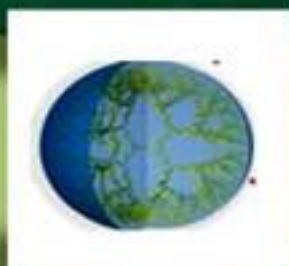




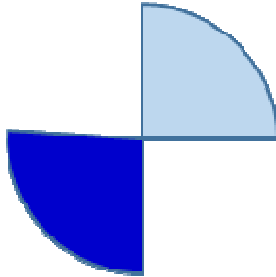
Nanotecnología y células dendríticas en el desarrollo de una vacuna terapéutica frente al VIH



PROGRAMA IBEROAMERICANO

CYTED

CIENCIA Y TECNOLOGIA PARA EL DESARROLLO



PROGRAMA IBEROAMERICANO

CYTED

CIENCIA Y TECNOLOGIA PARA EL DESARROLLO

**NANOTECNOLOGÍA Y CÉLULAS DENDRÍTICAS EN EL
DESARROLLO DE UNA VACUNA TERAPÉUTICA FRENTE AL VIH**

La responsabilidad del contenido de las colaboraciones publicadas
Corresponderá a sus autores, quienes autorizan la reproducción de sus artículos a la CYTED exclusivamente para esta edición.
La CYTED no hace necesariamente suyos los textos o los criterios expresados por sus colaboradores.

ÍNDICE DE CAPÍTULOS

	<u>Pags.</u>
CAPÍTULO 1: EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA	1
CAPÍTULO 2: NUEVAS APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS FRENTE AL VIH-1: ESTRATEGIAS DE ERRADICACIÓN Y VACUNAS	14
CAPÍTULO 3: BIOLOGÍA DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS Y SU APLICACIÓN EN EL DISEÑO DE NUEVAS VACUNAS	31
CAPÍTULO 4: NANOTECNOLOGÍA, NANOMEDICINA E INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH)	39
CAPÍTULO 5: SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE DENDRÍMEROS	50
CAPÍTULO 6: DENDRÍMEROS CON NANOPARTÍCULAS INORGÁNICAS COMO NÚCLEO: PREPARACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y SU POTENCIAL USO EN BIOMEDICINA	66
CAPITULO 7: ESTUDIOS IN SILICO PARA EL DISEÑO DE DENDRIPLEXES	83
CAPITULO 8: ESTUDIOS DE LA INTERACCIÓN PÉPTIDO-DENDRÍMERO A TRAVÉS DE SIMULACIONES COMPUTACIONALES	99
CAPÍTULO 9: TOXICOLOGÍA ASOCIADA AL USO DE NANOPARTÍCULAS	116
CAPITULO 10: MÉTODOS DE ESTUDIO DE TOXICIDAD DE XENOCOMPUESTOS <i>IN VIVO</i>	129
CAPITULO 11: BÚSQUEDA DE NUEVAS APROXIMACIONES TERAPÉUTICA FRENTE AL VIH-1: NANOTECNOLOGÍA Y CÉLULAS DENDRÍTICAS	140
CAPITULO 12: BIOBANCO VIH HGM: SU PAPEL EN INVESTIGACIÓN Y ENSAYOS CLÍNICOS	140

Los imposibles de hoy serán posibles mañana

Konstantín Tsiolkoski, inventor y científico ruso

Agradecimientos

Nanotecnología y células dendríticas en el desarrollo de una vacuna terapéutica frente al VIH.
Proyecto CYTED 214RT0482.

	Páginas
CAPÍTULO 1: EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA	1
1. Historia de la infección por el VIH	1
2. Clasificación del VIH	2
3. Genoma del VIH-1	2
4. Morfología del VIH-1	3
5. Ciclo infectivo del VIH-1	4
5.1. Fase temprana	4
5.2. Fase tardía	5
6. Curso de la infección por el VIH-1 <i>in vivo</i>	5
7. Llegada de la terapia antirretroviral combinada	7
8. Mecanismo de escape viral	8
9. Respuesta Inmunológica frente al VIH-1	8
9.1. Respuesta humoral	8
9.2. Respuesta celular	9
10. Nuevas estrategias en la lucha frente al VIH-1	9
11. Referencias	10
CAPÍTULO 2: NUEVAS APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS FRENTE AL VIH-1: ESTRATEGIAS DE ERRADICACIÓN Y VACUNAS	14
1. Introducción	14
2. Nuevos Retos: Estrategias de Erradicación del VIH-1	14
3. Nuevos pasos hacia la Reactivación viral: La Briostatina-1 como fármaco Anti-latencia frente al VIH-1	14
4. Vacunas frente al VIH-1	15
5. Referencias	25
CAPÍTULO 3: BIOLOGÍA DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS Y SU APLICACIÓN EN EL DISEÑO DE NUEVAS VACUNAS	31
1. Introducción	31
2. Monocitos, Macrófagos y células dendríticas	31
3. Inmunidad Innata, Receptores de Células Dendríticas, Citoquinas y Quimiocinas	33
4. Maduración y Migración de Células Dendríticas a Órganos Linfoides Secundarios	34
5. Papel de las Células Dendríticas en la Inmunidad Adaptativa	34
6. Las Células Dendríticas y Terapias Futuras	35
7. Referencias	36
CAPÍTULO 4: NANOTECNOLOGÍA, NANOMEDICINA E INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA	39
1. Introducción	39
2. Nanomedicina e Infección por el VIH	41
3. Dendrimeros e Infección por el VIH	42
4. Referencias	45
CAPÍTULO 5: SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE DENDRÍMEROS	50
1. Definición	50

2. Síntesis de dendrímeros	51
2.1. Dendrímeros polipropilenimina (PPI)	52
2.2. Dendrímeros carbosilano (CBS)	53
2.3. Dendrímeros basados en péptidos	54
2.4. Dendrímeros tipo Newkome	54
2.5. Dendrímeros tipo poliamido(amino) (PAMAM)	54
2.6. Dendrímeros de fósforo	55
2.7. Otras estructuras dendríticas	56
2.8. Dendrímeros mixtos	56
3. Caracterización estructural de dendrímeros	57
3.1. Métodos espectrométricos y espectroscópicos	57
3.1.1. <i>Espectrometría de masas (MS)</i>	57
3.1.2. <i>Resonancia magnética Nuclear (RMN)</i>	58
3.1.3. <i>Resonancia paramagnética electrónica (EPR)</i>	58
3.1.4. <i>Espectroscopia por fluorescencia</i>	58
3.1.5. <i>Espectroscopia infrarroja y Raman</i>	59
3.1.6. <i>Espectroscopia de UV-VIS</i>	59
3.2. Técnicas cromatográficas	59
3.2.1. <i>Cromatografía de permeación de Gel (GPC)</i>	59
3.2.2. <i>Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)</i>	59
3.3. Técnicas de dispersión	60
3.3.1. <i>Dispersión de Neutrones de Ángulo Pequeño (SANS)</i>	60
3.3.2. <i>Dispersión de neutrones cuasi-elástica (QENS)</i>	60
3.3.3. <i>Dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS)</i>	60
3.3.4. <i>Dispersión dinámica de luz (DLS)</i>	60
3.4. Microscopía	60
3.4.1. <i>Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)</i>	60
3.4.2. <i>Microscopía de Efecto Túnel (STM)</i>	61
3.5. Técnicas Electroforéticas	61
3.6. Otras Técnicas	62
3.6.1. <i>Difracción de Rayos X</i>	62
3.6.2. <i>Valoraciones Ácido-base</i>	62
4. Referencias	62

CAPÍTULO 6: DENDRÍMEROS CON NANOPARTÍCULAS INORGÁNICAS COMO NÚCLEO: PREPARACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y SU POTENCIAL USO EN BIOMEDICINA **66**

1. Introducción	66
2. Síntesis, Caracterización y aspectos relevantes de los NCD	68
3. Aplicaciones de los NCD en Bionanomedicina y como Nanotransportadores en Liberación Controlada	70
4. Diseño, Síntesis y Optimización de NCDs adaptadas para su aplicación como Nanotransportadores de Moléculas Orgánicas a Células Dendríticas	75
4.1. Modificación química de nanopartículas de oro por dendronización	75
4.2. Modificación química de nanopartículas magnéticas (MNPs) por dendronización	76
5. Referencias	78

CAPÍTULO 7: ESTUDIOS IN SILICO PARA EL DISEÑO DE DENDRIPLEXES **83**

1. Introducción	83
2. Estudio in silico de dendrímeros	83
3. Complejo dendrímero-péptidos usando herramientas informáticas	85

4. Selección de péptidos inmunogénicos	90
5. Referencias	91

CAPITULO 8: ESTUDIOS DE LA INTERACCIÓN PÉPTIDO-DENDRÍMERO A TRAVÉS DE SIMULACIONES COMPUTACIONALES **99**

1. Introducción	99
2. Simulación de Acoplamiento Molecular (Molecular Docking)	102
3. Simulación de dinámica molecular <i>all-atom</i>	103
4. Simulación molecular de grano grueso o <i>coarse-grained</i>	106
5. Cálculos de Energía Libre de Unión	107
5.1. Método MM-GBSA (MM, mecánica molecular; GB, Born generalizado; SA, área de superficie)	107
5.2. Potencial de fuerza media (PMF)	108
5.3. Fuerza de sesgo adaptativa (ABF)	109
6. Referencias	110

CAPÍTULO 9: TOXICOLOGÍA ASOCIADA AL USO DE NANOPARTÍCULAS **116**

1. Introducción	116
2. Entidad sintética y biológica	116
2.1. Propiedades fisicoquímicas	117
2.1.1. <i>Tamaño de partícula</i>	117
2.1.2. <i>Forma</i>	117
2.1.3. <i>Química de superficies</i>	117
2.1.4. <i>Composición</i>	118
3. Retos actuales en nanotoxicología	119
3.1. La cuestión de dosimetría de nanopartículas	119
3.2. Diseño de modelo in vitro de alto rendimiento	119
4. Nanotoxicología: El Sistema Inmunológico	120
4.1. Nanomateriales y el sistema inmune innato	120
4.2. Nanomateriales y el sistema inmune adaptativo	121
5. Referencias	122

