lugar a tres tipos de tautómeros con propiedades diferentes.

El tautómero diceto de la CUR presenta dos grupos cetonas ubicados en forma antiparalela, lo que genera que la molécula tenga una disposición angular y dos fragmentos feruloil no conjugados. La absorbancia máxima de la forma diceto se reportó entre 350 y 365 nm, por transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ de

las unidades feruloil no conjugadas ^{250,251}. Este tautómero es el reconocido como medicinalmente activo, y el que predomina en medios acuosos a pH ácido o neutro ^{252,253}.

El tautómero ceto-enol de la CUR presenta un grupo cetona y un grupo alcohol, lo que genera una estructura completamente conjugada y planar (debido a que entre el grupo cetona y el alcohol se establece un puente de hidrógeno intramolecular). La absorbancia máxima en este tautómero se reportó entre 420 y 430 nm, por transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ de la CUR completamente conjugada ^{250,251}. Este tautómero es el presente en solventes orgánicos, en agua a pH alcalino y en estado sólido ^{252,253}. A su vez, el tautómero ceto-enol puede presentarse en las formas isoméricas cis o trans, también dependiendo de las condiciones del medio ²⁴⁹.

Por otro lado, los hidrógenos fenólicos de la CUR presentan propiedades ácido-base, con pKas de 8,38, 9,88 y 10,51 en solución acuosa ^{252,254}. Por tanto, a pH fisiológico la CUR se encuentra en su forma neutra, más hidrofóbica.

La CUR es generalmente utilizada como especia en las comidas asiáticas, como colorante en alimentos a escala mundial y como medicina en las prácticas orientales y ayurvedas. Además, ha demostrado ser un compuesto con múltiples mecanismos de acción que podría modular la progresión de la EdA ^{9,246,255-259}. Por ejemplo, se ha demostrado tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* que la CUR:

- ✓ aumenta los niveles de ACh (dado que inhibe la enzima AChE).
- ✓ inhibe la producción de A β (por que inhibe de la expresión de la β -secretasa), impide la formación de agregados de A β y promueve la desagregación de los ya formados (debido a que su naturaleza hidrofóbica le permite interactuar con las proteínas formadoras de la placa impidiendo que interaccionen entre sí).
- ✓ inhibe la fosforilación de Tau (por que inhibe la quinasa GSK-3 β) y disminuye la agregación de Tau (debido a que activa la expresión de la chaperona BAG2 encargada de transportar a Tau al proteosoma para su degradación).
- ✓ actúa como antioxidante reduciendo los niveles de estrés oxidativo (reacciona directamente con los radicales libres y activa indirectamente la respuesta citoprotectiva contra el estrés oxidativo).
- ✓ actúa como anti-inflamatorio (dado modula la actividad de la microglia, reduciendo los niveles de TNF- α y de citoquinas pro-inflamatorias).

Estos efectos se deberían a la capacidad de la CUR de modular múltiples vías de señalización simultáneamente, incluyendo las relacionadas con factores de transcripción, proteínas activadoras, enzimas, arresto del ciclo celular y proliferación celular ¹²¹.

A pesar de toda la evidencia a favor de esta droga para el tratamiento de la EdA y de que ha demostrado ser segura en dosis elevadas en humanos, los estudios clínicos que se llevaron a cabo hasta el momento no tuvieron resultados positivos ²⁶⁰. Esto podría deberse a la baja biodisponibilidad de la droga, que impide que se alcancen las dosis terapéuticas efectivas ^{121,261}. En particular, la baja absorción oral, la rápida metabolización y la elevada tasa de eliminación del sistema contribuyen a la baja biodisponibilidad de la CUR ²⁶². Sumado a ello, de lo poco que se absorbe, la CUR es metabolizada por sulfatación y glucuronación en varios tejidos, lo que reduce su actividad ²⁶¹. Adicionalmente, su escasa solubilidad en agua (0,6 µg/mL, 1,63 µM, a 25 °C) y su inestabilidad en condiciones fisiológicas (tiempo de vida media corto), constituyen otros desafíos a superar para su aplicación en el tratamiento de la EdA. Específicamente, la CUR presentó un tiempo de vida media menor a 10 min en PBS 10 mM pH 7,2 a 37°C ²⁶⁰. Además, la CUR ha demostrado ser muy inestable a la luz, degradándose a vainillina, ácido vainillínico, aldehído ferúlico y ácido ferúlico ¹²¹.

Según lo mencionado, incorporar la CUR en un sistema de *delivery* nanotecnológico podría dar lugar a una estrategia terapéutica exitosa. Por ello, en esta tercera propuesta tenemos el objetivo de desarrollar y caracterizar una terapia combinada entre la CUR y dendrímeros PAMAM generación 4.0 y 4.5, dando lugar a un sistema de *delivery* capaz incrementar la solubilidad y estabilidad de la droga en medios acuosos, y de actuar como potenciador en el tratamiento de la EdA.

5.2 Resultados y discusión

5.2.1 Obtención de los complejos D-CUR

La CUR posee una escasa solubilidad en agua (0,6 $\mu\text{g/mL}$, 1,63 μM , a 25 °C), inestabilidad en condiciones fisiológicas (tiempo de vida media corto) y baja biodisponibilidad (baja absorción oral, rápida metabolización y elevada tasa de eliminación del sistema). En este sentido, los dendrímeros PAMAM se presentan como buenos candidatos para incrementar la solubilidad y estabilidad de esta droga en medios acuosos. Como se describió anteriormente, el tipo y la estabilidad de la interacción droga-dendrímero dependerá de las características del nanomaterial, del compuesto bioactivo y de las condiciones del medio. Particularmente, los dendrímeros PAMAM de generación 4.0 (DG4.0) y generación 4.5 (DG4.5) podrían encapsular estas moléculas de fármaco en sus bolsillos internos, o bien anclarlas en sus grupos funcionales terminales.

En primer lugar, se evaluó la capacidad de ambos dendrímeros (DG4.0 y DG4.5) de formar complejos con la CUR. Para ello, diferentes cantidades de droga se expusieron a una cantidad constante de dendrímero, con el objetivo de estimar el número máximo de moléculas de CUR que se pueden complejar por cada molécula de dendrímero. Las relaciones molares teóricas D:CUR estudiadas fueron 1:2, 1:5, 1:10, 1:25, 1:50, 1:100 y 1:150. La CUR soluble luego del protocolo de complejación, se determinó por el método indirecto descrito en la sección 2.3.3 (Figura 5.2).

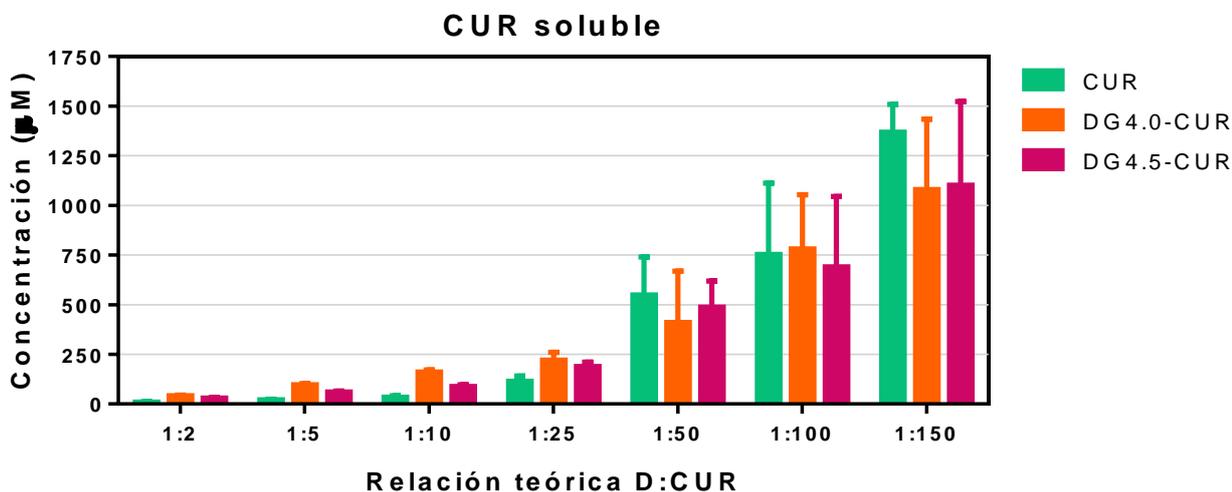


Figura 5.2 – Optimización de la relación molar D:CUR utilizada para obtener los complejos D-CUR. Concentración de CUR soluble, cuantificada por el método indirecto, luego del proceso de complejación en distintas relaciones molares teóricas D:CUR (desde 1:2 a 1:150).

Cuando se utilizaron las relaciones molares D:CUR 1:2, 1:5, 1:10 y 1:25, se observó que la cantidad de droga soluble en los complejos D-CUR fue superior al control de CUR libre. Por el contrario,

cuando la relación molar fue 1:50 o superior, los resultados exhibieron una cantidad similar de droga soluble en el control y en los complejos. Sin embargo, estos resultados obtenidos por una cuantificación indirecta no se pueden correlacionar con lo esperado teóricamente al considerar que la CUR es un compuesto poco soluble en agua, por lo que su concentración en medios acuosos no podría exceder el límite de solubilidad ($1,6 \mu\text{M}$). Asimismo, tampoco se correlacionan con lo observado en los espectros de absorción UV-Vis (**Figura 5.3**) ni a nivel macroscópico (**Figura 5.4**). Cuando se determinaron los espectros de absorción UV-Vis en PBS del control de CUR, de los dendrímeros y de los complejos D-CUR luego del protocolo de complejación, se observó que mientras los complejos DG4.0-CUR y DG4.5-CUR presentaron el máximo de absorbancia característico a 424 nm, el control de droga libre no presentó absorbancia, lo que podría significar que no hubo droga soluble, o que se encontró por debajo del límite de detección del equipo. Del mismo modo, al observar macroscópicamente las suspensiones obtenidas durante el protocolo de complejación, el control de CUR libre no presentó el color anaranjado característico de este compuesto, mientras que este color sí se observó en los complejos D-CUR.

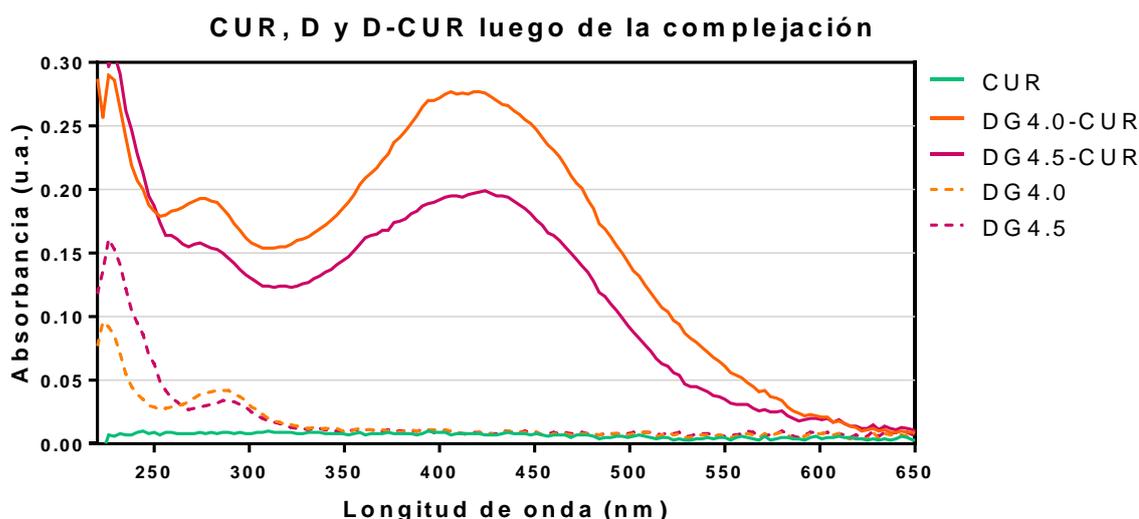


Figura 5.3 – Espectros de absorción UV-Vis de suspensiones de CUR, D y D-CUR en PBS. Espectros de absorción UV-Vis de las suspensiones en PBS de CUR, dendrímeros y complejos D-CUR obtenidas luego del protocolo de complejación, utilizando la relación teórica 1:50 D:CUR.

En este aspecto, la cantidad de droga que no se encontró en el *pellet* luego de la centrifugación (cuantificada por el método indirecto y representada en la Figura 5.2), pero que tampoco se encontró en la suspensión al finalizar el protocolo (representada en la Figura 5.3), podría corresponder a la CUR que se degrada o se pierde durante el proceso de complejación. Esta degradación podría ocurrir por la propia inestabilidad de la CUR en soluciones acuosas, así como también por el proceso de evaporación del metanol utilizado para la preparación de las muestras. Por ejemplo, si se observa en detalle la **Figura 5.4**, se podrá notar que la muestra de CUR libre da

lugar a un *pellet* claro, mientras las muestras de D-CUR dan lugar a *pellets* de un color rojo-naranja intenso, a pesar de que las tres soluciones metanólicas iniciales poseían la misma cantidad de droga. Es decir, los dendrímeros no solo permitirían obtener una mayor cantidad de la droga en solución acuosa, sino que tendrían la capacidad de estabilizar e impedir la degradación durante el proceso de evaporación de solvente.

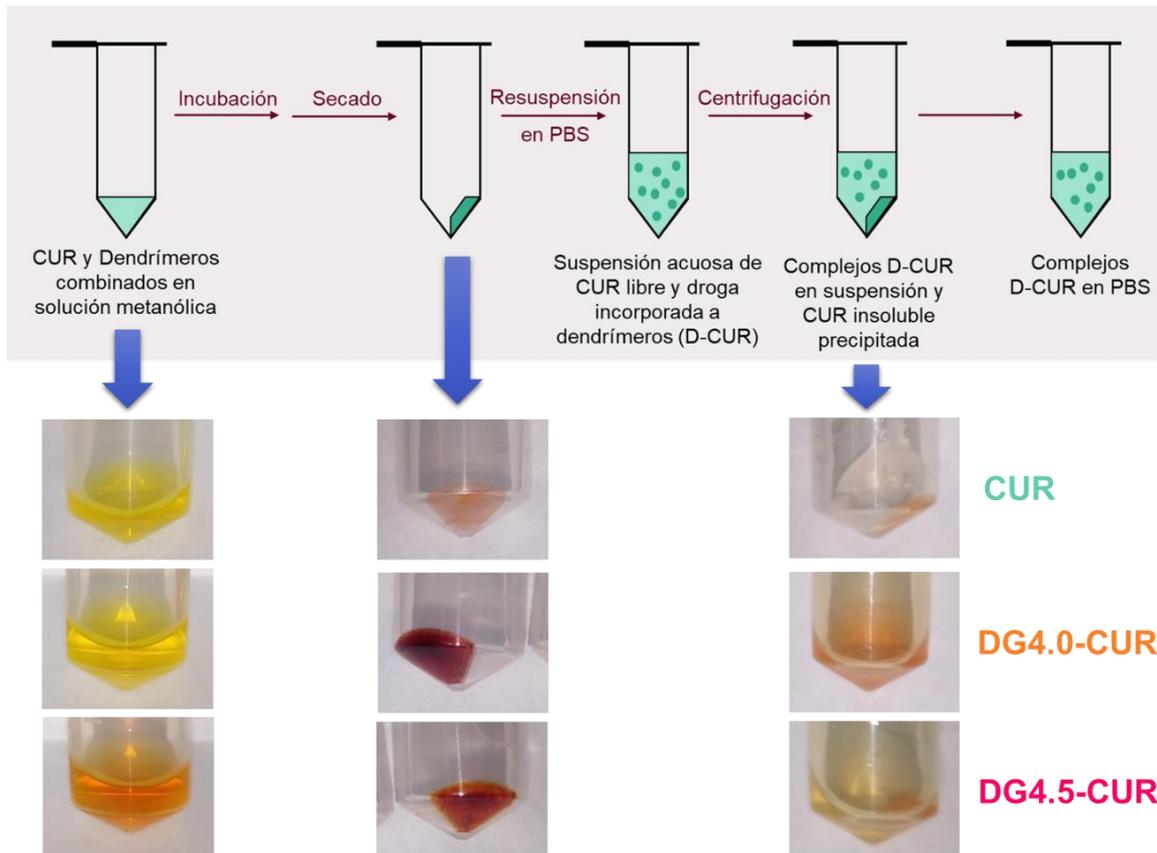


Figura 5.4 – Fotografías de muestras de CUR y D-CUR a lo largo del protocolo de complejación. Fotografías representativas de las muestras de CUR, DG4.0-CUR y DG4.5-CUR a lo largo del proceso de complejación utilizando la relación teórica 1:50 D:CUR.

Dicho esto, la optimización de la relación molar D:CUR utilizada en el método de complejación debería balancear una buena solubilidad final de la CUR (en los complejos D-CUR), sin demasiada pérdida de droga durante el proceso. Es por ello que se descartaron las relaciones molares iguales o superiores a 1:50 D:CUR y se repitieron las complejaciones utilizando las relaciones molares 1:2, 1:5, 1:10 y 1:25 D:CUR.

En dichas relaciones se observó que la cantidad de droga soluble en los complejos D-CUR fue significativamente superior a la presente en el control de CUR libre (**Figura 5.5**). Los mayores grados de significancia se obtuvieron para las relaciones 1:10 y 1:25, pero en dichas muestras también se observó una mayor cantidad de droga degradada/perdida durante el proceso (reflejado

en el control de CUR libre). Por otro lado, al utilizar las relaciones 1:5, 1:10 y 1:25, se observó que los moles de CUR soluble por mol de dendrímero fueron significativamente mayor en las muestras con el DG4.0, respecto de las muestras con el DG4.5. Esta diferencia en la solubilidad de la CUR se podría deber a interacciones particulares establecidas con cada tipo de dendrímero. Como la CUR es una molécula hidrofóbica, se hipotetizó que las interacciones ocurrirían mayoritariamente a nivel de los bolsillos internos de los dendrímeros, pero no se puede descartar la existencia de interacciones del tipo ion-dipolo, establecidas entre los grupos terminales de los dendrímeros y la CUR.

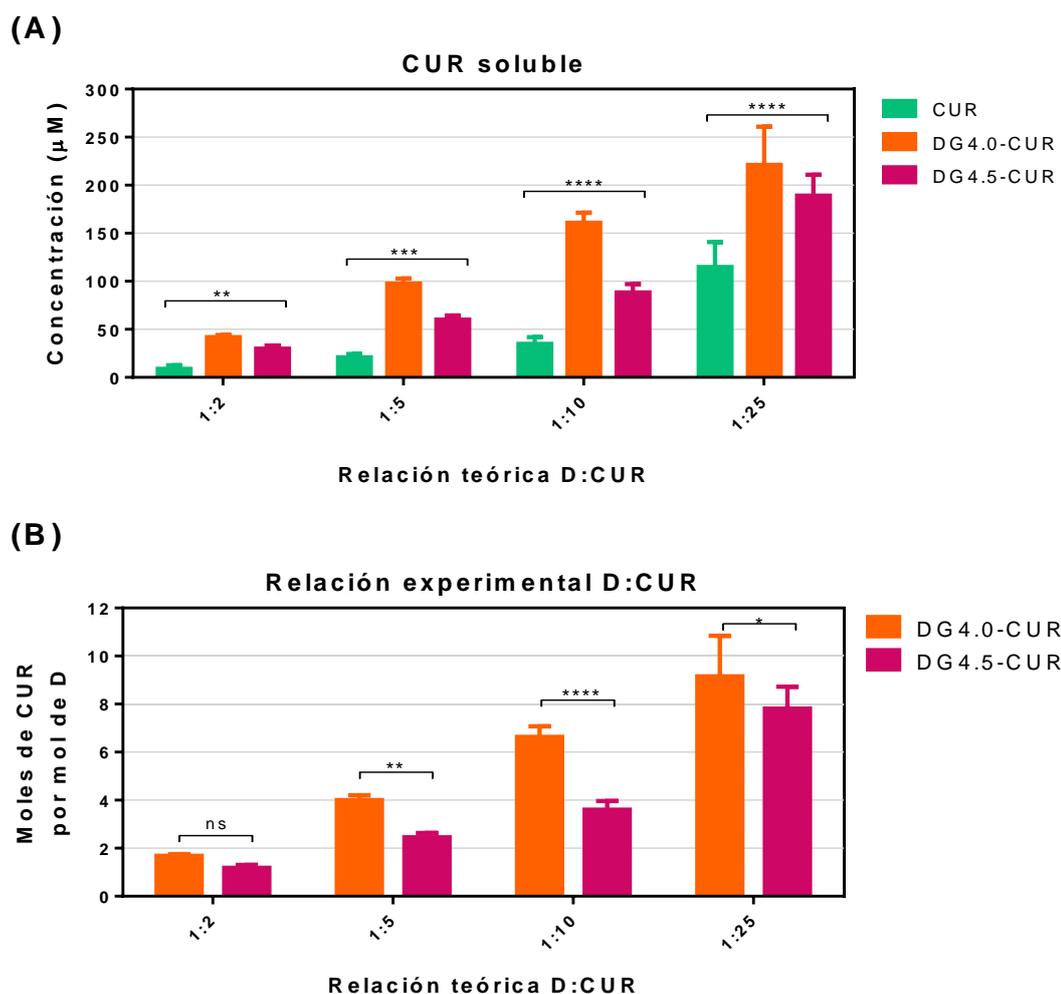


Figura 5.5 – Optimización de la relación molar D:CUR utilizada para obtener los complejos D-CUR. La CUR y los dendrímeros se combinaron en distintas relaciones molares teóricas D:CUR. **(A)** Concentración de CUR soluble, cuantificada por el método indirecto, luego del proceso de complejación en distintas relaciones molares teóricas D:CUR (desde 1:2 a 1:25). **(B)** Moles de CUR por mol de DG4.0 o DG4.5 obtenidos luego del proceso de complejación.

En promedio, la relación molar teórica 1:10 dio lugar a la complejación de 6 y 4 moléculas de CUR por cada molécula de DG4.0 y D4.5, respectivamente; mientras que la relación molar 1:25 dio lugar a la interacción de 9 y 8 moléculas de CUR por cada molécula de DG4.0 y D4.5, respectivamente.

Estos resultados concuerdan con los reportados por Markatou y col. (2007), quienes estudiaron la incorporación de dimetoxicurcumina en dendrímeros PAMAM de G3.5 y G4.0, utilizando distintas relaciones molares teóricas dendrímero:dimetoxicurcumina (desde 1:2 a 1:10). Los resultados obtenidos por este grupo indicaron que relaciones iniciales 1:8 y 1:10 fueron necesarias para alcanzar la incorporación máxima de 4,2 y 5,0 moléculas de CUR por mol de DG3.5 o de DG4.0, respectivamente ²⁴⁵.

En la búsqueda de un balance entre incrementar la concentración de CUR soluble y que no se degrade/pierda gran cantidad de droga durante el proceso, decidimos seguir trabajando con la relación molar teórica 1:10 D:CUR; dicha relación se utilizó para estudiar la reproducibilidad del protocolo de complejación. Los resultados obtenidos (**Figura 5.6**) demuestran que, al formar complejos con dendrímeros, la solubilidad de CUR aumentó significativamente en medios acuosos.

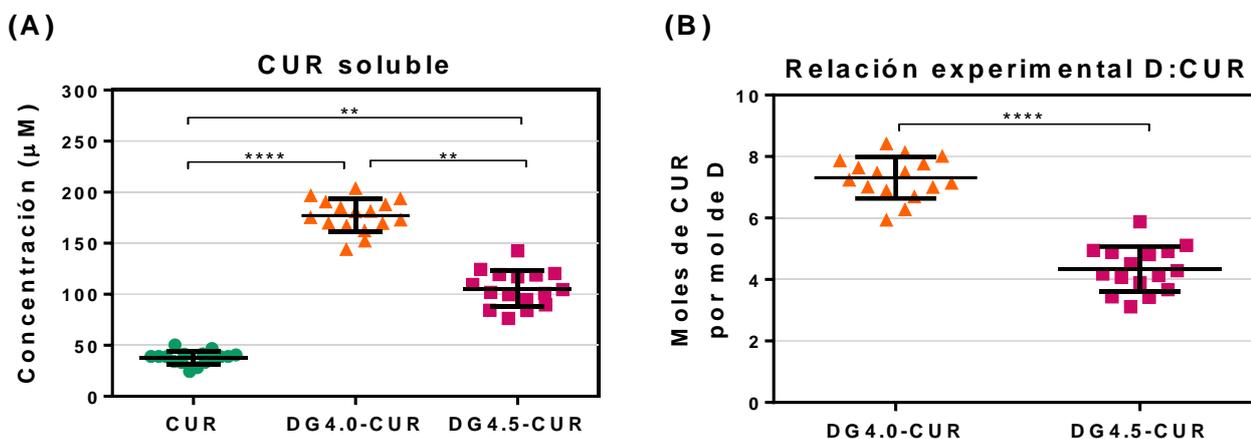


Figura 5.6 – Obtención de complejos utilizando la relación molar 1:10 D:CUR. El protocolo de complejación se repitió (n=16) utilizando la relación 1:10 D:CUR para estudiar su reproducibilidad. **(A)** Concentración de CUR soluble luego del proceso de complejación. **(B)** Moles de CUR por mol de DG4.0 o DG4.5 obtenidos luego del proceso de complejación.

En el control de CUR libre se obtuvo una resuspensión promedio de $37,77 \pm 6,38 \mu\text{M}$ cuantificada por el método indirecto; como la solubilidad de la droga en agua es $1,6 \mu\text{M}$, podemos suponer que la diferencia entre dichos valores es la cantidad de CUR que se degrada/pierde durante el proceso de complejación. En el caso de los complejos DG4.0-CUR la concentración de CUR fue de $177,1 \pm 16,2 \mu\text{M}$ y en los DG4.5-CUR de $105,5 \pm 17,7 \mu\text{M}$. En los complejos D-CUR no podemos asegurar que se degrade/pierda la misma cantidad de droga que en el control de CUR libre dado que, como se explicó anteriormente, los dendrímeros presentarían un efecto estabilizador de la droga durante el proceso de evaporación del solvente. Como la concentración de dendrímero en suspensión es conocida, podemos entonces señalar que se logró incrementar la cantidad de CUR soluble a través

de la complejación de un promedio de 7 ± 1 y 4 ± 1 moles de CUR por mol de DG4.0 y DG4.5, respectivamente.

En este caso, se volvió a observar una diferencia significativa entre la cantidad de CUR soluble en los complejos DG4.0-CUR y en los DG4.5-CUR, lo que podría deberse a un patrón de interacción diferencial entre la droga y los distintos dendrímeros. Como una primera aproximación para la interpretación de estos resultados, se determinaron los espectros de absorción UV-Vis y los espectros de emisión de fluorescencia de las suspensiones en PBS de CUR libre y de los complejos D-CUR obtenidos luego del protocolo de complejación (Figura 5.7). En los complejos D-CUR, la droga podría estar encapsulada en el interior de los dendrímeros donde el ambiente sería hidrofóbico, podría estar anclada a los grupos superficiales de los dendrímeros donde el ambiente tendería a ser hidrofílico, o podría encontrarse en suspensión en la fase acuosa en un ambiente totalmente hidrofílico. Se esperaría que, si la CUR se encuentra en entornos fisicoquímicos distintos, se observara algún cambio en el espectro de absorción UV-Vis o en el espectro de emisión de fluorescencia, dado que se ha demostrado que la CUR posee máximos de absorbancia y de emisión de fluorescencia distintos dependiendo de la polaridad del medio y del tipo de tautómero predominante^{249,250}.

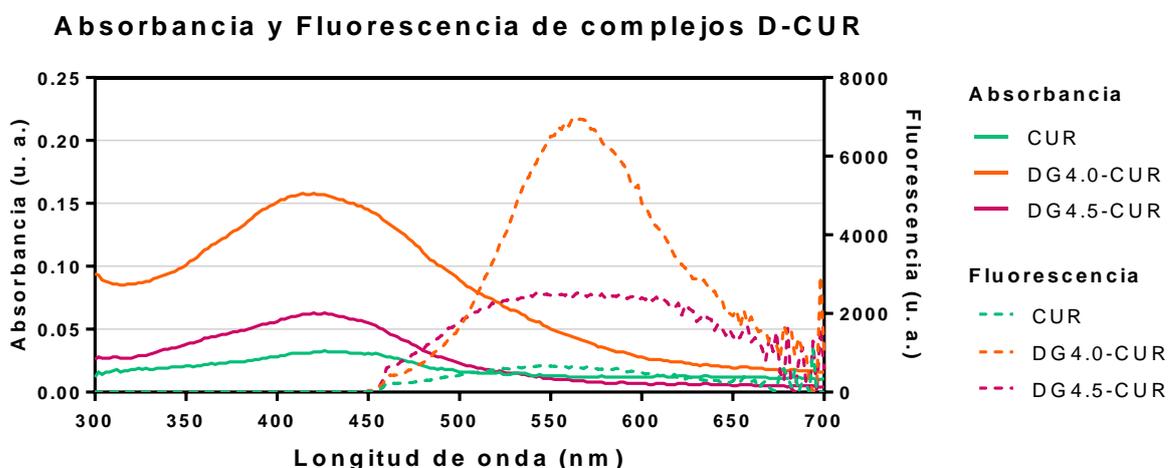


Figura 5.7 – Espectros de absorción y de emisión de fluorescencia de CUR y D-CUR. Espectros de absorción UV-Vis de las suspensiones de CUR y D-CUR obtenidas luego del proceso de complejación en la relación teórica 1:10 D:CUR, y espectros de emisión de fluorescencia al excitar dichas muestras a 424 nm.

