



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas  
Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

**EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE NANOPARTICULAS DE  
ORO CONJUGADAS AL PEPTIDO CLPFFD-NH<sub>2</sub>**

**PROFESOR  
PATROCINANTE**

**Dr. Marcelo J. Kogan**

DEPARTAMENTO DE  
QUIMICA FARMACOLOGICA  
Y TOXICOLOGICA

**DIRECTOR DE  
MEMORIA**

**Dr. Juan Pablo Muñoz**

DEPARTAMENTO DE  
BIOQUIMICA Y BIOLOGIA  
CELULAR

**DIRECTOR DE  
MEMORIA**

**Dr. Marcelo J. Kogan**

DEPARTAMENTO DE  
QUIMICA FARMACOLOGICA  
Y TOXICOLOGICA

Memoria para optar al título de Bioquímico

**HÉCTOR PABLO MARAMBIO RETAMAL**

Santiago, Chile

2007

*“La naturaleza esconde su secreto porque es sublime, no por astucia”*

**Albert Einstein**

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a mis padres, Laura Retamal y Héctor Marambio V., que a pesar de lo difícil que ha sido todo. Siempre han estado a mi lado, tendiéndome su cariñosa mano en mis tropiezos y apoyándome por sobre cada obstáculo.

A mi tía, Alicia Marambio, por su amor incondicional y apoyo sin cuartel durante toda mi vida.

A Marcelo J. Kogan, por la oportunidad de trabajar en un tema apasionante que me hizo amar, aún más, la ciencia.

A mi hermano del alma: Javier Wolnitzky Wenk, que ha estado siempre allí, entregándome su comprensión, cariño y fe.

A Marianela Sanchez, por su constante apoyo, cariño, comprensión y por enseñarme lo importante que es no dejar morir la magia en mi vida.

A Carla Delporte y Dante Miranda, que han sido para mí, grandes ejemplos. Por ser profesionales excepcionales, como por conservar en ellos la humildad que espero algún día alcanzar.

A Amalia Sapag de la Peña, por sus sabios consejos y excelente disposición.

A Ginéz Gonzalez, Rene Valdés, Italo Espinoza, Nicole Espinoza, Leonardo Sepúlveda, Stephanie Brain y Karina Navarrete. Grandes amigos, les agradezco por su apoyo a prueba de todo.

A Juan Pablo Muñoz, por todo lo que me ha enseñado en este bellissimo mundo que es la biología celular, así como su amistad. Le agradezco por sus conocimientos y buena fe.

A Dagoberto Soto, un grande sobre los grandes. Que aunque tomamos rumbos distintos, siempre estás en mi memoria y corazón por ser una gran persona y por sobretodo, un gran amigo.

A Fidel Albornoz, por todas las veces que me ayudaste en el laboratorio, con cosas que necesité y por haber sido siempre amable y respetuoso conmigo, te agradezco también por ese cálido saludo cada mañana.

A Guisela Muñoz, por tu eficiente trabajo, que sin duda apresuró mucho más el mío.

A Miguel Copaja, Pablo Aranguiz, Paulina Rojas, Rodrigo Almarcegui, Jorge Simon, Alan Letelier y Christian Smolic, compañeros de piso, con quienes he tenido la oportunidad de compartir momentos muy agradables.

A las bellas personas con las que tuve el honor de trabajar en Barcelona: Eliandre de Olivera, David Bellido, Merixell Texido, Miriam Royo, Tommaso Cupido, Stephanie Boussert, Frank Sicherl, Luis Javier Cruz, Fernando Albericio y tantas personas más que fueron un gran apoyo y me entregaron su cariño cuando estaba lejos de mi hogar.

A todos los animales que entregaron su vida en pos de esta investigación. Espero, de todo corazón, que su muerte no haya sido en vano y esta memoria de pie a un bello descubrimiento.

A mis compañeros de laboratorio y a la facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.

Finalmente al proyecto FONDECYT 1061142, al proyecto AECI A/3888/05 y al proyecto FONDAP 11980002 que hicieron posible este trabajo.

## TABLA DE CONTENIDOS

		Página
Agradecimientos.....		ii
Tabla de Contenidos.....		iv
Abreviaturas.....		vi
Resumen.....		viii
Summary.....		ix
1. Introducción.....		1
1.1 Marco Teórico.....		4
	1.1.1 Obtención y caracterización de conjugados AuNP-péptido con potencial aplicación para la EA.....	4
	1.1.1.1 Conjugación de AuNP al péptido CLPFFD-NH <sub>2</sub> , capaz de reconocer los agregados amiloides tóxicos de A $\beta$ .....	4
	1.1.2 Evaluación de la citotoxicidad de las AuNP y sus conjugados.....	8
	1.1.2.1 Ensayos de Citotoxicidad.....	8
	1.1.3 Determinación de tipo de muerte celular, en cultivos de neuronas de hipocampo de rata E18.....	9
	1.1.3.1 Análisis de muerte celular.....	11
	1.1.4 Determinación de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), en cultivos de neuronas de hipocampo de rata E18.....	13
	1.1.5 Análisis proteómico de cultivos celulares.....	14
Hipótesis.....		19
Objetivos.....		20
Objetivo general.....		20
Objetivos específicos.....		20
2. Materiales y Métodos.....		21
2.1 Reactivos.....		21
2.2 Materiales.....		22
2.3 Equipos.....		22
2.4 Kits.....		23

<b>2.5 Síntesis de AuNP.....</b>	<b>23</b>
<b>2.6 Conjugación de AuNP a Cys-LPFFDNH<sub>2</sub> (Pep).....</b>	<b>24</b>
<b>2.7 Concentraciones de AuNP.....</b>	<b>25</b>
<b>2.8 Toxicidad <i>in vitro</i>.....</b>	<b>26</b>
<b>2.8.1 Cultivos celulares de línea Neuroblastoma SH-SY5Y.....</b>	<b>26</b>
<b>2.8.2 Cultivos celulares de neuronas de hipocampo de rata E18.....</b>	<b>27</b>
<b>2.8.3 Tratamientos en cultivos celulares.....</b>	<b>29</b>
<b>2.8.4 Marcadores de viabilidad celular.....</b>	<b>30</b>
<b>2.8.5 Determinación de los tipos de muerte celular en cultivos de neuronas hipocampales E18.....</b>	<b>33</b>
<b>2.8.6 Evaluación de la producción de ROS en cultivos de neuronas hipocampales E18.....</b>	<b>35</b>
<b>2.8.7 Evaluación del efecto de las AuNP sobre la expresión de Proteínas en cultivos celulares.....</b>	<b>38</b>
<b>3. Resultados y Discusión.....</b>	<b>41</b>
<b>3.1 Caracterización de AuNP.....</b>	<b>41</b>
<b>3.2 Citotoxicidad de AuNP y AuNP-Pep.....</b>	<b>43</b>
<b>3.3 Efecto del tratamiento de AuNP y AuNP-Pep sobre el tipo de muerte en cultivos de neuronas hipocampales E18.....</b>	<b>52</b>
<b>3.4 Evaluación de la producción de ROS en cultivos de neuronas hipocampales E18 tratados con AuNP y AuNP-Pep.....</b>	<b>55</b>
<b>3.5 Expresión de proteínas en cultivos neuronas hipocampales E18.....</b>	<b>62</b>
<b>4. Conclusiones y Proyecciones.....</b>	<b>70</b>
<b>5. Bibliografía.....</b>	<b>74</b>

## ABREVIATURAS

<b>NPM</b>	: Nanopartículas metálicas
<b>CMO</b>	: Campo magnético oscilante
<b>RMN</b>	: Resonancia magnética nuclear
<b>AuNP</b>	: Nanopartículas de oro
<b>EC</b>	: Enfermedades conformacionales
<b>A<math>\beta</math></b>	: Proteína beta amiloide
<b>EA</b>	: Enfermedad de Alzheimer
<b>H<sup>+</sup>RMN</b>	: Resonancia magnética nuclear de protones
<b>APP</b>	: Proteína precursora del Amiloide
<b>BHE</b>	: Barrera hematoencefálica
<b>AuNP-Pep</b>	: Nanopartículas de oro, conjugadas al péptido CLPFFDNH <sub>2</sub>
<b>UV-Vis</b>	: Espectrofotometría Ultra Violeta-Visible
<b>TEM</b>	: Microscopía de transmisión electrónica
<b>MTT</b>	: Bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)2,5 difeniltetrazolio
<b>DNA</b>	: Ácido Deoxiribonucleico
<b>LDH</b>	: L-lactato deshidrogenasa
<b>NADH</b>	: Nicotinamida adenina dinucleótida reducida
<b>NAD<sup>+</sup></b>	: Nicotinamida adenina dinucleótida oxidada
<b>TdT</b>	: Transferasa deoxinucleotidil Terminal
<b>BrdUTP</b>	: 5-bromo-2'-deoxiuridina-5'-trifosfato
<b>TUNEL</b>	: <u>T</u> erminal <u>D</u> eoXinucleotide <u>T</u> ransferase <u>d</u> UTP <u>N</u> ick <u>E</u> nd <u>L</u> abeling
<b>GFP-LC3</b>	: Proteína fluorescente verde-LC3
<b>AdLC3</b>	: Adenovirus-LC3
<b>ROS</b>	: Especies reactivas del oxígeno
<b>DCF</b>	: 2',7'-di-clorofluoreceína
<b>H<sub>2</sub>DCFDA</b>	: Cloro-dihidro-fluoreceína-diacetato
<b>NAC</b>	: N-acetil cisteína
<b>SOD</b>	: Enzima Superóxido dismutasa
<b>MS</b>	: Espectrometría de masas

**MALDI-TOF** : Desorción por laser asistida por matriz/tiempo de vuelo  
**ESI** : Ionización por electrospray  
**HPLC** : Cromatografía líquida a alta resolución



## RESUMEN

La nanotecnología, en la biomedicina, trabaja desarrollando herramientas, tanto de diagnóstico, como estrategias terapéuticas, menos invasivas y más eficientes que las actualmente en uso. Entre estas herramientas, se encuentran el uso de las nanopartículas metálicas (NPM), las cuales, siendo tan pequeñas tienen la propiedad de poder difundir a través de barreras biológicas, siendo capaces de llegar al sitio de interés terapéutico.

Las nanopartículas de oro (AuNP) poseen potenciales aplicaciones en el campo de la biomedicina, siendo una de ellas el diagnóstico y la terapia de la enfermedad de Alzheimer (EA). Recientemente, en nuestro laboratorio se demostró que es posible producir la desagregación de agregados tóxicos (AT) de la proteína  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) involucrada en la EA mediante el uso de AuNP y la aplicación de campos magnéticos oscilantes. Para unir las AuNP a los AT de  $A\beta$ , las mismas se conjugaron al péptido CLPFFD-NH<sub>2</sub>, que presenta afinidad por  $A\beta$ , obteniendo los conjugados AuNP-CLPFFD-NH<sub>2</sub> (AuNP-Pep) .

En este trabajo de memoria se evaluó su neurotoxicidad. Para ello se realizaron ensayos de viabilidad, frente a cultivos de neuronas hipocampales extraídas de embriones de rata (E18) y Neuroblastoma SH-SY5Y.

Para el caso de las AuNP se encontró una leve disminución de la viabilidad respecto de los controles. Contrariamente, para AuNP-Pep, existe un aumento de la viabilidad celular que implica neuroprotección. Asimismo se evaluaron los efectos de los tratamientos en los mecanismos de muerte celular. Por otra parte, se determinaron los niveles de ROS producidos por las AuNP y las AuNP-Pep observándose que estas últimas presentan a tiempos tempranos de incubación un aumento de estas especies. También se estudió la producción de proteínas, en cultivos de neuronas, y se encontró un aumento en ciertas proteínas que, darían cuenta, de un efecto de “preacondicionamiento”, que contribuye a activar mecanismos de defensa que convierten a las neuronas en más resistentes.

**SUMMARY**

**EVALUATION OF THE CITOTOXICITY OF GOLD NANOPARTICLES  
CONJUGATED TO THE PEPTIDE CLPFFD-NH<sub>2</sub>**

The nanotechnology, in biomedicine, works in pursuit to develop diagnosis as therapeutic tools, with strategies less invasive and more efficient than nowadays in use. We can find the use of the metallic nanoparticles (MNP), which, being so small have the property of being able to spread across biological barriers, being capable of coming to the place of therapeutic interest.

The gold nanoparticles (AuNP) possess potential applications in the field of biomedicine, being one of them, the diagnosis and the therapy of Alzheimer's disease (AD). Recently, in our laboratory there was demonstrated that it is possible to produce the disaggregation of toxic attachés (TA) of the protein  $\beta$ -amyloid ( $A\beta$ ) involved in the AD using AuNP and the application of magnetic oscillating fields. To join the AuNP to this TA of  $A\beta$ , the same ones were conjugated to the peptide CLPFFD-NH<sub>2</sub>, which presents affinity for  $A\beta$ . Obtaining the conjugate AuNP-CLPFFD-NH<sub>2</sub> (AuNP-Pep).

In this report, there neurotoxicity was evaluated. For this assays of viability were realized, cultures of hippocampal neurons extracted from embryos of mice (E18) and Neuroblastome SH-SY5Y.

For the case of the AuNP a slight decrease of the viability was reported, respect of the controls. Opposited of that, for AuNP-Pep, there exists an increase of the cellular viability that it implies neuroprotección. Likewise the effects of this treatments were evaluated in the mechanisms of cellular death. On the other hand, ROS levels produced by the AuNP and the AuNP-Pep were determined, being observed an increase of these species at early times of incubation Also the synthesis of proteins, in cultures of neurons, was studied and one found an increase in certain proteins that, they would realize, of an effect of "preconditioning", that helps to activate mechanisms of defence that it will make the neurons in more resistant to injurys.

## 1. INTRODUCCIÓN

La nanotecnología, en la biomedicina, trabaja desarrollando herramientas, tanto de diagnóstico, como estrategias terapéuticas, menos invasivas y más eficientes que las actualmente en uso. Entre estas herramientas, se encuentran el uso de las nanopartículas metálicas (NPM), las cuales, siendo tan pequeñas tienen la propiedad de poder difundir a través de barreras biológicas, siendo capaces de llegar al sitio de interés terapéutico. Para dirigir selectivamente las NPM a la diana terapéutica, las mismas pueden conjugarse a moléculas con capacidad de reconocer selectivamente el sitio de acción.

Una característica común en los metales es que al ser sometidos a un campo magnético oscilante (CMO) pueden absorber energía de forma eficaz, disipándola en forma de calor. En el caso de las NPM, también están sujetas a esta característica, pero su carácter “nano” les entrega la cualidad de disiparla de forma local (nanométricamente), no afectando las estructuras aledañas a la que sería la diana terapéutica, lo que las ha llevado a ser utilizadas como agentes de hipertermia en el tratamiento de algunos tumores cancerígenos (1). Otra de las aplicaciones de las NPM es en diagnóstico, ya que las NPM pueden actuar como agentes de contraste mejorando la resolución de imágenes de tumores por RMN (2).

Entre estas NPM, se encuentran las nanopartículas de oro (AuNP), las cuales serían útiles en una gran cantidad de aplicaciones biológicas, debido a su tamaño y capacidad de difusión a diferentes zonas del organismo, entre las que cuentan ser agentes de liberación controlada de fármacos (*drug delivery*) y ser parte de andamiajes farmacológicos. También, se han utilizado como vectores de transfección, agentes de unión a DNA (3), inhibidores de proteínas, y marcadores espectroscópicos (4). Sin embargo, se ha encontrado que poseen toxicidad a elevadas dosis en cultivos de células mamarias (Cos-1) (4).

Las AuNP podrían ser utilizadas en la terapia o diagnóstico de algunas patologías denominadas enfermedades conformacionales (EC), las cuales tienen en común un carácter molecular, que se asocia con el mal plegamiento de proteínas, donde cambian su estructura

secundaria, desde una conformación  $\alpha$  mayoritaria (soluble) a una conformación  $\beta$  mayoritaria (insoluble), formando estructuras cuaternarias tóxicas para las células que circundan estos agregados (5). Entre las EC se encuentran la enfermedad de Huntington (6), la enfermedad de Creutzfeld-Jacob y otras patologías de carácter priónico (7), la amiloidosis (8), la diabetes mellitus no insulino dependiente (9), la enfermedad de Parkinson (10) y la enfermedad de Alzheimer (EA) (11), siendo esta última de gran importancia, tanto por su incidencia como por el impacto que tiene en los pacientes como en sus familiares.

Estudios preliminares, *in vitro*, desarrollados en nuestro laboratorio, evidenciaron que es posible producir la desagregación de agregados tóxicos de la proteína  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ), involucrada en la EA, mediante el uso de AuNP y la aplicación de CMO (12). Con la finalidad de dirigir las AuNP a la diana terapéutica, en este caso los agregados tóxicos de  $A\beta$ , se conjugaron al péptido LPFFD-NH<sub>2</sub>, que presenta capacidad para unirse selectivamente a agregados tóxicos de  $A\beta$  (Fig.1) (13).

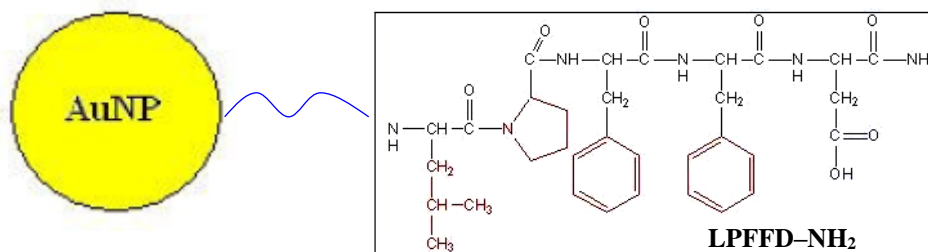


Fig. 1 AuNP conjugada al péptido LPFFD-NH<sub>2</sub>.

Aun así, a pesar de todos los potenciales beneficios de los nanomateriales, es poco lo que se sabe del potencial efecto nocivo de los mismos, a corto y largo plazo, a nivel de la salud humana como medioambiental. Específicamente, se desconocen detalles sobre el efecto debido a su tamaño, forma y superficie (14). También desde un punto de vista farmacológico y toxicológico varios son los interrogantes por responder, como por ejemplo como es su distribución,

metabolismo y excreción, cual sería su influencia en el metabolismo, y que mecanismo de degradación sufrirían estos nanomateriales (14).

Estudios recientes, mostraron que las AuNP recubiertas con especies catiónicas, tienen una toxicidad moderada, mientras que las recubiertas con especies aniónicas, casi no presentan toxicidad, en cultivos bacterianos (*E.coli*), de glóbulos rojos y células mamarias (Cos-1). Siendo, posiblemente, esta toxicidad dosis-dependiente mediada por características electrostáticas de las AuNP (21).

Por lo tanto, una solución para resolver el inconveniente de la toxicidad de los nanomateriales es la biocompatibilización. En el caso de las AuNP, pueden conjugarse a péptidos, logrando así que su toxicidad disminuya (14). Estos péptidos, además pueden otorgar a las AuNP, la capacidad de translocarse a través de membranas plasmáticas, siendo útiles en la entrega de fármacos (*drug delivery*), como ser reconocidas por receptores específicos de membrana. En resumen, estos péptidos, por un lado, pueden ser capaces de biocompatibilizar a las AuNP y, por otro, entregarles a las AuNP la capacidad de ingresar en la mecánica celular normal (14).

Para un potencial uso de los conjugados péptido-AuNP, es necesario evaluar la citotoxicidad de estos nanobiomateriales, como un paso previo para un estudio *in vivo* en mamíferos.

Esta memoria de título “**Evaluación de la citotoxicidad de nanopartículas de oro conjugadas al péptido CLPFFD-NH<sub>2</sub>**” tiene como objetivo llevar a cabo un estudio de citotoxicidad de AuNP de 12nm y del conjugado AuNP-CLPFFD-NH<sub>2</sub> (AuNP-Pep). Considerando el potencial uso del mencionado conjugado en el diagnóstico y/o tratamiento de la EA.

