



Universidad de Concepción

Dirección de Postgrado

Facultad de Ciencias Biológicas -Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas

Área Biología Celular y Molecular

ESTUDIO DE LA INTERNALIZACIÓN CELULAR Y POTENCIAL USO COMO NANOTRANSPORTADORES DE FÁRMACOS DE DENDRÍMEROS PAMAM EN NEURONAS

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas

Área Biología Celular y Molecular

FELIPE ANDRÉS VIDAL CID

CONCEPCIÓN-CHILE

2018

Profesor Guía: Dr. José Leonardo Guzmán González

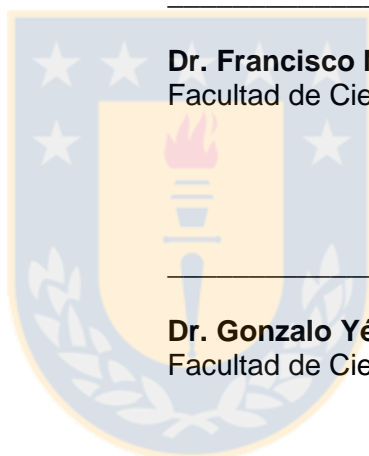
Dpto. de Fisiología, Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

Dr. José Leonardo Guzmán González
Profesor Guía de Tesis
Facultad de Ciencias Biológicas



Dr. Francisco Nualart Santander
Facultad de Ciencias Biológicas

Dr. Gonzalo Yévenes Crisóstomo
Facultad de Ciencias Biológicas

Dra. Soledad Bollo Dragnic
Profesora Evaluadora Externa
Universidad de Chile

Dr. Juan Pablo Henríquez Hohmann
Director
Programa Doctorado en Ciencias Biológicas
Área Biología Celular y Molecular

Agradecimientos

Creo firmemente que los avances que ha alcanzado y puede alcanzar la humanidad no son fruto de una genialidad individual, sino más bien producto del trabajo colectivo, donde todos/as tenemos algo importante que aportar y donde muchas veces ciertos actores son invisibilizados. La investigación científica es sin duda el resultado de un esfuerzo colectivo más que individual, y es por ello que más que agradecer, quisiera reconocer a todas aquellas personas que fueron, de una u otra forma, parte fundamental del desarrollo de esta tesis doctoral.

En primer lugar, reconocer a las personas involucradas más directamente. Al Dr. Leonardo Guzmán, tutor de esta tesis, por su acompañamiento, las interesantes discusiones científicas y su calidad humana. A los integrantes del Laboratorio de Neurobiología Molecular, tanto quienes me recibieron y ayudaron en las primeras etapas de este trabajo como Daniela González, Daniela Nova y Loreto San Martín, y con quienes tuve la oportunidad de conformar equipo posteriormente como Francisca Cayumán y en especial a Pilar Vásquez, con quien trabajé codo a codo casi desde los inicios de esta tesis, con quien además se realizaron muchas de las discusiones que permitieron el avance de este trabajo y cuya compañía durante este período me hizo crecer como investigador y como persona, sumando nuevas perspectivas a mi forma de ver esta actividad y el mundo en general.

Este trabajo contó también con importantes colaboradores. A los integrantes del Laboratorio de Biomateriales y Diseño Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Concepción, particularmente a Carola Díaz y al Dr. Joel Alderete, quienes también fueron parte importante del desarrollo y discusión de esta tesis. Al Leibniz Research Centre for Working Environment and Human Factors, IfADo, Dortmund, Alemania, donde también se llevó a cabo parte del trabajo, en especial al Dr. Patricio Godoy, quien me recibió e hizo posible mi estadía en el Instituto, al Dr. Christoph van Thriel, Daniela González y Brigitte Begher-Tibbe, además de los integrantes de los grupos de investigación Liver Toxicology y Neurotoxicology and Chemosensation.

Quisiera hacer mención también a todos los demás integrantes del Departamento de Fisiología, lugar donde se desarrolló principalmente esta tesis, a todos los estudiantes de pregrado, postgrado, técnicos, funcionarios, administrativos y docentes que ayudaron en la realización de algún experimento, en discusiones de resultados, soluciones a problemas y en mantener el funcionamiento general del laboratorio.

A los integrantes de la comisión evaluadora Dr. Francisco Nualart, Dr. Gonzalo Yévenes y Dra. Soledad Bollo por sus aportes para la mejora de esta tesis.

Al financiamiento otorgado por los proyectos Fondecyt 1131004, 1130531, 1170853, 1170426 y mi Beca de Doctorado Nacional Conicyt 21140992.

Finalmente, a mi madre, padre, hermano y amigos, quienes siempre estuvieron abiertos a conversar de mi interés por la investigación que estaba desarrollando y que siempre han apoyado los diversos proyectos que he emprendido.

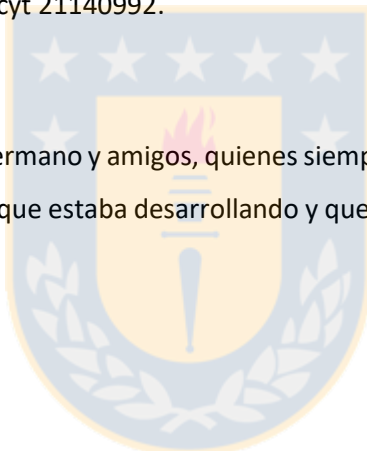


TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO	v
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
RESUMEN	x
ABSTRACT	xii
I. INTRODUCCIÓN	1
Desafíos y problemas de la neurofarmacología.....	1
Dendrimeros PAMAM y su potencial uso como nanotransportadores de fármacos en el SNC.....	3
Toxicidad celular de dendrimeros PAMAM	7
Internalización celular de dendrimeros PAMAM.....	9
Biodistribución y direccionamiento al SNC	12
II. HIPÓTESIS	16
III. OBJETIVOS	17
Objetivo general.....	17
Objetivos específicos.....	17
IV. METODOLOGÍA	18
Aspectos generales	18
1. Materiales	18
2. Cultivos celulares.....	18
3. Funcionalización de dendrimeros PAMAM.....	19
Determinación de los mecanismos moleculares de internalización neuronal de dendrimeros PAMAM según sus propiedades superficiales	19
4. Inmunocitoquímica	19
5. Estudio de internalización	20
6. Análisis de colocalización	20
7. Ensayo con inhibidores específicos de endocitosis.....	20
8. Microscopía confocal	21
9. Análisis estadístico	21
Evaluación de los efectos electrofisiológicos de dendrimeros PAMAM con distintas propiedades superficiales	22
10. Evaluación de citotoxicidad.....	22
11. Análisis de transitorias de Ca ²⁺ intracelular.	22
12. Electrofisiología	22

13.	Estudio de la liberación de vesículas sinápticas	23
14.	Análisis estadístico	23
	Estudio de la biodistribución de dendrímeros PAMAM, su asociación a distintas estructuras del SNC y el efecto de su funcionalización con folato en dichos fenómenos	24
15.	Animales	24
16.	Evaluación de biodistribución	24
17.	Determinación de concentración de dendrímeros en plasma.....	25
18.	Microscopía confocal	25
V.	RESULTADOS	26
1.	Determinación de los mecanismos moleculares de internalización neuronal de dendrímeros PAMAM según sus propiedades superficiales.....	26
1.1	Dendrímeros en estudio.....	26
1.2	Internalización de los distintos dendrímeros	27
1.3	Cinética de internalización de G4 y PFO ₂₅	28
1.4	Colocalización de G4 y PFO ₂₅ con marcadores de endocitosis.....	33
1.5	Efecto de inhibidores específicos de endocitosis en la internalización de G4 y PFO ₂₅ 33	
2.	Evaluación de los efectos electrofisiológicos de dendrímeros PAMAM con distintas propiedades superficiales	38
2.1	Dendrímeros en estudio.....	38
2.2	Citotoxicidad de dendrímeros en estudio	38
2.3	Efecto de dendrímeros en la permeabilidad de membrana	40
2.4	Efecto de dendrímeros en transitorias de Ca ²⁺ intracelular.....	42
2.5	Efecto de dendrímeros en la dinámica de la liberación de vesículas sinápticas.....	43
3.	Estudio de la biodistribución de dendrímeros PAMAM, su asociación a distintas estructuras del SNC y del efecto de su funcionalización con folato en dichos fenómenos	48
3.1	Dendrímeros en estudio.....	48
3.2	Biodistribución de G4 y PFO ₄₀ en el SNC	49
3.3	Biodistribución de G4 y PFO ₄₀ en el resto del organismo	50
3.4	Biodistribución de G4 y PFO ₄₀ en riñón.....	57
3.5	Biodistribución de G4 y PFO ₄₀ en plasma sanguíneo	59
VI.	DISCUSIÓN	61
	Internalización de dendrímeros PAMAM con distintas propiedades superficiales	62
	Mecanismos de internalización de los dendrímeros G4 y PFO ₂₅	63

Tráfico intracelular y liberación de la carga farmacológica	64
Conclusiones y proyecciones acerca de los estudios de internalización celular	66
Neurotoxicidad de dendrímeros PAMAM con distintas propiedades superficiales	67
Efectos en la permeabilidad de membrana	68
Efectos en Ca ²⁺ intracelular y actividad sináptica	69
Conclusiones y proyecciones acerca de los estudios de neurotoxicidad.....	70
Biodistribución de dendrímeros PAMAM y su direccionamiento a distintas estructuras del SNC	71
Biodistribución de dendrímeros PAMAM en el resto del organismo	73
Conclusiones y proyecciones acerca de los estudios de biodistribución.....	75
VII. CONCLUSIONES	77
VIII. REFERENCIAS.....	78
IX. Anexo 1.....	86
X. Anexo 2.....	91



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de los distintos tipos de nanopartículas empleadas como sistemas de transporte y entrega de fármacos.	4
Figura 2. Estructura química del dendrímero PAMAM.	5
Figura 3. Representación esquemática de las distintas interacciones establecidas por el dendrímero PAMAM.	6
Figura 4. Principales mecanismos de endocitosis.	10
Figura 5. Representación esquemática del traspaso por la BHE de dendrímeros funcionalizados mediante transcitosis mediada por receptor.	14
Figura 6. Representación del modelo de transporte de folato a través de los plexos coroideos en humano.	15
Figura 7. Representación esquemática de los dendrímeros PAMAM en estudio.	27
Figura 8. Análisis de internalización de los distintos dendrímeros.	31
Figura 9. Cinética de internalización de G4 y PFO₂₅.	32
Figura 10. Colocalización de G4 y PFO₂₅ con marcadores de endocitosis.	34
Figura 11. Efecto de inhibidores específicos de endocitosis en la internalización de G4 y PFO₂₅.	36
Figura 12. Esquema representativo de los mecanismos de internalización de dendrímeros PAMAM en neuronas.	37
Figura 13. Representación esquemática de los dendrímeros PAMAM en estudio.	39
Figura 14. Evaluación de citotoxicidad.	40

Figura 15. Efectos en la permeabilidad de membrana.....	41
Figura 16 . Análisis de transitorias de Ca²⁺ intracelular.....	43
Figura 17. Efecto de dendrímeros en la dinámica de la liberación de vesículas sinápticas.....	44
Figura 18. Efecto de dendrímeros en la actividad sináptica.	46
Figura 19. Esquema representativo de los efectos de dendrímeros PAMAM en la funcionalidad sináptica en neuronas.	47
Figura 20. Representación esquemática de los dendrímeros PAMAM en estudio.....	48
Figura 21. Localización de dendrímeros en plexos coroideos en tercer ventrículo.	51
Figura 22. Localización de dendrímeros en giro dentado.	52
Figura 23. Localización de dendrímeros en corteza cerebral.....	53
Figura 24. Localización de dendrímeros en cerebelo.	54
Figura 25. Localización de dendrímeros en hígado.	56
Figura 26. Localización de dendrímeros en riñón.....	58
Figura 27. Concentración de dendrímeros en plasma.....	59

RESUMEN

Los dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM) son polímeros hiper-ramificados que han sido ampliamente estudiados como nanotransportadores para la entrega de fármacos (*drug delivery*). A pesar de los prometedores resultados obtenidos en diferentes modelos *in vitro* e *in vivo*, importantes aspectos acerca de su interacción con neuronas y el sistema nervioso central (SNC) para generar aplicaciones seguras y más efectivas dirigidas a enfermedades que afectan dicho sistema, aún no han sido dilucidados. Teniendo esto en consideración, la presente tesis se enfocó en el estudio de tres aspectos relevantes acerca de la interacción de dendrímeros PAMAM con neuronas y el SNC.

Un proceso clave de entender es su mecanismo de internalización celular dada su influencia directa en su distribución intracelular, asociación a organelos, cinética de ingreso y liberación del cargo transportado. Cuatro dendrímeros marcados con una sonda fluorescente basados en PAMAM G4 con diferentes propiedades superficiales fueron estudiados: G4 no modificado, con una superficie de carga positiva; PPEG₅₀, con una sustitución del 50% de sus grupos amino superficiales con moléculas neutras de polietilenglicol; PAC, con una sustitución del 30% de sus grupos amino superficiales con moléculas aniónicas de acrilato; y PFO₂₅, modificado con folato en un 25% de los grupos amino terminales. Imágenes de microscopía confocal mostraron que tanto G4 como PFO₂₅, ingresan en neuronas hipocampales, no así PPEG₅₀ ni PAC. La colocalización con marcadores de endocitosis y experimentos de internalización utilizando inhibidores de endocitosis demostraron que la endocitosis mediada por clatrina es el mecanismo principal de ingreso de G4, mientras que la endocitosis mediada por clatrina y caveola están involucradas en la internalización de PFO₂₅. Estos resultados muestran la existencia de diferentes mecanismos de internalización para los dendrímeros PAMAM en neuronas y la posibilidad de controlar sus propiedades de internalización con funcionalizaciones específicas.

Por otra parte, es de gran relevancia determinar la biocompatibilidad de los sistemas de entrega de fármacos. Sin embargo, los posibles efectos tóxicos de los dendrímeros PAMAM en neuronas no han sido totalmente investigados, y aspectos importantes como efectos en la transmisión sináptica no han sido explorados. Por lo tanto, se estudió el efecto de PAMAM G4 con su superficie no modificada de carga positiva en neuronas hipocampales y se compararon los resultados con dendrímeros funcionalizados en un 25% de sus grupos superficiales con folato (PFO₂₅) y polietilenglicol (PPEG₂₅). Dendrímeros G4 redujeron la viabilidad celular en forma significativa, lo cual fue atenuado por ambas modificaciones químicas. Registros de patch clamp demostraron que G4 induce un incremento de 7,5 veces en la carga transferida por la membrana como una medida de la permeabilidad de membrana. Más aun, el tratamiento con este dendrímero aumentó el Ca²⁺ intracelular en 8 veces con una disrupción total del patrón normal de incrementos transitorios, teniendo como consecuencia que el tratamiento con G4 aumentó la liberación de vesículas sinápticas y la frecuencia de eventos sinápticos en 2,4 y 3 veces, respectivamente. Los tratamientos con PFO₂₅ y PPEG₂₅ no alteraron la permeabilidad de membrana, el ingreso total de Ca²⁺, la liberación de vesículas sinápticas ni la frecuencia en la actividad sináptica. Estos resultados demuestran que los dendrímeros G4 catiónicos tienen efectos neurotóxicos e inducen alteraciones en la actividad

sináptica normal, mientras que dichos efectos son prevenidos mediante la modificación del 25% de su superficie ya sea con folato o polietilenglicol.

Finalmente, la biodistribución de los dendrímeros PAMAM y la mejora de su capacidad para alcanzar el parénquima del SNC por medio de modificaciones químicas fue evaluada empleando dendrímeros G4 no modificados y G4 funcionalizados en un 40% de sus grupos superficiales con folato (PFO₄₀). Para ello, dendrímeros marcados con una sonda fluorescente fueron inyectados en ratones C57BL/6J y se obtuvieron diferentes cortes de tejido para su análisis en microscopía confocal. Aunque los resultados no mostraron una mejora en el direccionamiento al SNC inducida por la modificación con folato, un alto grado de localización de ambos dendrímeros en los plexos coroideos fue evidenciado, lo cual sustenta la idea de que es posible generar sistemas capaces de unirse a los mecanismos de transporte de esta región para alcanzar las células del parénquima nervioso.

En conjunto, los resultados de la presente tesis demuestran la importancia de las propiedades superficiales de los dendrímeros PAMAM en su interacción con neuronas y la posibilidad de optimizar sus características como nanotransportadores dirigidos al SNC a través de funcionalizaciones en su superficie.



ABSTRACT

Polyamidoamine (PAMAM) dendrimers are hyperbranched polymers which have been widely studied as nanocarriers for drug delivery. Despite their promising results in different *in vitro* and *in vivo* models, important aspects about their interaction with neurons and central nervous system (CNS) to generate safe and more effective applications for CNS diseases remain unclear. In this context, the following thesis was focused in three relevant features about the interaction of PAMAM dendrimers with neurons and CNS.

A key process to understand is their cellular internalization mechanism because of its direct influence on their intracellular distribution, association with organelles, entry kinetics, and cargo release. Four fluorescent labeled dendrimers based on G4 PAMAM with different surface properties were studied: unmodified G4, with a positively charged surface; PPEG₅₀, with a substitution of the 50% of amino surface groups with polyethylene glycol neutral groups; PAC, with a substitution of the 30% of amino surface groups with acrylate anionic groups; and PFO₂₅, decorated with folic acid groups in a 25% of total terminal groups. Confocal microscopy images showed that both G4 and PFO₂₅ are able to enter the hippocampal neurons, but not PPEG₅₀ and PAC. Colocalization with endocytosis markers and internalization experiments using endocytosis inhibitors demonstrated that clathrin-mediated endocytosis is the main internalization mechanism for G4, whereas clathrin- and caveolae-mediated endocytosis are implicated in PFO₂₅ internalization. These results show the existence of different internalization mechanisms for PAMAM dendrimers in neurons and the possibility to control their internalization properties with specific functionalizations.

On the other hand, it is highly relevant to determine the biocompatibility of drug delivery systems. However, the possible toxic effects of PAMAM dendrimers in neurons have not been thoroughly investigated, and important aspects such as effects on synaptic transmission remain unexplored. Therefore, it was studied the effects of G4 PAMAM with unmodified positively charged surface in hippocampal neurons and compared the results with dendrimers functionalized in 25% of their surface groups with folate (PFO₂₅) and polyethylene glycol (PPEG₂₅). G4 dendrimers significantly reduced cell viability, which was attenuated by both chemical modifications. Patch clamp recordings demonstrated that G4 induced a 7.5-fold increment in membrane charge transferred as a measure of membrane permeability. Moreover, treatment with this dendrimer increased intracellular Ca²⁺ by 8-fold with a complete disruption of transients pattern, having as consequence that G4 treatment increased the synaptic vesicle release and frequency of synaptic events by 2.4- and 3-fold, respectively. PFO₂₅ and PPEG₂₅ treatments did not alter membrane permeability, total Ca²⁺ intake, synaptic vesicle release and synaptic activity frequency. These results demonstrate that cationic G4 dendrimers have neurotoxic effects and induce alterations in normal synaptic activity, whereas these toxic effects are prevented by the modification of 25% of PAMAM surface with either folate or polyethylene glycol.

Finally, the biodistribution of PAMAM dendrimers and the improvement of their ability to reach CNS parenchyma by chemical modifications was evaluated using unmodified G4 dendrimers and G4 functionalized in 40% of their surface groups with folate (PFO₄₀). To this aim, fluorescent labeled dendrimers was injected in C57BL/6J mice and different tissue slices were collected for confocal microscopy analysis. Although the results did not show an improvement of CNS targeting induced

by folate modification, a high level of localization of both dendrimers in choroid plexus was evidenced, supporting the idea that it is possible to generate systems able to target the transport mechanisms of this region to reach brain parenchymal cells.

Taken together, the results of this thesis demonstrate the importance of the surface properties of PAMAM dendrimers in their interaction with neurons and the possibility to improve their nanocarrier ability in CNS applications by surface functionalization.



I. INTRODUCCIÓN

Desafíos y problemas de la neurofarmacología

Las enfermedades que afectan al sistema nervioso central (SCN) constituyen uno de los grupos de patologías más relevantes y cuyo tratamiento es uno de los más complejos a nivel mundial, siendo estas enfermedades una de las áreas de salud no cubiertas de mayor y más rápido incremento, con más de 1,5 billones de pacientes a nivel mundial (Xu et al., 2014).

Actualmente, Chile es uno de los países con mayor carga de morbilidad por enfermedades psiquiátricas en el mundo según la OMS (23,2%), siendo la depresión mayor y los trastornos por consumo de alcohol las patologías más relevantes (Vicente et al., 2016). Por otra parte, enfermedades neurodegenerativas tales como el Alzheimer, presentan una alta incidencia en países de bajo y mediano ingreso como el nuestro. Al presente, su incidencia en estos países alcanza un 58% y se espera que para el año 2050 ascienda a un 68%, representando un grave problema de salud pública (Prince et al., 2015).

A pesar de su preocupante incidencia a nivel mundial y local, muchas de estas enfermedades aún no cuentan con un apropiado tratamiento farmacológico, y tanto las alternativas existentes, así como las que se encuentran en desarrollo, deben enfrentar importantes limitaciones (Gribkoff and Kaczmarek, 2017; Saraiva et al., 2016; Xu et al., 2014). En general, para todo tipo de terapia farmacológica, mientras mayores sean la especificidad de la droga utilizada por su blanco molecular y su biodisponibilidad para llegar al sitio de acción, mayor será su efectividad (Liu et al., 2016). No obstante, muchas drogas pueden actuar en más de un blanco molecular dependiendo de la dosis administrada y de su biodistribución, lo cual puede derivar en efectos secundarios adversos (Edwards and Aronson, 2000; Peper, 2009). Más aún, muchas de ellas tienen una baja solubilidad acuosa y/o una baja permeabilidad celular, problemas que además de afectar a muchas drogas clásicas del tipo molécula pequeña, se han hecho particularmente relevantes para las nuevas estrategias basadas en péptidos, proteínas y ácidos nucleicos, debido a su mayor tamaño y propiedades químicas (Yun et al., 2015).

Además de estos problemas comunes a la farmacología en general, el desarrollo de alternativas terapéuticas para enfermedades que afectan al SNC reviste especial complejidad. A pesar de los importantes avances en la comprensión de la estructura y fisiología de este sistema, tanto la

efectividad de las drogas actualmente disponibles, así como el desarrollo exitoso de nuevas alternativas para este grupo de patologías, son mucho más reducidos comparados con aquellas dirigidas a otro tipo de enfermedades, teniendo incluso un porcentaje de fracaso del 100% en áreas como las principales enfermedades neurodegenerativas (Gribkoff and Kaczmarek, 2017). En general, la investigación de los procesos fisiológicos y fisiopatológicos que tienen lugar en el SNC presenta un alto nivel de complejidad y para muchas enfermedades aún no se conocen con certeza los mecanismos implicados en su origen y desarrollo, por lo que la descripción de dichos mecanismos y la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos es un campo de estudio aún abierto. Sumado a ello, las particularidades del SNC complejizan de manera especial la farmacocinética de los agentes terapéuticos dirigidos a dicho tejido, generando así un obstáculo adicional para el tratamiento farmacológico de este grupo de patologías (Gribkoff and Kaczmarek, 2017).

Dada su alta relevancia para el organismo, el SNC es una región especialmente protegida y el paso de sustancias desde y hacia ella se encuentra altamente regulado por importantes barreras biológicas (Xu et al., 2014). Entre tales barreras, destaca la barrera hematoencefálica (BHE) como la principal separación entre los componentes de la sangre en circulación y del fluido extracelular cerebral. Esta estructura biológica de permeabilidad selectiva está conformada por las células endoteliales de los capilares sanguíneos que llegan hasta el SNC, los cuales se encuentran rodeados de su respectiva lámina basal, además de los pericitos y de los pies perivasculares de los astrocitos. Las uniones ocluyentes establecidas por las células endoteliales restringen el paso de sustancias a mecanismos de transporte que tienen lugar a través de los componentes celulares de la BHE (Abbott et al., 2006). Por otro lado, el SNC cuenta con su propio fluido biológico, conocido como líquido cefalorraquídeo (LCR), el cual le confiere un microambiente particular distinto al del resto del organismo. El LCR es producido por los plexos coroideos, estructura que se encuentra en las zonas ventriculares del cerebro y que es conformada por una capa de células epiteliales que rodean un núcleo de capilares fenestrados y células estromales. Estas células epiteliales se encuentran unidas a través de uniones ocluyentes y regulan el paso de sustancias a través de ellas mediante mecanismos de transporte específicos, al igual que ocurre en la BHE (Lun et al., 2015). Es así como la existencia de estas barreras biológicas supone un importante obstáculo para cualquier droga que pretenda ser dirigida al SNC y ha significado, por un lado, la limitación de la efectividad de muchas de las drogas actualmente existentes, y por otro, una preocupación central para el diseño de nuevas alternativas terapéuticas (Soni et al., 2016).

Por otra parte, en muchas ocasiones el blanco terapéutico corresponde a un componente intracelular, sin embargo, el ingreso del agente farmacológico en la célula no siempre es un proceso favorecido (Jhaveri and Torchilin, 2016). El direccionamiento específico hacia las distintas regiones subcelulares se hace particularmente relevante para el SNC, y en especial para la neurona, debido a la alta especialización que dichas regiones poseen en esta célula. Es por ello que además de la necesidad de atravesar barreras biológicas, es importante que los agentes terapéuticos sean capaces de ejercer sus efectos en regiones subcelulares específicas, a fin de minimizar efectos colaterales y maximizar su actividad farmacológica (Miyashiro et al., 2009).

Todas estas limitaciones han hecho especialmente complejo el tratamiento farmacológico de este grupo de patologías. Así, por ejemplo, drogas de amplia prescripción como antipsicóticos y ansiolíticos presentan una serie de importantes efectos secundarios (Griffin et al., 2013; Miller, 2009). Por otro lado, factores neuroprotectores para tratar y prevenir el infarto cerebral, catalogado como una de las principales causas de muerte a nivel mundial, no han mostrado evidencia clínica satisfactoria suficiente a la fecha (Grupke et al., 2015). Para el caso del tratamiento del cáncer cerebral, la baja solubilidad de las drogas empleadas y el restringido paso a través de la BHE condicionan drásticamente su efectividad (del Burgo et al., 2014), mientras que para las enfermedades neurodegenerativas, aún no existen tratamientos efectivos y que actúen sobre la progresión de la patología (Gribkoff and Kaczmarek, 2017).

Dendrímeros PAMAM y su potencial uso como nanotransportadores de fármacos en el SNC

Muchas estrategias han sido utilizadas con el fin de superar las distintas limitantes que presentan las diversas terapias farmacológicas, entre las cuales, el uso de nanotransportadores para la entrega de fármacos aparece como una promisoriosa alternativa (Cheng et al., 2015; Kannan et al., 2014). El objetivo del uso de tecnologías de entrega de fármacos (*drug delivery*) es mejorar la eficacia y reducir los efectos secundarios adversos de un agente terapéutico a través del control de su biodistribución, biodisponibilidad y propiedades farmacocinéticas en general (Cheng et al., 2015; Liu et al., 2016). Existe una amplia gama de sistemas nanotransportadores de variada naturaleza utilizados en la actualidad, entre los que es posible mencionar micelas, dendrímeros, ciclodextrinas, nanocápsulas, nanotubos de carbono y liposomas, entre otros (**Fig. 1**). Todos estos sistemas tienen la capacidad de establecer distintos tipos de interacciones con el agente terapéutico pudiendo este

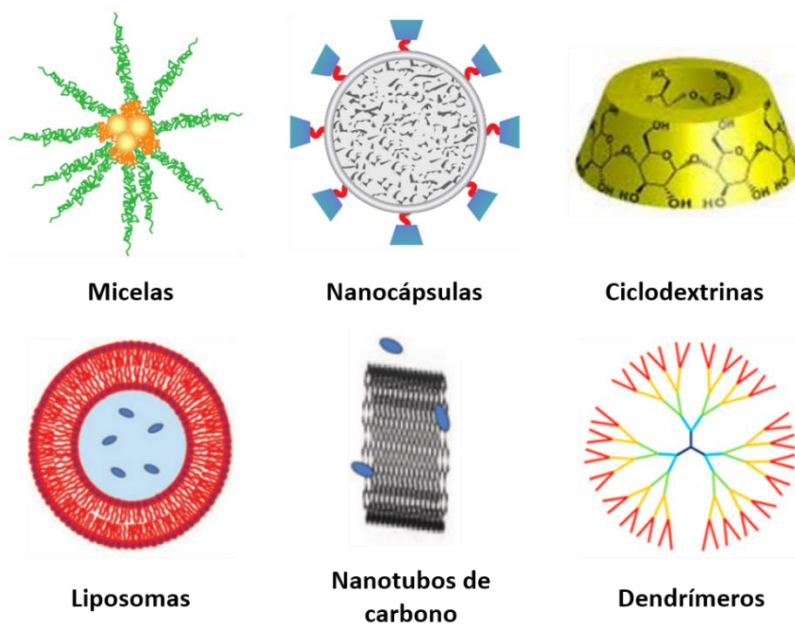


Figura 1. Representación esquemática de los distintos tipos de nanopartículas empleadas como sistemas de transporte y entrega de fármacos. En el panel superior y de izquierda a derecha, micelas, nanocápsulas, ciclodextrinas, y en el panel inferior y de izquierda a derecha, liposomas, nanotubos de carbono, dendrímeros. Fuente: Modificado de (Peer et al., 2007; Wilczewska et al., 2012; Wu et al., 2015)

ser encapsulado, unido covalentemente, adsorbido o generar otro tipo de complejos moleculares. (Peer et al., 2007; Wilczewska et al., 2012; Zhao and Feng, 2015).

Dentro de los distintos nanotransportadores que han sido generados y estudiados, destacan los dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM) como uno de los que han presentado mayores resultados satisfactorios (Kannan et al., 2014; Wu et al., 2015). Los dendrímeros PAMAM son polímeros hiper-ramificados cuya estructura se compone de un núcleo central de etilendiamina que da paso a un crecimiento expansivo en capas desde cada punto focal, formando así distintos niveles conocidos como generaciones. Este crecimiento genera cavidades internas y termina en una superficie de aminas primarias que se encuentran con carga positiva a pH fisiológico (**Fig. 2**). Esta estructura confiere al dendrímero la capacidad de interactuar con otras moléculas a través de diversos mecanismos. Las cavidades generadas permiten encapsular drogas y otro tipo de moléculas pequeñas en su interior, mientras que en su superficie fácilmente modificable es posible enlazar de forma covalente diversos agentes farmacológicos, sondas para su detección o ligandos para su direccionamiento específico. Además, sus grupos terminales de carga positiva posibilitan la interacción electrostática del dendrímero tanto con moléculas pequeñas como con otras

macromoléculas, donde destacan biopolímeros tales como péptidos, proteínas y ácidos nucleicos (Kesharwani et al., 2014; Vidal and Guzman, 2015; Wu et al., 2013, 2015) (**Fig. 3**).

Los estudios a la fecha han mostrado prometedores resultados en el uso de estas macromoléculas como sistemas transportadores para la entrega de drogas, péptidos y ácidos nucleicos principalmente en aplicaciones anticancerígenas, antimicrobianas y antiinflamatorias (Kannan et al., 2014; Manchun et al., 2012; Svenson, 2009a). Para el caso de las enfermedades que afectan al SNC, la investigación desarrollada hasta el momento se ha centrado fundamentalmente en la generación de nanotransportadores capaces de alcanzar específicamente este sistema y de atravesar la BHE, con especial aplicación al tratamiento de gliomas (del Burgo et al., 2014; Xu et al., 2014).

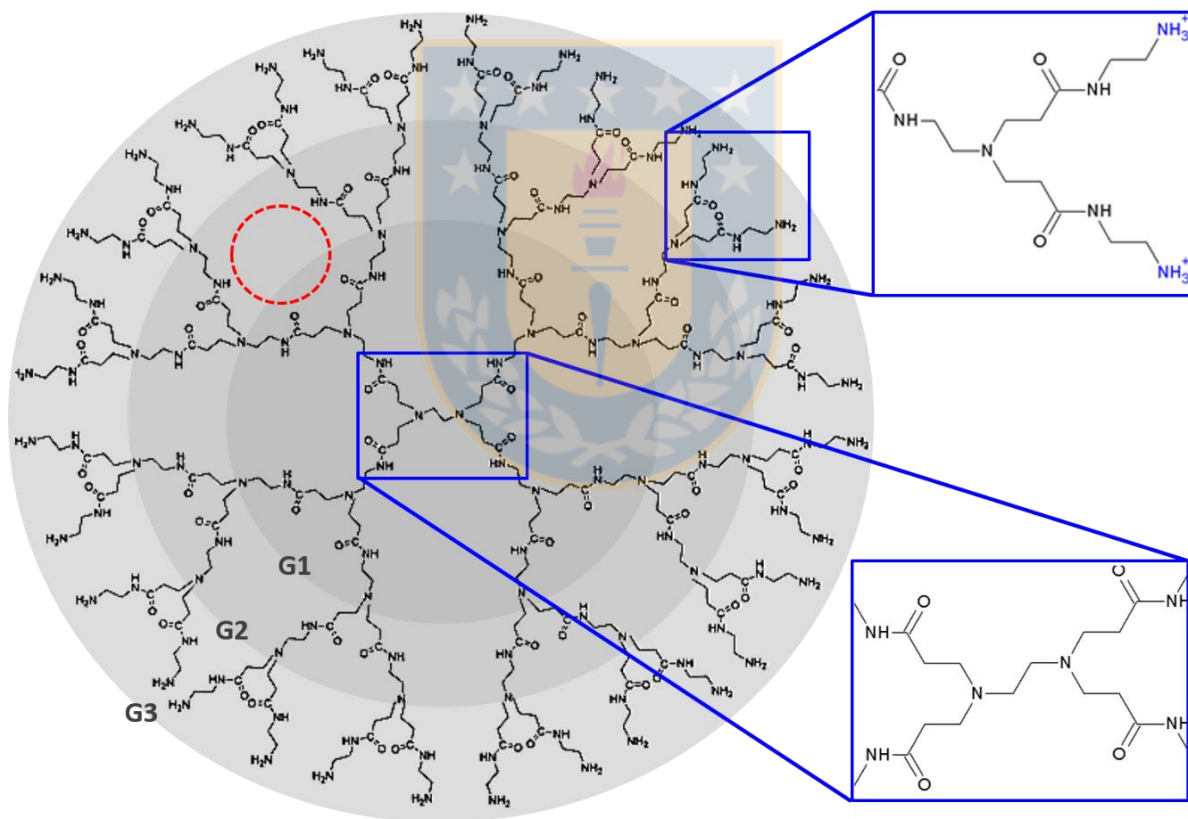


Figura 2. Estructura química del dendrímero PAMAM. Los principales detalles son resaltados. Los recuadros azules muestran los grupos amino superficiales de carga positiva a pH fisiológico y el núcleo central de etilendiamina. El círculo rojo de línea punteada indica una de las cavidades internas generadas. Las diferentes generaciones son marcadas en las distintas tonalidades de color gris. Fuente: Modificado de (Vidal and Guzman, 2015)

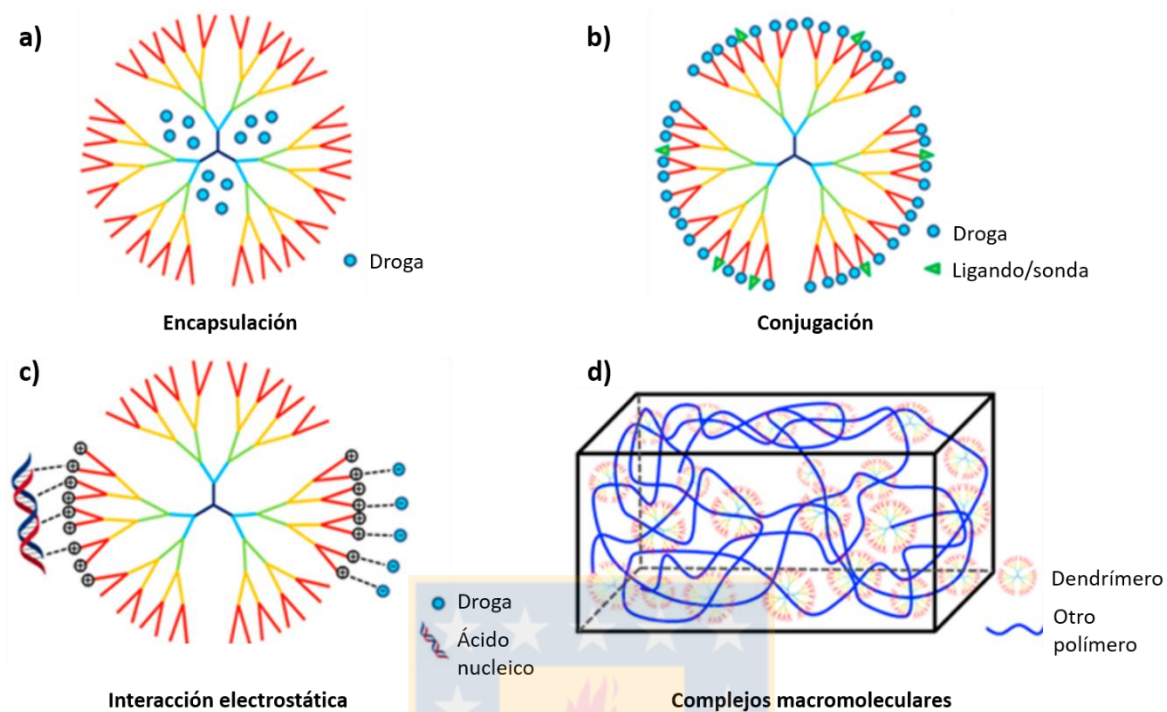


Figura 3. Representación esquemática de las distintas interacciones establecidas por el dendrímtero PAMAM. a) Encapsulación de moléculas pequeñas. b) Conjugación de su superficie a través de enlace covalente. c) Interacción electrostática con moléculas pequeñas o macromoléculas. d) Conformación de complejos macromoleculares con otros polímeros. Fuente: Modificado de (Wu et al., 2015)

Entre los avances más relevantes concernientes al uso de estos polímeros en aplicaciones al SNC, es posible destacar estudios *in vivo* donde se demuestra que el uso de dendrímeros PAMAM conjugados con ligandos de alta afinidad por el receptor de transferrina, expresado en la BHE y en células cancerígenas, optimiza el efecto de drogas de baja solubilidad acuosa y ácidos nucleicos en el tratamiento de gliomas (Gao et al., 2015; Liu et al., 2012). Sumado a ello, el uso de dendrímeros PAMAM y otras nanopartículas para la expresión de GDNF (factor neurotrófico derivado de línea celular glial) funcionalizadas con péptidos de afinidad por el receptor LRP-1 que también se expresa en la BHE, muestra la mejora en la actividad motora y la aparente recuperación de neuronas dopaminérgicas en un modelo de enfermedad de Parkinson en rata (Huang et al., 2013). Por otro lado, estudios demuestran que el aumento de permeabilidad de la BHE que se produce en enfermedades neuroinflamatorias facilita el acceso de dendrímeros PAMAM al SNC y permite su uso para la optimización del efecto de drogas contra daño y parálisis cerebral (Kannan et al., 2012).

