



**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
**Doctorado en Ciencias con Mención en Química**

**DISEÑO DE NUEVOS NANOTRANSPORTADORES BIFUNCIONALES  
BASADOS EN SISTEMAS CONJUGADOS PÉPTIDO-PAMAM-pTAT CON  
POTENCIAL APLICACIÓN EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES  
NEURODEGENERATIVAS**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Químicas para optar al grado de  
Doctora en Ciencias con Mención en Química

POR:

**KELLY PATRICIA MARRUGO AGRESOTT**

Profesor Guía: Dr. Cristian Hugo Campos Figueroa  
Profesor Co-Guía: Dr. Joel Bernabé Alderete Triviños

mayo de 2021  
Concepción, Chile



Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.



*Dedicado a:*

*Carlos Teodoro Vivas Bueno (Sr. Adolfo),  
Eusebia Torres Arias y Catalina Hortensia  
Martínez Altamiranda. Mis abuelos amados.*

## ***AGRADECIMIENTOS***

Indudablemente, el cierre de esta etapa tan importante de mi vida no habría sido posible sin la ayuda o intervención de las personas e instituciones que nombraré a continuación.

En primer lugar, dar gracias a *ELOHIM*, mi lugar de reposo, mi Shalom, por poner en mí el deseo de salir de mi zona de confort para emprender este desafío, sabiendo que su mano me sostendría desde el principio hasta el final.

A la Universidad de Concepción, ahora mi segunda casa de estudios, y a la Facultad de Ciencias Químicas por todo el apoyo brindado. A la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT-ANID) por otorgarme la beca de Doctorado Nacional 21161020 con la que iniciaría mis estudios en Chile. Agradecer también al Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT) a través del proyecto 1170426 y al Proyecto UCO 1866, por el financiamiento de mi proyecto de tesis doctoral.

A todos los profesores que contribuyeron a mi formación, en especial a quienes fueron mis tutores y guías durante todo el camino: Dr. Joel Alderete Triviños, Dra. Verónica Jiménez Curihual y Dr. Cristian Campos Figueroa. Son una fuente invaluable de conocimientos que ganaron mi admiración desde el primer momento. Gracias por todo lo impartido, por su confianza, su consejo y por enseñarme, cada uno en su área, a pensar siempre en grande.

A los todos los integrantes del Laboratorio de Biomateriales y Diseño Molecular (BDM, UdeC), Nanomaterial & Biomolecular Research Group (N&Biorg, UNAB), Nanomaterials for Catalytic and Biomedical Applications (NCBA, UdeC), con quienes pude compartir buenos y malos momentos. Gracias por recibir de ustedes la ayuda oportuna, en especial a la Dra. Cecilia Torres, MSc. Natalia Ortiz, Lcda. Daniela Seguel, Dr. Matías Zúñiga, Dra. Karen Navarrete y Dra. Tatiana Bustamante.

Al Dr. José Leonardo Guzmán, jefe del laboratorio de Neurobiología Molecular (FCB-UdeC), así como a las bioquímicas Pilar Vásquez y Josefa Torres por su disponibilidad y enseñanza en los primeros ensayos de inmunocitoquímica. Al Dr. Oliberto Sánchez, jefe del laboratorio de Biofármacos Recombinantes (FCB-UdeC), y a la Dra. Ma. Angélica Contreras por la disposición e instrucción en el uso del equipo Monolith™ NT.115<sup>Pico</sup>.

Agradecer especialmente al Dr. Joaquín Manzo Merino, jefe del Laboratorio de Agentes Biológicos y Cáncer del INCAN, por todo su apoyo como tutor de pasantías en tiempos de pandemia y ponerme como prioridad entre todos sus estudiantes. Asimismo, quiero agradecer a la Dra. Marcela Lizano Soberón, quien nos apoyó con aspectos logísticos y administrativos durante la estancia. De igual forma, extendiendo mi agradecimiento a todos quienes forman parte de los laboratorios 2 y 3, por integrarme al grupo y enseñarme valiosos conocimientos de biología molecular en cada seminario.

Estas líneas no pueden terminar sin el mayor de los agradecimientos hacia mi familia, mis padres Isabel y Amauri, y mis hermanos Katherine, Jonathan y Victoria. Gracias por su inmensurable amor, tangible en cada palabra, en cada detalle que recibí, incluso, a través de una pantalla. El esfuerzo ha valido más que la pena. ¡No saben cuánto los amo!

A Katerina Medrano y familia, especialmente a sus padres Sandra y Arturo, quienes me recibieron con brazos abiertos al llegar a la ciudad de Concepción. A quienes fueron como mis padres durante los últimos años, Eric Díaz y Susan Ramírez. Gracias por ser ese soporte emocional y espiritual, por apoyarme como a una hija más.

Al personal administrativo del postgrado, en especial a las secretarías Karin Garcés G. y Andrea Fuenzalida O., así como al Ing. Hans Wicky T., por todas las gestiones realizadas que fueron de suma importancia para mí. Asimismo, agradecer a la Lcda. Karen Bustamante por la adquisición de los espectros de RMN en 1D y 2D.

A todas aquellas personas que de alguna u forma me acompañaron a lo largo de esta temporada de crecimiento profesional y personal, ¡MIL GRACIAS! Tengan por seguro que cada experiencia vivida fue un cimiento para esta gran construcción.

## TABLA DE CONTENIDO

|  |    |
|--|----|
| ÍNDICE DE TABLAS.....  | 9  |
| ÍNDICE DE FIGURAS .....  | 10 |
| LISTA DE ABREVIATURAS.....   | 12 |
| RESUMEN .....  | 14 |
| ABSTRACT.....  | 16 |
| <b>CAPÍTULO 1. Introducción</b> .....  | 18 |
| <b>1.1 ENFERMEDADES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL</b> .....   | 19 |
| 1.1.1 Dendrímeros PAMAM como nanotransportadores hacia el Sistema Nervioso Central (SNC).....                                    | 20 |
| 1.1.2 Péptidos Penetrantes de Células: 1-HIV TAT .....   | 24 |
| 1.1.3 E-selectina como blanco para la liberación de fármacos .....   | 27 |
| <b>1.2 PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN</b> .....  | 32 |
| 1.2.1 Hipótesis.....   | 35 |
| 1.2.2 Objetivo General.....  | 36 |
| 1.2.3 Objetivos Específicos .....  | 36 |
| <b>CAPÍTULO 2. Metodología</b> .....   | 37 |
| <b>2.1 DISEÑO DE EXPERIMENTOS PARA LA VECTORIZACIÓN, SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DEL NANOTRANSPORTADOR BIFUNCIONAL</b> ..... | 38 |
| <b>2.1.1 Búsqueda de Péptidos “hit” afines con el sitio activo de E-selectina</b> .....  | 38 |
| 2.1.1.1 Preparación de la proteína y los péptidos .....  | 38 |
| 2.1.1.2 Docking molecular .....  | 39 |
| 2.1.1.3 Simulaciones de Dinámica Molecular para E-selectina/péptidos .....   | 39 |
| 2.1.1.4 Cálculos de energía libre por el método MM/GBSA .....  | 41 |
| <b>2.1.2 Ensayos de Afinidad de los péptidos “hit” por la proteína E-selectina</b> .....   | 42 |
| 2.1.2.1 Determinación de la afinidad de unión por termoforesis a microescala .....   | 42 |
| <b>2.1.3 Síntesis y caracterización de los nanotransportadores</b> .....   | 45 |

|  |   |           |
|--|---|-----------|
| 2.1.3.1  | Dendrímero AC50.....  | 45        |
| 2.1.3.2  | Dendrímero conjugado AC50-pTAT .....  | 47        |
| 2.1.3.3  | Dendrímeros conjugados AC50-pTAT-CIELLQAR/CIELFQAR.....   | 48        |
| <b>2.1.4</b>                                   | <b>Ensayos de Citotoxicidad de los nanotransportadores .....</b>  | <b>49</b> |
| 2.1.4.1  | Cultivo de células .....  | 49        |
| 2.1.4.2  | Ensayos de viabilidad celular .....   | 49        |
| <b>2.1.5</b>                                   | <b>Ensayos de internalización del nanotransportador bifuncionalizado<br/>PAE-PAMAM-pTAT .....</b>         | <b>51</b> |
| 2.1.5.1.                                       | Captación celular.....  | 51        |
| <b>CAPÍTULO 3. Resultados y Discusión.....</b> |   | <b>53</b> |
| <b>3.1</b>                                     | <b>CÁLCULOS COMPUTACIONALES .....</b>   | <b>54</b> |
| 3.1.1  | Estudio teórico de la afinidad del péptido IELLQAR por E-selectina. 54                                    |           |
| 3.1.2  | Búsqueda de péptidos mutantes de mayor afinidad por E-selectina. 57                                       |           |
| 3.1.3  | Análisis de las interacciones polares entre el péptido nativo y<br>mutantes elegidos con E-selectina..... | 60        |
| 3.1.4  | Simulación de los péptidos candidatos con un residuo <i>N</i> -Cys.....                                   | 64        |
| <b>3.2</b>                                     | <b>ENSAYO DE AFINIDAD EXPERIMENTAL POR TERMOFORESIS A<br/>MICROESCALA (MST).....</b>                      | <b>68</b> |
| <b>3.3</b>                                     | <b>SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS<br/>NANOTRANSPORTADORES DERIVADOS DE PAMAM .....</b>                 | <b>75</b> |
| <b>3.3.1</b>                                   | <b>Caracterización de los péptidos adquiridos comercialmente.....</b>                                     | <b>75</b> |
| 3.3.1.1  | Péptido C-pTAT (CGRKKRRQRR) .....   | 75        |
| 3.3.1.2  | Péptido C-nativo (CIELLQAR).....  | 78        |
| 3.3.1.3  | Péptido C-mutante 11 (CIELFQAR) .....   | 79        |
| <b>3.3.2</b>                                   | <b>Síntesis del sistema AC50 .....</b>  | <b>81</b> |
| <b>3.3.3</b>                                   | <b>Síntesis del sistema AC50-pTAT.....</b>  | <b>83</b> |
| <b>3.3.4</b>                                   | <b>Síntesis de los sistemas AC50-pTAT-CIELLQAR/CIELFQAR.....</b>  | <b>86</b> |
| <b>3.4</b>                                     | <b>ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR POR MTS Y CRISTAL VIOLETA<br/>.....</b>                                  | <b>90</b> |
| <b>3.5</b>                                     | <b>INTERNALIZACIÓN CELULAR DE LOS NANOTRANSPORTADORES<br/>DERIVADOS DE PAMAM.....</b>                     | <b>97</b> |
| <b>3.5.1</b>                                   | <b>Captación de los nanotransportadores bifuncionales en células<br/>activadas con PMA.....</b>           | <b>98</b> |

|   |   |     |
|---|---|-----|
| 3.5.2   | Captación de los nanotransportadores bifuncionales en células activadas con TNF- $\alpha$ ..... | 102 |
| 3.6   | ENSAYO DE SELECTIVIDAD PARA EL RECEPTOR DE E-SELECTINA .....                                    | 107 |
| <b><i>CAPÍTULO 4. Conclusiones y Proyecciones</i></b> ..... |   | 111 |
| <b>CONCLUSIONES</b> .....                                   |   | 112 |
| <b>PROYECCIONES</b> .....                                   |   | 115 |
| <b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....                     |   | 117 |
| <b>ANEXOS</b> .....   |   | 127 |
| <b>PRODUCCIÓN CIENTÍFICA</b>                                |   |     |





## ÍNDICE DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla 3.1</b> Estimación de las energías libres de unión para la asociación E-selectina/Péptido obtenidas por el método MM/GBSA .....  | 58 |
| <b>Tabla 3.2</b> Estimación de las energías libres de unión para la asociación de E-selectina con los péptidos candidatos modificados con un residuo <i>N</i> -Cys obtenidas por el método MM/GBSA..... | 67 |
| <b>Tabla 3.3</b> Constantes de disociación ( $K_d$ ) y energías libres de unión ( $\Delta G_{bind}$ ) de los complejos E-selectina/C-péptidos obtenidos por termoforesis a microescala (MST).....       | 74 |
| <b>Tabla 3.4</b> Relaciones molares AC50:GMBS:pTAT ensayadas para la conjugación de pTAT con el dendrímero AC50 .....   | 86 |



## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.1</b> Representación de la estructura química de dendrímeros poliamidoamina (PAMAM) .....  | 22 |
| <b>Figura 1.2</b> Representación esquemática del CPP TAT HIV-1 .....   | 25 |
| <b>Figura 1.3</b> Estructura de la BHE y principales alteraciones ante una enfermedad del SNC .....  | 30 |
| <b>Figura 2.1</b> Esquema integrado para el protocolo de cálculos computacionales  | 42 |
| <b>Figura 2.2</b> Montaje experimental y señal de MST. ....  | 44 |
| <b>Figura 2.3</b> Ruta sintética para la obtención de nanotransportadores derivados de PAMAM-G4 marcados y no marcados. AC50, AC50-pTAT, AC50-pTAT-CIELLQAR y AC50-pTAT-CIELFQAR. .... | 46 |
| <b>Figura 3.1</b> Poses de unión de los péptidos en el sitio de unión consenso de E-selectina.....   | 55 |
| <b>Figura 3.2</b> Mapas de calor que indican la formación de enlaces de hidrógeno entre los residuos de los péptidos candidatos y E-selectina.....                                     | 61 |
| <b>Figura 3.3</b> Mapa de calor que representa de forma general la formación de puentes salinos entre los péptidos candidatos y E-selectina. ....                                      | 63 |
| <b>Figura 3.4</b> Estabilidad dinámica de los complejos formados entre E-selectina y los péptidos candidatos modificados con un residuo N-Cys. ....                                    | 66 |
| <b>Figura 3.5</b> Ensayo de afinidad de los C-péptidos por E-selectina .....   | 73 |
| <b>Figura 3.6</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H del péptido C-pTAT (CGRKKRRQRR) adquirido de la casa comercial Biomatik. ....   | 76 |
| <b>Figura 3.7</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H y ampliaciones del péptido C-nativo CIELLQAR adquirido de la casa comercial Biomatik. ....  | 79 |
| <b>Figura 3.8</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H y ampliaciones del péptido C-mutante CIELFQAR adquirido de la casa comercial Biomatik. ....   | 80 |
| <b>Figura 3.9</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H del sistema AC50. ....  | 82 |
| <b>Figura 3.10</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H del sistema AC50-pTAT .....  | 84 |
| <b>Figura 3.11</b> Espectro <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C HSQC del nanotransportador AC50-pTAT .....   | 85 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figura 3.12</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H del sistema AC50-pTAT-CIELLQAR. ....   | 87  |
| <b>Figura 3.13</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H del sistema AC50-pTAT-CIELFQAR. ....   | 88  |
| <b>Figura 3.14.</b> Espectro NOESY del nanotransportador AC50-pTAT-CIELFQAR. ....  | 90  |
| <b>Figura 3.15</b> Representación esquemática del mecanismo propuesto para la reducción celular de MTS a formazán. ....                        | 91  |
| <b>Figura 3.16</b> Ensayo de proliferación celular por MTS en el modelo endotelial HUVEC/TERT2 y de glioblastoma T98G. ....                    | 93  |
| <b>Figura 3.17</b> Ensayo de densidad celular por tinción con cristal violeta en el modelo endotelial HUVEC/TERT2 y de glioblastoma T98G. .... | 96  |
| <b>Figura 3.18</b> Activación de las células endoteliales durante la inflamación del SNC. ....   | 98  |
| <b>Figura 3.19</b> Captación celular de los nanotransportadores bifuncionalizados en células HUVEC/TERT2 estimuladas con PMA. ....             | 100 |
| <b>Figura 3.20.</b> Captación celular de los nanotransportadores bifuncionalizados en células T98G estimuladas con PMA. ....                   | 101 |
| <b>Figura 3.21</b> Captación celular de los nanotransportadores bifuncionalizados en células HUVEC/TERT2 estimuladas con TNF- $\alpha$ . ....  | 103 |
| <b>Figura 3.22</b> Captación celular de los nanotransportadores bifuncionalizados en células T98G estimuladas con TNF- $\alpha$ . ....         | 105 |
| <b>Figura 3.23</b> Cuantificación de la fluorescencia de E-selectina por el método CTCF. ....  | 106 |
| <b>Figura 3.24</b> Selectividad <i>in Vitro</i> de los péptidos CIELLQAR y CIELFQAR hacia E-selectina. ....                                    | 108 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                             |  |
|-----------------------------|--|
| AC50                        | Dendrímero PAMAM de cuarta generación acetilado al 50%   |
| AC50-pTAT                   | Dendrímero PAMAM acetilado al 50% conjugado con el péptido penetrante de células p-TAT                       |
| AC50-pTAT-CIELFQAR          | Dendrímero PAMAM acetilado al 50% conjugado con p-TAT y con el péptido CIELFQAR afín por la E-selectina      |
| AC50-pTAT-CIELLQAR          | Dendrímero PAMAM acetilado al 50% conjugado con p-TAT y con el péptido CIELLQAR afín por la E-selectina      |
| BHE                         | Barrera hematoencefálica   |
| COSY                        | <i>Correlation Spectroscopy</i>  |
| CPPs                        | <i>Cell Penetrating Peptides</i>   |
| cRGDyC                      | Péptido cíclico RGDYC  |
| CTCF                        | <i>Corrected Total Cell Fluorescence</i>   |
| D <sub>2</sub> O            | Agua deuterada   |
| DM                          | Dinámica Molecular   |
| DMF                         | <i>N,N</i> -dimetilformamida   |
| DMSO                        | Dimetilsulfóxido   |
| DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> | Dimetilsulfóxido deuterado   |
| HSQC                        | <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>  |
| HMBC                        | <i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>   |
| MM/GBSA                     | <i>Molecular Mechanics Generalized Born Surface Area</i>   |
| MST                         | <i>Microscale thermophoresis</i>   |
| MTS                         | <i>5-[3-(carboxymethoxy)phenyl]-3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium inner salt</i> |
| NOESY                       | <i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>  |
| TEA                         | Trietilamina   |

|               |                                       |
|---------------|---------------------------------------|
| TNF- $\alpha$ | Factor de necrosis tumoral alfa       |
| TOCSY         | <i>Total Correlation Spectroscopy</i> |
| PAMAM-G4      | Poliamidoamina de cuarta generación   |
| PMA           | Forbol 12-miristato 13-acetato        |
| RMN           | Resonancia Magnética Nuclear          |
| RMSD          | <i>Root-mean-square deviation</i>     |
| SNC           | Sistema Nervioso Central              |



## RESUMEN

Hoy en día las enfermedades del SNC aún suponen un gran desafío para la industria farmacológica, debido a la baja tasa de penetración de la BHE que exhiben muchas de las drogas actualmente empleadas como tratamiento. En este sentido, el desarrollo de estructuras macromoleculares a través de la nanotecnología representa una alternativa para la entrega exitosa de fármacos a través de esta compleja membrana.

En esta tesis doctoral se describe el diseño, síntesis, caracterización y ensayos biológicos de un nuevo nanotransportador bifuncional que tiene como base al dendrímero PAMAM de cuarta generación, el cual fue acetilado para disminuir su citotoxicidad intrínseca, posteriormente conjugado con el péptido penetrante de células pTAT (un vector de internalización celular), y a su vez con el péptido CIELFQAR, un ligando de gran afinidad por la proteína E-selectina.

La primera etapa del trabajo de investigación consistió en la búsqueda de un péptido mutante de mayor afinidad por E-selectina a partir del péptido nativo IELLQAR mediante estudios de *docking*, DM y cálculos de energía libre por el método MM/GBSA. La afinidad experimental de los péptidos candidatos se realizó por la técnica MST, donde se validó la tendencia de unión por la proteína a través de los valores de  $K_d$ .

La segunda etapa consistió en la síntesis del nuevo nanotransportador bifuncional, para el cual se eligió al péptido de mayor afinidad CIELFQAR. Asimismo, se sintetizó un nanotransportador control con el péptido CIELLQAR que sirvió para validar su internalización celular y su especificidad por E-selectina.

Los nanotransportadores sintetizados presentaron baja toxicidad tanto en el modelo de células endoteliales (HUVEC/TERT2) como en el modelo de células de cáncer cerebral (T98G). Por otra parte, la internalización de AC50-pTAT-CIELFQAR en ambas líneas celulares fue mediada selectivamente por el receptor E-selectina en comparación a AC50-pTAT-CIELLQAR y los dendrímeros precursores AC50 y AC50-pTAT.

En consecuencia, se reporta la obtención del nanotransportador bifuncional AC50-pTAT-CIELFQAR, el cual se perfila como una novedosa macromolécula dirigida hacia la BHE con potencial aplicación en el tratamiento de enfermedades del neurodegenerativas y cáncer cerebral.

## ABSTRACT

Nowadays, CNS diseases still pose a great challenge for the pharmaceutical industry, since many of the current treatments have a low penetration rate of the BBB. In this sense, the development of macromolecular ensembles aided by nanotechnology represents a valuable alternative for the successful delivery of drugs across this complex membrane.

This doctoral thesis describes the design, synthesis, characterization and biological assays of a new bifunctional nanocarrier based on the fourth generation PAMAM dendrimer, which was acetylated to decrease its intrinsic cytotoxicity, subsequently conjugated with the cell penetrating peptide pTAT (a cell internalization vector), and also with the CIELFQAR peptide, a high-affinity ligand for the E-selectin protein.

The first stage of the research work consisted in the search for a mutant peptide with higher affinity for E-Selectin, which was derived from the native IELLQAR peptide through docking studies, DM and MM/GBSA free energy calculations. The experimental affinity of candidate peptides was performed by the MST technique, where the binding tendency for the target protein was validated through  $K_d$  values.

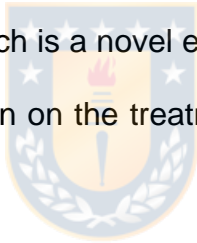
The second stage consisted of the synthesis of the new bifunctional nanocarrier, for which the highest affinity peptide CIELFQAR was chosen. A nanocarrier with



the CIELLQAR peptide was also synthesized in order to validate its cellular internalization and its specificity for E-selectin.

The synthesized nanocarriers showed low toxicity in both endothelial cell model (HUVEC/TERT2) and brain cancer cell model (T98G). Moreover, the internalization of AC50-pTAT-CIELFQAR in both cell lines was selectively mediated by the E-selectin receptor compared to AC50-pTAT-CIELLQAR and the precursor dendrimers AC50 and AC50-pTAT.

Consequently, we report here the development of the bifunctional nanotransporter AC50-pTAT-CIELFQAR, which is a novel emerging macromolecule targeting the BBB with potential application on the treatment for neurodegenerative diseases and brain cancer.



# ***CAPÍTULO 1. Introducción***



## 1.1 ENFERMEDADES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Las enfermedades del sistema nervioso central (SNC) son en conjunto un grupo de desórdenes neurológicos que afectan la estructura y funcionamiento del cerebro o de la médula espinal. Se caracterizan por tener un origen multifactorial entre los que destacan aquellos inherentes a un desorden metabólico, accidente cerebrovascular, tumor cerebral (ej. glioblastoma multiforme), condición degenerativa, daños causados por procesos infecciosos, entre otros. Algunas de estas enfermedades son crónicas e incurables cuyos efectos incapacitantes pueden prolongarse por años e incluso décadas.<sup>[1]</sup>

El tratamiento farmacológico para este tipo de afecciones resulta ser ineficaz debido a la dificultad que presentan algunos principios activos de permear la barrera hematoencefálica (BHE) y llegar hasta el blanco de acción, logrando acumularse sólo un pequeño porcentaje del fármaco administrado inicialmente a través del torrente sanguíneo.<sup>[2]</sup> La BHE, una barrera dinámica y compleja formada por células endoteliales, recubre los vasos sanguíneos del SNC, impidiendo la entrada de organismos patógenos y sustancias no deseadas, como es el caso de muchas moléculas terapéuticas.<sup>[3,4]</sup> Debido a que la BHE está compuesta por membranas biológicas, se ha tomado ventaja de las proteínas transmembrana presentes en ellas para mejorar el transporte de fármacos mediante un proceso de internalización celular.

Actualmente, a través de la nanotecnología, se han desarrollado numerosas estrategias para superar los problemas encontrados en la terapia farmacológica relacionados con la biodistribución y baja especificidad de la droga. El uso de nanotransportadores para la administración de fármacos ha tenido un impacto positivo tanto para el tratamiento como en el diagnóstico de diversas patologías como el cáncer gracias al transporte selectivo de moléculas “target” hacia las células tumorales, minimizando los efectos colaterales en células no afectadas.<sup>[5]</sup>

### **1.1.1 Dendrímeros PAMAM como nanotransportadores hacia el Sistema Nervioso Central (SNC)**

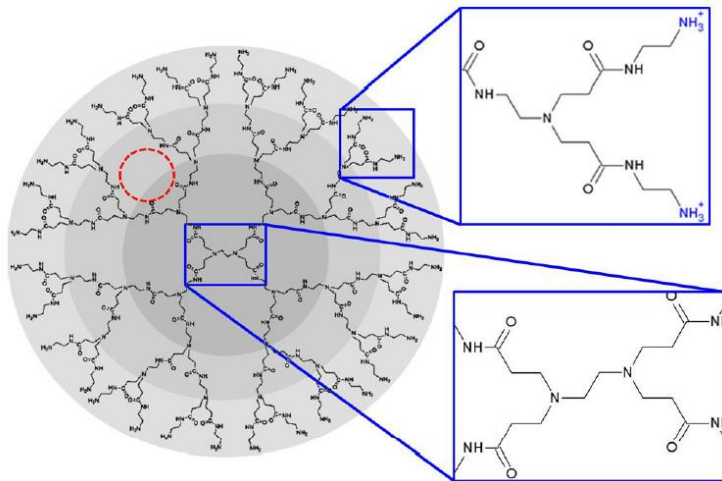
Entre los nanotransportadores de fármacos capaces de atravesar la BHE se encuentran aquellos basados en liposomas, liposomas catiónicos, lípidos sólidos, nanoemulsiones y polímeros, bien sea de origen natural o sintético.<sup>[6-10]</sup> Los nanotransportadores de este último tipo han sido los más estudiados ya que presentan una importante ventaja estructural y es la posibilidad de incorporar agentes hidrofílicos en su superficie con el fin de mejorar su solubilidad en condiciones fisiológicas, haciéndolos capaces de transportar moléculas de limitada solubilidad en agua y farmacocinética deficiente. De esta manera, con el uso de diferentes polímeros modificados superficialmente se ha conseguido administrar al SNC una gran variedad de moléculas que incluyen analgésicos, esteroides, anticancerígenos, anticonvulsivantes, antiretrovirales, drogas contra

el Parkinson y Alzheimer, así como algunas enzimas y otro tipo de macromoléculas haciendo uso de nanotransportadores biodegradables.<sup>[11]</sup>

En años recientes, los polímeros de poli-[amidoamina], mejor conocido como dendrímeros PAMAM, han sido considerados como excelentes de nanotransportadores que ejerzan su acción en el SNC, juntamente con los derivados del poli-[butilcianoacrilato] (PBCA) y poli-[ácido láctico] (PLA).<sup>[12-14]</sup> Se trata de macromoléculas sintéticas altamente ramificadas, de tamaño bien definido y forma globular. Están formadas por un núcleo de etilendiamina del cual emergen subunidades ramificadas de funciones amido-amida, desde el interior hacia la superficie, formando capas homocéntricas llamadas generaciones (Fig. 1.1).<sup>[15-18]</sup>



Entre las características que poseen los dendrímeros PAMAM se pueden mencionar: a) la posibilidad de funcionalizar covalentemente su superficie con módulos de orientación activa que permitan dirigir al nanotransportador a un blanco específico (active targeting), entre ellos, ligandos, anticuerpos, tensoactivos, entre otros; b) Aumento en la acumulación del fármaco al interior de las cavidades hidrofóbicas del dendrímero debido a procesos de encapsulación, gobernado por interacciones no covalentes y c) Presentan mecanismos de liberación controlada del fármaco, mejorando su biodisponibilidad.<sup>[20-23]</sup>



**Figura 1.1** Representación de la estructura química de dendrímeros poliamidoamina (PAMAM).<sup>[19]</sup>

No obstante, los dendrímeros PAMAM poseen una limitación como transportador de especies activas y es la facilidad de ser eliminado del torrente sanguíneo sin haber alcanzado antes el sitio de acción. Por otra parte, su citotoxicidad aumenta con el grado de generación del dendrímero, debido a la carga superficial altamente positiva que le confiere la protonación de las aminas primarias ubicadas en su periferia a pH fisiológico.<sup>[24-26]</sup> Para superar este inconveniente, se ha empleado la estrategia de modificación superficial de los dendrímeros PAMAM con algunas moléculas neutras o aniónicas que disminuyan el valor de la carga neta de la macromolécula y que a su vez favorezcan la biodisponibilidad del transportador.<sup>[27-29]</sup>

En los últimos años, en nuestro grupo de investigación se ha funcionalizado la superficie de dendrímeros PAMAM con diversas moléculas a fin de mejorar la viabilidad celular y maximizar la encapsulación de fármacos con propiedades antiinflamatorias y anticancerígenas.<sup>[30-32]</sup> Recientemente, se estudió la internalización celular de dendrímeros PAMAM en neuronas del hipocampo de ratones para evaluar la influencia de su modificación superficial sobre la neurotoxicidad. Para ello, se sintetizaron dendrímeros PAMAM (G4) marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC), a los que se unió covalentemente PEG (PP-50%), 2-carboxi-etil-Acrilato (PA-30%) y ácido fólico (PFO-25%). El análisis realizado por microscopía confocal de fluorescencia mostró que sólo los dendrímeros PAMAM G4 y PFO-25% fueron capaces de entrar a las neuronas, mientras que PP-50% y PA-30% permanecieron fuera de ella.<sup>[33]</sup> Esto nos motivó a realizar nuevos estudios modificando la superficie de PAMAM con vectores que también sean capaces de internalizarse en neuronas, y con ligandos que además muestren especificidad hacia un receptor específico que se sobreexpresa durante la manifestación de enfermedades neurodegenerativas.

En tal sentido, la búsqueda de dichos vectores ha sido dirigida hacia aquellos que mimeticen los procesos naturales, tal como ocurre con la permeabilidad de proteínas en membranas celulares, en donde segmentos específicos de la gran cadena de aminoácidos sirven como moléculas diana para la internalización.<sup>[34]</sup> Gracias a los recientes avances de la biología celular y molecular se ha logrado aislar segmentos de péptidos de anticuerpos, virus y otras proteínas naturales

que cumplen con estas características, dando origen a un selecto grupo de moléculas conocido como Péptidos Penetrantes de Células (CPPs, por sus siglas en inglés).<sup>[35]</sup>

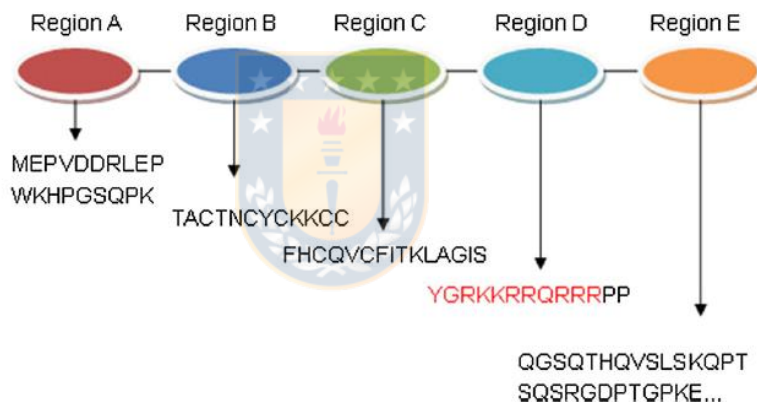
### **1.1.2 Péptidos Penetrantes de Células: 1-HIV TAT**

Los CPPs son péptidos pequeños que poseen dominios de transducción formados por secuencias de menos de 20 aminoácidos, caracterizados por penetrar la barrera lipofílica de las membranas celulares.<sup>[36]</sup> Se dividen en dos tipos principales: los péptidos derivados de proteínas naturales con funciones penetrantes y los péptidos sintetizados artificialmente, diseñados para optimizar la actividad de los ya existentes.<sup>[37]</sup> El uso de CPPs ha sido un área recientemente explorada con un potencial desarrollo de investigación. Desde su descubrimiento hasta la actualidad, los CPPs se han estudiado como vectores de internalización celular en la entrega de una variedad de especies biológicamente activas como proteínas, material genético, anticuerpos e incluso nanotransportadores de fármacos.<sup>[4,35]</sup> Los mecanismos de internalización propuestos dependen del CPP y del medio,<sup>[36,38]</sup> pero en general se proponen dos: 1) endocitosis celular o 2) traslocación directa.<sup>[39-41]</sup>

Uno de los CPPs más estudiados es el péptido trans-activador de transcripción (TAT) derivado del Virus-1 de la inmunodeficiencia humana (HIV-1), perteneciente a la clase de CPPs catiónicos.<sup>[35,41]</sup> La secuencia de TAT se puede



dividir en varias regiones diferentes de acuerdo con la composición de aminoácidos: región amino ácida de activación terminal (A), región enriquecida con cisteína (B), región central (C), región enriquecida en aminoácidos básicos (D) y región enriquecida con glutamina (E).<sup>[42]</sup> Para el TAT, el dominio de transducción corresponde a la secuencia YGRKKRRQRRR (TAT 47-57), compuesto en su mayoría por residuos básicos de arginina y lisina<sup>[43]</sup> (Fig. 1.2).