CAPÍTULO 10: MÉTODOS DE ESTUDIO DE TOXICIDAD DE XENOCOMPUESTOS *IN VIVO* **129**

1. Introducción	129
2. Metodología de las pruebas toxicológicas empleadas para identificar posibles acciones tóxicas <i>in vivo</i> de xenocompuestos	130
2.1. Ensayo pirogénico	130
2.2. Estudios de genotoxicidad	131
2.3. Ensayo de aberraciones cromosómicas in vivo	131
2.4. Ensayo del micronúcleo	133
2.5. Ensayo Comet	134
3. Estudios de carcinogénesis	134
4. Estudios de embriotoxicidad	134
5. Inmunotoxicidad	136
6. Fototoxicidad	136
7. Pruebas hematológicas	138
8. Parámetros bioquímicos	139
8.1. Perfil general	139

8.2. Perfil lipídico	139
8.3. Perfil renal	139
8.4 Perfil hepático	139
9. Estudios histopatológicos	139
10. Estudios de comportamiento	139
11. Referencias	140

CAPÍTULO 11: BÚSQUEDA DE NUEVAS APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS FRENTE AL VIH-1: NANOTECNOLOGÍA Y CÉLULAS DENDRÍTICAS **129**

1. Búsqueda de una vacuna efectiva frente a la infección por el VIH	129
2. Elección de Antígenos virales	130
3. Células Dendríticas como estrategia terapéutica frente al VIH-1	134
4. Dendrimeros y nanopartículas como nueva herramienta en el diseño de vacunas terapéuticas	134
5. Nuevos métodos para mejorar el tratamiento frente al VIH-1	136
6. Referencias	140

129

CAPÍTULO 12: BIOBANCO VIH HGM: SU PAPEL EN INVESTIGACIÓN Y ENSAYOS CLÍNICOS

1. Biobancos e Investigación Biomédica	129
2. Nanotecnología, Biobancos y Biorepositorios en la Investigación de la Infección VIH-1	130
3. El BioBanco y BioRepositorio VIH	134
4. BioBanco VIH: Desarrollo de Proyectos de Investigación y Ensayos Clínicos	134
5. Referencias	136

CAPÍTULO 6

DENDRÍMEROS CON NANOPARTÍCULAS INORGÁNICAS COMO NÚCLEO: PREPARACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y SU POTENCIAL USO EN BIOMEDICINA

Lydia Bouchet¹, Jimena Mora², Verónica Brunetti¹ y Miriam Strumia²

1. INFIQC-Conicet. Departamento de Química Física. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.

2. IMBIV-Conicet. Departamento de Química Orgánica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.

1. INTRODUCCIÓN

Las nanopartículas (NPs) son una clase interesante de objetos en la nanoescala que recientemente están recibiendo una atención especial debido a su amplia gama de aplicaciones (1). Estos materiales exhiben generalmente características relacionadas con el tamaño que difieren significativamente de aquellas que presentan dichos materiales en la escala macroscópica. Su importancia se atribuye al hecho de que representan un enlace crítico entre las tecnologías actuales y las futuras aplicaciones, principalmente en base a su tamaño diminuto, su gran relación superficie/volumen y sus propiedades dependientes del tamaño. Tanto las NPs metálicas o semiconductoras como las estructuras híbridas formadas con material polimérico, han sido sintetizadas y forman parte de la fabricación de nuestros productos de la vida cotidiana desde hace más de una década (anteojos resistentes al rayado, pinturas que no se agrietan, revestimientos anti-grafiti para paredes, protectores solares transparentes, tejidos repelentes de manchas, ventanas autolimpiantes y revestimientos cerámicos para las celdas solares) (2). En la actualidad, existen nanocompuestos con aplicaciones de alto rendimiento en diversos campos, como dispositivos electrocrómicos (3) y almacenamiento de energía (4) que hacen que estos materiales híbridos adquieran mayor importancia.

Las NPs de oro forman parte de los nanomateriales más estudiados desde hace un siglo debido a sus extraordinarias propiedades ópticas relacionadas con la absorción del plasmón y actualmente están siendo muy utilizadas en diversas áreas de la química, la biología, la ingeniería y la medicina debido a sus propiedades ópticas, eléctricas y catalíticas (5). Estas NPs han atraído el interés de los científicos especialmente para su uso en terapia fototérmica (6), biosensores (7), diagnóstico por imágenes (8), y liberación controlada (9). Las nanopartículas magnéticas (MNPs) también han generado un gran interés en el mundo científico, especialmente en el ámbito de la biomedicina y las tecnologías, en particular para su uso en medios de almacenamiento magnético (10), biosensores (11), tintas y pinturas (12), administración de fármacos y agentes de contraste en imágenes de resonancia magnética (13). Las NPs se sintetizan generalmente en solución, tanto en medio orgánico como acuoso, y por lo tanto requieren un recubrimiento para aumentar su estabilidad. Los procesos de agregación que se producen con frecuencia en los sistemas coloidales de NPs metálicas o semiconductoras restringen severamente su utilización en diferentes aplicaciones. Por lo tanto, con el fin de prevenir o retardar la agregación, las NPs deben ser funcionalizadas con una delgada película que puede contener estabilizadores monoméricos (tioles, carboxilatos, fosfatos o sulfatos), polímeros sintéticos o naturales (dextrano, polietileno glicol (PEG), polivinil pirrolidona, óxido de polietileno o quitosano), materiales inorgánicos (silicio o derivados), liposomas o incluso una película de moléculas más novedosas como son los dendrímeros y los dendrones. Los recubrimientos orgánicos para aplicaciones biomédicas deben

contener varias funciones bioactivas con el fin de garantizar su biocompatibilidad y direccionamiento a la zona de interés, deben considerar los posibles cuidados terapéuticos a la hora de ser utilizados y además deben evitar la aglomeración de las nanopartículas en el entorno fisiológico favoreciendo una biodistribución y bioeliminación óptima (14).

Los dendrímeros son macromoléculas bien definidas con un alto grado de ramificación que pueden imitar ciertas propiedades de las micelas, liposomas y de otros bloques de construcción también muy organizados que están presentes en los sistemas biológicos (15). Estas propiedades hacen que los dendrímeros sean adecuados para diversas e importantes áreas de aplicación, en particular, en forma de nanotransportadores de fármacos. Crooks y colaboradores informaron por primera vez la síntesis y caracterización de nanopartículas metálicas encapsuladas en dendrímeros (16). Estas estructuras con un alto grado de organización son capaces de atrapar diferentes iones metálicos y por ello han sido utilizadas como una plantilla para la formación de una amplia gama de nanoestructuras metálicas de Cu, Ag, Au, Pt y Pd (17). El desarrollo y la investigación de NPs estabilizadas por moléculas dendríticas abre un apasionante campo de investigación debido a la posibilidad de combinar las propiedades de un núcleo en la escala nano con el entramado permeable de las ramas dendríticas. Por otra parte, el uso de estos bloques de construcción con fines biomédicos comprende un área de investigación en auge, debido principalmente a su estructura y composición definida con alta precisión, así como a su química superficial que es sintonizable a nivel superior.

El uso de dendrímeros y dendrones como agentes estabilizantes en lugar de los ligandos no dendríticos usados comúnmente proporciona una ventaja interesante, sin embargo, a la fecha existen pocos reportes sobre ello. Una de las razones podría ser que los costos asociados con su síntesis y purificación son mayores que para sustratos no dendríticos. Schlüter y colaboradores (18) han mostrado que las moléculas dendríticas presentan varias ventajas: (i) la estructura y el tamaño del dendron se pueden controlar con precisión durante la síntesis; (II) la clásica estructura con forma cónica de los dendrones es de particular interés para la generación de NPs ultra pequeñas con un gran radio de curvatura por lo que permite optimizar el impedimento estérico en la adsorción macromolecular y en la aglomeración de partículas; (III) las estructuras dendríticas con los grupos periféricos funcionalizados muestran potencial para una buena y controlada disposición de (bio)ligandos con alta densidad superficial; (IV) la presencia de brazos hiperamificados aumenta la afinidad y avidéz de las (bio)interacciones específicas multivalentes útiles para su aplicación en biosensores; (V) algunas moléculas pequeñas pueden ser incorporadas en la cavidad dendrítica de las NPs estabilizadas con dendrones volviendo este sistema atractivo para la liberación controlada de fármacos; (VI) la estabilización de NPs usando dendrones genera una capa orgánica relativamente delgada y, por lo tanto, se forman NPs de tamaño pequeño en un rango de 10 a 30 nm. Esta última propiedad es muy importante porque genera un material prometedor para aplicaciones biomédicas en sistemas de liberación de fármacos: la captación celular eficiente, la mejora de la difusión de tejidos, y en particular para combatir tumores a través del efecto de permeabilidad y retención mejorada, explotando la naturaleza nanoporosa de los vasos sanguíneos en tejido canceroso (14). Pan y colaboradores (19) también han mostrado la eficacia de los dendrímeros para el control sistemático del espaciado en las nanopartículas y han desarrollado una estrategia constructiva en la cual las NPs coloidales se utilizan como ladrillos mientras que los dendrímeros son similares al mortero. Estos resultados confirmaron que el proceso de ensamblaje proporciona control sobre los agregados resultantes lo que permite una ruta versátil para generar nuevos materiales.

El uso exclusivo de las moléculas dendríticas como estabilizador da lugar a una nueva clase de material: dendrímeros con nanopartículas como núcleo, mejor conocidos por sus siglas en inglés como NCDs (nanoparticle-core dendrimers). Los NCDs son materiales que poseen grupos inorgánicos de tamaño nanométrico en el núcleo rodeado por una cáscara de moléculas dendríticas que se unen radialmente al núcleo estabilizando al coloide y por lo tanto impidiendo

su agregación (véase la **Figura 1**). En este caso, las NPs son unidades estructurales del dendrímero y no se encuentran atrapadas o encapsuladas en su cavidad interior (20). Los NCDs protegidos por dendrones con un grupo tiolen el punto focal mostraron mayor estabilidad y una clara mejora con respecto a las NPs encapsuladas en dendrímeros (21).