No obstante lo anterior, aspectos clave para la aplicación efectiva y segura de estas moléculas como nanotransportadores dirigidos al SNC permanecen aún poco investigados. Entre tales aspectos es posible destacar su potencial toxicidad para las neuronas y las alteraciones de su normal funcionamiento, sus mecanismos de internalización en dichas células a fin de tener una mejor comprensión de su aplicación en la entrega de fármacos a nivel subcelular, además de su biodistribución y el desarrollo de nuevas alternativas de direccionamiento específico al SNC.

Toxicidad celular de dendrímeros PAMAM

Un aspecto central de estudio para las aplicaciones biomédicas y farmacológicas de este tipo de polímeros es su biocompatibilidad, donde es necesario demostrar la ausencia de efectos tóxicos y/o la alteración de la función fisiológica tanto general, como del tejido blanco en particular (Kannan et al., 2014; Soni et al., 2016). En cuanto a la interacción de los dendrímeros PAMAM a nivel celular, ha sido descrito que las cargas positivas de sus grupos amino superficiales inducen efectos citotóxicos, los cuales incrementan a medida que aumenta la generación y concentración del dendrímero (Duncan and Izzo, 2005; Jain et al., 2010; Jevprasesphant et al., 2003). Ensayos de toxicidad medidos con MTT muestran la reducción en la viabilidad celular de células epiteliales de adenocarcinoma colorrectal, Caco-2, cuando estas son tratadas con dendrímeros PAMAM de segunda (PAMAM G2), tercera (PAMAM G3) y cuarta generación (PAMAM G4), siendo posible evidenciar que los efectos tóxicos son inducidos a menor concentración a medida que aumenta la generación (Jevprasesphant et al., 2003). El efecto de dendrímeros PAMAM G4 en la viabilidad celular también fue estudiado mediante ensayo MTT en células B14, fibroblastos de hámster, y células BRL-3A, células hepáticas derivadas de rata, mostrándose su toxicidad creciente a medida que incrementa su concentración (Janaszewska et al., 2013).

Entre los estudios realizados para dilucidar los mecanismos de su toxicidad celular, experimentos de microscopía de fuerza atómica en modelos de bicapas lipídicas y en células KB, línea celular queratina positiva derivada de células HeLa, y células Rat2, fibroblastos de rata, muestran que la superficie catiónica de los dendrímeros PAMAM interacciona con la carga negativa de las membranas biológicas, conduciendo a una disrupción de su estabilidad y la formación de nanoporos que pueden derivar en lisis celular, demostrándose además que estos efectos serían más importantes en los dendrímeros con mayor número de cargas positivas superficiales estudiados, es

decir, PAMAM de quinta generación (PAMAM G5) y PAMAM de séptima generación (PAMAM G7) (Hong et al., 2004; Leroueil et al., 2008). Más aún, estudios en distintos tipos celulares demuestran que el estrés oxidativo y la apoptosis estarían involucrados en los mecanismos de toxicidad inducidos por estas macromoléculas (Mukherjee and Byrne, 2013; Wang et al., 2009). Un estudio realizado en células HaCaT, línea celular de queratinocitos, muestra que el tratamiento con dendrímeros PAMAM G4, G5 y G6 induce el aumento de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) y glutatión (GSH), de factores proinflamatorios como TNF α e IL-8, y la activación de caspasa-3 y -8 (Mukherjee and Byrne, 2013). Por otro lado, el aumento de ROS y la inducción de apoptosis producto del tratamiento con dendrímeros PAMAM G5 también fueron demostrados en células de fibroblastos de embriones de ratón NIH 3T3 (Wang et al., 2009).

Con el fin de superar la limitante que implican estos efectos citotóxicos para el uso de los dendrímeros PAMAM, diversos estudios han explorado la influencia que tiene en ello la modificación de su superficie, demostrando que la sustitución de sus aminas primarias por moléculas neutras o de carga negativa permite la reducción de los efectos tóxicos previamente descritos, con el consecuente incremento de su biocompatibilidad. Entre algunas de las moléculas más comúnmente empleadas para tal fin destacan grupos acetilo, 4-carboxipirrolidona y polietilenglicol (Ciolkowski et al., 2012; Janaszewska et al., 2013; Kolhatkar et al., 2007; Lee et al., 2005; Wang et al., 2009).

En cuanto a estudios más específicos en modelos neuronales y del SNC en general, no existe un gran número de reportes a la fecha. Sin embargo, es posible destacar algunos trabajos. Estudios demuestran que el tratamiento de la línea celular mHippoE-18 con dendrímeros PAMAM G4 disminuye su viabilidad celular en ensayos de MTT (Janaszewska et al., 2013). Por otra parte, ha sido reportado que estos mismos dendrímeros inducen apoptosis en cultivo primario de neuronas corticales (Albertazzi et al., 2013), mientras que dendrímeros PAMAM G5 inducen autofagia que conduce a muerte celular en células de glioblastoma (Wang et al., 2014). Más aún, estudios asociados a la integridad de membrana y la permeabilidad a iones, propiedades de alta relevancia en la funcionalidad neuronal, demuestran que dendrímeros PAMAM G5 incrementan el influjo de iones Na⁺, lo cual estaría asociado a la formación de poros en la membrana plasmática (Nyitrai et al., 2013a). De manera complementaria, también ha sido demostrado que estos mismos dendrímeros aumentan los niveles de Ca²⁺ intracelular en neuronas piramidales y astrocitos, alterando la actividad mitocondrial (Nyitrai et al., 2013b).

Estos hallazgos hacen necesario evaluar el uso seguro y efectivo de estos polímeros en aplicaciones dirigidas al SNC es necesario profundizando en el análisis de la neurotoxicidad de estos compuestos y de cómo prevenirla. En particular, reviste gran importancia el estudio de potenciales alteraciones en la regulación fisiológica de iones claves para la función neuronal y en la actividad sináptica propiamente tal.

Internalización celular de dendrímeros PAMAM

Tal como se mencionó previamente, en muchas ocasiones es fundamental que el agente farmacológico sea capaz de ingresar en la célula para actuar sobre blancos moleculares intracelulares. Los dendrímeros pueden ser utilizados para facilitar este proceso, ya que ha sido descrita su capacidad de ingresar a diferentes tipos celulares mediante distintas rutas de endocitosis (Albertazzi et al., 2010; Perumal et al., 2008; Saovapakhiran et al., 2009; Shen et al., 2014). La endocitosis es un proceso de transporte a través del cual la célula internaliza moléculas de gran tamaño mediante la formación de vesículas a partir de su membrana plasmática (Kumari et al., 2010). Distintos tipos de endocitosis han sido descritos, destacando principalmente la endocitosis mediada por clatrina y la endocitosis mediada por caveola, aunque también existen diversos otros mecanismos independientes de clatrina y caveola (Doherty and McMahon, 2009).

En la endocitosis mediada por clatrina, la vesícula endocítica se forma a partir de la invaginación de la membrana celular y la polimerización de la proteína clatrina, la cual conforma una red poligonal que da estructura y recubre a la vesícula. La asociación de tres cadenas pesadas y tres cadenas livianas de clatrina conforman lo que se conoce como trisqueliones, siendo estas estructuras las que se ensamblan entre sí para recubrir a la vesícula, en un proceso en el que participan proteínas ensambladoras dentro de las que destaca la proteína adaptadora AP-2. Finalmente, la GTPasa dinamina se encarga de separar a la vesícula de la membrana (McMahon and Boucrot, 2011). Este proceso endocítico prosigue con la asociación a endosomas tempranos, endosomas tardíos y finalmente a lisosomas, en una vía de acidificación de estas vesículas y de degradación de las partículas endocitadas (Khalil et al., 2006) (**Fig. 4**). Por su parte, en la endocitosis mediada por caveola, la vesícula endocítica se forma mediante una invaginación de la membrana celular que tiene lugar en rafts lipídicos conocidos como caveolas. Éstos corresponden a microdominios lipídicos que se conforman en torno a la proteína caveolina-1, la cual es una proteína de membrana que no

expone sitios hacia la zona extracelular y que en su región N-terminal posee un sitio de andamiaje que une colesterol y esfingolípidos, generando una zona enriquecida en dichos lípidos (Kiss and Botos, 2009). En esta vía, se ha descrito que los endosomas derivan hacia el aparato de Golgi y/o el retículo endoplásmico, en una ruta donde no habría acidificación ni degradación, aunque también ha sido descrito que en ciertos casos terminan asociados a endosomas y lisosomas (Khalil et al., 2006; Kiss and Botos, 2009) (Fig. 4).

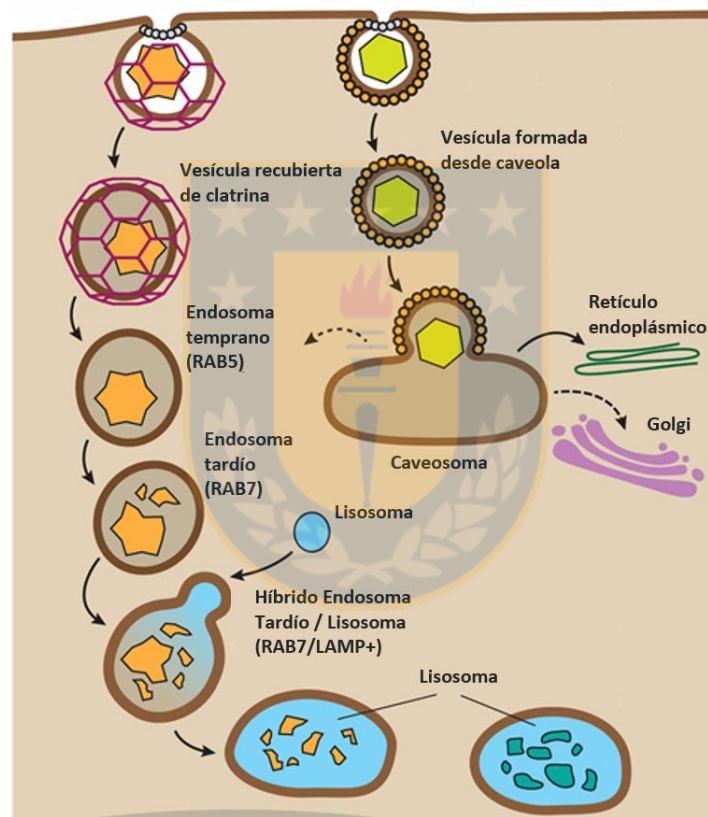


Figura 4. Principales mecanismos de endocitosis. A la izquierda, la endocitosis mediada por clatrina, donde se muestra la formación de la vesícula recubierta por clatrina, su separación de la membrana y su paso a los endosomas tempranos, endosomas tardíos y finalmente a lisosomas, con la degradación de la molécula endocitada. A la derecha, la endocitosis mediada por caveola, donde se muestra la formación de la vesícula desde caveola, su separación de la membrana, la formación del caveosoma y su paso ya sea al retículo endoplásmico y/o el aparato de Golgi, o al endosoma temprano. Fuente: Modificado de (Stern et al., 2012).

En cuanto a los mecanismos de internalización celular descritos para los dendrímeros PAMAM, la evidencia experimental demuestra que estos varían dependiendo de las propiedades superficiales del dendrímero y del tipo celular (Albertazzi et al., 2010; Perumal et al., 2008; Saovapakhiran et al., 2009; Shen et al., 2014). Así, por ejemplo, la sobreexpresión de caveolina-1 (endocitosis mediada por caveola) incrementa el ingreso de dendrímeros PAMAM G5 modificados con moléculas de polietilenglicol en su superficie (PAMAM-PEG) en células de hepatocarcinoma HepG2, mientras que en células de mioblasto C2C12, esta sobreexpresión no influye en el proceso (Shen et al., 2014). A su vez, estudios demuestran que en células epiteliales de carcinoma pulmonar A549, dendrímeros PAMAM G4 con superficie de carga positiva ingresan a la célula por mecanismos no mediados ni por clatrina ni caveola, mientras que dendrímeros PAMAM 3.5 de superficie aniónica, lo harían parcialmente por endocitosis mediada por caveola y por mecanismos no mediados ni por clatrina ni caveola. Además, estos estudios muestran que los dendrímeros de superficie positiva tienen un mayor grado de internalización comparados con aquellos de superficie neutra y negativa (Perumal et al., 2008). La internalización de dendrímeros PAMAM G4 también fue demostrada en células HeLa, en procesos de endocitosis mediados por clatrina y macropinocitosis (Albertazzi et al., 2010).

Para el caso de las neuronas, como primera aproximación se emplearon células PC-12, provenientes de la glándula adrenal y de origen neuronal, demostrándose la eficiente unión a la membrana plasmática por parte de dendrímeros PAMAM G4, pero una baja internalización comparadas con otras líneas celulares como HepG2 y HeLa (Albertazzi et al., 2010). Posteriormente, estudios en cultivo primario de neuronas corticales mostraron la internalización neuronal de dendrímeros PAMAM G4 (Albertazzi et al., 2013). Sin embargo, los mecanismos específicos por los cuales estas moléculas son internalizadas en neuronas y la influencia que puedan tener modificaciones superficiales en dicho proceso aún no han sido determinados. Conocer con mayor detalle cómo ocurre el proceso de internalización de estas nanopartículas en neuronas posee gran relevancia para su aplicación como nanotransportadores en estas células, ya que de los distintos mecanismos de ingreso de los dendrímeros dependerán importantes aspectos, tales como su cinética de internalización, su distribución intracelular, asociación a organelos y la liberación de su carga farmacológica.

Biodistribución y direccionamiento al SNC

En general, la biodistribución y clearance del organismo de las nanopartículas utilizadas como transportadores de fármacos depende de una serie de factores, entre los cuales destacan por parte de la nanopartícula, su composición química, tamaño, geometría, las propiedades de su núcleo central y especialmente las de su superficie; mientras que desde el punto de vista del organismo destacan la interacción con proteínas plasmáticas, la potencial activación del sistema inmune y las distintas barreras biológicas existentes. Todos estos factores en conjunto influyen directamente sobre el tiempo de vida media en circulación de estos compuestos y su acumulación en determinados tejidos (Alexis et al., 2008; Moghimi et al., 2012).

Los primeros estudios realizados para la biodistribución de los dendrímeros PAMAM, utilizando ratones como modelo *in vivo* y evaluando dendrímeros G3, G5 y G7, muestra que estos polímeros se acumulan preferentemente en el hígado, páncreas, riñón y bazo. Además, una rápida y marcada aparición del dendrímero G7 en la orina fue evidenciada, alcanzado un valor de un 74% de la dosis administrada a las 4 h post inyección, lo cual sugiere su rápida excreción del organismo (Roberts et al., 1996). Un estudio posterior efectuado en rata como modelo animal y empleando dendrímeros PAMAM G2.5, G3, G3.5, G4 y G5.5 mostró que en general, todas estas nanopartículas tienen una rápida depuración de la circulación sanguínea y una importante acumulación a nivel hepático, siendo posible detectar en este órgano un 60 – 90 % de la dosis administrada a 1 h post inyección. Cabe destacar que los dendrímeros de superficie negativa (G2.5, G3.5, G5.5) presentaron un mayor tiempo de duración en circulación, aunque su presencia en el plasma no supera el 40% a 1 h post inyección (Malik et al., 2000). Ambos estudios indican que no existe una correlación directa entre la masa molar y el patrón de biodistribución de los dendrímeros PAMAM, sugiriendo que su masa molar, arquitectura y propiedades superficiales actúan en conjunto para determinar su biodistribución (Malik et al., 2000; Roberts et al., 1996).

La posibilidad de modificar fácilmente la superficie de los dendrímeros PAMAM es una de sus características más notables, por lo que el efecto de dichas modificaciones en su biodistribución a fin de optimizar su biodisponibilidad en el organismo también ha sido evaluado. Es así como la modificación superficial de estos compuestos con moléculas de polietilenglicol ha demostrado incrementar su tiempo de retención en circulación y disminuir su acumulación en órganos como

hígado y riñón, fenómeno que sería más notorio a medida que aumenta el largo de cadena de la molécula de polietilenglicol utilizada (Kojima et al., 2010; Liu et al., 2014).

En cuanto a la distribución de estas macromoléculas hacia el SNC, los experimentos de biodistribución general muestran que su acumulación en dicho tejido es baja y que su paso a través de la BHE se encuentra restringido (del Burgo et al., 2014; Xu et al., 2014). Sin embargo, existen algunos factores que podrían facilitar el paso de los dendrímeros hacia el SNC. Uno de ellos es la vía de administración, ya que estudios muestran que dendrímeros PAMAM G4 inyectados de forma intracerebroventricular en ratón, son capaces de pasar desde la región ventricular hacia el parénquima cerebral. Sin embargo, cuando la superficie de estos dendrímeros es modificada con cadenas alifáticas de 12 carbonos, estos no son capaces de pasar a través de esta barrera, reafirmando la importancia de las propiedades superficiales en su interacción con componentes biológicos (Albertazzi et al., 2013). Por otro lado, también ha sido demostrado que el aumento de permeabilidad de la BHE que se produce en ciertas patologías permite el paso de estos polímeros a través de ella. Así, por ejemplo, estudios en modelo animal de neuroinflamación y parálisis cerebral en conejo muestran que dendrímeros PAMAM G4, cuya superficie ha sido sustituida completamente por grupos hidroxilo, presentan la capacidad de alcanzar el parénquima cerebral y colocalizar con astrocitos y microglías en esta condición patológica (Kannan et al., 2012; Lesniak et al., 2013). Más aún, ha sido reportada la presencia de dendrímeros PAMAM G6 modificados con hidroxilo en hipocampo, corteza, cerebelo y LCR post inyección intravenosa en un modelo canino de daño cerebral, demostrándose además que dendrímeros G6 presentan una mayor acumulación en cerebro comparados con dendrímeros G4 (Zhang et al., 2017).

Más allá de estos hallazgos, el mayor desafío actualmente dice relación con la posibilidad de emplear estos y otros nanotransportadores en condiciones en las que la BHE presenta una permeabilidad normal, es decir, en donde el paso de estos compuestos se encuentra restringido. Para ello, han sido desarrollados distintos sistemas funcionalizados con ligandos afines por receptores expresados en la BHE y que buscan traspasarla a través de transcitosis mediada por dichos receptores (del Burgo et al., 2014; Xu et al., 2014) (**Fig. 5**). Dentro de los receptores más comúnmente utilizados como blanco para tal objetivo se encuentra, por ejemplo, el receptor LRP-1, para el cual se han diseñado distintos ligandos peptídicos denominados Angiopep y cuya unión a la superficie de los dendrímeros ha demostrado su eficiente direccionamiento al SNC (Gao et al., 2013; Ke et al., 2009). Otro receptor de gran interés ha sido el receptor de transferrina, para el que

también se han generado ligandos como el péptido T7, el cual ha sido empleado para funcionalizar dendrímeros PAMAM y otras nanopartículas dendriméricas similares, demostrándose la capacidad

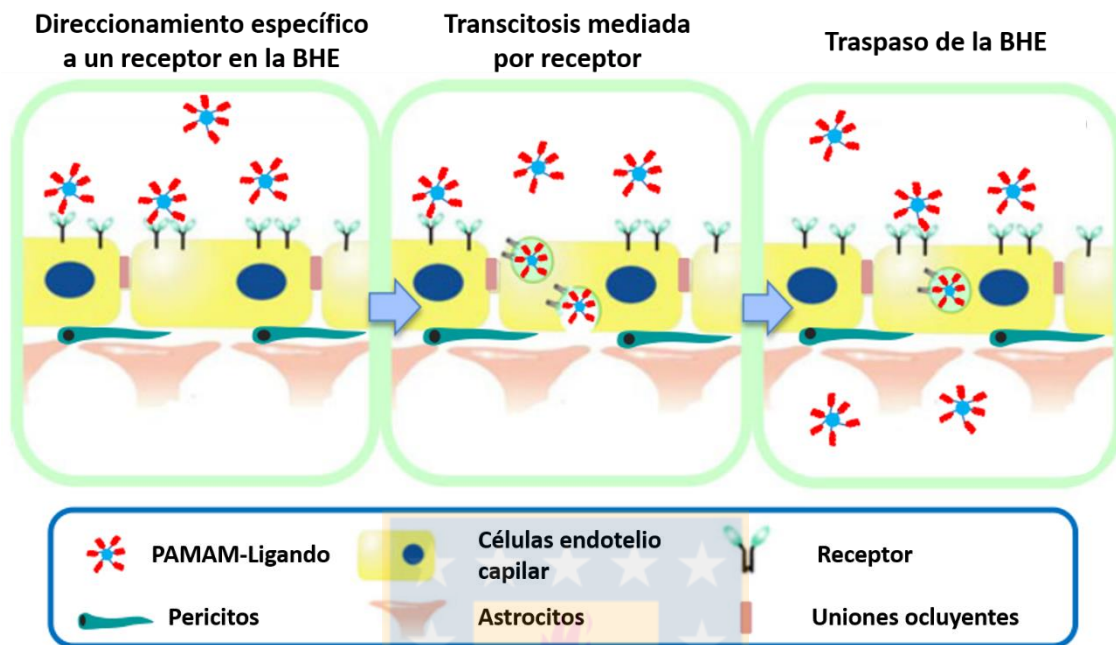


Figura 5. Representación esquemática del traspaso por la BHE de dendrímeros funcionalizados mediante transcitosi mediada por receptor. De izquierda a derecha se observa la unión específica del sistema dendrímero-ligando al receptor en la cara apical del endotelio, la transcitosi del sistema dendrímero-ligando a través de la maquinaria de tráfico intracelular endotelial y finalmente su liberación hacia el interior del SNC. Fuente: Modificado de (Gao et al., 2013).

de estos sistemas de alcanzar el SNC en mayor proporción al compararlos con aquellos no funcionalizados (Gao et al., 2015; Kuang et al., 2013; Liu et al., 2012).

A pesar de que muchos de estos estudios han evidenciado inclusive la capacidad de estos sistemas funcionalizados de optimizar la acción de determinados fármacos *in vivo*, principalmente de agentes anticancerígenos en modelos de glioma, la demostración efectiva de su traspaso a través de la BHE y su localización en células del parénquima cerebral, en general, no ha sido cabalmente descrita (Gao et al., 2015, 2013; Ke et al., 2009; Kuang et al., 2013; Liu et al., 2012). Por otro lado, existen otras estructuras que podrían ser empleadas como una puerta de entrada al SNC y que podrían mediar este proceso con mayor eficiencia. Por ello, la búsqueda de nuevos blancos para el direccionamiento de nanotransportadores de fármacos hacia el SNC y la demostración efectiva de su localización en el parénquima nervioso siguen siendo importantes campos abiertos de estudio.

En tal sentido, a la fecha, ha sido poco explorada la posibilidad de direccionar sistemas de entrega de fármacos hacia receptores expresados en los plexos coroideos, estructura encargada de la producción del LCR y a través del cual estas nanopartículas podrían distribuirse por todo el SNC. Entre los receptores que se expresan en esta estructura se encuentra el receptor alfa de folato (FOLR α), el cual transporta dicha molécula por medio de transcitosiis para su posterior liberación hacia astrocitos y neuronas, lo que lo convierte en un potencial blanco para el transporte y entrega de fármacos hacia el SNC (Grapp et al., 2013) (**Fig. 6**). La funcionalización de nanotransportadores de fármacos con folato no es nueva y ha sido previamente explorada para su direccionamiento específico a células tumorales, debido a la sobreexpresión existente de este receptor en células con esta condición patológica (Choi et al., 2005; Guo et al., 2011; Pradhan et al., 2010; Singh et al., 2008). El mecanismo de transporte descrito para el folato en el SNC abre la posibilidad de una interesante nueva aplicación para dendrímeros funcionalizados con esta molécula y otras derivadas de ella.

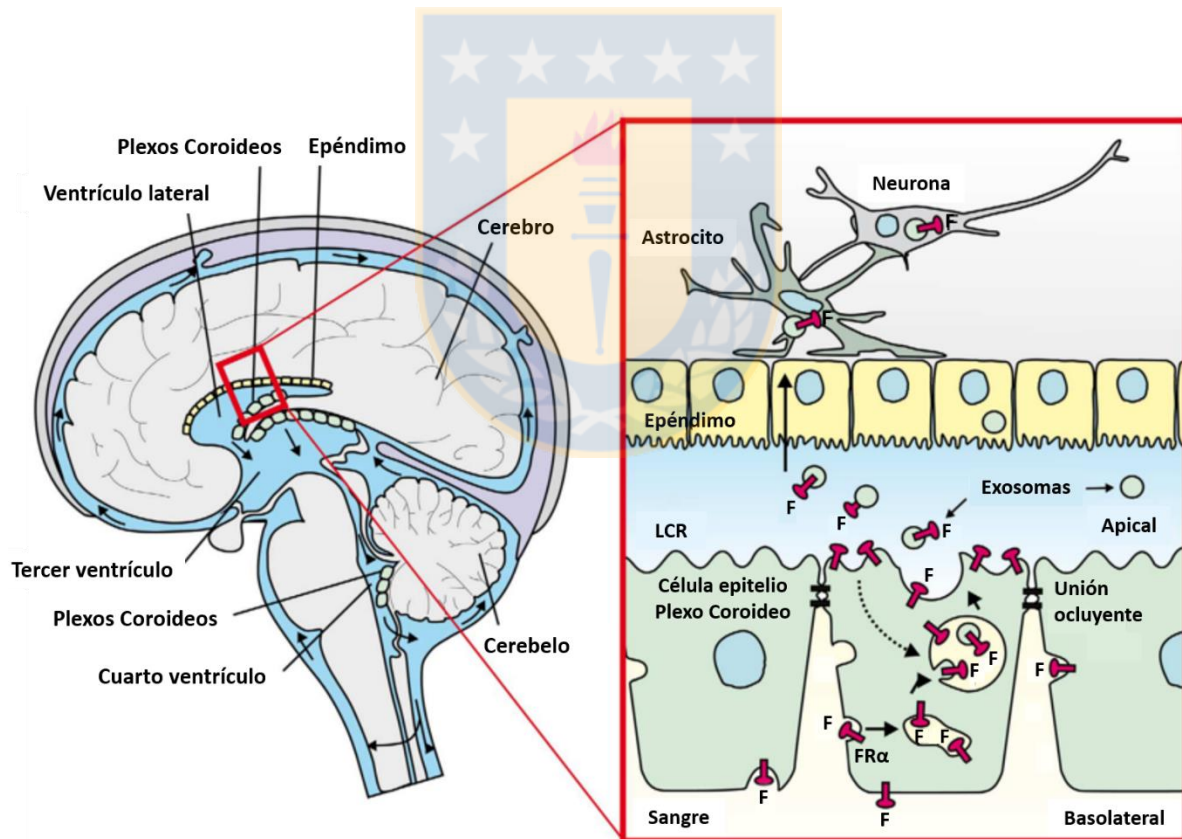


Figura 6. Representación del modelo de transporte de folato a través de los plexos coroideos en humano. El rectángulo rojo muestra una magnificación de la región del plexo coroideo y el epéndimo. El folato (F) sería captado por el receptor FR α en la membrana basolateral del plexo coroideo. Luego, el complejo F-FR α es internalizado por endocitosis mediada por receptor y translocado hacia la zona apical. Desde allí, exosomas que contienen el complejo F-FR α son liberados hacia el LCR, los cuales atraviesan la capa celular ependimaria para ser captados por astrocitos y (a través de ellos) neuronas. Fuente: Modificado de (Grapp et al., 2013)

II. HIPÓTESIS

Sistemas nanotransportadores de fármacos basados en dendrímeros PAMAM ingresan en neuronas a través de mecanismos de endocitosis sin generar alteraciones significativas en sus propiedades electrofisiológicas y son capaces de alcanzar el SNC *in vivo*.



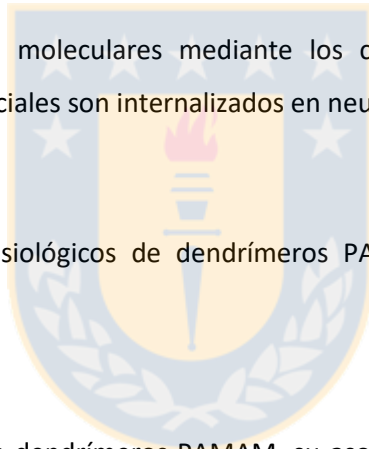
III. OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar los mecanismos de internalización celular y efectos electrofisiológicos de dendrímeros PAMAM con distintas propiedades superficiales en neuronas, además de su biodistribución *in vivo*.

Objetivos específicos

1. Determinar los mecanismos moleculares mediante los cuales dendrímeros PAMAM con distintas propiedades superficiales son internalizados en neuronas.
2. Evaluar los efectos electrofisiológicos de dendrímeros PAMAM con distintas propiedades superficiales.
3. Estudiar la biodistribución de dendrímeros PAMAM, su asociación a distintas estructuras del SNC y el efecto de su funcionalización con folato en dichos fenómenos.



IV.METODOLOGÍA

Aspectos generales

1. Materiales

Dendrimeros PAMAM de cuarta generación (G4, disuelto en metanol, Sigma número CAS 163442-67-9), polietilenglicol 2000 Da, 2-carboxietilacrilato, folato, fluoresceína isotiocianato (FITC), anticuerpos monoclonales producidos en ratón anti-clatrina, anti-Rab5, y anti-MAP2, y anticuerpos policlonales producidos en conejo anti-caveolina-1 y anti MAP2, clorpromazina clorhidrato (CPZ), complejo filipin (Fil), transferrina-FITC y toxina del cólera subunidad B-FITC fueron comprados a Sigma-Aldrich (Santiago, Chile). Fluo-4 AM, sonda de permeabilidad celular, marcador FMTM 1-43 y el reactivo de viabilidad celular AlamarBlueTM fueron comprados a Thermo Fischer Scientific (Santiago, Chile). OCT Optimal Cutting Temperature Compound y medio de montaje Fluoroshield with DAPI fueron obtenidos de VWR International (Fontenay-sous-Bois, Francia) y Sigma-Aldrich (Alemania), respectivamente.

2. Cultivos celulares

Neuronas hipocampales fueron obtenidas desde embriones de ratones C57BL/6J de 18-19 días, según lo descrito por las recomendaciones del *National Institute of Health* (NIH) (Aguayo and Pancetti, 1994). El medio de cultivo consistió en 90% medio MEM (BRL Technologies, Rockville, MD, USA), 5% suero de caballo inactivado por calor, 5% suero bovino fetal y una mezcla de suplementos nutritivos. Las células fueron sembradas a una concentración de 300.000 céls/mL y los estudios se realizaron luego de 7 a 10 días en cultivo. El cuidado de los animales y los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Concepción y fueron realizados de acuerdo con los protocolos de ética establecidos por el NIH y la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica de Chile (CONICYT).

3. Funcionalización de dendrímeros PAMAM

Para los diversos estudios realizados, distintos dendrímeros fueron generados a partir del dendrímero PAMAM G4. Dendrímero PAMAM G4 sin modificaciones superficiales (G4), que posee sus 64 grupos amino con carga positiva expuestos. Dendrímero PAMAM G4 con sus grupos amino superficiales sustituidos por folato en un 25% (PFO₂₅) y 50% (PFO₅₀), según el protocolo de Benchaala y col. (Benchaala et al., 2014). Dendrímero PAMAM G4 con sus grupos amino superficiales sustituidos por polietilenglicol 2000 Da en un 25% (PPEG₂₅) y (PPEG₅₀) 50%, según el protocolo de Kojima y col. (Kojima et al., 2000). Dendrímero PAMAM G4 con 30% de sus grupos amino superficiales sustituidos por 2-carboxietilacrilato (PAC), mediante adición de Michael (Sabahi et al., 2014). Dendrímeros marcados con FITC, según el protocolo de Kolhe y col. (Kolhe et al., 2003) y con AlexaFluor 555 mediante reacción con el grupo N-hidroxisuccinimida según recomendación del fabricante. Protocolos de diálisis y lavado fueron aplicados para eliminar el exceso de reactivos. Luego del proceso de secado, los dendrímeros fueron disueltos en buffer PBS (pH 7,4). Todas las modificaciones químicas y la ausencia de solventes como metanol y otros, fueron verificadas mediante espectroscopía RMN ¹H en espectrómetro Bruker 400 Avance (Ettlingen, Alemania) (Anexo 1).

