



Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Ciencias Químicas  
Programa de Doctorado en Ciencias c/m en Química

**Efecto de la modificación superficial de dendrímeros  
PAMAM en la cinética plasmática y formación de complejos  
con aplicación farmacológica**

Tesis para optar al grado de Doctora en Ciencias c/m Química

CAROLA FERNANDA DÍAZ GÓMEZ  
CONCEPCIÓN-CHILE  
DICIEMBRE, 2018

Profesor Guía: Dr. Joel Alderete Triviños  
Dpto. de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad de Concepción

Profesor Co-Guía: Dr. Gonzalo Yévenes Crisóstomo  
Dpto. de Fisiología, Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

## AGRADECIMIENTOS

---

Esta investigación doctoral agradece su financiamiento al proyecto FONDECYT 1170426 y a la beca CONICYT 21141008 por su manutención.

Al departamento de Fisiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción por su colaboración en los experimentos en células y animales realizados en el transcurso de esta tesis.

A Carolina Benítez, veterinaria, por asegurar que el trabajo con animales cumpliera todos los estándares éticos y se realizaran en condiciones dignas, libres de crueldad.

Al Programa de Postgrado en Química de la Facultad de Ciencias Químicas y a la Dirección de Postgrado de la Universidad de Concepción.

## GUÍA DE CONTENIDO

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	i
ÍNDICE DE TABLAS .....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS .....	v
SIMBOLOGÍA .....	vii
<b>RESUMEN</b> .....	viii
<b>ABSTRACT</b> .....	x
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>NANOMATERIALES</b> .....	1
DENDRÍMEROS .....	5
<b>CÁNCER</b> .....	15
PÉPTIDOS COMO POTENCIAL HERRAMIENTA CONTRA EL CÁNCER .....	18
PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN .....	25
HIPÓTESIS .....	30
OBJETIVO .....	31
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
<b>METODOLOGÍA</b> .....	32
<b>SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE SISTEMAS NANOTRANSPORTADORES BASADOS EN DENDRÍMEROS PAMAM DE CUARTA GENERACIÓN</b> .....	33
<b>SÍNTESIS DE SISTEMA NANOTRANSPORTADOR PAMAM CONJUGADO CON ÁCIDO FÓLICO (PAMAM-FA)</b> .....	33
<b>SÍNTESIS DE SISTEMA NANOTRANSPORTADOR PAMAM CONJUGADO CON POLIETILENGLICOL (PAMAM-PEG)</b> .....	34
<b>CONJUGACIÓN DE FITC A PAMAM, PAMAM-FA Y PAMAM-PEG</b> .....	36
<b>ESTUDIO DE VIABILIDAD CELULAR DE LOS NANOTRANSPORTADORES</b> .....	37
<b>ANÁLISIS DE LA CINÉTICA PLASMÁTICA DE DENDRÍMEROS PAMAM Y EL EFECTO DE SU MODIFICACIÓN SUPERFICIAL</b> .....	38
<b>EFFECTO DE LA MODIFICACIÓN SUPERFICIAL DE DENDRÍMEROS PAMAM SOBRE EL EFECTO ANTIPROLIFERATIVO COMBINADO DE OCTREÓTIDO Y METOTREXATO</b> .....	40
<b>ESTUDIO DE FLUORESCENCIA ENTRE OCTREÓTIDO Y DENDRÍMEROS PAMAM FUNCIONALIZADOS</b> .....	40

ANÁLISIS DE LA ACCIÓN ANTIPROLIFERATIVA DE LOS COMPLEJOS PAMAM-OCT-MTX <i>IN VITRO</i> EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER .....	42
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	44
SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS SISTEMAS NANOTRANSPORTADORES BASADOS EN PAMAM-G4 CON POLIETILENGLICOL Y ÁCIDO FÓLICO.....	45
FUNCIONALIZACIÓN DE DENDRÍMEROS PAMAM CON ÁCIDO FÓLICO .....	48
FUNCIONALIZACIÓN DE DENDRÍMEROS PAMAM CON POLIETILENGLICOL .....	53
FUNCIONALIZACIÓN CON DE LOS SISTEMAS PAMAM, PAMAM-FA Y PAMAM-PEG CON FLUORESCÉINA ISOTIOCIANATO .....	59
EFECTO DE LA MODIFICACIÓN ESTRUCTURAL DE PAMAM SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR <i>IN VITRO</i> .....	64
ANÁLISIS DE LA CINÉTICA PLASMÁTICA DE DENDRÍMEROS PAMAM Y EL EFECTO DE SU MODIFICACIÓN SUPERFICIAL .....	67
EFECTO DE LA MODIFICACIÓN SUPERFICIAL DE DENDRÍMEROS PAMAM SOBRE EL EFECTO ANTIPROLIFERATIVO COMBINADO DE OCTREÓTIDO Y METOTREXATO .....	74
ESTUDIO DE FLUORESCENCIA ENTRE OCTREÓTIDO Y DENDRÍMEROS PAMAM FUNCIONALIZADOS .....	74
ACCIÓN ANTIPROLIFERATIVA DE LOS COMPLEJOS PAMAM-OCT-MTX <i>IN VITRO</i> EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER.....	84
<b>CONCLUSIONES</b> .....	92
<b>REFERENCIAS</b> .....	95

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Características físicas de los dendrímeros PAMAM según su generación.	<b>09</b>
<b>Tabla 2.</b>	Receptores de péptidos sobreexpresados en tumores humanos	<b>17</b>
<b>Tabla 3.</b>	Asignación de señales e integrales del espectro de $^1\text{H}$ para PAMAM-G4	<b>47</b>
<b>Tabla 4.</b>	Asignación de señales e integrales del espectro de $^1\text{H}$ para PAMAM-FA	<b>52</b>
<b>Tabla 5.</b>	Asignación de señales e integrales del espectro de $^1\text{H}$ para PAMAM-PEG	<b>58</b>
<b>Tabla 6.</b>	Asignación de señales e integrales del espectro de $^1\text{H}$ para los dendrímeros PAMAM funcionalizados con FITC	<b>62</b>
<b>Tabla 7</b>	Parámetros estimados para PAMAM, PAMAM-FA y PAMAM-PEG	<b>63</b>
<b>Tabla 8.</b>	Parámetros de farmacocinética no-compartimental calculados para PAMAM, PAMAM-FA y PAMAM-PEG	<b>70</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Nanotransportadores de fármacos con potencial aporte en terapia dirigida, diagnóstico y seguimiento de la patología	<b>04</b>
<b>Figura 2.</b>	Esquema de un dendrímero PAMAM de cuarta generación (G4).	<b>08</b>
<b>Figura 3.</b>	Estructura somatostatina-14 y somatostatina-28	<b>19</b>
<b>Figura 4.</b>	Corte histológico de tumor carcinoide	<b>21</b>
<b>Figura 5</b>	Estructura SST-14. Las flechas indican los sitios susceptibles a degradación enzimática	<b>22</b>
<b>Figura 6.</b>	Estructura de somatostatina-14 y sus análogos estructurales	<b>23</b>
<b>Figura 7.</b>	Esquema de sistemas nanotransportadores generados a partir de la funcionalización superficial de PAMAM-G4	<b>27</b>
<b>Figura 8</b>	Estructura metotrexato (MTX)	<b>28</b>
<b>Figura 9.</b>	Esquema de funcionalización de PAMAM con ácido fólico.	<b>34</b>
<b>Figura 10.</b>	Esquema de funcionalización de PAMAM con PEG-4-NFC.	<b>36</b>
<b>Figura 11.</b>	Conjugación FITC a dendrímeros PAMAM	<b>37</b>
<b>Figura 12.</b>	Espectro RMN $^1\text{H}$ en $\text{D}_2\text{O}$ para PAMAM-G4.	<b>47</b>
<b>Figura 13.</b>	Sobrevivencia celular en células HEK-293 a concentraciones crecientes de dendrímeros PAMAM-G4 y PAMAM con ácido fólico desde 25 al 75%	<b>49</b>
<b>Figura 14.</b>	Espectro RMN de $^1\text{H}$ para PAMAM-FA en $\text{D}_2\text{O}$	<b>51</b>
<b>Figura 15.</b>	Viabilidad celular en células HEK-293 a concentraciones crecientes de dendrímeros PAMAM-	<b>54</b>

G4 pegilados con PEG de 550 y 2000 Da

<b>Figura 16.</b>	Espectro RMN de $^1\text{H}$ para PAMAM-PEG en DMSO- $\text{d}_6$	<b>57</b>
<b>Figura 17.</b>	Espectro RMN $^1\text{H}$ de PAMAM, PAMAM-FA y PAMAM-PEG en $\text{D}_2\text{O}$ .	<b>61</b>
<b>Figura 18.</b>	Viabilidad celular (%) en la línea celular HEK para soluciones de concentración creciente de PAMAM-G4, FA-PAMAM y PEG-PAMAM	<b>66</b>
<b>Figura 19.</b>	Diagrama de concentración en $\mu\text{molL}^{-1}$ de dendrímeros PAMAM (A), PAMAM-FA (B) y PAMAM-PEG (C) marcados con FITC por unidad de tiempo	<b>69</b>
<b>Figura 20.</b>	Quenching de fluorescencia de octreótido por interacción con metotrexato.	<b>77</b>
<b>Figura 21.</b>	Quenching de fluorescencia de octreótido por interacción con PAMAM	<b>79</b>
<b>Figura 22.</b>	Quenching de fluorescencia de octreótido por interacción con PAMAM-FA	<b>81</b>
<b>Figura 23.</b>	Quenching de fluorescencia de octreótido por interacción con PAMAM-PEG	<b>83</b>
<b>Figura 24.</b>	Viabilidad (%) en células HeLa para soluciones de concentración $1\mu\text{mol L}^{-1}$ PAMAM-G4, FA-PAMA, PEG-PAMAM, octreótido y metotrexato	<b>87</b>
<b>Figura 25.</b>	Viabilidad (%) en células PC12 para soluciones de concentración $1\mu\text{mol L}^{-1}$ PAMAM-G4, FA-PAMA, PEG-PAMAM, octreótido y metotrexato	<b>89</b>

## SIMBOLOGÍA

CCK	: Colecistoquinina
CDCl <sub>3</sub>	: Cloroformo deuterado
D <sub>2</sub> O	: Agua deuterada
DMSO	: Dimetilsulfóxido
DMSO-D6	: Dimetilsulfóxido deuterado
EDC	: N-Etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
FA	: Ácido fólico
FITC	: Fluoresceína isotiocianato
GRP	: Péptido liberador de gastrina
HEK	: Células embrionales de riñón humano
LHRH	: Hormona liberadora de la hormona luteinizante
NHS	: N-hidroxi-succinimida
NET	: Tumor neuroendocrino
OCT	: Octreótido
PAMAM	: Dendrímero poliamidoamina
PAMAM-G4	: Dendrímero poliamidoamina de cuarta generación
PAMAM-FA	: Dendrímero poliamidoamina conjugado con ácido fólico
PAMAM-PEG	: Dendrímero poliamidoamina conjugado con polietilenglicol
PBS	: Buffer Fosfato salino
PEG	: Polietilenglicol
PEG-4-NFC	: Polietilenglicol metil éter 4-nitrofenil carbonato
RMN	: Resonancia magnética nuclear
SST	: Somatostatina
sst1	: Subtipo 1 del receptor de somatostatina
SST-14	: Somatostatina de 14 aminoácidos
sst2	: Subtipo 2 del receptor de somatostatina
SST-28	: Somatostatina de 28 aminoácidos
sst3	: Subtipo 3 del receptor de somatostatina
sst4	: Subtipo 4 del receptor de somatostatina
sst5	: Subtipo 5 del receptor de somatostatina
TEA	: Trietilamina
THF	: Tetrahidrofurano
VIP	: Péptido vasoactivo intestinal
HeLa	: Células de cáncer cervico-uterino
PC12	: Células de feocromocitoma de médula adrenal de rata

## RESUMEN

---

La aplicación de nanomateriales en biomedicina, a raíz de su gran capacidad para encapsular y transportar moléculas, ha permitido avanzar en el diagnóstico y tratamiento de diversas enfermedades. Patologías de alta complejidad como el cáncer, cuya terapia se encuentra limitada por las características de los fármacos utilizados, ven el uso de nanotrasportadores como una de las posibles estrategias para superar esta problemática. De los nanotrasportadores generados, los dendrímeros poliamidoamina (PAMAM) se encuentran a la vanguardia de la investigación y sus propiedades han sido ampliamente reportadas; no obstante, la citotoxicidad asociada a sus aminas primarias superficiales y su falta de selectividad por el tejido patológico, demandan un perfeccionamiento de estos sistemas.

Con el objetivo de potenciar las características positivas de los PAMAM y utilizarlos como nanotrasportadores, estos fueron funcionalizados con polietilenglicol de 2000 Da y con ácido fólico (PAMAM-PEG y PAMAM-FA) y luego caracterizados estructuralmente por espectroscopía de resonancia magnética nuclear. Además, para conocer el efecto de la funcionalización superficial se estudió la viabilidad celular y en la cinética plasmática de PAMAM y los sistemas modificados. Finalmente, se formaron complejos supramoleculares con octreótido (OCT) y metotrexato (MTX) –moléculas antiproliferativas empleadas en el tratamiento del cáncer- para analizar si los nanotrasportadores causan sinergia en el efecto intrínseco de los fármacos en cultivos celulares de líneas de cáncer.

Los resultados de esta tesis revelaron que la funcionalización de dendrímeros PAMAM de cuarta generación modula no sólo su cinética

plasmática, sino que además potencia el efecto antiproliferativo de octreótido y metotrexato a concentraciones experimentales muy bajas. PAMAM-FA y PAMAM-PEG fomentan este fenómeno tanto en cultivos celulares de HeLa como de PC12, pero el sistema pegilado es el que alcanza el efecto más pronunciado.

PAMAM-PEG mostró la vida media plasmática más prolongada y los parámetros farmacocinéticos más auspiciosos para modular el transporte. Este antecedente, más la sinergia de la antiproliferación celular de OCT y MTX a causa de su interacción con el dendrímero pegilado, lo perfila como un nanomaterial potencial para avanzar hacia su aplicación clínica en la terapia contra el cáncer.



## ABSTRACT

---

The application of nanomaterials in biomedicine as a result of their great capacity to encapsulate and carrier molecules has allowed progress in the diagnosis and treatment of various diseases. Pathologies such as cancer, whose therapy is limited by the features of the drugs used, see the use of nanotransporters as one of the possible strategies to overcome this problem. Polyamidoamine dendrimers (PAMAM) are the forefront of research and their properties have been widely reported; nevertheless, the cytotoxicity associated to their primary surface amines and their lack of selectivity for the pathological tissue, demand an improvement of these systems.

In order to enhance PAMAMs features and use them as nanocarriers, these were partially functionalized with polyethylene glycol (PAMAM-PEG) and folic acid (PAMAM-FA) and structurally characterized by nuclear magnetic resonance spectroscopy. In addition, to know the effect of surface functionalization, cell viability and plasma kinetics of PAMAM and modified systems were studied. Finally, supramolecular complexes were formed with octreotide (OCT) and methotrexate (MTX), antiproliferative molecules used in the treatment of cáncer, with the aim of analyze if nanocarriers would cause synergy in the intrinsic effect of drugs in cáncer cell lines.

The results revealed that the functionalization of fourth generation PAMAM dendrimers modulates not only their plasma kinetics, but also potentiates the antiproliferative effect of octreotide and methotrexate at very low experimental concentrations. PAMAM-FA and PAMAM-PEG promote this phenomenon both in cell cultures of HeLa and PC12, but the pegylated system is the one that achieves the most pronounced effect.

PAMAM-PEG showed the largest plasma half-life and the most auspicious pharmacokinetic parameters to modulate drug transport. This background, plus the synergy of the cellular antiproliferation of OCT and MTX due to its interaction with the pegylated dendrimer, makes it a potential nanomaterial to advance towards its clinical application in cancer therapy.



# INTRODUCCIÓN

---

## NANOMATERIALES

En las últimas décadas la investigación en química, física e ingeniería se ha centrado en la generación de nuevos materiales y la diversificación de sus productos. En este avance, los materiales de escala nanoscópica han tomado el mayor protagonismo dadas sus amplias aplicaciones, no sólo en el área tecnológica -como es su uso en óptica y electrónica-, sino que con especial foco en las ciencias biomédicas.

La síntesis de nanomateriales ha avanzado significativamente en el control de la arquitectura y composición química de los sistemas generados, los que por medio de modificaciones sencillas a su estructura pueden mejorar o adquirir nuevas características de alto interés biológico. Estos adelantos han permitido desarrollar su utilización en nanomedicina [1] –a partir de la gran capacidad para alojar moléculas en su interior o conjugarlas en su superficie- posicionando su uso en el tratamiento y diagnóstico de una gran gama de enfermedades. Es por ello, que los nanomateriales a modo de nanotransportadores se perfilan como una alternativa seria en la administración controlada de fármacos, logrando reducir los efectos secundarios nocivos de los tratamientos convencionales [2].

El uso de nanomateriales para el transporte de fármacos ofrece muchas ventajas por sobre la administración de las drogas libres [3], las cuales por su toxicidad sobre células sanas, baja solubilidad en agua, o bajos tiempos de circulación en el plasma, ya muestran ser bastante ineficientes [4]. Dentro de las ventajas de emplear nanotransportadores, cabe destacar las siguientes funciones:

- Proteger a los fármacos de la degradación prematura;
- Prevenir su interacción temprana con el entorno biológico;
- Propiciar la absorción en el tejido diana (como, por ejemplo, un tumor);
- Controlar la farmacocinética y distribución de las drogas en los tejidos;
- Tener alta capacidad de carga y liberación controlada de compuestos;
- Mejorar la penetración celular.

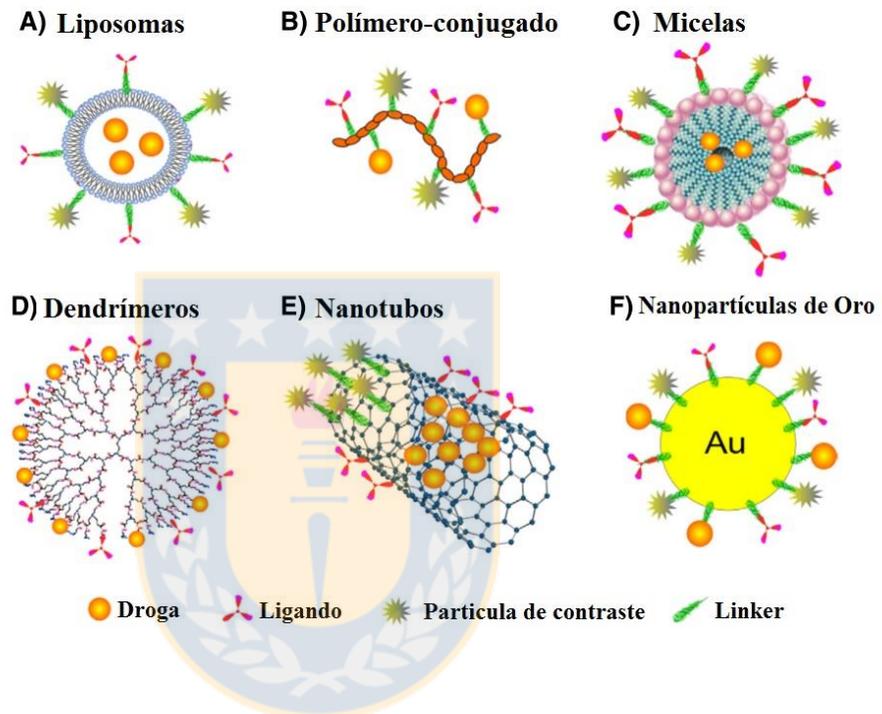
Es preciso considerar en su síntesis la inserción de grupos funcionales que permitan lograr la máxima encapsulación de fármacos o acoplamiento de ligandos a estos sistemas; minimizando cualquier efecto nocivo propio de ellos. Algunas de las características a considerar en su arquitectura, para potenciar el uso de nanomateriales en biomedicina son las siguientes:

- Ser sintetizados de un material biocompatible, bien caracterizado y con funcionalización sencilla;
- Exhibir alta capacidad de discriminar entre tejido sano y patológico;
- Ser soluble o coloidal en fase acuosa para incrementar su efectividad;
- Tener una vida media en circulación extendida y larga vida útil.

En la actualidad, se han diseñado diversos nanotransportadores basados en estructuras químicas de distinta naturaleza: nanotubos, micelas, dendrímeros, liposomas, nanopartículas, entre otras; con la finalidad de optimizar la quimioterapia de una serie de patologías complejas (figura 1)[5-8].

La búsqueda de nuevos nanomateriales y nuevas tecnologías de síntesis ha conducido a la creación de rutas sintéticas con las que se pueden obtener nanoestructuras bien definidas y con el mayor número de propiedades que faciliten su aplicación biológica. En ese sentido, dentro de los nanotransportadores hasta hoy sintetizados, los dendrímeros han demostrado ser notablemente versátiles, a raíz de su estructura sencilla y su superficie con gran cantidad de grupos funcionales disponibles para efectuar modificaciones. Esta cualidad permite la funcionalización de su estructura obedeciendo a los parámetros requeridos por patologías de alta

complejidad en su acceso o tratamiento en el organismo; como el cáncer o enfermedades del sistema nervioso central [9-11].



**Figura 1.** Nanotransportadores de fármacos con potencial aporte en terapia dirigida, diagnóstico y seguimiento de la patología [12].