Sin embargo, en los distintos complejos D-CUR, no se observaron cambios en los máximos de absorbancia/emisión que podrían correlacionarse con modificaciones en el entorno de la droga, y solo se observaron cambios en la intensidad de absorbancia/emisión que están relacionados con la cantidad de droga soluble. Es importante resaltar que el máximo de absorbancia de la droga en

ambos complejos se mantuvo a 424 nm, por lo que la CUR complejada se encontraría en la forma tauomérica ceto-enol, que es la predominante en solventes orgánicos. Además, cuando la CUR complejada se excitó a 424 nm, su máximo de emisión de fluorescencia se encontró a 560 nm, lo que también está reportado para la forma ceto-enol ²⁶². En este sentido, se podría constatar que la interacción mayoritaria ocurre en los bolsillos internos de los dendrímeros donde existiría un ambiente más hidrofóbico.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Cao y col. (2013), quienes estudiaron la interacción de la CUR con dendrímeros PAMAM G4.0 modificados en su superficie con ramificaciones carbonadas (C₁₂), a los que llamaron PAMAM-C₁₂ 25%. Ellos reportaron, por estudios espectroscópicos, que la CUR unida a sus dendrímeros presentó un máximo de absorbancia a 454 nm, correspondiente a la forma ceto-enol de la droga. Asimismo, por estudios de *docking* determinaron que sus dendrímeros poseían cinco sitios de unión para CUR, obteniendo una relación molar 1:5 D:CUR, y que las uniones se estabilizaban por interacciones hidrofóbicas, de puente de hidrógeno y de van der Waals ²⁵⁰.

Según lo expuesto, la relación 1:10 fue la seleccionada para generar todos los complejos utilizados en los ensayos a continuación descritos, y debido a la variabilidad observada, la cantidad de CUR soluble se cuantificó en todas las muestras utilizadas. De todos modos, es interesante resaltar que la variabilidad observada en estos complejos es mucho menor que las reportadas previamente para los complejos D-CBZ y D-TAC.

5.2.2 Estudios de estabilidad de la CUR en los complejos D-CUR

La CUR es reconocida como una droga con baja solubilidad y elevada inestabilidad en medios acuosos. Por otro lado, los dendrímeros tienen la capacidad de aumentar la solubilidad y estabilidad de los compuestos bioactivos con los que forman complejos. Como se demostró anteriormente, los DG4.0 y DG4.5 incrementaron significativamente la cantidad de CUR soluble en PBS, por lo que es relevante entonces estudiar si tienen algún efecto positivo sobre la estabilidad de la droga. Consecuentemente, se utilizaron cuatro enfoques distintos para abordar el estudio de la estabilidad de la CUR en los complejos D-CUR.

5.2.2.1 Estabilidad en el tiempo de la CUR en los complejos D-CUR en suspensión

En primer lugar, se evaluó la estabilidad de la CUR en el tiempo y en diversas condiciones de almacenamiento, a partir de suspensiones acuosas de CUR libre o en complejos D-CUR. Para ello, las muestras fueron almacenadas en oscuridad a -20, 4 o 25 °C durante 30 días luego del proceso de complejación. A tiempos predeterminados se realizaron observaciones macroscópicas (**Figura 5.8**), se determinó la absorbancia a 424 nm característica de la forma ceto-enol de la CUR (**Figura 5.9**) y se midieron los espectros de absorbancia UV-Vis (**Figura 5.10**).

En la **Figura 5.8** se ejemplifican los cambios en las muestras a los 30 días de almacenamiento, sin embargo estas observaciones macroscópicas se realizaron rutinariamente. En las muestras de CUR libre, no se observaron cambios a lo largo del ensayo en ninguna de las tres temperaturas utilizadas, lo que se debe a que no existe droga en solución que pueda ser detectada a simple vista.

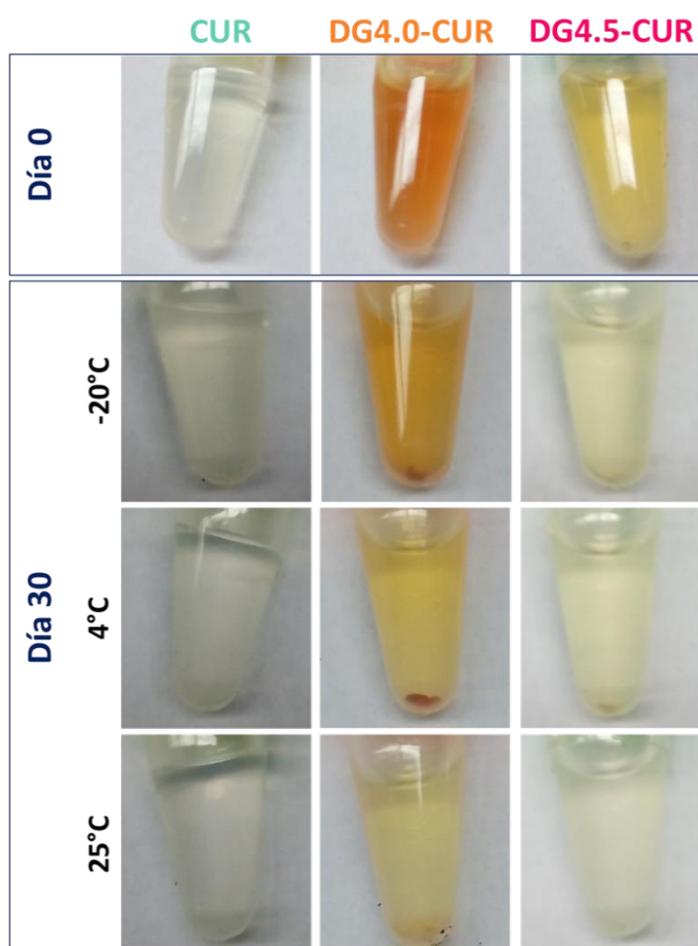


Figura 5.8 – Fotografías de suspensiones de CUR y D-CUR durante el almacenamiento. Se presentan fotografías de las suspensiones de CUR y D-CUR inmediatamente después del protocolo de complejación (día 0), y luego de 30 días de almacenamiento a distintas temperaturas (-20, 4 y 25 °C).

Por otro lado, en los complejos DG4.0-CUR se observó la aparición de precipitados a partir del día 7 para las muestras almacenadas a -20 y 4 °C; mientras que en la muestra almacenada a 25 °C se comenzó a notar una disminución del color anaranjado de la suspensión, pero sin la aparición de precipitado. Al día 15, se incrementaron los efectos previamente descritos, hasta que en el día 30 se observó que las muestras almacenadas a -20 y 4 °C poseían una mayor cantidad de precipitado y un menor color en la suspensión, y que la muestra almacenada a 25 °C presentó un color aún más claro en la suspensión. Según lo descrito, en el almacenamiento a -20 y 4 °C existirían tanto procesos de degradación de la CUR (por ello disminuye el color de la suspensión), como procesos de liberación a partir de los complejos y precipitación (por exceder el límite de solubilidad de la

droga en medios acuosos); mientras que en el almacenamiento a 25 °C la velocidad de degradación se incrementaría, por lo que la droga liberada se degradaría antes de precipitar.

En el caso de los complejos DG4.5-CUR, a partir del día 1 después de la complejación, se observó la aparición de un precipitado en las muestras almacenadas a -20 y 4 °C, sin cambios en el color de la suspensión; mientras que en la muestra almacenada a 25 °C se observó una disminución en el color. Al día 7, en todas las muestras se observó disminución en el color de la suspensión, pero sin incremento en la cantidad de precipitado, por lo que el efecto mayoritario sería la degradación. Al día 30, todas las muestras presentaron un color marcadamente disminuido respecto del día 0, siendo el orden de degradación: 25 °C > 4 °C > -20 °C.

Estas observaciones macroscópicas se correlacionan con los resultados obtenidos en cuanto a la absorbancia de las suspensiones a 424 nm en función del tiempo (**Figuras 5.9**). Ha sido reportado por Boruah y col. (2012) que, en condiciones fisiológicas, la CUR se degrada a vainillina, ácido ferúlico y el feruloil metano; y que la contribución de esas moléculas al máximo de absorción de la CUR es despreciable; por lo que un seguimiento de la absorbancia a 424 nm en función del tiempo nos permitiría confirmar los procesos de degradación de la CUR ²⁵¹.

En los complejos DG4.0-CUR y DG4.5-CUR se observó una disminución progresiva de la absorbancia característica a 424 nm de la CUR en función del tiempo, para todas las temperaturas de almacenamiento. Asimismo, las muestras almacenadas a 25 °C presentaron un decaimiento de la absorbancia más rápido que el observado para las muestras almacenadas a -20 y 4 °C, demostrando que los procesos de degradación se exacerban al aumentar la temperatura.

El tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de un compuesto se define como el tiempo necesario para que se degrade la mitad de la droga que se encuentra en solución. En bibliografía, se encontró reportado que el $t_{1/2}$ de la CUR a 37 °C en PBS 25 mM pH 7,2 es de 9,4 minutos ²⁶³. Con el objetivo de estimar el $t_{1/2}$ de la CUR en los complejos D-CUR, se relativizaron los datos de absorbancia considerando como 100% a la absorbancia de la droga en los complejos al día 0. Este análisis permitió estimar que el $t_{1/2}$ de la CUR en los complejos DG4.0-CUR se incrementó a 7 días (168 h) para el almacenamiento a -20 y 4 °C, y a 3 días (72 h) para el almacenamiento a 25 °C. Por otro lado, el $t_{1/2}$ de la CUR en los complejos DG4.5-CUR se incrementó a ~2 días (48 h) para el almacenamiento a -20 °C, a 3 días (72 h) para el almacenamiento a 4 °C, y a 1 día (24 h) para el almacenamiento a 25 °C. Si bien estos resultados son estimativos, queda en evidencia que los dendrímeros aumentaron la estabilidad de la CUR en solución acuosa. Asimismo, el hecho de que los complejos DG4.0-CUR aumentaran en mayor medida el $t_{1/2}$ de la CUR respecto de los complejos DG4.5-CUR, demuestra que las interacciones establecidas en el primer caso son más fuertes que en el segundo,

por lo que se mantiene la droga complejada por un mayor periodo de tiempo, evitando su degradación/precipitación.

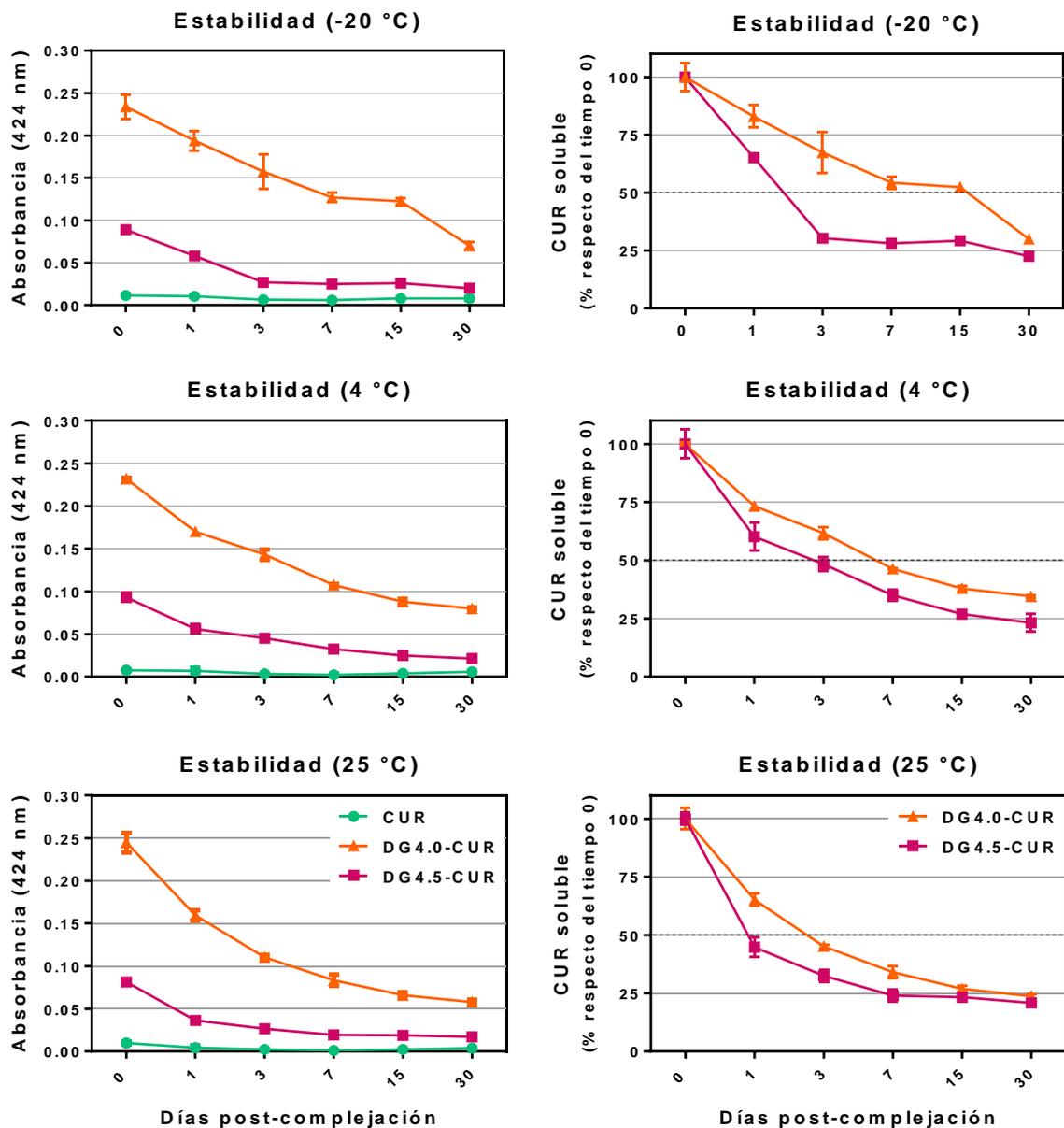


Figura 5.9 – Estabilidad de la CUR en los complejos D-CUR durante el almacenamiento a distintas temperaturas. La estabilidad de la CUR libre o en los complejos D-CUR se estudió durante el almacenamiento a -20, 4 o 25 °C. En los gráficos de la izquierda se presenta la intensidad de absorbancia a 424 nm (característica de la forma ceto-enol de la CUR) y en los gráficos de la derecha se presentan los porcentajes de CUR (respecto de la cantidad inicial en cada muestra), ambos a lo largo de tiempo de almacenamiento.

Estos resultados concuerdan con los reportados por Boruah y col. (2012), quienes estudiaron la degradación de la CUR en nanopartículas de quitosano en PBS pH 7,4 siguiendo el máximo de

absorbancia de la droga, y observaron una disminución progresiva de la misma tanto en el control (CUR en metanol) como en la suspensión acuosa de nanopartículas ²⁵¹.

En este trabajo, además del seguimiento de la absorbancia a 424 nm, se midieron los espectros UV-Vis de todas las suspensiones en función del tiempo de almacenamiento (**Figura 5.10**), con el objetivo de determinar si hubo cambios en el entorno fisicoquímico de la droga. En este caso, se observó que, con el correr de los días, los espectros presentaron un corrimiento desde 424 nm a 350 nm, concomitantemente con la disminución en la intensidad de absorbancia. En bibliografía se reportó que el tautómero ceto-enol la CUR que absorbe a 424 nm es el que se encuentra en un ambiente hidrofóbico (como podría ser el interior del dendrímero), mientras que el tautómero diceto de la CUR que absorbe a 350 nm predomina en medios hidrofílicos (es decir, una vez liberado del interior del complejo al medio acuoso) ²⁵⁰.

Los resultados obtenidos demuestran que si bien una parte de la CUR se libera del interior de los complejos D-CUR y se degrada o precipita (por la disminución en la intensidad de absorbancia a 424 nm y las observaciones macroscópicas), otra parte de la CUR se libera y se transforma en su tautómero medicinalmente activo (diceto). Que dicho tautómero no se degrade y permanezca en suspensión incluso después de varios días de la preparación, reportaría la existencia interacciones estabilizadoras con los dendrímeros. Dichas interacciones, dado que el tautómero se encuentra en medio hidrofílico, podrían establecerse con los grupos terminales de los dendrímeros. Estos resultados concuerdan con los reportados por Dutta y col. (2013) quienes demostraron que la forma diceto de la CUR se estabiliza en medios acuosos por la interacción con surfactantes aniónicos o catiónicos en bajas concentración y muestra un máximo de absorción a 355 nm, que es lo que podría ocurrir cuando la CUR se libera del interior del dendrímero e interacciona con sus grupos terminales. Además, estos autores demostraron que a concentraciones elevadas de surfactantes, por encima de su concentración micelar crítica, la CUR se encuentra en la forma ceto-enol y se localiza en el interior hidrofóbico de la micela, presentando el máximo de absorbancia a 425 nm ²⁵².

En resumen, a pesar de existir procesos de degradación y precipitación, los DG4.0 y DG4.5 lograron incrementar significativamente la solubilidad de la CUR y su estabilidad en medios acuosos, incluso a temperatura ambiente. Además, presentaron una liberación controlada de la droga a lo largo del tiempo, proceso que da lugar a la tautomerización de la CUR a su forma medicinalmente activa.

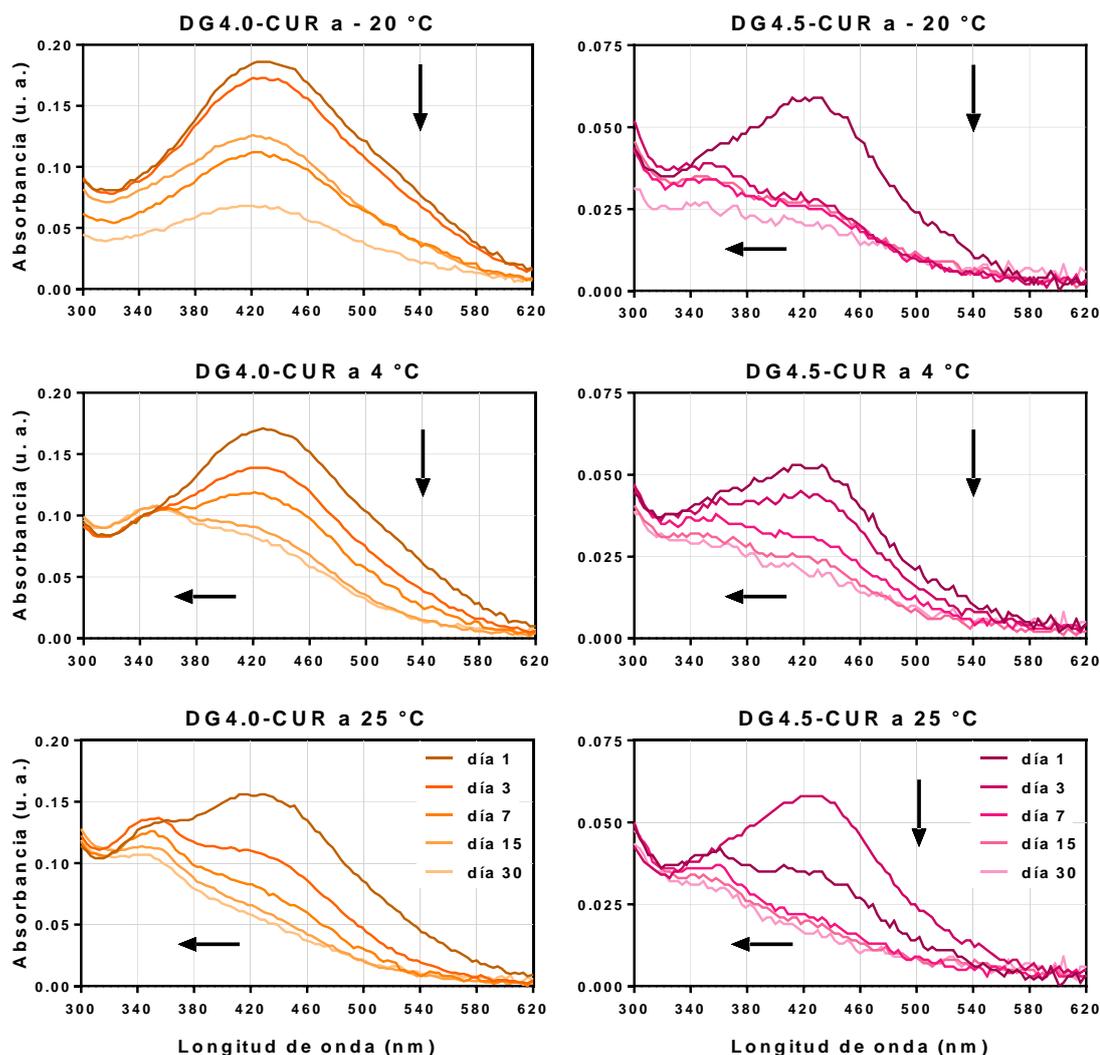


Figura 5.10 – Espectros de absorbancia UV-Vis de los complejos D-CUR durante el almacenamiento a distintas temperaturas. Espectros de absorbancia UV-Vis de los complejos D-CUR en PBS durante el almacenamiento a -20, 4 o 25°C. Se observan dos efectos: disminución en la intensidad de absorbancia (relacionado con la degradación/precipitación de la CUR) y corrimientos hacia menores longitudes de onda (relacionado con el cambio en el entorno fisicoquímico y la tautomerización de la CUR).

5.2.2.2 Estabilidad de los complejos D-CUR frente al proceso de liofilización

En segundo lugar, se evaluó la estabilidad de los complejos D-CUR frente al proceso de liofilización en ausencia de crioprotectores (Figuras 5.11 y 5.12), con el objetivo de determinar si luego del proceso de liofilización y reconstitución los complejos mantenían la CUR retenida y soluble.

En la Figura 5.11 se presentan las fotografías de los sólidos obtenidos por liofilización, resultando de interés resaltar que la muestra control de CUR dio lugar a un polvo blanco, mientras que los complejos D-CUR presentaron color anaranjado característico de este fármaco. Estos resultados

confirman la ausencia de CUR en el control de droga libre, debido a la insolubilidad de la misma en medios acuosos; correspondiendo los sólidos obtenidos a las sales que componían el PBS.

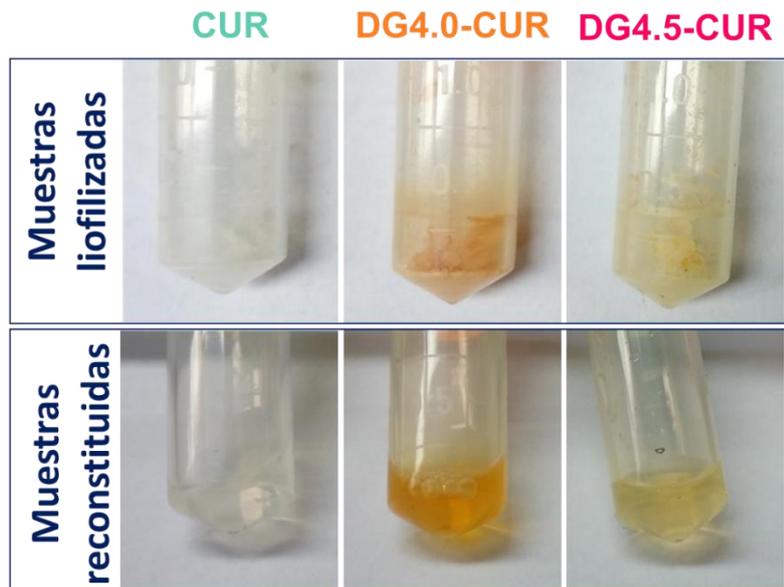


Figura 5.11 – Fotografías de muestras liofilizadas y reconstituidas de CUR y D-CUR. Se presentan fotografías de los sólidos obtenidos por liofilización de CUR y D-CUR, y de las suspensiones obtenidas por reconstitución de dichos liofilizados.

Por otro lado, a partir de los espectros de absorbancia UV-Vis (**Figura 5.12**), se determinó que los complejos D-CUR fueron parcialmente estables al proceso de liofilización. En todas las formulaciones se observó una reducción de la cantidad de droga soluble luego de la liofilización, siendo los porcentajes de CUR remanentes de 65% y 69% para los complejos DG4.0-CUR y DG4.5-CUR, respectivamente. Debido a que en la muestra de CUR libre no se detectó suficiente droga previa a la liofilización, no se pudo calcular un porcentaje de CUR remanente para utilizar como control. De todos modos, si bien los dendrímeros no lograron evitar la degradación/perdida de una parte de la CUR complejada, las muestras reconstituidas presentaron una concentración significativamente mayor de droga soluble respecto de la solubilidad teórica. Además, como se observa en los espectros UV-Vis, la CUR soluble se mantuvo en el interior de los dendrímeros, dado que su máximo de absorbancia se mantuvo a 424 nm luego del proceso de liofilización y reconstitución. Así, se presentan como perspectivas la optimización del protocolo de liofilización, con el objetivo de incrementar los porcentajes de CUR remanentes, y los estudios de estabilidad de la CUR en los sólidos liofilizados.

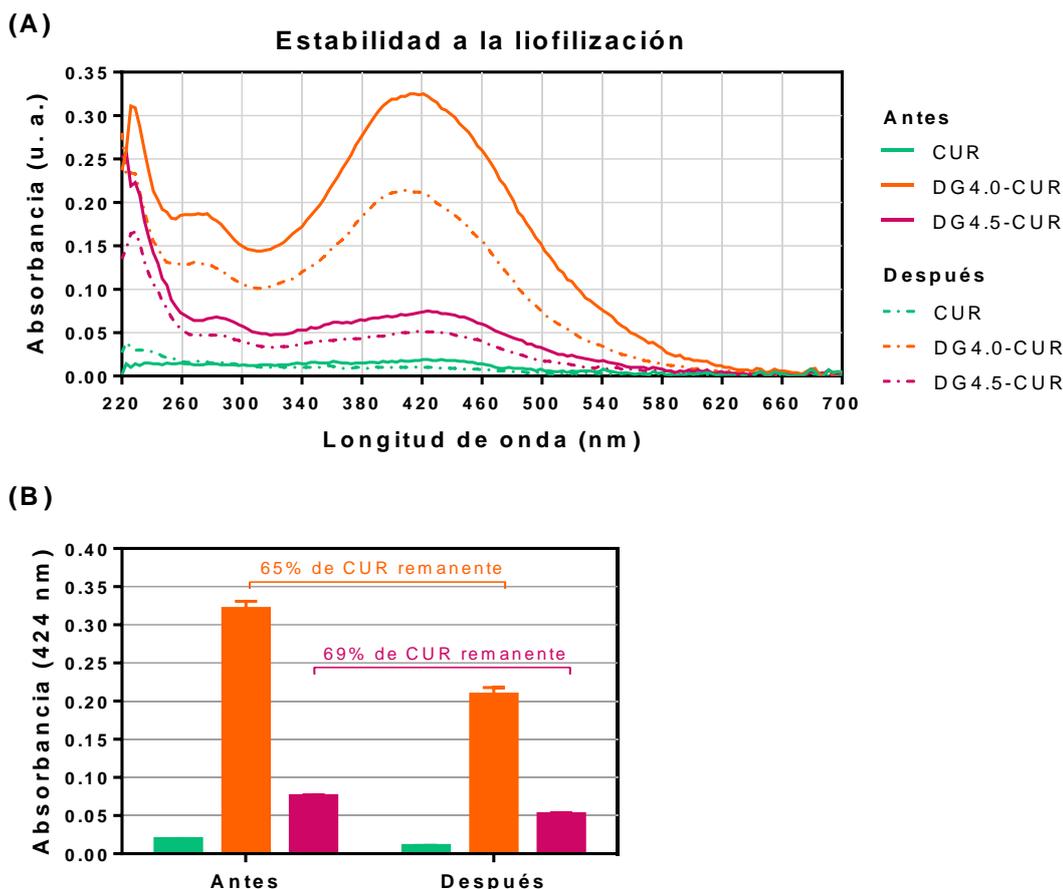


Figura 5.12 – Estabilidad de los complejos D-CUR frente al proceso de liofilización. (A) Espectros de absorción UV-Vis de las suspensiones de CUR, dendrímeros y complejos D-CUR antes y después el proceso de liofilización y reconstitución. (B) Absorbancia a 424 nm de las muestras de CUR y D-CUR antes y después el proceso de liofilización y reconstitución, con los porcentajes de CUR remanente.

5.2.2.3 Estabilidad en el tiempo de la CUR en los complejos D-CUR reconstituidos

En tercer lugar, se evaluó la estabilidad en el tiempo de la CUR en los complejos D-CUR luego del proceso de liofilización y reconstitución. Para ello, las suspensiones se almacenaron en oscuridad a 4 °C durante 30 días luego de la reconstitución en PBS (Figura 5.13). En estas muestras, si bien se observó una disminución en la intensidad de absorbancia en función del tiempo, el decaimiento de dicho parámetro se produjo lentamente en comparación con las muestras sin liofilizar almacenadas a 4 °C (Figura 5.9). De hecho, el $t_{1/2}$ de la CUR en los complejos DG4.0-CUR reconstituidos fue de 15 días (360 h), mientras que en los complejos DG4.5-CUR reconstituidos fue de 7 días (168 h). Este incremento en la estabilidad del material liofilizado a 4 °C, respecto de los complejos no liofilizados, podría deberse a que durante el proceso de sublimación del solvente las interacciones fármaco-dendrímero se maximizan, dando lugar a complejos capaces de retener la CUR soluble por un mayor periodo de tiempo.