Determinación de los mecanismos moleculares de internalización neuronal de dendrímeros PAMAM según sus propiedades superficiales

4. Inmunocitoquímica

Neuronas hipocampales fueron incubadas con los dendrímeros G4, PPEG₅₀, PAC y PFO₂₅, marcados con FITC a concentración 0,5 μM a diferentes tiempos en incubadora (37 °C, 5% CO₂). Luego de la incubación, las células fueron lavadas con buffer PBS y fijadas con paraformaldehído 4% por 15 minutos. Las células fueron nuevamente lavadas y permeabilizadas con solución de Triton 0,1% por 30 minutos. Anticuerpos anti-MAP2 producidos en ratón y conejo (1:200) fueron utilizados para marcar las neuronas. Para el estudio de las rutas de endocitosis fueron empleados anticuerpos anti-clatrina (1:500) producido en ratón, anti-caveolina-1 (1:1000) producido en conejo y anti-Rab5 (1:1000) producido en ratón. Todos los anticuerpos primarios fueron incubados durante 16 h a 4 °C. Anticuerpos secundarios contra anticuerpos de ratón y conejo marcados con AlexaFluor 647 (1:200) se utilizaron para MAP2, mientras que anticuerpos secundarios contra anticuerpos de ratón y conejo

marcados con Cy3 (1:200) fueron utilizados para los marcadores de endocitosis. Todos los anticuerpos secundarios fueron incubados durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, las células fueron incubadas por 10 min a temperatura ambiente con DAPI para el marcaje nuclear.

5. Estudio de internalización

Neuronas hipocampales fueron incubadas por 30 minutos con dendrímeros G4 y PFO₂₅ marcados con FITC a concentración 0,5 μ M en incubadora. Posteriormente, las células fueron lavadas con buffer PBS para remover el exceso de dendrímero y se incubaron en medio de cultivo por 0, 2,5 o 5 h en incubadora. A continuación, fueron fijadas y permeabilizadas, y se procedió con el marcaje neuronal y nuclear según lo descrito en el protocolo de *Inmunocitoquímica*. Para un análisis más detallado, se estableció una región de interés (ROI) de 2,2 x 3,96 μ m desde la membrana plasmática hacia el interior de la neurona y el perfil de la intensidad de fluorescencia dentro de dicha región fue determinado, normalizando los valores de intensidad según la fluorescencia promedio de la respectiva neurona analizada. El programa MacBiophotonics ImageJ fue empleado para llevar a cabo el análisis.

6. Análisis de colocalización

Las imágenes obtenidas de la inmunocitoquímica para los marcadores de endocitosis fueron analizadas con el programa MacBiophotonics ImageJ a fin de determinar su colocalización con la marca de los dendrímeros G4 y PFO₂₅ marcados con FITC. El coeficiente de Manders fue determinado por neurona, obteniéndose los valores promedio para cada marcador con ambos dendrímeros.

7. Ensayo con inhibidores específicos de endocitosis

Como otra forma de determinar la ruta de endocitosis seguida por cada dendrímero, las neuronas fueron incubadas por 30 min en incubadora con el inhibidor de endocitosis mediada por clatrina, clorpromazina (20 μ g/mL), o con el inhibidor de endocitosis mediada por caveola, filipin (2 μ g/mL). Transferrina marcada con FITC fue utilizada como control de endocitosis mediada por clatrina,

mientras que toxina del cólera subunidad B marcada con FITC, fue empleada como control de endocitosis mediada por caveola (**Anexo 2**). Las células fueron incubadas por 1 h con dendrímeros G4 y PFO 0,5 μ M marcados con FITC en incubadora. A continuación, fueron fijadas y permeabilizadas, y se procedió con el marcaje neuronal y nuclear según lo descrito en el protocolo de *Inmunocitoquímica*. La intensidad de fluorescencia de los dendrímeros marcados con FITC por neurona fue medida con el programa MacBiophotonics ImageJ y se compararon los valores promedio de intensidad para las células tratadas y no tratadas con los inhibidores de endocitosis, considerando el promedio de intensidad de fluorescencia de las células no tratadas como 100% de fluorescencia.

8. Microscopía confocal

Las imágenes para los distintos ensayos fueron obtenidas en el Centro de Microscopía Avanzada (CMA Bio-Bio) de la Universidad de Concepción. Para ello, se utilizó un microscopio confocal espectral (LSM780 NLO, Zeiss) equipado con objetivo Plan-Apochromat 63x/1.40 oil DIC M27 y láseres de 405, 488, 561 y 633 nm. El equipo de detección de fluorescencia consiste en detector con 32 fotomultiplicadores policromáticos GaASP, 2 fotomultiplicadores PMP FL y un detector de luz transmitida T-PMT.

9. Análisis estadístico

Todos los experimentos fueron efectuados utilizando un muestreo no-probabilístico por conveniencia, considerando cada neurona de tres diferentes disecciones como la unidad de estudio. Los resultados son expresados como el promedio \pm la desviación estándar. En el caso del ensayo con inhibidores de endocitosis, los test de Levene y Shapiro-Wilk fueron usados para evaluar la homocedasticidad de varianza y la normalidad de las variables, respectivamente. El test de Kruskal-Wallis fue empleado para evaluar las diferencias significativas entre las neuronas tratadas con inhibidor y las neuronas control. Los datos fueron analizados con el programa Origin 6.0 (MicroCal Inc.).

Evaluación de los efectos electrofisiológicos de dendrímeros PAMAM con distintas propiedades superficiales

10. Evaluación de citotoxicidad

Neuronas hipocampales fueron incubadas en placas de 24 pocillos en incubadora con los dendrímeros G4, PFO₂₅ y PPEG₂₅. Neuronas incubadas solo con medio de cultivo y con Triton 0,25% fueron utilizados como controles positivos y negativos de viabilidad celular, respectivamente. Luego del tratamiento, las células fueron incubadas por 2 h con AlamarBlue 10% en incubadora. Finalmente, la fluorescencia del reactivo (excitación 540 nm – emisión 590 nm) fue medida en un lector multiplacas NOVOstar (BGM Labtech, Offenburg, Alemania).

11. Análisis de transitorias de Ca²⁺ intracelular.

Neuronas hipocampales fueron incubadas con la sonda Fluo-4 AM en buffer PBS en incubadora por 20 minutos. Luego, las células fueron lavadas por 20 minutos con buffer PBS en incubadora y traspasadas a pocillo con solución externa normal (SEN), consistente en NaCl 150 mM, KCl 5,4 mM, CaCl₂ 2,0 mM, MgCl₂ 1,0 mM, HEPES 10 mM (pH 7,4) y glucosa 10 mM. Posteriormente, las células fueron montadas en microscopio invertido Nikon TE2000 (Tokio, Japón). Los cambios en la intensidad de fluorescencia (excitación 480 nm – emisión 510 nm) fueron adquiridos cada 2 s durante un periodo de 200 s con cámara iXon EMCCD (Andor, Belfast, Irlanda del Norte). Los registros fueron realizados con el programa ImagingWorkbench 6.0 (Indec Biosystems, Santa Clara, CA, USA). Registros en presencia de SEN fueron usados como control y una solución 1 μM de los distintos dendrímeros fue utilizada para evaluar su efecto en la actividad normal de Ca²⁺ intracelular.

12. Electrofisiología

Registros de patch clamp fueron realizados fijando el potencial de membrana en -60 mV y las corrientes fueron adquiridas con un panel Digidata 1200 y el programa pClamp10 (Axon Instruments, Inc., Foster City, CA, USA). Las pipetas de registro fueron elaboradas a partir de capilares de borosilicato (WPI, Sarasota, FL) en un “puller” horizontal (Sutter Instruments P-89, Novato, CA) y se cargaron con solución KCl 140 mM, BAPTA 10 mM, HEPES (pH 7,4) 10 mM, MgCl₂

4 mM, ATP 2 mM y GTP 0,5 mM. La solución para las células fue la misma SEN descrita en el protocolo de *Análisis de transitorias de Ca²⁺ intracelular*.

Para los estudios de permeabilidad de membrana, se utilizó la configuración “cell-attached” y se adicionaron los diferentes dendrímeros en estudio en la solución cargada en la pipeta de registro a una concentración 1 μ M, tal como en los experimentos de patch clamp perforado, y se usó una solución sin dendrímero como control. Los registros se llevaron a cabo durante 30 minutos.

Para los estudios de actividad sináptica, se utilizó la configuración “whole-cell”. Solución SEN con tetrodotoxina (TTX) 0,5 μ M fue aplicada mediante perfusión durante 2 min como condición control y luego los diferentes dendrímeros, disueltos en la misma solución a concentración 1 μ M, fueron aplicados por perfusión durante 2 min.

13. Estudio de la liberación de vesículas sinápticas

Neuronas hipocampales fueron incubadas en solución de alta concentración de K⁺ (30 mM) durante 5 minutos en incubadora. Luego, las células fueron lavadas con SEN e incubadas por 15 minutos con el marcador de vesículas FM 1-43 en incubadora. Las neuronas fueron lavadas nuevamente con SEN y montadas en microscopio invertido Nikon TE2000 (Tokio, Japón). Los cambios en la intensidad de fluorescencia (excitación 510 nm – emisión 620 nm) fueron adquiridos cada 2 durante un periodo de 15 min con cámara iXon EMCCD (Andor, Belfast, Irlanda del Norte). Los registros fueron realizados con el programa ImagingWorkbench 6.0 (Indec Biosystems, Santa Clara, CA, USA). Registros en presencia de SEN fueron usados como control y una solución 1 μ M de los distintos dendrímeros fue utilizada para evaluar su efecto en la liberación de vesículas sinápticas.

14. Análisis estadístico

Todos los experimentos fueron efectuados utilizando un muestreo no-probabilístico por conveniencia, considerando cada neurona de tres diferentes disecciones como la unidad de estudio. Para el caso de los ensayos de citotoxicidad, cada pocillo de una placa de 24 pocillos fue considerado como la unidad de estudio. Los resultados son expresados como el promedio \pm la desviación estándar. El test de Shapiro-Wilk fue utilizado para la evaluar la normalidad de las variables. El Análisis de varianzas (ANOVA) y el post hoc test de Tukey fueron usados para determinar diferencias

significativas. Para el caso de la evaluación de la actividad sináptica, se empleó el test Kolmogorov-Smirnov. Los datos fueron analizados con el programa GraphPAD Prism 6.0 (GraphPad, La Jolla, CA, USA).

Estudio de la biodistribución de dendrímeros PAMAM, su asociación a distintas estructuras del SNC y el efecto de su funcionalización con folato en dichos fenómenos

15. Animales

Ratones C57BL/6J macho de 8-12 semanas de edad fueron utilizados para los ensayos de biodistribución *in vivo*. El cuidado de los animales y los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Concepción y fueron realizados de acuerdo con los protocolos de ética establecidos por la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica de Chile (CONICYT) y el *German Animal Welfare Act* basado en la guía 2010/63 de la Unión Europea.

16. Evaluación de biodistribución

Dendrímeros G4 y PFO₄₀ marcados con la sonda fluorescente AlexaFluor 555 fueron inyectados por vía intravenosa en ratones C57BL/6J a una dosis de 1 $\mu\text{mol/kg}$. Para su administración, los dendrímeros fueron disueltos en buffer PBS e inyecciones que contuvieron sólo dicho buffer fueron utilizadas como condición control. Luego, se recolectó el plasma, hígado, riñón y cerebro a las 0,5, 1 y 4 horas post-inyección, respectivamente. Las muestras de plasma fueron preservadas a -80 °C para su posterior análisis. Para el caso de los órganos, estos fueron embebidos con compuesto OCT (Optimal Cutting Temperature Compound) (VWR International, Fontenay-sous-Bois, Francia) en criomoldes estándar (Weckert Labortechnik, Kitzingen, Alemania) para ser congelados en isopentano frío. Se obtuvieron rebanadas de las distintas regiones de interés utilizando un micrótopo criostato Leica CM 3050s-cryostate (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Las rebanadas de los distintos tejidos fueron posteriormente fijadas con paraformaldehído 4% por 2 minutos y luego montadas en portaobjeto con medio de montaje que incluía DAPI como marcador nuclear (Fluoroshield with DAPI, Sigma-Aldrich) para su observación en microscopio confocal.

17. Determinación de concentración de dendrímeros en plasma

Se midió la emisión de fluorescencia de las muestras de plasma obtenidas para los distintos tiempos post-administración de G4 y PFO₄₀ (excitación 550 nm – emisión 580 nm) utilizando un lector multiplacas TECAN infinite M200 pro (Zúrich, Suiza). Para el cálculo de la concentración, se realizaron las curvas respectivas para cada dendrímero.

18. Microscopía confocal

Las imágenes para los distintos ensayos fueron obtenidas utilizando un microscopio confocal espectral (LSM FV1000MPE, Olympus) equipado con objetivos Olympus UIS2 y láseres de 405, 473, 559 y 635 nm. El equipo de detección de fluorescencia consiste en 3 detectores fotomultiplicadores estándar, 2 fotomultiplicadores PMP FL y un detector de luz transmitida DIC.



V. RESULTADOS

1. Determinación de los mecanismos moleculares de internalización neuronal de dendrímeros PAMAM según sus propiedades superficiales

Diversos estudios han demostrado la capacidad de dendrímeros PAMAM de ingresar en células, proceso que depende de las propiedades superficiales del dendrímero y que es mediado por distintos mecanismos dependiendo del tipo celular considerado (Albertazzi et al., 2010; Perumal et al., 2008; Saovapakhiran et al., 2009; Shen et al., 2014). Respecto a este proceso específicamente en neuronas, existe evidencia de que dendrímeros PAMAM G4 son internalizados por neuronas corticales de cultivo primario de ratón (Albertazzi et al., 2013). No obstante, los mecanismos a través de los cuales ocurre este proceso y la influencia que en ello tiene la modificación de la superficie del dendrímero no han sido determinados. De esta forma, como primer objetivo de esta tesis se planteó estudiar el proceso de internalización a nivel celular y molecular de dendrímeros PAMAM con distintos grupos químicos superficiales usando como modelo de estudio cultivo primario de neuronas hipocampales de ratón.

1.1 Dendrímeros en estudio

Cuatro dendrímeros generados a partir del dendrímero PAMAM G4 fueron estudiados. El dendrímero PAMAM G4 sin ninguna modificación en su superficie, que posee 64 aminas primarias de carga positiva (G4), PAMAM G4 con el 50% de sus grupos amino superficiales modificados con polietilenglicol (PPEG₅₀), molécula neutra ampliamente utilizada para reducir la toxicidad y aumentar la eficiencia de dendrímeros y otros nanotransportadores (Luong et al., 2016), PAMAM G4 con el 30% de sus grupos amino superficiales modificados con 2-carboxietilacrilato (PAC), molécula que expone grupos carboxilato de carga negativa (Sabahi et al., 2014), PAMAM G4 con el 25% de sus grupos amino superficiales modificados con folato (PFO₂₅), molécula que ha sido utilizada para el direccionamiento de fármacos anticancerígenos dada la sobreexpresión del receptor FolR α en células tumorales (Kesharwani et al., 2015), y que también podría tener una aplicación de direccionamiento hacia el SNC considerando su expresión en los plexos coroideos (Grapp et al., 2013). Además, para su estudio, todos los dendrímeros fueron marcados con la sonda fluorescente FITC, la cual fue enlazada covalentemente a la superficie del dendrímero (**Fig. 7**).

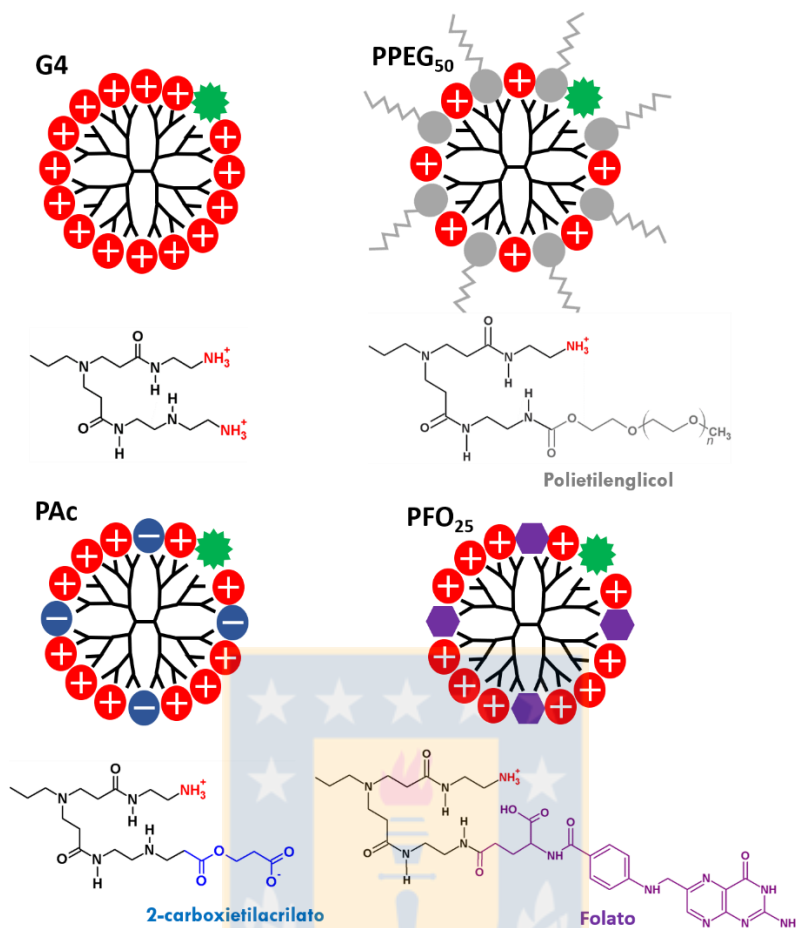


Figura 7. Representación esquemática de los dendrímeros PAMAM en estudio. Cuatro diferentes dendrímeros fueron evaluados. G4: Dendrímero PAMAM de cuarta generación con todos sus grupos amino superficiales de carga positiva (rojo). PPEG₅₀: G4 con el 50% de sus grupos superficiales sustituidos con polietilenglicol (gris). PAC: G4 con el 30% de sus grupos superficiales sustituidos con 2-carboxietilacrilato de carga negativa (azul). PFO₂₅: G4 con el 25% de sus grupos superficiales sustituidos con folato (púrpura). Todos los dendrímeros fueron conjugados con FITC para su detección (verde). Debajo de cada representación esquemática se muestra la estructura química de los grupos terminales expuestos en la superficie. *Fuente: Elaboración propia.*

1.2 Internalización de los distintos dendrímeros

Como primera evaluación general de la capacidad de internalización de los distintos dendrímeros en estudio, neuronas hipocampales fueron incubadas por 30 min con los diferentes dendrímeros marcados con FITC y las imágenes fueron analizadas mediante microscopía confocal, demostrándose que los dendrímeros G4 y PFO₂₅ son capaces de asociarse a regiones periféricas de las neuronas, mientras que para los dendrímeros PPEG₅₀ y PAC no fue posible observar ningún tipo

de asociación (**Fig. 8A**). Para observar una internalización más evidente de G4 y PFO₂₅ y descartar la posibilidad de que para PPEG₅₀ y PAC sean necesarios tiempos de incubación más prolongados, se realizaron incubaciones de 6 h. A este tiempo de incubación, es posible observar una importante marca fluorescente de los dendrímeros G4 y PFO₂₅ distribuida por todo el citoplasma, incluyendo regiones más internas (**Fig. 8B**). Para el caso de PPEG₅₀ y PAC, nuevamente no se observa ningún tipo de asociación a las neuronas (**Fig. 8B**). Al incubar estos dos dendrímeros a un tiempo mayor de 12 h, tampoco es posible evidenciar indicios de su internalización en neuronas (**Fig. 8C**). Este primer estudio exploratorio demuestra por tanto que solo los dendrímeros G4 y PFO₂₅ son capaces de ingresar en neuronas, no así los dendrímeros PPEG₅₀ y PAC.

1.3 Cinética de internalización de G4 y PFO₂₅

Luego de obtener evidencia de que solo los dendrímeros G4 y PFO₂₅ son internalizados por las neuronas, se decidió estudiar la cinética de su ingreso de manera más detallada. Para tal objetivo, las neuronas fueron incubadas durante 30 minutos con cada uno de ellos. Posteriormente, las células fueron lavadas para retirar el exceso de dendrímero y mantenidas en medio de cultivo durante distintos tiempos para obtener imágenes de su internalización a las 0 h, 2,5 h y 5 h post incubación. Los resultados muestran que a tiempo cero ambos dendrímeros se localizan en la periferia celular, como era de esperar de acuerdo a lo previamente observado (**Fig. 9A**). Es interesante destacar que a 2,5 y 5 h post incubación es posible observar las marcas fluorescentes tanto de G4 como de PFO₂₅, en regiones celulares más internas (**Fig. 9A y 9C**). Al cuantificar la distribución de la intensidad de fluorescencia para una región de interés (ROI) determinada desde la periferia hacia el interior del citoplasma neuronal se aprecia el cambio en su distribución dependiendo del tiempo transcurrido desde la incubación inicial. Así, es posible observar el desplazamiento del peak de máxima intensidad hacia una localización más interna en el soma de la neurona a medida que avanza el tiempo y, por ende, el proceso de internalización (**Fig. 9B y 9D**). Estas observaciones sugieren que los dendrímeros G4 y PFO₂₅ son capaces de interactuar con la membrana de la neurona y ser internalizados por dicha célula.



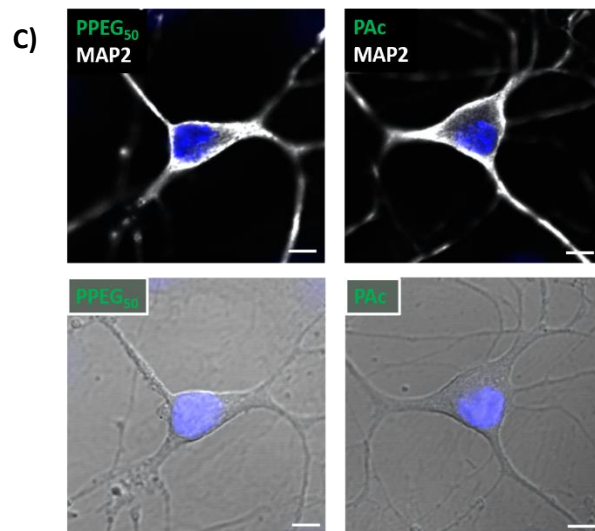
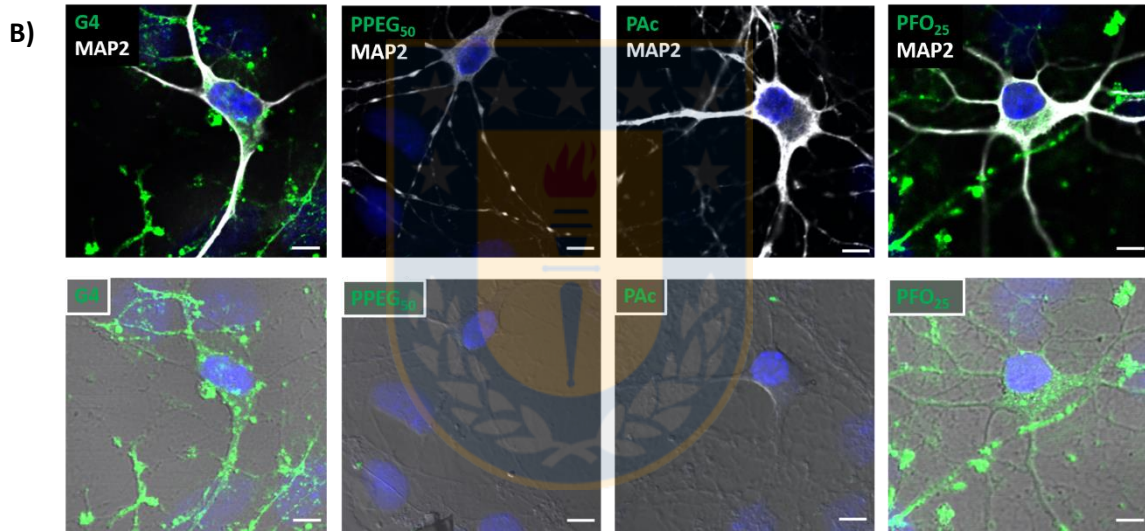
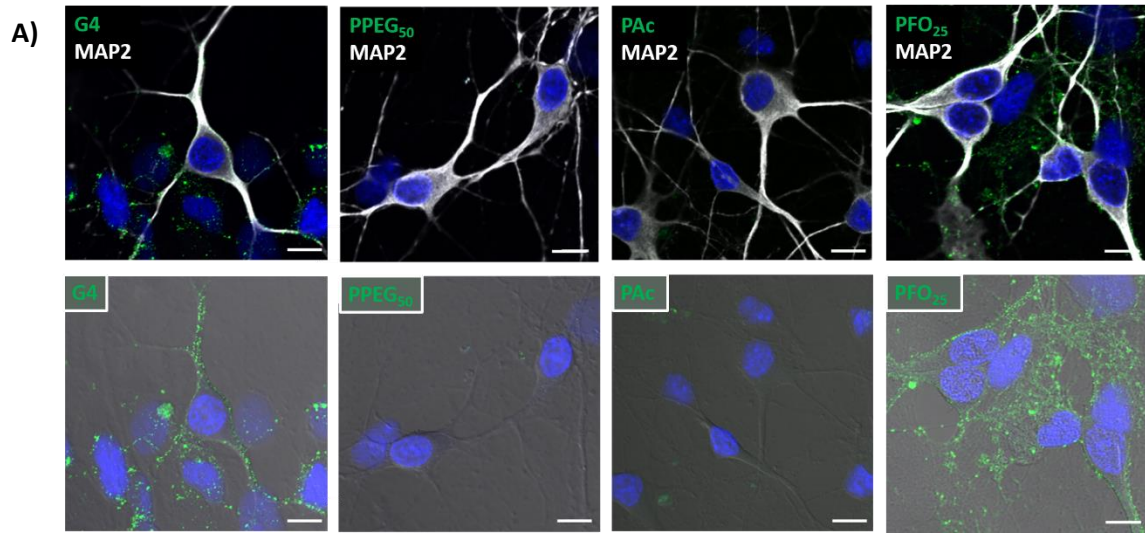


Figura 8. Análisis de internalización de los distintos dendrímeros. Neuronas hipocampales fueron incubadas a distintos tiempos con los diferentes dendrímeros conjugados con FITC (verde). Luego, mediante inmunocitoquímica se empleó anticuerpo anti-MAP2 (blanco) para marcar las neuronas y DAPI (azul) para marcar los núcleos. **A)** Incubación de 30 min para G4, PPEG₅₀, PAc y PFO₂₅. **B)** Incubación de 6 h para G4, PPEG₅₀, PAc y PFO₂₅. **C)** Incubación de 12 h para PPEG₅₀ y PAc. Para todos los casos se muestra la imagen de microscopía fluorescente normal (panel superior) y de luz transmitida (panel inferior) para una mejor visualización de las moléculas internalizadas. Barra de escala = 10 μ m. *Fuente: Elaboración propia.*



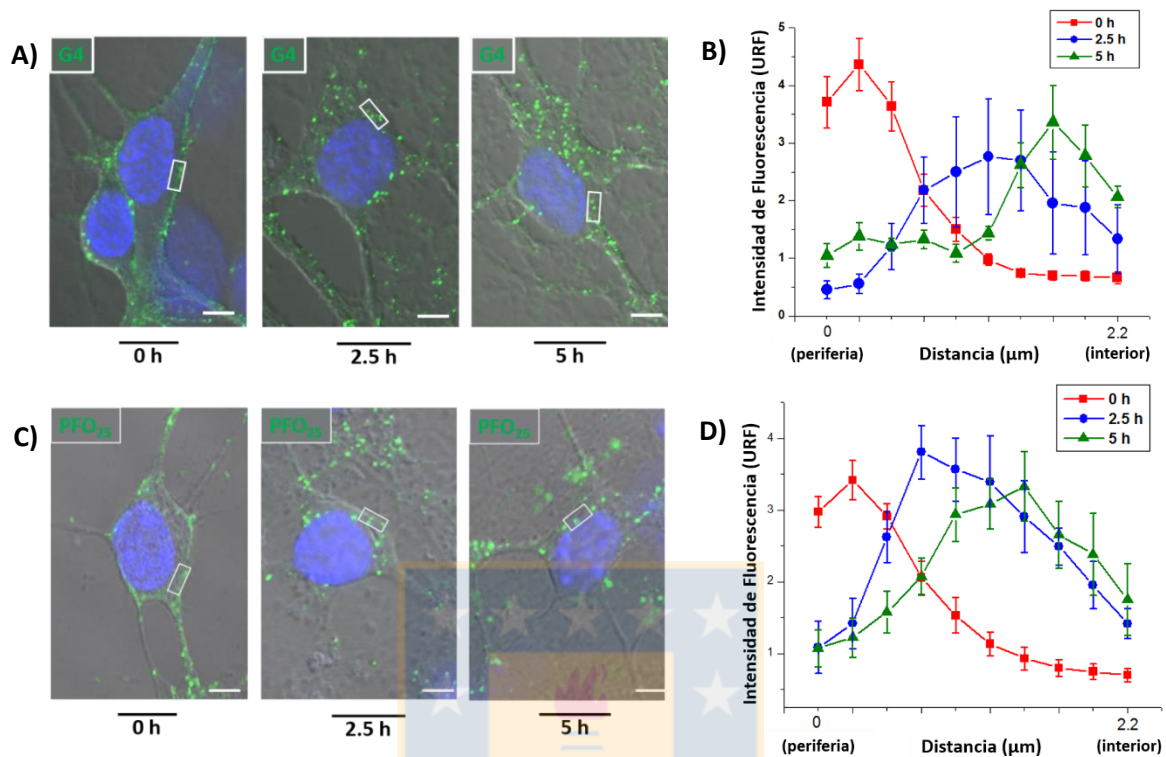


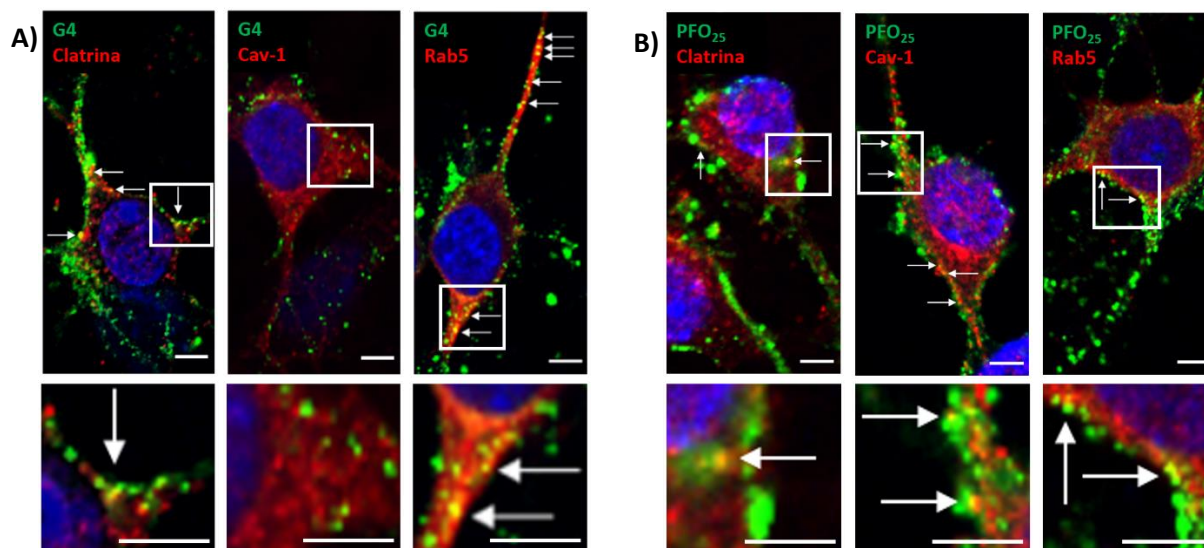
Figura 9. Cinética de internalización de G4 y PFO₂₅. Neuronas hipocámpales fueron incubadas por 30 min con los respectivos dendrímeros. Luego, la solución fue removida y se analizó la distribución de fluorescencia a distintos tiempos post incubación. **A)** Imágenes de internalización de G4 a 0, 2,5 y 5 h post incubación. **B)** Distribución de la intensidad de fluorescencia de G4 a 0, 2,5 y 5 h post incubación considerando una región de interés (ROI) rectangular marcada desde la periferia hacia el interior de la célula. **C)** Imágenes de internalización de PFO₂₅ a 0, 2,5 y 5 h post incubación **D)** Distribución de la intensidad de fluorescencia de PFO₂₅ a 0, 2,5 y 5 h post incubación considerando una región de interés (ROI) rectangular marcada desde la periferia hacia el interior de la célula. Barra de escala = 5 μm. (n = 6). Fuente: *Elaboración propia*.

1.4 Colocalización de G4 y PFO₂₅ con marcadores de endocitosis

Existe evidencia experimental que demuestra que la internalización celular de dendrímeros PAMAM es un proceso que ocurre a través de distintas vías de endocitosis (Albertazzi et al., 2010; Perumal et al., 2008). Con el fin de conocer los mecanismos involucrados en la internalización de los dendrímeros en estudio, neuronas fueron incubadas con G4 y PFO₂₅ marcados con FITC por 1 h y estudiadas mediante inmunocitoquímica empleando anticuerpos para marcadores de endocitosis: anti-clatrina (endocitosis mediada por clatrina), anti-caveolina-1 (endocitosis mediada por caveola) y anti-Rab5 (endosomas tempranos) (Kerr and Teasdale, 2014). El análisis realizado en microscopía confocal muestra que existe una importante colocalización de G4 con los marcadores para clatrina y Rab5, no así con caveolina-1 (**Fig. 10A**). Como medida del grado de colocalización, los coeficientes de Manders fueron determinados obteniéndose valores de $0,443 \pm 0,053$ para clatrina, $0,254 \pm 0,119$ para caveolina-1 y $0,473 \pm 0,117$ para Rab5 (**Fig. 10C**). Estos valores se correlacionan con lo observado en las imágenes, indicando que la endocitosis mediada por clatrina y la ruta clásica de tráfico intracelular seguida de los endosomas tempranos es un importante mecanismo de internalización de este dendrímero en neuronas hipocampales. Siguiendo el mismo protocolo de análisis, los datos obtenidos demostraron que el dendrímero PFO₂₅ colocaliza con los marcadores de caveola, clatrina y endosomas tempranos (**Fig. 10B**). Los coeficientes de Manders muestran una importante colocalización con los tres marcadores, siendo el valor para caveolina-1 el mayor, $0,555 \pm 0,062$, mientras que los valores para clatrina y Rab5 fueron $0,407 \pm 0,106$ y $0,470 \pm 0,055$, respectivamente (**Fig. 10C**). Estos resultados permiten inferir que la adición de los grupos folato en la superficie del dendrímero induce un cambio en el mecanismo de internalización, evidenciándose ahora la participación de la ruta mediada por caveola, además de la endocitosis mediada por clatrina demostrada para el dendrímero G4 sin funcionalizar.

