

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos Autor.

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Nanociencias**

**Diseño y evaluación de un hidrogel cargado con puntos
cuánticos de carbono conjugados con un inhibidor de beta
secretasa, en un modelo de Alzheimer**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Carlos Guzmán Uribe

Ensenada, Baja California, México
2022

Tesis defendida por
Carlos Guzmán Uribe

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Ana Bertha Castro Ceseña
Codirectora de tesis

Dr. Pavel Hayl Lugo Fabres
Codirector de tesis

Dra. Tanya Amanda Camacho Villegas

Dr. Sergio Andrés Águila Puentes

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro



Dra. Catalina López Bastidas
Coordinadora del Posgrado en Nanociencias

Dr. Pedro Negrete Regagnon
Director de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Carlos Guzmán Uribe** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Nanociencias.

Diseño y evaluación de un hidrogel cargado con puntos cuánticos de carbono conjugados con un inhibidor de beta secretasa, en un modelo de Alzheimer

Resumen aprobado por:

Dra. Ana Bertha Castro Ceseña
Codirectora de tesis

Dr. Pavel Hayl Lugo Fabres
Codirector de tesis

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un proceso neurodegenerativo, crónico, progresivo e irreversible en adultos mayores de 65 años. La EA se desencadena por la acción de β -secretasa (BACE1), la cual ocasiona daño neuronal. Actualmente, los tratamientos contra la EA tienen poca eficacia en llegar a cerebro y tiene una alta toxicidad hepática en su administración oral. Para superar estos retos, sintetizamos un nanocompuesto con hidrogeles (G) y puntos cuánticos de carbono (CD), con potencial aplicación transdérmica. Los CD se sintetizaron a partir de ácido cítrico por método solvotermal y los hidrogeles de gelatina metacrilada (GelMA) se obtuvieron por fotoentrecruzamiento con luz UV. Los CD se conjugaron con transferrina (CD-T) para cruzar la barrera hematoencefálica (BHE), con un péptido inhibidor de BACE1 (CD-i β) y con ambos (CD-Ti β). Los CD emitieron fluorescencia a una longitud de onda de 470.4 nm (cian), se observaron estructuras esféricas y con tamaños desde 8.3 nm (CD) hasta 16.9 nm (CD-T) en promedio, respectivamente. Además, la cantidad de proteínas conjugadas a los CD fue de 8.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (CD-i β) y 10.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (CD-T y CD-Ti β). La microestructura en todos los nanocompuestos se conservó y se observaron poros de 51-100 μm de diámetro. En PBS, los nanocompuestos comenzaron a degradarse a las 96h y mostraron una degradación máxima entre las 120-144 h. Los nanocompuestos de G-CD-i β y G-CD-Ti β mostraron un mayor hinchamiento y una degradación más rápida, en comparación con los otros nanocompuestos. Los nanocompuestos en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) tuvieron una cinética de liberación de orden cero, mostrando una liberación controlada por difusión. El 50% de los conjugados de CD se liberaron desde los nanocompuestos G-CD-Ti β a las 96 h, mientras que desde los G-CD-T lo hicieron a las 144 h. Los ensayos de viabilidad celular de las células endoteliales (HBEC 5i) y células de glioblastoma (U-87 MG) mostraron que todos los conjugados de CD eran citocompatibles. Los distintos CD conjugados lograron cruzar un modelo *in vitro* de BHE e inhibieron >50% de la actividad de BACE1 en un modelo *in vitro* de enfermedad de Alzheimer inducido con escopolamina en las células U-87 MG.

Palabras clave: Alzheimer, beta secretasa, hidrogeles, puntos cuánticos, Transwell.

Abstract of the thesis presented by **Carlos Guzmán Uribe** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Nanoscience.

Design and evaluation of a hydrogel loaded with beta-secretase inhibitor conjugated carbon quantum dots, in an Alzheimer's model

Abstract approved by:

Dr. Ana Bertha Castro Ceseña

Thesis Codirector

Dr. Pavel Hayl Lugo Fabres

Thesis Codirector

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative, chronic, progressive and irreversible process in adults older than 65 years. AD is triggered by the action of β -secretase (BACE1), causing neuronal damage. Currently, AD treatments have shown little efficacy in reaching the brain and liver toxicity in oral administration. To overcome these challenges, we synthesized a nanocomposite with hydrogels (G) and quantum carbon points (CD), with the potential transdermal application. CDs were synthesized from citric acid by solvothermal method and gelatin methacryloyl hydrogels (GelMA) were photocrosslinked by UV irradiation. CDs were conjugated with transferrin (CD-T) to pass through the blood brain barrier (BBB), with a BACE1-inhibitor peptide (CD-i β) and both (CD-Ti β). CDs showed fluorescence emission at a wavelength of 470.4 nm (cyan), were observed spherical and with sizes from 8.3 nm (CD) to 16.9 nm (CD-T) average, respectively. Moreover, the amount of proteins conjugated to CDs was 8.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (CD-i β) and 10.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (CD-T and CD-Ti β). Microstructure in all nanocomposites was preserved and pores of 51-100 μm in size were observed. In PBS, nanocomposites degradation began at 96h and showed maximum degradation between 120-144 h. G-CD-i β and G-CD-Ti β nanocomposites showed greater swelling and faster degradation compared to others. Nanocomposites in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) had zero-order release kinetics, showing a controlled release by diffusion. 50% of CDs conjugates were released from G-CD-Ti β nanocomposites at 96 h, while from G-CD-T were at 144 h. Cell viability tests on endothelial cells (HBEC 5i) and glioblastoma cells (U-87 MG) showed that all CDs conjugates were cytocompatible. All CD conjugates succeeded in crossing an *in vitro* model of BBB and inhibited >50% BACE1 activity in an *in vitro* model of scopolamine-induced Alzheimer's disease in U-87 MG cells.

Keywords: Alzheimer, beta-secretase, carbon dots, hydrogels, Transwell.

Dedicatoria

A todas las personas que han creído en mí, brindándome su apoyo y amor incondicional.

A quienes buscan un propósito en la vida, como inspiración para alcanzar sus metas.

A la ciencia, que nos permite cuestionarnos y darle una explicación a la vida.

A la Tierra que nos brinda un hogar y el sustento para vivir cada día.

A mi yo del futuro: haz lo que te apasiona, lo puedes lograr.

*"En cada paso alcanzado...cada pensamiento procesado
...cada segundo que transcurre. En cada acción realizada...
Basta con hacer las cosas lo mejor posible,
por simples o efímeras que parezcan,
cada una construye la pluralidad de la que estamos hechos"*

[La mejor versión de uno mismo]

C. GuzUri

XVII-VI-MMXIX

Agradecimientos

Agradezco al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) y al Centro de Nanociencias y Nanotecnología (CNyN-UNAM), por permitirme realizar mis estudios de posgrado en esta institución y brindarme las herramientas necesarias para obtener el grado de Maestro en Ciencias. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por otorgarme la beca para estudios de posgrado (#28563).

Agradezco a mis directores de tesis, la Dra. Ana Bertha Castro Ceseña y el Dr. Pavel Hayl Lugo Fabres, por su apoyo y asesoría para desarrollar este proyecto, por permitirme proponer y trabajar en algo que me apasiona. A los miembros de mi comité de tesis, la Dra. Tanya Amanda Camacho Villegas, el Dr. Sergio Andrés Águila Puentes y el Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro, por sus comentarios y aportaciones que enriquecieron este trabajo.

Al Dr. José Enrique Íñiguez Pacheco del Departamento de Geología y CeMIEGeo, por ayudarme a analizar mis nanocompuestos por microtomografía computarizada y FTIR. Al Dr. Carlos Belman Rodríguez del Departamento de Nanoestructuras del CNyN, por su apoyo en técnicas de síntesis y caracterización de nanomateriales. Al Dr. Gustavo Alonso Hirata Flores y al Dr. Prakhar Sengar del Departamento de Físicoquímica de materiales, por su apoyo en la medición de los espectros de fluorescencia de mis nanomateriales. Al Dr. Eduardo Antonio Murillo Bracamontes de la Unidad de Nanocaracterización del CNyN, por su apoyo en el análisis por AFM de mis nanomateriales. Al Dr. Edgardo Sepúlveda del Departamento de Microbiología del CICESE, por permitirme realizar mediciones de fluorescencia. Al Dr. Rafael Vázquez Duhalt del Departamento de Bionanotecnología del CNyN, por permitirme realizar caracterización de mis nanomateriales con DLS. Al Dr. Noé Díaz de León del Departamento de Nanocatálisis del CNyN, por permitirme realizar evaluaciones de potencial Z.

Al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), por permitirme realizar una estancia de investigación, para capacitarme y realizar experimentos de mi proyecto.

Agradezco infinitamente a mi familia, por su amor y apoyo incondicional a lo largo de mi vida, que me permitieron llegar hasta aquí, y que a pesar de la distancia siempre pude contar con ellos. A mis amigos, de años previos y los nuevos que conocí en Ensenada y Guadalajara; los cuales estuvieron presentes en cada experiencia nueva y en los momentos importantes durante estos dos años.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas	xii
Capítulo 1. Introducción.....	1
Capítulo 2. Antecedentes	6
2.1 Beta secretasa (BACE1)	6
2.1.1 Estructura y función fisiológica de BACE1.....	6
2.1.2 Papel de BACE1 en la cascada amiloide	8
2.1.3 Tratamiento de enfermedad de Alzheimer: Inhibidores de BACE1	10
2.2 Puntos cuánticos de carbono (CD).....	11
2.3 Hidrogeles y puntos cuánticos de carbono (CD) en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (EA).....	12
2.3.1 Parche de Rivastigmina	12
2.3.2 Hidrogeles transdérmicos para la entrega de medicamentos contra EA.....	13
2.3.3 Efectos de los puntos cuánticos de carbono en la EA.....	14
2.3.4 Nanocompuestos de hidrogel y puntos cuánticos de carbono.....	16
2.4 Barrera hematoencefálica (BHE).....	18
2.4.1 Componentes de la BHE	18
2.4.2 Mecanismos de transporte a través de la BHE	20
2.4.3 Transferrina	21
2.5 Transwell como modelo <i>in vitro</i> de BHE	22
Capítulo 3. Hipótesis y objetivos.....	25
3.1 Hipótesis.....	25
3.2 Objetivos	25
3.2.1 Objetivo general.....	25
3.2.2 Objetivos específicos.....	25

Capítulo 4. Metodología.....	26
4.1 Síntesis de puntos cuánticos de carbono.....	27
4.2 Conjugación de puntos cuánticos de carbono con transferrina e iBACE1.....	27
4.3 Caracterización de puntos cuánticos de carbono conjugados.....	29
4.3.1 Morfología y tamaño de los CD conjugados: TEM, AFM y DLS.....	29
4.3.2 Carga eléctrica superficial de los CD conjugados: potencial ζ	30
4.3.3 Espectros de fluorescencia de los CD conjugados.....	30
4.3.4 Propiedades superficiales de los CD conjugados mediante FTIR.....	31
4.3.5 Detección de proteínas en los CD conjugados mediante SDS-PAGE.....	31
4.3.6 Cuantificación de proteína en los CD conjugados mediante Micro-BCA.....	31
4.4 Síntesis de hidrogeles.....	32
4.5 Evaluación de los nanocompuestos de hidrogeles con CD conjugados.....	34
4.5.1 Microestructura: porosidad y conectividad.....	35
4.5.2 Hinchamiento de los nanocompuestos.....	35
4.5.3 Degradación de los nanocompuestos.....	35
4.5.4 Liberación de los puntos cuánticos de carbono desde los hidrogeles.....	36
4.6 Prevalidación de la inhibición de la actividad de BACE1.....	37
4.7 Modelo <i>in vitro</i> de BHE y enfermedad de Alzheimer.....	38
4.7.1 Inducción con escopolamina del modelo <i>in vitro</i> de enfermedad de Alzheimer.....	39
4.7.2 Citocompatibilidad de CD conjugados.....	39
4.7.3 Modelo <i>in vitro</i> de BHE con un Transwell cocultivo.....	41
4.7.3.1 Permeabilidad en el modelo <i>in vitro</i> de BHE.....	42
4.7.4 Detección de BACE1 en el modelo <i>in vitro</i> de enfermedad de Alzheimer.....	44
4.8 Inhibición de la actividad de BACE1 en el modelo <i>in vitro</i> de enfermedad de Alzheimer.....	44
4.9 Análisis estadístico y gráficos.....	45
Capítulo 5. Resultados.....	46
5.1 Síntesis de puntos cuánticos de carbono.....	46
5.2 Conjugación de puntos cuánticos de carbono con transferrina e iBACE1.....	46
5.3 Caracterización de los puntos cuánticos de carbono conjugados.....	47
5.3.1 Morfología y tamaño de los CD conjugados: TEM, AFM y DLS.....	47
5.3.2 Carga eléctrica superficial de los CD conjugados: potencial ζ	49
5.3.3 Espectros de fluorescencia de los CD conjugados.....	50
5.3.4 Propiedades superficiales de los CD mediante FTIR.....	53

5.3.5	Detección de proteínas en los CD conjugados mediante SDS-PAGE.....	54
5.3.6	Cuantificación de proteína en los CD conjugados mediante Micro-BCA	55
5.4	Síntesis de hidrogeles.....	56
5.5	Evaluación de los nanocompuestos de hidrogeles con CD conjugados.....	57
5.5.1	Microestructura: porosidad y conectividad	57
5.5.2	Hinchamiento y degradación de los nanocompuestos	60
5.5.3	Liberación de puntos cuánticos de carbono desde los hidrogeles	62
5.6	Prevalidación de la inhibición de la actividad de BACE1	65
5.7	Modelo <i>in vitro</i> de BHE y enfermedad de Alzheimer.....	66
5.7.1	Inducción con escopolamina del modelo <i>in vitro</i> de enfermedad de Alzheimer	66
5.7.2	Citocompatibilidad de CD conjugados	68
5.7.3	Permeabilidad en el modelo <i>in vitro</i> de BHE.....	70
5.7.4	Detección de BACE1 en el modelo <i>in vitro</i> de enfermedad de Alzheimer	72
5.8	Inhibición de la actividad de BACE1 en el modelo <i>in vitro</i> de enfermedad de Alzheimer.....	74
Capítulo 6. Discusión.....		76
Capítulo 7. Conclusiones, contribuciones y perspectivas a futuro		82
7.1	Conclusiones y contribuciones.....	82
7.2	Perspectivas a futuro.....	83
Literatura citada		84
Anexos		91

Lista de figuras

Figura	Página
1. Relación de la magnitud de los biomarcadores con las etapas clínicas de la enfermedad de Alzheimer	1
2. Estructura de la población de México: 2000, 2010 y 2020.	2
3. Cascada amiloide en la enfermedad de Alzheimer	3
4. BACE 1 a) Componentes estructurales y b) estructura en 3D del dominio catalítico de BACE1.6	
5. Mecanismo catalítico de BACE1 mediante dos aspartatos: D32 y D228	7
6. Acción de alfa, gamma y beta-secretasa (BACE1) en la proteína precursora de amiloide (APP), para la generación de péptidos de beta-amiloide (A β) en forma de monómeros oligómeros o fibrillas.	9
7. Imágenes de CD por microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HR-TEM)...	12
8. Efecto inhibitorio de diferentes concentraciones de CD en la actividad de BACE1 mediante ensayo de FRET.....	15
9. Mecanismo de reacción de esterificación con EDC y NHS, para la conjugación de puntos cuánticos de carbono con transferrina (T) y doxorubicina (DOX)	15
10. Imágenes de fluorescencia de la distribución de CD-T en a) cerebro sección frontal, b) dorsal, c) ventral y d) lateral de pez cebra.	16
11. Caracterización de puntos cuánticos de carbono con microscopio electrónico de transmisión de alta resolución (HRTEM).....	17
12. Perfil de liberación de cefadroxilo de los hidrogeles GNC0, GNC1, GNC2 y GNC3 en solución amortiguadora con A) pH 1.8 y B) pH 7.4.....	18
13. Unidad neurovascular y componentes de la BHE	19
14. Uniones del epitelio vascular cerebral mediante moléculas de adhesión para mantener el revestimiento estructural endotelial hermético	20
15. Mecanismos de transporte en la BHE para la entrega de medicamentos a cerebro	21
16. Estructura de la transferrina	22
17. Representación esquemática de los modelos de BHE con Transwell	23
18. Metodología propuesta para el proyecto de Maestría en Ciencias en Nanociencias.....	26
19. Esquema de los CD conjugados con transferrina (CD-T), con un péptido inhibidor de BACE1 (CD-i β) y con doble conjugación (CD-Ti β)	29
20. Metacrilación de gelatina con anhídrido metacrílico para formar gelatina metacrilada (GelMA) y ácido metacrílico como productos	33

21. Esquema de los nanocompuestos de hidrogeles de GelMA (G) con CD: G-CD, G-CD-T, G-CD-i β y G-CD-Ti β	34
22. Modelo <i>in vitro</i> de BHE en un Transwell cocultivo con HBEC 5i en los insertos y U-87 MG en los pozos	41
23. Ensayo de permeabilidad del modelo <i>in vitro</i> de la BHE con amarillo Lucifer (AL, 1 mM)	43
24. Apariencia de los materiales en polvo: A) ácido cítrico (precursor) en color blanco, B) CD pH 4 en color naranja oscuro y C) CD pH 7 en color café oscuro	46
25. Morfología por TEM de A) CD pH 4 y B) CD pH 7	47
26. Morfología por TEM de A) CD-T, B) CD-i β , C) CD-Ti β	48
27. Potencial ζ de CD (azul), CD-T (verde), CD-i β (rojo) y CD-Ti β (amarillo) en PBS 1x a pH 7.4....	50
28. Efecto del pH y el medio en el potencial ζ de CD pH 4 (morado), CD pH 7 (azul) y CD-T (verde)	50
29. Espectro de excitación de CD a pH 4 y pH7.....	51
30. Espectro de emisión de CD a pH 4 y pH7	52
31. Evidencia de la fluorescencia de los CD a pH 4 y pH 7, al estar A) sin lámpara UV y B) con lámpara UV.....	52
32. Fluorescencia de CD (azul), CD-T (verde), CD-i β (rojo) y CD-Ti β (amarillo) a una λ_{ex} de 380nm y λ_{em} de 470 nm.....	53
33. Espectro de transmitancia con FTIR de ácido cítrico (morado), transferrina (T, café), CD (azul), CD-T (verde), CD-i β (rojo) y CD-Ti β (amarillo)	54
34. Detección de CD y proteínas en los CD conjugados mediante SDS-PAGE	55
35. Cuantificación proteica con micro-BCA en los conjugados de CD-T (verde), CD-i β (rojo) y CD-Ti β (amarillo)	56
36. Nanocompuestos expuestos a luz UV	57
37. Representación en 3D de la microestructura de los nanocompuestos de hidrogeles y CD conjugados	58
38. Microestructura de los nanocompuestos. A) Distribución del tamaño de poro B) Tamaño promedio del poro y C) grosor de la estructura.....	59
39. Degradación de los hidrogeles de GelMA (G, morado), G-CD (azul), G-CD-T (verde), G-CD-i β (rojo) y G-CD-Ti β (amarillo)	61
40. Liberación acumulada en PBS 1x de CD desde los nanocompuestos de G-CD (azul), G-CD-T (verde), G-CD-i β (rojo) y G-CD-Ti β (amarillo)	63
41. Liberación acumulada en DMEM de CD desde los nanocompuestos de G-CD (azul), G-CD-T (verde), G-CD-i β (rojo) y G-CD-Ti β (amarillo)	64
42. Inhibición de la actividad de BACE1 con un péptido inhibidor de BACE1 (i β) a 30 y 60 nM....	66

43. Detección de BACE1 en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al inducir con escopolamina el modelo <i>in vitro</i> de enfermedad de Alzheimer en células U-87 MG, tratadas con A) 10 µg/mL y B) 20 µg/mL de CD conjugados	67
44. Intensidad relativa de las bandas detectadas en los geles de poliacrilamida de la Figura 43 .	67
45. Viabilidad celular de HBEC 5i (endotelio vascular cerebral humano) al estar en contacto con CD (azul), CD-T (verde), CD-iβ (rojo) y CD-Tiβ (amarillo) a 10 y 20 µg/mL	68
46. Viabilidad celular de U-87 MG (glioblastoma) al estar en contacto con CD (azul), CD-T (verde), CD-iβ (rojo) y CD-Tiβ (amarillo) a 10 y 20 µg/mL	69
47. Viabilidad celular de U-87 MG (glioblastoma) después de la inducción con escopolamina (U-87+Sco) y al estar en contacto con CD (azul), CD-T (verde), CD-iβ (rojo) y CD-Tiβ (amarillo) a 10 y 20 µg/mL.....	70
48. Permeabilidad aparente de la BHE al amarillo Lucifer (AL) en el inserto del Transwell sin células y con células HBEC 5i.....	71
49. Permeabilidad aparente de la BHE a los CD (azul), CD-T (verde), CD-iβ (rojo) y CD-Tiβ (amarillo) a 10 y 20 µg/mL.....	72
50. Detección de BACE1 en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al inducir con escopolamina el modelo <i>in vitro</i> de enfermedad de Alzheimer en el Transwell cocultivo	73
51. Intensidad relativa de las bandas detectadas a 60 kDa en los geles de poliacrilamida de la Figura 50-B	74
52. Ensayo FRET de inhibición de la actividad de BACE1, en un modelo <i>in vitro</i> de enfermedad de Alzheimer inducido con escopolamina en células U-87 MG (U-87+Sco), al exponerse a 10 µg/mL y 20 µg/mL de CD (azul), CD-T (verde), CD-iβ (rojo) y CD-Tiβ (amarillo).....	75
53. Curva estándar de BSA para determinar las concentraciones de proteína en el ensayo de micro-BCA	91
54. Curva estándar del kit de detección de la actividad de BACE1, para convertir la señal de fluorescencia del ensayo FRET a concentración en pmol	91
55. Morfología de A) células endoteliales de la microvasculatura cerebral (HBEC-5i) y B) células de glioblastoma (U-87 MG).....	92
56. Imágenes de topografía con AFM en modo intermitente de A) PBS 1x, B) Sustrato, C) CD pH 4, D) CD pH 7, E) CD-T, F) CD-iβ, G) CD-Tiβ. Barrido de 1x1 µm.....	92
57. Distribución de tamaño por número de A) CD, B) CD-T, C) CD-Tiβ.....	93

Lista de tablas

Tabla	Página
1. Ventajas y limitaciones de los modelos Transwell (Stone et al., 2019).	24
2. Coeficientes de extinción molar de resazurina reducida y oxidada a longitudes de onda de 570 y 600 nm.....	40
3. Tamaño promedio de puntos cuánticos de carbono y conjugados: TEM, AFM y D_h	49
4. Parámetros morfométricos de los nanocompuestos de G, G-CD, G-CD-T, G-CD-i β y G-CD-Ti β , obtenidos por microtomografía computarizada.....	60
5. Parámetros de cinética de liberación en PBS 1x de los nanocompuestos de G-CD, G-CD-T, G-CD-i β y G-CD-Ti β	63
6. Parámetros de cinética de liberación en medio DMEM de los nanocompuestos de G-CD, G-CD-T, G-CD-i β y G-CD-Ti β	65

Capítulo 1. Introducción

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un proceso neurodegenerativo, crónico, progresivo e irreversible. Esta enfermedad es la principal causa de demencia degenerativa en adultos mayores de 65 años a nivel mundial (American Psychiatric Association, 2018; Faustino et al., 2017). La EA puede dividirse en 3 etapas: preclínica, deterioro cognitivo leve (MCI, por sus siglas en inglés) y demencia; las cuales pueden relacionarse con biomarcadores, daño neuronal e inicio de síntomas (Figura 1). La etapa preclínica es lenta y puede iniciar años o incluso décadas antes de presentar síntomas. En esta etapa se identifican 3 fases: la primera sin presencia de biomarcadores detectables por las técnicas actuales, en la segunda se empiezan a detectar biomarcadores y en la tercera continúan aumentando los biomarcadores y pueden detectarse síntomas leves (Hane et al., 2017).

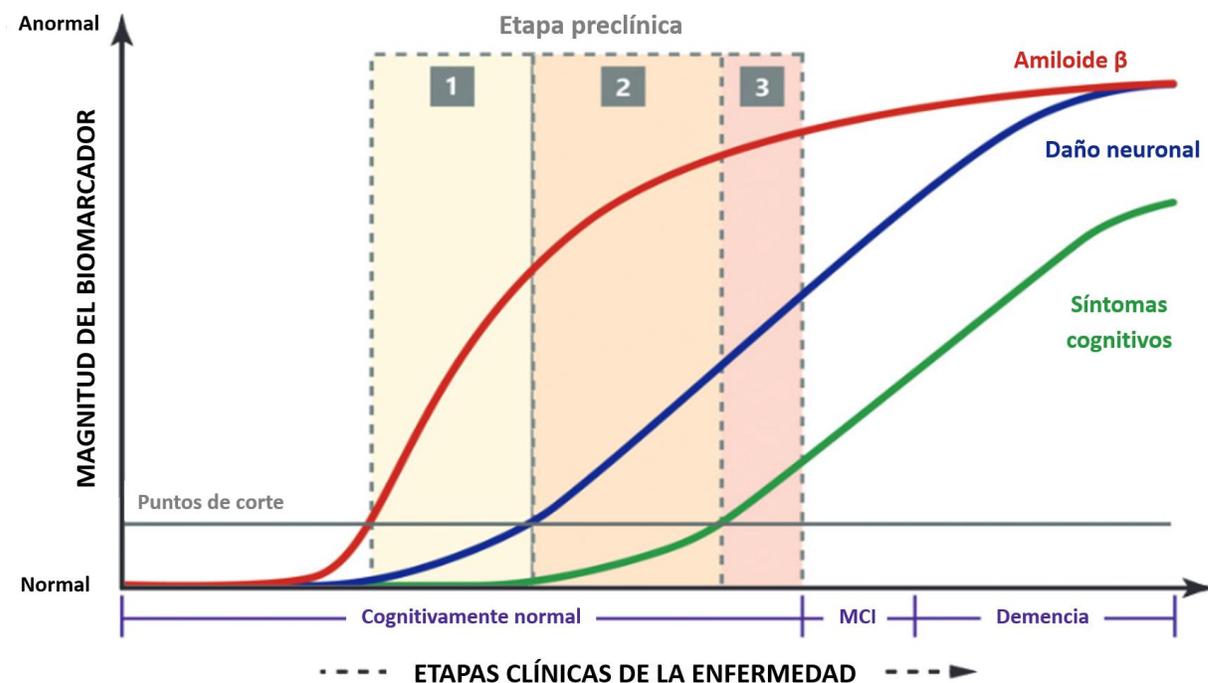


Figura 1. Relación de la magnitud de los biomarcadores con las etapas clínicas de la enfermedad de Alzheimer: preclínica, deterioro cognitivo leve (MCI) y demencia. (Tomada y modificada de Hane et al., 2017).

La etapa de deterioro cognitivo leve se caracteriza por una disminución de la función cognitiva, pero que aún permite al paciente ser autónomo y funcional. Puede presentar pérdida progresiva de la memoria a

corto plazo, dificultad en la ejecución motora (apraxia), en la comprensión y comunicación (afasia) o incapacidad para procesar información sensorial (agnosia). Por último, en la etapa de demencia progresan los síntomas hasta interferir con la función social y las actividades de la vida diaria, presentando delirio, discapacidad física, dependencia y muerte prematura (Arvanitakis et al., 2019; Hane et al., 2017; Scheltens et al., 2016).

Se han identificado 12 factores de riesgo modificables para la demencia, que al eliminarse pueden prevenir o retrasar su desarrollo en alrededor del 40% de los casos. Estos factores de riesgo modificables son un bajo nivel educativo, inactividad física, tabaquismo, consumo excesivo de alcohol, contaminación ambiental, contacto social infrecuente, obesidad, hipertensión, diabetes, depresión, trauma cerebral y alteración de la audición (Livingston et al., 2020). Por otro lado, existen factores de riesgo no modificables como la afectación de familiares de primer grado, los factores genéticos y la edad, con la cual se presenta un aumento en la incidencia a edades avanzadas (Prince et al., 2016). Es importante modificar el estilo de vida en etapas tempranas para prevenir el desarrollo de comorbilidades en la edad adulta y evitar el daño irreversible que causan, ya que el riesgo de demencia por sí solo aumenta con la edad.

El crecimiento poblacional en México ha cambiado de un patrón piramidal en el año 2000 (Figura 2), con mayor frecuencia de niños en la base y menor de adultos mayores en la punta, a un ensanchamiento en la parte intermedia para 2020, correspondiente a los adolescentes y adultos jóvenes (INEGI, 2020). Se estima que la pirámide poblacional se invertirá en los siguientes años debido a una disminución en la natalidad y un aumento en la esperanza de vida. Con ello se incrementa el riesgo de presentar EA y otras comorbilidades en los adultos mayores, así como discapacidad, una mala calidad de vida del paciente o sus cuidadores, y dependencia tanto social como económica (Livingston et al., 2020).

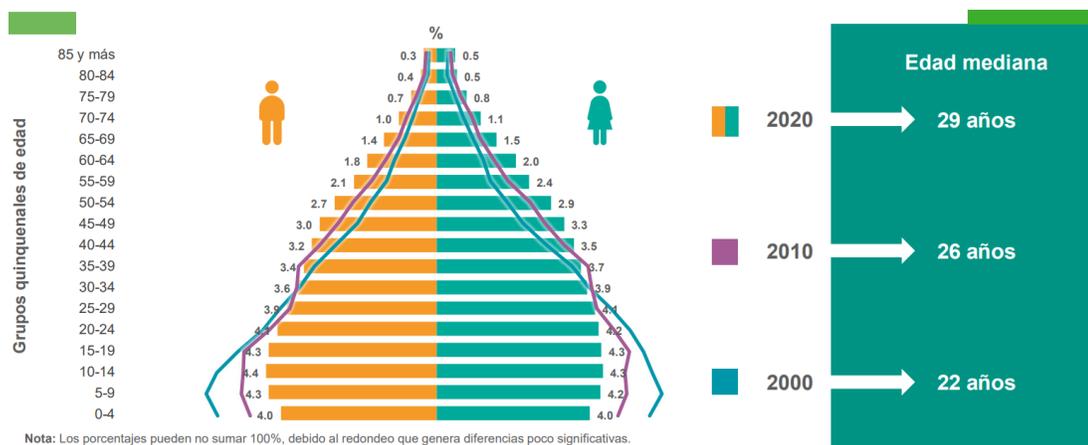


Figura 2. Estructura de la población de México: 2000, 2010 y 2020 (Tomada de INEGI, 2020).

En 2015 se estimó el impacto global de la demencia, con un aproximado de 46.8 millones de personas con demencia en 2015, un caso cada 3 s. La tendencia es que este número se duplique cada 20 años. De tal manera, se proyecta que para 2030 habrán 74.7 millones y para 2050 se alcanzarán los 131.5 millones, principalmente en países de medianos y escasos recursos. Además, en 2015 se estimó el costo total a nivel mundial del cuidado de la demencia, en 818 mil millones de dólares estadounidenses (USD), con un estimado de 2 billones USD para 2030. Esta suma de dinero excedió el valor del mercado en 2015 de compañías tales como Apple, cuyo presupuesto era de 742 mil millones USD (ADI, 2020). Por ello, es importante la intervención temprana en el desarrollo de la EA para disminuir la incidencia y los costos derivados de ella.

El desarrollo de la EA se relaciona con la presencia de biomarcadores patológicos como la acumulación extracelular de placas de amiloide y la acumulación intracelular de marañas neurofibrilares (NFTs, por sus siglas en inglés). Las placas de amiloide se forman por la agregación de péptidos de beta amiloide ($A\beta$) mal plegados, los cuales se originan por la acción de las enzimas γ -secretasa y β -secretasa (BACE1) en la proteína precursora de amiloide (APP). La generación de péptidos $A\beta$ es parte de los procesos iniciales en la cascada amiloide de la EA (Figura 3), la cual desencadena efectos como la agregación de péptidos de $A\beta$, neuroinflamación, estrés oxidativo, hiperfosforilación de la proteína Tau (formando NFTs), disminución de acetilcolina, excitotoxicidad por glutamato y muerte neuronal (Binda et al., 2020; dos Santos Picanco et al., 2018).

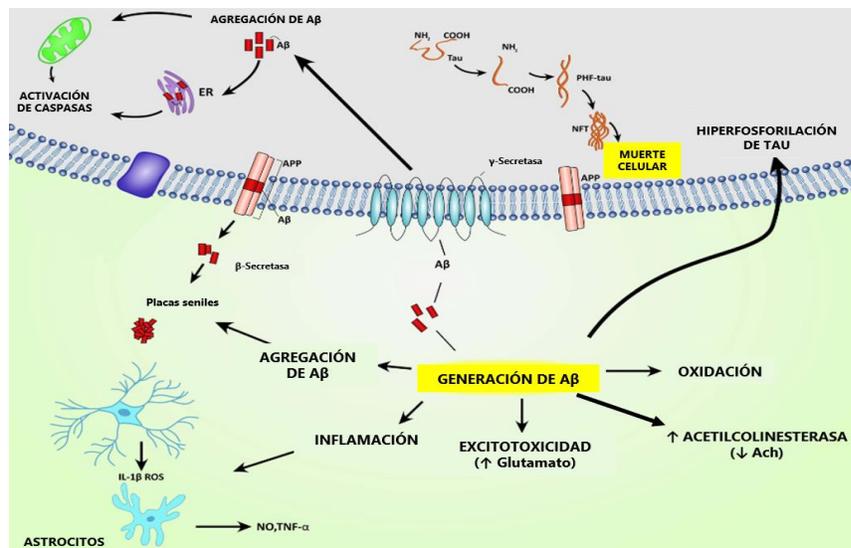


Figura 3. Cascada amiloide en la enfermedad de Alzheimer. La enzima β -secretasa escinde a la proteína precursora de amiloide (APP), generando péptidos de β -amiloide ($A\beta$). Los péptidos de $A\beta$ se agregan para formar placas seniles, o inducir inflamación, excitotoxicidad, aumento de acetilcolinesterasa, oxidación e hiperfosforilación de la proteína Tau, lo cual provocará muerte celular. (Tomada y modificada de dos Santos Picanco et al., 2018).

Para el tratamiento de la EA existen planes integrales con enfoques no farmacológicos para mantener la funcionalidad física y mental con apoyo de los cuidadores, y farmacológicos para reducir el daño causado en la fisiopatología y retrasar la sintomatología. Sin embargo, ninguno de ellos es curativo ni estabiliza permanentemente la progresión y proporcionan solo un beneficio moderado (Arvanitakis et al., 2019). El tratamiento farmacológico actual aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) consta de 6 medicamentos: 4 son inhibidores de la acetilcolinesterasa (tacrina, donepezilo, rivastigmina y galantamina), un antagonista no competitivo del receptor NMDA (N-metil-D-aspartato) de glutamato (memantina) y un inhibidor de la agregación de péptidos de A β (aducanumab). Estos tratamientos se centran en etapas sintomáticas (MCI y demencia) de la EA, cuando el daño neuronal ya está establecido y es irreversible, y tienen un mal pronóstico en la progresión de la enfermedad (Binda et al., 2020; Yiannopoulou and Papageorgiou, 2020; Scheltens et al., 2016).

Para superar este reto se han desarrollado tratamientos con inhibidores de BACE1 (iBACE1). Algunos de ellos han alcanzado la fase III de ensayos clínicos, pero se han abandonado debido a su poca eficacia en la entrega de medicamentos y la presencia de toxicidad hepática en humanos (Panza et al., 2019). Además, otra limitante en la entrega de medicamentos al cerebro es su paso a través de la barrera hematoencefálica (BHE), la cual regula el paso de sustancias que entran y salen del cerebro para mantener su homeostasis (Lee y Leong, 2020). Sin embargo, un vehículo o transportador con dimensiones en la escala nanométrica podría ayudar a resolver ese reto.

Los nanotransportadores son nanomateriales con al menos una de sus dimensiones en la escala entre 1-100 nm, capaces de modificar, controlar o dirigir la entrega de medicamentos u otras sustancias (Javadzadeh and Azharshekoufeh Bahari, 2017).

Los puntos cuánticos de carbono (carbon quantum dots, carbon dots, CDots, CD) se descubrieron accidentalmente por Xu et al. (2004) durante la purificación de nanotubos de carbono de pared sencilla (SWCNTs, por sus siglas en inglés) y se refirieron a ellos como “una mezcla de nanopartículas fluorescentes derivadas de los SWCNTs”. Posteriormente, los puntos cuánticos de carbono recibieron su nombre debido a sus similitudes con los puntos cuánticos, al exhibir una fluorescencia de emisión, pero con una estructura de carbono como un elemento no tóxico, los cuales actuaban como puntos cuánticos no metálicos, lo cual atrajo el interés científico para estudiar sus posibles aplicaciones (Jelinek, 2017). Los puntos cuánticos de carbono se han propuesto como nanotransportadores de medicamentos contra enfermedades neurodegenerativas debido a su tamaño (<10 nm), su capacidad de conjugarse con transferrina para cruzar fácilmente la BHE, de inhibir la actividad de BACE1 y de disminuir la toxicidad desencadenada por las placas

de A β , lo cual los hace una opción prometedora en el tratamiento de la EA (Ashrafizadeh et al., 2020; Han et al., 2017; Li, Amat, et al., 2016).

Una estrategia para entregar estos puntos cuánticos de carbono puede ser mediante un hidrogel (redes tridimensionales formadas por polímeros que puede absorber miles de veces su peso seco) que funcione como un parche que se coloque en la piel y libere los puntos cuánticos de carbono (Agrawal et al., 2021).

En el presente proyecto se propone el diseño de un sistema polimérico de entrega de agentes terapéuticos, compuesto por un hidrogel cargado con puntos cuánticos de carbono conjugados con transferrina para cruzar la BHE y un péptido iBACE1 para inhibir la actividad de la BACE1, con lo cual se incidirá en una etapa inicial de la cascada amiloide de la enfermedad de Alzheimer.

Capítulo 2. Antecedentes

2.1 Beta secretasa (BACE1)

2.1.1 Estructura y función fisiológica de BACE1

La enzima β -secretasa, también conocida como memapsina 2 o BACE1 (β -site APP-Cleaving Enzyme), es una proteasa aspártica transmembranal que está constituida por 501 aminoácidos. La composición de BACE1 consiste en tres grandes dominios: el catalítico extracelular, el transmembranal y el citoplasmático (Figura 4a). La parte extracelular se subdivide en un péptido de señal de escisión en el extremo N-terminal (residuos 1-21), seguido de un pro-dominio corto (residuos 22-45) y un gran dominio catalítico (residuos 46-451) que tiene enlaces disulfuro en C216-C420, C278-C443 y C330-C380. Luego, continúa con un dominio transmembranal único (residuos 452-483) y termina en un dominio citoplasmático corto (residuos 484-501) en su extremo C-terminal (Hu et al., 2019).

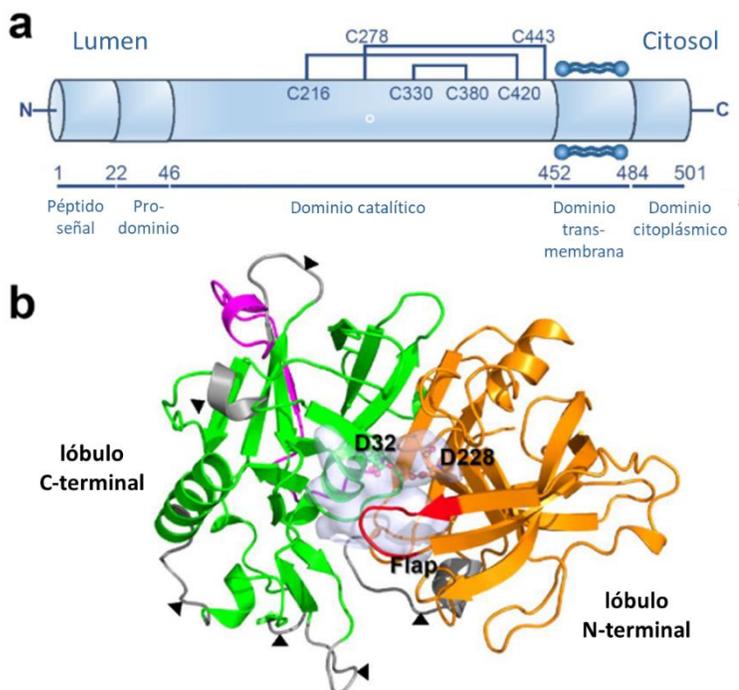


Figura 4. BACE 1 a) Componentes estructurales y b) estructura en 3D del dominio catalítico de BACE1 (Tomada de Hu et al., 2019).