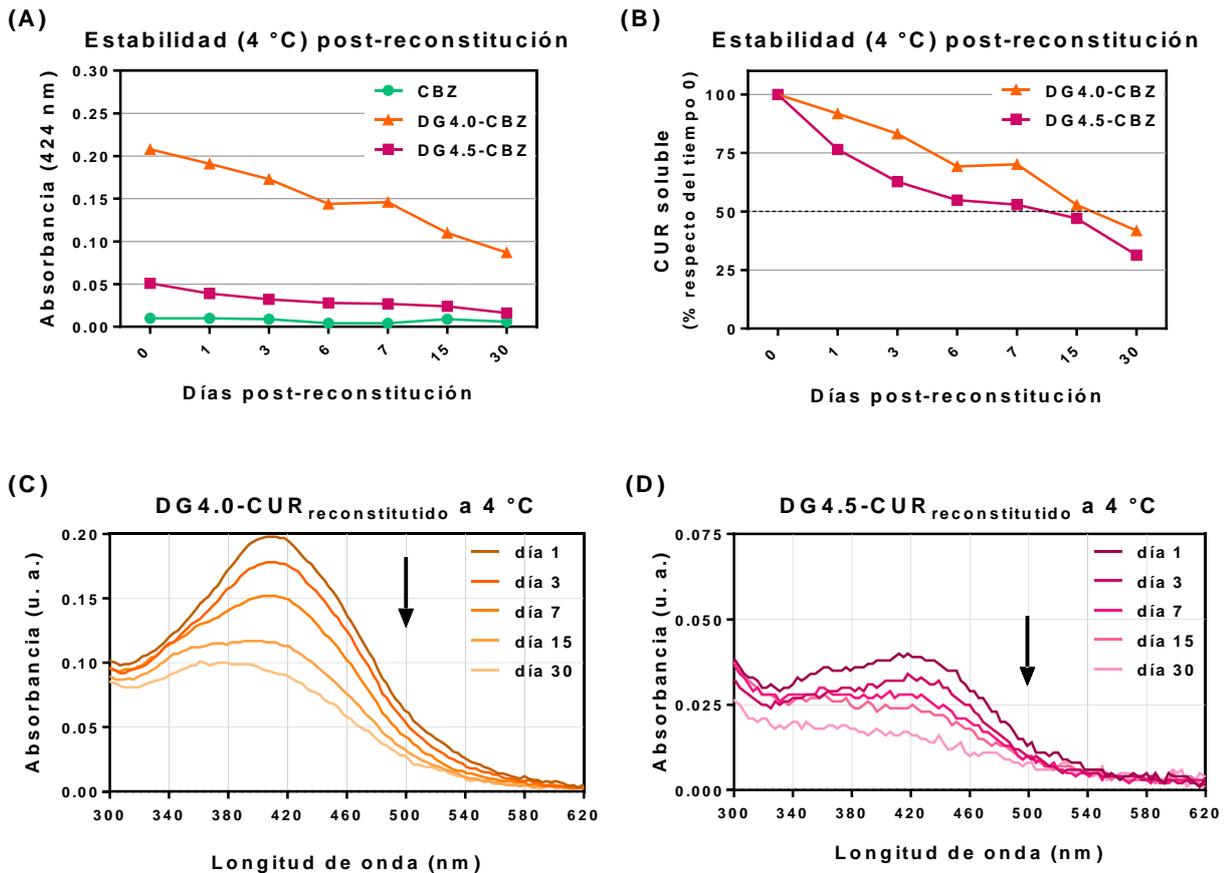


Figura 5.13 – Estabilidad de la CUR en los complejos D-CUR después del proceso de liofilización y reconstitución. La estabilidad de la CUR en los complejos D-CUR reconstituidos se estudió durante el almacenamiento a 4 °C. En los gráficos se presentan, en función del tiempo, **(A)** la intensidad de absorbancia a 424 nm, **(B)** los porcentajes de CUR (respecto de la cantidad inicial en cada muestra); **(C)** los espectros de absorbancia UV-Vis de los complejos DG4.0-CUR reconstituidos; y **(D)** de los DG4.5-CUR reconstituidos.

En concordancia con estos resultados, los espectros de absorbancia UV-Vis de los complejos D-CUR reconstituidos demostraron que el fenómeno mayoritario fue la degradación de la CUR, en lugar de la liberación al medio acuoso y consecuente tautomerización. Dicho hecho se refleja en que no se observaron corrimientos significativos del máximo de absorbancia hacia 350 nm, sino que se observó una disminución progresiva en la intensidad de la absorbancia a 424 nm. En este aspecto, si bien los complejos reconstituidos presentan una menor cantidad de CUR que los complejos sin liofilizar, la mantienen estable en suspensión y la retienen encapsulada por un mayor periodo de tiempo.

5.2.2.4 Estabilidad en el tiempo de la CUR en los *pellets* de complejos D-CUR

En cuarto lugar, se evaluó la estabilidad de la CUR en los *pellets* de complejos D-CUR (obtenidos por evaporación del metanol durante el protocolo de complejación). Para tal fin, se almacenaron los *pellets* en oscuridad a distintas temperaturas (-20, 4 y 25 °C) y se fueron resuspendiendo durante 30 días luego del proceso de secado. A tiempos predeterminados se realizaron observaciones macroscópicas (Figura 5.14), se determinó la absorbancia a 424 nm característica de la forma ceto-enol de la CUR (Figuras 5.15) y se midieron los espectros de absorbancia UV-Vis (Figura 5.16).

En la Figura 5.14 se presentan los cambios en los *pellets* a los 30 días de almacenamiento. A partir del día 3 se comenzó a observar disminución en el color de todos los *pellets* almacenados a 4 y 25 °C. Por otro lado, en los *pellets* almacenados a -20 °C no se evidenció disminución del color hasta los 15 días. Asimismo, en las tres condiciones de almacenamiento, en los *pellets* de DG4.5-CUR se observó una disminución en el color más marcada que en los *pellets* de DG4.0-CUR. En los *pellets* de CUR no se observaron cambios drásticos en el color a lo largo del almacenamiento. Estos cambios en el color de los *pellets* podrían ser atribuidos a procesos degradativos de la CUR en estado sólido, siendo macroscópicamente el orden de degradación: 25 °C > 4 °C > -20 °C.

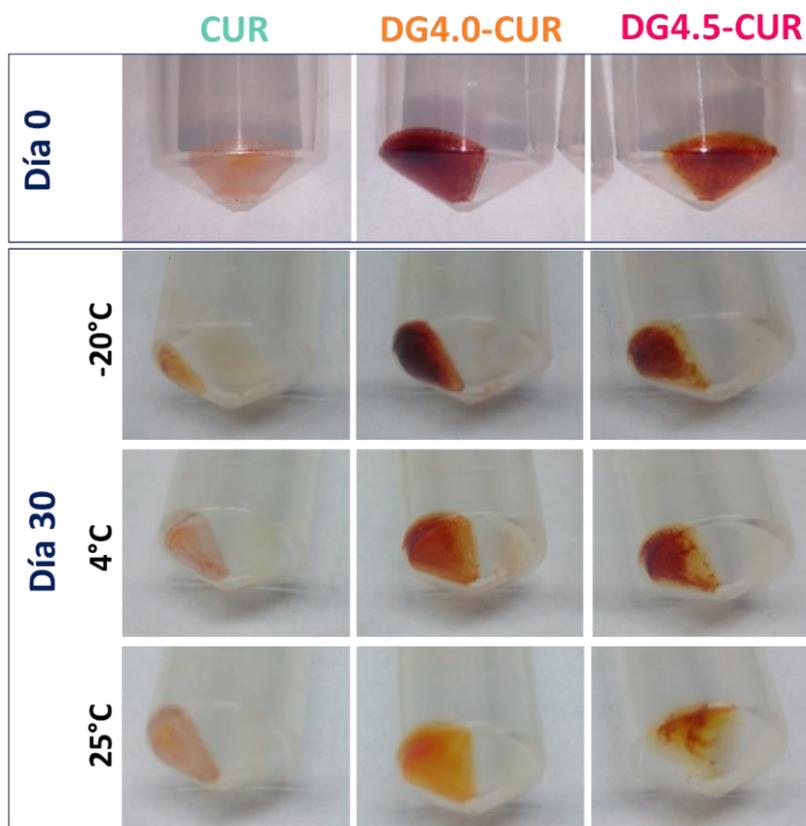


Figura 5.14 – Fotografías de los *pellets* de CUR y D-CUR durante el almacenamiento. Se presentan fotografías de los *pellets* de CUR y D-CUR inmediatamente después de la evaporación del metanol (día 0), y luego de 30 días de almacenamiento en distintas temperaturas (-20, 4 y 25 °C).

Una vez realizadas las observaciones macroscópicas, los *pellets* se resuspendieron para continuar con el protocolo de complejación, y se determinó la absorbancia a 424 nm de las suspensiones obtenidas (**Figuras 5.15**). Se esperaba ver una disminución progresiva en la CUR resuspendida, por los procesos degradativos que ocurrirían al almacenar los *pellets*. Sin embargo, para ambos complejos (DG4.0-CUR y DG4.5-CUR) se observó un aumento progresivo de la CUR soluble para los *pellets* almacenados a -20 °C, alcanzándose un 200% de resuspensión luego de 30 días a dicha temperatura. Según lo expuesto, el almacenamiento a bajas temperaturas disminuiría la velocidad de los procesos degradativos, propiciando la estabilidad química de la CUR, y aumentaría las interacciones droga-dendrímico, llevando a una mayor cantidad de CUR soluble al agregar el PBS. En concordancia con ello, los *pellets* almacenados a -20 °C fueron los que presentaron una menor disminución del color según las observaciones macroscópicas.

Por otro lado, los *pellets* de DG4.0-CUR que fueron almacenados a 4 y 25 °C mostraron una disminución de la CUR soluble con el correr de los días de almacenamiento, evidenciando procesos de degradación de la CUR incluso en estado sólido. Caso contrario, los *pellets* de DG4.5-CUR almacenados a 4 y 25 °C mostraron un incremento de la CUR soluble a lo largo del tiempo. Estos resultados se podrían interpretar al considerar, nuevamente, que existen patrones de interacción diferenciados en los complejos DG4.5-CUR respecto de los DG4.0-CUR.

Además del seguimiento de la absorbancia a 424 nm, se determinaron los espectros de absorción UV-Vis de todas las suspensiones obtenidas (**Figura 5.16**). Para los complejos DG4.0-CUR, se observó que el almacenamiento de -20 °C dio lugar a suspensiones con cantidades crecientes de CUR, cuyo máximo de absorbancia se mantuvo a 424 nm (tautómero ceto-enol). Por el contrario, en las muestras almacenadas a 4 y 25 °C se evidenció la degradación de la CUR y la drástica disminución en la intensidad de absorbancia, lo que se correlaciona con los resultados explicados anteriormente.

Por otro lado, para los complejos DG4.5-CUR, se observó que el almacenamiento a -20 °C dio lugar a suspensiones con un incremento progresivo de la CUR soluble en los diversos tiempos de almacenamiento. De igual forma, pero contrariamente a lo que ocurrió en el DG4.0-CUR, el almacenamiento a 4 °C dio lugar a un incremento en la absorbancia de CUR a 424 nm, reportando una mayor cantidad de droga soluble en el DG4.5-CUR. Finalmente, en el almacenamiento a 25 °C se observó un corrimiento en el máximo de absorbancia hacia 350 nm, concomitante con el incremento en la intensidad de absorbancia a dicha longitud de onda. Estos resultados podrían estar reportando un cambio en el patrón de interacción de la CUR con el DG4.5, dependiente de la temperatura de almacenamiento. Así, podemos hipotetizar que a 25 °C ocurriría una liberación de la CUR, porque su máximo de absorbancia se corre hacia el reportado para solvente acuoso, pero

que existirían aún interacciones con los grupos terminales del DG4.5, lo que explicaría la obtención de dicha cantidad de CUR en suspensión.

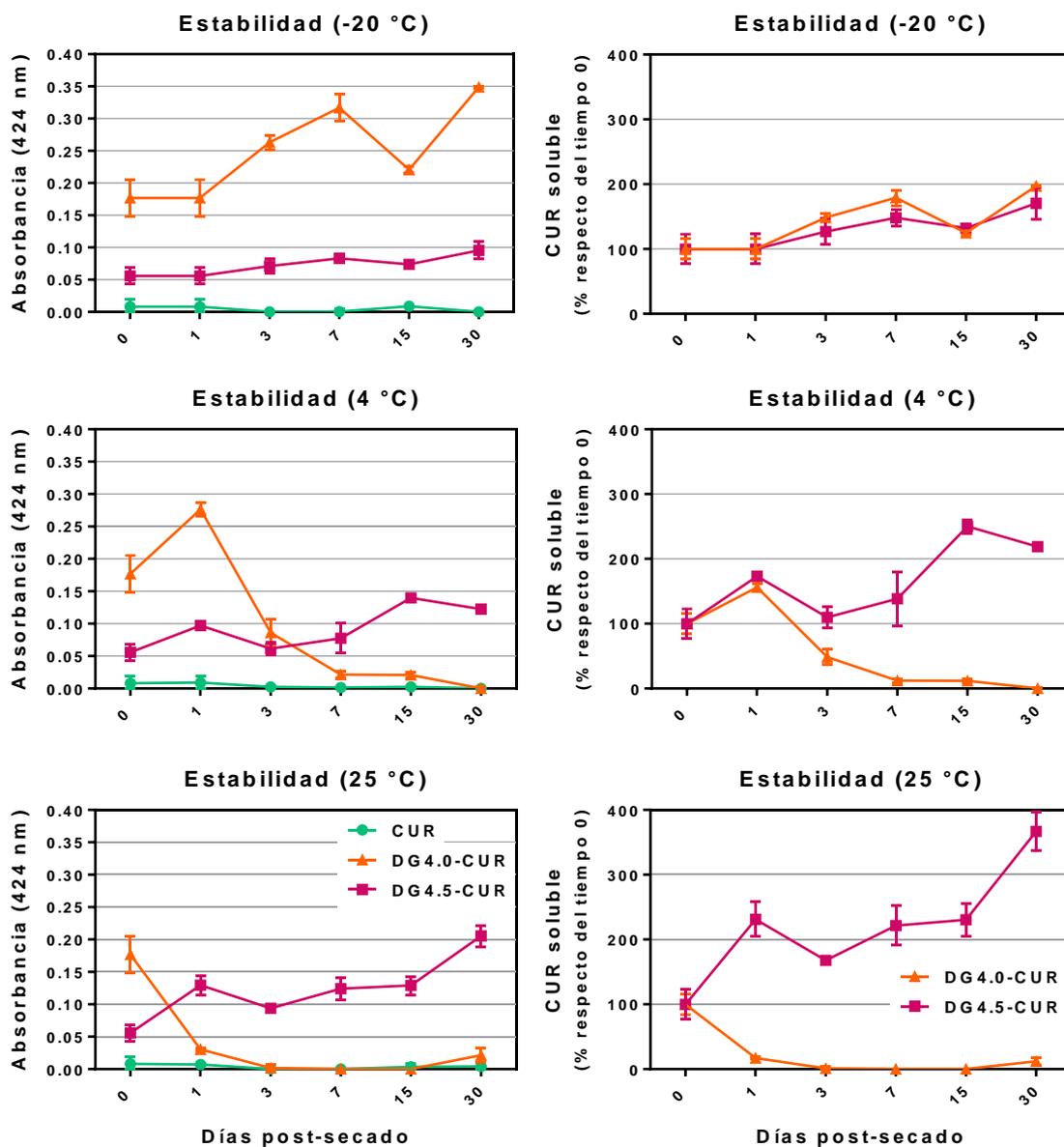


Figura 5.15 – Estabilidad de la CUR en los *pellets* de complejos D-CUR durante el almacenamiento a distintas temperaturas. La estabilidad de la CUR en los *pellets* de los complejos D-CUR se estudió durante el almacenamiento a -20, 4 o 25 °C. En los gráficos de la izquierda se presenta la intensidad de absorbancia a 424 nm (característica de la forma ceto-enol de la CUR) y en los gráficos de la derecha se presentan los porcentajes de CUR (respecto de la cantidad inicial en cada muestra), ambos a lo largo de tiempo de almacenamiento.

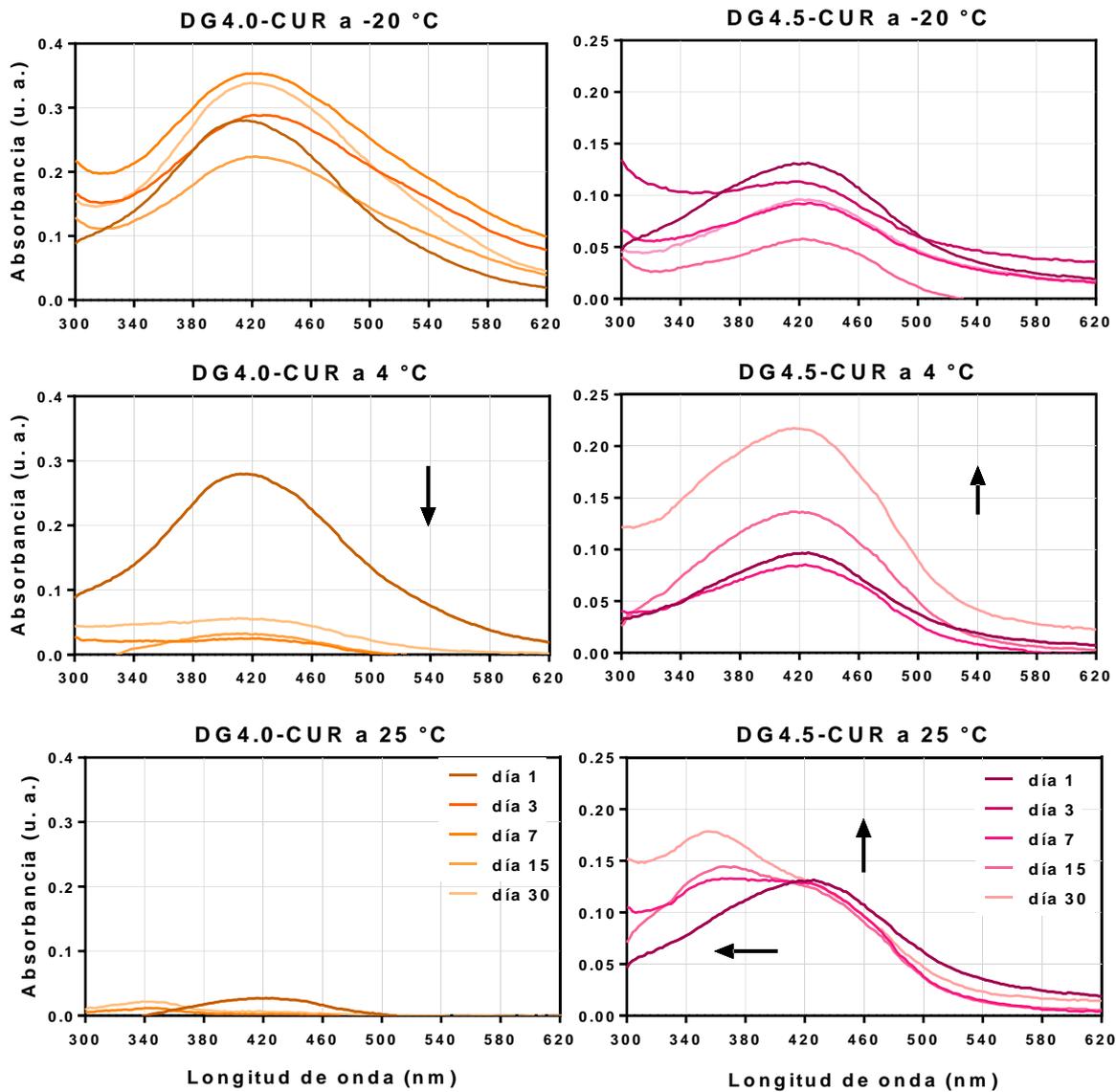


Figura 5.16 – Espectros de absorbancia UV-Vis de los complejos D-CUR resuspendidos a partir de *pellets* en distintos días de almacenamiento. Espectros de absorbancia UV-Vis de los complejos D-CUR obtenidos al resuspender los *pellets* que fueron almacenados a -20, 4 o 25°C durante 1, 3, 7, 15 o 30 días.

En base a estos resultados, y con el objetivo de seleccionar un método de almacenamiento de los *pellets* que produjera los menores cambios posibles en ambos tipos de complejos, se decidió seguir trabajando con *pellets* almacenados a -20 °C, dado que fue la temperatura donde se observaron menores cambios de color en los mismos a nivel macroscópico y la resuspensión en ambos complejos fue en incremento con el correr del tiempo de almacenamiento, obteniendo suspensiones con CUR complejada con un máximo de absorbancia a 424 nm.

En conjunto, a partir de todos los estudios de estabilidad realizados, se puede concluir que a pesar de existir procesos de degradación, los dendrímeros lograron incrementar significativamente

estabilidad de la CUR en medios acuosos y en estado sólido, a través de la encapsulación de la droga en sus bolsillos internos y de interacciones con sus grupos superficiales. Los complejos presentaron, además, procesos de liberación controlada de la droga que dieron lugar a la tautomerización de la CUR a su forma medicinalmente activa. Asimismo, si bien los complejos resultaron parcialmente estables frente al proceso de liofilización, la droga que permanece complejada luego de la reconstitución se mantiene soluble por un mayor periodo de tiempo.

5.2.3 Estudios de la interacción D-CUR por FT-IR

Como los dendrímeros DG4.0 y DG4.5 complejaron diferentes cantidades de CUR y presentaron diferentes perfiles de estabilidad en el tiempo, hipotetizamos que la interacción droga-dendrímero ocurre tanto en los bolsillos internos, como en los grupos terminales de los dendrímeros. Mientras los bolsillos internos son químicamente idénticos y de similar tamaño, los grupos terminales son diferentes ($-\text{NH}_3^+$ para el DG4.0 y $-\text{COO}^-$ para el DG4.5, a pH fisiológico). Es por ello que las interacciones entre la CUR y los grupos terminales podrían ser de tipo ion-dipolo y serían diferentes (catión-dipolo vs anión-dipolo) para cada dendrímero, explicando los patrones de complejación y estabilidad diferenciales. Con el objetivo de confirmar nuestra hipótesis se estudió la interacción entre la CUR y los dendrímeros utilizando la espectroscopia FT-IR, técnica descrita previamente en los capítulos 3 y 4.

El espectro FT-IR de la CUR sólida (**Figura 5.17 A**) presentó las bandas de absorción específicas del fármaco ^{264,265}, incluyendo las bandas de estiramiento de los enlaces $-\text{C}-\text{H}$ y $-\text{O}-\text{H}$ a 3507 cm^{-1} , la vibración del enlace $-\text{C}=\text{O}$ a 1626 cm^{-1} , el estiramiento de los enlaces $-\text{C}=\text{C}-$ de los anillos aromáticos a 1601 cm^{-1} , la vibración del enlace $-\text{C}-\text{OH}$ a 1455 cm^{-1} y del enlace $-\text{CH}_3$ a 1427 cm^{-1} , el estiramiento del $-\text{O}-\text{H}$ a 1315 y 1272 cm^{-1} , y la flexión de los anillos aromáticos en el rango de 880 a 710 cm^{-1} . En estado sólido la CUR se encuentra en su forma ceto-enol, lo que puede ser confirmado por estos resultados, dado que la vibración de estiramiento del carbonilo $-\text{C}=\text{O}$ se presenta a 1626 cm^{-1} , en lugar de a $1715-1745\text{ cm}^{-1}$ que sería la esperada para la forma diceto ²⁴⁵.

El espectro FT-IR del PBS liofilizado (**Figura 5.17 B y C**) se incluyó como un control interno de nuestro ensayo porque las formulaciones de D-CUR se disolvieron en este *buffer* antes de la liofilización. En este control, se encontró que las bandas de absorción a 528 , 548 , 668 , 861 , 949 , 1075 , 1165 , 2341 y 2360 cm^{-1} corresponden a las vibraciones de los grupos fosfato de las sales del *buffer* y al CO_2 ambiental. Como la mayoría de las bandas del PBS se encontraron en la región de “huella dactilar”, el análisis de los espectros FT-IR de los dendrímeros y los complejos se realizó únicamente entre 4000 y 1300 cm^{-1} .

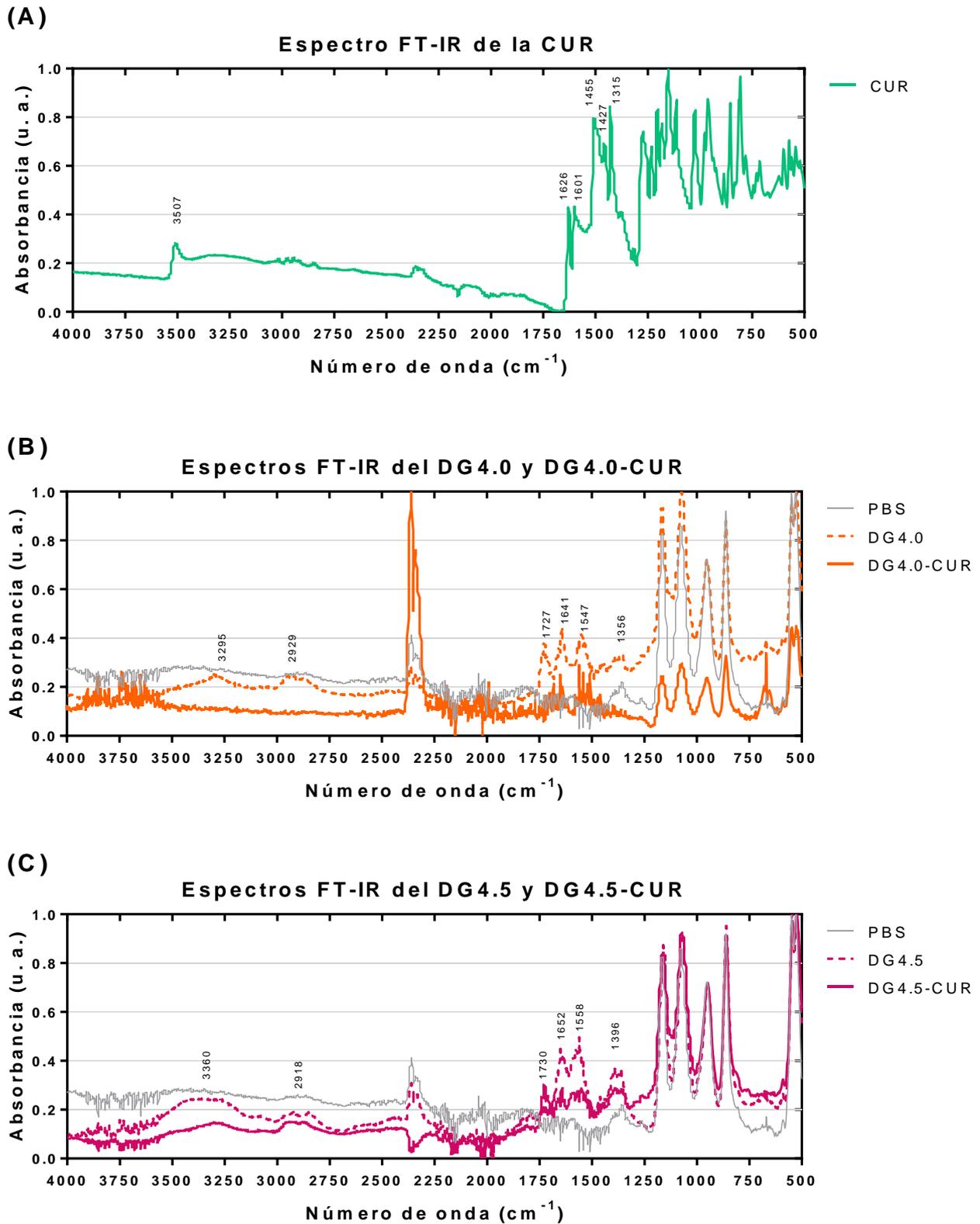


Figura 5.17 – Estudio de la interacción entre la CUR y los dendrímeros por FT-IR. (A) Espectro FT-IR de la CUR sólida; (B) Espectros FT-IR de liofilizados del DG4.0, del complejo DG4.0-CUR y del control de PBS; (C) Espectros FT-IR de liofilizados del DG4.5, del complejo DG4.5-CUR y del control de PBS.