**Figura 1.2** Representación esquemática del CPP TAT HIV-1.<sup>[42]</sup>

Debido a la gran capacidad que posee para superar las barreras celulares y tisulares, el péptido pTAT (YGRKKRRQRRR) se ha enlazado a diferentes moléculas terapéuticas para facilitar su liberación en células diana y aumentar la probabilidad de una acción farmacológica eficiente. En consecuencia, pTAT ha

sido conjugado a drogas, anticuerpos, proteínas, péptidos, liposomas y nanopartículas con una potencial aplicación médica.<sup>[41]</sup>

A nivel del SNC, experimentos *in Vivo* han puesto de manifiesto la capacidad de pTAT de atravesar la BHE. Se ha reportado la unión de este CPP a las proteínas Bcl-xL<sup>[44]</sup>, FNK<sup>[45]</sup> y mGluRL<sup>[46]</sup>, actuando como neuroprotectores en el tratamiento de lesiones isquémicas, mientras que su unión con el factor de crecimiento haFGF promovió la función del sistema colinérgico.<sup>[47]</sup> Por otra parte, la conjugación de pTAT con lípidos<sup>[48,49]</sup> y nanopartículas poliméricas ha sido eficaz en la entrega de fármacos para combatir desórdenes cerebrales (epilepsia). Así también, la conjugación con partículas superparamagnéticas y sondas fluorescentes han ampliado el campo de investigación del pTAT para el tratamiento y diagnóstico de glioblastomas por medio de la terapia de imagen.<sup>[50]</sup> No obstante, el pTAT por sí solo presenta baja especificidad en el reconocimiento de células dañadas, teniendo como principal inconveniente la correcta distribución de especies biológicamente activas en las células afectadas.<sup>[41]</sup>

Para mejorar la distribución de especies activas en el sitio deseado de acción, se ha conjugado el pTAT con otros ligandos capaces de dirigir selectivamente el sistema transportador hacia una proteína blanco que se sobreexpresa de manera específica en las células dañadas. Los ejemplos más frecuentes de este tipo se observan en el área de la oncología, en donde el pTAT ha sido modificado para bloquear al receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-IR) implicado

en la proliferación de varios tipos de células cancerosas.<sup>[51,52]</sup> Asimismo, se ha reportado que la conjugación de pTAT con ligandos proteicos como apoptina<sup>[53]</sup> y Smac<sup>[52]</sup> promueve la muerte celular programada de células cancerígenas inducido por el mecanismo de apoptosis.

De igual manera puede extrapolarse esta acción al endotelio vascular cerebral, en el cual se encuentran diversos receptores transmembrana que al unirse con ligandos específicos (insulina, transferrina, lactoferrina o anticuerpos) promueven la entrada de estos al citosol, superando la BHE.<sup>[4,54]</sup> En este sentido, es posible apuntar al desarrollo de nanotransportadores específicos que ejerzan su acción a través de la interacción con proteínas que se encuentran sobreexpresadas en la BHE frente a desórdenes neurodegenerativos, tal como la E-selectina.

### **1.1.3 E-selectina como blanco para la liberación de fármacos**

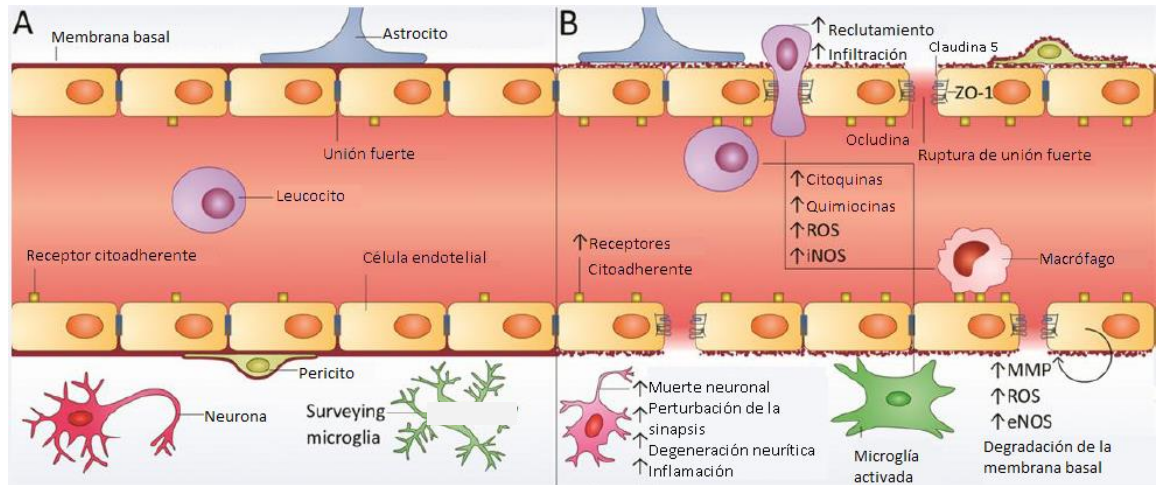
Frente a desórdenes neurodegenerativos la BHE está sujeta a un constante estrés oxidante que conlleva a una inflamación crónica que da lugar a la sobreexpresión de proteínas que no están presentes en el tejido sano.<sup>[54]</sup> Durante un accidente cerebrovascular isquémico las células endoteliales estimuladas por moduladores inflamatorios promueven la expresión de moléculas de adhesión como VCAM, ICAM-1 y Selectinas.<sup>[54,55]</sup> De igual manera, la misma manifestación se observa durante las enfermedades de Alzheimer y Parkinson, en donde el continuo daño tisular es provocado por ciertas biomoléculas presentes en la

sustancia gris y la sustancia negra del cerebro.<sup>[3,56]</sup> Dado que el proceso inflamatorio que acompaña a estas afecciones deriva de la activación de citocinas en el endotelio vascular, se desencadena también la expresión de la proteína de adhesión celular E-selectina, de la que se ha tomado ventaja para ser usada como biomarcador de procesos neurodegenerativos, progresión tumoral de meningiomas y glioblastomas; y también como un potencial receptor en el tratamiento de estas patologías, ya que aún la forma soluble de la proteína retiene la habilidad de unirse a sus ligandos.<sup>[57-59]</sup>

Las selectinas son glucoproteínas transmembranales que actúan como receptores de adhesión de leucocitos al endotelio vascular. Tienen en común un dominio extracelular homólogo al de las lectinas capaz de reconocer y unirse con gran afinidad a carbohidratos, como el tetrasacárido de Lewis x y su isómero Lewis a, en su forma sializada (sLe<sup>x</sup> y sLe<sup>a</sup>).<sup>[60,61]</sup> Están clasificadas de acuerdo a su sitio de expresión como L-Selectina (Leucocitos) P-Selectina (Plaquetas) y E-selectina (Endotelio activado).<sup>[60]</sup> A nivel fisiológico, la expresión de selectinas se relaciona con procesos inflamatorios y es estrictamente controlada a fin de limitar las reacciones de los mecanismos bioquímicos asociados. Los avances en biología celular y molecular han permitido elucidar el rol que juegan cada uno de estos receptores en un rango de desórdenes patológicos que afectan al sistema inmunológico. En este contexto, la E-selectina destaca en la familia al estar íntimamente implicada en diversos desórdenes inflamatorios que incluyen el cáncer y la metástasis.<sup>[62]</sup>

E-selectina (64 kDa), conocida también como CD62E, ELAM-1 y LECAM-2, es una proteína de adhesión vascular que se expresa específicamente por células endoteliales dañadas activadas por citocinas, razón por la cual resulta ser un receptor biológico de gran importancia para la terapia dirigida.<sup>[61]</sup>

Ante una enfermedad del SNC, como infecciones, tumor cerebral, accidente cerebrovascular e incluso enfermedades neurodegenerativas como Parkinson o Alzheimer, acontece un proceso inflamatorio como respuesta innata del sistema inmunológico, desencadenando una serie de reacciones que conllevan a la expresión de E-selectina en el endotelio vascular cerebral para el reclutamiento de leucocitos. En condiciones patológicas tiene lugar la degradación de la membrana basal a causa del estrés oxidante ocasionado por incremento en la concentración de especies reactivas de oxígeno (ROS), óxido nítrico derivado de células endoteliales (eNOS) y de macrófagos (iNOS), juntamente con la liberación de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1) y quimiocinas. Todos estos eventos conducen a una respuesta de tipo inflamatoria, dando como resultado final la expresión de moléculas de adhesión y, a su vez, una mayor permeabilidad de la BHE<sup>[54,63]</sup> (Fig. 1.3).



**Figura 1.3** Estructura de la BHE y principales alteraciones ante una enfermedad del SNC. Comparación entre endotelio vascular sano (A) y dañado por condición patológica (B) [54]

Estudios *in Vitro* han demostrado que la acumulación de péptidos beta amiloide ( $A\beta$ ), relacionados con la enfermedad de Alzheimer, induce la expresión de selectinas endoteliales (E-selectina) y receptores integrina (VCAM-1, ICAM-1) en células del endotelio cerebral de ratones y humanos.<sup>[64,65]</sup> Cabe resaltar que durante la inflamación cerebral la expresión de estas moléculas de adhesión aumenta considerablemente y sus formas solubles son liberadas al líquido cefalorraquídeo (LCR), sirviendo como biomarcadores de la inflamación vascular y distinción endotelial.<sup>[66]</sup> En este sentido, se ha indagado en el uso de la E-selectina como biomarcador objetivo de la enfermedad de Alzheimer para el diagnóstico clínico de esta demencia en personas que, además de presentar otras patologías, muestren resultados negativos al test tradicional tau/ $A\beta_{42}$ .<sup>[67]</sup>

Recientemente, se halló una relación género-edad con algunas enfermedades en adultos cognitivamente normales a través de las diferencias de concentraciones de los biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer ( $A\beta_{42}$ -p-tau<sub>181</sub> y tau total) y lesión vascular (E-selectina).<sup>[68]</sup> Asimismo, se encontró que el número de genotipos proinflamatorios (genes de citocinas que estimulan la producción de moléculas de adhesión), podrían influir en el desarrollo y progresión de la enfermedad de Alzheimer.<sup>[69]</sup>

Por otra parte, durante la enfermedad de Parkinson, la lesión o muerte de las neuronas dopaminérgicas ocasiona la liberación de las proteínas contenidas en su interior, principalmente  $\alpha$ -sinucleína, convirtiendo a la sustancia negra en un sitio proinflamatorio activo. Esto conlleva a una respuesta inmune de adhesión de linfocitos T y una inflamación sistémica que se atribuye a dos causas principales: incremento de la apoptosis de los leucocitos de la periferia y la expresión de moléculas de adhesión endotelial como las ya discutidas.<sup>[70-72]</sup>

De igual forma, la sobreexpresión de E-selectina ha sido ampliamente estudiada en otro tipo de condiciones fisiopatológicas, especialmente en el tráfico de células cancerosas, las cuales imitan a los leucocitos para extravasar el endotelio activado y alojarse en órganos distantes formando tumores secundarios (metástasis).<sup>[61,73,74]</sup> Esto se ha relacionado con la vascularización *de novo* de algunos tumores sólidos primarios mediada por esta proteína. Estudios *in Vivo* han demostrado que la migración de células de tumores primarios de carcinoma

de colon, mama y estómago a órganos como hígado y pulmón está sobrerregulada por E-selectina.<sup>[61,75]</sup> En relación al SNC, se ha observado la metástasis en médula espinal de cáncer de próstata<sup>[76,77]</sup> y también la metástasis en cerebro de cáncer de pulmón y mama.<sup>[78-80]</sup> La malignidad de estas células cancerosas está directamente relacionada con la presencia anormal de proteínas glicosiladas con gran afinidad por E-selectina como PSLG-1, ESL-1, CD44 (HCELL), CD43, DR3, LAMP-1, LAMP-2 y recientemente L1CAM, encontrada en células de cáncer colorectal.<sup>[74,81,82]</sup> Por esta razón, el bloqueo o silenciamiento de E-selectina ha sido, hasta ahora, la mejor alternativa para impedir la progresión tumoral *in Vivo*.<sup>[77,83]</sup>

En este sentido, E-selectina y sus ligandos glicomiméticos siguen siendo el centro de atención de la comunidad científica para aliviar los síntomas de las patologías antes mencionadas, más aún, al ser una potencial proteína blanco donde pueden dirigirse fármacos a un sitio anatómico tan complejo como el SNC.

## 1.2 PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN

En años recientes se ha reportado la síntesis de nanotransportadores en base a dendrímeros PAMAM unidos a pTAT con la capacidad de entregar variedad de moléculas como oligonucleótidos<sup>[84]</sup>, ácidos nucleicos (terapia génica)<sup>[85]</sup>, drogas antitumorales<sup>[86]</sup>, entre otros. En todos los casos se observó la internalización del sistema PAMAM-pTAT en las células objeto de estudio, pero no en todos se logró



disminuir la citotoxicidad. De igual manera se ha estudiado el sistema conjugado L-PAMAM-pTAT, donde el ligando (L) no necesariamente es reconocido por un receptor, pero su interacción con la membrana plasmática facilita el mecanismo de endocitosis, como es el caso de *b*-colesterol<sup>[87]</sup> y las bacterias magneto-tácticas (BMPs).<sup>[88]</sup> Un estudio relativo a procesos inflamatorios describe el diseño de nanotransportadores bifuncionales cRGDyC-PAMAM-pTAT para el potencial tratamiento de enfermedades neovasculares.<sup>[89]</sup> El péptido cíclico cRGDyC tiene una fuerte afinidad por la  $\alpha\beta 3$  integrina, una proteína que se sobreexpresa durante la angiogénesis en enfermedades como artritis reumatoide, crecimiento tumoral y metástasis. En todos los sistemas sintetizados el grado de sustitución de cRGDyC fue mayor al de pTAT; se observó que el sistema con mayor número de péptidos por molécula de PAMAM tuvo la máxima captación celular, lo que sugiere un papel predominante del péptido cRGDyC en el reconocimiento celular previo a la internalización mediada por pTAT.

A pesar de las aplicaciones dadas al pTAT, su uso en el diseño y síntesis de nanotransportadores bifuncionalizados con ligandos afines a proteínas constituye un número ínfimo de ejemplos; en apariencia, ninguno está directamente relacionado a enfermedades del SNC. Por tal motivo, estos antecedentes constituyen un fundamento importante para la síntesis de nuevas nanoplataformas basadas en dendrímeros PAMAM y conjugadas con ligandos específicos de proteínas sobreexpresadas en la manifestación de enfermedades del SNC.

La propuesta de esta investigación se basó en diseñar y sintetizar un nuevo nanotransportador de fármacos bifuncional con posible aplicación en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y cáncer cerebral basado en el dendrímero PAMAM-G4, el péptido penetrante de células pTAT y un péptido de gran afinidad por la proteína blanco E-selectina (PAE).

Para ello, se realizó una búsqueda de péptidos glicomiméticos al sLe<sup>X</sup> con conocida afinidad por la proteína. De los péptidos reportados DITWDQLWDLMK,<sup>[90]</sup> YRNFWFGRW<sup>[91]</sup> e IELLQAR,<sup>[92]</sup> éste último llamó la atención por ser un péptido pequeño y además poco explorado en cuanto a modificaciones estructurales necesarias para mejorar su afinidad por la proteína. Además, recientemente se ha utilizado en la síntesis de conjugados con dermatán sulfato denominados EC-SEAL, como compuestos miméticos del glicocáliz, para estudiar la actividad antiplaquetaria y el reclutamiento de neutrófilos por células endoteliales que sobreexpresan a la proteína de adhesión vascular E-selectina,<sup>[93,94]</sup> mostrando excelentes resultados.

En este sentido, se eligió a IELLQAR como péptido nativo para estudiar, en primer lugar, sus modos de unión y afinidad por E-selectina mediante cálculos de *docking*, simulaciones de DM y cálculos de energía libre de unión por el método MM/GBSA. A partir de las interacciones polares observadas entre los residuos de aminoácidos se modificó el esqueleto peptídico mediante un diseño racional para dar lugar a nuevos péptidos mutantes de mayor afinidad.

La afinidad experimental de los péptidos candidatos seleccionados se evaluó por la técnica de MST y se seleccionó al mutante CIELFQAR como ligando para la síntesis del nuevo nanotransportador bifuncional AC50-pTAT-CIELFQAR. Asimismo, se sintetizó un nanotransportador control con el péptido C-nativo CIELLQAR para comparar sus características estructurales en los ensayos de viabilidad e internalización celular. La acetilación previa del dendrímero PAMAM-G4 condujo a la disminución de su carga superficial y con ello se pudo reducir la citotoxicidad de sus derivados.

Los nanotransportadores indujeron una alta supervivencia celular en las líneas HUVEC/TERT2 y T98G, que representan un modelo de célula endotelial de la BHE y un modelo de cáncer cerebral. En particular, el dendrímero AC50-pTAT-CIELFQAR mostró una mayor afinidad por E-selectina en los ensayos de internalización celular *in Vitro*, lo que valida todos los diseños experimentales planteados.

### **1.2.1 Hipótesis**

A través de estudios computacionales validados por ensayos experimentales es posible encontrar péptidos de gran afinidad por la E-selectina ( $K_d < 1 \text{ mM}$ ) que puedan unirse covalentemente al dendrímero PAMAM-pTAT para sintetizar un nuevo nanotransportador bifuncional PAE-PAMAM-pTAT, capaz de ser captado e internalizado eficientemente por células del SNC.

### **1.2.2 Objetivo General**

Diseñar y sintetizar un nuevo nanotransportador bifuncional basado en el dendrímero PAMAM-pTAT y un péptido de gran afinidad por E-selectina (PAE).

### **1.2.3 Objetivos Específicos**

- i. Identificar péptidos con gran afinidad por el sitio activo de la proteína blanco E-selectina mediante técnicas bioinformáticas.
- ii. Evaluar la afinidad de los péptidos seleccionados con E-selectina mediante ensayos experimentales.
- iii. Sintetizar el nanotransportador conjugado PAE-PAMAM-pTAT y evaluar su citotoxicidad.
- iv. Evaluar la internalización del nuevo nanotransportador bifuncional PAE-PAMAM-pTAT en células del SNC.



# ***CAPÍTULO 2. Metodología***



## 2.1 DISEÑO DE EXPERIMENTOS PARA LA VECTORIZACIÓN, SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DEL NANOTRANSPORTADOR BIFUNCIONAL

### 2.1.1 Búsqueda de Péptidos “hit” afines con el sitio activo de E-selectina

#### 2.1.1.1 Preparación de la proteína y los péptidos

La estructura cristalina de E-selectina humana fue obtenida desde la base de datos de Protein Data Bank,<sup>[95]</sup> formando el complejo E-selectina/sLe<sup>x</sup> (código de referencia 1G1T)<sup>[96]</sup> a una resolución cristalográfica de 1,5 Å. El servidor Swiss-Model se utilizó para evaluar la secuencia de la estructura de la proteína en búsqueda de residuos faltantes. Los estados de protonación de los residuos ionizables se estimaron en condiciones fisiológicas (pH 7,4) utilizando los servidores PROPKA<sup>[97]</sup> y/o H++ (<http://biophysics.cs.vt.edu/>).<sup>[98]</sup> El péptido glicomimético IELLQAR reportado por Fukuda et.al<sup>[92]</sup> se utilizó como ligando de referencia para posteriores mutaciones. El diseño de nuevos péptidos glicomiméticos se logró cambiando algunos residuos como resultado de la exploración previa de interacción de éstos con la superficie del sitio de unión. La construcción de los péptidos se realizó utilizando el módulo LEaP del software AmberTools 16.21. Los parámetros de estructura tanto para la proteína como para los diferentes péptidos se describieron con el campo de fuerza ff14SB.<sup>[99]</sup>

### 2.1.1.2 Docking molecular

El cálculo automatizado de *docking* molecular se realizó empleando el software AutoDock Vina (v 1.5.6)<sup>[100]</sup> en el dominio Lectina, donde se encuentra el sitio de unión de E-selectina y su ligando natural sLe<sup>x</sup>. La preparación de péptidos se realizó utilizando el software AutoDockTools agregando hidrógenos polares, cargas parciales de Gasteiger y estableciendo restricciones de rotación para los enlaces amida y guanidina. El bolsillo de unión se delimitó a una rejilla cúbica de 18 Å centrada en la coordenada atómica del ión Ca<sup>2+</sup>, en la que se realizó un *docking* de ligando flexible manteniendo una estructura rígida de la proteína. De acuerdo a la función de puntuación, se seleccionaron las conformaciones mejor clasificadas para las poses de unión de los péptidos a fin de establecer posteriormente las estructuras iniciales en las simulaciones de dinámica molecular.

### 2.1.1.3 Simulaciones de Dinámica Molecular para E-selectina/péptidos

Una vez obtenidas las coordenadas iniciales de cada péptido en el sitio activo, los complejos Proteína-Péptido se sometieron a simulaciones de DM completamente atomísticas de 20 ns. Todos los sistemas se centraron y solvataron en una caja cúbica de 10 Å de longitud con moléculas de agua modelo TIP3P, seguido de una neutralización general con contraiones de Na<sup>+</sup>. Para tratar interacciones de largo alcance se utilizaron condiciones periódicas de contorno

según el método de Particle Mesh Ewald (PME), mientras que las interacciones no covalentes se calcularon con un cut-off de 8 Å. Las longitudes de los enlaces se restringieron a sus valores iniciales mediante el algoritmo SHAKE.<sup>[101]</sup> Las simulaciones de DM se realizaron utilizando los módulos *sander* y *pmemd* para las minimizaciones y calentamientos, mientras que las producciones se llevaron a cabo utilizando el software *pmemd.cuda* bajo las implementaciones mejoradas por GPU de Amber16. El protocolo consistió en a) 5000 pasos de minimización utilizando el método de descenso por gradiente seguido de 5000 ciclos de minimización de gradiente conjugado, b) 100 ps de equilibrio NVT, en el que los sistemas se calentaron progresivamente de 0 a 300 K, y finalmente c) 20 ns de dinámica de producción NPT sin restricciones a 300 K y 1 bar, con un intervalo de tiempo de 40 fs. La estabilidad Proteína-péptido se estimó mediante análisis de trayectoria RMSD utilizando el software VMD.

Los cálculos de MM/GBSA se realizaron con estos datos de producción preliminares para comparar los valores de energía libre de unión entre péptidos mutantes y IELLQAR (nativo). Se eligieron cuatro péptidos mutantes con los valores más bajos de  $\Delta G_{\text{bin}}$  como péptidos "*hit*" para E-selectina. La identificación de formación de puentes salinos y enlaces de hidrógeno fue posible a través de los análisis de trayectorias alineadas con los correspondientes complementos del software VMD, considerando cut-off de 4.5 y 5.0 Å respectivamente, y un corte de ángulo de enlace de hidrógeno de 20°. Estos resultados fueron representados en mapas de calor, los cuales se graficaron utilizando el paquete ggplot2 del

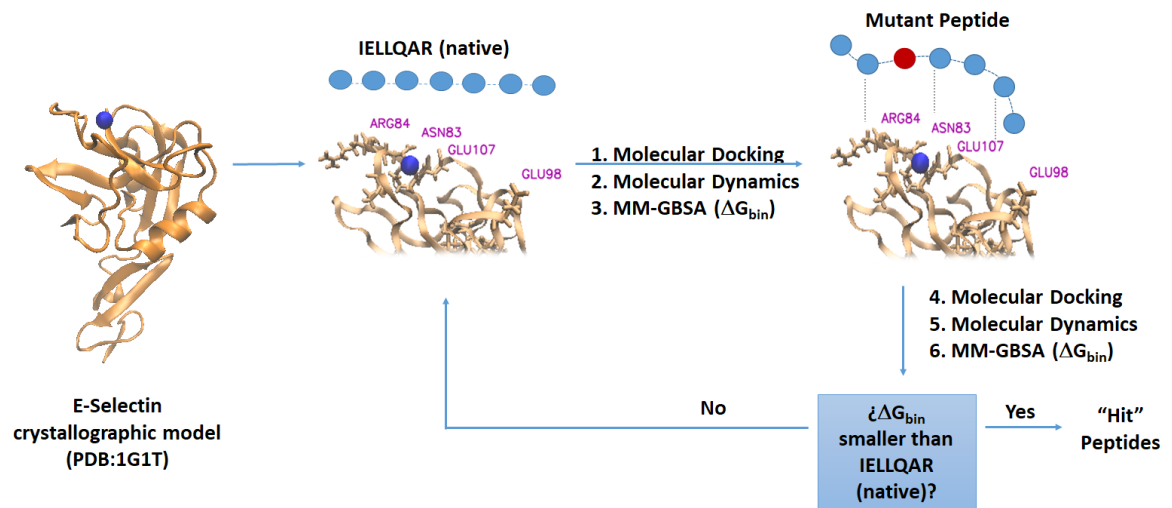


lenguaje de programación estadística R. Se utilizó el software RStudio para la visualización de datos. Se realizaron simulaciones de DM adicionales añadiendo un residuo de cisteína *N*-terminal a los péptidos nativo y "*hit*", cuyo tiempo de producción se incrementó hasta 50 ns para asegurar el equilibrio de los sistemas, partiendo de las estructuras finales recuperadas de 20 ns de simulación.

Considerar la incorporación de cisteína *N*-terminal a los péptidos "*hit*" es crucial, si se tiene en cuenta que la conjugación de éstos al dendrímero PAMAM es una etapa clave para la obtención de los nuevos nanotransportadores, ya que la cisteína tiene una química de bioconjugación bien establecida y reproducible lo cual garantiza el buen desarrollo de las etapas experimentales.

#### 2.1.1.4 Cálculos de energía libre por el método MM/GBSA

Los cálculos de MM/GBSA se llevaron a cabo utilizando el protocolo de trayectoria única en el que los conjuntos necesarios para los cálculos de energía libre de unión se recuperaron de los frames extraídos de los últimos 10 ns (simulaciones cortas) o 25 ns (simulaciones largas) de las trayectorias equilibradas de DM de los complejos E-selectina/péptido utilizando el módulo MMPBSA.py de Amber16.<sup>[102]</sup> Los cálculos de GB se realizaron utilizando el modelo de GB modificado por OBC, con los parámetros  $\alpha/\beta/\gamma$  de 1.0, 0.8 y 4.85 (igb = 5). En la figura 2.1 se resume el diseño de la metodología computacional empleada para la búsqueda de péptidos con mayor afinidad por E-selectina.



**Figura 2.1** Esquema integrado para el protocolo de cálculos computacionales. El primer análisis se realizó para IELLQAR (nativo). Los péptidos mutantes se sometieron luego a análisis iterativo.

## 2.1.2 Ensayos de Afinidad de los péptidos “hit” por la proteína E-selectina

### 2.1.2.1 Determinación de la afinidad de unión por termoforesis a microescala

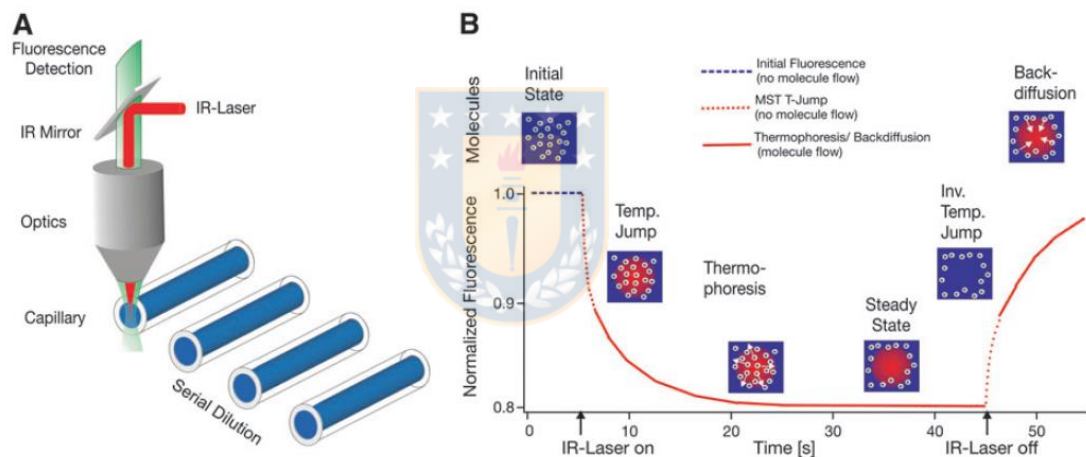
Las medidas de MST se realizaron con el equipo Monolith™ NT.115<sup>Pico</sup> (NanoTemper Technologies GmbH, Alemania) ubicado en el Laboratorio de Biofármacos Recombinantes de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción (Chile).

La proteína E-selectina (ADP1-200, Recombinant Human E-Selectin/CD62E, R&D Systems, Inc., EE.UU) se marcó con una sonda fluorescente en el rojo

lejano, siguiendo las instrucciones del kit de marcaje RED-NHS amino reactivo de segunda generación (MO-L011, NanoTemper Technologies GmbH, Alemania). La proteína se marcó con una relación molar colorante:E-selectina de 0,67. El buffer MST utilizado para los ensayos (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 0,05%) se complementó con CaCl<sub>2</sub> 1 mM para garantizar modos de unión correctos de los péptidos en el dominio de lectina. A su vez, al buffer MST se añadió PEG-8000 al 0,1% y DTT 5 mM para evitar la agregación de los péptidos durante las corridas. Los péptidos CIELLQAR, CIEELQAR y CIELFQAR (Biomatik, Canadá) se disolvieron *in situ* en DMSO y luego se diluyeron en el buffer MST suplementado, hasta obtener concentraciones estables de trabajo de 2,4-0,3 mM y una concentración final de DMSO de 2%.

Se evaluaron diferentes concentraciones de péptidos frente a una concentración constante de E-selectina marcada (1 nM) disuelta en buffer MST suplementado (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, Tween 0,05%). Las muestras se cargaron en capilares premium recubiertos (MO-K025, NanoTemper Technologies GmbH, Alemania), luego se incubaron durante 10 min a 20° C y finalmente se leyeron en el equipo a 25° C. Las mediciones de MST se realizaron utilizando un 60% de potencia MST y un 40% de potencia LED con la ayuda del software MO.Control v.2.3 (NanoTemper Technologies GmbH, Alemania). Los tiempos de encendido y apagado del láser fueron de 0 s y 21 s, respectivamente. Para cada conjunto de experimentos de afinidad, se llevaron a

cabo tres mediciones de MST independientes. Los conjuntos de datos se procesaron con el software MO.Affinity Analysis v2.3 (NanoTemper Technologies GmbH, Alemania), utilizando la fluorescencia normalizada *fraction bound* para graficar las curvas de dosis-respuesta. La determinación de la constante de disociación ( $K_d$ ) se realizó en el intervalo de tiempo de 9 a 10 s. En la figura 2.2 se muestra parte de la instrumentación y del fundamento de la técnica de MST.