La maduración de BACE1 requiere de la eliminación del pro-dominio, pero se ha visto que la interrupción en la maduración no interfiere en su actividad enzimática. En una representación en 3D del dominio catalítico (Figura 4b) se pueden observar 2 lóbulos (naranja y verde) con seis inserciones (gris, marcados con un triángulo), una extensión C-terminal de 35 residuos (magenta) y el sitio de unión al sustrato (gris claro) que se localiza entre los dos lóbulos, está cubierto por una solapa (rojo) y contiene dos aspartatos conservados, D32 y D228, que son activos en pH ácido (Hu et al., 2019).

El mecanismo catalítico de BACE1 (Figura 5) es similar al de otras proteasas aspárticas, como pepsinas o catepsinas, en el cual al entrar en contacto con un sustrato peptídico, uno de sus aspartatos catalíticos ayuda a la molécula de agua en el ataque nucleofílico del carbono del carbonilo (Figura 5-A); mientras que, el otro aspartato activa el oxígeno del carbonilo para obtener un complejo intermediario tetraédrico de oxianión (Figura 5-B), estabilizado por puentes de hidrógeno; seguido de la reformación del carbonilo y la escisión del enlace amida (Figura 5-C), del cual se generan dos productos (Hu et al., 2019), por lo que esta enzima puede tener otros sustratos.

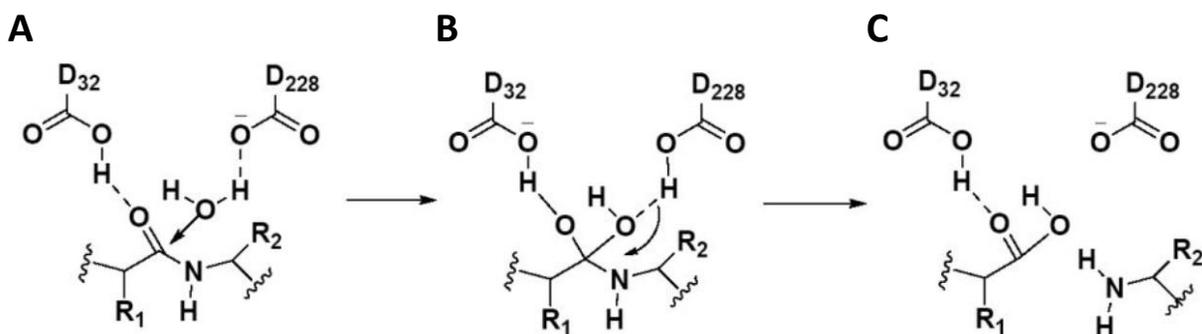


Figura 5. Mecanismo catalítico de BACE1 mediante dos aspartatos: D32 y D228. A) ataque nucleofílico. B) formación del complejo intermediario tetraédrico de oxianión. C) escisión del enlace amida. (Tomada de Hu et al., 2019).

BACE1 se expresa en la membrana celular de neuronas, astrocitos, células de la glía, macrófagos relacionados con glioblastoma y en células de glioblastoma U-87 MG (Badhwar y Haqqani, 2020; Kim et al., 2013; Martinsson et al., 2019; Zhai et al., 2021). BACE1 se descubrió al estudiar los mecanismos de la acumulación de amiloide beta ($A\beta$) en la EA, lo que pronto llevó al hallazgo de su homóloga, BACE2, la cual tiene un 52% de similitud en su secuencia (Hu et al., 2019) y se encuentra altamente expresada en células pancreáticas, con una posible asociación páncreas-cerebro al liberar proteína precursora de amiloide (APP) de forma autocrina o paracrina (Kulas et al., 2017). Además, se ha visto que la EA tiene una relación estrecha con el síndrome metabólico (obesidad, diabetes, hipertensión arterial, dislipidemia), debido a la

hiperinsulinemia presente en estas enfermedades, la cual desencadena la activación atípica de la proteína cinasa C (aPKC) inducida por dieta en cerebro e hígado. La aPKC actúa mediante el factor nuclear kappa-B (NFκ-B) para incrementar los niveles de BACE1 en cerebro e hígado, la cual incrementa el riesgo de desarrollar EA y además, disminuye los niveles de receptores de insulina, lo que ayuda a perpetuar el ciclo de resistencia a la insulina y su hiperinsulinemia compensatoria (Farese et al., 2020).

Por otro lado, se ha observado que en ratones se requiere BACE1 para formar y mantener los husos musculares, los cuales se relacionan con la coordinación motora. También, BACE1 procesa la proteína transmembranal neuregulina 1 (NRG1) que regula la mielinización, actúa en el homólogo cercano a L1 (CHL1) para la formación del bulbo olfatorio y regula la exocitosis de vesículas sinápticas (Martinsson et al., 2019; Weber et al., 2017).

2.1.2 Papel de BACE1 en la cascada amiloide

Para explicar la fisiopatología de la EA se tienen varias hipótesis, de las cuales la cascada amiloide es la más aceptada. En la cascada amiloide, la proteína precursora de amiloide (APP) es escindida por las enzimas transmembranales α -, β - y γ -secretasas, donde se pueden distinguir 2 vías: la amiloidogénica desencadenada por la acción de BACE1 y γ -secretasa, y la no amiloidogénica producida por α -secretasa (ADAM10: a disintegrin and metalloproteinase 10) y γ -secretasa (Figura 6). En la vía amiloidogénica primero se escinde la APP por la β -secretasa (BACE1) en un fragmento soluble de la APP (sAPP β) y el fragmento C-terminal C99 (CTF); luego el CTF se escinde por la γ -secretasa para generar el dominio intracelular de la APP (AICD) y liberar péptidos de amiloide beta (A β) de 39-43 aminoácidos en forma de monómeros u oligómeros, de los cuales A β ₄₀ y A β ₄₂ son los principales péptidos que participan en el desbalance de la EA (Heneka et al., 2015; Shui et al., 2018).

Los monómeros de A β liberados se empiezan a agregar y a depositar para formar fibrillas y placas amiloides, debido a un mal plegamiento, en las cuales el A β ₄₂ se ha reportado como el principal componente depositado en el parénquima cerebral en la EA. La generación de A β desencadena efectos citotóxicos relacionados con el proceso de neurodegeneración, tales como: estrés oxidativo por una alteración del balance redox mitocondrial, neuroinflamación por activación de astrocitos y microglia, excitotoxicidad por aumento de glutamato, disminución de acetilcolina por la activación de la enzima acetilcolinesterasa, acumulación intracelular de marañas neurofibrilares (NFT, por sus siglas en inglés) debido a la hiperfosforilación de la proteína Tau, y finalmente la activación de caspasas que promueven la

apoptosis o muerte celular programada de las neuronas (Binda et al., 2020; dos Santos Picanco et al., 2018).

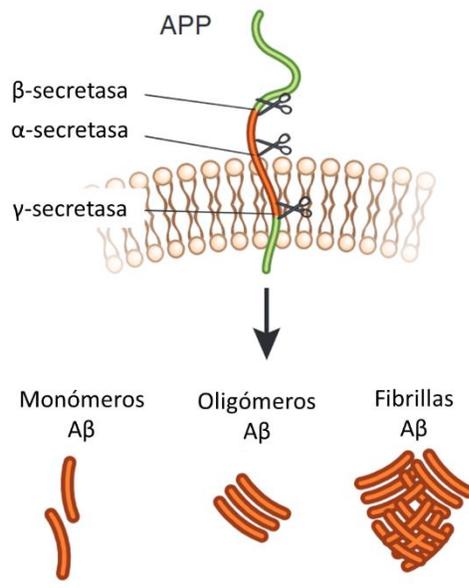


Figura 6. Acción de alfa, gamma y beta-secretasa (BACE1) en la proteína precursora de amiloide (APP), para la generación de péptidos de beta-amiloide (Aβ) en forma de monómeros oligómeros o fibrillas (Tomada y modificada de Heneka et al., 2015).

En otros estudios se ha demostrado que ADAM10 y BACE1, pero no γ -secretasas, se localizan en las vesículas sinápticas, lo cual sugiere que el primer paso del procesamiento de la APP ocurre en ellas y el paso final en otro lugar (Lundgren et al., 2015). De igual manera, se ha observado que la APP se transporta hacia las dendritas y axones para traducirse en sinapsis, ya que funciona como una molécula de adhesión transináptica, donde el Aβ es preferencialmente generado, secretado y degradado debido al aumento de la actividad sináptica, lo que provoca su acumulación y agregación en sinaptosomas en etapas iniciales de la EA, lo cual se correlaciona con el desarrollo de demencia (Martinsson et al., 2019).

Se ha reportado que la escopolamina (Sco), al ser un antagonista de receptores muscarínicos, induce un modelo de déficit colinérgico y neurotoxicidad asociados a enfermedad de Alzheimer. Por ello, la escopolamina promueve el microambiente de la enfermedad de Alzheimer, caracterizado por un aumento en la actividad de BACE1 y en la producción de APP, ROS, NF- κ B, citocinas proinflamatorias y caspasas de apoptosis (Joseph et al., 2020; Suthprasertporn et al., 2020). Además, se ha reportado que las células U-87 MG expresan APP y BACE1 (Kim et al., 2013; Zhai et al., 2021).

2.1.3 Tratamiento de enfermedad de Alzheimer: Inhibidores de BACE1

El tratamiento farmacológico actual de la EA se limita a seis medicamentos aprobados por la FDA (Food and Drug Administration), de los cuales cuatro son inhibidores de acetilcolinesterasa (AChE) (rivastigmina, donepezilo, tacrina y galantamina), uno es antagonista no competitivo del receptor NMDA (N-metil-D-aspartato) de glutamato (memantina) y un anticuerpo inhibidor de la agregación de péptidos de A β (aducanumab). Algunas de sus limitaciones son la presencia de efectos adversos gastrointestinales y su acción enfocada en los síntomas, sin bloquear la progresión de la enfermedad (Binda et al., 2020; Yiannopoulou y Papageorgiou, 2020).

Otros estudios se han enfocado hacia otros blancos terapéuticos como la enzima BACE1, los péptidos de A β o los agregados de A β , para actuar en la fisiopatología inicial de la EA, aunque a pesar de tener resultados prometedores en estudios *in vivo*, al llegar a estudios clínicos en humanos no se comportan igual y presentan poca eficacia y toxicidad, por lo que es necesario desarrollar nuevas estrategias que resuelvan estas limitaciones, proponiendo terapias dirigidas y específicas que reduzcan los efectos secundarios (Panza et al., 2019; Tiwari et al., 2019).

Los inhibidores de BACE1 (i β) bloquean la escisión de la APP, lo cual previene la formación de péptidos de A β que son responsables de la formación de fibrillas y placas de amiloide. Esta intervención temprana hace a los i β una opción atractiva, aunque las enzimas BACE1 y BACE2 tienen otras funciones fisiológicas dentro y fuera del sistema nervioso, por lo que su inhibición inespecífica puede afectar negativamente. Algunos iBACE1 han alcanzado la fase III de ensayos clínicos, pero han sido abandonados por su poca eficacia y toxicidad en humanos. Algunos ejemplos de i β son: verubecestat, anabecestat, LY2811376, OM99-2 y ginsenósido Rg1 (dos Santos Picanco et al., 2018; Panza et al., 2019).

Así mismo, existen péptidos i β como el BSI 1 (beta-secretase inhibitor 1), que es un inhibidor peptidomimético basado en estatina (Stat), también llamado P₁₀-P₄' StatVal o KTEEISEVN-Stat-VAEF (Choi et al., 2012). El BSI1 tiene la secuencia de aminoácidos: Lys-Thr-Glu-Glu-Ile-Ser-Glu-Val-Asn-Stat-Val-Ala-Glu-Phe. Al tener la modificación con estatina y al sustituir la valina por ácido aspártico en P₁, este péptido i β inhibe la actividad de BACE1 en forma dosis-dependiente, con una concentración inhibitoria media (IC₅₀) de ~30 nM (Sinha et al., 1999).

En general, la falla farmacológica en la EA se debe a que los fármacos tienen propiedades fisicoquímicas inadecuadas, baja absorción por membranas biológicas, parámetros farmacocinéticos desfavorables,

inestabilidad (hidrólisis, oxidación) e inespecificidad que provoca toxicidad tisular (hepatotoxicidad, neurotoxicidad o nefrotoxicidad). También, se ha visto que muchos medicamentos pierden su eficacia al cruzar la barrera hematoencefálica (BHE), lo que ocasiona una mínima biodisponibilidad en el cerebro (Tiwari et al., 2019).

2.2 Puntos cuánticos de carbono (CD)

Los CD son nanomateriales (NMs) a base de carbono, esféricos, de dimensión cero (0D), con propiedades fisicoquímicas atractivas, como un tamaño <10 nm (Figura 7), su gran estabilidad en biofluidos a largo plazo, fotoluminiscencia dependiente del tamaño, son altamente biocompatibles al tener baja citotoxicidad, no son inmunógenos, muestran una fácil funcionalización con biomoléculas, y tienen alta capacidad para cargar y liberar medicamentos de manera controlada (Han et al., 2016; Tian et al., 2020). Debido a esto, se han propuesto aplicaciones biomédicas teranósticas, tanto de diagnóstico como de tratamiento, en áreas como bioimagen, fotocatalisis, biosensores y sistemas de entrega de medicamentos (Canevari et al., 2016; Farshbaf et al., 2018).

Se han usado CD como componentes de nanocompuestos, principalmente por sus propiedades fluorescentes para el desarrollo de biosensores. Los CD embebidos en matrices poliméricas o en nanopartículas mesoporosas se pueden liberar y posteriormente emitir fluorescencia (Jelinek, 2017). Se sabe que la mayoría de los sistemas de entrega de medicamentos han fallado por no tener una entrega dirigida apropiada y porque el tamaño de los nanomateriales aumenta después de conjugar el medicamento a las nanopartículas (Hettiarachchi et al., 2019). Por ello, se usan NMs pequeños como los CD para que el tamaño no sea un problema y se ha visto que la funcionalización es necesaria para mejorar su afinidad y especificidad al aplicarse en bioimagen o entrega de medicamentos (Peng et al., 2017).

Así mismo, los CD se han propuesto como agentes nanotransportadores de medicamentos contra enfermedades neurodegenerativas o tumores cerebrales, debido a que, por su tamaño y capacidad de funcionalizarse con transferrina, cruzan fácilmente la BHE, no producen nanotoxicidad y pueden liberar medicamentos en su sitio de acción (Ashrafizadeh et al., 2020).

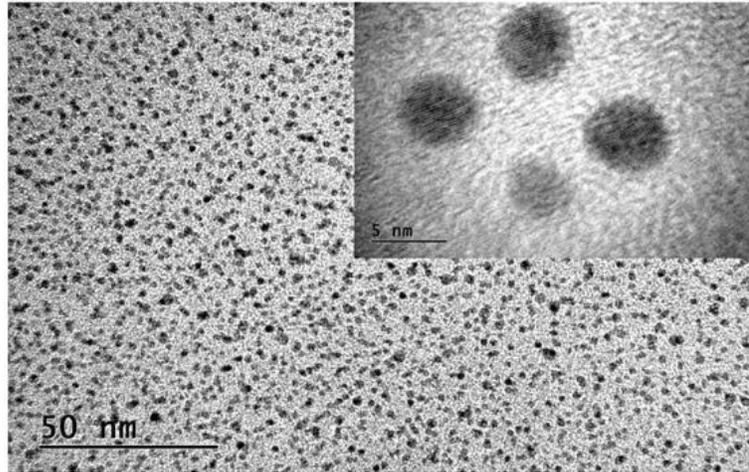


Figura 7. Imágenes de CD por microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HR-TEM), en las cuales se muestra su geometría esférica y un diámetro promedio entre 3-4 nm. Barra de referencias de 50 nm y 5 nm (Tomada de Canevari et al., 2016).

2.3 Hidrogeles y puntos cuánticos de carbono (CD) en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (EA)

En esta sección, primero se abordarán los hidrogeles transdérmicos aplicados en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (EA), luego se explicarán los efectos particulares que los puntos cuánticos de carbono tienen en la EA y finalmente, se verán los nanocompuestos de hidrogel y puntos cuánticos de carbono que se han propuesto en aplicaciones biomédicas.

2.3.1 Parche de Rivastigmina

El parche de rivastigmina es la única alternativa transdérmica aprobada por la FDA (Food and Drug Administration) para tratar la EA. Winblad et al. (2007) evaluaron la eficacia, seguridad y tolerabilidad del parche de rivastigmina en pacientes con demencia tipo Alzheimer de leve a moderada, en un estudio llamado Investigation of transDermal Exelon in Alzheimer's disease (IDEAL). En IDEAL compararon el parche de rivastigmina de 10 cm² (18 mg) y 20 cm² (36 mg), contra la rivastigmina oral (3 mg) y un placebo por 24 semanas. En la escala cognitiva Alzheimer's Disease Assessment Scale-Cognitive (ADAS-Cog) se observó que no hubo diferencias cognitivas a las 24 semanas con el parche de 10cm² o las cápsulas. En cambio, el parche de 20 cm² mejoró la puntuación cognitiva significativamente y el placebo provocó un empeoramiento cognitivo a las 24 semanas.

El estudio también concluye que, en general, el parche de rivastigmina tuvo una concentración máxima en circulación baja y una vida media alta, lo cual evitó los efectos secundarios gastrointestinales provocados en la vía oral. Además, la vía transdérmica era segura, tolerable, evitó el metabolismo hepático y se eliminó por vía renal. Asimismo, muestran una mejor adherencia al tratamiento, con una probabilidad alta de alcanzar la dosis deseada, ya que los cuidadores refirieron una administración más fácil en comparación con la oral. Aunque una desventaja es que son más caros que el medicamento oral (Winblad et al., 2007).

2.3.2 Hidrogeles transdérmicos para la entrega de medicamentos contra EA

Otra alternativa transdérmica para el tratamiento de la EA es el uso de inhibidores de acetilcolinesterasa, sin embargo, éstos actúan en etapas sintomáticas avanzadas y aún no están aprobados por la FDA. Además, no hay estudios de hidrogeles transdérmicos con inhibidores de BACE1 ($i\beta$).

Un gel de nanoemulsión transdérmico se diseñó para la entrega de tacrina (NEGT, NanoEmulsion Gel of Tacrine), ya que en su presentación oral muestra una dosificación frecuente, hepatotoxicidad y metabolismo amplio (Setya et al., 2019). En este trabajo se comparó la seguridad y biodisponibilidad del NEGТ transdérmico, cápsulas de tacrina y un hidrogel convencional, mediante un modelo de Alzheimer de ratas Wistar con amnesia inducida con escopolamina. El NEGТ mostró un mayor grado de absorción, 2.18 veces en comparación con las cápsulas y 5.26 veces en comparación con el hidrogel. Las pruebas bioquímicas mostraron una actividad antiamnésica superior con NEGТ, al aumentar enzimas antioxidantes y disminuir ambas la actividad de acetilcolinesterasa y la peroxidación de lípidos. Las ratas con amnesia inducida tratadas con NEGТ presentaron una mejora neuroconductual significativa y valores bajos de aminotransferasa, lo cual indicaba la ausencia de hepatotoxicidad. Además, el NEGТ transdérmico no causó irritación dérmica, por lo que mostró ser segura y eficaz para tratar la EA.

Por otro lado, hidrogeles poliméricos se diseñaron para la entrega transdérmica de donepezilo, otro inhibidor de acetilcolinesterasa (Bashyal et al., 2020). Los hidrogeles eran una mezcla de poli (vinil alcohol) (PVA), poli (vinil pirrolidona) (PVP) y propilenglicol (PG), cargados con donepezilo. Los hidrogeles tuvieron un mayor hinchamiento y biodegradación al aumentar la concentración de PG. En ensayos *in vivo*, al aplicar los hidrogeles en la piel de ratas Sprague-Dawley, se observó que la concentración máxima en plasma se alcanzaba a las 8 h y dependía de la dosis. El hidrogel tuvo el potencial para mejorar la entrega de donepezilo por vía transdérmica y para disminuir los efectos secundarios, asociados a su presentación oral.

2.3.3 Efectos de los puntos cuánticos de carbono en la EA

Los puntos cuánticos de carbono (CD) tienen la propiedad de intervenir en la vía amiloidogénica mediante varios mecanismos: previenen o retrasan la conversión de intermediarios monoméricos y oligoméricos en fibrillas maduras, disuelven oligómeros en monómeros y desagregan las fibrillas maduras. Debido a estas propiedades y a su baja citotoxicidad se sugiere su aplicación, tanto profiláctico (prevención) como terapéutico, en enfermedades neurodegenerativas con proteínas mal plegadas, como Alzheimer (Guerrero et al., 2021; Han et al., 2017).

Han et al. (2017) reportaron por primera vez el efecto inhibitorio que tienen los puntos cuánticos de carbono en la fibrilación de péptidos $A\beta_{42}$ y $A\beta_{40}$, mediante el ensayo de unión a Tioflavina T (ThT). La ThT exhibe fluorescencia al unirse específicamente a la estructura β de los péptidos $A\beta$. En ausencia de puntos cuánticos de carbono se observó agregación rápida de $A\beta_{42}$. En presencia de al menos 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de puntos cuánticos de carbono se vio una supresión de la agregación y una mayor disminución al aumentar la concentración. Este efecto también fue estudiado por microscopía de fuerza atómica (AFM), donde se observó que en ausencia de puntos cuánticos de carbono hay presencia de fibrillas de $A\beta_{42}$ largas después de 4.5 h de incubación. Al ser incubadas con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de puntos cuánticos de carbono por 4.5 h, se observaron menos fibrillas y con menor cantidad de protofibrillas.

La capacidad de los puntos cuánticos de carbono para inhibir la actividad de BACE1 sólo ha sido reportada por Han et al. (2017). Dicha capacidad se midió mediante un ensayo de transferencia de energía de resonancia de la fluorescencia o de Förster (FRET) con un equipo comercial, en el cual el sustrato de BACE1 se unió a un colorante fluorescente. En el ensayo se mezclaron la enzima y el sustrato de BACE1 con concentraciones crecientes de CD (0, 0.05, 0.1, 1, 5, 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Figura 8). Los resultados indicaron que con 5, 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de puntos cuánticos de carbono se inhibía eficientemente la actividad de BACE1.

Previamente, Li, Amat et al. (2016), del mismo grupo de estudio que Han et al. (2017), mejoraron la eficacia y selectividad de los CD para cruzar la BHE al conjugarlos con transferrina (CD-T) (Figura 9), provocando una endocitosis mediada por el receptor de transferrina, expresado en el endotelio de la BHE.

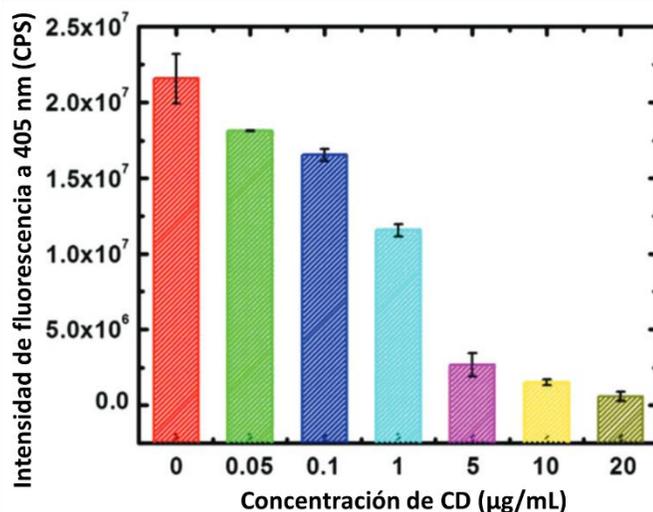


Figura 8. Efecto inhibitorio de diferentes concentraciones de CD en la actividad de BACE1 mediante ensayo de FRET. El control negativo (barra roja) representa al sustrato de BACE1 con la enzima BACE1 al incubarse por 3h. Los CD a 5, 10 y 20 µg/mL tienen un mayor efecto inhibitorio de BACE1. Intensidad de fluorescencia medida a 405 nm. (Tomada y modificada de Han et al., 2017).

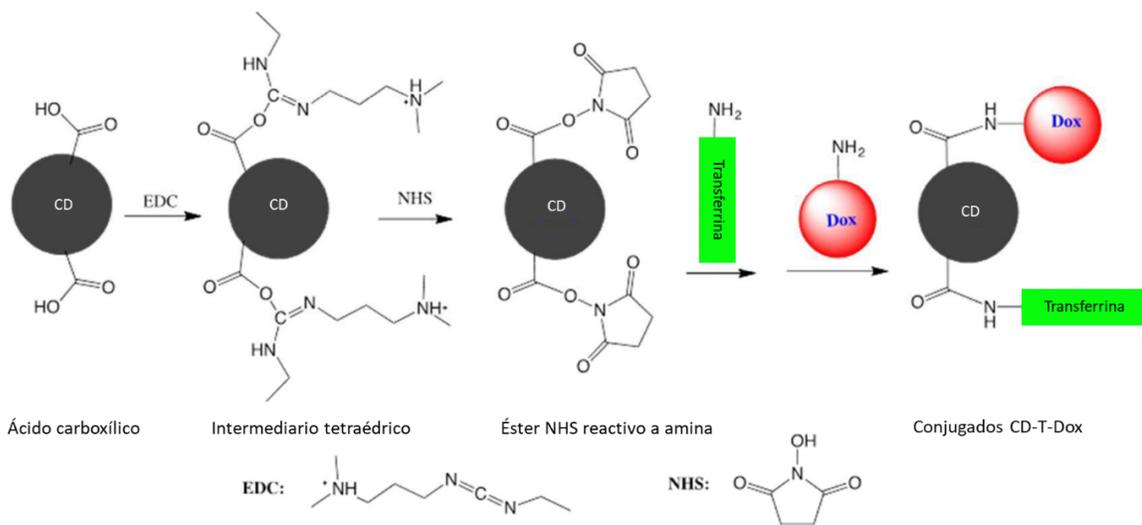


Figura 9. Mecanismo de reacción de esterificación con EDC y NHS, para la conjugación de puntos cuánticos de carbono con transferrina (T) y doxorubicina (DOX). (Tomada y modificada de Li, Amat, et al., 2016).

Basándose en estos resultados, Han et al. (2017) demostraron que los CD-T atraviesan la BHE y logran dirigirse selectivamente al cerebro en la sección frontal del pez cebra y no a otras secciones (Figura 10). Finalmente, se observó que los puntos cuánticos de carbono (CD) a concentraciones crecientes y los conjugados de CD-T no eran citotóxicos y permitían un desarrollo normal de los embriones de erizo.

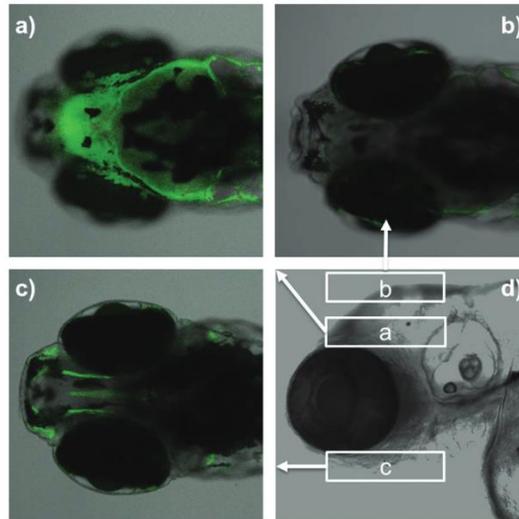


Figura 10. Imágenes de fluorescencia de la distribución de CD-T en a) cerebro sección frontal, b) dorsal, c) ventral y d) lateral de pez cebra (Tomada de Han et al., 2017).

Por otro lado, los puntos cuánticos de carbono tienen actividad antioxidante, ya que disminuyeron especies de nitrógeno (RNS) y de oxígeno (ROS) altamente reactivas (Zhang et al., 2020). En contraste, otro grupo de estudio (Christensen et al., 2011) refieren que los puntos cuánticos de carbono tienen actividad prooxidante, debido a su actividad fotocatalítica durante su estado de fotoexcitación, ya que generan oxígeno atómico o liberan electrones que inducen la formación de radicales libres, ROS y RNS.

2.3.4 Nanocompuestos de hidrogel y puntos cuánticos de carbono

Hasta ahora no hay estudios con nanocompuestos de hidrogel y puntos cuánticos de carbono enfocados al tratamiento de la EA. Aunque, un nanocompuesto de películas poliméricas de hidrogel de carboximetil celulosa (CMC) y puntos cuánticos de grafeno (GQD) se propuso para mejorar la efectividad de doxorubicina (DOX) en la quimioterapia (Javanbakht y Namazi, 2018). El nanocompuesto CMC-GQD-DOX se estudió en diferentes concentraciones: CMC, CMC-GQD y CMC-GQD-DOX con 10%, 20% y 30% de GQD. Los hidrogeles tuvieron una mayor degradación y un menor hinchamiento al agregar los GQDs. Al aumentar el porcentaje de GQDs en CMC-GQD-DOX se disminuyó la liberación de DOX, aunque causó sensibilidad a pH y una liberación sostenida, la cual fue mayor en pH 7.4. Finalmente, se demostró que el nanocompuesto CMC/GQD sin DOX no es tóxico y es biodegradable.

Por otro lado, un hidrogel nanocompuesto de gelatina (GNC) y puntos cuánticos de carbono se formuló para la entrega de antibióticos y como sensor de pH (Bhattacharyya et al., 2020). Los puntos cuánticos de carbono se usaron como agente entrecruzante del hidrogel y como cromóforo, lo cual redujo el uso de un entrecruzante tóxico. Se diseñaron cuatro tipos de hidrogeles: GNC0, GNC1, GNC2 y GNC3 con 0, 12.5, 25 y 37.5 mg/mL de puntos cuánticos de carbono, respectivamente. Además, los GNC se cargaron con cefadroxilo. En la caracterización los hidrogeles GNC1 mostraron una agregación mínima de puntos cuánticos de carbono, mientras que los GNC3 se agregaban en cúmulos masivos de ~500 nm de tamaño (Figura 11). Asimismo, los puntos cuánticos de carbono tuvieron una distribución del tamaño de 6.07 ± 0.96 nm.

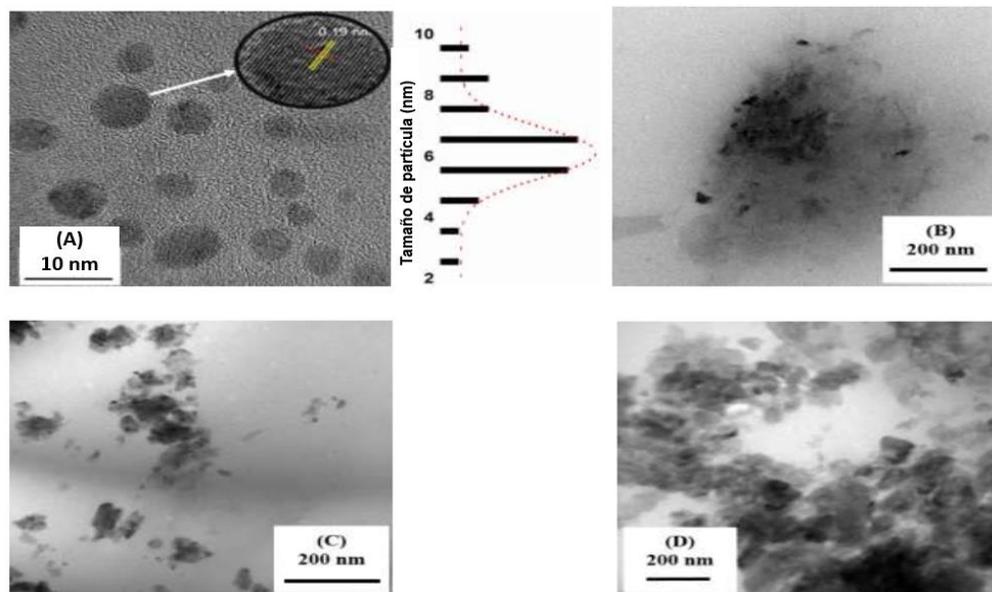


Figura 11. Caracterización de puntos cuánticos de carbono con microscopio electrónico de transmisión de alta resolución (HRTEM). A) Partículas de puntos cuánticos de carbono e histograma. Morfología y dispersión interior de los hidrogeles B) GNC1, C) GNC2 y D) GNC3. (Tomada y modificada de Bhattacharyya et al., 2020).

Los hidrogeles GNC tenían una liberación sostenida del medicamento, la cual fue por difusión y estaba influenciada por el pH y la cantidad de puntos cuánticos de carbono como entrecruzante, ya que la tasa de liberación fue mayor a pH 7.4 a las 24 h, mientras que disminuyó en medio ácido y al aumentar la concentración de puntos cuánticos de carbono (Figura 12). Además, la actividad del medicamento no se alteró por el atrapamiento en el hidrogel y aumentó al incrementar su liberación. Finalmente, se observó que todos los hidrogeles, incluso con medicamento, no eran citotóxicos (Bhattacharyya et al., 2020).

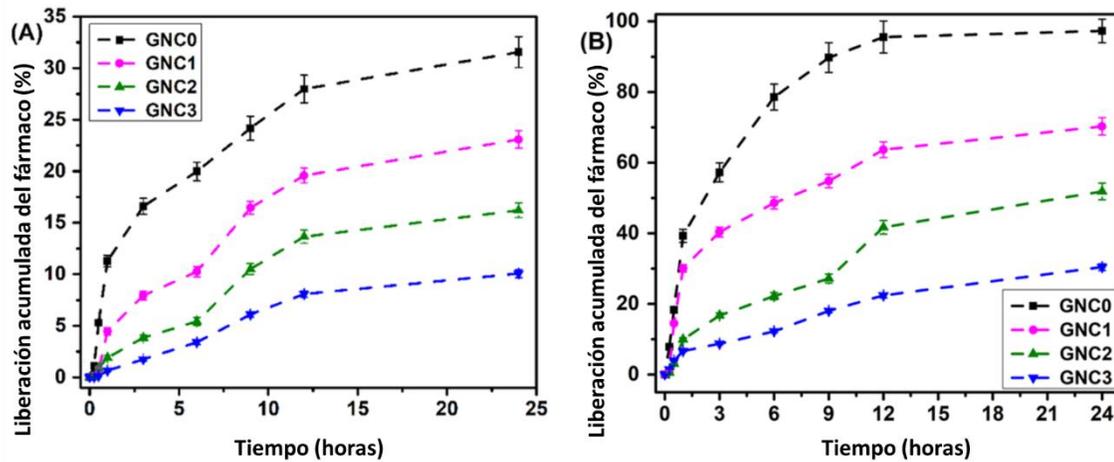


Figura 12. Perfil de liberación de cefadroxilo de los hidrogeles GNC0, GNC1, GNC2 y GNC3 en solución amortiguadora con A) pH 1.8 y B) pH 7.4. (Tomada y modificada de Bhattacharyya et al., 2020).

2.4 Barrera hematoencefálica (BHE)

La barrera hematoencefálica (BHE) es una de las barreras biológicas que limita el paso de sustancias que entran y salen del sistema nervioso para mantener su homeostasis y prevenir que componentes neurotóxicos del plasma, células sanguíneas o patógenos entren en el cerebro. Algunos estados patológicos provocan una ruptura y disfunción de la BHE, lo cual conduce a la infiltración de células y sustancias tóxicas al cerebro que provocan alteraciones neurológicas (Sweeney et al., 2019).

2.4.1 Componentes de la BHE

La BHE es una barrera compleja que forma parte de la unidad neurovascular y que está compuesta de una monocapa de células endoteliales de capilares cerebrales con uniones estrechas (tight junctions, TJ), pericitos incrustados en la membrana basal y pies astrocíticos que rodean a los capilares. Además, para formar la unidad neurovascular se agregan vénulas y arteriolas precapilares, células de músculo liso de arteriolas, células de la glía como astrocitos, microglia y oligodendrocitos, y neuronas (Figura 13). Este conjunto de células tiene como funciones mantener la integridad de la BHE, el flujo sanguíneo cerebral, las interacciones célula-matriz extracelular, eliminación de neurotransmisores, angiogénesis y neurogénesis (Lee y Leong, 2020; Sweeney et al., 2019).

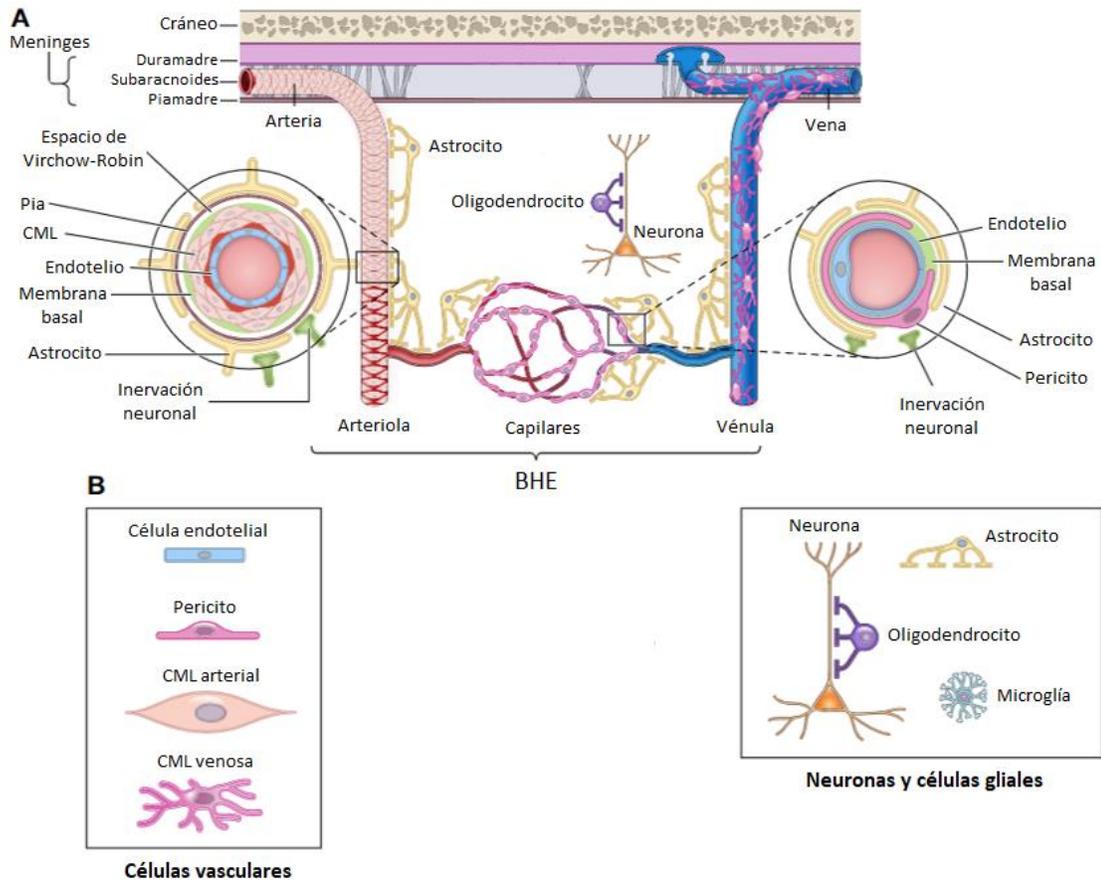


Figura 13. Unidad neurovascular y componentes de la BHE. A) Esquema de la unidad neurovascular y B) células de la unidad neurovascular que regulan la integridad de la BHE. CML: células de músculo liso. BHE: barrera hematoencefálica (Tomada de Sweeney et al., 2019).