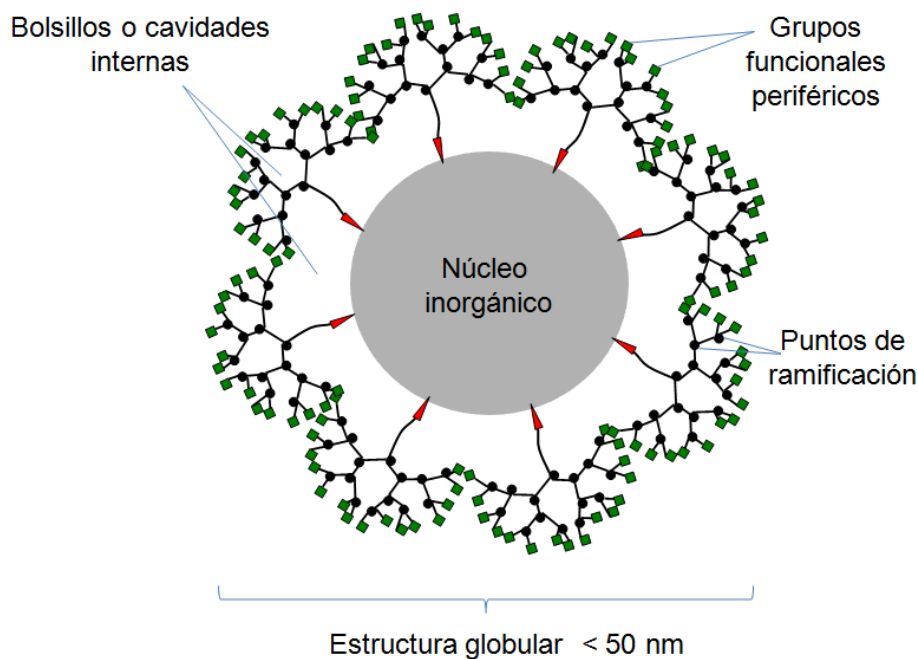


Figura 1: Esquema general de los NCDs

2. SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y ASPECTOS RELEVANTES DE LOS NCDs

La generación de los NCDs se obtiene por lo general aplicando alguna de las tres metodologías sintéticas más conocidas (22) (véase la **Figura 2**). El método directo emplea la reducción de un catión metálico en presencia de dendrones que llevan grupos funcionales adecuados en su punto focal (a). Para la síntesis de NCDs con enlace metal-azufre se emplean por lo general grupos tioles y/o disulfuros. En los últimos años se ha desarrollado un nuevo enfoque del método directo que implica la reducción simultánea del catión metálico en presencia de dendrones con un grupo diazonio en el punto focal; esta metodología conduce a la formación de NCDs con enlaces metal-carbono (23). En contraste, el método de intercambio de ligando (b) es un método indirecto que comprende reacciones en dos pasos: inicialmente la síntesis del coloide estabilizada por una monocapa no dendrítica seguida en una segunda instancia por la sustitución de la capa orgánica por dendronestiolados. Este método tiene la ventaja de mantener el tamaño del núcleo sin cambios durante la reacción de intercambio de ligandos, pero su principal limitación es la dificultad de obtener los dendronestiolados. Por último, también se utiliza el enfoque convergente (c) en el que se emplean reacciones individuales o de varios pasos para construir arquitecturas dendríticas.

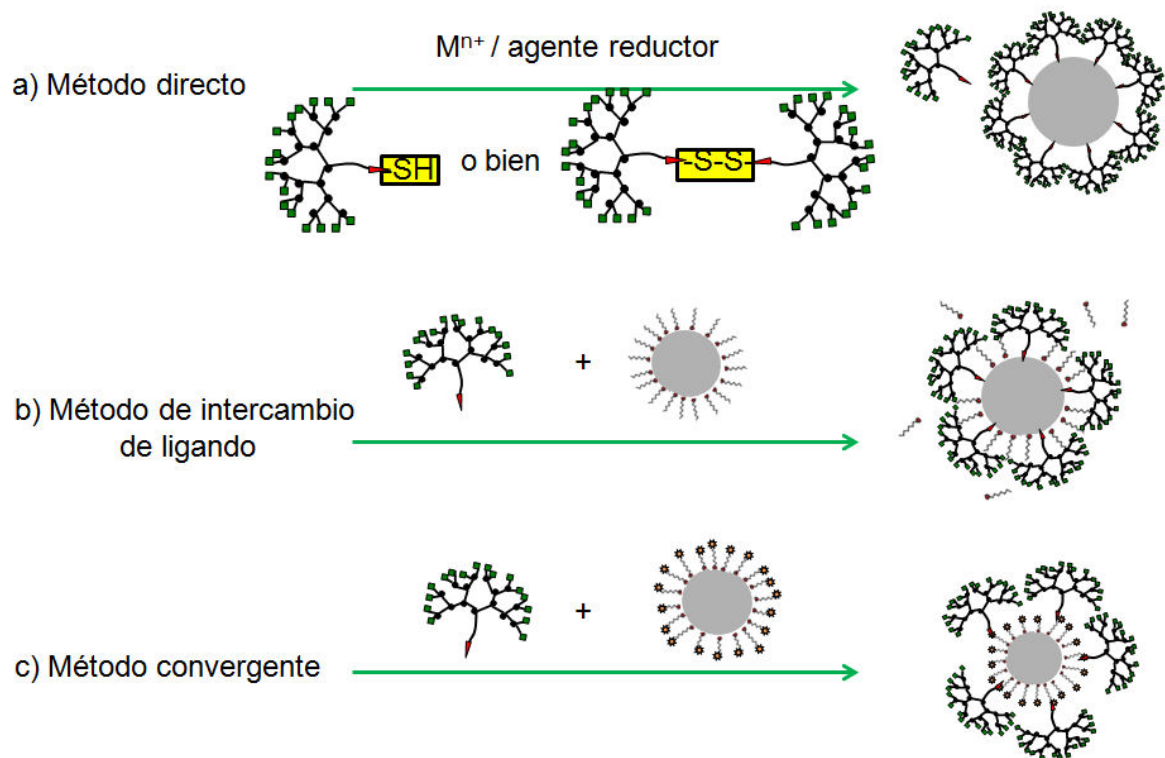


Figura 2: Procedimientos usuales para la síntesis de NCDs

El tamaño y las características del material en los NCDs han sido recientemente investigadas a fondo usando una variedad de técnicas experimentales, como la espectroscopia, microscopía, la electroquímica, la fotoquímica, etc. Los NCDs más sintetizados tienen Au en el núcleo y dendronestiolados alifáticos o aromáticos en el exterior. Los ligandos dendríticos también se han utilizado en la preparación de NCDs con material magnético en el núcleo (especialmente magnetita), Pd o Ag entre otros metales, o incluso semiconductores tales como CdSe. En cuanto a la naturaleza de los ligandos ramificados, podemos citar varios pero los más utilizados para la construcción de los NCD son probablemente poli(amidoamina), poliarileter y polipropilenimina.

El diseño controlado de la arquitectura dendrítica a través de la elección de los grupos químicos funcionales y de la extensión de la ramificación dendrítica ejerce un control importante sobre las propiedades finales de los NCDs. Kim (24) y Wang (25) han mostrado claramente que la generación de las moléculas dendríticas puede controlar las dimensiones de los NCDs mediante el uso de dendrones de éter aromático con grupos tiol o 4-piridona en el punto focal. Yany colaboradores (26) han informado también que las propiedades únicas de las moléculas dendríticas de arenotiol (arilmercaptanos) no sólo poseen la capacidad de controlar el crecimiento del tamaño de las NPs de oro sino que dejan lista la superficie para su derivatización posterior. Los ligandos de tipo Newkome usados para el recubrimiento durante la síntesis de NPs de oro también determinan su solubilidad y estabilidad, así como las características del núcleo a través de un control dendrítico del tamaño del NCD (27). Fox y colaboradores (20) han utilizado dendrones de tipo Fréchet para estabilizar la superficie de NPs de oro mostrando que a medida que la generación dendrítica aumenta, la densidad de dendrones en los NCDs disminuye como consecuencia del impedimento estérico de las ramas. Esto trae como consecuencia que existe una fracción importante de la superficie de oro no pasiva en los NCDs de mayor generación, y por lo tanto permanece disponible para una reacción catalítica (20). Kumary colaboradores (28) también informaron de la síntesis de NCDs utilizando Pd con dendrones de tipo Fréchet funcionalizados con grupos diazo obteniendo materiales promisorios para aplicaciones catalíticas. Lovey

colaboradores (29) han informado que el uso de un ligando ramificado conduce a partículas más pequeñas y mejor definidas que cuando se emplea su análogo no dendrítico. Por otra parte, los bloques constructivos que presentan ramificaciones "largas" y "cortas" podría esperarse que formen una monocapa menos empaquetada sobre la superficie del núcleo metálico y por lo tanto, permitan la exposición de sus vértices y/o sitios con defectos a la solución de trabajo (29). Astrucy colaboradores (30) han desarrollado un dispositivo sensor mediante el uso de dendrones con grupos ferrocenilos y NPs de oro, mostrando cómo la funcionalidad se puede introducir en los NCDs brindando propiedades específicas de aplicación. Por último, la estrategia de dendronización se puede emplear también para controlar la separación entre partículas y de esta manera controlar las propiedades ópticas de los agregados (31).

3. APLICACIONES DE LOS NCDs EN BIONANOMEDICINA Y COMO NANOTRANSPORTADORES EN LIBERACIÓN CONTROLADA

La nanotecnología ofrece a los científicos diversas oportunidades para explorar sus ideas en el campo de la biomedicina. Nanopartículas de óxido de hierro (32), puntos cuánticos (33), nanotubos de carbono (34), nanopartículas de oro (35) y nanopartículas de silicio (36) han sido previamente investigadas para su posible aplicación en diagnóstico por imágenes y son excelentes candidatas para la construcción de plataformas teranósticas basadas en nanopartículas. Por lo tanto, la nanomedicina y la teranóstica están emergiendo como un paradigma terapéutico prometedor que aplica tanto el diagnóstico por imágenes como los agentes terapéuticos en un mismo paso; es decir, que en forma simultánea con la realización de pruebas de diagnóstico, se brinda una terapia y se controla su respuesta terapéutica. Los nanosistemas resultantes juegan un papel importante en la era emergente de la nanomedicina y por ello una gran parte de los actuales esfuerzos en tareas de investigación se han dedicado a este objetivo.