**Figura 2.2** Montaje experimental y señal de MST. (A) La fluorescencia dentro del capilar se excita y se mide a través del mismo elemento óptico. Se utiliza un láser de IR enfocado para calentar localmente el volumen de muestra que se observa por fluorescencia y se detecta la termoforesis a través del gradiente de temperatura. B) Señal típica de MST para un capilar. Inicialmente, las moléculas están distribuidas homogéneamente y se mide una "fluorescencia inicial" constante. Al encender el láser de IR, se observa un rápido salto de temperatura (T-jump), seguido de un movimiento termoforético de las moléculas. La disminución de la fluorescencia se mide durante unos segundos. Cuando se apaga el láser IR, se observa un T-Jump inverso, seguido de la difusión inversa de las moléculas, que es netamente impulsada por la difusión de masa, lo que permite deducir información sobre el tamaño de la molécula.<sup>[103,104]</sup>

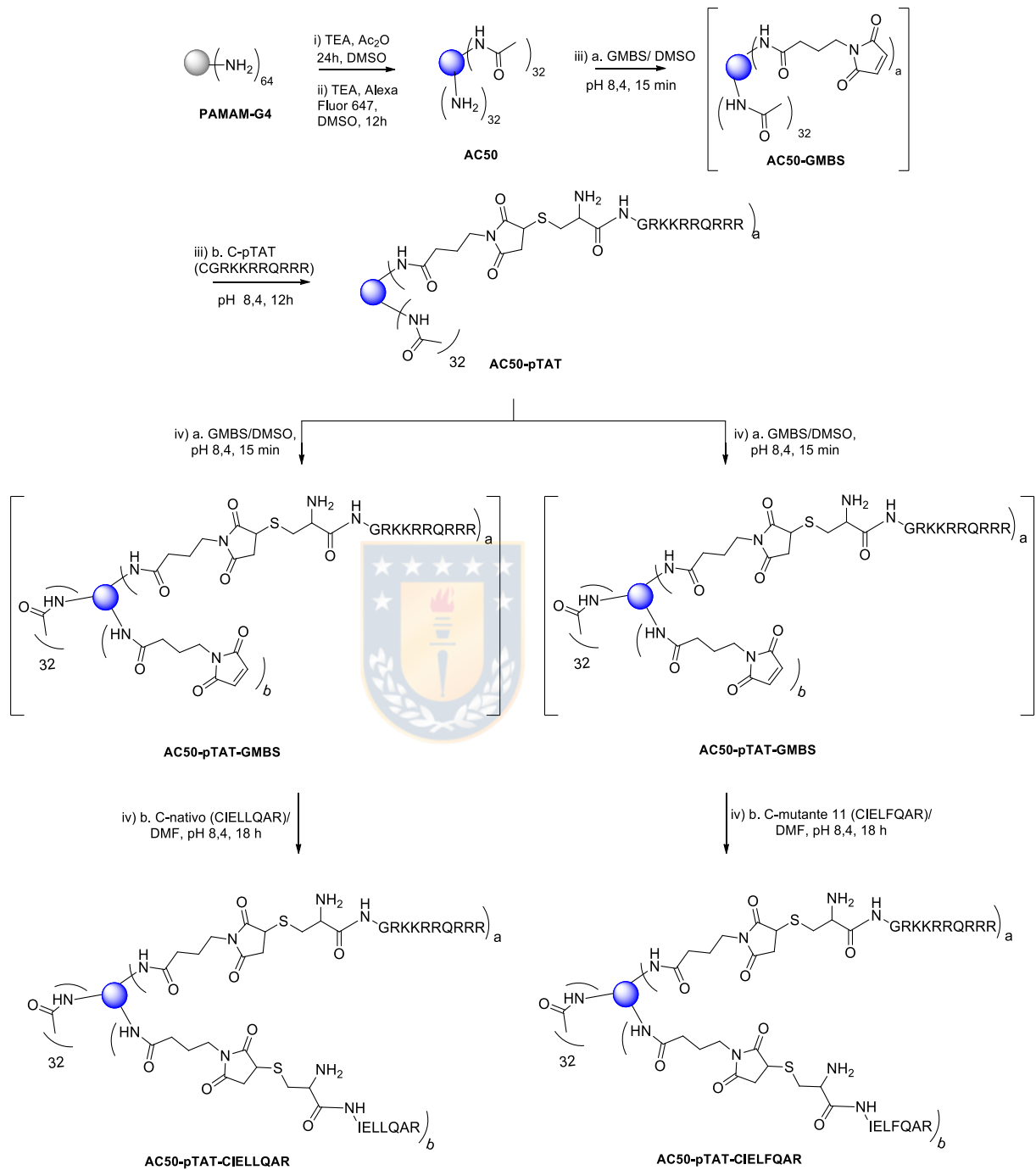
### 2.1.3 Síntesis y caracterización de los nanotransportadores

El dendrímero PAMAM-NH<sub>2</sub> de cuarta generación (412449, solución al 10% en metanol), anhídrido acético (242845), linker *N*-succinimidil-4-maleimidobutirato (63175, GMBS), fueron adquiridos en Sigma-Aldrich. La solución buffer pH 8,0 Certipur® (109460), filtros de centrífuga AMICON® (3 kD, UFC9003; 10 kD, UFC9010) y los solventes TEA, DMSO, DMF, DMSO-*d*<sub>6</sub> y D<sub>2</sub>O fueron adquiridos en Merck KGaA (Alemania). La sonda Alexa Fluor® 647 NHS éster se adquirió en Thermo Fisher Scientific, Inc. (EE. UU). El péptido penetrante de células C-pTAT (CGRKKRRQRRR) y los péptidos afines por E-selectina CIELLQAR (C-nativo) y CIELFQAR (C-mutante 11) fueron sintetizados por Biomatik (Canadá).

En la Figura 2.3 se resumen los pasos de reacción empleados para la obtención de los nanotransportadores bifuncionalizados y más adelante se describen los detalles asociados a cada etapa de la ruta sintética.

#### 2.1.3.1 Dendrímero AC50

La acetilación parcial del dendrímero PAMAM-G4 se realizó siguiendo el método modificado de Waite et. al,<sup>[105]</sup> el cual se describe brevemente. El dendrímero PAMAM-G4 (1,43 mol) fue disuelto en DMSO seco (830 µl) bajo agitación magnética constante. A esta solución se añadió TEA seca (45,75 µmol) y después de cinco minutos, se adicionó anhídrido acético (45,75 µmol) gota a



**Figura 2.3** Ruta sintética para la obtención de nanotransportadores derivados de PAMAM-G4 marcados y no marcados. AC50, AC50-pTAT, AC50-pTAT-CIELLQAR y AC50-pTAT-CIELFQAR.

gota. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación durante 24 h a temperatura ambiente (20 °C). Luego, se diluyó con agua destilada y se filtró usando un filtro de centrífuga AMICON® (3 kD) para eliminar el exceso de solventes orgánicos mediante lavados sucesivos con solución salina tamponada con fosfato (PBS) 1X y agua ultrapura. Finalmente, el producto purificado se secó en una estufa de vacío a 40 ° C durante 24 h.

Para la síntesis del nanotransportador AC50 marcado, se continuó con el siguiente paso después de la adición del anhídrido acético: finalizado el tiempo, a la mezcla de reacción se agregó un exceso de TEA seca. Seguidamente, se añadió, gota a gota, una alícuota de una solución recién preparada de la sonda fluorescente disuelta en DMSO seco (5 mM) y se mantuvo en agitación durante 12 h adicionales. La relación estequiométrica utilizada PAMAM-G4:Alexa Fluor® 647 fue 1:1,02. El procedimiento de purificación se realizó como se describió anteriormente y los derivados marcados se obtuvieron de acuerdo al esquema de síntesis lineal que se muestra en la figura 2.3.

#### 2.1.3.2 Dendrímero conjugado AC50-pTAT

El dendrímero AC50 (0,935 µmol) fue disuelto en buffer Certipur® pH 8,00 (840 µL) en constante agitación magnética. Luego, se añadió lentamente una solución del linker GMBS (7,48 µmol) disuelto en DMSO (50 µL). La mezcla de reacción se colocó en un baño ultrasónico (75 MHz) durante 5 min y se llevó a agitación

magnética durante 10 min adicionales. Posteriormente, se agregó, gota a gota, el péptido C-pTAT (5,61  $\mu\text{mol}$ ) disuelto en buffer pH 8,00 (60  $\mu\text{L}$ ) en un intervalo de 5 min, asistido por el baño ultrasónico. La reacción se incubó durante 12 h a temperatura ambiente (20 °C) con agitación magnética continua. La purificación se realizó en filtros de ultracentrífuga AMICON® (3 kD) haciendo lavados sucesivos con agua ultrapura. El concentrado se colocó en viales que fueron posteriormente secados al vacío a 40° C durante 24 h.

#### 2.1.3.3 Dendrímeros conjugados AC50-pTAT-CIELLQAR/CIELFQAR

El dendrímero AC50-pTAT (0,54  $\mu\text{mol}$ ) se disolvió en buffer pH 8,00 (430  $\mu\text{L}$ ) bajo constante agitación magnética. A esta solución, se añadió, gota a gota, el linker GMBS (3,23  $\mu\text{mol}$ ) disuelto en DMSO (40  $\mu\text{L}$ ) durante 10 min en el baño ultrasónico y se llevó a agitación magnética por 5 min adicionales. A continuación, se agregó gota a gota una solución recién preparada del péptido CIELLQAR o CIELFQAR (2,15  $\mu\text{mol}$ ) en DMF (70  $\mu\text{L}$ ) a la mezcla de reacción durante 15 min en el baño de ultrasonido (75 MHz) o hasta la disolución de todos los reactivos. Posteriormente, la mezcla se mantuvo en agitación magnética durante 18 h. La relación estequiométrica AC50-pTAT:GMBS:C-péptido fue 1:6:4. Los productos finales se purificaron como se describió previamente.

La caracterización de cada sistema nanotransportador, así como la estimación del grado de funcionalización, se realizó mediante Resonancia Magnética



Nuclear (RMN) utilizando técnicas unidimensionales y bidimensionales en un equipo Bruker Ascend 400 MHz. El disolvente de RMN utilizado fue D<sub>2</sub>O a menos que se indique lo contrario.

## **2.1.4 Ensayos de Citotoxicidad de los nanotransportadores**

### **2.1.4.1 Cultivo de células**

Las células HUVEC/TERT2 (CRL-4053, ATCC®) se cultivaron con medio basal de células vasculares (PCS-100-030™, ATCC®), suplementado con el kit de crecimiento de células endoteliales VEGF (PCS-100-041™, ATCC®), mientras que las células T98G (CRL-1690, ATCC®) se cultivaron usando medio RPMI 1640 (31800022, Gibco®) suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 10%. Las células se mantuvieron a 37° C en una cámara humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>.

### **2.1.4.2 Ensayos de viabilidad celular**

La citotoxicidad de los dendrímeros PAMAM conjugados se evaluó en ambas líneas celulares utilizando dos enfoques diferentes que se detallan a continuación:

En microplacas de 96 pocillos se sembró un total de  $3 \times 10^3$  (T98G) o  $5 \times 10^3$  (HUVEC/TER2) células por pozo, éstas se incubaron durante 24 h para permitir

la adherencia. Acto seguido, se lavaron las células con PBS 1X y se les añadieron medios frescos con diferentes concentraciones de dendrímeros (0,1 - 10  $\mu$ M). Se utilizó una solución de Tritón al 0,1% como control inductor de muerte y células sin tratamiento como referencia de una supervivencia del 100%. Al finalizar el tiempo de incubación (24 h o 48 h), se evaluó la viabilidad de las células utilizando el kit de ensayo de proliferación celular en solución acuosa CellTiter 96® (MTS) (G3580, Promega). Para ello, se reemplazó el medio con tratamiento por medio fresco que contenía un porcentaje de este reactivo, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La absorbancia se midió 2 h después en un lector de microplacas de ELISA (Labsystem Multiskan MS MCC/340) a 492 nm. De inmediato, las células se lavaron con PBS 1X y se fijaron con paraformaldehído al 3,7% en PBS 1X durante 15 minutos, luego se lavaron y se tiñeron con una solución de cristal violeta al 0,1% con el fin de evaluar la densidad celular. Posteriormente, las células se lavaron con PBS 1X y agua bidestilada hasta eliminar todo el colorante no absorbido. Las placas se secaron a temperatura ambiente y el colorante se eluyó con una solución de ácido acético al 10%. La absorbancia se cuantificó a 540 nm utilizando un lector de microplacas Multiskan.

Los datos obtenidos se normalizaron y graficaron utilizando el software estadístico GraphPad Prism versión 9.0. Las células sin tratamiento se utilizaron como control de normalización. Para evaluar las diferencias entre los datos, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con una prueba Tukey post-hoc considerando un valor  $p \leq 0,05$  como estadísticamente significativo.

## **2.1.5 Ensayos de internalización del nanotransportador bifuncionalizado PAE-PAMAM-pTAT**

### **2.1.5.1. Captación celular**

Las células (HUVEC/TERT2 o T98G) se sembraron en cubreobjetos que se encontraban dentro de placas de 6 pozos, a una densidad de  $1,2 \times 10^4$  células por pozo. Tras la adhesión, un grupo de células fue tratado con los agentes proinflamatorios TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) (210-TA, R&D Systems, EE. UU.) o PMA (1 ng/mL) (P1585, Sigma-Aldrich, Co., EE. UU) para inducir la sobreexpresión de E-selectina<sup>[106]</sup>, mientras que el otro grupo se mantuvo con la expresión basal de la proteína. Al término de 4 h o 6 h de incubación, se añadieron soluciones de los nanotransportadores, basados en dendrímeros PAMAM conjugados, al medio de cultivo de ambos grupos para alcanzar una concentración final de 0,50 ó 0,75  $\mu$ M en cada pozo. Finalmente, las células fueron incubadas durante 6 h y 12 h adicionales para evaluar la internalización de los nanotransportadores, y posteriormente se fijaron para la tinción de inmunofluorescencia indirecta.

Para el ensayo de selectividad por E-selectina, se sembró la misma cantidad de células en las placas de 6 pozos; sin recibir tratamiento con los agentes proinflamatorios. Éstas se incubaron con el anticuerpo primario anti-E-selectina (25 mg/mL) (sc-137054, Santa Cruz Biotechnology, Inc., EE. UU.) durante 1 h para bloquear el sitio de unión de la proteína. En seguida, se añadieron los

dendrimeros conjugados AC50-pTAT-CIELLQAR y AC50-pTAT-CIELFQAR al medio de cultivo y se incubaron como se ha descrito anteriormente.

#### 2.1.5.2. Inmunofluorescencia indirecta e imágenes celulares

Una vez fijadas, las células se permeabilizaron utilizando Tritón X100-PBS al 0,1%. Luego, los sitios de unión inespecíficos se bloquearon con BSA al 0,5%/PBS y las células se incubaron durante la noche a 4° C con el anticuerpo primario anti-E-selectina (sc-137054, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) a una dilución 1:50. Posteriormente, éstas se lavaron con PBS 1X y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes, EE. UU.) a una dilución 1:700 durante 2 h a temperatura ambiente. Los cubreobjetos se lavaron y se montaron en portaobjetos usando medio de montaje *antifading* VECTASHIELD® Vibrance™ con DAPI (H-1800, Vector Laboratories, EE. UU.). Los portaobjetos se analizaron en un microscopio de fluorescencia EVOS FL (Thermo Fisher Scientific, Inc.) con el objetivo de 40X.

La fluorescencia de la E-selectina y de los dendrimeros derivados PAMAM se cuantificó mediante el método de fluorescencia celular total corregida (CTCF). Para evaluar la diferencia de datos entre dos grupos se realizó una prueba *t* de *student* no apareada en el software GraphPad Prism 9.0. Un valor  $p \leq 0,05$  se consideró estadísticamente significativo.

# ***CAPÍTULO 3. Resultados y Discusión***

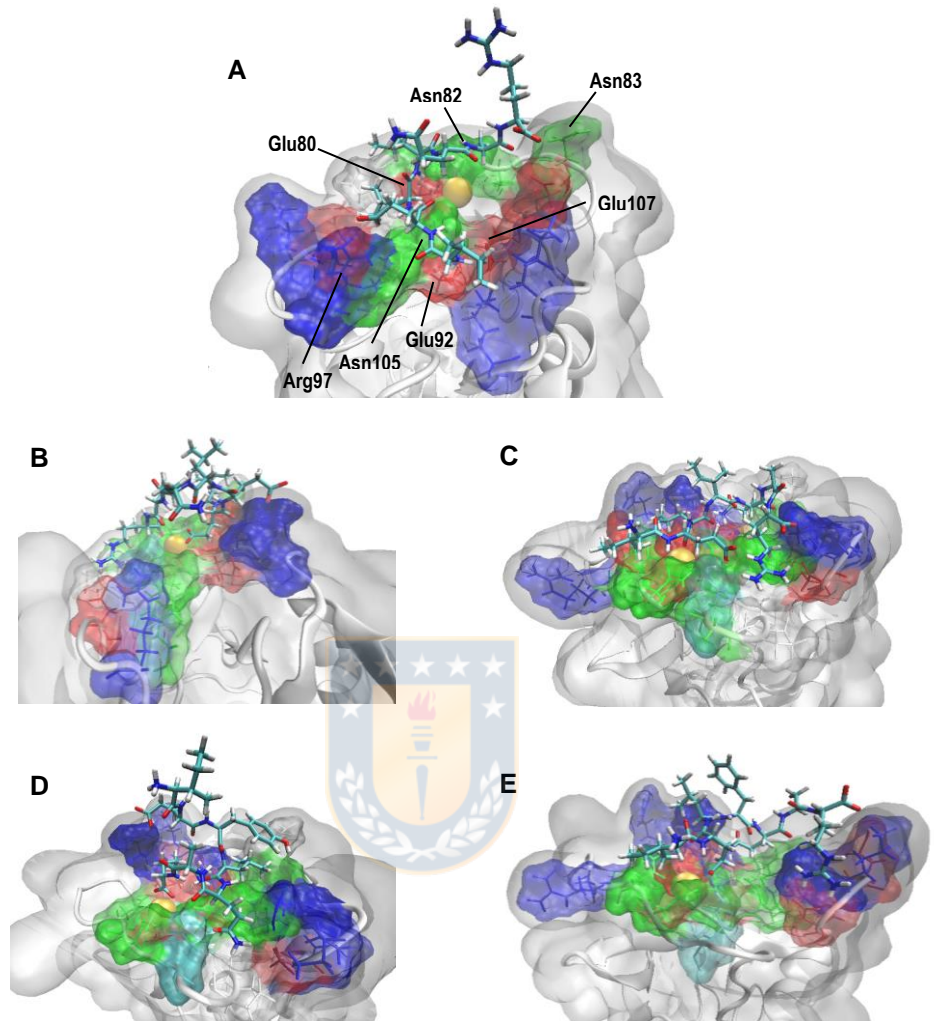


## 3.1 CÁLCULOS COMPUTACIONALES

### 3.1.1 Estudio teórico de la afinidad del péptido IELLQAR por E-selectina

El péptido IELLQAR (nativo) es un péptido glicomimético al tetrasacárido de Lewis (sLe<sup>X</sup>) y, al igual que éste, se une a E-selectina en el dominio lectina, dependiente del ion Ca<sup>2+</sup>. Para estudiar primero su modo de asociación a la proteína, se llevaron a cabo cálculos de *docking*, simulaciones cortas de DM (20 ns) y cálculos de energía libre de unión ( $\Delta G_{\text{bind}}$ ) por el método MM/GBSA siguiendo el protocolo previamente descrito.

Las interacciones entre los residuos proteína-péptido se delimitaron dentro de un radio de 5 Å utilizando el software VMD (Fig. 3.1). A lo largo de la trayectoria, el péptido IELLQAR mostró interacciones con un total de 11 residuos del sitio activo de E-selectina (Fig. 3.1A). Seis de ellos coinciden con lo reportado para sLe<sup>X</sup>[107] en su interacción con Glu80, Asn82, Asn83, Glu92, Arg97 y Glu107, mientras que los otros cinco, corresponden a Tyr94, Lys99, Asp100, Lys111 y Lys113, los cuales se han reportado recientemente en los modos de unión de pequeños fármacos glicomiméticos al sLe<sup>X</sup> hallados mediante screening virtual.[108]



**Figura 3.1** Poses de unión de los péptidos en el sitio de unión consenso de E-selectina. La interacción entre los residuos se estimó en una distancia de 5 Å. A) IELLQAR (nativo), B) IEELQAR (mutante 2), C) IEYLQAR (mutante 3), D) IELIQAR (mutante 10) y E) IELFQAR (mutante 11).

Para estimar la fuerza de la asociación proteína-péptido se calculó  $\Delta G_{\text{bind}}$  por el método MM/GBSA utilizando los últimos 250 frames recuperados de 20 ns de trayectorias equilibradas (tabla 3.1). Los cálculos para el péptido nativo IELLQAR

mostraron una energía libre de unión ( $\Delta G_{\text{bind}}$ ) de  $-26,14 \pm 0,40 \text{ kcal mol}^{-1}$ . La descomposición de la energía libre proporcionó información adicional, en la que se observó que la contribución principal proviene de la energía electrostática ( $\Delta G_{\text{ele}}$ ) (Anexo 1). Esto concuerda con la naturaleza altamente polar de algunos aminoácidos que constituyen el péptido nativo y las propiedades donoras-aceptoras que ellos poseen para formar enlaces de hidrógeno intermoleculares.

Teniendo en cuenta lo anterior, era necesario identificar y diferenciar los residuos importantes de aquellos lábiles (menor interacción con el sitio activo) en IELLQAR para eventualmente modificar su estructura y dar lugar a nuevos péptidos glicomiméticos de mayor afinidad por E-selectina. En este sentido, el análisis visual de la topología en la formación del complejo E-selectina/IELLQAR fue complementado con los hallazgos reportados previamente por Fukuda et. al,<sup>[92]</sup> donde se evaluó la afinidad experimental de otros péptidos obtenidos juntamente con IELLQAR mediante una biblioteca de fagos (*phage display*).

Al comparar los 3 péptidos de mayor afinidad IELLQAR > IDLMQAR > ISLLQAR se hizo evidente la importancia del residuo Glu2 en la estructura. Cuando Glu2 fue reemplazado por otros residuos aniónicos (Asp2), polares (Ser2) o hidrófobos (Ile2), la afinidad experimental disminuyó en el mismo orden IDLMQAR < ISLLQAR < IILLQAR, por lo que era posible que Glu2 participara directamente en la estabilización del complejo con E-selectina. Se hizo un análisis similar al comparar los péptidos IELLQAR e IFLLWQR, en donde la afinidad experimental



de éste último por la proteína disminuyó drásticamente con el cambio simultáneo en Glu2, Gln5 y Ala6 por Phe2, Trp5 y Gln6. Por esta razón, se eligieron los residuos Glu2, Gln5 y Ala6 como residuos importantes de IELLQAR y se asumió que las posiciones 1, 3, 4 y 7 tenían un carácter lábil, es decir, menos determinantes en la interacción E-selectina/péptido.

En consecuencia, para el diseño racional de los nuevos péptidos mutantes se realizaron modificaciones no simultáneas sobre los residuos lábiles (Ile1, Leu3, Leu4, Arg7) identificados en el esqueleto del péptido nativo IELLQAR.

### **3.1.2 Búsqueda de péptidos mutantes de mayor afinidad por E-selectina**

Se diseñaron y evaluaron dieciséis péptidos mutantes glicomiméticos a sLe<sup>x</sup> siguiendo los protocolos descritos para *docking* molecular, DM y MM/GBSA, de acuerdo a la metodología condicional e iterativa planteada en la Figura 2.1.

Con el fin de mejorar la fuerza de unión de IELLQAR (nativo) en la posición 3, se decidió explorar la naturaleza de las interacciones reemplazando a Leu3 por los residuos Lys3 (catiónico), Glu3 (aniónico) y Tyr3 (hidrofóbico). El cambio por Lys3 (IEKLQAR, mutante 1) no mejoró la unión, probablemente debido a la formación de un puente salino intramolecular que involucra a Glu2-Lys3. Sin embargo, se observó un resultado opuesto al cambiar por Glu3 (IEELQAR, mutante 2) y Tyr3 (IEYLQAR, mutante 3), donde la energía libre de unión disminuyó considerablemente en ambos casos (tabla 3.1).

**Tabla 3.1** Estimación de las energías libres de unión para la asociación E-selectina/Péptido obtenidas por el método MM/GBSA.

| Nombre            | Péptido | Secuencia                   | $\Delta G_{\text{bind}}$ (kcal mol <sup>-1</sup> ) |
|-------------------|---------|-----------------------------|--|
| <i>nativo</i>     | IELLQAR | Ile-Glu-Leu-Leu-Gln-Ala-Arg | -26,14 ± 0,40                                      |
| <i>mutante 1</i>  | IEKLQAR | Ile-Glu-Lys-Leu-Gln-Ala-Arg | -6,509 ± 0,42                                      |
| <i>mutante 2</i>  | IEELQAR | Ile-Glu-Glu-Leu-Gln-Ala-Arg | -54,80 ± 0,53                                      |
| <i>mutante 3</i>  | IEYLQAR | Ile-Glu-Tyr-Leu-Gln-Ala-Arg | -32,41 ± 0,52                                      |
| <i>mutante 4</i>  | VEYLQAR | Val-Glu-Tyr-Leu-Gln-Ala-Arg | -12,43 ± 0,43                                      |
| <i>mutante 5</i>  | LEYLQAR | Leu-Glu-Tyr-Leu-Gln-Ala-Arg | -2,333 ± 0,22                                      |
| <i>mutante 6</i>  | FEYLQAR | Phe-Glu-Tyr-Leu-Gln-Ala-Arg | -3,165 ± 0,28                                      |
| <i>mutante 7</i>  | IEYLQAT | Ile-Glu-Tyr-Leu-Gln-Ala-Thr | -8,27 ± 0,37                                       |
| <i>mutante 8</i>  | IEYLQAM | Ile-Glu-Tyr-Leu-Gln-Ala-Met | -28,93 ± 0,33                                      |
| <i>mutante 9</i>  | IEYLQAN | Ile-Glu-Tyr-Leu-Gln-Ala-Asn | -10,75 ± 0,46                                      |
| <i>mutante 10</i> | IELIQAR | Ile-Glu-Leu-Ile-Gln-Ala-Arg | -30,01 ± 0,38                                      |
| <i>mutante 11</i> | IELFQAR | Ile-Glu-Leu-Phe-Gln-Ala-Arg | -30,28 ± 0,41                                      |
| <i>mutante 12</i> | IELVQAR | Ile-Glu-Leu-Val-Gln-Ala-Arg | 1,320 ± 0,27                                       |
| <i>mutante 13</i> | VELLQAR | Val-Glu-Leu-Leu-Gln-Ala-Arg | -28,49 ± 0,36                                      |
| <i>mutante 14</i> | VELKQAR | Val-Glu-Leu-Lys-Gln-Ala-Arg | -13,93 ± 0,43                                      |
| <i>mutante 15</i> | IELEQAR | Val-Glu-Leu-Glu-Gln-Ala-Arg | -9,372 ± 0,29                                      |
| <i>mutante 16</i> | VELYQAR | Val-Glu-Leu-Tyr-Gln-Ala-Arg | -11,81 ± 0,48                                      |

Partiendo entonces de la estructura IEYLQAR (mutante 3), se estudió la labilidad de Ile1 al reemplazarlo por residuos de la misma naturaleza: Val1 (VEYLQAR, mutante 4), Leu1 (LEYLQAR, mutante 5) y Phe1 (FEYLQAR, mutante 6). Curiosamente, los valores de  $\Delta G_{\text{bind}}$  revelaron que el aminoácido hidrofóbico Ile1 parece ser importante para la conformación del péptido. Por otro lado, explorando la labilidad de Arg7, ésta se sustituyó por Met7 y se obtuvo para el péptido

IEYLQAM (mutante 8) un valor de  $\Delta G_{\text{bind}}$  similar al de IELLQAR (nativo), lo que sugiere que la longitud del péptido podría ser un requisito importante para la interacción en el sitio activo (tabla 3.1).

Con el objetivo de evaluar la labilidad de Leu4 en IELLQAR (nativo), el residuo fue reemplazado por otros aminoácidos hidrofóbicos: Ile4 (IELIQAR, mutante 10), Phe4 (IELFQAR, mutante 11) y Val4 (IELVQAR, mutante 12). Sorprendentemente, los valores de  $\Delta G_{\text{bind}}$  para el mutante 10 y el mutante 11 disminuyeron hasta  $-30,01 \pm 0,38$  y  $-30,28 \pm 0,41$  kcal mol<sup>-1</sup>. Estos resultados pueden sugerir la existencia de un efecto estérico que estabiliza a ambas estructuras peptídicas, desplazando el equilibrio conformacional hacia la población de conformeros de menor energía. Cabe señalar que las modificaciones adicionales que se realizaron al reemplazar Ile1 y Leu4 (mutantes 13-16) no mejoraron los valores de  $\Delta G_{\text{bind}}$  (tabla 3.1).

De esta manera, se obtuvo un total de dieciséis péptidos mutantes, de los cuales cuatro mostraron una mayor afinidad por E-selectina, convirtiéndose IEELQAR (mutante 2), IEYLQAR (mutante 3), IELIQAR (mutante 10) e IELFQAR (mutante 11) en potenciales ligandos para ser dirigidos a esta proteína.

En la figura 3.1 se muestran los modos de unión de IELLQAR (nativo) y los péptidos mutantes seleccionados con el sitio activo de E-selectina. Si bien a lo largo de las dinámicas de producción las interacciones de estos péptidos “hit” con los residuos Glu80, Glu92 y Asp100 se conservan, no todos interactúan con los

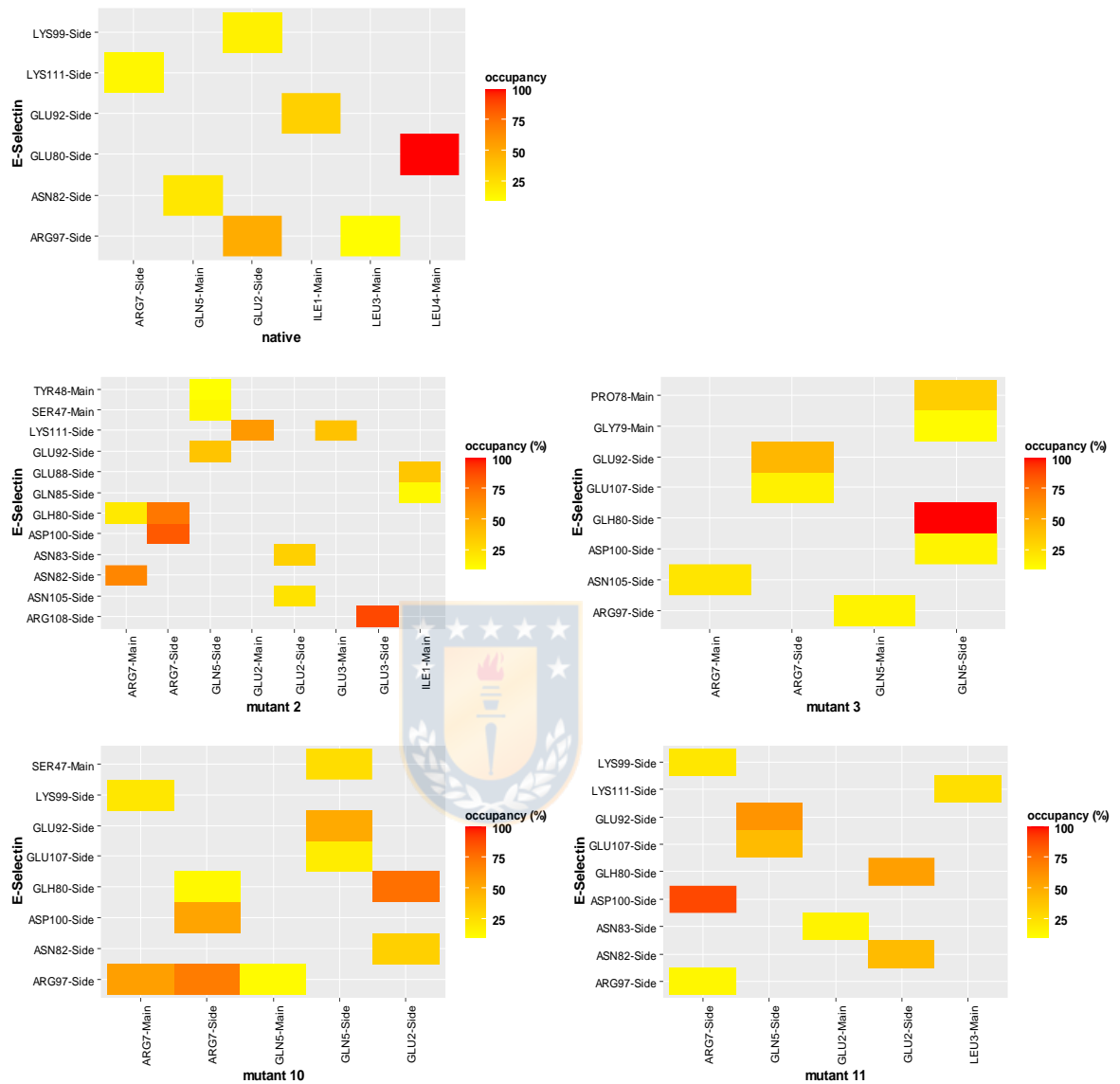
residuos Asn82, Asn83, Arg97, Lys99 y Lys111 (Fig. 3.1B-E), tal como se describió previamente para IELLQAR. A fin de conocer la naturaleza de las interacciones que estabilizan los complejos E-selectina/péptidos se indagó en la formación de enlaces de hidrógeno y puentes salinos a través de análisis de trayectorias de DM en el software VMD con el correspondiente *plug-in*.

### **3.1.3 *Análisis de las interacciones polares entre el péptido nativo y mutantes elegidos con E-selectina***

Se estimó la frecuencia de ocupación de interacciones polares entre pares de residuos tomando los últimos 250 frames recuperados de 20 ns de trayectorias alineadas. Para ello, se consideró un porcentaje de ocupación de al menos 10% en la formación de enlaces de hidrógeno y puentes salinos intermoleculares entre E-selectina y los ligandos peptídicos.

Mediante mapas de calor se logró representar de mejor forma las contribuciones individuales de los residuos del esqueleto peptídico en la estabilidad de los complejos con E-selectina; éstas estuvieron principalmente asociadas a la disminución de la energía libre de unión ( $\Delta G_{\text{bind}}$ ) de los mutantes seleccionados.

En relación a los enlaces de hidrógeno (H-B), se estableció el análisis dentro de un cut-off de 5 Å (Fig. 3.2), para lo cual el péptido IELLQAR (nativo) mostró un total de 7 H-B. Las interacciones más importantes se vieron entre los residuos Leu4-Glu80, Glu2-Arg97 e Ile1-Glu92.