En comparación con el endotelio capilar de órganos periféricos, el endotelio de la BHE está sellado por uniones estrechas (TJ), tiene una baja tasa de flujo por transcitosis, una baja permeabilidad paracelular y transcelular, lo cual bloquea el paso de moléculas pequeñas con peso molecular <400 Da y de todas las macromoléculas del transporte paracelular. Para mantener estas uniones estrechas el endotelio presenta diferentes uniones en su membrana con moléculas de adhesión específicas (Figura 14). Las uniones adherentes se encuentran cerca de la membrana basolateral y están formadas por cadherina endotelial vascular (VE-cadherina, CD144) y moléculas de adhesión de células endoteliales y plaquetas 1 (PECAM-1, CD31). Las uniones Gap o comunicantes que incluyen conexina 30 (CX30) y 43 (CX43) que forman hemicanales entre las células endoteliales. Otras moléculas de adhesión en el centro de la membrana que contribuyen son las moléculas de adhesión de células endoteliales (ESAM) y las moléculas de adhesión de uniones estrechas (JAM-A, -B, -C). Cerca de la membrana apical se encuentran las uniones TJ, las cuales están compuestas de lipoproteínas estimuladas por lipólisis (LSR), angulina-1, claudina-1, -3, -5, -12 y

ocludina, las cuales se unen a filamentos del citoesqueleto como actina y vinculina para limitar la difusión paracelular de solutos y iones a través de la monocapa endotelial. Finalmente, en la parte más apical se encuentran las uniones ocluyentes o zónula ocludens (ZO-1, -2, -3), que igual están unidas a actina y vinculina, las cuales se reclutan por la distrofina para mantener la red del citoesqueleto endotelial (Sweeney et al., 2019).

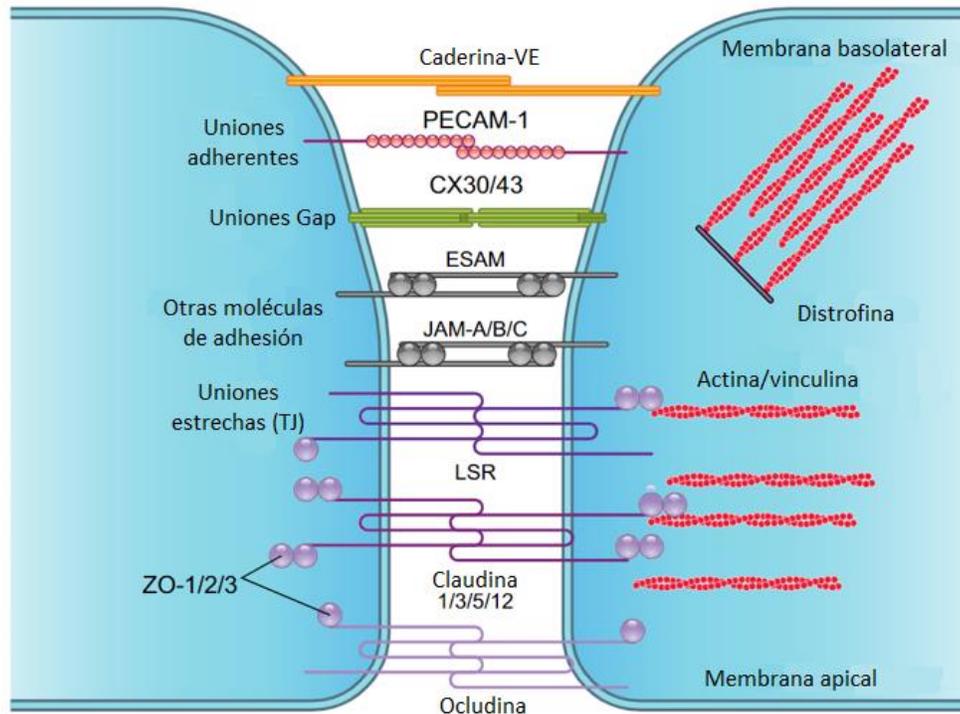


Figura 14. Uniones del epitelio vascular cerebral mediante moléculas de adhesión para mantener el revestimiento estructural endotelial hermético (Tomada de Sweeney et al., 2019).

2.4.2 Mecanismos de transporte a través de la BHE

Debido al paso limitado de sustancias a través de la BHE ocasionado por las uniones estrechas, se tienen mecanismos de transporte específicos para permitir el paso de moléculas hacia y desde el cerebro, los cuales pueden ser usados para la entrega de medicamentos a cerebro mediante nanotransportadores (Figura 15). Los mecanismos de transporte pueden dirigirse hacia el cerebro por la vía lipofílica transcelular, la vía acuosa paracelular, mediados por transportadores como GLUT1 para glucosa o LAT1 para aminoácidos, mediados por receptores de transferrina, insulina o LDL mediante transcitosis, mediados por absorción de albúmina y mediados por células como monocitos o eritrocitos. O bien, de forma inversa para que pueden salir del cerebro mediante transportadores de eflujo, cintas unidas a ATP (ABC), transportadores de aniones orgánicos (OATs/SLC22A), polipéptidos para transporte de aniones

orgánicos (OATPs/SLCO), P-glicoproteínas (P-gp/ABCB1), proteína resistente a cáncer de mama (BCRP/ABCG2) y proteína 1 resistente a multifármacos (MRP1/ABCC1) (Lee y Leong, 2020).

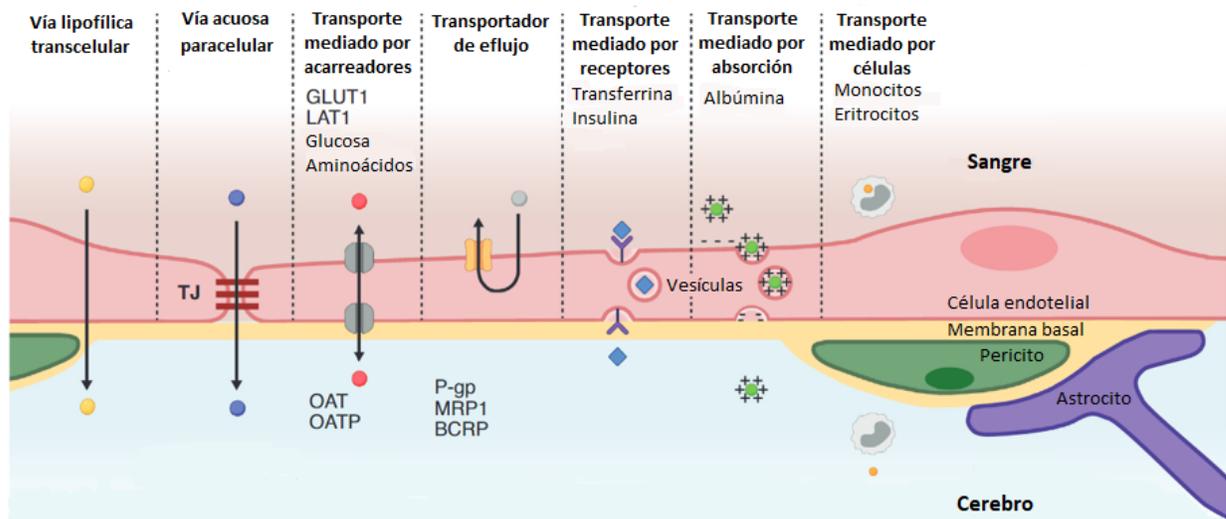


Figura 15. Mecanismos de transporte en la BHE para la entrega de medicamentos a cerebro: vía lipofílica transcelular, vía acuosa transcelular, transporte mediado por acarreadores, transportador de eflujo, transporte mediado por receptores, transporte mediado por absorción y el transporte mediado por células (Tomada y modificada de Lee & Leong, 2020).

2.4.3 Transferrina

La transferrina (T) humana es una glicoproteína que contiene 679 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 80 kDa. La molécula de transferrina se divide en dos lóbulos, designados como lóbulo-N con 336 residuos y lóbulo-C con 343 residuos, los cuales están unidos por una secuencia espaciadora corta. Cada lóbulo contiene dos dominios de una serie de α -hélices superpuestas de una columna central de láminas β (Figura 16). Los dominios interactúan para formar un sitio de unión hidrofílico y profundo para el hierro, ya que su función es transportar de forma segura al hierro en la circulación. La transferrina se produce principalmente en el hígado y tiene una vida media aproximada de 8 días en el suero (Gomme y McCann, 2005; Kawabata, 2019).

Los nanotransportadores usualmente se funcionalizan en su superficie con ligandos que les permitan unirse específicamente con los receptores en las células del tejido blanco, en este caso el endotelio de la BHE. La transferrina es un ligando muy usado debido a que los receptores de transferrina 1 (TR1) se encuentran altamente expresados en la BHE y ayudan a transportar los conjugados al sistema nervioso central mediante transcitosis, el cual es un mecanismo de internalización donde no se libera el contenido

de la vesícula en el citoplasma y lo cruza inalterado hasta el otro extremo de la célula (Li, Peng, et al., 2016).

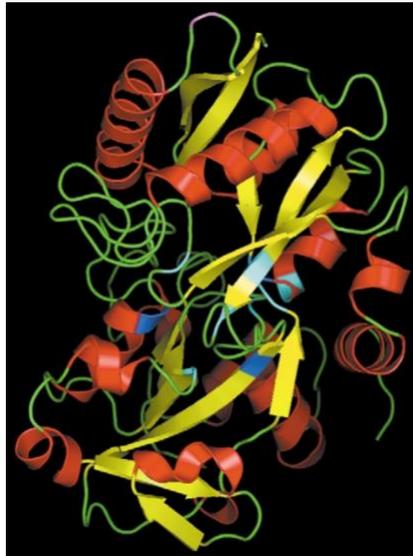


Figura 16. Estructura de la transferrina. Las flechas amarillas indican las láminas β , las α -hélices se muestran en rojo (Tomada y modificada Gomme & McCann, 2005).

2.5 Transwell como modelo *in vitro* de BHE

Recientemente, la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA), como parte su Ley para el control de sustancias tóxicas (TSCA), desarrolló un plan estratégico para promover el desarrollo y la implementación de métodos de evaluación alternativos y estrategias para reducir, refinar o reemplazar los ensayos con animales vertebrados. Las 3 R's (Reducción, Refinamiento y Reemplazo) se han usado para definir a los métodos de evaluación alternativos por más de 50 años. La 'Reducción' es simplemente usar menos animales en la experimentación, el 'Refinamiento' del uso de animales incluye procedimientos para disminuir o evitar su dolor y estrés, y 'Reemplazo' es el uso de sistemas de evaluación con animales invertebrados (USEPA, 2018).

Existen metodologías de nuevo enfoque (NAM) con modelos *in vitro* que simulan barreras y el ambiente *in vivo*, como los Transwell que pueden reconstruir la unidad neurovascular *in vitro* para formar modelos de BHE, los cuales pueden usarse para hacer investigación clínicamente relevante en la permeabilidad y entrega de medicamentos. Uno de los retos que tienen estos modelos con Transwell es su extrapolación a una situación *in vivo* humana, ya que comúnmente se usan células derivadas de animales, aunque

recientemente hay una tendencia a usar células derivadas de humanos para construir un modelo humano completo lo más cercano a la realidad (Hatherell et al., 2011).

Se han descrito diferentes modelos de BHE, que van desde los más simples con transwell en monocultivo o cocultivo, hasta los más complejos con sistemas esferoideales o estilo chip en 3D y multicultivo. Los modelos complejos ofrecen una representación más cercana al ambiente *in vivo*, pero su ensamble es más difícil y caro. Al aumentar la complejidad del sistema se disminuye la permeabilidad y se aumenta la fuerza de la barrera y la resistencia eléctrica transepitelial (TEER), la cual mide la resistencia de las uniones estrechas de las células endoteliales en la BHE (Stone et al., 2019).

Los modelos de BHE con transwell pueden ser en monocultivo con células endoteliales de la microvasculatura cerebral humana (HBMEC o HBEC), en cocultivo que puede ser con HBEC y astrocitos o pericitos (Figura 17 A), en tricultivo con HBEC, astrocitos y pericitos con variación en su sitio de inserción en la placa de transwell (Figura 17 B, C, D), y en multicultivo con HBMEC, astrocitos, pericitos y neuronas (Figura 17 E). Por otro lado, los modelos más complejos incluyen parámetros como la organización tridimensional (sistemas esferoideales) o sistemas de microflujo para simular el flujo sanguíneo cerebral (modelo estilo chip) (Stone et al., 2019).

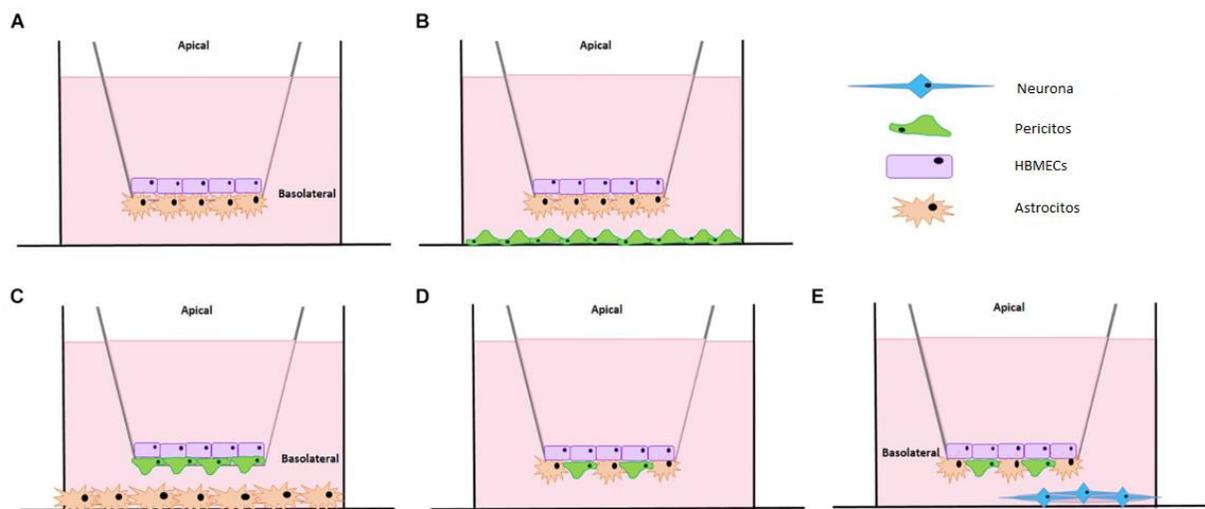


Figura 17. Representación esquemática de los modelos de BHE con Transwell. A) Cocultivo con HBMECs y astrocitos (apical). B) Tricultivo con HBMECs, astrocitos (apical) y pericitos (basolateral). C) Tricultivo con HBMECs, pericitos (apical) y astrocitos (basolateral). D) Tricultivo con HBMECs, pericitos y astrocitos (apical). E) Multicultivo con HBMECs, pericitos, astrocitos (apical) y neuronas (basolateral) (Tomada de Stone et al., 2019).

Finalmente, se presentan algunas ventajas y limitaciones de los modelos Transwell (Tabla 1), las cuales están relacionadas con los parámetros de medición, la reproducibilidad del modelo, el acceso para aplicar medicamentos o tomar una muestra del medio, su manipulación y el tiempo para establecer el modelo (Stone et al., 2019). Es importante conocer esta información para poder desarrollar un modelo de BHE con transwell lo más cercano posible al ambiente *in vivo* humano y que los resultados obtenidos sean relevantes y puedan extrapolarse.

Al considerar la información actual sobre el tema expuesto, se propuso diseñar un nanocompuesto de hidrogel, puntos cuánticos de carbono, transferrina y un inhibidor de BACE1 (hidrogel-CD-Ti β). Este nanocompuesto funcionó como un sistema de entrega de agentes terapéuticos a cerebro. La transferrina se usó para dirigir el nanomaterial al cerebro y cruzar la BHE, ya que las células endoteliales de la BHE tienen altamente expresado el receptor de transferrina 1 (TR1). Por otro lado, el péptido iBACE1 (i β) tuvo 2 funciones: dirigir el nanomaterial a las células que expresan BACE1 en su membrana celular e inhibir su actividad, para bloquear la cascada amiloide en una etapa inicial de la enfermedad de Alzheimer. Además, se estableció un modelo *in vitro* de la BHE y de la enfermedad de Alzheimer en un dispositivo Transwell cocultivo.

Tabla 1. Ventajas y limitaciones de los modelos Transwell (Stone et al., 2019).

Ventajas	Limitaciones
<ul style="list-style-type: none"> • Pueden acelerar el desarrollo de fármacos al tener una plataforma de modelado farmacocinético fisiológico. • Permite medir TEER de forma repetitiva para conocer la integridad de la BHE, con daño mínimo a las células. • Acceso a compartimentos apical y basal para la aplicación de medicamentos y muestreo del medio. • Visualización de las células a lo largo del experimento. • Se pueden utilizar neuronas después de experimentos iniciales. • Se pueden teñir las células en los cubreobjetos o lisarse para realizar pruebas intracelulares. 	<ul style="list-style-type: none"> • El tiempo es crítico en el establecimiento del modelo de 4 células. • Revitalización y sembrado de neuronas humanas. • Si se adicionan a un tiempo incorrecto el modelo no funciona efectivamente y los valores de TEER serán más bajos. • Técnica inapropiada: pérdida de uniformidad y formación de neuritas inadecuada. • Evitar remover neuronas de incubadora por periodos largos. • Evitar tocar neuronas de cubreobjetos al tomar TEER.

Capítulo 3. Hipótesis y objetivos

3.1 Hipótesis

Los puntos cuánticos de carbono conjugados con transferrina y un inhibidor de beta secretasa, que se liberan desde un hidrogel, serán capaces de atravesar la BHE y de inhibir la actividad de beta secretasa en un modelo *in vitro* de la enfermedad de Alzheimer.

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo general

Diseñar y evaluar un hidrogel cargado con puntos cuánticos de carbono conjugados con transferrina y un inhibidor de beta secretasa, para inhibir la actividad de beta secretasa en un modelo *in vitro* de enfermedad de Alzheimer.

3.2.2 Objetivos específicos

- Establecer la conjugación de puntos cuánticos de carbono con transferrina y un péptido inhibidor de beta secretasa mediante la reacción de esterificación con EDC y NHS.
- Sintetizar hidrogeles y cargarlos con los puntos cuánticos de carbono conjugados con transferrina y un inhibidor de beta secretasa para formar nanocompuestos como propuesta de sistemas poliméricos para la entrega de fármacos.
- Determinar que los puntos cuánticos de carbono conjugados con transferrina y un inhibidor de beta secretasa, tienen la capacidad de atravesar la BHE y de inhibir la actividad de beta secretasa, mediante un modelo *in vitro* de BHE y de la enfermedad de Alzheimer.

Capítulo 4. Metodología

La metodología propuesta se expone en la Figura 18. Primero, se realizó la síntesis y conjugación de los puntos cuánticos de carbono (CD), la síntesis de hidrogeles y el diseño del nanocompuesto. Luego, se hicieron estudios de caracterización por microscopio electrónico de transmisión (TEM), microscopio de fuerza atómica (AFM), dispersión de luz dinámica (DLS), espectroscopía de fluorescencia (PL) y espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). La evaluación de las propiedades del nanocompuesto se determinó al medir su hinchamiento y degradación en PBS 1x, su rapidez y cinética de liberación en PBS 1x y DMEM, y mediante tomografía computarizada (TC) se analizó su microestructura, porosidad y conectividad. Posteriormente, un modelo *in vitro* de enfermedad de Alzheimer se indujo con escopolamina y un modelo *in vitro* de BHE se simuló en dispositivos Transwell cocultivo, para evaluar la capacidad del nanocompuesto para cruzar la BHE e inhibir la actividad de BACE1. También, se determinó la permeabilidad del modelo de BHE y la citocompatibilidad de los nanomateriales en los cultivos celulares.

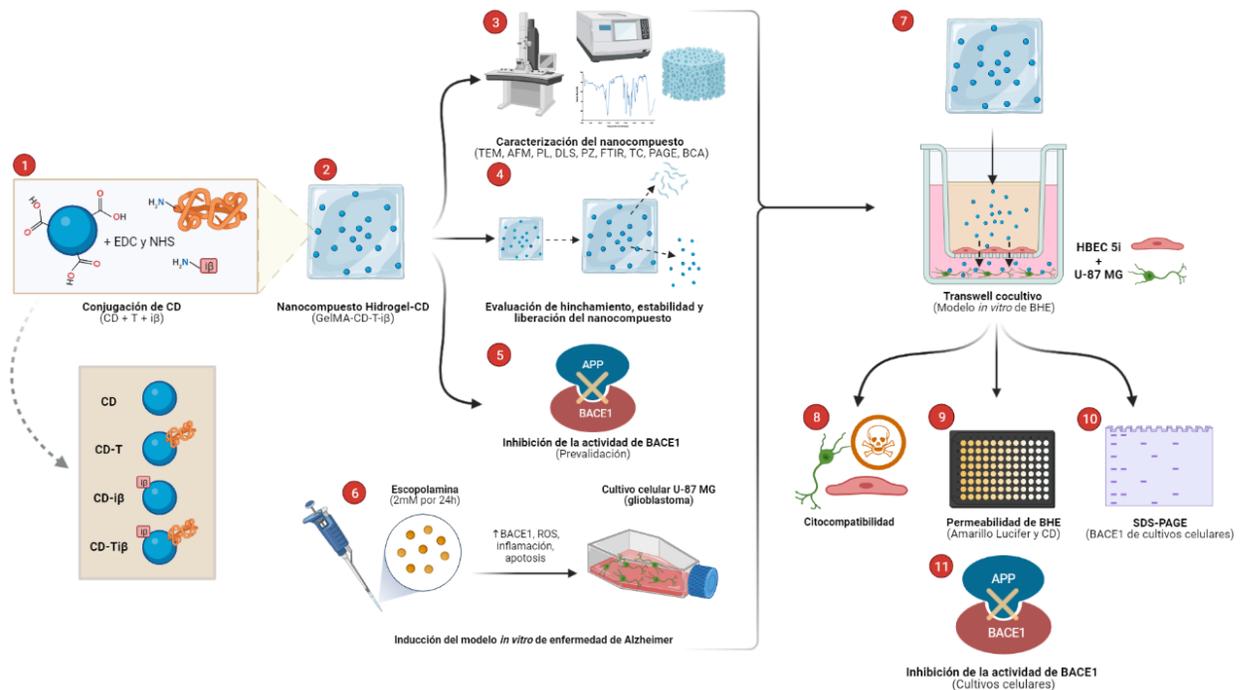


Figura 18. Metodología propuesta para el proyecto de Maestría en Ciencias en Nanociencias. 1. Síntesis y conjugación de puntos cuánticos de carbono (CD): CD, CD-T, CD- β , CD-T β . 2. Síntesis de hidrogeles y carga de CD conjugados. 3. Caracterización del nanocompuesto. 4. Evaluación del hinchamiento, la estabilidad y liberación del hidrogel. 5. Prevalidación de la inhibición de la actividad de BACE1. 6. Inducción del modelo *in vitro* de la enfermedad de Alzheimer. 7. Ensayos con Transwell cocultivo. 8. Ensayos de citocompatibilidad 9. Medición de la permeabilidad de la BHE. 10. Ensayos de proteómica para identificar a BACE1 por SDS-PAGE. 11. Evaluación de la inhibición de la actividad de BACE1 en cultivos celulares (Guzmán-Urbe, 2022. Creado en BioRender.com).

4.1 Síntesis de puntos cuánticos de carbono

Los puntos cuánticos de carbono (CD) funcionalizados con grupos carboxilos en su superficie se sintetizaron a partir de ácido cítrico monohidratado como precursor (SIGMA, C1909). Se distribuyeron 25 g de ácido cítrico sobre la superficie de un recipiente de vidrio, el cual se colocó en un horno Lindberg/Blue M Thermo Fisher Scientific a 180 °C por 40 h, con aire atmosférico para llevar a cabo su termólisis (Amato et al., 2021). Pasado el tiempo se obtuvo un líquido viscoso color café-naranja, que al enfriarse es sólido y friable. Se recuperó este material en un mortero, donde se consiguió un polvo naranja fino. Se obtuvo un rendimiento del 30.8% en relación a la cantidad inicial de ácido cítrico.

Posteriormente, se realizó un ajuste de pH con NaOH 5 M para cambiar el pH 4 (ácido) proporcionado por el precursor, por un pH 7 (neutro), lo cual está reportado que modula el tamaño de los CD, mejora sus propiedades fluorescentes (Martindale et al., 2015) y los hace compatibles con el pH sanguíneo (7.34-7.45). Para neutralizar 3 g de CD, se mezclaron con 6.6 mL de agua desionizada y 5 mL de NaOH 5M. La reacción se llevó a cabo a 50 °C en baño María, con agitación constante a 700 rpm durante 40 min. La solución de CD neutralizados se congeló a -80 °C por 24 h y luego se liofilizó durante 31 h, a una presión de vacío de 0.011 mbar y una temperatura de -56 °C.

4.2 Conjugación de puntos cuánticos de carbono con transferrina e iBACE1

La conjugación de CD con holo-transferrina (T) y un péptido inhibidor de beta secretasa 1 (iBACE1 o i β) se llevó a cabo siguiendo el protocolo de esterificación propuesto por Li, Amat et al. (2016) (Figura 9). Para la conjugación se utilizaron los CD neutralizados a pH 7. En la conjugación se utilizó 1-etil-3-(3-dimetilaminopropilo) carbodiimida (EDC) (SIGMA, E7750) para formar un intermediario y activar los grupos carboxilos de los puntos cuánticos de carbono, y N-hidroxisuccinimida (NHS) (SIGMA, 130672) para obtener un mejor grupo saliente, previo a la esterificación. En estas reacciones se activan los grupos carboxilo en la superficie de los puntos cuánticos de carbono para formar uniones covalentes, tipo amida, con las aminas primarias (lisinas) de la holo-transferrina humana (SIGMA, T0665) y del péptido i β (PeptaNova, 4378v). El péptido i β es una secuencia comercial de aminoácidos (P₁₀-P₄, StatVal), el cual al tener estatina inhibe mejor a la enzima BACE1 a concentraciones de 30 nM. Los CD, T, EDC y NHS se prepararon con PBS 1x a una concentración inicial de 10 mg/mL, mientras que el péptido i β se preparó a 120 nM.

En un vaso de precipitados de 10 mL se agregó 1 mL de CD (3 mg/mL) y 1 mL de EDC (6.7 mg/mL), la solución se agitó a 300 rpm y a temperatura ambiente durante 30 min. Luego, 1 mL de NHS (4 mg/mL) se agregó a la reacción previa y se agitó a 300 rpm y a temperatura ambiente durante otros 30 min. Posteriormente, se agregó a la solución 1 mL de transferrina (8 mg/mL) por goteo (1 gota cada 6 s) y se dejó con agitación a 300 rpm durante 2 h, a temperatura ambiente.

El conjugado CD-T se purificó con un dispositivo concentrador de proteína de ultrafiltración por centrifugación de 30 kDa MWCO (Pierce, ThermoScientific, 88502). Los concentradores se usaron para filtrar los componentes no conjugados y quedarnos sólo con el retenido que tiene CD-T, considerando que el conjugado CD-T tiene un peso molecular (PM) de 82.4 kDa y los CD de ~2.4 kDa (Li, Amat, et al., 2016). Para ello, primero se realizó un prelavado de la cámara de muestra del concentrador con 500 μ L de PBS 1x y se centrifugó a 15,000 x g por 3 min a 4 °C. Luego, se retiró el filtrado y el retenido con una micropipeta y se colocaron 500 μ L de la muestra de interés. El concentrador se centrifugó a 15,000 x g por 2 min a 4 °C, lo cual se repitió 8 veces al tener 4 mL del conjugado. Por cada ciclo se obtuvieron 200 μ L de retenido con CD-T y 300 μ L del filtrado, obteniendo 800 μ L totales del conjugado CD-T.

Al conjugado CD-T filtrado se le agregaron 200 μ L de PBS 1x y 1 mL de EDC (6.7 mg/mL), la solución se agitó a 300 rpm y a temperatura ambiente durante 30 min. Luego, 1 mL de NHS (4 mg/mL) se agregó a la reacción previa y se agitó a 300 rpm y a temperatura ambiente durante otros 30 min. El péptido i β se agregó por goteo para obtener una concentración final en la solución de 30 nM (1 mL a 120 nM) (Sinha et al., 1999) y se dejó con agitación de 300 rpm y temperatura ambiente durante 2 h. Posteriormente, los conjugados CD-Ti β se purificaron por ultrafiltración para retirar los péptidos i β que no reaccionaron. Los concentradores usados fueron de 3 kDa MWCO (Amicon Ultra-15 3K, Millipore), considerando que el péptido i β tiene un PM de 1.6 kDa, y se centrifugaron a 5,000 x g por 20 min.

Así mismo, se realizaron conjugaciones de CD con transferrina (CD-T) y con el péptido i β (CD-i β) por separado, siguiendo el mismo método de esterificación con EDC-NHS y la purificación por ultrafiltración de los conjugados (30 kDa y 3 kDa, respectivamente). Para eliminar las impurezas durante la manipulación, los conjugados se filtraron con membranas de 0.2 μ m en campana de flujo laminar. Para el almacenamiento de los conjugados, se congelaron a -80 °C por 24 h y luego se liofilizaron por 24 h (presión de vacío=0.011 mbar, temperatura= -55 °C), obteniendo un polvo blanco que se almacenó a 4 °C.

Los puntos cuánticos de carbono (CD) se conjugaron con transferrina (T) y un péptido inhibidor de BACE1 (i β), obteniendo los siguientes conjugados: CD-T, CD-i β y CD-Ti β (Figura 19).

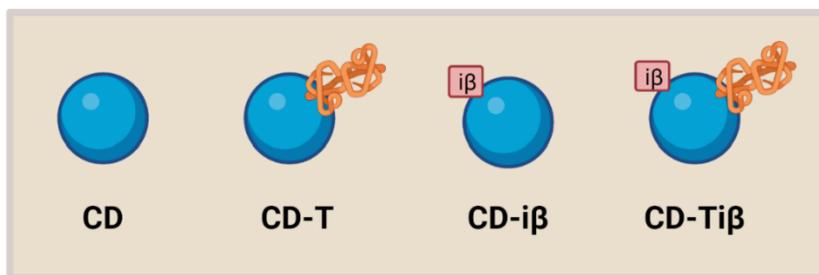


Figura 19. Esquema de los CD conjugados con transferrina (CD-T), con un péptido inhibidor de BACE1 (CD-i β) y con doble conjugación (CD-Ti β). Los CD se representan en azul, la transferrina en color naranja y el péptido i β en color rojo (Guzmán-Uribe, 2022. Creado en BioRender.com).

4.3 Caracterización de puntos cuánticos de carbono conjugados

4.3.1 Morfología y tamaño de los CD conjugados: TEM, AFM y DLS

La morfología de los CD y los CD conjugados se analizó con un TEM JEOL JEM-2010, usando rejillas Lacey F/C 300 mesh Cu y con aumentos entre 50-80 $\times 10^3$ veces. Las imágenes de TEM se analizaron con ImageJ para determinar el tamaño de las partículas individuales de CD. La topografía, altura y diámetro de los CD y CD conjugados se analizaron con un AFM Park Systems XE-70 en modo intermitente (tapping), obteniendo imágenes de 1 \times 1 μ m. Como control se analizó el sustrato (portaobjetos) en el cual se colocaron los CD y una muestra de PBS 1x, que fue el medio en el cual se prepararon los CD conjugados. Las imágenes de AFM se analizaron con Gwyddion para obtener imágenes en 3D de la topografía, la altura y el diámetro promedio de las partículas de CD. Al medir el tamaño promedio de partícula se excluyeron los tamaños máximos que correspondían a los aglomerados y se consideraron sólo los diámetros de las partículas individuales, realizando 100 mediciones para calcular la media y desviación estándar.

El diámetro hidrodinámico se analizó mediante dispersión de luz dinámica (DLS) con un equipo Zetasizer Nanoseries (Malvern). Las mediciones se realizaron considerando un índice de refracción de 1.33 y una absorción de 0.001 para los CD, con agua como medio dispersante, a temperatura de 25 °C. Las diluciones y tiempo de sonicado de cada muestra fueron las siguientes: CD pH 4 a 1 mg/mL, diluido 1:1,000 y sonicado 30 min; CD pH 7 a 1 mg/mL, diluido 1:100 y sonicado 30 min; CD-T a 1 mg/mL y sonicado 10 min; CD-i β a 1 mg/mL, diluido 1:10 y sonicado 20 min; CD-Ti β a 1 mg/mL y sonicado 10 min. Mediante DLS, se determinó la distribución del tamaño por número y el índice de polidispersidad (PDI), obteniendo la media y desviación estándar de 100 iteraciones. El PDI nos habla de la variación del tamaño: si el PDI está cercano a 0 la distribución de tamaño es más heterodispersa y si está cercano a 1 es más homodispersa.

4.3.2 Carga eléctrica superficial de los CD conjugados: potencial ζ

El potencial Z (ζ) se realizó usando un equipo Zetasizer Nanoseries (Malvern) mediante dispersión de luz dinámica (DLS). Los CD conjugados se analizaron en dos medios dispersantes: PBS 1x (pH 7.4) y NaCl 10 mM (pH 7), considerando un índice de refracción de 1.33 y a temperatura de 25 °C. El potencial ζ con PBS 1x se analizó a pH 7 bajo las siguientes condiciones: CD pH 7 a 1 mg/mL, diluido 1:100 y sonicado 70 min; CD-T a 1 mg/mL y sonicado 20 minutos; CD-i β a 1 mg/mL, diluido 1:100 y sonicado 70 minutos; CD-Ti β a 1 mg/mL, diluido 1:10 y sonicado 20 minutos. El potencial ζ con NaCl 10 mM de CD pH 4, CD pH 7 y CD-T, se realizó a una concentración de 1.6 mg/mL y con sonicado de 10 minutos. Se analizaron las muestras a pH desde 2 hasta 9, ajustando el pH con NaOH 10 mM (básico) y HCl 10 mM (ácido). Se realizaron de 40-45 iteraciones de cada muestra para obtener su media y desviación estándar.

El potencial ζ nos habla de la carga eléctrica superficial que tienen las partículas en suspensión, en relación a su medio dispersante y al pH. Así, el potencial ζ indica la magnitud de atracción o repulsión de cargas entre las partículas, lo cual indica su estabilidad: las partículas se aglomeran cuando tienen valores en el rango de 0 a ± 30 mV, ya que tienden a neutralizar su carga superficial y se atraen entre ellas; en cambio las partículas se dispersan si tienen valores mayores a ± 30 mV, ya que sus cargas superficiales muy negativas o positivas harán que se repelan entre ellas.

4.3.3 Espectros de fluorescencia de los CD conjugados

Para medir la fotoluminiscencia (PL) de los CD a pH 4 y pH 7 así como de los CD conjugados con transferrina (T) y un inhibidor de BACE1 (i β), se utilizó un espectrofotómetro de fluorescencia Hitachi F-7000 modelo 5J1-0003. Los nanomateriales se prepararon a una concentración de 1 mg/mL en agua Milli-Q y se sonicaron por 30 min previamente a medir sus espectros de excitación y emisión. Los espectros de excitación se midieron en un rango de 280-500 nm con longitudes de onda de emisión de 400, 450, 500, 550 y 600 nm. Los espectros de emisión se midieron en un rango de 350-700 nm con longitudes de onda de excitación de 330, 350, 380, 400 y 450 nm.

4.3.4 Propiedades superficiales de los CD conjugados mediante FTIR

Con la finalidad de determinar los grupos carboxilo en la superficie de los CD, se realizó espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) en un equipo Cary 630 FTIR, Agilent Technologies. Las muestras de CD pH 7, CD-T, CD-i β y CD-Ti β se analizaron en polvo de forma directa. También el ácido cítrico, que fue el precursor de los CD, y la transferrina (T) se analizaron como controles, para poder comparar con los espectros de los CD.

4.3.5 Detección de proteínas en los CD conjugados mediante SDS-PAGE

Para corroborar la presencia de proteínas conjugadas a los CD y la obtenida en la extracción de proteína de los cultivos celulares del Transwell, se realizó electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). En la SDS-PAGE se usó el gel concentrador al 5% y el gel separador al 12%. Las muestras de CD conjugados se analizaron directamente sin desnaturalizarse, sólo se les agregó "buffer" Laemmli. Los CD conjugados se cargaron en el gel y se realizó la electroforesis. La escalera de pesos moleculares (BIO-RAD Precision plus protein standards Dual color) tenía como referencia a la transferrina (T) a 75 kDa. Adicionalmente, para visualizar la presencia de los CD se analizó la fluorescencia de los geles con una lámpara UV y con el filtro SYBER GREEN del lector de geles BIO-RAD Gel Doc EZ Imager. Luego, para visualizar las proteínas, los geles se tiñeron con Azul de Coomassie y el exceso de colorante se retiró con solución de desteñido (40% metanol, 10% ácido acético y 50% agua destilada). Los geles se visualizaron en el lector de geles BIO-RAD. El peso molecular y la intensidad de las bandas se analizaron con ImageLab 6.1 de BIO-RAD.

4.3.6 Cuantificación de proteína en los CD conjugados mediante Micro-BCA

La cuantificación de transferrina y del péptido i β en los CD conjugados se realizó con un ensayo de micro-BCA (método con ácido bicinonínico). El ensayo de micro-BCA se realizó de acuerdo con las condiciones descritas por el fabricante en el Micro BCA Protein Assay Kit 23235 Thermo Scientific. Para estandarizar las concentraciones de proteína, se realizó una curva estándar con albúmina de suero bovino (BSA) a las siguientes concentraciones: 0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20, 40, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Cada estándar y muestra se realizó por triplicado.

Para calcular el volumen total de reactivo de trabajo (WR), considerando 100 μL por muestra, se usó la siguiente ecuación:

$$WR = (\# \text{ estándares} + \# \text{muestras desconocidas})(\# \text{replicados})(100 \mu\text{L}) \quad (1)$$

El WR se preparó con los reactivos MA, MB y MC del kit, los cuales estuvieron a una concentración de 50, 48 y 2% respectivamente, de acuerdo al volumen requerido calculado. En una placa de 96 pozos se colocaron 100 μL de los estándares o muestras y 100 μL de WR, se mezclaron por 30 s y se incubaron a 37 °C durante 2 h. Pasado el tiempo de incubación se dejó enfriar la placa a temperatura ambiente por 5 min. Luego, la absorbancia se midió a 562 nm en un lector de placas. La concentración de proteína ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de las muestras se determinó a partir de los valores de absorbancia de la curva estándar y su ecuación de la recta (Figura 53).

4.4 Síntesis de hidrogeles

Para la síntesis de hidrogeles se utilizó gelatina tipo A derivada de piel porcina, con 300 grados Bloom (SIGMA, G1890). La gelatina se preparó al 10% en baño María a 50 °C, en donde se disolvieron 2 g de gelatina en 20 mL de PBS 1x, bajo agitación constante a 500 rpm, durante 10 min. Previo a la metacrilación de gelatina se ajustó el pH a 9 con 50 μL de NaOH 5 M, para mantener las condiciones óptimas de la reacción.

En la metacrilación de gelatina se utilizó anhídrido metacrílico (MA) (SIGMA, 276685). El MA promueve el entrecruzamiento de la gelatina mediante luz UV-A, ya que los monómeros de MA reaccionan con los grupos de hidroxilisina de la gelatina al disolver la gelatina en PBS 1x a una temperatura de 50 °C (Shirahama et al., 2016). El MA se utilizó en una razón de 0.1 mL/g, por lo que al utilizar 2 g de gelatina corresponden 200 μL de MA. El MA se agregó por goteo (10 μL) a la solución de gelatina al 10% m/v, manteniendo una agitación constante de 500 rpm, a 50 °C por 3 h (Figura 20). Durante la reacción se hizo un ajuste constante de pH a 9 con NaOH 5 M al agregar cada gota de MA, para mantener las condiciones óptimas para la reacción. Finalmente, para detener la reacción se diluyó con 5 veces su volumen con PBS 1x, para neutralizar el pH a 7.4 de la gelatina metacrilada (GelMA) obtenida.

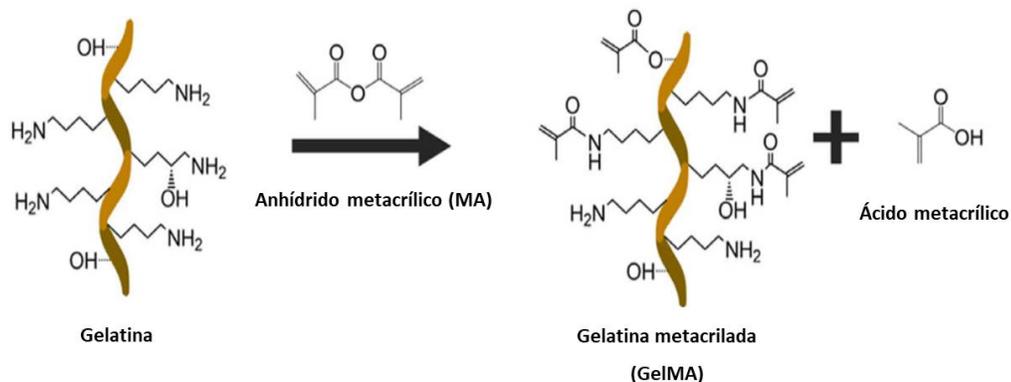


Figura 20. Metacrilación de gelatina con anhídrido metacrílico para formar gelatina metacrilada (GelMA) y ácido metacrílico como productos (Tomada y modificada de Shirahama et al., 2016).