Una ventaja en la construcción de sistemas con funcionalidades integradas es que muchas de estas nanoplataformas ya contienen, por sí mismas, el agente de contraste necesario para el diagnóstico por imágenes. La química superficial bien desarrollada de los NCDs hace que sea fácil la inclusión de fármacos en su interior y por eso los vuelve promisorios como posibles nanosistemas teranósticos (37). Las mediciones de resonancia magnética *in vitro* (e incluso *in vivo*) han demostrado que la utilización de las nanopartículas dendronizadas mejora el contraste obtenido respecto a las nanopartículas recubiertas con otros polímeros comerciales no dendríticos (14).

Las nanopartículas de sílice mesoporosa (NSMs) han sido ampliamente estudiadas y las mismas han sido propuestas como candidatos prometedores para numerosas aplicaciones en biomedicina (38). Recientemente, Pan y colaboradores (39) han reportado el diseño, preparación, caracterización y evaluación de bioseguridad de las NSMs funcionalizadas con péptidos. Estos nanohíbridos fueron preparados por modificación de la superficie de los NSMs a través de una reacción directa del grupo azido con dendrones peptídicos y se ha evaluado su citotoxicidad *in vitro* y su toxicidad *in vivo* mostrando buena biocompatibilidad ya que no hay evidencia de efectos colaterales significativos en los órganos normales de ratones sanos (39). Otras nanopartículas, tales como óxidos de hierro y nanopartículas de oro han mostrado ser también plataformas muy útiles para construir nanoportadores teranósticos ya que combinan ambas funciones terapéuticas y de diagnóstico dentro de una sola nano estructura; sin embargo, su superficie debe ser funcionalizada apropiadamente para las aplicaciones *in vivo* (40). La derivatización de la superficie puede proporcionar sitios de unión adecuados para diversos ligandos y/o para el transporte de fármacos.

Son varios los factores cruciales que deben tenerse en cuenta al desarrollar una plataforma para nanomedicina (41):

- (I) identificación de un objetivo específico a nivel molecular,
- (II) la elección del candidato adecuado para el recubrimiento del nanocomponente,
- (III) el diseño del sistema de transporte,
- (IV) la caracterización de su tamaño y forma nanométricos,
- (V) la actividad biológica (*in vivo* o *in vitro*) y su evaluación farmacológica.

En todo caso, el estado superficial de las NPs funcionalizadas depende en gran medida de suruta de síntesis y de las estrategias utilizadas para su funcionalización, haciéndolas adecuadas (o no) para sus futuras aplicaciones médicas.

Los sistemas multifuncionales híbridos con tamaños que varían típicamente entre 1 y 100 nm capaces de suministrar un agente bioactivo en el sitio de destino con una mejor actividad terapéutica que la forma libre del biocomponente reciben el nombre de "nanotransportadores"(41). En particular, ya se han estudiado algunas NPs como una estrategia interesante para suministrar fármacos convencionales, proteínas, vacunas o ácidos nucleicos como el ADN o ARN. Para que funcione como nanotransportador, los sistemas de liberación de fármacos deben proporcionar algunos atributos positivos respecto ala droga "libre", por ejemplo, la mejora de la solubilidad, la estabilidad *in vivo* y la biodistribución (42). Las NPs de oro son capaces de captar biomoléculas grandes sin restringirse a sí mismas como portadores de fármacos sólo para moléculas pequeñas; además, el control del tamaño y la posibilidad de seleccionar una adecuada funcionalidad para el reconocimiento específico las convierte en sistemas eficientes para la liberación controlada de biomoléculas. Tanto las NPs de oro como otros materiales coloidales aptos para sistemas de liberación de fármacos pueden modificar la cinética, la distribución en el cuerpo y la liberación del fármaco para una droga específica (43). Por lo general, son de tamaño similar a los componentes y las proteínas celulares típicos, y por lo tanto puede pasar por alto barreras mecánicas naturales que posiblemente conducen a la reacción adversa del tejido (44). En particular, las NPs de oro cargadas positivamente son de interés en cuanto a la captación celular (45). Su naturaleza catiónica induce interacciones electrostáticas con entidades cargadas negativamente, tales como las membranas celulares, ADN plásmido, siRNA, o bien nanopartículas de anticuerpos (46). A pesar que las NPs aprobadas clínicamente han mostrado consistentemente una buena capacidad para reducir la toxicidad del fármaco, su uso no siempre se ha traducido en mejora de los resultados clínicos. Esto ha llevado al desarrollo de NPs "multifuncionales", donde capacidades adicionales como la selectividad y la mejora en su uso para imágenes por contraste debe ser agregada (47). Generalmente las NPs son consideradas como material no tóxico y biocompatible, pero Pan y colaboradores (48) han informado que NPs de oro de 1,4 nm de diámetro que contienen trifenilfosfinamonosulfonato son aún más citotóxicas que nanopartículas de 15 nm de composición química similar. Estos resultados destacan la importancia de un tamaño óptimo de los nanoportadores. Por otra parte, Stobieckay colaboradores (49) han demostrado que la principal ventaja de los recubrimientos de polímeros de L-lisina en NPs de oro está relacionada con la ausencia de toxicidad para la liberación del ligando en procesos de transferencia de genes, en contraste con las NPs de oro funcionalizadas con grupos tiol. Papp y colaboradores (50) han mostrado que NPs de oro pequeñas funcionalizadas químicamente usando dendrones de glicerol con ácido siálico como grupo terminal genera coloides estables que muestran buena actividad para la inhibición de la infección por el virus de la influenza. Como la unión de la proteína hemaglutinina a la superficie de la célula huésped está mediada por los receptores de ácido siálico, se cree que la interacción multivalente con NPsfuncionalizadas con ácido siálico puede inhibir competitivamente la infección viral (50).

Las diversas posibilidades funcionales de los NCDs permite una amplia variedad de enfoques para el diseño de nano transportadores (**Figura 3**). Gopidas y colaboradores informaron de la síntesis de NCDs con corazón de oro solubles en agua que presentan propiedades micelares capaces de encapsular cloruro de pinacianol (51). Estas propiedades hacen que los NCDs sean candidatos

ideales como nanoportadores; los fármacos hidrófobos pueden ser cargados en nanovehículos a través de interacciones no covalentes en el interior hidrofóbico sin necesidad de sufrir una modificación estructural para su liberación (52). Del mismo modo, se puede utilizar la conjugación covalente a los NCD a través de enlaces escindibles para entregar a la célula profármacos y el medicamento puede ser liberado entonces por estímulos externos o internos. Significativamente, los estímulos internos funcionan de una manera biológicamente controlada, mientras que los estímulos externos proporcionan un control espacio-temporal sobre la liberación (53). Independientemente del método utilizado, la capacidad de adaptación de los NCDs es crucial para la liberación interna o externa. Comúnmente, un fármaco conjugado covalentemente a un nanotransportador es más adecuado para la administración de un fármaco dirigido específicamente, mientras que un fármaco que forma un complejo de inclusión con el nanotransportador se libera fácilmente y es activo *in vitro* (54). Por ejemplo, la conjugación directa de péptidos funcionales de NPs de oro proporciona una serie de propiedades adaptables que pueden modular sus funciones dentro de las células vivas. Las distribuciones intracelulares de las partículas cambian desde el núcleo hasta el retículo endoplásmico, aumentando la densidad de péptidos para nanopartículas de diámetro constante o aumentando el diámetro de las NPs manteniendo una densidad de péptidos constante, lo que conduce a una menor absorción celular (55). Hay un gran interés en el desarrollo de sistemas de administración de fármacos que puedan permitir un transporte eficiente y específico de medicamentos para los tejidos afectados por una enfermedad.

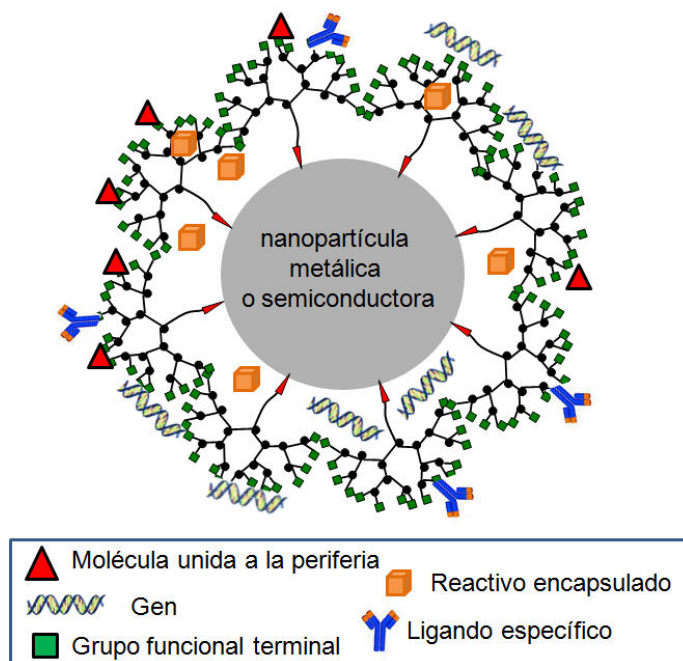


Figura 3: Esquema de las diferentes vías de acción como nanovehículos de los NCDs