En el espectro FT-IR del DG4.0 (**Figura 5.17 B**) se observaron las vibraciones de estiramiento de los enlaces -C-H y -N-H del interior del dendrímico a 3295 y 2929 cm^{-1} ; la vibración de deformación de los grupos -NH terminales a 1641 cm^{-1} y las de estiramiento a 1356 cm^{-1} ; las vibraciones del enlace -C=O de las amidas del interior del dendrímico a 1727 cm^{-1} ; y las vibraciones de estiramiento de los enlaces C-C y C-N en el interior del dendrímico a 1547 cm^{-1} ^{50,153,213,214}. En el espectro FT-IR del complejo DG4.0-CUR, se observó la desaparición de las bandas de absorción a 2917 y 2849 cm^{-1} y el desplazamiento de la banda de 1641 a 1660 cm^{-1} . Dado que las dos primeras señales corresponden a grupos internos del DG4.0 y la tercera a las aminos terminales, las moléculas de CUR estarían interactuando tanto con los bolsillos internos del DG4.0 como con sus grupos amino terminales.

Por otro lado, el espectro FT-IR del DG4.5 (**Figura 5.17 C**) mostró la vibración de flexión de los enlaces -N-H de las amidas del interior de dendrímico a 3360 cm^{-1} y a 1652 cm^{-1} ; las vibraciones de estiramiento de los enlaces -C-C- y -C-H también del interior del dendrímico a 2918 y 1558 cm^{-1} ; la vibración de estiramiento del -C=O de los grupos terminales a 1730 cm^{-1} ; y la vibración simétrica del -COO del grupo terminal a 1396 cm^{-1} ^{153,218}. En el espectro FT-IR del complejo DG4.5-CUR, se observó la desaparición de la banda de absorción a 3359 cm^{-1} y el desplazamiento de algunas bandas hacia 2950, 1726, 1641, 1547 y 1390 cm^{-1} . Como estas señales corresponden tanto a los grupos internos como a los terminales del DG4.5, las moléculas de CUR podrían estar tanto encapsuladas en el interior como anclada a los grupos superficiales.

Considerando los resultados obtenidos, se señaló que las bandas de absorción correspondientes a los grupos internos sufrieron modificaciones en las formulaciones de D-CUR respecto de los dendrímeros libres, por lo que podemos confirmar nuestra hipótesis de que la CUR interactúa con el interior de ambos dendrímeros. Asimismo, también se observaron modificaciones en las bandas de absorción de los grupos terminales de ambos dendrímeros, por lo que la interacción dendrímico-droga también ocurriría a nivel superficial. De todos modos, es importante remarcar que las formulaciones sólidas de D-CUR fueron obtenidas por liofilización, y como se discutió en capítulos anteriores, este proceso podría maximizar las interacciones entre la CUR y los dendrímeros, y entre moléculas adyacentes de dendrímeros. Nuevamente, sería ideal estudiar las interacciones en solvente acuoso.

En resumen, se incrementó significativamente la solubilidad de la CUR a través de la interacción con dendrímeros, obteniendo complejos con un promedio de 7 ± 1 y 4 ± 1 moles de CUR por mol de DG4.0 y DG4.5, respectivamente. Estos complejos aumentaron más de 100 veces la solubilidad de la CUR respecto de la reportada teóricamente para la droga libre, y aumentaron su estabilidad en medios acuosos, incrementando el tiempo de vida media, y la estabilidad en estado sólido.

Además, por FT-IR se confirmó que las interacciones que se establecen entre la CUR y ambos dendrímeros ocurren tanto a nivel de bolsillos internos como de grupos terminales.

Una vez finalizada la caracterización fisicoquímica, se procedió con los estudios de nanotoxicidad y biocompatibilidad de las formulaciones obtenidas. Para ello, se buscó información bibliográfica sobre las concentraciones terapéuticas de CUR en sangre, sin embargo poca información y muy contradictoria se encontró al respecto. La mayoría de los reportes concuerdan en que, debido a su baja biodisponibilidad, es necesario el consumo de una gran cantidad de CUR (incluso por encima de su ingesta diaria admitida) para alcanzar concentraciones detectables de la misma en sangre. Por ejemplo, Lin y col. (2013) reportaron que los niveles de CUR en sangre luego del consumo oral de 4-8 g de CUR son 0,4-3,6 μM ²⁵⁵. De tal forma, la concentración terapéutica debería ser menor en comparación con las utilizadas para CBZ y TAC, por ello decidimos trabajar con concentraciones menores a 10 μM de droga libre o complejada.

Además, como la CUR es insoluble en medios puramente acuosos, y el control de CUR libre del proceso de complejación no dio lugar a la resuspensión de una cantidad de droga comparable a la de los complejos, en los estudios de toxicidad se utilizó un control de CUR preparado a partir de un stock concentrado en DMSO. En todos los casos, la concentración final de DMSO a la que fueron expuestos los glóbulos rojos, las células neuronales y las larvas de *zebrafish* fue menor al 0,1%, rango de concentración en donde el DMSO es inocuo en dichos sistemas.

5.2.4 Estudios de la toxicidad *ex vivo* en glóbulos rojos humanos

Los efectos hemolíticos y sobre la morfología de los glóbulos rojos humanos tras el tratamiento con dendrímeros se describieron previamente y se abordaron en el capítulo 3. Sin embargo, es de interés evaluar la toxicidad *ex vivo* de cualquier nanocompuesto que pueda ser utilizado con fines biomédicos, como serían en este caso los complejos D-CUR. Por ello, en este trabajo, evaluamos los efectos hemolíticos y los posibles cambios morfológicos en glóbulos rojos humanos después de 4 y 24 h de incubación con CUR, dendrímeros y complejos D-CUR.

Como se puede observar en las **Figuras 5.18** y **5.19**, no se observaron efectos hemolíticos o cambios morfológicos significativos en comparación con los glóbulos rojos incubados con el *buffer* isotónico (control negativo de PBS) para ninguno de los tratamientos evaluados, en ninguno de los periodos de incubación. Este hecho da un indicio de que los complejos D-CUR obtenidos podrían ser administrados por vía intravenosa, además de por vía transdérmica o nasal.

Estos resultados concuerdan con los reportados anteriormente por Yallapu y col. (2011), quienes estudiaron el efecto hemolítico de la CUR libre y encapsulada en partículas de PLGA, y demostraron que 100 μM de CUR dio lugar a un 40% de hemólisis, mientras que concentraciones iguales o menores a 50 μM no tuvieron efecto hemolítico²⁶⁶.

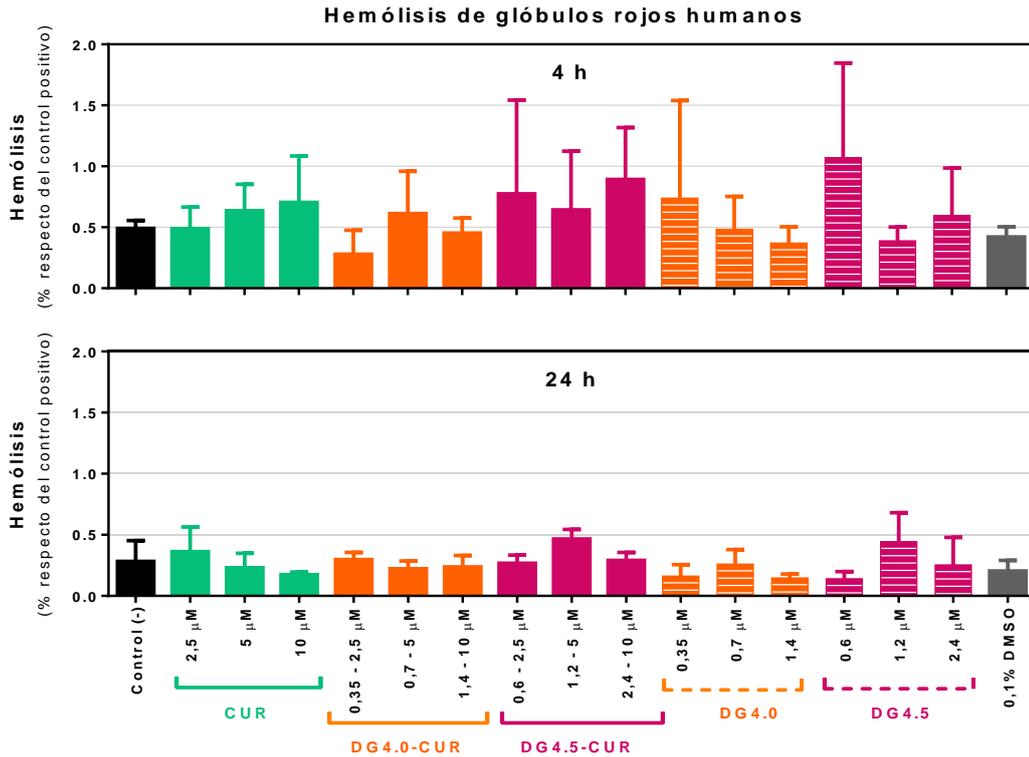


Figura 5.18 – Toxicidad *ex vivo* estudiada por hemólisis en glóbulos rojos humanos. Hemólisis después de 4 o 24 h de tratamiento con CUR, dendrímeros o complejos D-CUR. La hemólisis se expresó como un porcentaje respecto del control positivo de SDS (100% hemólisis). No se encontraron diferencias significativas respecto del control negativo de PBS.

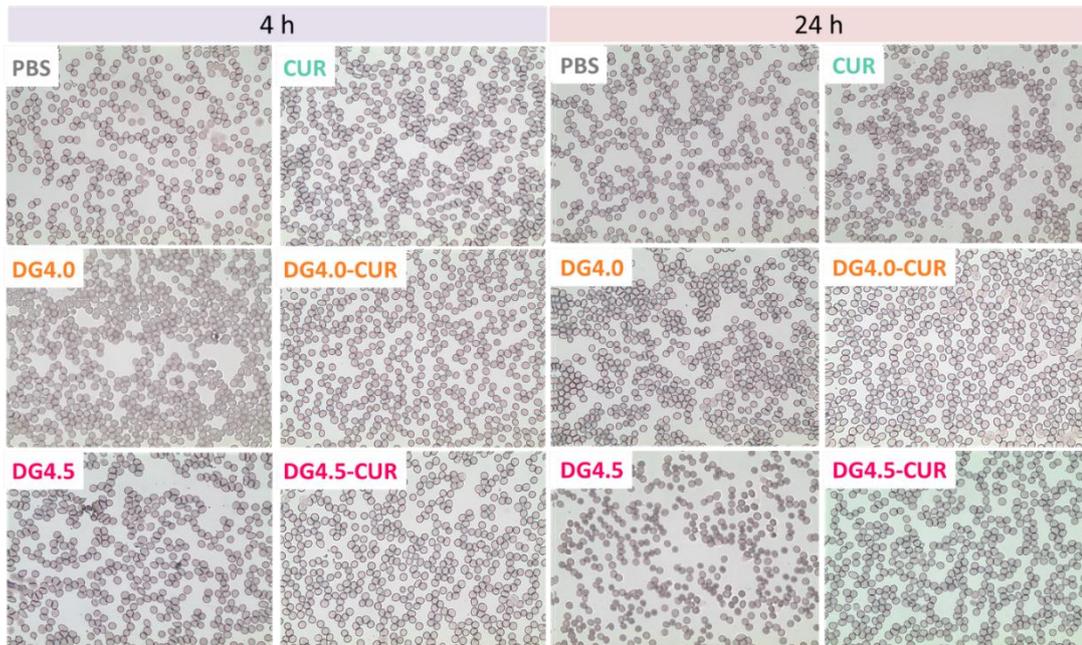


Figura 5.19 – Análisis morfológico de los glóbulos rojos humanos. Luego de 4 o 24 h de tratamiento con CUR (10 μM), DG4.0 (1,4 μM), DG4.5 (2,4 μM), DG4.0-CUR (1,4 μM de D con 10 μM de CUR) o DG4.5-CUR (2,4 μM de D con 10 μM de CUR), los glóbulos rojos humanos se tiñeron con Giemsa y se observaron por microscopía óptica. No se observaron cambios morfológicos en las células asociados con toxicidad *ex vivo* luego de los tratamientos.

5.2.5 Estudios de la toxicidad *in vitro* en cultivo celular Neuro-2a

Resulta de interés estudiar la toxicidad *in vitro* de los complejos D-CUR, por lo que evaluamos los efectos de la CUR, los dendrímeros y los complejos D-CUR en la línea celular Neuro-2a después de 4 y 24 h de tratamiento. Para ello, se utilizaron tres métodos colorimétricos con el objetivo de detectar los efectos sobre la viabilidad, por la tinción con cristal violeta (CV), sobre la actividad metabólica celular, mediante el ensayo de MTT, y sobre el nivel de afección de membranas, mediante el ensayo de captura de rojo neutro (RN).

Luego de 4 y 24 h de tratamiento (**Figuras 5.20 y 5.21**), no se observaron cambios significativos en la viabilidad, en la actividad metabólica o en la captura de RN de las células Neuro-2a tratadas con CUR o complejos D-CUR. Asimismo, tampoco se observaron efectos nocivos para el control de células tratadas con 0,1% de DMSO. Por el contrario, los dendrímeros libres en su mayor concentración (1,35 μM para el DG4.0 y 2,4 μM para el DG4.5), dieron lugar a efectos tóxicos a nivel de las membranas celulares, dado que se reveló una disminución significativa en la captura del colorante. Estos resultados concuerdan con los obtenidos y reportados en los capítulos 4 y 5. En este caso, es importante resaltar que los complejos D-CUR no presentaron este efecto a nivel de membranas, por lo que la CUR presentaría un efecto protector.

Asimismo, Debnath y col. (2013) estudiaron la toxicidad de la CUR en dos líneas celulares de cáncer de mama y, a través del ensayo de MTT, determinaron que la concentración inhibitoria del 50% de la actividad metabólica (CI_{50}) de la CUR que fue $47,9 \pm 21,5 \mu\text{M}$ en SKBr3 y $35,8 \pm 18,4 \mu\text{M}$ para BT549 ²⁶². En este sentido, al haber trabajado con concentraciones de CUR menores a dichos CI_{50} , no se observaron efectos a nivel de la actividad metabólica. En concordancia, Wang y col. (2013) estudiaron la toxicidad de la CUR en las células A549 por el método de MTT y demostraron que 5 y 10 μM de CUR libre no produjeron efectos sobre la actividad metabólica ²⁶⁰. Sumado a ello, Lin y col. (2013) evaluaron el efecto de 2,5 μM de CUR en células Neuro-2a y tampoco reportaron efectos tóxicos medidos por MTT ²⁵⁵.

Por lo tanto, el uso de distintos métodos de detección, concentraciones y tiempos de incubación para estudiar los efectos tóxicos en las células Neuro-2a, permitió demostrar que los complejos DG4.0-CUR y DG4.5-CUR no presentaron efectos citotóxicos en las concentraciones evaluadas.

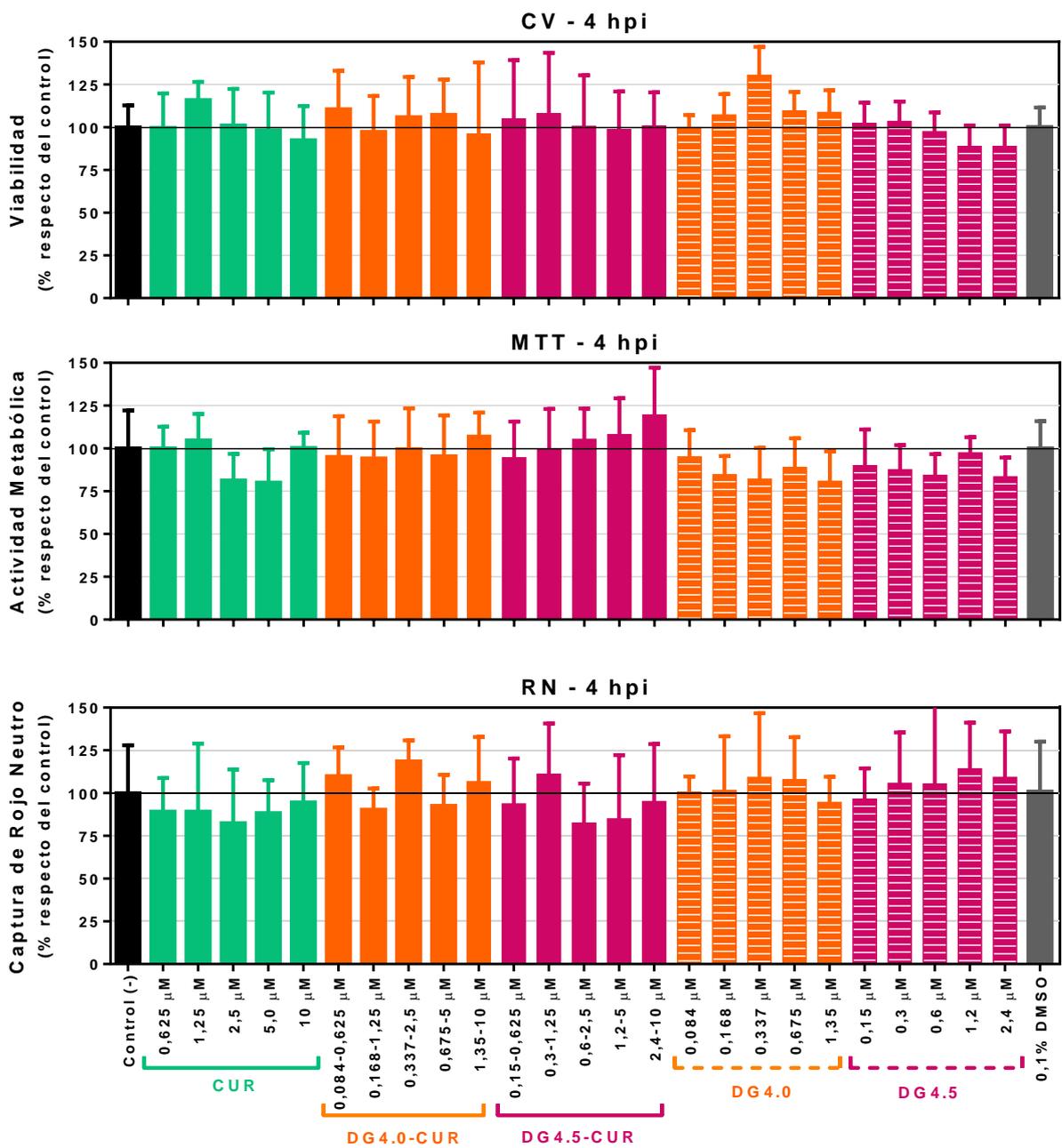


Figura 5.20 – Toxicidad *in vitro* en células Neuro-2a por métodos colorimétricos (4 h de tratamiento). La citotoxicidad luego de 4 h de tratamiento con CUR, dendrímeros o complejos D-CUR se determinó mediante el estudio de la viabilidad por tinción con cristal violeta (CV), de la actividad metabólica mediante el ensayo de MTT y de la afcción de membranas mediante la captura de rojo neutro (RN). Todos los datos se expresaron como un porcentaje con respecto al control de células no tratadas, que se consideró como el 100% de viabilidad, de actividad metabólica o de captura de RN.

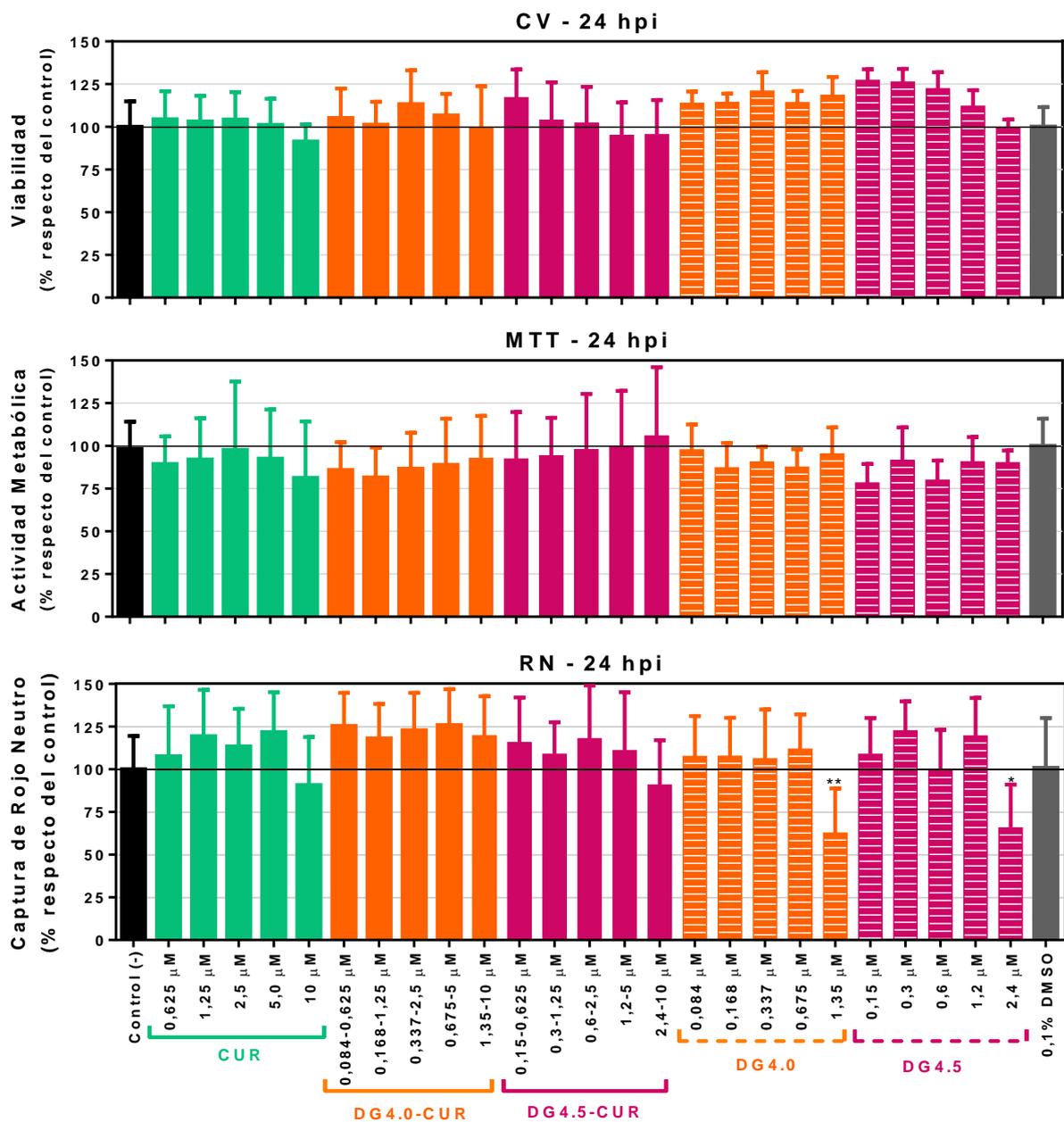


Figura 5.21 – Toxicidad *in vitro* en células Neuro-2a por métodos colorimétricos (24 h de tratamiento). La citotoxicidad luego de 24 h de tratamiento con CUR, dendrímeros o complejos D-CUR se determinó mediante el estudio de la viabilidad por tinción con cristal violeta (CV), de la actividad metabólica mediante el ensayo de MTT y de la afeción de membranas mediante la captura de rojo neutro (RN). Todos los datos se expresaron como un porcentaje con respecto al control de células no tratadas, que se consideró como el 100% de viabilidad, de actividad metabólica o de captura de RN.

5.2.6 Estudios de la biocompatibilidad *in vivo* en larvas de *Zebrafish*

Los resultados obtenidos anteriormente en los ensayos *ex vivo* e *in vitro*, sumado al amplio uso de la CUR en la medicina oriental y en la alimentación a nivel mundial, permiten suponer que este

compuesto bioactivo no generaría efectos tóxicos en ningún organismo. Sumado a ello, estudios en ratas Wistar demostraron que la CUR, cuando es administrada oralmente, no tiene efectos tóxicos sobre la hembra, sobre su capacidad reproductiva (fertilidad), ni sobre sus embriones²⁶⁷. En conjunto, estos resultados permitirían caracterizar a la CUR como “biocompatible”. Sin embargo, un trabajo ha reportado que la CUR presenta efectos letales en *zebrafish*, incluso en concentraciones relativamente bajas de droga ²⁵⁷. En dicho trabajo estudiaron los efectos de la CUR sobre embriones y larvas de *zebrafish*, demostrando que este compuesto tiene efectos embriotóxicos y teratogénicos en rango de concentración micromolar. Concretamente, estudiaron el efecto de 5, 7,5, 10, 12,5 y 15 μM de CUR en embriones de 1 h post-fecundación (hpf) y en larvas de 3 dpf, y determinaron la concentración letal 50 (CL₅₀), es decir la concentración que produce la muerte de la mitad de la población. En embriones observaron una disminución significativa en la viabilidad y la velocidad de eclosión; siendo 7,5 μM de CUR la CL₅₀. En larvas observaron que la CL₅₀ fue 5 μM luego de 24 h de tratamiento. Además, reportaron múltiples efectos morfológicos, como fueron columna doblada, edema pericardial, vitelo no consumido y disminución del tamaño de la larva. Recientemente, en un segundo trabajo realizado por Gao y col. (2014), utilizaron embriones de 2 hpf y larvas de *zebrafish* de 4 dpf. En embriones reportaron la formación de edemas pericardiales tras el tratamiento con 5,9 μM de CUR, mientras que en larvas reportaron una CL₅₀ de $11,8 \pm 1,5 \mu\text{M}$ de CUR ²⁶⁸. Hasta el momento, no existen otros reportes sobre la toxicidad de la CUR en este modelo animal.

Por esta razón, presta especial relevancia el estudio de los efectos de la CUR y los complejos D-CUR obtenidos en el modelo animal de larvas de *zebrafish*. Para tal fin se evaluaron los efectos sobre la viabilidad (**Figuras 5.22 y 5.23**), sobre la actividad de nado espontáneo (**Figura 5.24**), sobre el ritmo cardíaco (**Figura 5.25**), sobre el estado del hígado (**Tabla 5.1**) y sobre la morfología general (**Figura 5.26 y 5.27**) de las larvas, luego del tratamiento con CUR o D-CUR en concentraciones de droga entre 0,625 y 10 μM .

La administración de CUR libre y de complejos D-CUR produjo efectos letales en las larvas de *zebrafish* (**Figuras 5.22**). La CUR produjo la muerte de las larvas en concentraciones relativamente bajas (7,5 y 10 μM) y a tiempos cortos de incubación (a partir de las 4 h post-incubación, hpi). Además, las curvas de viabilidad demostraron que los complejos DG4.0-CUR produjeron la muerte de las larvas a tiempos más cortos (desde 1 hpi) y en concentraciones más bajas (desde 5 μM) que los complejos DG4.5-CUR y que la CUR libre. El control con DMSO no produjo efectos letales en las larvas luego de 48 h, por lo que los efectos observados corresponden puramente a la acción de la droga.

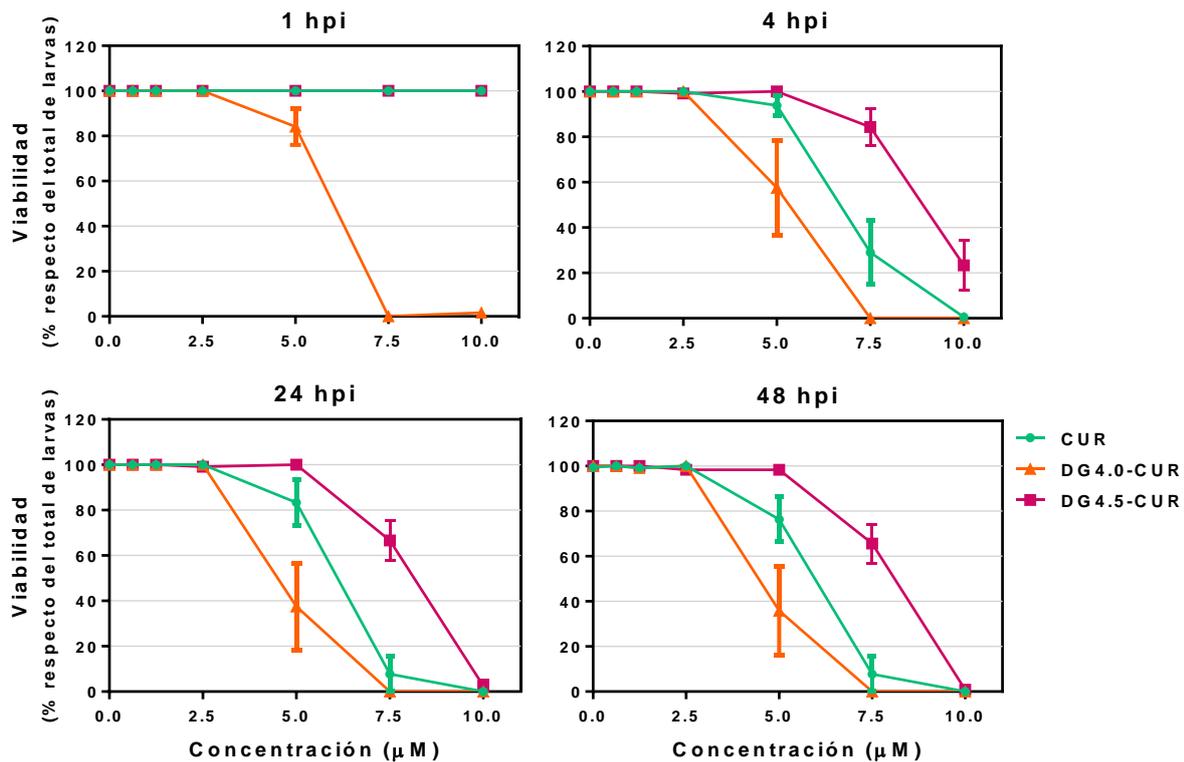


Figura 5.22 – Biocompatibilidad *in vivo* en larvas de *zebrafish*. Viabilidad. Viabilidad de las larvas luego de 1, 4, 24 y 48 h de tratamiento con CUR o complejos D-CUR. La viabilidad se expresó como el porcentaje de larvas vivas con respecto al total de larvas tratadas. Debido a que la representación de las diferencias encontradas respecto del control de larvas sin tratar dificultaría la interpretación de los gráficos, los resultados estadísticos se presentan en la Tabla A5.1 del Anexo de este capítulo.