La diálisis de GelMA se realizó usando tubos de diálisis MEGA GeBaFlex con capacidad de 15-20 mL, de un tamaño de poro de 12-14 kDa MWCO (SIGMA, PURG12015). Previo a la diálisis se hidrataron las membranas de los tubos de diálisis con 20 mL de agua desionizada durante 5 minutos, lo cual también se usó para verificar si los tubos tenían alguna fuga de agua. El agua se removió de los tubos de diálisis y se agregaron 20 mL de GelMA en cada uno de los 5 tubos utilizados. La GelMA se dializó contra 100 veces su volumen con agua desionizada a 40 °C, con agitación constante a 60 rpm y durante 24 h, con 2 recambios del agua dializada a las 4 h y 6 h. La diálisis de GelMA se realizó para eliminar el ácido metacrílico producido en la reacción y el MA que no reaccionó con la gelatina.

La liofilización de GelMA se realizó en un liofilizador LABCONCO FreeZone 1 Liter Benchtop Freeze Dry System. La solución de GelMA obtenida en la diálisis se colocó en recipientes de plástico rectangulares, previamente pesados, y se congeló a -80 °C por 24 h. Posteriormente, se colocaron los recipientes sin tapa ni parafilm en el liofilizador a una presión de vacío de 0.012 mbar y una temperatura de -55 °C, durante 48 h. Con ello se obtuvo un material blanco, brillante y de consistencia esponjosa, el cual al pesar el recipiente que lo contenía se calculó un rendimiento final del 62% (1.25 g) en relación a los 2 g de gelatina agregados inicialmente. La GelMA obtenida se almacenó en refrigeración a -4 °C hasta su uso.

Para fotoentrecruzar la GelMA se utilizó litio fenil-2, 4, 6-trimetilbenzoilfosfinato (LAP) como fotoiniciador (SIGMA 900889). LAP produce radicales libres al ser expuesto a luz UV de 365 nm, los cuales generan un fotoentrecruzamiento químico por la formación de enlaces covalentes entre los precursores poliméricos, de modo que se obtendrá la estructura tridimensional del hidrogel (Magdassi et al., 2021).

Los hidrogeles se prepararon con GelMA al 10% m/v en agua Milli-Q, de acuerdo al volumen deseado para cada prueba. La solución de GelMA 10% m/v se sonicó en un sonicador Branson M 1800, durante 30 minutos con calor para obtener una solución homogénea y transparente. Luego, a esta solución se agregó LAP a una concentración de 0.1% m/v y se sonicó de nuevo por 30 minutos. La solución de GelMA-LAP se colocó en una placa de 96 pozos, con 150 μ L en cada pozo y por triplicado para cada ensayo. La placa se expuso a luz UV-A de una lámpara de 86 W durante 60 s. Los hidrogeles fotoentrecruzados se colocaron en baño María por 10 minutos para desmontarlos con facilidad de la placa.

4.5 Evaluación de los nanocompuestos de hidrogeles con CD conjugados

Para sintetizar los nanocompuestos con los hidrogeles de GelMA y CD conjugados, una solución de GelMA 10% m/v y LAP 0.1% m/v se preparó en agua Milli-Q y antes de exponerla a luz UV-A se agregaron los CD. Los CD y los conjugados de CD-T, CD-i β y CD-Ti β se agregaron en una concentración equivalente a 12.5 mg/mL. Las soluciones de GelMA-LAP con CD se sonicaron por 30min y se colocaron en placas de 96 pozos (150 μ L en cada pozo), para luego exponerlos a luz UV-A con una lámpara de 86 W durante 60 s. Al final, se obtuvieron diferentes nanocompuestos (Figura 21): hidrogeles de GelMA (G), hidrogeles de GelMA con CD sin conjugar (G-CD), hidrogeles de GelMA con CD conjugados con transferrina (G-CD-T), hidrogeles de GelMA con CD conjugados con un péptido inhibidor de BACE1 (G-CD-i β) e hidrogeles de GelMA con CD conjugados con transferrina y un péptido inhibidor de BACE1 (G-CD-Ti β).

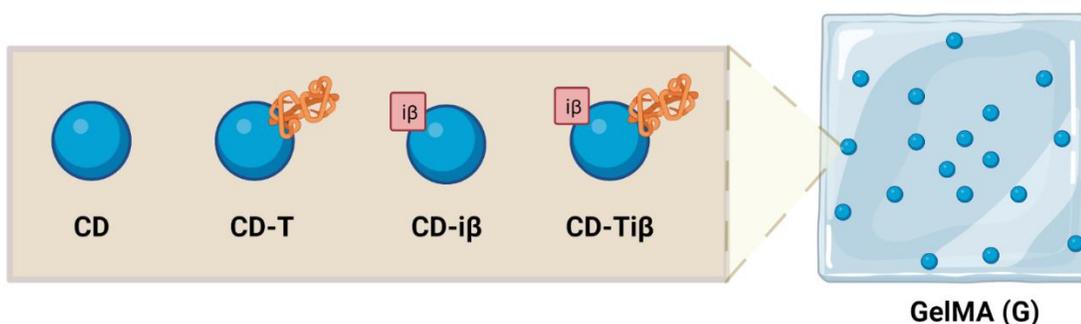


Figura 21. Esquema de los nanocompuestos de hidrogeles de GelMA (G) con CD: G-CD, G-CD-T, G-CD-i β y G-CD-Ti β . Los CD se representan en azul, la transferrina en color naranja y el péptido i β en color rojo (Guzmán-Urbe, 2022. Creado en BioRender.com).

4.5.1 Microestructura: porosidad y conectividad

La microestructura de los nanocompuestos se analizó mediante tomografía computarizada con un Bruker Micro-CT SkyScan 2211. Previo a su análisis, los distintos nanocompuestos se congelaron por 24 h a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y luego se deshidrataron por liofilización durante 24 h, para conservar su estructura. Se analizó sólo un hidrogel de cada nanocompuesto, teniendo como control un hidrogel de GelMA (G) para comparar contra los nanocompuestos con CD conjugados. El análisis de los datos se realizó con CTvox 3.3.1 y CT-Analyser (CTAn), para obtener modelos 3D de la microestructura, cálculos del grosor de la estructura, tamaño del poro, densidad de conectividad, porosidad y volumen del espacio de los poros abiertos y cerrados.

4.5.2 Hinchamiento de los nanocompuestos

El hinchamiento de los nanocompuestos de GelMA-CD se evaluó por su capacidad para absorber líquidos. Para este ensayo se sintetizaron hidrogeles como se describió previamente, teniendo un triplicado de cada grupo y teniendo un hidrogel de GelMA sin CD como control. El peso inicial de los hidrogeles se midió (tiempo cero), luego se dejaron inmersos en 1 mL de PBS 1x, incubándose a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y en agitación a 120 rpm. El peso de los hidrogeles se midió a determinados intervalos de tiempo: 0.25, 1, 2, 6, 9, 12, 24, 48, 72, 96, 120 y 144 h; para observar su hinchamiento máximo y el inicio de su degradación, retirando el exceso de líquido de su superficie.

El hinchamiento de los hidrogeles en cada tiempo se calculó con la siguiente ecuación (Javanbakht y Namazi, 2018):

$$\text{Hinchamiento } (\%) = \frac{P_t - P_0}{P_0} \times 100 \quad (2)$$

Donde, P_t es el peso del hidrogel al tiempo 't' y P_0 es el peso inicial del hidrogel.

4.5.3 Degradación de los nanocompuestos

La degradación de los nanocompuestos de GelMA-CD se determinó por la pérdida de peso que tuvieron a lo largo del tiempo, considerando el punto de hinchamiento máximo calculado previamente. El ensayo se

hizo con un triplicado de cada grupo y con un hidrogel de GelMA sin CD como control. A los hidrogeles se les midió su peso inicial (tiempo cero) y luego se colocaron en 1 mL de PBS 1x, a 37 °C y agitando a 120 rpm. Los hidrogeles se pesaron a los tiempos: 0.25, 1, 2, 6, 9, 12, 24, 48, 72, 96, 120 y 144 h; hasta su degradación total. La degradación de los hidrogeles en cada tiempo se calculó con la siguiente ecuación (Javanbakht y Namazi, 2018):

$$\text{Degradación (\%)} = \frac{P_0 - P_t}{P_0} \times 100 \quad (3)$$

Donde, P_t es el peso del hidrogel al tiempo 't' y P_0 es el peso inicial del hidrogel.

4.5.4 Liberación de los puntos cuánticos de carbono desde los hidrogeles

La liberación de los CD conjugados desde los hidrogeles de GelMA se determinó en 2 medios: PBS 1x y DMEM suplementado; y se incubaron a 37 °C con agitación de 120 rpm, para simular un ambiente sanguíneo. En estos ensayos los distintos nanocompuestos se colocaron por triplicado en 1 mL de PBS 1x o DMEM, de acuerdo con el ensayo. Durante el experimento se recuperaron 500 μ L de medio y se reemplazaron por 500 μ L de medio nuevo a los tiempos: 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 6, 9, 12, 24, 48, 72, 96, 120 y 144 h en PBS 1x (debido a su degradación), y hasta 168, 192 y 216 h en DMEM. La liberación de CD conjugados se determinó mediante fluorescencia. Los sobrenadantes (PBS o DMEM) recuperados a los diferentes tiempos se colocaron en una placa negra de 96 pozos con fondo plano (Costar) y se analizaron con un fluorómetro Fluoroskan FL-Thermo Scientific, a una longitud de onda de excitación de 355 nm y una longitud de onda de emisión de 460 nm. Para el análisis de cada ensayo, se hizo la extracción de la señal fluorescente del PBS 1x y DMEM, respectivamente. Además, el porcentaje de liberación acumulada se calculó considerando la fluorescencia inicial en cada nanocompuesto como referencia del 100% de fluorescencia, en comparación con lo liberado en cada medio.

Para determinar la cinética de liberación de orden cero para cada grupo de CD conjugados se usó la siguiente ecuación:

$$[C]_t = kt + [C]_0 \quad (4)$$

Donde, $[C]_t$ es la concentración de la muestra al tiempo 't', k es la constante de rapidez de liberación, 't' es el tiempo y $[C]_0$ es la concentración de la muestra al tiempo 0.

Para determinar la cinética de liberación de orden cero para cada grupo de CD conjugados se usó la siguiente ecuación:

$$\ln[C]_t = -kt + \ln[C]_0 \quad (5)$$

Donde, $\ln[C]_t$ es el logaritmo natural de la concentración de la muestra al tiempo 't', k es la constante de rapidez de liberación, 't' es el tiempo y $\ln[C]_0$ es el logaritmo natural de la concentración de la muestra al tiempo 0 (Ata et al., 2020).

4.6 Prevalidación de la inhibición de la actividad de BACE1

La inhibición de la actividad de la enzima BACE1 se analizó mediante un ensayo con método de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET), con el kit comercial de detección de la actividad de BACE1 (SIGMA, CS0010), de acuerdo con las condiciones descritas por el fabricante. El método de FRET se basa en la transferencia de energía de un fluoróforo donador a un fluoróforo receptor, al estar a distancias muy cortas (1-10 nm). En este caso, el kit comercial contenía un buffer fluorescente-FAB (receptor) y el sustrato de BACE1 con un fluoróforo (donador). La fluorescencia del sustrato aumenta al ser escindido por BACE1, para luego hacer la transferencia de energía al receptor.

En el ensayo se colocaron por triplicado el sustrato de BACE1 como control negativo (80 μ L de FAB + 20 μ L de sustrato), la enzima BACE1 como control positivo (78 μ L de FAB + 20 μ L de sustrato + 2 μ L de BACE1), y el péptido inhibidor de BACE1 ($i\beta$) a 30 nM (68 μ L de FAB + 20 μ L de sustrato + 2 μ L de BACE1 + 10 μ L de $i\beta$) y 60 nM (58 μ L de FAB + 20 μ L de sustrato + 2 μ L de BACE1 + 20 μ L de $i\beta$). La placa se cubrió de la luz y se incubó por 2 h a 37 °C, tiempo necesario para que BACE1 escinda el sustrato. La fluorescencia de las muestras se midió a las 0 y 2 h en un fluorómetro TECAN Infinite 200 Pro, a una λ_{ex} : 488 nm y λ_{em} : 509 nm. El control negativo se consideró como blanco y se extrajo de la señal fluorescente de las muestras. El porcentaje de escisión del sustrato de BACE1 (actividad de BACE1) se calculó usando la siguiente ecuación:

$$\text{Escisión del sustrato de BACE1 (\%)} = \frac{S (\text{pmol}) - 50}{500 (\text{pmol})} \times 100 \quad (6)$$

Donde, S es la cantidad en pmol de la fluorescencia en la muestra obtenida de la curva estándar (Figura 54). Esta ecuación indica el 50% del producto de escisión a las 2 h de la reacción según el kit de detección, y refleja la fluorescencia de 500 pmol del estándar, ya que la cantidad de sustrato agregada en la reacción fueron 1,000 pmol.

Finalmente, la actividad de BACE1 se normalizó al 100%, considerando al control positivo con la enzima BACE1 como referencia del 100% de actividad enzimática.

4.7 Modelo *in vitro* de BHE y enfermedad de Alzheimer

Para establecer el modelo *in vitro* de BHE en un Transwell cocultivo se usaron células endoteliales de la microvasculatura cerebral (HBEC-5i, CRL-3245, ATCC) y células de glioblastoma (U-87 MG, HTB-14, ATCC) para inducir el modelo *in vitro* de enfermedad de Alzheimer. Ambas líneas celulares son derivadas de humanos para simular las funciones biológicas humanas.

Las células endoteliales de la microvasculatura cerebral (HBEC-5i) son células inmortalizadas, derivadas de la corteza cerebral humana de un paciente sin enfermedad. Las HBEC-5i expresan marcadores estables de las células endoteliales, como el factor VIII de von Willebrand, cadherina vasculoendotelial (VE), ocludinas, moléculas de adhesión celular (VCAM-1 e ICAM-1) y marcadores para la activación de células presentadoras de antígenos (CD54 y CD40). Debido a ello, forman estructuras eficientes con uniones estrechas (TJ), logrando una alta resistencia eléctrica transendotelial y una permeabilidad muy baja a dextrano de 70 kDa. Las células se cultivaron en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) F12, el cual se suplementó con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de antibiótico (100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina), con cambios de medio cada 2-3 días y condiciones de incubación de 37 °C y 5% de CO₂ (Figura 55).

Las células de glioblastoma (U-87 MG) son derivadas de cerebro humano, de células gliales de un paciente masculino con glioma maligno. Las U-87 MG tienen morfología epitelial y propiedades de crecimiento adherente, son tumorigénicas y se han usado en investigaciones de neurociencias e inmuno-oncología. Las células se cultivaron en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) alto en glucosa, el cual se suplementó con 10% de suero fetal bovino (FBS) y 1% de antibiótico (100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina), con cambios de medio cada 2-3 días e incubadas a 37 °C y 5% de CO₂ (Figura 55).

4.7.1 Inducción con escopolamina del modelo *in vitro* de enfermedad de Alzheimer

El modelo *in vitro* de enfermedad de Alzheimer se estableció en las células de glioblastoma (U-87 MG) tratadas con escopolamina (hioscina). El cultivo de células U-87 MG se llevó a confluencia del 90%. Luego, las células se trataron con 1 mL de tripsina-EDTA y se sembraron en una placa de 96 pozos a una densidad de 1.5×10^4 células/pozo, incubándolas durante 24 h con medio de cultivo DMEM alto en glucosa suplementado, a 37 °C y 5% de CO₂. A las 24h, el medio de cultivo se cambió por DMEM alto en glucosa libre de suero fetal bovino y se agregó escopolamina (Sco) a 2 mM para inducir el modelo (aumento de BACE1), incubándolas durante 24 h. En la placa se colocaron por triplicado un control negativo de células U-87 MG, un control positivo del modelo con U-87+Sco y éstas últimas células expuestas a los distintos CD conjugados (CD, CD-T, CD-iβ y CD-Tiβ) a 10 y 20 μg/mL, de acuerdo a lo reportado por Han et al. (2016). Posteriormente, con TRIsure (BIO-38033, Meridian Bioscience) se realizó lisis celular y se extrajo proteína de la fase orgánica en tubos de microcentrífuga. Para realizar la precipitación de la proteína extraída de los cultivos celulares, se realizó un tratamiento con ácido tricloroacético (TCA) al 100% (15 μL por cada 100 μL de muestra) y acetona al 100% (1 mL).

Para detectar la presencia de BACE1 en el modelo inducido con escopolamina, se realizaron geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE). Las muestras se desnaturalizaron a 95 °C por 5 min con “buffer” Laemmli y luego se cargaron en los geles para realizar la electroforesis. La escalera de pesos moleculares tenía como referencia a la transferrina (T) a 75 kDa, además se tenía un control negativo de células U-87 MG y un control positivo del modelo con U-87+Sco. Para visualizar las proteínas, los geles se tiñeron con Azul de Coomassie y el exceso de colorante se retiró con solución de desteñido. Los geles se visualizaron en el lector de geles BIO-RAD Gel Doc EZ Imager. El peso molecular y la intensidad de las bandas se analizaron con ImageLab 6.1 de BIO-RAD.

4.7.2 Citocompatibilidad de CD conjugados

La citocompatibilidad se realizó mediante un ensayo de reducción de resazurina, en el cual se cuantificó la actividad metabólica celular y la diferencia entre células tratadas y no tratadas, para determinar el porcentaje de viabilidad celular. Las células endoteliales de la microvasculatura cerebral (HBEC-5i) y las de glioblastoma (U-87 MG) se sembraron en placas de 96 pozos a una densidad de 1.5×10^4 células/pozo y se incubaron por 24 h con 100 μL de medio de cultivo DMEM F-12 y DMEM alto en glucosa, respectivamente. Se realizaron 3 ensayos de citocompatibilidad: uno con células HBEC-5i y dos con U-87 MG (uno libre de

escopolamina y otro con escopolamina). Previo al ensayo con resazurina, en el grupo de U-87 MG con escopolamina se realizó la inducción del modelo de la enfermedad de Alzheimer durante 24 h. Las células se incubaron por triplicado con los distintos CD conjugados (CD, CD-T, CD-i β y CD-Ti β) a 10 y 20 μ g/mL, durante 2 h. Además, como control negativo se consideró un grupo de células con DMSO al 20% (C-) y como control positivo a las células libres de CD conjugados y/o escopolamina (C+). Luego, la resazurina se agregó al 10% (10 μ L en cada pozo) y se dejó reaccionar durante 4 h. La placa se leyó a una absorbancia de 570 y 600 nm para determinar la reducción de resazurina mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Reducción de resazurina (\%)} = \frac{(O_2 \times A_1) - (O_1 \times A_2)}{(R_1 \times N_2) - (R_2 \times N_1)} \times 100 \quad (7)$$

Donde, O_1 es el coeficiente de extinción de la resazurina oxidada a 570 nm, O_2 es el coeficiente de extinción de la resazurina oxidada a 600 nm, R_1 es el coeficiente de extinción de la resazurina reducida a 570 nm, R_2 es el coeficiente de extinción de la resazurina reducida a 600 nm, A_1 es el valor de absorbancia de la muestra a 570 nm, A_2 es el valor de absorbancia de la muestra a 600 nm, N_1 es el valor de absorbancia del control negativo a 570 nm y N_2 es el valor de absorbancia del control negativo a 600 nm (Tabla 2).

Tabla 2. Coeficientes de extinción molar de resazurina reducida y oxidada a longitudes de onda de 570 y 600 nm.

Longitud de onda	Reducida (R)	Oxidada (O)
570 nm	155,677	80,586
600 nm	14,652	117,216

La viabilidad celular se calculó con la diferencia de reacción entre los grupos tratados con CD conjugados y los no tratados, mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Viabilidad celular (\%)} = \frac{(O_2 \times A_1) - (O_1 \times A_2)}{(O_2 \times P_1) - (O_1 \times P_2)} \times 100 \quad (8)$$

Donde, O_1 es el coeficiente de extinción de la resazurina oxidada a 570 nm, O_2 es el coeficiente de extinción de la resazurina oxidada a 600 nm, A_1 es el valor de absorbancia de la muestra a 570 nm, A_2 es el valor de absorbancia de la muestra a 600 nm, P_1 es el valor de absorbancia del control positivo a 570 nm y P_2 es el valor de absorbancia del control positivo a 600 nm (Tabla 2).

4.7.3 Modelo *in vitro* de BHE con un Transwell cocultivo

El modelo *in vitro* de BHE se estableció usando un dispositivo Transwell de 96 pozos (Corning #3381, HTS Transwell-96), el cual tenía insertos con membranas de policarbonato, un tamaño de poro de 0.4 μm y un área de crecimiento celular de 0.143 cm^2 . El modelo se hizo en cocultivo con células endoteliales de la microvasculatura cerebral (HBEC-5i) para establecer la BHE y con las células de glioblastoma (U-87 MG) que se les indujo el modelo de enfermedad de Alzheimer con escopolamina.

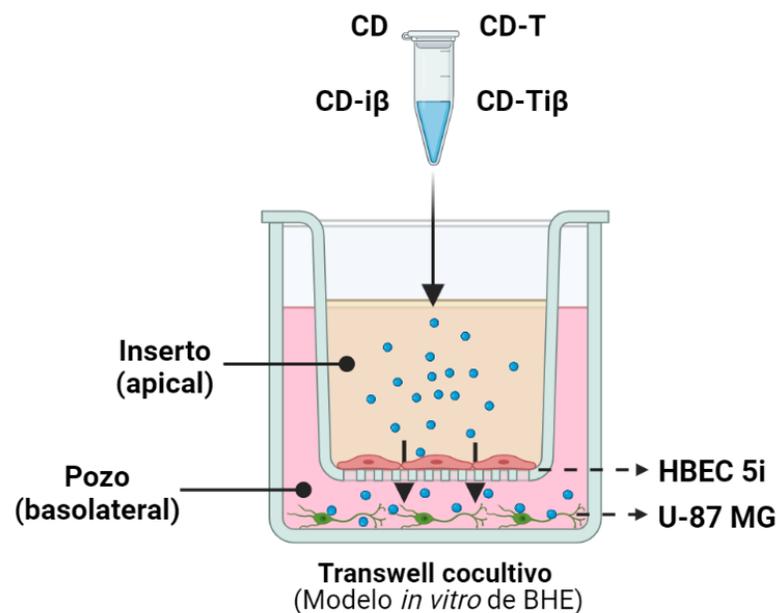


Figura 22. Modelo *in vitro* de BHE en un Transwell cocultivo con HBEC 5i en los insertos y U-87 MG en los pozos. La BHE se simuló con las células endoteliales de la microvasculatura cerebral humana (HBEC), sus uniones estrechas (tight junctions) y las membranas de los insertos con poros de 0.4 μm . Estas células se pusieron en contacto con cada conjugado (CD, CD-T, CD-iβ y CD-Tiβ) y se midió su permeabilidad a través de la BHE (Guzmán-Urbe, 2022. Creado en BioRender.com).

En el día 0, las células endoteliales (HBEC 5i) se colocaron en la parte apical del Transwell sobre las membranas de los insertos (Figura 22), a una densidad de 1.5×10^4 células/inserto, con 75 μL de DMEM-F12 en los insertos y 235 μL en los pozos. En el día 2, el medio DMEM-F12 del compartimento basolateral (cerebro) se descartó y se sembraron las células de glioblastoma (U-87 MG) en este compartimento, a una densidad de 1.5×10^4 células/pozo, con 235 μL de DMEM-alto en glucosa. Las células se incubaron a 37 $^{\circ}\text{C}$ y 5% de CO_2 , con cambios de medio cada 2 días, para asegurar su adherencia y crecimiento (Baranyai et al., 2021; Stone et al., 2019). En el día 5, la formación del modelo *in vitro* de BHE se comprobó con un ensayo

de permeabilidad con amarillo Lucifer (1 mM). Al confirmar la integridad de la BHE, el modelo *in vitro* de enfermedad de Alzheimer se indujo en las células U-87 MG como se describió previamente, agregando 7.1 μL de escopolamina (2 mM) en el compartimento basolateral e incubando por 24 h. Al día 6, en el compartimento apical del Transwell se agregaron 15 μL de cada conjugado (CD, CD-T, CD-i β y CD-Ti β) por triplicado, a concentraciones de 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y se incubaron por 2 h a 37 °C y 5% de CO_2 (Figura 22).

Pasado ese tiempo, el medio de cultivo de cada compartimento se recuperó en tubos de microcentrífuga para el análisis de la permeabilidad a los CD conjugados en el modelo *in vitro* de BHE. Luego, en ambos compartimentos se agregó tripsina para desprender las células HBEC-5i y U-87 MG de la placa (30 μL en los insertos y 100 μL en los pozos). Posteriormente, con TRIsure (BIO-38033, Meridian Bioscience) se realizó la lisis celular y se extrajo proteína de la fase orgánica en tubos de microcentrífuga. Finalmente, con ácido tricloroacético (TCA) y acetona se realizó la precipitación de proteínas.

4.7.3.1 Permeabilidad en el modelo *in vitro* de BHE

El modelo *in vitro* de BHE establecido simuló tres componentes importantes de la BHE (Lee y Leong, 2020): la capa de células endoteliales y sus uniones estrechas (células HBEC-5i), y la membrana basal de células endoteliales y pericitos (membrana del Transwell). La formación del modelo *in vitro* de BHE y la integridad de las uniones estrechas en las células endoteliales, se comprobaron con ensayos de permeabilidad con amarillo Lucifer (SIGMA, L0144). Mientras que, la capacidad de los CD conjugados para cruzar el modelo *in vitro* de la BHE se midió con un ensayo de permeabilidad a los propios CD conjugados.

En el ensayo de permeabilidad con amarillo Lucifer (AL) se comparó la permeabilidad de los insertos sin células y la de los insertos con células endoteliales (HBEC-5i). En este ensayo se cambió el medio de cultivo de los insertos por 75 μL de una solución de amarillo Lucifer con buffer HEPES (1 mM, pH 7.4) y el medio de cultivo de los pozos se cambió por 235 μL de buffer HEPES (30 mM, pH 7.4). El ensayo se realizó por triplicado y el Transwell se dejó incubando por 2 h a 37 °C y 5% de CO_2 . Luego, el amarillo Lucifer y el buffer HEPES de cada compartimento se recuperaron en una placa y su absorbancia se leyó a una λ_{ex} : 430 nm (Figura 23).

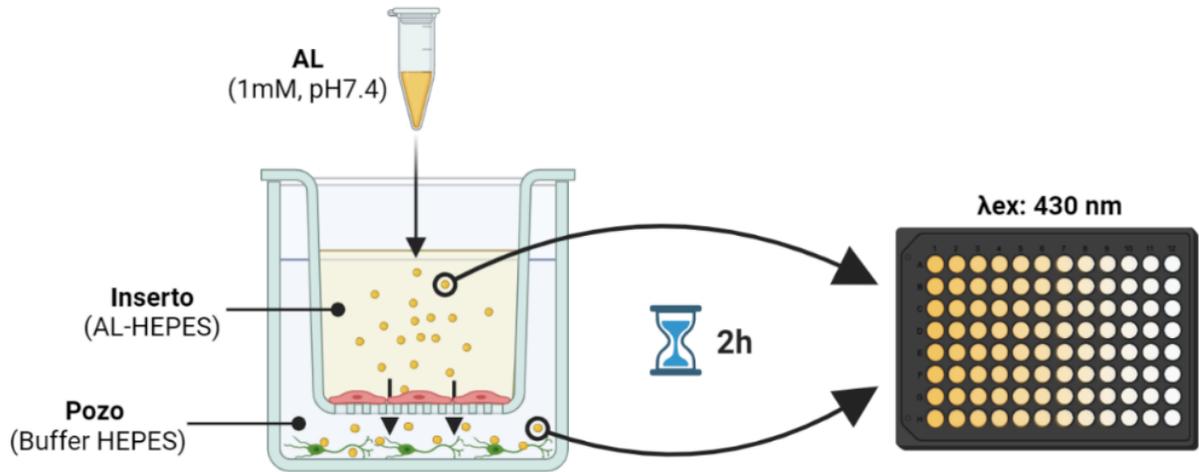


Figura 23. Ensayo de permeabilidad del modelo *in vitro* de la BHE con amarillo Lucifer (AL, 1 mM). Se colocó AL en el inserto y HEPES en los pozos para determinar cuánto colorante AL cruzaba la BHE del modelo en 2 h. Se midió su absorbancia a una λ_{ex} de 430 nm para calcular su permeabilidad aparente (Guzmán-Urbe, 2022. Creado en BioRender.com).

El coeficiente de permeabilidad aparente (P_{app}) se calculó con la siguiente ecuación (Eigenmann et al., 2013):

$$P_{app}(cm/s) = \frac{V_B}{AC_{A0}} \times \frac{\Delta C_B}{\Delta t} \quad (9)$$

Donde, V_B es el volumen en el compartimento basolateral (235 μ L), A es el área superficial de la membrana (0.143 cm^2), C_{A0} es la concentración inicial en el compartimento apical (inserto) y $\frac{\Delta C_B}{\Delta t}$ es el cambio de concentración a través del tiempo (7,200 s o 2 h) en el compartimento basolateral (pozo).

El ensayo de permeabilidad a CD conjugados se realizó con los medios de cultivo recuperados de los compartimentos del Transwell (sección 4.7.3), de los cuales se leyó su fluorescencia con un fluorómetro TECAN Infinite 200 Pro, a una λ_{ex} : 488 nm y λ_{em} : 509 nm. La señal fluorescente de los medios DMEM se extrajo de la señal de las muestras y la permeabilidad aparente se calculó con la misma ecuación (9).

4.7.4 Detección de BACE1 en el modelo *in vitro* de enfermedad de Alzheimer

Para detectar la presencia de BACE1 en el modelo inducido con escopolamina en el Transwell cocultivo, se realizaron geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE), con el mismo procedimiento descrito previamente (sección 4.7.1). Se realizaron 3 geles: uno con los controles de enzima BACE1, transferrina (T), células U-87, U-87+Sco y HBEC; otro de las células U-87+Sco de los pozos del Transwell expuestas a 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de los distintos CD conjugados (CD, CD-T, CD-i β y CD-Ti β); y otro de las células HBEC de los insertos del Transwell expuestas a los mismos CD conjugados. En este caso se utilizó como referencia una escalera de pesos moleculares BIO-RAD Broad Range. Los geles se visualizaron en el lector de geles BIO-RAD Gel Doc EZ Imager. El peso molecular y la intensidad relativa de las bandas se analizaron con ImageLab 6.1 de BIO-RAD.

4.8 Inhibición de la actividad de BACE1 en el modelo *in vitro* de enfermedad de Alzheimer

La inhibición de la actividad de la enzima BACE1 se analizó mediante un ensayo con método de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET), de acuerdo al procedimiento indicado en el kit comercial de detección de la actividad de BACE1 (SIGMA, CS0010). El método de FRET se basa en la transferencia de energía de un fluoróforo donador a un fluoróforo receptor, al estar a distancias muy cortas (1-10 nm). En este caso, el kit comercial contenía un buffer fluorescente-FAB (receptor) y el sustrato de BACE1 con un fluoróforo (donador). La fluorescencia del sustrato aumenta al ser escindido por BACE1, para luego hacer la transferencia de energía al receptor.

En el ensayo se colocaron por triplicado el sustrato de BACE1 como control negativo (80 μL de FAB + 20 μL de sustrato), la enzima BACE1 como control positivo (78 μL de FAB + 20 μL de sustrato + 2 μL de BACE1), las células U-87 MG con escopolamina (U-87+Sco) como el control positivo del modelo (60 μL de FAB + 20 μL de sustrato + 20 μL de muestra) y los distintos CD conjugados (CD, CD-T, CD-i β y CD-Ti β) a 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (60 μL de FAB + 20 μL de sustrato + 20 μL de muestra), de acuerdo a lo reportado por Han et al. (2016). La placa se cubrió de la luz y se incubó por 2 h a 37 °C, tiempo necesario para que BACE1 escinda el sustrato. La fluorescencia de las muestras se midió a las 0 y 2 h en un fluorómetro TECAN Infinite 200 Pro, a una λ_{ex} : 488 nm y λ_{em} : 509 nm. El control negativo se consideró como blanco y se extrajo de la señal fluorescente de las muestras.

El porcentaje de escisión del sustrato de BACE1 (actividad de BACE1) se calculó usando la siguiente ecuación:

$$\textit{Escisión del sustrato de BACE1} (\%) = \frac{S (\textit{pmol}) - 50}{500 (\textit{pmol})} \times 100 \quad (10)$$

Donde, S es la cantidad en pmol de la fluorescencia en la muestra obtenida de la curva estándar. Esta ecuación indica el 50% del producto de escisión a las 2 h de la reacción según el kit de detección, y refleja la fluorescencia de 500 pmol del estándar, ya que la cantidad de sustrato agregada en la reacción fueron 1,000 pmol.

Finalmente, estos datos de actividad de BACE1 se normalizaron al 100%, considerando a la actividad basal de BACE1 en las U-87 MG como una referencia del 100% y para determinar el porcentaje de actividad en cada uno de los CD conjugados se tomó la actividad de BACE1 del modelo con U-87 MG+Sco como el 100%, ya que fueron las células en las que se evaluaron estos nanomateriales.

4.9 Análisis estadístico y gráficos

Para procesar los datos, obtener los gráficos y el análisis estadístico de los resultados se utilizaron Excel-Microsoft Office Profesional Plus 2019 y GraphPad Prism 9.4.0. Cada ensayo se realizó con triplicados de cada grupo (n=3), para obtener la media y desviación estándar. De acuerdo a los grupos de estudio analizados y a las comparaciones necesarias, se usaron los modelos estadísticos de T-student de 2 colas, de muestras independientes y con corrección de Welch; o el análisis de la varianza (ANOVA) de una o dos vías con pruebas post *hoc* de comparaciones múltiples de Tukey. El nivel de significancia fue del 95%, con un marco de error del 5% ($p < 0.05$). Se consideraron diferencias significativas al tener comparaciones con $p < 0.05$ (*), $p < 0.005$ (**), $p < 0.0005$ (***) y $p < 0.0001$ (****). Los esquemas de la metodología del proyecto se crearon en BioRender.com 2022.

Capítulo 5. Resultados

5.1 Síntesis de puntos cuánticos de carbono

El ácido cítrico, usado como precursor, era un polvo de color blanco. Los puntos cuánticos obtenidos directamente de la termólisis de ácido cítrico se mostraban en el recipiente como una costra café oscura y al pulverizarse en un mortero se obtenía un polvo fino de color naranja oscuro con olor cítrico e higroscópico. Los CD sintetizados tenían un pH de 4 (ácido) y se neutralizaron a pH de 7. Los CD de pH 7 se liofilizaron y se obtuvo un polvo fino de color café oscuro con olor cítrico e higroscópico (Figura 24).

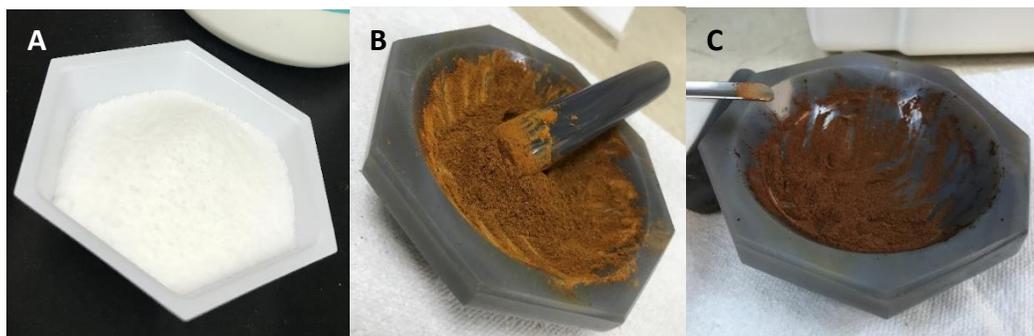


Figura 24. Apariencia de los materiales en polvo: A) ácido cítrico (precursor) en color blanco, B) CD pH 4 en color naranja oscuro y C) CD pH 7 en color café oscuro. Ambos CD muestran ser higroscópicos.

5.2 Conjugación de puntos cuánticos de carbono con transferrina e iBACE1

Los puntos cuánticos de carbono (CD) neutralizados a pH 7 se conjugaron mediante esterificación con holo-transferrina (T) y un péptido inhibidor de BACE1 ($i\beta$) para obtener los conjugados de CD-T, CD- $i\beta$ y CD-T $i\beta$. Las soluciones obtenidas de la conjugación mostraban un color dorado brillante y el polvo obtenido de su liofilización era de color beige.

5.3 Caracterización de los puntos cuánticos de carbono conjugados

5.3.1 Morfología y tamaño de los CD conjugados: TEM, AFM y DLS

En las imágenes por TEM se observa que los puntos cuánticos de carbono (CD) tienen forma esférica (Figura 25). Los CD de pH4 tienen un tamaño de 12.16 ± 1.65 nm (Figura 25-A), mientras que los CD de pH7 tienen un tamaño de 12.15 ± 0.8 nm (Figura 25-B). En las imágenes de TEM no se observan diferencias en la morfología y el tamaño entre los CD a distintos pH.

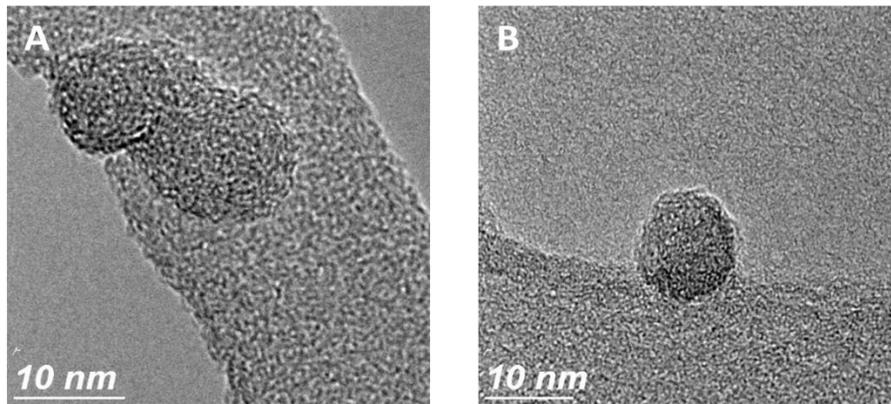


Figura 25. Morfología por TEM de A) CD pH 4 y B) CD pH 7. Con ambos pH se observa una morfología esférica y un tamaño aproximado de 12 nm. Barra de referencia: 10 nm.

Los CD conjugados tienen una gran variabilidad de tamaños por TEM (Tabla 3), los cuales son >10 nm ya que tienden a aglomerarse. Los CD-T muestran una morfología multiforme con un halo transparente alrededor de las nanopartículas (Figura 26-A), lo cual hace que aumente su tamaño a 118.6 ± 33.4 nm y se formen aglomerados. Los CD-i β son esféricos (Figura 26-B) y de un tamaño promedio de 35.8 ± 14.9 nm. Los CD-Ti β son esféricos (Figura 26-C) y muestran un tamaño promedio de 64.9 ± 28.6 nm.

En las imágenes de topografía de AFM se observan aglomerados de los CD conjugados, correspondientes a mayores alturas y diámetros (Figura 56). Los conjugados de CD-Ti β muestran más aglomerados, mientras que los de CD-T y CD-i β tienen menos aglomerados y se pueden distinguir esferas pequeñas y dispersas. Los CD pH4 tienen una altura de 6.54 ± 1.2 nm y un diámetro de 4.6 ± 2.1 nm; los CD pH 7 tienen una altura de 12.7 ± 2.4 nm y un diámetro de 19.3 ± 2.6 nm; los CD-T muestran una altura de 8.7 ± 0.9 nm y un

diámetro de 16.5 ± 1.6 nm; los CD-i β tienen una altura de 9.2 ± 1.5 nm y un diámetro de 22.7 ± 8.5 nm; y los CD-Ti β muestran una altura de 3.0 ± 0.9 nm y un diámetro de 70.9 ± 9.5 nm (Tabla 3). Se observa que el diámetro aumenta al tener la doble conjugación de CD con transferrina y el péptido i β (CD-Ti β).