1.5 Efecto de inhibidores específicos de endocitosis en la internalización de G4 y PFO₂₅

Con el fin de complementar los resultados obtenidos en los experimentos de colocalización, se evaluó el efecto que tienen en la internalización de G4 y PFO₂₅ inhibidores específicos para las rutas de endocitosis estudiadas. Previo a la incubación con los dendrímeros, las neuronas fueron tratadas con clorpromazina, empleada como inhibidor de la endocitosis mediada por clatrina, y con filipin, empleado como inhibidor de la endocitosis mediada por caveola (Huth et al., 2006). Luego, las



c)	Clathrin	Caveolin-1	Rab-5
G4	0.433 ± 0.053	0.254 ± 0.119	0.473 ± 0.117
PFO	0.407 ± 0.106	0.555 ± 0.062	0.470 ± 0.055

Figura 10. Colocalización de G4 y PFO₂₅ con marcadores de endocitosis. Neuronas hipocámpicas fueron incubadas con G4 y PFO₂₅ (verde) y se realizó inmunocitoquímica para clatrina, caveolina-1 y Rab5 (rojo) como marcadores de endocitosis. **A)** Colocalización de G4 con clatrina (izquierda), caveolina-1 (centro) y Rab5 (derecha). Se muestra la imagen de una neurona (panel superior) y una ampliación para mejor visualización de los puntos de colocalización (panel inferior). **B)** Colocalización de PFO₂₅ con clatrina (izquierda), caveolina-1 (centro) y Rab5 (derecha). Se muestra la imagen de una neurona (panel superior) y una ampliación para mejor visualización de los puntos de colocalización (panel inferior). **C)** Coeficientes de Manders para G4 y PFO₂₅ con los tres marcadores de endocitosis. Barra de escala = 5 μm. (n = 22). Fuente: *Elaboración propia*.

neuronas fueron incubadas con ambos dendrímeros marcados con FITC por 1 h y se comparó la intensidad de la marca fluorescente presente en las células no tratadas con aquellas tratadas con los distintos inhibidores. En el caso de G4, el tratamiento de las células con clorpromazina muestra una reducción significativa de su internalización a un 53,7% (Q1, 38,3%; Q3, 63,1%), mientras que el tratamiento con filipin no afectó significativamente su ingreso, obteniéndose un valor de 93,4% (Q1, 81,1%; Q3, 109,6%) (**Fig. 11A y 11B**). Estos resultados indican que la endocitosis mediada por clatrina se encuentra involucrada en el proceso de internalización de este dendrímero y, a su vez, descartan la participación importante de la endocitosis mediada por caveola. Para el caso de PFO₂₅ el tratamiento con ambos inhibidores implicó una disminución significativa de su internalización, reduciendo su porcentaje de ingreso a un 55,8% (Q1, 51,13%; Q3, 62,9%) para el tratamiento con clorpromazina y a un 47,6% (Q1, 38,6%; Q3, 68,0%) para el tratamiento con filipin (**Fig. 11C y 11D**).

A partir de estos resultados es posible inferir que tanto la endocitosis mediada por clatrina, así como la endocitosis mediada por caveola, son importantes para la internalización de este dendrímero. En conjunto, los resultados de este ensayo concuerdan con lo observado en el estudio de colocalización en cuanto a las rutas de ingreso determinadas para cada dendrímero y ratifica, además, que el cambio en las propiedades superficiales de estos polímeros origina cambios en sus mecanismos de internalización en neuronas.

En síntesis, los resultados obtenidos para este objetivo de investigación demuestran que el proceso de internalización de dendrímeros PAMAM en neuronas depende directamente de las propiedades superficiales de estos nanotransportadores. Así, se evidencia que la sustitución de sus aminas primarias con moléculas de distinta naturaleza química modifica sus propiedades de internalización, ya sea generando cambios en su ruta ingreso en la neurona o inclusive restringiendo su capacidad de hacerlo (**Fig. 12**).



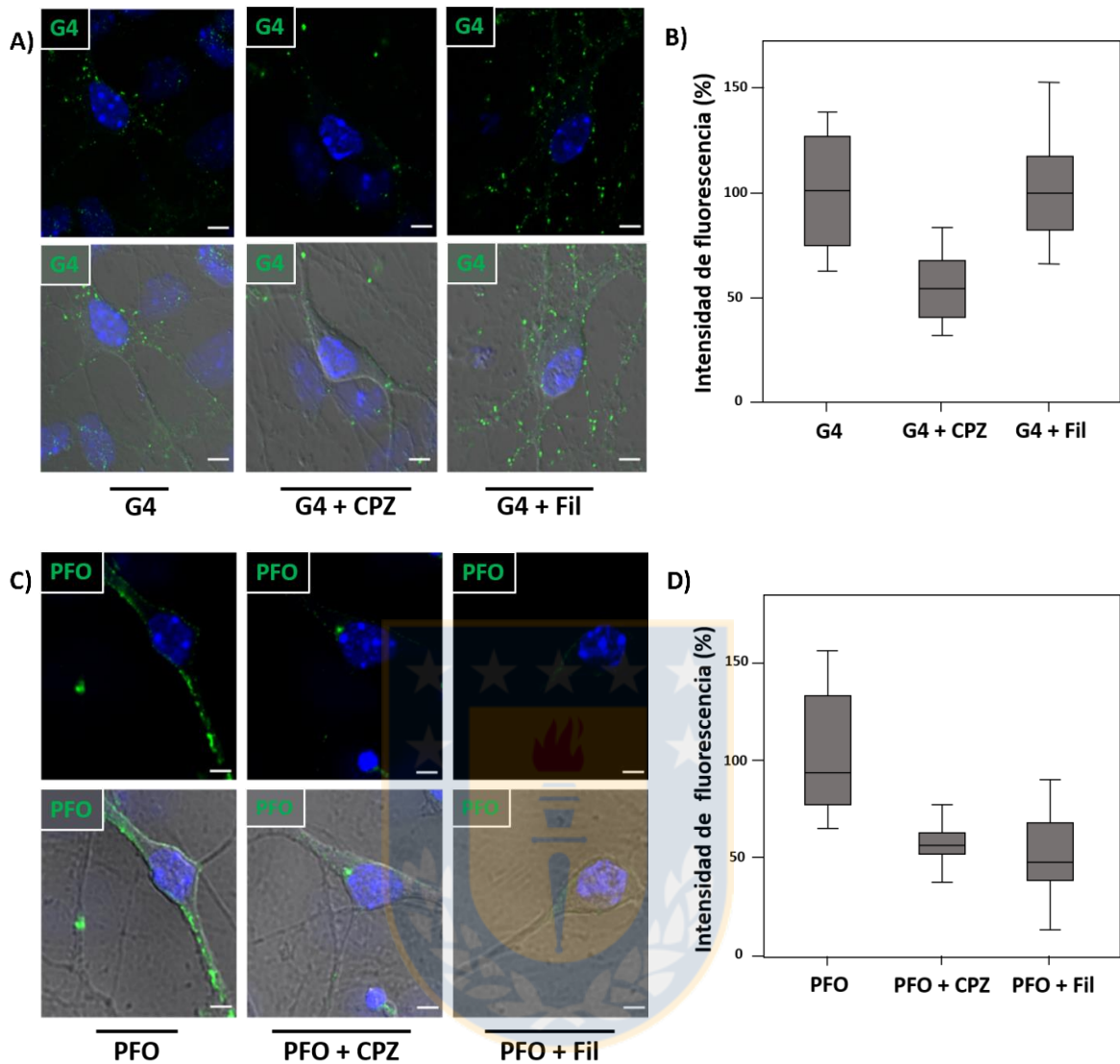


Figura 11. Efecto de inhibidores específicos de endocitosis en la internalización de G4 y PFO₂₅. Previo a la incubación con G4 y PFO₂₅ (verde), neuronas fueron tratadas con clorpromazina 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (CPZ) como inhibidor de la endocitosis mediada por clatrina y filipin 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Fil) como inhibidor de la endocitosis mediada por caveola. **A)** Internalización de G4 en ausencia de inhibidores de endocitosis (izquierda), bajo tratamiento con CPZ (centro) y bajo tratamiento con Fil (derecha). **B)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de G4 asociada a neuronas para cada condición. Los resultados son expresados como porcentaje respecto del control sin inhibidor. **C)** Internalización de PFO₂₅ en ausencia de inhibidores de endocitosis (izquierda), bajo tratamiento con CPZ (centro) y bajo tratamiento con Fil (derecha). **D)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de PFO₂₅ asociada a neuronas para cada condición. Los resultados son expresados como porcentaje respecto del control sin inhibidor. Para **A)** y **C)** se muestra la imagen de microscopía fluorescente normal (panel superior) y de luz transmitida (panel inferior) para una mejor visualización de las moléculas internalizadas. Barra de escala = 5 μm . (n = 16). Fuente: *Elaboración propia*.

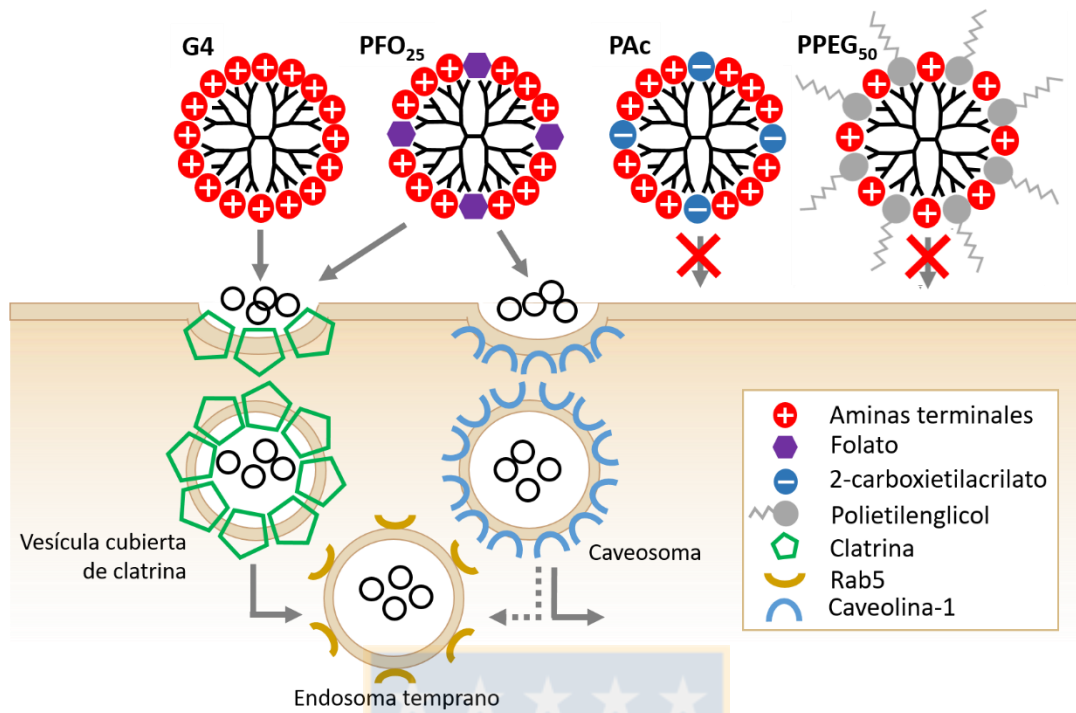


Figura 12. Esquema representativo de los mecanismos de internalización de dendrímeros PAMAM en neuronas. De acuerdo con los resultados obtenidos, G4 ingresaría por endocitosis mediada por clatrina asociándose posteriormente a endosomas tempranos. PFO₂₅ ingresaría tanto por endocitosis mediada por clatrina como por caveola, con la posibilidad de continuar su tráfico intracelular hacia los endosomas tempranos o hacia una ruta alternativa. PAc y PPEG₅₀ serían incapaces de ingresar en las neuronas. *Fuente: Elaboración propia.*

2. Evaluación de los efectos electrofisiológicos de dendrímeros PAMAM con distintas propiedades superficiales

Existe bastante evidencia que asocia el gran número de cargas positivas en la superficie de los dendrímeros PAMAM con efectos tóxicos a nivel celular (Duncan and Izzo, 2005; Jain et al., 2010; Jevprasesphant et al., 2003). Más aún, estudios demuestran que estas macromoléculas alteran la integridad de la membrana plasmática (Hong et al., 2004; Leroueil et al., 2008). En cuanto a los efectos más específicos que podrían generar los dendrímeros en neuronas existe poca evidencia hasta el momento. En particular, adquiere gran interés explorar posibles alteraciones en la funcionalidad neuronal, con especial atención en los efectos en la permeabilidad de membrana y sus posibles consecuencias en los niveles intracelulares de iones y en la actividad sináptica, además de los mecanismos asociados a dichos fenómenos. Es por ello que, como segundo objetivo de esta tesis se planteó estudiar los efectos que tienen dendrímeros PAMAM con distintas propiedades superficiales en la viabilidad celular y actividad electrofisiológica de neuronas hipocampales de ratón.

2.1 Dendrímeros en estudio

Tres dendrímeros generados a partir del dendrímero PAMAM G4 fueron estudiados. El dendrímero PAMAM G4 sin ninguna modificación en su superficie, exponiendo sus 64 aminas primarias de carga positiva (G4), y dos dendrímeros con un igual porcentaje de sustitución de sus aminas primarias, PAMAM G4 con el 25% de sus grupos amino superficiales modificados con polietilenglicol (PPEG₂₅), (Luong et al., 2016), y PAMAM G4 con el 25% de sus grupos amino superficiales modificados con folato (PFO₂₅), a fin de evaluar la capacidad de las distintas moléculas adicionadas de prevenir los potenciales efectos neurotóxicos del dendrímero no modificado (**Fig. 13**).

2.2 Citotoxicidad de dendrímeros en estudio

Como primer aspecto general de la toxicidad de los distintos dendrímeros en neuronas (**Fig. 13**), se evaluó la citotoxicidad de estas moléculas mediante el ensayo de viabilidad de AlamarBlue. Para ello, las células fueron incubadas por 24 h con concentraciones crecientes de G4, PFO₂₅ y PPEG₂₅. Los resultados obtenidos muestran que los dendrímeros G4 presentan un alto grado de citotoxicidad

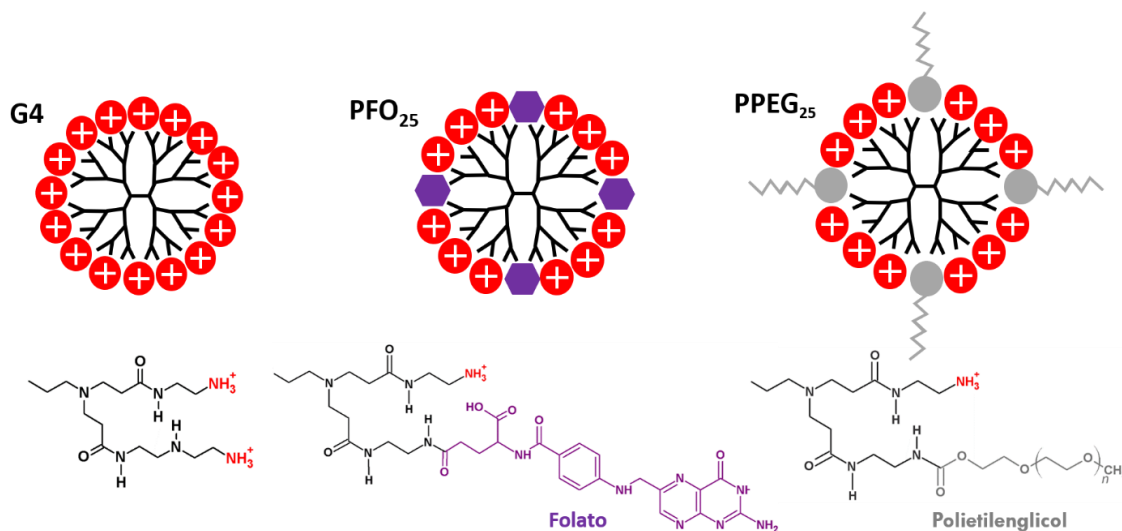


Figura 13. Representación esquemática de los dendrímeros PAMAM en estudio. Tres diferentes dendrímeros fueron evaluados. G4: Dendrímtero PAMAM de cuarta generación con todos sus grupos amino superficiales de carga positiva (rojo). PFO₂₅: G4 con el 25% de sus grupos superficiales sustituidos con folato (púrpura). PPEG₂₅: G4 con el 25% de sus grupos superficiales sustituidos con polietilenglicol (gris). Debajo de cada representación esquemática se muestra la estructura química de los grupos terminales expuestos en la superficie. *Fuente: Elaboración propia.*

reduciendo la viabilidad neuronal a un $44,57 \pm 13,93\%$, cuando estos son aplicados a una concentración de $1 \mu\text{M}$. A concentraciones mayores, 10 y $100 \mu\text{M}$, el nivel de citotoxicidad se hace comparable con el control negativo de Triton, reduciéndose la viabilidad celular a valores de $6,3 \pm 0,10$ y $5,7 \pm 0,29\%$, respectivamente. En el caso del dendrímero PFO₂₅, es posible observar un menor efecto tóxico comparado con G4. La reducción significativa de la viabilidad celular fue observada solo a partir de la concentración $10 \mu\text{M}$, alcanzando un $38,2 \pm 13,87\%$. Por su parte, a $100 \mu\text{M}$ se observa una reducción similar a la del control negativo con un valor de $7,1 \pm 0,36\%$. Con respecto al dendrímero PPEG₂₅, este mostró tener la menor toxicidad celular generando una disminución significativa de la viabilidad solo con la mayor concentración utilizada, es decir, $100 \mu\text{M}$, alcanzando la viabilidad celular a un valor de $22,45 \pm 5,3\%$ (**Fig. 14**). Estos resultados se correlacionan con lo previamente observado en otros modelos celulares en donde el importante número de aminas cargadas positivamente ha sido asociado con efectos tóxicos. Además, se demuestra que la sustitución de un 25% de estos grupos de carga positiva genera una disminución significativa de esta citotoxicidad.

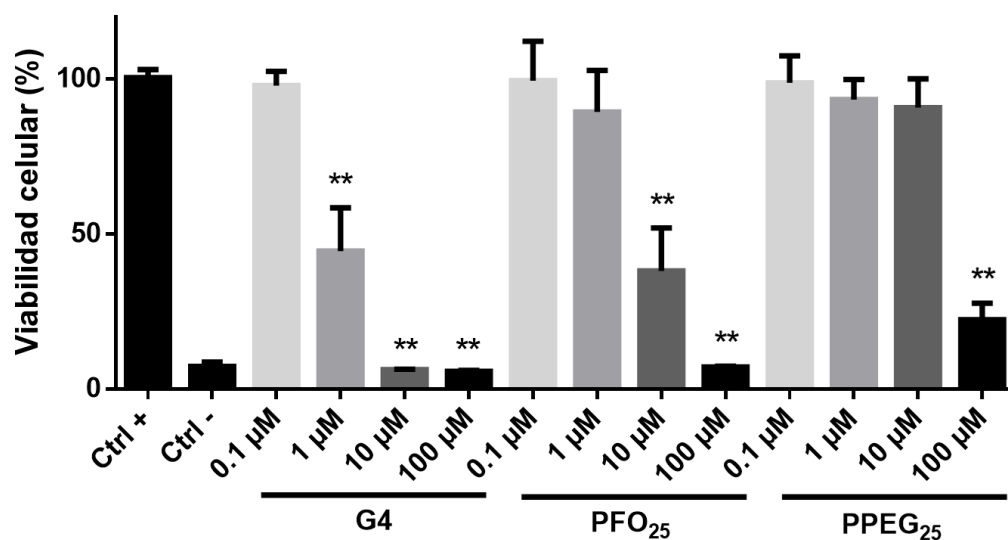


Figura 14. Evaluación de citotoxicidad. Ensayo de viabilidad celular con el reactivo AlamarBlue fue realizado incubando las neuronas por 24 h con G4, PFO₂₅ y PPEG₂₅. Incubaciones solo con medio de cultivo y con Triton 0,25% fueron utilizadas como control positivo y negativo, respectivamente. La emisión de fluorescencia del reactivo fue medida y los resultados se expresan como porcentaje de viabilidad celular respecto del control positivo. Las diferencias significativas entre el control positivo y los tratamientos con dendrímeros fueron evaluadas. (n = 6; **p < 0,01). Fuente: *Elaboración propia*.

2.3 Efecto de dendrímeros en la permeabilidad de membrana

La integridad de membrana y la permeabilidad a iones son importantes parámetros a analizar en relación con la actividad normal de las neuronas. Reportes previos muestran que nanopartículas de superficie positiva alteran la integridad de la membrana y forman nanoporos que pueden derivar en lisis celular, demostrándose además que para el caso de los dendrímeros estos efectos serían más importantes a medida que aumenta su generación, debido al mayor número de cargas presente (Hong et al., 2004; Leroueil et al., 2008). A fin de evaluar los efectos de los dendrímeros en estudio en la permeabilidad de membrana de neuronas hipocámpales, experimentos de patch clamp en configuración cell-attached fueron llevados a cabo. Los distintos dendrímeros fueron incluidos en la solución interna de la pipeta de registro a una concentración de 1 μM, tal como se realiza para técnicas de patch perforado con moléculas perforantes como gramicidina (Sepulveda et al., 2010), y la estabilidad de las corrientes capacitativas fue evaluada durante 30 min. La corriente detectada a través del sello de alta resistencia de la configuración cell-attached puede ser estudiada en estas condiciones para evaluar los efectos de distintas sustancias en la integridad y permeabilidad de la

membrana (Peters et al., 2013; Sepúlveda et al., 2014). La cuantificación de la carga total transferida a través de la membrana durante el período de registro muestra que el tratamiento con G4 genera un aumento significativo de 7,5 veces en dicho parámetro comparado con el control sin dendrímero, el cual se origina alrededor de los 15 min y se mantiene sin variaciones significativas hasta el minuto 30. Para el caso de los dendrímeros funcionalizados, PFO₂₅ y PPEG₂₅, por el contrario, no se observan alteraciones significativas durante el período de evaluación (**Fig. 15A**). En el tiempo final de estudio, es decir a los 30 min, es posible observar una mayor apertura del sello generado entre la pipeta y la membrana de la neurona cuando el dendrímero G4 es incluido en la solución de la pipeta de registro, al ser comparado con el control sin dendrímero. Por su parte, en el caso de PFO₂₅ y PPEG₂₅, las corrientes capacitativas se mantienen similares a la condición control (**Fig. 15B**). Los resultados de este ensayo demostrarían que los dendrímeros G4 generan una disrupción en la integridad de la membrana plasmática de la neurona y un aumento de su permeabilidad, lo cual se vería reflejado en el aumento de la conductancia observado. A su vez, se evidencia que las modificaciones al 25% tanto con folato como con polietilenglicol son capaces de prevenir este efecto.

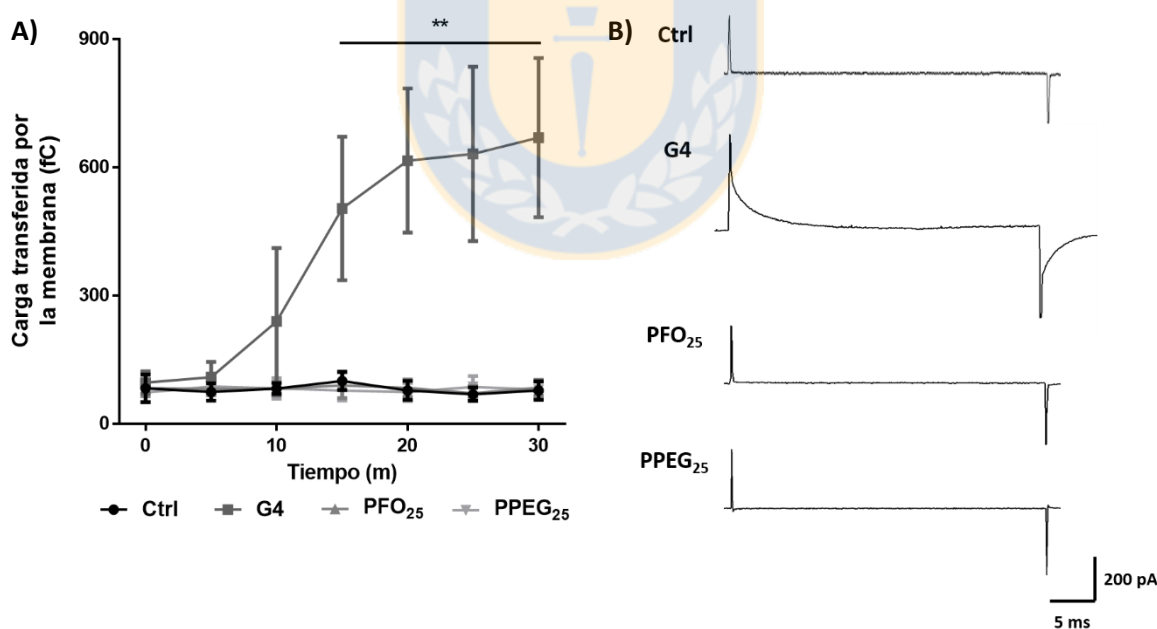


Figura 15. Efectos en la permeabilidad de membrana. Registros de patch clamp fueron llevados a cabo incluyendo los distintos dendrímeros en estudio en la solución interna de la pipeta de registro (1 μ M). Solución sin dendrímeros fue utilizada como control. **A)** Carga transferida por la membrana bajo el tratamiento con G4, PFO₂₅ y PPEG₂₅ durante un período de 30 min de registro. **B)** Trazos representativos de las corrientes capacitativas bajo el tratamiento con G4, PFO₂₅ y PPEG₂₅ al minuto 30 de registro. (n = 7, **p < 0,01). Fuente: *Elaboración propia.*

2.4 Efecto de dendrímeros en transitorias de Ca^{2+} intracelular

Los incrementos en la permeabilidad de la membrana plasmática evidenciados en los registros de patch clamp (**Fig. 15**) podrían tener como consecuencia la alteración en los niveles homeostáticos intracelulares de iones importantes tales como Ca^{2+} . En ese sentido, existe evidencia de que dendrímeros G5 aumentan los niveles de Ca^{2+} intracelular en neuronas piramidales, derivando en la disrupción de la función mitocondrial (Nyitrai et al., 2013b). Con el objetivo de estudiar las posibles alteraciones inducidas por los dendrímeros en estudio en la actividad fisiológica asociada al Ca^{2+} intracelular, los incrementos transitorios espontáneos de este ion fueron evaluados en neuronas en presencia de G4, PFO₂₅ y PPEG₂₅ a concentración 1 μM . En términos cualitativos, es posible apreciar un incremento del Ca^{2+} intracelular con una completa pérdida del patrón normal de aumentos transitorios cuando las neuronas son tratadas con G4, mientras que para el caso de los dendrímeros modificados no se observan diferencias aparentes (**Fig. 16A**). La cuantificación del área bajo la curva de las respectivas transitorias de Ca^{2+} muestra que solo el dendrímero G4 ocasiona un aumento significativo en el Ca^{2+} intracelular total, el cual sería de 8 veces comparado con la condición control (**Fig. 16B**). Otro parámetro comúnmente analizado en las transitorias de Ca^{2+} es su frecuencia. Para el caso del tratamiento con G4, la marcada pérdida del patrón normal de aumentos transitorios impide analizar este parámetro. En el caso de los tratamientos con PFO₂₅ y PPEG₂₅ se observan aumentos significativos que alcanzan valores iguales a $0,047 \pm 0,013$ y $0,038 \pm 0,010$ Hz, respectivamente (**Fig. 16C**). No obstante, este aumento en la frecuencia observado para los dendrímeros funcionalizados no implican un aumento significativo en los niveles de Ca^{2+} intracelular si se considera lo observado en el análisis de áreas bajo la curva (**Fig. 16B**).

De manera complementaria, el mismo análisis del efecto de G4 en las transitorias de Ca^{2+} fue evaluado comparando la respuesta al tratamiento de las neuronas con este dendrímero utilizando una solución externa con y sin Ca^{2+} . Interesantemente, los resultados muestran que no existen incrementos en los niveles intracelulares de este ion cuando la medición se realiza con una solución externa en que este se encuentra ausente (**Fig. 16D**). Este ensayo demuestra que el aumento de Ca^{2+} intracelular inducido por G4 se origina por el influjo de iones provenientes del medio extracelular y permitiría, por lo tanto, correlacionar dicho aumento con las alteraciones en la integridad y permeabilidad de la membrana plasmática previamente observadas (**Fig. 15**).

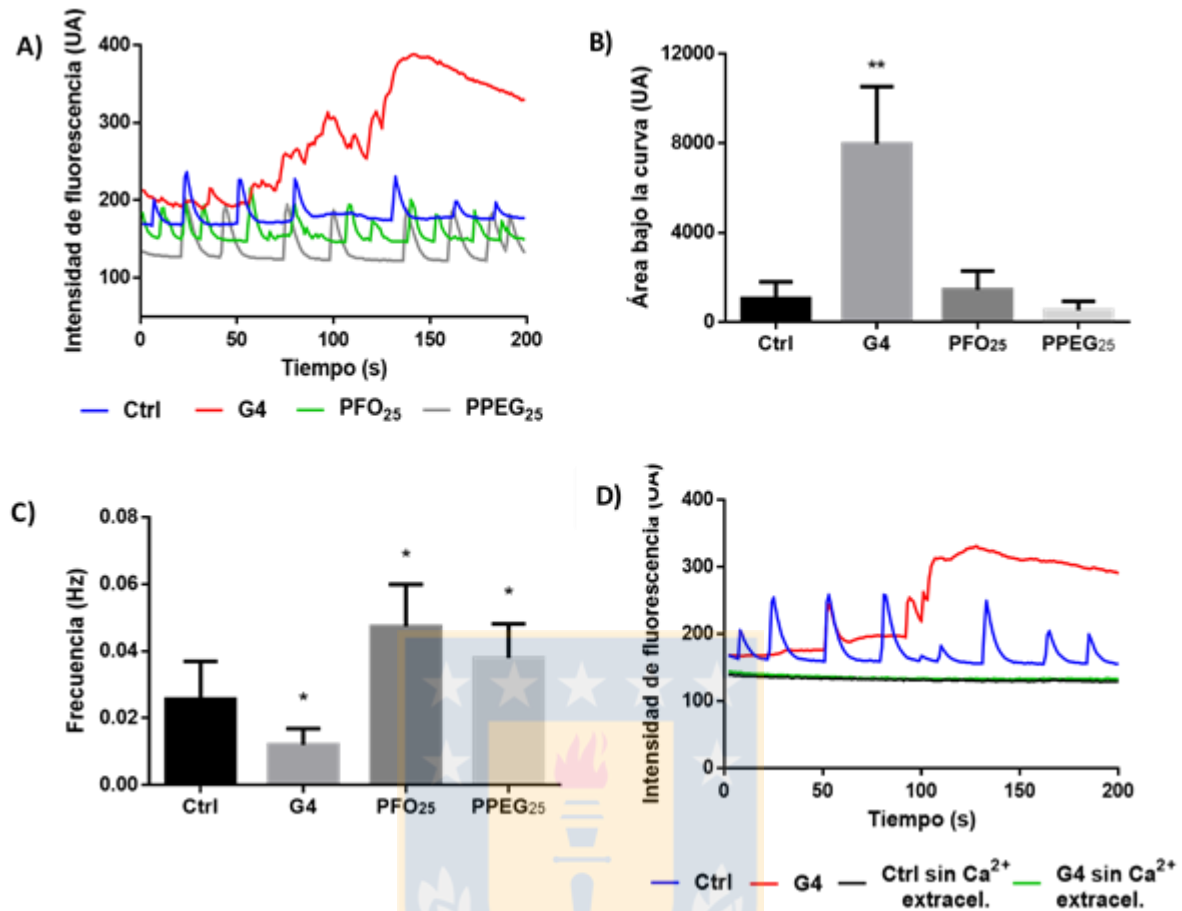


Figura 16 . Análisis de transitorias de Ca²⁺ intracelular. Neuronas fueron incubadas con la sonda fluorescente Fluo-4 AM y luego tratadas con los distintos dendrímeros en estudio (1 μM). Solución sin dendrímeros fue utilizada como control. **A)** Trazos representativos de transitorias de Ca²⁺ intracelular bajo el tratamiento con G4, PFO₂₅ y PPEG₂₅. **B)** Cuantificación del área bajo la curva de los respectivos patrones de transitorias de Ca²⁺ intracelular para cada condición. **C)** Cuantificación de la frecuencia de transitorias de Ca²⁺ intracelular para cada condición. **D)** Trazos representativos de transitorias de Ca²⁺ intracelular bajo tratamiento con G4 y control en ausencia y presencia de Ca²⁺ extracelular. (n = 15, *p < 0,05; **p < 0,01). Fuente: *Elaboración propia*.

2.5 Efecto de dendrímeros en la dinámica de la liberación de vesículas sinápticas

Considerando el importante rol que cumple el Ca²⁺ en la liberación de las vesículas sinápticas (Rizo and Xu, 2015) y la alteración evidenciada en sus niveles intracelulares inducida por los dendrímeros (**Fig. 16**), fue de particular interés estudiar posibles variaciones en la dinámica de dicho proceso cuando las neuronas interactúan con estas nanopartículas. Para llevar a cabo este análisis, las vesículas sinápticas de los cultivos primarios de neuronas hipocámpales fueron marcadas con la sonda fluorescente FM 1-43, la cual se une a vesículas y disminuye su intensidad de fluorescencia cuando estas se asocian a la membrana y tienen contacto con el medio extracelular, permitiendo

interpretar disminuciones en su señal de fluorescencia como una consecuencia de la liberación de vesículas sinápticas (Gaffield and Betz, 2006).

La disminución de la intensidad de fluorescencia de esta sonda fue evaluada bajo el tratamiento de las neuronas con los diferentes dendrímeros a concentración 1 μ M durante 15 minutos. La cinética de decaimiento de la fluorescencia cuando las neuronas fueron tratadas con los dendrímeros funcionalizados, PFO₂₅ y PPEG₂₅, fue similar a la de la condición control que contenía solución externa normal. Por su parte, el dendrímero G4 indujo un mayor decaimiento de la fluorescencia en el tiempo (**Fig. 17A**). La constante de decaimiento (K) para las distintas curvas fue determinada y se obtuvieron valores de 0,0315 \pm 0,0032 min⁻¹ para el control, 0,0964 \pm 0,0025 min⁻¹ para G4, 0,0444 \pm 0,0039 min⁻¹ para PFO₂₅ y 0,0315 \pm 0,0032 min⁻¹ para PPEG₂₅ (**Fig. 17B**). La constante K para el tratamiento con G4 muestra un valor de 2,4 veces mayor que la constante obtenida con el tratamiento control, mientras que valores similares al control fueron obtenidos para las constantes de PFO₂₅ y PPEG₂₅. Estos resultados demuestran que el incremento del Ca²⁺ intracelular inducido por G4 tiene como consecuencia un aumento en la liberación de vesículas sinápticas. A su vez, se descarta un efecto por parte de PFO₂₅ y PPEG₂₅ en este proceso, quedando en evidencia que solo el aumento significativo inducido por G4 en los niveles intracelulares de este ion es capaz de alterar la dinámica de exocitosis vesicular.

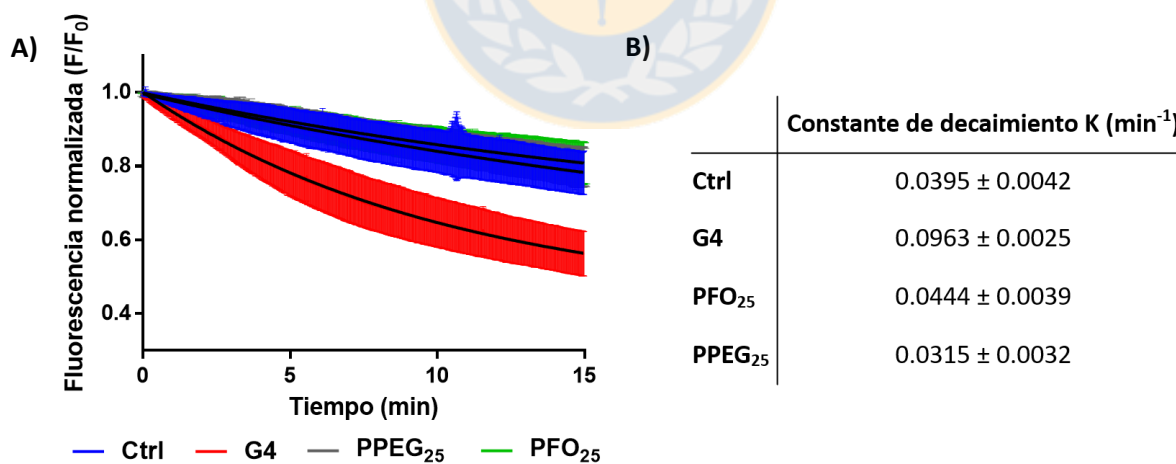


Figura 17. Efecto de dendrímeros en la dinámica de la liberación de vesículas sinápticas. Neuronas fueron incubadas con la sonda fluorescente FM 1 -43 y luego tratadas con los distintos dendrímeros en estudio (1 μ M). Solución sin dendrímeros fue utilizada como control. **A)** Decaimiento de la intensidad de fluorescencia de FM 1 - 43 bajo el tratamiento con G4, PFO₂₅ y PPEG₂₅. Líneas negras muestran la curva de regresión no lineal para cada condición. **B)** Constantes de decaimiento K de la regresión no lineal de la curva de decaimiento de fluorescencia para cada condición. (n = 10). Fuente: *Elaboración propia*.