## DENDRÍMEROS

Los dendrímeros son polímeros de síntesis definida, hiper-ramificados y monodispersos, los cuales exponen en su superficie determinados grupos funcionales de forma multivalente [13, 14]. Esta última característica permite llevar a cabo cambios o mejoras en sus propiedades mediante reacciones químicas simples, ya sea con uno o varios de los grupos disponibles para reaccionar en un volumen molar acotado.

La denominación de estas macromoléculas nace del griego *dendron* que significa “árbol” o “rama”, dada su estructura tridimensional ramificada. En la naturaleza se puede hallar esta arquitectura a gran escala en las ramas de los árboles y sus raíces; e incluso en el cuerpo humano en órganos como los pulmones, riñones y en microescala en las neuronas. Es evidente que las estructuras ramificadas ofrecen muchos beneficios como una de las topologías más observadas en los seres vivos, sobre todo en sistemas biológicos cuya función primordial es el transporte de información y nutrientes esenciales para la sobrevivencia; como es el caso del aparato circulatorio y nervioso. Esta cualidad biomimética de los dendrímeros hace muy valiosa su aplicación en ciencias de la vida, diferenciándolo de otros nanomateriales similares [15-17].

El diseño de estos sistemas puede estar basado en diversos grupos funcionales, destacando entre ellas las poliaminas o la mezcla de aminas y poliamidas, como la estructura que poseen los dendrímeros poliamidoamina (PAMAM). El desarrollo de esta clase nanomateriales permite la síntesis de diferentes variedades de dendrímeros: aniónicos, catiónicos, una mezcla de ambos o neutros; lo que otorga a cada macromolécula características y propiedades muy particulares [16, 18, 19].

La estructura a escala nanoscópica de los dendrímeros se encuentra caracterizada por capas o “generaciones” que se forman a partir de un punto de reacción al otro, las cuales aparecen desde el núcleo central hasta la superficie. El núcleo o *core* es denominado a veces generación cero (G0), ya que no presenta ningún punto focal.

A medida que aumentan de tamaño, los dendrímeros presentan compartimentos y estructuras que se pueden clasificar en tres partes fundamentales:

- La superficie multivalente, con un alto número de sitios reactivos potenciales;
- El almacén interno, justo por debajo de la superficie con un microambiente protegido de la parte externa por la superficie del dendrímero;

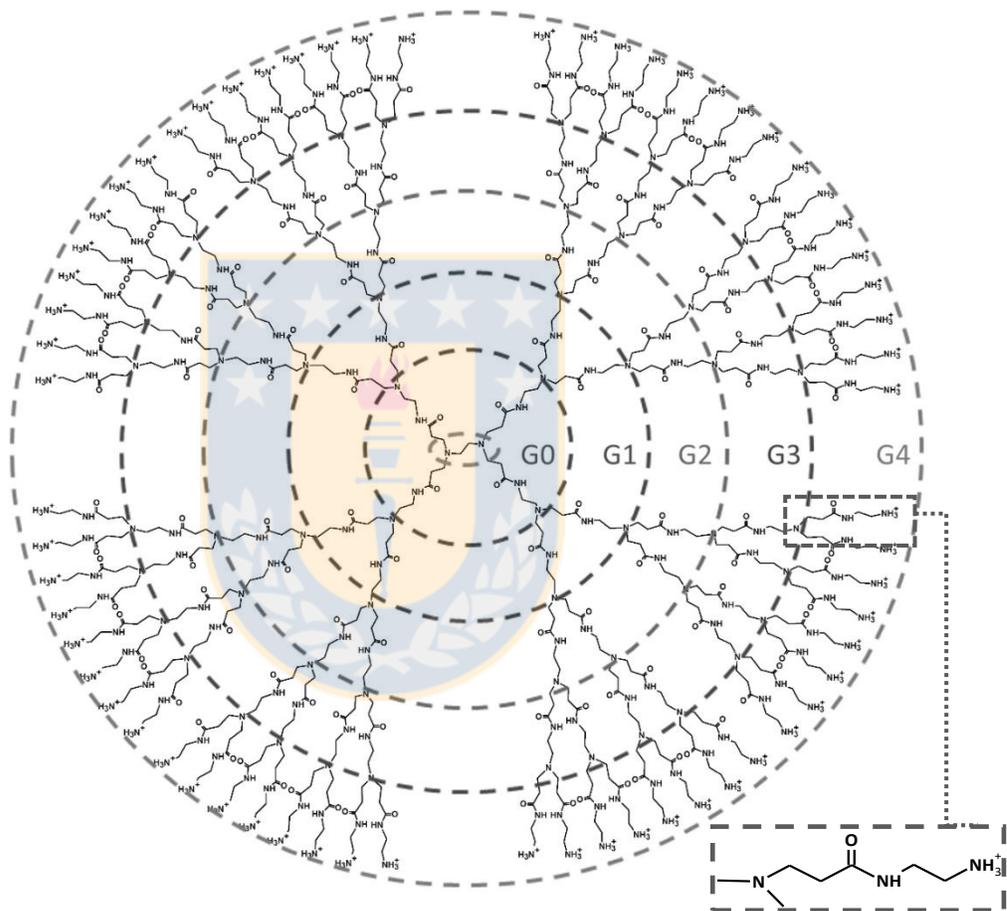
- El núcleo o *core*, que en los dendrímeros de alta generación está protegido del exterior por las capas superiores, creando un microambiente hidrofóbico rodeado por las ramas dendríticas.

De los compartimentos mencionados, el interior del dendrímero es el que presenta el mayor potencial para interactuar con moléculas, en específico las que tienen mayor grado de hidrofobicidad; asimismo, la superficie multivalente permite una extensa zona para conjugar ligandos o interactuar no covalentemente con otras estructuras cuyo fin sea mejorar las propiedades intrínsecas de estas macromoléculas [20-22].

De las familias de dendrímeros hasta ahora conocidos, los PAMAM son unos de los más utilizados en la investigación actual. Fueron los primeros en ser sintetizados, caracterizados y comercializados, y sus propiedades - ya muy conocidas- se encuentran ampliamente reportadas.

Su estructura está constituida por poliamidas y aminas terciarias en sus capas internas y aminas primarias en su superficie, en consecuencia, su conformación es altamente sensible a variaciones de pH. Esto le otorga la capacidad de encapsular moléculas hidrofóbicas o con polaridad levemente negativa por medio de interacciones no covalentes. Análogamente, esta estructura química basada en aminas y poliamidas resulta ser muy similar a las proteínas, tornando a los dendrímeros

materiales altamente biocompatibles y con baja inmunogenicidad (figura 2) [15, 23].



*Elaboración propia*

**Figura 2.** Esquema de un dendrímoro PAMAM de cuarta generación (G4). En el círculo más interno se observa el núcleo y en los siguientes círculos se observan las ramificaciones que gatillan el crecimiento del dendrímoro en generaciones.

A medida que aumenta la generación de estos nanotransportadores también se puede observar como algunas de las características principales de los dendrímeros, como su tamaño y masa molar, varían en proporción. De igual modo, existe un incremento progresivo de los grupos amino primarios en la superficie del dendrímero, como se puede apreciar a continuación en la tabla 1.

**Tabla 1.** Características físicas de los dendrímeros PAMAM según su generación [24].

DENDRÍMERO PAMAM GENERACIÓN	MASA MOLAR (kDa)	DIÁMETRO (nm)	GRUPOS AMINO DE SUPERFICIE
0	0,517	1,5	4
1	1,430	2,2	8
2	3,256	2,9	16
3	6,909	3,6	32
4	14,215	4,5	64
5	28,826	5,4	128
6	58,048	6,7	256
7	116,493	8,1	512
8	233,383	9,7	1024
9	467,162	11,4	2048
10	934,720	13,5	4096

El aumento en volumen tiende a ser mínimo con respecto al incremento de los grupos funcionales de la superficie. Por lo tanto, la conjugación y encapsulación de moléculas de interés biológico se duplica con el aumento de generación, manteniendo gran capacidad de carga en un tamaño acotado. Esto facilita la llegada de los dendrímeros, en especial los PAMAM, a diversos sitios del organismo e incluso penetrar células [25]. Por otro lado, su extensa superficie funcionalizada con aminas primarias facilita la conjugación de diversos ligandos y permite una amplia zona de interacción electrostática con aniones.

Son enormes las ventajas de estos sistemas nanotransportadores, sin embargo, a pH fisiológico 7.4 los PAMAM de cuarta generación y superiores ocasionan toxicidad celular y hemólisis intravascular –a raíz de su alta carga positiva superficial- provocada por las aminas primarias protonadas a este pH [26]. Por ello, resulta fundamental conjugar en su superficie moléculas inocuas y biocompatibles que permitan sortear este problema [27, 28].

Se ha reportado mediante ensayos *in vitro* que conjugar a la superficie de los dendrímeros PAMAM cadenas de polietilenglicol (PEG), ácido fólico (FA), ácidos grasos u otras moléculas neutras o aniónicas, no perjudica la capacidad intrínseca de los dendrímeros para encapsular y disminuye su toxicidad celular [29-32]. No obstante, es preciso determinar un porcentaje

de funcionalización y largo de cadena adecuado de moléculas como el PEG, que minimicen el daño provocado por las cargas positivas de las aminas primarias superficiales de PAMAM, sin aminorar su capacidad transportadora de fármacos.

El polietilenglicol hasta ahora ha sido la molécula más utilizada para el enmascaramiento de macromoléculas, en especial para evitar el reconocimiento por el sistema inmunológico. También es empleado para aumentar considerablemente el tamaño y la masa de materiales con potencial utilidad en biomedicina, pero que su dimensión reducida no permite una gran permanencia en circulación para lograr los efectos terapéuticos deseados [33, 34]. Se conocen innumerables beneficios del PEG en la funcionalización, sin embargo, su uso no aporta en selectividad ni direccionamiento del nanotransporte de fármacos. Por ello, aún queda pendiente esta misión para avanzar en terapia de enfermedades como el cáncer –empleando moléculas que otorguen esta propiedad a los sistemas- arriesgando al mínimo la salud de los pacientes con efectos colaterales indeseados.

La funcionalización de dendrímeros poliamidoamina de cuarta generación es necesaria para no ocasionar citotoxicidad inespecífica en sistemas biológicos ni otros efectos adversos [35]; por otro lado, también permite

otorgar a los nanomateriales la capacidad de discriminar entre células sanas y patológicas o dirigirse a sitios específicos del organismo.

Utilizar moléculas que actúen como metabolitos en el organismo, abre la oportunidad de un sistema nanotransportador, que no sea reconocido por el sistema inmune y que sea capaz de aislar moléculas farmacológicamente activas en su interior el tiempo suficiente para liberarlas en el microambiente y alcanzar la célula tumoral para eliminarla.

Este perfil calza con sustancias como el ácido fólico [36], molécula necesaria en procesos biológicos trascendentales; tal como la síntesis nucleótidos y la interconversión de aminoácidos, por lo que se encuentra presente en la mayoría de las células y es reconocido por un receptor para ser internalizado.

La participación de este metabolito en los procesos fisiopatológicos del cáncer, se encuentra considerablemente reportada. La sobreexpresión del receptor de ácido fólico en células tumorales en varios tipos de neoplasias es conocida, al igual que su capacidad de mediar la endocitosis de macromoléculas que tengan folato en su superficie, la que al ser reconocida por su receptor, causa la internalización de estos conjugados en las células [37].

La endocitosis, como mecanismo general e inespecífico, se encuentra favorecida por macromoléculas con gran concentración de cargas

catiónicas disponibles para interactuar con la membrana plasmática de las células. Tal es el caso de PAMAM a pH fisiológico, mas al tratarse de encontrar mayor selectividad en un nanotransportador, se hace ineludible la funcionalización con moléculas que favorezcan el reconocimiento celular en tejido patológico y su permanencia en el entorno donde se gesta la enfermedad.

El diseño racional de nanotransportadores de fármacos para el tratamiento de enfermedades implica visualizar la estrategia para abordar la problemática tanto del punto de vista biológico como químico. Entonces es preciso tener en consideración tres aspectos centrales para desarrollar quimioterapia basada en nanomateriales:

- Conocer la naturaleza de la enfermedad. Esto se relaciona con el conocimiento de la fisiopatología tras la enfermedad a tratar; los desafíos y riesgos que involucra.
- Elegir el nanotransportador y las moléculas para la funcionalización que potencien su eficacia y selectividad.
- Determinar, acorde al mecanismo patológico y la naturaleza del nanotransportador, el o los fármacos que vean favorecido su efecto al ser encapsulados o conjugados.

Ante la diversidad de factores involucrados en el diseño de nanomateriales y dado que la aplicación clínica de los nanotransportadores de fármacos

basados en PAMAM es todavía incipiente, se requiere una caracterización detallada de sus propiedades estructurales y farmacocinéticas, puesto que la funcionalización de la superficie modula su retención en el torrente sanguíneo y los sitios preferenciales de acumulación en el cuerpo. Una vez funcionalizados los dendrímeros, es fundamental analizar su comportamiento tanto *in vitro* como *in vivo*; para descartar que continúen efectos secundarios nocivos –por daño en el tejido sano- y modular de la mejor manera posible su acción terapéutica.



## CÁNCER

Cáncer se denomina a un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento y propagación descontrolada de células anormales, la cual si no es intervenida puede ocasionar la muerte [38, 39]. Su origen se debe a factores tanto externos (tabaco, organismos infecciosos, alimentación deficiente, sustancias químicas y radiación) como internos (mutaciones heredadas, hormonas, factores epigenéticos, problemas inmunitarios y mutaciones debidas al metabolismo); componentes causales que pueden finalmente ejercer su acción en conjunto o en secuencia para iniciar o promover la carcinogénesis.

A lo largo del progreso de la patología hay un notable aumento de la población celular, las que por medio de una serie de mecanismos gatillan el desarrollo de nueva vasculatura que permita irrigar el tejido en crecimiento (angiogénesis), proveerlo de los nutrientes y otros factores necesarios para su supervivencia y en algunos casos, facilitar la migración de estas células a otros sitios del organismo donde pueden formar nuevos tumores (metástasis) [40, 41]. Análogamente, el metabolismo celular acelerado favorece la formación de un microambiente más ácido en comparación al que existe en los tejidos sanos, a raíz de la obtención de energía en un alto porcentaje a costa de glucólisis anaeróbica. Los vasos

sanguíneos y linfáticos aberrantes que irrigan los tumores, causan la acumulación de sustancias de gran tamaño y masa molar en torno a las cercanías del tumor (efecto de permeabilidad y retención aumentada o efecto EPR)[42]. Por último, dentro de los mecanismos fisiopatológicos del cáncer, cabe destacar la sobreexpresión de receptores de una gran variedad de hormonas y péptidos en la membrana plasmática de las células cancerosas, los cuales tienden a variar desde un tipo de tumor a otro dependiendo de su ubicación anatómica y posibles requerimientos para sobrevivir [37, 43].

Son amplias las condiciones que se pueden identificar en el desarrollo de esta patología, no obstante, la sobreexpresión de ciertos receptores en la membrana plasmática de las células neoplásicas abre un blanco terapéutico mucho más efectivo y selectivo para abordar la terapia y mejorar el diagnóstico del cáncer. Este último hallazgo ha fomentado el desarrollo de nuevas estrategias para abordar la enfermedad de manera más eficiente y temprana, forjando interés principalmente por la generación de análogos de péptidos que, sin perder su afinidad natural por el receptor en cuestión, puedan dirigirse al sitio del tumor –e incluso tumores secundarios- para optimizar el diagnóstico y la terapia [44].

Tal es el caso de los receptores de los péptidos individualizados en la tabla 2, los cuales han permitido el desarrollo de análogos estructurales o

conjugados aprovechando su biocompatibilidad intrínseca con el organismo y el efecto natural del péptido como hormona para inhibir el crecimiento celular. Además, con mínimas modificaciones se puede beneficiar la afinidad natural de las hormonas peptídicas por su receptor convirtiéndolos en agentes antiproliferativos aún más efectivos.

**Tabla 2.** Receptores de péptidos sobreexpresados en tumores humanos [45].

<b>PÉPTIDO</b>	<b>TUMOR EN QUE SE EXPRESAN</b>
SOMATOSTATINA	Neuroendocrino (gastroenteropancreático, pituitario), linfoma, paraganglioma, mama, cerebro, cáncer de pulmón de células pequeñas
BOMBESINA/GRP	Próstata, mama, páncreas, gástrico
VIP	Mama, adenocarcinomas de colon, tumores endocrinos
NEUROTENSINA	Pancreático exocrino, mama, colon, cáncer de próstata
CCK/GASTRINA	Cáncer medular tiroideo, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de estroma, cáncer de estroma de ovario, astrocitoma, gastrointestinal
LHRH	Próstata, cáncer de mama

*GRP: péptido liberador de gastrina, VIP: péptido vasoactivo intestinal, CCK: colecistoquinina, LHRH: hormona liberadora de la hormona luteinizante.*

## PÉPTIDOS COMO POTENCIAL HERRAMIENTA CONTRA EL CÁNCER

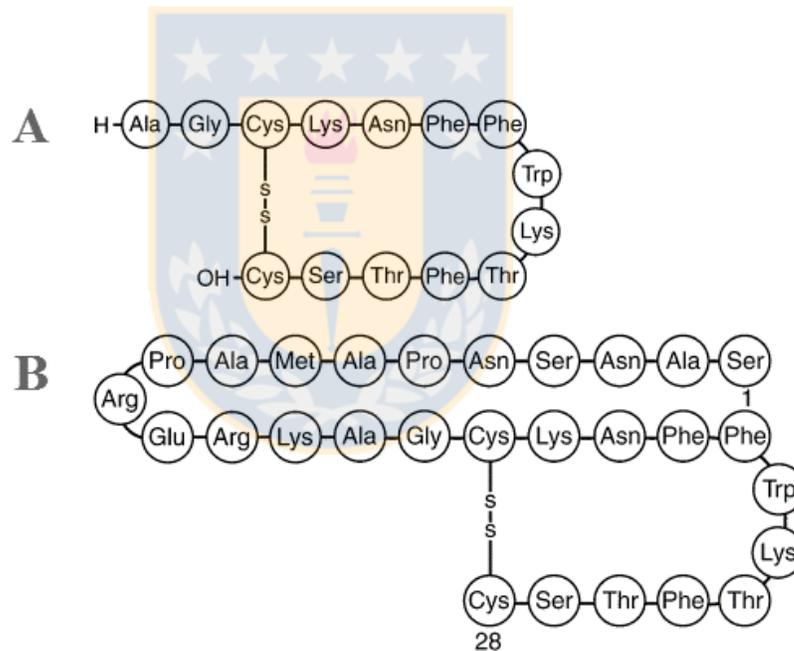
Por más de 50 años la quimioterapia ha sido la alternativa para tratar tumores muy avanzados o metastásicos, asimismo, puede ser empleada como adyuvante a la remoción quirúrgica o radioterapia. Sin embargo, los fármacos antineoplásicos usados tienen variados mecanismos de acción, los que ya sea por su simple administración o por combinación de ellos, resultan altamente ineficientes e inespecíficos, generando efectos colaterales muy dañinos para la salud de los pacientes. Las drogas anticancerosas convencionales están limitadas intrínsecamente por la resistencia de las células tumorales y por la incapacidad de administrar dichos fármacos directamente en la zona de la patología sin afectar células normales [46, 47].

Estas problemáticas pueden ser superadas con el desarrollo de una terapia dirigida y selectiva que emplee un objetivo predefinido, como algún receptor sobreexpresado, de este modo se restringe el acceso de las drogas utilizadas a los tejidos sanos, reduciendo en consecuencia la toxicidad y maximizando la efectividad del tratamiento.

Recurrir a péptidos para tratar el cáncer no sólo podría ser más eficiente y selectivo, sino que también posee una serie de ventajas en comparación al uso de moléculas de mayor tamaño como anticuerpos u otras proteínas,

como, por ejemplo: síntesis y modificación química más sencilla, mayor habilidad de penetrar en el tumor y alta biocompatibilidad.

La somatostatina (SST), conocida también como “hormona inhibidora de la hormona del crecimiento”, es una hormona peptídica compuesta por 14 o 28 aminoácidos en su forma bioactiva (figura 3); la que es secretada por el hipotálamo, páncreas y mucosa gastrointestinal.

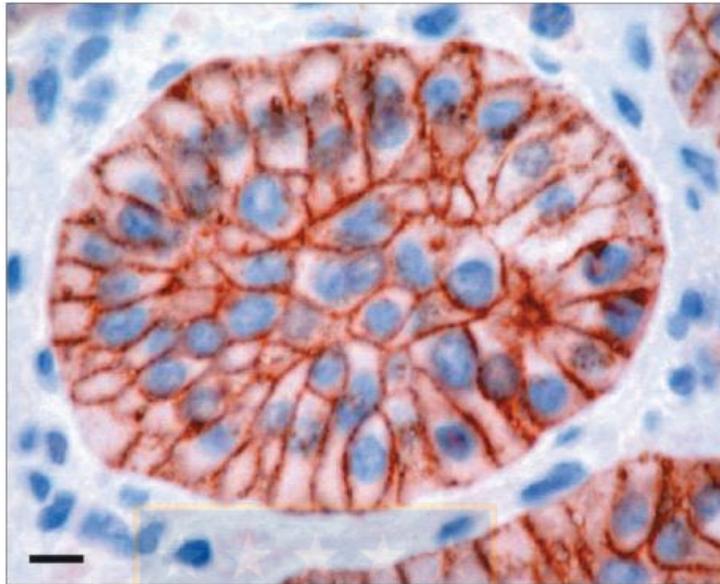


**Figura 3.** (A) Estructura somatostatina-14. (B) Estructura somatostatina-28 [48].

Esta hormona controla una serie de procesos fisiológicos dentro de los que destacan: regulación de la secreción de las hormonas del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides, contracción del músculo liso, absorción de nutrientes y división celular. Estas propiedades han permitido la aplicación clínica de análogos de la somatostatina en una serie de patologías como: acromegalia, gigantismo, diarrea, tirotropinoma, entre otras.