Actualmente existe un amplio espectro de polímeros sintéticos con variaciones estructurales y arquitectónicas bajo investigación, incluyendo polímeros lineales, en forma de estrella, dendríticos o hidrogeles. La comparación de las características de dendrímeros y polímeros lineales muestra que la arquitectura del polímero dendrítico es ventajosa para su aplicación en liberación controlada. Un ejemplo interesante fue descrito por Contantino y colaboradores (56) quienes han presentado un método general para la incorporación de la biomolécula en un arreglo perfectamente definido sobre la superficie de nanopartículas biocompatibles de material polimérico compuesto por poliéster y co-polímero biodegradable ácido poli (láctico-co- glicólico) (PGLA) derivatizado con dendrones que poseen grupo amino terminal. De esta manera, es posible obtener NPs que presenten una variación en el grado de cubrimiento de la superficie. Esta nueva

estrategia se ha aplicado con éxito a la preparación de NPs funcionalizadas con péptidos y con D-glucosa. Esta aplicación se basa en el descubrimiento de que las NPs con una arquitectura dendrítica han mostrado ser capaz de cruzar la barrera sangre-cerebro después de la administración sistémica. NCDs de oro usando dendrímeros de poli(propilenimina) con tetraetilenglicol como espaciador han sido sintetizados por Pan y colaboradores (57). Estos dendrímeros han mostrado una gran estabilidad en soluciones reguladoras de fosfato y se encontró que la protonación de sus aminas terciarias internas a pH cercanos a 4,5 desempeña un papel crucial en el escape lisosomal durante la administración de fármacos. Por otra parte, la amina primaria terminal proporciona una gran facilidad para la derivatización directa con otras entidades como fármacos o grupos funcionales específicos que orienten a la biomolécula; es decir que puede proveer de múltiples funciones a los nanovehículos (58). Una de las modificaciones más populares de la superficie de nanovehículos es la funcionalización con polietilenglicol que permite la reducción de la citotoxicidad y ofrece muchas ventajas adicionales como la mejora para la biodisponibilidad en aplicaciones orales ya que mejora la biodistribución, la farmacocinética y la solubilidad; produce un aumento de la carga del fármaco, una liberación sostenida y controlada del fármaco, mejor eficiencia en la transfección y en la localización tumoral (59). Bergen y colaboradores (60) han mostrado que las diferentes propiedades físico-químicas de las NPs tales como el tamaño, la forma, la derivatización o el ligando regula si la recepción es no específica o bien si es orientada a un blanco específico. Choy colaboradores (46) han informado del desarrollo de un dendrón catiónico con grupos carboxílicos esterificados con polietilenglicol y luego funcionalizados con grupos terminales de amonio cuaternario. Estos dendrones se utilizaron para la preparación de NCDs con corazón de oro y carga positiva que fue evaluado *in vivo* e *in vitro* y la investigación ha confirmado el desarrollo exitoso de los NCDs con una excelente estabilidad en medios biológicos conteniendo proteínas y electrolitos con una vida útil superior a los 6 meses. En este último caso, la buena estabilidad en soluciones acuosas y la aparente falta de toxicidad indican un potencial uso como material de ensayo para analizar las interacciones entre NPs cargadas positivamente y los sistemas celulares o biomoleculares o también como un excelente vehículo nanoterapéutico. Ghoshy colaboradores (61) han informado que NPs de oro funcionalizadas con dendrones de lisina pueden ser 28 veces más eficaces y potentes que el ADN en la transferencia de genes. Lo más importante, es que estos NCDs no mostraron citotoxicidad cuando se utilizaron como agentes de transferencia génica. Estos materiales también fueron sensibles al nivel de glutatión celular durante la transferencia *in vitro*, proporcionando información sobre su modo de actividad, además de ser una potencial herramienta para el control ortogonal de la transferencia génica (62).

Debido a sus propiedades físicas, las nanopartículas de óxido de hierro super-paramagnéticas están siendo ampliamente estudiadas como parte de las estrategias de diagnóstico y terapéutica en los tratamientos del cáncer. Se pueden utilizar como agentes para imágenes *in vitro* o *in vivo*, para guiar la dirección del fármaco por medios magnéticos o en terapia térmica (63). La tendencia a agregarse de las NPs limita su uso terapéutico *in vivo* pero eso puede controlarse a través de la funcionalización de su periferia para producir cargas positivas o negativas sobre la superficie (64). Eso ha convertido a los NCDs con núcleo magnético en una solución simple para construir nuevos nanotransportadores aptos para la administración de fármacos. Un buen ejemplo es el trabajo de Khodadust (65) que desarrolló nanopartículas magnéticas recubiertas con diferentes generaciones de PAMAM (G2 a G7) funcionalizado con 1-metilimidazol y ácido poliinosínico-policitidílico (poli (I:C)) para dirigir el nanocarrier específicamente al sitio del tumor utilizando un bajo campo magnético. Ellos han demostrado que los sistemas que tienen más grupos funcionales en la superficie, como las generaciones más altas (G7, G6 y G5) fueron más adecuados para la administración del poli (I:C) probando que el análisis *in vitro* e *in vivo* de estos NCDs puede proporcionar nuevas oportunidades para la identificación selectiva y la muerte de las células tumorales.

Gillichy colaboradores (18) han desarrollado NPs de magnetita estabilizadas con polietilenglicoldendrítico y lineal variando respectivamente la generación del dendrón o la longitud de la cadena. En este caso, los autores mostraron que las NPs dendronizadas poseen una excelente estabilidad coloidal a pesar de tener un radio hidrodinámico menor y una capa de solvatación más pequeña en comparación con su análogo lineal. Además, para la misma densidad de injerto y peso molecular de los estabilizadores, las NPs dendronizadas muestran un comportamiento reversible para la agregación inducida por temperatura, en contraste con la agregación y sedimentación irreversible observada para los análogos lineales de polietilenglicol. Esta clase de NPs estabilizadas dendríticamente muestra un gran potencial para un futuro uso biomédico y otras aplicaciones, en las que es relevante su estabilidad, la resistencia a la agregación (o su reversibilidad), su tamaño ultra pequeño (para cruzar las barreras biológicas o favorecer su inclusión en membranas artificiales) y/o la alta densidad de (bio)ligandos activos que pueden ser inmovilizados en la periferia. Las NPs de magnetita modificadas con dendrones de PAMAM funcionalizados con tiol también se utilizaron con éxito para la recuperación de ADN por separación magnética (66). Zhu y colaboradores (67) han empleado NPs superparamagnéticas dendronizadas para vehicular doxorubicina. El fármaco anticancerígeno se conjugó a los grupos funcionales periféricos de un dendrón poli (ácido L-glutámico) con enlace de hidracina sensible al pH para construir nanocarriers magnéticos (67). Por otra parte, Martin y colaboradores (68) usando NPs magnéticas derivatizadas con dendrones de poliéster con múltiples grupos guanidina periféricos han logrado modular la absorción de los NCDs en las células para la marcación *in vitro*.

En resumen, los NCDs son prometedores nanotransportadores para la liberación controlada de fármacos. Para lograr este propósito, los NCD deben exhibir solubilidad alta en agua y buena capacidad para cargar las biomoléculas, baja toxicidad, características favorables para la retención y biodistribución, alta especificidad y adecuada biodisponibilidad. Una de las principales ventajas que se derivan de la arquitectura dendrítica es el acceso al control espacial del sistema ligando-molécula bioactiva de modo de optimizar la dirección específica donde debe actuar el nanotransportador. El espacio vacío interior bien definido entre el núcleo y los brazos dendríticos puede ser utilizado para encapsular fármacos pequeños mientras que los grupos terminales en la superficie de los NCD son ideales para la bioconjugación de drogas o biomarcadores. El uso de los NCD también puede aumentar la estabilidad de la carga útil. Se necesita un cuidadoso diseño de la modificación superficial del NCD para evitar su aglomeración después de la etapa de la dendronización y aún así mantener una buena disponibilidad de la carga útil. Sobre la base de nuestra comprensión de lo que se conoce acerca de las características de los NCD, las siguientes estrategias pueden ser útiles en estudios futuros para su uso como nanoportadores: (a) centrarse en diámetros que oscilan entre 10 a 30 nm; este tamaño parece ser el más adecuado para mantener un equilibrio entre la circulación de la sangre y el espacio extracelular, lo que aumenta el tiempo de circulación y facilita la administración del fármaco; (b) identificar los marcadores endoteliales de la superficie celular para órganos específicos y los marcadores específicos de células "blanco" y diseñar péptidos de afinidad o anticuerpos para estos objetivos y (c) diseñar los grupos periféricos del dendrón para funcionalizar NPs con recubrimientos hidrófilos y carácter catiónico manteniendo un radio hidrodinámico por debajo del tamaño crítico. Estos atributos pueden ser explotados para proporcionar una plataforma eficaz y selectiva para la liberación intracelular selectiva de algunas sustancias.

4. DISEÑO, SÍNTESIS Y OPTIMIZACIÓN DE NCDs ADAPTADAS PARA SU APLICACIÓN COMO NANOTRANSPORTADORES DE MOLÉCULAS ORGÁNICAS A CÉLULAS DENDRÍTICAS

Como grupo de investigación integrante del proyecto "Desarrollo de una vacuna frente al VIH-1: Estudio de los cambios en la biología de células dendríticas humanas tras interacción de distintos

sistemas de liberación de péptidos del VIH", proyecto CYTED 214RT0482, nuestro aporte al proyecto es el diseño, síntesis y optimización de NCDs adaptadas para su aplicación como nanotransportador de moléculas orgánicas. Para tal fin, se utilizaron nanopartículas de oro y magnética las que fueron funcionalización en su superficie con dendrones biocompatibles específicamente sintetizados. El objetivo principal de la dendronización es el aporte de estabilidad coloidal a las nanopartículas y funcionalidad superficial para que permitan en una etapa posterior, la unión covalente de moléculas específicas, como drogas de uso terapéutico, moléculas solubilizantes, ligandos diana o moléculas sensibles a estímulos. El proyecto se ha dividido en dos temas principales de estudio, que se describen a continuación.

4.1. Modificación química de nanopartículas de oro por dendronización

El objetivo de esta parte del proyecto consistió en la síntesis de NCDs cuyo núcleo inorgánico se encuentra formado por nanopartículas de oro y utilizando dendrones como ligandos estabilizantes, con ácido carboxílico como grupos funcionales periféricos. En una segunda etapa se funcionalizaron los NCDs obtenidos en la etapa anterior con arginina. La síntesis y caracterización de dichos nanomateriales se llevó a cabo con el objetivo final de evaluarlos los NCDs como posibles nanotransportadores para el desarrollo de vacunas anti-VIH, utilizando una plataforma de células dendríticas. Se utilizarán los NCDs modificados para su estudio *in vitro* y para desarrollar terapias que controlen la replicación del VIH y que mejoren el agotamiento del sistema inmune haciendo más efectiva su respuesta contra el VIH.

La síntesis se llevó a cabo a través del método directo siguiendo la metodología previamente propuesta por Paez *et al.* (27), en donde el procedimiento se efectuó en etanol como solvente, usando $AuCl_4^-$ como precursor de las NPs, borohidruro de sodio como reductor y disulfuros dendríticos de tipo *Newkome* como ligandos (**Figura4**).

