

## **Nanopartículas de Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub> conjugadas a Amylovis<sup>®</sup>-204, con potencial afinidad por las placas β-amiloides. Parte II**

Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles grafted to Amylovis<sup>®</sup>-204, with potential affinity for β-amyloid plaques. Part II

Gabriel Rafael Guerrero-Porras<sup>1</sup><https://orcid.org/0000-0002-2895-4426>

Marquiza Sablón-Carrazana<sup>2\*</sup><https://orcid.org/0000-0002-4053-8302>

Alicia M. Díaz-García<sup>1</sup><https://orcid.org/0000-0002-1527-8174>

Chryslaine Rodríguez-Tanty<sup>2</sup><https://orcid.org/0000-0002-3958-183X>

<sup>1</sup>Laboratorio de Bioinorgánica, Departamento de Química General e Inorgánica, Facultad de Química, Universidad de La Habana, La Habana, Cuba

<sup>2</sup>Laboratorio de Síntesis Orgánica, Departamento de Neuroquímica, Dirección de Neurociencias Moleculares, Centro de Neurociencias de Cuba, La Habana, Cuba

\*Autor para correspondencia: [marquiza@cneuro.edu.cu](mailto:marquiza@cneuro.edu.cu)

### **RESUMEN**

Para la visualización por Resonancia Magnética de Imágenes (RMI) de los marcadores moleculares —péptido β-amiloides (βA)— de la enfermedad de Alzheimer, es necesario el empleo de agentes de contrastes (ACs). En la práctica clínica, la obtención de nanopartículas de óxido de gadolinio(III) (Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>NPs) como ACs es un campo de investigación muy activo. En este trabajo se conjugó a Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>NPs uno de los compuestos Amylovis<sup>®</sup>, derivados del naftaleno, obtenidos en CNEURO, con gran afinidad por el βA. Las Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>NPs se caracterizaron por FT-IR, TEM, TGA, DLS y Potencial ζ. Por FT-IR y TEM, respectivamente. Se corroboró la funcionalización con grupos carboxilos y el tamaño de las Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>NPs (< 10 nm). Si bien la cantidad de

Amylovis<sup>®</sup>-204 que se conjuga puede disminuir la estabilidad coloidal de las Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>NPs, los valores de diámetros hidrodinámicos (< 200 nm) y relaxitividad longitudinal de las Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>NPs, justifican su empleo potencial como AC para el fin propuesto.

**Palabras clave:** nanopartículas de óxido de gadolinio(III); agente de contraste; Amylovis<sup>®</sup>; enfermedad de Alzheimer.

## ABSTRACT

For Magnetic Resonance Imaging (MRI) visualization of molecular markers — $\beta$ -amyloid peptide ( $\beta$ A)— of Alzheimer's disease, the use of contrast agents (CAs) is necessary. In clinical practice, obtaining gadolinium(III) oxide nanoparticles (Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>NPs) as ACs is a very active field of research. In this work, one of the Amylovis<sup>®</sup> compounds, naphthalene derivatives obtained at CNEURO with high affinity for  $\beta$ A, was conjugated to Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>NPs. The Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>NPs were characterized by FT-IR, TEM, TGA, DLS and  $\zeta$ -potential. By FT-IR and TEM, respectively, the functionalization with carboxyl groups and the size of the Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>NPs (< 10 nm) were corroborated. Although the amount of Amylovis<sup>®</sup>-204 conjugated could decrease the colloidal stability of Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>NPs, the values of hydrodynamic diameters (< 200 nm) and longitudinal relaxivity of Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>NPs justify their potential use as AC for the proposed purpose.

**Keywords:** gadolinium(III) oxide nanoparticles; MRI contrast agent; Amylovis<sup>®</sup>; Alzheimer's disease.

Recibido: 11/10/2022

Aprobado: 12/11/2022

## Introducción

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo que se desarrolla, principalmente, en las personas mayores. Se caracteriza histopatológicamente por la presencia en el cerebro de placas seniles (PS) o  $\beta$ -amiloides ( $\beta$ A). La acumulación

anómala de estas trae consigo la pérdida específica de neuronas, y afecta a las sinapsis entre ellas. No existe actualmente una cura para la EA, la cual tiene un gran impacto emocional, social y económico, tanto en los pacientes, como en sus familias. Por ello, la búsqueda de métodos de diagnóstico de esta enfermedad resulta de gran interés.<sup>(1,2)</sup>

Entre las técnicas de neuroimagen exploradas para la detección *in vivo* de  $\beta$ A, la Resonancia Magnética de Imágenes (RMI) presenta ventajas sobre otras que utilizan radiaciones ionizantes y son menos accesibles. La baja sensibilidad de la RMI a las estructuras  $\beta$ A hace necesario el uso de agentes de contraste (ACs) que permitan diferenciar mejor los tejidos sanos, de los patológicos.<sup>(3)</sup> Las investigaciones actuales se centran en la búsqueda de ACs capaces de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) y que, a su vez, porten en su estructura moléculas afines al  $\beta$ A, lo que garantizaría un diagnóstico preciso de la EA. Los ACs descritos para este uso no son seguros, debido a problemas relacionados con su estabilidad química y su capacidad de atravesar la BHE.<sup>(4)</sup>

Las sales de gadolinio(III) —Gd(III)— generan un aumento de la relajación longitudinal ( $T_1$ ) de los protones del agua en los tejidos, provocando un incremento en la intensidad de la señal en RMI. El uso clínico de estas sales, consideradas como ACs positivos (o ACs  $T_1$ ), no está permitido debido a su toxicidad. Sin embargo, se ha experimentado con éxito el uso de iones Gd(III) en forma de complejos o de nanopartículas (NPs) del óxido metálico. En particular, las NPs son ventajosas porque pueden ser funcionalizadas con recubrimientos tales que permitan el acceso a zonas específicas del cuerpo y, al mismo tiempo, transporten compuestos con alta afinidad por las dianas terapéuticas deseadas.<sup>(4)</sup>

Diferentes derivados monosustituídos de la naftalina, denominados Amylovis<sup>®</sup>, y obtenidos en el Centro de Neurociencias de Cuba (CNEURO), son considerados candidatos potenciales para el estudio de la EA. Estudios previos<sup>(5-9)</sup> han evaluado el efecto de los Amylovis<sup>®</sup> sobre la cinética de agregación de la proteína BSA y del péptido hIAPP1-37 *in vitro*, mediante diversos ensayos.