La somatostatina también juega un importante rol en la terapia antitumoral, puesto que al encontrarse su receptor sobreexpresado en la membrana celular de una serie de tumores -como neuroendocrinos, cerebrales, de mama, de pulmón- estos son más susceptibles al tratamiento con somatostatina o sus análogos, lo que termina inhibiendo el crecimiento del tumor (figura 4) [48, 49].

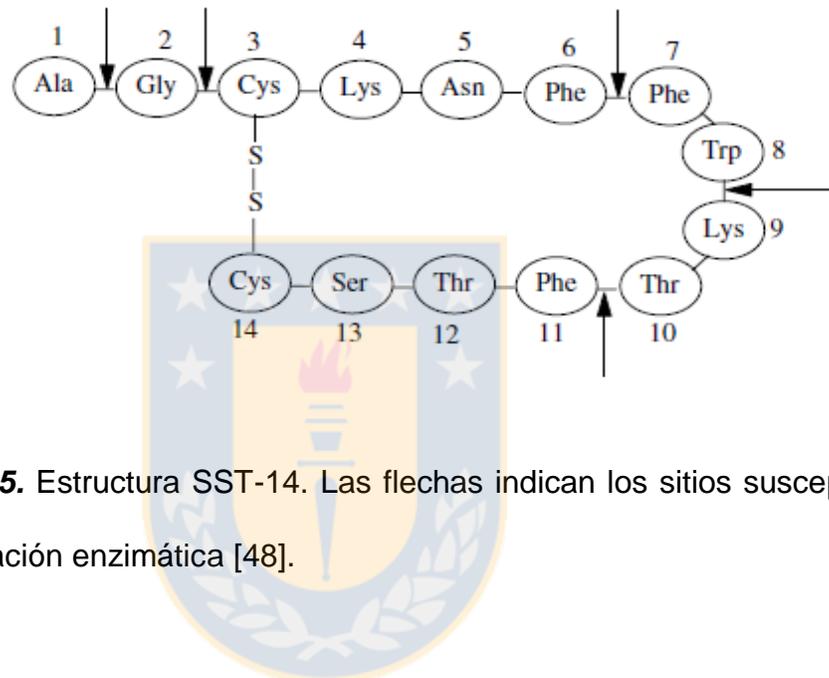
Se han descrito 5 subtipos del receptor de somatostatina: sst1, sst2, sst3, sst4, sst5, de los que cabe resaltar la sobreexpresión del receptor sst2 en muchos tumores neuroendocrinos (NETs), sin embargo, la presencia de los demás subtipos es basta en los tejidos no tumorales. Tanto el péptido de 14 aminoácidos como el de 28 muestran afinidad similar por cada receptor de somatostatina, aunque otros análogos estructurales que se han desarrollado como el octreótido (sandostatina<sup>®</sup>), poseen afinidad variable por los distintos subtipos; en particular esta molécula posee mayor afinidad por sst2 y sst5.



**Figura 4.** Corte histológico de tumor carcinoide, el cual fue tratado con el anticuerpo R2-88 para la detección inmunohistoquímica del receptor sst2 de somatostatina. El color rojizo de las membranas celulares demuestra la abundante presencia del receptor en este tejido [48].

Si bien el tetradecapéptido de somatostatina presenta variadas acciones biológicas y aparece como un agente antiproliferativo endógeno, su potencial oncológico se ve limitado por la corta vida media que posee (aproximadamente 3 minutos) [50]. La somatostatina resulta de un extenso precursor que es degradado por enzimas hasta alcanzar la extensión de 28 o 14 aminoácidos, no obstante, en circulación es altamente susceptible

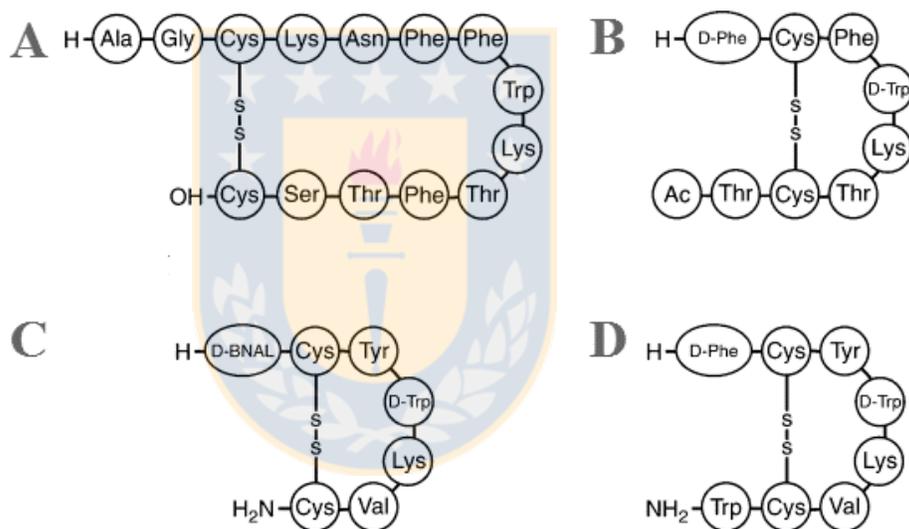
a peptidasas y excretado rápidamente tanto por la vía renal como por la vía hepato-biliar, lo que reduce rápidamente su actividad (figura 5).



**Figura 5.** Estructura SST-14. Las flechas indican los sitios susceptibles a degradación enzimática [48].

A partir de las ventajas ya conocidas de este péptido, es que se han realizado en él una serie de modificaciones con el fin de añadir nuevas propiedades y superar la problemática de la baja vida media de la molécula de somatostatina; ello con el objetivo de realizar avances cuantitativos tanto en el diagnóstico como en la quimioterapia antitumoral. En la actualidad, el uso de sus análogos estructurales (figura 6) se encuentra dentro de las terapias farmacológicas validadas para emplear en pacientes e incluso están disponibles comercialmente. También se

emplea esta hormona marcada con isótopos radiactivos u otras moléculas que permitan detectar a través de técnicas imagenológicas la presencia de algún tumor -o posibles tumores secundarios metastásicos- que manifiesten sobreexpresión del receptor de somatostatina, con el propósito de dar tratamiento más selectivo.



**Figura 6.** Estructura de somatostatina-14 (A) y sus análogos estructurales octreótido (B), lanreótido (C) y vapreótido o RC-160 (D) [48].

Asimismo, investigadores han modificado la estructura de somatostatina o sus análogos añadiendo a alguno de sus extremos un fármaco antineoplásico utilizado en la quimioterapia convencional, como por

ejemplo doxorubicina o camptotecina [53, 54], aprovechando que una vez que esta hormona peptídica interacciona con su receptor el complejo formado es rápidamente ingresado a la célula y el receptor queda nuevamente disponible para otra interacción. Esto permitiría que el fármaco conjugado, una vez internalizado con el complejo, pueda realizar su acción terapéutica en el interior de la célula blanco [55, 56].

A pesar de los adelantos alcanzados, la complejidad de algunas neoplasias –dada por su progreso o difícil acceso anatómico-, subsiste un impedimento de realizar cirugías o administrar tratamiento farmacológico. Este es el caso por ejemplo de los tumores malignos avanzados y metastásicos, en que la terapia se ve limitada por la dificultad que conlleva para muchas moléculas mantenerse en circulación –ya sea por su susceptibilidad a la degradación o escasa biodisponibilidad- y llegar al tejido diana. Asimismo, ejecutar la extirpación quirúrgica se ve obstaculizada en caso de que el neoplasma se halle en órganos vitales o esté diseminado por varias zonas del organismo.

## PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN

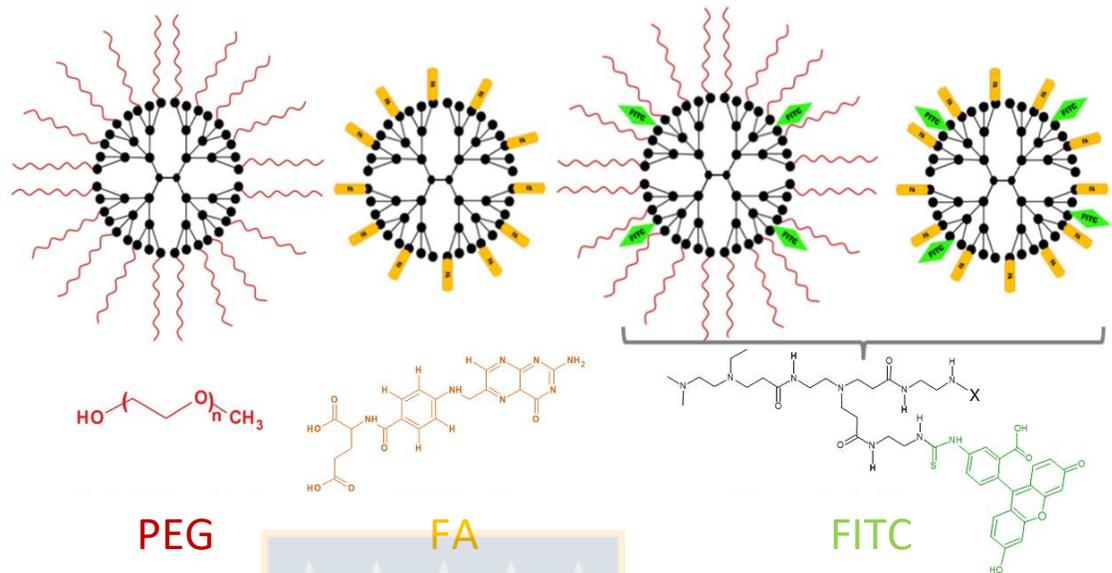
En Chile, las muertes por neoplasias representan aproximadamente el 24% de todas las defunciones al año, alcanzando el segundo lugar de causas de muerte luego de las enfermedades cardiovasculares y con una preocupante proyección ascendente [57]. Estos antecedentes, generan la necesidad de efectuar una terapia racional contra el cáncer para optimizar sus resultados y disminuir sus efectos adversos. A raíz de ello, esta investigación tuvo como propósito el desarrollo de sistemas nanotransportadores basados en dendrímeros PAMAM de cuarta generación –los que luego de una caracterización *in vitro* e *in vivo*- fueron empleados para encapsular moléculas con actividad antineoplásica.

Dendrímeros PAMAM fueron funcionalizados con polietilenglicol de 2000 Da y ácido fólico (PAMAM-PEG y PAMAM-FA); este último a modo de generar un sistema mucho más sensible a la expresión de distintas moléculas que participan en la fisiopatología del cáncer.

Los nuevos nanomateriales generados se caracterizaron estructuralmente por resonancia magnética nuclear y además se analizó la sobrevivencia celular *in vitro*, con el fin de comprobar que se haya minimizado la

citotoxicidad asociada a las aminas primarias de PAMAM y descartar que la funcionalización realizada también haya causado muerte celular.

Posteriormente, se efectuaron estudios cinéticos *in vivo* mediante la conjugación de fluoresceína a un porcentaje de las aminas superficiales de PAMAM-PEG y PAMAM-FA que no fueron funcionalizadas (figura 7); sistemas generados que se probaron en ratones para analizar en su circulación sanguínea la presencia de los dendrímeros marcados a distintos tiempos utilizando espectrofluorimetría. Esta etapa determinó el momento en que los PAMAM entran en circulación y salen de ella en dirección a distintas zonas de su organismo o para ser excretados. El propósito de estos ensayos fue analizar el efecto de la modificación superficial de los dendrímeros sobre su cinética plasmática. Ahí radica la importancia de caracterizar cualquier sistema con potencial uso clínico, para conocer el comportamiento que tiene en un organismo vivo y así aplicar los nanotransportadores terapéuticamente en la patología de acuerdo a su farmacocinética.

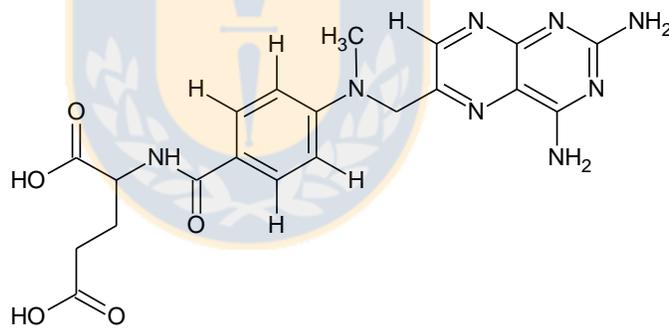


*Elaboración propia*

**Figura 7.** Esquema de sistemas nanotransportadores generados a partir de la funcionalización superficial de PAMAM-G4.

Por otro lado, dado que se ha demostrado la sobreexpresión del receptor de somatostatina en una amplia gama de tumores, se utilizó como base un análogo estructural de somatostatina-14: Octeótrido. Dado que esta familia peptídica posee triptófano en su cadena, la fluorescencia intrínseca de este residuo permitió determinar su interacción con otras especies, a partir del quenching observado, y que es proporcional a la formación de complejos de asociación.

En adición, se agregó el fármaco antiproliferativo metotrexato (MTX) – antimetabolito análogo estructural del ácido fólico inhibidor de la enzima dihidrofolato reductasa- (figura 8) para incrementar el efecto terapéutico y evaluar cualquier tipo de sinergia entre ambas sustancias. Esto aprovechando la capacidad antiproliferativa que posee octreótido, la sobreexpresión de su receptor, y además el ingreso de la droga citotóxica MTX preferentemente en células que vean aumentada su necesidad de ácido fólico, como es el caso del tejido tumoral.



*Elaboración propia*

**Figura 8.** Estructura metotrexato (MTX)

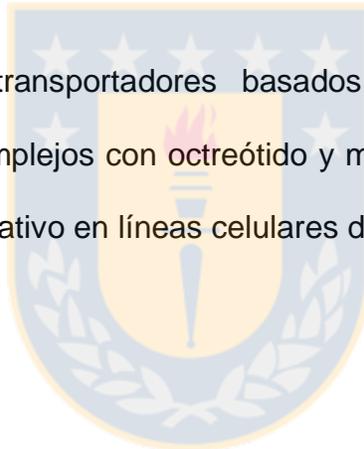
Terminada la caracterización estructural de los nanomateriales modificados se formaron complejos en distintas composiciones, con especial énfasis en el uso combinado de las drogas antiproliferativas con cada uno de los dendrímeros. Estos fueron caracterizados por medio de espectroscopía de fluorescencia. El quenching del triptófano confirmó las interacciones entre las moléculas.

Una vez caracterizado el complejo, los nanotransportadores con el péptido y metotrexato fueron probados en líneas celulares de cáncer –HeLa y PC12-. Se probó el efecto individual y combinado de todos los componentes bajo estudio. Los niveles de viabilidad celular de los complejos permitieron concluir la factibilidad de aplicar estos sistemas en quimioterapia, para progresar en el modelo de estudio, con miras a una aplicación clínica más avanzada.

# HIPÓTESIS

---

- i. La cinética plasmática de los dendrímeros PAMAM está modulada por su modificación superficial.
- ii. Los nanotransportadores basados en dendrímeros PAMAM al formar complejos con octreótido y metotrexato, potencian su efecto antiproliferativo en líneas celulares de cáncer.



# OBJETIVO

---

Desarrollar dos sistemas nanotransportadores basados en PAMAM-G4, para determinar su cinética plasmática *in vivo* y finalmente formar un complejo con un análogo de somatostatina y un fármaco citotóxico.



- i. Sintetizar y caracterizar el sistema nanotransportador basado en PAMAM-G4 con polietilenglicol y ácido fólico.
- ii. Determinar la farmacocinética del nanotransportador en ratones mediante estudio de su plasma mediante espectrofluorimetría.
- iii. Formar el complejo dendrímero-péptido-fármaco y corroborar su interacción.
- iv. Analizar la acción citotóxica del complejo *in vitro* en líneas celulares de cáncer.

# METODOLOGÍA

---

A continuación, se describe la metodología general utilizada para alcanzar los objetivos propuestos por esta investigación.

Los reactivos empleados fueron adquiridos en Sigma Aldrich<sup>®</sup>, mientras que los solventes fueron obtenidos en Merck Millipore<sup>®</sup>.

Los análisis por espectroscopía RMN fueron ejecutados en el equipo Bruker Avance de 400 MHz de la Universidad de Concepción.

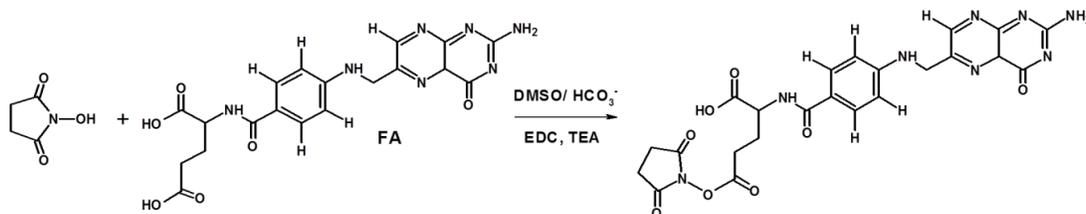
Los estudios biológicos, tanto *in vitro* como *in vivo*, fueron realizados en colaboración con el Departamento de Fisiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción; quienes poseen todos los permisos bioéticos pertinentes de acuerdo a la normativa vigente para el trabajo con animales.

# SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE SISTEMAS NANOTRANSPORTADORES BASADOS EN DENDRÍMEROS PAMAM DE CUARTA GENERACIÓN

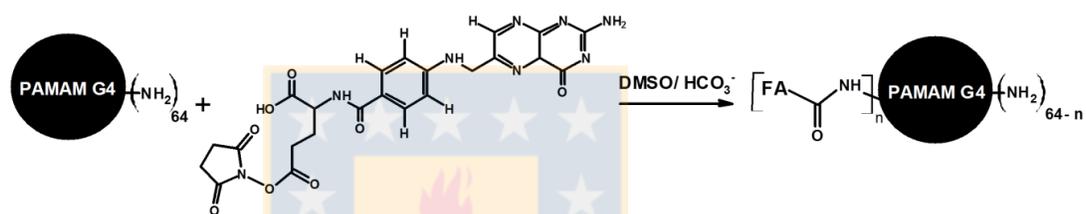
## SÍNTESIS DE SISTEMA NANOTRANSPORTADOR PAMAM CONJUGADO CON ÁCIDO FÓLICO (PAMAM-FA)

En un balón de reacción con 20 mL de solución buffer  $\text{DMSO}/\text{HCO}_3^-$  (1:1) fue disuelto FA (0.23 mmol) y posteriormente se añadieron (0.46 mmol), EDC (1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida, 0.46 mmol) y trietilamina (TEA, 0.46 mmol), dejándolos bajo agitación constante a temperatura ambiente y atmósfera de nitrógeno durante 1 hora (etapa 1, figura 9). PAMAM-G4 (7  $\mu\text{mol}$ ), fue disuelto en 5 mL de DMSO y luego fue agregado a la mezcla con el fin de funcionalizar aproximadamente el 50% de las aminas primarias disponibles en su superficie. La reacción transcurrió durante 24 horas bajo las mismas condiciones anteriormente descritas (etapa 2, figura 9). El producto bruto fue purificado por diálisis en una membrana de 25 kDa de corte contra agua desionizada. El dendrímero funcionalizado con ácido fólico final fue obtenido por evaporación del agua en rotavapor y caracterizado por espectroscopía RMN de  $^1\text{H}$  en  $\text{D}_2\text{O}$ .

## Etapa 1



## Etapa 2



*Elaboración propia*

**Figura 9.** Esquema de funcionalización de PAMAM con ácido fólico.

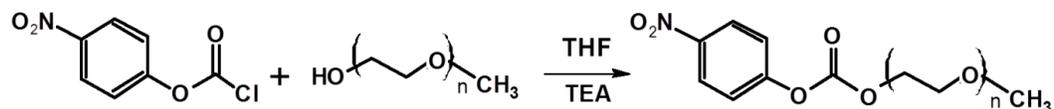
## SÍNTESIS DE SISTEMA NANOTRANSPORTADOR PAMAM CONJUGADO CON POLIETILENGLICOL (PAMAM-PEG)

En un balón se añadió 3.6 mmol de polietilenglicol monometil éter de 2000 Da en 200 mL de Tetrahidrofurano (THF). Posteriormente, se agregó a la mezcla de reacción 7.2 mmol de 4-nitrofenil cloroformiato y 7.2 mmol de TEA, dejando transcurrir la reacción a temperatura ambiente y agitación constante durante tres días (etapa 1, figura 10). Terminada la síntesis, el

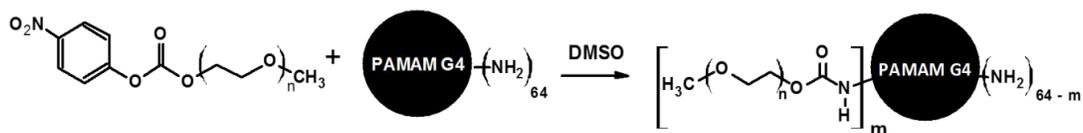
solvente fue volatilizado y el producto bruto, disuelto en metanol, fue purificado en una columna sephadex LH-20. Una vez volatilizado el metanol, el producto final fue caracterizado por RMN de  $^1\text{H}$ , en cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ).