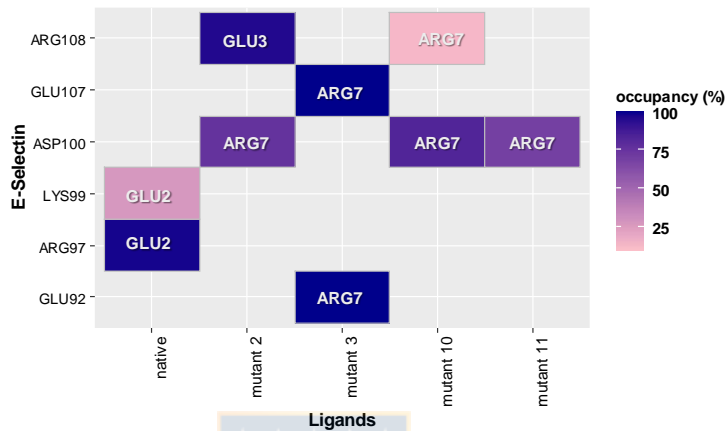
**Figura 3.2** Mapas de calor que indican la formación de enlaces de hidrógeno entre los residuos de los péptidos candidatos y E-selectina. La interacción se calculó a partir de una persistencia de al menos 10% durante los últimos 10 ns de simulación de cada complejo de E-selectina con IELLQAR (nativo), IEELQAR (mutante 2), IEYLQAR (mutante 3), IELIQAR (mutante 10) e IELFQAR (mutante 11).

Las posteriores mutaciones en IELLQAR dieron lugar a cambios conformacionales que promovieron la formación de nuevos enlaces de hidrógeno, diferentes a los mencionados anteriormente, pero similares en cuanto al porcentaje de ocupación. Este es el caso de Glu3-Arg108 y Arg7-Asp100 para el péptido IEELQAR (mutante 2), Gln5-Glu80 y Arg7-Glu92 para IEYLQAR (mutante 3), Glu2-Glu80 y Arg7-Arg97 para IELIQAR (mutante 10), finalmente Arg7- Asp100 y Gln5-Glu92 para IELFQAR (mutante 11).

Como se observa en los mapas de calor, los residuos Gln5 y Arg7 que tuvieron inicialmente los porcentajes de ocupación más bajos en IELLQAR (< 22%) se presentan en un rango mayor de ocurrencia (40-100%) en todos los péptidos mutantes. Asimismo, la participación del residuo Glu2 fue fundamental en la estabilidad de los complejos formados con IEELQAR (mutante 2), IELIQAR (mutante 10) e IELFQAR (mutante 11), mientras que la participación de Ile1 se mantuvo solamente para IELIQAR (mutante 10) en un porcentaje de ocupación similar (38%) al del péptido nativo.

Por otro lado, el análisis de ocurrencia de puentes salinos en los sistemas proteína/péptido se estableció dentro de un cut-off de 4,5 Å. Las interacciones entre los pares se representan en un mapa de calor global que contiene a todos los ligandos (Fig. 3.3). Se puede observar que los puentes salinos de mayor relevancia entre los complejos E-selectina/péptido están constituidos por los

residuos Glu2-Arg97 (nativo), Glu3-Arg108 (mutante 2), Arg7-Glu92 (mutante 3) y Arg7-Asp100 (mutantes 2, 10 y 11).



**Figura 3.3** Mapa de calor que representa de forma general la formación de puentes salinos entre los péptidos candidatos y E-selectina. La interacción se calculó a partir de una persistencia (ocupación) de al menos 10% durante los últimos 10 ns de simulación de cada complejo de E-selectina con IELLQAR (nativo), IEELQAR (mutante 2), estructura IEYLQAR (mutante 3), IELIQAR (mutante 10) e IELFQAR (mutante 11).

De forma general, estos resultados permitieron corroborar la importancia de los residuos Glu2 y Gln5 en los péptidos por su tendencia a formar enlaces de hidrógeno fuertes con E-selectina, y también puentes salinos en el caso de IELLQAR (nativo). A su vez, los análisis también demuestran que Arg7 pasó de ser un residuo lábil en IELLQAR (nativo) para convertirse en una pieza importante dentro de la estructura de los péptidos mutantes por su capacidad de formar de puentes salinos estables en el sitio activo.

Cabe resaltar que las interacciones polares encontradas aquí concuerdan en su mayoría con las reportadas en otros estudios teóricos para sLe<sup>x</sup> y cuatro ligandos glicomiméticos de sLe<sup>x</sup> que involucran principalmente a los residuos Glu80, Asn82, Arg97, Lys99 y Lys111 de la proteína.<sup>[107,108]</sup> Asimismo, las interacciones de los péptidos mutantes son comparables con las reportadas para Ac-IELLQAR-CONH<sub>2</sub>, particularmente aquellas establecidas con los residuos Ser47, Pro78, Glu80, Arg97, Asn105 y Lys111.<sup>[109]</sup>

#### **3.1.4 Simulación de los péptidos candidatos con un residuo N-Cys**

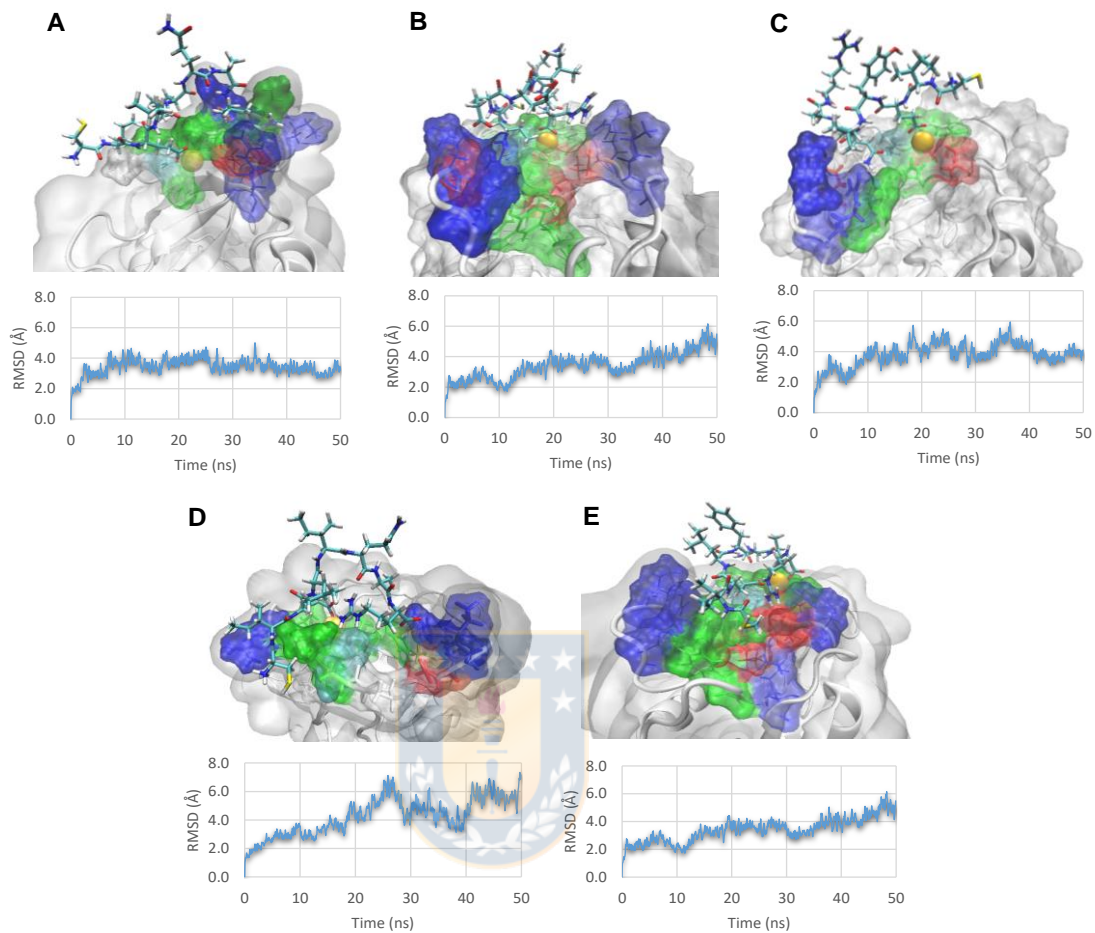
Hasta el momento los péptidos IEELQAR (mutante 2), IEYLQAR (mutante 3), IELIQAR (mutante 10) e IELFQAR (mutante 11) figuran como potenciales candidatos para ser dirigidos a E-selectina en un ensamblaje macromolecular (nanotransportador). No obstante, en el diseño de nanoestructuras de orientación activa con aplicación farmacéutica se requiere de estrategias sintéticas que permitan unir covalentemente a las moléculas activas a través de reacciones de bioconjugación, que se llevan a cabo preferentemente en medios acuosos. En este sentido, se ideó la unión del péptido de mayor afinidad a través de la reacción maleimido-cisteína considerando el extremo N-terminal en Ile1, dada la menor interacción de Ile1 con la proteína. Por lo tanto, fue necesario evaluar una vez más la afinidad por E-selectina de los péptidos mutantes seleccionados con un residuo Cys1 adicional (C-péptidos).



A fin de conocer la estabilidad de los nuevos complejos E-selectina/C-péptido, los tiempos de simulación se incrementaron hasta 50 ns. Se pudo observar a lo largo de las trayectorias que el residuo Cys1 de los C-péptidos no establece interacciones con ninguno de los residuos de E-selectina en un radio de 5 Å, a excepción de CIELFQAR (C-mutante 11), el cual forma enlaces de hidrógeno débiles (< 18%) con Asn105, Glu107 y Glu92 (Fig. 3.4, 3.4E).

En cuanto al resto los residuos, se mantuvo la participación de Glu3, Gln6 y Arg8 en la estabilidad de los complejos formados. Todos los C-péptidos coincidieron en su interacción con Asn82 y algunos de ellos con los residuos Glu80, Asn83, Arg97, Tyr94 y Lys99 de la proteína. Dichas interacciones están representadas gráficamente en la figura 3.4 en los modos de unión de los C-péptidos con el sitio activo de E-selectina (Fig. 3.4A-E).

Adicionalmente, se midió el RMSD de cada péptido para evaluar su estabilidad estructural en el sitio activo utilizando las trayectorias alineadas de los mismos. Los péptidos CIELLQAR, CIELIQAR y CIELFQAR reflejaron una gran estabilidad con un RMSD de  $\sim 3$  Å (Fig. 3.4A, 3.4B, 3.4E). Sin embargo, CIEYLQAR y CIELIQAR mostraron mayores fluctuaciones a lo largo de las trayectorias que se correlacionan con los valores de energía libre de unión obtenidos (Fig. 3.4C, 3.4D).



**Figura 3.4** Estabilidad dinámica de los complejos formados entre E-selectina y los péptidos candidatos modificados con un residuo N-Cys. Los RMSDs fueron obtenidos a partir de trayectorias alineadas de 50 ns considerando el esqueleto proteico y los átomos pesados de cada péptido A) CIELLQAR (C-nativo), B) CIEELQAR (C-mutante 2), C) CIEYLQAR (C-mutante 3), D) CIELIQAR (C-mutante 10) y E) CIELFQAR (C-mutante 11).

Para los cálculos de  $\Delta G_{\text{bind}}$  de los C-péptidos se tomaron los últimos 625 frames recuperados de 50 ns de trayectorias equilibradas (tabla 3.2). Como se observa en la tabla 3.2, la adición de Cys1 le confiere una estabilidad adicional al péptido

nativo IELLQAR en la formación del complejo con E-selectina. De igual forma ocurre con el péptido CIELFQAR (C-mutante 11), cuyo valor de disminuyó hasta  $-44,11 \pm 0,70 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Curiosamente, esta tendencia se revierte para los péptidos CIEELQAR (C-mutante 2), CIEYLQAR (C-mutante 3) y CIELIQAR (C-mutante 10), quienes mostraron una importante pérdida de afinidad por la proteína. Esto coincide con las contribuciones de  $\Delta G_{\text{ele}}$  que sugieren un menor número de interacciones polares entre los complejos (Anexo 2). En consecuencia, los péptidos CIEYLQAR (C-mutante 3) y CIELIQAR (C-mutante 10) se excluyeron de posteriores validaciones experimentales, quedando como candidatos finales CIEELQAR (C-mutante 2) y CIELFQAR (C-mutante 11).



**Tabla 3.2** Estimación de las energías libres de unión para la asociación de E-selectina con los péptidos candidatos modificados con un residuo *N*-Cys obtenidas por el método MM/GBSA.

| Nombre              | Péptido  | Secuencia                       | $\Delta G_{\text{bind}} \text{ (kcal mol}^{-1}\text{)}$ |
|---------------------|----------|---------------------------------|---|
| <b>C-nativo</b>     | CIELLQAR | Cys-Ile-Glu-Leu-Leu-Gln-Ala-Arg | $-28,74 \pm 0,40$                                       |
| <b>C-mutante 2</b>  | CIEELQAR | Cys-Ile-Glu-Glu-Leu-Gln-Ala-Arg | $-33,80 \pm 0,36$                                       |
| <b>C-mutante 3</b>  | CIEYLQAR | Cys-Ile-Glu-Tyr-Leu-Gln-Ala-Arg | $-7,65 \pm 0,35$  |
| <b>C-mutante 10</b> | CIELIQAR | Cys-Ile-Glu-Leu-Ile-Gln-Ala-Arg | $-7,57 \pm 0,21$  |
| <b>C-mutante 11</b> | CIELFQAR | Cys-Ile-Glu-Leu-Phe-Gln-Ala-Arg | $-44,11 \pm 0,70$                                       |

### **3.2 ENSAYO DE AFINIDAD EXPERIMENTAL POR TERMOFORESIS A MICROESCALA (MST)**

Una de las dificultades que se presentó al momento de diseñar el experimento de afinidad de los C-péptidos por E-selectina fue la baja solubilidad de éstos en medio fisiológico, debido al alto porcentaje de residuos hidrofóbicos que conforman sus estructuras.

Aun cuando se han establecido diferentes técnicas para determinar la afinidad proteína-ligando en términos de la constante de disociación ( $K_d$ ), la elección de la adecuada estará restringida a la naturaleza de las moléculas a evaluar así como al valor de  $K_d$  esperado, ya que, para obtener un buen ajuste, se requiere evaluar los ligandos a un rango de concentraciones que exceda de 10 a 100 veces la concentración del receptor.

A este respecto, los métodos desarrollados para medir variaciones en la intensidad de fluorescencia de las moléculas se caracterizan por ser los más accesibles y también figuran entre los de mayor sensibilidad, comparados con otros como calorimetría de titulación isotérmica (ITC) o resonancia del plasmón superficial (SPR). Si bien inicialmente se pensó en diseñar un experimento de competencia por el sitio activo de E-selectina entre los C-péptidos y un fluoróforo externo, se hizo muy difícil llevarlo a cabo dado que la concentración de saturación de éste último para la formación del complejo con E-selectina (300

$\mu\text{M}$ ) ameritaba explorar rangos de concentraciones superiores de los péptidos que no fueron estables en el buffer de prueba.

En la búsqueda de otros métodos alternativos para la determinación de  $K_d$ , y luego de intentar alcanzar este objetivo mediante la cuantificación indirecta de los C-péptidos, la afinidad experimental por E-selectina se realizó finalmente por la técnica de termoforesis a microescala (MST por sus siglas en inglés).

La termoforesis describe el movimiento dirigido de las moléculas a lo largo de un gradiente de temperatura. Una diferencia local de temperatura  $\Delta T$ , inducida por un láser infrarrojo, conduce a un cambio local en la concentración de moléculas solvatadas (agotamiento o enriquecimiento), cuantificado por el coeficiente de Soret  $S_T$ ,  $C_{\text{hot}}/C_{\text{cold}} = \exp(-S_T \Delta T)$ .<sup>[110]</sup> En condiciones de amortiguación constantes, los cambios en la termoforesis de una concentración fija de una molécula fluorescente (receptor) reflejan los cambios en su tamaño, carga o la entropía de solvatación inducidos por la unión de otra molécula no fluorescente (ligando). La medición de este comportamiento a diferentes concentraciones de ligando permite cuantificar la unión y determinar la afinidad.<sup>[104,111]</sup>

Para validar los resultados computacionales, se evaluó experimentalmente la afinidad hacia el sitio activo de E-selectina humana de los péptidos CIEELQAR (C-mutante 2), CIELPQAR (C-mutante 11) y CIELLQAR (C-nativo), sirviendo este último como ligando de referencia. Las medidas de MST se realizaron en un equipo Monolith™ NT.115<sup>Pico</sup>, del que destacan las siguientes ventajas: bajos

límites de detección de la sonda fluorescente ( $\geq 50$  pM), rango de estudio de  $K_d$  entre pico-nano molar (pM-mM) y volúmenes pequeños de solución de complejos proteína-péptido (20  $\mu$ L). Esto permitió diseñar los experimentos de acuerdo a la solubilidad de cada péptido en el buffer de prueba.

En la Figura 3.5A se muestran los termogramas o curvas de MST a diferentes concentraciones de los C-péptidos. La amplitud de ellas denota cambios entre la forma unida y no unida de la proteína con sus ligandos. Durante todo el experimento el láser de excitación del fluoróforo permanece encendido, mientras que el láser de IR, que induce el gradiente de temperatura, se enciende desde el tiempo 0 hasta los 21 s de movimiento termoforético. Las curvas de dosis-respuesta (Fig. 3.5B) se obtuvieron con el software MO.Affinity Analysis v2.3, en donde el cambio en la termoforesis se expresa como la variación en la fluorescencia normalizada ( $\Delta F_{norm}$ ), es decir, la razón entre la fluorescencia registrada en la región caliente y la registrada en la zona fría ( $F_{hot}/F_{cold}$ ), en función de la concentración de los C-péptidos.

Estas medidas de fluorescencia son directamente proporcionales a la concentración de proteína unida al ligando  $[BL]$  y la concentración de proteína libre  $[B]$ , de acuerdo a la siguiente reacción de equilibrio, en donde la constante de disociación  $K_d$  es equivalente al inverso de la constante de asociación  $K_a$ :



El cambio relativo en la concentración se normaliza con respecto al valor de saturación, en el que todas las moléculas se encuentran en el estado de unión. La unión de los ligandos a un receptor específico se caracteriza por la  $K_d$  y la concentración total de sitios de unión,  $[B_0]$ . La determinación de estos dos parámetros puede lograrse utilizando curvas de saturación de unión obtenidas en el equilibrio mediante la función de ajuste (1)<sup>[112]</sup>, que se deriva de la ley de acción de masas:

$$\frac{[BL]}{[B_0]} = \frac{([L_0] + [B_0] + K_d) - \sqrt{((L_0] + [B_0] + K_d))^2 - 4[L_0][B_0]}}{2[B_0]} \quad (1)$$

La variable  $[L_0]$  es igual a la cantidad de ligando añadido en cada punto de datos y  $[BL]$  es la concentración de complejos formados entre los sitios de unión,  $[B]$ , y el ligando,  $[L]$ .

El ajuste confiable de los resultados obtenidos (regresión no lineal) requirió un test previo de fluorescencia inicial de E-selectina (zona fría) para todos los capilares en cada repetición, con el fin de descartar un aumento en la intensidad de fluorescencia, *quenching* o *photobleaching* a causa de la unión con el ligando. En consecuencia, las curvas ajustadas para cada péptido muestran las variaciones ocurridas sólo durante el movimiento termoforético (Fig. 3.5B).

Las curvas de afinidad de los C-péptidos se representan en términos del *fraction bound*, que resulta de dividir cada valor de  $\Delta F_{norm}$  entre la amplitud de las curvas

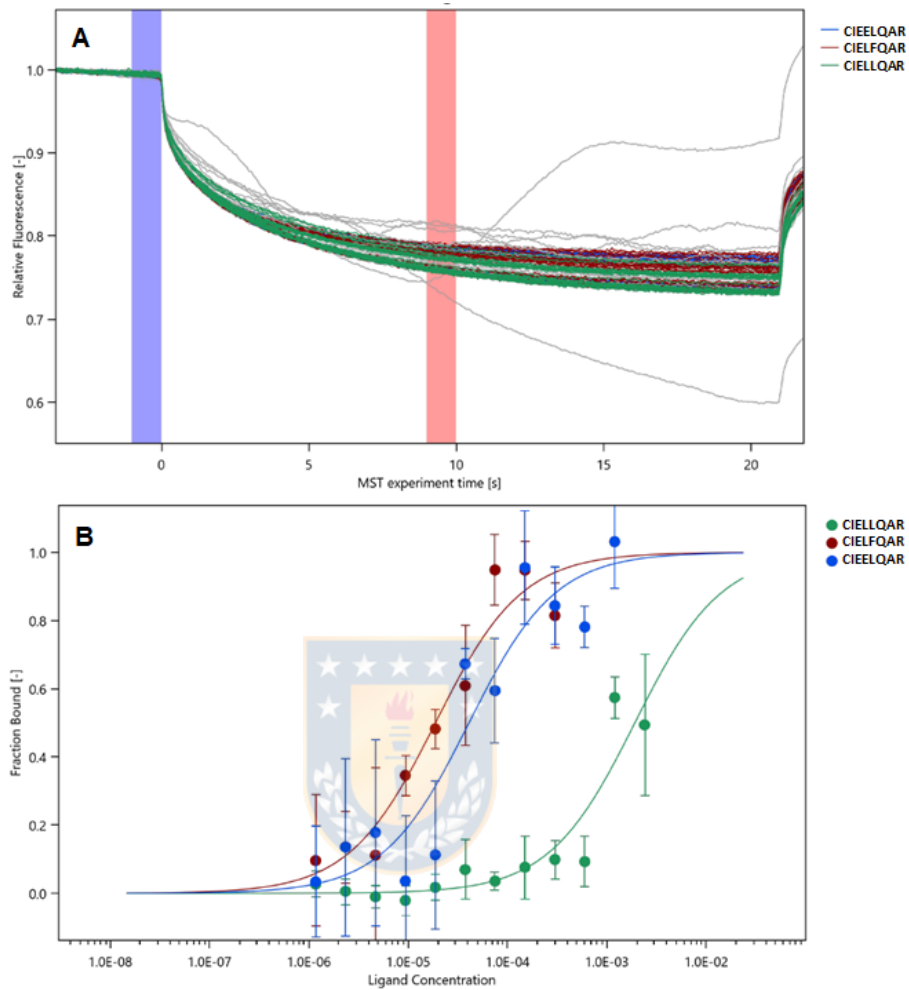
originales para obtener una escala de 0 a 1, en donde pueden compararse los resultados de los tres ligandos de manera conjunta. La forma sigmoideal demuestra que todos los péptidos tienen un sólo sitio de unión a E-selectina.

A pesar de que CIELLQAR (C-nativo) fue el péptido más soluble en buffer MST suplementado (2,4 mM), éste no logró alcanzar la concentración de saturación de la proteína (Fig. 3.5B). No obstante, los datos fueron suficientes para estimar un valor de  $K_d$  promedio de  $1916,8 \pm 2,59 \mu\text{M}$  (tabla 3.3).

Por su parte, los péptidos mutantes CIEELQAR (C-mutante 2) y CIELFQAR (C-mutante 11) sí lograron alcanzar la concentración de saturación, aun cuando su máxima solubilidad en el buffer MST suplementado fue 1,2 mM. Las curvas de dosis-respuesta muestran que se necesita una menor concentración de estos ligandos para alcanzar el equilibrio en la formación del complejo con E-selectina.

Los valores estimados de  $K_d$  promedio para CIEELQAR (C-mutante 2) y CIELFQAR (C-mutante 11) fueron  $41,05 \pm 0,89$  y  $18,86 \pm 0,77 \mu\text{M}$  respectivamente, lo que convierte a éste último en el péptido de mayor afinidad experimental por E-selectina.





**Figura 3.5** Ensayo de afinidad de los C-péptidos por E-selectina. Termogramas de la formación de complejos E-selectina/C-péptidos (A). La franja azul indica la zona fría donde se cuantifica la fluorescencia inicial ( $F_{\text{cold}}$ ) y la franja roja indica la zona caliente elegida para la lectura de fluorescencia final ( $F_{\text{hot}}$ ). El láser de IR permanece encendido desde 0 hasta 21 s mientras se registran los trazos del movimiento termoforético (líneas de colores). Las medidas que registraron formación de agregados fueron descartadas para la cuantificación (líneas grises). Curvas dosis-respuesta de la unión E-selectina/C-péptidos (B). Se realizó un ajuste no lineal de las fracciones  $[BL]/[B_0]$  para el cálculo de  $K_d$  promedio de tres experimentos independientes (error: DE,  $n = 3$ ). La concentración de E-selectina se mantuvo constante (1 nM).

En la tabla 3.3 se resumen los valores de  $K_d$  promedio para cada conjunto de datos así como los valores de energía libre de asociación obtenidos a partir de la ecuación de Gibbs (2):

$$\Delta G = -RT \ln K_a = RT \ln K_d \quad (2)$$

**Tabla 3.3** Constantes de disociación ( $K_d$ ) y energías libres de unión ( $\Delta G_{\text{bind}}$ ) de los complejos E-selectina/C-péptidos obtenidos por termoforesis a microescala (MST)

| Nombre              | Péptido  | $K_d$ ( $\mu\text{M}$ ) | $\Delta G_{\text{bind}}$ ( $\text{kcal mol}^{-1}$ ) |
|---------------------|----------|-------------------------|---|
| <i>C-nativo</i>     | CIELLQAR | 1916,8 $\pm$ 2,59       | -3,71 $\pm$ 0,59                                    |
| <i>C-mutante 2</i>  | CIEELQAR | 41,05 $\pm$ 0,89        | -5,98 $\pm$ 0,07                                    |
| <i>C-mutante 11</i> | CIELFQAR | 18,86 $\pm$ 0,77        | -6,45 $\pm$ 0,15                                    |

Estos resultados permitieron validar la tendencia de afinidad de los C-péptidos por E-selectina obtenida previamente por cálculos computacionales (CIELFQAR > CIEELQAR > CIELLQAR), lo que conllevó a seleccionar, sin lugar a dudas, al péptido CIELFQAR para la síntesis del nuevo nanotransportador bifuncional.

### 3.3 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS NANOTRANSPORTADORES DERIVADOS DE PAMAM

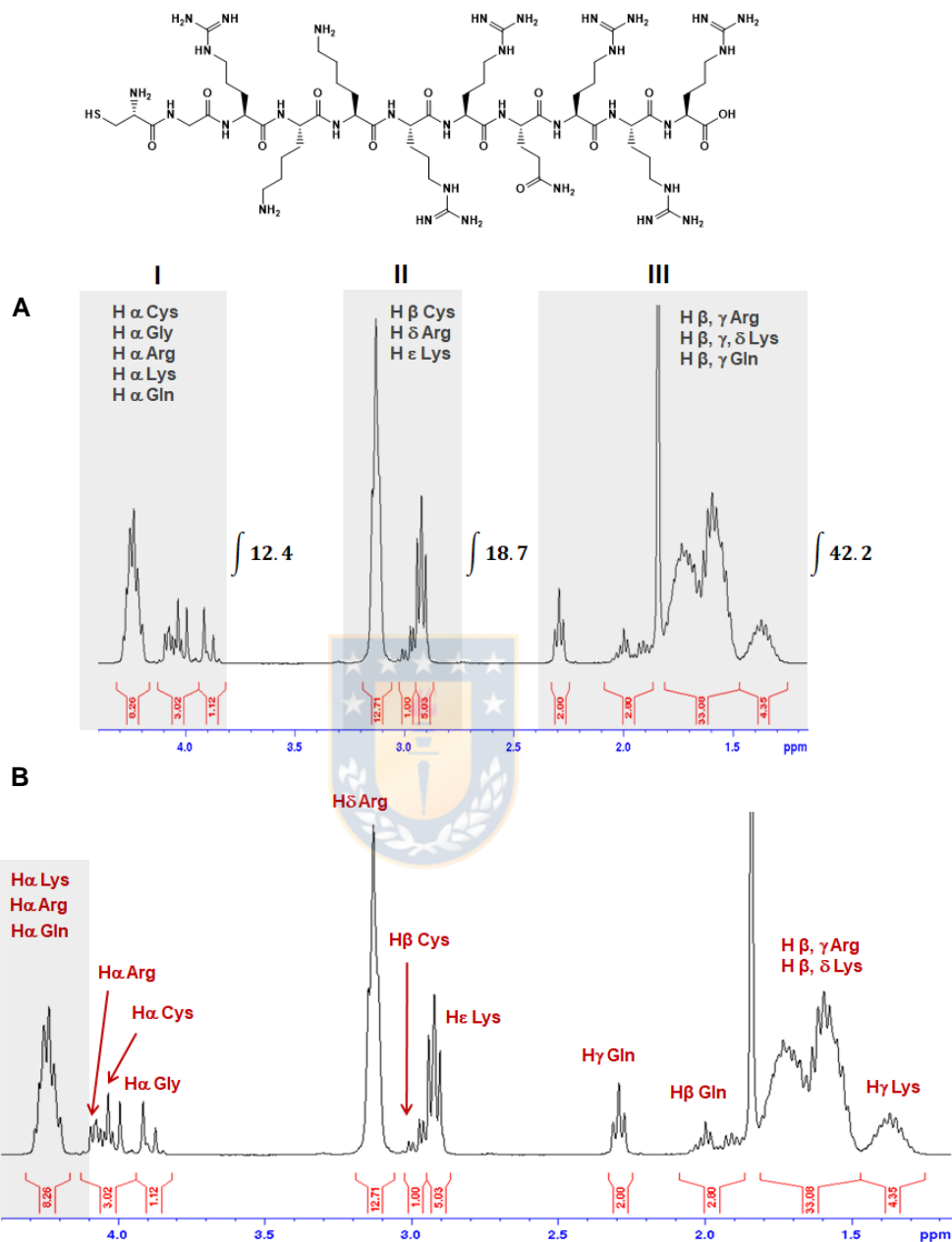
#### 3.3.1 Caracterización de los péptidos adquiridos comercialmente

El péptido penetrante de células C-pTAT (CGRKKRRQRR) así como los péptidos afines a E-selectina CIELLQAR y CIELFQAR fueron caracterizados por RMN  $^1\text{H}$  para corroborar su integridad y también ubicar aquellas señales que permitieran determinar el grado de funcionalización con respecto a la estructura del dendrímero PAMAM-G4.



##### 3.3.1.1 Péptido C-pTAT (CGRKKRRQRR)

La asignación de las principales señales de C-pTAT se realizó de acuerdo a los desplazamientos químicos reportados para los aminoácidos libres y algunos péptidos constituidos por menos de cinco aminoácidos, pudiendo dividirse el espectro en 3 regiones fundamentales (Fig. 3.6A): región I, que contiene los protones  $\text{H}_\alpha$  de todos los aminoácidos; región II, donde se ubican principalmente los protones  $\text{H}_\delta$  de Arg (R) y  $\text{H}_\epsilon$  de Lys (K); y región III donde se encuentran los protones más apantallados  $\text{H}_\beta$ ,  $\text{H}_\gamma$  y  $\text{H}_\delta$  de los respectivos aminoácidos. Por ser un péptido sintético, éste viene acompañado del contraión acetato, que se evidencia en el singlete desplazado a 1,77 ppm.



**Figura 3.6** Espectro de RMN <sup>1</sup>H del péptido C-pTAT (CGRKKRRQRR) adquirido de la casa comercial Biomatik. A) Asignación preliminar de las señales de acuerdo a lo reportado para las regiones I, II y III. B) Asignación final para los protones deducida por experimentos de RMN en dos dimensiones. La señal sombreada fue seleccionada para la cuantificación.

Seguidamente, se cuantificó el número de protones por región y comparó con los valores teóricos esperados. En la región I, la suma de todas las integrales fue de 12.40 H que concuerda exactamente con el número de protones H $\alpha$  presentes en la estructura. En la región II, la señal asignada para H $\delta$  Arg (R) también se acercó al valor teórico correspondiente de 12.00 H, mientras que el triplete asignado para H $\epsilon$  Lys (K), que integra para 5.03 H, parece solaparse con la señal de un protón geminal de Cys (C) que aparece al mismo desplazamiento químico. Por otra parte, en la región III, la suma total de las integrales fue de 42.23 H, valor que difiere ligeramente del número de protones esperados (40.00 H).

Al ser los más desapantallados, los protones H $\alpha$  resultaron ser de gran interés y los mejores candidatos para cuantificar una proporción relativa de C-pTAT en relación al dendrímero AC50. En este sentido, la asignación correcta tanto de los H $\alpha$  así como del resto de los protones se logró con análisis de RMN bidimensional mediante los experimentos de correlación homonuclear  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY y TOCSY. Una vez identificados, los protones permitieron ubicar los núcleos de carbono directamente unidos a través del experimento de correlación heteronuclear  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, mientras que los carbonos cuaternarios fueron asignados con el experimento HMBC.