Recientemente, se realizaron simulaciones de dinámica molecular *in silico* para identificar el tipo de interacción y la estabilidad del complejo formado entre estos derivados con el péptido  $\beta$ A<sub>1-42</sub>, así como con una estructura fibrilar del mismo, que predijeron que Amylovis<sup>®</sup> puede inhibir los procesos de oligomerización y fibrilación.

Además, los ensayos *in vitro* e *in vivo* que evalúan la actividad anti- $\beta$ A<sub>1-42</sub> de estos compuestos tuvieron resultados prometedores.

En la actualidad, el CNEURO y el Laboratorio de Bioinorgánica (LBI) trabajan en conjunto en el diseño de ACs basados NPs de óxidos metálicos para la detección precoz de la EA a través de la RMI.<sup>(10-12)</sup> De forma general, estos ACs se conforman por un núcleo magnético de hierro(II, III) o gadolinio(III) recubierto con polímeros funcionalizados, como el polietilenglicol dicarboxilado (PEGdiCOOH), al cual se conjuga, mediante la reacción de esterificación tipo *Steglich*, el N<sup>1</sup>-(2-aminoetil)-N<sup>4</sup>-(1-naftil)succinimida (Amylovis<sup>®</sup>-204).

El objetivo del presente trabajo es caracterizar los conjugados de Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>NPs con Amylovis<sup>®</sup>-204 y evaluar su relaxitividad longitudinal. El producto final puede generar un novedoso AC para el estudio molecular y el diagnóstico *in vivo* de la EA por RMI, y ayudar a la implementación de terapias tempranas para mitigar la enfermedad.

## **Materiales y métodos**

### **Reactivos y disolventes**

Los reactivos y disolventes utilizados fueron puros para síntesis de las firmas Merck, Panreac y Sigma-Aldrich. El agua utilizada en todos los experimentos fue destilada.

### **Instrumentos y caracterizaciones**

Los espectros infrarrojos con transformada de Fourier (FT-IR) se registraron en un equipo ATI Mattson Genesis Series FTIR. El tamaño (d) y el diámetro hidrodinámico (d<sub>h</sub>) de las Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>NPs fueron determinados mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) —JEM-1010, JEOL—, y Dispersión Dinámica de la Luz (DLS) —Zetasizer AT, Malvern Panalytical—, respectivamente. La cantidad de materia orgánica en la superficie de las Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>NPs se determinó mediante Análisis Termogravimétrico (TGA) —Thermogravimetric Analyzer SF<sup>®</sup>, Mettler Toledo, USA—. La determinación del contenido de Gd(III) y la relaxitividad longitudinal (r<sub>1</sub>) de las Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>NPs se determinaron con un equipo de resonancia magnética SIEMENS Magnetom Allegra 3T. Para realizar la determinación por RMI de la c(Gd) se digieren las muestras (rel. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:HNO<sub>3</sub> 1:2, v/v) y se enrasan a volumen final de 1,5 mL con agua destilada. Las

imágenes de RMI se obtuvieron con una secuencia de pulso Recuperación de Inversión Eco de Espín (IR-SE). Los tiempos de repetición (TR) empleados fueron 8 500 y 10 000 ms; el tiempo de eco (TE) 13 ms y los tiempos de inversión (TI) estuvieron entre 23 ms y 6 800 ms. Se emplea el *ToolBox* de MATLAB “KRelax” (desarrollado en CNEURO y registrado en el CENDA, en donde se procesan las imágenes obtenidas que permiten calcular los valores de intensidad y desviación estándar de la región de interés (ROI) seleccionada. A partir de la curva de relajación longitudinal (Intensidad vs. TI) obtenida, se aplica el algoritmo de *Levenberg-Marquardt*, y se deducen los valores de  $T_1$  para cada ROI. Asimismo, a partir de la curva de velocidad de relajación longitudinal ( $R_1 = 1/T_1$ ,  $R_1$  vs.  $c(\text{Gd})$ ) obtenida, se interpolan en ella los valores de  $R_1$  de las muestras analizadas para determinar la  $c(\text{Gd})$ . La curva de calibración de Gd(III) confeccionada abarcó un intervalo de concentración entre 0 y 2 mmol/L del elemento.