Específicamente, la CL_{50} de la CUR a las 48 h de tratamiento fue de 5,7 μM ; mientras que la CL_{50} de los DG4.0-CUR fue 4,9 μM (más tóxica que la droga libre) y la de los DG4.5-CUR fue 7,8 μM (menos tóxica que la droga libre) (**Figuras 5.23**). Este incremento en la toxicidad mediado por los complejos DG4.0-CUR respecto de la CUR libre podría deberse a dos efectos: (1) a una captura incrementada del compuesto bioactivo por parte de las larvas, dado que los DG4.0 tienen la capacidad de permeabilizar las barreras biológicas; o (2) a un efecto sinérgico en la toxicidad mediada por los DG4.0 *per se*. En trabajos anteriores de nuestro grupo se reportó que los DG4.0 fueron tóxicos en concentraciones superiores a 0,5 μM ¹⁵⁸. En este caso nosotros trabajamos con concentraciones iguales a 1,35 μM de DG4.0 (cuando se administran 10 μM de CUR) o menores, por lo que sería factible esperar efectos tóxicos dados por el DG4.0 en sí mismo.

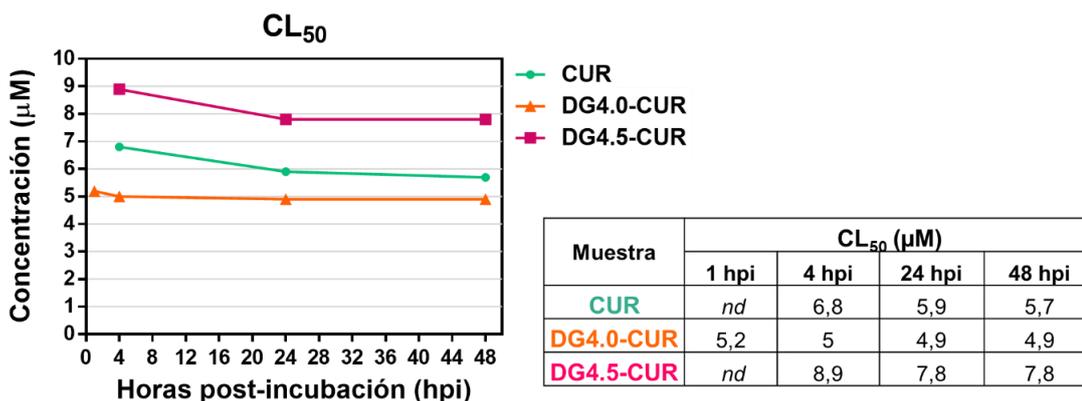


Figura 5.23 – Biocompatibilidad *in vivo* en larvas de *zebrafish*. CL₅₀. La concentración letal 50 (CL₅₀) es la concentración que produce la muerte del 50% de las larvas, y se calculó luego de 1, 4, 24 y 48 h de tratamiento con CUR o complejos D-CUR (*nd*: no determinada).

Además, se estudiaron los efectos sobre la actividad de nado espontáneo de las larvas (Figura 5.24), siendo este un parámetro de neurotoxicidad. Una disminución en la movilidad de las larvas podría deberse tanto a efectos a nivel neurológico, como a efectos sobre la viabilidad (si mueren el movimiento es nulo) o sobre la morfología de las larvas (si tienen malformaciones tienden a moverse menos). Por otro lado, un incremento en la movilidad de las larvas suele estar relacionado directamente con una activación a nivel neurológico. Entonces, la disminución en la actividad de nado observada tras los tratamientos con CUR libre o en complejos D-CUR en concentraciones de 7,5 y 10 µM, podría deberse a la muerte de las larvas mediadas por estos tratamientos. El control con DMSO no produjo cambios en el movimiento de las larvas respecto del control negativo (larvas tratadas solo con PBS). Ahora bien, los efectos observados en concentraciones menores o iguales a 5 µM de CUR libre o en complejos DG4.5-CUR, o en concentraciones menores o iguales a 2,5 µM de DG4.0-CUR, se deberían netamente a efectos a nivel neurológico, dado que no se detectaron efectos sobre la viabilidad en dichas concentraciones. Se observó, en ese caso, que la CUR produjo una disminución significativa de la actividad de nado luego de 1 hpi, que se mantuvo durante las primeras 4 hpi. Pero estos efectos no se prolongaron a largo plazo, dado que a las 24 y 48 hpi, el movimiento no presentó diferencias significativas respecto del control.

Por su parte, el complejo DG4.5-CUR presentó un perfil de afección de movimiento a bajas concentraciones similares al de la CUR libre. Contrariamente, el complejo DG4.0-CUR produjo una activación neurológica, dando lugar a un incremento significativo del movimiento espontáneo a las 4 y 24 hpi. Como la administración de 2,5 µM de CUR se realiza con 0,34 µM de DG4.0 en los complejos DG4.0-CUR, y en dicha concentración los dendrímeros no reportaron efectos tóxicos, el incremento en la movilidad de las larvas podría deberse a un incremento en la captación de CUR mediada por el dendrímero.

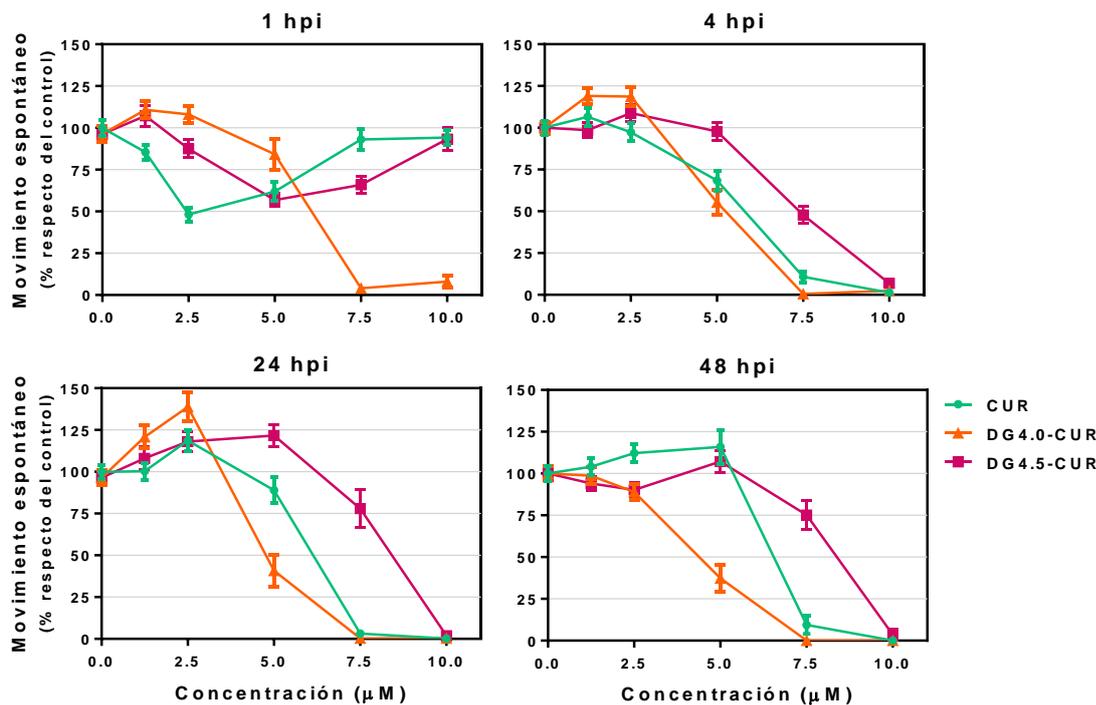


Figura 5.24 – Biocompatibilidad *in vivo* en larvas de *zebrafish*: Neurotoxicidad. Movimiento espontáneo de larvas de *zebrafish* después de 1, 4, 24 y 48 h de tratamiento con CUR o complejos D-CUR. El movimiento espontáneo se expresó como un porcentaje con respecto al movimiento en el control de larvas no tratadas. Debido a que la representación de las diferencias encontradas respecto del control de larvas no tratadas dificultaría la interpretación de los gráficos, los resultados estadísticos se presentan en la Tabla A5.2 del Anexo de este capítulo.

Por otro lado, se realizaron estudios sobre el ritmo cardíaco de las larvas expuestas a CUR libre o en complejos D-CUR (**Figura 5.25**). Nuevamente, los efectos cardiotoxicos podrían corresponder a: ausencia de ritmo cardíaco debido a la muerte de las larvas, disminución del ritmo cardíaco debido a efectos a nivel del funcionamiento del corazón o a malformaciones mediadas por los tratamientos (edema pericardial por ejemplo), o incremento del ritmo cardíaco debido netamente a efectos a nivel del funcionamiento del corazón. Entonces, las concentraciones letales (7,5 y 10 μM) de CUR libre dieron lugar a la muerte de las larvas (0% de ritmo cardíaco), mientras que la concentración sub-letal (2,5 μM) de CUR libre incrementó significativamente el ritmo cardíaco, denotando efectos cardiotoxicos. Por su parte, los efectos observados a nivel cardíaco tras el tratamiento con 5, 7,5 y 10 μM de DG4.0-CUR se correlacionan directamente con la muerte de las larvas; mientras que el tratamiento con DG4.5-CUR en concentraciones sub-letales (2,5 μM) también reportó el incremento significativo del ritmo cardíaco. Este efecto se debería a la acción tóxica de la CUR por sí misma sobre este modelo animal.

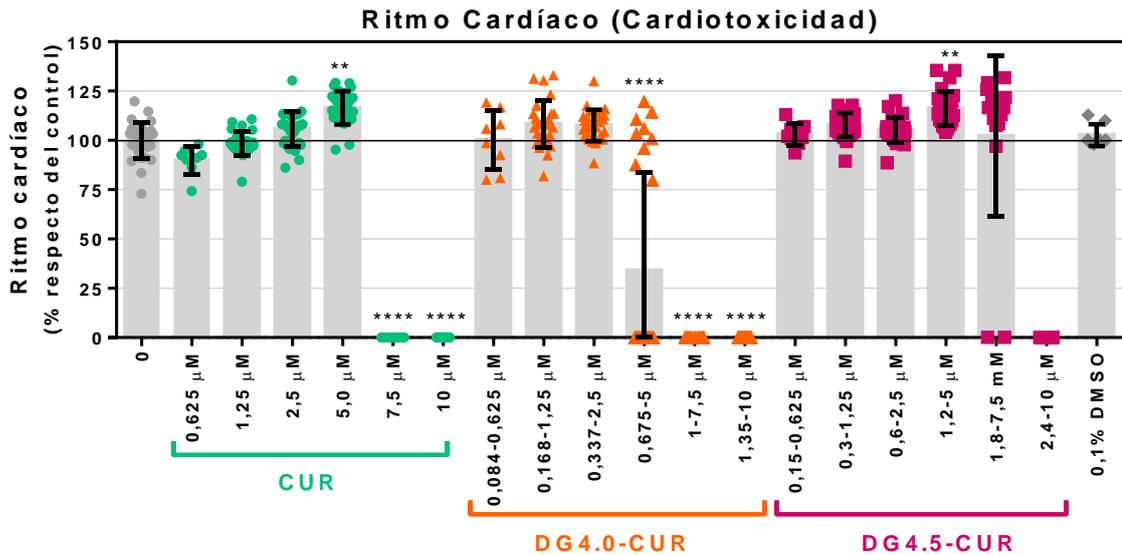


Figura 5.25 – Biocompatibilidad *in vivo* en larvas de *zebrafish*. Cardiotoxicidad. Ritmo cardíaco de larvas al 7 dpf después de 48 h de tratamiento con CBZ o complejos D-CBZ. El ritmo cardíaco se expresó como el porcentaje de latidos en las larvas tratadas con respecto a los latidos en el control de larvas no tratadas.

Sumados a estos efectos sobre la viabilidad, la actividad de nado y el ritmo cardíaco, se estudiaron los efectos sobre la morfología de las larvas (Figuras 5.26 y 5.27). Nuevamente, las concentraciones letales de CUR (7,5 y 10 μM), DG4.0-CUR (5, 7,5 y 10 μM) y DG4.5-CUR (10 μM) dieron lugar a la puntuación de cambios morfológicos más elevada (4) que corresponde con la muerte de las larvas. Por su parte, la administración de 5 μM de CUR libre dio lugar a cambios morfológicos significativos, como así también la administración de 5 y 7,5 μM de DG4.5-CUR. Los cambios morfológicos observados correspondieron en general a vejiga natatoria desinflada, necrosis en el vitelo, vitelo sin consumir y malformación de mandíbula. Por otro lado, la administración de dosis sub-letales de DG4.0-CUR no produjo cambios significativos.

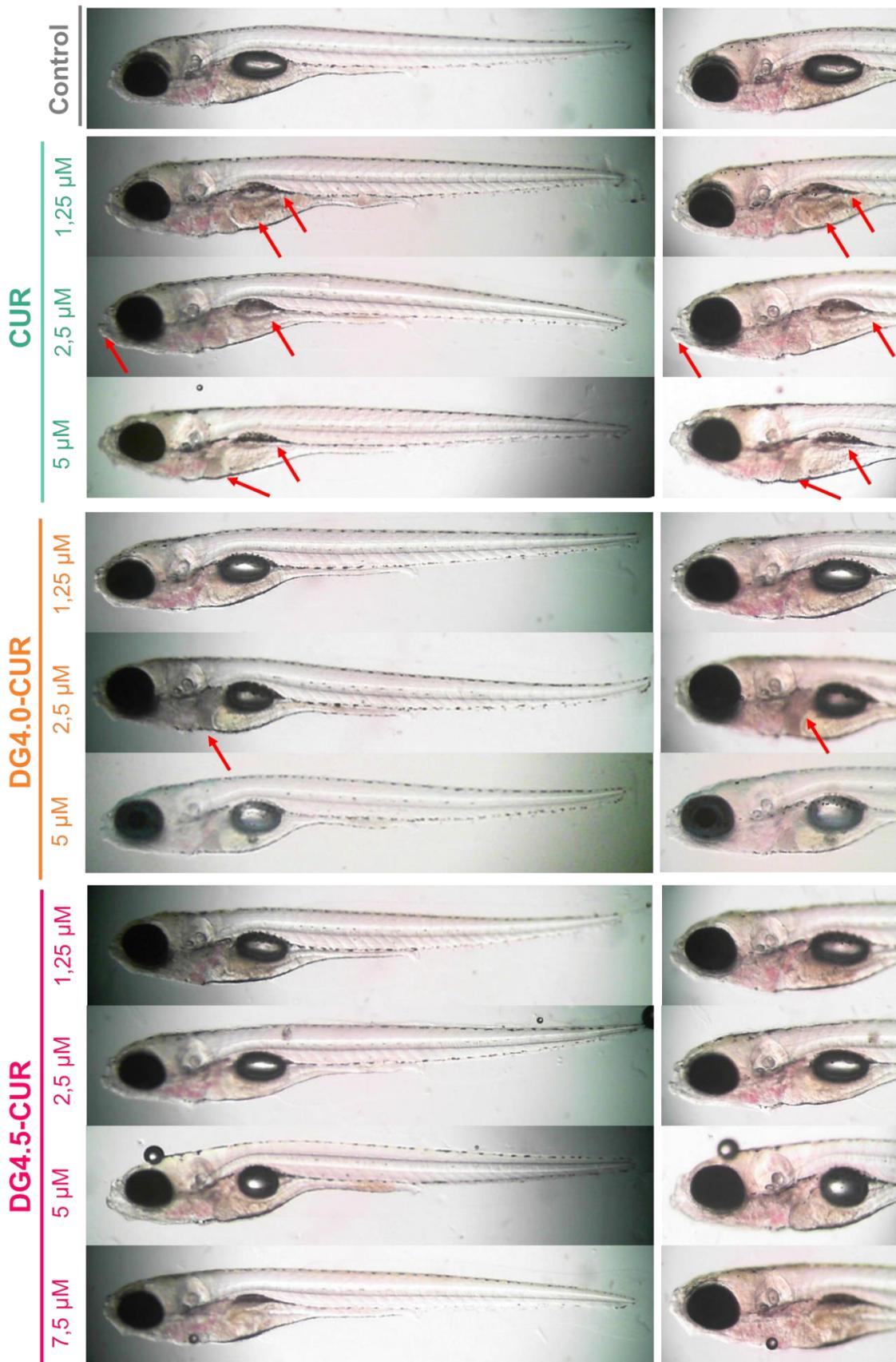


Figura 5.26 – Biocompatibilidad *in vivo* en larvas de *zebrafish*. Cambios morfológicos. Fotografías representativas de las larvas de *zebrafish* a los 7 dpf, luego de 48 h de tratamiento con CBZ o complejos D-CBZ. Los cambios morfológicos significativos se indicaron con flechas rojas.

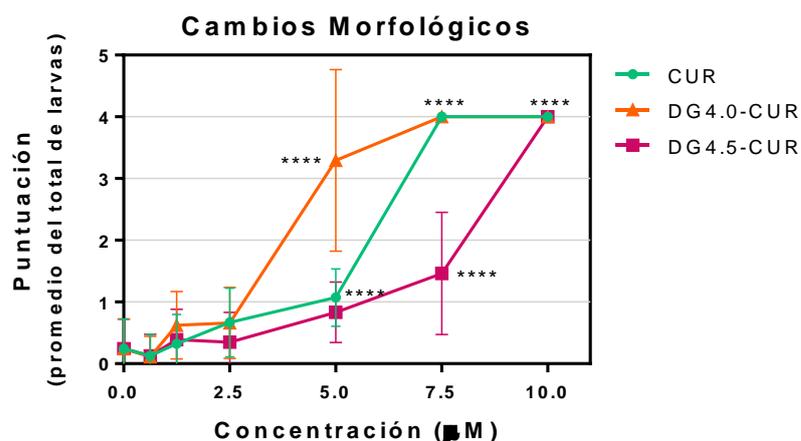


Figura 5.27 – Biocompatibilidad *in vivo* en larvas de *zebrafish*. Puntuación de cambios morfológicos. Los cambios morfológicos se puntuaron según el grado de anomalías de las larvas de *zebrafish* a los 7 dpf, después de 48 h de tratamiento con CBZ o complejos D-CBZ.

Finalmente, se evaluaron los efectos a nivel hepático (Tabla 5.1) en las concentraciones sub-letales. El tratamiento con CUR libre reportó efectos a nivel hepático incluso en concentraciones bajas (1,25 μM), alcanzando un porcentaje de hepatotoxicidad del 39,3% con una dosis de 5 μM de CUR. Por su parte, el tratamiento con DG4.0-CUR dio lugar a una hepatotoxicidad incrementada en las concentraciones sub-letales; mientras que el tratamiento con DG4.5-CUR redujo los efectos a nivel hepático respecto del tratamiento con CUR libre.

Tabla 5.1 - Biocompatibilidad *in vivo* en larvas de *zebrafish*. Hepatotoxicidad. Porcentaje de larvas con necrosis hepática (hígado oscuro y opaco) al 7 dpf después de 48 h de tratamiento con CBZ o D-CBZ.

Concentración (μM)	Hepatotoxicidad (% de larvas con necrosis hepática respecto del total)		
	CUR	DG4.0-CUR	DG4.5-CUR
1,25	12,9	21,6	10,3
2,5	29,6	43,9	10,8
5	39,3	letal	18,6

Considerando los resultados obtenidos, podría hipotetizarse que los DG4.0-CUR incrementan la toxicidad del fármaco por dos razones: los DG4.0 tienen efectos tóxicos *per se* e incrementan el ingreso de la CUR a las larvas exacerbando los efectos tóxicos de la droga. Por otro lado, podría suponerse que los DG4.5-CUR reducen los efectos tóxicos del fármaco porque disminuyen su ingreso a las larvas. Para confirmar estas hipótesis, se estudió y cuantificó la captura de CUR en las larvas (Figura 5.28). Si bien no se observó un aumento significativo de la fluorescencia de CUR

en las larvas, sí se reveló una tendencia hacia una captura incrementada de la droga cuando es administrada con ambos complejos D-CUR.

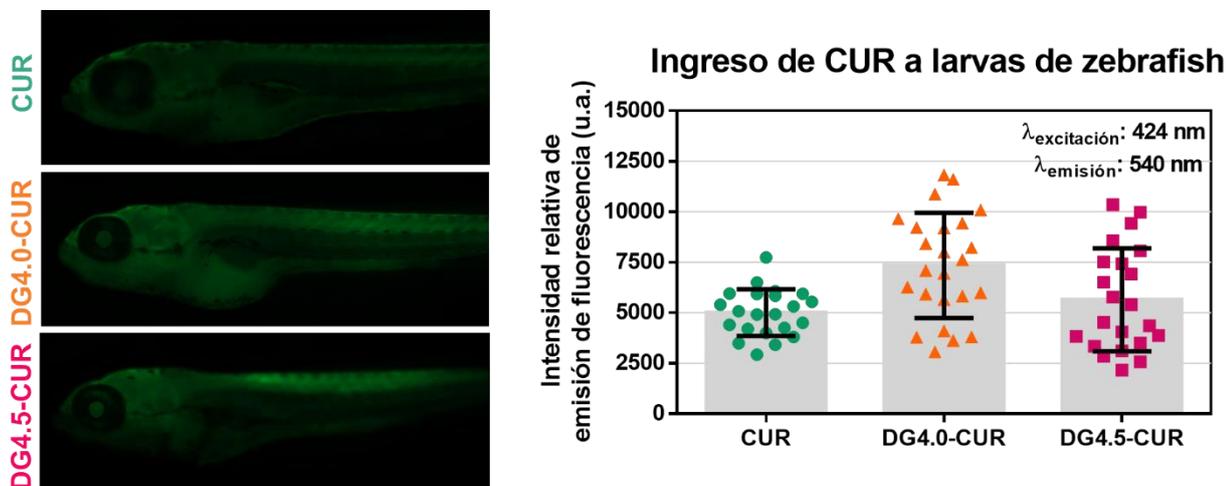


Figura 5.28 - Biocompatibilidad *in vivo* en larvas de *zebrafish*: Captura de CUR por parte de las larvas. A la izquierda se presentan fotografías representativas de la fluorescencia de las larvas de *zebrafish* a los 7 dpf, luego de 48 h de tratamiento con CUR o complejos D-CUR. A la derecha se presenta la intensidad relativa de emisión de fluorescencia cuantificada a partir de las imágenes con el programa ImageJ.

Analizando estos efectos en conjunto se puede concluir que la incorporación de la CUR en los dendrímeros aniónicos DG4.5, redujo la toxicidad causada por la droga libre. Esta reducción no se debe a una captura disminuida, por el contrario, las larvas incorporaron la misma o incluso mayor cantidad de CUR, pero esta presentó menos efectos tóxicos. Por otro lado, los efectos letales y sub-letales aumentaron cuando la CUR se administró con los dendrímeros catiónicos DG4.0, lo que se debe tanto a efectos tóxicos del dendrímero *per se*, como a una captura incrementada.

Wu y col. (2007) propusieron que los efectos tóxicos de la CUR en los embriones se deberían tanto a la desregulación simultánea de la expresión de múltiples genes, como a la inhibición de distintas enzimas. Sumado a ello, el grupo concluye que la bioacumulación de la CUR en el saco vitelino y en algunas células de la piel de las larvas sería la responsable de que ocurra dicha desregulación múltiple, dado que en ratas se observó que el 75% de la CUR es rápidamente excretada y no hay bioacumulación²⁵⁷. En conjunto, los efectos tóxicos de la CUR en las larvas de *zebrafish* se deberían que estos animales son incapaces de metabolizar y excretar la droga. Estudios más profundos son necesarios para determinar el mecanismo exacto de toxicidad de la CUR en este modelo animal.

5.3 Resumen de resultados y conclusiones parciales

Las conclusiones más importantes de este capítulo incluyen:

- Se ha desarrollado un sistema de *delivery* de curcumina (CUR), basado en la complejación con dendrímeros PAMAM de generación 4.0 y 4.5 (DG4.0 y DG4.5), capaz de incrementar la solubilidad y estabilidad de la droga en medios acuosos.
- A través de la complejación, se incrementó la solubilidad de la CUR en medios acuosos desde 1,6 μM a $177,1 \pm 16,2 \mu\text{M}$ en los DG4.0-CUR y $105,5 \pm 17,7 \mu\text{M}$ en los DG4.5-CUR.
- La complejación utilizando una relación teórica 1:10 D:CUR, resultó en la incorporación de 7 ± 1 y 4 ± 1 moles de CUR por mol de DG4.0 y DG4.5, respectivamente.
- Ambos complejos, DG4.0-CBZ y DG4.5-CBZ, retuvieron la CUR soluble y estable en medios acuosos, incluso a temperatura ambiente; lo que resultó en el incremento del tiempo de vida media. Los complejos DG4.0-CBZ presentaron una estabilidad aumentada en solución respecto de los complejos DG4.5-CBZ.
- Los complejos fueron parcialmente resistentes a la liofilización, dado que parte de la CUR se degradó en el proceso. Sin embargo, luego de la reconstitución, los complejos presentaron una estabilidad incrementada en solución respecto de los complejos sin liofilizar.
- Las interacciones estabilizadoras de los complejos D-CBZ ocurrieron tanto a nivel de los bolsillos internos de los dendrímeros como a nivel de los grupos superficiales. Esto dio lugar a un patrón de interacción diferencial con los dendrímeros, resultando en que los DG4.0 tuvieron la capacidad para complejar una mayor cantidad de CUR y mantenerla estable por un mayor periodo de tiempo.
- Los complejos obtenidos no fueron hemolíticos ni causaron cambios morfológicos en los ensayos *ex vivo* en glóbulos rojos humanos, por lo que se podrían administrar por vía intravenosa, así también como por vías no convencionales (transdérmica o intranasal)
- No se observaron efectos citotóxicos *in vitro* en cultivo celular ni del fármaco libre ni incorporado en los complejos.
- Respecto de los estudios *in vivo* en *zebrafish*, la CUR resultó sumamente tóxica debido a la incapacidad de las larvas de metabolizar y excretar la droga. La administración de los complejos DG4.0-CUR resultó en un incremento de la toxicidad, mediada por dos cuestiones: una mayor captación de la CUR y el efecto tóxico de los dendrímeros catiónicos *per se*. La administración de los complejos DG4.5-CUR resultó en una disminución de la toxicidad respecto de la CUR libre, incluso cuando la droga fue capturada en la misma proporción. Este efecto protector mediado por el DG4.5 podría deberse a que los complejos con dendrímeros aniónicos se metabolizan y excretan de modo diferencial a la droga libre y a los dendrímeros catiónicos.

- Se han cumplido las expectativas más importantes de este trabajo, que incluían aumentar la solubilidad de la CUR en medios acuosos y su estabilidad en el tiempo. Estos factores eran limitantes para la utilización de la droga en los tratamientos actuales.

Asimismo, surgen las siguientes perspectivas a futuro:

- ✓ Optimizar el protocolo de liofilización, para obtener un mayor porcentaje de CUR remanente, y estudiar la estabilidad de la droga en los complejos liofilizados en estado sólido, para ser utilizado como método de almacenamiento.
- ✓ Cuantificar la captura de la CUR por las larvas de zebrafish a lo largo del tiempo (4, 24 y 48 hpi), tanto en la droga libre como en los complejos, con el objetivo de determinar el mecanismo de toxicidad y acumulación de la droga en este modelo.
- ✓ Estudiar la actividad antioxidante de los complejos obtenidos en comparación a la CUR libre.
- ✓ Explorar la capacidad de los complejos DG4.0-CUR y DG4.5-CUR para aumentar la biodisponibilidad de la droga en un modelo murino, dado que esta era la tercera limitante del tratamiento.

Anexo del capítulo 5

Tabla A5.1 – Análisis estadístico de la viabilidad de larvas de *zebrafish* tras el tratamiento con CUR libre o en complejos D-CUR. Las diferencias significativas con respecto del control de larvas sin tratar (100% de viabilidad) se determinaron mediante el análisis TWO-WAY ANOVA seguido del post-test de comparaciones múltiples de Dunnett (*p<0,05; **p<0,01; ***p 0,001; ****p<0,0001; ns: no significativo).