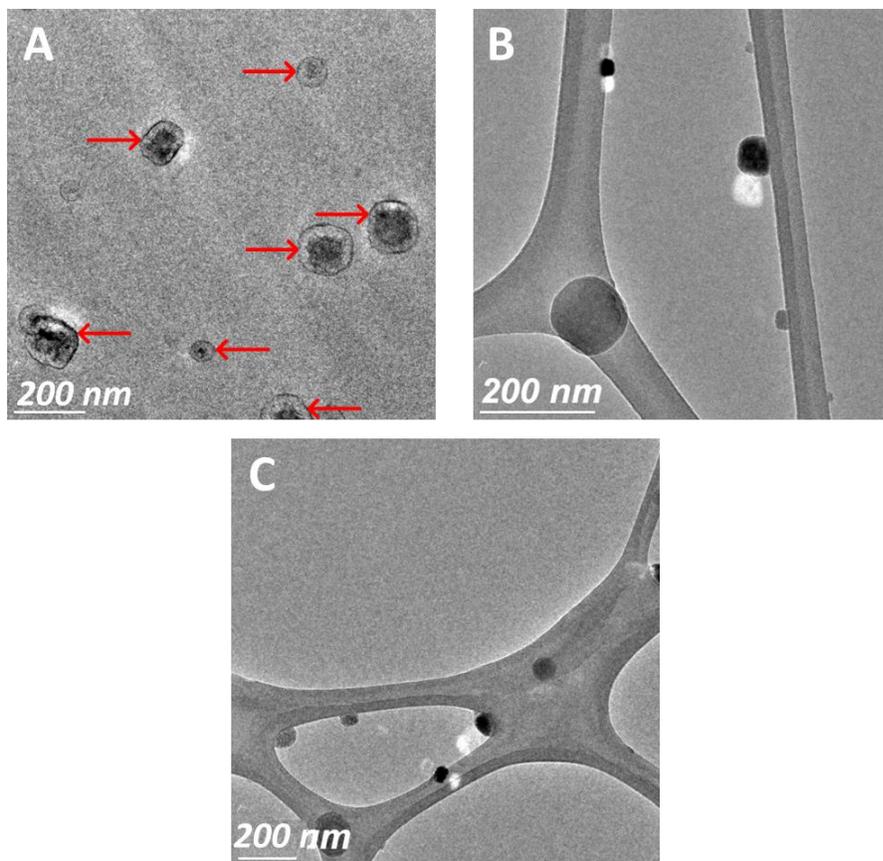


Figura 26. Morfología por TEM de A) CD-T, B) CD-i β , C) CD-Ti β . Los CD conjugados presentan una morfología multiforme y tienden a aglomerarse, presentando tamaños >10 nm. Los CD-T están rodeados de un halo transparente (flechas rojas). Barras de referencia: 200 nm.

El D_h de CD pH4 fue de 55.4 ± 21.7 nm con un índice de polidispersidad (PDI) de 0.4; el D_h de CD pH7 fue de 8.3 ± 2.0 nm con un PDI de 0.7; el D_h de CD-T fue de 16.9 ± 4.5 nm con un PDI de 0.7; el D_h de CD-i β fue de 1.7 ± 0.2 nm en partículas individuales y de 355.3 ± 43.0 nm en aglomerados, con un PDI de 0.4; y el D_h de los CD-Ti β fue de 8.7 ± 1.2 nm con un PDI de 0.6 (Tabla 3). Los CD pH4 y los CD-i β tienden más a aglomerarse y son más heterodispersos en comparación con los CD pH7, CD-T y CD-Ti β , los cuales tienen tamaños más pequeños y son más homodispersos, es decir, sus diferentes poblaciones no difieren tanto en su tamaño (Figura 57).

Tabla 3. Tamaño promedio de puntos cuánticos de carbono y conjugados: TEM, AFM y diámetro hidrodinámico (D_h)

	TEM	AFM		D_h
		Altura	Diámetro	
CD pH4	12.16 ± 1.65 nm	6.54 ± 1.23 nm	4.6 ± 2.1 nm	55.4 ± 21.7 nm
CD pH7	12.15 ± 0.8 nm	12.7 ± 2.4 nm	19.3 ± 2.6 nm	8.3 ± 2.0 nm
CD-T	118.6 ± 33.4 nm	8.7 ± 0.9 nm	16.5 ± 1.6 nm	16.9 ± 4.5 nm
CD-iβ	35.8 ± 14.9 nm	9.2 ± 1.5 nm	22.7 ± 8.5 nm	1.7 ± 0.2 nm 355.3 ± 43.0 nm
CD-Tiβ	64.9 ± 28.6 nm	3.0 ± 0.9 nm	70.9 ± 9.5 nm	8.7 ± 1.2 nm

5.3.2 Carga eléctrica superficial de los CD conjugados: potencial ζ

El potencial ζ se midió para determinar la tendencia de los CD a dispersarse o aglomerarse, de acuerdo a su carga eléctrica superficial. En PBS 1x y a un pH de 7.4; los CD pH 4 tienen una carga de -23.6 ± 0.1 mV, los CD pH 7 de -12.9 ± 1.3 mV, los CD-T de -16.2 ± 1.1 mV, los CD-iβ de -23.8 ± 1.4 mV y los CD-Tiβ de -12.5 ± 1.2 mV (Figura 27), lo cual hace que tiendan a aglomerarse. Podemos ver que los CD-iβ tienden a hacerse más negativos y muestran diferencias significativas al compararlos con los CD y CD-Tiβ. Las comparaciones entre CD, CD-T y CD-Tiβ no fueron significativas, lo cual demuestra que tienen cargas superficiales similares a pesar de estar conjugados.

En contraste, el potencial ζ de los CD muestra un comportamiento diferente al medirse en NaCl 0.01 M y a diferentes pH. Con NaCl a un pH 7, el potencial ζ de los CD pH 4 es de -62.1 ± 2.4 mV, el de CD pH 7 es de -64.4 ± 10.2 mV y el de CD-T es de -30.6 ± 1.6 mV (Figura 28). Estos resultados nos demuestran que en NaCl a pH 7 los CD tienden a dispersarse mejor que con PBS 1x, ya que presentan cargas superficiales muy negativas, menores a -30 mV, las cuales son cada vez más negativas al acercarse a un pH neutro. Los conjugados de CD-T tienen un punto isoeléctrico a pH 4 y se observa que las proteínas hacen más positiva su carga superficial, siendo el efecto contrario al observado en PBS 1x.

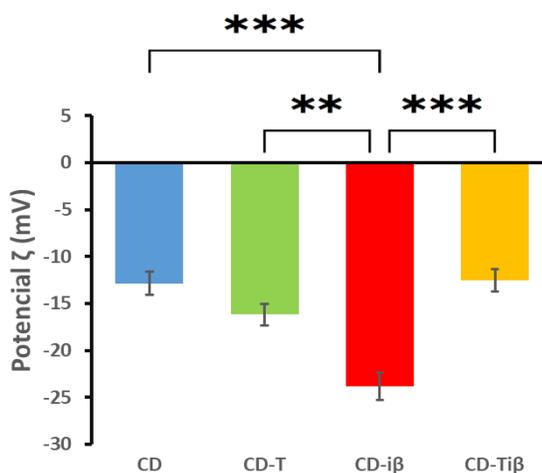


Figura 27. Potencial ζ de CD (azul), CD-T (verde), CD-i β (rojo) y CD-Ti β (amarillo) en PBS 1x a pH 7.4. Los CD y CD conjugados tienen cargas eléctricas negativas entre 0 y -30 mV, lo cual las hace aglomerarse. Los CD-i β tienen una carga más negativa, mientras que los CD-T y CD-Ti β tienen una carga similar a los CD a pesar de estar conjugados. Las barras negras representan la desviación estándar de la media (\pm), $n=3$ por grupo. ANOVA de una vía con comparaciones múltiples de Tukey con una $p < 0.005$ (**) y $p < 0.0005$ (***) al compararse con CD-i β .

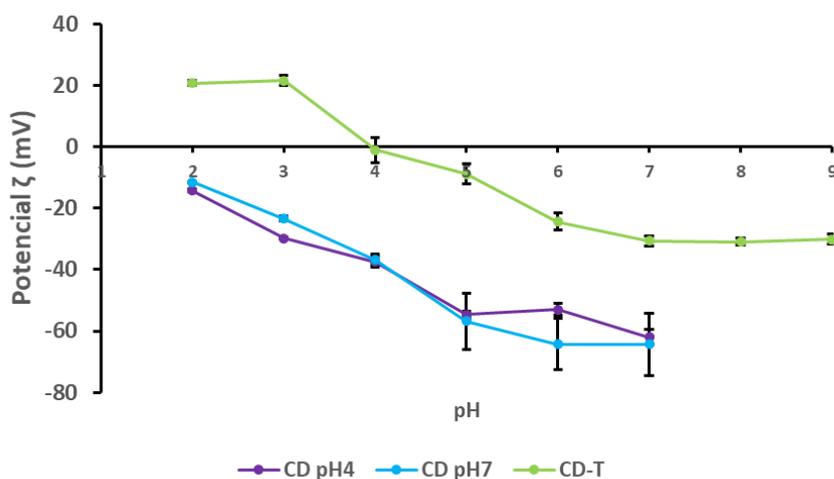


Figura 28. Efecto del pH y el medio en el potencial ζ de CD pH 4 (morado), CD pH 7 (azul) y CD-T (verde). Mediciones en NaCl 10 mM a distintos pH. La transferrina en los CD-T hace que su carga eléctrica sea más positiva y se observa un punto isoeléctrico a pH 4. En NaCl y a pH neutro los CD y CD-T son más negativos y dispersos. Las barras negras representan la desviación estándar de la media (\pm), $n=3$ por grupo.

5.3.3 Espectros de fluorescencia de los CD conjugados

Con la espectroscopía de fluorescencia se comprobó que los CD sintetizados tienen la propiedad de emitir fluorescencia. Un espectro de excitación se realizó para conocer la longitud de onda de excitación (λ_{ex})

óptima, a longitudes de onda de emisión (λ_{em}) desde 400 hasta 600 nm. La fluorescencia de los CD de pH 4 tiene una intensidad máxima a una λ_{ex} de 392 nm, mientras que la de los CD de pH 7 se encuentra a 374.2 nm. Por lo que, los CD de pH 7 se excitan a longitudes de onda menores y con una intensidad de fluorescencia mayor que la de los CD pH 4, a una λ_{em} de 450 nm (Figura 29).

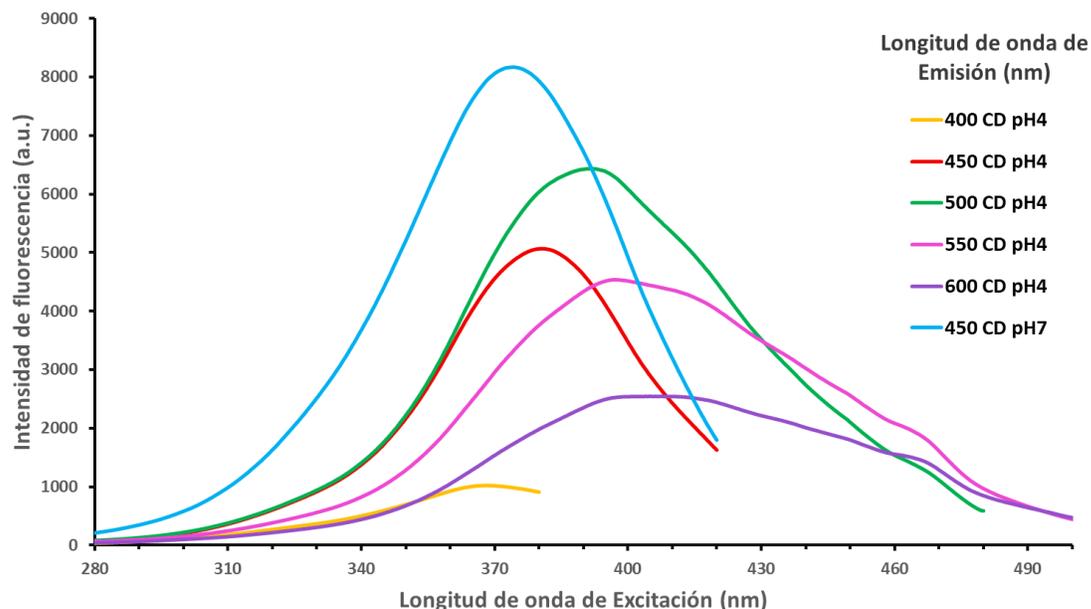


Figura 29. Espectro de excitación de CD a pH 4 (curva amarilla, roja, verde, rosa y morada) y pH7 (curva azul) con longitudes de onda de emisión (λ_{em}) de 400-600 nm. Los CD pH7 se excitan a longitudes de onda menores y con una intensidad de fluorescencia mayor que la de los CD pH4.

Con base en estos resultados se realizó un espectro de emisión de los CD para conocer la longitud de onda a la cual emiten mayor fluorescencia, con longitudes de onda de excitación alrededor de los 380 nm. A una λ_{ex} de 380 nm los CD de pH 4 tienen una intensidad de fluorescencia máxima a una λ_{em} de 476.4 nm y la de CD de pH 7 está a 470.4 nm (Figura 30). Los CD de pH 7 muestran una emisión de fluorescencia con mayor intensidad que la de los CD de pH 4, al ser excitados a una λ_{ex} de 380 nm. Asimismo, se observa que la intensidad de fluorescencia de emisión decrece al aumentar la longitud de onda de excitación por arriba de 380 nm. Ambas longitudes de onda de emisión corresponden a una fluorescencia en color cian en el espectro de luz visible (Figura 31).

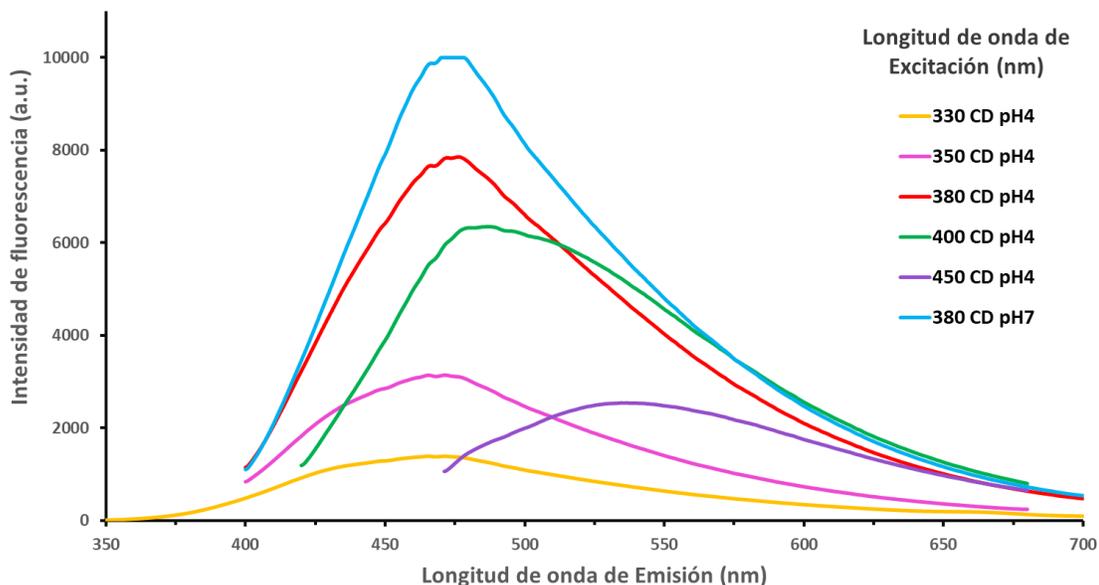


Figura 30. Espectro de emisión de CD a pH 4 (curva amarilla, rosa, roja, verde y morada) y pH7 (curva azul) con longitudes de onda de excitación (λ_{ex}) de 330-450 nm. Al ser excitados a una λ_{ex} de 380 nm, los CD de pH 7 (curva azul) muestran una emisión de fluorescencia con mayor intensidad que la de los CD de pH 4 (curva roja).

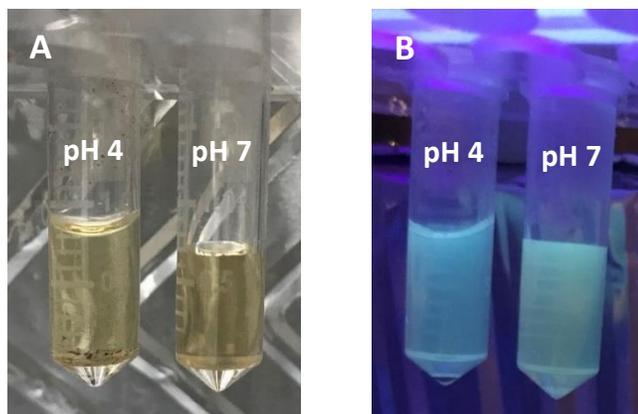


Figura 31. Evidencia de la fluorescencia de los CD a pH 4 y pH 7, al estar A) sin lámpara UV y B) con lámpara UV. Los CD emiten fluorescencia en color cian del espectro visible, aunque a pH 7 tienden a acercarse al verde.

Con los resultados obtenidos se analizó la intensidad de fluorescencia de los CD pH7 (CD) y los CD conjugados, a una λ_{ex} de 380 nm y una λ_{em} de 470 nm, para ver si el recubrimiento de los nanomateriales modificaba esta propiedad. La intensidad de fluorescencia de los CD conjugados disminuye en más del 50% al compararlos con la fluorescencia de los CD, la cual se considera como el 100%. Los CD-T disminuyen

su fluorescencia a 33.8 %, los CD-i β a 30.2% y los CD-Ti β a 30.3%; la fluorescencia de los tres CD conjugados es diferente significativamente al compararla con la de los CD (Figura 32).

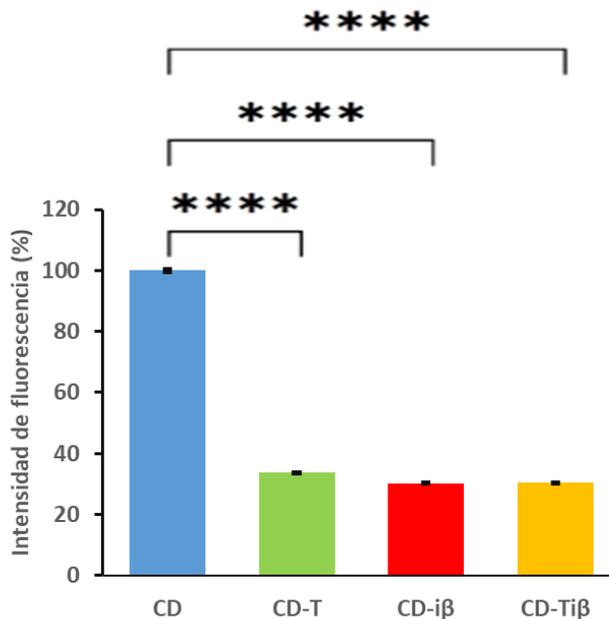


Figura 32. Fluorescencia de CD (azul), CD-T (verde), CD-i β (rojo) y CD-Ti β (amarillo) a una λ_{ex} de 380nm y λ_{em} de 470 nm. La emisión de fluorescencia disminuye en más del 50% en los CD al estar conjugados. Las barras negras representan la desviación estándar de la media (\pm), n=3 por grupo. ANOVA de una vía con comparaciones múltiples de Tukey, con $p < 0.0001$ (****) al comparar contra CD.

5.3.4 Propiedades superficiales de los CD mediante FTIR

Con espectroscopía FTIR se identificaron los picos en los espectros de CD, que corresponden a las vibraciones moleculares de los grupos carboxilos en su superficie y los grupos amino de las proteínas, necesarios para la conjugación. Para poder comparar, se midió el espectro del precursor usado para la síntesis, el ácido cítrico, la transferrina (T) y los CD conjugados (Figura 33). En el espectro de transmitancia con FTIR del ácido cítrico se observó una banda entre 3579-3200 cm^{-1} que corresponde a los enlaces de hidrógeno y grupos hidroxilo (-OH), mientras que los picos en 1728, 1691 y 1392 cm^{-1} corresponden a los grupos carbonilo (C=O y C-O-H).

El espectro de transmitancia mediante FTIR (Figura 33) muestra que la transferrina tiene picos en 1514 y 1383 cm^{-1} que corresponden a grupos carbonilo (C-O-H); un pico en 1633 cm^{-1} identificado como aminas primarias (-NH); y un pico en 1235 cm^{-1} de éteres aromáticos (-O), que corresponde con los aminoácidos

aromáticos de la proteína. En el espectro de los CD se detectaron picos en 1549 y 1384 cm^{-1} correspondientes a grupos carbonilo (C-O-H), los cuales se relacionan con los grupos carboxilo en su superficie. En el espectro de los CD-T se identificó un pico en 1646 cm^{-1} que corresponde con aminas primarias y amidas (-NH), picos en 1550 cm^{-1} y 1383 cm^{-1} correspondientes con los grupos carbonilo (C-O-H) y un pico en 1228 cm^{-1} de éteres aromáticos (-O), de los aminoácidos aromáticos. En el espectro de CD-i β se muestran picos de aminas primarias y amidas en 1651 cm^{-1} , de grupos carbonilo en 1564 cm^{-1} y 1383 cm^{-1} , y de éteres aromáticos (-O) en 1235 cm^{-1} . Finalmente, en el espectro de CD-Ti β se identificaron picos de aminas primarias y amidas en 1646 cm^{-1} , de grupos carbonilo en 1558 cm^{-1} y 1393 cm^{-1} , y de éteres aromáticos (-O) en 1229 cm^{-1} . Los picos de amida de los CD conjugados se relacionan con los enlaces tipo amida que se forman en la conjugación, entre los grupos carboxilo de los puntos cuánticos de carbono y las aminas primarias de la transferrina y/o el péptido inhibidor de BACE1.

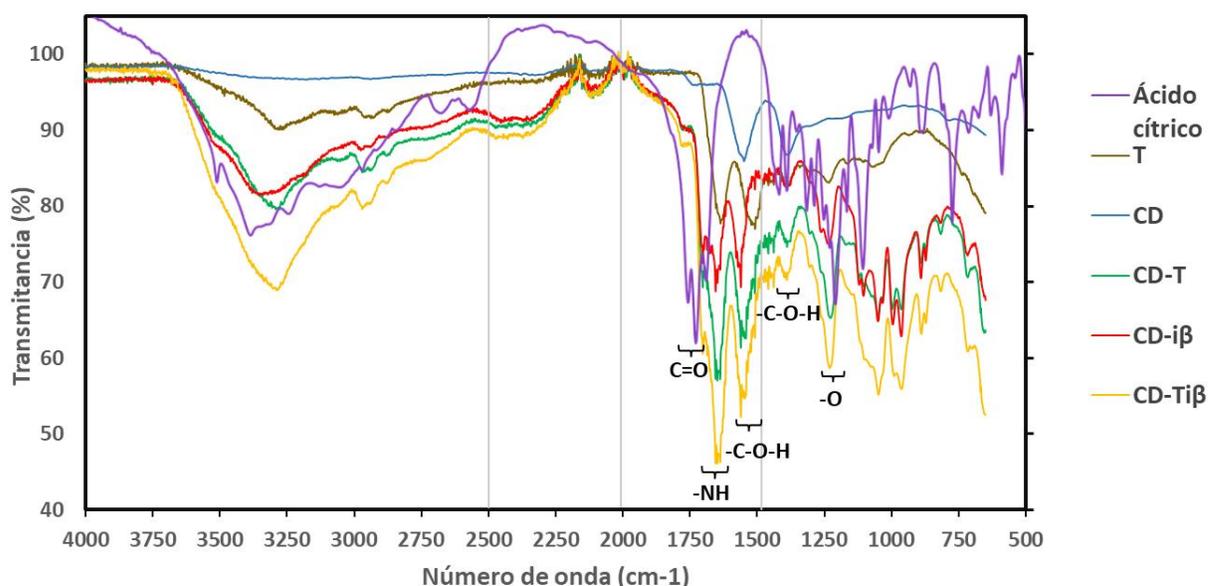


Figura 33. Espectro de transmitancia con FTIR de ácido cítrico (morado), transferrina (T, café), CD (azul), CD-T (verde), CD-i β (rojo) y CD-Ti β (amarillo). En los CD y el ácido cítrico (su precursor) se observan picos de carbonilo. En la T y los CD conjugados se observan los picos relacionados con los grupos carboxilo y aminas primarias de los enlaces amida formados en la conjugación.

5.3.5 Detección de proteínas en los CD conjugados mediante SDS-PAGE

Mediante SDS-PAGE se comprobó la presencia de las proteínas conjugadas con los puntos cuánticos de carbono. En la Figura 34 se muestra el mismo gel de poliacrilamida observado con un filtro de SYBR-Green para ver la fluorescencia de los CD y con tinción de azul de Coomassie para identificar a las proteínas. Por

fluorescencia se observan bandas fluorescentes sólo en los CD-Ti β y CD-T a la altura del estándar fluorescente de transferrina a 75 kDa. Con la tinción de Coomassie se demuestra la presencia de proteínas en los conjugados de CD-T a 74 kDa y en los CD-Ti β a 82 kDa, las cuales corresponden a la transferrina en los conjugados. La señal de fluorescencia de los CD y la de transferrina se traslapan, por lo que se comprueba que la transferrina está presente en los conjugados de CD-T y CD-Ti β . En los CD y CD-i β no se observan bandas ya que los CD y el péptido i β son de un peso molecular menor al detectado por los geles: \sim 2.4 kDa y 1.6 kDa respectivamente.

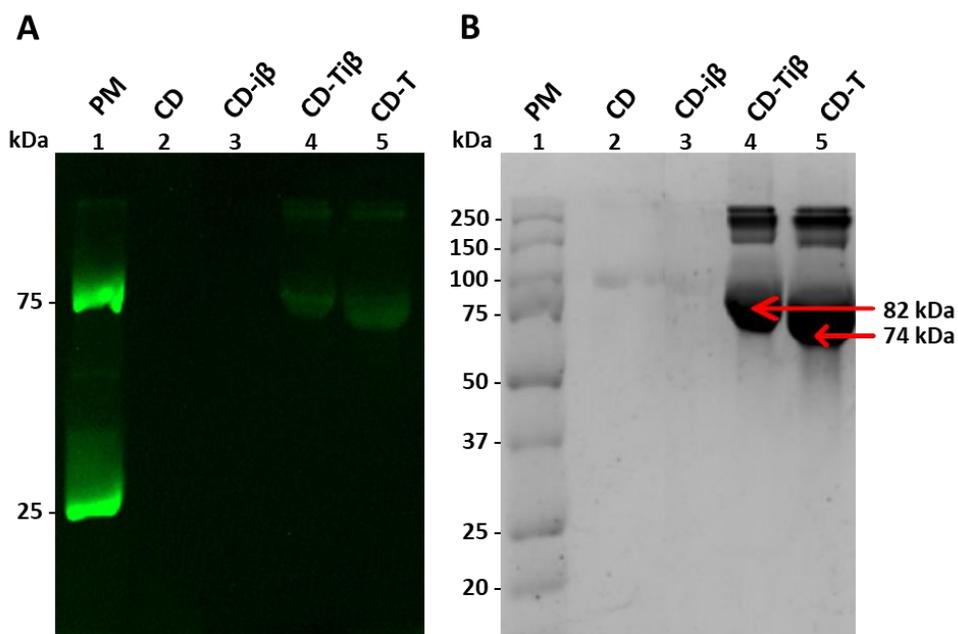


Figura 34. Detección de CD y proteínas en los CD conjugados mediante SDS-PAGE. A) Fluorescencia con el filtro SYBR-Green. B) Tinción con azul de Coomassie. Las flechas rojas indican el peso molecular (PM) en kDa de la banda inferior de cada carril. La escalera de PM (carril 1) tiene un estándar de transferrina a 75 kDa y de quimiotripsinógeno a 25 kDa. En los CD-T (carril 5) y CD-Ti β (carril 4) se traslapa la señal de fluorescencia de los CD con la banda de transferrina de los conjugados, comprobando que la transferrina está unida a los CD. En los CD (carril 2) y CD-i β (carril 3) no se presenta fluorescencia ni banda de proteína, porque su tamaño es menor al detectado por los geles.

5.3.6 Cuantificación de proteína en los CD conjugados mediante Micro-BCA

Con lo anterior, comprobamos que las proteínas estaban presentes en los CD conjugados, pero para detectar cuantitativamente la concentración de proteína conjugada se realizó un ensayo de Micro-BCA. La concentración de proteína en los CD-T fue de $10.4 \pm 0.68 \mu\text{g/mL}$, la cual corresponde a transferrina; en los CD-i β es de $8.5 \pm 0.07 \mu\text{g/mL}$ y corresponde al péptido inhibidor de BACE1; y en los CD-Ti β es de $10.5 \pm$

0.71 $\mu\text{g}/\text{mL}$, siendo la combinación de transferrina y el péptido $i\beta$ conjugados a los CD (Figura 35). Los CD-T y CD-Ti β muestran diferencias significativas al compararlos con CD- $i\beta$, pero no son diferentes entre ellos. Los CD se analizaron para determinar la ausencia de proteína y usarse como blanco. También, la concentración de transferrina (T) se cuantificó como referencia, a la misma concentración agregada inicialmente en la reacción de conjugación (8 mg/mL), obteniendo una concentración de $6.3 \pm 0.11 \mu\text{g}/\text{mL}$.

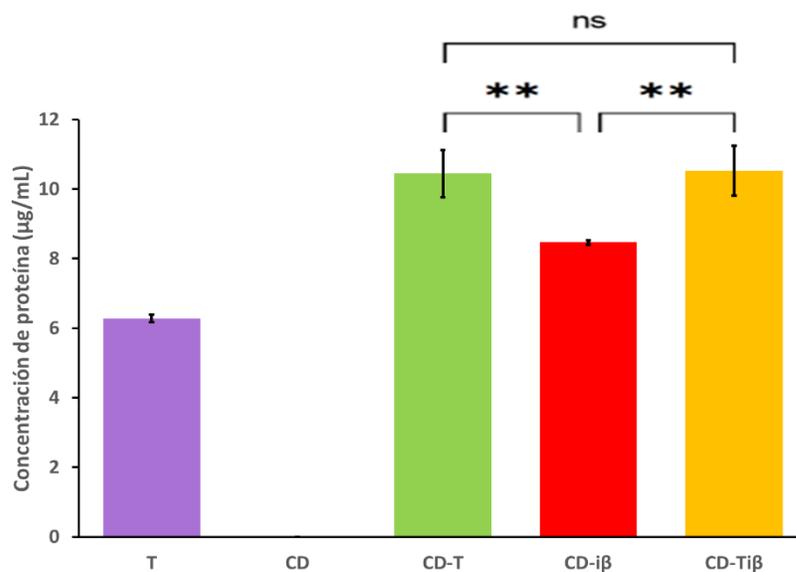


Figura 35. Cuantificación proteica con micro-BCA en los conjugados de CD-T (verde), CD- $i\beta$ (rojo) y CD-Ti β (amarillo). Con CD como control negativo de proteína y transferrina (T, morado) como referencia de la proteína agregada a los CD conjugados. En los CD conjugados se comprueba la presencia de proteína en una concentración entre 8.5-10.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las barras negras representan la desviación estándar de la media (\pm), $n=3$ por grupo. ANOVA de una vía con comparaciones múltiples de Tukey con $p < 0.005$ (**) y comparaciones no significativas (ns) entre los CD conjugados.

5.4 Síntesis de hidrogeles

Los hidrogeles sintetizados adoptan la forma cilíndrica de las placas de 96 pozos, son transparentes, estables a su manipulación, ya que no se rompen al doblarse sobre sí mismos. Al agregar los CD conjugados y formar los nanocompuestos, el color de los hidrogeles cambia a un amarillo claro y se observa fluorescencia en cian al exponerlos a luz UV (Figura 36). Los parámetros de síntesis de hidrogeles de GelMA se estandarizaron. Para la metacrilación de gelatina se usó anhídrido metacrílico a 0.1mL/g (MA/Gelatina), gelatina al 10% m/v y se realizó con ajuste de pH a 9, a 50 °C por 3h. Para el fotoentrecruzamiento se usó GelMA al 10% m/v y LAP al 0.1% m/v, expuestos a luz UV-A durante 60 s.

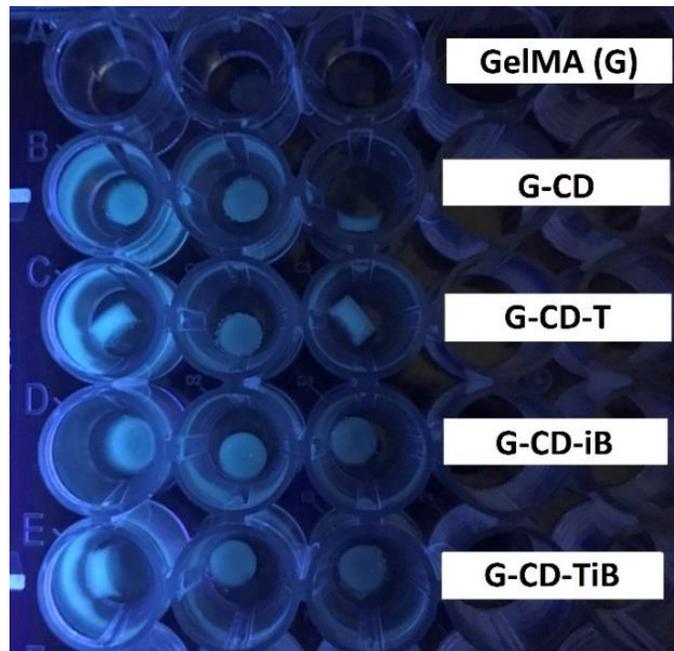


Figura 36. Nanocompuestos expuestos a luz UV. Hidrogeles de GelMA (G, pozos A₁₋₃) se observan transparentes y sin fluorescencia. Los nanocompuestos de G-CD (pozos B₁₋₃), los G-CD-T (pozos C₁₋₃), los G-CD- i β (pozos D₁₋₃) y los G-CD-Ti β (pozos E₁₋₃) tienen fluorescencia en cian.

5.5 Evaluación de los nanocompuestos de hidrogeles con CD conjugados

Los nanocompuestos de hidrogeles de GelMA y los distintos CD conjugados (Figura 21 y Figura 36) se sintetizaron para evaluar si la presencia de CD conjugados modifica la microestructura y las propiedades de los hidrogeles, para proponer su aplicación como sistemas de entrega de fármacos.

5.5.1 Microestructura: porosidad y conectividad

Mediante microtomografía computarizada (microTC) se analizó la microestructura de los hidrogeles de GelMA (G) y los nanocompuestos, obteniendo parámetros morfométricos relevantes sobre la porosidad, el grosor de la estructura, su densidad y conectividad; los cuales se relacionan con las propiedades de los nanocompuestos evaluadas más adelante. La microestructura de los nanocompuestos se logró reconstruir en representaciones 3D mediante microTC, en donde la estructura de los polímeros entrecruzados se representa en gris y el tamaño de poro, desde 0 hasta 150 μm , se representa con un espectro de colores (Figura 37).

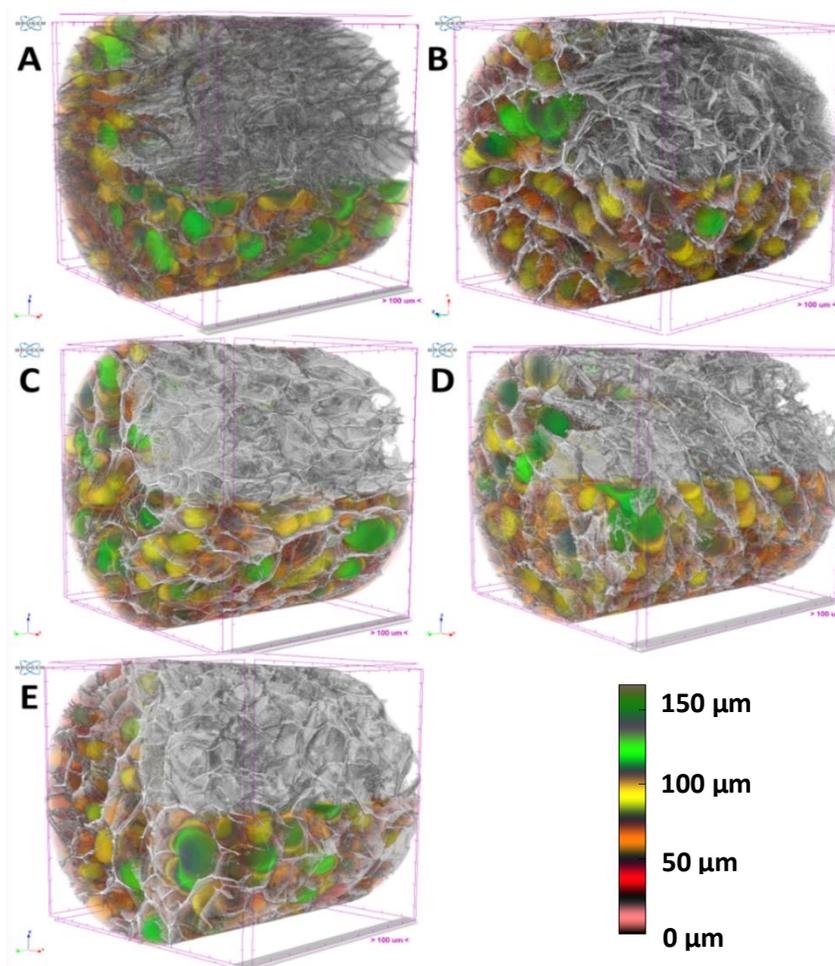


Figura 37. Representación en 3D de la microestructura de los nanocompuestos de hidrogeles y CD conjugados. **A)** Hidrogeles de GelMA (G) y nanocompuestos de **B)** G-CD, **C)** G-CD-T, **D)** G-CD-i β , **E)** G-CD-Ti β . La estructura se representa en color gris y el tamaño de poro en distintos colores de acuerdo a la barra de referencia de 0-150 μm . La estructura de los hidrogeles se conserva y se observa mayor cantidad de poros de 51-100 μm . Imágenes obtenidas por microtomografía computarizada.

En la Figura 38 se presenta el análisis de la microestructura de los nanocompuestos con base en el microtomografía computarizada. La distribución del tamaño de poro (Figura 38-A) muestra que, en los hidrogeles de GelMA (G) y en todos los nanocompuestos, los poros de 51-100 μm son el tamaño más frecuente; siendo en G del 42.9%, en G-CD del 50.1%, en G-CD-T del 42.9%, en G-CD-i β del 49.4% y en G-CD-Ti β del 45.3%. Al conocer esta frecuencia, se calculó el tamaño promedio del poro (Figura 38-B), el cual en los hidrogeles de G es de 80.6 μm , en los G-CD es de 64.4 μm , en los G-CD-T es de 79.9 μm , en los G-CD-i β es de 63.9 μm y en los G-CD-Ti β es de 59.5 μm . No se observan diferencias significativas entre los tamaños promedio del poro de los hidrogeles de G y los nanocompuestos, aunque en los hidrogeles de G se observan poros más grandes y en el nanocompuesto de G-CD-Ti β los poros son más pequeños. El grosor

de la estructura en los hidrogeles de G es de $2.8 \mu\text{m}$ y en los nanocompuestos este grosor aumenta casi al doble, aunque no se observan diferencias significativas entre ellos (Figura 38-C). La estructura en los nanocompuestos G-CD tiene un grosor de $4.8 \mu\text{m}$, en los G-CD-T es de $5.6 \mu\text{m}$, en los G-CD-i β es de $5.3 \mu\text{m}$ y en los G-CD-Ti β es de $5.4 \mu\text{m}$.