## **1.1 Marco Teórico**

### **1.1.1 Obtención y caracterización de conjugados AuNP-péptido con potencial aplicación para la EA**

**Síntesis de AuNP:** En el proceso de la síntesis de AuNP, se persigue conseguir una solución coloidal (sistema compuesto por una fase dispersa o material particulado, cuyo tamaño oscila entre 1-500nm, y una fase dispersante que cumple la función de medio continuo), donde se encuentren estas NPM en suspensión, y que tengan un diámetro aproximado a 12nm. Esta suspensión coloidal, tendrá un carácter liofóbico, presentando una afinidad casi nula por el medio continuo del coloide.

Esta solución coloidal, se puede obtener utilizando un método sintético de condensación, donde partículas de tamaños subcoloidales (bajo 1nm de diámetro), son inducidas a agregarse hasta alcanzar tamaños coloidales (16). La síntesis se encuentra en detalle en la sección **Materiales y Métodos (2.5)** de esta memoria de título.

#### **1.1.1.1 Conjugación de AuNP al péptido CLPFFD-NH<sub>2</sub>, capaz de reconocer los agregados amiloides tóxicos de A $\beta$**

La EA, es un desorden neurodegenerativo, sin cura, tratamiento efectivo o diagnóstico temprano.

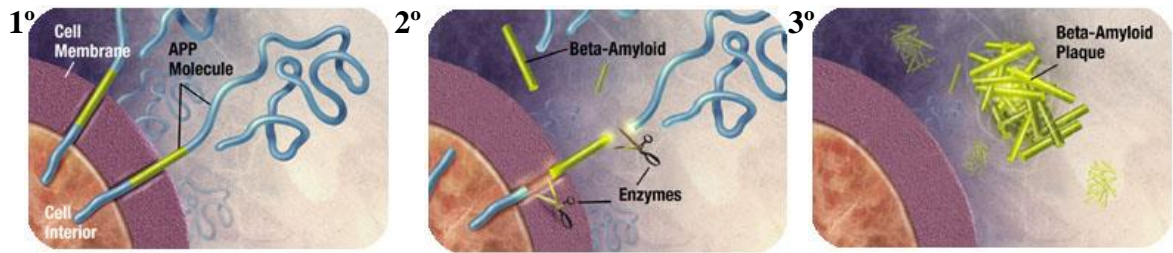
En la actualidad, el diagnóstico certero de esta enfermedad es *post mortem*, mediante análisis histopatológicos del tejido cerebral (16,20), donde se manifiesta una pérdida de la integridad del tejido hipocámpal y la corteza entorrinal (visibles mediante H<sup>+</sup>RMN) (20), así como, la muerte de neuronas de tipo colinérgicas y otras pertenecientes a la corteza cerebral.

A pesar de que no se conoce a cabalidad las causas de esta patología(19), la EA está, molecularmente, relacionada con la formación de ovillos neurofibrilares formados por la

proteína Tau, una proteína asociada a microtúbulos, que tiende a agregarse cuando es hiperfosforilada (20, 21) y a la formación de agregados protéicos insolubles de A $\beta$  en la matriz extracelular, que forman la denominada *placa senil* (placa amiloide), compuesta por los depósitos insolubles de A $\beta$  y componentes de la matriz extracelular (16).

El péptido A $\beta$ , está constituido por una familia de péptidos de entre 39-43 residuos aminoacídicos (aa) que se producen por la degradación de una proteína transmembrana denominada proteína precursora del amiloide (APP) (22). Entre estos péptidos, el 1-42 (A $\beta$ <sub>1-42</sub>), participa en la génesis de la EA. En condiciones fisiológicas normales, se encuentra como monómero soluble, y en condiciones patológicas se autoagrega, formando especies insolubles tóxicas (22).

La proteólisis de APP es mediada por dos vías principales (22), la primera involucra a la  $\alpha$ -secretasa, que escinde al APP formando un fragmento de 12-14 aa, en el dominio transmembrana del APP (22, 23). Fragmento que activaría un receptor acoplado a GMPc, que luego, activaría una proteína quinasa C (24), dependiente de este segundo mensajero, la cual puede promover la apertura de canales de potasio, dando lugar a una hiperpolarización de la membrana y activación del factor transcripcional NF- $\kappa$ B, esta señal estaría involucrada con la supervivencia celular (25). La segunda vía de degradación del APP, es la responsable de la producción del péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub> y es donde la  $\beta$ -secretasa y la  $\gamma$ -secretasa, escinden a APP dando lugar a los residuos terminales N- y C-terminal, respectivamente (Fig. 2) (25). Luego, A $\beta$ <sub>1-42</sub> es liberado al medio extracelular y si se encuentra en condiciones patológicas (alta concentración de A $\beta$ <sub>1-42</sub> y un ambiente oxidante) comienza el proceso de autoagregación (25), llevando a inducir la peroxidación de los lípidos de membrana, deteriorando la función de la membrana celular; viéndose afectado el flujo de iones (calcio y sodio) dependiente de ATPasas y de los canales transportadores de glucosa (25). Llevando a las neuronas a inducir un proceso de muerte por apoptosis (25, 26, 27, 28).



**Fig. 2** 1° Proteína transmembrana APP en su estado natural., 2° El APP es escindido por la  $\beta$  y  $\gamma$  secretasas, dando lugar a los péptidos  $A\beta_{1-42}$ , 3° Los péptidos  $A\beta$  tienden a agregarse, formando pequeños oligómeros que luego formaran la placa amiloide, la cual es tóxica y produce la muerte neuronal.

Se cree que este proceso es el fundamental responsable de la patogénesis en la EA, en este proceso especies monoméricas de  $A\beta$  solubles (principalmente en conformación  $\alpha$ -hélice), sufren un cambio conformacional ( $\beta$ -sheet mayoritaria) que llevaría a su auto-agregación, formando especies que se depositan y acumulan en el cerebro, ejerciendo un efecto tóxico para las neuronas aledañas (29).

En estudios previos, se demostró que una parte de la secuencia de  $A\beta_{1-42}$  ( $^{17}LVFF^{20}$ ) presenta un núcleo hidrofóbico que es clave para el proceso de autoagregación. En base a este núcleo, Soto y cols., diseñaron el péptido LPFFD-NH<sub>2</sub> que posee la propiedad de unirse a los agregados tóxicos de  $A\beta$ , siendo un disruptor de láminas beta e inhibiendo, a altas concentraciones, el proceso de agregación de dicha proteína (13, 16). Estudios *in vivo* han demostrado que este péptido posee la propiedad de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE), debido a su pequeño tamaño. Esta secuencia, se une selectivamente a los agregados de  $A\beta$  presentes en las placas seniles, ya que mantiene los aminoácidos necesarios para la unión de los núcleos hidrofóbicos de  $A\beta$  en el proceso de agregación normal (L y F) pero posee las siguientes variaciones: sustitución de Valina por Prolina, ya que este residuo es capaz de actuar como disruptor de estructuras secundarias, siendo capaz de evitar la agregación de  $A\beta$  y su autoagregación. La inserción de un residuo Aspártico, tiene por motivo entregarle a la secuencia un grupo hidrofílico, brindando así una mayor anfipaticidad y solubilidad (13).





**Fig. 3** En la parte superior se detalla la secuencia de  $\text{A}\beta_{1-42}$ . En rojo se representan los aminoácidos hidrofóbicos que forman parte del núcleo de agregación. En la parte inferior, se muestra la secuencia del péptido con afinidad por los agregados tóxicos de  $\text{A}\beta$ . En verde se destacan los aminoácidos modificados en la secuencia basada en el fragmento 17-20 de  $\text{A}\beta$ .

Este péptido resulta ser de gran utilidad, ya que, por las propiedades antes mencionadas, ayudaría a destinar las AuNP hacia la diana terapéutica específica de la EA, que serían los agregados tóxicos de  $\text{A}\beta$ . Entonces, si se conjuga este péptido a las AuNP, se logra obtener un conjugado selectivo, con la capacidad de absorber y ceder la energía proveniente de un CMO a nivel nanométrico y local (16).

Una de las estrategias para conjugar péptidos a AuNP es la de incluir en la secuencia peptídica un residuo de cisteína que contienen un grupo tiol (-SH). Este grupo tiene la propiedad de unirse espontáneamente a la superficie de oro formando un enlace de carácter covalente (16, 17, 30). La cisteína se adiciona en la posición N-terminal, entregándole al péptido inicial, la capacidad de unirse establemente a la superficie de las AuNP, lográndose así una nueva secuencia CLPFFDNH<sub>2</sub> (Pep) (17), que al reaccionar con las AuNP, dará lugar a un conjugado AuNP-CLPFFDNH<sub>2</sub> (AuNP-Pep) manteniéndose expuesta la secuencia LPFFD-NH<sub>2</sub>.

**Caracterización de las AuNP y AuNP-Pep:** Las técnicas para esta caracterización, son variadas (16). En esta memoria solo se utilizaron técnicas empleadas en forma rutinaria ya que son de fácil acceso, como es Electroforesis en gel de agarosa, o una espectrometría mediante UV-Visible, las cuales, se encuentran explicadas con más detalle en la sección de **Materiales y Métodos (2.6)** de esta memoria de título. Sin embargo, para una correcta caracterización de los conjugados se debe emplear una amplia gama de técnicas como (microcopia de fuerza atómica, XPS, EELS, análisis de aminoácidos) según se describe en la revisión (31).

### **1.1.2 Evaluación de la citotoxicidad de las AuNP y sus conjugados:**

En pos de sustentar el uso de AuNP en el campo de la biomedicina, como una posible herramienta terapéutica y/o de diagnóstico de ciertas patologías es de gran importancia evaluar sus posibles efectos tóxicos. En la actualidad, variados estudios se han llevado a cabo, para dilucidar los posibles efectos tóxicos de estos nanomateriales en los seres vivos (32). Estudios recientes (14), han evidenciado un efecto citotóxico en cultivos celulares de diversos tipos (Cos-1, eritrocitos y algunas bacterias), al estar conjugadas a moléculas con alguna actividad farmacológica (14), aunque en cultivos celulares de fibroblastos no mostraron citotoxicidad significativa (32). Entonces queda la pregunta de si estos materiales serán o no tóxicos en los sistemas biológicos en los que son de interés para esta investigación. Dado que, la misma, está abocada a encontrar una herramienta contra EA, donde las AuNP relacionadas con la presente memoria se dirigirán al cerebro, es interesante ensayar su posible toxicidad *in vitro* utilizando cultivos celulares, tanto de una línea inmortalizada de células de tumor cerebral humano (SH-SY5Y) y como también en cultivos primarios de neuronas de hipocampo de embrión de rata (E18). Estas células son utilizadas como modelo debido a que replican el comportamiento que tendrían las células nerviosas si fueran sometidos a algún tratamiento.

#### **1.1.2.1 Ensayos de Citotoxicidad:**

Existen variados ensayos de citotoxicidad, entre los que cuentan el ensayo de reducción de un metabolito coloreado amarillo, MTT (bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)2,5 difeniltetrazolio), que mide la actividad del metabolismo mitocondrial. Este metabolito amarillo una vez que ingresa a la célula viable es reducido mediante este metabolismo, formando una especie insoluble púrpura denominada formazán (Fig.4). La mayor cantidad de formazán, se producirá en células que tengan el mayor metabolismo mitocondrial. Es decir, que se puede relacionar la concentración de formazán, con el número de células viables en el cultivo

ensayado. Luego de que el formazán producido, es solubilizado, se puede cuantificar sin problema utilizando un lector convencional de placa ELISA a 570nm de longitud de onda (22). Las células que hayan sufrido alguna injuria, tenderán a disminuir su metabolismo mitocondrial, produciéndose una menor concentración de formazán, siendo esto traducido en una disminución en la viabilidad celular tanto en la línea SH-SY5Y como en las neuronas de hipocampo E18 (22).

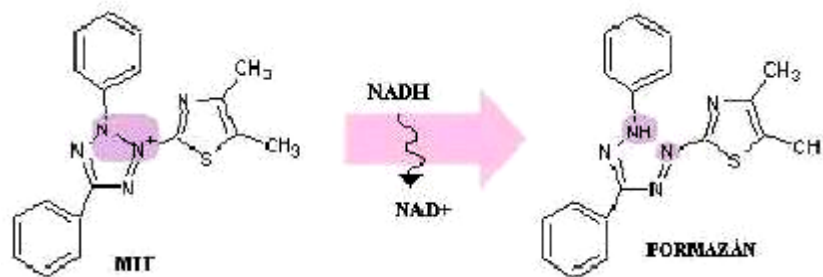


Fig.4 Reacción del MTT a Formazán por acción del metabolismo mitocondrial

Otro método utilizado también para censar, ya exclusivamente, la viabilidad celular es empleando un colorante denominado “Azul de Tripan”, el cual es de carácter aniónico, perteneciente al grupo de los colorantes azoicos y es un coloide que se introduce en el interior de las células que presentan ruptura en la membrana, el cual no es transportado hacia el exterior como el caso de las células viables (33). En esta técnica es imprescindible el uso de la cámara de Neubauer, donde se cuenta el número de células en un volumen estandarizado (33).

### 1.1.3 Determinación de tipo de muerte celular, en cultivos de neuronas de hipocampo de rata E18:

En el estudio de la viabilidad celular, es de gran importancia el distinguir qué tipo de muerte celular es el mayoritario para este tipo de cultivos, entre los mecanismos de muerte conocidos (Fig.5).

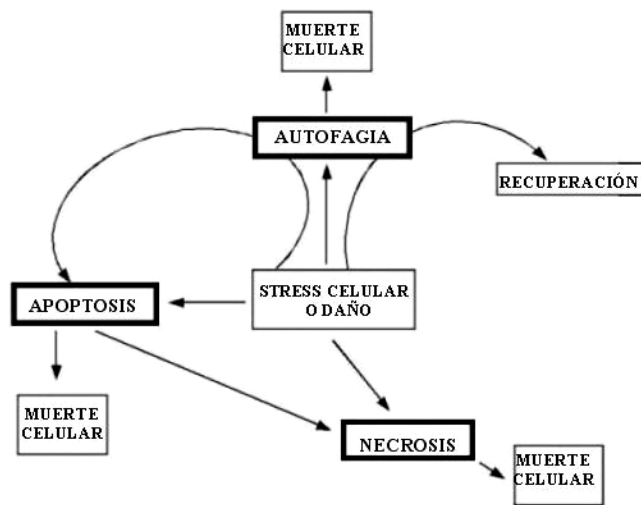


Fig. 5 Diagrama resumen de las variadas formas de degeneración, que puede seguir al estrés o daño celular

**Necrosis:** Forma rápida y violenta de degeneración de una extensa población celular, provocada por un agente nocivo que ha provocado una lesión tan grave que no se puede reparar. Se caracteriza por un aumento en el volumen del citoplasma, destrucción de los organelos y disrupción de la membrana plasmática, llevando a la liberación del contenido intracelular. Una vez que se ha producido y desarrollado la necrosis, es irreversible (34).

**Apoptosis:** Uno de los principales tipos de muerte celular programada, el cual es un conjunto de reacciones bioquímicas que ocurre en las células de un organismo pluricelular, encaminadas a producir la muerte de la célula de manera controlada, a diferencia de la necrosis. Puede tener dos motivos fundamentales, como parte del remodelamiento de estructuras corporales o bien para eliminar células que supongan una amenaza para la integridad del organismo (34). Es posible identificarlo en células únicas, rodeadas por células vecinas aparentemente sanas. Se caracteriza por un encogimiento de la célula, invaginaciones de la membrana plasmática, mantención de la integridad de los organelos, y condensamiento y fragmentación del DNA, siendo, los restos celulares, eliminados por fagocitosis. La apoptosis es un fenómeno biológico fundamental, permanente, dinámico e interactivo. Existen mecanismos pro- o anti-apoptóticos, regulados

genéticamente, que actúan de forma activa (pues consumen energía) y equilibrada. Por lo que la apoptosis puede ser frenada, mantenerse en equilibrio o ser estimulada (34, 35).

**Autofagia:** Mecanismo catabólico conservado evolutivamente en células eucariontes, el cual destruye proteínas e incluso organelos. Durante la autofagia se forman vesículas de doble membrana llamadas autofagosomas que capturan material citoplasmático y lo transportan hasta los lisosomas, donde son degradados por enzimas hidrolíticas (36). Una vez que los autofagosomas se han fusionado con los lisosomas, las vesículas resultantes (ya de membrana simple) pasan a denominarse autolisosomas. En mamíferos, la autofagia es un evento constitutivo que regula crecimiento celular, desarrollo y homeostasis (36). Que puede ser inducida bajo condiciones de estrés celular, tales como falta de nutrientes, incremento de temperatura o estrés oxidativo. Los estudios más recientes apuntan a que la autofagia, además de constituir un proceso reparativo, está implicado en fenómenos de muerte celular. Estos fenómenos han sido denominados "procesos de muerte tipo II" (no apoptótica) (36).

Existen variados protocolos experimentales para evaluar cada uno de estos tipos de muerte, algunos de los cuales, se utilizaron en este trabajo de memoria para determinar el mecanismo mayoritario de muerte en los cultivos neuronales de hipocampo E18.

#### **1.1.3.1. Análisis de muerte celular:**

**Uno de los métodos mas utilizados para la detección de muerte por necrosis es la determinación de la actividad de l-lactato deshidrogenasa (LDH):** Una vez que se produce un efecto necrótico en las células, estas liberan el contenido intracelular al medio exterior. Entre este contenido, se encuentra la enzima LDH, la que corresponde a la categoría de oxidoreductasas, dado que cataliza una reacción *redox*, en la que el piruvato es reducido a l-lactato gracias a la oxidación de NADH a NAD<sup>+</sup> (Fig.7). Participa en el metabolismo energético anaerobio, reduciendo el piruvato (procedente de la glucólisis) para regenerar el NAD<sup>+</sup>, que en presencia de glucosa es el sustrato limitante de la vía glucolítica (37).

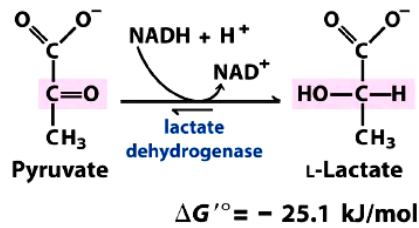


Fig..7. Reacción mediada por la l-lactato deshidrogenasa

En esta reacción se puede medir, por espectrofotometría, la cinética de desaparición del NADH, dando paso a  $\text{NAD}^+$ , lo cual se puede relacionar, directamente, con la cantidad de LDH liberada al medio y con un proceso necrótico (37).

*Uno de los métodos más utilizados para la detección de muerte por apoptosis es el ensayo TUNEL (Terminal Deoxinucleotide Transferase dUTP Nick End Labeling):* Uno de los estadios más distintivos de un proceso de muerte por apoptosis, es la activación de nucleasas que, eventualmente, terminarán por degradar el DNA nuclear en fragmentos de, aproximadamente, 200 pares de bases (pb) de longitud (38). La detección de estos fragmentos de DNA es bastante directa, haciendo, a este ensayo, el más sensible de los métodos para identificar células en estado apoptótico (39). Este ensayo, se basa en que al producirse la fragmentación del DNA, este se rompe dejando un gran número de extremos 3'-hidroxilo libres en los extremos, los cuales sirven de punto de partida para la Transferasa deoxinucleotidil Terminal (TdT), la cual adiciona deoxiribonucleotidos, de una forma independiente a la hebra templado (39).

La adición de un análogo a la deoxitimidina como lo es la BrdUTP (5-bromo-2'-deoxiuridina-5'-trifosfato) a la reacción de la TdT, permite marcar los sitios que fueron rotos por nucleasas en la apoptosis. Los cuales, una vez marcados por BrdU, pueden ser detectados por un anticuerpo anti-BrdU, usando técnicas estándares de inmunohistoquímica.