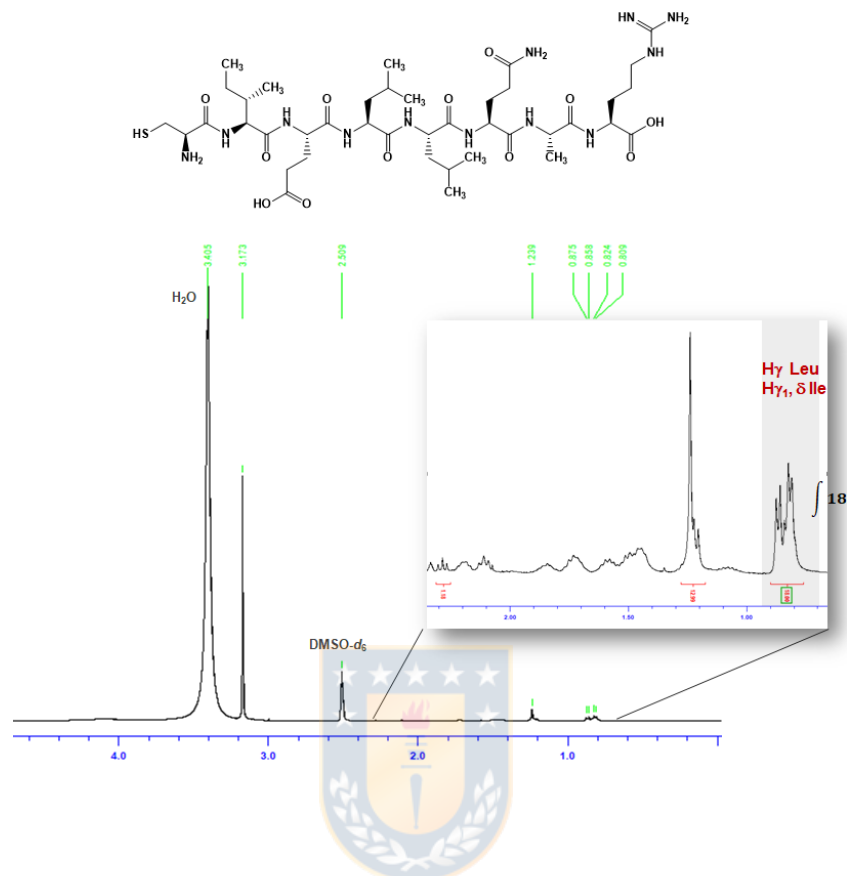
En la figura 3.6B se muestra finalmente la asignación realizada a todos los protones de C-pTAT. Algunas señales importantes de mencionar son dos dobletes centrados en 3,85 y 4,01 ppm correspondientes a los dos H $\alpha$  Gly (G),

un triplete ubicado en 4,04 ppm asignado al H $\alpha$  Cys (C), un triplete centrado en 4,08 ppm atribuido a un H $\alpha$  Arg (R) y un multiplete desplazado a 4,20 ppm que integra para el resto de los H $\alpha$  de la estructura (8H), siendo elegido éste último para la determinación del grado de funcionalización.

### 3.3.1.2 Péptido C-nativo (CIELLQAR)

La adquisición del espectro de RMN  $^1\text{H}$  se realizó en DMSO- $d_6$  (Fig. 3.7). A primera vista, se observó un singlete en 3,40 ppm que interfería con la ganancia en la relación señal/ruido de los protones del péptido. Esto puede atribuirse a la presencia de H $_2\text{O}$  en el polvo liofilizado o en el solvente deuterado.

Las señales de interés se encuentran a campo alto, en donde se aprecia un doblete no definido centrado en 0,85 ppm y un singlete no definido en 1,24 ppm, característicos de los metilos y metilenos de los residuos hidrofóbicos Ile (I), Leu (L) y Ala (A). A este respecto, se tomó la señal más apantallada para la cuantificación sabiendo que estas no se solaparían con la señal de los protones H $\gamma$  de Arg (R). En dicha señal se encuentran contenidos los protones H $\gamma$  Leu (L), H $\gamma_1$  Ile (I) y H $\delta$  Ile (I) que teóricamente integran para 18 H.

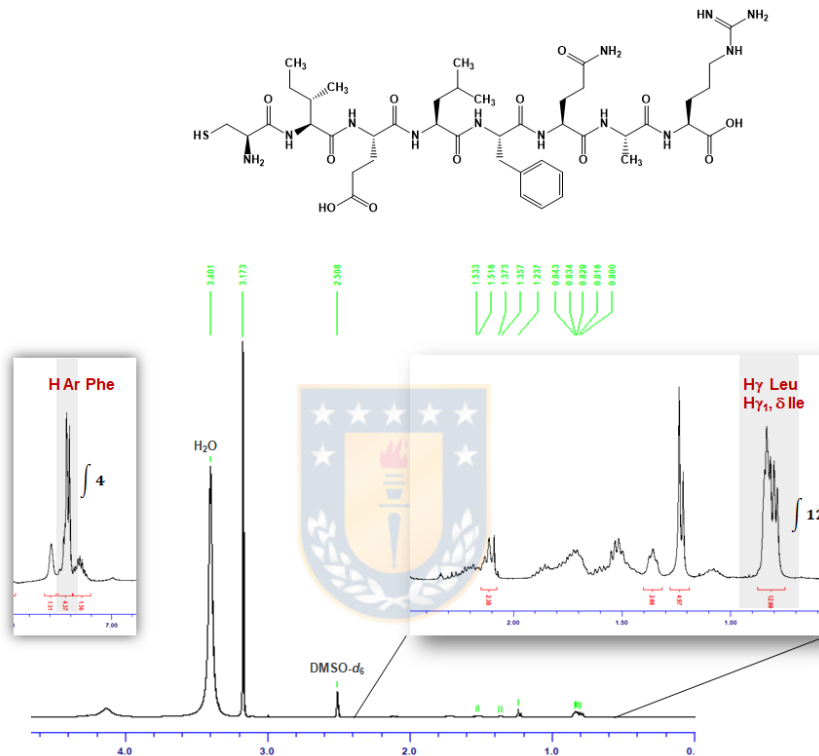


**Figura 3.7** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  y ampliaciones del péptido C-nativo CIELLQAR adquirido de la casa comercial Biomatik. La señal sombreada a campo alto denota la integridad del péptido.

### 3.3.1.3 Péptido C-mutante 11 (CIELFQAR)

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Fig. 3.8) se pudo apreciar a campo bajo la presencia de los protones aromáticos del péptido como un doblete centrado en 7,21 ppm y que puede atribuirse a 4 de los 5 H del anillo bencénico de Phe (F). Asimismo, se observaron a campo alto las señales de interés ubicadas en 1,24 y 0,83 ppm. Esta última ahora integra teóricamente para 12 H debido al cambio en los

residuos Leu5 por Phe5, y corresponde a los protones de los grupos metilo presentes en los residuos de Ile (I) y Leu (L).



**Figura 3.8** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  y ampliaciones del péptido C-mutante CIELFQAR adquirido de la casa comercial Biomatik. Las señales sombreadas denotan la integridad del péptido.

De esta manera, se lograron identificar exitosamente las señales que permitirían conocer el número de péptidos conjugados a cada sistema nanotransportador en el transcurso de síntesis de los mismos.

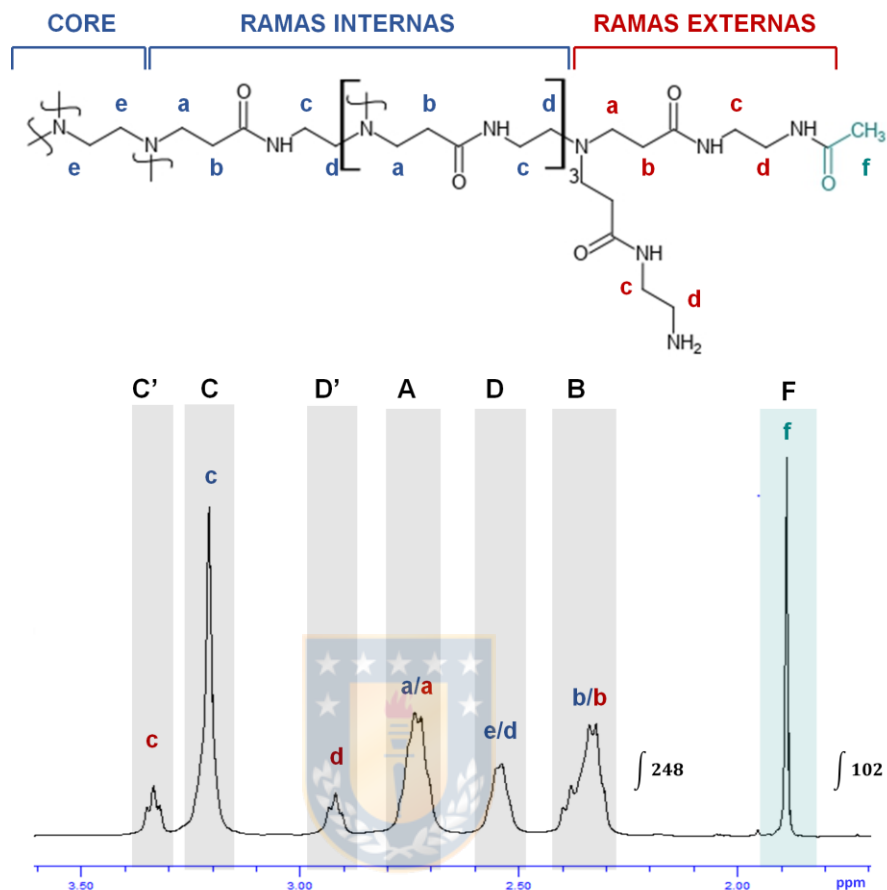


### 3.3.2 Síntesis del sistema AC50

La acetilación parcial del dendrímero PAMAM-G4 es una de las formas de funcionalización recientemente estudiadas dentro de nuestro grupo de investigación.<sup>[113]</sup> Por ser una reacción reproducible y cuantitativa se espera que mantenga la monodispersidad en sus derivados. Además de reducir la citotoxicidad de PAMAM al disminuir su carga superficial, la acetilación retiene la permeabilidad celular y mejora la acumulación en diversos órganos a causa de su mayor tiempo de circulación en sangre.<sup>[114,115]</sup>

Se eligió un porcentaje de acetilación de 50% dado que, en ensayos previos, el dendrímero AC50, por sí mismo, no pudo internalizarse en células neuronales de ratones,<sup>[113]</sup> lo que permitió abrir un campo de exploración en la captación celular promovida solamente por los vectores pTAT, CIELLQAR y CIELFQAR.

La reacción consistió en una adición nucleofílica de las aminas superficiales de PAMAM al carbonilo del anhídrido acético, seguido de la eliminación del ión acetato para formar el enlace amida. Con el fin de conocer el grado de acetilación aproximado, se identificó previamente en el espectro de PAMAM-G4 la señal adecuada para realizar la relación de integrales. Esta corresponde a un multiplete centrado en 2,35 ppm (señal B) que mantiene su desplazamiento químico a pesar de las modificaciones superficiales. Contiene los protones b de las ramas internas y externas del dendrímero e integra por un total de 248 H (Fig. 3.9).



**Figura 3.9** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del sistema AC50. Las señales A, B, C, C', D y D' corresponden a los metilenos del dendrímtero, mientras que la señal F corresponde los protones del grupo acetilo.

El cambio más importante en la estructura, se observa en 1,88 ppm con la aparición del singlete F correspondiente al grupo metilo del acetilo. Al normalizar el valor de su integral con respecto a la señal B se obtuvo un total de 102 H, que coinciden con 34 grupos acetilos por molécula de PAMAM-G4, resultando en un 53% de sustitución. Las señales C' y D', que contienen los protones c y d externos

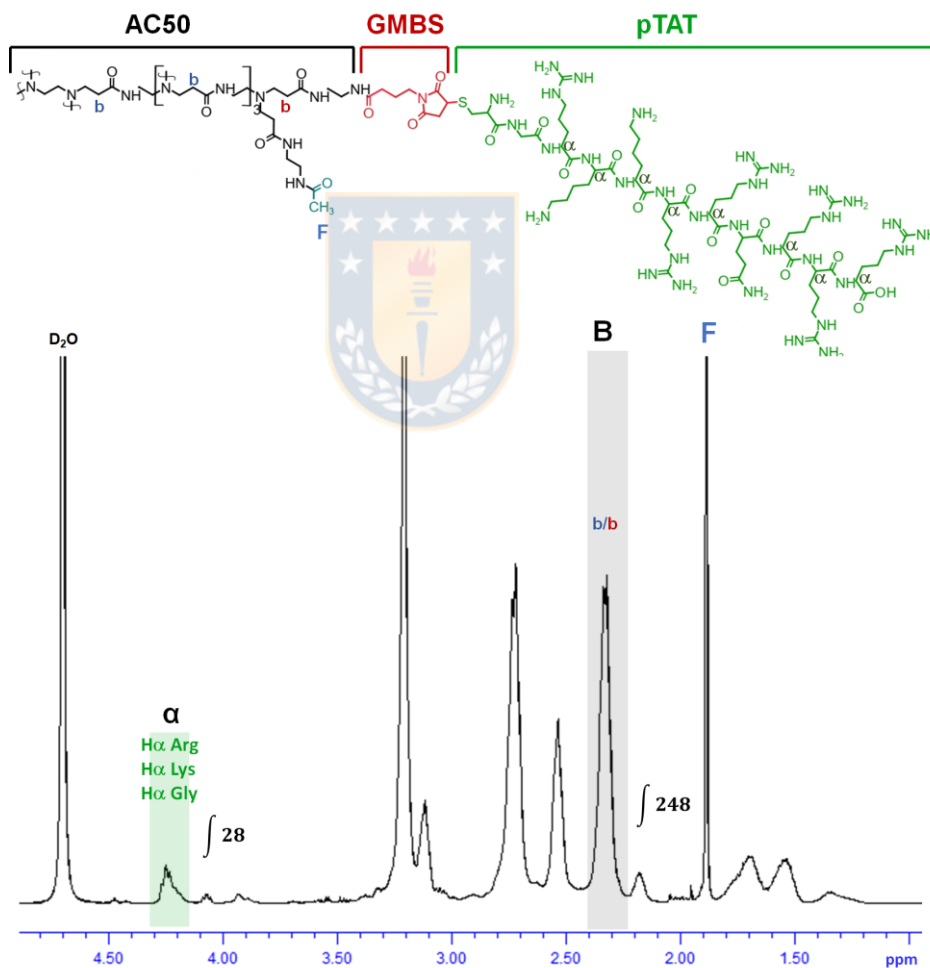
de las ramas no funcionalizadas se desplazaron desde 3,15 y 2,63 ppm hasta 3,33 y 2,91 ppm respectivamente, lo que demuestra un cambio en el entorno químico de estos protones con respecto a los metilenos c y d de las ramas funcionalizadas, ya que con la formación de nuevos enlaces amidas, las señales de dichos protones aparecen al mismo desplazamiento químico que los protones c en 3,21 ppm, aumentando en tamaño de la señal C, la cual integra ahora por 274 H (antes 124 H). El resto de los protones del dendrímero están debidamente asignados a las señales A y D, ubicadas en 2,73 y 2,55 ppm (Fig. 3.9).

Desde el punto de vista espectroscópico, la ventaja de funcionalizar con el grupo acetilo es que describe una única señal en el espectro de RMN  $^1\text{H}$ , bien definida y a un desplazamiento químico que está lo suficientemente alejado como para interferir con las señales más importantes de PAMAM, pTAT y de los péptidos CIELLQAR/CIELFQAR.

### **3.3.3 Síntesis del sistema AC50-pTAT**

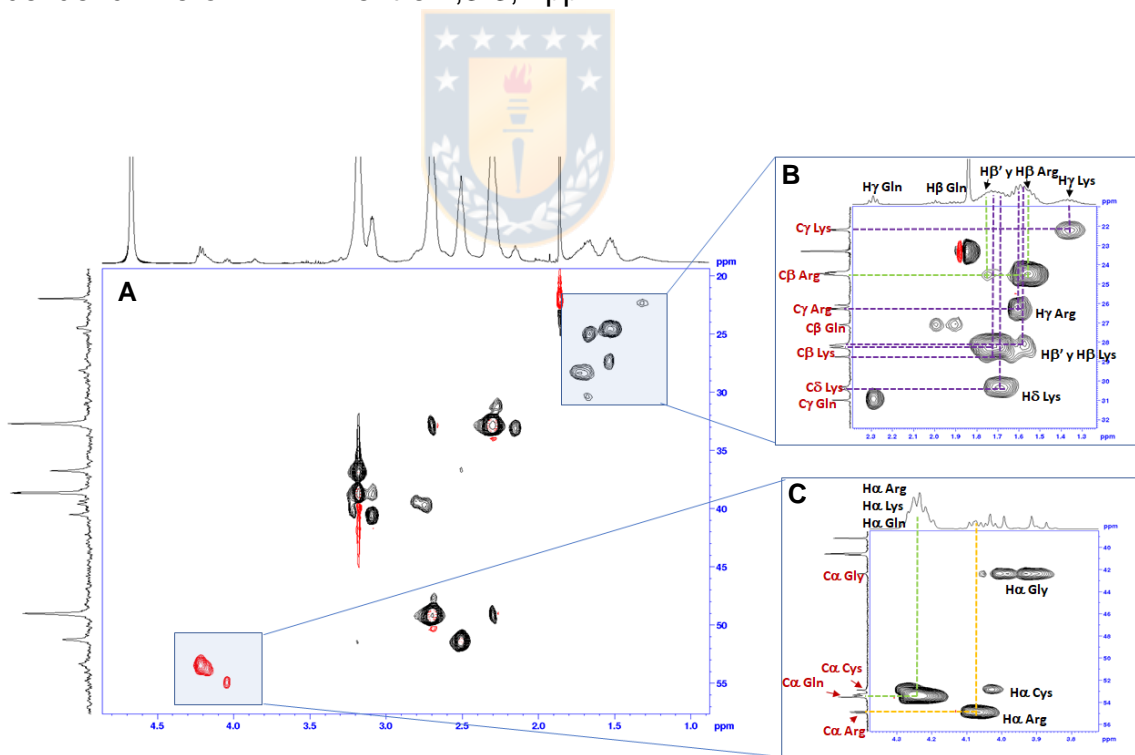
La síntesis de este nanotransportador se llevó a cabo en dos etapas. La primera, consistió en la reacción de las aminas superficiales del sistema AC50 con el éster de *N*-hidroxisuccinimida del GMBS a través de una sustitución nucleofílica bimolecular ( $\text{S}_{\text{N}}^2$ ); la segunda, fue la adición conjugada de C-pTAT (CGRKKRRQRR) al grupo maleimido del linker GMBS a través del grupo tiol de la cisteína. En el espectro de protones (Fig. 3.10) se pueden observar las señales

correspondientes al pTAT, en particular, el multiplete asignado a los 8 protones H $\alpha$  centrado en 4,23 ppm. Las señales del dendrímero AC50 permanecen a los mismos desplazamientos químicos. Al normalizar el espectro por la señal B (248 H), se obtuvo para la señal asociada a los H $\alpha$  un total de 28 H, que arroja un valor promedio de 3,5 moléculas de pTAT por dendrímero.



**Figura 3.10** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del sistema AC50-pTAT. La señal  $\alpha$  indica la presencia del péptido pTAT en la estructura.

Con el espectro HSQC se pudo confirmar la unión de pTAT en la nanoestructura mediante la correlación C-H a un enlace de los residuos Arg (R) y Lys (K) del péptido (Fig. 3.11A). Al comparar con las ampliaciones del espectro HSQC de C-pTAT, se observaron a campo bajo los núcleos contenidos en los multipletes ubicados entre 1,25-1,80 ppm, asignados a los protones H $\beta$ , H $\beta'$ , H $\gamma$  y H $\delta$  de estos aminoácidos (Fig. 3.11B). A su vez, a campo medio se observaron los núcleos de los H $\alpha$  de gran parte de los aminoácidos, en especial los de Arg (R) (Fig. 3.11C). Asimismo, se aprecian los núcleos correspondientes a los metilenos del dendrímero PAMAM entre 2,3-3,4 ppm.



**Figura 3.11** Espectro  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC del nanotransportador AC50-pTAT(A). La conjugación con C-pTAT se evidencia al comparar con las ampliaciones del espectro HSQC del péptido, a campo bajo (B) y a campo medio (C).

A pesar de lo reportado para esta reacción de conjugación en otros sistemas PAMAM similares, la unión de C-pTAT sólo fue posible a pH 8,4, considerando tiempos cortos entre la adición de los reactivos a fin de evitar la degradación del grupo maleimido del linker GMBS en presencia de agua. Las relaciones estequiométricas AC50:GMBS:pTAT ensayadas se muestran en la tabla 3.4, en donde se evidencia una efectividad de conjugación cercana al 60% con respecto al valor teórico.

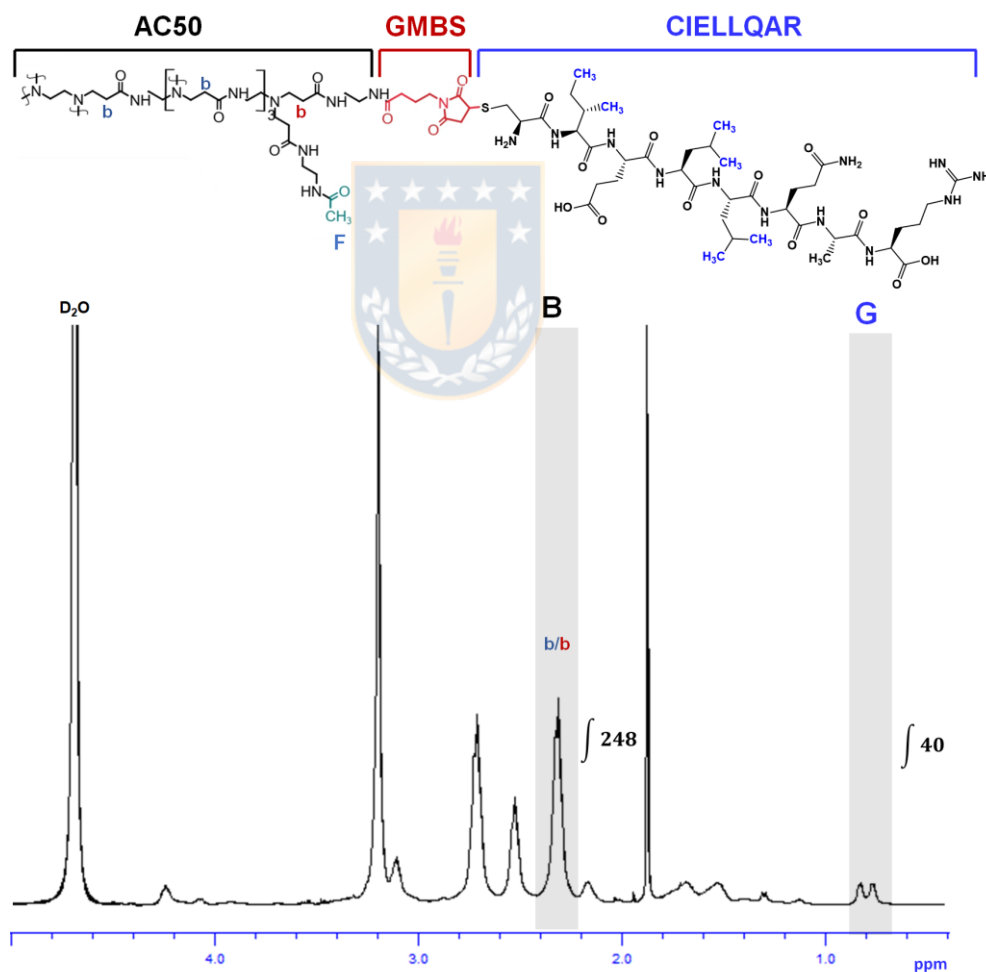
**Tabla 3.4** Relaciones molares AC50:GMBS:pTAT ensayadas para la conjugación de pTAT con el dendrímero AC50

| Buffer              | pH  | Relación molar | Moléculas de pTAT |
|---------------------|-----|----------------|-------------------|
| <i>PBS</i>          | 7,4 | 1:8:6          | -                 |
| <i>Bórax/Borato</i> | 8,4 | 1:8:6          | 3,5               |
| <i>Bórax/Borato</i> | 8,4 | 1:6:4          | 2,2               |

### 3.3.4 Síntesis de los sistemas AC50-pTAT-CIELLQAR/CIELFQAR

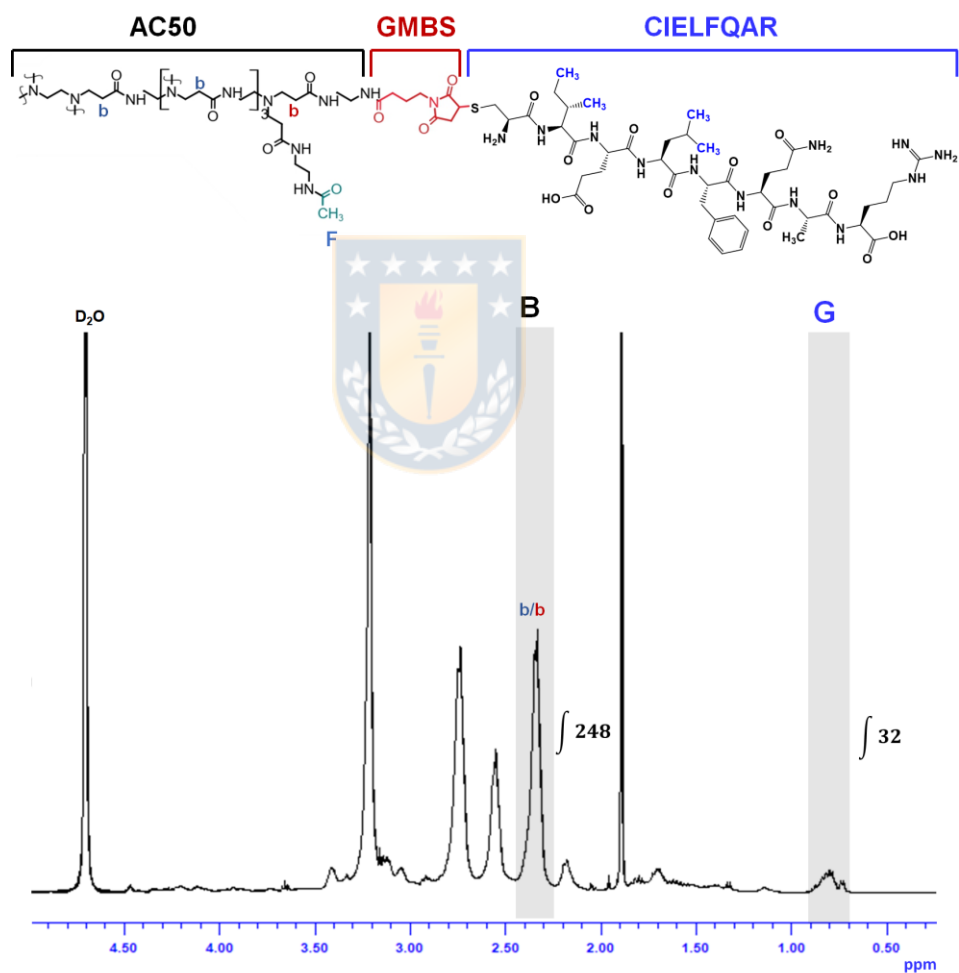
La conjugación de los péptidos afines a E-selectina al dendrímero AC50-pTAT se realizó siguiendo la estrategia sintética previamente descrita (Fig. 2.3) a través del linker GMBS. Debido a la baja solubilidad en agua de los C-péptidos, las reacciones se llevaron a cabo a un porcentaje final de solvente orgánico de 30%. Las relaciones molares estudiadas para la síntesis de AC50-pTAT fueron también

evaluadas acá. No obstante, el número de moléculas de péptidos conjugadas no varió significativamente entre la proporción 1:8:6 y 1:6:4. La síntesis exitosa de ambos nanotransportadores bifuncionales se verificó en los correspondientes espectros de RMN  $^1\text{H}$  por la presencia de dobletes y tripletes superpuestos a campo bajo (G) entre 0,72-0,84 ppm, atribuidos a los protones de grupos metilo de los residuos de Ile (I) y Leu (L) presentes en ambos péptidos (Fig. 3.12-3.13).



**Figura 3.12** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del sistema AC50-pTAT-CIELLQAR. Los protones contenidos en la señal G (40 H) confirman la presencia del péptido en la estructura.

Al normalizar las señales G en función de la señal B del dendrímero (248 H), se obtuvo un total de 40 H para el nanotransportador control AC50-pTAT-CIELLQAR y 32 H para el nanotransportador de mayor afinidad por E-selectina AC50-pTAT-CIELFQAR que coinciden con la unión de 2,22 y 2,63 moléculas de sus respectivos péptidos.

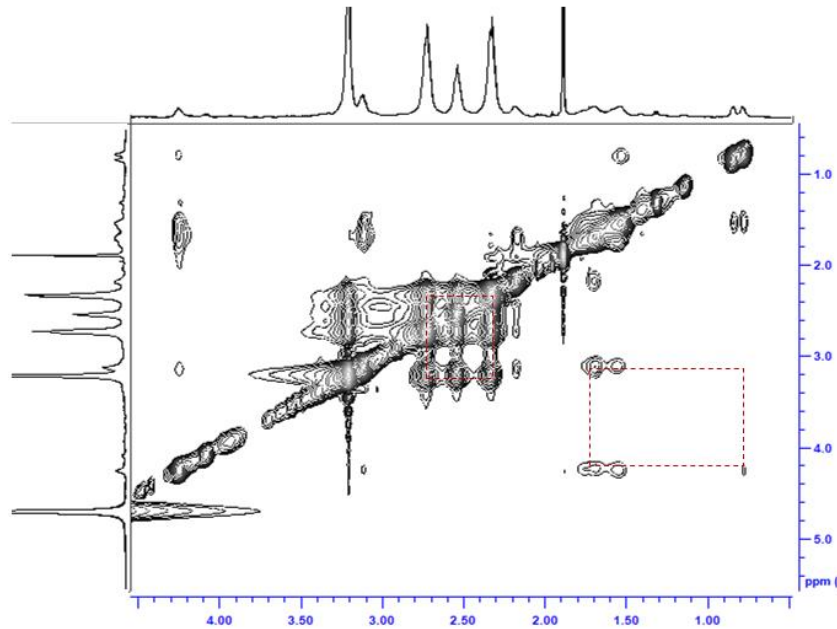


**Figura 3.13** Espectro de RMN <sup>1</sup>H del sistema AC50-pTAT-CIELFQAR. Los protones contenidos en la señal G (32 H) confirman la presencia del péptido en la estructura.



Teniendo en cuenta las características hidrofóbicas de ambos péptidos y la posibilidad de ser encapsulados por el dendrímero AC50-pTAT durante la reacción, se realizó un espectro NOESY para verificar que la unión fuese netamente covalente y no por la formación de un complejo supramolecular. Como ejemplo, se muestra el espectro NOESY para el nanotransportador bifuncional AC50-pTAT-CIELLQAR (Fig. 3.14), en donde se observa una correlación espacial entre los protones de las ramas internas y externas del dendrímero, pero no se aprecia una correlación de éstos con los protones de los aminoácidos hidrofóbicos más abundantes Ile (I) y Leu (L). De esta manera, se comprueba la conjugación exitosa de los péptidos CIELLQAR y CIELFQAR, los cuales tendrán la función de direccionar a los nanotransportadores hacia la proteína blanco E-selectina.

Cabe resaltar que para la síntesis de los nanotransportadores bifuncionales marcados con la sonda Alexa Fluor® 647 se siguió el mismo esquema sintético (Fig. 2.3) partiendo desde un solo batch de dendrímeros AC50\*, funcionalizados con C-pTAT a una relación 1:6:4 y posteriormente funcionalizados con los péptidos CIELLQAR o CIELFQAR a una relación 1:6:4. Estos sistemas nanotransportadores marcados con la sonda fluorescente fueron usados para los ensayos biológicos de viabilidad e internalización celular.



**Figura 3.14.** Espectro NOESY del nanotransportador AC50-pTAT-CIELFQAR. La ausencia de correlación entre los sistemas de spin de los metilenos del dendrímero y los metilos de los residuos Ile (I) y Leu (L) descartan la encapsulación del péptido durante la reacción.