Finalmente, en consideración de las alteraciones observadas en los niveles de Ca^{2+} intracelular y de la liberación de vesículas sinápticas, se evaluó directamente el efecto de los distintos dendrímeros generados en la actividad sináptica espontánea de neuronas hipocámpales a través de registros electrofisiológicos. Para tal fin, registros de patch clamp en configuración whole-cell fueron llevados a cabo aplicando, en primer lugar, solución externa normal mediante perfusión extracelular por 2 min como condición control y luego, también por 2 min soluciones $1 \mu\text{M}$ de G4, PFO₂₅ o PPEG₂₅, respectivamente (**Fig. 18A**). El análisis de la frecuencia de los eventos sinápticos muestra que existe un incremento significativo de alrededor de 3 veces cuando las células son tratadas con G4, obteniéndose valores de $2,81 \pm 0,93$ Hz para el tratamiento con este dendrímero y de $0,95 \pm 0,25$ Hz para el control. Para el caso de los dendrímeros PFO₂₅ y PPEG₂₅ no se observaron diferencias significativas con respecto al control en este parámetro y se obtuvieron valores de frecuencia de $1,26 \pm 0,64$ y $0,94 \pm 0,23$ Hz, respectivamente (**Fig. 18B**). La amplitud de corriente de los eventos sinápticos también fue analizada, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas para ninguno de los tratamientos (**Fig. 18C**). De estos resultados se puede inferir, por tanto, que el dendrímero G4 genera un aumento en la actividad sináptica de las neuronas hipocámpales, alterando su transmisión sináptica normal y que, por otra parte, la funcionalización tanto con folato como con polietilenglicol evitarían dicho efecto.

Tomando en conjunto todos estos resultados, es posible determinar que el aumento de permeabilidad de la membrana neuronal inducido por el dendrímero G4 origina un marcado aumento del Ca^{2+} intracelular, el cual deriva en un incremento en la liberación de vesículas sinápticas, con el consecuente aumento en la frecuencia de eventos sinápticos. Por otra parte, la sustitución del 25% de la superficie del dendrímero con folato y polietilenglicol fue suficiente para prevenir las alteraciones en la permeabilidad de membrana, en los niveles de Ca^{2+} intracelular, el aumento en la liberación de vesículas sinápticas y en la frecuencia de la actividad sináptica (**Fig. 19**).

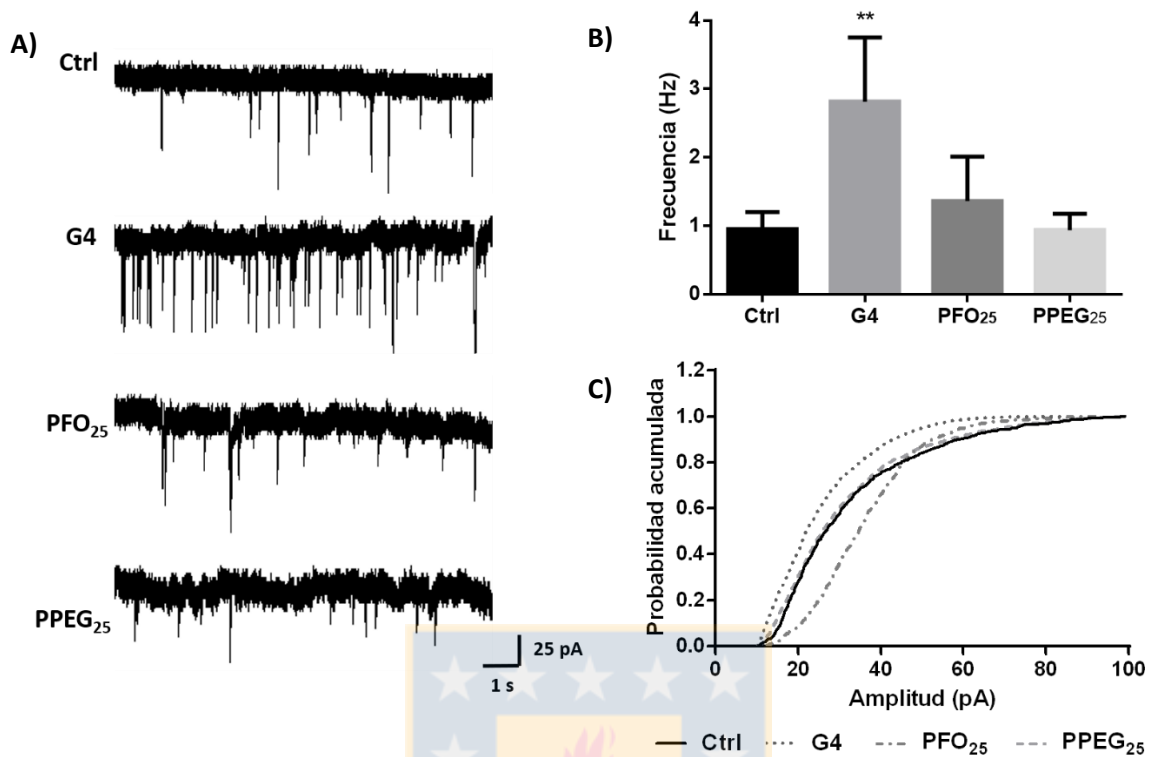


Figura 18. Efecto de dendrímeros en la actividad sináptica. Registros de patch clamp fueron llevados a cabo en neuronas hipocampales aplicando soluciones de los distintos dendrímeros mediante perfusión externa (1 μ M). Solución sin dendrímeros fue utilizada como control. **A)** Trazos representativos de los registros de actividad sináptica bajo el tratamiento con G4, PFO₂₅ y PPEG₂₅. **B)** Cuantificación de la frecuencia de los eventos sinápticos para cada condición. **C)** Probabilidad acumulada para los valores de amplitud de los eventos sinápticos para cada condición. (n = 9, **p < 0,01). Fuente: *Elaboración propia*.

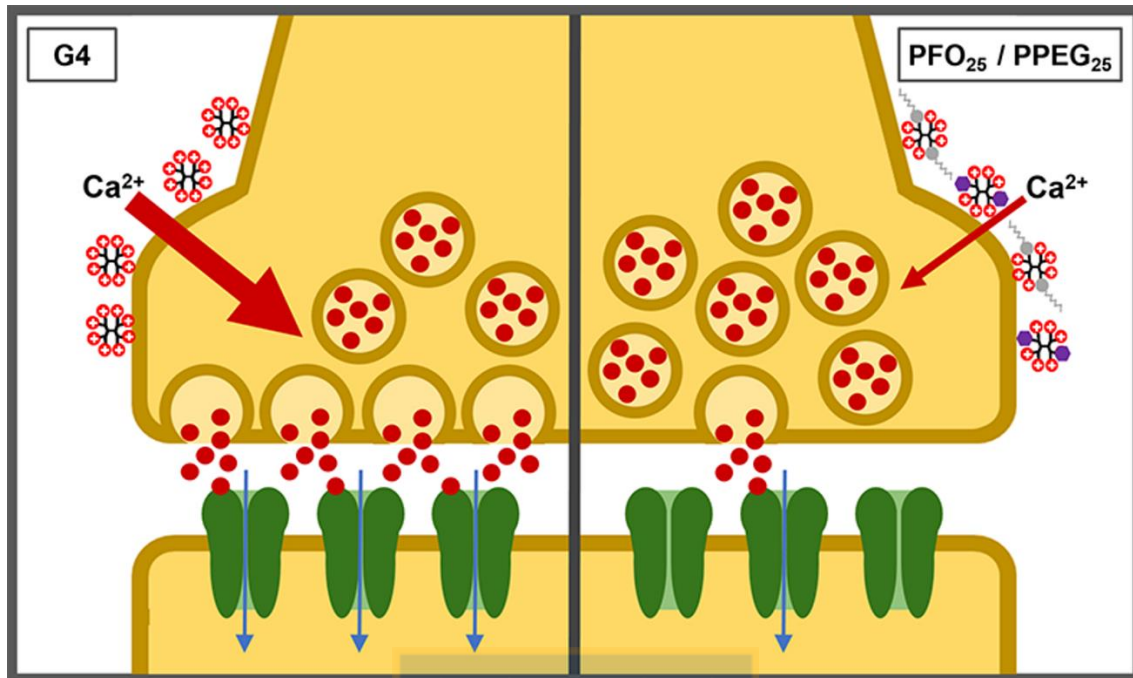


Figura 19. Esquema representativo de los efectos de dendrímeros PAMAM en la funcionalidad sináptica en neuronas. El dendrímero G4 induce un aumento de permeabilidad de la membrana que genera un marcado ingreso de Ca^{2+} , lo cual deriva en un incremento en la liberación de vesículas sinápticas y, por tanto, una mayor generación de eventos sinápticos (izquierda). Los dendrímeros PFO₂₅ y PPEG₂₅ no generan alteraciones en la permeabilidad de membrana, manteniendo un ingreso normal de Ca^{2+} sin producir variaciones significativas en la dinámica normal de la actividad sináptica de las neuronas (derecha). Fuente: *Elaboración propia*.

3. Estudio de la biodistribución de dendrímeros PAMAM, su asociación a distintas estructuras del SNC y del efecto de su funcionalización con folato en dichos fenómenos

3.1 Dendrímeros en estudio

Una de las principales áreas de estudio para la aplicación efectiva de los sistemas nanotransportadores de fármacos en neurofarmacología, es la funcionalización de las nanopartículas empleadas con ligandos que permitan su direccionamiento específico al SNC (Xu et al., 2014). Al respecto, ha sido descrito que el transporte de folato hacia el SNC se produce en los plexos coroideos a través de transcitosis mediada por el receptor FolR α (Grapp et al., 2013). Por lo tanto, la funcionalización de dendrímeros PAMAM con folato podría facilitar su direccionamiento y traspaso hacia el parénquima del tejido nervioso. Para estudiar esta posibilidad, dendrímeros PAMAM G4 fueron modificados con folato en un 40% de sus grupos amino terminales (PFO₄₀). Tanto PFO₄₀ y el dendrímero control G4, fueron marcados con la sonda fluorescente AlexaFluor 555 para su detección (Fig. 20).

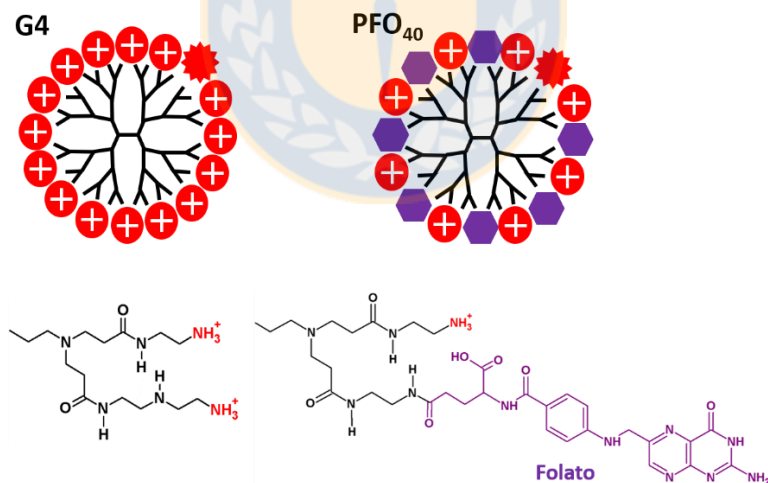


Figura 20. Representación esquemática de los dendrímeros PAMAM en estudio. Dendrímero modificado con folato y sin modificaciones superficiales fueron evaluados. G4: Dendrímero PAMAM de cuarta generación con todos sus grupos amino superficiales de carga positiva (rojo). PFO₄₀: G4 con el 40% de sus grupos superficiales sustituidos con folato (púrpura). Ambos dendrímeros fueron conjugados con AlexaFluor 555 para su detección (rojo). Debajo de cada representación esquemática se muestra la estructura química de los grupos terminales expuestos en la superficie. Fuente: *Elaboración propia*.

3.2 Biodistribución de G4 y PFO₄₀ en el SNC

Con el fin de evaluar la biodistribución de los dendrímeros de interés, ratones C57BL/6J fueron inyectados vía i.v. con G4 y PFO₄₀. Posterior a ello, para estudiar su localización en el SNC, los animales fueron sacrificados y se extrajo el cerebro para luego obtener cortes histológicos a nivel de la corteza cerebral, hipocampo y tercer ventrículo, y cerebelo. La extracción de los órganos se llevó a cabo a 0,5, 1 y 4 h post administración de los dendrímeros.

Las imágenes de microscopía confocal muestran que, en la región del tercer ventrículo es posible observar una importante marca de ambos dendrímeros asociada a dicha estructura, siendo esta mucho más marcada para el caso de G4, en especial a 1 h post inyección (**Fig. 21A**). Cuando la región es explorada con mayor aumento, se identifica un patrón de marca que sugiere la localización de los dendrímeros a través de la vasculatura del plexo coroideo y su posible asociación a células endoteliales. Sin embargo, en el caso del dendrímero PFO₄₀ a las 4 h post administración, se aprecia una marca más diseminada que la obtenida con G4 y rodeando núcleos celulares, lo que podría sugerir la internalización celular del dendrímero funcionalizado. Más aún, el tamaño y forma de dichos núcleos podría indicar que estas células corresponden a células distintas de las endoteliales (**Fig. 21B**). La determinación certera tanto de la internalización celular de los dendrímeros, así como del tipo de célula con el que las nanopartículas se están asociando dependerá de futuros experimentos en los cuales se utilicen marcadores específicos para las distintas células que componen los plexos coroideos.

Más allá de demostrar la acumulación de los dendrímeros en zonas vasculares o en estructuras como los plexos coroideos, es importante evidenciar su capacidad de alcanzar el parénquima cerebral. En el presente estudio, se analizaron imágenes de la zona del giro dentado del hipocampo, región que se encuentra cercana a las paredes del tercer ventrículo y desde donde podrían difundir los dendrímeros observados en los plexos coroideos (**Fig. 22**). En dichas imágenes se evidencia la presencia de dendrímeros G4 en esta región, la cual es mayor a los tiempos más cortos analizados y disminuye a las 4 h; mientras que para el dendrímero modificado con folato, no se observa su presencia en el área analizada (**Fig. 22**). La observación de esta región con mayor aumento sugiere la asociación de G4 a las células presentes en el giro dentado. No obstante, la ausencia de un marcaje específico impide dilucidar a qué tipo celular en particular ocurriría dicha asociación. Además del hipocampo, la corteza cerebral también fue analizada y se observó la presencia de ambos dendrímeros, aunque cabe destacar que, al menos en términos cualitativos, se aprecia una mayor

abundancia de la marca correspondiente a G4, mientras que para PFO₄₀ se observa un acotado número de marcas fluorescentes en la región analizada (**Fig. 23A**). Al igual que en el caso del giro dentado, el análisis a mayor aumento muestra una asociación a células por parte de los dendrímeros que requiere del uso de marcadores específicos para su estudio más detallado (**Fig. 23B**).

Del mismo modo se analizaron cortes de cerebelo, los cuales indican la presencia de ambos dendrímeros con un patrón similar a los cortes previamente descritos. La presencia de G4 queda claramente evidenciada para los dos primeros tiempos de estudio (0,5 y 1 h post administración), mientras que esta disminuye considerablemente para las 4 h post inyección (**Fig. 24A**). En cuanto a PFO₄₀, su presencia es escasa en la región en general (**Fig. 24A**), aunque las imágenes de mayor aumento permiten observar algunas marcas asociadas a componentes celulares (**Fig. 24B**). Nuevamente, estudios más detallados son necesarios para determinar con qué células interaccionan los dendrímeros que alcanzan el cerebelo (**Fig. 24B**).

El estudio con marcadores celulares específicos será clave para determinar si los dendrímeros empleados son efectivamente capaces de alcanzar células del parénquima nervioso o sólo interaccionan con las células endoteliales sin atravesar las barreras biológicas presentes. Las imágenes de hipocampo, corteza y cerebelo principalmente en el caso de G4, sugieren la presencia del dendrímero en capilares, aunque no se puede descartar su asociación a células parenquimales. Los resultados obtenidos, por el momento, permiten evidenciar como primera aproximación la llegada de los dendrímeros a regiones del SNC y su importante acumulación en los plexos coroideos.

3.3 Biodistribución de G4 y PFO₄₀ en el resto del organismo

La utilización efectiva de los sistemas nanotransportadores estudiados en aplicaciones orientadas al SNC no solo depende de su interacción con dicho tejido, sino que también de su biodistribución general en el organismo y de su interacción con otros órganos encargados de la metabolización y eliminación de sustancias exógenas. Es por ello que resulta relevante analizar la presencia de los dendrímeros PAMAM en estudio en órganos tales como hígado, riñón y en el plasma sanguíneo.

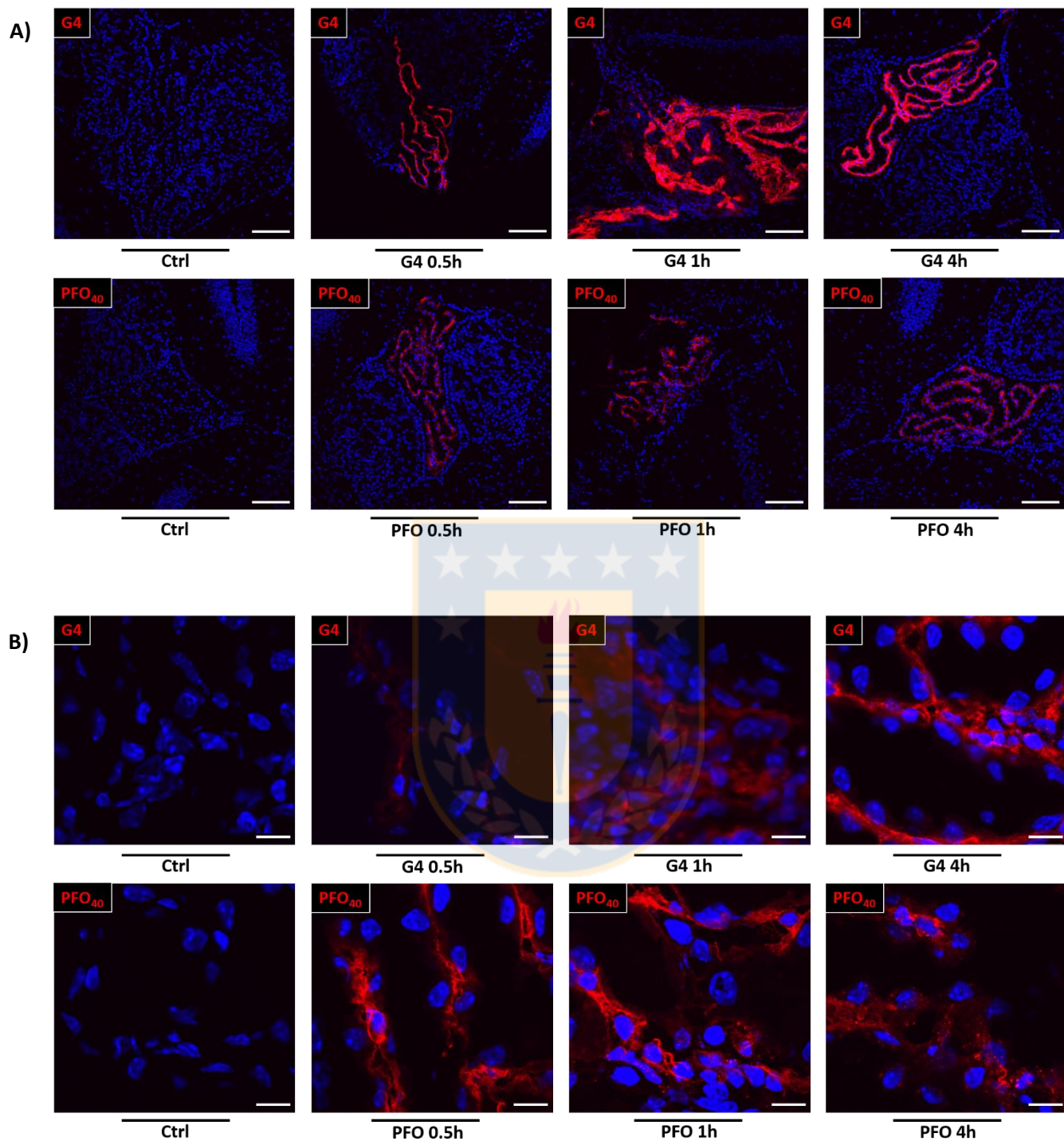


Figura 21. Localización de dendrímeros en plexos coroideos en tercer ventrículo. Ratones fueron inyectados con G4 y PFO₄₀ (rojo) y se realizaron cortes coronales de tejido a 0,5, 1 y 4 h post inyección. Los núcleos celulares fueron marcados con DAPI (azul). **A)** Visualización general de los plexos coroideos en tercer ventrículo post inyección de G4 (panel superior) y PFO₄₀ (panel inferior). De izquierda a derecha control, 0,5, 1 y 4 h post inyección de dendrímero. Barra de escala = 100 μ m. **B)** Ampliación de la región de estudio para mayor detalle de la presencia de G4 (panel superior) y PFO₄₀ (panel inferior). De izquierda a derecha control, 0,5, 1 y 4 h post inyección de dendrímero. Barra de escala = 10 μ m. (n = 2). Fuente: *Elaboración propia*.

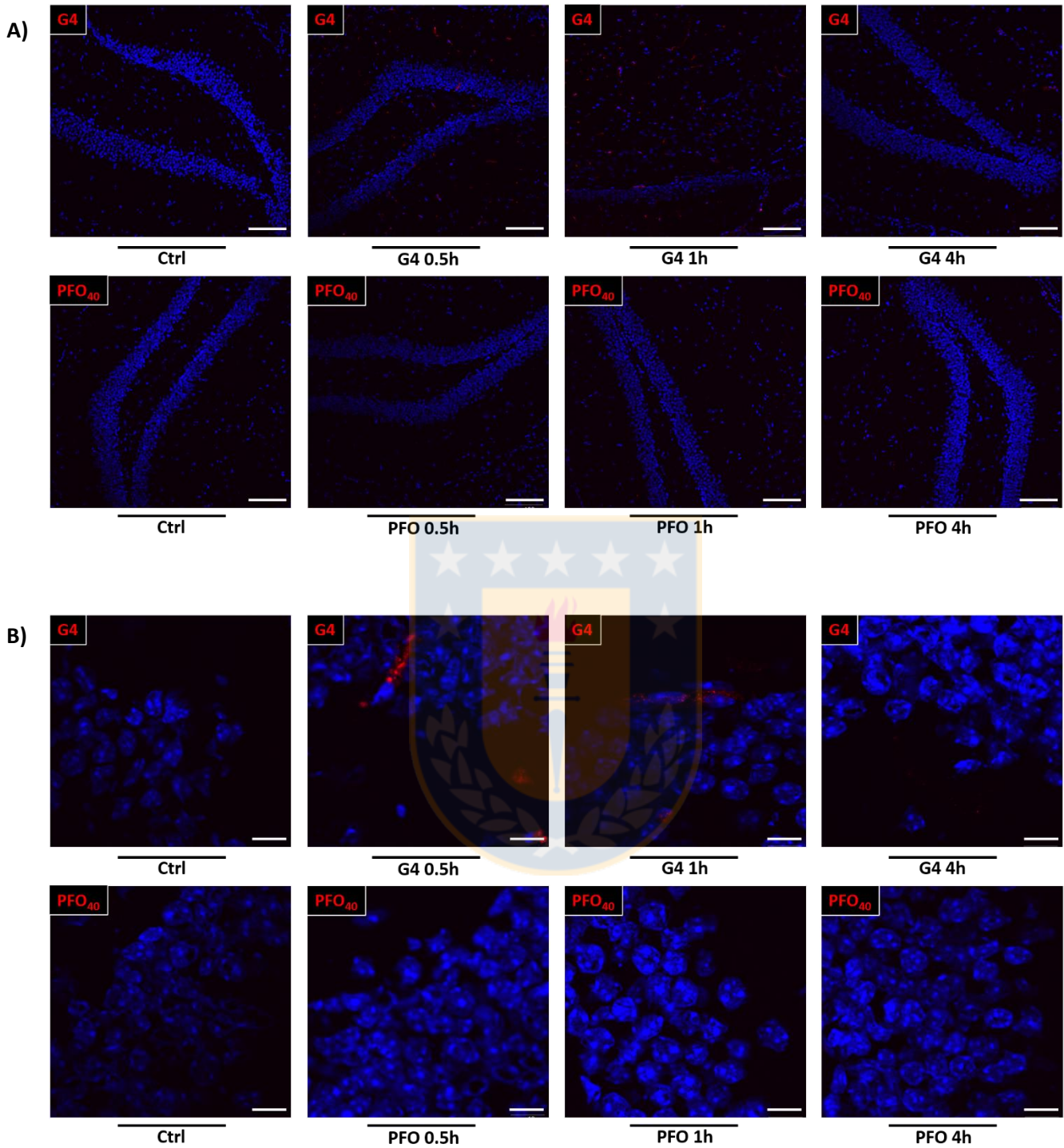


Figura 22. Localización de dendrímeros en giro dentado. Ratones fueron inyectados con G4 y PFO₄₀ (rojo) y se realizaron cortes coronales de tejido a 0,5, 1 y 4 h post inyección. Los núcleos celulares fueron marcados con DAPI (azul). **A)** Visualización general del giro dentado post inyección de G4 (panel superior) y PFO₄₀ (panel inferior). De izquierda a derecha control, 0,5, 1 y 4 h post inyección de dendrímero. Barra de escala = 100 μm. **B)** Ampliación de la región de estudio para mayor detalle de la presencia de G4 (panel superior) y PFO₄₀ (panel inferior). De izquierda a derecha control, 0,5, 1 y 4 h post inyección de dendrímero. Barra de escala = 10 μm. (n = 2). Fuente: *Elaboración propia.*

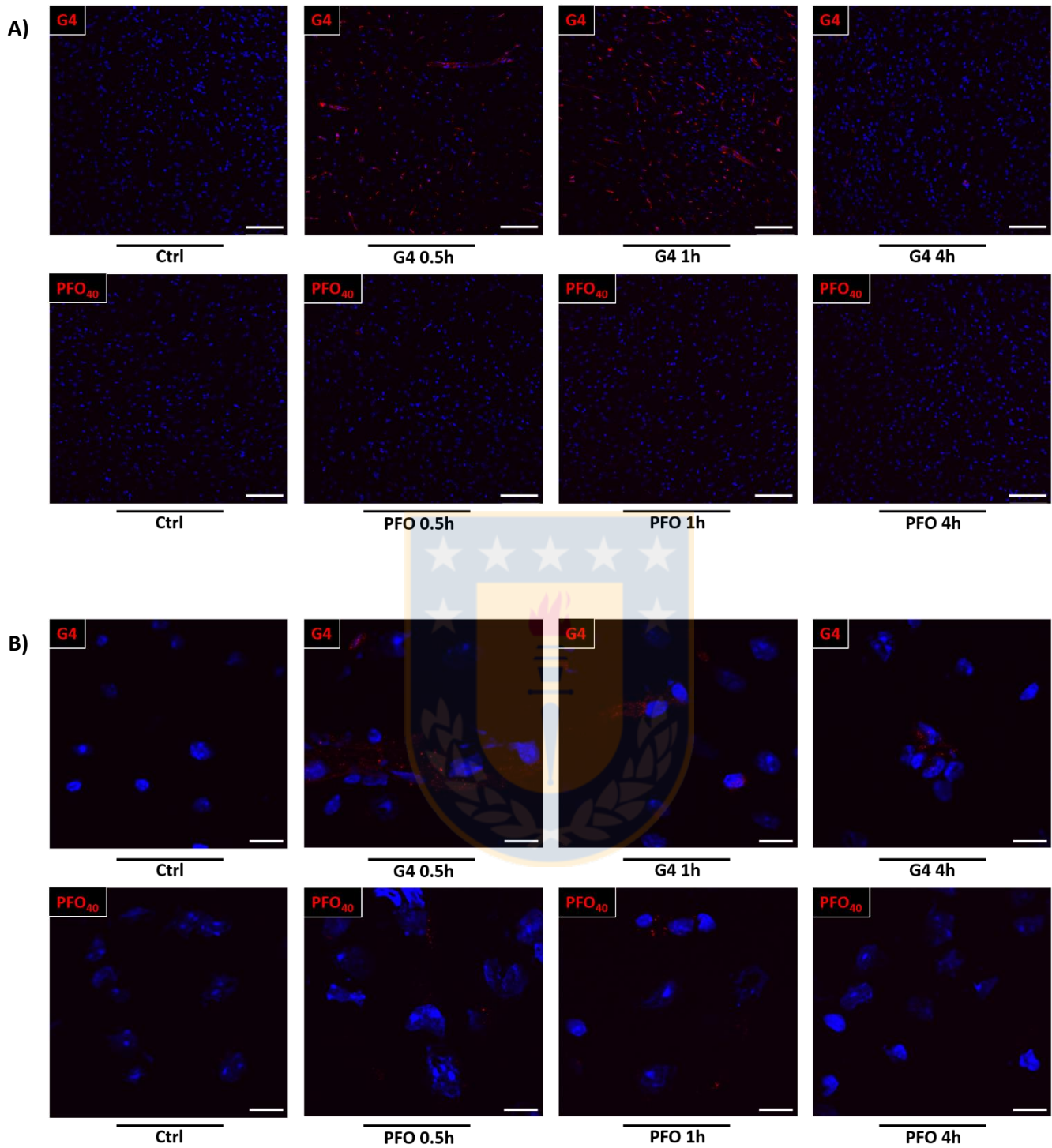


Figura 23. Localización de dendrímeros en corteza cerebral. Ratones fueron inyectados con G4 y PFO₄₀ (rojo) y se realizaron cortes coronales de tejido a 0,5, 1 y 4 h post inyección. Los núcleos celulares fueron marcados con DAPI (azul). **A)** Visualización general de la corteza cerebral post inyección de G4 (panel superior) y PFO₄₀ (panel inferior). De izquierda a derecha control, 0,5, 1 y 4 h post inyección de dendrímero. Barra de escala = 100 μm. **B)** Ampliación de la región de estudio para mayor detalle de la presencia de G4 (panel superior) y PFO₄₀ (panel inferior). De izquierda a derecha control, 0,5, 1 y 4 h post inyección de dendrímero. Barra de escala = 10 μm. (n = 2). Fuente: *Elaboración propia.*

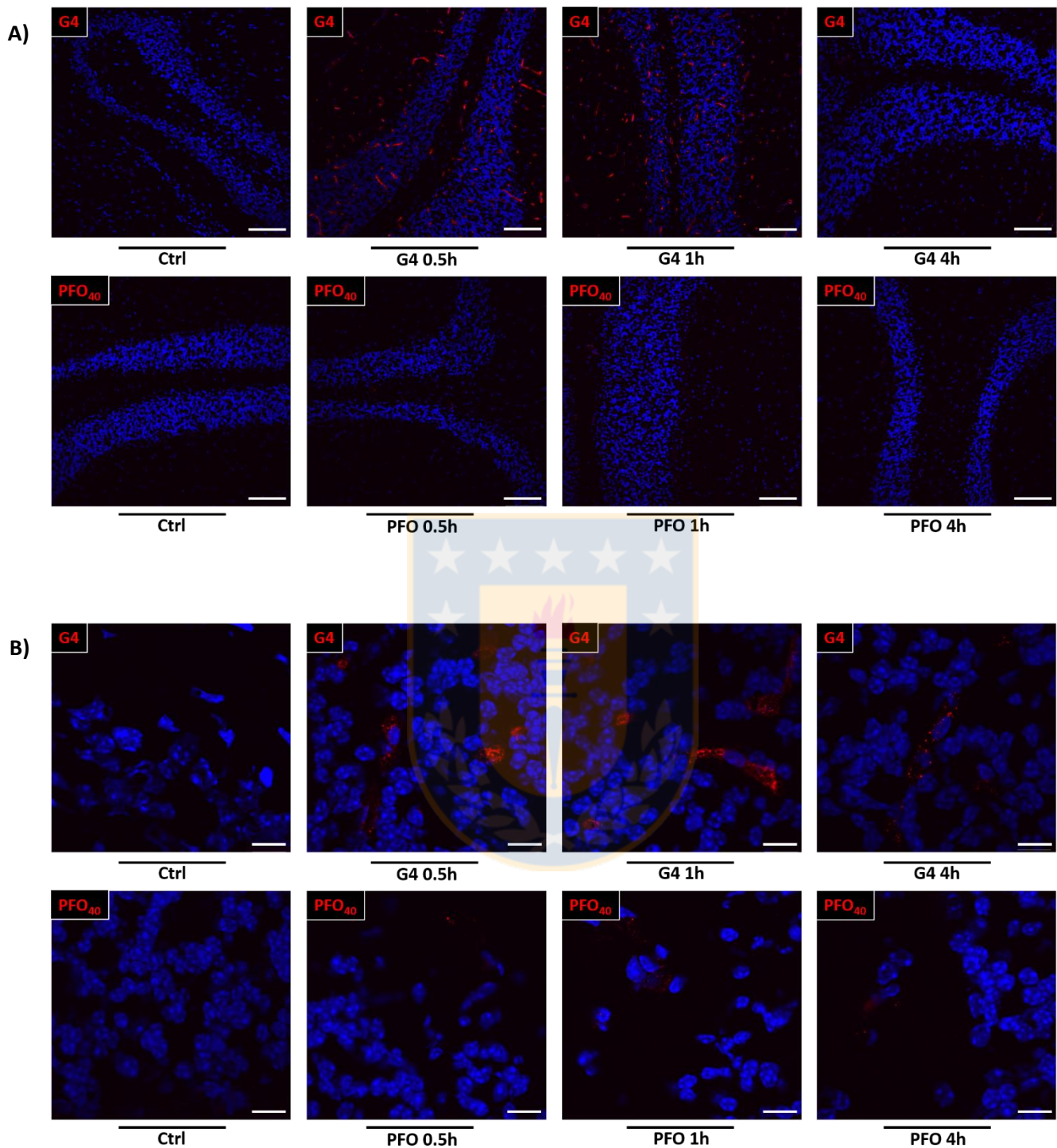


Figura 24. Localización de dendrímeros en cerebelo. Ratones fueron inyectados con G4 y PFO₄₀ (rojo) y se realizaron cortes coronales de tejido a 0,5, 1 y 4 h post inyección. Los núcleos celulares fueron marcados con DAPI (azul). **A)** Visualización general del cerebelo post inyección de G4 (panel superior) y PFO₄₀ (panel inferior). De izquierda a derecha control, 0,5, 1 y 4 h post inyección de dendrímero. Barra de escala = 100 μ m. **B)** Ampliación de la región de estudio para mayor detalle de la presencia de G4 (panel superior) y PFO₄₀ (panel inferior). De izquierda a derecha control, 0,5, 1 y 4 h post inyección de dendrímero. Barra de escala = 10 μ m. (n = 2). Fuente: *Elaboración propia.*

El hígado constituye el principal órgano en la función de metabolización de sustancias exógenas y detoxificación en el organismo, por lo que la presencia de G4 y PFO₄₀ también fue evaluada a nivel hepático a las 0,5, 1 y 4 h post administración de cada dendrímero. Estudios previos demuestran una importante acumulación de dendrímeros PAMAM de distintas generaciones en el hígado (Malik et al., 2000; Roberts et al., 1996). Para el caso de los dendrímeros en estudio, el análisis mediante microscopía confocal de cortes de este tejido detectó la presencia tanto de G4 como de PFO₄₀. Es interesante destacar que se evidencia un patrón distinto para ambos dendrímeros, lo cual es posible apreciar de mejor manera en las imágenes de menor aumento (**Fig. 25A**). En cuanto al dendrímero G4, este parece disminuir la intensidad de su fluorescencia a medida que avanza el tiempo. Llama la atención la notoria diferencia en la intensidad de fluorescencia observada en lo que serían las paredes de la vena central y el resto de las células para el tiempo 1 h post inyección, a diferencia de lo que se observa para los otros dos tiempos que presentan una distribución más homogénea de la intensidad de fluorescencia. Cuando se analiza la marca fluorescente del dendrímero sustituido con folato, es posible apreciar una mayor intensidad de fluorescencia al tiempo 1 h comparado con el tiempo 0,5 h, para finalmente disminuir su fluorescencia a las 4 h post inyección.