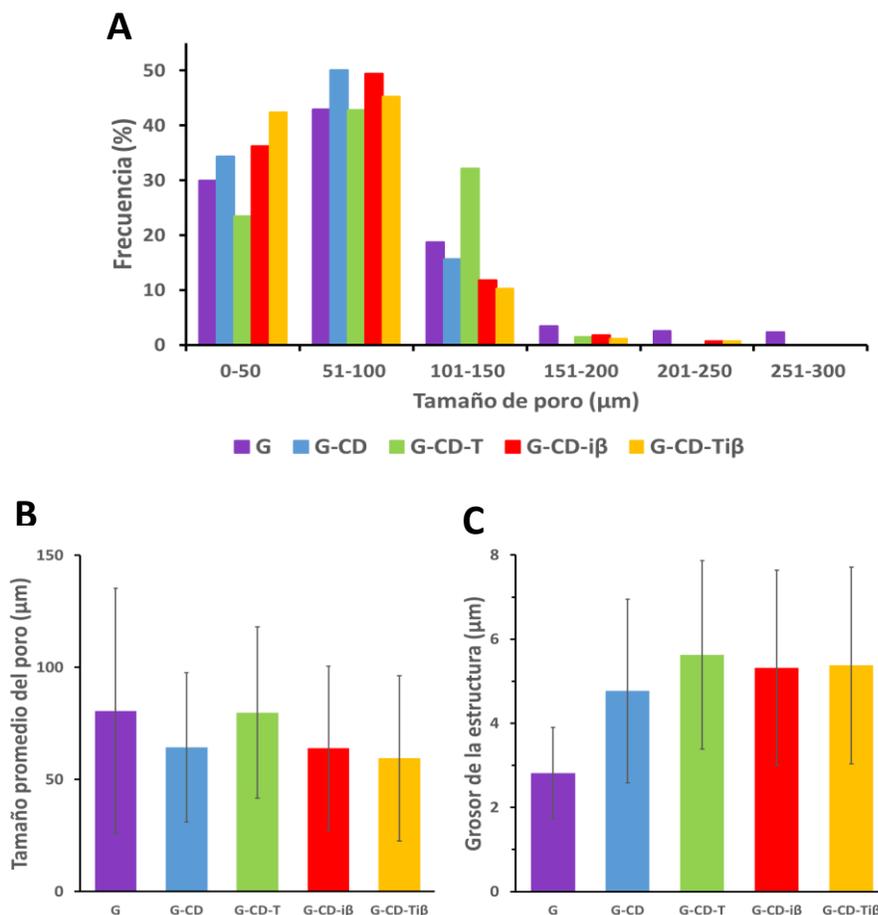


Figura 38. Microestructura de los nanocompuestos. **A)** Distribución del tamaño de poro **B)** Tamaño promedio del poro y **C)** grosor de la estructura. En las gráficas se muestran los hidrogeles de GelMA (G, morado), G-CD (azul), G-CD-T (verde), G-CD-i β (rojo) y G-CD-Ti β (amarillo). La mayoría de los poros en todos los nanocompuestos y los hidrogeles G son de tamaño entre 51-100 μm de tamaño. El grosor de la estructura de los hidrogeles aumenta al doble con la presencia de CD y CD conjugados. Las barras negras representan la desviación estándar de la media (\pm) de todos los poros y grosor de estructura de cada nanocompuesto. El análisis de ANOVA de una vía con comparaciones múltiples de Tukey no muestra diferencias significativas al comparar los nanocompuestos con los hidrogeles G.

El resto de parámetros morfométricos de los nanocompuestos se compararon usando como referencia los valores de los hidrogeles de GelMA (G) (Tabla 4). La densidad lineal de la estructura disminuye en los nanocompuestos de G-CD, G-CD-T y G-CD-i β , pero se mantiene e incluso aumenta un poco en los G-CD-

Ti β , al compararlos con los hidrogeles de G. La densidad de conectividad disminuye en todos los nanocompuestos al compararlos con los hidrogeles de G. El porcentaje de porosidad total y de poros abiertos disminuye un poco en los nanocompuestos, aunque se mantiene alrededor del 90%. El porcentaje de poros cerrados y el volumen de los poros (abiertos y cerrados) disminuyen en los nanocompuestos a menos de la mitad de los valores observados en los hidrogeles de G.

En cambio, al comparar los nanocompuestos que tienen CD conjugados (G-CD-T, G-CD-i β y G-CD-Ti β) con el nanocompuesto de CD sin conjugaciones (G-CD), se observó el efecto contrario. Los valores de densidad lineal de la estructura, el porcentaje de poros cerrados y el volumen de los poros aumentan al tener CD conjugados en los nanocompuestos (Tabla 4).

Tabla 4. Parámetros morfométricos de los nanocompuestos de G, G-CD, G-CD-T, G-CD-i β y G-CD-Ti β , obtenidos por microtomografía computarizada. G: hidrogeles de GelMA. G-CD: hidrogeles con CD. G-CD-T: hidrogeles con CD conjugados con transferrina (T). G-CD-i β : hidrogeles con CD conjugados con el péptido i β . G-CD-Ti β : hidrogeles con CD conjugados con transferrina y el péptido i β .

Parámetros	G	G-CD	G-CD-T	G-CD-i β	G-CD-Ti β
Densidad lineal de la estructura (1/mm)	21.98 (100%)	17.34 (78.9%)	17.83 (81.1%)	18.82 (85.6%)	22.95 (104.4%)
Densidad de conectividad (1/mm ³)	1,920,600 (100%)	520,660 (27.1%)	413,990 (21.6%)	506,530 (26.4%)	708,420 (36.9%)
Porosidad total (%)	93.81	91.74	89.97	89.99	87.67
Poros abiertos (%)	93.79	91.73	89.96	89.99	87.66
Poros cerrados (%)	0.25	0.02	0.11	0.05	0.07
Volumen de los poros abiertos (mm ³)	2.29	0.92	1.22	0.93	0.97
Volumen de los poros cerrados ($\times 10^{-4}$ mm ³)	3.75	0.20	1.50	0.53	0.94

5.5.2 Hinchamiento y degradación de los nanocompuestos

En la Figura 39 se muestra la degradación de los nanocompuestos en valores positivos y los valores negativos corresponden al hinchamiento de los mismos. El hinchamiento de los nanocompuestos es muy variable a lo largo del tiempo, manteniéndose estable de las 6-48 h y presentando un pico de hinchamiento a las 72 h previo a su degradación total. Todos los nanocompuestos absorben poco PBS 1x, presentando

un hinchamiento menor al 20%. De las 2-72 h, se observa un mayor hinchamiento de los nanocompuestos G-CD-T, G-CD-i β y G-CD-Ti β ; mientras que los G y G-CD se degradan a partir de las 2 h. Los nanocompuestos G-CD-i β y G-CD-Ti β fueron diferentes significativamente de los G-CD, al presentar un hinchamiento mayor, los cuales se mantienen así hasta las 72 h, con lo cual previnieron su degradación temprana. El hinchamiento máximo de los hidrogeles de G es del 2.7% en la primera hora, el de los nanocompuestos de G-CD es del 4.8% a los 15 min, el de los G-CD-T es del 6.6% en la primera hora, el de G-CD-i β es del 12.3% a las 72 h y el de G-CD-Ti β es del 15.9% a las 72 h; siendo este último el que presenta mayor hinchamiento.

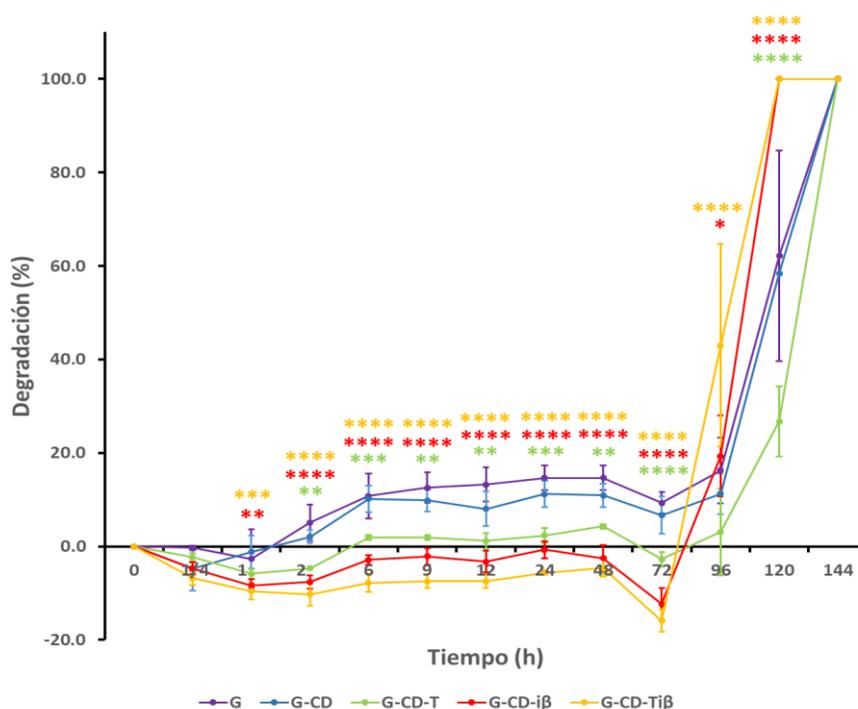


Figura 39. Degradación de los hidrogeles de GelMA (G, morado), G-CD (azul), G-CD-T (verde), G-CD-i β (rojo) y G-CD-Ti β (amarillo). Los hidrogeles G y nanocompuestos G-CD muestran mayor degradación inicial de las 0-72 h, aunque los G-CD-i β y G-CD-Ti β se degradan más rápido al final a las 96 h. Los valores negativos corresponden al hinchamiento de los nanocompuestos. Los nanocompuestos de G-CD-i β y G-CD-Ti β tienen mayor hinchamiento y mantienen su peso inicial de las 0-72 h. Las barras representan la desviación estándar de la media (\pm), $n=3$ por grupo. ANOVA de dos vías con comparaciones múltiples de Tukey con $p < 0.05$ (*), $p < 0.005$ (**), $p < 0.0005$ (***) y $p < 0.0001$ (****). El color de los asteriscos corresponde con las diferencias del grupo con el mismo color, al compararlos con G-CD.

La degradación en todos los nanocompuestos se mantuvo por debajo del 20% de las 0 a las 72 h (Figura 39), observando que los hidrogeles G y los G-CD tienen una degradación inicial mayor en comparación con los demás nanocompuestos. Los nanocompuestos con CD conjugados muestran diferencias significativas a partir de la primera hora, al compararlos con los G-CD, lo cual nos dice que mantienen su estructura y evitan la degradación. A las 96 h, los nanocompuestos de G-CD-i β aumentan su degradación al 19.3% y los

G-CD-Ti β al 43%, mostrando diferencias significativas con respecto a G-CD. A las 120 h, los nanocompuestos de G-CD-T tienen una degradación del 26.7%, siendo diferentes significativamente de los demás. La degradación al 100% de los nanocompuestos se da a las 120 h en los G-CD-i β y G-CD-Ti β , y a las 144h en los G-CD, G-CD-T y los hidrogeles de G. De acuerdo a la constante de rapidez (k), los nanocompuestos G-CD-Ti β (k=7.3) son los que se degradan más rápido, mientras que los G-CD-T (k=4.3) son los que se degradan más lento; como referencia, los hidrogeles de G tienen una k=5.5.

En las primeras 72 h se observó una relación inversamente proporcional entre el hinchamiento y la degradación de los nanocompuestos, ya que los nanocompuestos que más se hincharon fueron los que presentaron menor degradación. Aunque, a partir de las 96 h, esta relación se vuelve directamente proporcional, ya que los nanocompuestos que más se hincharon en las primeras 72 h (G-CD-i β y G-CD-Ti β) fueron los que se degradaron más rápido.

5.5.3 Liberación de puntos cuánticos de carbono desde los hidrogeles

Luego de conocer las propiedades de hinchamiento y degradación de los nanocompuestos, se evaluó la liberación de los CD conjugados desde los hidrogeles en PBS 1x y DMEM. En general, la liberación acumulada de CD conjugados en PBS 1x (Figura 40) es de forma acelerada durante la primera hora, luego presenta una meseta entre las 2-72 h y finalmente, aumenta a partir de las 96h, lo cual se relaciona con el aumento en la degradación de los nanocompuestos observado en la evaluación previa. Los nanocompuestos de G-CD-Ti β liberan el 52.2% de CD-Ti β a las 96 h y los G-CD-i β liberan el 51.2% de CD-i β a las 120 h; en cambio, los G-CD y G-CD-T no llegan a liberar el 50% de sus CD. Aunque, los G-CD-Ti β son los únicos que muestran diferencias significativas en su liberación acumulada a las 120 y 144 h, al compararlos con los G-CD, comprobando que son los mejores en liberar el 50% de los CD.

La cinética de liberación en PBS 1x se analizó con modelos de orden cero y de primer orden para identificar qué tipo de liberación tienen los nanocompuestos y determinar su comportamiento como sistemas de entrega de fármacos. Al comparar ambos modelos (Tabla 5), se demuestra que la liberación en PBS 1x de los CD conjugados desde los nanocompuestos se ajusta mejor a una cinética de primer orden, la cual representa a una liberación sostenida. En el modelo de primer orden (Tabla 5), los nanocompuestos de G-CD tienen una $R^2= 0.92$, los G-CD-T una $R^2= 0.93$, los G-CD-i β una $R^2= 0.86$ y los de G-CD-Ti β una $R^2= 0.86$. De acuerdo con la constante de rapidez de liberación (k) del modelo de primer orden, los nanocompuestos

de G-CD tienen una liberación lenta ($k=0.032$) y los G-CD-Ti β muestran una liberación 2 veces más rápida ($k=0.088$) a las 96 h.

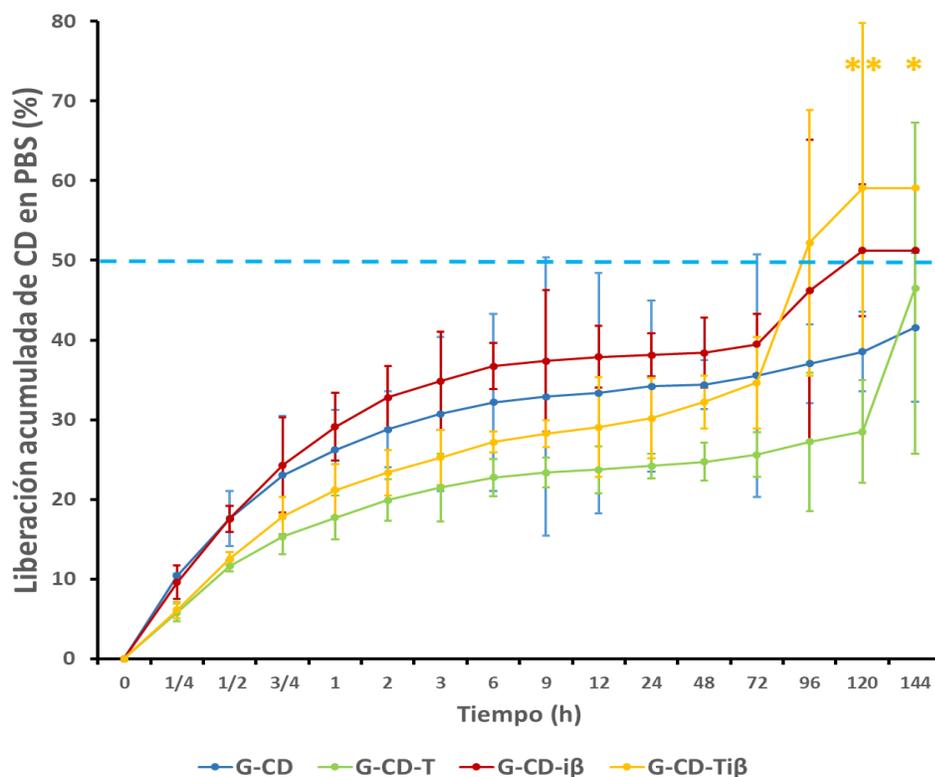


Figura 40. Liberación acumulada en PBS 1x de CD desde los nanocompuestos de G-CD (azul), G-CD-T (verde), G-CD-i β (rojo) y G-CD-Ti β (amarillo). Los G-CD-i β y G-CD-Ti β muestran una liberación rápida a partir de las 96 h y son los únicos que liberan >50% de CD. La cinética de liberación es de primer orden, correspondiente a una liberación sostenida. Línea punteada azul: referencia del 50% de liberación. Las barras representan la desviación estándar de la media (\pm), $n=3$ por grupo. ANOVA de dos vías con comparaciones múltiples de Tukey con $p < 0.05$ (*) y $p < 0.005$ (**). Los asteriscos amarillos corresponden a las diferencias de G-CD-Ti β al compararlos con G-CD.

Tabla 5. Parámetros de cinética de liberación en PBS 1x de los nanocompuestos G-CD, G-CD-T, G-CD-i β y G-CD-Ti β . G-CD: hidrogeles con CD. G-CD-T: hidrogeles con CD conjugados con transferrina (T). G-CD-i β : hidrogeles con CD conjugados con el péptido i β . G-CD-Ti β : hidrogeles con CD conjugados con transferrina y el péptido i β .

MODELO DE ORDEN CERO				
Parámetros	G-CD	G-CD-T	G-CD-i β	G-CD-Ti β
k	2.0753	1.6084	2.7506	3.6824
R^2	0.5454	0.6114	0.6322	0.8006
MODELO DE PRIMER ORDEN				
k	0.0322	0.0397	0.0426	0.0883
R^2	0.9261	0.9295	0.8634	0.8576

De igual manera, la liberación de los CD conjugados desde los hidrogeles se evaluó en DMEM, ya que este medio de cultivo contiene iones, glucosa y proteínas del suero, que se asemejan a los componentes de la sangre en los sistemas biológicos; además, fue el medio de cultivo usado para los modelos in vitro. Un dato experimental que es importante mencionar, es que los nanocompuestos inmersos en DMEM no se degradaron a lo largo del experimento y por ello se evaluaron hasta las 216 h (9 días).

La liberación acumulada de los CD conjugados en DMEM tiene un patrón de liberación exponencial, el cual es diferente al visto en PBS 1x (Figura 41). En DMEM todos los nanocompuestos logran liberar más del 50% de sus CD conjugados. Los nanocompuestos de G-CD-Ti β liberan el 54.3% de CD-Ti β a las 96 h y llegan a liberar hasta un 96.5% a las 216 h; los G-CD-i β liberan el 51.6% de CD-i β a las 120 h; los G-CD-T liberan el 52.9% de CD-T a las 144 h; y los G-CD liberan el 51.3% de CD a las 168 h. Los nanocompuestos de G-CD-Ti β comienzan a ser diferentes significativamente de los G-CD a partir de las 72 h; mientras que, los G-CD-i β lo hacen a partir de las 168 h, comprobando que estos nanocompuestos son los que liberan el 50% de los CD de forma más rápida.

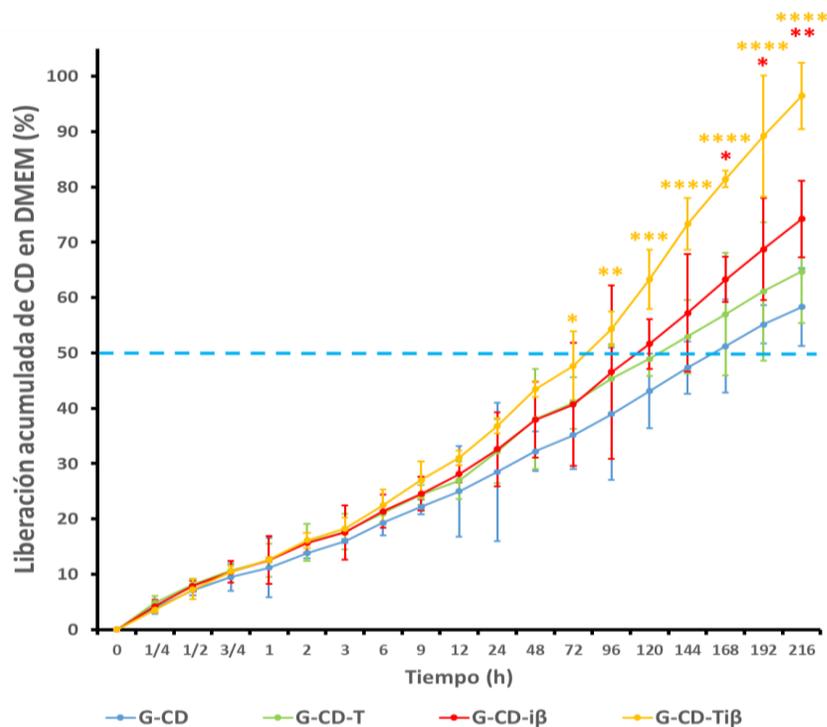


Figura 41. Liberación acumulada en DMEM de CD desde los nanocompuestos de G-CD (azul), G-CD-T (verde), G-CD-i β (rojo) y G-CD-Ti β (amarillo). Los G-CD-Ti β muestran una liberación rápida y son los primeros en liberar >50% de sus CD a las 96 h. Los G-CD tienen una liberación lenta, liberando el 50% de sus CD hasta las 168 h. La cinética de liberación es de orden cero, correspondiente a una liberación controlada. Línea punteada azul: referencia del 50% de liberación de CD. Las barras representan la desviación estándar de la media (\pm), n=3 por grupo. ANOVA de dos vías con comparaciones múltiples de Tukey con $p < 0.05$ (*) y $p < 0.005$ (**). El color de los asteriscos corresponde con las diferencias del grupo con el mismo color, al compararlos con G-CD.

La cinética de liberación en DMEM también se analizó con los modelos de orden cero y de primer orden. Al contrastar ambos modelos (Tabla 6), se determinó que la liberación en DMEM de los CD conjugados desde los nanocompuestos se ajusta a una cinética de orden cero, que corresponde a una liberación controlada en los sistemas de entrega de fármacos. En el modelo de orden cero (Tabla 6), los nanocompuestos de G-CD tienen una $R^2= 0.99$, los G-CD-T una $R^2= 0.99$, los G-CD-i β una $R^2= 0.98$ y los G-CD-Ti β una $R^2= 0.96$. Con la constante de rapidez de liberación (k) del modelo de orden cero, se comprueba que los nanocompuestos de G-CD tienen la liberación más lenta ($k=3.195$) y que los G-CD-Ti β tienen la liberación más rápida ($k=5.255$), lo cual se ve claramente en la Figura 41.

Tabla 6. Parámetros de cinética de liberación en medio DMEM de los nanocompuestos de G-CD, G-CD-T, G-CD-i β y G-CD-Ti β . G-CD: hidrogeles con CD. G-CD-T: hidrogeles con CD conjugados con transferrina (T). G-CD-i β : hidrogeles con CD conjugados con el péptido i β . G-CD-Ti β : hidrogeles con CD conjugados con transferrina y el péptido i β .

MODELO DE ORDEN CERO				
Parámetros	G-CD	G-CD-T	G-CD-iβ	G-CD-Tiβ
k	3.1953	3.5813	4.0044	5.2550
R^2	0.9911	0.9912	0.9791	0.9571
MODELO DE PRIMER ORDEN				
k	0.1398	0.1382	0.1483	0.1702
R^2	0.9359	0.9449	0.9486	0.9513

5.6 Prevalidación de la inhibición de la actividad de BACE1

Luego de evaluar los distintos nanocompuestos y antes de aplicarlos en los modelos *in vitro* de la enfermedad de Alzheimer, se comprobó que el péptido inhibidor de BACE1 (i β) conjugado a los CD tenía el efecto deseado sobre la enzima BACE1. En el ensayo se usó la enzima BACE1 del kit para detectar la actividad de BACE1 como control positivo del 100% de actividad, el sustrato de la BACE1 como control negativo de su actividad y se colocó el péptido i β a 30 nM y 60 nM para ver su efecto inhibitorio (Figura 42). El péptido i β a 30 nM disminuye la actividad de BACE1 al 30.3% (69.7% de inhibición). El péptido i β a 60 nM disminuye la actividad de BACE1 al 8.0% (92% de inhibición). Ambas concentraciones del péptido i β disminuyen la actividad de la enzima BACE1 por debajo del 50% y son diferentes significativamente del control de BACE1 y entre ellas.

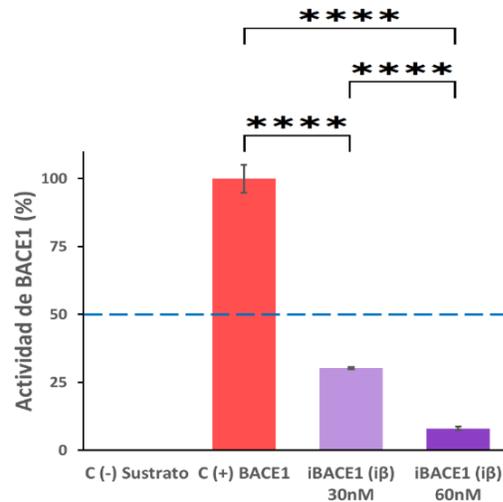


Figura 42. Inhibición de la actividad de BACE1 con un péptido inhibidor de BACE1 (iβ) a 30 (morado claro) y 60 nM (morado oscuro). Enzima BACE1 (rojo) como control positivo de actividad al 100%. Sustrato de BACE1 como control negativo. El péptido iβ a 30 y 60 nM disminuye >50% la actividad de BACE1. Línea punteada azul: referencia del 50% de actividad. ANOVA de una vía con comparaciones múltiples de Tukey con $p < 0.0001$ (***) entre los grupos.

5.7 Modelo *in vitro* de BHE y enfermedad de Alzheimer

Al conocer las concentraciones inhibitorias del péptido iβ y de los CD (Choi et al., 2012; Han et al., 2017) y comprobar que los CD y CD conjugados se liberan de los hidrogeles, se decidió usar en los ensayos *in vitro* las concentraciones de 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CD reportadas (Han et al., 2017). Los nanocompuestos (hidrogeles + CD conjugados) no se usaron en los ensayos *in vitro*, ya que los hidrogeles se propusieron como una opción transdérmica a futuro y su función sería sólo como una matriz para controlar la liberación de los CD conjugados externamente y no directo en cerebro. Luego de que los CD conjugados se liberen y absorban, se espera que viajen por torrente sanguíneo para alcanzar la BHE en cerebro y que ejerzan su acción, tal como lo simulamos en los modelos *in vitro* de BHE y de enfermedad de Alzheimer.

5.7.1 Inducción con escopolamina del modelo *in vitro* de enfermedad de Alzheimer

En los geles de poliacrilamida se muestra la presencia de las proteínas extraídas de las células U-87+Sco del modelo *in vitro* de enfermedad de Alzheimer, que estuvieron expuestas directamente a los CD conjugados. En el control positivo con las células U-87+Sco se observó una banda de 100 kDa, la cual no aparece en el control negativo de células U-87 (Figura 43-A). Estas proteínas podrían corresponder a la APP (PM=100-140 kDa), que es el sustrato de la enzima BACE1. Al igual, la banda de 100 kDa está presente

en las U-87+Sco con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CD, CD-T y CD-Ti β ; la cual aumenta en intensidad 1.7, 1.6 y 1.4 veces respectivamente, con relación a la banda de U-87+Sco (Figura 44). Pero está ausente en los CD-i β .

En las U-87+Sco con 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CD y CD-Ti β se muestra la presencia de una banda de 115 kDa correspondiente con APP (Figura 43-B), la cual en este caso disminuye su intensidad 0.4 y 0.9 veces respectivamente, con relación a la banda de U-87+Sco (Figura 44). Con los conjugados de CD-T y CD-i β no se detectan bandas de proteína. También, se colocaron los medios de cultivo usados en las células, para garantizar que las bandas detectadas correspondían a las proteínas inducidas en el modelo y no a los componentes de los medios de cultivo.

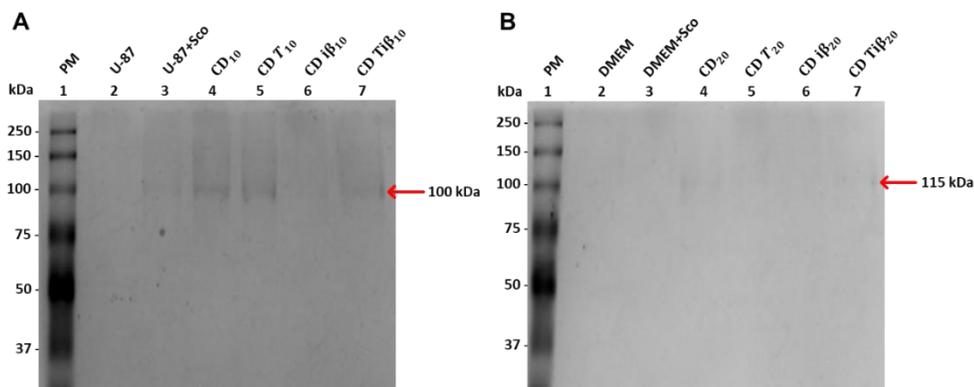


Figura 43. Detección de BACE1 en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al inducir con escopolamina el modelo *in vitro* de enfermedad de Alzheimer en células U-87 MG, tratadas con A) 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y B) 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CD conjugados. Las flechas rojas indican el peso molecular (PM) en kDa de las bandas presentes. Con escopolamina se presenta una banda de 100-115 kDa en U-87+Sco (carril 3-A), que corresponde con la APP. La banda aumenta en intensidad con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CD (carril 4-A), CD-T (carril 5-A) y CD-Ti β (carril 7-A). Tinción con Azul de Coomassie.

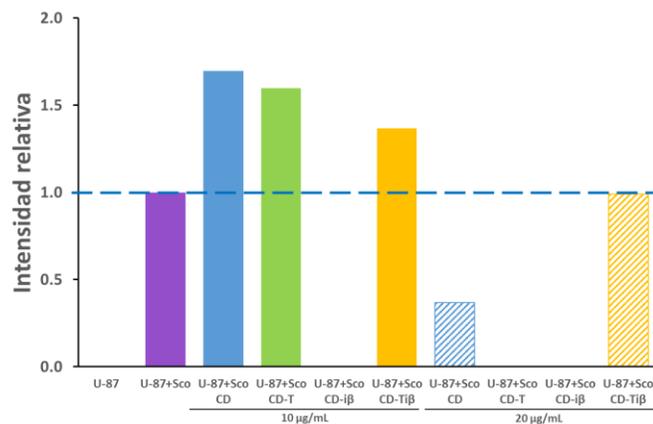


Figura 44. Intensidad relativa de las bandas detectadas en los geles de poliacrilamida de la Figura 43. Considerando como banda de referencia la del control positivo de U-87+Sco (morado) con valor de 1.0 (línea azul punteada). La intensidad de la banda de 100 kDa aumenta con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CD (azul sólido), CD-T (verde sólido) y CD-Ti β (amarillo sólido), mientras que con 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ disminuye o está ausente. Análisis de las bandas con ImageLab-BIO-RAD.

5.7.2 Citocompatibilidad de CD conjugados

Para poder establecer el modelo *in vitro* de BHE y de enfermedad de Alzheimer, se midió la citocompatibilidad de los distintos CD conjugados en las células endoteliales de la microvasculatura cerebral (HBEC 5i) y de glioblastoma con (U87+Sco) y sin escopolamina (U-87), a los mismos tiempos de exposición del experimento en el dispositivo Transwell.

La viabilidad celular de las HBEC se mantiene en valores por arriba del 100%, al exponerse a todos los CD conjugados a 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 45), con lo cual se determina que son citocompatibles. Incluso se observa una viabilidad celular mayor en las células HBEC con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CD-i β del 129.2%, con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CD-Ti β del 119.8% y con 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CD-T del 114.8%; las cuales son significativamente diferentes del control positivo de células HBEC. El resto de comparaciones no fueron significativas, es decir que, los CD conjugados no modifican la viabilidad de las células HBEC. En general, las células HBEC tienen un metabolismo lento, con valores de reducción de resazurina del 32.9%, la cual se consideró como el 100% de viabilidad. El control negativo de muerte con DMSO reduce el 7.9% de resazurina, que corresponde al 24.2% de viabilidad celular. Los CD conjugados aumentan ligeramente el metabolismo de las células HBEC.

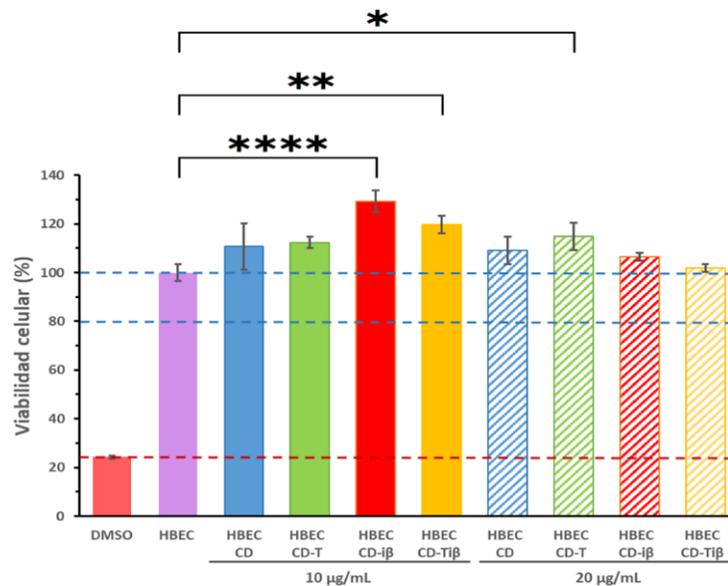


Figura 45. Viabilidad celular de HBEC 5i (endotelio vascular cerebral humano) al estar en contacto con CD (azul), CD-T (verde), CD-i β (rojo) y CD-Ti β (amarillo) a 10 (color sólido) y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (color rayado). Células HBEC sin nanomateriales como control positivo (morado). DMSO como control negativo (rojo opaco sólido). Líneas azules punteadas: rango aceptable de viabilidad. Línea roja punteada: referencia de control de muerte celular. Los CD y CD conjugados a ambas concentraciones muestran ser citocompatibles, al mantener una viabilidad celular por arriba del 100%. Las barras negras representan la desviación estándar de la media (\pm), $n=3$ por grupo. ANOVA de una vía con comparaciones múltiples de Tukey con $p < 0.05$ (*), $p < 0.005$ (**) y $p < 0.0001$ (***) al comparar contra el control de células HBEC.

Por otro lado, las células de glioblastoma (U-87 MG) mantienen su viabilidad celular por arriba del 100% al exponerse a la mayoría de los CD conjugados (Figura 46). Con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CD-i β la viabilidad celular disminuye a 96.2%. y con 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CD disminuye a 98.9%, aunque ambas se mantienen en el rango aceptable de viabilidad celular de 80 a 100%. No se observan diferencias significativas entre los diferentes CD conjugados con ambas concentraciones, al compararse con el control positivo de células U-87 MG, por lo que se determina que son citocompatibles. Las células U-87 MG muestran un metabolismo rápido, con valores de reducción de resazurina del 94%, la cual se considera como el 100% de viabilidad. El control negativo de muerte con DMSO reduce el 12% de resazurina, que corresponde al 12.8% de viabilidad celular.

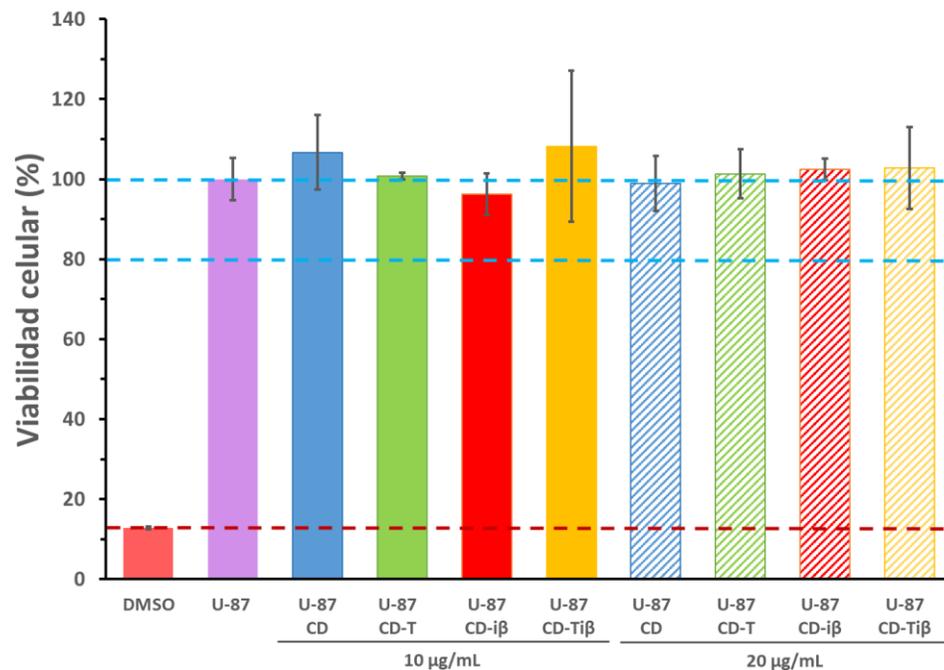


Figura 46. Viabilidad celular de U-87 MG (glioblastoma) al estar en contacto con CD (azul), CD-T (verde), CD-i β (rojo) y CD-Ti β (amarillo) a 10 (color sólido) y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (color rayado). Células U-87 MG sin nanomateriales como control positivo (morado). DMSO como control negativo (rojo opaco sólido). Líneas azules punteadas: rango aceptable de viabilidad. Línea roja punteada: referencia de control de muerte celular. Los CD y CD conjugados a ambas concentraciones muestran ser citocompatibles, al mantener una viabilidad celular del 95-100%. Las barras negras representan la desviación estándar de la media (\pm), $n=3$ por grupo. ANOVA de una vía con comparaciones múltiples de Tukey con diferencias no significativas al comparar contra el control de células U-87 MG.

Considerando el control positivo con U-87 MG del ensayo previo como el 100% de viabilidad celular, las U-87+Sco del modelo *in vitro* de la enfermedad de Alzheimer disminuyen su viabilidad celular al 95% con la presencia de escopolamina (Figura 47), que corresponde al 89.4% de reducción de resazurina. Con todos los CD conjugados en ambas concentraciones se mantiene una viabilidad celular aceptable, dentro del

rango de 80-100% y no se observan diferencias significativas al compararlas con el control positivo de células U-87+Sco, por lo que presentan citocompatibilidad aún con la presencia de escopolamina. Las células U-87+Sco tienen un metabolismo rápido, con valores de reducción de resazurina por arriba del 85%, aunque disminuye en comparación con las células U-87 MG sin escopolamina.

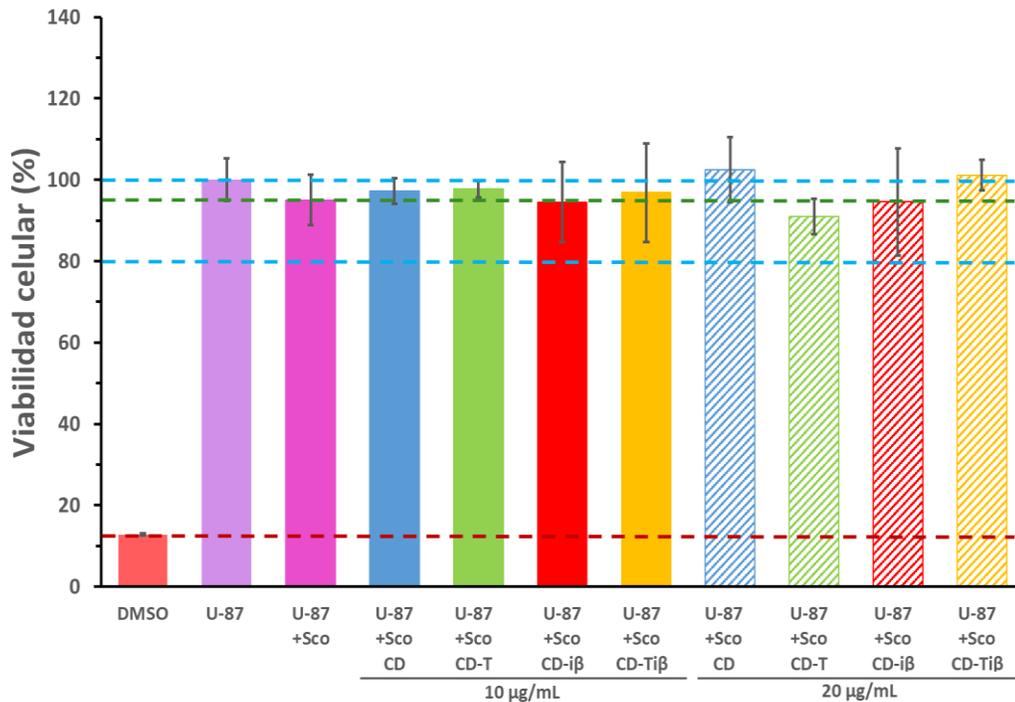


Figura 47. Viabilidad celular de U-87 MG (glioblastoma) después de la inducción con escopolamina (U-87+Sco) y al estar en contacto con CD (azul), CD-T (verde), CD-iβ (rojo) y CD-Tiβ (amarillo) a 10 (color sólido) y 20 µg/mL (color rayado). Células U-87 MG sin nanomateriales como control positivo (morado). DMSO como control negativo (rojo opaco sólido). Líneas azules punteadas: rango aceptable de viabilidad. Línea verde: referencia de viabilidad con escopolamina (Sco). Línea roja punteada: referencia de control de muerte celular. La escopolamina disminuye la viabilidad de las células U-87 MG al 95%. Los CD y CD conjugados a ambas concentraciones muestran ser citocompatibles, al mantener una viabilidad celular del 90-100%. Las barras negras representan la desviación estándar de la media (\pm), $n=3$ por grupo. ANOVA de una vía con comparaciones múltiples de Tukey con diferencias no significativas al comparar contra el control de células U-87+Sco.