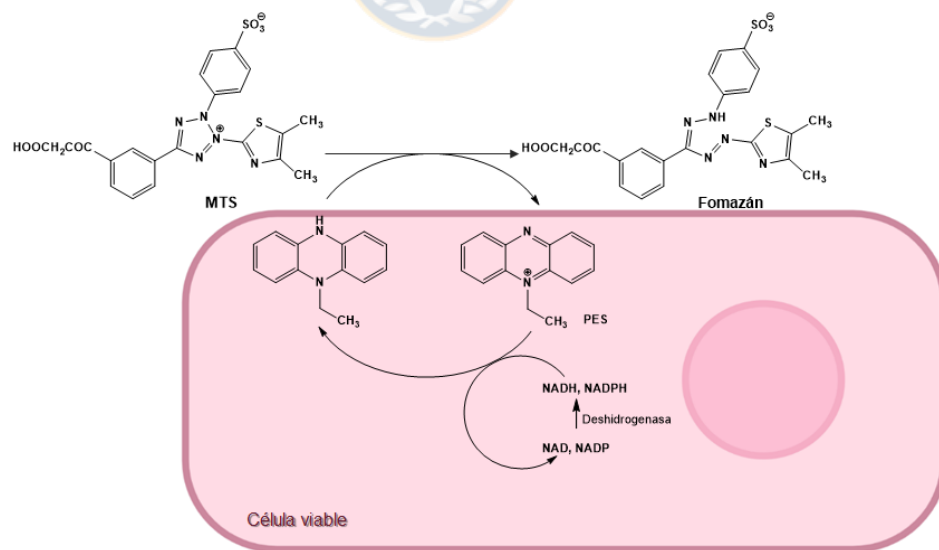
### 3.4 ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR POR MTS Y CRISTAL VIOLETA

Se estudió la toxicidad de los nanotransportadores en la línea celular de endotelio HUVEC/TERT2 y de glioblastoma T98G a través de dos métodos diferentes:

El primero, fue el ensayo de proliferación celular con el kit CellTiter 96®, que se basa en la reacción colorimétrica de la sal de tetrazolio MTS cuando se transforma en un producto de formazán soluble en el medio de cultivo por acción de las células viables. A diferencia del MTT, esta sal de segunda generación no

requiere la adición de DMSO o detergentes para la cuantificación del formazán, por lo que las células pueden lavarse y regresar de nuevo a incubación.<sup>[116]</sup>

La reducción del MTS ocurre mayormente de forma extracelular, tal como se muestra en la figura 3.15. La reacción es mediada por etil sulfato de fenazina (PES), un aceptor de electrones que tiene la capacidad de penetrar las células y ser reducido principalmente por el flujo de NAD(P)H en el citoplasma, el cual está relacionado con el impulso de energía que mantiene activo el metabolismo celular. De esta manera, la producción de formazán, medida por la absorbancia a 490 nm, se ha relacionado de forma directa con el número de células vivas en el cultivo.<sup>[117]</sup>

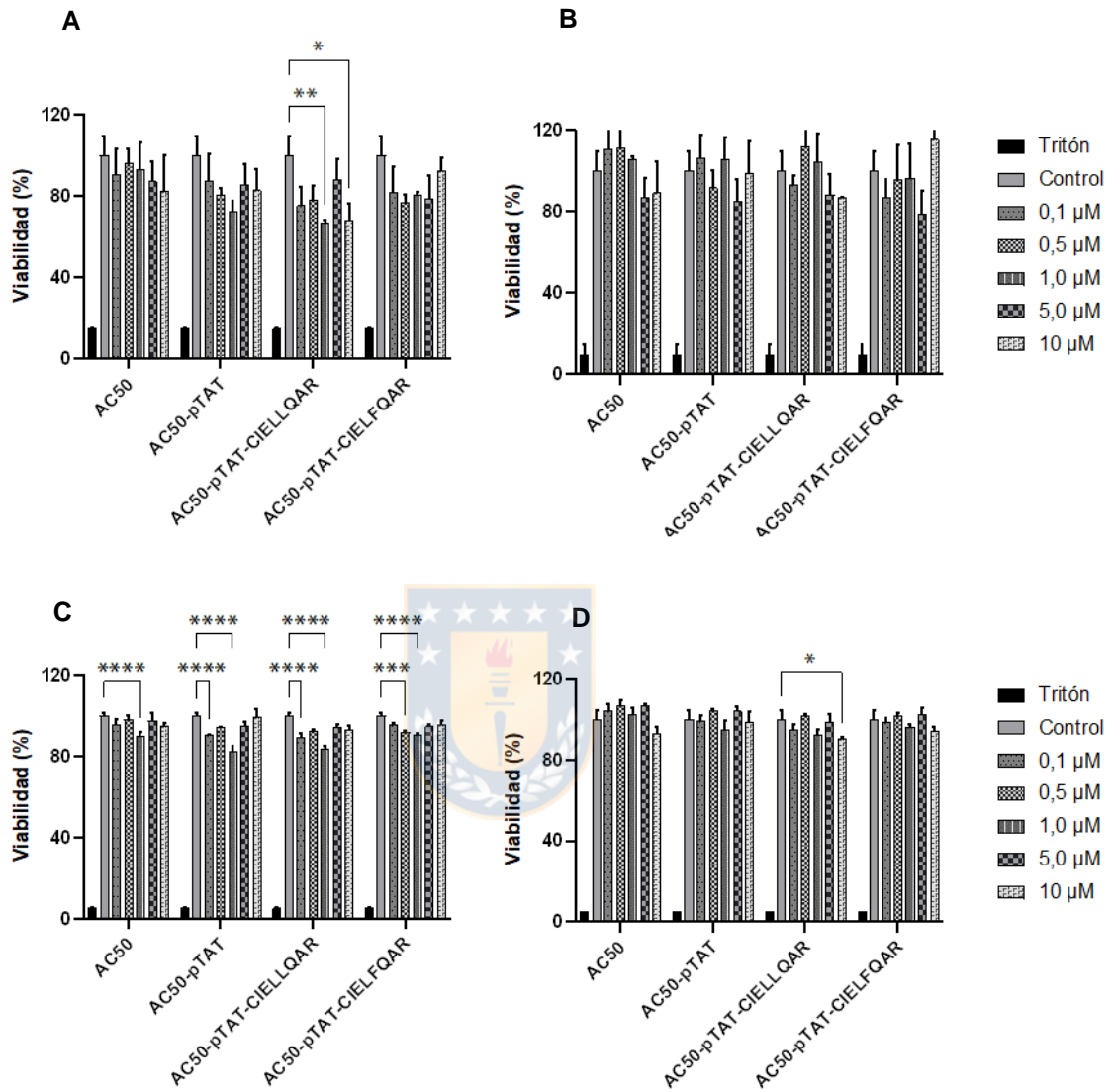


**Figura 3.15** Representación esquemática del mecanismo propuesto para la reducción celular de MTS a formazán. El transporte de electrones es atribuido principalmente a NADPH o NADH producidos por enzimas deshidrogenasas en células metabólicamente activas. (Imagen realizada en BioRender.com)

Con el fin de evaluar la toxicidad de los nanotransportadores sintetizados, las células se incubaron con concentraciones crecientes de estos compuestos. Asimismo, se realizó una comparación precisa entre los cuatro sistemas mediante un test de ANOVA de dos vías teniendo en cuenta dos variables: la concentración del sistema nanotransportador y su grado de funcionalización relacionado a la carga superficial (Fig. 3.16).

Los resultados de este análisis estadístico mostraron que el aumento de la concentración de los dendrímeros afecta ligeramente a la viabilidad en ambas líneas celulares estudiadas ( $p < 0,001$ ), mientras que la influencia de la funcionalización afectó en mayor medida a las células HUVEC/TERT2 ( $p < 0,05$ ) en comparación con las células T98G ( $p < 0,001$ ).

El análisis de comparación múltiple entre las células HUVEC/TERT2 arrojó una disminución del 15 - 25% en la viabilidad después de 24 h de incubación con los dendrímeros AC50 y AC50-pTAT, lo cual puede estar asociado a la proporción de cargas positivas en la superficie de estos dendrímeros.<sup>[118]</sup> Aunque para los nanotransportadores AC50-pTAT-CIELLQAR y AC50-pTAT-CIELFQAR parece haber una tendencia similar, se puede observar que la viabilidad celular se mantiene en un 80%, incluso a altas concentraciones de los mismos (Fig. 3.16A). No obstante, la actividad metabólica de las células HUVEC/TERT2 se recupera al término de 48 h de incubación con los dendrímeros, en donde la viabilidad media aumenta hasta un 90% en cualquiera de los casos (Fig. 3.16B).



**Figura 3.16** Ensayo de proliferación celular por MTS en el modelo endotelial HUVEC/TERT2 y de glioblastoma T98G. Las células fueron tratadas con los nanotransportadores PAMAM en un rango de concentración de 0,1-10 μM. Viabilidad de HUVEC/TERT2 a las A) 24 h y B) 48 h, viabilidad de T98G a las C) 24 h y D) 48 h. Los datos se expresan como media ± SD. Prueba de Tukey \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  y \*\*\*\* $p < 0,0001$  frente al control (medio de cultivo),  $n=3$ .

Por otra parte, la viabilidad en las células T98G disminuyó entre 5 y 10% luego de 24 h de incubación con los dendrímeros, especialmente a concentraciones de 0,1 y 1,0  $\mu\text{M}$ . A pesar de que las diferencias fueron estadísticamente significativas, se puede observar que a concentraciones más altas, la viabilidad se mantiene en un 90% (Fig. 3.16C). Esta tendencia se hace más evidente a tiempos de incubación de 48 h, donde el promedio total de la viabilidad celular supera el 95%, indicando una recuperación de la actividad metabólica a cualquier concentración (Fig. 3.16D).

Es importante señalar que existen otros procesos celulares que se caracterizan por mantener un metabolismo activo en las células, pero que no necesariamente dan cuenta de la viabilidad de las mismas. Parte de ello se debe al estrés que generan las células al momento de endocitar o degradar sustancias externas que no son captadas apropiadamente, desencadenando, en algunos casos, la activación de mecanismos de muerte como autofagia, apoptosis, necrosis, entre otros.<sup>[119]</sup>

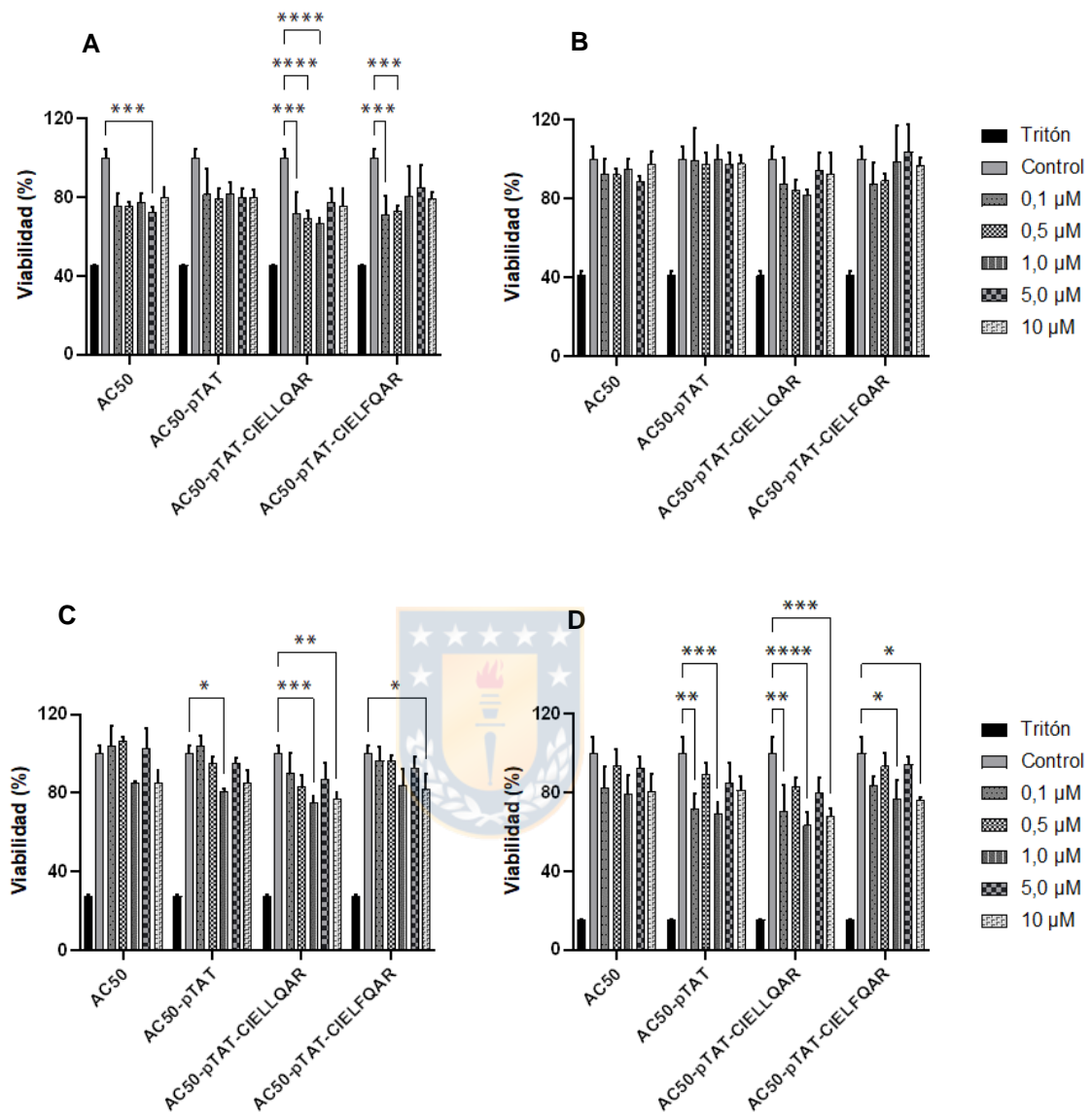
Los cambios en la morfología de las células durante un proceso de muerte están estrechamente relacionados con la falta de adherencia de las mismas al sustrato de cultivo. La mayoría de las células viables se adhieren firmemente a un sustrato de cultivo adecuado, mientras que aquellas lesionadas se redondean progresivamente y acaban desprendiéndose, lo que coincide con la muerte celular.<sup>[120,121]</sup> Por esta razón, se realizó un segundo ensayo de viabilidad, en

donde se evaluó la densidad de células adheridas mediante la tinción con cristal violeta.

En la figura 3.17 se muestran los resultados obtenidos desde las microplacas representativas usadas para el ensayo con MTS (Fig. 3.16). En la línea HUVEC/TERT2 la densidad celular a 24 h disminuyó entre un 25-30%, lo que correlaciona con lo visto anteriormente para el ensayo de MTS. En cuanto al experimento de 48 h, se observó un aumento general en la densidad, en donde se evidencia que los dendrímeros no inhibieron la proliferación de estas células.

Por su parte, las células T98G mostraron una disminución en la densidad de hasta 20% en las primeras 24 h de incubación con los nanotransportadores. Sin embargo, este porcentaje fue mucho más variable en el experimento de 48 h ya que en las concentraciones de 0,1 y 1,0  $\mu\text{M}$  la densidad celular disminuyó hasta un 30%, mientras que a concentraciones de 0,5 y 5,0  $\mu\text{M}$  fue apenas de un 10%. Estas fluctuaciones se atribuyen a potenciales errores técnicos durante el cambio del medio de cultivo por el que contenía las soluciones de dendrímeros.

Por lo tanto, tomando el conjunto de resultados de ambos ensayos de viabilidad celular, se puede concluir que los nanotransportadores sintetizados mostraron una baja toxicidad (5-15%) a las concentraciones probadas y no inhibieron la proliferación de las dos líneas celulares estudiadas.



**Figura 3.17** Ensayo de densidad celular por tinción con cristal violeta en el modelo endotelial HUVEC/TERT2 y de glioblastoma T98G. Las células fueron tratadas con los nanotransportadores PAMAM en un rango de concentración de 0,1-10  $\mu\text{M}$ . Viabilidad de HUVEC/TERT2 a las A) 24 h y B) 48 h, viabilidad de T98G a las C) 24 h y D) 48 h. Los datos se expresan como media  $\pm$  SD. Prueba de Tukey \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  y \*\*\*\* $p < 0,0001$  frente al control (medio de cultivo),  $n=3$ .

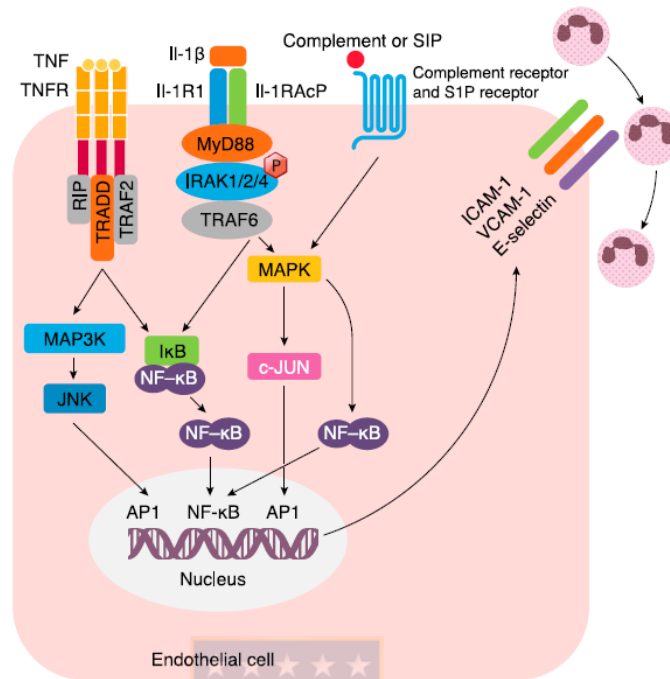


### 3.5 INTERNALIZACIÓN CELULAR DE LOS NANOTRANSPORTADORES

#### DERIVADOS DE PAMAM

La capacidad penetrante de los nanotransportadores se evaluó a través de dos modelos *in Vitro* de acuerdo a la hipótesis planteada: a) un modelo de células endoteliales que asemejan a aquellas que recubren las paredes de la BHE, el cual está representado por las células HUVEC/TERT2 y b) un modelo de células enfermas del SNC, el cual está representado por las células de glioblastoma multiforme T98G.

Considerando el proceso de inflamación crónica que tiene lugar ante la persistencia de alguna enfermedad neurodegenerativa, se indujo la activación de esta cascada de señalización en los modelos celulares estudiados a través de dos agentes pro-inflamatorios. El primero, conocido como PMA, es un quimiotáctico que estimula directamente a la Proteína quinasa C (PKC),<sup>[122]</sup> mientras que el segundo, TNF- $\alpha$ ,<sup>[106]</sup> es una citocina que interviene en la regulación de las células del sistema inmune. Ambos activan al factor de transcripción NF- $\kappa$ B para la síntesis de proteínas de adhesión vascular, entre ellas ICAM-1, VCAM-1 y E-selectina. La sobreexpresión de estas proteínas es sinónimo de un endotelio activado (Fig. 3.18).<sup>[123]</sup>



**Figura 3.18** Activación de las células endoteliales durante la inflamación del SNC. El TNF- $\alpha$  activa a NF- $\kappa$ B, un factor de transcripción crítico que se encuentra río abajo en las vías de señalización de MAPK y la proteína quinasa C. Estas vías inducen la expresión de una serie de genes y proteínas inflamatorias, como E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1, que son importantes en el *rolling* y adhesión de los leucocitos al endotelio activado.

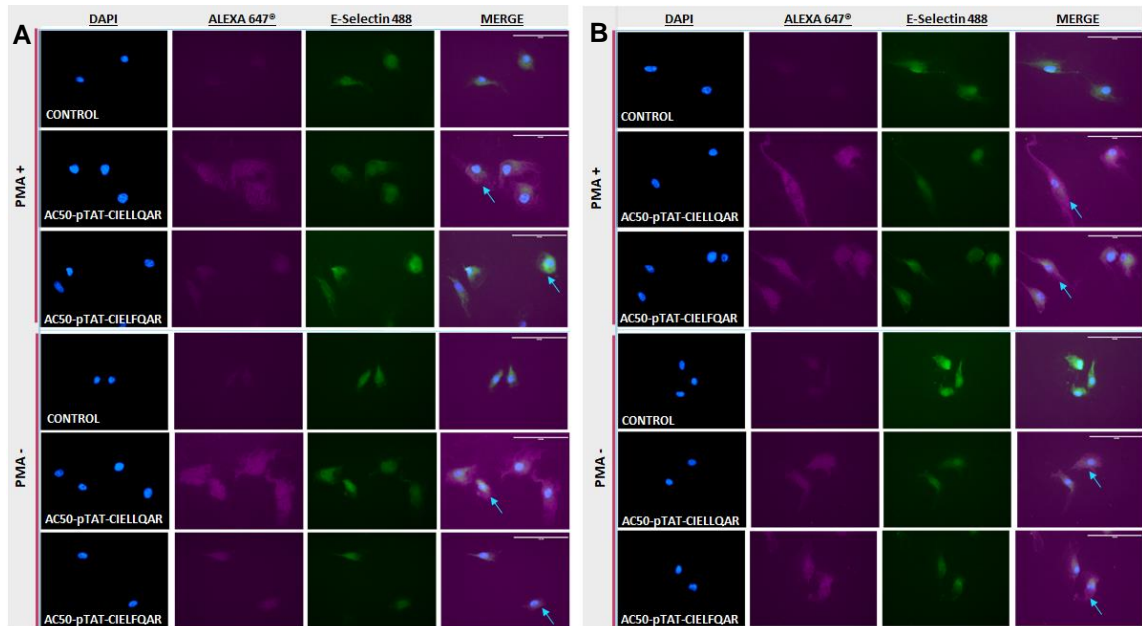
### 3.5.1 Captación de los nanotransportadores bifuncionales en células activadas con PMA

Se evaluó la captación celular de los dendrímeros AC50-pTAT-CIELLQAR y AC50-pTAT-CIELFQAR en células activadas y no activadas con PMA con el fin de comparar el comportamiento de los mismos frente a una sobreexpresión de E-selectina (PMA +) y niveles basales de esta proteína (PMA -). Para ello, se

optimizaron los tiempos de incubación a 6 h y 12 h de acuerdo a lo reportado recientemente sobre la captación del dendrímero AC50 en cultivos primarios de neuronas del hipocampo de ratón.<sup>[113]</sup>

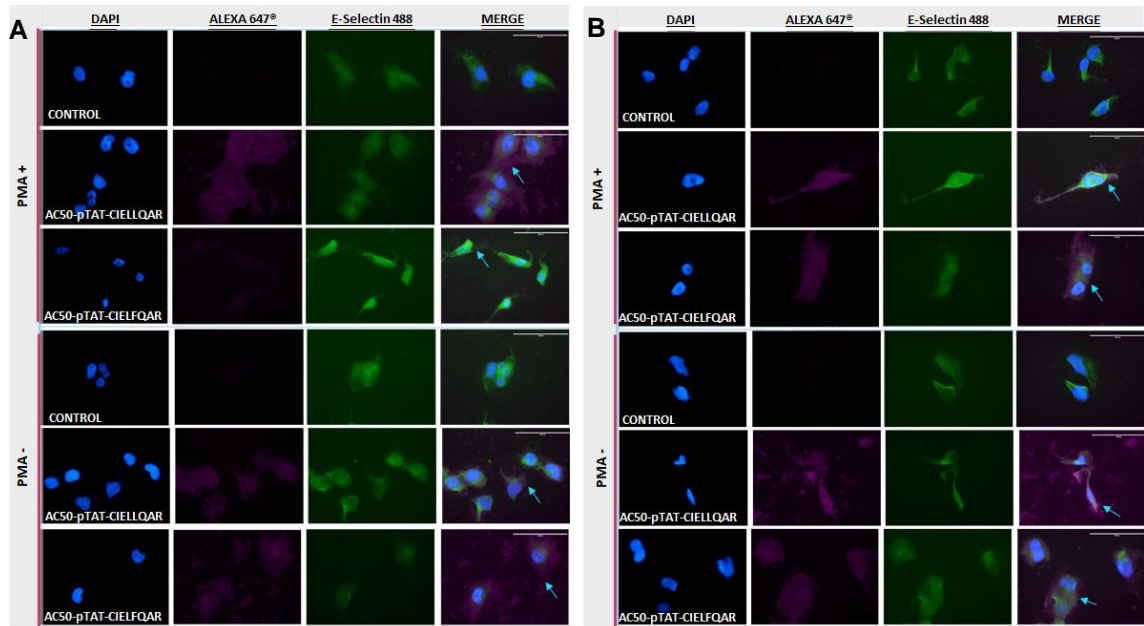
En la figura 3.19 se muestran las fotografías representativas obtenidas de las células HUVEC/TERT2. En el panel A (6 h) se observa de forma general una acumulación de los dendrímeros alrededor de células. Esta es más abundante con respecto al dendrímero AC50-pTAT-CIELLQAR, sin que haya diferencias significativas entre las células activadas (PMA +) y no activadas (PMA -). Por su parte, el dendrímero AC50-pTAT-CIELFQAR describe una menor proporción en la acumulación, la cual parece incrementarse ligeramente en las células activadas en comparación a las no activadas.

No obstante, en el panel B (12 h) se puede observar de forma general un aumento en la intensidad de fluorescencia de ambos nanotransportadores, siendo la acumulación más definida y consecuente con la morfología en las células que fueron activadas (PMA +) con respecto a las que no (PMA -). Estos resultados sugieren que la internalización de los nanotransportadores ocurre a tiempos superiores de 6 h de incubación, en donde la sobreexpresión de E-selectina contribuye parcialmente con la entrada de los dendrímeros bifuncionales a las células endoteliales.<sup>[33,124]</sup>



**Figura 3.19** Captación celular de los nanotransportadores bifuncionalizados en células HUVEC/TERT2 estimuladas con PMA. Imágenes representativas de HUVEC/TERT2 incubadas con los dendrímeros a A) 6 h y B) 12 h. Todas las imágenes fueron adquiridas con el objetivo 40X en una escala = 100  $\mu$ m.

En este sentido, se decidió explorar lo que ocurría en la línea T98G ya que, originalmente, estas células también expresan a la proteína E-selectina. En el panel A (6 h) de la figura 3.20 se observa un comportamiento de los nanotransportadores similar al visto en las células HUVEC/TERT2 activadas (PMA +), con una mayor acumulación de AC50-pTAT-CIELLQAR en comparación con AC50-pTAT-CIELFQAR. Sin embargo, en las células T98G no activadas (PMA -) la acumulación de ambos nanotransportadores fue muy semejante en intensidad.



**Figura 3.20.** Captación celular de los nanotransportadores bifuncionalizados en células T98G estimuladas con PMA. Imágenes representativas de T98G incubadas con los dendrímeros a A) 6 h y B) 12 h. Todas las imágenes fueron adquiridas con el objetivo 40X en una escala = 100  $\mu$ m.

Asimismo, se puede observar en el panel B (12 h) una tendencia parecida a la vista previamente para la línea HUVEC/TERT2, en donde la intensidad de fluorescencia de AC50-pTAT-CIELFQAR aumenta en las células T98G activadas (PMA +) y, de forma general, la acumulación de los dendrímeros coincide con la morfología de las mismas. A pesar de esto, en las células T98G no activadas (PMA -) no parece haber ninguna diferencia entre las intensidades de ambos dendrímeros con respecto a las células que fueron incubadas por 6 h.

A pesar de que en la línea T98G se observó una señal de los nanotransportadores bifuncionales en sitios inespecíficos, fue mayor la acumulación de éstos en la periferia de las células, lo cual apoya la hipótesis de su captación celular. Sin embargo, se hizo difícil concluir que los mismos estaban siendo realmente internalizados por las células T98G desde tiempos menores a 6 h y que la capacidad penetrante fuese independiente de la sobreexpresión de E-selectina. A modo de comparación, se llevó a cabo el ensayo de captación celular con la citocina TNF- $\alpha$ , cuidando algunos aspectos del protocolo experimental que permitieran esclarecer los resultados obtenidos hasta el momento.

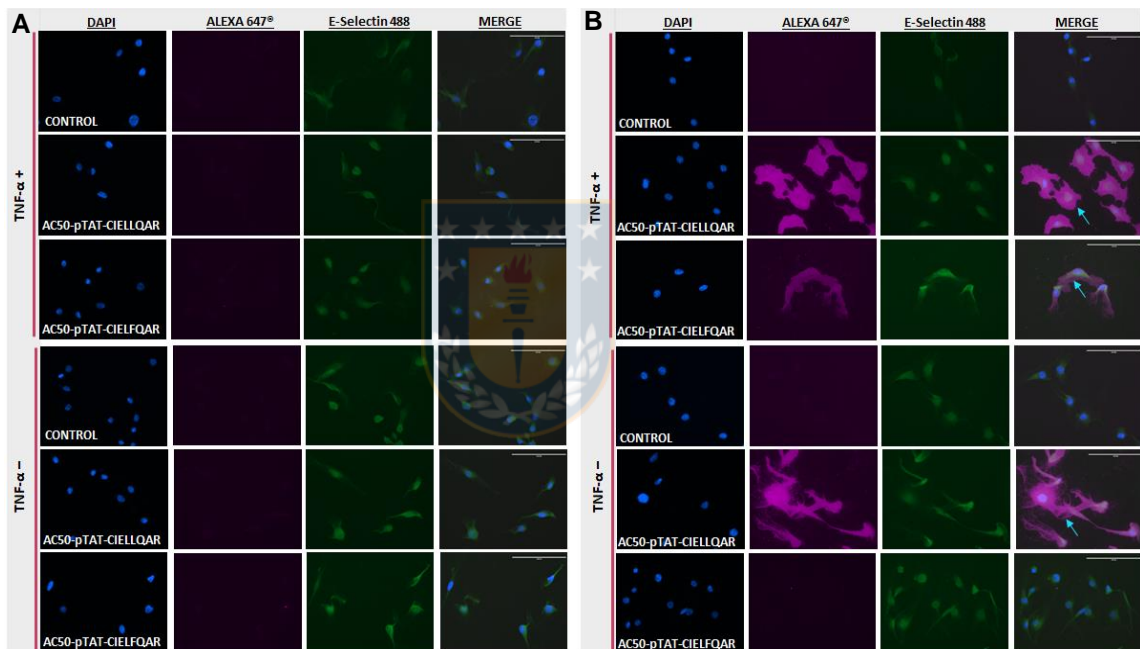


### **3.5.2 Captación de los nanotransportadores bifuncionales en células activadas con TNF- $\alpha$**

En estos ensayos, se evaluó la captación celular de los nanotransportadores AC50-pTAT-CIELLQAR y AC50-pTAT-CIELFQAR en células activadas y no activadas con TNF- $\alpha$ , incrementando un 50% la concentración de los dendrímeros para una mejor señal de fluorescencia y manteniendo los mismos tiempos de incubación de 6 h y 12 h.

Las imágenes representativas obtenidas de la línea HUVEC/TERT2 evidencian que luego de 6 h de incubación (panel A, Fig. 3.21) no existe acumulación y/o internalización de los nanotransportadores bifuncionales, tanto en células

activadas (TNF- $\alpha$  +) como en las no activadas (TNF- $\alpha$  -). Curiosamente, tras 12 h de exposición, la internalización de ambos dendrímeros tuvo lugar en las células que sobreexpresan al receptor de E-selectina (TNF- $\alpha$  +), mientras que en aquellas que mantienen niveles basales de la proteína (TNF- $\alpha$  -) sólo internalizó el dendrímero control AC50-pTAT-CIELLQAR (panel B, Fig. 3.21).



**Figura 3.21** Captación celular de los nanotransportadores bifuncionalizados en células HUVEC/TERT2 estimuladas con TNF- $\alpha$ . Imágenes representativas de HUVEC/TERT2 incubadas con los dendrímeros a A) 6 h y B) 12 h. Todas las imágenes fueron adquiridas con el objetivo 40X en una escala = 100  $\mu$ m.

Estos resultados se complementan con los obtenidos para el ensayo con PMA y permiten confirmar que el ingreso de los nanotransportadores bifuncionales a las células endoteliales ocurre a tiempos mayores de 6 h y más aún, que la entrada

de AC50-pTAT-CIELFQAR sí parece estar mediada en mayor medida por E-selectina.

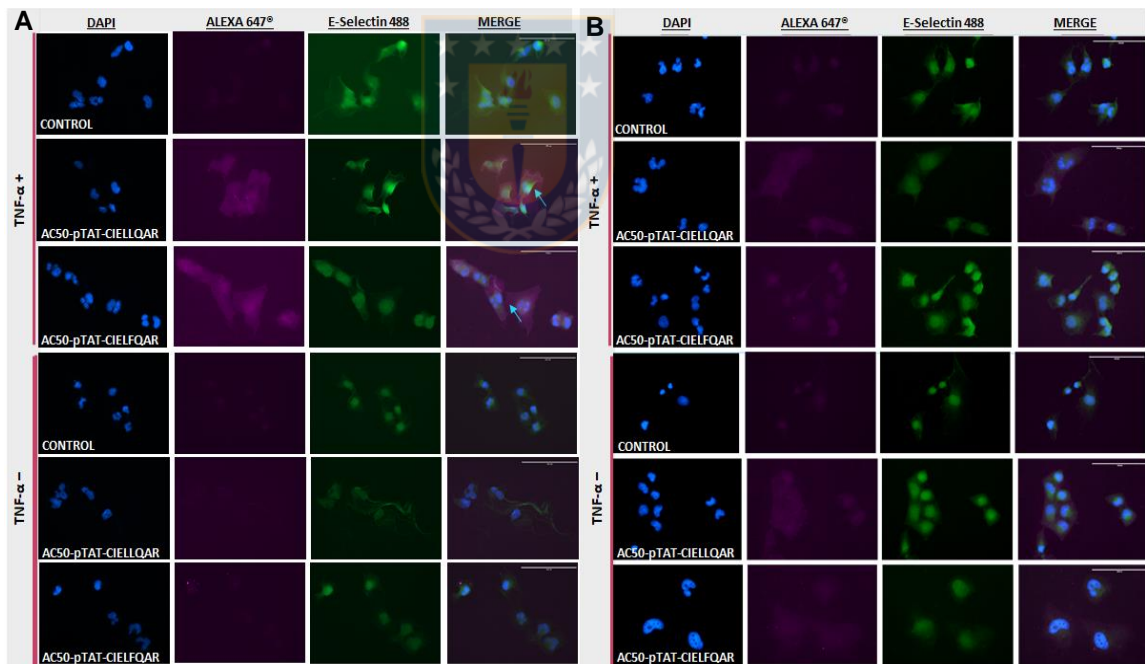
Por otro lado, las imágenes representativas obtenidas de la línea T98G demuestran que los dendrímeros AC50-pTAT-CIELLQAR y AC50-pTAT-CIELFQAR son capaces de ingresar a las células activadas transcurridas 6 h de incubación. A diferencia del ensayo de activación con PMA, no se observó acumulación y/o internalización de estos compuestos en las células no activadas, lo que sugiere que el ingreso de los nanotransportadores debería estar siendo mediado por el receptor (panel A, Fig. 3.22). También, se observó que luego de 12 h de exposición ambos nanotransportadores permanecen dentro de las células cancerígenas activadas, mientras que en aquellas no activadas se apreció levemente la entrada de AC50-pTAT-CIELLQAR y, en menor proporción, la de AC50-pTAT-CIELFQAR (panel B, Fig. 3.22).