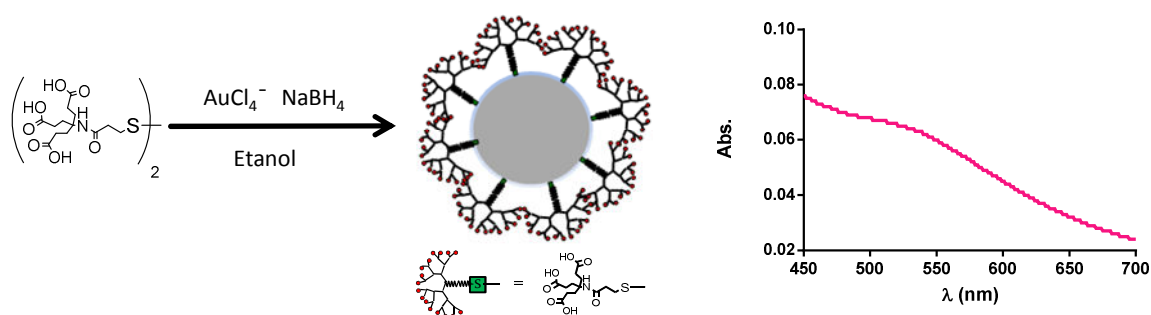


Figura 4. Síntesis NCDs

Los NCDs obtenidos fueron caracterizados por espectroscopia FT-IR, espectroscopia UV-Vis, resonancia magnética nuclear (RMN) y microscopía electrónica de transmisión (TEM). Para la caracterización IR de los NCDs sintetizados se compararon los espectros del disulfuro puro y del correspondiente NCD. Por otra parte, también se realizaron los espectros de RMN del disulfuro puro y del correspondiente NCD. Ambas técnicas mostraron que los NCD sintetizados poseen el dendrón G1-COOH como ligando. El espectro UV-Vis realizado evidenció la presencia de la banda plasmónica LSPR de baja intensidad cuyo máximo se ubica a 540nm. Los resultados obtenidos indican que las NPs obtenidas son aproximadamente esféricas y de un tamaño inferior los 15 nm. Por su parte, la microscopía TEM ha mostrado ser muy útil para determinar fácilmente el tamaño de las NPs metálicas. Las imágenes TEM muestran que, efectivamente, las NPs sintetizadas son cuasi esféricas y de un tamaño menor a los 10nm, en concordancia con los estudios UV-Vis.

Una vez caracterizados los NCD, se procedió a la funcionalización de los mismos con arginina. Para ello se llevaron a cabo dos metodologías. La primera consistió en la unión covalente de la arginina a través de la formación de un enlace amida con los ácidos carboxílicos del dendrón, utilizando EDC y NHS como activantes. Por otra parte, se procedió a la unión electrostática de la arginina con los NCD, incubando durante 30 minutos los NCD en una solución de arginina en buffer fosfato (pH=7).

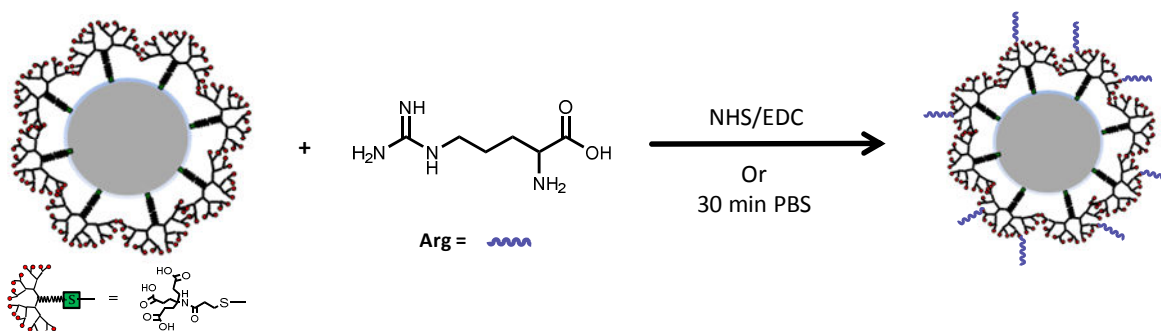


Figura 5. Funcionalización de NCDs con arginina.

Una vez finalizados los estudios de caracterización de todos los sistemas, éstos se están probando en ensayos biomédicos por otros grupos pertenecientes a la RED CYTED.

4.2. Modificación química de nanopartículas magnéticas por dendronización

El objetivoplanteado se basó en la obtención de nuevos sistemas de nanopartículas magnéticas (MNPs) por dendrón. La combinación de las propiedades superparamagnéticas de las nanopartículas de óxido de hierro, capaces de ser direccionadas hacia un sitio específico mediante la aplicación de un campo magnético externo y las propiedades de los dendrones de poder ser funcionalizados de acuerdo a necesidades concretas, hace a estos nuevos sistemas un potencial nanotransportador aplicable en nanomedicina. Para tal fin, se realizó la modificación química de MNPs usando dendrones del tipo carbosilanos. Se procedió a la dendronización de las MNPs previamente silanizadas con 3-(aminopropil)trietoxisilano (MNP-NH₂). Los dendrones carbosilanos fueron seleccionados con puntos focales -NH₂ o -Cl. Primero se incorporó en la superficie de MNP-NH₂ el dendrón de generación 2 NH₂G₂(S-NMe⁺I)₄ (NH₂G₂S), conteniendo cuatro cargas positivas en la periferia (**Figura 6**).

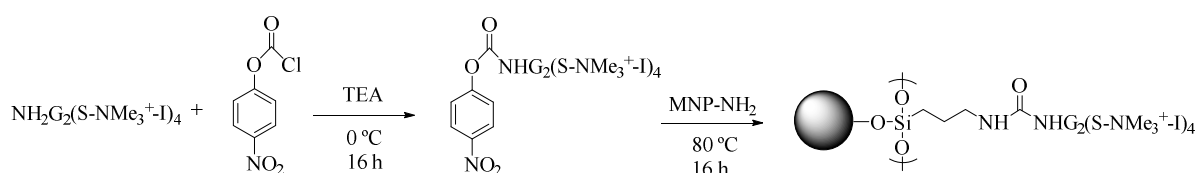


Figura 6. Síntesis MNP-urea-G₂S

La metodología de síntesis implica el acoplamiento amino-amino mediante la formación de un enlace urea. Por otro lado, se dendronizaron MNP-NH₂ (**Figura 7**) mediante alquilación del grupo amino usando el dendrón ClG₂(Si-NMe⁺I)₄. Ambos productos de síntesis fueron caracterizados por espectroscopia FT-IR, análisis termogravimétrico (TGA), potencial Z, microscopia electrónica de transmisión (TEM) y análisis elemental.

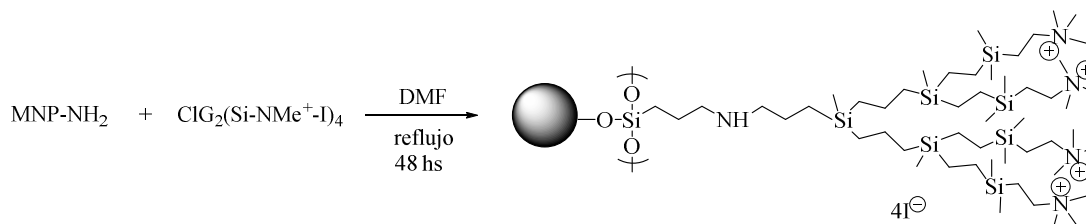


Figura 7. Síntesis de MNP-NH-G₂Si

Tanto para la síntesis de MNP-urea-G₂S como para MNP-NH-G₂Si, los análisis de potencial Z indicaron que el valor aumenta de 0 mV para MNP-NH₂ a ~33 y ~47 mV, respectivamente (**Figura 8**). Este cambio en el potencial se debe a la presencia de las cargas positivas en la periferia de los dendrones. Las imágenes tomadas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) indicaron que la forma de las MNP no se ven modificadas, y el tamaño y forma permanece estable bajo las condiciones de reacción.

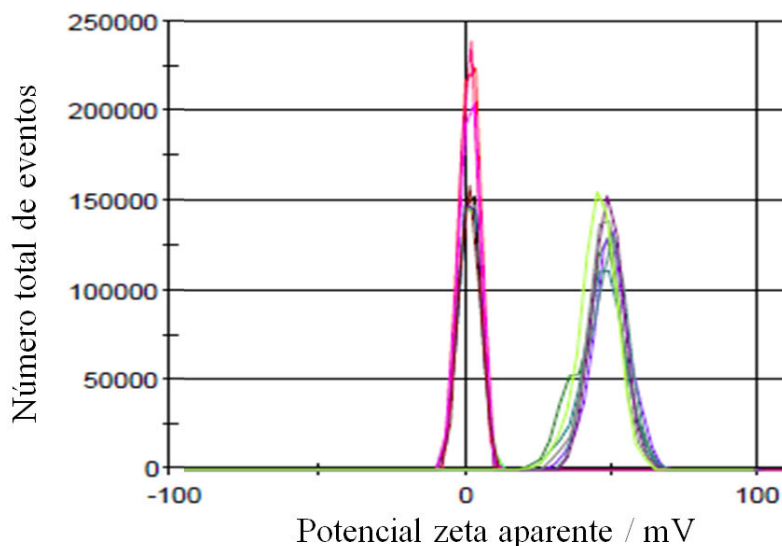


Figura 8. Distribución de Potencial Zeta para MNP-NH₂ y MNP-NH-G₂Si.

En la Figura 9 (izq) se muestran los espectros FTIR de las MNPs modificadas con el silano y las dendronizadas. Se observa la presencia de las bandas características de la nanopartícula original (core) dada por la vibración del enlace Fe-O a ~590 cm⁻¹ de la magnetita. En los espectros correspondientes a las MNPs dendronizadas se observan las bandas características del dendrón a ~1050 cm⁻¹ debido al enlace Si-O-Si δ simétrico; los picos intensos entre ~1100-1020 cm⁻¹ corresponden a las aminas secundarias. Además, se observó el aumento y desdoblamiento de la banda C-N a 1618 cm⁻¹, que demuestra la presencia de ambas estructuras. Según los análisis TGA (**Figura 9**), se deduce que la incorporación y el aumento de la materia orgánica en las MNP-NH₂ fue de aproximadamente un 20% respecto al peso total de las nanopartículas.