La observación a mayor aumento muestra que para los tiempos 0,5 y 1 h, existe una asociación de la marca fluorescente de ambos dendrímeros principalmente a lo que serían células endoteliales y la membrana de los hepatocitos, esto es inferido por el tamaño y ubicación de los núcleos celulares. En contraste, a las 4 h post administración, tanto para G4 como para PFO₄₀ ya no se observa la acumulación de la marca fluorescente en la periferia celular, sino que esta presenta un patrón puntiforme y se localiza en lo que podría identificarse como el citoplasma de los hepatocitos, sugiriendo su internalización en dichas células (**Fig. 25B**). La disminución en la intensidad de fluorescencia observada en este tiempo de estudio podría deberse tanto a un efecto aparente por la diseminación de la marca, así como a la metabolización y eliminación de las nanopartículas por parte de las células hepáticas. Nuevas estrategias experimentales son necesarias para discriminar estas alternativas.

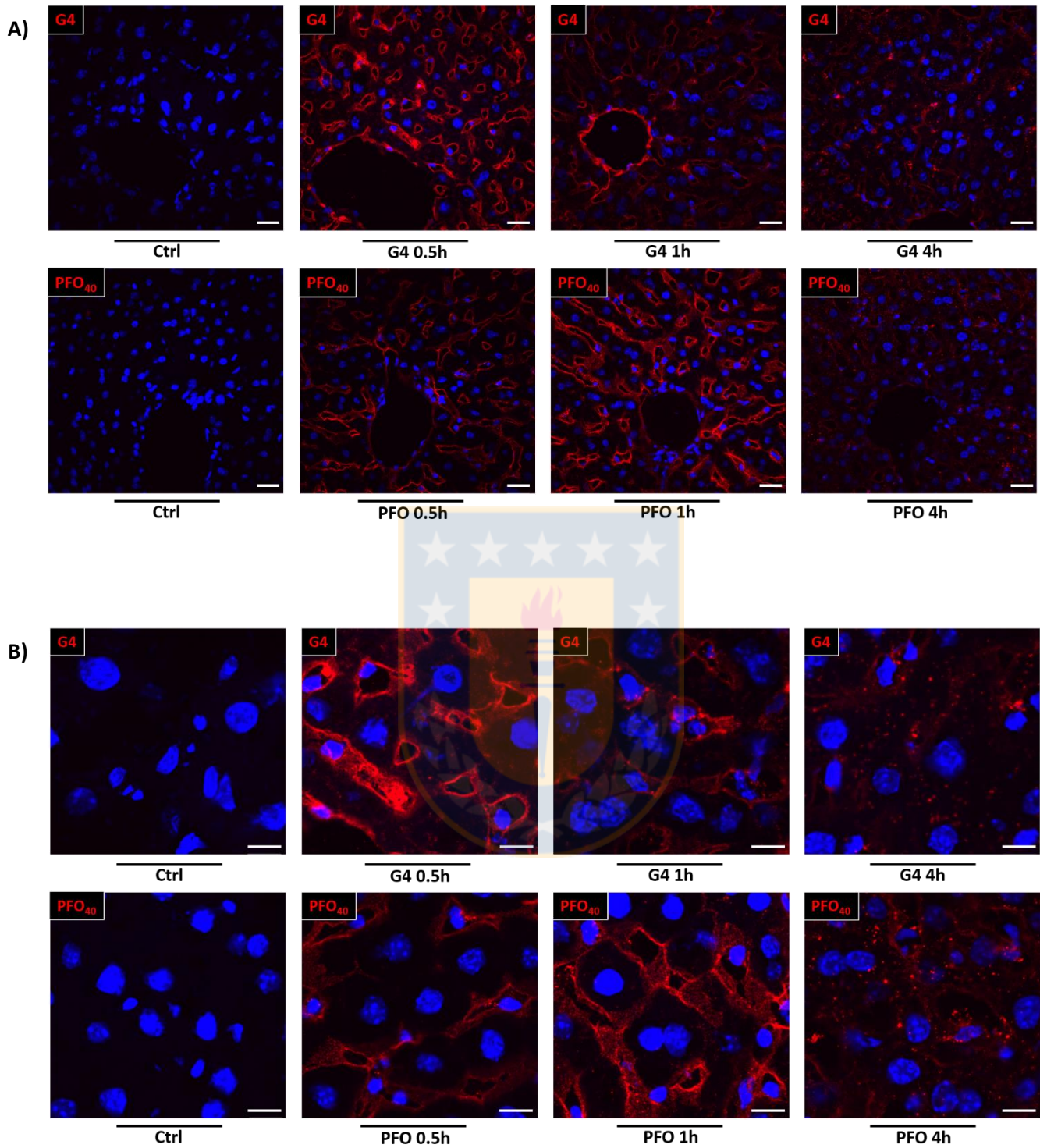
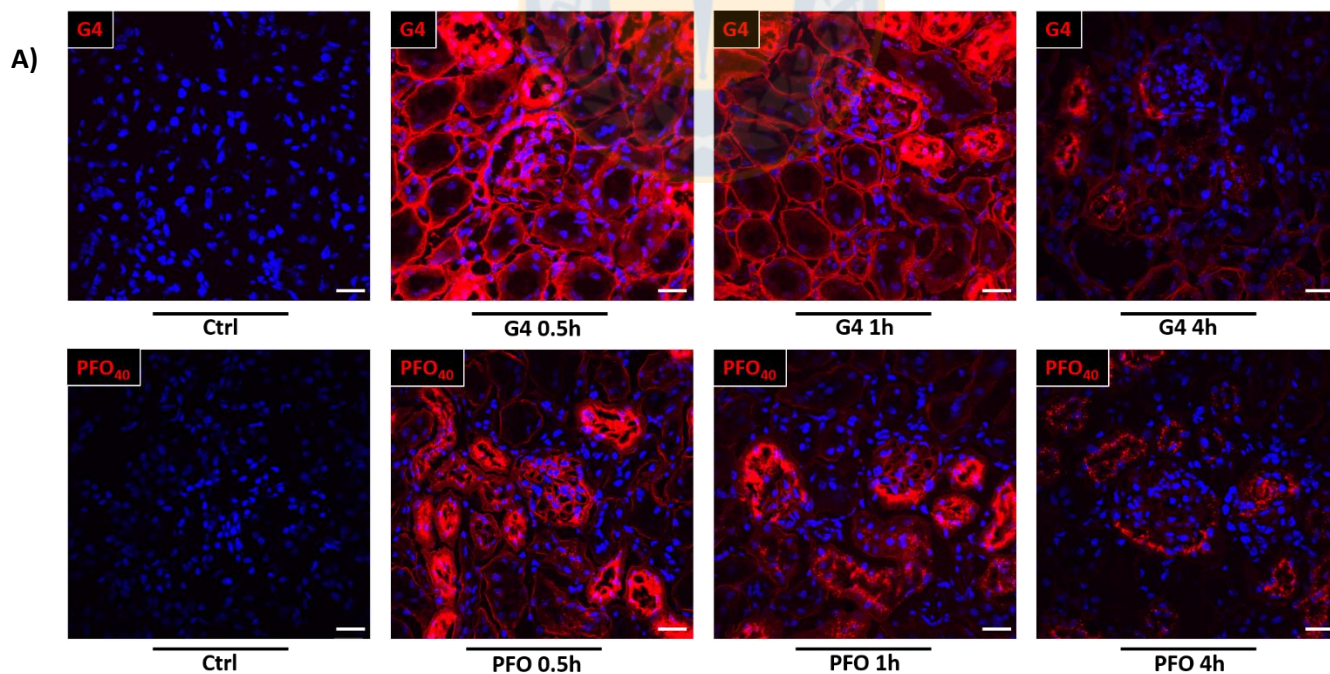


Figura 25. Localización de dendrímeros en hígado. Ratones fueron inyectados con G4 y PFO₄₀ (rojo) y se realizaron cortes coronales de tejido a 0,5, 1 y 4 h post inyección. Los núcleos celulares fueron marcados con DAPI (azul). **A)** Visualización general del hígado post inyección de G4 (panel superior) y PFO₄₀ (panel inferior). De izquierda a derecha control, 0,5, 1 y 4 h post inyección de dendrímero. Barra de escala = 20 μ m. **B)** Ampliación de la región de estudio para mayor detalle de la presencia de G4 (panel superior) y PFO₄₀ (panel inferior). De izquierda a derecha control, 0,5, 1 y 4 h post inyección de dendrímero. Barra de escala = 10 μ m. (n = 2). Fuente: *Elaboración propia.*

3.4 Biodistribución de G4 y PFO₄₀ en riñón

La literatura previa indica que el riñón también es un importante órgano de acumulación para dendrímeros de distintas generaciones y que el sistema urinario participa de su eliminación del organismo (Malik et al., 2000; Roberts et al., 1996). Teniendo en cuenta estos antecedentes y el hecho de que el riñón es un órgano fundamental en la excreción de sustancias de desecho en el organismo, éste también fue considerado dentro de los órganos analizados en el estudio de biodistribución de G4 y PFO₄₀. Para ello, cortes de la corteza renal fueron obtenidos a los mismos tiempos post inyección previamente descritos. El análisis general de la región de estudio muestra una dinámica similar para ambos dendrímeros, en la cual se observa la disminución de la intensidad de su marca fluorescente a medida que avanza el tiempo. La comparación cualitativa parece indicar una mayor presencia de G4 por sobre la de PFO₄₀ en este órgano, lo que se hace patente sobre todo en los primeros tiempos de evaluación (**Fig. 26A**). El análisis más detallado de los glomérulos (**Fig. 26B**) y de los túbulos contorneados (**Fig. 26C**) muestra disminuye la marca fluorescente de los dendrímeros en el tiempo para ambos casos, lo cual sugiere su eliminación por la vía renal.



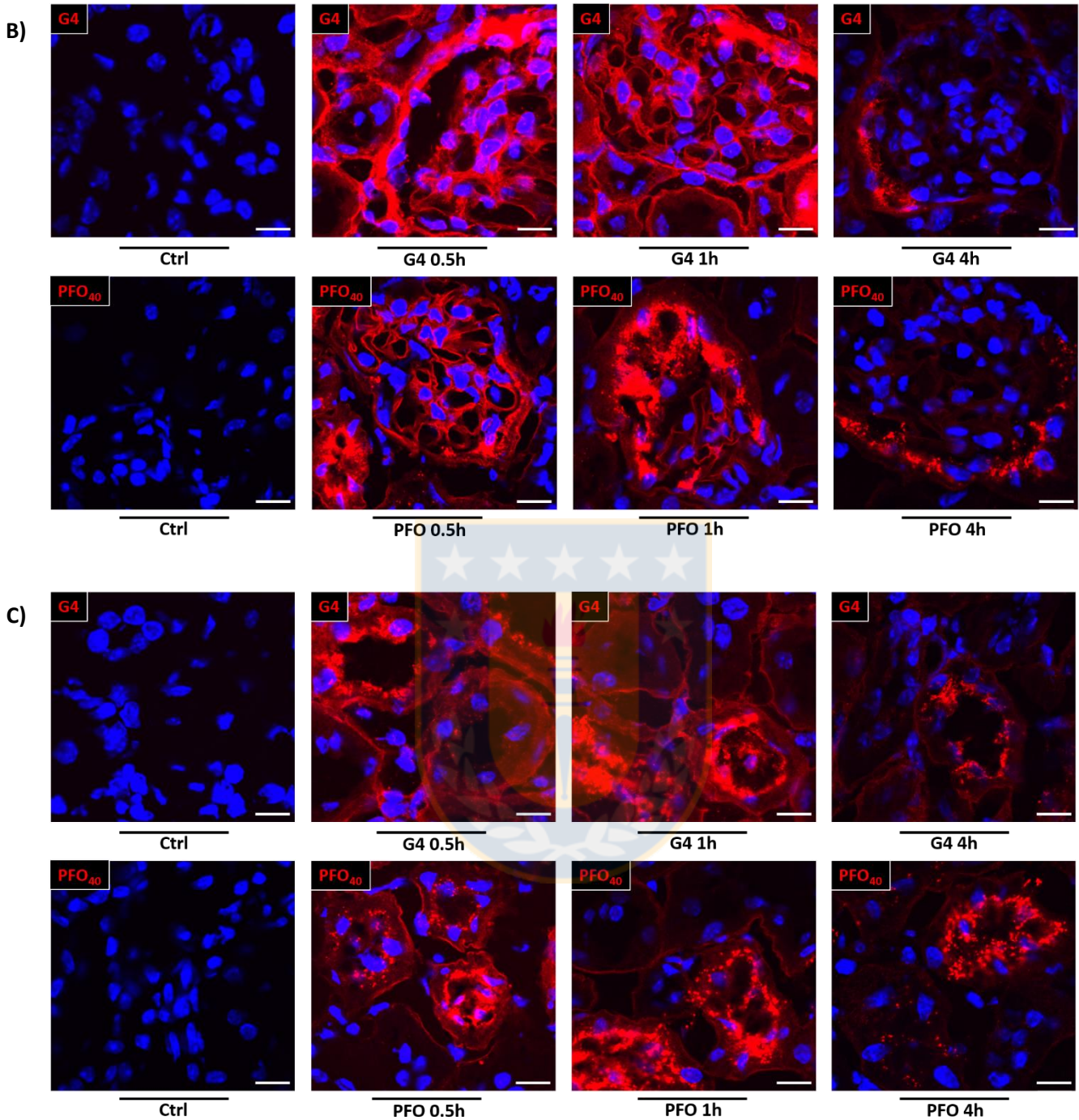


Figura 26. Localización de dendrímeros en riñón. Ratones fueron inyectados con G4 y PFO₄₀ (rojo) y se realizaron cortes coronales de tejido a 0,5, 1 y 4 h post inyección. Los núcleos celulares fueron marcados con DAPI (azul). **A)** Visualización general del riñón post inyección de G4 (panel superior) y PFO₄₀ (panel inferior). De izquierda a derecha control, 0,5, 1 y 4 h post inyección de dendrímero. Barra de escala = 20 μm. **B)** Ampliación del glomérulo para mayor detalle de la presencia de G4 (panel superior) y PFO₄₀ (panel inferior). De izquierda a derecha control, 0,5, 1 y 4 h post inyección de dendrímero. **C)** Ampliación de túbulos contorneados para mayor detalle de la presencia de G4 (panel superior) y PFO₄₀ (panel inferior). De izquierda a derecha control, 0,5, 1 y 4 h post inyección de dendrímero. Barra de escala = 10 μm. (n = 2). Fuente: *Elaboración propia.*

3.5 Biodistribución de G4 y PFO₄₀ en plasma sanguíneo

Además de la detección de los dendrímeros en determinados órganos, es importante cuantificar su concentración en el plasma sanguíneo en el tiempo, a fin de evaluar su permanencia en el organismo y, por ende, su biodisponibilidad general. La medición de los niveles de ambos dendrímeros muestra interesantes diferencias en su cinética plasmática. En los tiempos evaluados, el dendrímero PFO₄₀ muestra un decaimiento de su concentración en plasma a medida que avanza el tiempo, con un máximo de $2,08 \pm 0,31 \mu\text{mol/L}$ a las 0,5 h después de la inyección y que luego decae a un valor cercano a cero a las 4 h post administración. El dendrímero G4, por el contrario, muestra un aumento de más de cuatro veces su concentración plasmática desde el tiempo 0,5 h al tiempo 1 h post inyección, con valores iguales a $1,49 \pm 0,10$ y $8,06 \pm 0,25 \mu\text{mol/L}$, respectivamente. Luego de 4 h post inyección, este dendrímero también muestra una concentración cercana a cero (**Fig. 27**).

Si bien estos datos tienen un número de repeticiones aún bajo que no permite realizar comparaciones estadísticas que otorguen resultados completamente concluyentes, es posible observar tendencias marcadas que despiertan interés por profundizar el estudio de la cinética plasmática que siguen ambos dendrímeros e indagar en cómo las modificaciones superficiales influyen en este parámetro de gran relevancia para la biodisponibilidad de estas nanopartículas.

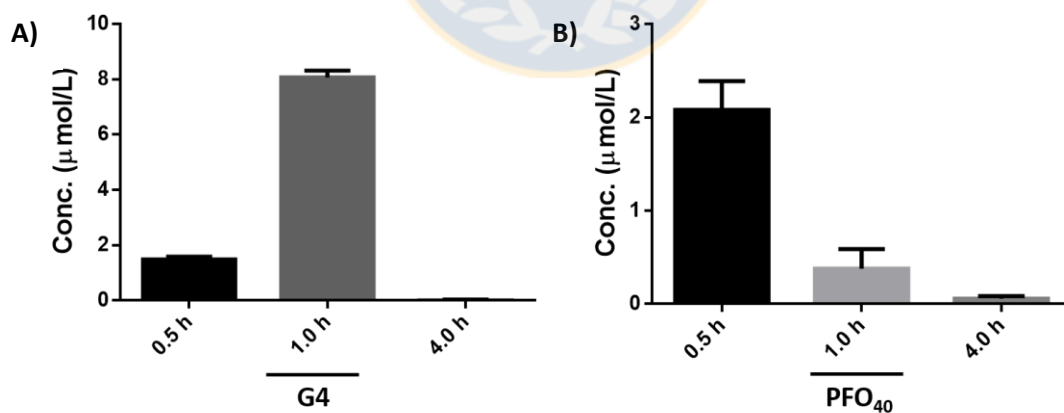


Figura 27. Concentración de dendrímeros en plasma. Ratones fueron inyectados con G4 y PFO₄₀ y se obtuvieron muestras de plasma a 0,5, 1 y 4 h post administración. **A)** Concentración plasmática de G4 **B)** Concentración plasmática de PFO₄₀. (n = 2). Fuente: *Elaboración propia*.

Dentro de estos resultados preliminares destaca la evidencia de la importante acumulación de los dendrímeros en estudio en la región de los plexos coroideos, lo cual sustentaría la idea de realizar funcionalizaciones que posibiliten emplear dicho tejido como una puerta de entrada al SNC. Por otro lado, destacan también las diferencias evidenciadas en la farmacocinética y biodisponibilidad de estas nanopartículas en el organismo, lo que sugiere posibles ventajas y/o diferentes usos para uno u otro dendrímero.



VI.DISCUSIÓN

Desde que los dendrímeros PAMAM fueron desarrollados como polímeros hiper-ramificados que podían ser utilizados como sistemas nanotransportadores de fármacos (Tomalia et al., 1985), estas macromoléculas han sido ampliamente estudiadas para su uso en diversas aplicaciones farmacológicas clásicas y con nuevos agentes terapéuticos en desarrollo, no sólo remitiéndose al uso de drogas tipo molécula pequeña, sino que también para su utilización con agentes de naturaleza peptídica y génica (Kannan et al., 2014; Svenson, 2009b).

Entre los principales campos de aplicación en que se ha enfocado la investigación de estos sistemas de entrega de fármacos, destaca su uso en terapias anticancerígenas debido al problema de solubilidad que presentan muchas de estas drogas, y en las que su encapsulación en dendrímeros ha demostrado aumentar su solubilidad y optimizar su efectividad en distintos modelos de esta patología. El uso de estas nanopartículas también ha demostrado importantes resultados en la mejora de la efectividad de agentes antiinflamatorios y antimicrobianos, entre otros (Menjoge et al., 2010; Svenson, 2009b).

En cuanto a la aplicación de estas nanopartículas en terapias dirigidas al SNC, el foco de investigación se ha centrado primordialmente en generar sistemas conjugados con ligandos que permitan alcanzar de manera selectiva este tejido y atravesar la BHE (Soni et al., 2016; Xu et al., 2014). A su vez, respecto de su uso en terapias, estos dendrímeros han sido empleados para transportar principalmente agentes anticancerígenos en distintos modelos de gliomas, además de su aplicación en modelos de enfermedades neuroinflamatorias y neurodegenerativas (del Burgo et al., 2014; Huang et al., 2013; Kannan et al., 2012; Nance et al., 2015).

A pesar de estos avances, existen diversas interrogantes aún abiertas en torno a la interacción más específica de estas nanopartículas a nivel neuronal, tales como su capacidad de internalización y efectos tóxicos en dicho tipo celular, además de mayores evidencias de su capacidad de atravesar las barreras biológicas presentes en el SNC, así como la posibilidad de encontrar nuevas rutas de ingreso al tejido nervioso. Por lo tanto, la presente tesis tuvo su principal foco en dichos aspectos.

Internalización de dendrímeros PAMAM con distintas propiedades superficiales

Los resultados obtenidos para el estudio de la internalización de dendrímeros PAMAM en neuronas muestran que las propiedades de los grupos químicos presentes en la superficie de estas macromoléculas tienen una importante influencia en dicho proceso, pudiendo inclusive bloquearse. Para el caso del dendrímero G4, sin modificaciones en su superficie y que expone sus 64 grupos amino superficiales de carga positiva, fue posible demostrar su ingreso en neuronas hipocampales (**Fig. 8**), lo cual concuerda con la capacidad previamente reportada de dendrímeros de superficie con carga completamente positiva para ingresar en neuronas corticales y otras células (Albertazzi et al., 2010, 2013; Perumal et al., 2008). Por su parte, la sustitución del 50% de los grupos amino superficiales del dendrímero con polietilenglicol, de naturaleza neutra, demostró contrarrestar la capacidad inicial del dendrímero de ser internalizado por las neuronas (**Fig. 8**). El mismo resultado fue observado para el dendrímero denominado PAC, el cual cuenta con un 30% de los grupos amino superficiales sustituidos por 2-carboxietilacrilato que expone grupos carboxilato de carga negativa (**Fig. 8**). Si se considera que en el dendrímero PAC, además de la disminución de la carga superficial generada por el reemplazo directo de los grupos amino, existe la reducción de otro 30% de las cargas positivas totales producto de la neutralización originada por las cargas negativas de los grupos acrilato, es posible establecer que la densidad de carga superficial de los dendrímeros PPEG₅₀ y PAC es similar (40 – 50% de cargas positivas). Esto, por ende, explicaría por qué ambos no son internalizados por las neuronas. Es interesante destacar que en el caso del dendrímero cuyos grupos amino terminales fueron sustituidos con folato en un 25%, PFO₂₅, la modificación de la superficie del dendrímero a este porcentaje no implicó un bloqueo del proceso, siendo posible observar su internalización (**Fig. 8**). Más aún, los estudios de internalización a distintos tiempos muestran una cinética similar para los dendrímeros G4 y PFO₂₅ (**Fig. 9**), aunque cabe mencionar que estudios cinéticos más detallados podrían determinar diferencias al respecto.

Estos resultados demuestran que la presencia de al menos un 50% de las cargas positivas de la superficie del dendrímero PAMAM G4 es necesaria para su interacción con la neurona y su posterior internalización. El hecho de que el proceso de internalización celular en neuronas se encuentra más favorecido para dendrímeros con mayor porcentaje de carga positiva superficial concuerda con estudios previos en otros modelos celulares. Por ejemplo, el estudio realizado en células epiteliales de carcinoma pulmonar A549, muestra a través de ensayos de citometría de flujo que dendrímeros PAMAM G4 de superficie completamente neutra y de carga negativa tienen un menor grado de

internalización comparados con aquellos de superficie de carga completamente positiva (Perumal et al., 2008). Por otro lado, estudios de microscopía confocal en células HeLa con dendrímeros GATG, de naturaleza similar a los dendrímeros PAMAM, demostró una importante internalización para los dendrímeros de superficie positiva, mientras que se evidenció una débil internalización para los de superficie aniónica y nulo ingreso para aquellos de superficie neutra (Albertazzi et al., 2012). En el caso de los resultados obtenidos en la presente tesis, se demuestra que solo una modificación parcial de la superficie del dendrímero es suficiente para bloquear este proceso. Al respecto, las propiedades intrínsecas de endocitosis de cada tipo celular podrían explicar estas diferencias y futuros estudios comparativos podrían estar enfocados en explorar con más precisión dichas diferencias en la internalización de estas moléculas en distintas células.

Mecanismos de internalización de los dendrímeros G4 y PFO₂₅

En cuanto a los mecanismos de internalización de los dendrímeros para los cuales fue demostrada su capacidad de ingresar en neuronas, es decir, G4 y PFO₂₅, tanto los experimentos realizados con anticuerpos para marcadores específicos de endocitosis, así como los efectuados con inhibidores específicos para dicho proceso, evidencian la existencia de diferencias en las rutas endocíticas seguidas por estos dendrímeros. Respecto de G4, ambos experimentos demostraron que su ingreso en la neurona involucra la participación de la endocitosis mediada por clatrina (**Figs. 10 y 11**), mientras que el estudio de colocalización con Rab5 evidencia que el proceso prosigue a través de la ruta clásica de tráfico intracelular hacia endosomas tempranos (**Fig. 10**), la cual derivaría finalmente en la asociación a lisosomas (Khalil et al., 2006). Estos ensayos, a su vez, descartaron la participación de la endocitosis mediada por caveola en la internalización de G4.

Estos mismos experimentos para PFO₂₅ muestran que este dendrímero ingresa tanto por la endocitosis mediada por clatrina como por caveola (**Figs. 10 y 11**). La colocalización observada con Rab5 demuestra además que PFO₂₅, al igual que G4, alcanza los endosomas tempranos, y que, por tanto, también proseguiría por la ruta de tráfico intracelular que deriva en lisosomas (**Fig. 10**). No obstante, la participación de la endocitosis mediada por caveola en el proceso supone la posibilidad de que estos dendrímeros, de manera paralela, sean internalizados evadiendo los lisosomas, ya que ha sido descrito que en este mecanismo de endocitosis las moléculas pueden derivar tanto a lisosomas como a una ruta alternativa que llega al aparato de Golgi y/o al retículo endoplásmico

(Khalil et al., 2006; Kiss and Botos, 2009). La participación de ambas rutas de endocitosis para los dendrímeros modificados con folato puede ser explicada porque dicha sustitución de los grupos amino superficiales es solo parcial. Así, el importante número de cargas positivas aún presente en la superficie del dendrímero lo conduciría a través de la endocitosis mediada por clatrina, tal como fue demostrado para el dendrímero G4 sin modificar, mientras que la reducción de sus cargas positivas dada por la sustitución de parte de las aminas primarias por los grupos folato induciría su internalización a través de la endocitosis mediada por caveola. Si bien han sido descritos diversos mecanismos de endocitosis para estas macromoléculas según el tipo celular, existe evidencia que permitiría afirmar que la ausencia y/o la disminución de las cargas positivas superficiales del dendrímero tiene como consecuencia que su internalización celular se produzca mediante endocitosis mediada por caveola (Perumal et al., 2008; Shen et al., 2014).

Por otra parte, es relevante mencionar que solo estas dos rutas endocíticas fueron evaluadas, debido a que son las más importantes y mayormente asociadas a la internalización de dendrímeros de acuerdo a estudios previos para otros modelos celulares (Albertazzi et al., 2010; Doherty and McMahon, 2009; Saovapakhiran et al., 2009). Sin embargo, la participación de otros mecanismos complementarios independientes de clatrina y caveola no puede ser descartada, por lo que nuevos estudios podrían estar enfocados a evaluar la participación de otras rutas de endocitosis alternativas en el proceso de internalización de dendrímeros PAMAM en neuronas.

Tráfico intracelular y liberación de la carga farmacológica

Dilucidar los mecanismos de internalización celular de estas moléculas, así como la posibilidad de modificar su ruta de ingreso, reviste gran interés dada la posibilidad de proyectar su uso como nanotransportadores de agentes terapéuticos de distinta naturaleza. El ingreso a la célula a través de diferentes rutas de endocitosis implica el tránsito de la molécula endocitada mediante diversas vías de tráfico intracelular y su interacción con distintos organelos (Khalil et al., 2006). Poco se sabe acerca de cómo es liberada finalmente la carga farmacológica una vez que alcanza el interior de la célula. A pesar de ello, es posible plantear algunas hipótesis al respecto. Una importante propiedad de los dendrímeros es que la conformación que adopta su estructura es modificada por cambios en las condiciones del medio en que se encuentran, tales como el pH, lo cual tiene una gran influencia en la liberación de la carga farmacológica transportada (Manchun et al., 2012). Teniendo esto en

consideración, el hecho de que los componentes vesiculares de la ruta clásica de tráfico intracelular, y particularmente los lisosomas, tengan un pH inferior al del resto de la célula y del medio extracelular, podría favorecer la liberación de moléculas pequeñas encapsuladas en las cavidades internas del dendrímero al generar cambios en la conformación de su estructura. Por otro lado, la actividad enzimática lisosomal podría actuar sobre los enlaces amida de la estructura del dendrímero, ya que estos corresponden a los mismos enlaces peptídicos de las proteínas, degradando así su estructura y permitiendo la liberación del cargo transportado. Además, esta actividad enzimática podría también escindir la unión de moléculas enlazadas de manera covalente a los grupos superficiales del dendrímero produciendo su liberación. Es así como el pH ácido y la actividad degradativa de los lisosomas podrían favorecer la entrega de fármacos, fundamentalmente del tipo molécula pequeña. Para que ello ocurra, estas drogas deberían contar con al menos dos propiedades importantes. La primera es que éstas no sean susceptibles a la degradación lisosomal y, en segundo lugar, que una vez liberadas del dendrímero puedan escapar también de los compartimentos vesiculares para alcanzar sus blancos moleculares.

Para el caso del transporte de moléculas como péptidos y ácidos nucleicos, susceptibles a la degradación enzimática, por el contrario, una de las principales preocupaciones es justamente evadir la maquinaria de degradación presente en la célula, lo cual se ha convertido en una importante limitante para la aplicación efectiva de este tipo de alternativas terapéuticas (Pérez-Martínez et al., 2011). En relación con este punto, ha sido planteada la teoría de la “esponja de protones”, la cual postula que la capacidad de actuar como tampón por parte de polímeros policationicos, como los dendrímeros, podría contrarrestar la acidez del lisosoma, previniendo la degradación de las moléculas transportadas e inclusive generar la lisis vesicular posibilitando su salida desde dichos compartimentos (Akinc et al., 2005; Sonawane et al., 2003). No obstante, esta teoría es ampliamente debatida y aun no existe evidencia concluyente al respecto. Un estudio realizado con dendrímeros de polietilimina, similares a los dendrímeros PAMAM, demuestra que estos polímeros no generan cambios en el pH del lisosoma cuestionando la existencia de este efecto (Benjaminsen et al., 2013), mientras que estudios más recientes, comparando distintas líneas celulares (HeLa, ARPE-19, H1299 y A549) y empleando estos mismos nanotransportadores, demuestran que el escape desde los endosomas mediado por el efecto de “esponja de protones” dependería del tamaño y la permeabilidad de las vesículas, lo cual varía entre las distintas células (Vermeulen et al., 2018). Estas nuevas evidencias sugieren por tanto que este fenómeno estaría más

favorecido en ciertos tipos celulares y explicaría la divergencia en las observaciones previamente reportadas.

Por otro lado, la posibilidad de modificar las rutas de endocitosis de estas macromoléculas evitando la degradación lisosomal también ha sido explorada. La funcionalización de la superficie del dendrímero con folato mostró conducir la internalización de un complejo formado entre dendrímero y gen de luciferasa a través de endocitosis mediada por caveola, mostrando una mayor eficiencia de transfección en células HeLa al ser comparada con dendrímeros modificados con transferrina que son internalizados a través de endocitosis mediada por clatrina. El estudio de colocalización con marcadores para endosomas tempranos y lisosomas muestra que existe una baja colocalización para el caso de los dendrímeros con folato, demostrando que su ingreso por la ruta mediada por caveola evade estos compartimentos y permite prevenir la degradación del cargo transportado (Gabrielson and Pack, 2009).

Conclusiones y proyecciones acerca de los estudios de internalización celular

Los resultados obtenidos demuestran que la modificación química de la superficie del dendrímero PAMAM genera cambios en sus propiedades de internalización celular en neuronas hipocampales, ya sea conduciéndolos a través de distintas rutas de endocitosis o bloqueando el proceso, en el cual las cargas positivas juegan un papel fundamental. Estos hallazgos abren la posibilidad de controlar el ingreso de estas moléculas en neuronas. Más aún, la posibilidad de direccionar estas nanopartículas a través de mecanismos mediados tanto por clatrina como por caveola permitiría contar con sistemas empleados para la entrega tanto de moléculas pequeñas como de biopolímeros con un alto grado de eficiencia escogiendo la ruta de internalización óptima en función del cargo transportado.

Futuros experimentos podrían complementar estos resultados llevando a cabo un estudio más detallado de las vías de tráfico intracelular y la asociación de estos nanotransportadores a determinados organelos una vez internalizados por las neuronas. Además, gran interés reviste la modificación de la superficie del dendrímero para su direccionamiento hacia regiones subcelulares de alta relevancia para la funcionalidad neuronal como son todas aquellas estructuras involucradas en la actividad sináptica.

Neurotoxicidad de dendrímeros PAMAM con distintas propiedades superficiales

El estudio de toxicidad en neuronas para los distintos dendrímeros evaluados demuestra la relación que existe entre las cargas positivas superficiales de estas macromoléculas y su efecto en la viabilidad celular. Como primera aproximación, fue posible evidenciar la citotoxicidad del dendrímero G4 sin modificaciones en su superficie, el cual reduce de manera significativa la viabilidad de las neuronas al ser aplicado a una concentración de 1 μM y disminuye dicho parámetro a valores comparables con el control de muerte celular al ser empleado a concentraciones mayores (**Fig. 14**). En cuanto a estudios previamente reportados en esta materia, ensayos de MTT realizados en células hipocampales inmortalizadas de ratón mHippo-18 muestran que el tratamiento con dendrímeros G4 sin modificaciones superficiales genera una reducción significativa de la viabilidad celular cuando este es aplicado a partir de una concentración igual a 40 μM (Janaszewska et al., 2013). Las diferencias en las concentraciones a las cuales se observa la reducción de la viabilidad podrían explicarse por la naturaleza de las células inmortalizadas, de las cuales es factible esperar una mayor resistencia a los efectos de agentes tóxicos comparadas con células de cultivo primario. Este hecho, por lo tanto, resalta las diferencias que pueden existir entre líneas celulares y cultivos primarios, y destaca a su vez la importancia de avanzar los estudios hacia modelos que sean lo más cercanos posible a las condiciones fisiológicas. Otros reportes, a través del estudio de la morfología celular y ensayos de apoptosis muestran que estos mismos dendrímeros inducen una disminución significativa de la viabilidad celular en cultivos primarios de neuronas corticales a concentraciones de 0,1 μM (Albertazzi et al., 2013). Estos resultados, por ende, sustentan el hecho de que existe una mayor susceptibilidad de las células de cultivo primario a la toxicidad de estas moléculas.