### **Síntesis de las $\text{Gd}_2\text{O}_3@ \text{PEGdiCOOH}_{600}\text{NPs}$**

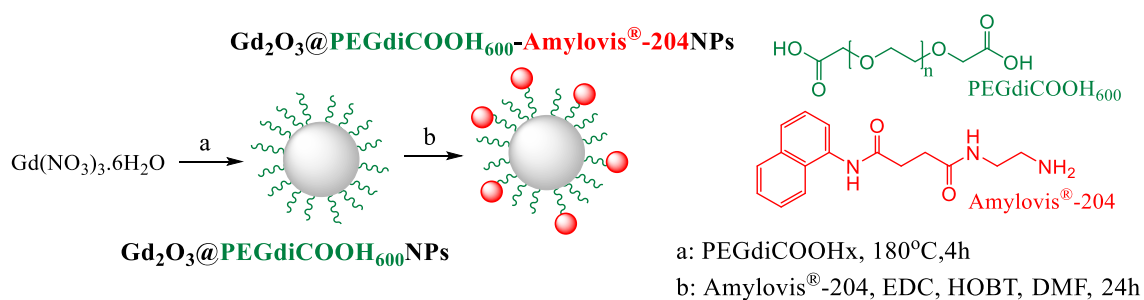
En un balón de 25 mL equipado con un condensador a reflujo, 955 mg (2,12 mmol) de  $\text{Gd}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , se disuelven en 24 g (40 mmol) de  $\text{PEGdiCOOH}_{600\text{Da}}$ , a 100 °C. Luego, la temperatura de la mezcla de reacción se eleva a 140 °C por 1 h, y posteriormente a 180 °C, por 4 h más. Concluido este tiempo, el crudo de reacción se dializa en agua por 2 días (rel. v/v 1:1000), se ultrafiltra (membrana PES, 30 kDa) y se centrifuga (5 000 rpm, 15 min). La dispersión acuosa se conserva a 5 °C.

### **Conjugación del Amylovis<sup>®</sup>-204 a las $\text{Gd}_2\text{O}_3@ \text{PEGdiCOOH}_{600}\text{NPs}$ ( $\text{Gd}_2\text{O}_3@ \text{PEGdiCOOH}_{600}\text{-Amylovis}^{\text{®}}\text{-204NPs}$ )**

A 10 mL de una dispersión acuosa de  $\text{Gd}_2\text{O}_3@ \text{PEGdiCOOH}_{600}\text{NPs}$  se adicionan 5 mL de DMF, y se elimina el agua mediante rotoevaporación. A esta disolución se adicionan, de forma consecutiva,  $\text{N}^1\text{-(2-aminoetil)-N}^4\text{-(1-naftil)succinimida}$  (Amylovis<sup>®</sup>-204, 22 mg, 77  $\mu\text{mol}$ ), HOBt (25 mg; 0,19 mmol) y EDC (25 mg; 0,13 mmol), previamente disueltos en DMF (850, 500, 1 000  $\mu\text{L}$ , respectivamente). La mezcla se agita durante 24 h. Luego se dializa, ultrafiltra y centrifuga en condiciones similares a las descritas anteriormente. La dispersión acuosa se conserva a 5 °C.

## Resultados y discusión

Tomando en cuenta experiencias previas, <sup>(12)</sup> la síntesis de nanopartículas de óxido de gadolinio(III) ( $Gd_2O_3$ NPs) funcionalizadas con grupos carboxilos (figura 1, etapa a) se realizó por el método del poliol, que consiste en la descomposición térmica de una sal de Gd(III) en presencia de un disolvente de alto punto de ebullición, que también actúa como recubrimiento.<sup>(13)</sup> En este caso se empleó un derivado dicarboxílico de polietilenglicol de 600 Da comercial (PEGdiCOOH<sub>600Da</sub>). La presencia de grupos carboxilos permite, por tanto, la conjugación de N<sup>1</sup>-(2-aminoetil)-N<sup>4</sup>-(1-naftil)succinimida (Amylovis<sup>®</sup>-204) a través de una reacción de esterificación tipo Steglich (figura 1, etapa b).



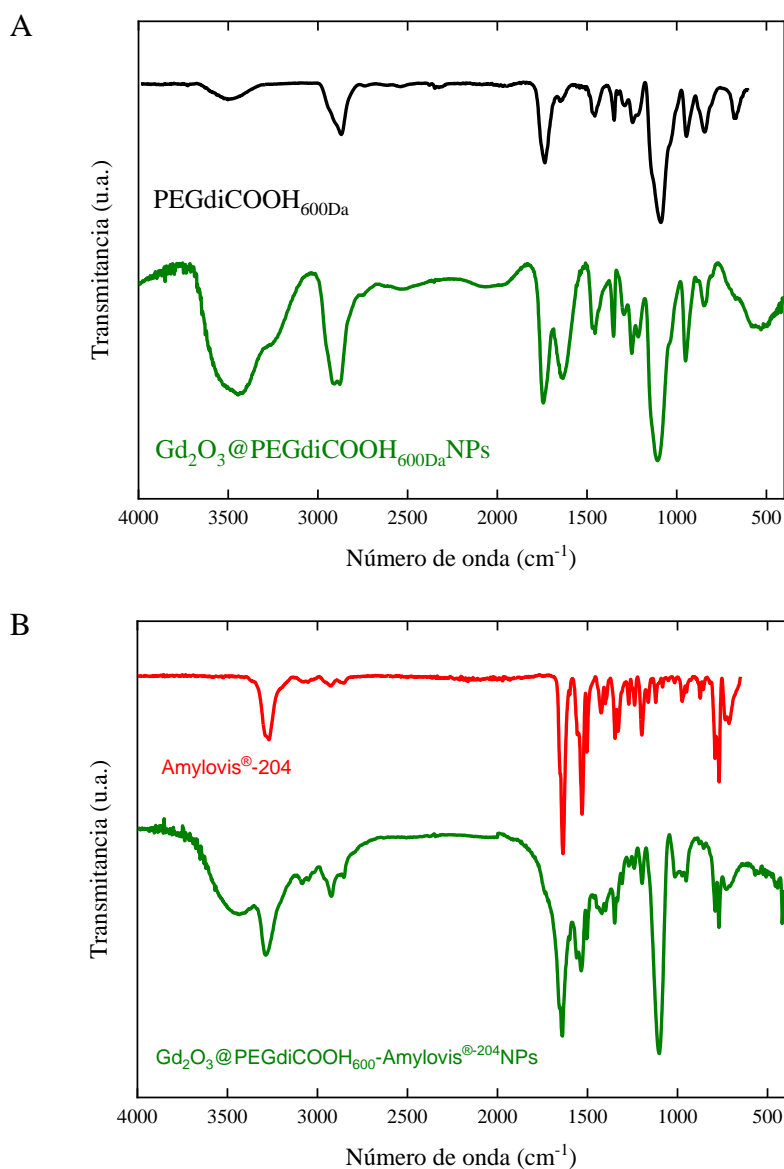
**Fig. 1-** Esquema general de síntesis de  $Gd_2O_3$ NPs conjugadas al Amylovis<sup>®</sup>-204