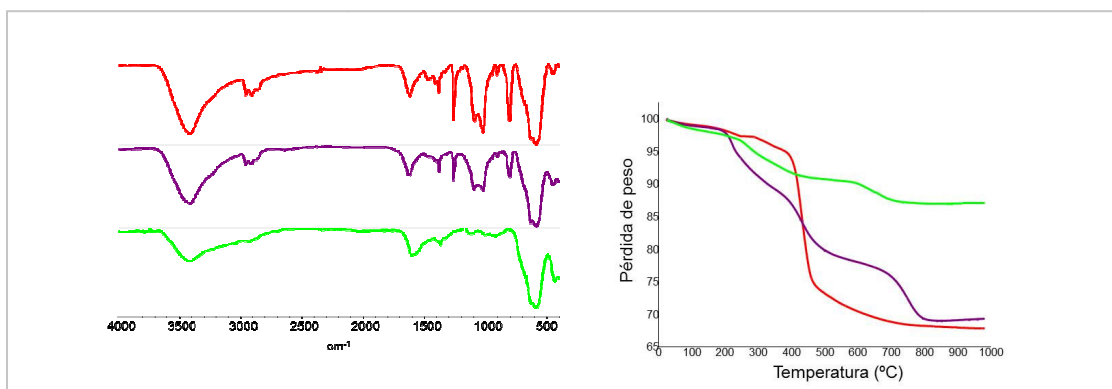


Figura 9. Espectro FT-IR (izq) y TGA (der) para MNP-NH₂ (línea verde), MNP-NH-G₂Si (línea violeta) y MNP-urea-G₂S (línea roja).

Una vez finalizados los estudios de caracterización de todos los sistemas, los mismos serán utilizados para estudios de interacción con péptidos y ensayos de citotoxicidad en células por varios grupos de la RED CYTED.

En resumen, en este capítulo se han revisado los avances más recientes en el uso de los NCDs como nanotransportadores para la administración de fármacos destacando la importancia de las moléculas dendríticas en la estabilización de los coloides. Estas nanopartículas híbridas (orgánica/inorgánica) han surgido como una solución simple para construir sistemas "teranósticos" que actualmente se encuentran bajo una intensa investigación.

Por otro lado, se ha mostrado en forma sintética los objetivos y resultados alcanzados en nuestro proyecto específico de estudio en el tema de NCDs.

Esperamos que estas plataformas puedan ofrecer un rendimiento superior en aquellas terapias médicas que requieren el transporte a través de las barreras del tejido, ya que las interacciones multivalentes son un factor crucial en la explotación del efecto de permeabilidad mejorada. Esta razón claramente podría justificar el mayor costo de síntesis de las moléculas dendríticas. Además, se han discutido temas relacionados a la modificación superficial, la ramificación de los ligandos y su efecto en las características del nanotransportador. Un control preciso de la cantidad y la distribución de los grupos funcionales en las superficies internas y externas de los NCDs ayudaría a incrementar la carga de fármacos hidrofóbicos y controlar su tiempo de liberación. Sin lugar a dudas, el progreso en el diseño de los NCDs junto con el desarrollo en su aplicación en biomedicina brindará resultados exitosos en los próximos años.

Agradecimientos:

Los autores agradecen a los organismos que gentilmente financiaron este trabajo: SECyT(UNC), ANPCyT, CONICET y CYTED 214RT0482.

5. REFERENCIAS

1. (a) Viñes F, Gomes JRB, Illas F (2014). Understanding the reactivity of metallic nanoparticles: Beyond the extended surface model for catalysis. *Chemical Society Reviews* 43 (14), 4922-4939; (b) Zhou W, Gao X, Liu D, Chen X (2015). Gold Nanoparticles for In Vitro Diagnostics. *Chemical Reviews* 115 (19), 10575-10636. (c) Sundar DS, Antoniraj MG, Kumar CS, Mohapatra SS, Houreld NN, Ruckmani K (2016). Recent Trends of Biocompatible and Biodegradable Nanoparticles in Drug Delivery: Review *Current Medicin Chemist*.
2. Hoet PH M, Bruske-Hohlfel I, Salata OV (2004). Nanoparticles-Known and unknown health risks. *J Nanobiotechnology* 2 (12).
3. (a) Thakur VK, Ding G, Ma J, Lee PS, Lu X (2012). Hybrid materials and polymer electrolytes for

- electrochromic device applications. *Adv Mater* 24 (30), 4071-4096; (b) Kumar PN, Narayanan R, Laha S, Deepa M Srivastava, AK. Photoelectrochromic cell with a CdS quantum dots/graphitic-nanoparticles sensitized anode and a molybdenum oxide cathode (2016). *Solar Energy Materials and Solar Cells* 153, 138-147; (c) Kasem KK, Olsen J-C, Baker KM, Santucci C, Lalla J, Willman AN (2016). Electrochemical studies on photoactive semiconductor Organic/Inorganic hybrid interface consisting of a poly tris[4-(2-Thienyl)phenyl]amine and CdS nanoparticles. *Synthetic Metals* 217, 61-67.
4. Thakur VK, Lin MF, Tan EJ, Lee PS (2012). Green aqueous modification of fluoropolymers for energy storage applications. *J Mater Chem* 22 (13), 5951-5959.
 5. (a) Majdalawieh A, Kanan MC, El-Kadri O, Kanan SM (2014). Recent advances in gold and silver nanoparticles: synthesis and applications. *J Nanosci Nanotechnol* 14 (7), 4757-4780; (b) Alex S, Tiwari A (2015). Functionalized Gold Nanoparticles: Synthesis, Properties and Applications. *J Nanosci Nanotechnol* 15 (3), 1869-1894. Review.
 6. Hwang S, Nam J, Song J, Jung S, Hur J, Im K, Park N, Kim S (2014). A sub 6 nanometer plasmonic gold nanoparticle for pH-responsive near-infrared photothermal cancer therapy. *New J Chem* 38 (3), 918-922.
 7. (a) Lin Y, Ren J, Qu X (2014) Nano-gold as artificial enzymes: Hidden talents. *Advanced Materials* 26 (25), 4200-4217; (b) Barsan MM, Brett CMA (2016). Recent advances in layer-by-layer strategies for biosensors incorporating metal nanoparticles. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 79, 286-296.
 8. Lee J, Chatterjee DK, Lee, MH, Krishnan S (2014). Gold nanoparticles in breast cancer treatment: Promise and potential pitfalls. *Cancer Letters* 347 (1), 46-53.
 9. Fratoddi I, Venditti I, Cametti C, Russo MV (2014). Gold nanoparticles and gold nanoparticle-conjugates for delivery of therapeutic molecules. *Progress and challenges J Mater Chem* 2 (27), 4204-4220.
 10. Bensebaa F (2013). Optoelectronics. In *Interface Science and Technology* Vol. 19, pp 429-479.
 11. Sagadevan S, Periasamy M (2014). Recent trends in nanobiosensors and their applications. *Adv Mater Science* 36 (1), 62-69. Review.
 12. He L, Wang M, Ge J, Yin Y (2014). Magnetic assembly route to colloidal responsive photonic nanostructures. *Acc Chem Res* 45 (9), 1431-1440.
 13. (a) Banerjee R, Katsenovich Y, Lagos L, McIntosh M, Zhang X, Li CZ (2010). Nanomedicine: Magnetic nanoparticles and their biomedical applications. *Curr Med Chem* 17 (27), 3120-3141; (b) Hajba L, Guttman A (2016). The use of magnetic nanoparticles in cancer theranostics: Toward handheld diagnostic devices. *Biotechnol Adv* 34 (4), 354-361.
 14. Basly B, Popa G, Fleutot S, Pichon BP, Garofalo A, Ghobril C, Billotey C, Bernard A, Bonazza P, Martinez H, Felder-Flesch D, Begin-Colin S (2013). Effect of the nanoparticle synthesis method on dendronized iron oxides as MRI contrast agents. *Dalton Trans* 42 (6), 2146-2157.
 15. Tomalia DA, Naylor AM, Goddard Iii WA (1990). Starburst dendrimers: Molecular-level control of size, shape, surface chemistry, topology, and flexibility from atoms to macroscopic matter. *Angewandte Chemie - International Edition in English* 29 (2), 138-175.
 16. Zhao M, Sun L, Crooks RM (1998). Preparation of Cu Nanoclusters within Dendrimer Templates. *J Am Chem Soc* 120 (19), 4877-4878.
 17. Crooks R, M Zhao, M Sun, L Chechik, V Yeung, LK (2001). Dendrimer-encapsulated metal nanoparticles: Synthesis, characterization, and applications to catalysis. *Acc Chem Res* 34 (3), 181-190.
 18. Gillich T, Acikgoz C, Isa L, Schluter AD, Spencer ND, Textor M (2013). PEG-stabilized core-shell nanoparticles: Impact of linear versus dendritic polymer shell architecture on colloidal properties and the reversibility of temperature-induced aggregation. *ACS Nano* 7 (1), 316-329.
 19. Pan B, Gao F, Ao L, Tian H, He R, Cui D (2005). Controlled self-assembly of thiol-terminated poly(amidoamine) dendrimer and gold nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 259 (1-3), 89-94.
 20. Gopidas KR, Whitesell JK, Fox MA (2003). Nanoparticle-cored dendrimers: Synthesis and

characterization. *J Am Chem Society* 125 (21), 6491-6502.