5.7.3 Permeabilidad en el modelo *in vitro* de BHE

El modelo *in vitro* de BHE se estableció en un dispositivo Transwell con las membranas de los insertos (poros de 0.4µm) y las células de endotelio vascular cerebral humano (HBEC 5i), las cuales expresan moléculas de adhesión celular para formar las uniones estrechas (tight junctions, TJ).

La integridad de la BHE en el modelo se comprobó midiendo su permeabilidad aparente (P_{aap}) al colorante amarillo Lucifer (AL), en el cual un grupo de insertos sin células HBEC 5i, pero con membranas, se usó como control negativo (Figura 48). La P_{aap} de los insertos es de 14.5×10^{-3} cm/s, y la de los insertos con células HBEC es de 6.8×10^{-3} cm/s, los cuales al compararse muestran ser diferentes significativamente. La permeabilidad al amarillo Lucifer en el modelo *in vitro* de BHE disminuye en más del 50% al tener células HBEC presentes, con lo cual se determina que la BHE está íntegra y es semipermeable.

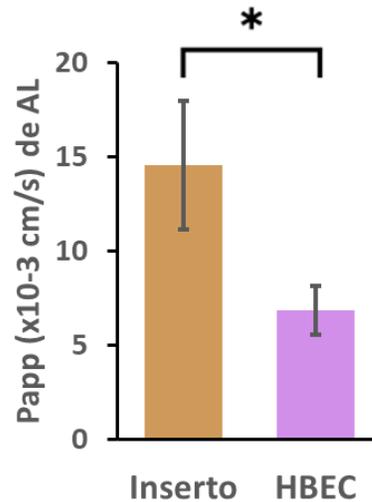


Figura 48. Permeabilidad aparente de la BHE al amarillo Lucifer (AL) en el inserto del Transwell sin células (café) y con células HBEC 5i (morado). La permeabilidad al AL disminuye en >50% al tener células HBEC y membranas en el inserto, lo cual determina que la barrera está íntegra y es semipermeable. Las barras negras representan la desviación estándar de la media (\pm), $n=3$ por grupo. T-student con corrección de Welch con $p < 0.05$ (*) al comparar con el inserto sin HBEC.

Después de comprobar la integridad de la BHE para establecer un modelo *in vitro* de barrera semipermeable, se evaluó el paso de los CD conjugados a través de ella, mediante el mismo ensayo de permeabilidad en el dispositivo Transwell. La P_{aap} de la BHE a los CD conjugados muestra que todos logran cruzar la BHE, aunque los CD y CD-Ti β tienen una alta permeabilidad, mientras que la de los CD-i β es muy baja (Figura 49). Los CD a una concentración de 10 μ g/mL tienen una P_{aap} de 54.5×10^{-3} cm/s y a 20 μ g/mL aumenta a 78.9×10^{-3} cm/s. Los CD-T a una concentración de 10 μ g/mL tienen una P_{aap} de 40.5×10^{-3} cm/s y a 20 μ g/mL disminuye a 27.1×10^{-3} cm/s. Los CD-i β a una concentración de 10 μ g/mL tienen una P_{aap} de 9.9×10^{-3} cm/s y a 20 μ g/mL aumenta a 14.2×10^{-3} cm/s. Los CD-Ti β a una concentración de 10 μ g/mL tienen una P_{aap} de 55.9×10^{-3} cm/s y a 20 μ g/mL aumenta a 62.1×10^{-3} cm/s. Se observan diferencias significativas en la permeabilidad aparente de los CD, CD-T y CD-Ti β al compararlos con CD-i β , pero no entre los mismos grupos a diferentes concentraciones.

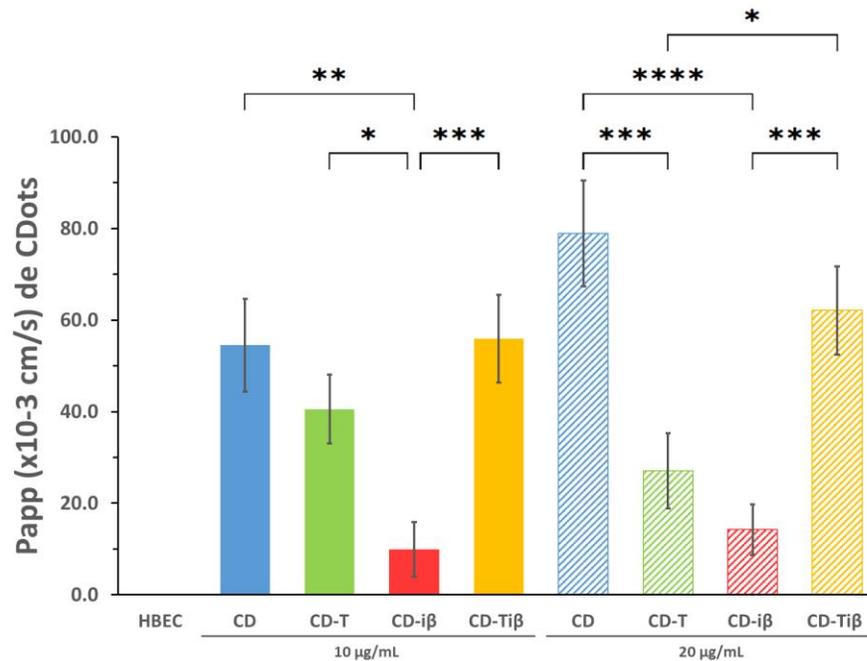


Figura 49. Permeabilidad aparente de la BHE a los CD (azul), CD-T (verde), CD-iβ (rojo) y CD-Tiβ (amarillo) a 10 (color sólido) y 20 µg/mL (color rayado). Ensayo en un modelo *in vitro* de BHE en un Transwell cocultivo. HBEC sin nanomateriales como control negativo. Los CD y CD-Tiβ tienen una mayor permeabilidad a ambas concentraciones. Los CD-iβ tienen una permeabilidad baja a ambas concentraciones. La permeabilidad no depende de la concentración de CD conjugados. Las barras negras representan la desviación estándar de la media (\pm), $n=3$ por grupo. ANOVA de una vía con comparaciones múltiples de Tukey con $p < 0.05$ (*), $p < 0.005$ (**), $p < 0.0005$ (***) y $p < 0.0001$ (****) al comparar contra CD-iβ y entre los grupos.

5.7.4 Detección de BACE1 en el modelo *in vitro* de enfermedad de Alzheimer

Luego de establecer el modelo *in vitro* de la enfermedad de Alzheimer en el Transwell cocultivo y determinar que los CD conjugados cruzan la BHE simulada, se evaluó su efecto sobre las células U-87+Sco del Transwell. Para ello, la presencia de la enzima BACE1 se detectó mediante SDS-PAGE.

La enzima BACE1 del kit de detección FRET se usó como control, observando una banda de 80 kDa; la transferrina usada para la conjugación se usó como referencia, observando una banda de 63 kDa (60-80 kDa); el control positivo del modelo con células U-87+Sco muestra un doble bandeo en 65 y 58 kDa, mientras que en los controles negativos con células U-87 y HBEC no se detectan bandas (Figura 50-A). La presencia del doble bandeo en el control positivo puede corresponder a la BACE1, ya que tiene un PM de 56-75 kDa.

En las células U-87+Sco se observó un doble bandeo en 75 y 60 kDa con todos los CD conjugados, el cual corresponde al doble bandeo de su control positivo, pero con diferentes intensidades (Figura 50-B). Con

10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CD conjugados la banda de 60 kDa de las U-87+Sco disminuye de intensidad 0.4 veces con CD-T, 0.2 veces con CD-i β y 0.9 veces con CD-Ti β ; mientras que, con los CD aumenta 1.1 veces (Figura 51). Con 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CD conjugados ocurre el efecto contrario, sólo disminuye la intensidad 0.9 veces con CD; mientras que, la intensidad aumenta 2.2 veces con CD-T, 1.02 veces con CD-i β y 2.7 veces con CD-Ti β (Figura 51). En las células HBEC 5i no hay presencia de proteínas, ya que en ellas no se indujo el modelo con escopolamina (Figura 51-C).

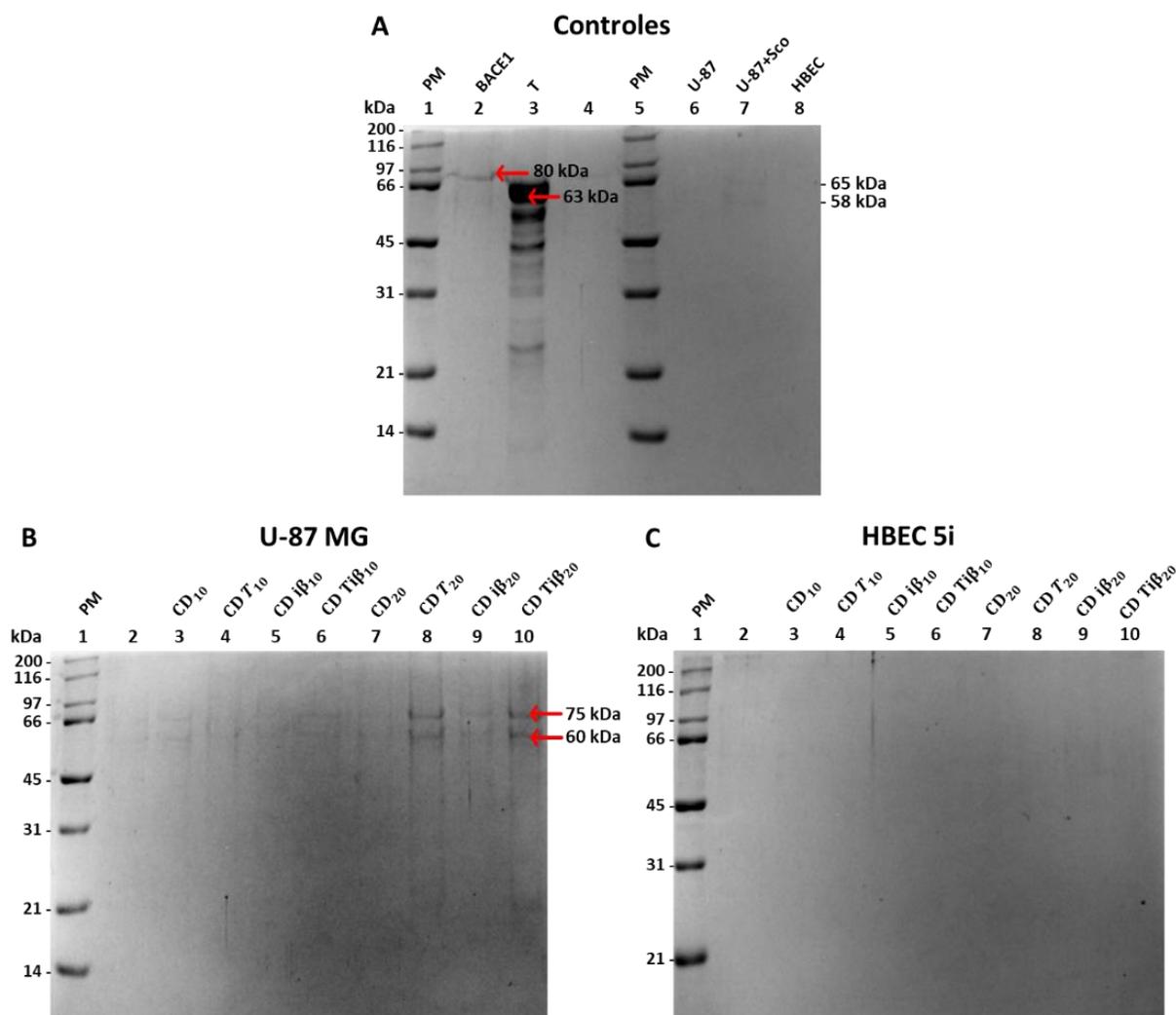


Figura 50. Detección de BACE1 en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al inducir con escopolamina el modelo *in vitro* de enfermedad de Alzheimer en el Transwell cocultivo. Geles con proteínas de A) controles, B) U-87 MG y C) HBEC 5i tratadas con 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CD (carril 3-B y 7-C), CD-T (carril 4-B y 8-C), CD-i β (carril 5-B y 9-C) y CD-Ti β (carril 6-B y 10-C). Las flechas rojas indican el peso molecular (PM) en kDa de las bandas presentes. Con escopolamina se presenta un doble bandeo en 75 y 60 kDa en las células U-87+Sco (carril 7-A) y en todos los grupos con CD conjugados, que corresponden con BACE1. Tinción con Azul de Coomassie.

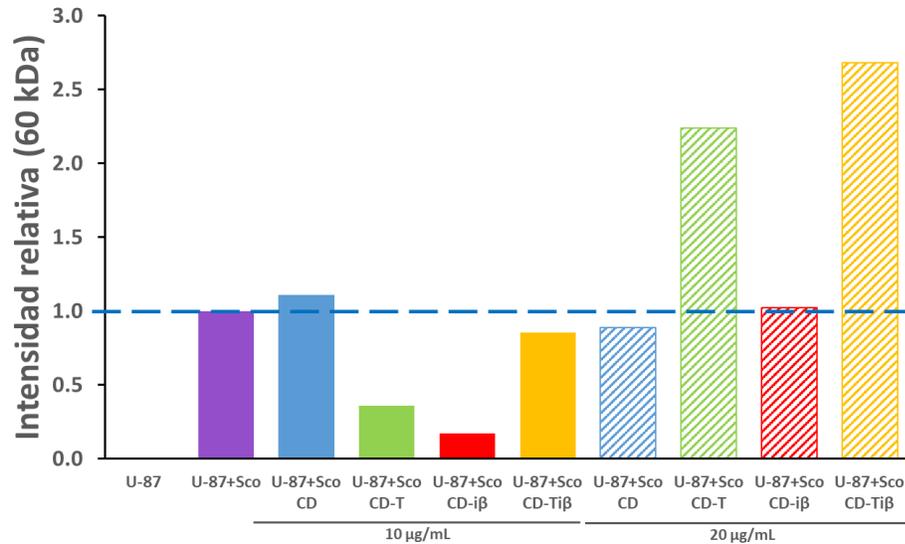


Figura 51. Intensidad relativa de las bandas detectadas a 60 kDa en los geles de poliacrilamida de la Figura 50-B. Considerando como banda de referencia a las células del modelo U-87+Sco (morada, 58 kDa), con valor de 1.0. Exposición a 10 µg/mL (color sólido) y 20 µg/mL (color rayado) de CD (azul), CD-T (verde), CD-iβ (rojo) y CD-Tiβ (amarillo). Con 10 µg/mL de CD-T, CD-iβ y CD-Tiβ disminuye de intensidad la banda de 60 kDa, que corresponde a BACE1. Con 20 µg/mL de CD-T y CD-Tiβ aumenta la intensidad de la banda por la presencia de transferrina en los conjugados. Análisis de las bandas con ImageLab-BIO-RAD.

5.8 Inhibición de la actividad de BACE1 en el modelo *in vitro* de enfermedad de Alzheimer

Finalmente, la actividad de BACE1 se midió en el modelo *in vitro* de la enfermedad de Alzheimer para determinar que los distintos CD conjugados tienen la capacidad de inhibir a la enzima BACE1, después de atravesar la BHE simulada en el Transwell.

La Figura 52 muestra la actividad de la enzima BACE1 en las células de glioblastoma (U-87 MG), en el modelo *in vitro* de la enfermedad de Alzheimer inducido con escopolamina (U-87+Sco) y el efecto de los CD conjugados a 10 y 20 µg/mL en las células del modelo. Las células U-87 MG muestran una actividad basal de BACE1, la cual se consideró como referencia del 100% de actividad. En las células del modelo con U-87+Sco se observa que la actividad de BACE1 aumenta al $124.7 \pm 11.8 \%$ y tiene una diferencia significativa con respecto a las células U-87 MG sin escopolamina. La actividad de BACE1 en el modelo disminuye en más del 50% con los diferentes CD conjugados a ambas concentraciones, excepto con 10 µg/mL de CD-T, siendo menos eficiente. A pesar de eso, todos los CD conjugados muestran diferencias significativas con respecto al control de U-87+Sco.

La actividad de BACE1 con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CD disminuye al 15.9% (84.1% de inhibición), de CD-T disminuye al 81.2% (18.8% de inhibición), de CD-i β disminuye al 24.7% (75.3% de inhibición) y de CD-Ti β disminuye al 27.5% (72.5% de inhibición). Así mismo, la actividad de BACE1 a concentraciones de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CD disminuye al 14.3% (85.7% de inhibición), de CD-T disminuye al 11.1% (88.9% de inhibición), de CD-i β disminuye al 16.4% (83.6% de inhibición) y de CD-Ti β disminuye al 26.7% (73.3% de inhibición). Con concentraciones de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de los CD conjugados, se observa una disminución ligeramente mayor de la actividad de BACE1 al compararlos con los mismos conjugados a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, aunque no muestran diferencias significativas entre ellas, a excepción de los CD-T.

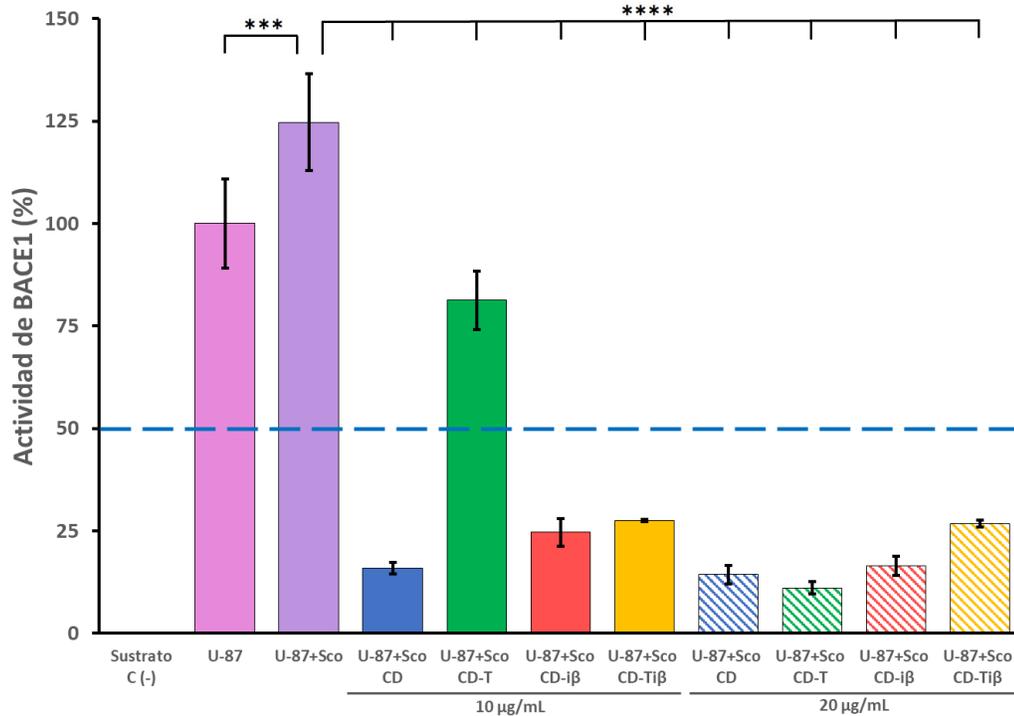


Figura 52. Ensayo FRET de inhibición de la actividad de BACE1, en un modelo *in vitro* de enfermedad de Alzheimer inducido con escopolamina en células U-87 MG (U-87+Sco), al exponerse a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (color sólido) y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (color rayado) de CD (azul), CD-T (verde), CD-i β (rojo) y CD-Ti β (amarillo). Células U-87 MG sin escopolamina (U-87) como referencia de la producción basal de BACE1. El sustrato de BACE1 sin la enzima BACE1 como control negativo (C-). Línea punteada azul: 50% de inhibición de la actividad. En las células del modelo U-87+Sco (morado) se aumenta la actividad de BACE1 al 124.7%. Todos los CD conjugados disminuyen la actividad de BACE1, la cual está por debajo del 50% en la mayoría, excepto con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CD-T. Las barras negras representan la desviación estándar de la media (\pm), $n=3$ por grupo. ANOVA de una vía con comparaciones múltiples de Tukey, con $p < 0.0005$ (***) y $p < 0.0001$ (****) al comparar con el control U-87+Sco.

Capítulo 6. Discusión

La morfología de los puntos cuánticos de carbono (CD) se pudo confirmar mediante TEM (Amato et al., 2021; Martindale et al., 2015) y AFM (Li et al., 2015), observando partículas primarias esféricas y agregados de tamaños muy variados e incluso mayores a los ya reportados, aunque dentro de la escala nanométrica. Debemos considerar que el tamaño de los CD depende de los parámetros de síntesis y del precursor usado. Además, TEM no es la técnica más adecuada para medir el tamaño de las nanopartículas, se prefiere medirlo por DLS para obtener el diámetro hidrodinámico (D_h), ya que considera el tamaño de las partículas, la carga eléctrica superficial y su interacción con la conductividad eléctrica del líquido dispersante. El D_h de los CD fue <10 nm (8.3 ± 2.0 nm), el cual concuerda con lo reportado previamente, mientras que el D_h de los CD-T aumentó al doble (16.9 ± 4.5 nm), presentando valores similares a los reportados por Li, Amat et al. (2016) en sus conjugados CD-T (9-12 nm).

El halo transparente alrededor de los CD-T observado por TEM no está reportado en estudios previos (Li, Amat, et al., 2016; Li, Peng, et al., 2016), pero se puede relacionar con la formación de la corona proteica en los CD al estar conjugados con transferrina, lo cual los hace propensos a aglomerarse y aumentar su tamaño. En los CD-Ti β se observa sólo un ligero aumento del tamaño después de la conjugación y no hay presencia del halo transparente, esto se puede deber a que se estabiliza al estar unido al péptido i β .

Los resultados de potencial ζ obtenidos indican que los CD conjugados tienen una tendencia a aglomerarse, ya que tienen cargas eléctricas cercanas a 0, con predisposición a neutralizarse y atraerse entre sí (Li, Peng, et al., 2016). Estos resultados explican el comportamiento observado en TEM, AFM y diámetro hidrodinámico. Debido a que el potencial ζ de CD, CD-T y CD-Ti β es similar, podemos decir que la conjugación de CD no cambia significativamente su carga eléctrica superficial. Además, se analizó el efecto del pH sobre el potencial ζ : en pH ácido el potencial ζ tiende a hacerse más positivo, mientras que en pH neutro y básico éste tiende a hacerse más negativo. Este efecto del pH se debe a que hay mayor presencia de protones en la solución con pH ácido, lo cual genera una protonación de las partículas y las hace cada vez más positivas.

Los espectros de fluorescencia de los CD mostraron una excitación máxima a 374.2 nm y una emisión máxima a 470.4 nm, las cuales son consistentes con lo reportado previamente con una excitación a 360 nm y una emisión a 465 nm (Amato et al., 2021; Martindale et al., 2015), ya que se encuentran en la misma fluorescencia cian del espectro de luz visible. La disminución de fluorescencia $>50\%$ que observamos en

los CD conjugados ya está reportado en estudios previos (Sirkisoon et al., 2019), en los cuales la fluorescencia de los CD disminuye al estar conjugados con holo-transferrina, que es la transferrina usada para las conjugaciones en el presente trabajo, pero no cambia con apo-transferrina. Los autores indican que esto se debe a que el Fe^{3+} unido a la transferrina experimenta interacciones electrostáticas con los grupos carboxilos e hidroxilos de la superficie de los CD, formando un complejo de estado basal no emisor.

Los conjugados de CD-Ti β no se habían sintetizado previamente, pero se observó que mantienen un tamaño y carga eléctrica similares a los CD, y que al caracterizarlos sólo son diferentes por la presencia de proteínas en su superficie, lo cual ocasiona una disminución de su emisión de fluorescencia.

Con los espectros de FTIR se identificaron picos de carbonilos en los CD y CD conjugados, que se relacionan con los grupos carboxilo en su superficie derivados de su síntesis (Martindale et al., 2015). La presencia de picos característicos de amidas en los CD conjugados se relaciona con los enlaces tipo amida que se forman en la conjugación, entre los grupos carboxilo de los puntos cuánticos de carbono y las aminas primarias de la transferrina y/o el péptido inhibidor de BACE1 (Li, Peng, et al., 2016; Peng et al., 2017).

Con geles de poliacrilamida se demostró la presencia de transferrina en los conjugados CD-T y CD-Ti β , relacionados con los pesos moleculares reportados de 79.2 kDa para la transferrina (T) y 82.4 kDa para los CD-T (Li, Amat, et al., 2016; Li, Peng, et al., 2016). La señal de fluorescencia de los CD y la de transferrina se traslapan, por lo que se comprueba que la transferrina está presente en los conjugados de CD-T y CD-Ti β . En los CD y CD-i β no se observan bandas ya que los CD y el péptido i β son de un peso molecular menor al detectado por los geles, de ~ 2.4 kDa y 1.6 kDa respectivamente. Con la cuantificación de proteína por Micro-BCA se logró comprobar que también los CD-i β tienen el péptido i β conjugado a los CD.

La microestructura de los hidrogeles se conserva en forma general al agregar los CD conjugados, ya que mantiene el tamaño promedio de poro, la porosidad total y el porcentaje de poros abiertos. El grosor de la estructura aumenta al agregar los CD y CD conjugados, lo cual puede relacionarse con un mayor grado de entrecruzamiento de los hidrogeles, ya que los CD pueden ser usados como agentes entrecruzantes al proveer grupos carboxilos para unir las moléculas de gelatina (Bhattacharyya et al., 2020). Aunque la densidad de conectividad y de la estructura lineal disminuyen al agregar los CD, lo cual también se debe a que el volumen de los poros también está disminuyendo. Así mismo, se ha visto que el enfriamiento de los hidrogeles de GelMA durante su síntesis o manipulación, puede condicionar a tener tamaños de poro más pequeños (T. Liu et al., 2021). En este caso, durante la síntesis de GelMA y en la preparación para el análisis por tomografía se realizó ultracongelación y liofilización, lo cual condicionó a una mayor

distribución del tamaño de poro entre 51-100 μm , siendo adecuado para el sistema propuesto, ya que los CD conjugados son de tamaño nanométrico, lo cual permite su adecuada liberación.

El poco hinchamiento observado en los nanocompuestos se puede relacionar con las características morfométricas obtenidas, al tener poros de tamaño pequeño, disminución en su volumen y una baja densidad de la estructura (T. Liu et al., 2021). Además, se ha reportado (Bittner et al., 2021) que los hidrogeles de GelMA en PBS a 37 °C mantienen un hinchamiento en equilibrio después de 24 h y hasta por 28 días, sin tener un hinchamiento significativo a lo largo del tiempo. Por otro lado, el aumento en el grosor de la estructura (mayor entrecruzamiento) en los nanocompuestos con CD conjugados les ayuda a mantener su estructura y tener un hinchamiento mayor, previniendo su degradación temprana y modulando su liberación. Esto es consistente con estudios previos (Bhattacharyya et al., 2020), donde se usan los CD como entrecruzante de hidrogeles de gelatina. Dentro de los mecanismos de liberación de fármacos en los sistemas poliméricos se encuentran el hinchamiento, la erosión y la difusión (Ata et al., 2020). Primero ocurre un hinchamiento máximo, en el cual los poros del hidrogel se llenan de moléculas de agua y puede ocurrir difusión por diferencia de gradientes de concentración; luego, esas moléculas de agua promueven la hidrólisis de los puentes de hidrógeno en la estructura de los hidrogeles; con lo cual, finalmente se degradan los sistemas poliméricos y liberan completamente los fármacos, en este caso los CD conjugados. Por ello, el proceso de degradación es inversamente proporcional al hinchamiento al inicio, pero directamente proporcional en general, ya que los G-CD-Ti β y G-CD-i β fueron los que tuvieron un mayor hinchamiento inicial, pero a su vez una mayor degradación al final, con una constante de rapidez alta; caso contrario en los hidrogeles de G y los nanocompuestos de CD.

Los nanocompuestos como sistemas poliméricos para la entrega de fármacos muestran una cinética de liberación diferente en PBS 1x y DMEM (Bhattacharyya et al., 2020). Aunque en ambos casos, los G-CD-Ti β tienen una liberación más rápida, seguidos por los G-CD-i β , alcanzando liberaciones >50% en ambos medios. La liberación en PBS 1x de los CD conjugados se ajusta a una cinética de primer orden, la cual representa a una liberación sostenida o de estallido; que no es la deseada en sistemas poliméricos, ya que muestra una rapidez de liberación rápida al inicio, seguida de una liberación lenta y variable a lo largo del tiempo (Ata et al., 2020). Mientras que, la liberación en DMEM de los CD conjugados se ajusta a una cinética de orden cero, relacionada con una liberación controlada; la cual es óptima para los sistemas poliméricos, ya que tiene una rapidez de liberación constante a lo largo del tiempo y la liberación se da principalmente por difusión. Con una liberación controlada, todos los nanocompuestos logran liberar >50% de los CD conjugados, con una rapidez constante.

La concentración inhibitoria media (IC_{50}) del péptido $i\beta$ reportada por el proveedor es de 30 nM (Sinha et al., 1999), mientras que la reportada en la literatura es de 1.08 y 5.6 nM (Choi et al., 2012). En nuestro ensayo de inhibición de la actividad de BACE1, el péptido $i\beta$ a 30 y 60 nM supera el IC_{50} reportado en la literatura; con lo cual se asegura una inhibición eficientemente la actividad de la enzima BACE1 en el modelo *in vitro* de enfermedad de Alzheimer.

El uso de los CD conjugados de forma directa en los ensayos *in vitro*, y no con los hidrogeles para formar los nanocompuestos, se debió a que, en la aplicación transdérmica propuesta a futuro, se esperaría que los CD conjugados se liberen de forma controlada desde los hidrogeles en la piel, se absorban y se dirijan por torrente sanguíneo hasta el cerebro. En este sitio ejercen su acción de cruzar la BHE e inhibir BACE1, como lo simulamos en los modelos *in vitro* de BHE y de enfermedad de Alzheimer, en donde los hidrogeles ya no estarían presentes al no ser necesarios.

Los efectos de la escopolamina en la inducción del modelo *in vitro* de enfermedad de Alzheimer fueron consistentes con lo reportado previamente (Joseph et al., 2020; Suthprasertporn et al., 2020). En las células U-87+Sc0, las bandas de proteína en los geles de poliacrilamida de 100 y 115 kDa, podrían corresponder a la proteína precursora de amiloide (APP, 100-140 kDa). Con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CD conjugados se ve la presencia de APP, excepto con CD- $i\beta$. Respecto a los CD conjugados a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ disminuye la intensidad de esas bandas, por lo que se infiere que disminuye la expresión de APP con estos conjugados. Por otro lado, el doble bandeo en 65 y 58 kDa o 75 y 60 kDa, correspondería a la enzima BACE1 (56-75 kDa) y/o NF- κB (65 kDa) (J. J. Liu et al., 2019; Wei et al., 2020). En el modelo se observa un aumento de APP, que es el sustrato de BACE1, pero una disminución de la presencia de BACE1 con los CD conjugados. Esto podría indicar que, a pesar de tener el sustrato presente, la enzima BACE1 no está ejerciendo su acción porque disminuye por la presencia de CD conjugados.

La detección de las bandas en los geles de poliacrilamida nos habla de la presencia de las proteínas, no de su actividad. Por lo que, la acentuación de las bandas con CD-T y CD-T $i\beta$ a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se debe a que la banda de transferrina se traslapa con la de la proteína presuntamente de BACE1, lo cual nos podría indicar que los CD conjugados se están uniendo a BACE1 y aumentan su intensidad en los geles. También, se ve una tendencia a que los CD se unan a la APP y BACE1, por lo que los CD podrían funcionar como marcadores fluorescentes para ayudar a identificar proteínas, aunque haría falta realizar Western blot con anticuerpos específicos anti-APP y anti-BACE1 para comprobar que las bandas corresponden a esas proteínas.

La viabilidad celular evaluada está basada en el metabolismo celular al reducir la resazurina a resorufina, por lo que también podemos analizar el metabolismo celular en cada línea celular. La viabilidad de las células HBEC 5i expuestas a CD no se ha estudiado hasta el día de hoy, nuestros resultados indican que los distintos CD conjugados a 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ son citocompatibles con HBEC 5i, e incluso aumentan la viabilidad celular hasta el 129.2% con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CD-i β , aunque presentan un metabolismo celular lento. La viabilidad celular de las células de glioblastoma (U-87 MG) expuestas a CD fueron consistentes con estudios previos (Li, Amat, et al., 2016; Sviridova et al., 2022), comprobando que los distintos CD conjugados son citocompatibles a 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y que tienen un metabolismo rápido. La viabilidad celular de las células U-87+Sco del modelo fue diferente a lo reportado por Suthprasertporn, et al. (2020), ya que la viabilidad en las U-87 MG sólo disminuye al 95% al agregar la escopolamina y no hasta el 50%. Aunque, Suthprasertporn et al. (2020), inducen el modelo en células de neuroblastoma y no de glioblastoma (U-87 MG); a la fecha no hay estudios donde se induzca este modelo con escopolamina en células de glioblastoma y tampoco en los que se mida viabilidad celular con CD conjugados en U-87+Sco.

De acuerdo a estudios previos (Eigenmann et al., 2013) se comprobó la integridad de la BHE con el ensayo de permeabilidad aparente para amarillo Lucifer (AL), estableciendo un modelo *in vitro* de BHE semipermeable con las células HBEC-5i, sus uniones estrechas y las membranas de los insertos del Transwell, para simular los componentes de la BHE. Los resultados fueron consistentes con los ya reportados, en los cuales se disminuye la permeabilidad para AL en >50% con células HBEC-5i.

Se ha demostrado que los CD-T cruzan la BHE en modelos con pez cebra (Han et al., 2017; Li, Peng, et al., 2016), pero es la primera vez que se evalúan CD y CD conjugados en un modelo *in vitro* en un Transwell cocultivo. Los CD por sí mismos cruzan fácilmente la BHE. Los CD-T y CD-Ti β cruzan en mayor cantidad la BHE por transcitosis mediada por receptores de transferrina (Lee y Leong, 2020), debido a que tienen transferrina conjugada, aunque no cruzan en mayor cantidad que los CD. En cambio, los CD-i β cruzan en menor cantidad si se comparan con los CD y CD conjugados con transferrina; esto puede deberse a que el péptido i β está interfiriendo en el cruce facilitado de los CD por su tamaño, ya que, como se observó previamente con el D_h y PZ, estos conjugados forman aglomerados, son heterodispersas y tienen cargas eléctricas superficiales más negativas. En relación a la concentración de los CD conjugados, se observó que cruzan de igual manera, independientemente de la concentración.

De igual manera, la inducción del modelo *in vitro* de enfermedad de Alzheimer se comprobó al aumentar la actividad de BACE1 a 124.7 ± 11.8 % en células de glioblastoma con escopolamina (U-87+Sco), lo cual es consistente con estudios previos (Suthprasertporn et al., 2020), donde la actividad de BACE1 aumentó a

139 ± 5% en células de neuroblastoma tratadas con escopolamina. La inhibición de la actividad de BACE1 >50% (IC₅₀) con CD a 10 y 20 µg/mL se había evaluado sólo en un estudio previo (Han et al., 2017). En el presente trabajo se comprueba este efecto y además se evalúa por primera vez el efecto de CD conjugados, a 10 y 20 µg/mL, sobre la actividad de BACE1. Los CD conjugados inhiben efectivamente la actividad de BACE1 (>50%), excepto los CD-T a 10 µg/mL, los cuales a pesar de estar cruzando la BHE en el modelo, en los geles de poliacrilamida no se observa un aumento en la intensidad de la banda correspondiente a BACE1. Con lo anterior, podríamos inferir que los CD-T no se están uniendo efectivamente a BACE1, posiblemente por la presencia de la corona proteica (halo transparente) que se observó mediante TEM y en consecuencia la presencia de transferrina impide el efecto inhibitorio observado en los CD. Sorprendentemente, con los CD-iβ se observa el efecto contrario; ya que, a pesar de cruzar en menor cantidad la BHE en el modelo y mostrar una baja intensidad en las bandas de BACE1 de los geles de poliacrilamida, se observa una efectiva inhibición de la actividad de BACE1 (>50%). Este efecto es el esperado, ya que tienen conjugado un péptido que inhibe específicamente a la enzima BACE1, a una concentración que alcanza y supera el IC₅₀ reportado (Sinha et al., 1999).

Han et al. (2017) proponen que los CD pueden estar inhibiendo la fibrilación de β-amiloide mediante impedimento estérico, al interaccionar la superficie hidrofílica de los CD con los monómeros de β-amiloide. En este caso, los CD conjugados que se sintetizaron en este trabajo también podrían unirse a la proteína precursora de amiloide (APP), impidiendo que la enzima BACE1 se una a su sustrato y ejerza su actividad catalítica, bloqueando la cascada amiloide en la enfermedad de Alzheimer (dos Santos Picanco et al., 2018). Otro posible mecanismo de acción en la inhibición de la enzima BACE1 por el péptido iβ y los CD conjugados, es mediante una inhibición competitiva. En ésta, los CD conjugados se unen al sitio de unión del sustrato en el dominio catalítico de la enzima BACE1, mimetizan al sustrato peptídico y bloquean la reacción catalizada por la enzima, es decir, el desencadenamiento del proceso fisiopatológico de la cascada amiloide en la enfermedad de Alzheimer. Esto se debe a que el péptido iβ y los CD conjugados tienen enlaces amida, los cuales interactúan con los aspartatos del dominio catalítico de BACE1, promoviendo su actividad como proteasa aspártica, la cual es escindir un enlace amida (Hu et al., 2019). Aunque para comprobar estas hipótesis sobre el mecanismo de acción de los CD conjugados en la inhibición de BACE1, se necesitaría estudiar más a fondo su interacción y los efectos que tienen.

Capítulo 7. Conclusiones, contribuciones y perspectivas a futuro

7.1 Conclusiones y contribuciones

Los puntos cuánticos de carbono (CD) se sintetizaron por termólisis a partir de ácido cítrico. Con la neutralización de pH durante la síntesis de CD se logró modular el tamaño, la emisión de fluorescencia y la dispersión en el medio. Los CD sintetizados tienen la propiedad de emitir autofluorescencia en color cian del espectro de luz visible, aunque ésta disminuye en >50% si los CD están conjugados con proteínas. Mediante FTIR se verificó que los CD tienen grupos carboxilo en su superficie. Los CD a pH 7 tienen tamaños <10 nm, se excitan a longitudes de onda menores y emiten fluorescencia con mayor intensidad que los CD a pH4. Los CD se lograron conjugar con transferrina y un péptido inhibidor de BACE1 mediante esterificación con EDC y NHS. La conjugación se comprobó mediante la presencia de picos por FTIR relacionados con enlaces tipo amida, al detectar las proteínas conjugadas mediante SDS-PAGE y cuantificarlas con micro-BCA.

Los nanocompuestos de hidrogeles de GelMA y CD conjugados se lograron sintetizar por primera vez. La degradación de los nanocompuestos es inversamente proporcional a su hinchamiento al inicio de la evaluación. Aunque, de forma general esta relación fue directamente proporcional, ya que los nanocompuestos que más se hincharon inicialmente, fueron los primeros en degradarse. Los nanocompuestos en PBS 1x se degradan entre las 120-144 h (5-6 días) y muestran una cinética de primer orden con una liberación sostenida. En DMEM los nanocompuestos tienen una cinética de orden cero con una liberación controlada por difusión. Los nanocompuestos de G-CD-Ti β mostraron una rapidez alta de degradación y de liberación a lo largo de los ensayos.