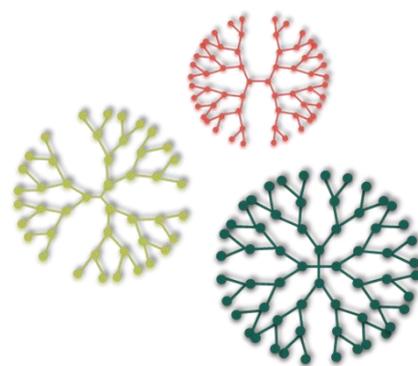
Muestra	Test de múltiples comparaciones de Dunnett	1 hpi		4 hpi		24 hpi		48 hpi	
		Significancia	Valor de p ajustado						
CUR	0,625 µM vs control	ns	> 0,9999						
	1,25 µM vs control	ns	> 0,9999						
	2,5 µM vs control	ns	> 0,9999						
	5,0 µM vs control	ns	> 0,9999	ns	0,9595	ns	0,1634	*	0,0253
	7,5 µM vs control	ns	> 0,9999	****	< 0,0001	****	< 0,0001	****	< 0,0001
	10 µM vs control	ns	> 0,9999	****	< 0,0001	****	< 0,0001	****	< 0,0001
DG4.0-CUR	0,625 µM vs control	ns	> 0,9999						
	1,25 µM vs control	ns	> 0,9999	ns	> 0,9999	ns	> 0,9999	ns	0,9999
	2,5 µM vs control	ns	> 0,9999						
	5,0 µM vs control	****	< 0,0001	****	< 0,0001	****	< 0,0001	****	< 0,0001
	7,5 µM vs control	****	< 0,0001	****	< 0,0001	****	< 0,0001	****	< 0,0001
	10 µM vs control	****	< 0,0001	****	< 0,0001	****	< 0,0001	****	< 0,0001
DG4.5-CUR	0,625 µM vs control	ns	> 0,9999						
	1,25 µM vs control	ns	> 0,9999						
	2,5 µM vs control	ns	> 0,9999	ns	0,9999	ns	0,9999	ns	0,9997
	5,0 µM vs control	ns	> 0,9999	ns	> 0,9999	ns	> 0,9999	ns	0,9997
	7,5 µM vs control	ns	> 0,9999	ns	0,3695	***	0,0010	***	0,0007
	10 µM vs control	ns	> 0,9999	****	< 0,0001	****	< 0,0001	****	< 0,0001

Tabla A5.2 – Análisis estadístico del movimiento espontáneo de larvas de *zebrafish* tras el tratamiento con CUR libre o en complejos D-CUR. Las diferencias significativas con respecto del control de larvas sin tratar (100% de movimiento espontáneo) se determinaron mediante el análisis TWO-WAY ANOVA seguido del post-test de comparaciones múltiples de Dunnett (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ns: no significativo).

Muestra	Test de múltiples comparaciones de Dunnett	1 hpi		4 hpi		24 hpi		48 hpi	
		Significancia	Valor de p ajustado						
CUR	1,25 μM vs control	ns	0,1279	ns	0,7026	ns	> 0,9999	ns	0,9690
	2,5 μM vs control	****	< 0,0001	ns	0,9880	ns	0,0602	ns	0,2937
	5,0 μM vs control	****	< 0,0001	****	< 0,0001	ns	0,4524	ns	0,0953
	7,5 μM vs control	ns	0,8233	****	< 0,0001	****	< 0,0001	****	< 0,0001
	10 μM vs control	ns	0,8698	****	< 0,0001	****	< 0,0001	****	< 0,0001
DG4.0-CUR	1,25 μM vs control	ns	0,2476	*	0,0214	*	0,0238	ns	0,9997
	2,5 μM vs control	ns	0,4351	*	0,0240	****	< 0,0001	ns	0,5111
	5,0 μM vs control	ns	0,3931	****	< 0,0001	****	< 0,0001	****	< 0,0001
	7,5 μM vs control	****	< 0,0001	****	< 0,0001	****	< 0,0001	****	< 0,0001
	10 μM vs control	****	< 0,0001	****	< 0,0001	****	< 0,0001	****	< 0,0001
DG4.5-CUR	1,25 μM vs control	ns	0,5046	ns	0,9997	ns	0,5415	ns	0,9175
	2,5 μM vs control	ns	0,6923	ns	0,5554	ns	0,0571	ns	0,6256
	5,0 μM vs control	****	< 0,0001	ns	0,9972	*	0,0177	ns	0,8394
	7,5 μM vs control	**	0,0013	****	< 0,0001	ns	0,1656	*	0,0164
	10 μM vs control	ns	0,9944	****	< 0,0001	****	< 0,0001	****	< 0,0001

Capítulo 6

Conclusiones Generales y Perspectivas



Capítulo 6 – Conclusiones Generales y Perspectivas

El objetivo general del presente trabajo ha sido diseñar y desarrollar terapias combinadas basadas en nanotecnología farmacéutica para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (EdA), con el fin de mejorar y potenciar el tratamiento actual.

Para ello, se diseñaron tres estrategias terapéuticas que incluyeron la combinación de las drogas carbamazepina (CBZ), tacrina (TAC) o curcumina (CUR) con los dendrímeros PAMAM generación 4.0 o 4.5 (DG4.0 o DG4.5). Para el diseño se tomaron en consideración los siguientes aspectos:

- La CBZ es un antiepiléptico aprobado por la FDA, que recientemente ha demostrado potenciar la autofagia y retrasar la neurodegeneración en modelos animales murinos. En este trabajo se la reposiciona como una nueva droga para el tratamiento de la EdA. Sin embargo, su uso es limitado, dado que presenta baja solubilidad en agua, un perfil farmacocinético ineficiente y múltiples efectos secundarios.
- La TAC es un inhibidor de la AChE que fue autorizada para el tratamiento de la EdA, pero luego fue removida del mercado debido a que causa hepatotoxicidad cuando se administra por vía oral. En este aspecto, es esencial explorar rutas alternativas de administración *y/o delivery* mediante nanotecnología para reducir dicho efecto secundario.
- La CUR es un compuesto natural que podría retrasar la progresión de la EdA a través de varios mecanismos, dado que ha demostrado tener actividad como inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa y de la producción de β -amiloide, como inhibidor de la agregación de proteínas, como anti-oxidante y como anti-inflamatorio. Sin embargo, su uso es limitado, debido a que presenta baja solubilidad en medio acuosos, es inestable en condiciones fisiológicas y exhibe baja biodisponibilidad.
- Los dendrímeros son polímeros tridimensionales obtenidos por síntesis orgánica que consisten en un *core* central, ramificaciones unidas covalentemente al *core* y una superficie con múltiples grupos terminales. Particularmente, en este trabajo se utilizaron los dendrímeros PAMAM con *core* de etilendiamina de generación 4.0 (DG4.0) que presentan grupos amino terminales, y por tanto carga positiva en condiciones fisiológicas, y de generación 4.5 (DG4.5) que presentan grupos carboxílicos terminales, y por tanto carga negativa en condiciones fisiológicas. Ambos dendrímeros son óptimos como nanotransportadores de drogas y como nanodrogas *per se*.

En este trabajo se desarrollaron las tres estrategias terapéuticas mencionadas, comenzando por la puesta a punto de un protocolo sencillo para la obtención de complejos D-droga. El mismo consistió en la combinación de las drogas y los dendrímeros en metanol, seguido de un período de agitación para favorecer la interacción y de la evaporación del solvente orgánico. Los residuos sólidos obtenidos se reconstituyeron en buffer fosfato salino, a pH fisiológico, y tras una centrifugación para eliminar los restos de droga no incorporada a dendrímeros, se obtuvieron los complejos D-droga en solución acuosa. En el caso de las drogas hidrofóbicas (CBZ y CUR) se evaluaron distintas relaciones D:droga para encontrar la óptima; mientras que para la droga hidrofílica (TAC) solo se evaluó una relación elevada para asegurar la interacción. De esta manera, a través de un mismo protocolo sencillo y reproducible, se obtuvieron complejos de DG4.0 o DG4.5 con CBZ, TAC o CUR.

Para abordar la caracterización de dichos complejos, se estudió la capacidad de carga (moles de droga por mol de dendrímero) y la capacidad de incrementar la solubilidad en agua de las drogas hidrofóbicas. Los resultados obtenidos en este aspecto se presentan en la **Tabla 6.1**.

Tabla 6.1 – Resumen de los resultados obtenidos al complejar las drogas con los dendrímeros.



	Terapia combinada 1			Terapia combinada 2			Terapia combinada 3		
	CBZ	DG4.0-CBZ	DG4.5-CBZ	TAC	DG4.0-TAC	DG4.5-TAC	CUR	DG4.0-CUR	DG4.5-CUR
Relación teórica D:droga óptima	-	1:150	1:150	-	1:200	1:200	-	1:10	1:10
Concentración (μM) de droga soluble	322,2 \pm 52,7	834,8 \pm 187,2	898,7 \pm 279,4	3878 \pm 513	4050 \pm 438	4435 \pm 444	1,6	177,1 \pm 16,2	105,5 \pm 17,7
Moles de droga por mol de dendrímero	-	21 \pm 7	24 \pm 11	-	15 \pm 12	28 \pm 20	-	7 \pm 1	4 \pm 1

Los presentes resultados demuestran que los DG4.0 y DG4.5 tienen la capacidad de incrementar significativamente la solubilidad de drogas hidrofóbicas, como la CBZ y la CUR, presentando la ventaja de no introducir modificaciones químicas en su estructura. Estos resultados también demuestran que los dendrímeros tienen la capacidad de interactuar con drogas hidrofílicas, como la TAC, aunque sin incrementar significativamente su solubilidad.

Asimismo, estos resultados evidencian que la interacción establecida es sumamente dependiente de la estructura química y del tamaño de la droga. Es decir, ambos dendrímeros presentaron una elevada capacidad de carga y una tendencia similar a la solubilización de CBZ, mientras que los DG4.0 fueron más eficaces en la interacción con CUR que los DG4.5, ambos presentando una capacidad de carga relativamente baja, y los DG4.5 presentaron una mayor interacción con la TAC que los DG4.0, sin incrementar significativamente la solubilidad en ninguno de los casos. La diferencia en la capacidad de carga de CBZ y CUR podría radicar en dos cuestiones: (1) la CBZ es una molécula más pequeña que la CUR, por lo que para un mismo tamaño de bolsillos internos, se

podrían incorporar una mayor cantidad de moléculas pequeñas; y (2) se combinó una mayor cantidad de CBZ con los dendrímeros en solución metanólica en comparación con la cantidad de CUR que se ofreció a los dendrímeros, diferencia que radica en que la CUR se degradó rápidamente incluso en condiciones controladas, lo que llevaría a pérdidas en el proceso de complejación. De todos modos, se incrementó alrededor de tres veces la solubilidad de CBZ y más de cien veces la solubilidad de CUR en medios acuosos, por complejación con 24 μM de DG4.0 o DG4.5. Ahora bien, es importante resaltar que si se utilizara una mayor concentración de dendrímero en el protocolo de complejación, se incrementaría aún más la concentración de droga en solución acuosa, dado que en bibliografía se ha reportado que existe una relación lineal entre la concentración de dendrímero y la de su carga. Por tanto, al utilizar mayores concentraciones de dendrímeros podríamos obtener mayores concentraciones de CBZ y CUR en solución acuosa.

Evaluando los resultados en conjunto también se puede notar que el proceso de complejación de TAC presentó mucha más variabilidad que los otros dos, hecho que se debería a la elevada solubilidad de la droga en medios acuosos y a que la interacción con los dendrímeros ocurrió por anclaje en los grupos superficiales. Este tipo de interacción podría conllevar entonces a una mayor variabilidad en los procesos de obtención de complejos. Igualmente, en todos los casos, las drogas fueron cuantificadas luego de cada complejación para asegurar la reproducibilidad en los ensayos consiguientes.

Si además de los resultados presentados en la Tabla 6.1, se consideran los obtenidos por otras técnicas, se pueden evidenciar los tipos de interacciones dendrímero-droga que darían lugar a la formación de complejos. En el caso de la CBZ, la solubilización mediada por dendrímeros se debería a la formación de complejos por encapsulación del fármaco en los bolsillos internos de estos nanotransportadores, involucrando interacciones de puente de hidrógeno e hidrofóbicas. En el caso de la CUR, la solubilización mediada por dendrímeros se debería a la formación de complejos tanto por encapsulación en los bolsillos internos como por anclaje a sus grupos superficiales, involucrando interacciones hidrofóbicas en el primer caso e interacciones ion-dipolo inducido en el segundo caso (catión-dipolo inducido para los DG4.0-CUR y anión-dipolo inducido para los DG4.5-CUR). En el caso de la TAC, si bien no hubo un incremento en la solubilidad, se demostró que los grupos terminales aniónicos de los DG4.5 fueron capaces de anclar débilmente al grupo amina catiónico de este fármaco.

Así también, es menester acentuar que la concentración de droga dentro de los dendrímeros es mucho mayor que la concentración de droga aparente en solución. Además, se debe considerar que en un evento aislado de captura por difusión de una droga, el orden de volumen que ingresa a una célula es muy pequeño, y que para un mismo volumen de droga libre o en dendrímeros, la cantidad de droga ingresante es muy diferente. Con ello nos referimos a que, por ejemplo, alrededor

de ~20 moléculas de CBZ se encapsularon en cada molécula de DG4.0, cuyo volumen corresponde a 33,5 nm³. Por lo tanto, la concentración de CBZ sería 20 moléculas/33,5 nm³, lo que corresponde a una concentración de 104 μM en el interior de cada dendrímero. Una idea de esto se presenta en la **Figura 6.1**, donde se puede observar que para una misma cantidad de moléculas de droga, contenidas en dos volúmenes iguales, puede la concentración ser en realidad muy diferente. Incluso aunque las concentraciones globales fueran iguales (una misma cantidad de moléculas de droga totales en un mismo volumen, representando por los rectángulos azules), la concentración en el volumen del dendrímero (círculo rosa) es mucho mayor cuando la droga se encuentra complejada que cuando se encuentra libre.

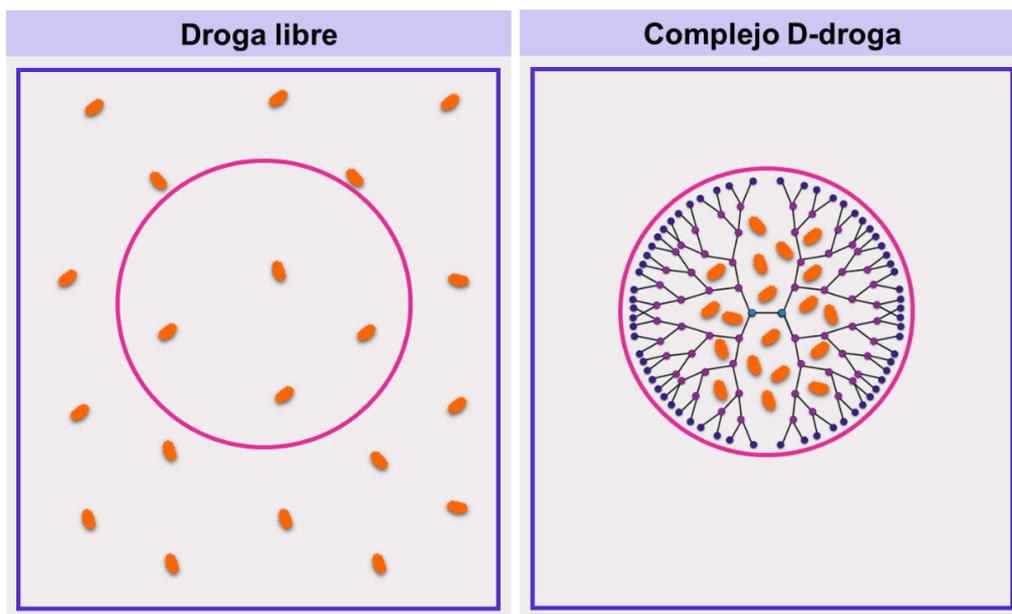


Figura 6.1 – Esquema de la concentración de droga libre o complejada en dendrímeros. Para una misma cantidad de droga (20 moléculas en este caso) y un mismo volumen (volumen de un dendrímero), se evidencia la diferencia entre la concentración de droga libre y de droga complejada.

En conclusión, a través de los estudios de complejación realizados con CBZ, TAC y CUR, se ha demostrado la capacidad de los dendrímeros de incrementar la solubilidad de drogas hidrofóbicas y de interactuar con drogas hidrofílicas. Además, se ha demostrado que la interacción depende tanto de las características del dendrímero como de las características del fármaco, dando lugar a distintos patrones de complejación (encapsulación y/o anclaje). Sumado a ello, la complejación en dendrímeros permitiría incrementar no solo la concentración total en solución, sino que incrementaría la concentración de droga por cada volumen de dendrímero, lo que daría lugar a un ingreso incrementado de la droga complejada en los sistemas biológicos, en comparación a la droga libre.

Para continuar con la caracterización de los complejos obtenidos, se estudió la estabilidad en el tiempo de las drogas en distintas condiciones y su perfil de liberación desde los complejos D-droga. Un resumen de los resultados obtenidos se presenta en la **Tabla 6.2**.

Tabla 6.2 – Resumen de los resultados obtenidos al caracterizar los complejos D-droga.



	Terapia combinada 1			Terapia combinada 2			Terapia combinada 3		
	CBZ	DG4.0-CBZ	DG4.5-CBZ	TAC	DG4.0-TAC	DG4.5-TAC	CUR	DG4.0-CUR	DG4.5-CUR
Estabilidad en solución acuosa	Estable por 90 días a 4,25 y 37 °C.	Estables por 90 días a 37 °C. A 4 y 25 °C ocurrieron procesos de liberación y precipitación de la CBZ a partir de los complejos D-CBZ.		Estable por, al menos, 60 días a 4,25 y 37 °C.	Estables por, al menos, 60 días a 4,25 y 37 °C. No modificaron el perfil de estabilidad de la droga.		Inestable ($t_{1/2}$ de 0,5 h a 25 °C).	Incrementó la estabilidad de la droga ($t_{1/2}$ de 72 h a 25 °C)	Incrementó la estabilidad de la droga ($t_{1/2}$ de 24 h a 25 °C)
Perfil de liberación de la droga	-	Liberaron de manera controlada la droga a pH fisiológico. Este proceso fue dependiente del pH.		-	No presentaron un perfil de liberación controlada de la droga.		-	Liberaron de manera controlada la droga. Este proceso fue dependiente de la temperatura.	
Tipo de interacción dendrímero-droga	-	Encapsulación en bolsillos internos de los dendrímeros		-	No hubo interacción	Interacción con grupos superficiales del dendrímero	-	Encapsulación en bolsillos internos y anclaje a grupos superficiales de los dendrímeros	

En conclusión, a través de los estudios de estabilidad de los complejos con CBZ, TAC y CUR, se ha demostrado la capacidad de los dendrímeros de incrementar la estabilidad de las drogas hidrofóbicas (CBZ y CUR) en solución acuosa, y de liberarlas a la solución de manera controlada en el tiempo. Particularmente, ambos dendrímeros demostraron incrementar significativamente la estabilidad de la CUR en solución acuosa, en solución metanólica, y en estado sólido, soslayando uno de los desafíos más importantes en la utilización de este compuesto bioactivo. Además, estos resultados demuestran nuevamente que el tipo de interacción dendrímero-droga depende del tipo de dendrímero y de las características de la droga.

Finalmente, se determinó el perfil toxicológico de los complejos D-droga. Para ello se estudiaron los efectos *ex vivo* (en glóbulos rojos humanos), *in vitro* (en cultivo de células Neuro-2a) e *in vivo* (en larvas de *zebrafish*). Un resumen de los resultados se presenta en la **Tabla 6.3**.

Según los ensayos *ex vivo*, podemos concluir que todos los complejos obtenidos podrían administrarse por vía intravenosa sin generar efectos tóxicos en los glóbulos rojos. Así también podrían administrarse por vías no convencionales (transdérmica o intranasal).

En cuanto a los estudios *in vitro*, nuestros resultados demostraron que los dendrímeros aniónicos presentan efectos tóxicos reducidos respecto de los tratamientos con CBZ o TAC libre. Es decir, la citotoxicidad de la CBZ y la TAC se redujo cuando las drogas se incorporaron en los DG4.5, hecho que no ocurrió con los DG4.0. En el caso de la CUR no se observaron efecto citotóxicos para la

droga libre ni complejada con dendrímeros. En conjunto, estos resultados destacan la ventaja de usar dendrímeros PAMAM con carga negativa al diseñar sistemas de *delivery* de fármacos estables y no citotóxicos.

Los experimentos *in vivo* concuerdan con los de cultivo celular y recalcan la ventaja de utilizar dendrímeros aniónicos al diseñar nanotransportadores biocompatibles. Dicho hecho se refleja en los resultados obtenidos para los complejos DG4.5-CBZ, que resultaron biocompatibles al igual que la CBZ libre, y para los complejos DG4.5-CUR, que lograron reducir la toxicidad inducida por la CUR.

Tabla 6.3 – Resumen de los resultados obtenidos al estudiar el perfil toxicológico de los complejos.



	Terapia combinada 1			Terapia combinada 2			Terapia combinada 3		
	CBZ	DG4.0-CBZ	DG4.5-CBZ	TAC	DG4.0-TAC	DG4.5-TAC	CUR	DG4.0-CUR	DG4.5-CUR
Toxicidad <i>ex vivo</i> en glóbulos rojos humanos	La droga libre y los complejos, en las concentraciones evaluadas, no produjeron efectos hemolíticos ni cambios morfológicos en los eritrocitos.			La droga libre y los complejos, en las concentraciones evaluadas, no produjeron efectos hemolíticos ni cambios morfológicos en los eritrocitos.			La droga libre y los complejos, en las concentraciones evaluadas, no produjeron efectos hemolíticos ni cambios morfológicos en los eritrocitos.		
Toxicidad <i>in vitro</i> en cultivo celular de Neuro-2a	Redujo la viabilidad medida por CV luego de 24 h.	No logró evitar el efecto tóxico causado por la CBZ libre.	Evitó el efecto tóxico causado por la CBZ libre.	Redujo la viabilidad medida por CV, MTT y RN luego de 24 h.	No logró evitar el efecto tóxico causado por la TAC libre	Disminuyó el efecto tóxico causado por la TAC libre	La droga libre y los complejos, en las concentraciones evaluadas, no produjeron efectos tóxicos medidos por CV, MTT o RN en cultivo celular.		
Toxicidad <i>in vivo</i> en larvas de zebrafish	Biocompatible	Resultó tóxico debido a los efectos del dendrímero catiónico.	Biocompatible	Produjo cambios morfológicos severos y resultó cardiotoxica y hepato-tóxica.	Disminuyeron los efectos tóxicos causados por la TAC libre, pero no los evitaron completamente.		Resultó letal, dado que las larvas no tienen la capacidad de metabolizarla y excretarla.	Incrementaron la toxicidad, debido a un mayor ingreso de CUR a las larvas y al efecto tóxico del dendrímero	Reducieron la toxicidad de la CUR, sin reducir el ingreso de la droga a las larvas.

Considerando los resultados presentados en la Tabla 6.3, podemos señalar que la plataforma propuesta en este trabajo para el estudio de la nanotoxicidad y la biocompatibilidad ha demostrado ser completa y ha permitido identificar los puntos críticos a mejorar en las terapias combinadas propuestas.

Asimismo, si se toman en consideración todos los resultados obtenidos, podemos concluir que:

- ✓ Se ha desarrollado un sistema estable de *delivery* del fármaco CBZ, basado en la complejación con dendrímeros PAMAM DG4.0 y DG4.5, siendo la terapia combinada DG4.5-CBZ la más propicia para continuar con estudios de actividad, debido a que presentaron una solubilización y estabilización similar de la droga que los DG4.0, pero resultaron menos tóxicos *in vitro* y más biocompatibles *in vivo*.
- ✓ Se ha desarrollado una estrategia terapéutica basada en la administración conjunta de TAC con DG4.0 o DG4.5, que se presenta como una terapia novedosa, ya que resultó menos citotóxica y

más biocompatible que el fármaco libre, y podría ser administrada por rutas no tradicionales. Los complejos DG4.0-TAC presentaron una hepatotoxicidad reducida respecto del tratamiento con TAC libre o con DG4.5-TAC. Como este es uno de los limitantes más importantes del tratamiento con dicho fármaco, los complejos DG4.0-TAC se presentan como buenos candidatos para continuar y profundizar el estudio de esta terapia combinada.

- ✓ Se ha desarrollado un sistema de *delivery* de CUR, basado en la complejación con DG4.0 y DG4.5, cumpliendo con las expectativas más importantes de este trabajo, que incluían aumentar la solubilidad de la CUR en medios acuosos y su estabilidad en el tiempo, debido a que estos factores eran limitantes para la utilización de la droga en los tratamientos actuales. Ninguno de los complejos D-CUR presentó efectos tóxicos *ex vivo* e *in vitro*, por lo que ambos son candidatos para la profundización del estudio de esta tercera terapia combinada.

En base a todo lo mencionado, podemos decir que los resultados de este trabajo amplían el conocimiento sobre la capacidad de los dendrímeros de actuar como nanotransportadores de distintos tipos de drogas, así como sobre los mecanismos que intervienen en su perfil toxicológico. Sumado a ello, los resultados de este trabajo funcionarían como punto de partida para el diseño de terapias combinadas basadas en dendrímeros capaces de actuar sobre varias hipótesis etiológicas de la EdA.

La perspectiva a futuro más importante de este trabajo es el estudio de la actividad de las terapias combinadas aquí diseñadas y desarrolladas. Por ejemplo, a través de la exploración de la capacidad de los complejos DG4.5-CBZ para reducir la agregación anormal de proteínas β -amiloides en cultivos celulares y modelos mamíferos, comparándolos con el efecto de la droga libre. Así también, el estudio de la capacidad de los complejos DG4.0-TAC de inhibir sinérgicamente la AChE, y de transportar la droga por vías no tradicionales de administración (transdérmica o nasal) para reducir su toxicidad. Del mismo modo, es una perspectiva de este trabajo explorar la capacidad de los complejos DG4.0-CUR y DG4.5-CUR para aumentar la biodisponibilidad de la CUR en un modelo murino, dado que esta era la tercera limitante del tratamiento. Finalmente, surge como perspectiva evaluar la actividad sinérgica de los complejos D-CUR como anti-oxidantes y anti-inflamatorios, así como frente al proceso de agregación de proteínas que da lugar a la neuropatología de la EdA.

Con este trabajo hemos realizado un aporte significativo para el diseño de nuevas terapias combinadas, basadas en dendrímeros, para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Queremos resaltar que, a pesar de ello, mucho queda por hacer para avanzar en el campo de desarrollo de estrategias terapéuticas efectivas para esta enfermedad.



Referencias

1. Wilson, R. S. *et al.* Cognitive activity and the cognitive morbidity of Alzheimer disease. *Neurology* 75, 990–996 (2010).
2. de la Torre, J. The Vascular Hypothesis of Alzheimer's Disease: A Key to Preclinical Prediction of Dementia Using Neuroimaging. *J. Alzheimers. Dis.* 63, 35–52 (2018).
3. Zhao, Y. *et al.* In vivo detection of microstructural correlates of brain pathology in preclinical and early Alzheimer Disease with magnetic resonance imaging. *Neuroimage* 148, 296–304 (2017).
4. Morley, J. E. & Farr, S. A. The role of amyloid-beta in the regulation of memory. *Biochem. Pharmacol.* 88, 479–485 (2014).
5. Katzman, R. The Prevalence and Malignancy of Alzheimer Disease: A Major Killer. *JAMA Neurol.* 33, 217–218 (1976).
6. Alzheimer's, A. 2018 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dement.* 14, 367–429 (2018).
7. Hebert, L. E., Weuve, J., Scherr, P. A. & Evans, D. A. Alzheimer disease in the United States (2010–2050) estimated using the 2010 census. *Neurology* 80, 1778 LP – 1783 (2013).
8. Serafini, M. M., Catanzaro, M., Rosini, M., Racchi, M. & Lanni, C. Curcumin in Alzheimer's disease: Can we think to new strategies and perspectives for this molecule? *Pharmacol. Res.* 124, 146–155 (2017).
9. Tang, M., Taghibiglou, C. & Liu, J. The Mechanisms of Action of Curcumin in Alzheimer's Disease. *J. Alzheimer's Dis.* 58, 1003–1016 (2017).
10. Prince, M. *et al.* The global prevalence of dementia: A systematic review and metaanalysis. *Alzheimer's Dement.* 9, 63-75.e2 (2013).
11. Wimo, A. *et al.* The worldwide costs of dementia 2015 and comparisons with 2010. *Alzheimer's Dement.* 13, 1–7 (2017).
12. Frisoni, G. B. *et al.* Strategic roadmap for an early diagnosis of Alzheimer's disease based on biomarkers. *Lancet Neurol.* 16, 661–676 (2017).
13. Cubinkova, V. *et al.* Alternative hypotheses related to Alzheimer's disease. *Bratislava Med. J.* 119, 210–216 (2018).
14. Hampel, H. *et al.* The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain* 141, 1917–1933 (2018).
15. Romero, A., Cacabelos, R., Oset-Gasque, M. J., Samadi, A. & Marco-Contelles, J. Novel tacrine-related drugs as potential candidates for the treatment of Alzheimer's disease. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 23, 1916–1922 (2013).
16. Silva, T., Reis, J., Teixeira, J. & Borges, F. Alzheimer's disease, enzyme targets and drug discovery struggles: From natural products to drug prototypes. *Ageing Res. Rev.* 15, 116–145 (2014).
17. Fu, H. *et al.* Tau Pathology Induces Excitatory Neuron Loss, Grid Cell Dysfunction, and Spatial Memory Deficits Reminiscent of Early Alzheimer's Disease. *Neuron* 93, 533-541.e5 (2017).
18. Kametani, F. & Hasegawa, M. Reconsideration of amyloid hypothesis and tau hypothesis in Alzheimer's disease. *Frontiers in Neuroscience* 12, 25 (2018).
19. Johnson, K. A. *et al.* Tau positron emission tomographic imaging in aging and early Alzheimer disease.