*Uno de los métodos más utilizados para la detección de la formación de vesículas autofágicas, es mediante la infección de las células con Adenovirus GFP-LC3:* El proceso de autofagia, involucra la formación de unos cuerpos de doble-membrana denominados *autofagosomas* o *vesículas autofágicas*, que secuestran componentes citosólicos y organelos

para una posterior fusión con lisosomas que contienen proteasas. En la formación de estos autofagosomas, es requiere del citoesqueleto de microtúbulos, para lograr modificar la estructura celular, dando lugar a estas invaginaciones (40). La proteína asociada a microtúbulos, proteína liviana 3 (LC3), es un marcador específico de la formación de vesículas autofágicas y es ampliamente utilizado para analizar la inducción de autofagia en diversos modelos celulares (40).

Para lograr que una célula eucarionte normal, produzca esta proteína marcadora es necesario ingresar esta información, para ello se utiliza un agente infeccioso viral, cuya mecánica infecciosa comprende el insertar una secuencia específica de DNA en la información normal de las células, sin producir cambios significativos en el comportamiento normal de las mismas. El grupo de Sharon A. Tooze & cols ha diseñado un adenovirus denominado **AdLC3-GFP** que permite la fácil identificación de autofagosomas mediante el uso de un microscopio de fluorescencia (40).

#### **1.1.4 Determinación de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), en cultivos de neuronas de hipocampo de rata E18:**

Los metales pesados, tanto los que están presentes en el medio ambiente, como los que son utilizados con fines terapéuticos, exhiben variados efectos biológicos, incluyendo la modulación del sistema inmune y el desarrollo de enfermedades como dermatitis alérgica y reacciones autoinmunes. También, está ampliamente aceptado que, metales como la plata, mercurio y oro (todos en estado metálico, o estado de oxidación “0”) llevan a una degranulación de los mastocitos, llevando a esta respuesta alérgica (41). Este proceso está relacionado con la producción de ROS, por lo que es de vital importancia el censar la generación de estas especies en cultivos celulares (42).

Para llevar a cabo este estudio, se realizan ensayos de marcaje celular, utilizando derivados de fluoresceína y calceína reducidas, a los cuales las células son permeables, como indicadores de la producción de ROS, donde la sonda cloro-dihidro-fluoresceína-diacetato (H<sub>2</sub>DCFDA),

luego de ser modificada a en el interior de la célula a 2',7'-di-clorofluoreceína (DCF), fluoresce al ser oxidada por las ROS formadas (42).

*Bloqueo de la producción de ROS, mediante N-acetil-cisteína (NAC):* Las especies reactivas del oxígeno (ROS), son especies que se producen en el común metabolismo celular (45). En el caso de las neuronas de hipocampo, son sensibles a condiciones de hipoxia, donde se producen ROS en respuesta, que lleva a una neurodegeneración (43). N-acetil-cisteína es un compuesto con un potente poder antioxidante ya que es un precursor del glutatión, que es un metabolito capaz de aumentar la respuesta antioxidante normal de las células, reduciéndose así la toxicidad de los ROS formados, llevando a promover la viabilidad neuronal (43).

#### **1.1.5. Análisis proteómico de cultivos celulares:**

Para lograr conocer, detalladamente los mecanismos moleculares de ciertas respuestas celulares, es de gran importancia el conocer la expresión de sus proteínas, y explicar la mecánica metabólica involucrada en esta respuesta.

Gran parte de las respuestas metabólicas, están profundamente relacionadas con la producción de diferentes proteínas, como es el caso de la enzima superóxido dismutasa (SOD), que aumenta en respuesta al estrés oxidativo y formación de las especies del oxígeno no reducidas completamente (44). Por ejemplo, si un tratamiento induce esta respuesta, gracias al análisis proteómico, se puede evidenciar los cambios en los niveles de proteínas involucrados en la respuesta al estrés (44).

El análisis proteómico se basa en cuatro pilares tecnológicos, (i) un sistema fácil y rápido de purificar una pequeña cantidad de proteínas desde una mezcla compleja, (ii) un método rápido y sensible, para generar una limitada, pero suficiente, información estructural de las proteínas de interés, (iii) acceso a una extensa base de datos de proteínas, y (iv) un algoritmo computacional, capaz de traducir y relacionar el lenguaje de una secuencia de DNA con información estructural de proteínas de varios tipos, como por ejemplo su extremo N-terminal, así como la secuencia



interna de péptidos, composición aminoacídica, la huella digital del péptido, patrones de fragmentación por espectrometría de masas (MS), o secuencias señales de péptidos seleccionados. En la actualidad, la proteómica se basa en estos cuatro pilares que han sido desarrollados durante el tiempo (45).

La electroforesis de alta resolución, del cual la electroforesis de dos dimensiones (2-D) o SDS-PAGE es actualmente el método más poderoso en lo que a separación de proteínas se refiere, es un método analítico que se usa desde fines de los años 70s. Pero solo desde que las herramientas de preparación y secuenciación mejoraron considerablemente, fue que la electroforesis 2-D evolucionó a un procedimiento de purificación de proteínas (45). Una vez que la secuenciación por comparación ganó importancia, fue cuando la MS entró a participar activamente en este procedimiento. Las técnicas de MS, son rápidas y sensibles, a un nivel que no se ha logrado alcanzar con otras técnicas analíticas. Siendo dos las líneas tecnológicas principales que dominan el campo de la MS a la fecha, la desorción por laser asistida por matriz/tiempo de vuelo (MALDI-TOF) y la ionización por electrospray (ESI) (45).

El MALDI utiliza pulsos de luz laser (nanosegundos) en la frecuencia del ultravioleta o del infrarrojo lejano para desorber e ionizar la muestra. Produciendo, principalmente, iones por protonación o desprotonación siendo comunes iones con dos o más cargas en el caso de proteínas con pesos moleculares superiores a 5000 Da. Este método de desorción se utiliza casi exclusivamente con analizadores de tiempo de vuelo o TOF (*time of flight*), con los que comparte la característica de poseer un rango de masa prácticamente ilimitado y que ambos trabajan en régimen pulsatorio. El tamaño de las moléculas que pueden ser analizadas por MALDI-TOF, alcanzan los 150 KDa (46).

El MALDI- TOF es hoy en día un método estándar para el análisis de péptidos y proteínas y se caracteriza por su robustez, sencillez de manejo y capacidad de automatización así como por su alta sensibilidad y relativa tolerancia a sales y otras interferencias. Debido a esta última característica el MALDI es en muchos casos la técnica preferida para el análisis de proteínas

separadas mediante SDS-PAGE o de mezclas de péptidos procedentes de la digestión enzimática *in situ* de estas proteínas en procedimientos de mapeo peptídico (45).

La ESI-MS/MS se basa en la producción en fase gaseosa de iones de una proteína intacta (47) mediante la electronebulización de la solución que la contiene. Esta ionización tiene lugar a presión atmosférica en una cámara abierta, donde una solución del péptido o proteína es nebulizada a la salida de una fina aguja de sílice o acero en el interior de la cámara de ionización. La nebulización se produce debido a las repulsiones electrostáticas generadas en la superficie del líquido mediante la aplicación de una alta diferencia de potencial (3-5 KV) entre la aguja y la cámara en que ésta se encuentra (Fig.8). El aerosol está formado por microgotas cargadas que contienen iones del péptido o proteína. Luego de formado el aerosol, se produce la evaporación de moléculas neutras de disolvente quedando, finalmente, iones en fase gaseosa susceptibles de ser analizados por la MS (48).

Dado que el proceso tiene lugar a presión atmosférica y las MS trabajan a alto vacío, la fuente de ESI está provista de restrictores y etapas de vacío intermedio que permiten la transferencia de los iones, acelerados y guiados por campos eléctricos, al interior del espectrómetro (48).

La formación de iones en ESI implica dos mecanismos principales: la desorción de iones a fase gaseosa inducida por el exceso de energía electrostática en la microgota cargada y la evaporación de moléculas neutras de disolvente de estas gotas para dar lugar a iones desolvatados en fase gaseosa. En cualquier caso los iones observados, generalmente derivados de la protonación o desprotonación de la molécula así como de la formación de aductos con iones del medio, reflejan directamente los equilibrios ácido-base existentes en solución.

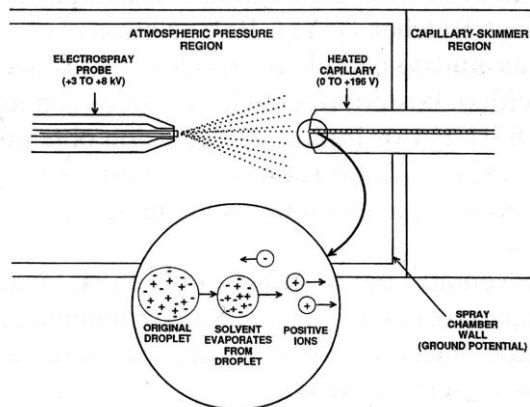


Fig. 8 Esquema de una fuente de ionización para electrospray ESI (Finnigan).

El típico espectro de ESI está constituido por una serie de señales correspondientes a moléculas con distintos estados de carga o valores de  $n$  (Fig.9). Lo que logra que se extienda el rango de masas observable en la proporción en que lo hace la multiplicidad de carga. Esto permite observar iones de compuestos de pesos moleculares por encima del rango de los analizadores convencionales. Así, el ESI, acoplado a analizadores de cuadrupolo, es utilizado de forma rutinaria para la determinación de pesos moleculares de péptidos y proteínas de hasta 30-50 KDa, habiéndose reportado la ionización de proteínas de hasta 200 KDa (49).

N--G--L--B--V--D--V--R--D--G--R--F--H--N--G--N--A--I--Q--L--W--P--B--K--S--N  
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25  
 --T--D--A--N--Q--L--W--T--L--K--R--D--N--T--I--R--S  
 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42

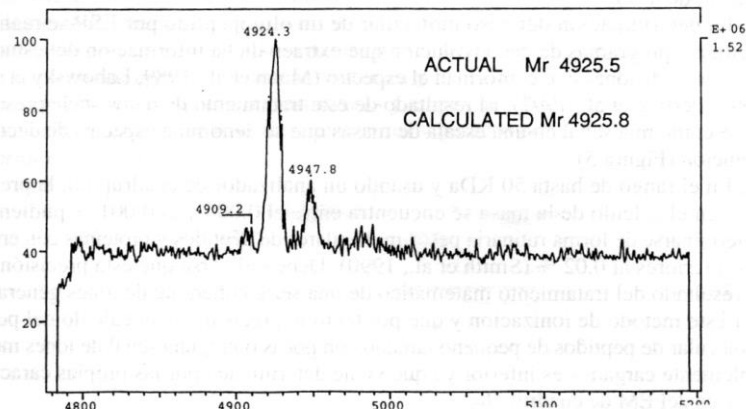


Fig. 9 Espectro ESI de un péptido sintético, cuya secuencia se muestra arriba. La masa se determinó con un error inferior al 0,01% . La pequeña señal observable en el espectro, corresponde a la sal de sodio del péptido.

En el rango de hasta 50 KDa y usando un analizador de cuadrupolo, la precisión en el cálculo de la masa se encuentra entre el 0.005 y el 0.001 % pudiendo determinarse de forma rutinaria pesos moleculares de péptidos y proteínas con errores inferiores al 0.02 % (50).

El trabajo en ESI implica la introducción de un flujo continuo de disolvente por lo que esta interfase ha sido ideal para su acoplamiento a técnicas separativas en fase líquida como la cromatografía líquida a alta resolución (HPLC: High Performance Liquid Chromatography) (51). Dado que las fuentes originales de ESI admitían únicamente la nebulización de soluciones introducidas a bajos flujos (0.2-5  $\mu\text{L}/\text{min}$ ), el acoplamiento con la cromatografía líquida requería la utilización de columnas capilares de sílice fundida o la utilización de divisores de flujo postcolumna. Asimismo, los requerimientos físicos para la electronebulización hacían difícil la utilización de las soluciones de alta conductividad o alta tensión superficial generalmente empleadas en la cromatografía de péptidos y proteínas. La introducción de interfases en las que la nebulización es asistida por ultrasonido (52) o por un flujo de gas coaxial (ionspray) (53) ha solventado en gran modo estas limitaciones. La interfase de ionspray o ESI asistido neumáticamente es actualmente la empleada por la mayoría de los fabricantes. Las interfases asistidas permiten el trabajo práctico a flujos entre 5 y 300  $\mu\text{L}/\text{min}$ . por lo que son ideales para acoplarse a sistemas de HPLC utilizando columnas narrow bore (1-3 mm).

Hoy en día el ESI es quizás la técnica que acumula el mayor número de aplicaciones en el campo del análisis de péptidos y proteínas por MS.

Finalmente, en base a los siguientes antecedentes:

- Las NPM son utilizadas en la actualidad como herramientas terapéuticas.
- Una de las causas de la EA, es la agregación de  $A\beta_{1-42}$ , formando especies tóxicas.
- Las AuNP conjugadas al péptido CLPFFD-NH<sub>2</sub> (AuNP-Pep), se unen a los agregados de  $A\beta$  y al ser sometidas a un CMO, producen su desagregación.
- Las AuNP-Pep, podrían ser una herramienta como terapia o diagnóstico de la EA

Es que hemos formulado la siguiente hipótesis:

### **HITÓTESIS**

- Las AuNP-Pep presentan un menor grado de citotoxicidad que AuNP sin conjuar.

## OBJETIVOS

### Objetivo General:

- Evaluar la citotoxicidad *in vitro* de AuNP, conjugadas y no conjugadas al péptido CLPFFD-NH<sub>2</sub>, en cultivos celulares de líneas celulares inmortalizadas y células de hipocampo de embrión de rata, como un paso preliminar, fundamental, para el desarrollo de una nueva estrategia terapéutica para la EA.

### Objetivos específicos:

- Obtención de AuNP empleando el método de Levy & cols y su posterior conjugación al péptido CLPFFDNH<sub>2</sub>, capaz de reconocer agregados tóxicos de A $\beta$ .
- Ensayos de toxicidad *in vitro*, de las AuNP y conjugadas al péptido CLPFFDNH<sub>2</sub>
- Precisar el mecanismo de muerte (necrosis, apoptosis o autofagia) inducido por la nanopartículas en cultivos primarios de neuronas de hipocampo de embrión de rata de 18 días de gestación (E18).
- Cuantificar la producción de ROS inducida por la nanopartículas en cultivos celulares de neuronas de hipocampo E18.
- Evaluación del efecto de las AuNP conjugadas y sin conjugar, sobre la expresión de proteínas en cultivos primarios de hipocampo de rata mediante un análisis proteómico.

## 2. MATERIALES Y METODOS

### 2.1 Reactivos:

Acetonitrilo: Merck, pureza 99,9%, PM 41.05

Ácido Fórmico: Merck, Cat.1.00264.1000

Agarosa: Sigma, Cat. 6B100.

Antibiótico estreptomicina-penicilina: GIBCO, Cat. 15140-122.

Ara C: Citosina  $\beta$ -D-arabinofuranosida: Sigma, Cat. C1768.

Bicarbonato de Amonio ( $\text{NaNH}_3$ ): Fluka, Cat. 09832

Bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ): Winkler, MW 84,01uma

Bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il) 2,5 difeniltetrazolio (MTT): Invitrogen, Cat. M6494.

CHAPS: PlusOne, Cat. 17-1314-01

Citrato de sodio dihidratado ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ): Fluka, MW 294.10uma

Dodecilsulfato de sodio (SDS): Sigma, MW 288.38uma

DTT: Sigma, Cat. D9163-25G

Hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ): Merck, MW 40.00uma

Isopropanol: Merck, Cat. K22589297, p.a.

L-Glutamina 200 mM: GIBCO Invitrogen, MW 146.15uma, Cat. 25030

Medio de montaje Dako: DakoCytomation, Cat. S3000

Medio Dulbecco Eagle modificado (DMEM): Sigma, Cat. D1152.

Medio Neurobasal sin L-Glutamina: GIBCO, Cat. 21103.

NAC: *N*-acetil-cisteina: Sigma, Cat. A9165

Peróxido de Hidrogeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ): Merck, calidad analítica, MW 34,02uma

Piruvato de Sodio: Merck, Cat. 1.00619.0050

Poli-D-Lisina: Sigma Aldrich, Cat.6407-5MG

Sal tetracloroaúrica monohidratada ( $\text{HAuCl}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ ): Aldrich, MW 339.79uma

Suplemento B-27: GIBCO, Cat. 17504-044.

Tampón fosfato salino (tableta): Sigma, Cat. P-4417.

Tiourea: GE Healthcare, Cat. RPN6301

Tripsina grado de secuenciación: Promega, Cat. V5111

Tripsina: GIBCO, Cat. 15400.

Azul de Tripán: Hyclone, Cat. SV30030.01.

Urea: PlusOne, Cat.17-1319-01

## **2.2 Materiales:**

Agujas cubiertas nano-ES: PicoTip™, New Objective.

Columna capilar C<sub>18</sub> : PepMap column, LC Packings.

Filtros no pirogénicos de 0,2 µm: Schleicher & Schuell.

Membrana de diálisis: Spectra/por MWCO 6-8,000.

Placas de cultivo: Orange Scientific.

Tiras de Isoelectroenfoque: Immobiline™ Drystrip pH 4-7 NL 24 cm GE

Tubo de centrifuga con filtro: Millipore, Amicon Ultra, MWCO 5000.

## **2.3 Equipos:**

Agitador Heidolph DSG 304

Camara de Electroforesis: ETTAN DALT 2, Amershan Biosciences

Camara de Isoelectroenfoque: IPGphor, Pharmacia Biotech

Cámara y placa de electroforesis BioRad

Campana de seguridad biológica Nuair UN-425-400E

Centrífuga Eppendorf AG 5415 D

Centrífuga Hettich Rotofix 32



Centrífuga Varifuge 3.0 Heraeus Sepatech

Cromatógrafo, para cromatografía líquida: CapLC-nano-ESI-Q-TOF

Equipo automático de secuenciación: Investigator ProGest, Genomic Solution

Equipo ESI-MS/MS: Q-TOF Global, Micromass-Waters

Espectrofotómetro: ATI UNICAM UV3

Espectrómetro de masas: CapLC, Micromass-Waters

Estufa Nuair US con sistema de filtración HEPA y autoflujo de CO<sub>2</sub>

Fluorímetro de Placa: CytoFluor II, Perseptive Biosystems

Lector ELISA BioRad 550

Liofilizador VIRTIS 12EL

Lupa Zeiss Stemi SV6.

Microscopio Electrónico de Transmisión Zeiss EM 109.

Peachímetro WTW Microprocessor pH Meter.

Scanner: Imagen Scanner, Amersham Pharmacia Biotech.

Sonicador Ultrasons P-Selecta.

Vortex Eurolab MelB1719.

#### **2.4 Kits:**

ROS Detection Reagents: 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H<sub>2</sub>DCFDA), Molecular Probes, Cat. D399

TUNEL: Apo-BrdU<sup>TM</sup> TUNEL Assay kit, Molecular Probes, Cat. A-23210

#### **2.5 Síntesis de AuNP:**

Para obtener AuNP de aproximadamente 12nm con los que se hicieron los estudios de citotoxicidad, se siguió el protocolo descrito por Turkevich y cols modificado por Levy y cols

(31). Todo el material fue previamente lavado con Extran al 2% en H<sub>2</sub>O<sub>NANOPURE</sub>, secado en una estufa a 60°C, lavado con agua regia (HNO<sub>3</sub>/HCl 1:3) y, finalmente, enjuagado sucesivamente con H<sub>2</sub>O<sub>NANOPURE</sub>.

**Método de Levy y cols:** Fueron preparados 100mL de una solución 1mM de HAuCl<sub>4</sub>, para lo cual se pesaron 33,9mg de este reactivo y se disolvió en H<sub>2</sub>O<sub>NANOPURE</sub>. La reacción se llevó a cabo en un balón de 250mL de tres cuellos, siendo conectado a un condensador de reflujo, y colocando todo el sistema en un manto calefactor de aluminio con un agitador magnético para lograr una mezcla continua. Por otro lado se prepararon 10mL de una solución acuosa 38,8mM de citrato de sodio dihidratado, para lo cual se pesaron 114,1mg de este reactivo y una vez preparada fue calentada en microondas hasta alcanzar los 60°C, una vez que la solución de HAuCl<sub>4</sub> alcanzó un reflujo violento, se esperó 8 minutos, y se adicionó rápidamente la dilución de Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>. De inmediato se vio un color negro intenso, el cual transcurrido 3 minutos pasó a un color rojo intenso, indicativo de la formación de las AuNP. Se dejó el sistema a reflujo por 30 minutos más y una vez terminado se dejó enfriar el balón a temperatura ambiente, se filtró la solución mediante un filtro de 0,45µm y las AuNP obtenidas se almacenaron a 4 °C.