Obtenido el polietilenglicol activado, dendrímeros poliamidoamina de cuarta generación (PAMAM-G4), se funcionalizaron superficialmente en 50% aproximadamente del total de aminas terminales disponibles (etapa 2, figura 10). Para ello se hizo reaccionar en 30 mL de DMSO el dendrímero PAMAM-G4 ( $17 \mu\text{mol}$ ) con PEG-4-NFC ( $1.1 \text{ mmol}$ ) previamente preparado, para pegar 32 aminas de las 64 disponibles. La reacción transcurrió cinco días a temperatura ambiente y agitación constante. Una vez finalizada la síntesis, el producto fue purificado por ultrafiltración y caracterizado por RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HSQC y COSY en DMSO deuterado (DMSO-D6) [58].

### **Etapas 1**



## Etapa 2

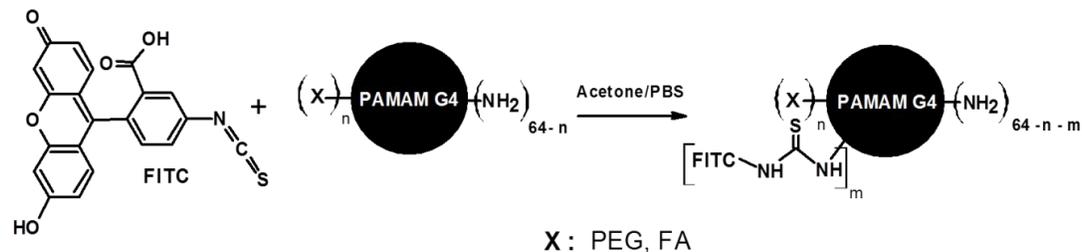


*Elaboración propia*

**Figura 10.** Esquema de funcionalización de PAMAM con PEG-4-NFC.

## CONJUGACIÓN DE FITC A PAMAM, PAMAM-FA Y PAMAM-PEG

En un balón de reacción fueron disueltos 24  $\mu\text{mol}$  de fluoresceína isotiocianato (FITC) en 10 mL de acetona. Posteriormente, se agregó 3  $\mu\text{mol}$  de PAMAM disuelto en 10 mL de PBS al balón y se dejó a temperatura ambiente bajo agitación constante por 48 horas en oscuridad. Del mismo modo se procedió con los sistemas funcionalizados con polietilenglicol y ácido fólico (figura 11). El producto bruto fue purificado por diálisis contra agua desionizada en una membrana de 10.000 MWCO y recuperado el producto, fue volatilizado el solvente, y se caracterizó por espectroscopía RMN de  $^1\text{H}$  en  $\text{D}_2\text{O}$ .



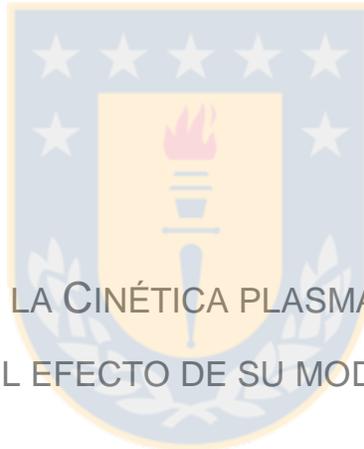
*Elaboración propia*

**Figura 11.** Conjugación FITC a dendrímeros PAMAM.

## ESTUDIO DE VIABILIDAD CELULAR DE LOS NANOTRANSPORTADORES

El estudio de viabilidad *in vitro* fue realizado en cultivos de células HEK-293 (Human Embryonic Kidney 293 cells) en placas de 96 pocillos en una solución del Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM = 4.5 g L<sup>-1</sup> glucosa, 2 mmol L<sup>-1</sup> glutamina, 0.11 g L<sup>-1</sup> sodio piruvato y Suero bovino fetal al 10%) más soluciones de los dos sistemas nanotransportadores generados: PAMAM-FA, PAMAM-PEG y PAMAM-G4 como sistema de referencia. Se evaluaron 5 concentraciones de nanotransportadores: 1, 10, 50, 100 y 500 μmol/L con seis repeticiones de cada determinación respectivamente. Luego de una incubación de 24 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, el medio fue reemplazado por uno nuevo y se añadió a cada pocillo una alícuota del kit Alamarblue, para dejar incubando las células bajo las

mismas condiciones durante 3 horas más. Finalmente, se midió la emisión de fluorescencia del compuesto reducido a 580 nm en el equipo NOVOstar multiplate reader. Se utilizó DMEM como medio de control de supervivencia celular (C+), mientras que el 0,1% de tritón se empleó como control de muerte celular (C-). La comparación con los grupos de control se realizó utilizando la herramienta ANOVA de una manera del software Origin™ 8.0 con  $p < 0.05$  para diferencias significativas entre los grupos estudiados.



## ANÁLISIS DE LA CINÉTICA PLASMÁTICA DE DENDRÍMEROS PAMAM Y EL EFECTO DE SU MODIFICACIÓN SUPERFICIAL

La cuantificación de dendrímeros funcionalizados en circulación de ratones se realizó mediante el análisis de muestras de plasma a distintos tiempos. Para medir selectivamente los sistemas nanotransportadores en sangre, fueron todos marcados fluoresceína isotiocianato (FITC) aproximadamente al 10% con el fin de seguir la concentración de dendrímero por espectrofluorimetría en plasma sanguíneo. La molécula de FITC absorbe a 495 nm y emite a 516 nm, lo que permite evitar

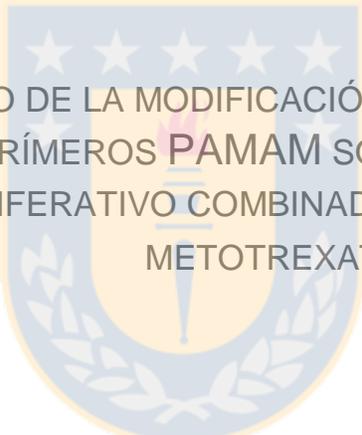
interferencias de otras sustancias que también emiten fluorescencia como algunos aminoácidos de las proteínas en circulación.

Los materiales marcados con FITC se inyectaron en ratones ( $n = 24$ , 27-28 g) con una dosis de  $1 \mu\text{mol} / \text{kg}$ . La fluorescencia en sangre se midió a  $t = 2, 5, 15, 30, 60$  y  $120$  minutos para PAMAM-G4 y PAMAM-FA, y  $t = 15, 30, 45, 60, 90, 120$  y  $180$  minutos para PAMAM-PEG. Los animales se anestesiaron con isoflurano para extraer muestras de sangre y el plasma se separó de la porción celular por centrifugación a  $10.000 \text{ rpm}$  a  $4^\circ \text{C}$ . La señal FITC de los sobrenadantes se midió a  $516 \text{ nm}$  en el lector multiplaca NOVOstar. El grupo de control fue inyectado con solución salina. Se empleó un análisis no-compartimental para estimar los parámetros farmacocinéticos del plasma para los sistemas en estudio, incluida la constante de velocidad de eliminación ( $k_e$ ), la vida media del plasma ( $t_{1/2}$ ), el área bajo la curva de concentración de plasma en el tiempo de cero a infinito ( $\text{AUC}_{0 \rightarrow \infty}$ ) el área bajo la curva del primer momento de cero a infinito ( $\text{AUMC}_{0 \rightarrow \infty}$ ), y el tiempo de residencia medio (MRT). Se empleó un ajuste no lineal para obtener los valores de  $k_e$  y  $t_{1/2}$  asumiendo una cinética de primer orden para las fases de eliminación. El método trapezoidal lineal extrapolado a infinito se empleó para obtener  $\text{AUC}_{0 \rightarrow \infty}$  y  $\text{AUMC}_{0 \rightarrow \infty}$ . MRT se calculó a partir de la relación entre  $\text{AUC}_{0 \rightarrow \infty}$  y  $\text{AUMC}_{0 \rightarrow \infty}$ . Como la fracción de la dosis absorbida ( $F$ ) era desconocida, el aclaramiento plasmático (Cl)

y el volumen de distribución en estado estacionario ( $V_{ss}$ ) se expresaron en función de F, utilizando las ecuaciones 1 y 2.

$$\frac{Cl}{F} = \frac{D}{AUC} \quad (1)$$

$$\frac{V_{ss}}{F} = \frac{Cl \times AUMC}{AUC} \quad (2)$$



EFEECTO DE LA MODIFICACIÓN SUPERFICIAL DE  
DENDRÍMEROS PAMAM SOBRE EL EFECTO  
ANTIPROLIFERATIVO COMBINADO DE OCTREÓTIDO Y  
METOTREXATO

ESTUDIO DE FLUORESCENCIA ENTRE OCTREÓTIDO Y DENDRÍMEROS  
PAMAM FUNCIONALIZADOS

Con el objetivo de formar complejos con aplicación farmacológica, se analizó la interacción entre los dendrímeros PAMAM modificados, metotrexato y octeótrido (OCT), análogo estructural del péptido Somatostatina.

Octeótrido posee fluorescencia intrínseca, debido a la presencia de triptófano en su cadena aminoacídica. Gracias a ello, fue posible

determinar la asociación “anfitrión-huésped” de esta molécula con los dendrímeros y metotrexato mediante espectroscopía de fluorescencia, a partir del quenching generado por la formación de un complejo supramolecular. La longitud de onda de excitación fue 283 nm y la de emisión 350 nm.

Se preparó una solución  $5 \mu\text{mol L}^{-1}$  de OCT para medir su fluorescencia y posteriormente se tituló con alícuotas de MTX, PAMAM, PAMAM-FA y PAMAM-PEG respectivamente; haciendo un barrido de concentraciones desde  $0.1 \mu\text{mol L}^{-1}$  hasta  $12 \mu\text{mol L}^{-1}$  para superar el doble de la cantidad de péptido inicial. Cada solución de las moléculas en estudio se realizó en  $5 \mu\text{mol L}^{-1}$  de OCT para mantener la concentración del péptido constante en el transcurso del experimento y en todas las soluciones se empleó como solvente agua ultrapura a pH neutro. Se asumió que la estequiometría asociada es de 1:1 para la elaboración del experimento.

Se recolectó la emisión entre 300 y 420 nm para ver los perfiles de fluorescencia y posteriormente se evaluó el descenso de fluorescencia a 350 nm a medida que se varió la concentración de los compuestos de forma creciente. Se estimó que este descenso es proporcional a la formación de complejos, corroborando la interacción entre OCT y las demás moléculas analizadas.

## ANÁLISIS DE LA ACCIÓN ANTIPROLIFERATIVA DE LOS COMPLEJOS PAMAM-OCT-MTX *IN VITRO* EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER

Una vez comprobada la formación del complejo farmacológico entre los sistemas nanotransportadores con octeótrido y metotrexato, fue estudiada su acción citotóxica *in vitro* en cultivos de dos líneas celulares: HeLa y PC12.

Las células HeLa y PC12 fueron cultivadas en placas de 96 pocillos en una solución del Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM HeLa= 4.5 g L<sup>-1</sup> glucosa, 2 mmol L<sup>-1</sup> glutamina, 0.11 g L<sup>-1</sup> sodio piruvato y FBS al 10%. DMEM PC12=4.5 g L<sup>-1</sup> glucosa, 2 mmol L<sup>-1</sup> glutamina, 0.11 g L<sup>-1</sup> ácido ascórbico, FBS al 5%, FHS al 5% y 1% penicilina/estreptomicina). Dado que el ensayo implicaba incubar por 48 hrs, los experimentos se hicieron a confluencia inicial del 40% aproximadamente.

En cada pocillo se agregó una alícuota de los distintos complejos a una concentración de cada analito de 1 μmol L<sup>-1</sup>, en la combinación que se muestra en el esquema inferior en el respectivo medio de cultivo -total de 15 sistemas- haciendo 3 repeticiones de cada grupo por línea celular. Se incubó 48 hrs a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, para luego cambiar el medio por uno nuevo que contenía el reactivo Alamar blue. Luego de 3 horas extras de incubación, se determinó la sobrevivencia celular en el equipo NOVostar

multiplate reader a 580 nm. El control de viabilidad (C+) fue células incubadas sólo con medio y el control de muerte celular (C-) fue tritón al 0.1%. La comparación entre los grupos de control y los complejos se realizó utilizando la herramienta ANOVA de una manera del software Origin™ 8.0 con  $p < 0.05$  para diferencias significativas entre los grupos estudiados.

		FÁRMACO			
		-	MTX	OCT	MTX-OCT
DENDRÍMERO		COMPLEJOS			
-	COMPLEJOS	-	MTX	OCT	MTX-OCT
PAMAM		PAMAM	PAMAM MTX	PAMAM OCT	PAMAM O+M
PAMAM-FA		PAMAM-FA	PAMAM-FA MTX	PAMAM-FA OCT	PAMAM-FA O+M
PAMAM-PEG		PAMAM-PEG	PAMAM- PEG MTX	PAMAM- PEG OCT	PAMAM- PEG O+M

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

Los dendrímeros PAMAM modificados con FA y PEG (PAMAM-FA y PAMAM-PEG) se sintetizaron como nanotransportadores biocompatibles, con diferente tamaño, carga y funcionalidad de superficie. La espectroscopia de RMN se empleó para medir las relaciones de sustitución y para verificar la unión covalente de FA y PEG a la superficie PAMAM. Se llevaron a cabo ensayos de viabilidad celular para confirmar la reducción de la citotoxicidad de PAMAM-FA y PAMAM-PEG en comparación con el dendrímero sin funcionalizar. La cinética plasmática in vivo de los materiales preparados se midió para evaluar el efecto de la unión de FA y PEG en el tiempo de circulación de la sangre de PAMAM-G4. Finalmente, para evaluar una terapia combinada, se formaron complejos farmacológicos utilizando octreótido –análogo estructural de somatostatina- y metotrexato; los cuales fueron probados en cultivos de líneas celulares de cáncer para comprobar cualquier efecto sinérgico.

## SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS SISTEMAS NANOTRANSPORTADORES BASADOS EN PAMAM-G4 CON POLIETILENGLICOL Y ÁCIDO FÓLICO.

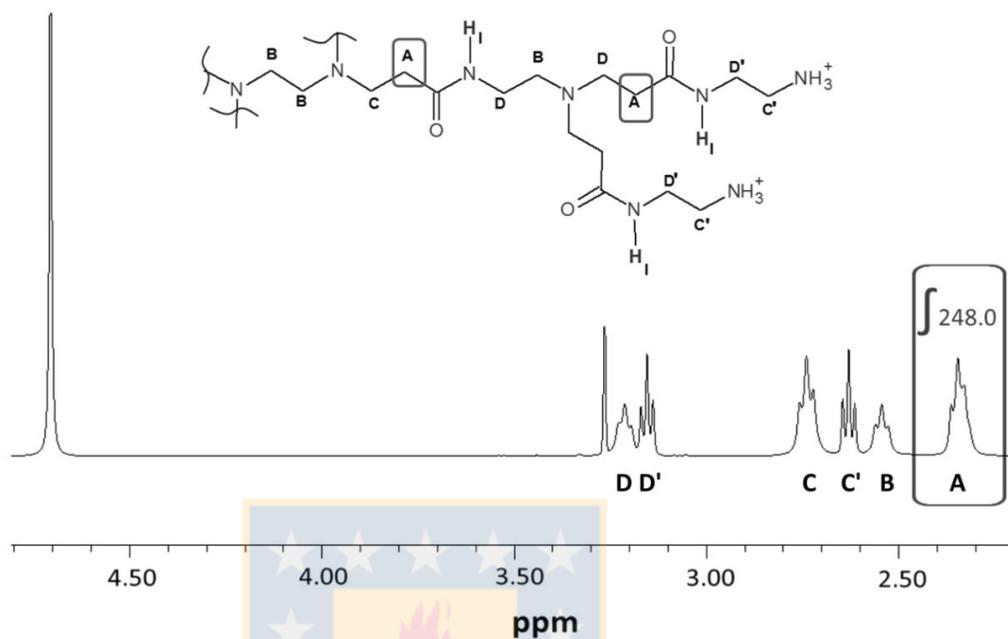
Basado en la información recopilada, se decidió que las moléculas que representaban mejor la diversidad de nanotransportadores funcionalizados, serían polietilenglicol y ácido fólico. De esta forma se podría analizar la variación del tamaño y carga superficial del dendrímero y como estos cambios afectarían su comportamiento farmacocinético y la interacción con las drogas a transportar.

A partir de estudios de espectroscopia RMN se determinó la cantidad de moléculas promedio covalentemente unidas al dendrímero y con este antecedente fueron calculadas las masas molares nominales de cada sistema sintetizado y su carga superficial residual.

En primer lugar, se realizó la caracterización estructural del dendrímero PAMAM de cuarta generación a través de RMN  $^1\text{H}$ , para asignar las señales y determinar la más apropiada de estas para integrar y conocer el porcentaje de funcionalización de manera más precisa.

En la figura 12 se encuentra el espectro del dendrímero PAMAM sin funcionalizar y en la tabla 3 la respectiva asignación. En él se observaron los tripletes característicos de los seis hidrógenos de los metilenos que

logran diferenciarse entre sí en el polímero. La señal A, representó una integral equivalente a los 248 hidrógenos de esa posición, y dado que – junto con la señal B- son las únicas señales del dendrímero que no se verían afectadas por la funcionalización alterando su desplazamiento químico en el espectro o por cambio en la simetría de la estructura solapar con otra. Entonces, esta fue escogida como referencia para saber el grado de conjugación superficial de PAMAM. Al ser la señal “A” correspondiente a un grupo de hidrógenos metilénicos de capas internas del dendrímero, no se solapó con otras señales y apareció suficientemente separada de las demás. Ello ha permitido integrar correctamente para hacer la relación entre cantidad de hidrógenos del dendrímero con respecto a hidrógenos de los grupos funcionales presentes en las moléculas empleadas en para las funcionalizaciones.



*Elaboración propia*

**Figura 12.** Espectro RMN  $^1\text{H}$  en  $\text{D}_2\text{O}$  para PAMAM-G4.

**Tabla 3.** Asignación de señales e integrales del espectro de  $^1\text{H}$  para PAMAM-G4.

H	$\delta$ (ppm)	INTEGRAL
A	<b>2.34</b>	<b>248.0 *</b>
B	2.55	120.5
C'	2.63	128.4
C	2.74	247.5
D'	3.15	126.5
D	3.22	123.9

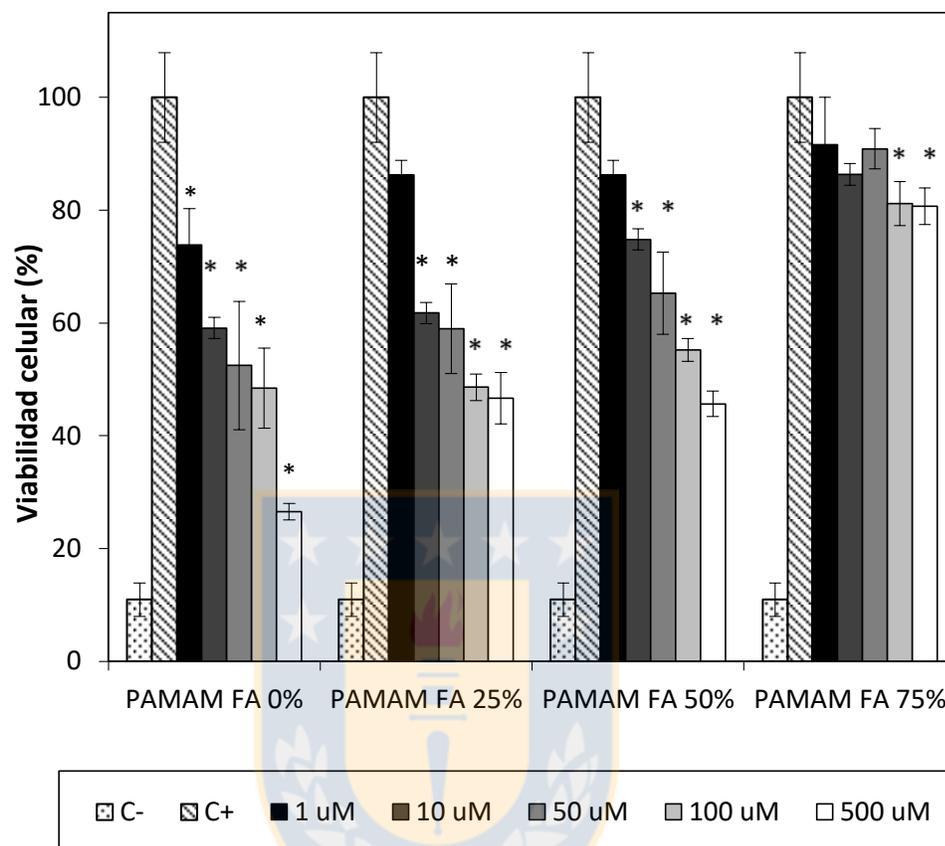
*Elaboración propia*

## FUNCIONALIZACIÓN DE DENDRÍMEROS PAMAM CON ÁCIDO FÓLICO

El dendrímero PAMAM fue funcionalizado con ácido fólico para representar estructuralmente el desarrollo de un nanotransportador capaz de penetrar en distintos tejidos ayudado por la interacción con su receptor.

Antes de decidir un porcentaje de funcionalización, se realizaron estudios de viabilidad celular a distintos porcentajes de folato en la superficie del dendrímero: 25, 50 y 75%; los cuales se compararon con PAMAM de cuarta generación nativo como sistema de referencia (figura 13).

Los resultados de sobrevivencia confirman la tendencia de que la conjugación de moléculas a la superficie del dendrímero disminuye la toxicidad causada por las aminas superficiales. Sin embargo, 25% de funcionalización no amortigua suficiente la carga de los PAMAM y el 75% vuelve el sistema demasiado hidrofóbico para ser utilizado en soluciones acuosas. Por lo tanto, el porcentaje elegido para los estudios posteriores fue funcionalizar alrededor del 50% de las aminas primarias superficiales del dendrímero.