Por otra parte, los ensayos realizados en este trabajo de tesis con los dendrímeros modificados muestran que la sustitución del 25% de las aminas de la superficie, tanto con folato como con polietilenglicol, disminuye la citotoxicidad evidenciada con el dendrímero G4. Si se realiza la comparación entre los resultados obtenidos para ambos dendrímeros modificados, PFO₂₅ y PPEG₂₅, es posible apreciar que este último presenta una menor citotoxicidad (**Fig. 14**). Este resultado podría explicarse por la diferencia de tamaño existente entre ambas moléculas, ya que al ser el polietilenglicol una molécula de cadena más larga que el folato, reduce el efecto de la carga positiva superficial no solo por la sustitución de las aminas primarias, sino también por un apantallamiento de la densidad de carga generado por el plegamiento de su cadena sobre la superficie del dendrímero, tal como sugiere la simulación molecular de su conformación (Barraza et al., 2017).

Efectos en la permeabilidad de membrana

Dentro de los mecanismos subyacentes a los efectos tóxicos de estos polímeros, ha sido descrita la capacidad de dendrímeros y otras nanopartículas policatiónicas de desestabilizar la integridad de la membrana celular y generar poros en ella (Leroueil et al., 2008). Teniendo en consideración la relevancia que posee para la funcionalidad neuronal el paso selectivo y regulado de iones a través de la membrana plasmática, se realizaron ensayos electrofisiológicos a fin de determinar los efectos de los dendrímeros en estudio en la integridad de la membrana celular, obteniéndose interesantes resultados. Los registros de corrientes capacitativas muestran que el dendrímero G4 induce un aumento significativo de la permeabilidad de la membrana de las neuronas, mientras que no se observaron alteraciones significativas para el tratamiento con PFO₂₅ ni con PPEG₂₅ (**Fig. 15**). Dichos aumentos en la permeabilidad de la membrana son correlacionables con desestabilizaciones en su integridad en estas condiciones experimentales (Peters et al., 2013; Sepulveda et al., 2010). A su vez, cabe destacar que a la concentración utilizada para los registros de patch clamp, es decir, 1 μ M, no se observaron disminuciones significativas de la viabilidad celular con los dendrímeros funcionalizados, como sí ocurrió para el caso del tratamiento con G4 (**Fig. 14**). Estos resultados, por tanto, sustentan la idea de que los efectos inducidos por el dendrímero G4 en la membrana neuronal están relacionados con su citotoxicidad.

Estudios realizados con dendrímeros PAMAM G5 en neuronas piramidales muestran que estos inducen un aumento del influjo de corriente en la célula, y que, cuando los registros se llevan a cabo empleando dendrímeros de superficie completamente negativa, no se observan estas alteraciones. Más aún, estos estudios demuestran que los aumentos de corriente corresponderían particularmente a iones Na⁺ y los autores postulan la formación de poros específicos para este ion, aunque este mecanismo debe ser explorado en mayor detalle (Nyitrai et al., 2013a). En el caso de los dendrímeros utilizados en la presente tesis, es posible apreciar que la sustitución de tan solo el 25% de los grupos amino superficiales fue suficiente para prevenir el aumento de permeabilidad de membrana inducido por G4. Respecto al paso de determinados iones mediante mecanismos específicos, futuros estudios son necesarios para determinar este aspecto y explorar con mayor detalle tanto la formación de poros, así como su tamaño y selectividad. No obstante, en el presente estudio fue posible demostrar el aumento significativo en los niveles de Ca²⁺ intracelular inducido por parte del dendrímero G4 (**Fig. 16**), aunque el mecanismo específico por el cual esto ocurriría no

fue dilucidado y de momento solo es posible atribuirlo a un aumento general en la permeabilidad de membrana.

Por otro lado, es importante considerar la posibilidad de que estos compuestos interactúen con canales iónicos y otros elementos proteicos de la membrana celular. Un interesante estudio indaga en esta materia y demuestra que la interacción de los dendrímeros con componentes de la membrana plasmática puede derivar también en una disminución de su permeabilidad. Es así como este estudio indica que dendrímeros G2 y G3, pero no G5, son capaces de permear a través de poros de α -hemolisina y que la asociación de los dendrímeros al lumen del poro reduciría las corrientes iónicas en registros de electrofisiología (Martin et al., 2007). Tomando en conjunto los estudios previamente publicados y el aporte de los resultados de la presente tesis, es posible aseverar que los dendrímeros PAMAM poseen la capacidad de interactuar con los distintos componentes de la membrana celular modificando su permeabilidad, siendo los efectos particulares producidos dependientes del tamaño y las propiedades superficiales de estos polímeros.

Efectos en Ca^{2+} intracelular y actividad sináptica

En cuanto a la evaluación directamente relacionada con potenciales efectos en la actividad sináptica por parte de los dendrímeros en estudio, la influencia de las alteraciones en la permeabilidad de membrana sobre la dinámica de incrementos transitorios de Ca^{2+} intracelular fue evaluada considerando el rol clave de este ion en la sinapsis (Rizo and Xu, 2015). Tal como se mencionó anteriormente, los experimentos realizados demuestran que G4 induce aumentos significativos en los niveles de Ca^{2+} intracelular, los cuales estarían caracterizados por una completa interrupción del patrón normal de transitorias (**Fig. 16**). Estudios previos mostraron que dendrímeros PAMAM G5 incrementan de manera significativa el Ca^{2+} intracelular en neuronas de rebanadas de hipocampo de rata (Nyitrai et al., 2013b). Los resultados de la presente tesis demuestran que dendrímeros de una generación menor (G4) también son capaces de alterar los niveles fisiológicos de este ion en neuronas hipocámpales. Posteriormente, el análisis de la liberación de vesículas sinápticas demostró que este incremento en el Ca^{2+} intracelular tiene como consecuencia un aumento en la liberación de dichas vesículas (**Fig. 17**), con el consiguiente incremento de la frecuencia de los eventos sinápticos, tal como fue posible observar a través de los registros de patch-clamp (**Fig. 18**). Variaciones en la frecuencia de la actividad sináptica son usualmente atribuidas a fenómenos que

ocurrirían a nivel presináptico, mientras que, por el contrario, variaciones en la amplitud de los eventos sinápticos se asocian con efectos a nivel postsináptico. Según lo observado en los registros electrofisiológicos, al existir alteraciones significativas en la frecuencia y no en la amplitud de los eventos sinápticos, es posible inferir que los dendrímeros G4 estarían afectando la actividad sináptica a nivel presináptico. Sin embargo, si se considera que la interacción de los dendrímeros con la membrana celular sería a través de sus cargas y de manera más bien inespecífica con los componentes lipídicos de esta (Keszthelyi et al., 2015; Leroueil et al., 2008), estas macromoléculas también interaccionarían con la membrana postsináptica, por lo que también sería esperable ver posibles efectos a este nivel. Por lo tanto, futuros experimentos que estudien los efectos de los dendrímeros PAMAM G4 a distintas concentraciones y tiempos de tratamiento podrían demostrar esta posibilidad.

Por otro lado, los ensayos realizados con los dendrímeros funcionalizados con folato y polietilenglicol muestran que estos no produjeron cambios significativos en el Ca^{2+} intracelular ni en la actividad sináptica normal de las neuronas hipocampales (**Figs. 16, 17 y 18**). Dichos resultados serían concordantes con lo observado en los estudios de citotoxicidad y de permeabilidad de membrana, donde tampoco se apreciaron alteraciones significativas.

Estos resultados, en resumen, evidencian que la superficie de carga completamente positiva del dendrímero PAMAM G4 induce una mayor excitabilidad presináptica de las neuronas hipocampales alterando su transmisión sináptica normal, producto del aumento de los niveles de Ca^{2+} intracelular generado a partir del incremento de la permeabilidad de la membrana plasmática, y que, por otro lado, la sustitución del 25% de las cargas superficiales con moléculas como folato y polietilenglicol es capaz de prevenir estos efectos.

Conclusiones y proyecciones acerca de los estudios de neurotoxicidad

El estudio de la toxicidad y los efectos electrofisiológicos de dendrímeros PAMAM con distintas propiedades superficiales muestra que dendrímeros de superficie completamente positiva generan una importante neurotoxicidad y alteran la actividad sináptica normal de neuronas hipocampales, mientras que, por otra parte, demuestran también que funcionalizaciones que reducen su carga positiva superficial son capaces de prevenir dichos efectos y abren la posibilidad de generar nanotransportadores de mayor biocompatibilidad para su uso seguro en aplicaciones

neurofarmacológicas. En especial, revisten particular interés los resultados obtenidos para el dendrímero modificado con folato, ya que de esta molécula no había sido reportada previamente su capacidad de contribuir en la disminución de la citotoxicidad de los dendrímeros PAMAM.

Respecto de futuros experimentos que complementen y/o indaguen con mayor profundidad en los resultados obtenidos, nuevos ensayos son necesarios para determinar con mayor precisión los mecanismos detrás de los aumentos de permeabilidad de membrana y alteraciones en la actividad sináptica observados. Un estudio acabado de la formación de poros y la interacción con la bicapa lipídica de la membrana por parte de los dendrímeros, así como explorar la posibilidad de su interacción con canales iónicos y otro tipo de proteínas que indiquen la participación de mecanismos moleculares específicos en los fenómenos observados, permitirían un mejor entendimiento de su neurotoxicidad y de cómo prevenirla. Por otra parte, sería de gran interés determinar la potencial generación de estrés oxidativo y activación de apoptosis en la muerte celular observada producto de los aumentos de Ca^{2+} intracelular, ya que estos mecanismos han sido descritos para otros modelos celulares y su estudio ayudaría a tener una comprensión global de los distintos efectos neurotóxicos de estas moléculas.

Biodistribución de dendrímeros PAMAM y su direccionamiento a distintas estructuras del SNC

La biodistribución y biodisponibilidad de los dendrímeros PAMAM son aspectos clave a la hora de evaluar su capacidad de ser empleados como plataformas químicas para la entrega de agentes terapéuticos en el organismo. Diversos reportes han demostrado que al igual que la gran mayoría de fármacos y sustancias exógenas en general, los dendrímeros se distribuyen principalmente a órganos como el hígado y el riñón (Lesniak et al., 2013; Malik et al., 2000; Roberts et al., 1996). A su vez, ha sido descrito que estas nanopartículas presentan una rápida eliminación del organismo, la cual puede ser retardada con la adición de moléculas que aumenten su tamaño, como por ejemplo, cadenas de polietilenglicol (Kojima et al., 2010; Liu et al., 2014). En cuanto a la localización de dendrímeros PAMAM en el SNC luego de su administración, diferentes estudios en modelos animales demuestran que esta es más bien baja, y a pesar de que en ciertas condiciones patológicas podría verse más favorecida, en general, las barreras biológicas presentes dificultan su acceso a este tejido (del Burgo et al., 2014; Lesniak et al., 2013; Xu et al., 2014). Es por ello que, la funcionalización de dendrímeros y de sistemas nanotransportadores de diverso tipo con ligandos que permitan

direccionarlos de manera selectiva hacia el SNC, favoreciendo su localización en dicho tejido y confiriéndoles además la capacidad de atravesar las barreras presentes a fin de alcanzar las células del parénquima, constituye un importante área de estudio aún abierta para las aplicaciones neurofarmacológicas de estas macromoléculas (del Burgo et al., 2014; Soni et al., 2016; Xu et al., 2014).

En el presente estudio, se exploró el efecto de la funcionalización de dendrímeros PAMAM G4 con folato en su asociación con estructuras del SNC, considerando que esta molécula es transportada a través de los plexos coroideos hacia el parénquima nervioso por el receptor FolR α (Grapp et al., 2013). Los resultados muestran que, contrario a lo que se podría haber esperado, en términos cualitativos existe una mayor presencia del dendrímero G4 sin modificaciones superficiales en los diferentes cortes de estructuras nerviosas, comparado con el dendrímero PFO₄₀, para el cual incluso no se observó su presencia en los cortes realizados en hipocampo (**Figs. 21, 22, 23 y 24**). A pesar de ello, destaca el hecho de que ambos dendrímeros presentan una importante marca asociada a los plexos coroideos, estructura de particular interés en este análisis (**Fig. 21**). Por otro lado, la distribución de la marca fluorescente observada sobre todo para el dendrímero G4 sugiere su presencia en los capilares sanguíneos del hipocampo, corteza y cerebelo (**Figs. 22, 23 y 24**). Sin embargo, cabe mencionar que la ausencia de marcadores específicos que permitan diferenciar los distintos tipos celulares presentes en los cortes de tejido estudiados impide determinar de manera certera si estas nanopartículas atraviesan hacia el parénquima o solo se mantienen interaccionado con estructuras vasculares. No obstante, muchas de las imágenes parecen mostrar que los dendrímeros han sido internalizados por las células a cuyos núcleos se ve asociada su marca, por lo que, aunque estas correspondan a células endoteliales y no parenquimales, existe la posibilidad de que se genere su transporte mediante transcitosis, fenómeno que también debe ser estudiado con mayor detalle. Por otro lado, destacan las imágenes de los cortes de plexos coroideos para el dendrímero PFO₄₀ a las 4 h post inyección, en donde se aprecia una marca más diseminada y que, además, rodea núcleos celulares cuyo tamaño sugiere que corresponden a células que no serían endoteliales, abriendo la posibilidad de que PFO₄₀ efectivamente se asocie a células coroideas (**Fig. 21**). Llama la atención, a su vez, la ausencia de marca de dendrímero en zonas de esta región carentes de barrera hematoencefálica como el órgano subfornical, donde es de esperar que exista una mayor permeabilidad de sustancias (Miyata, 2015). Todas estas aproximaciones deben ser estudiadas con mayor detalle en futuros experimentos con técnicas que permitan determinar con qué células y en qué región subcelular se asocian los dendrímeros de interés. Además, es necesario

un mayor número de repeticiones que den significancia estadística a las evidencias encontradas, así como un análisis cinético más detallado.

A pesar de que aún sean necesarios nuevos experimentos para dar respuesta con mayor precisión a las preguntas abiertas en cuanto a la distribución en el SNC de los dendrímeros de interés, es importante destacar que este trabajo pone de manifiesto la potencialidad de utilizar los mecanismos de transporte presentes en los plexos coroideos para alcanzar el parénquima nervioso, debido a la gran presencia evidenciada de las nanopartículas en estudio en dicha región. Si bien existen algunos reportes previos que muestran la presencia de dendrímeros en esta zona cerebral, el foco de estos trabajos no está centrado en plexos coroideos y dicha estructura no ha sido considerada hasta la fecha como una ruta de ingreso al SNC para este tipo de nanopartículas. Además, en estas investigaciones fueron utilizados dendrímeros con otro tipo de modificaciones superficiales y modelos animales patológicos, donde la permeabilidad de las barreras biológicas se encuentra alterada (Nance et al., 2015; Pereira et al., 2011), por lo que estos serían los primeros hallazgos directamente orientados en tal sentido.

Biodistribución de dendrímeros PAMAM en el resto del organismo

En términos de la biodistribución en el resto del organismo, en primer lugar, se demuestra cualitativamente que la localización de los dendrímeros estudiados es mucho mayor en órganos como hígado y riñón en comparación al SNC, lo cual se correlaciona con estudios previos y reafirma la complejidad de alcanzar de manera preferente este tejido por sobre otros órganos especializados en el transporte y metabolización de sustancias (Lesniak et al., 2013; Malik et al., 2000; Roberts et al., 1996). Por otra parte, si bien el foco de esta investigación se centró en el SNC, los resultados en estos órganos también plantean interesantes aspectos en sí mismos.

Los resultados en hígado sugieren que ambos dendrímeros, G4 y PFO₄₀ alcanzan los hepatocitos, en donde estas nanopartículas podrían ser metabolizadas (**Fig. 25**). Se evidencia, además, su rápida desaparición de este tejido, lo cual podría sustentar la idea de que estas moléculas son degradadas y/o eliminadas en el hígado. Estudios con dendrímeros G5 en modelo celular de co-cultivo de hepatocitos y células de Kupffer muestran efectos citotóxicos que derivan en la activación de las células de Kupffer y la inducción de un incremento de los niveles de Ca²⁺ intracelular en hepatocitos, ambos fenómenos asociados al daño hepático inducido por drogas (DILI, por sus siglas en inglés)

(Jemnitz et al., 2016). Considerando estos resultados y las observaciones de la presente tesis en cuanto a la biodistribución de dendrímeros PAMAM a nivel hepático, surge como una interesante proyección el estudio de estos efectos tóxicos *in vivo* y de la relación existente entre las respuestas celulares observadas y la localización de los dendrímeros en determinadas células y regiones subcelulares. Por otra parte, son también de interés los efectos observados para el Ca^{2+} intracelular teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la presente tesis, donde también se demostró la inducción de aumentos significativos de este ion a nivel neuronal. Indagar con mayor detalle en los mecanismos subyacentes a estos fenómenos en ambos modelos celulares permitiría demostrar si su origen radica en interacciones inespecíficas por parte de los dendrímeros con las células o si estos se asocian a interacciones con componentes específicos que pueden variar según el tipo celular. Además, será importante determinar el efecto de la funcionalización con folato en todas estas observaciones.

En el caso del riñón, se evidenció una intensa marca para ambos dendrímeros asociada a las distintas estructuras de este órgano y cuya notoria disminución en el tiempo sugiere su rápida eliminación del organismo por la vía urinaria, si se correlacionan estas observaciones con reportes previos (**Fig. 26**) (Malik et al., 2000). Futuros experimentos que complementen estos resultados debieran enfocarse en medir la presencia de los dendrímeros administrados en orina, con el fin de determinar si efectivamente estos son eliminados por dicha vía y para estudiar con mayor detalle la cinética del proceso. Estudios previos *in vivo*, han demostrado que los dendrímeros PAMAM modulan la vía de señalización de MAP quinasas a nivel renal, lo cual podría estar relacionado a las evidencias *in vitro* de activación de estrés oxidativo y que tendría distintos efectos dependiendo de si se trata de riñones sanos o de animales con alguna patología crónica asociada a insuficiencia renal como la diabetes (Akhtar et al., 2016). Al igual que para los estudios en hígado, será de gran interés explorar estos hallazgos con mayor detalle, asociándolos a la evidencia de la distribución renal de los dendrímeros y determinar el efecto de la funcionalización con folato en ellos.

La medición de los niveles sanguíneos de los dendrímeros también indica que existiría una rápida eliminación del organismos de estas moléculas. Sin embargo, llama la atención el aumento de concentración plasmática que se produce a 1 h post inyección para el dendrímero G4, el cual podría deberse a una primera y rápida asociación de estas nanopartículas a tejidos producto de su gran número de cargas positivas, para luego ser liberadas al torrente sanguíneo por mecanismos que futuros experimentos debieran explorar (**Fig. 27**).

Conclusiones y proyecciones acerca de los estudios de biodistribución

Más allá del carácter exploratorio con que ha sido abordado este último objetivo, tomando en conjunto los distintos resultados, es posible obtener algunas conclusiones que orienten futuros experimentos. Como observación general de la biodistribución, queda demostrado el corto tiempo de vida media que tienen en el organismo tanto los dendrímeros G4 como PFO₄₀, por lo que nuevos sistemas debieran ser generados adicionando moléculas que aumenten su tamaño, como por ejemplo, polietilenglicol y así, aumentar su retención en circulación (Kojima et al., 2010; Liu et al., 2014).

Por otro lado, la comparación de la presencia de los dendrímeros estudiados en los distintos órganos muestra que, independiente de la funcionalización con folato, la distribución hacia el SNC se encuentra poco favorecida. En general, a pesar de las distintas modificaciones que se han realizado a los dendrímeros, incluso con moléculas que directamente buscan dirigirlos al SNC, la evidencia demuestra que su principal acumulación se produce en órganos como hígado y riñón (Gao et al., 2015; Huang et al., 2011; Liu et al., 2012; Salimi et al., 2018). Es importante destacar que la mayoría de drogas y sustancias exógenas se dirigen indistintamente a estos órganos especializados en el procesamiento y eliminación de moléculas, y que, a su vez, es difícil encontrar un receptor que esté expresado de manera exclusiva en la vasculatura del SNC, ya que el organismo necesita transportar nutrientes a largo de toda su extensión, y más aún, órganos como hígado y riñón presentan una alta capacidad de transporte de múltiples sustancias para poder cumplir sus funciones. Es así como los receptores comúnmente empleados para el direccionamiento de nanotransportadores al SNC no sólo se encuentran expresados en dicho tejido, sino que también en distintos epitelios, en hígado y en riñón, tal como ocurre para el caso del receptor de transferrina, receptor LRP1 y el propio receptor de folato (Actis Dato and Chiabrand, 2018; Tortorella and Karagiannis, 2014; Zhao et al., 2011).

Considerando estos antecedentes, probablemente la investigación en el transporte de fármacos hacia el SNC debiese estar enfocada en explorar las diversas rutas de acceso y la comprobación de la llegada de los nanotransportadores al parénquima nervioso, más que en maximizar el direccionamiento de moléculas hacia este tejido en comparación con otros. Visto desde otro punto de vista, la búsqueda de moléculas que se expresen de manera altamente específica en el SNC, y en

general, en cualquier tejido de interés terapéutico, sigue siendo un importante desafío para la farmacología y las aplicaciones nanotecnológicas en este campo. Más aún, estudios recientes han puesto su centro de atención en la distribución diferencial entre los distintos tipos celulares existentes en el tejido nervioso (Alnasser et al., 2018; Zhang et al., 2016), lo cual adquiere gran relevancia considerando la complejidad del SNC en cuanto a su diversificación de funciones a nivel anatómico, celular y subcelular.

Finalmente, existen otros factores que pueden influir drásticamente en las propiedades de biodistribución de las nanopartículas en el organismo y que debieran ser considerados en futuros proyectos, a fin de tener una comprensión más cabal de este proceso y de los obstáculos que podrían dificultar la llegada de los dendrímeros de interés al SNC. Por ejemplo, ha sido descrito que la agregación de dendrímeros de carga positiva es crítica para su capacidad de atravesar barreras biológicas como la BHE, por lo que reducir los niveles de agregación de estas nanopartículas será clave para optimizar su acceso a este tejido (Kurokawa et al., 2017). Otro aspecto de gran relevancia es la formación de la llamada corona proteica, la cual corresponde a las diversas proteínas que se encuentran en circulación y que se asocian a la nanopartícula pudiendo generar importantes cambios en sus propiedades superficiales (Ge et al., 2015). Estudios recientes muestran que esta corona proteica va sufriendo modificaciones a medida que atraviesa por modelos *in vitro* de BHE, siendo difícil determinar la composición de la partícula que finalmente tiene contacto con el tejido nervioso en sus distintos niveles (Cox et al., 2018).

VII. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la presente tesis permiten concluir que:

1. Las propiedades superficiales de los dendrímeros PAMAM juegan un rol clave en su interacción con neuronas.
2. Modificaciones en la superficie del dendrímero PAMAM producen cambios en sus propiedades de internalización celular en neuronas, ya sea conduciéndolos por distintas rutas de endocitosis o bloqueando el proceso.
3. Dendrímeros PAMAM de superficie completamente positiva inducen efectos neurotóxicos que derivan finalmente en un aumento de la frecuencia de la actividad sináptica espontánea. Dendrímeros funcionalizaciones con folato y polietilenglicol en un 25% de su superficie no presentan estos efectos.
4. A pesar de que el cerebro no es uno de los órganos de mayor acumulación de los dendrímeros PAMAM, existe una importante localización de ellos en la región de los plexos coroideos, abriendo la posibilidad de direccionarlos a componentes moleculares que medien mecanismos de transporte en esta región, con el fin de alcanzar el parénquima nervioso.

VIII. REFERENCIAS

- Abbott, N.J., Rönnbäck, L., and Hansson, E. (2006). Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* *7*, 41–53.
- Actis Dato, V., and Chiabrando, G. (2018). The Role of Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 in Lipid Metabolism, Glucose Homeostasis and Inflammation. *Int. J. Mol. Sci.* *19*, 1780.
- Aguayo, L.G., and Pancetti, F.C. (1994). Ethanol modulation of the gamma-aminobutyric acidA- and glycine-activated Cl⁻ current in cultured mouse neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *270*, 61–69.
- Akhtar, S., Al-Zaid, B., El-Hashim, A.Z., Chandrasekhar, B., Attur, S., and Benter, I.F. (2016). Impact of PAMAM delivery systems on signal transduction pathways in vivo: Modulation of ERK1/2 and p38 MAP kinase signaling in the normal and diabetic kidney. *Int. J. Pharm.* *514*, 353–363.
- Akinc, A., Thomas, M., Klivanov, A.M., and Langer, R. (2005). Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis. *J. Gene Med.* *7*, 657–663.
- Albertazzi, L., Serresi, M., Albanese, A., and Beltram, F. (2010). Dendrimer internalization and intracellular trafficking in living cells. *Mol. Pharm.* *7*, 680–688.
- Albertazzi, L., Fernandez-Villamarin, M., Riguera, R., and Fernandez-Megia, E. (2012). Peripheral functionalization of dendrimers regulates internalization and intracellular trafficking in living cells. *Bioconjug. Chem.* *23*, 1059–1068.
- Albertazzi, L., Gherardini, L., Brondi, M., Sato, S.S., Bifone, A., Pizzorusso, T., Ratto, G.M., and Bardi, G. (2013). In Vivo Distribution and Toxicity of PAMAM Dendrimers in the Central Nervous System Depend on Their Surface Chemistry. *Mol. Pharm.* *10*, 249–260.
- Alexis, F., Pridgen, E., Molnar, L.K., and Farokhzad, O.C. (2008). reviews Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of. *Mol. Pharm.* *5*, 505–515.
- Alnasser, Y., Kambhampati, S.P., Nance, E., Rajbhandari, L., Shrestha, S., Venkatesan, A., Kannan, R.M., and Kannan, S. (2018). Preferential and Increased Uptake of Hydroxyl-Terminated PAMAM Dendrimers by Activated Microglia in Rabbit Brain Mixed Glial Culture. *Molecules* *23*.
- Barraza, L.F., Jiménez, V.A., and Alderete, J.B. (2017). Association of Methotrexate with Native and PEGylated PAMAM-G4 Dendrimers : Effect of the PEGylation Degree on the Drug-Loading Capacity and Preferential Binding Sites. *121*, 4–12.
- Benchaala, I., Mishra, M.K., Wykes, S.M., Hali, M., Kannan, R.M., and Whittum-Hudson, J.A. (2014). Folate-functionalized dendrimers for targeting Chlamydia-infected tissues in a mouse model of reactive arthritis. *Int. J. Pharm.* *466*, 258–265.
- Benjaminsen, R. V, Matthebjerg, M.A., Henriksen, J.R., Moein Moghimi, S., and Andresen, T.L. (2013). The Possible “Proton Sponge” Effect of Polyethylenimine (PEI) Does Not Include Change in Lysosomal pH. *Mol. Ther.* *21*, 149–157.
- del Burgo, L.S., Hernández, R.M., Orive, G., and Pedraz, J.L. (2014). Nanotherapeutic approaches for brain cancer management. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* *10*, 905–919.
- Cheng, C.J., Tietjen, G.T., Saucier-Sawyer, J.K., and Saltzman, W.M. (2015). A holistic approach to

targeting disease with polymeric nanoparticles. *Nat. Rev. Drug Discov.* *14*, 239–247.

Choi, Y., Thomas, T., Kotlyar, A., Islam, M.T., and Baker, J.R. (2005). Synthesis and functional evaluation of DNA-assembled polyamidoamine dendrimer clusters for cancer cell-specific targeting. *Chem. Biol.* *12*, 35–43.

Ciolkowski, M., Petersen, J.F., Ficker, M., Janaszewska, A., Christensen, J.B., Klajnert, B., and Bryszewska, M. (2012). Surface modification of PAMAM dendrimer improves its biocompatibility. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* *8*, 815–817.

Cox, A., Andreozzi, P., Dal Magro, R., Fiordaliso, F., Corbelli, A., Talamini, L., Chinello, C., RAIMONDO, F., Magni, F., Tringali, M., et al. (2018). Evolution of Nanoparticle Protein Corona Across the Blood-Brain Barrier. *ACS Nano* acsnano.8b03500.

Doherty, G.J., and McMahon, H.T. (2009). Mechanisms of endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* *78*, 857–902.

Duncan, R., and Izzo, L. (2005). Dendrimer biocompatibility and toxicity. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *57*, 2215–2237.

Edwards, I.R., and Aronson, J.K. (2000). Adverse drug reactions Adverse drug reactions : definitions , diagnosis , and management. *Lancet* *356*, 1255–1259.

Gabrielson, N.P., and Pack, D.W. (2009). Efficient polyethylenimine-mediated gene delivery proceeds via a caveolar pathway in HeLa cells. *J. Control. Release* *136*, 54–61.

Gaffield, M. a, and Betz, W.J. (2006). Imaging synaptic vesicle exocytosis and endocytosis with FM dyes. *Nat. Protoc.* *1*, 2916–2921.

Gao, S., Li, J., Jiang, C., Hong, B., and Hao, B. (2015). Plasmid pORF-hTRAIL targeting to glioma using transferrin-modified polyamidoamine dendrimer. *Drug Des. Devel. Ther.* *10*, 1–11.

Gao, X., Qian, J., Zheng, S., Xiong, Y., Man, J., Cao, B., Wang, L., Ju, S., and Li, C. (2013). Up-regulating blood brain barrier permeability of nanoparticles via multivalent effect. *Pharm. Res.* *30*, 2538–2548.

Ge, C., Tian, J., Zhao, Y., Chen, C., Zhou, R., and Chai, Z. (2015). Towards understanding of nanoparticle–protein corona. *Arch. Toxicol.* *89*, 519–539.

Grapp, M., Wrede, A., Schweizer, M., Hüwel, S., Galla, H.J., Snaidero, N., Simons, M., Bückers, J., Low, P.S., Urlaub, H., et al. (2013). Choroid plexus transcytosis and exosome shuttling deliver folate into brain parenchyma. *Nat Commun* *4*, 2123.

Gribkoff, V.K., and Kaczmarek, L.K. (2017). The Need for New Approaches in CNS Drug Discovery: Why Drugs Have Failed, and What Can Be Done to Improve Outcomes. *Neuropharmacology* *120*, 11–19.

Griffin, C.E., Kaye, A.M., Bueno, F.R., and Kaye, A.D. (2013). Benzodiazepine pharmacology and central nervous system-mediated effects. *Ochsner J.* *13*, 214–223.

Grupke, S., Hall, J., Dobbs, M., Bix, G.J., and Fraser, J.F. (2015). Understanding history, and not repeating it. Neuroprotection for acute ischemic stroke: From review to preview. *Clin. Neurol. Neurosurg.* *129*, 1–9.

- Guo, M., Que, C., Wang, C., Liu, X., Yan, H., and Liu, K. (2011). Multifunctional superparamagnetic nanocarriers with folate-mediated and pH-responsive targeting properties for anticancer drug delivery. *Biomaterials* 32, 185–194.
- Hong, S., Bielinska, A.U., Mecke, A., Keszler, B., Beals, J.L., Shi, X., Balogh, L., Orr, B.G., Baker, J.R., and Banaszak Holl, M.M. (2004). Interaction of poly(amidoamine) dendrimers with supported lipid bilayers and cells: Hole formation and the relation to transport. *Bioconjug. Chem.* 15, 774–782.
- Huang, R., Ke, W., Han, L., Li, J., Liu, S., and Jiang, C. (2011). Targeted delivery of chlorotoxin-modified DNA-loaded nanoparticles to glioma via intravenous administration. *Biomaterials* 32, 2399–2406.
- Huang, R., Ma, H., Guo, Y., Liu, S., Kuang, Y., Shao, K., Li, J., Liu, Y., Han, L., Huang, S., et al. (2013). Angiopep-conjugated nanoparticles for targeted long-term gene therapy of parkinson's disease. *Pharm. Res.* 30, 2549–2559.
- Huth, U.S., Schubert, R., and Peschka-Süss, R. (2006). Investigating the uptake and intracellular fate of pH-sensitive liposomes by flow cytometry and spectral bio-imaging. *J. Control. Release* 110, 490–504.
- Jain, K., Kesharwani, P., Gupta, U., and Jain, N.K. (2010). Dendrimer toxicity : Let's meet the challenge. 394, 122–142.
- Janaszewska, A., Ciolkowski, M., Wróbel, D., Petersen, J.F., Ficker, M., Christensen, J.B., Bryszewska, M., and Klajnert, B. (2013). Modified PAMAM dendrimer with 4-carbomethoxypyrrolidone surface groups reveals negligible toxicity against three rodent cell-lines. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 9, 461–464.
- Jemnitz, K., Bártai-Konczos, A., Szabó, M., Iojă, E., Kolacsek, O., Orbán, T.I., Török, G., Homolya, L., Kovács, E., Jablonkai, I., et al. (2016). A transgenic rat hepatocyte - Kupffer cell co-culture model for evaluation of direct and macrophage-related effect of poly(amidoamine) dendrimers. *Toxicol. Vitr.* 38, 159–169.
- Jevprasesphant, R., Penny, J., Jalal, R., Attwood, D., Mckeown, N.B., and Emanuele, A.D. (2003). The influence of surface modification on the cytotoxicity of PAMAM dendrimers. 252, 263–266.
- Jhaveri, A., and Torchilin, V. (2016). Intracellular delivery of nanocarriers and targeting to subcellular organelles. *Expert Opin. Drug Deliv.* 13, 49–70.
- Kannan, R.M., Nance, E., Kannan, S., and Tomalia, D.A. (2014). Emerging concepts in dendrimer-based nanomedicine: From design principles to clinical applications. *J. Intern. Med.* 276, 579–617.
- Kannan, S., Dai, H., Navath, R.S., Balakrishnan, B., Jyoti, a., Janisse, J., Romero, R., and Kannan, R.M. (2012). Dendrimer-Based Postnatal Therapy for Neuroinflammation and Cerebral Palsy in a Rabbit Model. *Sci. Transl. Med.* 4, 130ra46-130ra46.
- Ke, W., Shao, K., Huang, R., Han, L., Liu, Y., Li, J., Kuang, Y., Ye, L., Lou, J., and Jiang, C. (2009). Gene delivery targeted to the brain using an Angiopep-conjugated polyethyleneglycol-modified polyamidoamine dendrimer. *Biomaterials* 30, 6976–6985.
- Kerr, M., and Teasdale, R.D. (2014). Live imaging of endosome dynamics. *Semin. Cell Dev. Biol.* 31, 11–19.
- Kesharwani, P., Jain, K., and Jain, N.K. (2014). Dendrimer as nanocarrier for drug delivery. *Prog.*

Polym. Sci. 39, 268–307.

Kesharwani, P., Tekade, R.K., and Jain, N.K. (2015). Generation dependent safety and efficacy of folic acid conjugated dendrimer based anticancer drug formulations. *Pharm. Res.* 32, 1438–1450.

Keszthelyi, T., Holló, G., Nyitrai, G., Kardos, J., and Héja, L. (2015). Bilayer Charge Reversal and Modification of Lipid Organization by Dendrimers as Observed by Sum-Frequency Vibrational Spectroscopy. *Langmuir* 31, 7815–7825.

Khalil, I. a, Kogure, K., Akita, H., and Harashima, H. (2006). Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery. *Pharmacol. Rev.* 58, 32–45.

Kiss, A.L., and Botos, E. (2009). Endocytosis via caveolae: Alternative pathway with distinct cellular compartments to avoid lysosomal degradation? *J. Cell. Mol. Med.* 13, 1228–1237.

Kojima, C., Kono, K., Maruyama, K., and Takagishi, T. (2000). Synthesis of polyamidoamine dendrimers having poly(ethylene glycol) grafts and their ability to encapsulate anticancer drugs. *Bioconjug. Chem.* 11, 910–917.

Kojima, C., Regino, C., Umeda, Y., Kobayashi, H., and Kono, K. (2010). Influence of dendrimer generation and polyethylene glycol length on the biodistribution of PEGylated dendrimers. *Int. J. Pharm.* 383, 293–296.