El modelo in vitro de BHE y de enfermedad de Alzheimer se logró establecer en un dispositivo Transwell cocultivo. En el modelo in vitro de BHE se lograron simular 3 componentes de la BHE: las células del endotelio vascular cerebral humano, sus uniones estrechas y la membrana basal (membranas de los insertos). Además, la integridad de la BHE se pudo comprobar con ensayos de permeabilidad. El modelo in vitro de enfermedad de Alzheimer se logró inducir con escopolamina (2 mM) en células de glioblastoma (U-87 MG), en las cuales se comprobó que la actividad de BACE1 aumentó al 124.7 % y se detectó con SDS-PAGE la presencia de proteínas con pesos moleculares correspondientes a APP y BACE1. Los distintos CD conjugados lograron cruzar el modelo in vitro de BHE e inhibir la actividad de BACE1 en el modelo in vitro

de enfermedad de Alzheimer inducido con escopolamina. La concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ es adecuada para lograr lo efectos deseados sin generar toxicidad.

Los conjugados de CD-i β mostraron mejores características a lo largo de las evaluaciones, a excepción de su tamaño (>10 nm). Los CD-i β en los nanocompuestos G-CD-i β promueven un mayor hinchamiento inicial, una mayor degradación al final, una liberación controlada en DMEM y son citocompatibles con HBEC 5i y U-87 MG. Y lo más importante es que los CD-i β tienen la capacidad de inhibir en un 75-83% la actividad de BACE1, a pesar de que cruzan en poca cantidad la BHE y lo hacen sin la ayuda de transferrina. Los CD por sí mismos cruzan la BHE e inhiben la actividad de BACE1, aunque los nanocompuestos de G-CD tienen un menor hinchamiento, degradación y liberación. Además, se observa que la transferrina no es necesaria para que los CD y los CD conjugados crucen la BHE, al menos en nuestro modelo *in vitro* de BHE.

El presente trabajo contribuye con la generación de nuevo conocimiento, la estandarización de técnicas experimentales usadas por primera vez para analizar los nanocompuestos propuestos, así como información inicial para proponer sistemas poliméricos para la entrega controlada de un inhibidor de BACE1, como propuesta de tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Con la aplicación de modelos *in vitro* similares a los sistemas biológicos humanos, se promueve el uso de métodos de evaluación alternativos a los ensayos con animales vertebrados, propuestos por la USEPA en 2018.

7.2 Perspectivas a futuro

1. Evaluación de un modelo con Transwell multicultivo que emule las condiciones fisiopatológicas de Alzheimer en etapa temprana.
2. Evaluar la administración transdérmica de los nanocompuestos de hidrogeles de GelMA con CD conjugados, en un modelo *in vivo* para determinar parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos.
3. Desarrollar ensayos de nanotoxicidad de los CD y CD conjugados a mediano y largo plazo.
4. Estudiar el efecto de los CD en las cascadas de señalización involucradas en el proceso fisiopatológico de enfermedad de Alzheimer, para establecer su mecanismo de acción.

Literatura citada

- Agrawal, M., Prathyusha, E., Ahmed, H., Dubey, S. K., Kesharwani, P., Singhvi, G., Naidu, V. G. M., y Alexander, A. 2021. Biomaterials in treatment of Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*. Elsevier Ltd, 145(105008), 1–18. doi: 10.1016/j.neuint.2021.105008
- Alzheimer's Disease International (ADI). 2020, octubre 26. Dementia risk factors infographic. ADI. Recuperado el 16 de mayo de 2021, a partir de <https://www.alzint.org/resource/dementia-risk-factors-infographic/>
- Amato, F., Prado Soares, M. C., Cabral Destri, T., Fujiwara, E., Monteiro de Barros Cordeiro, C., Criado, A., Prato, M., y Bartoli, J. R. 2021. Agarose-Based Fluorescent Waveguide with Embedded Silica Nanoparticle–Carbon Nanodot Hybrids for pH Sensing. *ACS Applied Nano Materials*. American Chemical Society, 4, 9738–9751. doi: 10.1021/ACSANM.1C02127
- American Psychiatric Association. 2018. DSM-5. Actualización. Suplemento del Manual Diagnóstico y Estadístico de Trastornos Mentales (5ta ed). Recuperado el 20 de marzo de 2021, a partir de <https://psychiatryonline.org/>
- Arvanitakis, Z., Shah, R. C., y Bennett, D. A. 2019. Diagnosis and Management of Dementia: Review. *JAMA - Journal of the American Medical Association*. American Medical Association, 322(16), 1589–1599. doi: 10.1001/jama.2019.4782
- Ashrafizadeh, M., Mohammadinejad, R., Kailasa, S. K., Ahmadi, Z., Afshar, E. G., y Pardakhty, A. 2020. Carbon dots as versatile nanoarchitectures for the treatment of neurological disorders and their theranostic applications: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*. Elsevier B.V., 278, 102123. doi: 10.1016/j.cis.2020.102123
- Ata, S., Rasool, A., Islam, A., Bibi, I., Rizwan, M., Azeem, M. K., Qureshi, A. ur R., y Iqbal, M. 2020. Loading of Cefixime to pH sensitive chitosan-based hydrogel and investigation of controlled release kinetics. *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V., 155, 1236–1244. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.11.091
- Badhwar, A. P. y Haqqani, A. S. 2020. Biomarker potential of brain-secreted extracellular vesicles in blood in Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia: Diagnosis, Assessment and Disease Monitoring*. John Wiley and Sons Inc, 12(1), 1–14. doi: 10.1002/dad2.12001
- Baranyai, Z., Biri-Kovács, B., Krátký, M., Szeder, B., Debreczeni, M. L., Budai, J., Kovács, B., Horváth, L., Pári, E., Németh, Z., Cervenak, L., Zsila, F., Méhes, E., Kiss, É., Vinšová, J., y Bösze, S. 2021. Cellular Internalization and Inhibition Capacity of New Anti-Glioma Peptide Conjugates: Physicochemical Characterization and Evaluation on Various Monolayer- and 3D-Spheroid-Based in Vitro Platforms. *Journal of Medicinal Chemistry*. *J Med Chem*, 64(6), 2982–3005. doi: 10.1021/ACS.JMEDCHEM.0C01399
- Bashyal, S., Shin, C. Y., Hyun, S. M., Jang, S. W., y Lee, S. 2020. Preparation, characterization, and in vivo pharmacokinetic evaluation of polyvinyl alcohol and polyvinyl pyrrolidone blended hydrogels for transdermal delivery of donepezil HC1. *Pharmaceutics*. MDPI AG, 12(270), 1–16. doi: 10.3390/pharmaceutics12030270

- Bhattacharyya, S. K., Dule, M., Paul, R., Dash, J., Anas, M., Mandal, T. K., Das, P., Das, N. C., y Banerjee, S. 2020. Carbon Dot Cross-Linked Gelatin Nanocomposite Hydrogel for pH-Sensing and pH-Responsive Drug Delivery. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. *ACS Biomater Sci Eng*, 6(10), 5662–5674. doi: 10.1021/ACSBIMATERIALS.0C00982
- Binda, A., Murano, C., y Rivolta, I. 2020. Innovative therapies and nanomedicine applications for the treatment of alzheimer's disease: A state-of-the-art (2017–2020). *International Journal of Nanomedicine*. Dove Medical Press Ltd, 15, 6113–6135. doi: 10.2147/IJN.S231480
- Bittner, S. M., Pearce, H. A., Hogan, K. J., Smoak, M. M., Guo, J. L., Melchiorri, A. J., Scott, D. W. and Mikos, A. G. 2021. Swelling Behaviors of 3D Printed Hydrogel and Hydrogel-Microcarrier Composite Scaffolds. *Tissue Engineering. Part A*, Mary Ann Liebert, Inc., 27(11–12), 665–678. doi:10.1089/TEN.TEA.2020.0377
- Canevari, T. C., Nakamura, M., Cincotto, F. H., de Melo, F. M., y Toma, H. E. 2016. High performance electrochemical sensors for dopamine and epinephrine using nanocrystalline carbon quantum dots obtained under controlled chronoamperometric conditions. *Electrochimica Acta*. Pergamon, 209, 464–470. doi: 10.1016/J.ELECTACTA.2016.05.108
- Choi, Y., Cho, Y., Kim, M., Grailhe, R., y Song, R. 2012. Fluorogenic quantum dot-gold nanoparticle assembly for beta secretase inhibitor screening in live cell. *Analytical Chemistry*. *Anal Chem*, 84(20), 8595–8601. doi: 10.1021/ac301574b
- Christensen, I. L., Sun, Y. P., y Juzenas, P. 2011. Carbon dots as antioxidants and prooxidants. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. *J Biomed Nanotechnol*, 7(5), 667–676. doi: 10.1166/jbn.2011.1334
- dos Santos Picanco, L. C., Ozela, P. F., de Fatima de Brito Brito, M., Pinheiro, A. A., Padilha, E. C., Braga, F. S., de Paula da Silva, C. H. T., dos Santos, C. B. R., Rosa, J. M. C., y da Silva Hage-Melim, L. I. 2018. Alzheimer's Disease: A Review from the Pathophysiology to Diagnosis, New Perspectives for Pharmacological Treatment. *Current Medicinal Chemistry*. Bentham Science Publishers Ltd., 25(26), 3141–3159. doi: 10.2174/0929867323666161213101126
- Eigenmann, D. E., Xue, G., Kim, K. S., Moses, A. v., Hamburger, M., y Oufir, M. 2013. Comparative study of four immortalized human brain capillary endothelial cell lines, hCMEC/D3, hBMEC, TY10, and BB19, and optimization of culture conditions, for an in vitro blood-brain barrier model for drug permeability studies. *Fluids and Barriers of the CNS*. *Fluids Barriers CNS*, 10(33), 1–16. doi: 10.1186/2045-8118-10-33
- Farese, R. v., Kindy, M. A., y Sajan, M. P. 2020. Atypical Protein Kinase C Hyperactivity in Insulin-Resistant and Insulin-Sensitive Forms of Alzheimer's Disease: A Potential Therapeutic Target. *En Alzheimer's Disease: Drug Discovery*. Exon Publications. doi: 10.36255/exonpublications.alzheimersdisease.2020.ch6
- Farshbaf, M., Davaran, S., Rahimi, F., Annabi, N., Salehi, R., y Akbarzadeh, A. 2018. Carbon quantum dots: recent progresses on synthesis, surface modification and applications. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*. Taylor and Francis Ltd., 46(7), 1331–1348. doi: 10.1080/21691401.2017.1377725
- Faustino, C., Rijo, P., y Reis, C. P. 2017. Nanotechnological strategies for nerve growth factor delivery: Therapeutic implications in Alzheimer's disease. *Pharmacological Research*. Academic Press, 120, 68–87. doi: 10.1016/j.phrs.2017.03.020

- Gomez-Aparicio, L. S., Bernáldez-Sarabia, J., Camacho-Villegas, T. A., Lugo-Fabres, P. H., Díaz-Martínez, N. E., Padilla-Camberos, E., Licea-Navarro, A., y Castro-Ceseña, A. B. 2021. Improvement of the wound healing properties of hydrogels with: N-Acetylcysteine through their modification with methacrylate-containing polymers. *Biomaterials Science*. Royal Society of Chemistry, 9(3), 726–744. doi: 10.1039/d0bm01479f
- Gomme, P. T. y McCann, K. B. 2005. Transferrin: Structure, function and potential therapeutic actions. *Drug Discovery Today*. Elsevier Current Trends, 10(4), 267–273. doi: 10.1016/S1359-6446(04)03333-1
- Guerrero, E. D., Lopez-Velazquez, A. M., Ahlawat, J., y Narayan, M. 2021. Carbon Quantum Dots for Treatment of Amyloid Disorders. *ACS Applied Nano Materials*. American Chemical Society, 4(3), 2423–2433. doi: 10.1021/acsnm.0c02792
- Han, X., Jing, Z., Wu, W., Zou, B., Peng, Z., Ren, P., Wikramanayake, A., Lu, Z., y Leblanc, R. M. 2017. Biocompatible and blood-brain barrier permeable carbon dots for inhibition of A β fibrillation and toxicity, and BACE1 activity. *Nanoscale*. Royal Society of Chemistry, 9(35), 12862–12866. doi: 10.1039/c7nr04352j
- Han, X., Li, S., Peng, Z., Al-Yuobi, A. O., Bashammakh, A. S. O., El-Shahawi, M. S., y Leblanc, R. M. 2016. Interactions between carbon nanomaterials and biomolecules. *Journal of Oleo Science*. Japan Oil Chemists Society, 65(1), 1–7. doi: 10.5650/jos.ess15248
- Hane, F. T., Lee, B. Y., y Leonenko, Z. 2017. Recent Progress in Alzheimer's Disease Research, Part 1: Pathology. En *Journal of Alzheimer's Disease*, 57(1), 1–28. IOS Press. doi: 10.3233/JAD-160882
- Hatherell, K., Couraud, P. O., Romero, I. A., Weksler, B., y Pilkington, G. J. 2011. Development of a three-dimensional, all-human in vitro model of the blood-brain barrier using mono-, co-, and tri-cultivation Transwell models. *Journal of Neuroscience Methods*. *J Neurosci Methods*, 199(2), 223–229. doi: 10.1016/j.jneumeth.2011.05.012
- Heneka, M. T., Golenbock, D. T., y Latz, E. 2015. Innate immunity in Alzheimer's disease. *Nature Immunology*, 16(3), 229–236. Nature Publishing Group. doi: 10.1038/ni.3102
- Hettiarachchi, S. D., Graham, R. M., Mintz, K. J., Zhou, Y., Vanni, S., Peng, Z., y Leblanc, R. M. 2019. Triple conjugated carbon dots as a nano-drug delivery model for glioblastoma brain tumors. *Nanoscale*. Royal Society of Chemistry, 11(13), 6192–6205. doi: 10.1039/C8NR08970A
- Hu, H., Chen, Z., Xu, X., y Xu, Y. 2019. Structure-based survey of the binding modes of BACE1 inhibitors. *ACS Chemical Neuroscience*. American Chemical Society, 10(2), 880–889. doi: 10.1021/acscchemneuro.8b00420
- Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI). 2020. Censo Población y Vivienda 2020. Recuperado el 15 de mayo de 2021, a partir de <https://www.inegi.org.mx/programas/ccpv/2020/#Documentacion>
- Javadzadeh, Y. y Azharshekoufeh Bahari, L. 2017. Therapeutic Nanostructures for Dermal and Transdermal Drug Delivery. En *Nano- and Microscale Drug Delivery Systems: Design and Fabrication*. Elsevier, 131–146. doi: 10.1016/B978-0-323-52727-9.00008-X

- Javanbakht, S. y Namazi, H. 2018. Doxorubicin loaded carboxymethyl cellulose/graphene quantum dot nanocomposite hydrogel films as a potential anticancer drug delivery system. *Materials Science and Engineering C. Elsevier*, 87, 50–59. doi: 10.1016/j.msec.2018.02.010
- Jelinek, R. 2017. *Carbon Quantum Dots*. Springer International Publishing, AI, USA. doi: 10.1007/978-3-319-43911-2
- Joseph, E., Villalobos-Acosta, D. M. Á., Torres-Ramos, M. A., Farfán-García, E. D., Gómez-López, M., Miliar-García, Á., Fragoso-Vázquez, M. J., García-Marín, I. D., Correa-Basurto, J., y Rosales-Hernández, M. C. 2020. Neuroprotective Effects of Apocynin and Galantamine During the Chronic Administration of Scopolamine in an Alzheimer's Disease Model. *Journal of Molecular Neuroscience*. Humana Press Inc., 70(2), 180–193. doi: 10.1007/S12031-019-01426-5/FIGURES/7
- Kawabata, H. 2019. Transferrin and transferrin receptors update. *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier Inc., 133, 46–54. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.037
- Kim, J., Yoon, J. H., y Kim, Y. S. 2013. HIV-1 Tat Interacts with and Regulates the Localization and Processing of Amyloid Precursor Protein. *PLoS ONE*. Public Library of Science, 8(11), 77972. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0077972
- Kulas, J. A., Puig, K. L., y Combs, C. K. 2017. Amyloid precursor protein in pancreatic islets. *Journal of Endocrinology*. BioScientifica Ltd., 235(1), 49–67. doi: 10.1530/JOE-17-0122
- Lee, C. S. y Leong, K. W. 2020. Advances in microphysiological blood-brain barrier (BBB) models towards drug delivery. *Current Opinion in Biotechnology*. Elsevier Ltd, 66, 78–87. doi: 10.1016/j.copbio.2020.06.009
- Li, S., Amat, D., Peng, Z., Vanni, S., Raskin, S., Angulo, G. de, Othman, A. M., Graham, R. M., y Leblanc, R. M. 2016. Transferrin conjugated nontoxic carbon dots for doxorubicin delivery to target pediatric brain tumor cells. *Nanoscale*. The Royal Society of Chemistry, 8(37), 16662–16669. doi: 10.1039/C6NR05055G
- Li, S., Peng, Z., Dallman, J., Baker, J., Othman, A. M., Blackwelder, P. L., y Leblanc, R. M. 2016. Crossing the blood-brain-barrier with transferrin conjugated carbon dots: A zebrafish model study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Elsevier B.V., 145, 251–256. doi: 10.1016/j.colsurfb.2016.05.007
- Li, S., Wang, L., Chusuei, C. C., Suarez, V. M., Blackwelder, P. L., Micic, M., Orbulescu, J., y Leblanc, R. M. 2015. Nontoxic carbon dots potently inhibit human insulin fibrillation. *Chemistry of Materials*. American Chemical Society, 27(5), 1764–1771. doi: 10.1021/cm504572b
- Liu, J. J., Zhang, W., Wang, S. S., Jia, Z. Q., Shi, Y. H., Yang, L., y Shi, R. L. 2019. Effects of chain length of saturated fatty acids on A β generation in SH-SY5Y cells. *Neuroscience Letters*. Elsevier Ireland Ltd, 698, 169–172. doi: 10.1016/J.NEULET.2019.01.024
- Liu, T., Zhang, Y., Sun, M., Jin, M., Xia, W., Yang, H., y Wang, T. 2021. Effect of Freezing Process on the Microstructure of Gelatin Methacryloyl Hydrogels. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. Front Bioeng Biotechnol, 9, 1–8. doi: 10.3389/FBIOE.2021.810155
- Livingston, G., Huntley, J., Sommerlad, A., Ames, D., Ballard, C., Banerjee, S., Brayne, C., Burns, A., Cohen-Mansfield, J., Cooper, C., Costafreda, S. G., Dias, A., Fox, N., Gitlin, L. N., Howard, R., Kales, H. C., Kivimäki, M., Larson, E. B., Ogunniyi, A., Orgeta, V., Ritchie, K., Rockwood, K., Sampson, E. L., Samus,

- Q., Schneider, L. S., Selbæk, G., Teri, L., y Mukadam, N. 2020. Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission. *The Lancet*. Lancet Publishing Group, 396(10248), 413–446. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30367-6
- Lundgren, J. L., Ahmed, S., Schedin-Weiss, S., Gouras, G. K., Winblad, B., Tjernberg, L. O., y Frykman, S. 2015. ADAM10 and BACE1 are localized to synaptic vesicles. *Journal of Neurochemistry*. Blackwell Publishing Ltd, 135(3), 606–615. doi: 10.1111/jnc.13287
- Magdassi, S., Harris, D., y Luo, H. 2021. Water-Soluble Photoinitiators. Merck KGaA. Recuperado el 6 de julio de 2021, a partir de <https://www.sigmaaldrich.com/MX/en/technical-documents/technical-article/materials-science-and-engineering/polymer-synthesis/watersoluble-photoinitiators>
- Martindale, B. C. M., Hutton, G. A. M., Caputo, C. A., y Reisner, E. 2015. Solar Hydrogen Production Using Carbon Quantum Dots and a Molecular Nickel Catalyst. *Journal of the American Chemical Society*. American Chemical Society, 137(18), 6018–6025. doi: 10.1021/JACS.5B01650
- Martinsson, I., Capetillo-Zarate, E., Faideau, M., Willén, K., Esteras, N., Frykman, S., Tjernberg, L. O., y Gouras, G. K. 2019. APP depletion alters selective pre- and post-synaptic proteins. *Molecular and Cellular Neuroscience*. Academic Press Inc., 95, 86–95. doi: 10.1016/j.mcn.2019.02.003
- Nguyen, A. K., Goering, P. L., Reipa, V., y Narayan, R. J. 2019. Toxicity and photosensitizing assessment of gelatin methacryloyl-based hydrogels photoinitiated with lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate in human primary renal proximal tubule epithelial cells. *Biointerphases*. American Vacuum Society, 14(2), 021007. doi: 10.1116/1.5095886
- Panza, F., Lozupone, M., Logroscino, G., y Imbimbo, B. P. 2019. A critical appraisal of amyloid- β -targeting therapies for Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*. Nature Publishing Group, 15(2), 73–88. doi: 10.1038/s41582-018-0116-6
- Peng, Z., Miyajiri, E. H., Zhou, Y., Pardo, J., Hettiarachchi, S. D., Li, S., Blackwelder, P. L., Skromne, I., y Leblanc, R. M. 2017. Carbon dots: Promising biomaterials for bone-specific imaging and drug delivery. *Nanoscale*. Royal Society of Chemistry, 9(44), 17533–17543. doi: 10.1039/c7nr05731h
- Prince, M., Ali, G. C., Guerchet, M., Prina, A. M., Albanese, E., y Wu, Y. T. 2016. Recent global trends in the prevalence and incidence of dementia, and survival with dementia. *Alzheimer's Research and Therapy*. BioMed Central Ltd., 8(1), 1–13. doi: 10.1186/s13195-016-0188-8
- Scheltens, P., Blennow, K., Breteler, M. M. B., de Strooper, B., Frisoni, G. B., Salloway, S., y van der Flier, W. M. 2016. Alzheimer's disease. *The Lancet*. Lancet Publishing Group, 388(10043), 505–517. doi: 10.1016/S0140-6736(15)01124-1
- Setya, S., Madaan, T., Razdan, B. K., Farswan, M., y Talegaonkar, S. 2019. Design and Development of Novel Transdermal Nanoemulgel for Alzheimer's Disease: Pharmacokinetic, Pharmacodynamic and Biochemical Investigations. *Current Drug Delivery*. Bentham Science Publishers Ltd., 16(10), 902–912. doi: 10.2174/1567201816666191022105036
- Shirahama, H., Lee, B., Tan, L., y Cho, N. 2016. Precise Tuning of Facile One-Pot Gelatin Methacryloyl (GelMA) Synthesis. *Nature Scientific reports*, 6(31036), 1–11. doi: 10.1038/SREP31036

- Shui, B., Tao, D., Florea, A., Cheng, J., Zhao, Q., Gu, Y., Li, W., Jaffrezic-Renault, N., Mei, Y., y Guo, Z. 2018. Biosensors for Alzheimer's disease biomarker detection: A review. *Biochimie*. Elsevier B.V., 147, 13–24. doi: 10.1016/j.biochi.2017.12.015
- Sinha, S., Anderson, J. P., Barbour, R., Basi, G. S., Caccaveffo, R., Davis, D., Doan, M., Dovey, H. F., Frigon, N., Hong, J., Jacobson-Croak, K., Jewett, N., Keim, P., Knops, J., Lieberburg, I., Power, M., Tan, H., Tatsuno, G., Tung, J., Schenk, D., Seubert, P., Suomensaaari, S. M., Wang, S., Walker, D., Zhao, J., McConlogue, L., y John, V. 1999. Purification and cloning of amyloid precursor protein β -secretase from human brain. *Nature*. Nature Publishing Group, 402(6761), 537–540. doi: 10.1038/990114
- Sirkisoon, L. R., Makamba, H. C., Saito, S., y Colyer, C. L. 2019. Carbon Dot-Mediated Capillary Electrophoresis Separations of Metallated and Demetallated Forms of Transferrin Protein. *Molecules (Basel, Switzerland)*. *Molecules*, 24(10), 1–14. doi: 10.3390/MOLECULES24101916
- Stone, N. L., England, T. J., y O'Sullivan, S. E. 2019. A novel transwell blood brain barrier model using primary human cells. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. Frontiers Media S.A., 13(230), 1–16. doi: 10.3389/fncel.2019.00230
- Suo, H., Zhang, D., Yin, J., Qian, J., Wu, Z. L., y Fu, J. 2018. Interpenetrating polymer network hydrogels composed of chitosan and photocrosslinkable gelatin with enhanced mechanical properties for tissue engineering. *Materials Science and Engineering C*. Elsevier Ltd, 92, 612–620. doi: 10.1016/j.msec.2018.07.016
- Suthprasertporn, N., Mingchinda, N., Fukunaga, K., y Thangnipon, W. 2020. Neuroprotection of SAK3 on scopolamine-induced cholinergic dysfunction in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Cytotechnology*. Springer, 72(1), 155–164. doi: 10.1007/s10616-019-00366-7
- Sviridova, E., Barras, A., Addad, A., Plotnikov, E., di Martino, A., Deresmes, D., Nikiforova, K., Trusova, M., Szunerits, S., Guselnikova, O., Postnikov, P., y Boukherroub, R. 2022. Surface modification of carbon dots with tetraalkylammonium moieties for fine tuning their antibacterial activity. *Biomaterials Advances*. Elsevier, 134, 112697. doi: 10.1016/J.MSEC.2022.112697
- Sweeney, M. D., Zhao, Z., Montagne, A., Nelson, A. R., y Zlokovic, B. v. 2019. Blood-brain barrier: From physiology to disease and back. *Physiological Reviews*. American Physiological Society, 99(1), 21–78. doi: 10.1152/physrev.00050.2017
- Tian, B., Hua, S., Tian, Y., y Liu, J. 2020. Chemical and physical chitosan hydrogels as prospective carriers for drug delivery: A review. *Journal of Materials Chemistry B*. Royal Society of Chemistry, 8(44), 10050–10064. doi: 10.1039/d0tb01869d
- Tiwari, S., Atluri, V., Kaushik, A., Yndart, A., y Nair, M. 2019. Alzheimer's disease: Pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *International Journal of Nanomedicine*. Dove Medical Press Ltd., 14, 5541–5554. doi: 10.2147/IJN.S200490
- USEPA. 2018. *Strategic Plan to Promote the Development and Implementation of Alternative Test Methods Within the TSCA Program*, 1–39. Recuperado el 31 de mayo de 2021, a partir de https://www.epa.gov/sites/production/files/2018-06/documents/epa_alt_strat_plan_6-20-18_clean_final.pdf
- Weber, M., Wu, T., Meilandt, W. J., Dominguez, S. L., Solanoy, H. O., Maloney, J. A., Ngu, H., Baca, M., Kung, C., Lima, L., Earr, T. K., Fleck, D., Shields, S. D., Forrest, W. F., Foreman, O., Warming, S., Watts,

- R. J., y Scarce-Levie, K. 2017. BACE1 across species: A comparison of the in vivo consequences of BACE1 deletion in mice and rats. *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 7(44249), 1–17. doi: 10.1038/srep44249
- Wei, H., Zhang, H. liang, Wang, X. chuan, Xie, J. zhao, An, D. dan, Wan, L., Wang, J. zhi, Zeng, Y., Shu, X. ji, Westermarck, J., Lu, Y. ming, Ohlmeyer, M., y Liu, R. 2020. Direct Activation of Protein Phosphatase 2A (PP2A) by Tricyclic Sulfonamides Ameliorates Alzheimer’s Disease Pathogenesis in Cell and Animal Models. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. *Neurotherapeutics*, 17(3), 1087–1103. doi: 10.1007/S13311-020-00841-6
- Winblad, B., Cummings, J., Andreasen, N., Grossberg, G., Onofrj, M., Sadowsky, C., Zechner, S., Nagel, J., y Lane, R. 2007. A six-month double-blind, randomized, placebo-controlled study of a transdermal patch in Alzheimer’s disease - Rivastigmine patch versus capsule. *International Journal of Geriatric Psychiatry*. *Int J Geriatr Psychiatry*, 22(5), 456–467. doi: 10.1002/gps.1788
- Yiannopoulou, K. G. y Papageorgiou, S. G. 2020. Current and Future Treatments in Alzheimer Disease: An Update. *Journal of Central Nervous System Disease*. SAGE Publications, 12, 1–12. doi: 10.1177/1179573520907397
- Zhai, K., Huang, Z., Huang, Q., Tao, W., Fang, X., Zhang, A., Li, X., Stark, G. R., Hamilton, T. A., y Bao, S. 2021. Pharmacological Inhibition of BACE1 Suppresses Glioblastoma Growth by Stimulating Macrophage Phagocytosis of Tumor Cells. *Nature Cancer*. NIH Public Access, 2(11), 1136–1151. doi: 10.1038/S43018-021-00267-9
- Zhang, X. D., Ouyang, L., Mu, X., Wang, J., Li, Q., Gao, Y., Liu, H., Sun, S., Ren, Q., Yan, R., Wang, J., Liu, Q., Sun, Y., Liu, C., He, H., Long, W., y Zhang, X. D. 2020. Carbon dot targeting to nitrogen signaling molecules for inhibiting neuronal death. *Journal of Materials Chemistry B*. Royal Society of Chemistry, 8(11), 2321–2330. doi: 10.1039/c9tb02447f

Anexos

ANEXO A. Curvas de calibración

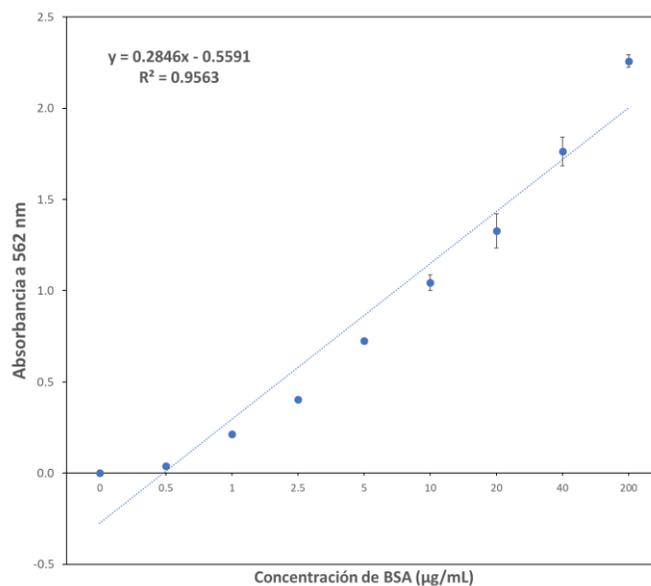


Figura 53. Curva estándar de BSA para determinar las concentraciones de proteína en el ensayo de micro-BCA. Se calculó la media y desviación estándar de los estándares por triplicado. $R^2=0.9563$.

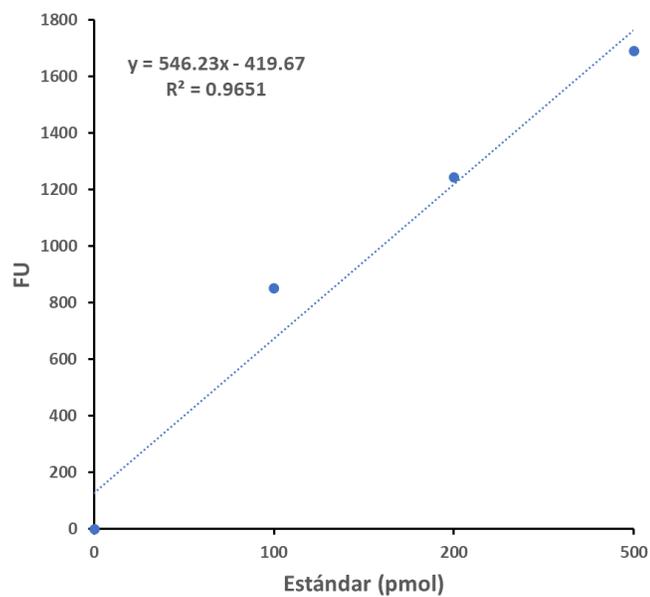


Figura 54. Curva estándar del kit de detección de la actividad de BACE1, para convertir la señal de fluorescencia del ensayo FRET a concentración en pmol. Se calculó la media y desviación estándar de los estándares por triplicado. $R^2=0.9651$.

ANEXO B. Cultivo celular

Las HBEC-5i llegaron a confluencia del 90% aproximadamente a los 13 días. Mientras que las U-87 MG llegaron a confluencia del 90% aproximadamente a los 10 días.

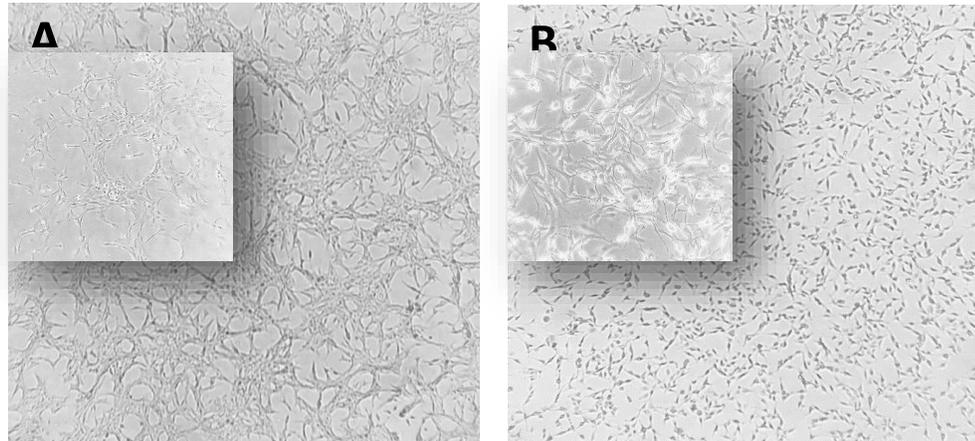


Figura 55. Morfología de **A)** células endoteliales de la microvasculatura cerebral (HBEC-5i) y **B)** células de glioblastoma (U-87 MG). Fotomicrografías de campo claro con objetivo 10x (Aumento total: 100x). Detalle (superior-izquierda): fotomicrografía de contraste de fases con objetivo 40x (Aumento total: 400x).

ANEXO C. Caracterización

Se obtuvieron imágenes de topografía por AFM en modo intermitente (tapping) de los CD conjugados. Como referencia se analizó el PBS 1x con el que se disolvieron los CD (Figura 56-A) y el sustrato de vidrio (Figura 56-B) para corroborar que el material analizado correspondía a los CD.

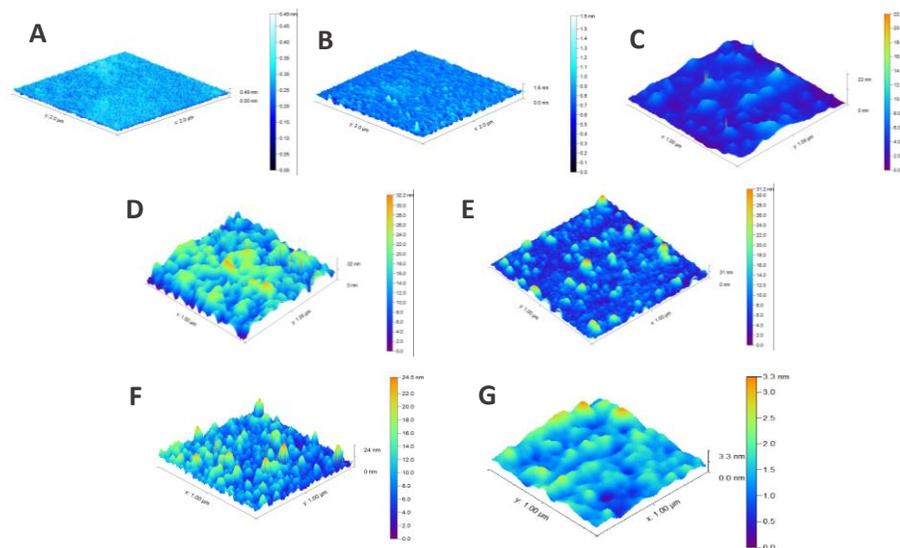


Figura 56. Imágenes de topografía con AFM en modo intermitente de **A)** PBS 1x, **B)** Sustrato, **C)** CD pH 4, **D)** CD pH 7, **E)** CD-T, **F)** CD-i β , **G)** CD-Ti β . Barrido de 1x1 μ m.

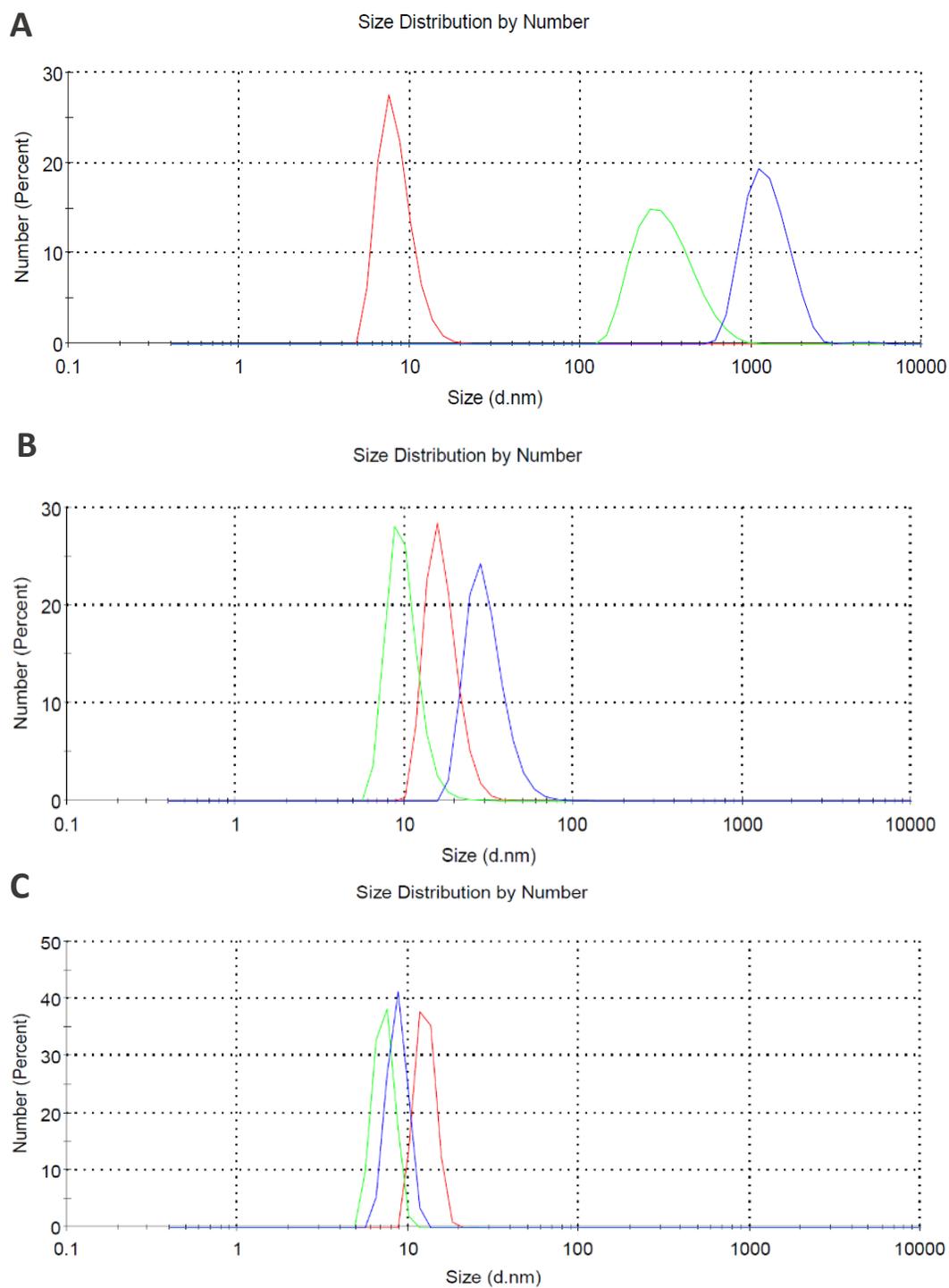


Figura 57. Distribución de tamaño por número de **A)** CD, **B)** CD-T, **C)** CD-Ti β .