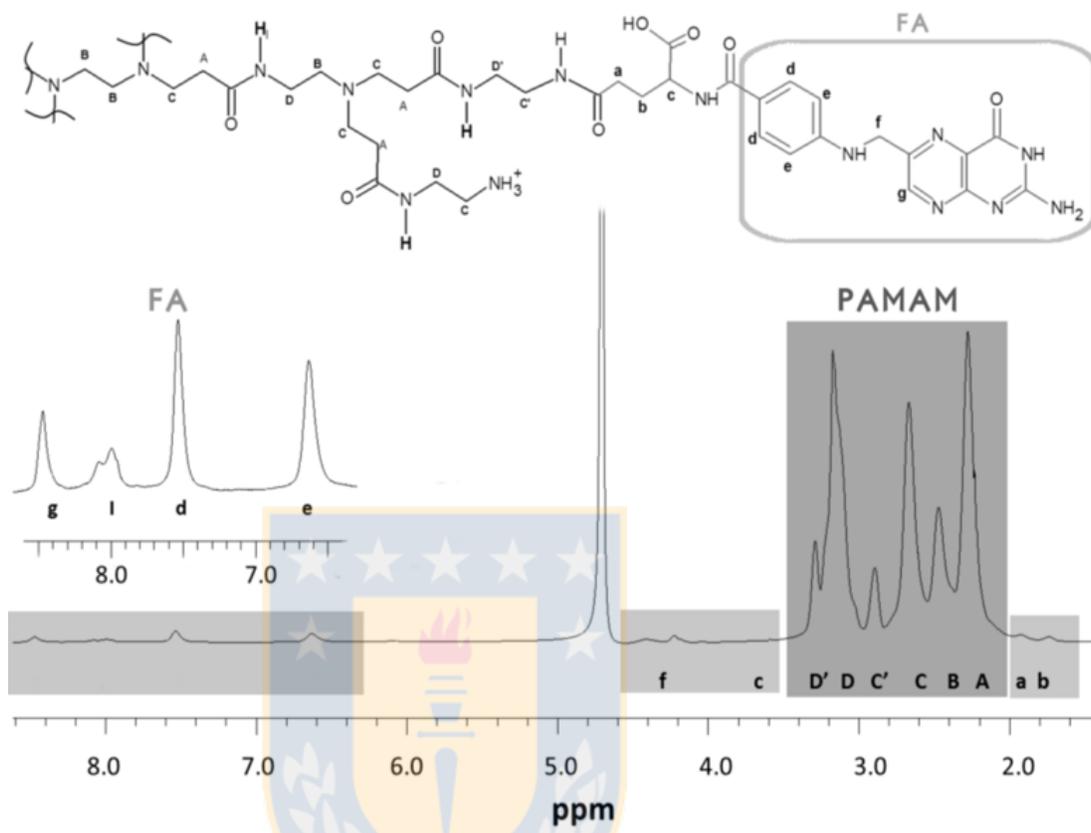


*Elaboración propia*

**Figura 13.** Sobrevivencia celular en células HEK-293 a concentraciones crecientes de dendrímeros PAMAM-G4 y PAMAM con ácido fólico desde 25 al 75%, incubadas por 24 horas y 37°C a 5% CO<sub>2</sub>. El control negativo (C-) corresponde a tritón 0,1% y el control positivo (C+) a las células incubadas sólo con medio. Diferencias significativas \* p < 0.05 con respecto a C+.

En la figura 14 se muestra el espectro RMN  $^1\text{H}$  de PAMAM-FA en  $\text{D}_2\text{O}$  y en la tabla 4 la respectiva asignación de cada una de las señales de la estructura final del nuevo sistema. En él, se corrobora la unión covalente a PAMAM con la aparición de las señales de los hidrógenos aromáticos característicos del ácido fólico, los que fueron destacados en la zona ampliada del espectro de protones. El ensanchamiento de estas señales también confirma la conjugación, puesto que al unirse a una molécula de mayor tamaño, se ve alterado el tiempo de relajación de los protones del folato y provocando esta alteración reflejada en el espectro. Este efecto y el solapamiento de algunas señales entre el dendrímero y el folato hicieron imposible integrar todas las señales.

El porcentaje de funcionalización de este sistema nanotransportador fue determinado a partir de la relación entre las integrales de los hidrógenos metilénicos de PAMAM (señal A) y los hidrógenos alifáticos del ácido fólico (señales a y b). El resultado de esta razón reveló que hay en promedio 25 moléculas de folato por dendrímero, lo que implica un porcentaje de funcionalización superficial del 39% aproximadamente.



*Elaboración propia*

**Figura 14.** Espectro RMN de  $^1\text{H}$  para PAMAM-FA en  $\text{D}_2\text{O}$ .

**Tabla 4.** Asignación de señales e integrales del espectro de  $^1\text{H}$  para PAMAM-FA.

H	$\delta$ (ppm)		INTEGRAL
b	1.74	}	101.2
a	1.93		
A	2.22		248.0*
B	2.47		-
C'	2.68		-
C	2.89		-
D'	3.17		-
D	3.29		-
c	3.60		-
f	4.42		32.0
e	6.63		29.5
d	7.54		32.4
l	8.05		-
g	8.47		15.2

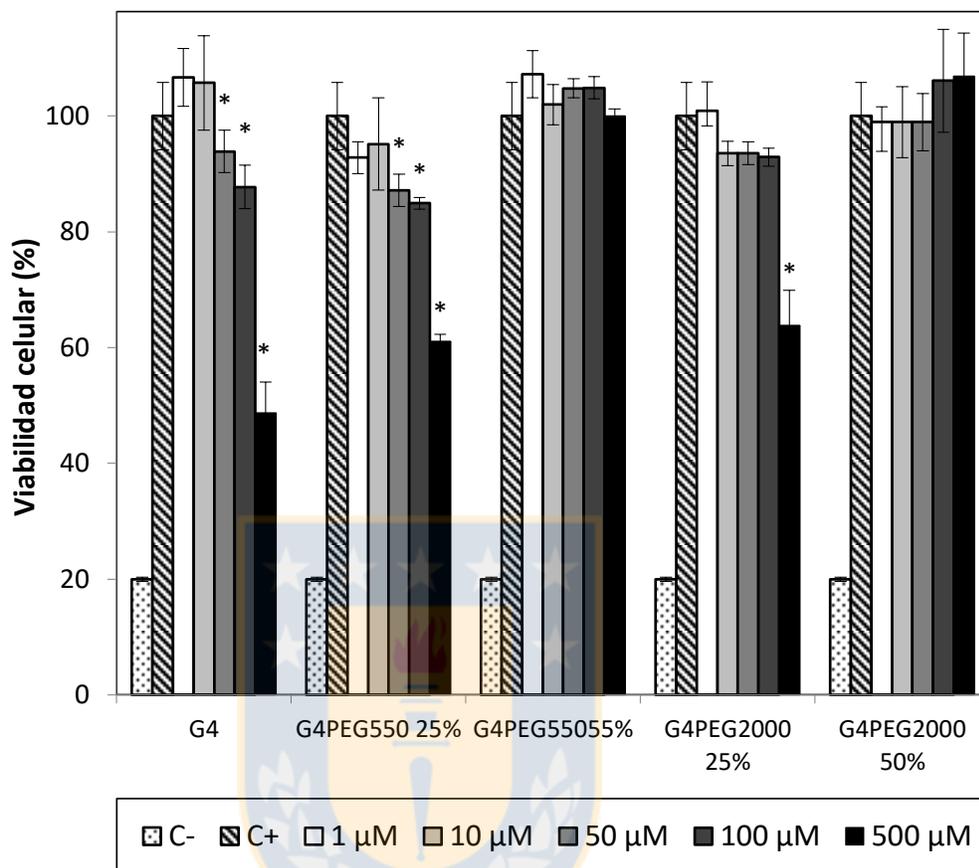
*Elaboración propia*

## FUNCIONALIZACIÓN DE DENDRÍMEROS PAMAM CON POLIETILENGLICOL

La funcionalización de dendrímeros PAMAM con polietilenglicol-metil-eter de 550 y 2000 Da, se llevó a cabo con la finalidad de obtener un sistema nanotransportador capaz de aumentar su retención en el organismo –a causa de su incremento considerable en tamaño y masa- luego de la funcionalización.

En principio y de forma exploratoria, se llevaron a cabo funcionalizaciones a PAMAM G4 con ambos largos de cadena y abarcando dos porcentajes de las aminas primarias superficiales: 25 y 50%. Esto con la finalidad de encontrar el grado de funcionalización adecuado para producir un sistema nanotransportador cuya capacidad de encapsulación sea máxima y su toxicidad mínima.

Los estudios de viabilidad celular en células embrionarias de riñón (figura 15), revelaron que los sistemas pegilados al 50% no afectan significativamente la viabilidad celular en todo el rango de concentraciones analizado. En adición, se comprobó un efecto amortiguador de la citotoxicidad a causa del largo de cadena de polietilenglicol, puesto que el dendrímero PAMAM-PEG de 2000 Da al 25% mostró ser menos citotóxico a concentraciones bajo 100  $\mu\text{M}$  con respecto a su análogo PAMAM-PEG de 550 Da.



*Elaboración propia*

**Figura 15.** Sobrevivencia celular en células HEK-293 a concentraciones crecientes de dendrímeros PAMAM-G4 pegilados con PEG de 550 y 2000 Da, incubadas por 24 horas y 37°C a 5% CO<sub>2</sub>. El control negativo (C-) corresponde a tritón 0,1% y el control positivo (C+) a las células incubadas sólo con medio. Diferencias significativas \* p < 0.05 con respecto a C+.

Para complementar lo anterior, se realizó estudios de encapsulación de fármacos poco solubles en solución acuosa, usando como modelo silibina. Los resultados señalaron que la pegilación triplica la capacidad de carga del dendrímero. Además, la carga de droga aumenta alrededor de un 15% al utilizar dendrímeros PAMAM con PEG de 2000 Da en su superficie con respecto al de 550 Da [59]. Al cambiar la droga a metotrexato, este incremento alcanza el 50% en su capacidad de encapsulación [60].

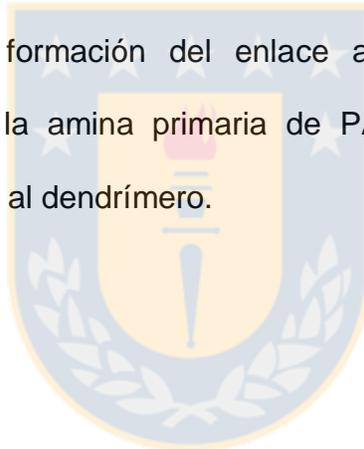
A la luz de estos resultados y esperando que el aumento considerable en tamaño de PAMAM –al funcionalizarlos con PEG de 2000 Da- se obtuviera mayor permanencia en circulación y se potenciara el efecto de retención de estas macromoléculas (efecto EPR) en las cercanías de un tumor, se pegiló con este largo de cadena un total de 50% de las aminas disponibles del dendrímero para ejecutar los estudios siguientes.

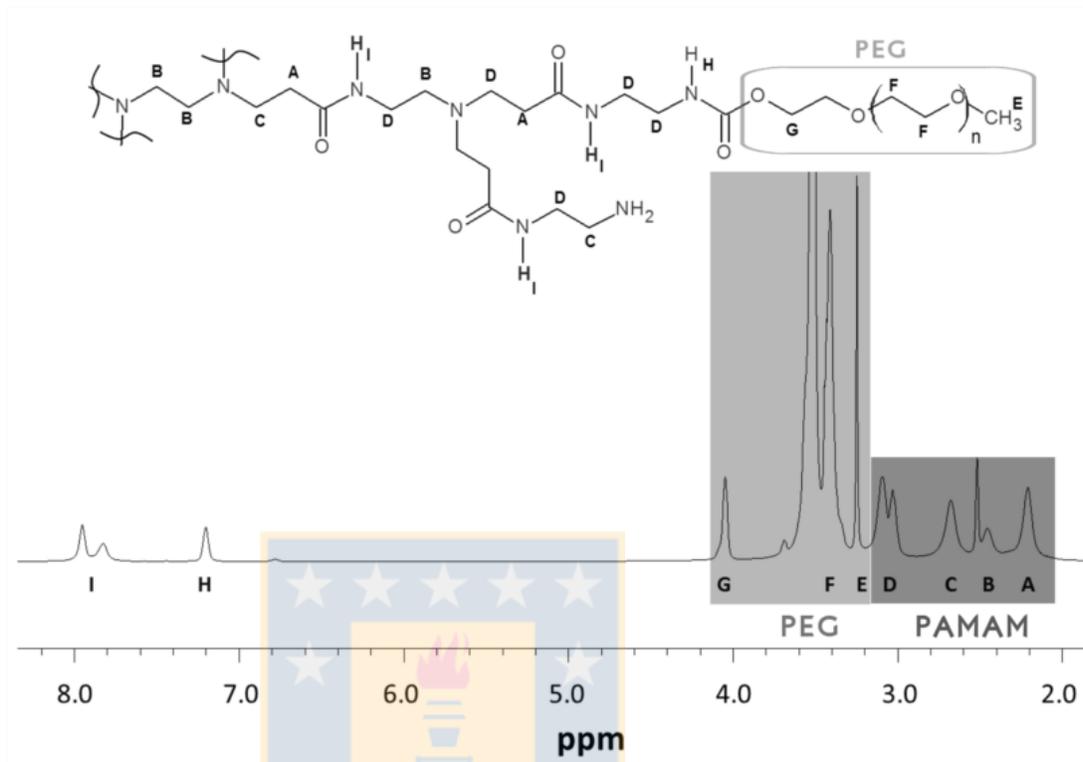
En la figura 16 se muestra el espectro RMN de  $^1\text{H}$  de PAMAM-PEG en DMSO- $d_6$  y en la tabla 5 su respectiva asignación para cada uno de los hidrógenos que logran diferenciarse. Se puede apreciar en singlete característico de los hidrógenos que componen el metoxilo final de la cadena de polietilenglicol-metil-eter (señal E) y la señal de los hidrógenos que forman parte del metileno más proximo al enlace amida formado entre PAMAM y polietilenglicol (señal G), el cual es el grupo con los hidrógenos

más desapantallados del polímero y logran distar lo suficiente de las demás señales como para integrar adecuadamente.

La relación entre la integral de polietilenglicol y los hidrógenos del metileno de PAMAM (señal A) da un número promedio de 33 cadenas de polietilenglicol por dendrímero, por lo tanto, el sistema naotransportador pegilado está funcionalizado al 52% aproximadamente.

Por último, es posible observar una señal alrededor de 7.2 ppm, la cual es distintiva de la formación del enlace amida entre el carbonato del polietilenglicol y la amina primaria de PAMAM, corroborando la unión covalente exitosa al dendrímero.



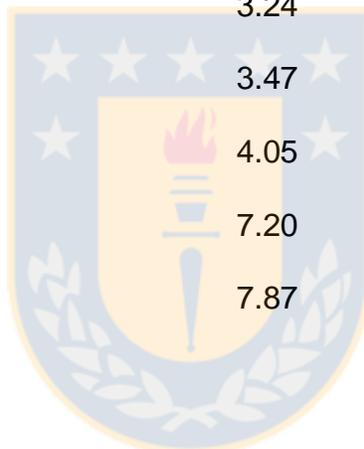


*Elaboración propia*

**Figura 16.** Espectro RMN de  $^1\text{H}$  para PAMAM-PEG en  $\text{DMSO-d}_6$ .

**Tabla 5.** Asignación de señales e integrales del espectro de  $^1\text{H}$  para PAMAM-PEG.

<b>H</b>	<b><math>\delta</math> (ppm)</b>	<b>INTEGRAL</b>
A	2.21	248.0*
B	2.44	120.7
C	2.68	291.6
D	3.07	427.1
E	3.24	99.5
F	3.47	2300.1
G	4.05	65.4
H	7.20	30.7
I	7.87	121.6



*Elaboración propia*

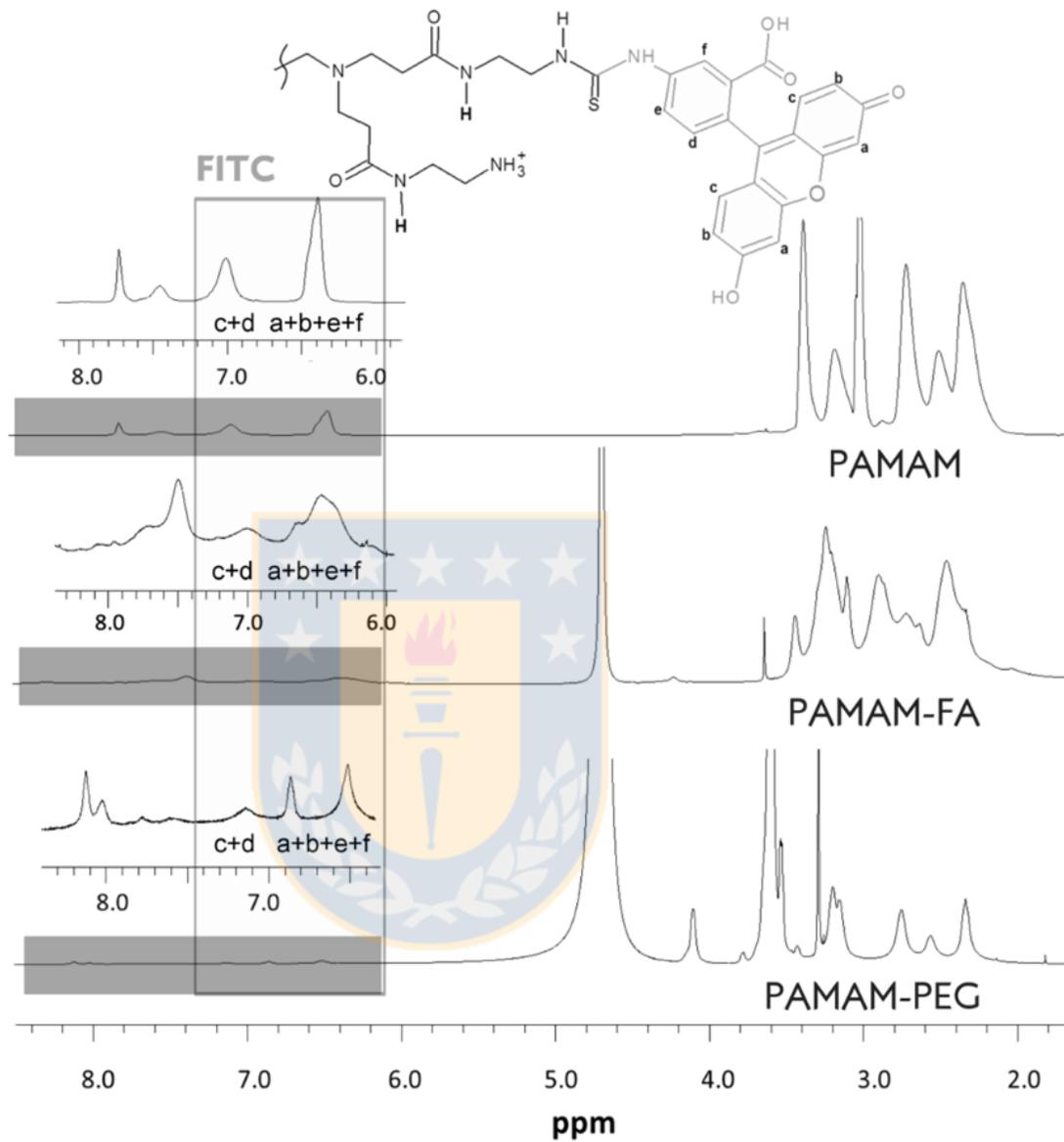
## FUNCIONALIZACIÓN CON DE LOS SISTEMAS PAMAM, PAMAM-FA Y PAMAM-PEG CON FLUORESCÉINA ISOTIOCIANATO

Con el fin de determinar la concentración de dendrímero en la sangre de ratones a distintos tiempos, los sistemas sintetizados –una vez purificados y caracterizados- fueron marcados con fluoresceína isotiocianato al igual que PAMAM de cuarta generación sin funcionalizar, para tener una referencia del comportamiento base de esta clase de nanomaterial, dado que en bibliografía no se encontró algún reporte de datos farmacocinéticos atribuibles a este sistema. La molécula de FITC permite medir por espectrofluorimetría dicho parámetro, en una zona del espectro visible donde otras moléculas biológicas no emiten fluorescencia, evitando cualquier interferencia en los resultados experimentales que puedan dar falsos positivos.

En la figura 17 se encuentran los espectros RMN  $^1\text{H}$  en  $\text{D}_2\text{O}$  de los compuestos marcados con FITC y en la tabla 6 la asignación correspondiente a las señales de los hidrógenos de los nuevos nanomateriales generados. En ellos se observa las señales características de fluoresceína en la zona aromática (zona ampliada del espectro), sin embargo, dado el número reducido de moléculas enlazadas al dendrímero y el ensanchamiento de las bandas espectrales causadas por esta misma unión, los picos están poco definidos.

La razón de la integral entre las señales de los hidrógenos del metileno “A” de PAMAM y los hidrógenos aromáticos de FITC dio un promedio de 4 moléculas de fluoresceína por nanotransportador. Este resultado muestra de igual modo, la reproducibilidad de la reacción de marcaje en las condiciones realizadas –con un rendimiento mayor al 50% - y dando por resultado la misma proporción de fluoróforo en todos los dendrímeros generados.





*Elaboración propia*

**Figura 17.** Espectro RMN  $^1\text{H}$  de PAMAM, PAMAM-FA y PAMAM-PEG en  $\text{D}_2\text{O}$ .

**Tabla 6.** Asignación de señales e integrales del espectro de  $^1\text{H}$  para los dendrímeros PAMAM funcionalizados con FITC.