El conjunto de estos resultados sugiere que los niveles basales de E-selectina en la línea T98G son mayores que en la línea HUVEC/TERT2 y que esta tendencia se mantiene aún con la estimulación por parte de los agentes pro-inflamatorios. Con la finalidad de verificar estos hechos, se estimó la cantidad de E-selectina expresada en ambas líneas celulares mediante la cuantificación de fluorescencia total corregida (CTCF) en aquellas células incubadas durante 12 h.

En la figura 3.23 se puede confirmar que la expresión de esta proteína es significativamente mayor en células activadas en comparación a las no activadas,

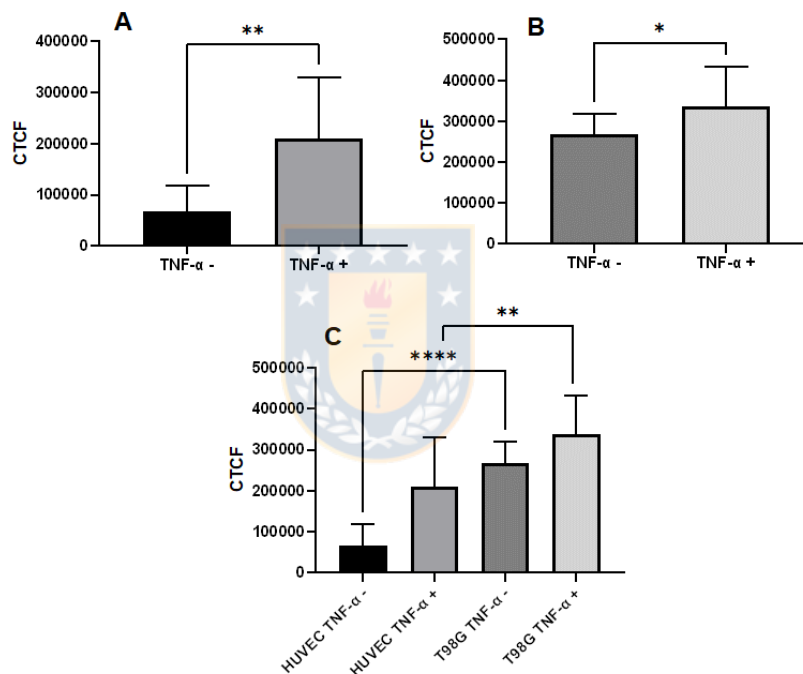


tanto para HUVEC/TERT2 (Fig. 3.23A) como para T98G (Fig. 3.23B). De igual forma, el análisis estadístico demuestra que los niveles de E-selectina el modelo de glioblastoma están significativamente más elevados con respecto al modelo endotelial, bien sea en la forma de expresión basal o en la estimulada con TNF- $\alpha$  (Fig. 3.23C). Esto reafirma la idea de que los nanotransportadores bifuncionales están siendo endocitados principalmente a través de este receptor, siendo más evidente en la internalización de AC50-pTAT-CIELFQAR.



**Figura 3.22** Captación celular de los nanotransportadores bifuncionalizados en células T98G estimuladas con TNF- $\alpha$ . Imágenes representativas de T98G incubadas con los dendrímeros a A) 6 h y B) 12 h. Todas las imágenes fueron adquiridas con el objetivo 40X en una escala = 100  $\mu$ m.

En este sentido, el ingreso del nanotransportador control AC50-pTAT-CIELLQAR en las células no activadas de ambas líneas celulares podría verse además favorecido por un mecanismo de transporte pasivo o transcitocis adsortiva, haciéndolo menos selectivo por la proteína.



**Figura 3.23** Cuantificación de la fluorescencia de E-selectina por el método CTCF. Comparación entre los niveles de expresión de E-selectina en A) HUVEC/TERT2, B) T98G y C) ambas líneas celulares. Los datos se expresan como media  $\pm$  SD. Prueba *t* de student \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  y \*\*\*\* $p < 0,0001$ ,  $n = 12$ .

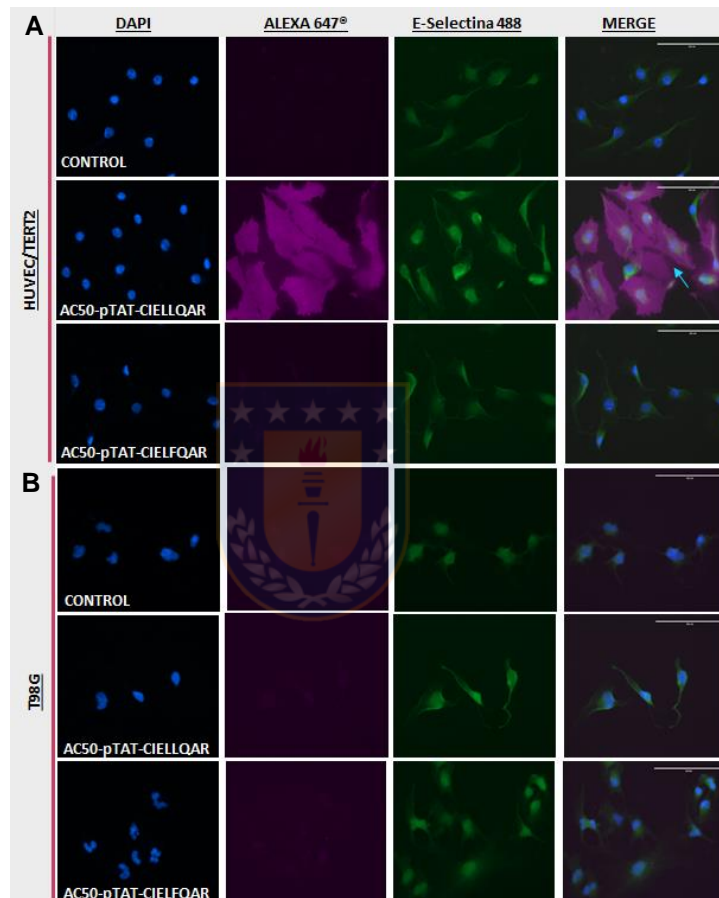
### 3.6 ENSAYO DE SELECTIVIDAD PARA EL RECEPTOR DE E-SELECTINA

Con el objetivo de estudiar la potencial selectividad *in Vitro* de los péptidos CIELLQAR y CIELFQAR hacia E-selectina, se pre-incubaron las células endoteliales y cancerosas no activadas con el anticuerpo anti-E-selectina para bloquear el sitio activo del receptor. Posteriormente, se evaluó la captación de los nanotransportadores bifuncionales durante un tiempo de exposición de 12 h.

En la figura 3.24 se observa que luego de 12 h de incubación (panel A) tiene lugar una gran acumulación de AC50-pTAT-CIELLQAR en las células HUVEC/TERT2, incluso en sitios inespecíficos de la superficie. Esta acumulación alrededor de las células no se aprecia con el dendrímero AC50-pTAT-CIELFQAR, por lo cual, estas observaciones sugieren una menor selectividad del péptido CIELLQAR hacia E-selectina expresada en las células endoteliales.

En cuanto a las células T98G (panel B), se observó un comportamiento diferente respecto al posible mecanismo de ingreso de los nanotransportadores, puesto que para el dendrímero AC50-pTAT-CIELLQAR no se evidencia una acumulación y/o internalización en esta línea celular, a diferencia de lo observado en las células endoteliales HUVEC/TERT2. De igual forma, el dendrímero AC50-pTAT-CIELFQAR tampoco es internalizado por las células cancerosas T98G. Debido a que la proteína se encuentra bloqueada por su respectivo anticuerpo, estos resultados indicarían la elevada selectividad del péptido CIELFQAR por E-

selectina y que la internalización del nanotransportador AC50-pTAT-CIELFQAR debería estar mediada fundamentalmente por su unión a este receptor.



**Figura 3.24** Selectividad *in Vitro* de los péptidos CIELLQAR y CIELFQAR hacia E-selectina. La afinidad se evaluó incubando los dendrímeros AC50-pTAT-CIELLQAR y AC50-pTAT-CIELFQAR durante el bloqueo del sitio activo de la proteína con un anticuerpo anti-E-selectina. Imágenes representativas al término de 12 h de exposición A) HUVEC/TERT2 y B) T98G. Todas las imágenes fueron adquiridas bajo el objetivo 40X en una escala = 100  $\mu$ m.

Además, estas evidencias resaltan las diferencias que existen entre las líneas estudiadas en relación a la composición de sus membranas celulares y cómo a través de ellas se establecen las diferencias en la entrada de un nanotransportador bifuncional por sobre otro. La expresión basal de E-selectina en la células HUVEC/TERT2 no es suficiente para que el dendrímero AC50-pTAT-CIELFQAR pueda ingresar, ni siquiera a tiempos largos de incubación (12 h). Esto indicaría, que el nanotransportador aparentemente no utiliza otro mecanismo alterno de ingreso a la célula que no sea el mediado por la proteína. En cambio, el nanotransportador control AC50-pTAT-CIELLQAR, utiliza un mecanismo de transporte diferente cuando los niveles de este receptor son bajos. Como se observó en las células T98G, los niveles basales de E-Selectina podrían ser lo suficientemente altos como para guiar a AC50-pTAT-CIELLQAR a un sólo mecanismo de entrada mediado por este receptor.

Las suposiciones anteriores están además sustentadas en los resultados de internalización obtenidos para los nanotransportadores AC50 y AC50-pTAT ensayados en las mismas líneas celulares, en donde se observó el ingreso de ambos compuestos en HUVEC/TERT2 (TNF- $\alpha$  -) al cabo de 6 h de incubación, indicando explícitamente que la internalización fue mediada por un mecanismo de transcitosis adsorptiva (Anexo 4). De forma similar ocurrió con la línea T98G, para la cual fue evidente el ingreso de estos dos compuestos al término de 12 h de exposición, tanto en las células activadas como en las no activadas (Anexo 5). En este sentido, se puede confirmar la mayor afinidad por E-Selectina del

nanotransportador conjugado con el péptido mutante CIELFQAR comparado con el nanotransportador AC50-pTAT-CIELLQAR, el cual se utilizó como sistema de referencia en estos estudios.



# ***CAPÍTULO 4. Conclusiones y Proyecciones***



## CONCLUSIONES

A través de estudios de *docking*, DM, análisis estructural y cálculos de energía libre por el método MM/GBSA se encontraron cuatro péptidos mutantes IEELQAR, IEYLLQAR, IELIQAR y IELFQAR con gran afinidad por E-selectina, derivados del péptido nativo IELLQAR. Tras ser modificados con un residuo *N*-Cys, los péptidos mutantes seleccionados mostraron variaciones en su energía libre de unión a E-selectina. Los C-péptidos que mantuvieron una alta afinidad por la proteína fueron CIELFQAR > CIEELQAR > CIELLQAR.

La alta sensibilidad de la técnica de termoforesis a microescala (MST) permitió comprobar experimentalmente la afinidad de los C-péptidos candidatos. Los valores promedio de  $K_d$  validaron la tendencia de afinidad que se obtuvo previamente para estos ligandos por los métodos computacionales. El péptido CIELLQAR fue seleccionado para la síntesis del nanotransportador bifuncional de mayor afinidad por E-selectina, mientras que el péptido CIEELQAR fue elegido para la síntesis del nanotransportador bifuncional de referencia.

La síntesis de los nanotransportadores bifuncionales se logró exitosamente mediante el esquema sintético planteado. La acetilación de PAMAM-G4 condujo a la unión de 34 grupos acetilos por molécula de dendrímero. La síntesis de AC50-pTAT mostró un porcentaje de eficiencia de 60% (aprox) a relaciones



molares AC50:GMBS:pTAT de 1:8:6 ó 1:6:4. Estas relaciones molares fueron también utilizadas en la síntesis de los nanotransportadores bifuncionales (AC50-pTAT:GMBS:CIELLQAR/CIELFQAR), sin embargo, no se observaron diferencias en el número de molécula conjugadas. El pH óptimo para las síntesis fue 8,4.

De forma general, las células estudiadas mostraron una elevada supervivencia (85-95%) luego de ser incubadas con los nanotransportadores sintetizados. Tanto la concentración como la carga superficial de los nanotransportadores sintetizados afectó en mayor medida la viabilidad de las células HUVEC/TERT2 en comparación a las células T98G durante las primeras 24 h de incubación. Sin embargo, la viabilidad en ambas líneas se recuperó luego de 48 h.

Los ensayos de internalización celular mostraron la preferencia de los nanotransportadores bifuncionales hacia el receptor E-selectina para mediar su entrada. Los resultados obtenidos con los agentes pro-inflamatorios revelaron que el ingreso de estos compuestos en células activadas ocurre luego de 6 h de incubación en la línea HUVEC/TERT2 y durante las primeras 6 h de incubación en la línea T98G.

El ensayo de selectividad *in Vitro* de los péptidos CIELLQAR y CIELFQAR por E-selectina confirmó la mayor afinidad de AC50-pTAT-CIELFQAR por sobre AC50-pTAT-CIELLQAR. En presencia de altos niveles de expresión de E-selectina se favorece un mecanismo de entrada mediado por este receptor para ambos nanotransportadores, mientras que a niveles muy bajos sólo AC50-pTAT-

CIELLQAR es capaz de ingresar a las células mediante un mecanismo de transcitosis adsorptiva.

La bifuncionalidad en AC50-pTAT-CIELFQAR le confiere a este dendrímero el potencial de ser usado como una novedosa macromolécula acarreadora que pueda ser dirigida hacia la BHE en el tratamiento de enfermedades del neurodegenerativas, cáncer cerebral y otras enfermedades del SNC.



## PROYECCIONES

Realizar ensayos de encapsulación y liberación de fármacos de interés en el nanotransportador bifuncional AC50-pTAT-CIELFQAR con el fin de elaborar formulaciones estables que puedan dosificarse en experimentos *in Vitro* e *in Vivo*.

Realizar ensayos *in Vivo* utilizando modelos murinos para el estudio de biodistribución del nanotransportador AC50-pTAT-CIELFQAR, así como estudios de internalización celular en tejidos de cerebro, médula espinal o tumores mediante las técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) y tinción con hematoxilina-eosina (H&E).

Particularmente, la evaluación en tumores puede lograrse a través de xenoinjertos con la inoculación de células de glioblastomas o neuroblastomas que sirvan como modelo de cáncer cerebral. También se puede inducir la tumorigénesis directamente en el cerebro, lo cual sería un modelo más adecuado que implica atravesar la BHE.

De igual forma, los nanotransportadores pueden evaluarse en modelos *in Vivo* de isquemia cerebral o de enfermedades neurodegenerativas como Parkinson y Alzheimer.

Por último, se podría explorar en la unión covalente de un fotosensibilizador a la estructura del dendrímero AC50-pTAT-CIELFQAR para que sea probado en células de cáncer del SNC que presenten resistencia a tratamientos con quimio o radioterapia.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] J.R. Kanwar, B. Sriramoju, R.K. Kanwar, Neurological disorders and therapeutics targeted to surmount the blood-brain barrier, *International journal of nanomedicine* 7 (2012) 3259-3277.
- [2] W.M. Pardridge, The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development, *NeuroRx* 2 (2005) 3-14.
- [3] H.E. de Vries, J. Kuiper, A.G. de Boer, T.J.C. Van Berkel, D.D. Breimer, The blood-brain barrier in neuroinflammatory diseases, *Pharmacological reviews* 49 (1997) 143-156.
- [4] L.-I. Zou, J.-L. Ma, T. Wang, T.-B. Yang, C.-B. Liu, Cell-penetrating peptide-mediated therapeutic molecule delivery into the central nervous system, *Current neuropharmacology* 11 (2013) 197-208.
- [5] M. Ferrari, Cancer nanotechnology: opportunities and challenges, *Nature reviews. Cancer* 5 (2005) 161-171.
- [6] P. Blasi, A. Schoubben, G. Traina, G. Manfroni, L. Barberini, P.F. Alberti, C. Cirotto, M. Ricci, Lipid nanoparticles for brain targeting III. Long-term stability and in vivo toxicity, *International journal of pharmaceutics* 454 (2013) 316-323.
- [7] S.R. Hwang, K. Kim, Nano-enabled delivery systems across the blood–brain barrier, *Archives of pharmacal research* 37 (2014) 24-30.
- [8] L. Shah, S. Yadav, M. Amiji, Nanotechnology for CNS delivery of bio-therapeutic agents, *Drug delivery and translational research* 3 (2013) 336-351.
- [9] M. Masserini, Nanoparticles for brain drug delivery, *ISRN biochemistry* 2013 (2013) 1-18.
- [10] D. Paolino, D. Cosco, R. Molinaro, C. Celia, M. Fresta, Supramolecular devices to improve the treatment of brain diseases, *Drug discovery today* 16 (2011) 311-324.
- [11] J. Kreuter, Drug delivery to the central nervous system by polymeric nanoparticles: what do we know?, *Advanced drug delivery reviews* 71 (2014) 2-14.
- [12] P. Ramge, J. Kreuter, B. Lemmer, Circadian Phase-Dependent Antinociceptive Reaction in Mice Determined by the Hot-Plate test and the Tail-Flick Test After Intravenous Injection of Dalargin-Loaded Nanoparticles, *Chronobiology International* 16 (1999) 767-777.

- [13] K. Gao, X. Jiang, Influence of particle size on transport of methotrexate across blood brain barrier by polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics* 310 (2006) 213-219.
- [14] T. Ren, N. Xu, C. Cao, W. Yuan, X. Yu, J. Chen, J. Ren, Preparation and Therapeutic Efficacy of Polysorbate-80-Coated Amphotericin B/PLA-b-PEG Nanoparticles, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 20 (2009) 1369-1380.
- [15] Y. Liu, V.S. Bryantsev, M.S. Diallo, W.A. Goddard III, PAMAM Dendrimers Undergo pH Responsive Conformational Changes without Swelling, *J. AM. CHEM. SOC* 131 (2009) 2798–2799.
- [16] P.K. Maiti, B. Bagchi, Diffusion of flexible, charged, nanoscopic molecules in solution: Size and pH dependence for PAMAM dendrimer, *J Chem Phys* 131 (2009) 214901.
- [17] D.A. Tomalia, Birth of a new macromolecular architecture: dendrimers as quantized building blocks for nanoscale synthetic polymer chemistry, *Progress in Polymer Science* 30 (2005) 294-324.
- [18] D.A. Tomalia, B. Huang, D.R. Swanson, H.M. Brothers, J.W. Klimash, Structure control within poly(amidoamine) dendrimers: size, shape and regio-chemical mimicry of globular proteins, *Tetrahedron* 59 (2003) 3799-3813.
- [19] F. Vidal, L. Guzman, Dendrimer nanocarriers drug action: perspective for neuronal pharmacology, *Neural regeneration research* 10 (2015) 1029.
- [20] A. D'Emanuele, D. Attwood, Dendrimer-drug interactions, *Adv Drug Deliv Rev* 57 (2005) 2147-2162.
- [21] A.M. Jolly, M. Bonizzoni, PAMAM dendrimers as supramolecular hosts through non-covalent interactions, *Supramolecular Chemistry* 27 (2014) 151-160.
- [22] P. Kolhe, Drug complexation, in vitro release and cellular entry of dendrimers and hyperbranched polymers, *International Journal of Pharmaceutics* 259 (2003) 143-160.
- [23] N. Taghavi Pourianazar, P. Mutlu, U. Gunduz, Bioapplications of poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers in nanomedicine, *Journal of Nanoparticle Research* 16 (2014).
- [24] R. Duncan, L. Izzo, Dendrimer biocompatibility and toxicity, *Adv Drug Deliv Rev* 57 (2005) 2215-2237.
- [25] D. Fischer, Y. Lib, B. Ahlemeyerc, J. Krieglsteinc, T. Kissel, In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis, *Biomaterials* 24 (2003) 1121–1131.
- [26] N. Malik, R. Wiwattanapatapee, R. Klopsch, K. Lorenz, H. Frey, J.W. Weener, E.W. Meijer, W. Paulus, R. Duncan, Dendrimers: Relationship between structure and biocompatibility in vitro, and preliminary studies on the biodistribution of <sup>125</sup>I-

- labelled polyamidoamine dendrimers in vivo, *Journal of Controlled Release* 65 (2000) 133–148.
- [27] Y. Cheng, L. Zhao, Y. Li, T. Xu, Design of biocompatible dendrimers for cancer diagnosis and therapy: current status and future perspectives, *Chem Soc Rev* 40 (2011) 2673-2703.
- [28] K. Jain, P. Kesharwani, U. Gupta, N.K. Jain, Dendrimer toxicity: Let's meet the challenge, *Int J Pharm* 394 (2010) 122-142.
- [29] S. Thakur, P. Kesharwani, R.K. Tekade, N.K. Jain, Impact of pegylation on biopharmaceutical properties of dendrimers, *Polymer* 59 (2015) 67-92.
- [30] P.A. Barra, L. Barraza, V.A. Jiménez, J.A. Gavín, J.B. Alderete, Complexation of Mefenamic Acid by Low-Generation PAMAM Dendrimers: Insight from NMR Spectroscopy Studies and Molecular Dynamics Simulations, *Macromolecular Chemistry and Physics* 215 (2014) 372-383.
- [31] L.F. Barraza, V.A. Jiménez, J.B. Alderete, Methotrexate Complexation with Native and PEGylated PAMAM-G4: Effect of the PEGylation Degree on the Drug Loading Capacity and Release Kinetics, *Macromolecular Chemistry and Physics* 217 (2016) 605-613.
- [32] C. Diaz, J. Guzmán, V.A. Jiménez, J.B. Alderete, Partially PEGylated PAMAM dendrimers as solubility enhancers of Silybin, *Pharmaceutical Development and Technology* (2017) 1-8.
- [33] F. Vidal, P. Vasquez, C. Diaz, D. Nova, J. Alderete, L. Guzman, Mechanism of PAMAM Dendrimers Internalization in Hippocampal Neurons, *Mol Pharm* 13 (2016) 3395-3403.
- [34] K.M. Wagstaff, D.A. Jans, Protein transduction: cell penetrating peptides and their therapeutic applications, *Current medicinal chemistry* 13 (2006) 1371-1387.
- [35] B. Gupta, T.S. Levchenko, V.P. Torchilin, Intracellular delivery of large molecules and small particles by cell-penetrating proteins and peptides, *Advanced drug delivery reviews* 57 (2005) 637-651.
- [36] C.C. Berry, Intracellular delivery of nanoparticles via the HIV-1 tat peptide, *Nanomedicine* 3 (2008) 357-365.
- [37] D. Zhang, J. Wang, D. Xu, Cell-penetrating peptides as noninvasive transmembrane vectors for the development of novel multifunctional drug-delivery systems, *Journal of controlled release* 229 (2016) 130-139.
- [38] H. Brooks, B. Lebleu, E. Vivès, Tat peptide-mediated cellular delivery: back to basics, *Advanced drug delivery reviews* 57 (2005) 559-577.
- [39] A. Mishra, G.H. Lai, N.W. Schmidt, V.Z. Sun, A.R. Rodriguez, R. Tong, L. Tang, J. Cheng, T.J. Deming, D.T. Kamei, Translocation of HIV TAT peptide and analogues induced by multiplexed membrane and cytoskeletal interactions, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (2011) 16883-16888.

- [40] J. Lin, A. Alexander-Katz, Cell membranes open “doors” for cationic nanoparticles/biomolecules: insights into uptake kinetics, *Acs Nano* 7 (2013) 10799-10808.
- [41] M. Rizzuti, M. Nizzardo, C. Zanetta, A. Ramirez, S. Corti, Therapeutic applications of the cell-penetrating HIV-1 Tat peptide, *Drug discovery today* 20 (2015) 76-85.
- [42] L. Zou, Q. Peng, P. Wang, B. Zhou, Progress in Research and Application of HIV-1 TAT-Derived Cell-Penetrating Peptide, *The Journal of membrane biology* 250 (2017) 115-122.
- [43] E. Vives, P. Brodin, B. Lebleu, A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus, *Journal of Biological Chemistry* 272 (1997) 16010-16017.
- [44] G. Cao, W. Pei, H. Ge, Q. Liang, Y. Luo, F.R. Sharp, A. Lu, R. Ran, S.H. Graham, J. Chen, In vivo delivery of a Bcl-xL fusion protein containing the TAT protein transduction domain protects against ischemic brain injury and neuronal apoptosis, *Journal of Neuroscience* 22 (2002) 5423-5431.
- [45] S. Asoh, I. Ohsawa, T. Mori, K.-i. Katsura, T. Hiraide, Y. Katayama, M. Kimura, D. Ozaki, K. Yamagata, S. Ohta, Protection against ischemic brain injury by protein therapeutics, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (2002) 17107-17112.
- [46] W. Xu, M. Zhou, M. Baudry, Neuroprotection by cell permeable TAT-mGluR1 peptide in ischemia: synergy between carrier and cargo sequences, *The Neuroscientist* 14 (2008) 409-414.
- [47] G. Lou, Q. Zhang, F. Xiao, Q. Xiang, Z. Su, L. Zhang, P. Yang, Y. Yang, Q. Zheng, Y. Huang, Intranasal administration of TAT-haFGF14–154 attenuates disease progression in a mouse model of Alzheimer’s disease, *Neuroscience* 223 (2012) 225-237.
- [48] T. Kanazawa, F. Akiyama, S. Kakizaki, Y. Takashima, Y. Seta, Delivery of siRNA to the brain using a combination of nose-to-brain delivery and cell-penetrating peptide-modified nano-micelles, *Biomaterials* 34 (2013) 9220-9226.
- [49] T. Kanazawa, H. Taki, K. Tanaka, Y. Takashima, H. Okada, Cell-penetrating peptide-modified block copolymer micelles promote direct brain delivery via intranasal administration, *Pharmaceutical research* 28 (2011) 2130-2139.
- [50] S. Santra, H. Yang, D. Dutta, J.T. Stanley, P.H. Holloway, W. Tan, B.M. Moudgil, R.A. Mericle, TAT conjugated, FITC doped silica nanoparticles for bioimaging applications, *Chemical Communications* (2004) 2810-2811.
- [51] M. Rapoport, H. Lorberboum-Galski, TAT-based drug delivery system—new directions in protein delivery for new hopes?, *Expert opinion on drug delivery* 6 (2009) 453-463.



- [52] H. Harada, S. Kizaka-Kondoh, M. Hiraoka, Antitumor protein therapy; application of the protein transduction domain to the development of a protein drug for cancer treatment, *Breast Cancer* 13 (2006) 16-26.
- [53] L. Guelen, H. Paterson, J. Gäken, M. Meyers, F. Farzaneh, M. Tavassoli, TAT-apoptin is efficiently delivered and induces apoptosis in cancer cells, *Oncogene* 23 (2004) 1153-1165.
- [54] C. Saraiva, C. Praça, R. Ferreira, T. Santos, L. Ferreira, L. Bernardino, Nanoparticle-mediated brain drug delivery: overcoming blood–brain barrier to treat neurodegenerative diseases, *Journal of Controlled Release* 235 (2016) 34-47.
- [55] S. Richard, L. Lagerstedt, P.R. Burkhard, M. Debouverie, N. Turck, J.-C. Sanchez, E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 as biomarkers of 3-month outcome in cerebrovascular diseases, *Journal of Inflammation* 12 (2015) 61.
- [56] J.R. Kanwar, B. Sriramoju, R.K. Kanwar, Neurological disorders and therapeutics targeted to surmount the blood-brain barrier, *International journal of nanomedicine* 7 (2012) 3259-3278.
- [57] A.P. Mann, T. Tanaka, A. Somasunderam, X. Liu, D.G. Gorenstein, M. Ferrari, E-Selectin-Targeted Porous Silicon Particle for Nanoparticle Delivery to the Bone Marrow, *Advanced Materials* 23 (2011).
- [58] N. Shonka, Y. Piao, M. Gilbert, A. Yung, S. Chang, L.M. DeAngelis, A.B. Lassman, J. Liu, T. Cloughesy, H.I. Robins, R. Lloyd, A. Chen, M. Prados, P.Y. Wen, J. Heymach, J. de Groot, Cytokines associated with toxicity in the treatment of recurrent glioblastoma with aflibercept, *Targeted Oncology* 8 (2013) 117-125.
- [59] E.P. Erkan, T. Strobel, C. Dorfer, M. Sonntagbauer, A. Weinhausel, N. Saydam, O. Saydam, Circulating Tumor Biomarkers in Meningiomas Reveal a Signature of Equilibrium Between Tumor Growth and Immune Modulation, *Front Oncol* 9 (2019) 1031.
- [60] M.P. Bevilacqua, Endothelial-leukocyte adhesion molecules, *Annual review of immunology* 11 (1993) 767-804.
- [61] E. Jubeli, L. Moine, J. Vergnaud-Gauduchon, G. Barratt, E-selectin as a target for drug delivery and molecular imaging, *Journal of controlled release* 158 (2012) 194-206.
- [62] S. Ma, X.Y. Tian, Y. Zhang, C. Mu, H. Shen, J. Bismuth, H.J. Pownall, Y. Huang, W.T. Wong, E-selectin-targeting delivery of microRNAs by microparticles ameliorates endothelial inflammation and atherosclerosis, *Scientific reports* 6 (2016) 22910.
- [63] J. Emerit, M. Edeas, F. Bricaire, Neurodegenerative diseases and oxidative stress, *Biomedicine & Pharmacotherapy* 58 (2004) 39-46.
- [64] E. Zenaro, E. Pietronigro, V. Della Bianca, G. Piacentino, L. Marongiu, S. Budui, E. Turano, B. Rossi, S. Angiari, S. Dusi, Neutrophils promote Alzheimer's disease-

- like pathology and cognitive decline via LFA-1 integrin, *Nature medicine* 21 (2015) 880-886.
- [65] E. Zenaro, G. Piacentino, G. Constantin, The blood-brain barrier in Alzheimer's disease, *Neurobiology of Disease* 107 (2017) 41-56.
- [66] H.-B. Wang, W. Jin-Tao, L. Zhang, Z.H. Geng, X. Wei-Li, T. Xu, Y. Huo, X. Zhu, E.F. Plow, M. Chen, P-selectin primes leukocyte integrin activation during inflammation, *Nature immunology* 8 (2007) 882-892.
- [67] G. Li, K. Xiong, A. Korff, C. Pan, J.F. Quinn, D.R. Galasko, C. Liu, T.J. Montine, E.R. Peskind, J. Zhang, Increased CSF E-Selectin in Clinical Alzheimer's Disease without Altered CSF A $\beta$  42 and Tau, *Journal of Alzheimer's Disease* 47 (2015) 883-887.
- [68] G. Li, J.B. Shofer, E.C. Petrie, C.-E. Yu, C.W. Wilkinson, D.P. Figlewicz, A. Shutes-David, J. Zhang, T.J. Montine, M.A. Raskind, J.F. Quinn, D.R. Galasko, E.R. Peskind, Cerebrospinal fluid biomarkers for Alzheimer's and vascular disease vary by age, gender, and APOE genotype in cognitively normal adults, *Alzheimer's Research & Therapy* 9 (2017) 48.
- [69] A. Flex, S. Giovannini, F. Biscetti, R. Liperoti, G. Spalletta, G. Straface, F. Landi, F. Angelini, C. Caltagirone, G. Ghirlanda, R. Bernabei, Effect of Proinflammatory Gene Polymorphisms on the Risk of Alzheimer's Disease, *Neurodegenerative Diseases* 13 (2014) 230-236.
- [70] K.U. Tufekci, R. Meuwissen, S. Genc, K. Genc, Inflammation in Parkinson's disease, *Advances in protein chemistry and structural biology* 88 (2012) 69-132.
- [71] C. Barcia, Glial-Mediated Inflammation Underlying Parkinsonism, *Scientifica* 2013 (2013) 1-15.
- [72] P.-L. Chiang, H.-L. Chen, C.-H. Lu, P.-C. Chen, M.-H. Chen, I.H. Yang, N.-W. Tsai, W.-C. Lin, White matter damage and systemic inflammation in Parkinson's disease, *BMC Neuroscience* 18 (2017) 48.
- [73] S. Gout, P.-L. Tremblay, J. Huot, Selectins and selectin ligands in extravasation of cancer cells and organ selectivity of metastasis, *Clinical & Experimental Metastasis* 25 (2008) 335-344.
- [74] B. Muz, A. Abdelghafer, M. Markovic, J. Yavner, A. Melam, N.N. Salama, A.K. Azab, Targeting E-selectin to Tackle Cancer Using Uproleselan, *Cancers* 13 (2021) 335.
- [75] M. Jiang, X. Xu, Y. Bi, J. Xu, C. Qin, M. Han, Systemic inflammation promotes lung metastasis via E-selectin upregulation in mouse breast cancer model, *Cancer Biology & Therapy* 15 (2014) 789-796.
- [76] M. Esposito, N. Mondal, T.M. Greco, Y. Wei, C. Spadazzi, S.C. Lin, H. Zheng, C. Cheung, J.L. Magnani, S.H. Lin, I.M. Cristea, R. Sackstein, Y. Kang, Bone vascular niche E-selectin induces mesenchymal-epithelial transition and Wnt activation in cancer cells to promote bone metastasis, *Nat Cell Biol* 21 (2019) 627-639.