El máximo de absorción para AuNP de un tamaño cercano a los 12nm, se puede observar a los 520nm de longitud de onda, y la concentración puede ser calculada ingresando el valor del coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) del coloide, mediante la ley de Lambert-Beer (54).

$$A = \epsilon bc \rightarrow \text{donde } A = \text{valor de absorbancia obtenido}$$
$$\epsilon = 4,2 \times 10^8 / M \cdot \text{cm}$$
$$b = 1 \text{ cm}$$
$$c = \text{Concentración expresada en Molar (Mol/L)}$$

## 2.6 Conjugación de AuNP a Cys-LPFFD-NH<sub>2</sub> (Pep):

Para lograr la conjugación de las AuNP al péptido de interés biológico Cys-LPFFD-NH<sub>2</sub> (Pep), se utilizó el protocolo descrito para la conjugación de tioles de naturaleza no peptídico

(12, 29). Se pesó 1mg de Pep y se suspendió en 1mL de  $H_2O_{NANOPURE}$ , fue sonicado para lograr una suspensión homogénea. Se midió un volumen de 20mL de la solución de AuNP, y se agitó con un núcleo magnético, donde se ajustó a pH 8 con una solución de hidróxido de sodio 0.5M (NaOH) para lograr una mayor estabilidad de la solución coloidal y prevenir una posible precipitación durante el proceso de conjugación. Se adicionó Pep en solución, gota a gota, y se dejó en agitación por 15 minutos, donde se llevó a cabo la conjugación. La solución resultante se dializó por 72 horas, en 2 litros de una solución 1.2mM de  $Na_3C_6H_5O_7$  en  $H_2O_{NANOPURE}$ , se sometió a agitación magnética continua y se reemplazó la solución de  $Na_3C_6H_5O_7$  cada 24 horas.

Finalmente, las AuNP, fueron caracterizadas mediante geles de agarosa al 2% aplicando un potencial de 114mV como se encuentra descrito en la revisión (55). Primero, se solubilizó 1g de agarosa en 50mL de tampón TAE 1X [Tris Base 2 M, EDTA 0,05 M y Ácido Acético Glacial (pH 8,3)] dejando solidificar en una placa de electroforesis, con una peineta de ocho dientes para formar los carriles de carga de muestra. Luego el gel fue colocado en una cámara de electroforesis y se cubrió con 250 mL de tampón TAE 1X. Finalmente se cargaron las muestras de AuNP y AuNP-Pep, mezcladas con glicerol en una proporción 1:9, y se dejó correr la electroforesis durante 5-7 minutos.

La caracterización mediante espectrofotometría UV-Visible fue realizada un espectrofotómetro UV-visible. Para la medición, fueron utilizadas cubetas plásticas de 1cm de longitud y se realizaron barridos entre longitudes de onda de 400 y 700nm buscando lambdas de absorción característicos para AuNP. Como blanco, fue utilizada una solución 1,2 mM de  $Na_3C_6H_5O_7$ . Todas las mediciones en el espectrofotómetro se realizaron de la misma manera y bajo las mismas condiciones de trabajo.

## **2.7 Concentraciones de AuNP:**

Para llevar a cabo los ensayos de citotoxicidad, se concentraron las soluciones de AuNP y AuNP-Pep, partiendo de soluciones coloidales de una concentración 1nM aproximadamente

(AuNP<sub>Stock</sub> y AuNP-Pep<sub>Stock</sub>). Las muestras más concentradas se obtuvieron por centrifugación en tubos de centrifuga Millipore, Amicon, en ciclos sucesivos de 10 minutos a 2000rpm, extrayendo el solvente hasta conseguir soluciones 20nM, 10nM y 5nM. Así, también, se prepararon diluciones de la solución coloidal stock, utilizándose una solución de Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> 1,2mM para alcanzar las siguientes concentraciones de AuNP y AuNP-Pep: 0.5nM, 0.25nM y 0.175nM. (Expresadas como concentraciones de nanopartículas de oro).

## **2.8 Toxicidad *in vitro*.**

### **2.8.1 Cultivos celulares de línea Neuroblastoma SH-SY5Y:**

Las células se reactivaron desde los -80°C, desde un tubo conteniendo las células en 900µL de Suero fetal bovino (SFB) (inactivado a 56°C por 45minutos) más un 100µL de DMSO (Dimetilsulfóxido). El tubo, se calentó, rápidamente, en un baño termorregulado a 37°C hasta que se descongeló y se centrifugó a 1000rpm por 4 minutos, se descartó el sobrenadante por aspiración, mediante una pipeta Pasteur de vidrio esterilizada, conectada a un sistema de vacío. El pellet se resuspendió en medio de cultivo DMEM alto en glucosa (4,5g de glucosa/mL), suplementado con 10% SFB, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomycin y se dejaron crecer en frascos estériles de cultivo, con 75 cm<sup>2</sup> de superficie. Se mantuvieron en una estufa de cultivo a 37 °C bajo una atmósfera compuesta por 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>.

Una vez que se logró una confluencia en el fondo del frasco, mayor a un 85%, se procedió a realizar los ensayos. Se retiró el medio de cultivo por aspiración, se lavaron los restos celulares y medio de cultivo con 4mL de PBS 1X, siendo aspirado con pipeta Pasteur. Se adicionaron 2mL de solución de tripsina al 0.25% EDTA dentro del frasco y se golpeó suavemente el fondo para acelerar el despegue de las células del fondo. Una vez que la totalidad de las células se despegó, se agregó 4mL de DMEM 10% SFB, para inactivar la tripsina. Se trasvasijó a un tubo estéril de centrifuga de 50mL y se centrifugó a 1000rpm durante 4 minutos en una centrífuga Hettich

Rotofix 32, luego se aspiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 10mL de DMEM 10% SFB. Se contó el total de células en la suspensión utilizando la formula 1, para lo cual se extrajo una alícuota de 20µL de la solución conteniendo las células y se diluyó en 180µL de DMEM 10%SFB (Factor de dilución **Fd<sub>1</sub>** = 10), en un tubo de centrifuga de 1,5mL. Luego se tomó 20µL de esta dilución y se mezcló con 20µL de Azul de Tripan (Factor de dilución **Fd<sub>2</sub>** = 2), y esta dilución es la que se observó en la cámara de Neubauer (Fig.6), lo cual entregó un valor de la cantidad de células por mL de medio de cultivo.

$$\frac{\text{N}^{\circ} \text{ de células}}{\text{mL de medio}} = \text{Fd}_1 \times N \times \text{Fd}_2 \times 10^4$$

**Donde:**

**N** = N<sup>o</sup> de células contadas en hemocitómetro

**Fd** = factor de dilución

**10<sup>4</sup>** = Factor de conversión que corresponde al volumen total del hemocitómetro expresado en mL.

### **Formula 1**

Se sembraron las placas de cultivo con 6000 células, por pocillo, en placas de cultivo de 96 pocillos, asegurándose que, las 24 horas de sembradas, se obtuviera una confluencia de aproximadamente el 50% para realizar los ensayos de toxicidad. Cultivos que fueron mantenidos en una estufa de cultivo a 37 °C bajo una atmósfera compuesta por 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>.<sup>1</sup>

#### **2.8.2 Cultivos celulares de neuronas de hipocampo de rata E18:**

Se realizaron cultivos celulares primarios de neuronas de hipocampo de rata E18 (Embriones de 18 días de gestación) de la cepa Sprague-Dawley. Para esto se utilizaron ratas hembras con 18 días de preñez, las que se anestesiaron intraperitonealmente con una solución de

---

<sup>1</sup> Todos los tratamientos y procesos que se mencionan que involucran cultivos celulares, se realizaron en medios ambientales de contaminación controlada. Dentro del perímetro de una cabina de flujo laminar.

Ketamina/Xilacina 2:1, inyectando un volumen de 500 $\mu$ L. Una vez inconcientes, se sometió a una cesárea para extraer los oviductos con los embriones, colocándolos en una placa de petri estéril, con tampón HANK 1X [HANK<sub>Stock</sub> 10X: 1.19g Hepes, 40g NaCl, 2g KCl, 5g D(+)-Glucosa y 0.3g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; en 500mL de H<sub>2</sub>O<sub>NANOPURE</sub>, pH (7.2)]. Los embriones se separaron de la placenta, y se decapitaron. Finalmente las cabezas se dejaron en HANK 1X estéril y se trasladaron a una campana de seguridad biológica, donde se extrajeron los cerebros.

Las cabezas, se sujetaron por los ojos con una pinzas y con unas tijeras se hicieron dos cortes por bajo las orejas, se levantó la calota y se extrajeron los cerebros colocándolos en una placa petri p60 estéril con HANK 1X y se procedió a la disección del tejido hipocampal. Se utilizó un microscopio Zeiss Stemi SV6, donde se separaron los hemisferios, se extrajeron las meninges y se extirpó el hipocampo, trasladando el tejido a una nueva placa petri p60 estéril, que contenía tampón HANK 1X. Terminada la disección, los tejidos en HANK 1X, se trasvasijaron a un tubo plástico de centrifuga de 50mL estéril, donde se incubó con 5mL de tripsina al 0.25% EDTA por 15 minutos a 37°C con agitación suave. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se agregaron 5mL DMEM 10% SFB a 37°C, para detener la acción de la tripsina. Luego se centrifugó a 1000rpm durante 4 minutos, se descartó el sobrenadante por aspiración y el pellet se resuspendió en 5mL de DMEM 10%SFB y homogenizó suavemente con una pipeta Pasteur estéril.

Una vez homogenizado el tejido, se procedió a centrifugar nuevamente a 1000rpm, deteniendo la centrifugación una vez que llegó a las 1000rpm, separando los fragmentos grandes de tejido, de las células en suspensión. Se recuperó el sobrenadante en un tubo de centrifuga de 50mL estéril y se resuspendió el pellet en otros 5mL de DMEM 10%SFB y repitiéndose la homogenización y la posterior centrifugación hasta alcanzar las 1000rpm, recuperando el sobrenadante y juntándolo con el anterior. Luego, se procedió a contar la densidad celular utilizando una cámara de Neubauer, con una alícuota de la suspensión de 20 $\mu$ L diluida en 180 $\mu$ L de DMEM 10% SFB y tomando una nueva alícuota de 20 $\mu$ L mezclándola con Azul de Tripán.

Se sembraron en placas de cultivo previamente tratadas con Poli-D-Lisina 1X (diluida en Buffer Borax [1.24 g ácido bórico, 1.90 g borax en 400 ml de H<sub>2</sub>O<sub>NANOPURE</sub> pH (8,3)], estéril). Las placas se lavaron 3 veces con H<sub>2</sub>O<sub>NANOPURE</sub> estéril antes de sembrar las células, ya que en exceso la Poli-D-Lisina es neurotóxica. Se sembró la cantidad necesaria de células para alcanzar sobre un 90% de confluencia y se dejaron con medio DMEM 10% SFB durante 2 horas, para asegurar que las células se hayan adherido a la matriz de Poli-D-Lisina. Una vez que pasan las dos horas, se reemplaza el DMEM 10%SFB por medio de cultivo Neurobasal® suplementado con (para 100mL): 11mg de piruvato de sodio, 992μL de Glutamina 200mM, 800μL de Streptomycin-Penicilina y finalmente 1mL de suplemento neurotrófico B-27 previamente a 37°C (*Neurobasal® B27*), se homogenizó y filtró con filtros estériles de 0.2μm. El cultivo celular se mantuvo a 37°C en una estufa de cultivo bajo una atmósfera compuesta por 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>, reemplazando el medio cada 48 horas, donde se extrajo la mitad del medio antiguo y se reemplazó por medio *Neurobasal® B27*, suplementado con Ara C 20μM (10μM en el cultivo) para impedir el crecimiento de células gliales (*Neurobasal® B27 Ara C*), hasta completar el volumen original.

### 2.8.3 Tratamientos en cultivos celulares:

Los tratamientos se realizaron durante variados tiempos: 48 horas, 24 horas y 6 horas, para evaluar el efecto de la presencia de los compuestos durante el tiempo.

Los compuestos utilizados fueron: **Citrato** 1.2 mM, solución vehículo de las AuNP y AuNP-Pep; **AuNP** y **AuNP-Pep** a las siguientes concentraciones nanomolares (nM) de nanopartículas (lo cual correspondería a concentraciones micromolares de Au): 20nM, 10nM, 5nM, 1nM, 0.5nM, 0.25nM y 0.175nM; **Pep** a una concentración de 1μM (concentración a la que se halla el péptido en la solución de AuNP-Pep); **SDS** y **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** a 0,2%, como controles de

muerte, el SDS, siendo un detergente, destruye la membrana plasmática, y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produce daño por estrés oxidativo<sup>2</sup>.

#### **2.8.4 Marcadores de viabilidad celular:**

*a) Ensayo colorimétrico de reducción de MTT:* Se utilizaron placas estériles de cultivo de 96 pocillos.

*Para neuroblastoma SH-SY5Y:* Se sembraron 6000 células por pocillo. Las células, una vez sembradas, se dejaron crecer durante 24 horas en una estufa de cultivos a 37°C, y se sometieron a los tratamientos detallados en 2.8.3.

*Para Neuronas de hipocampo de rata E18:* Se sembraron 100000 células por pocillo, en medio de cultivo DMEM 10%SFB (DMEM 10%SFB, este medio fue reemplazado por Neurobasal® B27 luego de dos horas en la estufa de cultivo). Las células, una vez sembradas, se dejaron diferenciar durante 96 horas en una estufa de cultivos a 37°C, cambiando el 50% del medio Neurobasal® B27 por Neurobasal® B27 Ara C, cada 48 horas. Al cuarto día se sometieron a los tratamientos detallados en 2.8.3.

Los tratamientos, fueron agregados adicionando un 20% del volumen total en el pocillo; es decir, si 100µL era el volumen total por pocillo, 80µL corresponderían a medio de cultivo y 20µL a la solución muestra. Cada concentración fue adicionada por sextuplicado, y en cada pocillo se redujo la concentración stock de la muestra a 5 veces. Es decir, las concentraciones en cultivo fueron: Citrato: 0.24mM; AuNP y AuNP-Pep: 4nM, 2nM, 1nM, 0.2nM, 0.1nM, 0.05nM y 0.035nM; Pep: 200nM; SDS y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 0.04%. Finalmente, las células, se trataron durante 48 horas con los compuestos.

---

<sup>2</sup> Las concentraciones, corresponden a las soluciones. No a las concentraciones en cultivo, donde fueron diluidas 5 veces en respeto a la concentración original.



Una vez terminado el tratamiento, se aspiró el medio de cultivo mediante vacío y se lavaron con tampón HANK 1X, para luego adicionar 100µL de una solución MTT 1mg/mL<sub>HANK 1X</sub> durante un período de 2 a 5 horas a 37 °C, tiempo suficiente para la formación de cristales de formazán. Terminado el tiempo, se aspiró, cuidadosamente, la solución de cada pocillo y se agregó 100 µl de isopropanol, se agitó por una hora con el fin de disolver los cristales formados y se midió la absorbancia de cada pocillo en un lector de placas ELISA a 570 nm de longitud de onda.

*b) Ensayo de exclusión de Azul de Tripán:* Los cultivos y tratamientos se realizaron de una manera similar a los descritos para el ensayo de MTT, aunque en esta ocasión, se utilizaron placas estériles de cultivo de 12 pocillos.

*Para neuroblastoma SH-SY5Y:* Se sembraron 15000 células por pocillo, una vez sembradas, se dejaron crecer durante 24 horas en una estufa de cultivos a 37°C, y se sometieron a los tratamientos detallados en 2.8.3.

*Para Neuronas de hipocampo de rata E18:* Se sembraron 250000 células por pocillo en medio de cultivo DMEM 10%SFB (el medio de cultivo DMEM 10%SFB, fue reemplazado por Neurobasal® B-27 luego de dos horas en la estufa de cultivo). Las células, se dejaron diferenciar durante 96 horas en una estufa de cultivo a 37°C, cambiando el medio *Neurobasal® B27* por medio *Neurobasal® B27 AraC* cada 48 horas. Al cuarto día se sometieron a los tratamientos detallados en 2.8.3.

Terminados los tratamientos los cultivos se lavaron, dos veces, con tampón HANK 1X. Se les agregó 300µL de una solución de tripsina al 0.25% EDTA, durante un tiempo de 3 a 5 minutos, para despegar la totalidad de células del fondo de la placa de cultivo, lo cual se examinó mediante el uso de un microscopio. Una que vez que las células se despegaron, se les agregó una cantidad de 500µL de DMEM 10% SFB (tanto para los cultivos de SH-SY5Y como para los cultivos de neuronas de hipocampo E18), para inactivar la tripsina. La suspensión resultante, fue trasvasijada a unos tubos de centrifuga *Eppendorf* de 1.5mL y centrifugada a 1000rpm durante 4 minutos, en una centrifuga a 4°C.

Una vez centrifugadas, se descartó el sobrenadante por aspiración y se resuspendieron los pellet en 1mL de DMEM 10%SFB y se dejaron en hielo. Luego, se extrajo una alícuota de 20µL de esta suspensión que se mezcló con 20µL de Azul de Tripan (Factor de dilución **Fd** = 2), y esta dilución es la que se observa en el hemocitómetro de Neubauer (Fig.4), donde se utilizó la misma formula 1 y entregó un valor de la cantidad total de células en el cultivo que fue tratado.

En ambos casos, tanto para el ensayo de MTT como el de Azul de Tripan, en los tipos celulares, los resultados obtenidos, se graficaron mediante el *software Excel* y se sometieron a análisis estadísticos paramétricos (ANOVA y test de Turkey-Kramer), mediante el *software Graphpad Instat*. Estudio estadístico de vital importancia, en orden de estimar si los resultados obtenidos, son significativos y reales, y no frutos del azar.

*c) Evaluación de la viabilidad de neuronas de hipocampo E18, frente a dos isómeros de Pep:* Con el fin de evaluar si la secuencia peptídica a la cual las AuNP es conjugada tiene alguna influencia en los resultados obtenidos, es que se repitió el ensayo de viabilidad, enfrentando las AuNP y AuNP-Pep, a dos isómeros de la secuencia Pep (CLPFFD-NH<sub>2</sub>), los cuales se diferencian en la posición del residuo Aspártico dentro de la secuencia. Los isómeros ensayados fueron: CLPDFF-NH<sub>2</sub> y CDLPFF-NH<sub>2</sub>, se estudió su efecto sobre la viabilidad mediante el ensayo colorimétrico de reducción de MTT.

*d) Evaluación del efecto en la sobrevida de neuronas de hipocampo E18, tratadas con AuNP:* Se sometieron los cultivos de neuronas de hipocampo E18 (sembradas en placas de cultivo de 12 pocillos), durante 48 horas a los tratamientos, luego se reemplazó el medio de cultivo con los tratamientos, por Neurobasal® B27 Ara C, cada 48 horas, hasta alcanzar los 7 días después de haber sido tratadas con las nanopartículas, cuando se sometieron a un análisis de viabilidad mediante el ensayo de exclusión de Azul de Tripan. Con el fin de evaluar si aumenta o disminuye la viabilidad, ya pasados 7 días desde que se retiraron los tratamientos.

### **2.8.5. Determinación de los tipos de muerte celular en cultivos de neuronas hipocampales E18:**

a) *Necrosis*: A las 48 horas de tratamiento, se evaluó la actividad de la enzima LDH. Para este fin, se extrajo el medio de cultivo, que contenía metabolitos de desecho de las mismas células. Es en este medio que se utilizó para medir la actividad de la LDH de las células que, al encontrarse en un proceso necrótico, liberan su contenido intracelular al medio externo. Se tomó una alícuota de 100 $\mu$ L de medio, se adicionó 850 $\mu$ L de tampón Fosfato 0,1M [para 100mL: 0.61g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 1.64g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, en 100mL de H<sub>2</sub>O<sub>NANOPURE</sub> pH(7.0)], se adicionó 33.3 $\mu$ L de Piruvato [2.5mg/mL] y se mezcló.