Kolhatkar, R.B., Kitchens, K.M., Swaan, P.W., and Ghandehari, H. (2007). Surface acetylation of polyamidoamine (PAMAM) dendrimers decreases cytotoxicity while maintaining membrane permeability. *Bioconjug. Chem.* 18, 2054–2060.

Kolhe, P., Misra, E., Kannan, R.M., Kannan, S., and Lieh-Lai, M. (2003). Drug complexation, in vitro release and cellular entry of dendrimers and hyperbranched polymers. *Int. J. Pharm.* 259, 143–160.

Kuang, Y., An, S., Guo, Y., Huang, S., Shao, K., Liu, Y., Li, J., Ma, H., and Jiang, C. (2013). T7 peptide-functionalized nanoparticles utilizing RNA interference for glioma dual targeting. *Int. J. Pharm.* 454, 11–20.

Kumari, S., Mg, S., and Mayor, S. (2010). Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell. *Cell Res.* 20, 256–275.

Kurokawa, Y., Sone, H., Win-Shwe, T.T., Zeng, Y., Kimura, H., Koyama, Y., Yagi, Y., Matsui, Y., Yamazaki, M., and Hirano, S. (2017). Aggregation is a critical cause of poor transfer into the brain tissue of intravenously administered cationic PAMAM dendrimer nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* 12, 3967–3975.

Lee, C.C., MacKay, J. a, Fréchet, J.M.J., and Szoka, F.C. (2005). Designing dendrimers for biological applications. *Nat. Biotechnol.* 23, 1517–1526.

Leroueil, P.R., Berry, S.A., Duthie, K., Han, G., Vincent, M., Mcnerny, D.Q., Baker, J.R., Orr, B.G., and Banaszak, M.M. (2008). A Wide Variety of Cationic Nanoparticles Induce Defects in Supported Lipid Bilayers. *Nano Lett.* 8, 420–424.

Lesniak, W.G., Mishra, M.K., Jyoti, A., Balakrishnan, B., Zhang, F., Nance, E., Romero, R., Kannan, S., and Kannan, R.M. (2013). Biodistribution of Fluorescently Labeled PAMAM Dendrimers in Neonatal Rabbits: Effect of Neuroinflammation. *Mol. Pharm.*

- Liu, D., Yang, F., Xiong, F., and Gu, N. (2016). The smart drug delivery system and its clinical potential. *Theranostics* 6, 1306–1323.
- Liu, J., Chu, L., Tong, L., Gao, H., Yang, C., Wang, D., Shi, L., Kong, D., and Li, Z. (2014). Synthesis, biodistribution, and imaging of PEGylated-acetylated polyamidoamine dendrimers. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 14, 3305–3312.
- Liu, S., Guo, Y., Huang, R., Li, J., Huang, S., Kuang, Y., Han, L., and Jiang, C. (2012). Gene and doxorubicin co-delivery system for targeting therapy of glioma. *Biomaterials* 33, 4907–4916.
- Lun, M.P., Monuki, E.S., and Lehtinen, M.K. (2015). Development and functions of the choroid plexus–cerebrospinal fluid system. *Nat. Rev. Neurosci.* 16, 445–457.
- Luong, D., Kesharwani, P., Deshmukh, R., Mohd Amin, M.C.I., Gupta, U., Greish, K., and Iyer, A.K. (2016). PEGylated PAMAM dendrimers: Enhancing efficacy and mitigating toxicity for effective anticancer drug and gene delivery. *Acta Biomater.* 43, 14–29.
- Malik, N., Wiwattanapatapee, M.R., Klopsch, R., Lorenz, K., Frey, H., Weener, J.W., Meijer, E.W., Paulus, W., and Duncan, R. (2000). Dendrimers: Relationship between structure and biocompatibility in vitro, and preliminary studies on the biodistribution of 125I-labelled polyamidoamine dendrimers in vivo. *J. Control. Release* 65, 133–148.
- Manchun, S., Dass, C.R., and Sriamornsak, P. (2012). Targeted therapy for cancer using pH-responsive nanocarrier systems. *Life Sci.* 90, 381–387.
- Martin, H., Kinns, H., Mitchell, N., Astier, Y., Madathil, R., and Howorka, S. (2007). Nanoscale Protein Pores Modified with PAMAM Dendrimers. 9640–9649.
- McMahon, H.T., and Boucrot, E. (2011). Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 517–533.
- Menjoge, A.R., Kannan, R.M., and Tomalia, D.A. (2010). Dendrimer-based drug and imaging conjugates: design considerations for nanomedical applications. *Drug Discov. Today* 15, 171–185.
- Miller, R. (2009). Mechanisms of action of antipsychotic drugs of different classes, refractoriness to therapeutic effects of classical neuroleptics, and individual variation in sensitivity to their actions: Part I. *Curr. Neuropharmacol.* 7, 302–314.
- Miyashiro, K.Y., Bell, T.J., Sul, J.Y., and Eberwine, J. (2009). Subcellular neuropharmacology: the importance of intracellular targeting. *Trends Pharmacol. Sci.* 30, 203–211.
- Miyata, S. (2015). New aspects in fenestrated capillary and tissue dynamics in the sensory circumventricular organs of adult brains. *Front. Neurosci.* 9, 1–15.
- Moghimi, S.M., Hunter, A.C., and Andresen, T.L. (2012). Factors Controlling Nanoparticle Pharmacokinetics: An Integrated Analysis and Perspective. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 52, 481–503.
- Mukherjee, S.P., and Byrne, H.J. (2013). Polyamidoamine dendrimer nanoparticle cytotoxicity, oxidative stress, caspase activation and inflammatory response: experimental observation and numerical simulation. *J. Control. Release* 9, 202–211.
- Nance, E., Porambo, M., Zhang, F., Mishra, M.K., Buelow, M., Getzenberg, R., Johnston, M., Kannan, R.M., Fatemi, A., and Kannan, S. (2015). Systemic dendrimer-drug treatment of ischemia-

- induced neonatal white matter injury. *J. Control. Release* 214, 112–120.
- Nyitrai, G., Keszthelyi, T., Bota, A., Simon, A., Toke, O., Horvath, G., Pal, I., Kardos, J., and Heja, L. (2013a). Sodium selective ion channel formation in living cell membranes by polyamidoamine dendrimer. *Biochim. Biophys. Acta* 1828, 1873–1880.
- Nyitrai, G., Héja, L., Jablonkai, I., Pál, I., Visy, J., and Kardos, J. (2013b). Polyamidoamine dendrimer impairs mitochondrial oxidation in brain tissue. *J. Nanobiotechnology* 11, 9.
- Peer, D., Karp, J.M., Hong, S., Farokhzad, O.C., Margalit, R., and Langer, R. (2007). Nano- carriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nanotechnol* 2, 751–760.
- Peper, A. (2009). Aspects of the relationship between drug dose and drug effect. *Dose-Response* 7, 172–192.
- Pereira, V.H., Salgado, a. J., Oliveira, J.M., Cerqueira, S.R., Frias, a. M., Fraga, J.S., Roque, S., Falcao, a. M., Marques, F., Neves, N.M., et al. (2011). In vivo biodistribution of carboxymethylchitosan/poly(amidoamine) dendrimer nanoparticles in rats. *J. Bioact. Compat. Polym.* 26, 619–627.
- Pérez-Martínez, F.C., Guerra, J., Posadas, I., and Ceña, V. (2011). Barriers to non-viral vector-mediated gene delivery in the nervous system. *Pharm. Res.* 28, 1843–1858.
- Perumal, O.P., Inapagolla, R., Kannan, S., and Kannan, R.M. (2008). The effect of surface functionality on cellular trafficking of dendrimers. *Biomaterials* 29, 3469–3476.
- Peters, C., Fernandez-Perez, E.J., Burgos, C.F., Espinoza, M.P., Castillo, C., Urrutia, J.C., Streltsov, V.A., Opazo, C., and Aguayo, L.G. (2013). Inhibition of amyloid beta-induced synaptotoxicity by a pentapeptide derived from the glycine zipper region of the neurotoxic peptide. *Neurobiol. Aging* 34, 2805–2814.
- Pradhan, P., Giri, J., Rieken, F., Koch, C., Mykhaylyk, O., Döblinger, M., Banerjee, R., Bahadur, D., and Plank, C. (2010). Targeted temperature sensitive magnetic liposomes for thermo-chemotherapy. *J. Control. Release* 142, 108–121.
- Prince, M., Wimo, A., Guerchet, M., Ali, G.-C., Wu, Y.-T., and Prina, M. (2015). World Alzheimer Report 2015 The Global Impact of Dementia. *Alzheimer's Dis. Int.*
- Rizo, J., and Xu, J. (2015). The Synaptic Vesicle Release Machinery. *Annu. Rev. Biophys.* 44, 339–367.
- Roberts, J.C., Bhalgat, M.K., and Zera, R.T. (1996). Preliminary biological evaluation of polyamidoamine (PAMAM) Starburst dendrimers. *J. Biomed. Mater. Res.* 30, 53–65.
- Sabahi, Z., Samani, S.M., and Dehshahri, A. (2014). Conjugation of poly(amidoamine) dendrimers with various acrylates for improved delivery of plasmid encoding interleukin-12 gene. *J. Biomater. Appl.*
- Salimi, M., Sarkar, S., Fathi, S., Alizadeh, A.M., Saber, R., Moradi, F., and Delavari, H. (2018). Biodistribution, pharmacokinetics, and toxicity of dendrimer-coated iron oxide nanoparticles in BALB / c mice. *Int. J. Nanomedicine* 13, 1483–1493.
- Saovapakhiran, A., D'Emanuele, A., Attwood, D., and Penny, J. (2009). Surface modification of PAMAM dendrimers modulates the mechanism of cellular internalization. *Bioconjug. Chem.* 20,

693–701.

Saraiva, C., Praça, C., Ferreira, R., Santos, T., Ferreira, L., and Bernardino, L. (2016). Nanoparticle-mediated brain drug delivery : Overcoming blood – brain barrier to treat neurodegenerative diseases. *235*, 34–47.

Sepulveda, F.J., Parodi, J., Peoples, R.W., Opazo, C., and Aguayo, L.G. (2010). Synaptotoxicity of Alzheimer beta amyloid can be explained by its membrane perforating property. *PLoS One* *5*, 1–9.

Sepúlveda, F.J., Fierro, H., Fernandez, E., Castillo, C., Peoples, R.W., Opazo, C., and Aguayo, L.G. (2014). Neurobiology of Aging Nature of the neurotoxic membrane actions of amyloid- b on hippocampal neurons in Alzheimer ' s disease. *Neurobiol. Aging* *35*, 472–481.

Shen, W., Van Dongen, M.A., Han, Y., Yu, M., Li, Y., Liu, G., Banaszak Holl, M.M., and Qi, R. (2014). The role of caveolin-1 and syndecan-4 in the internalization of PEGylated PAMAM dendrimer polyplexes into myoblast and hepatic cells. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* *88*, 658–663.

Singh, P., Gupta, U., Asthana, A., and Jain, N.K. (2008). Folate and Folate– PEG– PAMAM Dendrimers: Synthesis, Characterization, and Targeted Anticancer Drug Delivery Potential in Tumor Bearing Mice. *Bioconjug. Chem.* *19*, 2239–2252.

Sonawane, N.D., Szoka, F.C., and Verkman, A.S. (2003). Chloride Accumulation and Swelling in Endosomes Enhances DNA Transfer by Polyamine-DNA Polyplexes. *J. Biol. Chem.* *278*, 44826–44831.

Soni, S., Ruhela, R.K., and Medhi, B. (2016). Nanomedicine in central nervous system (CNS) disorders: A present and future prospective. *Adv. Pharm. Bull.* *6*, 319–335.

Stern, S.T., Adishesaiyah, P.P., and Crist, R.M. (2012). Autophagy and lysosomal dysfunction as emerging mechanisms of nanomaterial toxicity. *Part. Fibre Toxicol.* *9*, 20.

Svenson, S. (2009a). Dendrimers as versatile platform in drug delivery applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* *71*, 445–462.

Svenson, S. (2009b). Dendrimers as versatile platform in drug delivery applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* *71*, 445–462.

Tomalia, D.A., Baker, H., Dewald, J., Hall, M., Kallos, G., Martin, S., Roeck, J., Ryder, J., and Smith, P. (1985). A New Class of Polymers: Starburst-Dendritic Macromolecules. *Polym. J.* *17*, 117–132.

Tortorella, S., and Karagiannis, T.C. (2014). Transferrin receptor-mediated endocytosis: A useful target for cancer therapy. *J. Membr. Biol.* *247*, 291–307.

Vermeulen, L.M.P., Brans, T., Samal, S.K., Dubruel, P., Demeester, J., De Smedt, S.C., Remaut, K., and Braeckmans, K. (2018). Endosomal Size and Membrane Leakiness Influence Proton Sponge-Based Rupture of Endosomal Vesicles. *ACS Nano* *12*, 2332–2345.

Vicente, B., Saldivia, S., and Pihán, R. (2016). Prevalencias y brechas hoy: salud mental mañana. *Acta Bioeth.* *22*, 51–61.

Vidal, F., and Guzman, L. (2015). Dendrimer nanocarriers drug action: perspective for neuronal pharmacology. *Neural Regen. Res.* *10*, 1029–1031.

Wang, S., Li, Y., Fan, J., Wang, Z., Zeng, X., Sun, Y., Song, P., and Ju, D. (2014). The role of

autophagy in the neurotoxicity of cationic PAMAM dendrimers. *Biomaterials* 35, 7588–7597.

Wang, W., Xiong, W., Wan, J., Sun, X., Xu, H., and Yang, X. (2009). The decrease of PAMAM dendrimer-induced cytotoxicity by PEGylation via attenuation of oxidative stress. *Nanotechnology* 20, 105103.

Wilczewska, A.Z., Niemirowicz, K., Markiewicz, K.H., and Car, H. (2012). Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacol Rep* 64, 1020–1037.

Wu, J., Huang, W., and He, Z. (2013). Dendrimers as carriers for siRNA delivery and gene silencing: A review. *Sci. World J.* 2013, 1–16.

Wu, L.P., Ficker, M., Christensen, J.B., Trohopoulos, P.N., and Moghimi, S.M. (2015). Dendrimers in Medicine: Therapeutic Concepts and Pharmaceutical Challenges. *Bioconjug. Chem.* 26, 1198–1211.

Xu, L., Zhang, H., and Wu, Y. (2014). Dendrimer advances for the central nervous system delivery of therapeutics. *ACS Chem. Neurosci.* 5, 2–13.

Yun, Y.H., Lee, B.K., and Park, K. (2015). Controlled Drug Delivery: Historical perspective for the next generation. *J Control Release* 219, 2–7.

Zhang, F., Nance, E., Zhang, Z., Jasty, V., Kambhampati, S.P., Mishra, M.K., Burd, I., Romero, R., Kannan, S., and Kannan, R.M. (2016). Surface functionality affects the biodistribution and microglia-targeting of intra-amniotically delivered dendrimers. *J. Control. Release* 237, 61–70.

Zhang, F., Trent Magruder, J., Lin, Y.A., Crawford, T.C., Grimm, J.C., Sciortino, C.M., Wilson, M.A., Blue, M.E., Kannan, S., Johnston, M. V., et al. (2017). Generation-6 hydroxyl PAMAM dendrimers improve CNS penetration from intravenous administration in a large animal brain injury model. *J. Control. Release* 249, 173–182.

Zhao, J., and Feng, S.-S. (2015). Nanocarriers for delivery of siRNA and co-delivery of siRNA and other therapeutic agents. *Nanomedicine* 10, 2199–2228.

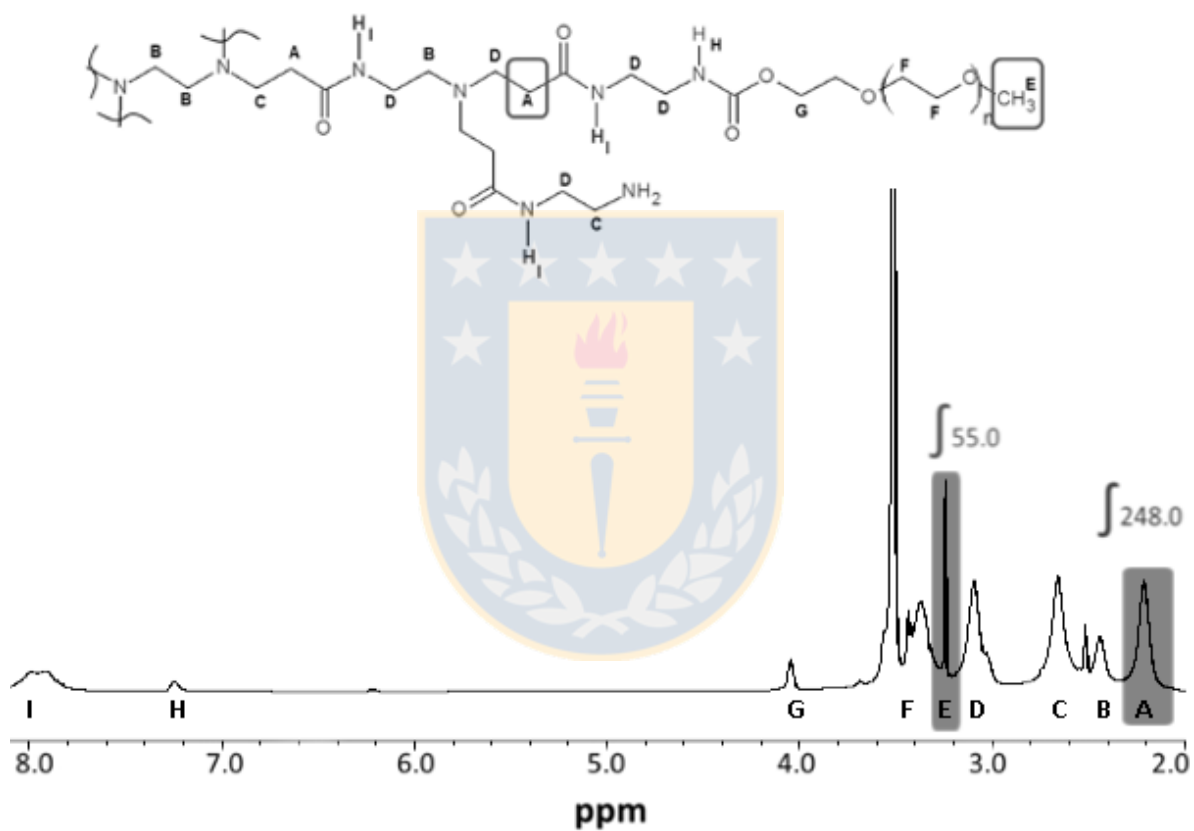
Zhao, R., Diop-Bove, N., Visentin, M., and Goldman, I.D. (2011). Mechanisms of membrane transport of folates into cells and across epithelia.

IX. ANEXO 1

Espectros RMN ^1H representativos de las distintas modificaciones químicas superficiales del dendrímero PAMAM G4. Fuente: Elaboración propia.

a) Funcionalización con polietilenglicol

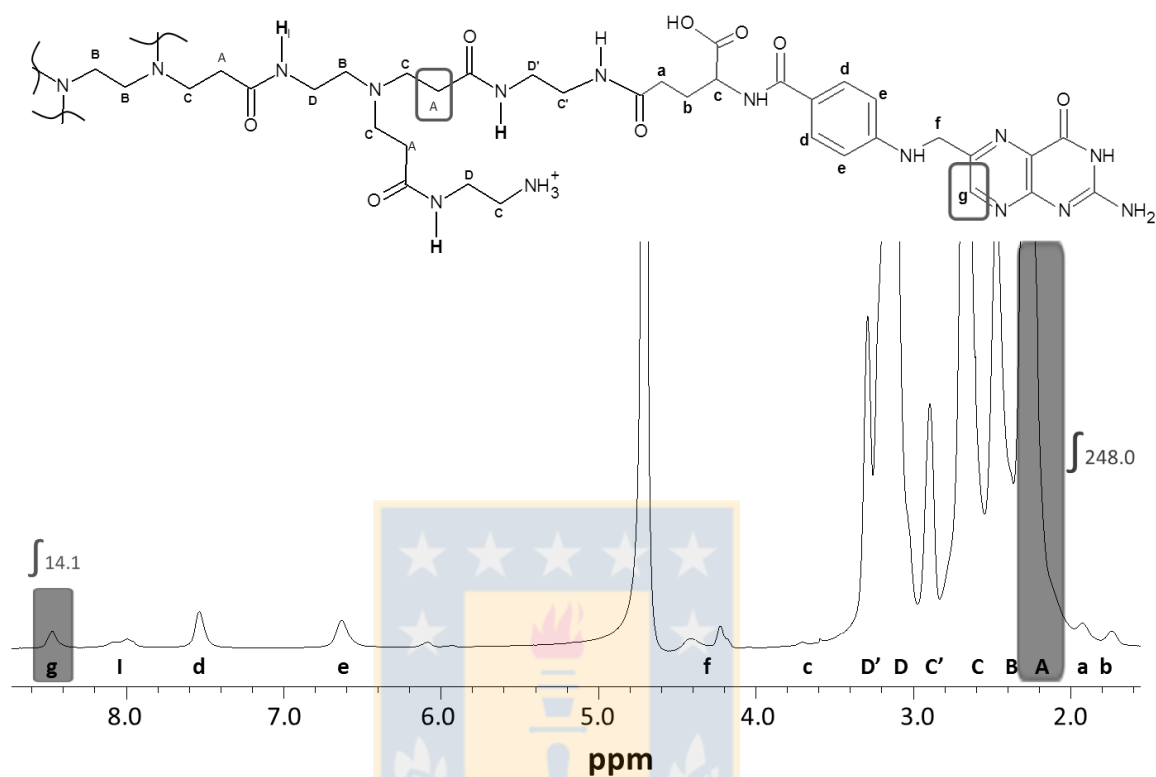
^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz)



H	δ (ppm)	Integral
A	2.21	248.0*
B	2.48	108.7
C	2.66	302.5
D	3.09	313.7
E	3.24	55.0
F	3.44	1169
G	4.04	33.3
H	7.24	10.3
I	7.87	116.8

b) Funcionalización con folato

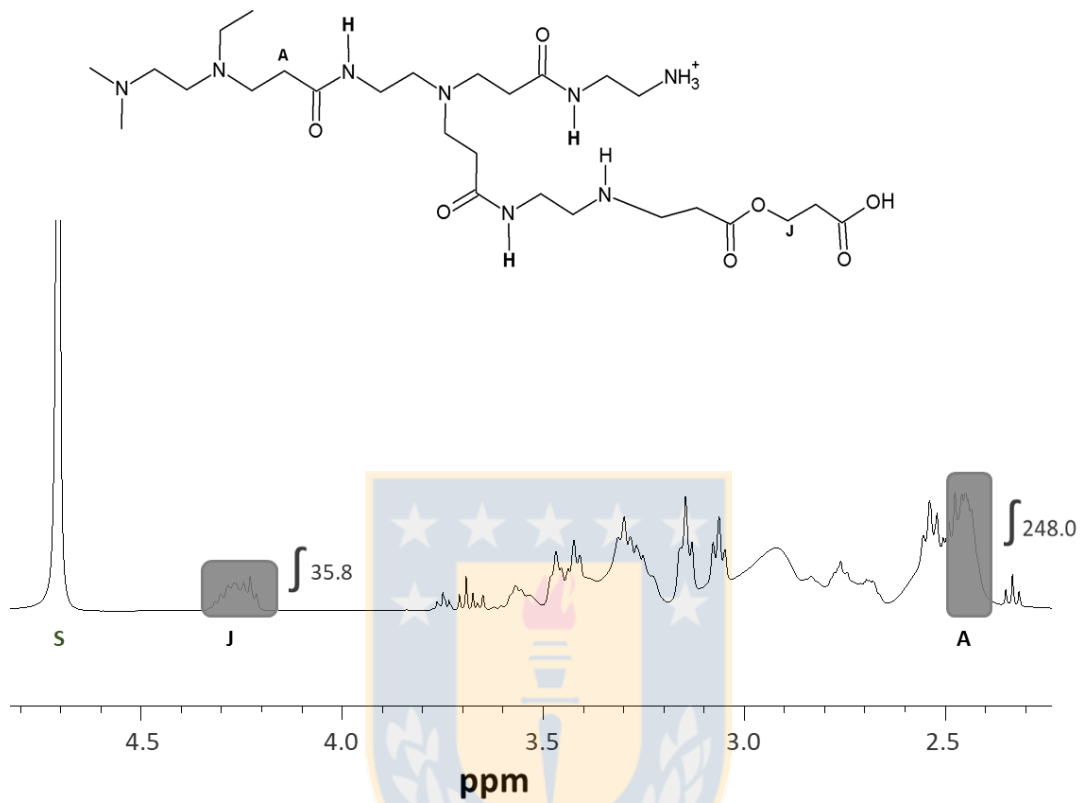
^1H NMR (D_2O , 400 MHz)



H	δ (ppm)	Integral
b	1.74	-
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	30.8
e	6.63	29.8
d	7.54	31.6
I	8.05	-
g	8.47	14.1

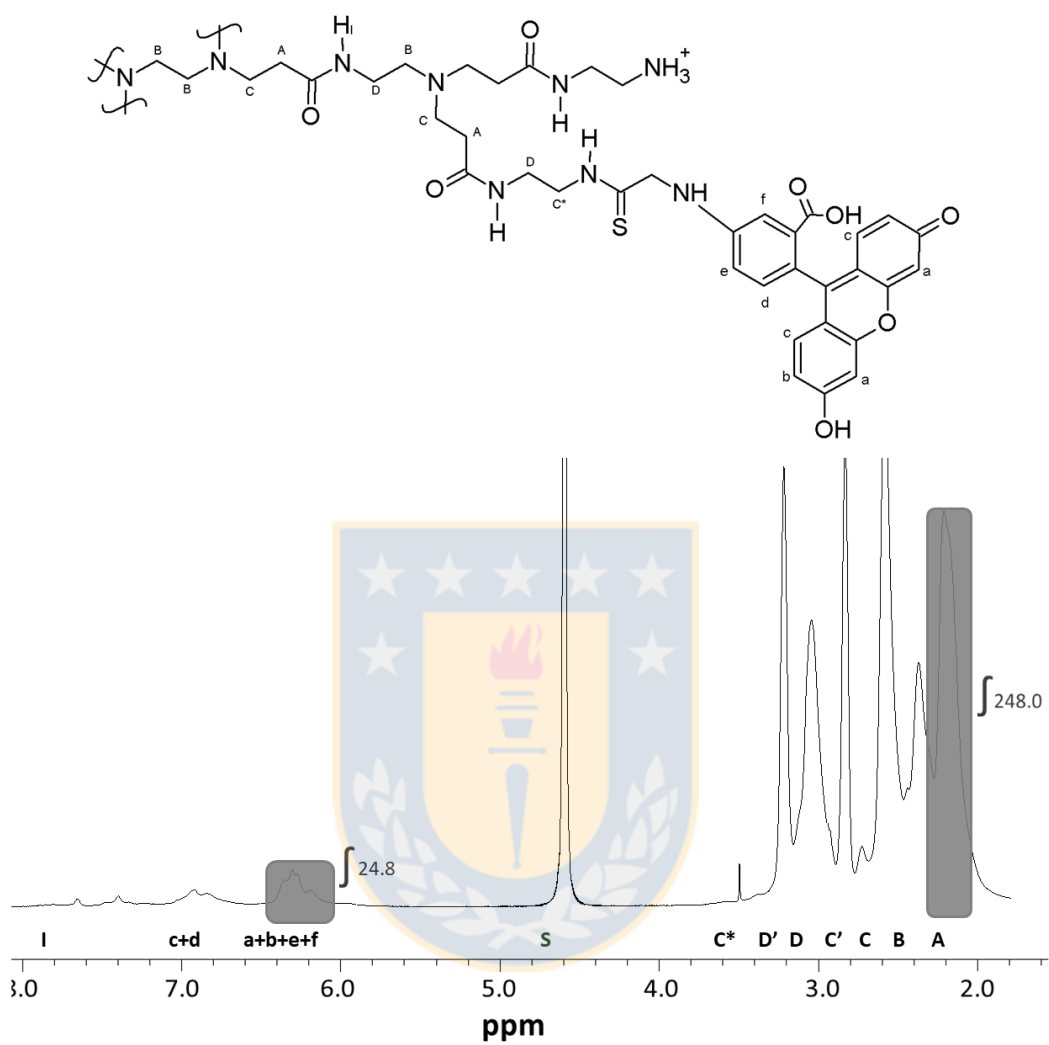
c) Funcionalización con 2-carboxietilacrilato

^1H NMR (D_2O , 400 MHz)

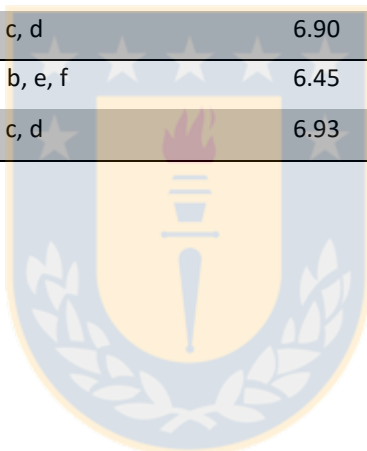


H	δ (ppm)		Integral
A	2.38	- 2.62	248.0*
J	4.20	- 4.32	35.8

d) Funcionalización con FITC

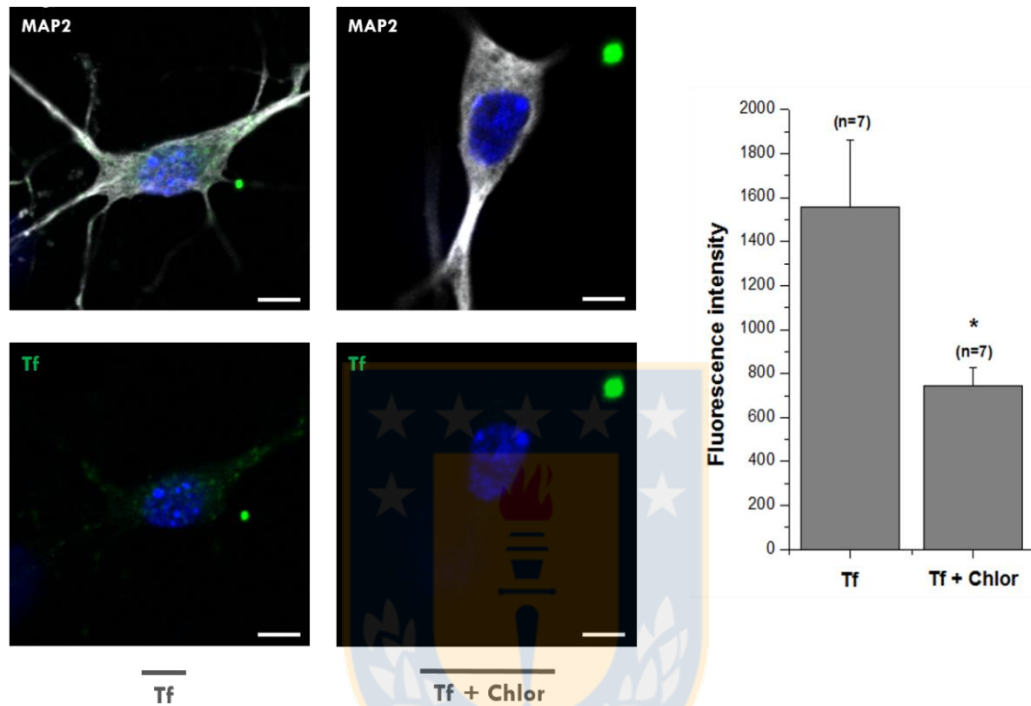


Dendrímero-FITC	H	δ (ppm)	Integral
	A	2.32	248.0*
	B	2.48	152.9
	C	2.69	242.6
	C'	2.94	108.1
	D	3.03	181.9
	D'	3.33	110.3
	C*	3.61	3.7
G4	a, b, e, f	6.41	24.8
	c, d	6.95	16.5
PPEG ₅₀	a, b, e, f	6.56	29.4
	c, d	6.93	20.3
PAC	a, b, e, f	6.39	23.9
	c, d	6.90	15.7
PFO ₂₅	a, b, e, f	6.45	24.6
	c, d	6.93	17.1

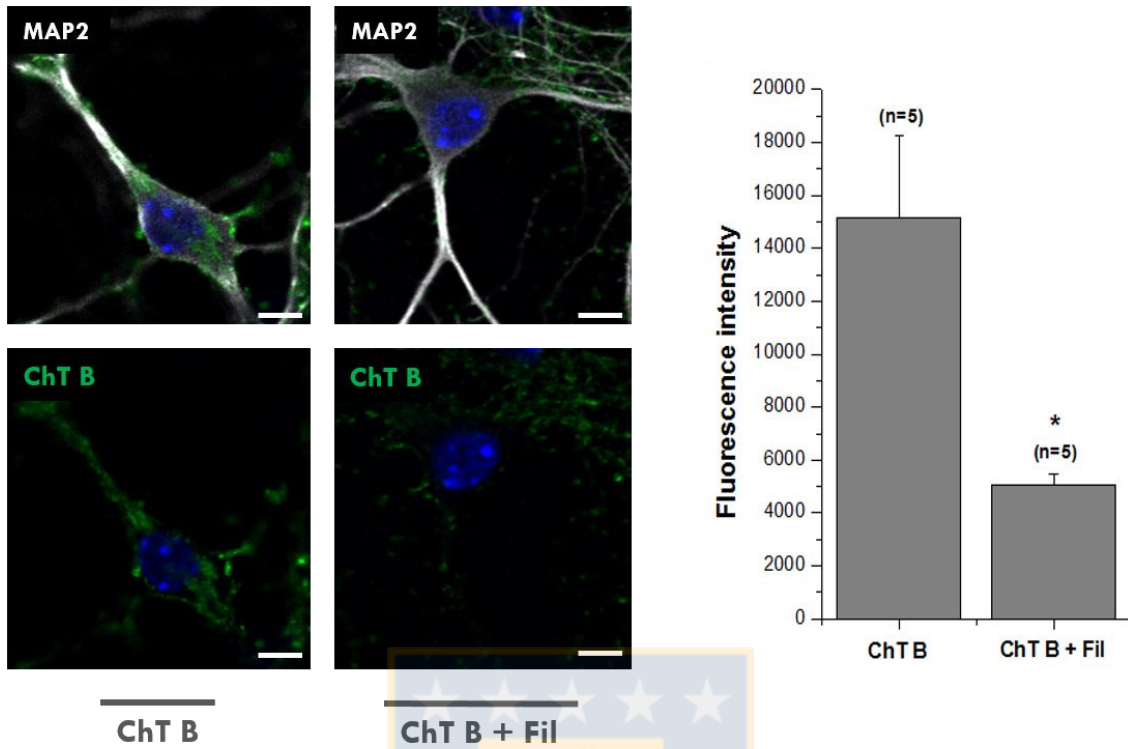


X. ANEXO 2

Controles para los inhibidores de endocitosis mediada por clatrina y caveola. *Fuente: Elaboración propia.*



Transferrina marcada con FITC (Tf) fue utilizada como control de la inhibición de endocitosis mediada por clatrina (Huth et al., 2006). La disminución de la intensidad de fluorescencia de transferrina asociada a neuronas hipocampales es observada cuando las células son tratadas con clorpromazina 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Barra de escala = 10 μm . * $p < 0,05$



Subunidad B de la toxina del cólera marcada con FITC (ChT B) fue utilizada como control de la inhibición de endocitosis mediada por caveola (Huth et al., 2006). La disminución de la intensidad de fluorescencia de subunidad B de la toxina del cólera asociada a neuronas hipocámpales es observada cuando las células son tratadas con el complejo filipin 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Barra de escala = 10 μm .
 * $p < 0,05$