DENDRIMERO-FITC	H	$\delta$ (ppm)	INTEGRAL
	A	2.32	248.0*
PAMAM	a, b, e, f	6.41	24.8
	c, d	6.95	16.5
PAMAM-PEG	a, b, e, f	6.56	29.4
	c, d	6.93	20.3
PAMAM-FA	a, b, e, f	6.45	24.6
	c, d	6.93	17.1

*Elaboración propia*

Una vez realizadas las caracterizaciones, con los datos de funcionalización obtenida de los espectros RMN, fue confeccionado un resumen con algunas de sus nuevas características. También se agregó el radio de giro ( $R_g$ ), como parámetro calculado por dinámica molecular dentro de nuestro grupo de investigación, para cada uno de los PAMAM sintetizados más el sistema nativo como referencia.

**Tabla 7.** Parámetros estimados para PAMAM, PAMAM-FA y PAMAM-PEG [61].

	$R_g$ (Å)	MM NOMINAL (g/mol)	MOLECULAS UNIDAS	N° AMINAS PRIMARIAS	CARGA SUPERFICIAL NOMINAL
PAMAM	20.7±0.3	14215	0	64	+64
PAMAM-FA	19.1±0.2	25240	25	39	+14
PAMAM-PEG	36.4±0.5	60215	33	31	+31

*Elaboración propia*

En el compilado de la tabla 7, se observa la variación de cada nuevo nanomaterial con respecto a PAMAM. Ambas moléculas variaron en proporción la masa molar nominal y sobre todo la carga superficial. El cambio más significativo se puede ver con ácido fólico, dado que no sólo neutraliza parte de las cargas superficiales, sino que aporta con un grupo aniónico a la estructura.

Sorpresivamente, para los resultados comparativos de radio de giro de los sistemas, la funcionalización con folato tiende a disminuir el tamaño del sistema, por la tendencia de la parte más hidrofóbica de esta molécula a ocultarse dentro del dendrímero. No es un cambio drástico, pero sí muy notable pensando que la masa molar casi se duplica y comparándolo, por otro lado, con el efecto de las cadenas de polietilenglicol en la superficie de PAMAM.

## EFFECTO DE LA MODIFICACIÓN ESTRUCTURAL DE PAMAM SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR *IN VITRO*

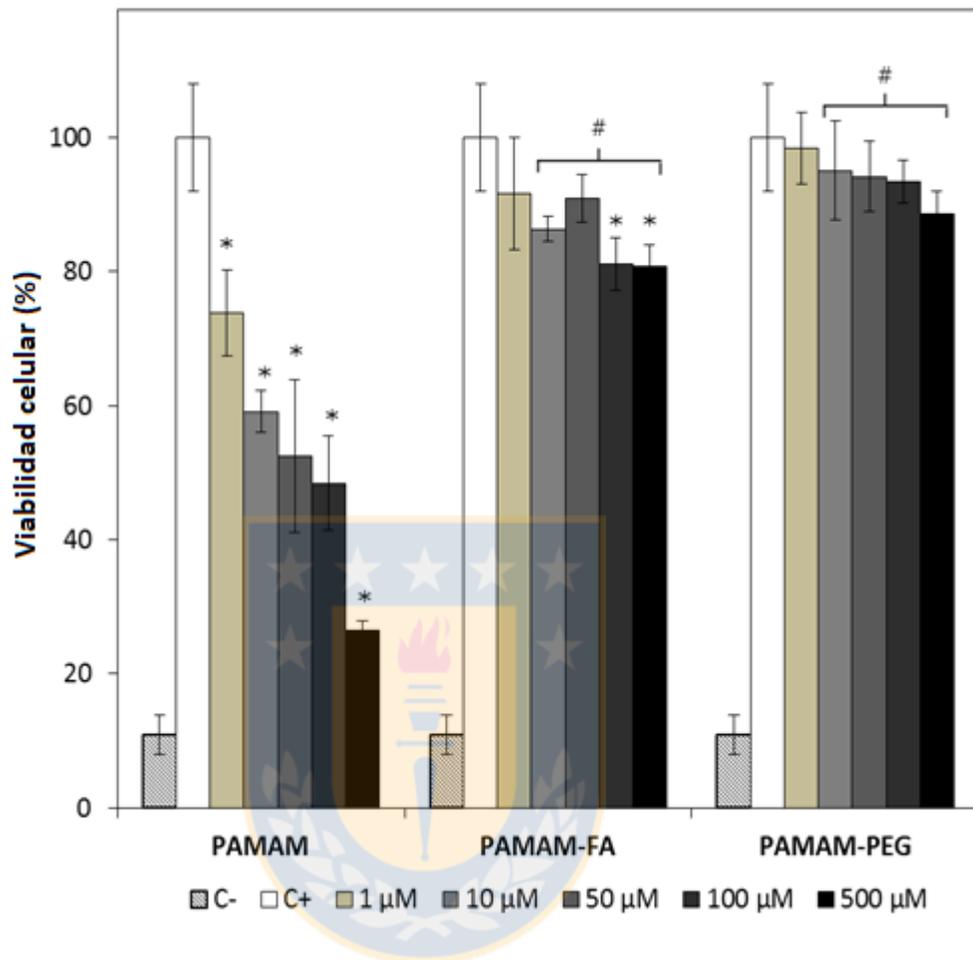
Los efectos tóxicos de los dendrímeros poliamidoamina de cuarta generación o superior –debido a su carga policatiónica- han sido ampliamente descritos y evaluados *in vitro* en una serie de líneas celulares. Por esta razón, se hace necesario aplacar el efecto de la carga de las aminas primarias superficiales de PAMAM, para aumentar su biocompatibilidad sin perjudicar sus propiedades como nanotransportador, con una serie de moléculas que sean inocuas. Para mantener una encapsulación de fármacos óptima y minimizar la toxicidad, se determinó que un porcentaje adecuado de funcionalización sería 50%.

La citotoxicidad de PAMAM fue evaluada en un rango de concentraciones de 1 a 500  $\mu\text{mol L}^{-1}$  usando el ensayo Alamar Blue en cultivos de células HEK. En la figura 17 se observa que a concentraciones crecientes de dendrímeros PAMAM sin funcionalizar disminuye la viabilidad significativamente con respecto al control de sobrevivencia celular. Luego de 24 horas de incubación, la sobrevivencia celular alcanza el 50% a 50  $\mu\text{M}$  y a 500  $\mu\text{M}$  esta se encuentra por debajo del 25%.

Por otro lado, PAMAM-FA y PAMAM-PEG resultaron no ser tóxicos en todo el rango de estudio en comparación con el control de viabilidad. Esto

muestra que la modificación cercana al 50% de las aminas primarias de PAMAM-G4 disminuye la citotoxicidad asociada a las cargas positivas significativamente, incluso ante una exposición de concentración y tiempo elevadas. Aunque las moléculas utilizadas para llevar a cabo la funcionalización del dendrímero tengan diferente estructura, tamaño y polaridad, los cultivos celulares no mostraron verse afectados por las características particulares del ácido fólico –una molécula hidrofóbica- o del polietilenglicol, una molécula hidrofílica que aumenta el tamaño y masa de PAMAM considerablemente.





*Elaboración propia*

**Figura 18.** Viabilidad celular (%) en la línea celular HEK para soluciones de concentración creciente de PAMAM-G4, FA-PAMAM y PEG-PAMAM (1-500  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). El control de supervivencia fue células incubadas solo con medio (C +). El control de la muerte celular fue células incubadas con medio y tritón al 0,1% (C-).  $p < 0.05$  indica diferencias significativas: \* respecto a C+ y # entre PAMAM-FA, PAMAM-PEG y PAMAM-G4 a la misma concentración.

## ANÁLISIS DE LA CINÉTICA PLASMÁTICA DE DENDRÍMEROS PAMAM Y EL EFECTO DE SU MODIFICACIÓN SUPERFICIAL

El análisis de la cinética plasmática de cada dendrímero fue realizado a partir de una administración intraperitoneal de los nanotransportadores disueltos en suero salino, midiendo su concentración en sangre a través del tiempo.

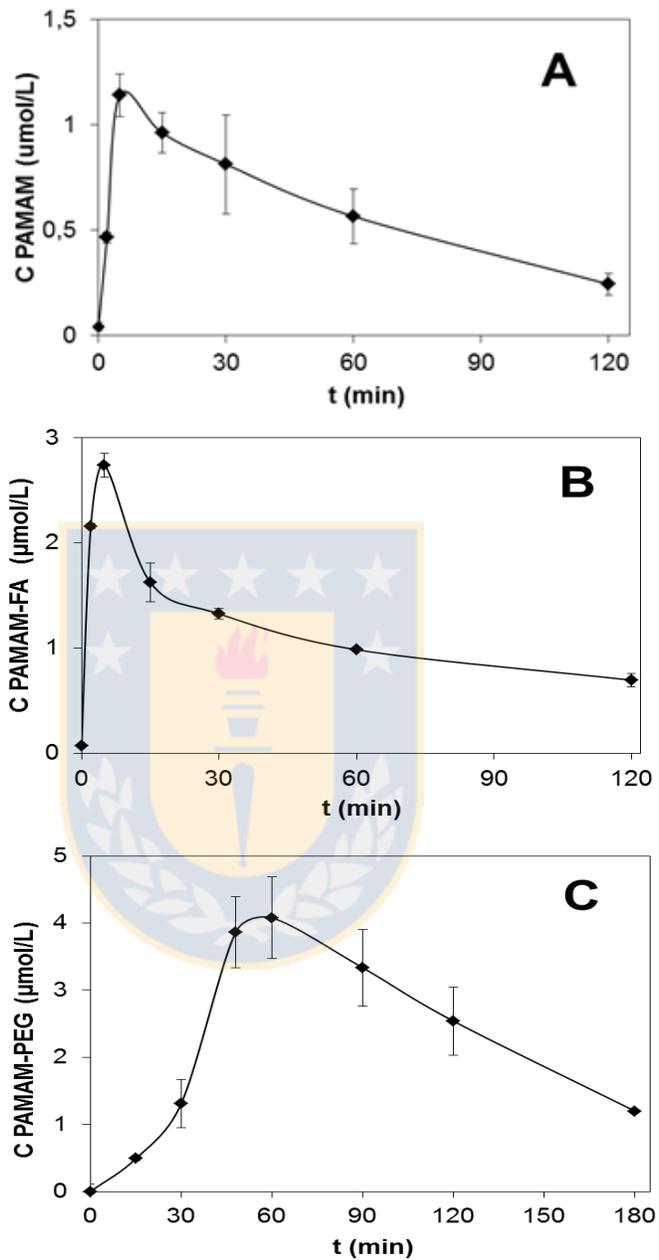
El modelo no-compartimental fue el empleado en este estudio, pues se obtienen resultados mucho más representativos estadísticamente sin incorporar el concepto de compartimento. Por otro lado, el ajuste a modelos compartimentales se ve en la mayoría de los casos susceptible a la percepción de quien realiza el ajuste y la matemática asociada es muy compleja. En adición, cuando se tiene un grupo de estudio diverso, como es el caso de los nanomateriales funcionalizados en esta investigación, resulta difícil aplicar un mismo ajuste cinético para hacer una comparación objetiva.

Ante lo anterior, los dendrímeros PAMAM como referencia y PAMAM-FA y PAMAM-PEG, se analizaron asumiendo una cinética de primer orden y se estimaron todos los parámetros farmacocinéticos a partir del modelo no-compartimental usando el método trapezoidal.

PAMAM y PAMAM-FA mostraron una absorción y eliminación muy rápida en el torrente sanguíneo (figura 19 A y B), presentando ambos su concentración máxima en la sangre a los 5 minutos post inyección (PAMAM  $1.14 \pm 0.10 \mu\text{mol L}^{-1}$ , PAMAM-FA  $2.74 \pm 0.12 \mu\text{mol L}^{-1}$ ).

Por otra parte, PAMAM-PEG (figura 19 C) mostró una absorción y eliminación del plasma mucho más lenta con respecto a los otros sistemas. La concentración máxima fue a los 60 minutos luego de la inyección y fue además la más alta ( $4.08 \pm 0.53 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) a pesar de que las dosis fueron iguales para todos los dendrímeros en estudio. Con esto se observa una tendencia de que el aumento en la masa molar de los dendrímeros a raíz de la funcionalización aumentaría su biodisponibilidad en la sangre.

La variación *in vivo* en la concentración plasmática con respecto al tiempo de PAMAM-G4, PAMAM-FA y PAMA-PEG después de la administración extravasal (intraperitoneal) se muestra en la figura 19.



*Elaboración propia*

**Figura 19.** Diagrama de concentración en  $\mu\text{molL}^{-1}$  de dendrímeros PAMAM (A), PAMAM-FA (B) y PAMAM-PEG (C) marcados con FITC por unidad de tiempo (min).

**Tabla 8.** Parámetros de farmacocinética no-compartimental calculados para PAMAM, PAMAM-FA y PAMAM-PEG luego de una inyección i.p. a ratones wild type [61].

PARÁMETRO	SISTEMA		
	PAMAM	FA-PAMAM	PEG-PAMAM
$C_{max}$ (mg mL <sup>-1</sup> )	0.0162 ± 0.0014	0.0685±0.0030	0.318±0.031
$C_{max}$ (μmol L <sup>-1</sup> )	1.14 ± 0.10	2.74 ± 0.12	4.08 ± 0.53
$k_e$ (min <sup>-1</sup> )	0.0130±0.00052	0.0174±0.0044	0.00966±0.00088
$t_{1/2}$ (min)	53.5	38.8	71.7
$AUC_{0 \rightarrow \infty}$ (mg min mL <sup>-1</sup> )	1.28	4.63	41.3
$AUMC_{0 \rightarrow \infty}$ (mg min <sup>2</sup> mL <sup>-1</sup> )	98	340	5488
MRT (min)	77.6	73.5	133.0
Cl/F	0.334	0.164	0.0569
$V_{ss}/F$	25.9	12.0	7.6

*Elaboración propia*

En los estudios de cinética de plasma, las diferencias estructurales y de tamaño entre los sistemas PAMAM modificados en la superficie se hicieron más evidentes, ya que el sistema PAMAM-PEG exhibió el tiempo de circulación sanguínea más prolongado y la  $C_{max}$  más alta en el

torrente sanguíneo en comparación con los sistemas PAMAM-G4 y PAMAM-FA. Según la data experimental la vida media disminuyó de 53.3 minutos en PAMAM-G4 a 41.8 minutos en PAMAM-FA, mientras que en PAMAM-PEG se extendió a 71.7 minutos; lo que representa un aumento de 1.7 veces en comparación con el dendrímero sin funcionalizar. Estos resultados revelan que las sustituciones con folato y polietilenglicol ejercen efectos opuestos sobre los tiempos de residencia de los nanomateriales en estudio, a pesar de que ambas sustituciones aumentan la masa molar de PAMAM-G4 en un grado significativo (Tabla 7).

Las estimaciones de  $R_g$ , realizadas en nuestro grupo de investigación y discutidas en el capítulo anterior, sugieren que las tendencias experimentales observadas en los parámetros  $k_e$ ,  $t_{1/2}$  y MRT están asociadas al tamaño de los sistemas en estudio, ya que las macromoléculas más pequeñas exhiben perfiles de absorción-eliminación más rápidos. Esto puede estar relacionado con una permeabilidad de membrana menos efectiva para sistemas más grandes, lo que lleva a un aumento de los tiempos de residencia en el plasma.

Además del tamaño, las diferentes propiedades cinéticas del plasma de los dendrímeros pueden estar interrelacionadas con las características inherentes de los grupos unidos a la superficie del dendrímero, como la carga y la hidrofobicidad. El aclaramiento más rápido (CI/F) y el mayor

volumen de distribución ( $V_{ss}/F$ ) de PAMAM en comparación con los derivados de FA y PEG se pueden explicar en términos de una asociación electrostática favorable entre los grupos amino terminales protonados de PAMAM y las distintas membranas celulares. En el caso de PAMAM-FA, la incorporación de grupos de cobertura aniónicos enmascara parcialmente las cargas superficiales de PAMAM, lo que dificulta el potencial de una rápida unión vascular. Además, la conjugación de ácido fólico aumenta el carácter lipófilo de la superficie de PAMAM, que puede asociarse con un aclaramiento reducido en comparación con los dendrímeros no funcionalizados.

La funcionalización con FA también proporciona a PAMAM la capacidad de interactuar con los receptores de folato presentes en todo el cuerpo, como se informó anteriormente en estudios de internalización de dendrímeros PAMAM funcionalizados con FA en células KB que sobreexpresan este receptor. A pesar de que tanto PAMAM como PAMAM-FA podrían ser internalizados, sus mecanismos de internalización pueden diferir, ya que existe evidencia de que ambos nanomateriales están asociados con endocitosis mediada por clatrina, pero PAMAM-FA también se internaliza mediante endocitosis mediada por caveolina [25]. Por lo tanto, los diferentes mecanismos de carga, hidrofobicidad e internalización celular pueden estar relacionados con el cambio en los

valores de  $C_{max}$ ,  $CI/F$  y  $V_{ss}/F$  de PAMAM en comparación con PAMAM-FA.

Con respecto al sistema PAMAM-PEG, la funcionalización de la superficie con grandes restos hidrófilos confiere a los dendrímeros propiedades inertes, no inmunogénicas y no antigénicas, junto con un aumento significativo de la solubilidad en agua, que resulta en una disminución de la absorción de macrófagos, hígado y bazo, y mejora la circulación sistémica, la biodistribución y la farmacocinética en comparación con el PAMAM nativo [62].

Conjuntamente, la barrera hidrofílica de PEG proporciona a PAMAM una capa de solvatación de agua que evita la biodegradación *in vivo* del nanomaterial, lo que reduce la tasa de eliminación del cuerpo. En efecto, los resultados comparativos obtenidos para PAMAM-FA y PAMAM-PEG sugieren que el sistema pegilado es un mejor candidato de nanotransportador en términos de un sistema de administración de fármacos más controlado y de acción prolongada.

# EFFECTO DE LA MODIFICACIÓN SUPERFICIAL DE DENDRÍMEROS PAMAM SOBRE EL EFECTO ANTIPROLIFERATIVO COMBINADO DE OCTREÓTIDO Y METOTREXATO

## ESTUDIO DE FLUORESCENCIA ENTRE OCTREÓTIDO Y DENDRÍMEROS PAMAM FUNCIONALIZADOS

Una vez caracterizados los nanotransportadores, se avanzó hacia la formación de los complejos fármacos-dendrímery se evaluaron sus interacciones, para comprender mejor cualquier efecto sinérgico que pudiese existir en el efecto antiproliferativo de las drogas estudiadas, beneficiando aún más la aplicación terapéutica.

Dentro de los componentes que formaron los complejos sólo octreótido posee fluorescencia. Esto se debe a la presencia de triptófano en su cadena peptídica, el cual fluoresce con gran rendimiento cuántico en la zona del ultravioleta. En efecto, la capacidad de determinar interacción mediante quenching de fluorescencia entre la mayoría de las proteínas y sus ligandos naturales es gracias a la presencia de este aminoácido.

Para mejor visualización de la interacción fueron graficados tanto los espectros de fluorescencia realizados durante la titulación de MTX, PAMAM, PAMAM-FA y PAMAM-PEG a la solución de octreótido y el

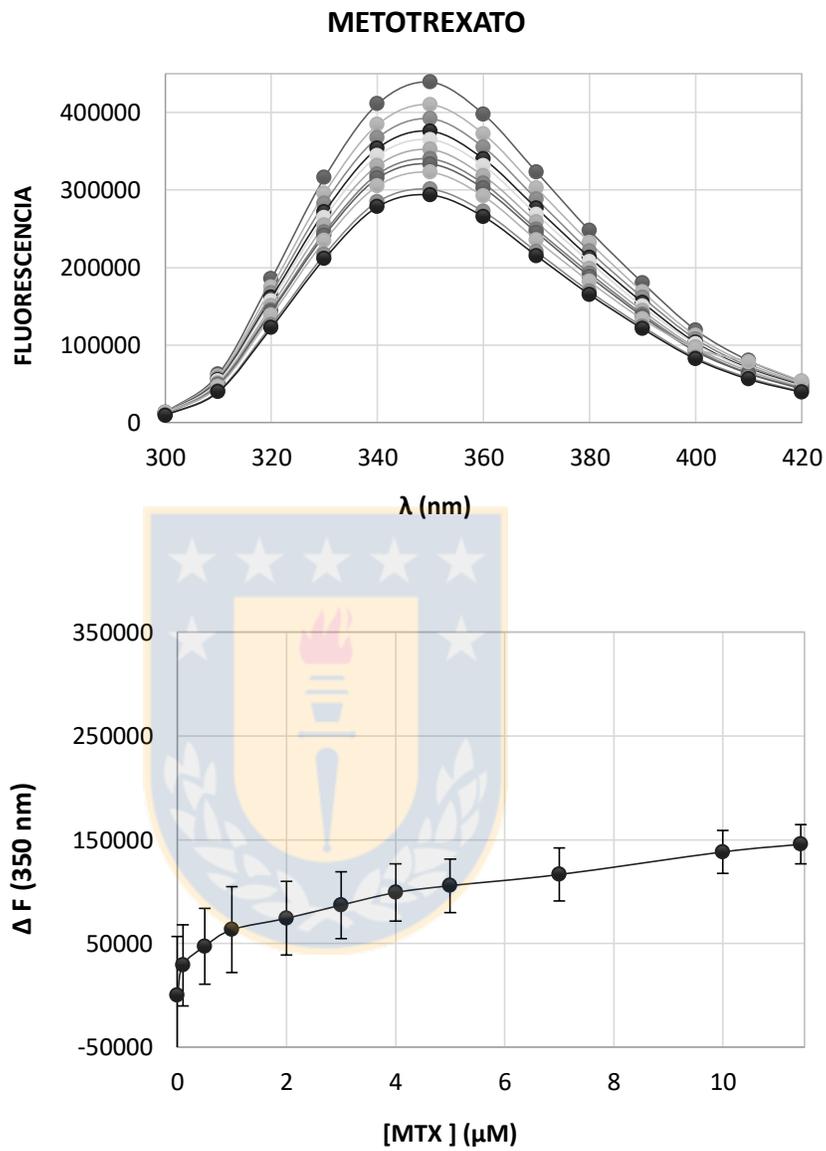
descenso de fluorescencia en el peak de emisión ( $\Delta F$  a 350 nm) contra el aumento de concentración de las sustancias tituladas. Se asume que al unirse el péptido a cualquiera de las otras moléculas, forma un complejo estable, lo que se traduce en una disminución de la intensidad de la fluorescencia. Mientras más fuerte sea esa interacción y a medida que más octeótrido se une al fármaco o a los dendrímeros el quenching observado es mayor.