Previo a la medición de la cinética de desaparición de NADH, mediante un análisis espectrofotométrico, se ajustó el equipo a una longitud de onda de 340nm y se ajusta para que registre el decaimiento de absorbancia durante 3 minutos a una temperatura controlada de 37°C. Una vez ajustado el equipo, se adicionó el sustrato coloreado NADH [10 mg/mL] que sirvió para medir la actividad de la LDH, al censar la disminución de la absorbancia mientras el NADH se transformó a NAD<sup>+</sup>.

Se graficó la variación de la absorbancia con respecto al tiempo, lo cual entregó la pendiente de decaimiento de color, que es directamente proporcional a la actividad de la LDH. Es decir, mientras mayor fuera la pendiente, mayor es la actividad de la LDH y mayor fue el número de células en estado necrótico.

b) *Apoptosis*: Para este ensayo, las células se dejaron crecer sobre cubreobjetos de vidrio de 12mm de diámetro, estériles y previamente tratados con poli-D-lisina y lavados con H<sub>2</sub>O<sub>NANOPURE</sub>.

En adición a los tratamientos con Citrato 0.24mM, AuNP 0.2nM, AuNP-Pep 0.2nM, Pep 200nM y se agregó un control positivo de apoptosis, que es una solución de Staurosporina a una

concentración de 1 $\mu$ M en el cultivo, para asegurar que la posterior tinción, no dé falsos positivos.

A las 48 horas de tratamiento, se extrajo el medio de cultivo por aspiración, y se lavaron dos veces con tampón HANK 1X y se fijaron con 500 $\mu$ L de p-formaldehído 1% en tampón PBS 1X [una tableta en 200mL de H<sub>2</sub>O<sub>NANOPURE</sub> pH (7.4)] durante 15 minutos, luego se extrajo el p-formaldehído 1% por aspiración y se lavaron dos veces las células fijadas a los cubreobjetos (preparados) con tampón PBS 1X, para luego reemplazar el volumen de p-formaldehído 1%, por Etanol<sub>GLACIAR</sub> al 70% v/v y se guardaron a -20°C durante 24 horas, previos a la tinción de los preparados.

Luego se procedió a la tinción de las células mediante el kit *Apo-BrdU<sup>TM</sup> TUNEL*. Primero, se lavaron los preparados, dos veces con 400 $\mu$ L de tampón de lavado y luego se preparó la solución de tinción de DNA con BrdUTP, con un volumen de 30 $\mu$ L por preparado y se incubó por un tiempo de 60 minutos a 37°C, protegido de la luz. Posteriormente, se lavaron los preparados, dos veces, con un volumen de 400 $\mu$ L de tampón de lavado.

Una vez terminado el lavado, se elaboró la solución de tinción por el anticuerpo Anti-BrdU marcado con AlexaFluor-488 con un volumen de 60 $\mu$ L por preparado y se incubó por un tiempo de 30 minutos a temperatura ambiente, también protegidas de la luz.

Finalmente se adicionó un volumen de 400 $\mu$ L de la solución de Ioduro de Propidio y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, luego se montaron sobre un portaobjetos con medio de montaje Dako y se observó mediante el uso de un microscopio de fluorescencia.

c) *Autofagia*: Para este ensayo, al igual que para el ensayo de apoptosis, las células se dejaron crecer sobre cubreobjetos de vidrio de 12mm de diámetro, estériles y previamente tratados con poli-D-lisina y lavados con H<sub>2</sub>O<sub>NANOPURE</sub>. En este ensayo no se evaluó la muerte por Autofagia, sino la formación de vesículas autofágicas que podrían desencadenar una muerte celular. La formación de vesículas autofágicas, es un proceso que se desarrolla a tempranos estadios de incubación (40), razón por la cual se utilizó un tiempo de 6 horas en este ensayo.

Al tercer día de realizado el cultivo, las células fueron sometidas a la infección por *Adenovirus GFP-LC3*. Para aquello, se realizó una dilución de la solución stock de adenovirus en medio *Neurobasal*® B27, para asegurar una concentración de moléculas infectivas (MOI) de 10 en el cultivo y se incubaron con este MOI 10 durante 12 horas.

Terminado el tiempo de infección, se retiró el medio de cultivo por aspiración y fue reemplazado por medio de cultivo *Neurobasal*® B27 nuevo y se adicionaron los tratamientos, antes descritos, mas un control positivo de autofagia, que constó de tampón PBS 1X en vez del medio *Neurobasal*® B27, para simular una privación de nutrientes, que llevaría a un proceso autofágico. El tiempo de los tratamientos fue de 6 horas, para asegurar el detener el proceso obteniendo la mayor cantidad de vesículas autofágicas en los cultivos, ya que, dado que es un proceso dinámico, las vesículas autofágicas van disminuyendo en su número a través del tiempo, dando lugar a resultados que llevarían a mala interpretación del proceso (40). Una vez transcurridas las 6 horas, se aspiró nuevamente el medio de cultivo con los tratamientos y se lavaron dos veces con tampón PBS 1X y se adicionó un volumen de 500µL de Metanol GLACIAR durante 10 minutos, para lograr la sensibilización de los cultivos en los cubreobjetos, para finalmente reemplazar el volumen de Metanol GLACIAR (que se retiró por aspiración) por PBS 1X, para mantener los preparados hidratados previos al montaje sobre portaobjetos.

Finalmente, los preparados fueron montados sobre portaobjetos con medio de montaje Dako y se observaron mediante un microscopio de fluorescencia.

#### **2.8.6 Evaluación de la producción de ROS en cultivos de neuronas hipocampales E18:**

Una vez que los cultivos, de neuronas de hipocampo E18, llegaron al cuarto día desde que fueron sembradas, donde se aseguró que estaban completamente diferenciadas y que los resultados ya eran representativos, se realizaron los ensayos para censar la producción de ROS ante el tratamiento con nanopartículas.

Las células se hicieron crecer en placas estériles de 96 pocillos, asegurando que la confluencia fuera mayor a un 80% al momento de realizar el ensayo (es decir, sembrando 100000 células por pocillo, en el momento de realizar el cultivo), para así obtener resultados más homogéneos y representativos.

Las células, se lavaron dos veces con tampón Krebs  $\text{Ca}^{++}$  [ $\text{NaCl}$  145mM,  $\text{KCl}$  5mM,  $\text{CaCl}_2$  2.5mM,  $\text{MgCl}_2$  1mM, Glucosa 5.6mM, Hepes 10mM, a pH (7.4)], para asegurar que no queden restos celulares. Luego se cargaron las células con una solución de  $10\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{DCFDA}_{\text{NO-FLUORECENTE}}$  en el cultivo, se incubó durante 15 minutos a  $37^\circ\text{C}$  y se protegió de la luz. Terminado el tiempo, se descartó la sonda, se lavaron las células con tampón Krebs  $\text{Ca}^{++}$  y se adicionó nuevamente tampón, se dejó a  $37^\circ\text{C}$  durante 15 minutos para asegurar que la sonda haya sido modificada de  $\text{H}_2\text{DCFDA}_{\text{NO-FLUORECENTE}}$  a  $\text{DCF}_{\text{FLUORECENTE}}$  por las esterasas intracelulares (42).

Finalmente se descartó el tampón y se agregaron rápidamente los tratamientos, ya que la sonda se oxida fácilmente, en tampón Krebs  $\text{Ca}^{++}$ .

Luego, las mediciones se realizaron en un fluorímetro de placa. Donde se tomó la precaución de encender la lámpara del equipo con un tiempo mínimo de 10 minutos antes de realizar la medición y luego se ajustó a los requerimientos del ensayo: temperatura controlada a  $37^\circ\text{C}$ , longitud de onda de excitación: 485nm y emisión: 530nm, tiempo de espera entre lecturas: 3 minutos y un número de ciclos suficientes para completar 75 minutos de lectura de la emisión de fluorescencia.

Dado que este marcador no permite evaluar tiempos largos de incubación, ya que por agotamiento de la sonda, la señal de fluorescencia va disminuyendo, es que fue necesario, preincubar las células durante 90 minutos y 210 minutos, para ver si existe alguna diferencia, entre la producción de ROS el tiempo en contacto con las nanopartículas. En ambos casos, una vez concluido el tiempo de preincubación, se retiraron los tratamientos, se agregó la sonda ( $\text{H}_2\text{DCFDA}_{\text{NO-FLUORECENTE}}$ ) y se repusieron los tratamientos, para, someterlos a la lectura mediante el fluorímetro de placa.

*a) Evaluación del efecto de AuNP sobre la mecánica antioxidante, frente al estrés oxidativo producido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:* Las células, de hipocampo de rata E18, se sembraron con las mismas características para realizar el ensayo con DCF.

Una vez alcanzado el cuarto día, las células se sometieron a 48 horas de tratamiento con los compuestos, como fue descrito en el punto 2.8.4. Una vez transcurrido este tiempo, a la mitad de la placa de 96 pocillos, se puso en contacto con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a una concentración de 300µM por 3 horas, con el fin de evaluar la influencia de los tratamientos con nanopartículas, frente al daño por estrés oxidativo producido por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se estudió su efecto sobre la viabilidad celular, mediante el ensayo colorimétrico de reducción de MTT.

*b) Bloqueo del estrés oxidativo, mediante la acción de N-Acetil-Cisteina (NAC) y determinación del efecto del bloqueo de ROS sobre la viabilidad celular:* Las células, de hipocampo de rata E18, se sembraron con las mismas características para realizar el ensayo con DCF.

Una vez llegado el cuarto día, las células fueron sometidas a un pretratamiento durante 60 minutos con NAC, a 50µM en cultivo, según se encuentra descrito en la literatura (43), para asegurar que las células se adecuen a la presencia de este reactivo. Modulando a una respuesta antioxidante, gracias a la presencia de NAC (43).

Una vez transcurrido el tiempo de tratamiento con NAC, se adicionaron los tratamientos antes señalados: Citrato 0.24mM, AuNP 0.2nM, AuNP-Pep 0.2nM, solo medio de cultivo y como control negativo de muerte a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y SDS a 0.04%, dejándose los cultivos durante 48 horas en contacto con los tratamientos y se estudió su efecto sobre la viabilidad celular, mediante el ensayo colorimétrico de reducción de MTT.

### **2.8.7. Evaluación del efecto de las AuNP sobre la expresión de Proteínas en cultivos celulares:**

Para este estudio, se repitieron los tratamientos antes mencionados, y se adhirió un tratamiento que constaba de solo adicionar CLPFFD-NH<sub>2</sub> (Pep) en solución (citrato 1.2 mM), para evaluar una posible acción del Pep solo, sobre la expresión de proteínas de las neuronas de hipocampo E18. Este tratamiento se adicionó a una concentración de 200nM en el cultivo, ya que esa sería la concentración teórica de Pep igualándola a la de AuNP-Pep y se dejó en contacto el mismo tiempo que los demás tratamientos.

*a) Extracción de proteínas:* Para la extracción de proteínas, una vez terminados los tratamientos antes mencionados (48 horas de tratamiento), para los ensayos de citotoxicidad, se removió el medio de cultivo por aspiración y se realizaron dos lavados con tampón HANK 1X. Luego se le adicionaron 400µL de tampón de Lisis [Urea 7M, Tiourea 2M, CHAPS 2%, DTT 80mM]. Se utilizó un “rascador” para producir la lisis mecánica de las células y se trasvasijó cada extracto a tubos de centrifuga Eppendorf de 1.5mL. Se sonicó cada uno de los extractos por 30 segundos y luego se centrifugaron a 20000g por 10 minutos, a 4°C y se almacenaron a -20°C.

Se realizó una cuantificación de las proteínas totales de cada extracto, usando el método colorimétrico descrito por Bradford (56), donde se logró obtener una relación entre el volumen del extracto y la cantidad de proteínas totales que este contenía. Luego se dio paso a un separación por el punto isoelectrico de las proteínas, denominado **isoelectroenfoque** en tiras de electroenfoque en un rango de **Punto Isoeléctrico (PI) de 3-11**, por 12 horas en una camara de Isoelectroenfoque. Donde se sometieron a una gradiente de voltaje mayor a los 8000 V acumulándose hasta los 60000 V, para asegurar un buen isoelectroenfoque. En cada tira se cargó una cantidad de **100µg de Proteína total**, lo cual asegura una normalización en los posteriores análisis de expresión.

Una vez terminado el electroenfoque, la cual se catalogó como una electroforesis de **primera dimensión**, se realizó una **segunda dimensión** de las muestras en geles de



**Poliacrilamida a 12,5%.** En una cámara de electroforesis, donde se sometieron a 120 V, durante 4 a 5 horas. Al terminar el tiempo de electroforesis, los geles se tiñeron con una solución de nitrato de plata para luego ser escaneados en un *scanner* BioRad y las imágenes analizadas en un *software* de análisis de las imágenes, donde se eligieron señales que fueron posteriormente analizadas mediante ESI e identificadas realizando un pareo contra una base de datos en línea para identificar que proteínas son las que variaron en los cultivos (57).

Los criterios utilizados, para comparar las señales (*spots*), fue intensidad y volumen en el gel 2-D, comparados con el gel correspondiente al extracto control (57).

*b) Digestión de Geles de poliacrilamida:* Una vez que se realizó el análisis de las imágenes de los geles, se procede a cortar del gel la zona que haya resultado de interés por comparación de los geles provenientes de diferentes tratamientos de las células y escogidas las proteínas (*spots*) fueron cortadas desde el gel y sometidas a un proceso de digestión con tripsina (modificada a grado de secuenciación) en un equipo automático de secuenciación

Los cortes seleccionados fueron sometidos a un lavado de secuenciación, con bicarbonato de amonio y acetonitrilo (respectivamente) para seguir a un proceso de equilibrado de las proteínas extraídas en una solución de DTT 10mM por 30 minutos y siendo tratadas con una solución de yodo acetamida 55mM. Después de terminado este lavado de secuenciación, las proteínas fueron digeridas durante toda la noche, con una solución de tripsina al 0,27 nM a 37°C.

Los péptidos trípticos (digeridos con tripsina), fueron extraídos de la matriz del gel con una solución de ácido fórmico y acetonitrilo al 10%. Finalmente, los extractos fueron reunidos y secados en una centrifuga con vacío.

*c) Obtención de MS y el espectro MS/MS:* Las proteínas que fueron obtenidas desde el gel 2D, se analizaron por ESI-MS/MS.

Los péptidos trípticos, fueron analizados por un cromatógrafo líquido en línea con un espectrómetro de masas. Previamente, las muestras fueron resuspendidas en 15mL de ácido fórmico 1%, de los cuales se tomó una alícuota de 4mL que fue sometida a una separación cromatográfica de fase reversa en una columna capilar C<sub>18</sub> (75mm de diámetro interno y 15cm

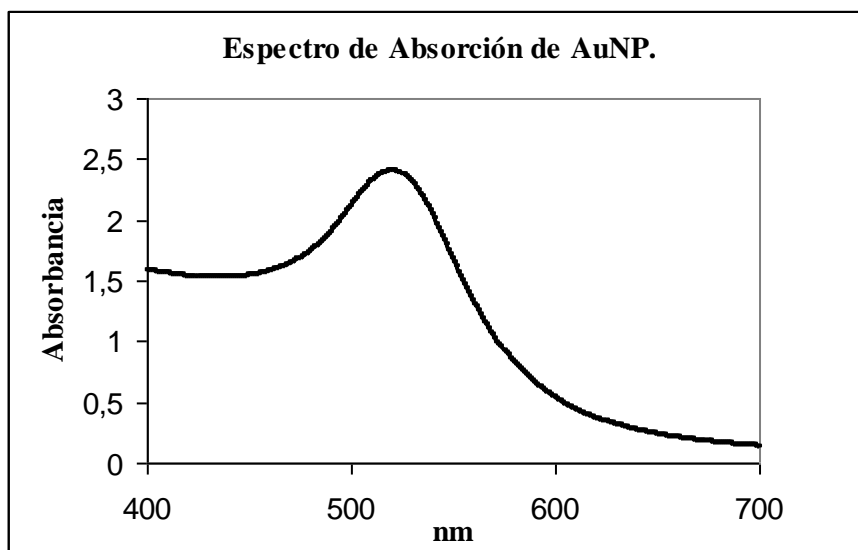
de longitud). Los péptidos, una vez eluidos fueron ionizados utilizando agujas cubiertas nano-ES. Donde fue aplicado un voltaje capilar de 1800-2200 V junto a un voltaje de cono de 80V, siendo realizada la colisión en el CID (*collision-induced dissociation*) a 20-35 eV y empleando argón como gas de colisión.

Finalmente, los datos fueron generados en un formato PKL, el cual pudo ser enviado a una búsqueda en una base de datos disponible en el servidor MASCOT, y así se logró su identificación.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSION

#### 3.1 Caracterización de AuNP:

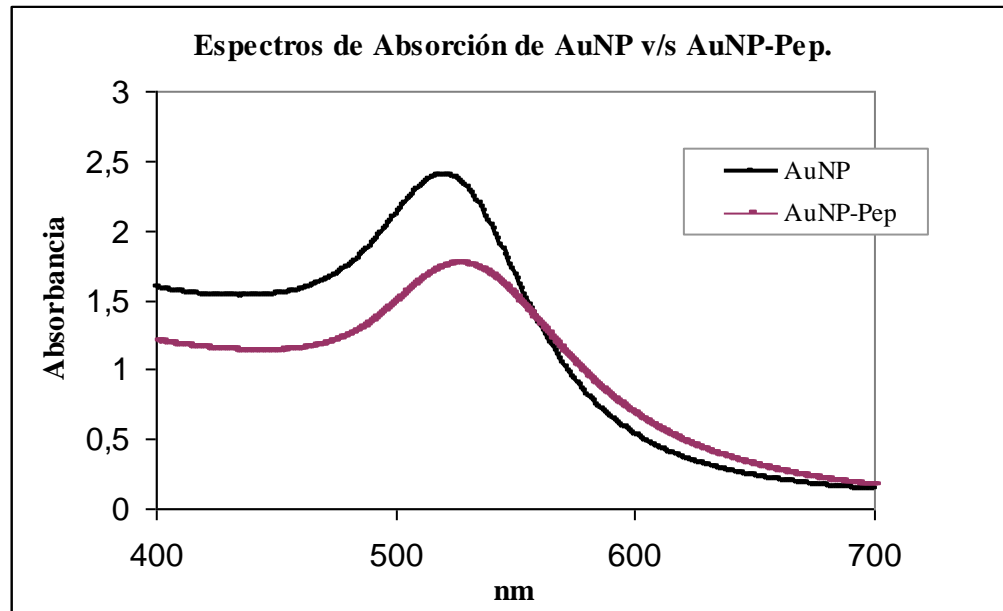
a) *Caracterización por espectrofotometría UV-Visible de AuNP:* Las AuNP obtenidas por el método de Levy mostraron una longitud de onda de absorción máxima ( $\lambda$  máximo) entre los 518-520nm (Fig.12), lo cual sugiere que el tamaño de las AuNP se encuentran en un rango de tamaño cercano a los 12nm (es importante destacar que a mayor  $\lambda$  del pico correspondiente al plasmon mayor es el tamaño de las partículas) (31) y mientras más estrecho sea el pico la distribución de tamaños es más homogénea (31).