### Caracterización mediante FT-IR

Los espectros FT-IR de las  $Gd_2O_3$ NPs recubiertas con PEGdiCOOH<sub>600Da</sub> y conjugadas al Amylovis<sup>®</sup>-204 se muestran en la figura 2. Para las  $Gd_2O_3@PEGdiCOOH_{600}NPs$ , la presencia en el espectro FT-IR (figura 2A) de una banda poco intensa en los 583  $cm^{-1}$  se atribuyó a  $\nu_{Gd-O}$ , evidenciando la formación del núcleo de óxido metálico. Según los informes de Ahrén y col., <sup>(14)</sup> la poca intensidad de la banda se corresponde con  $Gd_2O_3$ NPs con tamaños inferiores a los 10 nm. Asimismo, las bandas en 3 447  $cm^{-1}$  ( $\nu_{OH}$ ),

2 910-2 875  $cm^{-1}$  ( $\nu_{Csp^3-H}$ ), 1 456  $cm^{-1}$  ( $\delta_{CH_2}$ ) y 1 100  $cm^{-1}$  ( $\nu^{as}_{COC}$ ) se corresponden al polímero tipo PEG que recubre el núcleo de las NPs. La banda en 1 744  $cm^{-1}$  ( $\nu_{C=O}$ ) indica la presencia de grupos carboxilos libres.

En la figura 2A, las otras dos señales en el intervalo 1 450-1 650  $\text{cm}^{-1}$  corresponden a las bandas  $\nu^{\text{as}}\text{COO}^-$  (1 633  $\text{cm}^{-1}$ ) y  $\nu^{\text{s}}\text{COO}^-$  (1 470  $\text{cm}^{-1}$ ). Se conoce que los modos de coordinación del grupo carboxilato ( $\text{COO}^-$ ) se definen por la separación ( $\Delta$ ) de estas bandas.<sup>(14-15)</sup> Esta diferencia en las  $\text{Gd}_2\text{O}_3@\text{PEGdiCOOH}_{600}\text{NPs}$  es de 163  $\text{cm}^{-1}$ . Sobre la base de este valor, el modo de unión de los grupos carboxilato del recubrimiento al núcleo debe ser tipo puente.



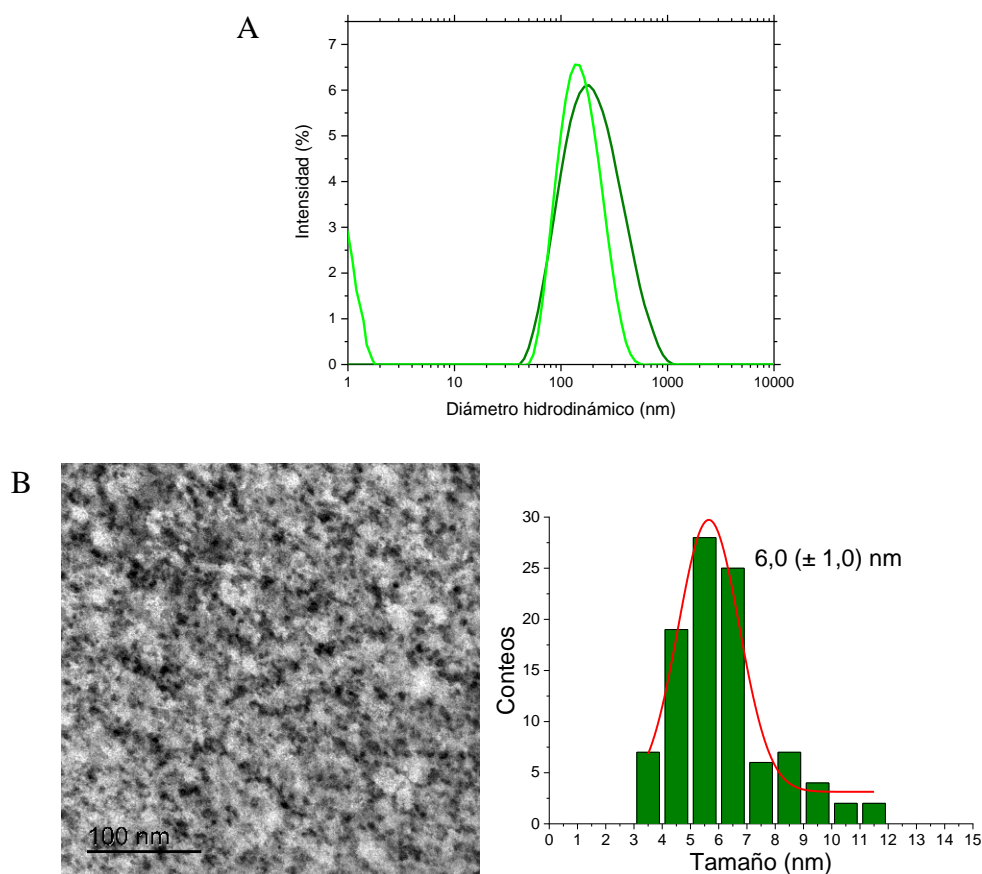
**Fig. 2-** Espectros FT-IR del PEGdiCOOH<sub>600</sub>Da y las Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@PEGdiCOOH<sub>600</sub>NPs (A) y del Amylovris<sup>®</sup>-204 y las Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@PEGdiCOOH<sub>600</sub>Amylovris<sup>®</sup>-204NPs (B)