21. Shon YS (2009). Nanoparticle-Cored Dendrimers and Hyperbranched Polymers: Synthesis, Properties, and Applications. *Adv Nanomaterials* Vol. 2, pp 743-766.
22. Paez JI, Martinelli M, Brunetti V, Strumia MC (2012). Dendronization: A useful synthetic strategy to prepare multifunctional materials. *Polymers* 4 (1), 355-395.
23. Kumar VKR, Gopidas KR (2010). Synthesis and characterization of gold-nanoparticle-cored dendrimers stabilized by metal-carbon bonds. *Chemistry - An Asian Journal* 5 (4), 887-896.
24. Kim MK, Jeon YM, Woo Sung J, Kim HJ, Seung Gab H, Chan Gyung P, Kim K (2001). Novel dendron-stabilized gold nanoparticles with high stability and narrow size distribution. *Chem Commun* (7), 667-668.
25. Wang R, Yang J, Zheng Z, Carducci MD, Jiao J, Seraphin S (2001). Dendron-controlled nucleation and growth of gold nanoparticles. *Angewandte Chemie - International Edition* 40 (3), 549-552.
26. Yan H, Wong C, Chianese AR, Luo J, Wang L, Yin J, Zhong CJ (2010). Dendritic arenethiol-based capping strategy for engineering size and surface reactivity of gold nanoparticles. *Chem Mater* 22 (21), 5918-5928.
27. Paez JI, Brunetti V, Coronado EA, Strumia MC (2013). Dendritic chemistry applied to the construction of tailored functional nanomaterials: Synthesis and characterization of gold nanoparticle-cored dendrimers (NCDs). *Curr Org Chem* 17 (9), 943-955.
28. Kumar VKR, Krishnakumar S, Gopidas KR (2012). Synthesis, characterization and catalytic applications of palladium nanoparticle-cored dendrimers stabilized by metal-carbon bonds. *European J Org Chem* (18), 3447-3458.
29. Love CS, Ashworth I, Brennan C, Chechik V, Smith DK (2006). Dendron-protected Au nanoparticles-Effect of dendritic structure on chemical stability. *J Colloid and Interface Sci* 302 (1), 178-186.
30. Daniel MC, Aranzaes JR, Nlate S, Astruc D (2005). Gold-nanoparticle-cored polyferrocenyl dendrimers: Modes of synthesis and functions as exoreceptors of biologically important anions and re-usable redox sensors. *J Inorg and Organometallic Polymers* 15 (1), 107-119.
31. Paez JI, Coronado EA, Strumia MC (2012). Preparation of controlled gold nanoparticle aggregates using a dendronization strategy. *J Colloid and Interface Sci* 384 (1), 10-21.
32. Liu G, Gao J, Ai H, Chen X (2013). Applications and potential toxicity of magnetic iron oxide nanoparticles. *Small* 9 (9-10), 1533-1545.
33. Pisanic I, T. R.; Zhang, Y.; Wang, T. H., Quantum dots in diagnostics and detection: Principles and paradigms. *Analyst* 2014,139 (12), 2968-2981.
34. Battigelli A, Menard-Moyon C, Da Ros T, Prato M, Bianco A (2013). Endowing carbon nanotubes with biological and biomedical properties by chemical modifications. *Adv Drug Deliv Rev* 65 (15), 1899-1920.
35. Dreaden EC, Alkilany AM, Huang X, Murphy CJ, El-Sayed MA (2012). The golden age: Gold nanoparticles for biomedicine. *Chem Soc Rev* 41 (7), 2740-2779.
36. Wu KCW, Yamauchi Y (2012). Controlling physical features of mesoporous silica nanoparticles (MSNs) for emerging applications. *J Mat Chem* 22 (4), 1251-1256.
37. Xie J, Liu G, Eden HS, Ai H, Chen X (2011). Surface-engineered magnetic nanoparticle platforms for cancer imaging and therapy. *Acc Chem Res* 44 (10), 883-892.
38. Hartono SB, Yu M, Gu W, Yang J, Strounina E, Wang X, Qiao S, Yu C (2014). Synthesis of multi-functional large pore mesoporous silica nanoparticles as gene carriers. *Nanotechnology* 25 (5).
39. Pan D, Guo C, Luo K, Gu Z (2014). Preparation and biosafety evaluation of the peptide dendron functionalized mesoporous silica nanohybrid. *Chinese J Chem* 32 (1), 27-36.
40. Gautier J, Allard-Vannier E, Herve-Aubert K, Souce M, Chourpa I (2013). Design strategies of hybrid metallic nanoparticles for theragnostic applications. *Nanotechnology* 24 (43).

41. Calderon M, Quadir MA, Sharma SK, Haag R (2010). Dendritic polyglycerols for biomedical applications. *Adv Mater* 22 (2), 190-218.
42. Patel PV, Soni TG, Thakkar VT, Gandhi TR (2013). Nanoparticle as an emerging tool in pulmonary drug delivery system. *Micro and Nanosystems* 5 (4), 288-302.
43. Parveen S, Misra R, Sahoo SK (2012). Nanoparticles: A boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 8 (2), 147-166.
44. Pan Y, Neuss S, Leifert A, Fischler M, Wen F, Simon U, Schmid G, Brandau W, Jahnen-Dechent W (2007). Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small* 3 (11), 1941-1949.
45. Dykman L, Khlebtsov N (2012). Gold nanoparticles in biomedical applications: Recent advances and perspectives. *Chem Soc Rev* 41 (6), 2256-2282.
46. Cho TJ, MacCuspie RI, Gigault J, Gorham JM, Elliott JT, Hackley VA (2014). Highly stable positively charged dendron-encapsulated gold nanoparticles. *Langmuir* 30 (13), 3883-3893.
47. Cheng Z, Al Zaki A, Hui JZ, Muzykantov VR, Tsourkas A (2012). Multifunctional nanoparticles: Cost versus benefit of adding targeting and imaging capabilities. *Science* 338 (6109), 903-910.
48. Pan Y, Leifert A, Ruau D, Neuss S, Bornemann J, Schmid G, Brandau W, Simon U, Jahnen-Dechent W. (2009). Gold nanoparticles of diameter 1.4 nm trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage. *Small* 5 (18), 2067-2076.
49. Stobiecka M, Hepel M (2011). Double-shell gold nanoparticle-based DNA-carriers with poly-L-lysine binding surface. *Biomaterials* 32 (12), 3312-3321.
50. Papp I, Sieben C, Ludwig K, Roskamp M, Bottcher C, Schlecht, S Herrmann A, Haag R (2010). Inhibition of influenza virus infection by multivalent sialic-acid- functionalized gold nanoparticles. *Small* 6 (24), 2900-2906.
51. Gopidas KR, Whitesell JK, Fox MA (2003). Metal-Core-Organic Shell Dendrimers as Unimolecular Micelles. *J Am Chem Soc* 125 (46), 14168-14180.
52. Ma D, Liu ZH, Zheng QQ, Zhou XY, Zhang Y, Shi YF, Lin JT, Xue W (2013). Star-shaped polymer consisting of a porphyrin core and poly(L-lysine) dendron arms: Synthesis, drug delivery, and in vitro chemo/photodynamic therapy. *Macro Rapid Commun* 34 (6), 548-552.
53. Leonard K, Kawashima M, Okamura H, Kurawaki J (2010). One-pot sonochemical synthesis of dendron-stabilized gold nanoparticles as promising nano-hybrid with potential impact in biological application. *Mater Lett* 64 (20), 2240-2243.
54. Patri AK, Kukowska-Latallo JF, Baker Jr JR (2005). Targeted drug delivery with dendrimers: Comparison of the release kinetics of covalently conjugated drug and non-covalent drug inclusion complex. *Adv Drug Deliv Reviews* 57 (15), 2203-2214.
55. Rana S, Bajaj A, Mout R, Rotello VM (2012). Monolayer coated gold nanoparticles for delivery applications. *Adv Drug Deliv Review* 64 (2), 200-216.
56. Costantino L, Gandolfi F, Bossy-Nobs L, Tosi G, Gurny R, Rivasi F, Angela Vandelli M, Forni F (2006). Nanoparticulate drug carriers based on hybrid poly(d,l-lactide-co-glycolide)-dendron structures. *Biomaterials* 27 (26), 4635-4645.
57. Pan H, Grow ME, Wilson O, Daniel MC (2013). A new poly(propylene imine) dendron as potential convenient building-block in the construction of multifunctional systems. *Tetrahedron* 69 (13), 2799-2806.
58. Daniel MC, Grow ME, Pan H, Bednarek M, Ghann WE, Zabetakis K, Cornish J (2011). Gold nanoparticle-cored poly(propyleneimine) dendrimers as a new platform for multifunctional drug delivery systems. *New J Chem* 35 (10), 2366-2374.
59. Yavuz B, Pehlivan SB, Unlu N (2013). Dendrimeric systems and their applications in ocular drug delivery. *The Scientific World Journal* 14;2013:732340.
60. Bergen JM, Von Recum HA, Goodman TT, Massey AP, Pun SH (2006). Gold nanoparticles as a versatile platform for optimizing physicochemical parameters for targeted drug delivery. *Macromol*

Biosci 6 (7), 506-516.

61. Ghosh PS, Kim CK, Han G, Forbes NS, Rotello VM (2008). Efficient gene delivery vectors by tuning the surface charge density of amino acid-functionalized gold nanoparticles. *ACS Nano* 2 (11), 2213-2218.
62. Ghosh P, Yang X, Arvizo R, Zhu ZJ, Agasti SS, Mo Z, Rotello VM (2010). Intracellular delivery of a membrane-impermeable enzyme in active form using functionalized gold nanoparticles. *J Am Chem Soc* 132 (8), 2642-2645.
63. Gautier J, Allard-Vannier E, Munnier E, Souce M, Chourpa I (2013). Recent advances in theranostic nanocarriers of doxorubicin based on iron oxide and gold nanoparticles. *J Control Release* 169 (1-2), 48-61.
64. Yang HW, Hua MY, Liu HL, Huang CY, Wei KC (2012). Potential of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery. *Nanotechnology, Science and Applications* 5 (1), 73-86.
65. Khodadust R, Mutlu P, Yalcin S, Unsoy G, Gunduz U (2013). Polyinosinic:polycytidylic acid loading onto different generations of PAMAM dendrimer-coated magnetic nanoparticles. *J Nanoparticle Research* 15 (8).
66. Tanaka T, Shibata K, Hosokawa M, Hatakeyama K, Arakaki A, Gomyo H, Mogi T, Taguchi T, Wake H, Tanaami T, Matsunaga T (2012). Characterization of magnetic nanoparticles modified with thiol functionalized PAMAM dendron for DNA recovery. *J Colloid Interface Sci* 377 (1), 469-475.
67. Zhu R, Luo K, Xu X, Wu Y, He B, Gu Z (2011). Poly (L-glutamic acid) dendron based pH sensitive drug carrier with magnetic nanoparticle core. *Acta Polymerica Sinica* (6), 679-686.
68. Martin AL, Bernas LM, Rutt BK, Foster PJ, Gillies ER (2008). Enhanced cell uptake of superparamagnetic iron oxide nanoparticles functionalized with dendritic guanidines. *Bioconjug Chem* 19 (12), 2375-2384.