- Ann. Neurol.* 79, 110–119 (2016).
20. Du, X., Wang, X. & Geng, M. Alzheimer's disease hypothesis and related therapies. *Transl. Neurodegener.* 7, 2 (2018).
 21. Ashraf, G. M. *et al.* The Possibility of an Infectious Etiology of Alzheimer Disease. *Mol. Neurobiol.* 56, 4479–4491 (2019).
 22. Cheignon, C. *et al.* Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biol.* 14, 450–464 (2018).
 23. Harris, H. & Rubinsztein, D. C. Control of autophagy as a therapy for neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Neurol.* 8, 108–117 (2012).
 24. Li, L. *et al.* Autophagy Enhancer Carbamazepine Alleviates Memory Deficits and Cerebral Amyloid- β ; Pathology in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer Research* 10, 433–441 (2013).
 25. Vidal, R. L., Matus, S., Bargsted, L. & Hetz, C. Targeting autophagy in neurodegenerative diseases. *Trends Pharmacol. Sci.* 35, 583–591 (2014).
 26. Hong, S. & Stevens, B. Microglia: Phagocytosing to Clear, Sculpt, and Eliminate. *Dev. Cell* 38, 126–128 (2016).
 27. Soscia, S. J. *et al.* The Alzheimer's Disease-Associated Amyloid β -Protein Is an Antimicrobial Peptide. *PLoS One* 5, e9505 (2010).
 28. Stilling, R. M., Dinan, T. G. & Cryan, J. F. The brain's Geppetto—microbes as puppeteers of neural function and behaviour? *J. Neurovirol.* 22, 14–21 (2016).
 29. Eimer, W. A. *et al.* Alzheimer's Disease-Associated β -Amyloid Is Rapidly Seeded by Herpesviridae to Protect against Brain Infection. *Neuron* 99, 56–63.e3 (2018).
 30. Vogt, N. M. *et al.* Gut microbiome alterations in Alzheimer's disease. *Sci. Rep.* 7, 13537 (2017).
 31. Logsdon, A. F., Erickson, M. A., Rhea, E. M., Salameh, T. S. & Banks, W. A. Gut reactions: How the blood–brain barrier connects the microbiome and the brain. *Exp. Biol. Med.* 243, 159–165 (2018).
 32. Sochocka, M. *et al.* The Gut Microbiome Alterations and Inflammation-Driven Pathogenesis of Alzheimer's Disease—a Critical Review. *Mol. Neurobiol.* 56, 1841–1851 (2019).
 33. Zhuang, Z. Q. *et al.* Gut Microbiota is Altered in Patients with Alzheimer's Disease. *J. Alzheimer's Dis.* 63, 1337–1346 (2018).
 34. Lin, L., Zheng, L. J. & Zhang, L. J. Neuroinflammation, Gut Microbiome, and Alzheimer's Disease. *Mol. Neurobiol.* 55, 8243–8250 (2018).
 35. Goldman, J. S. *et al.* Genetic counseling and testing for Alzheimer disease: Joint practice guidelines of the American College of Medical Genetics and the National Society of Genetic Counselors. *Genet. Med.* 13, 597–605 (2011).
 36. Lott, I. T. & Dierssen, M. Cognitive deficits and associated neurological complications in individuals with Down's syndrome. *Lancet Neurol.* 9, 623–633 (2010).
 37. Loy, C. T., Schofield, P. R., Turner, A. M. & Kwok, J. B. J. Genetics of dementia. *Lancet* 383, 828–840 (2014).
 38. Ward, A. *et al.* Prevalence of Apolipoprotein E4 genotype and homozygotes (APOE e4/e4) among patients diagnosed with Alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis. *Neuroepidemiology* 38, 1–

- 17 (2012).
39. Tang, Y., Lutz, M. W. & Xing, Y. A systems-based model of Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement.* 15, 168–171 (2019).
 40. Cummings, J. L., Morstorf, T. & Zhong, K. Alzheimer's disease drug-development pipeline: Few candidates, frequent failures. *Alzheimer's Res. Ther.* 6, 37 (2014).
 41. Bachurin, S. O., Gavrilova, S. I., Samsonova, A., Barreto, G. E. & Aliev, G. Mild cognitive impairment due to Alzheimer disease: Contemporary approaches to diagnostics and pharmacological intervention. *Pharmacol. Res.* 129, 216–226 (2018).
 42. Anand, R., Gill, K. D. & Mahdi, A. A. Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future. *Neuropharmacology* 76, 27–50 (2014).
 43. Gong, C.-X., Liu, F. & Iqbal, K. Multifactorial hypothesis and multi-targets for Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.* 1–11 (2018).
 44. Gartziandia, O., Herran, E., Pedraz, J. L., Igartua, M. & Hernandez, R. M. Nanotechnology-based drug-delivery systems releasing growth factors to the CNS. *Nanobiomaterials Drug Deliv.* 371–402 (2016). doi:10.1016/b978-0-323-42866-8.00011-3
 45. Sahoo, S. K. & Labhasetwar, V. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug Discov. Today* 8, 1112–20 (2003).
 46. Joris, F. *et al.* Assessing nanoparticle toxicity in cell-based assays: Influence of cell culture parameters and optimized models for bridging the in vitro-in vivo gap. *Chem. Soc. Rev.* 42, 8339–8359 (2013).
 47. Teo, B. K. & Sun, X. H. From top-down to bottom-up to hybrid nanotechnologies: Road to nanodevices. *J. Clust. Sci.* 17, 529–540 (2006).
 48. Kargozar, S. & Mozafari, M. Nanotechnology and Nanomedicine: Start small, think big. *Mater. Today Proc.* 5, 15492–15500 (2018).
 49. Kelsall, R. W., Hamley, I. W. & Geoghegan, M. *Nanoscale Science and Technology. Nanoscale Science and Technology* (2005). doi:10.1002/0470020873
 50. Kolhe, P., Misra, E., Kannan, R. M., Kannan, S. & Lieh-Lai, M. Drug complexation, in vitro release and cellular entry of dendrimers and hyperbranched polymers. *Int. J. Pharm.* 259, 143–160 (2003).
 51. Rajabi, M., Srinivasan, M. & Mousa, S. A. Nanobiomaterials in drug delivery. *Nanobiomaterials Drug Deliv. Appl. Nanobiomaterials* 1–37 (2016). doi:10.1016/B978-0-323-42866-8.00001-0
 52. Ventola, C. L. Progress in Nanomedicine: Approved and Investigational Nanodrugs. *P T* 42, 742–755 (2017).
 53. Boisseau, P. & Loubaton, B. Nanomedicine, nanotechnology in medicine. *Comptes Rendus Phys.* 12, 620–636 (2011).
 54. Bangham, A. D., Standish, M. M. & Watkins, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* 13, 238–252 (1965).
 55. LANGER, R. & FOLKMAN, J. Polymers for the sustained release of proteins and other macromolecules. *Nature* 263, 797–800 (1976).
 56. Gref, R. *et al.* Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science (80-.)*. 263, 1600–1603 (1994).
 57. Chan, W. C. W. & Nie, S. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science*

- (80-). 281, 2016–2018 (1998).
58. Markowicz-Piasecka, M. & Mikiciuk-Olasik, E. Dendrimers in drug delivery. *Nanobiomaterials Drug Deliv. Appl. Nanobiomaterials* 39–74 (2016). doi:10.1016/B978-0-323-42866-8.00002-2
 59. Rahman, Z. *et al.* Nanotechnology-based drug products. *Nanoscale Fabr. Optim. Scale-Up Biol. Asp. Pharm. Nanotechnol.* 619–655 (2018). doi:10.1016/b978-0-12-813629-4.00016-4
 60. Brambilla, D. *et al.* Nanotechnologies for Alzheimer's disease: Diagnosis, therapy, and safety issues. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 7, 521–540 (2011).
 61. Nazem A, M. G. Nanotechnology Building Blocks for Intervention with Alzheimer's Disease Pathology: Implications in Disease Modifying Strategies. *J. Bioanal. Biomed.* 06, 9 (2014).
 62. Dong, X. Current strategies for brain drug delivery. *Theranostics* 8, 1481–1493 (2018).
 63. Vila Jato, J. L. Nuevos aspectos biofarmacéuticos en nanotecnología farmacéutica. in *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* 73, (2009).
 64. Bobo, D., Robinson, K. J., Islam, J., Thurecht, K. J. & Corrie, S. R. Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. *Pharm. Res.* 33, 2373–2387 (2016).
 65. Saraiva, C. *et al.* Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood-brain barrier to treat neurodegenerative diseases. *J. Control. Release* 235, 34–47 (2016).
 66. Kakkar, A., Traverso, G., Farokhzad, O. C., Weissleder, R. & Langer, R. Evolution of macromolecular complexity in drug delivery systems. *Nat. Rev. Chem.* 1, 63 (2017).
 67. Jain, K. K. Drug delivery systems - An overview. in *Methods in Molecular Biology* (ed. Jain, K. K.) 437, 1–50 (Humana Press, 2008).
 68. Tibbitt, M. W., Dahlman, J. E. & Langer, R. Emerging Frontiers in Drug Delivery. *J. Am. Chem. Soc.* 138, 704–717 (2016).
 69. Amin, K. & Dannenfelser, R. M. In vitro hemolysis: Guidance for the pharmaceutical scientist. *J. Pharm. Sci.* 95, 1173–1176 (2006).
 70. Duncan, R. & Izzo, L. Dendrimer biocompatibility and toxicity. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 2215–2237 (2005).
 71. Temprana, C. F. *et al.* Diacetylenic lipids in the design of stable lipopolymers able to complex and protect plasmid DNA. *PLoS One* 12, e0186194 (2017).
 72. Dobrovolskaia, M. A. *et al.* Method for analysis of nanoparticle hemolytic properties in vitro. *Nano Lett.* 8, 2180–2187 (2008).
 73. Fard, J. K., Jafari, S. & Eghbal, M. A. A review of molecular mechanisms involved in toxicity of nanoparticles. *Adv. Pharm. Bull.* 5, 447–454 (2015).
 74. Fotakis, G. & Timbrell, J. A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol. Lett.* 160, 171–177 (2006).
 75. Fako, V. E. & Furgeson, D. Y. Zebrafish as a correlative and predictive model for assessing biomaterial nanotoxicity. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 478–486 (2009).
 76. Martinez, C. S. *et al.* Relation between biophysical properties of nanostructures and their toxicity on zebrafish. *Biophys. Rev.* 9, 775–791 (2017).
 77. Streisinger, G., Singer, F., Walker, C., Knauber, D. & Dower, N. Segregation analyses and gene-centromere distances in zebrafish. *Genetics* 112, 311–319 (1986).

78. Lee, K. Y. *et al.* Zebrafish models for functional and toxicological screening of nanoscale drug delivery systems: promoting preclinical applications. *Biosci. Rep.* 37, BSR20170199 (2017).
79. De Esch, C., Slieker, R., Wolterbeek, A., Woutersen, R. & de Groot, D. Zebrafish as potential model for developmental neurotoxicity testing. A mini review. *Neurotoxicol. Teratol.* 34, 545–553 (2012).
80. de Abreu, M. S., Giacomini, A. C. V. V., Echevarria, D. J. & Kalueff, A. V. Legal aspects of zebrafish neuropharmacology and neurotoxicology research. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 101, 65–70 (2019).
81. Nishimura, Y. *et al.* Using zebrafish in systems toxicology for developmental toxicity testing. *Congenit. Anom. (Kyoto)*. 56, 18–27 (2016).
82. Jain, K., Kesharwani, P., Gupta, U. & Jain, N. K. Dendrimer toxicity: Let's meet the challenge. *Int. J. Pharm.* 394, 122–142 (2010).
83. Tomalia, D. A. *et al.* A New Class of Polymers: Starburst-Dendritic Macromolecules. *Polym. J.* 17, 117–132 (1985).
84. Newkome, G. R., Yao, Z., Baker, G. R. & Gupta, V. K. Micelles. Part 1. Cascade molecules: a new approach to micelles. A [27]-arborol. *J. Org. Chem.* 50, 2003–2004 (1985).
85. D'Emanuele, A. & Attwood, D. Dendrimer-drug interactions. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 2147–2162 (2005).
86. Svenson, S. & Tomalia, D. A. Dendrimers in biomedical applications-reflections on the field. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64, 102–115 (2012).
87. Gupta, U. & Perumal, O. Dendrimers and Its Biomedical Applications. *Nat. Synth. Biomed. Polym.* 243–257 (2014). doi:10.1016/B978-0-12-396983-5.00016-8
88. Esfand, R. & Tomalia, D. A. Laboratory Synthesis of Poly (amidoamine) (PAMAM) Dendrimers. *Dendrimer Other Dendritic Polym.* 1, 587–604 (2001).
89. Caminati, G., Turro, N. J. & Tomalia, D. A. Photophysical Investigation of Starburst Dendrimers and Their Interactions with Anionic and Cationic Surfactants. *J. Am. Chem. Soc.* 112, 8515–8522 (1990).
90. Suarez, I. J. *et al.* Chemical and ecotoxicological assessment of poly(amidoamine) dendrimers in the aquatic environment. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 30, 492–506 (2011).
91. Prieto, M. J., Temprana, C. F., Del Río Zabala, N. E., Marotta, C. H. & Alonso, S. D. V. Optimization and in vitro toxicity evaluation of G4 PAMAM dendrimer-risperidone complexes. *Eur. J. Med. Chem.* 46, 845–850 (2011).
92. Prieto, M. J., Schillreff, P., Tesoriero, M. V. D., Morilla, M. J. & Romero, E. L. Brain and muscle of Wistar rats are the main targets of intravenous dendrimeric sulfadiazine. *Int. J. Pharm.* 360, 204–212 (2008).
93. Prieto, M. J. *et al.* G4. 5 PAMAM dendrimer-risperidone: Biodistribution and behavioral changes in in vivo model. (2013).
94. Prieto, M. J. *et al.* G4.5 Pamam Dendrimer-Risperidone: Biodistribution and Behavioral Changes in In Vivo Model. *J. Nanomedicine. Biotherapeutic Discov.* 04, 1–11 (2014).
95. Maiti, P. K., Çağın, T., Wang, G. & Goddard, W. A. Structure of PAMAM dendrimers: Generations 1 through 11. *Macromolecules* 37, 6236–6254 (2004).
96. Hawker, C. J. & Fréchet, J. M. J. Preparation of Polymers with Controlled Molecular Architecture. A New Convergent Approach to Dendritic Macromolecules. *J. Am. Chem. Soc.* 112, 7638–7647 (1990).
97. Kesharwani, P., Jain, K. & Jain, N. K. Dendrimer as nanocarrier for drug delivery. *Prog. Polym. Sci.* 39, 268–307 (2014).

98. Sowinska, M. & Urbanczyk-Lipkowska, Z. Advances in the chemistry of dendrimers. *New J. Chem.* 38, 2168–2203 (2014).
99. Fréchet, J. M. & Tomalia, D. A. *Dendrimers and Other Dendritic Polymers. Dendrimers and Other Dendritic Polymers* (2003). doi:10.1002/0470845821
100. Tomalia, D. A., Naylor, A. M. & Goddard, W. A. Starburst Dendrimers: Molecular-Level Control of Size, Shape, Surface Chemistry, Topology, and Flexibility from Atoms to Macroscopic Matter. *Angew. Chemie Int. Ed. English* 29, 138–175 (1990).
101. Yang, J., Zhang, Q., Chang, H. & Cheng, Y. Surface-Engineered Dendrimers in Gene Delivery. *Chem. Rev.* 115, 5274–5300 (2015).
102. Ammala, A. Biodegradable polymers as encapsulation materials for cosmetics and personal care markets. *Int. J. Cosmet. Sci.* 35, 113–124 (2013).
103. Qiao, Z. & Shi, X. Dendrimer-based molecular imaging contrast agents. *Progress in Polymer Science* 44, 1–27 (2015).
104. Reek, J. N. H., Arévalo, S., van Heerbeek, R., Kamer, P. C. J. & van Leeuwen, P. W. N. M. Dendrimers in Catalysis. *Adv. Catal.* 49, 71–151 (2006).
105. Menjoge, A. R., Kannan, R. M. & Tomalia, D. A. Dendrimer-based drug and imaging conjugates: design considerations for nanomedical applications. *Drug Discovery Today* 15, 171–185 (2010).
106. Sheikhpour, M., Barani, L. & Kasaeian, A. Biomimetics in drug delivery systems: A critical review. *J. Control. Release* 253, 97–109 (2017).
107. Eichman, J. D., Bielinska, A. U., Kukowska-Latallo, J. F. & Baker, J. R. The use of PAMAM dendrimers in the efficient transfer of genetic material into cells. *Pharm. Sci. Technol. Today* 3, 232–245 (2000).
108. Buczkowski, A., Olesinski, T., Zbicinska, E., Urbaniak, P. & Palecz, B. Spectroscopic and calorimetric studies of formation of the supramolecular complexes of PAMAM G5-NH₂ and G5-OH dendrimers with 5-fluorouracil in aqueous solution. *Int. J. Pharm.* 490, 102–111 (2015).
109. Kalomiraki, M., Thermos, K. & Chaniotakis, N. A. Dendrimers as tunable vectors of drug delivery systems and biomedical and ocular applications. *Int. J. Nanomedicine* 11, 1–12 (2015).
110. Najlah, M. & D'Emanuele, A. Synthesis of dendrimers and drug-dendrimer conjugates for drug delivery. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 10, 756–767 (2007).
111. Hsu, H. J., Bugno, J., Lee, S. R. & Hong, S. Dendrimer-based nanocarriers: a versatile platform for drug delivery. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology* 9, e1409 (2017).
112. Quintana, A. *et al.* Design and function of a dendrimer-based therapeutic nanodevice targeted to tumor cells through the folate receptor. *Pharm. Res.* 19, 1310–1316 (2002).
113. Lundquist, J. J. & Toone, E. J. The Cluster Glycoside Effect. *Chem. Rev.* 102, 555–578 (2002).
114. Bezouška, K. Design, functional evaluation and biomedical applications of carbohydrate dendrimers (glycodendrimers). *Rev. Mol. Biotechnol.* 90, 269–290 (2002).
115. Choudhary, S., Gupta, L., Rani, S., Dave, K. & Gupta, U. Impact of dendrimers on solubility of hydrophobic drug molecules. *Frontiers in Pharmacology* 8, 261 (2017).
116. Chen, W., Tomalia, D. A. & Thomas, J. L. Unusual pH-dependent polarity changes in PAMAM dendrimers: evidence for pH-responsive conformational changes. *Macromolecules* 33, 9169–9172 (2000).

117. Maiti, P. K., Çağın, T., Lin, S. T. & Goddard, W. A. Effect of solvent and pH on the structure of PAMAM dendrimers. *Macromolecules* 38, 979–991 (2005).
118. Chauhan, A. S. *et al.* Dendrimer-mediated transdermal delivery: Enhanced bioavailability of indomethacin. *J. Control. Release* 90, 335–343 (2003).
119. Ke, W., Zhao, Y., Huang, R., Jiang, C. & Pei, Y. Enhanced oral bioavailability of doxorubicin in a dendrimer drug delivery system. *J. Pharm. Sci.* 97, 2208–2216 (2008).
120. Patel, J., Basu, B., Dharamsi, A., Garala, K. & Raval, M. Solubility of aceclofenac in polyamidoamine dendrimer solutions. *Int. J. Pharm. Investig.* 1, 135 (2011).
121. Mohanty, C., Das, M. & Sahoo, S. K. Emerging role of nanocarriers to increase the solubility and bioavailability of curcumin. *Expert Opin. Drug Deliv.* 9, 1347–1364 (2012).
122. Mignani, S. *et al.* Can dendrimer based nanoparticles fight neurodegenerative diseases? Current situation versus other established approaches. *Prog. Polym. Sci.* 64, 23–51 (2017).
123. Nance, E. *et al.* Nanoscale effects in dendrimer-mediated targeting of neuroinflammation. *Biomaterials* 101, 96–107 (2016).
124. Sepúlveda-Crespo, D., Ceña-Díez, R., Jiménez, J. L. & Ángeles Muñoz-Fernández, M. Mechanistic Studies of Viral Entry: An Overview of Dendrimer-Based Microbicides As Entry Inhibitors Against Both HIV and HSV-2 Overlapped Infections. *Med. Res. Rev.* 37, 149–179 (2017).
125. Chen, C. Z. & Cooper, S. L. Interactions between dendrimer biocides and bacterial membranes. *Biomaterials* 23, 3359–3368 (2002).
126. Boas, U. & Heegaard, P. M. H. Dendrimers in drug research. *Chem. Soc. Rev.* 33, 43–63 (2004).
127. Chen, C. Z. *et al.* Quaternary ammonium functionalized poly(propylene imine) dendrimers as effective antimicrobials: Structure-activity studies. *Biomacromolecules* 1, 473–480 (2000).
128. Nagahori, N. *et al.* Inhibition of adhesion of type 1 fimbriated *Escherichia coli* to highly mannosylated ligands. *ChemBioChem* 3, 836–844 (2002).
129. Calabretta, M. K., Kumar, A., McDermott, A. M. & Cai, C. Antibacterial activities of poly(amidoamine) dendrimers terminated with amino and poly(ethylene glycol) groups. *Biomacromolecules* 8, 1807–1811 (2007).
130. Holmes, A. M., Heylings, J. R., Wan, K. W. & Moss, G. P. Antimicrobial efficacy and mechanism of action of poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers against opportunistic pathogens. *Int. J. Antimicrob. Agents* 53, 500–507 (2019).
131. Bourne, N. *et al.* Dendrimers, a new class of candidate topical microbicides with activity against herpes simplex virus infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 2471–2474 (2000).
132. Witvrouw, M. *et al.* Polyanionic (i.e., Polysulfonate) Dendrimers Can Inhibit the Replication of Human Immunodeficiency Virus by Interfering with Both Virus Adsorption and Later Steps (Reverse Transcriptase/Integrase) in the Virus Replicative Cycle. *Mol. Pharmacol.* 58, 1100–1108 (2018).
133. Rupp, R., Rosenthal, S. L. & Stanberry, L. R. VivaGel (SPL7013 Gel): a candidate dendrimer--microbicide for the prevention of HIV and HSV infection. *Int. J. Nanomedicine* 2, 561–6 (2007).
134. Klajnert, B., Sadowska, M. & Bryszewska, M. The effect of polyamidoamine dendrimers on human erythrocyte membrane acetylcholinesterase activity. *Bioelectrochemistry* 65, 23–26 (2004).
135. Shcharbin, D., Jokiel, M., Klajnert, B. & Bryszewska, M. Effect of dendrimers on pure acetylcholinesterase

- activity and structure. *Bioelectrochemistry* 68, 56–59 (2006).
136. Wasiak, T. *et al.* Phosphorus dendrimers affect Alzheimer's (A β 1-28) peptide and MAP-Tau protein aggregation. *Mol. Pharm.* 9, 458–469 (2012).
 137. Wasiak, T. *et al.* Cationic phosphorus dendrimers and therapy for Alzheimer's disease. *New J. Chem.* 39, 4852–4859 (2015).
 138. Klajnert, B., Cortijo-Arellano, M., Bryszewska, M. & Cladera, J. Influence of heparin and dendrimers on the aggregation of two amyloid peptides related to Alzheimer's and prion diseases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 339, 577–582 (2006).
 139. Patel, D. A., Henry, J. E. & Good, T. A. Attenuation of β -amyloid-induced toxicity by sialic-acid-conjugated dendrimers: Role of sialic acid attachment. *Brain Res.* 1161, 95–105 (2007).
 140. Milowska, K., Malachowska, M. & Gabryelak, T. PAMAM G4 dendrimers affect the aggregation of α -synuclein. *Int. J. Biol. Macromol.* (2011). doi:10.1016/j.ijbiomac.2011.02.021
 141. Durocher, I. & Girard, D. In vivo proinflammatory activity of generations 0–3 (G0–G3) polyamidoamine (PAMAM) nanoparticles. *Inflamm. Res.* (2016). doi:10.1007/s00011-016-0959-5
 142. Chauhan, A. S., Diwan, P. V., Jain, N. K. & Tomalia, D. A. Unexpected in vivo anti-inflammatory activity observed for simple, surface functionalized poly(amidoamine) dendrimers. *Biomacromolecules* 10, 1195–1202 (2009).
 143. Neibert, K. *et al.* 'Click' dendrimers as anti-inflammatory agents: With insights into their binding from molecular modeling studies. *Mol. Pharm.* 10, 2502–2508 (2013).
 144. Malik, N. *et al.* Dendrimers: Relationship between structure and biocompatibility in vitro, and preliminary studies on the biodistribution of 125I-labelled polyamidoamine dendrimers in vivo. *J. Control. Release* 65, 133–148 (2000).
 145. Bhadra, D., Bhadra, S., Jain, S. & Jain, N. K. A PEGylated dendritic nanoparticulate carrier of fluorouracil. *Int. J. Pharm.* 257, 111–124 (2003).
 146. Asthana, A., Chauhan, A. S., Diwan, P. V. & Jain, N. K. Poly(amidoamine) (PAMAM) dendritic nanostructures for controlled sitespecific delivery of acidic anti-inflammatory active ingredient. *AAPS PharmSciTech* 6, E536–E542 (2005).
 147. Domański, D. M., Klajnert, B. & Bryszewska, M. Influence of PAMAM dendrimers on human red blood cells. *Bioelectrochemistry* 63, 189–191 (2004).
 148. Dufès, C., Uchegbu, I. F. & Schätzlein, A. G. Dendrimers in gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 2177–2202 (2005).
 149. Wiwattanapatapee, R., Carreño-Gómez, B., Malik, N. & Duncan, R. Anionic PAMAM dendrimers rapidly cross adult rat intestine in vitro: A potential oral delivery system? *Pharm. Res.* 17, 991–998 (2000).
 150. Jevprasesphant, R., Penny, J., Attwood, D. & D'Emanuele, A. Transport of dendrimer nanocarriers through epithelial cells via the transcellular route. *J. Control. Release* 97, 259–267 (2004).
 151. Perumal, O. P., Inapagolla, R., Kannan, S. & Kannan, R. M. The effect of surface functionality on cellular trafficking of dendrimers. *Biomaterials* (2008). doi:10.1016/j.biomaterials.2008.04.038
 152. Zhang, J. *et al.* The cellular uptake mechanism, intracellular transportation, and exocytosis of polyamidoamine dendrimers in multidrug-resistant breast cancer cells. *Int. J. Nanomedicine* 11, 3677–3690 (2016).