En el caso del espectro FT-IR de las  $Gd_2O_3@PEGdiCOOH_{600}$ -Amylovis<sup>®</sup>-204NPs (figura 2B), las señales del derivado de PEG empleado, también se observan. La señal del grupo carbonilo se desplaza a menores valores de número de onda, de  $1744\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{C=O}$ , ácido carboxílico) a  $1640\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{C=O}$ , amida), producto de la conjugación del derivado de naftilo. Las bandas en  $3287\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{NH}$ ),  $3084\text{ cm}^{-1}$  y  $3049\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{Csp^2-H}$ ),  $1400\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{C-N}$ ),  $790\text{ cm}^{-1}$  ( $\delta_{NH}$ ) y  $770\text{ cm}^{-1}$  ( $\gamma_{CH}$ ) se corresponden con el derivado de Amylovis<sup>®</sup> empleado.<sup>(9)</sup> El desplazamiento de la señal  $\nu_{NH}$ , en comparación con el Amylovis<sup>®</sup>-204 ( $3270\text{ cm}^{-1}$ ), es consecuente con la formación de un enlace amida.<sup>(16)</sup> Una vez conjugado el Amylovis<sup>®</sup>-204 al recubrimiento de las  $Gd_2O_3@PEGdiCOOH_{600}$ NPs, la estabilidad del sistema coloidal disminuyó, manifestándose en la paulatina precipitación de las NPs. Este proceso ocurre de forma más rápida que en sus análogas sin conjugar, lo cual es indeseado para su aplicación final.

### Caracterización mediante DLS y TEM

La determinación del diámetro hidrodinámico ( $d_h$ ) de las  $Gd_2O_3@PEGdiCOOH_{600}$ NPs se realizó a través del registro de los perfiles de DLS (figura 3A, línea verde oscura). Las NPs pegiladas presentaron un  $d_h$  de 174 nm, valor inferior a los 200 nm que se describen en la literatura como el  $d_h$  idóneo, para que las NPs atraviesen la BHE. El perfil de DLS de las  $Gd_2O_3@PEGdiCOOH_{600}$ -Amylovis<sup>®</sup>-204NPs (figura 3B, línea verde clara) muestra que su  $d_h$  es de 156 nm, valor menor al de las NPs pegiladas. Esta disminución se asocia a la naturaleza hidrofóbica del derivado de Amylovis<sup>®</sup> conjugado, lo que limita la cantidad de moléculas de agua que interactúan con la NP. Según experiencias previas descritas en la literatura,<sup>(12)</sup> estas NPs presentaron  $d_h$  de alrededor de 2,5  $\mu\text{m}$ . Las diferencias de los resultados que se obtienen con aquellas descritas en este trabajo se asociaron, fundamentalmente, a la modificación de la metodología de síntesis y el método de purificación de las  $Gd_2O_3$ NPs.





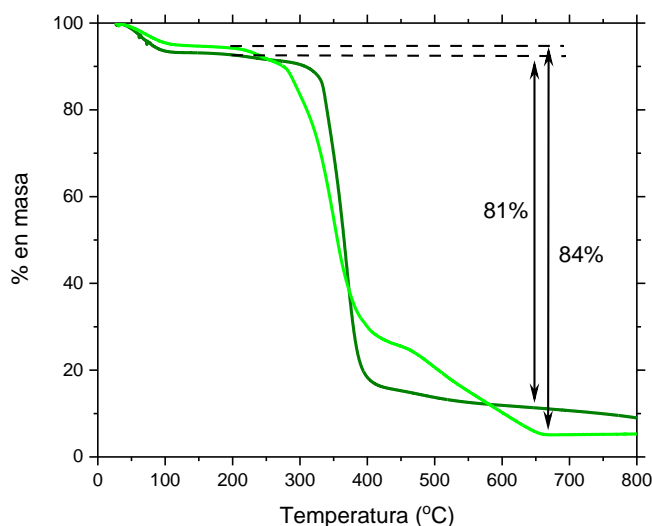
**Fig. 3-** Perfiles de DLS de las Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@PEGdiCOOH<sub>600</sub>NPs (línea verde oscuro) y Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@PEGdiCOOH<sub>600</sub>-Amylovis<sup>®</sup>-204Ps (línea verde clara) (A). Imagen TEM y distribución de tamaño de las Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@PEGdiCOOH<sub>600</sub>NPs (B)

Por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), y con el programa ImageJ 1.52a, se determinó el tamaño ( $d$ ) del núcleo de las Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@PEGdiCOOH<sub>600</sub>NPs (figura 3B), siendo este de 6,0 (± 1,0) nm. El valor de  $d$  para las Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>NPs pegiladas se corresponde con lo esperado por el análisis del espectro FT-IR de las NPs (menos de 10 nm, baja intensidad de la banda  $\nu_{\text{Gd-O}}$ ). Los valores de  $d$  suelen ser menores que los  $d_h$ , la diferencia entre ambos se asocia a la posible agregación de las NPs (ver imagen TEM, figura 3B) producto de las interacciones existentes entre las cadenas de PEGdiCOOH que las recubren, y a las interacciones de estas con el disolvente (agua). Estas interacciones pueden ser fundamentalmente del tipo hidrofílicas, producto de las características de los monómeros que conforman la cadena de PEG y la polaridad de sus grupos terminales.