**Fig.10** Espectro de absorción correspondiente a una solución de AuNP, obtenida mediante el método de Levy & cols

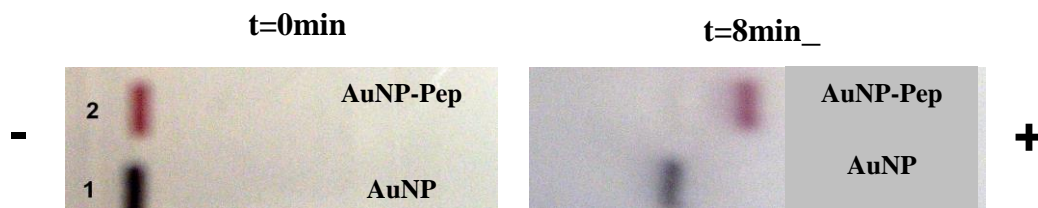
b) *Caracterización por espectrofotometría UV-Visible de conjugados de AuNP-Pep:* Las AuNP, luego de ser conjugadas al péptido CLPFFD-NH<sub>2</sub> y ser sometidas a un barrido entre los 400 y 800nm, en un espectrofotómetro, mostraron  $\lambda$  máximos a los 527nm (Fig.11). Lo cual muestra un desplazamiento en el  $\lambda$  máximo en comparación con las AuNPs sin conjugar. Este efecto podría atribuirse a una modificación en el plasmón superficial de la partícula, como

consecuencia de su conjugación con el péptido. Por una parte, se produce un cambio en el tamaño de las AuNP y por otra parte existe un cambio en el índice de refracción del medio.



**Fig.11** Espectro de absorción correspondiente a una solución de AuNP, obtenida mediante el método de Levy & cols, en comparación con el espectro entregado por sus conjugados al péptido CLPFFD-NH<sub>2</sub> (Pep)

*c) Caracterización mediante electroforesis en gel de agarosa:* En la figura 14 se observó la migración de los conjugados AuNP-Pep hacia el polo positivo en el gel. Para asegurar la migración de los conjugados, las muestras se ajustaron a pH 8, ya que a este pH, se produce la desprotonación del grupo carboxílico perteneciente al ácido aspártico, dejando al conjugado, cargado negativamente. Las AuNPs por sí solas no fueron capaces de migrar, debido a que son inestables en el tampón TAE 1X de corrida de la electroforesis (31).



**Fig.12** Electroforesis en gel de agarosa de AuNPs y sus conjugados. La electroforesis fue realizada a 120 V (diferencia de aplicación de voltaje), en gel de agarosa al 1,5% empleando tampón TAE 1X (31) .

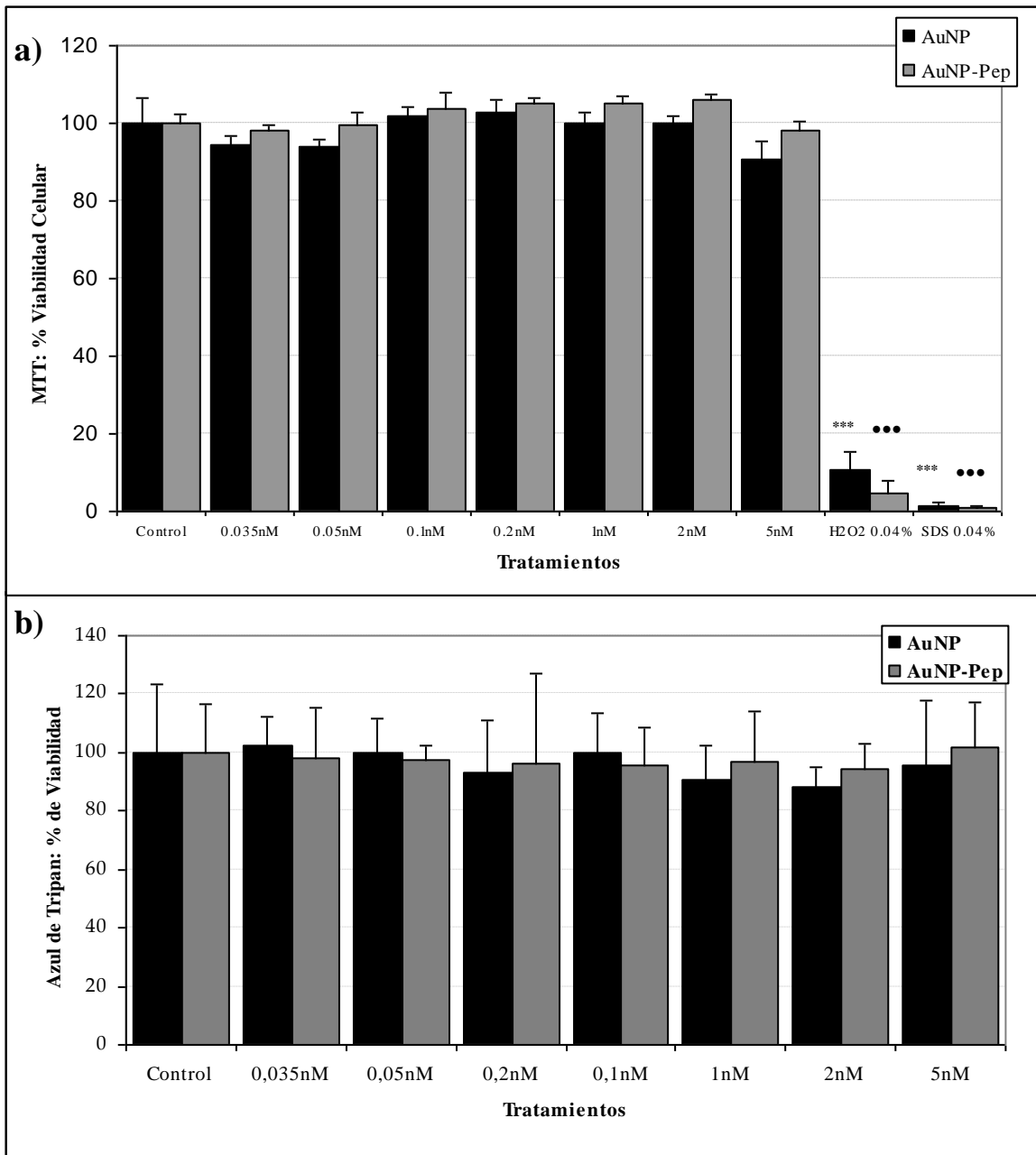
Esta técnica es limitada, ya que no da cuenta del número exacto de moléculas del péptido que se unen a cada AuNP. Pero brinda información sobre el grado de recubrimiento del Pep sobre la superficie de la AuNP, Mientras mas definida sea la banda en el gel de agarosa, significa que el grado de recubrimiento es más homogéneo.

En estudios preliminares a esta memoria de titulo, realizados por Olmedo I. se estimó que la cantidad aproximada de moléculas de Pep que se unen a cada AuNP es de 400 (31).

### **3.2. Citotoxicidad de AuNP y AuNP-Pep:**

Los estudios de toxicidad se realizaron en cultivos de línea celular SH-SY5Y y neuronas de hipocampo de rata E18. Los cultivos se sometieron a diferentes tiempos de exposición, incubándose con las muestras de nanopartículas a diferentes concentraciones en cultivo, evaluando la acción citotóxica de los mismos. En la gráfica de la figura 15.a, se observan los efectos sobre la intensidad de la señal de Formazan, la cual se relaciona con la viabilidad celular, luego de 24 horas de tratamiento en los cultivos de SH-SY5Y, no encontrándose diferencias significativas en lo que respecta a la toxicidad de las nanopartículas. Paralelamente, se realizó un ensayo de viabilidad pero utilizando Azul de Tripán como marcador (Fig. 13.b). En el caso de los estudios con Azul de Tripán (Fig.13.b), se observó una gran variabilidad en los resultados, ya que, al ser un método manual y además en la cámara de Neubauer no se tendrá, necesariamente, una distribución homogénea de las células lo que puede dar grandes diferencias entre una cuenta y otra (58), entregando una desviación estándar alta (58).

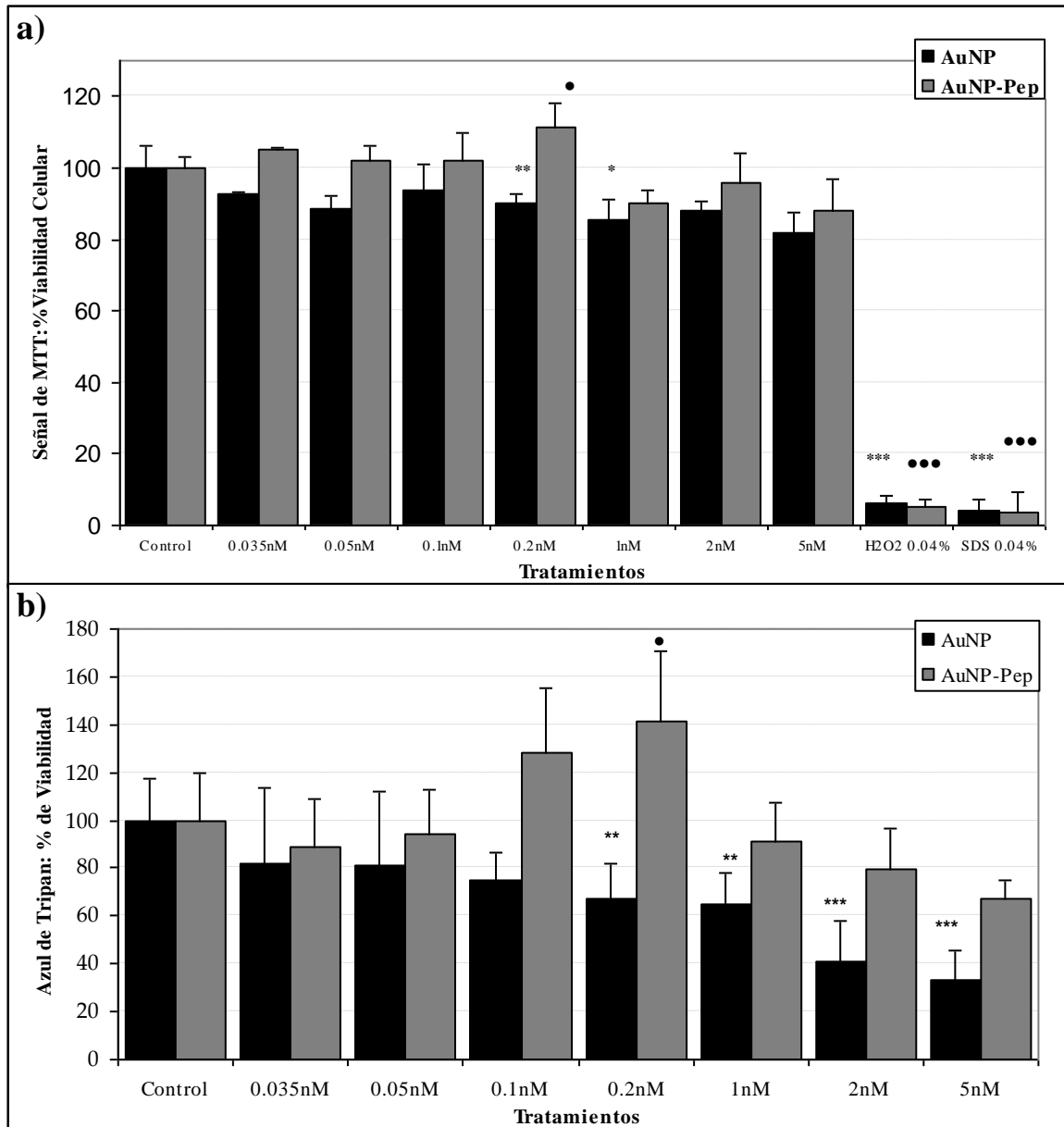
Cabe destacar que cada estudio estadístico, se refirió a solo un tipo de tratamiento (AuNP o AuNP-Pep) por gráfico, cuya comparación para estimar una significancia estadística, se hizo con su propio control interno del ensayo (citrato 0.24mM) al cual se le asignó un 100% de viabilidad ya que muestra la misma señal de viabilidad que un cultivo sin haber estado sometido a ningún tratamiento (dato no mostrado).



**Fig.13** Gráficas de los porcentajes de viabilidad de la línea celular SH-SY5Y, expuesta a las distintas concentraciones de AuNPs expresadas en nM durante **24 horas**, los controles de las gráficas representan a células SH-SY5Y, cuyos pocillos contenían Citrato 0,24mM. **a)** ensayo de MTT, usando como control positivo de muerte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y SDS a una concentración de 0,04 % y **b)** ensayo de Azul de Tripán. Para todas las muestras n = 12 (\*\* = corresponde a la serie AuNP y ●●● = corresponde a la serie AuNP-Pep), \*\*\* o ●●● p < 0,001, \*\* o ●● p < 0,01, \* o ● p < 0,05 ± SD.

En estos resultados no se ven diferencias, estadísticamente significativas, entre los tratamientos utilizados. Lo cual muestra que al tiempo ensayado las células se comportan de

manera similar, no observándose citotoxicidad. En cambio a tiempos más largos de incubación (48 horas) se observaron diferencias estadísticamente significativas (Fig. 14) en la viabilidad celular.



**Fig.14** Gráficas de los porcentajes de viabilidad de la línea celular SH-SY5Y, expuesta a las distintas concentraciones de AuNPs expresadas en nM durante **48 horas**, los controles de las gráficas representan a células SH-SY5Y, cuyos pocillos contenían citrato 0,24mM. **a)** ensayo de MTT, usando como control positivo de muerte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y SDS a una concentración de 0,04 % y **b)** ensayo de Azul de Tripan. Para todas las muestras n = 12 (\*\* = corresponde a la serie AuNP y ●●● = corresponde a la serie AuNP-Pep), \*\*\* o ●●● p < 0,001, \*\* o ●● p < 0,01, \* o ● p < 0,05 ± SD.

Estos resultados, muestran que a las 48 horas de tratamiento se manifiesta un comportamiento que se podría resumir en que: las AuNP tienen una leve toxicidad, a concentraciones mayores que 0.2nM en cultivo, y que esta toxicidad es dosis dependiente.

En el caso de las AuNP-Pep, se puede observar que su toxicidad es menor a la reportada para las AuNP, pero aún así es dependiente de la concentración, mostrándose que a mayor concentración es menor la viabilidad celular.

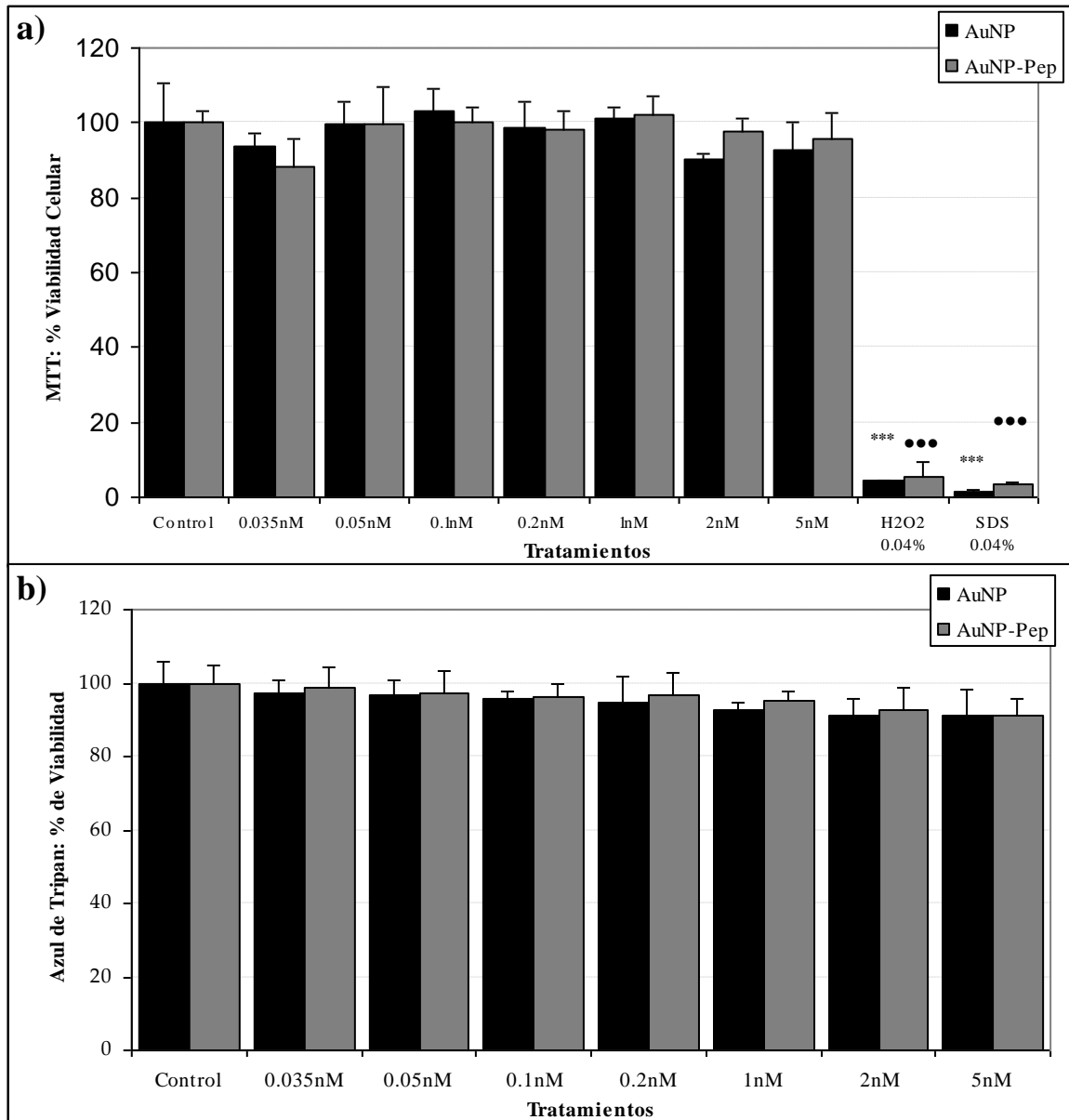
Sorprendentemente, a la concentración de 0.2nM de AuNP-Pep se observó que las señales de MTT y la viabilidad obtenida por exclusión del colorante, se encuentran aumentadas. Este efecto podría deberse a una citoprotección o a un aumento de la proliferación celular en estos cultivos. Estos resultados, pueden ser discutibles por el hecho de que, dado que esta es una línea celular inmortalizada, las células siguen proliferando a través del tiempo. Lo que entrega una variabilidad mayor a los resultados, ya que puede ser que los tratamientos estén mostrando alguna influencia positiva en la proliferación, más que en la viabilidad celular. Además, dado que las células siguen proliferando durante la incubación, del número censado al final de los tratamientos solo un porcentaje de las células estuvieron en contacto con las AuNP y AuNP-Pep durante la totalidad del tiempo. Estos resultados son poco concluyentes ya que con estos experimentos es imposible determinar si se trata de un efecto en la proliferación o de un efecto citoprotector.

En el caso de los cultivos primarios de neuronas de hipocampo de rata E18 no existe proliferación de las células, sino que en los mismos controles de viabilidad, incluso las células van muriendo a través del tiempo. En este caso todas las células del cultivo están en contacto con los tratamientos por la totalidad del tiempo. Dado que estos cultivos son mucho más sensibles cualquier efecto que haya sobre la viabilidad, sobrevida o muerte se hará evidente.

En este caso, así como en los cultivos de neuroblastoma SH-SY5Y cada estudio estadístico, se refirió a solo un tipo de tratamiento (AuNP o AuNP-Pep) por gráfico, cuya comparación para estimar una significancia estadística, se hizo con su propio control interno del ensayo (citrate 0.24mM) al cual se le asignó un 100% de viabilidad.