153. Prieto, M. J. *et al.* Nanomolar cationic dendrimeric sulfadiazine as potential antitoxoplasmic agent. *Int. J. Pharm.* 326, 160–168 (2006).
154. King Heiden, T. C., Dengler, E., Kao, W. J., Heideman, W. & Peterson, R. E. Developmental toxicity of low generation PAMAM dendrimers in zebrafish. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 225, 70–79 (2007).
155. Oliveira, E. *et al.* Transcriptomic response of zebrafish embryos to polyaminoamine (PAMAM) dendrimers. *Nanotoxicology* 8, 92–99 (2014).
156. Pryor, J. B., Harper, B. J. & Harper, S. L. Comparative toxicological assessment of PAMAM and thiophosphoryl dendrimers using embryonic zebrafish. *Int. J. Nanomedicine* 9, 1947–1956 (2014).
157. Bodewein, L. *et al.* Differences in toxicity of anionic and cationic PAMAM and PPI dendrimers in zebrafish embryos and cancer cell lines. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 305, 83–92 (2016).
158. Calienni, M. N. *et al.* Nanotoxicological and teratogenic effects: A linkage between dendrimer surface charge and zebrafish developmental stages. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 337, 1–11 (2017).
159. Tajarobi, F., El-Sayed, M., Rege, B. D., Polli, J. E. & Ghandehari, H. Transport of poly amidoamine dendrimers across Madin-Darby canine kidney cells. *Int. J. Pharm.* 215, 263–267 (2001).
160. Lee, H. & Larson, R. G. Lipid bilayer curvature and pore formation induced by charged linear polymers and dendrimers: The effect of molecular shape. *J. Phys. Chem. B* 112, 12279–12285 (2008).
161. Mignani, S., El Kazzouli, S., Bousmina, M. & Majoral, J. P. Expand classical drug administration ways by emerging routes using dendrimer drug delivery systems: A concise overview. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65, 1316–1330 (2013).
162. Padilla De Jesús, O. L., Ihre, H. R., Gagne, L., Fréchet, J. M. J. & Szoka, F. C. Polyester dendritic systems for drug delivery applications: In vitro and in vivo evaluation. *Bioconjug. Chem.* 13, 453–461 (2002).
163. El-Sayed, M., Ginski, M., Rhodes, C. & Ghandehari, H. Transepithelial transport of poly(amidoamine) dendrimers across Caco-2 cell monolayers. *J. Control. Release* 81, 355–365 (2002).
164. El-Sayed, M., Rhodes, C. A., Ginski, M. & Ghandehari, H. Transport mechanism(s) of poly (amidoamine) dendrimers across Caco-2 cell monolayers. *Int. J. Pharm.* 265, 151–157 (2003).
165. Kitchens, K. M., Kolhatkar, R. B., Swaan, P. W., Eddington, N. D. & Ghandehari, H. Transport of poly(amidoamine) dendrimers across Caco-2 cell monolayers: Influence of size, charge and fluorescent labeling. *Pharm. Res.* 23, 2818–2826 (2006).
166. Kolhatkar, R. B., Swaan, P. & Ghandehari, H. Potential oral delivery of 7-ethyl-10-hydroxy-camptothecin (SN-38) using poly(amidoamine) dendrimers. *Pharm. Res.* 25, 1723–1729 (2008).
167. Tripathi, P. K. *et al.* Dendrimer grafts for delivery of 5-fluorouracil. *Pharmazie* 57, 261–264 (2002).
168. Yiyun, C. *et al.* Transdermal delivery of nonsteroidal anti-inflammatory drugs mediated by polyamidoamine (PAMAM) dendrimers. *J. Pharm. Sci.* 96, 595–602 (2007).
169. Venuganti, V. V. K. & Perumal, O. P. Effect of poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimer on skin permeation of 5-fluorouracil. *Int. J. Pharm.* 361, 230–238 (2008).
170. Dong, Z., Katsumi, H., Sakane, T. & Yamamoto, A. Effects of polyamidoamine (PAMAM) dendrimers on the nasal absorption of poorly absorbable drugs in rats. *Int. J. Pharm.* 393, 245–253 (2010).
171. Katare, Y. K. *et al.* Brain Targeting of a Water Insoluble Antipsychotic Drug Haloperidol via the Intranasal Route Using PAMAM Dendrimer. *Mol. Pharm.* 12, 3380–3388 (2015).
172. Win-Shwe, T. T. *et al.* Effects of PAMAM dendrimers in the mouse brain after a single intranasal

- instillation. *Toxicol. Lett.* 228, 207–215 (2014).
173. Albertazzi, L. *et al.* In vivo distribution and toxicity of PAMAM dendrimers in the central nervous system depend on their surface chemistry. *Mol. Pharm.* 10, 249–260 (2013).
174. Srinageshwar, B. *et al.* PAMAM dendrimers cross the blood–brain barrier when administered through the carotid artery in C57BL/6J mice. *International Journal of Molecular Sciences* 18, (2017).
175. Berthomieu, C. & Hienerwadel, R. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *Photosynth. Res.* 101, 157–170 (2009).
176. Jackson, M. & Mantsch, H. H. The use and misuse of FTIR spectroscopy in the determination of protein structure. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30, 95–120 (1995).
177. Igartúa, D. E., Martínez, C. S., Temprana, C. F., Alonso, S. del V. & Prieto, M. J. PAMAM dendrimers as a carbamazepine delivery system for neurodegenerative diseases: A biophysical and nanotoxicological characterization. *Int. J. Pharm.* 544, 191–202 (2018).
178. Igartúa, D. E. *et al.* Development of Nutraceutical Emulsions as Risperidone Delivery Systems: Characterization and Toxicological Studies. *J. Pharm. Sci.* 104, 4142–4152 (2015).
179. Tremblay, R. G. *et al.* Differentiation of mouse Neuro 2A cells into dopamine neurons. *J. Neurosci. Methods* 186, 60–67 (2010).
180. Park, S. J. *et al.* Emodin induces neurite outgrowth through PI3K/Akt/GSK-3 β -mediated signaling pathways in Neuro2a cells. *Neurosci. Lett.* 588, 101–107 (2015).
181. Biswas, J. *et al.* Streptozotocin Induced Neurotoxicity Involves Alzheimer's Related Pathological Markers: a Study on N2A Cells. *Mol. Neurobiol.* 53, 2794–2806 (2016).
182. Huang, X. *et al.* The Prenylflavonoid xanthohumol reduces Alzheimer-Like changes and modulates multiple pathogenic molecular pathways in the Neuro2a/APP swe cell model of AD. *Frontiers in Pharmacology* 9, 199 (2018).
183. Kueng, W., Silber, E. & Eppenberger, U. Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Anal. Biochem.* 182, 16–19 (1989).
184. Gillies, R. J., Didier, N. & Denton, M. Determination of cell number in monolayer cultures. *Anal. Biochem.* 159, 109–113 (1986).
185. Gasparri, J., Speroni, L., Chiamoni, N. S. & Valle Alonso, S. Del. Relationship between the adjuvant and cytotoxic effects of the positive charges and polymerization in liposomes. *J. Liposome Res.* 21, 124–133 (2011).
186. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63 (1983).
187. Borenfreund, E. & Puerner, J. A. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol. Lett.* 24, 119–124 (1985).
188. Feas, D. A. *et al.* Nutraceutical emulsion containing valproic acid (NE-VPA): a drug delivery system for reversion of seizures in zebrafish larvae epilepsy model. *J. Pharm. Investig.* 47, 429–437 (2017).
189. Igartúa, D. E. *et al.* Folic acid magnetic nanotheranostics for delivering doxorubicin: Toxicological and biocompatibility studies on Zebrafish embryo and larvae. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 358, 23–34 (2018).
190. Prieto, M. J., Gutierrez, H. C., Arévalo, R. A., Chiamoni, N. S. & Alonso, S. del V. Effect of Risperidone and Fluoxetine on the Movement and Neurochemical Changes of Zebrafish. *Open J. Med. Chem.* 02,

- 129–138 (2012).
191. Selderslaghs, I. W. T., Hooyberghs, J., Blust, R. & Witters, H. E. Assessment of the developmental neurotoxicity of compounds by measuring locomotor activity in zebrafish embryos and larvae. *Neurotoxicol. Teratol.* 37, 44–56 (2013).
 192. Berghmans, S. *et al.* Zebrafish based assays for the assessment of cardiac, visual and gut function - potential safety screens for early drug discovery. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 58, 59–68 (2008).
 193. He, J. H. *et al.* A zebrafish phenotypic assay for assessing drug-induced hepatotoxicity. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 67, 25–32 (2013).
 194. Budini, M., Buratti, E., Morselli, E. & Criollo, A. Autophagy and Its Impact on Neurodegenerative Diseases: New Roles for TDP-43 and C9orf72. *Front. Mol. Neurosci.* (2017). doi:10.3389/fnmol.2017.00170
 195. Hidvegi, T. *et al.* An autophagy-enhancing drug promotes degradation of mutant α 1-antitrypsin Z and reduces hepatic fibrosis. *Science* (80-.). (2010). doi:10.1126/science.1190354
 196. Banerjee, R., Beal, M. F. & Thomas, B. Autophagy in neurodegenerative disorders: Pathogenic roles and therapeutic implications. *Trends Neurosci.* 33, 541–549 (2010).
 197. Williams, A. *et al.* Novel targets for Huntington's disease in an mTOR-independent autophagy pathway. *Nat. Chem. Biol.* (2008). doi:10.1038/nchembio.79
 198. Zhang, L. *et al.* Evaluating the Effectiveness of GTM-1, Rapamycin, and Carbamazepine on Autophagy and Alzheimer Disease. *Med. Sci. Monit.* (2017). doi:10.12659/msm.898679
 199. Brewster, M. E., Anderson, W. R., Estes, K. S. & Bodor, N. Development of aqueous parenteral formulations for carbamazepine through the use of modified cyclodextrins. *J. Pharm. Sci.* 80, 380–383 (1991).
 200. Hemenway, J. N. *et al.* Preparation and physicochemical characterization of a novel water-soluble prodrug of carbamazepine. *J. Pharm. Sci.* 99, 1810–1825 (2010).
 201. Martins, R. M., Siqueira, S., Tacon, L. A. & Freitas, L. A. P. Microstructured ternary solid dispersions to improve carbamazepine solubility. *Powder Technol.* 215, 156–165 (2012).
 202. El-Zein, H., Riad, L. & El-Bary, A. A. Enhancement of carbamazepine dissolution: in vitro and in vivo evaluation. *Int. J. Pharm.* 168, 209–220 (1998).
 203. Gavini, E. *et al.* Nasal administration of carbamazepine using chitosan microspheres: in vitro/in vivo studies. *Int. J. Pharm.* 307, 9–15 (2006).
 204. Kobayashi, Y., Ito, S., Itai, S. & Yamamoto, K. Physicochemical properties and bioavailability of carbamazepine polymorphs and dihydrate. *Int. J. Pharm.* 193, 137–146 (2000).
 205. Serralheiro, A., Alves, G., Fortuna, A. & Falcão, A. Intranasal administration of carbamazepine to mice : A direct delivery pathway for brain targeting. *Eur. J. Pharm. Sci.* 60, 32–39 (2014).
 206. Alrashood, S. T. Carbamazepine. in *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology* 41, 133–321 (Elsevier, 2016).
 207. Jiao, Z., Zhong, M. kang, Shi, X. jin, Hu, M. & Zhang, J. hua. Population pharmacokinetics of carbamazepine in Chinese epilepsy patients. *Ther. Drug Monit.* 25, 279–286 (2003).
 208. Rezaei, Z., Hemmateenejad, B., Khabnadideh, S. & Gorgin, M. Simultaneous spectrophotometric determination of carbamazepine and phenytoin in serum by PLS regression and comparison with HPLC.

- Talanta* 65, 21–28 (2005).
209. Kong, S. T. *et al.* Clinical Validation and Implications of Dried Blood Spot Sampling of Carbamazepine, Valproic Acid and Phenytoin in Patients with Epilepsy. *PLoS One* 9, e108190 (2014).
210. A.W.C., Y. *et al.* Erythrocyte and plasma fatty acid profiles in patients with epilepsy: Does carbamazepine affect omega-3 fatty acid concentrations? *Epilepsy Behav.* 12, 317–323 (2008).
211. Milović, M., Djuriš, J., Djekić, L., Vasiljević, D. & Ibrić, S. Characterization and evaluation of solid self-microemulsifying drug delivery systems with porous carriers as systems for improved carbamazepine release. *Int. J. Pharm.* 436, 58–65 (2012).
212. Wu, T. K., Lin, S. Y., Lin, H. L. & Huang, Y. T. Simultaneous DSC-FTIR microspectroscopy used to screen and detect the co-crystal formation in real time. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 21, 3148–3151 (2011).
213. Popescu, M. C. *et al.* Characterization by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) and 2D IR correlation spectroscopy of PAMAM dendrimer. *J. Phys. Chem. B* 110, 14198–14211 (2006).
214. Prajapati, R. N., Tekade, R. K., Gupta, U., Gajbhiye, V. & Jain, N. K. Dendrimer-mediated solubilization, formulation development and in vitro-in vivo assessment of piroxicam. *Mol. Pharm.* 6, 940–950 (2009).
215. Röhricht, M., Krisam, J., Weise, U., Kraus, U. R. & Düring, R. A. Elimination of carbamazepine, diclofenac and naproxen from treated wastewater by nanofiltration. *Clean - Soil, Air, Water* 37, 638–641 (2009).
216. Devarakonda, B., Otto, D. P., Judefeind, A., Hill, R. A. & de Villiers, M. M. Effect of pH on the solubility and release of furosemide from polyamidoamine (PAMAM) dendrimer complexes. *Int. J. Pharm.* 345, 142–153 (2007).
217. Pande, S. & Crooks, R. M. Analysis of poly(amidoamine) dendrimer structure by UV-Vis spectroscopy. *Langmuir* 27, 9609–9613 (2011).
218. Prieto, M. J. *et al.* Optimization and in vivo toxicity evaluation of g4.5 pamam dendrimer-risperidone complexes. *PLoS One* 9, e90393 (2014).
219. Sobotka, J. L., Alexander, B. & Cook, B. L. A review of carbamazepine's hematologic reactions and monitoring recommendations. *DICP, Ann. Pharmacother.* 24, 1214–1219 (1990).
220. Stroink, A. R., Skillrud, D. M., Kiely, J. M. & Sundt, T. M. Carbamazepine-induced hemolytic anemia. *Acta Haematol.* 72, 346–348 (1984).
221. Yamamoto, M. *et al.* Carbamazepine-Induced Hemolytic and Aplastic Crises Associated with Reduced Glutathione Peroxidase Activity of Erythrocytes. *Int. J. Hematol.* 86, 325–328 (2007).
222. Mukherjee, S. P., Lyng, F. M., Garcia, A., Davoren, M. & Byrne, H. J. Mechanistic studies of in vitro cytotoxicity of poly(amidoamine) dendrimers in mammalian cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 248, 259–268 (2010).
223. Vert, M. *et al.* Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure Appl. Chem.* 84, 377–410 (2012).
224. Jarrott, B. Tacrine: In vivo veritas. *Pharmacol. Res.* 116, 29–31 (2017).
225. Vetkin, D. O. *et al.* Study of cholinesterase active site using a fluorescent probe. *Biol. Bull.* 31, 121–125 (2004).
226. Wilson, B. *et al.* Chitosan nanoparticles as a new delivery system for the anti-Alzheimer drug tacrine. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 6, 144–152 (2010).
227. Summers, W. K. Tacrine (THA, Cognex®). *J. Alzheimer's Dis.* 2, 85–94 (2000).

228. Qian, S., Wo, S. K. & Zuo, Z. Pharmacokinetics and brain dispositions of tacrine and its major bioactive monohydroxylated metabolites in rats. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 61, 57–63 (2012).
229. Hartvig, P., Askmark, H., Aquilonius, S. M., Wiklund, L. & Lindström, B. Clinical pharmacokinetics of intravenous and oral 9-amino-1, 2, 3, 4-tetrahydroacridine, tacrine. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 38, 259–263 (1990).
230. Madden, S., Spaldin, V. & Park, B. K. Clinical pharmacokinetics of tacrine. *Clin. Pharmacokinet.* 28, 449–457 (1995).
231. Sathyan, G., Ritschel, W. A. & Hussain, A. S. Transdermal delivery of tacrine: I. Identification of a suitable delivery vehicle. *Int. J. Pharm.* 114, 75–83 (1995).
232. Luppi, B. *et al.* Albumin nanoparticles carrying cyclodextrins for nasal delivery of the anti-Alzheimer drug tacrine. *Eur. J. Pharm. Sci.* 44, 559–565 (2011).
233. Patocka, J., Jun, D. & Kuca, K. Possible role of hydroxylated metabolites of tacrine in drug toxicity and therapy of Alzheimer's disease. *Curr. Drug Metab.* 9, 332–335 (2008).
234. Xie, S.-S., Wang, X.-B., Li, J.-Y., Yang, L. & Kong, L.-Y. Design, synthesis and evaluation of novel tacrine–coumarin hybrids as multifunctional cholinesterase inhibitors against Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.* 64, 540–553 (2013).
235. Li, G. *et al.* Synthesis and activity towards Alzheimer's disease in vitro: Tacrine, phenolic acid and ligustrazine hybrids. *Eur. J. Med. Chem.* 148, 238–254 (2018).
236. Kankkunen, T., Sulkava, R., Vuorio, M., Kontturi, K. & Hirvonen, J. Transdermal iontophoresis of tacrine in vivo. *Pharm. Res.* 19, 705–708 (2002).
237. Patel, N., Jain, S. & Lin, S. Transdermal iontophoretic delivery of tacrine hydrochloride: Correlation between In vitro permeation and In vivo performance in rats. *Int. J. Pharm.* 513, 393–403 (2016).
238. Jogani, V. V., Shah, P. J., Mishra, P., Mishra, A. K. & Misra, A. R. Intranasal mucoadhesive microemulsion of tacrine to improve brain targeting. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 22, 116–124 (2008).
239. Agrawal, M. *et al.* Recent advancements in the field of nanotechnology for the delivery of anti-Alzheimer drug in the brain region. *Expert Opin. Drug Deliv.* 15, 589–617 (2018).
240. Freeman, S. E. & Dawson, R. M. Tacrine: A pharmacological review. *Prog. Neurobiol.* 36, 257–277 (1991).
241. Patel, N., Jain, S., Madan, P. & Lin, S. Influence of electronic and formulation variables on transdermal iontophoresis of tacrine hydrochloride. *Pharm. Dev. Technol.* 20, 442–457 (2015).
242. Sorrenti, M. *et al.* Solid-state characterization of tacrine hydrochloride. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 63, 53–61 (2012).
243. Vihola, H., Laukkanen, A., Hirvonen, J. & Tenhu, H. Binding and release of drugs into and from thermosensitive poly(N-vinyl caprolactam) nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Sci.* 16, 69–74 (2002).
244. Ford, J. M., Truman, C. A., Wilcock, G. K. & Roberts, C. J. C. Serum concentrations of tacrine hydrochloride predict its adverse effects in Alzheimer's disease. *Clin. Pharmacol. Ther.* 53, 691–695 (1993).
245. Markatou, E. *et al.* Molecular interactions between dimethoxycurcumin and Pamam dendrimer carriers. *Int. J. Pharm.* 339, 231–236 (2007).
246. Mukhopadhyay, C. Das, Ruidas, B. & Chaudhury, S. S. Role of Curcumin in Treatment of Alzheimer

- Disease. *Int. J. Neurorehabilitation* 04, 281–2376 (2017).
247. Shen, L. & Ji, H. F. Theoretical study on physicochemical properties of curcumin. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 67, 619–623 (2007).
248. Jagannathan, R., Abraham, P. M. & Poddar, P. Temperature-dependent spectroscopic evidences of curcumin in aqueous medium: A mechanistic study of its solubility and stability. *J. Phys. Chem. B* 116, 14533–14540 (2012).
249. Khopde, S. M., Indira Priyadarsini, K., Palit*, D. K. & Mukherjee, T. Effect of Solvent on the Excited-state Photophysical Properties of Curcumin. *Photochem. Photobiol.* 72, 625–631 (2000).
250. Cao, J., Zhang, H., Wang, Y., Yang, J. & Jiang, F. Investigation on the interaction behavior between curcumin and PAMAM dendrimer by spectral and docking studies. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 108, 251–255 (2013).
251. Boruah, B., Saikia, P. M. & Dutta, R. K. Binding and stabilization of curcumin by mixed chitosan-surfactant systems: A spectroscopic study. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 245, 18–27 (2012).
252. Dutta, A. *et al.* Stabilization of diketo tautomer of curcumin by premicellar anionic surfactants: UV-Visible, fluorescence, tensiometric and TD-DFT evidences. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 104, 150–157 (2013).
253. Manolova, Y. *et al.* The effect of the water on the curcumin tautomerism: A quantitative approach. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 132, 815–820 (2014).
254. Altunbas, A., Lee, S. J., Rajasekaran, S. A., Schneider, J. P. & Pochan, D. J. Encapsulation of curcumin in self-assembling peptide hydrogels as injectable drug delivery vehicles. *Biomaterials* 32, 5906–5914 (2011).
255. Lin, C.-F., Yu, K.-H., Jheng, C.-P., Chung, R. & Lee, C.-I. Curcumin Reduces Amyloid Fibrillation of Prion Protein and Decreases Reactive Oxidative Stress. *Pathogens* 2, (2013).
256. Shi, W. *et al.* Synthesis of monofunctional curcumin derivatives, clicked curcumin dimer, and a PAMAM dendrimer curcumin conjugate for therapeutic applications. *Org. Lett.* 9, 5461–5464 (2007).
257. Wu, J.-Y., Lin, C.-Y., Lin, T.-W., Ken, C.-F. & Wen, Y.-D. Curcumin Affects Development of Zebrafish Embryo. *Biol. Pharm. Bull.* 30, 1336–1339 (2007).
258. Sun, M. *et al.* Advances in nanotechnology-based delivery systems for curcumin. *Nanomedicine* 7, 1085–1100 (2012).
259. Hamaguchi, T., Ono, K. & Yamada, M. Curcumin and Alzheimer's disease. *CNS Neurosci. Ther.* 16, 285–297 (2010).
260. Wang, L. *et al.* Encapsulation of curcumin within poly(amidoamine) dendrimers for delivery to cancer cells. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 24, 2137–2144 (2013).
261. Fu, Y. *et al.* Dendritic nanoconjugate containing optimum folic acid for targeted intracellular curcumin delivery. *RSC Adv.* 4, 46020–46023 (2014).
262. Debnath, S. *et al.* Dendrimer-Curcumin Conjugate: A Water Soluble and Effective Cytotoxic Agent Against Breast Cancer Cell Lines. *Anticancer. Agents Med. Chem.* 13, 1531–1539 (2013).
263. Wang, Y. J. *et al.* Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15, 1867–1876 (1997).
264. Abderrezak, A., Bourassa, P., Mandeville, J.-S., Sedaghat-Herati, R. & Tajmir-Riahi, H.-A. Dendrimers

- Bind Antioxidant Polyphenols and cisPlatin Drug. *PLoS One* 7, e33102 (2012).
265. Rohman, A., . S., . D., Ramadhani, D. & Nugroho, A. Analysis of Curcumin in *Curcuma longa* and *Curcuma xanthorrhiza* Using FTIR Spectroscopy and Chemometrics. *Res. J. Med. Plant* 9, 179–186 (2015).
266. Yallapu, M. M., Ebeling, M. C., Chauhan, N., Jaggi, M. & Chauhan, S. C. Interaction of curcumin nanoformulations with human plasma proteins and erythrocytes. *Int. J. Nanomedicine* 6, 2779–2790 (2011).
267. Ganiger, S. *et al.* A two generation reproductive toxicity study with curcumin, turmeric yellow, in Wistar rats. *Food Chem. Toxicol.* 45, 64–69 (2007).
268. Gao, X. P. *et al.* Toxicity assessment of 7 anticancer compounds in zebrafish. *Int. J. Toxicol.* 33, 98–105 (2014).



Agradecimientos

“Dicen que antes de entrar en el mar, el río tiembla de miedo. Mira para atrás todo el camino recorrido, las cumbres, las montañas, el largo y sinuoso camino abierto a través de las selvas y poblados, y ve frente a sí un océano tan grande, que entrar en él solo puede significar desaparecer para siempre (...).” Así comienza una de las reflexiones con la que me siento identificada en este momento. Inevitable no pensar en el camino recorrido, en todas las personas que me acompañaron de una u otra manera, así como inevitable no rememorar los buenos y malos momentos, las altas y bajas; pero decisión propia quedarme con lo mejor de cada uno, elegir ver el lado bueno y los momentos atravesados por risas (y chocolate o golosinas jaja). Muchas cosas cambiaron desde el comienzo de este recorrido, allá por el 2015, cuando arrancaba el doctorado, que implicaron el crecimiento profesional pero también, y sobre todo, el personal. Estoy sumamente agradecida a la vida por estar hoy, en este momento, escribiendo esto.

En primer lugar, quiero agradecer a mi querida Universidad Nacional de Quilmes (UNQ), lugar que me dio la posibilidad de estudiar y de trabajar, de formarme en el ámbito profesional. Al Departamento de Ciencia y Tecnología (DCyT), que es donde desempeñé mis actividades día a día y gracias al cual comencé a desarrollar mi faceta docente. Gracias a todas las personas de otros laboratorios, del pasillo, de secretaria, de administración, del comedor... por siempre estar listos para ayudarme, explicarme cómo usar un equipo, darme algún reactivo o simplemente compartir un hola y una sonrisa. Gracias por su amabilidad y calidez. Además, gracias al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por otorgarme la beca de doctorado con la que pude sustentar este camino.

Gracias Silvia por abrirme las puertas del hoy Laboratorio de Bio-Nanotecnología (LBN) y aceptarme con una sonrisa, por darme ideas para los ensayos y siempre estar predispuesta a trabajar. Gracias Jime por darme la oportunidad de realizar este doctorado, por todos los consejos y por acompañarme en el proceso; aunque no fueron las mejores circunstancias de vida, sé que ambas hicimos lo mejor que pudimos; admiro tu capacidad de siempre seguir adelante. Gracias Nanu por actuar de mediadora y salvavidas, por darte el tiempo de leer este trabajo, admiro tu capacidad de siempre ver el lado bueno de las cosas. Gracias especiales a Caro, que llegó a mi vida con el comienzo de este doctorado y espero se quede por mucho más, gracias por tu amistad, por las charlas infinitas, y por todos los consejos profesionales y personales; admiro tu temple y capacidad de encontrar las palabras justas para decir las cosas. Gracias a todos mis compañeros del LBN, viejos y nuevos, por siempre tener un mate listo para compartir y alguna serie/película para debatir. Gracias Jorge, Fernando, Silvia A., Naty, Ian, Aye, Nico, David, Dani M., Sofi, Gise,

Ceci, Lore y Ale!!. Gracias a los que pasaron y ya no están. Gracias a las pi´ del box, Maca, Dani F., y Caro, por el tiempo compartido, por sacarme una sonrisa, por musicalizar las mañanas, por compartir muchas golosinas, sopitas y mates, hicieron mucho en estos años, lo saben.

Gracias al Dr. Valverde por ser mi consejero en este camino y las personas de su laboratorio por prestarme el microscopio óptico para realizar las micrografías de los glóbulos rojos. Gracias al personal del IMBICE por donarnos las células utilizadas en este trabajo y por todos los consejos intercambiados sobre cómo mantenerlas y congelarlas. Gracias también al Laboratorio de Inmunología y Virología por prestarme el lector de microplacas. En particular, gracias a Facu por siempre estar bien predispueto a compartir un café y alguna golosina, gracias por tu apoyo científico y personal.

Saliendo del ámbito laboratoril e ingresando al docente, gracias especiales a Pau, por estos años compartidos en Química general y Química de los Alimentos, gracias por todas las enseñanzas, por ser el modelo de docente que quiero ser, por siempre estar cambiando todo, incentivando la reflexión y el avance; gracias también por el acompañamiento fuera de las clases, por las meriendas y los consejos. Gracias por presentarme al LIFTA, donde pretendo seguir formándome como profesional. Gracias también a mis compañeros del Espacio de Acompañamiento por Asignaturas Bimodales, Mabel, Lucas y Ale, por todo el laburo que hemos realizado hasta ahora y por lo que nos queda, por darme otra mirada más allá de la investigación que podemos realizar dentro del laboratorio. Además, gracias a todos los integrantes de la Secretaría del DCyT por siempre estar bien dispuestos a trabajar juntos.

Cambiando y yendo para el lado más personal, quiero agradecer a mi familia por su apoyo incondicional. A mis papas que me apoyan y acompañar a pesar de que aún, después de 5 años de licenciatura en biotecnología y 5 años de doctorado, se preguntan qué es lo que estudio y lo que hago. Gracias a ambos por siempre estar ahí, por enseñarme que todo lo que uno quiere se puede conseguir, que sólo hay que esforzarse, trabajar y tener confianza. Gracias por todos los valores que me enseñaron, por enseñarme con su ejemplo. Gracias por criarnos independientes, por ponerse felices al vernos crecer. Y gracias por fabricar a Vane Jajaja. Gracias a vos hermanita, que suerte que papa y mama decidieron darme una persona con quien compartir la vida, que bueno saber que siempre vamos a caminar juntas. Gracias por todo, por estar en lo bueno y en lo malo, por ser como sos; admiro tu sinceridad y capacidad de ver las cosas siempre de otro modo.

Gracias a la vida por poner a Mau en mi camino. Gracias Mau por ser quien me acompaña hace casi diez años y con quien espero compartir todo lo que quede de acá en adelante. No tengo palabras para agradecerte todos estos años de amor y felicidad, de buena compañía, de paz.

Gracias por formar un hogar y una familia conmigo, gracias por hacerme parte de tu familia. Graciaaaaaaas infinitas!

Gracias a toda mi familia, que sigue y sigue creciendo, a mi abuela, mis tíos, mis primos, mis sobri-primos, mis suegros, mi cuña, mi banda dominguera. Gracias a todos por aceptarme como soy, por entender mis ausencias y siempre esperarme con una sonrisa bien grande y un abrazo bien fuerte. Son lo mejor de mí.

Gracias a mis amigas y amigos por todos estos años compartidos. Gracias a mis hermanas de la vida, Belenchu y Yani, que me acompañan desde pequeñas, espero llegar a viejitas a su lado. Gracias Belenchu por todo, de la mano siempre. Gracias Yani por ser mi amiga del pupo a la eternidad, no dejes de perseguir tus sueños. Gracias a mi jean claude querido, gracias Meli, Aylu, Ale, Picho, Belenchu y Vane, por todas las juntadas, comilonas, salidas, charlas, por siempre estar ahí atentas a todo, dispuestas a todo. Siempre suman positivo en mi balanza, espero darles al menos la mitad de todo lo que ustedes me dan a mí. A mis amigos, Agus, Juli, Juancito, Javi, Pikilin y sus familias, siempre llenando mis fines de semana de buenos momentos y de anécdotas para contar, algún día, a nuestros mil hijos todos re locos como nosotros. Gracias a las amigas que me dejo la facu, gracias Dani, Giu, Flor y Flor; gracias por las reuniones dos veces al año que me demuestran que la distancia no cambia nada, que siempre van a estar ahí. A todos mis amigos que mencioné hasta ahora, gracias por cada momento! Gracias por enseñarme a reírme de mí, gracias por ser como son. Hace más de 10 años que los tengo en mi vida, desde los 20 cuando solo pensamos en salir de joda, que dormíamos en el piso en un departamento en San Bernardo o amuchadas en un sillón en Mar del Plata, y ahora con casi 30, cada uno con su vida, su familia, y sus historias vividas... Gracias por dejarme ser parte, espero amigos que sigamos creciendo juntos!

La frase terminaba diciendo *"(...) Solamente entrando en el océano se diluirá el miedo, porque solo entonces sabrá el río que no se trata de desaparecer en el océano, sino de convertirse en océano"*. Así que, allá vamos...

¡Gracias a todos!