## Caracterización mediante TGA

En la figura 4 se observan las curvas correspondientes al Análisis Termogravimétrico (TGA) de las NPs pegiladas y conjugadas con Amylovis<sup>®</sup>-204. Las curvas del TGA se caracterizaron por la existencia de una primera etapa, donde se produce una pérdida de masa del 7 %, y 5 % para las Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@PEGdiCOOH<sub>600</sub>NPs y Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@PEGdiCOOH<sub>600</sub>-Amylovis<sup>®</sup>-204NPs, respectivamente, lo que corresponde a la eliminación de la humedad de la muestra. El menor grado de hidratación de la segunda muestra se corresponde con la hipótesis empleada para explicar su menor  $d_h$ , ya que estas interaccionan en menor medida con las moléculas de agua debido al carácter hidrofóbico del recubrimiento. A continuación, para las NPs funcionalizadas con el PEGdiCOOH<sub>600Da</sub>, se produce una pérdida de un 81 % de la masa entre los 200 y 600 °C, debido a procesos de desorción y descomposición del recubrimiento orgánico. En el caso de las NPs recubiertas con Amylovis<sup>®</sup>-204, la pérdida de masa en este intervalo de temperatura, se corresponde con un 84 %. En ambos gráficos de TGA se aprecia, que luego de los 650 °C no existen variaciones significativas de pérdida de masa, lo que se corresponde con el núcleo de las Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>NPs.

La existencia de una gran cantidad de recubrimiento en la superficie de las Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>NPs es evidente en ambos casos. La cantidad de materia orgánica pudiera ser la causa de la alta agregación que se observa en las imágenes TEM y la marcada diferencia entre los valores de  $d_h$  y  $d$ . Estos resultados evidencian la necesidad de optimizar los procesos de síntesis (relación PEGdiCOOH/Amylovis<sup>®</sup>-204) y purificación (tiempo de centrifugado, volumen de diálisis) de las Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@PEGdiCOOH<sub>600</sub>-Amylovis<sup>®</sup>-204NPs.



**Fig. 4-** Curvas de TGA de las  $Gd_2O_3@PEGdiCOOH_{600}NPs$  (línea verde oscura) y las  $Gd_2O_3@PEGdiCOOH_{600}-Amylovis^{\circledR}-204NPs$  (línea verde clara)

### Determinación de la relaxitividad longitudinal ( $r_1$ )

La caracterización magnética de los sistemas nanométricos descritos, resulta clave para validar su aplicabilidad como AC para RMI. Las relaxitvidades longitudinal y transversal ( $r_1$  y  $r_2$ , respectivamente) y su relación ( $r_2/r_1$ ), constituyen parámetros importantes para la selección del AC adecuado. Los AC  $T_1$  empleados en RMI deben poseer una relación  $r_2/r_1$  cercana a la unidad, buscándose siempre el más alto valor de  $r_1$ . Este valor está modulado por la mayor o menor interacción de las moléculas de agua con los iones paramagnéticos Gd(III). Es por ello, que los recubrimientos de estos compuestos deben ser seleccionados de forma adecuada, pues por un lado tienen la función de minimizar la toxicidad del ion; y por otro, no deben afectar el mecanismo de propagación del efecto paramagnético.<sup>(17-18)</sup>

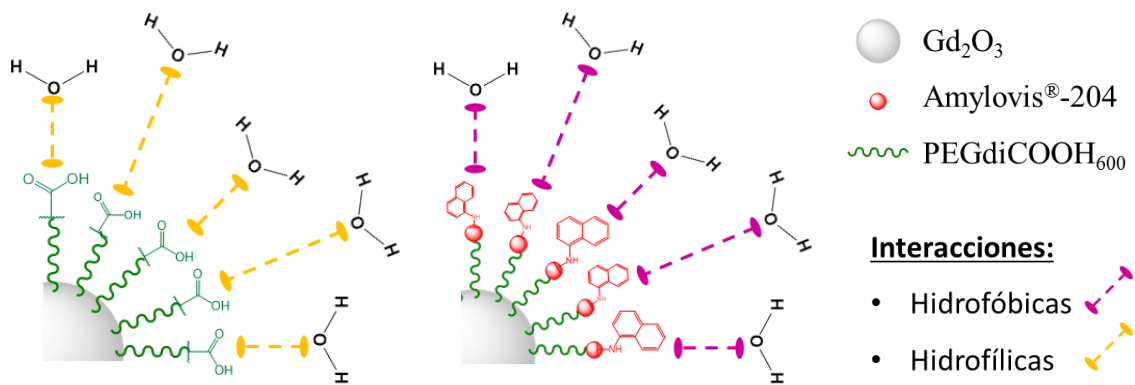
**Tabla 1-** Características y relaxitividad longitudinal ( $r_1$ ) de complejos de gadolinio(III) y  $Gd_2O_3NPs$

Sistema	d / d <sub>h</sub> (nm)	r <sub>1</sub> (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	Ref.
GdCl <sub>3</sub>	-	7,9	14
Gd <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @DEG	4-5 / 5-10	6,9	14
Magnevist® (Gd(III)-DTPA)	-	3,5	14
Gd <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @PEGdiCOOH <sub>600</sub> NPs	6,0 / 174	6,3	Este trabajo
Gd <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @PEGdiCOOH <sub>600</sub> -Amylovis®-204NPs	6,0 / 156	1,6	
Gd <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @PEGdiCOOH <sub>600</sub>	1,3 / -	10,9	19
Gd <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @PEGdiCOOH <sub>600</sub>	1,3 / 20	29,0	20
Gd <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @PEGdiCOOH <sub>600</sub> -BSA	2,0 / -	6,0	21
Gd <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @PEGdiCOOH <sub>600</sub> -fBSA	2,0 / -	7,6	21
Gd <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @PEGdiCOOH <sub>600</sub> -Amylovis®-204NPs	- / 2,5 μm	7,7	12

d: tamaño (TEM); d<sub>h</sub>: diámetro hidrodinámico (DLS); DEG: dietilenglicol; DTPA: ácido dietilentriaminopenta acético; Amylovis®-204: N<sup>1</sup>-(2-aminoetil)-N<sup>1</sup>-(1-naftil) succinimida; BSA: Albúmina de suero bovino, fBSA: fragmento de la BSA

En este trabajo, los resultados de las mediciones de relaxividad (tabla 1) confirman las propiedades magnéticas de las Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>NPs sintetizadas. Las Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@PEGdiCOOH<sub>600</sub>NPs mostraron valores de r<sub>1</sub> similares a los descritos en la literatura y superiores al del Magnevist®, complejo de Gd(III) de mayor empleo como AC en la práctica clínica actual. Esto corrobora que las NPs obtenidas fueron capaces de modificar la velocidad de relajación de los protones de las moléculas de agua, medio en el que se realizaron los estudios.