- [77] C. Festuccia, A. Mancini, G.L. Gravina, A. Colapietro, A. Vetuschi, S. Pompili, L. Ventura, S. Delle Monache, R. Iorio, A. Del Fattore, W. Fogler, J. Magnani, Dual CXCR4 and E-Selectin Inhibitor, GMI-1359, Shows Anti-Bone Metastatic Effects and Synergizes with Docetaxel in Prostate Cancer Cell Intraosseous Growth, *Cells* 9 (2019) 32.
- [78] S.A. Jassam, Z. Maherally, J.R. Smith, K. Ashkan, F. Roncaroli, H.L. Fillmore, G.J. Pilkington, TNF- $\alpha$  enhancement of CD62E mediates adhesion of non-small cell lung cancer cells to brain endothelium via CD15 in lung-brain metastasis, *Neuro-Oncology* 18 (2016) 679-690.
- [79] S. Jassam, Z. Maherally, J. Smith, K. Ashkan, F. Roncaroli, H. Fillmore, G. Pilkington, CD15s/CD62E Interaction Mediates the Adhesion of Non-Small Cell Lung Cancer Cells on Brain Endothelial Cells: Implications for Cerebral Metastasis, *International Journal of Molecular Sciences* 18 (2017) 1474.
- [80] T. Custódio-Santos, M. Videira, M.A. Brito, Brain metastasization of breast cancer, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1868 (2017) 132-147.
- [81] S.R. Barthel, J.D. Gavino, L. Descheny, C.J. Dimitroff, Targeting selectins and selectin ligands in inflammation and cancer, *Expert Opin Ther Targets* 11 (2007) 1473-1491.
- [82] F.M. Deschepper, R. Zoppi, M. Pirro, P.J. Hensbergen, F. Dall'Olio, M. Kotsias, R.A. Gardner, D.I.R. Spencer, P.A. Videira, L1CAM as an E-selectin Ligand in Colon Cancer, *International Journal of Molecular Sciences* 21 (2020) 8286.
- [83] Y. Morita, M. Leslie, H. Kameyama, G.L.R. Lokesh, N. Ichimura, R. Davis, N. Hills, N. Hasan, R. Zhang, Y. Kondo, D.G. Gorenstein, D.E. Volk, I. Chervoneva, H. Rui, T. Tanaka, Functional Blockade of E-Selectin in Tumor-Associated Vessels Enhances Anti-Tumor Effect of Doxorubicin in Breast Cancer, *Cancers (Basel)* 12 (2020).
- [84] H. Kang, R. DeLong, M.H. Fisher, R.L. Juliano, Tat-conjugated PAMAM dendrimers as delivery agents for antisense and siRNA oligonucleotides, *Pharmaceutical research* 22 (2005) 2099-2106.
- [85] A. Bahadoran, H. Moeini, M.H. Bejo, M.Z. Hussein, A.R. Omar, Development of tat-conjugated dendrimer for transdermal DNA vaccine delivery, *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences* 19 (2016) 325-338.
- [86] C. Yan, J. Gu, D. Hou, H. Jing, J. Wang, Y. Guo, H. Katsumi, T. Sakane, A. Yamamoto, Improved tumor targetability of Tat-conjugated PAMAM dendrimers as a novel nanosized anti-tumor drug carrier, *Drug development and industrial pharmacy* 41 (2015) 617-622.
- [87] L. Liu, K. Guo, J. Lu, S.S. Venkatraman, D. Luo, K.C. Ng, E.-A. Ling, S. Mochhala, Y.-Y. Yang, Biologically active core/shell nanoparticles self-assembled from cholesterol-terminated PEG-TAT for drug delivery across the blood-brain barrier, *Biomaterials* 29 (2008) 1509-1517.

- [88] L. Han, A. Zhang, H. Wang, P. Pu, X. Jiang, C. Kang, J. Chang, Tat-BMPs-PAMAM conjugates enhance therapeutic effect of small interference RNA on U251 glioma cells in vitro and in vivo, *Human gene therapy* 21 (2010) 417-426.
- [89] J. Li, X. Zhang, M. Wang, X. Li, H. Mu, A. Wang, W. Liu, Y. Li, Z. Wu, K. Sun, Synthesis of a bi-functional dendrimer-based nanovehicle co-modified with RGDyC and TAT peptides for neovascular targeting and penetration, *International journal of pharmaceutics* 501 (2016) 112-123.
- [90] C.L. Martens, S.E. Cwirla, R.Y.W. Lee, E. Whitehorn, E.Y.F. Chen, A. Bakker, E.L. Martin, C. Wagstrom, P. Gopalan, C.W. Smith, Peptides which bind to E-selectin and block neutrophil adhesion, *Journal of Biological Chemistry* 270 (1995) 21129-21136.
- [91] D.I. Susumu Kawano, Yusuke Sasaki, Haruo Sekizaki, and Eiko Toyota, Identification of a Novel Carbohydrate-Mimicking Octapeptide from Chemical Peptide Library and Characterization as Selectin Inhibitor, *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 34 (2011) 883-889.
- [92] C.O. Michiko N. Fukuda, Kevin Lowitz, Osamu Matsuo, Renata Pasqualini, Erkki Ruoslahti, and Minoru Fukuda, A Peptide Mimic of E-Selectin Ligand Inhibits Sialyl Lewis X-dependent Lung Colonization of Tumor Cells, *CANCER RESEARCH* 60 (2000) 450-456.
- [93] J.R. Wodicka, A.M. Chambers, G.S. Sangha, C.J. Goergen, A. Panitch, Development of a Glycosaminoglycan Derived, Selectin Targeting Anti-Adhesive Coating to Treat Endothelial Cell Dysfunction, *Pharmaceuticals (Basel)* 10 (2017).
- [94] J.R. Wodicka, V.A. Morikis, T. Dehghani, S.I. Simon, A. Panitch, Selectin-Targeting Peptide-Glycosaminoglycan Conjugates Modulate Neutrophil-Endothelial Interactions, *Cell Mol Bioeng* 12 (2019) 121-130.
- [95] J.W. Helen M. Berman, Zukang Feng, Gary Gilliland, T. N. Bhat, Helge Weissig, Ilya N. Shindyalov and Philip E. Bourne., The Protein Data Bank, *Nucleic Acids Research* 28 (2000) 235-242.
- [96] J.T. William S. Somers, Gray D. Shaw, and Raymond T. Camphausen, Insights into the Molecular Basis of Leukocyte Tethering and Rolling Revealed by Structures of P- and E-Selectin Bound to SLeX and PSGL-1, *Cell* 103 (2000) 467-479.
- [97] T.J. Dolinsky, J.E. Nielsen, J.A. McCammon, N.A. Baker, PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations, *Nucleic Acids Res* 32 (2004) W665-667.
- [98] J.C. Gordon, J.B. Myers, T. Folta, V. Shoja, L.S. Heath, A. Onufriev, H++: a server for estimating pKas and adding missing hydrogens to macromolecules, *Nucleic Acids Res* 33 (2005) W368-371.
- [99] J.A. Maier, C. Martinez, K. Kasavajhala, L. Wickstrom, K.E. Hauser, C. Simmerling, ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB, *Journal of Chemical Theory and Computation* 11 (2015) 3696-3713.

- [100] O. Trott, A.J. Olson, AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading, *J Comput Chem* 31 (2010) 455-461.
- [101] W.F. van Gunsteren, H.J.C. Berendsen, Algorithms for macromolecular dynamics and constraint dynamics, *Molecular Physics* 34 (1977) 1311-1327.
- [102] B.R. Miller, 3rd, T.D. McGee, Jr., J.M. Swails, N. Homeyer, H. Gohlke, A.E. Roitberg, MMPBSA.py: An Efficient Program for End-State Free Energy Calculations, *J Chem Theory Comput* 8 (2012) 3314-3321.
- [103] M. Jerabek-Willemsen, C.J. Wienken, D. Braun, P. Baaske, S. Duhr, Molecular interaction studies using microscale thermophoresis, *Assay Drug Dev Technol* 9 (2011) 342-353.
- [104] M. Jerabek-Willemsen, T. André, R. Wanner, H.M. Roth, S. Duhr, P. Baaske, D. Breitsprecher, MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond, *Journal of Molecular Structure* 1077 (2014) 101-113.
- [105] C.L. Waite, S.M. Sparks, K.E. Uhrich, C.M. Roth, Acetylation of PAMAM dendrimers for cellular delivery of siRNA, *BMC Biotechnol* 9 (2009) 38.
- [106] N.T. Jennifer Melrose, Gao Liu, and Ellen L. Berg, IFN-g Inhibits Activation-Induced Expression of E- and P-Selectin on Endothelial Cells, *J. Immunol.* 161 (1998) 2457-2464.
- [107] P.A. Barra, A.J. Ribeiro, M.J. Ramos, V.A. Jimenez, J.B. Alderete, P.A. Fernandes, Binding free energy calculations on E-selectin complexes with sLe(x) oligosaccharide analogs, *Chem Biol Drug Des* 89 (2017) 114-123.
- [108] P.A. Barra, V.A. Jimenez, J.A. Gavin, A.H. Daranas, J.B. Alderete, Discovery of New E-Selectin Inhibitors by Virtual Screening, Fluorescence Binding Assays, and STD NMR Experiments, *ChemMedChem* 11 (2016) 1008-1014.
- [109] A.C. Fernandes, M. Liu, T. Sorbo, L.C. Appold, M. Ilbert, G. Ferracci, F. Kiessling, F.B. RJ, T. Lammers, O. Iranzo, A computational and experimental study to develop E-selectin targeted peptides for molecular imaging applications, *Future Med Chem* (2018).
- [110] P. Baaske, C.J. Wienken, P. Reineck, S. Duhr, D. Braun, Optical thermophoresis for quantifying the buffer dependence of aptamer binding, *Angew Chem Int Ed Engl* 49 (2010) 2238-2241.
- [111] S.A. Seidel, P.M. Dijkman, W.A. Lea, G. van den Bogaart, M. Jerabek-Willemsen, A. Lazic, J.S. Joseph, P. Srinivasan, P. Baaske, A. Simeonov, I. Katritch, F.A. Melo, J.E. Ladbury, G. Schreiber, A. Watts, D. Braun, S. Duhr, Microscale thermophoresis quantifies biomolecular interactions under previously challenging conditions, *Methods* 59 (2013) 301-315.
- [112] C.J. Wienken, P. Baaske, U. Rothbauer, D. Braun, S. Duhr, Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis, *Nat Commun* 1 (2010) 100.

- [113] P.A.V. Natalia Ortiz, Felipe Vidal, Carola F. Díaz, José L. Guzmán, Verónica A. Jiménez and Joel B. Alderete, Polyamidoamine-based nanovector for the efficient delivery of methotrexate to U87 glioma cells, *Nanomedicine* 15 (2020).
- [114] K.M.K. Rohit B. Kolhatkar, Peter W. Swaan, and Hamidreza Ghandehari, Surface Acetylation of Polyamidoamine (PAMAM) Dendrimers Decreases Cytotoxicity while Maintaining Membrane Permeability, *Bioconjugate Chemistry* 18 (2007) 2054–2060.
- [115] J. Liu, J. Liu, L. Chu, L. Tong, H. Gao, C. Yang, D. Wang, L. Shi, D. Kong, Z. Li, Synthesis, Biodistribution, and Imaging of PEGylated-Acetylated Polyamidoamine Dendrimers, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 14 (2014) 3305-3312.
- [116] M.V. Berridge, P.M. Herst, A.S. Tan, Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction, 11 (2005) 127-152.
- [117] M.R. Riss TL, Niles AL, et al., Cell Viability Assays, *Assay Guidance Manual* (2016) 1-25.
- [118] Y.K. Yang Zeng, Tin-Tin Win-Shwe, Quin Zeng, Seishiro Hirano, Zhenya Zang and Hideko Sone, Effects of PAMAM dendrimers with various surface functional groups and multiple generation on cytotoxicity and neural differentiation using human neuralprogenitor cells, *J. Toxicol. Sci.* 41 (2016) 351-370.
- [119] B.J. Altman, J.C. Rathmell, Metabolic stress in autophagy and cell death pathways, *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4 (2012) a008763.
- [120] O. Kepp, L. Galluzzi, M. Lipinski, J. Yuan, G. Kroemer, Cell death assays for drug discovery, *Nat Rev Drug Discov* 10 (2011) 221-237.
- [121] M. Suzanne, H. Steller, Letting go: modification of cell adhesion during apoptosis, *J Biol* 8 (2009) 49.
- [122] J. Mear, S. Hughes, The Effect of Phorbol 12-Myristate 13-Acetate on CD11b and CD62-L Cell Surface Expression of Neutrophils and Monocytes, *International Journal of Biochemistry Research & Review* 15 (2016) 1-12.
- [123] F. Wu, L. Liu, H. Zhou, Endothelial cell activation in central nervous system inflammation, *J Leukoc Biol* 101 (2017) 1119-1132.
- [124] W. Shen, M.A. van Dongen, Y. Han, M. Yu, Y. Li, G. Liu, M.M. Banaszak Holl, R. Qi, 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 (2014) 658-663.

## ANEXOS

**Anexo 1.** Descomposición de la energía libre de unión de los complejos E-selectina/péptidos extraído de los últimos 10 ns de trayectoria

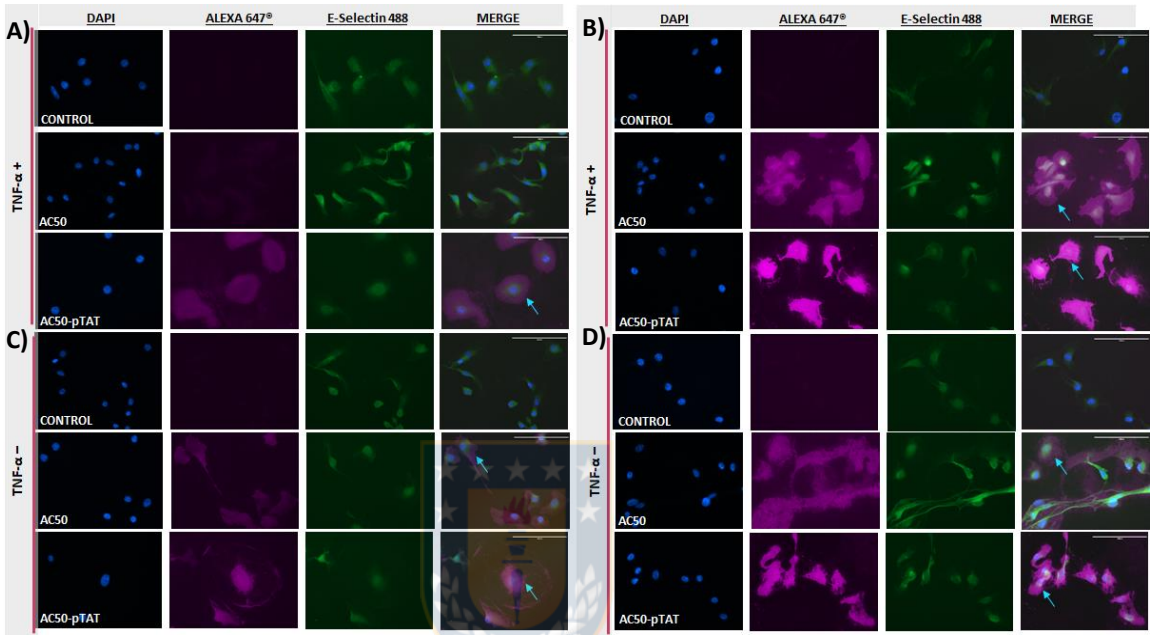
| <b>peptide</b>    | <b>Energy Component</b> | <b>Mean ± SD</b>   |
|-------------------|-------------------------|--------------------|
| <i>nativo</i>     | VDWAALS                 | -32.4746 ± 0.2362  |
|                   | EEL                     | -168.7049 ± 1.8808 |
|                   | EGB                     | 180.9255 ± 1.5723  |
|                   | ESURF                   | -5.8821 ± 0.023    |
|                   | DELTA TOTAL             | -26.1362 ± 0.4033  |
| <hr/>             |                         |                    |
| <i>mutante 2</i>  | <b>Energy Component</b> | <b>Mean ± SD</b>   |
|                   | VDWAALS                 | -20.35 ± 0.4429    |
|                   | EEL                     | -476.5944 ± 1.4365 |
|                   | EGB                     | 449.1355 ± 1.1857  |
|                   | ESURF                   | -6.9914 ± 0.0568   |
| DELTA TOTAL       | -54.8004 ± 0.5341       |                    |
| <hr/>             |                         |                    |
| <i>mutante 3</i>  | <b>Energy Component</b> | <b>Mean ± SD</b>   |
|                   | VDWAALS                 | -23.0993 ± 0.2947  |
|                   | EEL                     | -216.6939 ± 1.975  |
|                   | EGB                     | 213.143 ± 1.5344   |
|                   | ESURF                   | -5.7646 ± 0.0241   |
| DELTA TOTAL       | -32.4148 ± 0.5204       |                    |
| <hr/>             |                         |                    |
| <i>mutante 10</i> | <b>Energy Component</b> | <b>Mean ± SD</b>   |
|                   | VDWAALS                 | -37.7735 ± 0.3333  |
|                   | EEL                     | -146.9184 ± 1.2673 |
|                   | EGB                     | 162.8239 ± 1.0616  |
|                   | ESURF                   | -8.1458 ± 0.0282   |
| DELTA TOTAL       | -30.0138 ± 0.3859       |                    |
| <hr/>             |                         |                    |
| <i>mutante 11</i> | <b>Energy Component</b> | <b>Mean ± SD</b>   |
|                   | VDWAALS                 | -20.4729 ± 0.4214  |
|                   | EEL                     | -214.1087 ± 1.979  |
|                   | EGB                     | 210.6805 ± 1.6515  |
|                   | ESURF                   | -6.3767 ± 0.0402   |
| DELTA TOTAL       | -30.2778 ± 0.4146       |                    |

**Anexo 2.** Descomposición de la energía libre de unión de los complejos E-selectina/péptidos extraído de los últimos 10 ns de trayectoria

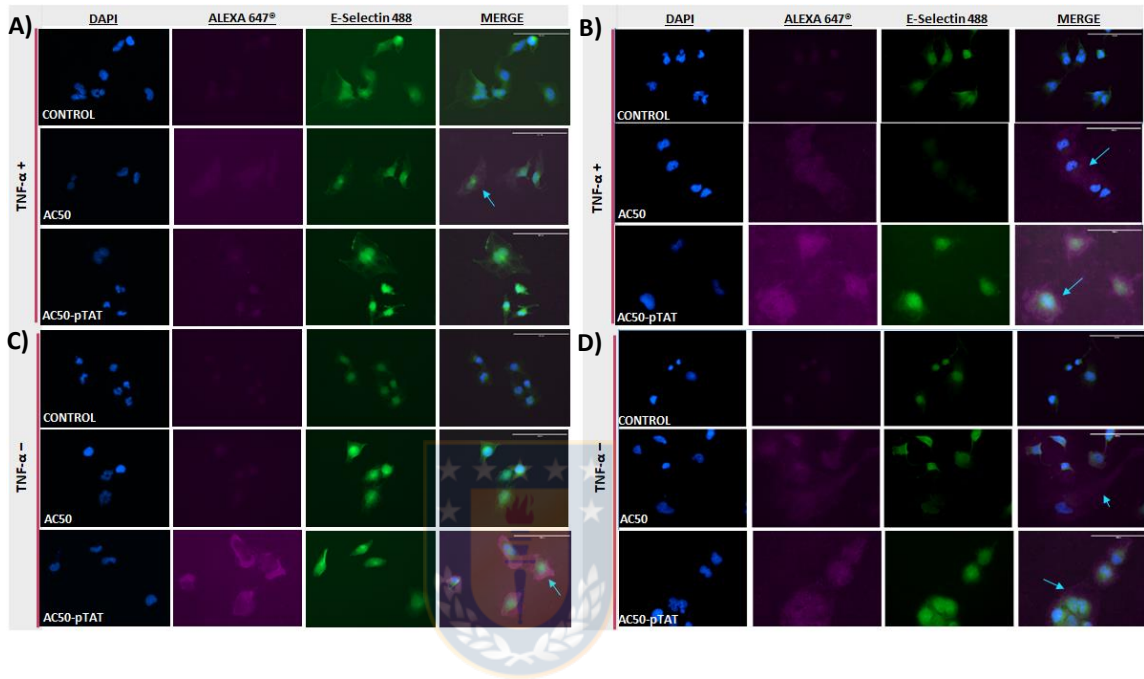
| <b>peptide</b>      | <b>Energy Component</b> | <b>Mean ± SD</b>   |
|---------------------|-------------------------|--------------------|
| <i>C-nativo</i>     | VDWAALS                 | -13.5429 ± 0.2466  |
|                     | EEL                     | -250.3067 ± 1.4557 |
|                     | EGB                     | 239.947 ± 1.2459   |
|                     | ESURF                   | -4.8358 ± 0.0255   |
|                     | DELTA TOTAL             | -28.7383 ± 0.4     |
| <hr/>               |                         |                    |
|                     | <b>Energy Component</b> | <b>Mean ± SD</b>   |
| <i>C-mutante 2</i>  | VDWAALS                 | -14.9737 ± 0.2259  |
|                     | EEL                     | -274.6675 ± 1.1496 |
|                     | EGB                     | 261.4495 ± 0.9627  |
|                     | ESURF                   | -5.6111 ± 0.0173   |
|                     | DELTA TOTAL             | -33.8028 ± 0.3655  |
| <hr/>               |                         |                    |
|                     | <b>Energy Component</b> | <b>Mean ± SD</b>   |
| <i>C-mutante 3</i>  | VDWAALS                 | -9.7602 ± 0.2093   |
|                     | EEL                     | -154.5864 ± 1.4856 |
|                     | EGB                     | 160.4349 ± 1.2331  |
|                     | ESURF                   | -3.7359 ± 0.0273   |
|                     | DELTA TOTAL             | -7.6476 ± 0.3525   |
| <hr/>               |                         |                    |
|                     | <b>Energy Component</b> | <b>Mean ± SD</b>   |
| <i>C-mutante 10</i> | VDWAALS                 | -15.4244 ± 0.2185  |
|                     | EEL                     | -132.3712 ± 0.8487 |
|                     | EGB                     | 143.8855 ± 0.722   |
|                     | ESURF                   | -3.6608 ± 0.0177   |
|                     | DELTA TOTAL             | -7.571 ± 0.209     |
| <hr/>               |                         |                    |
|                     | <b>Energy Component</b> | <b>Mean ± SD</b>   |
| <i>C-mutante 11</i> | VDWAALS                 | -16.5293 ± 0.3964  |
|                     | EEL                     | -475.2123 ± 1.7936 |
|                     | EGB                     | 454.0323 ± 1.2973  |
|                     | ESURF                   | -6.4016 ± 0.023    |
|                     | DELTA TOTAL             | -44.1109 ± 0.7045  |



**Anexo 3.** Internalización celular de los nanotransportadores AC50 y AC50-pTAT en la línea HUVEC/TERT2. A) 6 h de incubación en células activadas, B) 12 h de incubación en células activadas, C) 6 h de incubación en células no activadas y D) 12 h de incubación en células no activadas con TNF- $\alpha$ .



**Anexo 4.** Internalización celular de los nanotransportadores AC50 y AC50-pTAT en la línea T98G. A) 6 h de incubación en células activadas, B) 12 h de incubación en células activadas, C) 6 h de incubación en células no activadas y D) 12 h de incubación en células no activadas con TNF- $\alpha$ .



## PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

### Publicaciones derivadas del proyecto de tesis:

1. **Kelly P. Marrugo**, Joaquín Manzo-Merino, Cristian H. Campos, Joel B. Alderete. Cellular uptake of novel PAMAM-pTAT nanocarriers conjugated with peptides targeting E-selectin overexpressed on endothelial and glioma cell models, **2021**, (En redacción).
2. Verónica A. Jiménez, Karen R. Navarrete, Mario Duque-Noreña, **Kelly P. Marrugo**, María A. Contreras, Cristian H. Campos, Joel B. Alderete. Rational design of novel glycomimetic peptides for E-selectin targeting. *Journal of Chemical Information and Modeling*, **2021**, <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00295> (En prensa).
3. Verónica A. Jiménez, **Kelly Marrugo**, Cristian H. Campos, Joel B. Alderete, Cecilia C. Torres. Copper metallic nanoparticles capped with PEGylated PAMAM-G3 dendrimers for the catalytic reduction of low solubility nitroarenes of pharmaceutical interest. *Catalysis Today*, **2020**, <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2020.11.011> (En prensa).


### Publicaciones derivadas de colaboraciones:

1. Ruddy Morales, **Kelly P. Marrugo**, Joaquín Manzo-Merino, Cristian H. Campos, Joel B. Alderete. High-surface-area binary metal oxides synthesized by the nanocasting method as a novel methotrexate delivery systems. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, **2021** (En revisión).
2. Gustavo Cabrera-Barjas, Cristian González, Aleksandra Nesic, **Kelly P. Marrugo**, Oscar Gómez, Cédric Delattre, Oscar Valdes, Heng Yin, Gaston Bravo and Juan Cea. Utilization of Marine Waste to Obtain  $\beta$ -Chitin Nanofibers and Films from Giant Humboldt Squid *Dosidicus gigas*. *Marine Drugs*, **2021**, 19 (4), 184.
3. **Kelly P. Marrugo**, Alexis Maldonado, Ajoy K. Banerjee & Elvia V. Cabrera. A Formal Total Synthesis of ( $\pm$ )-Rishitinol. *Organic Preparations and Procedures International*, **2020**, 52:5, 442-445.
4. Akbar Ali, Muhammad Khalid, **Kelly P. Marrugo**, Ghulam Mustafa Kamal, Muhamma Saleem, Muhammad Usman Khan, Odette Concepción, Alexander F. de la Torre. Spectroscopic and DFT/TDDFT insights of the novel phosphonate imine compounds. *Journal of Molecular Structure*, **2020**, 1207, 127838.

5. Akbar Ali, Muhammad Khalid, Alexander F. de la Torre, **Kelly P. Marrugo**, Odette Concepcion, Ghulam Mustafa Kamal, Shabbir Muhamma, bdullah G. Al-Sehemi. Facile Synthesis, Spectral (IR, Mass, UV–Vis, NMR), Linear and Nonlinear Investigation of the Novel Phosphonate Compounds: A Combined Experimental and Simulation Study. *ChemistrySelect*, **2020**, 5, 2994–3006.

**Presentaciones en Congresos:**

| Título del Trabajo   | Autores  | Tipo de Participación          |              | Evento   | Fecha                        |
|--|--|--------------------------------|--------------|--|------------------------------|
|  |  | Expositor                      | Co-autor     |  |                              |
| Ensayos biológicos que apoyan una idea de investigación en el área química   | <b><u>Kelly P. Marrugo</u></b>   | Si<br>(conferencista invitada) |              | Workshop Químico-Biológico Generación 2019. Enmarcado en el Proyecto EDPG-LPR-173 de FCQ-UdeC y FCB-UdeC | 09 de diciembre de 2020      |
| Síntesis de dendrímeros PAMAM conjugados con péptidos penetrantes de células y su uso en internalización neuronal de fármacos                    | Joel B. Alderete, Natalia A. Ortiz, <b><u>Kelly P. Marrugo</u></b> , Verónica A. Jiménez |                                | Si<br>(oral) | XXXIII Jornadas Chilenas de Química. Puerto Varas-Chile.   | 7 al 10 de enero de 2020     |
| Diseño de nanotransportadores de fármacos dirigidos al sistema nervioso central basados en dendrímeros PAMAM y un péptido penetrante de células. | <b><u>Kelly P. Marrugo</u></b> , Cristian H. Campos, Joel B. Alderete y Natalia A. Ortiz | Si<br>(póster)                 |              | XXII Simposio Nacional de Química Orgánica. Mendoza-Argentina  | 5 al 8 de noviembre de 2019. |

|   |  |   |                |   |                              |
|---|--|---|----------------|---|------------------------------|
| Síntesis de 2-(3'-propanoato de metilo)-5-metoxi-1-naftol como potencial intermediario en la obtención de Kinamicinas   | <b><u>Kelly P. Marrugo.</u></b><br>Ajoy K. Banerjee,<br>Elvia V. Cabrera   | Si<br>(póster)  |                | XXII Simposio Nacional de Química Orgánica. Mendoza-Argentina   | 5 al 8 de noviembre de 2019. |
| Funcionalización de dendrímeros de poliamidoamina con azul de toluidina, como sistema fotosensibilizador.   | Natalia Ortíz, <b><u>Kelly Marrugo.</u></b><br>Pilar Vásquez,<br>Leonardo Guzmán,<br>Joel Alderete                         |   | Si<br>(oral)   | IX Coloquio de Macromoléculas, Parral-Chile.  | 5 al 8 de Diciembre de 2018  |
| Polímero de $\beta$ -ciclodextrina como agente de encapsulación de fotosensibilizadores para el uso en terapia fotodinámica   | <b><u>Kelly Marrugo.</u></b><br>Natalia Ortiz,<br>Verónica Jiménez,<br>Joel Alderete,<br>Pilar Vásquez,<br>Leonardo Guzmán |  Si<br>(oral) |                | IX Coloquio de Macromoléculas, Parral-Chile.  | 5 al 8 de Diciembre de 2018  |
| Rational design of novel glycomimetic peptides targeting E-Selectin from molecular docking, molecular dynamics simulations and MM/GBSA binding free energy calculations | <b><u>Kelly P. Marrugo.</u></b><br>Verónica A. Jiménez,<br>Joel Alderete   | Si<br>(póster)  |                | 11th Workshop on Computational Chemistry and Molecular Spectroscopy (WCCMS Chile 2018). Concón-Chile. | 15 al 18 de octubre de 2018. |
| Efecto fotosensibilizador y citotóxico de la curcumina en presencia de poli- $\beta$ -ciclodextrina   | <b><u>Kelly P. Marrugo.</u></b><br>Joel B. Alderete y<br>Natalia A. Ortiz  | Si<br>(oral)  |                | 33° Congreso Latinoamericano de Química (CLAQ). La Habana-Cuba.                                       | 9 al 12 de octubre de 2018.  |
| Sólidos nanoestructurados basados en sílice o   | Ruddy Morales,<br><b><u>Kelly</u></b>  |   | Si<br>(póster) | 33° Congreso Latinoamericano de Química   | 9 al 12 de octubre de 2018.  |

|  |  |  |                |   |  |
|--|--|--|----------------|---|--|
| titanio para la adsorción y liberación controlada de vancomicina   | <b><u>Marrugo,</u></b><br>Joel<br>Alderete.  |  |                | (CLAQ). La Habana-Cuba.                           |  |
| Spectroscopic studies on reduction of nitroarenes of hybrid gold-PAMAM catalyst                          | Cecilia Torres,<br>Verónica Jiménez,<br>Cristian H. Campos,<br><b><u>Kelly Marrugo</u></b><br>and Joel Alderete    |  | Si<br>(póster) | NAM25,<br>Denver,<br>Colorado.<br>Estados Unidos. | 4 al 9 de junio de 2017                    |
| Nanopartículas de Cu estabilizadas con polivinilpirrolidona para la reducción catalítica de 4-nitrofenol | <b><u>Kelly Marrugo,</u></b><br>Cristian H. Campos,<br>Joel B. Alderete,<br>Verónica Jiménez,<br>Cecilia C. Torres |  | Si<br>(oral)   | VIII Coloquio de Macromoléculas,<br>Parral-Chile. | 30 de noviembre al 3 de diciembre de 2016. |

**Estancia de investigación (Pasantías):**

**Lugar:** Instituto Nacional de Cancerología (INCan). Ciudad de México, México.

**Período:** 03 de febrero al 15 de julio de 2020.

**Tutor de Pasantías:** Dr. Joaquín Manzo Merino. Catedrático CONACyT. Jefe del Laboratorio de Agentes Biológicos y Cáncer.

**Cursos, talleres, concursos y otros:**

- Taller de transferencia tecnológica y licenciamiento. Dirección de Postgrado de la Universidad de Concepción (UdeC). Duración 3 h teórico-prácticas. 26 de noviembre de 2020.
- NanoScientific Symposium Latinoamérica 2020, Nano Aplicaciones para el mundo cambiante de hoy. Park Systems Microscopy. Del 22 al 23 de octubre de 2020.
- Curso Recomendaciones para un retorno seguro al trabajo ante COVID -19. Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Duración 5 h teórico-prácticas. 10 de agosto de 2020.
- Taller de escritura y edición de artículos científicos. Dirección de Postgrado de la Universidad de Concepción (UdeC). Duración 7 h prácticas y 14 h teóricas. Del 25 al 29 de mayo de 2020.
- Biología Molecular del Cáncer. Curso del postgrado de Ciencias Biológicas de la UNAM (Ciudad de México, México). Prof. encargado: Dr. Joaquín Manzo Merino. Semestre 1-2020.
- Adjudicación del fondo concursable de movilidad de doctorandos: Apoyo Pasantía internacional de Doctorado UCO 1866. Universidad de Concepción, convocatoria 2020.
- Determinación de estructuras de compuestos orgánicos por espectrometría de Masa. Curso del postgrado en Química, FCQ-UdeC (Concepción, Chile). Prof. encargado: Dr. Héctor Mansilla. Semestre 2-2018.
- Beyond Kds: New computational and experimental methods to address challenges in drug Discovery. Workshop. UNAB (Santiago, Chile). Diciembre 2017.