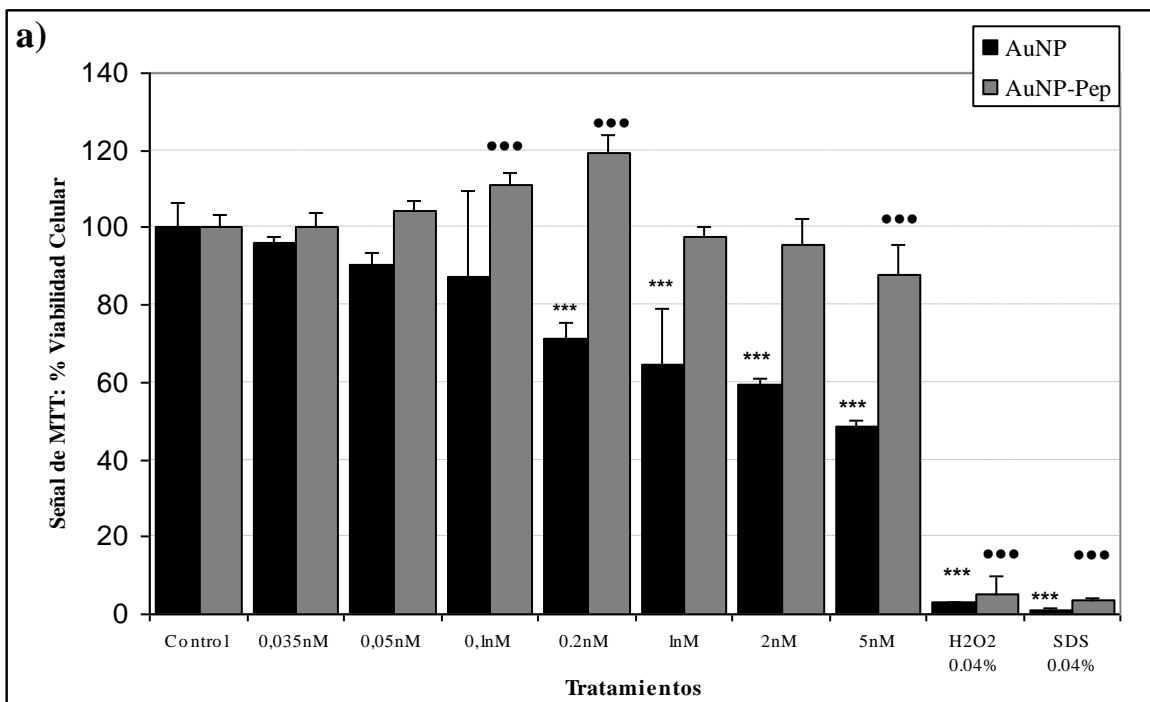


En las figura 15 se muestran los gráficos de la viabilidad celular a 24 horas de tratamiento, ensayados tanto por MTT como por Azul de Tripan, no observándose diferencias significativas entre los tratamientos a ese tiempo (al igual que lo ocurrido con la línea SH-SY5Y).

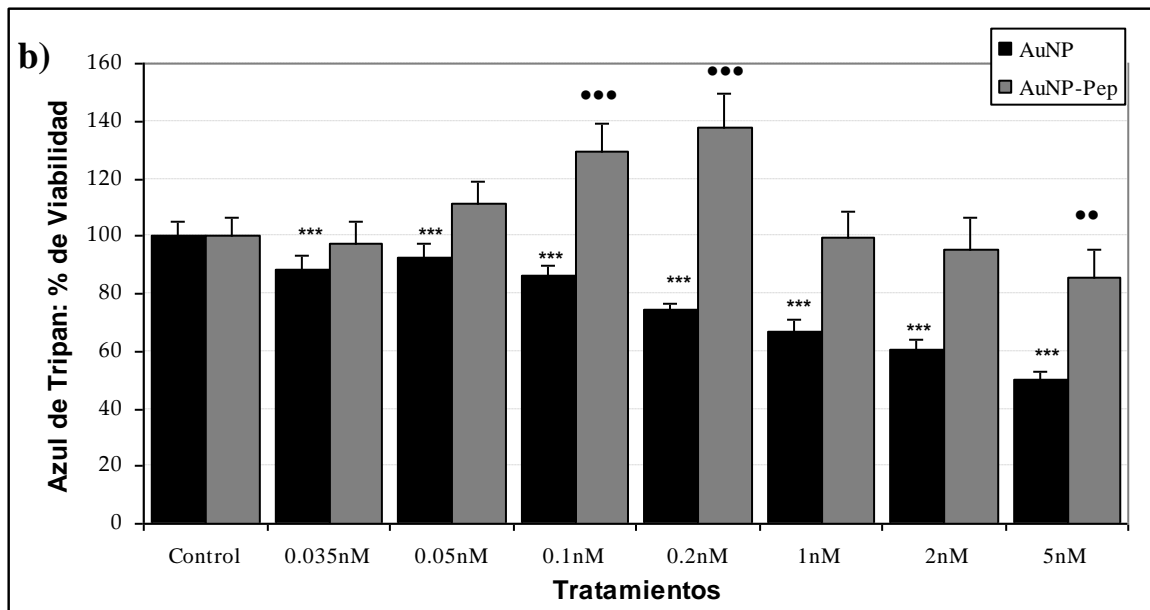


**Fig.15** Gráficas de los porcentajes de viabilidad de neuronas de hipocampo E18, expuestas a las distintas concentraciones de AuNPs expresadas en nM durante **24 horas**, los controles de las gráficas representan a las neuronas de hipocampo E18, cuyos pocillos contenían Citrato 0.24mM. **a)** ensayo de MTT, usando como control positivo de muerte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y SDS a una concentración de 0.04 % y **b)** ensayo de Azul de Tripan. Para todas las muestras n = 12 (\*\* = corresponde a la serie AuNP y ●●● = corresponde a la serie AuNP-Pep), \*\*\* o ●●● p < 0,001, \*\* o ●● p < 0,01, \* o ● p < 0,05 ± SD.

En este resultado se observa, un comportamiento muy similar, al encontrado en los cultivos de neuroblastoma SH-SY5Y, confirmando que a 24 horas de tratamiento, no se ven efectos en la viabilidad celular. En cambio, en neuronas incubadas durante 48 horas, se observan diferencias estadísticamente muy significativas, tanto por el ensayo con MTT (Fig. 16a) como por Azul de Tripán (Fig. 16b). Estos resultados pueden relacionarse con los obtenidos en la línea SH-SY5Y (Fig. 14) y descartan un aumento en las señales de viabilidad por una regulación positiva de la proliferación celular, ya que este cultivo (neuronas de hipocampo E18) no prolifera y todas las células se someten el mismo tiempo a los tratamientos.



**Fig.16a)** Gráfica de los porcentajes de viabilidad de neuronas de hipocampo E18 por ensayo de MTT, usando como control positivo de muerte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y SDS a una concentración de 0,04 %, expuestas a las distintas concentraciones de AuNPs expresadas en nM durante **48 horas**, los controles de las gráficas representan a las neuronas de hipocampo E18, cuyos pocillos contenían Citrato 0,24mM. Para todas las muestras n = 12 (\*\*\*) = corresponde a la serie AuNP y ●●●= corresponde a la serie AuNP-Pep), \*\*\* o ●●● p < 0,001, \*\* o ●● p < 0,01, \* o ● p < 0,05 ± SD.

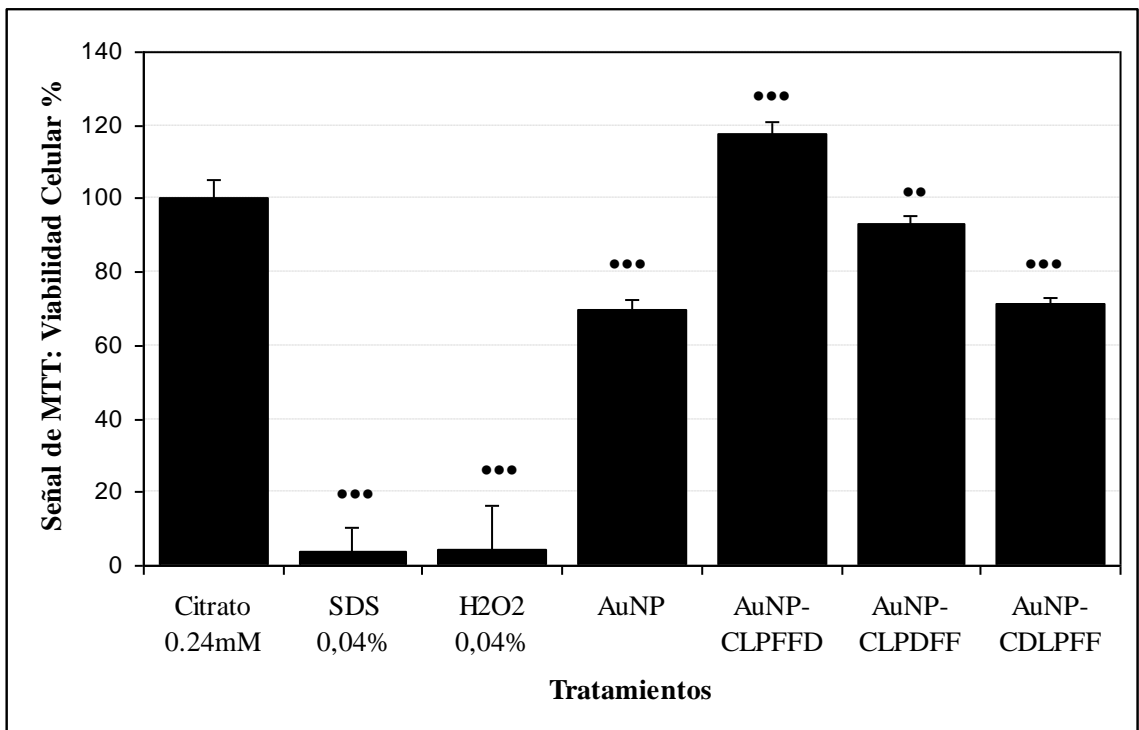


**Fig.16b)** Gráfica de los porcentajes de viabilidad de neuronas de hipocampo E18 por ensayo de Azul de Tripan., expuestas a las distintas concentraciones de AuNPs expresadas en nM durante **48 horas**, los controles de las gráficas representan a las neuronas de hipocampo E18, cuyos pocillos contenían Citrato 0.24mM. Para todas las muestras n = 12 (\*\* = corresponde a la serie AuNP y ●●● = corresponde a la serie AuNP-Pep), \*\*\* o ●●● p < 0,001, \*\* o ●● p < 0,01, \* o ● p < 0,05 ± SD.

En resumen los ensayos de viabilidad muestran una moderada toxicidad de las AuNP tanto en los cultivos de la línea SH-SY5Y como en los cultivos de neuronas de hipocampo E18 a las 48 horas de incubación. AuNP-Pep mostró toxicidad solo a concentraciones sobre los 2nM en cultivo, mientras a que a 0.2nM, se observó un aumento en la viabilidad dado, posiblemente, porque este tratamiento, ejerce un efecto protector hacia las células.

*Efecto de la secuencia del péptido PEP en el efecto citoprotector de AuNP-Pep:* Para este ensayo, se utilizó la concentración a la cual se ve este resultado donde aumenta la viabilidad en los ensayos anteriores, que es de 0.2nM, y se replicó con las mismas AuNP, pero conjugadas a dos isómeros de Pep, que fueron CLP**D**FF-NH<sub>2</sub> y CDLPFF-NH<sub>2</sub> (isómeros, donde se ha cambiado la posición del residuo Asp, desde la secuencia original CLPFF**D**-NH<sub>2</sub>). Los resultados se encuentran descritos en la figura 17 pudiéndose observar que el efecto, de aumento de la viabilidad, se repite pero solo en el caso del las células tratadas con AuNP-CLPFF**D**-NH<sub>2</sub>, y no en el caso de las AuNP conjugadas a los isómeros, incluso en el caso del isómero CDLPFF-NH<sub>2</sub>, la toxicidad es muy similar a la de AuNP. Esto se puede deber a que la cantidad

de moléculas de este péptido, conjugadas a las AuNP es casi la mitad de las moléculas del péptido CLPFFD-NH<sub>2</sub> conjugadas a cada AuNP (31). Pero en el caso de la secuencia CLPDDF-NH<sub>2</sub>, la cantidad de moléculas de péptido conjugadas a cada AuNP es muy similar al caso de la secuencia Pep (31), lo que sustenta el hecho de que este aumento en la viabilidad corresponde solo a esta secuencia en particular.

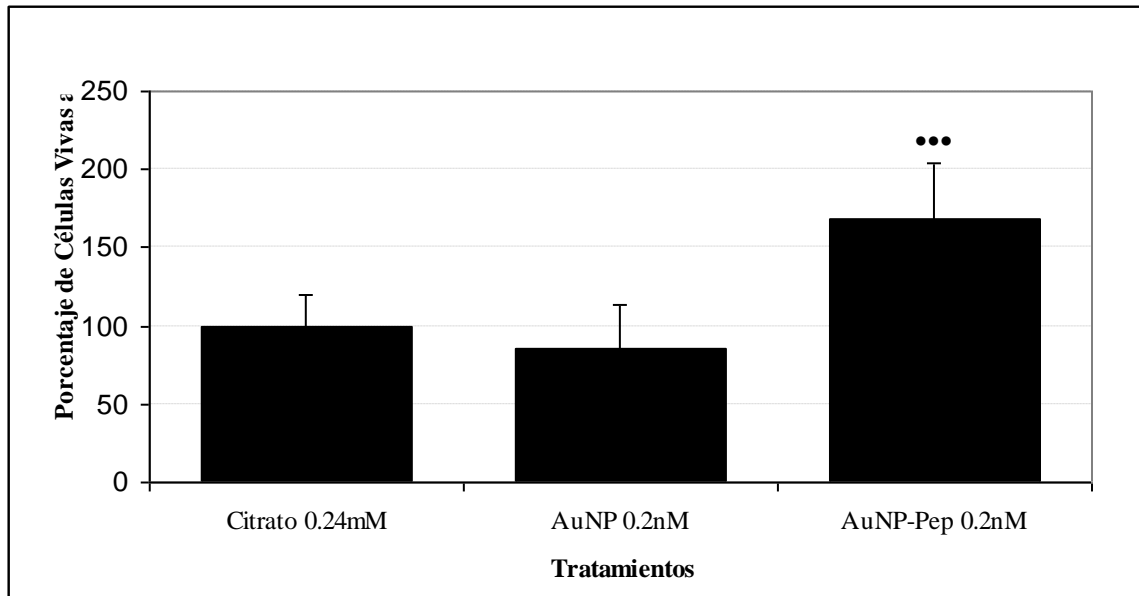


**Fig.17** Gráfica de los porcentajes de viabilidad de neuronas de hipocampo E18 por ensayo de MTT, expuestas a 0.2nM de AuNPs, conjugadas a diferentes secuencias peptídicas, durante **48 horas**, el control de vida (100%) representa a las neuronas de hipocampo E18, cuyos pocillos contenían Citrato 0.24mM y usando como control positivo de muerte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y SDS a una concentración de 0.04 %. Para todas las muestras n = 12, \*\*\* p < 0,001, \*\* p < 0,01, • p < 0,05 ± SD.

*Evaluación del efecto en la supervivencia de neuronas de hipocampo E18, tratadas con AuNP:*

Una vez que las 48 horas de tratamiento con Citrato 0.24nM, AuNP 0.2nM y AuNP-Pep 0.2nM, concluyeron y se dejaron los cultivos durante 7 días más, se sometieron a un ensayo de viabilidad por exclusión de colorante Azul de Tripan. Los resultados de este estudio se encuentran descritos en la figura 19, donde se muestra que las células que se sometieron al tratamiento con las AuNP-Pep, no solo estarían aumentado su viabilidad al término de las 48

horas, como lo descrito en los resultados anteriores. Sino que luego de 7 días, después de los tratamientos, las células se encuentran mucho más capacitadas para resistir el paso del tiempo en los cultivos, en comparación con los otros tratamientos.



**Fig.18** Gráfica de los porcentajes de viabilidad de neuronas de hipocampo E18 por ensayo de Azul de Tripan., 7 días después de haber sido expuestas a AuNPs durante **48 horas**, los controles de las gráficas representan a las neuronas de hipocampo E18, cuyos pocillos contenían Citrato 0,24mM. Para todas las muestras n = 12, ●●● p < 0,001, ●● p < 0,01, ● p < 0,05 ± SD.

Este resultado, demuestra que por el hecho de que las células, se hayan puesto en contacto con las nanopartículas durante 48 horas, si se incuban por un tiempo adicional de 7 días, sin los tratamientos, se observa, claramente, que el tratamiento con AuNP-Pep 0.2nM, produce un aumento en la sobrevivencia de las células con respecto a los controles. Este efecto citoprotector podría ser atribuido a un mecanismo de adaptación, tratadas con AuNP-Pep que conduciría a soportar mejor las condiciones de estrés que se dan en los cultivos neuronales. Contrariamente, para el caso de las neuronas tratadas con AuNP 0.2nM no se observa este aumento de la sobrevivencia, lo que se puede traducir en que las células ya han vuelto a la normalidad, 7 días después de haber retirado los tratamientos.

Debido a que el solo el conjugado AuNP-CLPFFD-NH<sub>2</sub> (AuNP-Pep) produce un efecto sobre la viabilidad en neuronas, es interesante determinar si algún tipo de muerte celular se ve aumentado, frente al tratamiento con AuNP, o disminuido, frente al tratamiento de AuNP-Pep. Por lo que se evaluaron tres mecanismos principales de muerte celular en neuronas.

### 3.3 Efecto del tratamiento de AuNP y AuNP-Pep sobre el tipo de muerte en cultivos de neuronas hipocampales E18:

*Necrosis:* Se estudió en cultivos de neuronas de hipocampo de rata E18. Los cultivos fueron sometidos a 48 horas de tratamiento con AuNP y AuNP-Pep a 0.2nM, citrato 0.24mM y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 500μM como control positivo de necrosis, en el cultivo. Luego al evaluarse la actividad de la LDH, se graficó la variación de la pendiente, como se observa en la figura 19, que es directamente proporcional a la cantidad de necrosis en el cultivo. Se refirió como 100% al control de viabilidad, que es el tratamiento con citrato 0.24mM.

Este resultado indicaría que las células tratadas con AuNP-Pep no muestran un aumento en la actividad de la LDH, por lo que no hay un aumento en la necrosis. En cambio el tratamiento AuNP, muestra un aumento, estadísticamente significativo, de la actividad de la LDH, lo que prueba un aumento en la necrosis, aunque no es tan alta como en el control positivo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 100μM.