Al comparar los valores de r<sub>1</sub> de las Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>NPs pegiladas con los de las Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@PEGdiCOOH<sub>600</sub>-Amylovis®-204NPs, se observa una disminución de dichos valores. Esto se asocia a la presencia de Amylovis®-204, cuya naturaleza hidrofóbica dificulta la migración de las moléculas de agua, desde el seno de la disolución a la superficie del núcleo de las Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>NPs (figura 5). En el espectro FT-IR de las Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@PEGdiCOOH<sub>600</sub>-Amylovis®-204NPs (figura 2B) no aparece la señal de vibración ν<sub>C=O</sub> del grupo carboxilo(-COOH). Esto indica, que el grado de conjugación fue total; por tanto, es de esperar que en las Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@PEGdiCOOH<sub>600</sub>-Amylovis®-204NPs no existan grupos -COOH disponibles. Esta cobertura hidrofóbica en las NPs (figura 5) afecta el valor de r<sub>1</sub>, el cual disminuye casi cuatro veces respecto a las NPs pegiladas. Una posible solución a esto sería controlar la cantidad de Amylovis®-204 conjugado a las Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>NPs.



**Fig. 5-** Tipos de interacción entre los recubrimientos de las Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>NPs y el disolvente

Es conocido, que las NPs con elevados  $d_h$ , o la poca estabilidad coloidal (procesos de agregación), generan elevados valores de relaxitividad transversal ( $r_2$ ). Esto puede propiciar que la relación  $r_2/r_1$  sea superior a la unidad, aspecto no favorable para el desarrollo de ACs T<sub>1</sub> basado en Gd(III). En este trabajo, debido a la poca estabilidad coloidal de las Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@PEGdiCOOH<sub>600</sub>NPs y las Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@PEGdiCOOH<sub>600</sub>-Amylovis<sup>®</sup>-204NPs, no fue posible determinar, de forma confiable, los valores de  $r_2$  para los sistemas obtenidos. Sin embargo, los resultados de  $r_1$  son alentadores para el fin planteado. La optimización de la síntesis y purificación de las Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>NPs podría permitir la determinación de los valores de  $r_2$ , para evaluar así las potencialidades de las Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@PEGdiCOOH<sub>600</sub>-Amylovis<sup>®</sup>-204NPs como ACs T<sub>1</sub> para la detección *in vivo*, por RMI, de las PS características de la EA.

## Conclusiones

El método del poliol propuesto para la obtención de Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>NPs funcionalizadas con PEGdiCOOH<sub>600</sub> y su posterior conjugación con el derivado de Amylovis<sup>®</sup>-204, permite obtener un conjugado Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@PEGdiCOOH<sub>600</sub>-Amylovis<sup>®</sup>-204NPs con  $d_h$  inferior a 200 nm. La cantidad de PEGdiCOOH y Amylovis<sup>®</sup>-204 en la superficie de las Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>NPs, puede resultar un parámetro clave para lograr sistemas de mayor estabilidad coloidal. Los valores de relaxitividad longitudinal ( $r_1$ ) de las Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>NPs fueron comparables a los valores  $r_1$  de los ACs nanoestructurados descritos en la literatura, y

superiores a los presentados por los complejos de Gd(III) de uso clínico. Este resultado valida su potencial uso como AC para la técnica de RMI.

## Agradecimientos

Al Dr.C. Luis Felipe Jiménez y la Dra.C. Reyna Lara (UNAM, México), por las mediciones de TEM. Al MsC. Andy Guzmán Rodríguez, la Lic. Sheyla Bermúdez Pérez y Lic. Amhed Valdés (CEA, Cuba), por su ayuda en las caracterizaciones por FT-IR. A la MsC. Samila León Chaviano (Universidad de Laval, Canadá), al DrC. Alexis Mussachio Lassa (CIGB, Cuba), Lic. Marcos Muñoz Arias (IFV, Cuba) por las mediciones de TGA, DLS y Pot.  $\zeta$ , respectivamente. Al Ing. Armando J. Rodríguez Hernández, el Lic. Israel Reyes Molina, el DrC. Evelio R. González Dalmau, todos del departamento de Resonancia Magnética de CNEURO, por el apoyo en los estudios de relaxitividad. Al Fondo Nacional de Ciencia e Innovación (FONCI, No. 07/2015) y a los Programas Nacionales de Neurociencias y Neurotecnología (PN305LH013-007) y Nanociencias y Nanotecnología (PN211LH008-033) del Ministerio Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente de Cuba (CITMA).