En primer lugar se estudió la interacción entre OCT y MTX, asumiendo que la estequiometría era 1:1. Comprobando la interacción entre ambos en primer lugar se podría prescindir de evaluar el mismo quenching entre los dendrímeros y el fármaco (dado que ninguno de ellos fluorescen lo suficiente como para realizar un estudio de este tipo) y ya es conocida la encapsulación de MTX al interior de los PAMAM [34, 60].

Como se observa en la figura 20, a medida que se aumenta la concentración de MTX, se observa descender la emisión de octeótrido, confirmando la interacción entre ellos. Es probable que este complejo se vea favorecido por la presencia de los residuos básicos presentes en la cadena peptídica, cargados positivamente a pH cercano al neutro al cual se realizó el experimento, disponibles para interactuar con los dos grupos carboxilatos de MTX. No obstante, no sería suficientemente fuerte como para alcanzar una tendencia cercana al cero de fluorescencia. Esto podría

ser a raíz de la conformación que posee octeótrido, con un puente disulfuro que lo transforma en una especie de loop, dejando a un lado sus cargas positivas y en otro los residuos más apolares (como triptófano y fenilalanina) y limitando –por ende- su interacción con MTX a una zona más acotada.





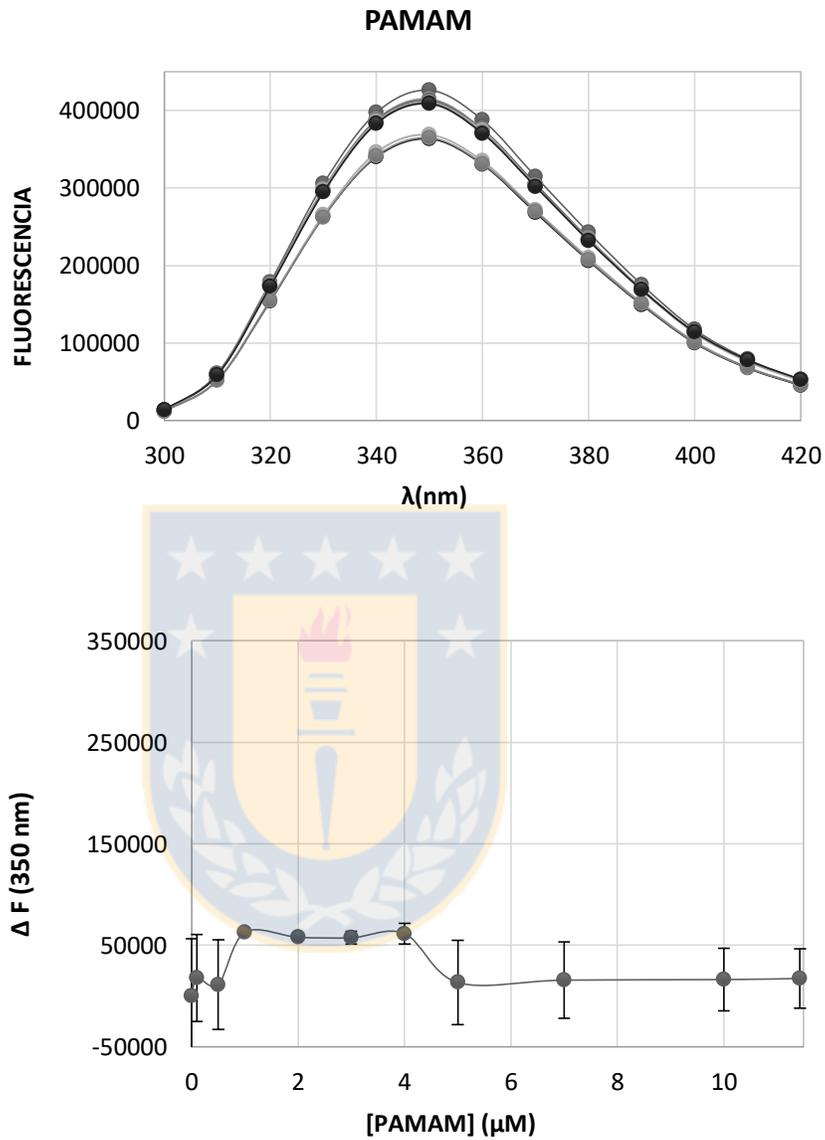
*Elaboración propia*

**Figura 20.** Quenching de fluorescencia de octreótido por interacción con metotrexato. En la parte superior los espectros de fluorescencia superpuestos; en la parte inferior el descenso de fluorescencia a 350 nm versus concentración de MTX.

Posteriormente se formaron los complejos con los dendrímeros PAMAM como referencia y PAMAM-FA y PAMAM-PEG para ver el efecto de la funcionalización en la encapsulación. Ya que se confirmó que octeótrido y metotrexato, este análisis se centró sólo en el quenching causado por los PAMAM al péptido.

En primer lugar se tituló octeótrido con PAMAM sin funcionalizar (figura 21). Al sobrepasar la concentración del péptido no se observaron diferencias significativas en los espectros de fluorescencia obtenidos. Al analizar el descenso neto a 350 nm a las distintas concentraciones de dendrímero se ve que esta gráfica es prácticamente asíntota al eje X, por lo tanto, no es posible confirmar la formación de un complejo entre estas especies.

Probablemente, este resultado se deba a la repulsión entre ambas especies, pues al pH trabajado tanto los residuos básicos de OCT como PAMAM se encontraban mayormente protonados. Por consiguiente, los dos como cationes generaron repulsión, impidiendo la posible encapsulación o formación de complejos supramoleculares.



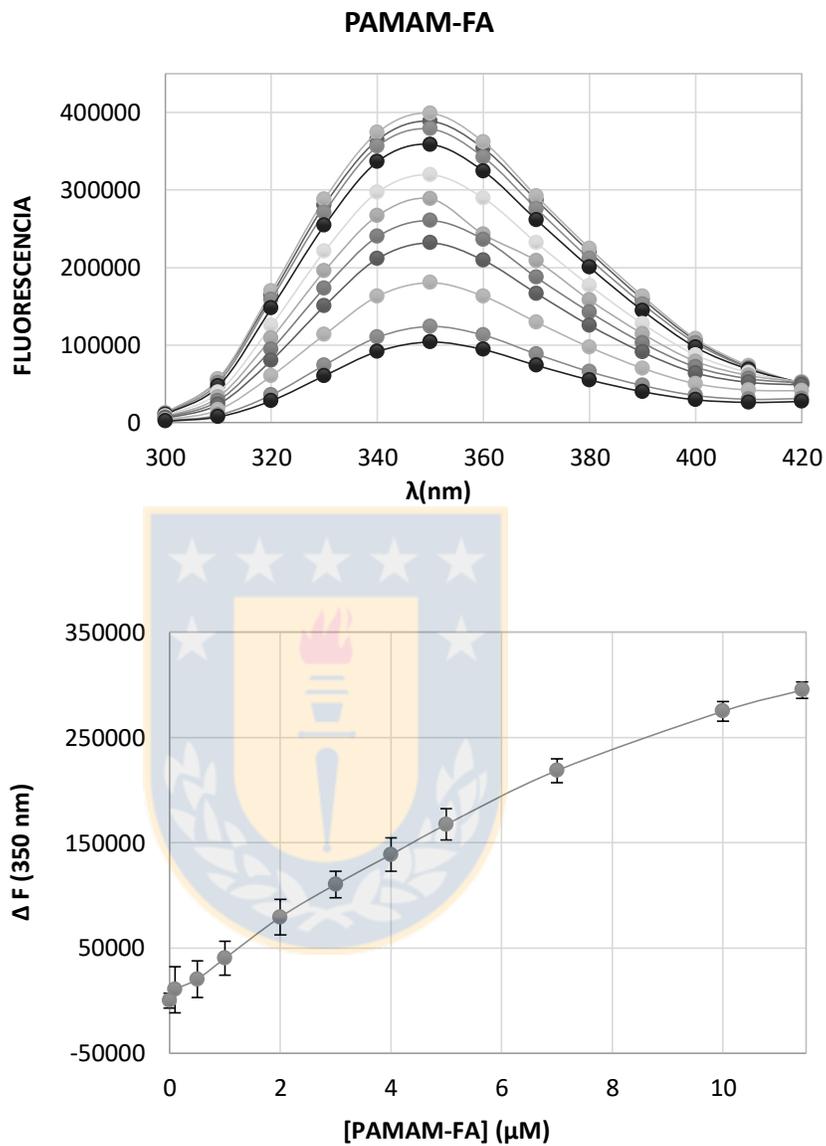
*Elaboración propia*

**Figura 21.** Quenching de fluorescencia de octreótido por interacción con PAMAM. En la parte superior los espectros de fluorescencia superpuestos; en la parte inferior el descenso de fluorescencia a 350 nm versus concentración de PAMAM.

En cuanto a OCT con PAMAM-FA, este estudio fue el que mostró la mayor disminución en la fluorescencia (figura 22), la cual bajó más de un 75% llegando a menos de 100 mil unidades al final de la titulación.

Como toda funcionalización, conjugar ácido fólico a la superficie de PAMAM disminuye las cargas positivas superficiales, reduciendo asimismo la repulsión con los grupos catiónicos del péptido. Además, al igual que metotrexato, la molécula de folato aporta con grupos aniónicos; observándose una interacción similar a la que existió entre OCT y el fármaco pero a mayor escala por los 25 folatos en la periferia del dendrímero.

En ese sentido, al presentarse entre este par de compuestos una de las interacciones no covalentes más fuertes, el descenso en la fluorescencia a medida que se formaba el complejo fue el más drástico de todos. Por otro lado, es posible que haya más de un sitio de interacción con el péptido, a raíz de la presencia de grupos hidrofóbicos disponibles para acercarse en ambas moléculas; y no se descarta la factibilidad de que exista encapsulación de octeótrido entre las ramas de PAMAM.



*Elaboración propia*

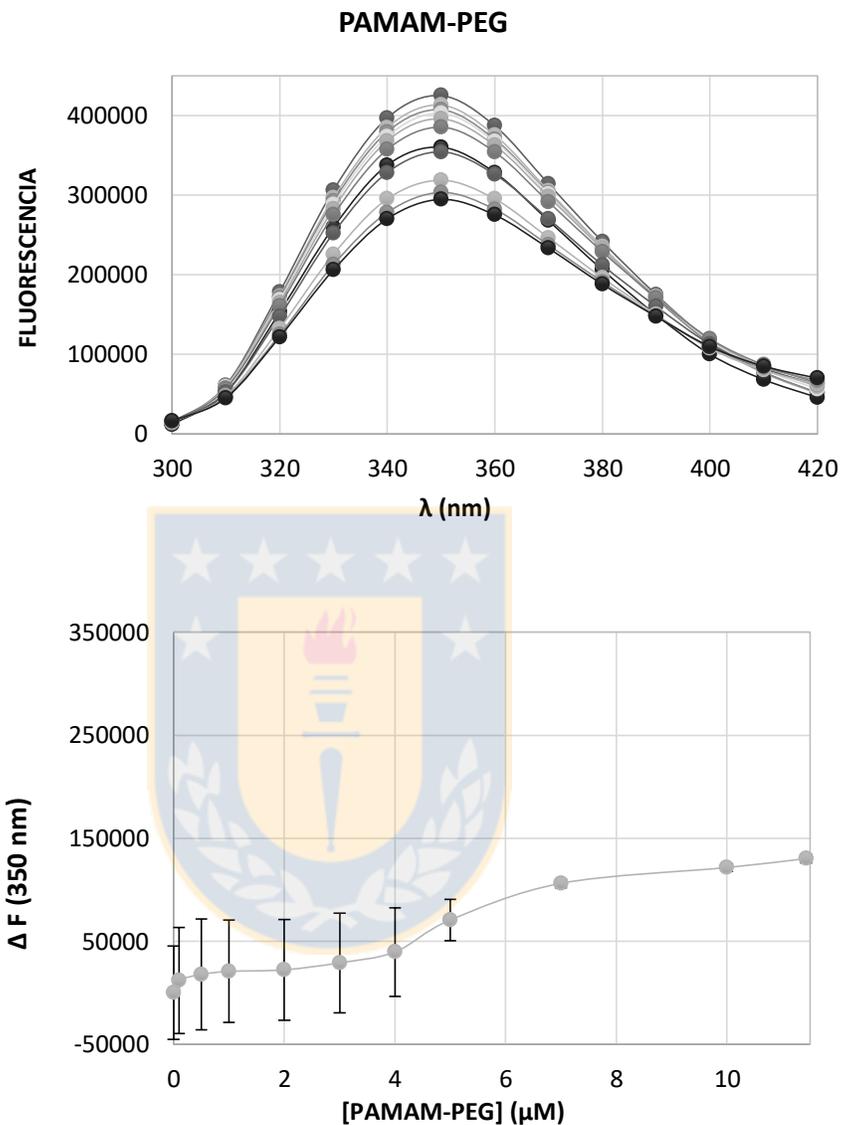
**Figura 22.** Quenching de fluorescencia de octreótido por interacción con PAMAM-FA. En la parte superior los espectros de fluorescencia superpuestos; en la parte inferior el descenso de fluorescencia a 350 nm versus concentración de PAMAM-FA.

El último análisis se llevó a cabo entre el dendrímero pegilado y octreótido (figura 23). Se observó un descenso en la fluorescencia cercano al 25% corroborando la interacción entre ambas moléculas.

En este caso, la funcionalización con polietilenglicol también tiene un efecto neutralizador de las cargas positivas superficiales de PAMAM, favoreciendo la formación del complejo con el péptido. No obstante, las cadenas de PEG aportan con grupos polares de gran extensión, los que pueden interactuar con octreótido y retenerlo entre sus cadenas pero no con la misma fuerza que la interacción electrostática producida con PAMAM-FA.

La pegilación aumenta considerablemente el tamaño del dendrímero, lo que también podría afectar la estequiometría del complejo, favoreciendo la encapsulación de más de una molécula de OCT.

En contraste, independientemente de la fuerza de la interacción –ya sea con PAMAM-FA o PAMAM-PEG- sólo los estudios celulares *in vitro* determinarán qué tipo de unión es más beneficiosa para los complejos y si se produce o no sinergia del efecto antiproliferativo que ya tienen octreótido y metotrexato por sí mismos.



*Elaboración propia*

**Figura 23.** Quenching de fluorescencia de octreótido por interacción con PAMAM-PEG. En la parte superior los espectros de fluorescencia, en la parte inferior el descenso de fluorescencia a 350 nm versus concentración de PAMAM-PEG.

## ACCIÓN ANTIPROLIFERATIVA DE LOS COMPLEJOS PAMAM-OCT-MTX *IN VITRO* EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER

Avanzando en esta investigación en la búsqueda de la generación de complejos dendrímero-fármaco-péptido con aplicación en la quimioterapia contra el cáncer, una vez comprobada la interacción entre las distintas moléculas en estudio, se comprobó su acción antiproliferativa *in vitro* en cultivos celulares de HeLa y PC12.

Como parte del diseño experimental, se consideró el mecanismo de acción tanto del metotrexato como de octeótrido. Ambas sustancias inhiben la proliferación celular, sin embargo, el efecto es notorio cuando las células entran en el proceso de mitosis. Ante esto, se procedió a confluencias iniciales de los cultivos no mayores al 40% y se incubó por 48 horas para evidenciar alguna respuesta.

Por otro lado, la elección de las líneas celulares se hizo teniendo en cuenta un origen "inmortal". En primer lugar, las células Hela fueron las primeras en usarse en cultivos, provenientes de cáncer cérvico-uterino, son reconocidas por su amplio uso en estudios relacionados a los mecanismos y tratamiento de distintas neoplasias. Las PC12 en cambio, son células de feocromocitoma de médula adrenal de rata, una línea representante de un tumor neuroendocrino y modelo de estudio

actualmente no sólo de diferenciación neuronal, sino de posible blanco de terapia. El receptor de somatostatina, tal como ya se describió en la revisión previa, se encuentra altamente expresado en este tipo de tejidos cancerosos (tabla 2), por lo tanto, resultaba muy adecuada para los estudios.

Para conocer posibles efectos sinérgicos, se estudió cada uno de los elementos que formarían parte del complejo por si solos, luego en parejas y finalmente el trío dendrímero-droga-péptido, distribuido por nanotransportador y además por línea celular utilizada.

Coherentemente con el primer estudio de sobrevivencia realizado para los nanomateriales, estos mostraron no afectar la viabilidad celular en ambas líneas (figura 24 y 25) al ser comparados con el control positivo, incluso ante una exposición prolongada de 48 hrs. Sorprendentemente, PAMAM sin funcionalizar tampoco mostró citotoxicidad, lo cual se relaciona con la concentración usada;  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$  final de cada compuesto en el pocillo. Se ha reportado que para la cuarta generación de dendrímeros poliamidoamina no hay daño celular a concentraciones tan bajas.

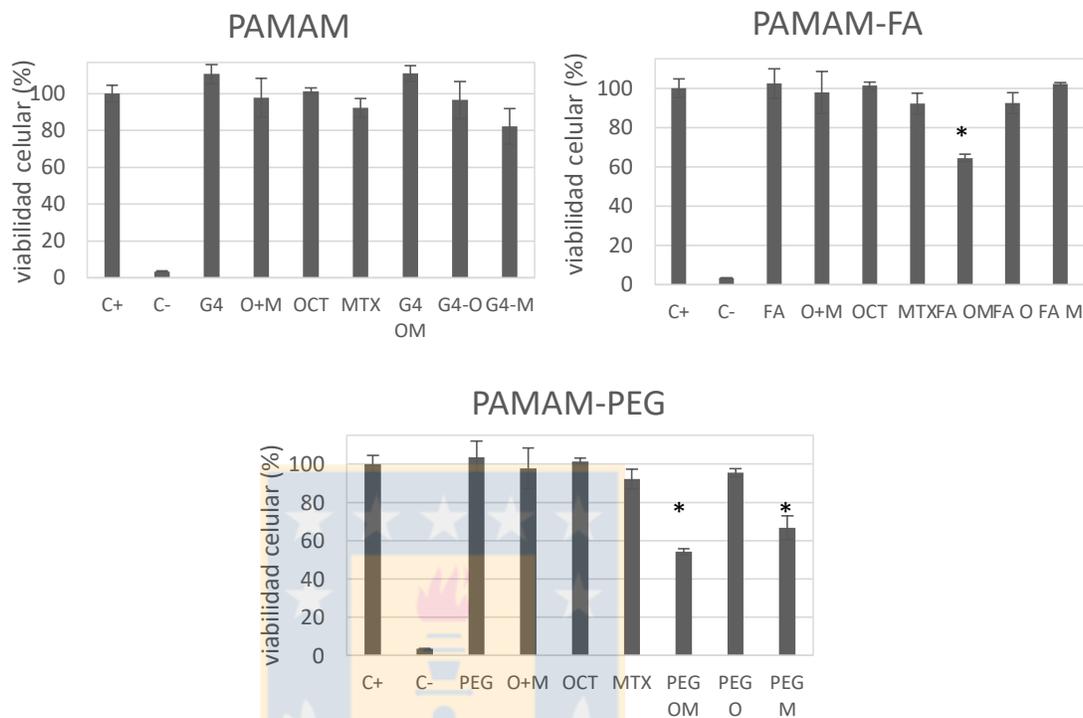
Asimismo, ni metotrexato u octeótrido por si solos o en mezcla, mostraron afectar la sobrevivencia, lo que en principio no formaba parte de lo esperado, a pesar de tomar las precauciones con respecto a dar las

condiciones para que al menos una división celular ocurriera, y así lograr visualizar mejor cualquier acción de las drogas.

El dendrímero PAMAM nativo, en adición, demostró que complejado con ninguna droga tiene efectos relevantes en la viabilidad celular de ninguno de los cultivos estudiados (figura 24 y 25). Con metotrexato mostró afectar muy levemente la sobrevivencia, lo cual se relaciona con que esta droga se ha comprobado que se encapsula en PAMAM; no obstante, esto es demasiado mínimo para ser considerado un resultado auspicioso.

En gran parte estos antecedentes se complementan con la incapacidad del péptido para interactuar adecuadamente con el dendrímero sin funcionalizar por la repulsión de cargas catiónicas, lo cual se demostró en gran medida anteriormente con el estudio de fluorescencia. Por otro lado, para que se vea un mejor efecto antiproliferativo es necesario que el complejo permanezca en el medio extracelular para su interacción con la membrana, sin embargo, como se ha comentado previamente a razón de la gran concentración de cargas positivas los PAMAM son rápidamente internalizados por las células.