## Referencias bibliográficas

1. ESTRADA RODRÍGUEZ, A. E. *et al.* “Papel de la agregación del péptido Beta amiloide en la enfermedad de Alzheimer”. *Revista de Educación Bioquímica (REB)* 2017, **36**(1), 2-11. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2017/reb171b.pdf>
2. SÁNCHEZ-MÁRQUEZ, N. I. *et al.* “Dinámica familiar de pacientes con enfermedad de Alzheimer antes y después del inicio de la enfermedad”. *Pensando Psicología* 2018, **14**(24), 1-17. <https://doi.org/10.16925/pe.v14i24.XXXX>
3. SALERNO, M. *et al.* “Alzheimer's disease: The use of contrast agents for magnetic resonance imaging to detect amyloid beta peptide inside the brain”. *Coordination Chemistry Reviews* 2016, **327**, 27-34. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2016.04.018>

4. AZRIA, D. *et al.* “Nanoparticles as contrast agents for brain nuclear magnetic resonance imaging in Alzheimer's disease diagnosis”. *Journal of Materials Chemistry B* 2017, **5**(35), 7216-7237. <https://doi.org/10.1039/c7tb01599b>
5. SABLÓN CARRAZANA, M. *et al.* “Drug development in conformational diseases: A novel family of chemical chaperones that bind and stabilise several polymorphic amyloid structures”. *PLOS ONE* 2015, **10**(9), e0135292. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135292>
6. BENCOMO MARTÍNEZ, A. *et al.* “Identificación y caracterización *in silico* de la zona de interacción entre el péptido beta-amiloide y compuestos derivados del naftaleno”. *Revista CENIC. Ciencias Químicas* 2012, **43**(1). <https://www.redalyc.org/pdf/1816/181628775009.pdf>
7. RIVERA MARRERO, S. *et al.* “[<sup>18</sup>F]Amylovis as a Potential PET Probe for  $\beta$ -Amyloid Plaque: Synthesis, *in Silico*, *in vitro* and *in vivo* Evaluations”. *Current Radiopharmaceuticals* 2019, **12**(1), 58-71. <https://doi.org/10.2174/1874471012666190102165053>
8. FERNÁNDEZ GÓMEZ, I. *et al.* “Diabetes drug discovery: hIAPP<sub>1-37</sub> polymorphic amyloid structures as novel therapeutic targets”. *Molecules* 2018, **23**(3), 686. <https://doi.org/10.3390/molecules23030686>
9. RIVERA MARRERO, S. *et al.* “Síntesis de nuevos derivados del naftaleno. *Revista CENIC. Ciencias Químicas* 2011, **42**(1), 25-32. <https://www.redalyc.org/pdf/1816/181622326003.pdf>
10. LAGAR SOSA, Á. Nanopartículas de óxido de hierro conjugadas con Amylovis por reacción de Ugi con potenciales aplicaciones como agente de contraste. BsC. Thesis, Universidad de La Habana, 2019.
11. GUZMÁN RODRÍGUEZ, A. *et al.* “Síntesis y caracterización de nanopartículas de óxido de hierro funcionalizadas con derivados de Amylovis”. *Revista Cubana de Química* 2022, **34**(1), 49-68. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=443570155004>
12. RODRÍGUEZ-IZQUIERDO, J. R. *et al.* “Nanopartículas de Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub> pegiladas y conjugadas a Amylovis con potencial aplicación en la detección de Alzheimer mediante RMI”. *Revista Cubana de Química* 2021, **33**(2), 3-22. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=443568186001>

13. GAYATHRI, T. *et al.* “Gadolinium Oxide Nanoparticles for Magnetic Resonance Imaging and Cancer Theranostics”. *Journal of Bionanoscience* 2015, **9**(6), 409-423. <https://doi.org/10.1166/jbns.2015.1325>
14. AHRÉN, M. *et al.* “A simple polyol-free synthesis route to Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles for MRI applications: an experimental and theoretical study”. *Journal of nanoparticle research* 2012, **14**(8), 1006. <https://doi.org/10.1007/s11051-012-1006-2>
15. NAKAMOTO, K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds, Part B: Applications in Coordination, Organometallic and Bioinorganic Chemistry*. John Wiley & Sons, Inc. ed.; Wiley: 2009. <https://doi.org/10.1002/9780470405840>.
16. PÉREZ MARTÍNEZ, C. S. *et al.* *Espectroscopia*. Ed. Félix Varela: 2010; vol., t. I y II.
17. CAO, Y. *et al.* “Gadolinium-based nanoscale MRI contrast agents for tumor imaging”. *Journal of Materials Chemistry B* 2017, **5**(19), 3431-3461. <https://doi.org/10.1039/C7TB00382J>
18. KIM, H.-K. *et al.* “Gadolinium as an MRI contrast agent”. *Future Medicinal Chemistry* 2018, **10**(6), 639-661. <https://doi.org/10.4155/fmc-2017-0215>
19. FAUCHER, L. *et al.* “Rapid Synthesis of PEGylated Ultrasmall Gadolinium Oxide Nanoparticles for Cell Labeling and Tracking with MRI”. *ACS Applied Materials and Interfaces* 2012, **4**(9), 4506-4515. <https://doi.org/10.1021/am3006466>
20. LI, J. *et al.* “Gadolinium oxide nanoparticles and aptamer-functionalized silver nanoclusters-based multimodal molecular imaging nanoprobe for optical/magnetic resonance cancer cell imaging”. *Analytical Chemistry* 2014, **86**(22), 11306-11311. <https://doi.org/10.1021/ac503026d>
21. AHMAD, M. W. *et al.* “Bovine serum albumin (BSA) and cleaved-BSA conjugated ultrasmall Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles: Synthesis, characterization, and application to MRI contrast agents”. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2014, **450**, 67-75. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.03.011>

### Conflicto de interés

Los autores declaran que no tienen conflictos de intereses que pudieran haber influido en el trabajo presentado.



## **Contribución de los autores**

Gabriel Rafael Guerrero Porras. Realizó el trabajo experimental que formó parte de su Tesis de Diploma, discusión de los resultados, escritura y discusión de los resultados.

Marquiza Sablón Carrazana. Supervisión del trabajo, discusión de los resultados, escritura y revisión del artículo.

Alicia M. Díaz García. Supervisión del trabajo, discusión de los resultados, escritura y revisión del artículo.

Chryslaine Rodríguez Tanty. Asesoría del trabajo, discusión de los resultados, escritura y revisión del artículo.