Con respecto a los estudios realizados en las células Hela (figura 23), se observa que los complejos entre las drogas con PAMAM-FA y PAMAM-PEG, tienen el efecto más notable sobre la viabilidad celular; de los cuales este último mostró tener los mejores resultados.



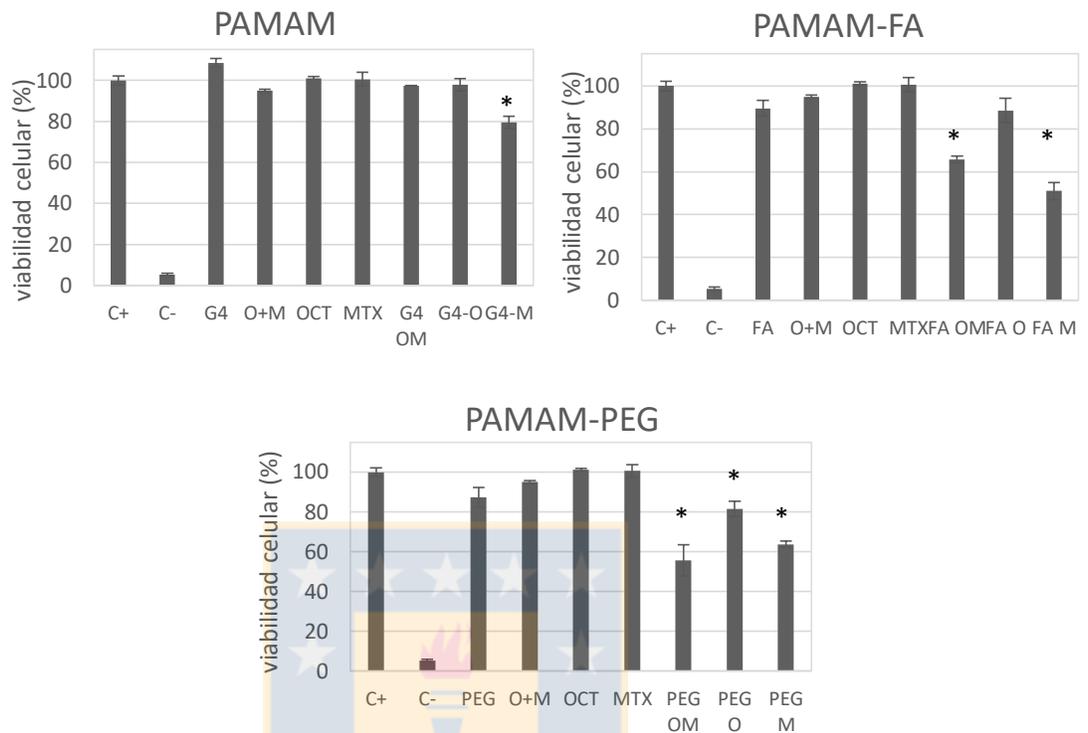
*Elaboración propia*

**Figura 24.** Viabilidad (%) células HeLa para soluciones de concentración  $1\mu\text{mol L}^{-1}$  PAMAM-G4, FA-PAMA, PEG-PAMAM, octreótido y metotrexato. El control de supervivencia fue células incubadas solo con medio (C +). El control de la muerte celular fue células incubadas con medio y tritón al 0,1% (C-). \*  $p < 0.05$  indica diferencias significativas con respecto a C+.

(G4: PAMAM; OCT: octreótido; MTX: metotrexato; O+M: OCT+MTX; FA: PAMAM-FA; PEG: PAMAM-PEG; G4 OM: PAMAM+OCT+MTX; G4 O: PAMAM+OCT; G4 M: PAMAM+MTX; FA OM: PAMAM-FA+OCT+MTX; FA O: PAMAM-FA+OCT; PEG M: PAMAM-PEG+MTX; PEG OM: PAMAM-PEG+OCT+MTX; PEG O: PAMAM-PEG+OCT; FA M: PAMAM-FA+MTX)

En ambos dendrímeros funcionalizados, los complejos con OCT y MTX demostraron causar mayor inhibición de la proliferación celular con respecto a su acción sin nanotransportador. Esto podría indicar que las drogas se encuentran protegidas de la degradación en el medio y su acción es más prolongada en el tiempo por mediación de los PAMAM modificados.

En cuanto a los estudios realizados en células PC12 (figura 24), se aprecia que los complejos con PAMAM-FA y PAMAM-PEG son los que potencian más el efecto citotóxico. Además, con sorpresa se observó que el efecto más potente fue el que contenía metotrexato en todos los nanotransportadores. Justamente, el complejo de dendrímero PAMAM-FA con metotrexato tuvo el efecto más pronunciado. Esto podría ser indicio de la presencia de receptores de ácido fólico en esta línea celular más que en Hela, dado que tanto metotrexato como el dendrímero sustituido con folato interaccionan con dicho receptor [63].



*Elaboración propia*

**Figura 25.** Viabilidad (%) en células PC12 para soluciones de concentración  $1\mu\text{mol L}^{-1}$  PAMAM-G4, FA-PAMA, PEG-PAMAM, octreótido y metotrexato. El control de supervivencia fue células incubadas solo con medio (C +). El control de la muerte celular fue células incubadas con medio y tritón al 0,1% (C-). \*  $p < 0.05$  indica diferencias significativas con respecto a C+.

(G4: PAMAM; OCT: octreótido; MTX: metotrexato; O+M: OCT+MTX; FA: PAMAM-FA; PEG: PAMAM-PEG; G4 OM: PAMAM+OCT+MTX; G4 O: PAMAM+OCT; G4 M: PAMAM+MTX; FA OM: PAMAM-FA+OCT+MTX; FA O: PAMAM-FA+OCT; PEG M: PAMAM-PEG+MTX; PEG OM: PAMAM-PEG+OCT+MTX; PEG O: PAMAM-PEG+OCT; FA M: PAMAM-FA+MTX).

PAMAM-PEG tuvo mayor eficacia al ser empleado como complejo con ambas moléculas: metotrexato y octeótrido. Lo que reafirma que este sistema aporta notablemente a la acción prolongada de las drogas potenciando su efecto. Es de esperar entonces, evidenciar resultados aún más potentes en concentraciones más elevadas y a tiempos de exposición más prolongados.

Otros estudios revelaron acción citotóxica a concentraciones elevadas de fármacos [63], en contraste, en este estudio se ven efectos a concentraciones muy bajas (1  $\mu\text{M}$ ). En adición, a pesar de generar todas las condiciones experimentales para ver alguna baja en la viabilidad luego de 48 hrs, las drogas por sí solas confirman que su dosis letal media es mayor que la necesaria en caso de formar complejos con dendrímeros PAMAM funcionalizados, confirmando la sinergia de los complejos antiproliferativos.

La selectividad de la terapia –basada en moléculas que se sobreexpresen en el tejido tumoral- y el aislamiento de moléculas que puedan ser dañinas para las células sanas empleando nanotransportadores, se vislumbra como una alternativa que supere los inconvenientes de la terapia convencional contra el cáncer.

Los resultados de esta investigación sin duda avanzaron con esa premisa, logrando demostrar auspiciosamente beneficiosos efectos, no sólo de la terapia combinada de drogas- sino que además que el uso de dendrímeros PAMAM funcionalizados aportan al efecto antiproliferativo, sin causar por sí mismos daño en células sanas.

Además, en la línea de modular la cinética plasmática de moléculas pequeñas, susceptibles a degradación en circulación o a rápida eliminación del organismo, se vio que PAMAM-PEG alcanzó aumentar notablemente su permanencia en la sangre. Esto aseguraría alcanzar efectos esperados de las drogas en su tejido diana, que sin la funcionalización no se observarían en los dendrímeros y mucho menos aún en los fármacos libres.

# CONCLUSIONES

---

Los dendrímeros funcionalizados basados en PAMAM de cuarta generación, fueron exitosamente caracterizados con ácido fólico y polietilenglicol, alcanzando un grado de conjugación del 39 y 52% respectivamente. Análogamente, el marcaje con fluoresceína dio lugar a la unión de 4 moléculas por dendrímero en todos los sistemas, lo que demuestra la reproducibilidad de este método.

Tanto PAMAM-FA como PAMAM-PEG demostraron disminuir al mínimo la citotoxicidad que posee PAMAM nativo a pesar de que las células fueron expuestas a largos tiempos y altas concentraciones de los nanomateriales, por lo cual el porcentaje de funcionalización fue el adecuado para el estudio.

Con respecto a los estudios farmacocinéticos, se determinó una dependencia de la vida media de los sistemas en circulación con su tamaño, lo cual era altamente esperable. Por ello, PAMAM-PEG exhibió los mejores tiempos de permanencia y biodisponibilidad en sangre; esto lo perfila como un gran candidato para ser un nanotrasportador de liberación controlada, pudiendo modular los tiempos de vida media de metotrexato y

octeótrido hacia periodos mucho más largos para mejorar su uso en quimioterapia.

En los análisis de la formación de complejos, se comprobó la interacción de octeótrido tanto con metotrexato como con los dendrímeros funcionalizados, siendo PAMAM-FA el que causa la interacción más fuerte. En contraste, PAMAM nativo no dio señales de complejar el péptido, lo cual se relacionaría a la repulsión electrostática entre ambas moléculas cargadas positivamente bajo las condiciones experimentales.

Con respecto al análisis de los complejos con posible aplicación farmacológica, tanto en Hela como en PC12, los dendrímeros mostraron no ser citotóxicos. Por otro lado, ni metotrexato ni el péptido por si solos o en conjunto mostraron efectos antiproliferativos. En este sentido, PAMAM no formó ningún complejo y en consecuencia tampoco se obtuvo con este sistema efectos antiproliferativos en las células estudiadas.

PAMAM-FA y PAMAM-PEG al interactuar con el péptido y metotrexato, mostraron en ambas líneas celulares disminuir notablemente la proliferación celular a pesar de la baja concentración usada de los complejos. Este resultado es altamente auspicioso, sobre todo considerando que ninguna molécula actuando por si sola demostró tener efecto antiproliferativo.

Finalmente, con este estudio se concluye que PAMAM-FA y PAMAM-PEG, son capaces de ser nanotransportadores viables para la terapia anticancerígena, potenciando el efecto de antiproliferativos como octeótrido y metotrexato. Particularmente PAMAM-PEG, que tuvo los efectos más notables y mostró los tiempos de permanencia en circulación más elevados, es candidato indiscutido para avanzar en mejoramientos que le permitan avanzar aún más en el desarrollo de una terapia racional contra enfermedades como el cáncer.



## REFERENCIAS

---

1. Gardner, J., *Nanotechnology in medicine and healthcare: Possibilities, progress and problems*. 2015. Vol. 8. 2015.
2. Davis, M.E., Z. Chen, and D.M. Shin, *Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer*. *Nat Rev Drug Discov*, 2008. **7**(9): p. 771-782.
3. Peer, D., et al., *Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy*. *Nature Nanotechnology*, 2007. **2**: p. 751.
4. Cho, K., et al., *Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer*. *Clinical cancer research*, 2008. **14**(5): p. 1310-1316.
5. Bae, K., H. Chung, and T. Park, *Nanomaterials for cancer therapy and imaging*. *Molecules and Cells*, 2011. **31**(4): p. 295-302.
6. Fernandez-Fernandez, A., R. Manchanda, and A. McGoron, *Theranostic Applications of Nanomaterials in Cancer: Drug Delivery, Image-Guided Therapy, and Multifunctional Platforms*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2011. **165**(7-8): p. 1628-1651.
7. Campos, C.H., et al., *PAMAM-Conjugated Alumina Nanotubes as Novel Noncytotoxic Nanocarriers with Enhanced Drug Loading and Releasing Performances*. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 2016. **217**(15): p. 1712-1722.
8. Torres, C.C., et al., *PAMAM-grafted TiO<sub>2</sub> nanotubes as novel versatile materials for drug delivery applications*. *Materials Science and Engineering: C*, 2016. **65**: p. 164-171.

9. Peer, D., *Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy*. Nature Nanotechnology, 2007. **2**: p. 751-760.
10. Bharali, D.J., *Nanoparticles and cancer therapy: A concise review with emphasis on dendrimers*. International Journal of Nanomedicine 2009:, 2009. **4**: p. 1-7.
11. Sharma, A.K., et al., *Dendrimer nanoarchitectures for cancer diagnosis and anticancer drug delivery*. Drug Discovery Today, 2017. **22**(2): p. 314-326.
12. Markman, J.L., et al., *Nanomedicine therapeutic approaches to overcome cancer drug resistance*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2013. **65**(13): p. 1866-1879.
13. Tomalia, D., et al., *A New Class of Polymers: Starburst-Dendritic*. Polymer Journal, 1985. **17**(1): p. 117-132.
14. Tomalia, D.A., et al., *Dendritic Macromolecules: Synthesis of Starburst Dendrimers*. Macromolecules, 1986. **19**: p. 2466-2468.
15. Esfand, R. and D.A. Tomalia, *Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications*. Drug Discovery Today, 2001. **6**(8): p. 427-436.
16. Lee, C.C., et al., *Designing dendrimers for biological applications*. Nat Biotech, 2005. **23**(12): p. 1517-1526.
17. Cloninger, M.J., *Biological applications of dendrimers*. Current Opinion in Chemical Biology, 2002. **6**(6): p. 742-748.
18. Tripathy, S. and M.K. Das, *Dendrimers and their Applications as Novel Drug Delivery Carriers*. 2013.
19. Medina, S.H. and M.E.H. El-Sayed, *Dendrimers as Carriers for Delivery of Chemotherapeutic Agents*. Chemical Reviews, 2009. **109**(7): p. 3141-3157.
20. Gillies, E.R. and J.M.J. Fréchet, *Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery*. Drug Discovery Today, 2005. **10**(1): p. 35-43.

21. D'Emanuele, A. and D. Attwood, *Dendrimer–drug interactions*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005. **57**(15): p. 2147-2162.
22. Choi, J.S., et al., *Enhanced transfection efficiency of PAMAM dendrimer by surface modification with L-arginine*. *Journal of Controlled Release*, 2004. **99**(3): p. 445-456.
23. Boas, U. and P.M. Heegaard, *Dendrimers in drug research*. *Chemical Society Reviews*, 2004. **33**(1): p. 43-63.
24. Klajnert, B. and M. Bryszewska, *Dendrimers: properties and applications*. *Acta biochimica Polonica*, 2001. **48**(1): p. 199-208.
25. Vidal, F., et al., *Mechanism of PAMAM Dendrimers Internalization in Hippocampal Neurons*. *Molecular Pharmaceutics*, 2016. **13**(10): p. 3395-3403.
26. Naha, P.C., et al., *Reactive oxygen species (ROS) induced cytokine production and cytotoxicity of PAMAM dendrimers in J774A.1 cells*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2010. **246**(1–2): p. 91-99.
27. Fischer, D., et al., *In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis*. *Biomaterials*, 2003. **24**(7): p. 1121-1131.
28. Duncan, R. and L. Izzo, *Dendrimer biocompatibility and toxicity*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005. **57**(15): p. 2215-2237.
29. Jevprasesphant, R., et al., *The influence of surface modification on the cytotoxicity of PAMAM dendrimers*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2003. **252**(1–2): p. 263-266.
30. Kolhatkar, R.B., et al., *Surface Acetylation of Polyamidoamine (PAMAM) Dendrimers Decreases Cytotoxicity while Maintaining Membrane Permeability*. *Bioconjugate Chemistry*, 2007. **18**(6): p. 2054-2060.
31. Wei, W., et al., *The decrease of PAMAM dendrimer-induced cytotoxicity by PEGylation via attenuation of oxidative stress*. *Nanotechnology*, 2009. **20**(10): p. 105103.

32. Fant, K., et al., *Effects of PEGylation and acetylation of PAMAM dendrimers on DNA binding, cytotoxicity and in vitro transfection efficiency*. *Molecular pharmaceutics*, 2010. **7**(5): p. 1734-1746.
33. Kojima, C., et al., *Influence of dendrimer generation and polyethylene glycol length on the biodistribution of PEGylated dendrimers*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2010. **383**(1–2): p. 293-296.
34. Barraza, L.F., V.A. Jiménez, and J.B. Alderete, *Effect of PEGylation on the Structure and Drug Loading Capacity of PAMAM-G4 Dendrimers: A Molecular Modeling Approach on the Complexation of 5-Fluorouracil with Native and PEGylated PAMAM-G4*. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 2015. **216**(16): p. 1689-1701.
35. Vidal, F., et al., *Prevention of Synaptic Alterations and Neurotoxic Effects of PAMAM Dendrimers by Surface Functionalization*. 2018. **8**(1): p. 7.
36. Chandrasekar, D., et al., *The development of folate-PAMAM dendrimer conjugates for targeted delivery of anti-arthritic drugs and their pharmacokinetics and biodistribution in arthritic rats*. *Biomaterials*, 2007. **28**(3): p. 504-512.
37. Wang, S. and P.S. Low, *Folate-mediated targeting of antineoplastic drugs, imaging agents, and nucleic acids to cancer cells*. *Journal of Controlled Release*, 1998. **53**(1–3): p. 39-48.
38. Hanahan, D. and Robert A. Weinberg, *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*. *Cell*, 2011. **144**(5): p. 646-674.
39. Nazir, S., et al., *Nanomaterials in combating cancer: Therapeutic applications and developments*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2014. **10**(1): p. 19-34.
40. Folkman, J., *Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease*. *Nat Med*, 1995. **1**(1): p. 27-30.
41. Fidler, I.J., *The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited*. *Nat Rev Cancer*, 2003. **3**(6): p. 453-458.

42. Fang, J., H. Nakamura, and H. Maeda, *The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2011. **63**(3): p. 136-151.
43. Schally, A.V. and A. Nagy, *Chemotherapy targeted to cancers through tumoral hormone receptors*. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2004. **15**(7): p. 300-310.
44. Schally, A. and A. Nagy, *Cancer chemotherapy based on targeting of cytotoxic peptide conjugates to their receptors on tumors*. *European Journal of Endocrinology*, 1999. **141**(1): p. 1-14.
45. Okarvi, S.M., *Peptide-based radiopharmaceuticals and cytotoxic conjugates: Potential tools against cancer*. *Cancer Treatment Reviews*, 2008. **34**(1): p. 13-26.
46. Coates, A., et al., *On the receiving end—patient perception of the side-effects of cancer chemotherapy*. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, 1983. **19**(2): p. 203-208.
47. Ford, J.M., *Cancer Chemotherapy: Principles and Practice*. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 1991. **64**(4): p. 412-413.
48. Reubi, J.C., *Peptide Receptors as Molecular Targets for Cancer Diagnosis and Therapy*. *Endocrine Reviews*, 2003. **24**(4): p. 389-427.
49. Rufini, V., M.L. Calcagni, and R.P. Baum, *Imaging of Neuroendocrine Tumors*. *Seminars in Nuclear Medicine*, 2006. **36**(3): p. 228-247.
50. Nubiola, P., et al., *Treatment of 27 postoperative enterocutaneous fistulas with the long half-life somatostatin analogue SMS 201-995*. *Ann Surg*, 1989. **210**(1): p. 56-8.
51. Susini, C. and L. Buscail, *Rationale for the use of somatostatin analogs as antitumor agents*. *Annals of Oncology*, 2006. **17**(12): p. 1733-1742.

52. Patel, Y.C., *General Aspects of the Biology and Function of Somatostatin*, in *Somatostatin*. 1992, Springer Berlin Heidelberg. p. 1-16.
53. Moody, T.W., et al., *Camptothecin-somatostatin conjugates inhibit the growth of small cell lung cancer cells*. *Peptides*, 2005. **26**(9): p. 1560-1566.
54. Nagy, A., et al., *Synthesis and biological evaluation of cytotoxic analogs of somatostatin containing doxorubicin or its intensely potent derivative, 2-pyrrolinodoxorubicin*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998. **95**(4): p. 1794-1799.
55. Sun, L.-C. and D. H Coy, *Somatostatin receptor-targeted anti-cancer therapy*. *Current drug delivery*, 2011. **8**(1): p. 2-10.
56. Fuselier, J.A., et al., *An adjustable release rate linking strategy for cytotoxin–Peptide conjugates*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2003. **13**(5): p. 799-803.
57. Departamento de Estadísticas e Información de Salud, D., *Indicadores básicos de salud Chile 2011*. 2011, DEIS Ministerio de Salud, Gobierno de Chile: Chile. p. 5.
58. Kojima, C., et al., *Synthesis of Polyamidoamine Dendrimers Having Poly(ethylene glycol) Grafts and Their Ability To Encapsulate Anticancer Drugs*. *Bioconjugate Chemistry*, 2000. **11**(6): p. 910-917.
59. Diaz, C., et al., *Partially PEGylated PAMAM dendrimers as solubility enhancers of Silybin*. *Pharmaceutical Development and Technology*, 2017: p. 1-25.
60. Barraza, L.F., V.A. Jiménez, and J.B. Alderete, *Methotrexate Complexation with Native and PEGylated PAMAM-G4: Effect of the PEGylation Degree on the Drug Loading Capacity and Release Kinetics*. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 2016. **217**(4): p. 605-613.
61. Diaz, C., et al., *Cytotoxicity and in vivo plasma kinetic behavior of surface-functionalized PAMAM dendrimers*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2018. **14**(7): p. 2227-2234.

62. Kojima, C., et al., *Dendrimer-based MRI contrast agents: the effects of PEGylation on relaxivity and pharmacokinetics*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2011. **7**(6): p. 1001-1008.
63. Nogueira, D.R., et al., *In vitro antitumor activity of methotrexate via pH-sensitive chitosan nanoparticles*. *Biomaterials*, 2013. **34**(11): p. 2758-2772.