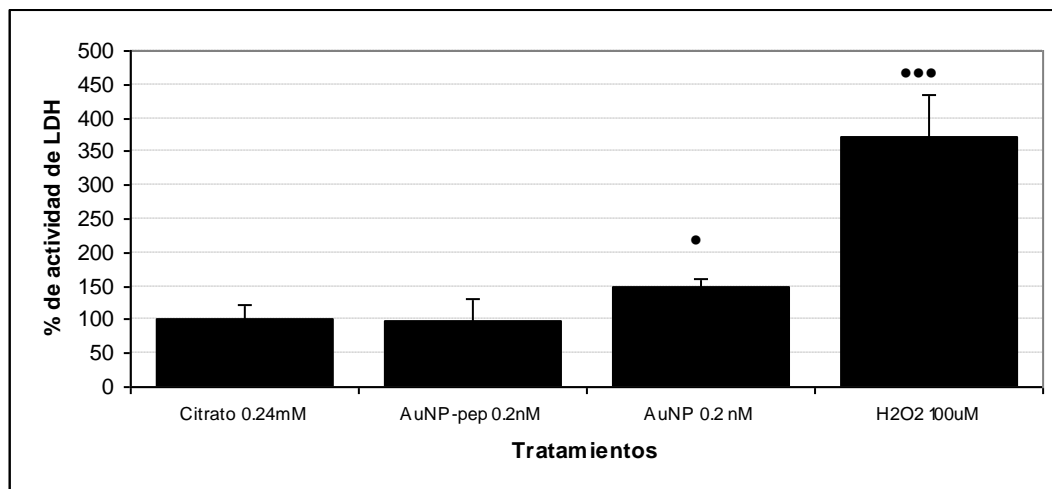
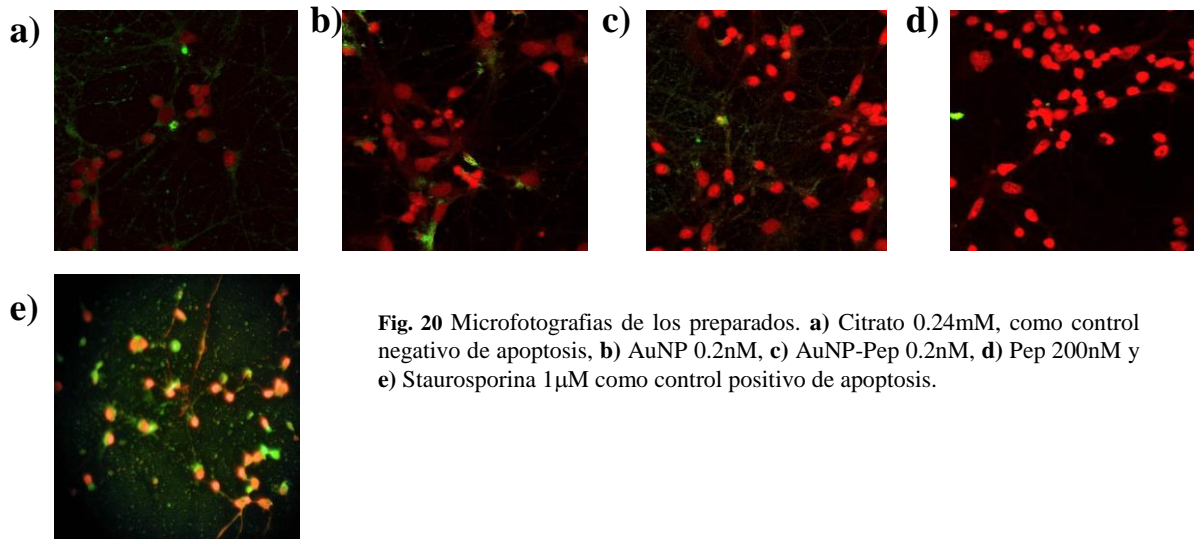
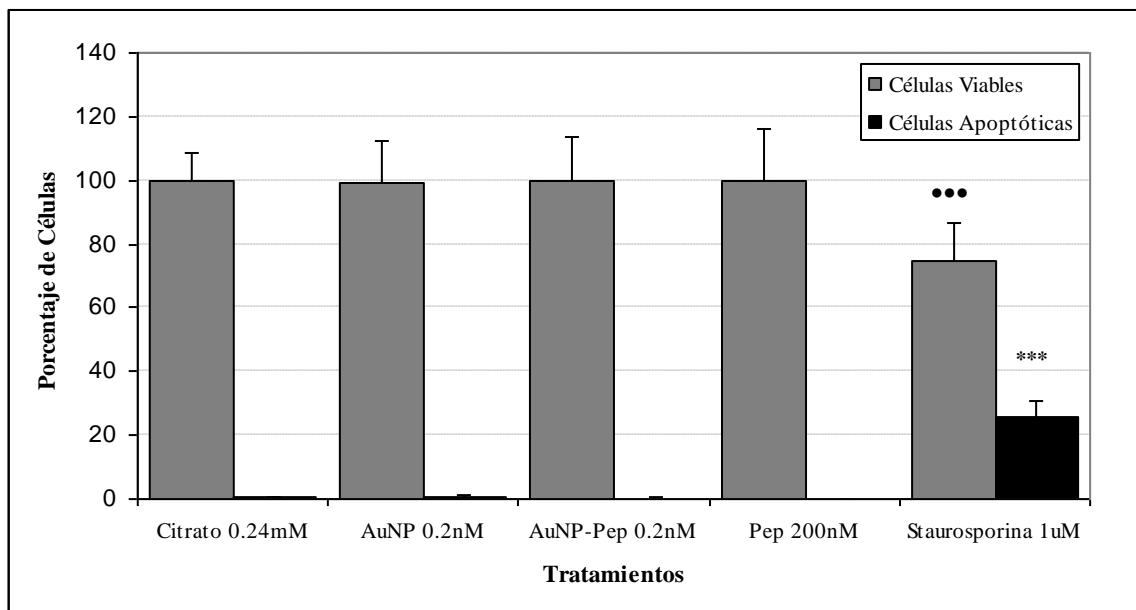


Fig. 19 Gráfica de los porcentajes de actividad de la LDH luego de **48 horas** de tratamientos. Para todas las muestras n=12, ●●● p < 0,001, ●● p < 0,01, ● p < 0,05 ± SD.

*Apoptosis:* Una vez finalizados los tratamientos, junto con el control positivo de apoptosis, se procedió a la tinción con *TUNEL*, y se tomaron microfotografías de los preparados en un microscopio de fluorescencia. En las imágenes obtenidas, se procedió a la cuenta de células apoptóticas (verdes: BrdU +) y las que eran viables (rojas: BrdU -) (Fig.20). Y se graficaron diferenciando el número total de células apoptóticas de las viables (Fig. 21).



**Fig. 20** Microfotografías de los preparados. **a)** Citrato 0.24mM, como control negativo de apoptosis, **b)** AuNP 0.2nM, **c)** AuNP-Pep 0.2nM, **d)** Pep 200nM y **e)** Staurosporina 1µM como control positivo de apoptosis.



**Fig. 21** Estadística de células apoptóticas (verdes) versus las células viables (rojas) en los preparados. Luego de 48 horas de tratamiento. Para todas las muestras n=9, ●●● o \*\*\* p < 0,001, ●● o \*\* p < 0,01, ● o \* p < 0,05 ± SD.

El resultado entregado por la tinción mediante *TUNEL*, indicó que la forma de muerte mayoritario no es mediado por un proceso apoptótico, en los cultivos de neuronas de hipocampo E18

*Autofagia:* Una vez terminados los tratamientos, se realizaron microfotografías de los preparados en un microscopio de fluorescencia. En las imágenes obtenidas, se procedió a la cuenta de células que presentaron vesículas autofágicas (Fig.24) y se llevó a cabo una estadística de población celular (Fig. 25). Donde, al igual que el ensayo de apoptosis, se graficaron diferenciando el número total de células con vesículas autofágicas y sin vesículas autofágicas presentes en las fotografías.

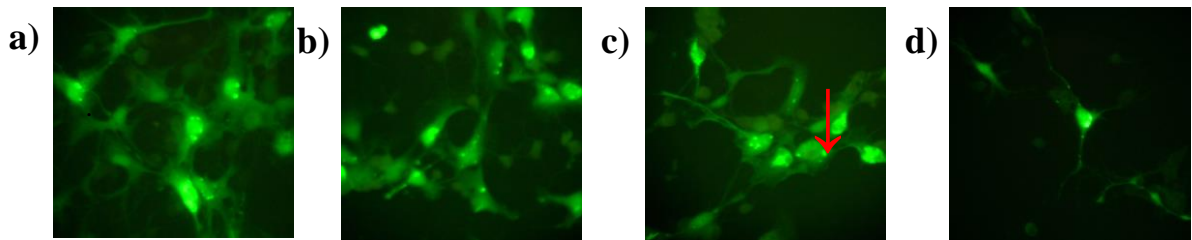


Fig. 22 Microfotografías de los preparados. a) Citrato 0.24mM, b) AuNP 0.2nM, c) AuNP-Pep 0.2nM y d) Pep 200nM.

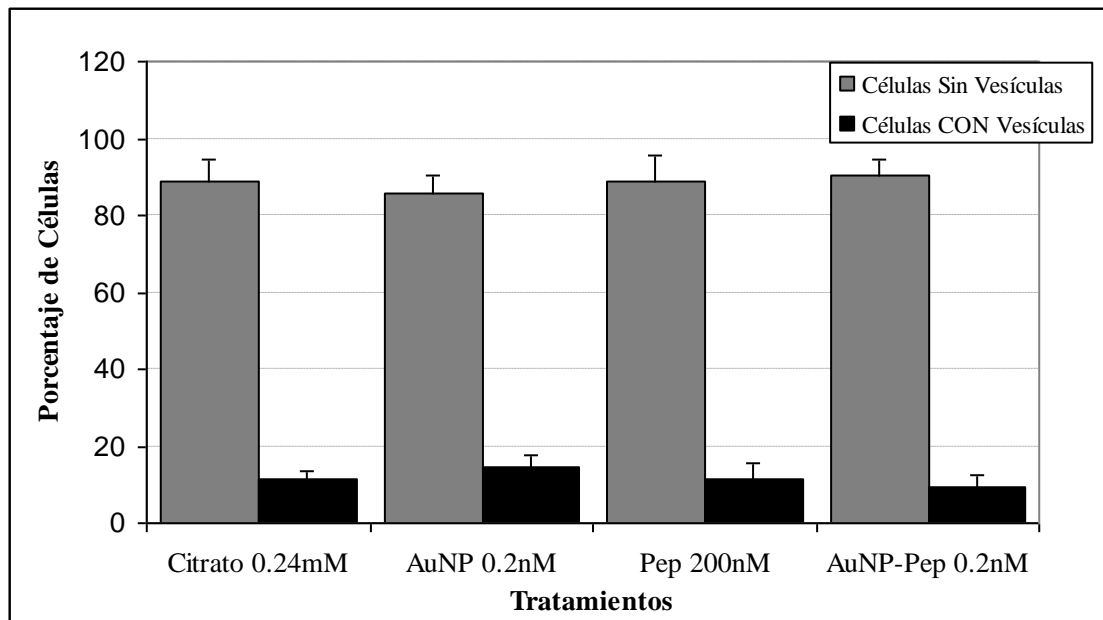


Fig. 23 Estadística de células con vesículas autofágicas, versus las células sin presencia de vesículas en los preparados. Luego de **48 horas** de tratamiento. Para todas las muestras n=9.



Estos resultados, indicarían que, se encuentra presente, un proceso autofágico y en mayor proporción que el proceso apoptótico.

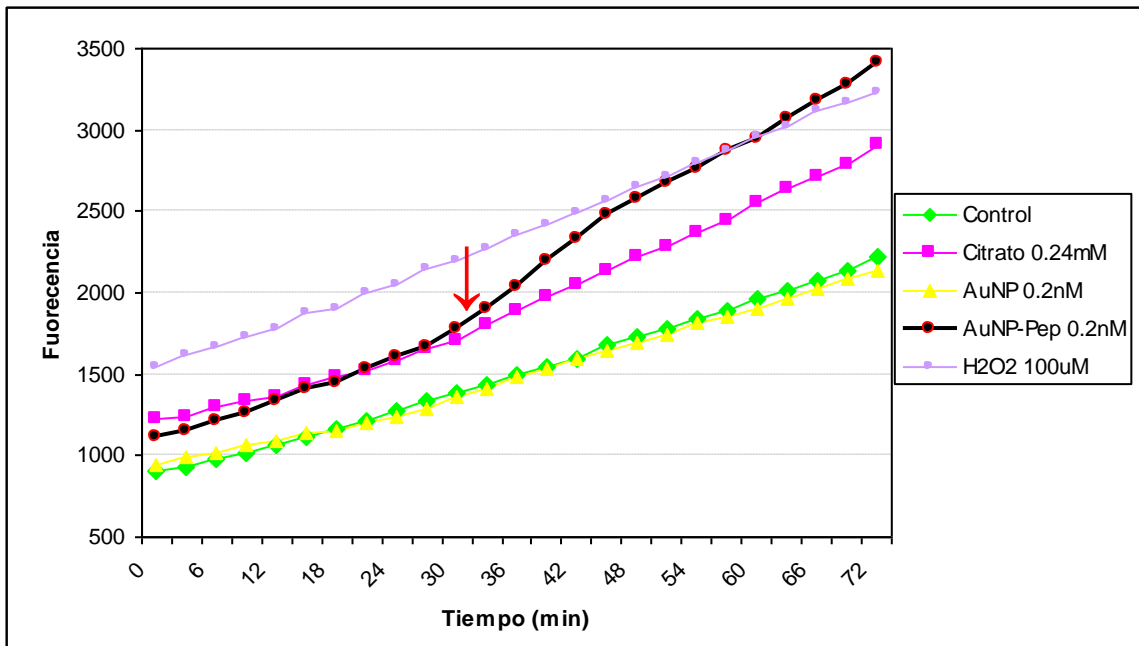
También que este proceso, es común a todos los tratamientos, sin entregar diferencias estadísticamente significativas.

Además de una respuesta tan drástica como es la muerte celular deben evaluarse otros efectos que podrían producirse en las células como son la producción de ROS ante la presencia de metales como el oro.

#### **3.4 Evaluación de la producción de ROS en cultivos de neuronas hipocampales E18 tratados con AuNP y AuNP-Pep:**

Los estudios de producción de ROS se realizaron en cultivos de neuronas de hipocampo de rata E18. Los cultivos se sometieron a diferentes tiempos de exposición con los tratamientos, a las concentraciones Citrato 0.24mM, AuNP 0.2nM, AuNP-Pep 0.2nM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100μM como control positivo de producción de ROS y un blanco al cual no se le adicionó ningún tratamiento, con tal de medir la producción de ROS basal de los cultivos.

Las mediciones, al fluorímetro de placa, se realizaron a diferentes tiempos de exposición a los tratamientos. Primero, se midió el aumento de fluorescencia de inmediato luego de haber agregado los tratamientos. Y se registró el aumento en la fluorescencia a través del tiempo (Fig.26). Donde se puede observar que durante los primeros 30 minutos de lectura, las variaciones de la fluorescencia con respecto al tiempo, son similares, mostrando un posible periodo LAG, en lo que respecta a la producción de ROS.



**Fig. 23** Gráfica de las variaciones de fluorescencia con respecto al tiempo. Se puede observar que el punto de inflexión (marcado con una **flecha roja**) de la producción de fluorescencia, es decir la producción de ROS, en las células tratadas con AuNP-Pep 0.2nM, se encuentra en los 1850segundos (30 minutos)

Este resultado, entrega datos de que a los 30 minutos desde que las células entran en contacto con este tratamiento, se produce un punto de inflexión en la cinética de producción de fluorescencia, correspondiente a las células tratadas con AuNP-Pep 0.2nM. Comportamiento que no se repite en los otros tratamientos, donde se mantiene una linealidad, a este tiempo, anterior al punto de inflexión, se le denominó periodo “LAG”.

Para poder graficar las variaciones de fluorescencia con respecto al tiempo, se decidió no tomar este periodo LAG, y graficar después del punto de inflexión, ya que, en este tiempo, las diferencias entre la velocidad de formación de ROS son imperceptibles. Entonces, a tiempos posteriores al punto de inflexión, se asegura una linealidad que entregaría un resultado estadísticamente aceptable, para evaluar la variación en la producción de fluorescencia con respecto al tiempo de lectura (Fig. 24). En este resultado, se puede observar que, la velocidad de producción de ROS que corresponde a las células tratadas con AuNP-Pep, es alta con respecto a las velocidades del resto de los tratamientos estudiados.

Al graficar las variaciones de fluorescencia con respecto al tiempo, se procedió a restar la fluorescencia base (mostrada por el blanco) a las variaciones entregadas por los cultivos expuestos a los tratamientos, esto, con el fin de observar con mayor claridad las diferencias entre ellos, y realizar el estudio estadístico correspondiente. Esto fue aplicado a todos los gráficos posteriores, donde se grafica la variación de la fluorescencia con respecto al tiempo v/s los tratamientos a los que pertenecen.

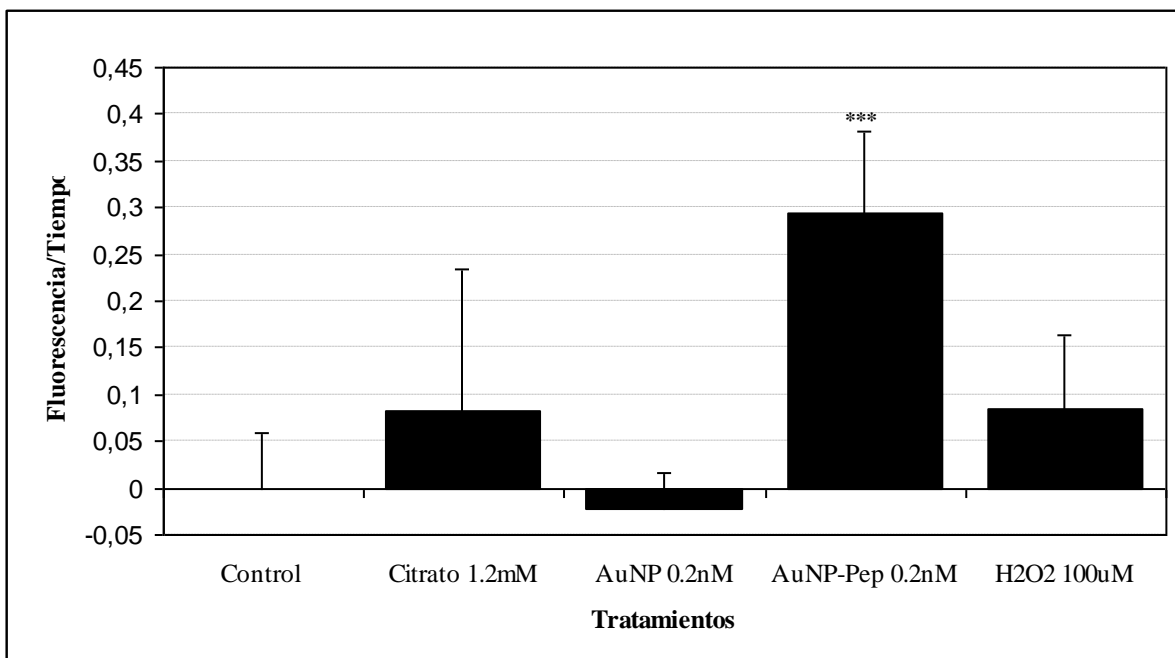


Fig. 24 Gráfica de las variaciones de fluorescencia con respecto al tiempo v/s los tratamientos, durante 75 minutos de lectura. Para todas las muestras  $n = 12$ ,  $*** p < 0,001 \pm SD$ .

Este resultado, muestra que luego de 30 minutos de tratamiento, se produce un aumento significativo en la producción de ROS, en las células tratadas con AuNP-Pep. Con respecto al control.

Para estudiar si estas velocidades de formación de ROS se mantienen a través del tiempo, se realizó el mismo estudio a tiempos de incubación mayores, con los tratamientos (90 y 210 minutos), se registró la formación de ROS de la misma forma que el experimento anterior. Este experimento se encuentra esquematizado en la figura 25.

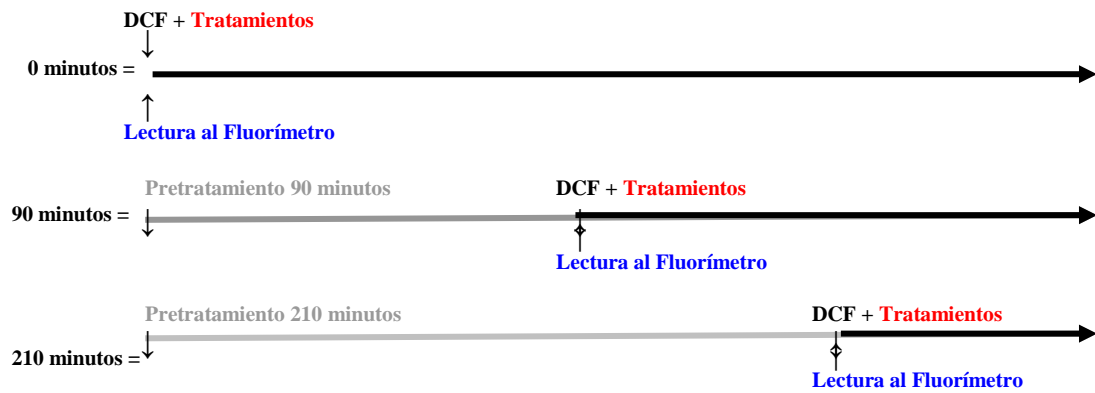


Fig. 25 Esquema de pretratamiento. En cada uno de los experimentos se preincubaron las células durante un tiempo de 0, 90 y 210 minutos. Terminados los tiempos de incubación se adicionó DCF, se repusieron los tratamientos y se leyó al fluorímetro de placa, registrando la velocidad de formación de ROS.

Luego se graficaron las velocidades de formación de ROS (figura 26), viendo diferencias entre las velocidades, registrándose una marcada disminución en la velocidad de producción de ROS correspondiente a las células tratadas con AuNP-Pep.

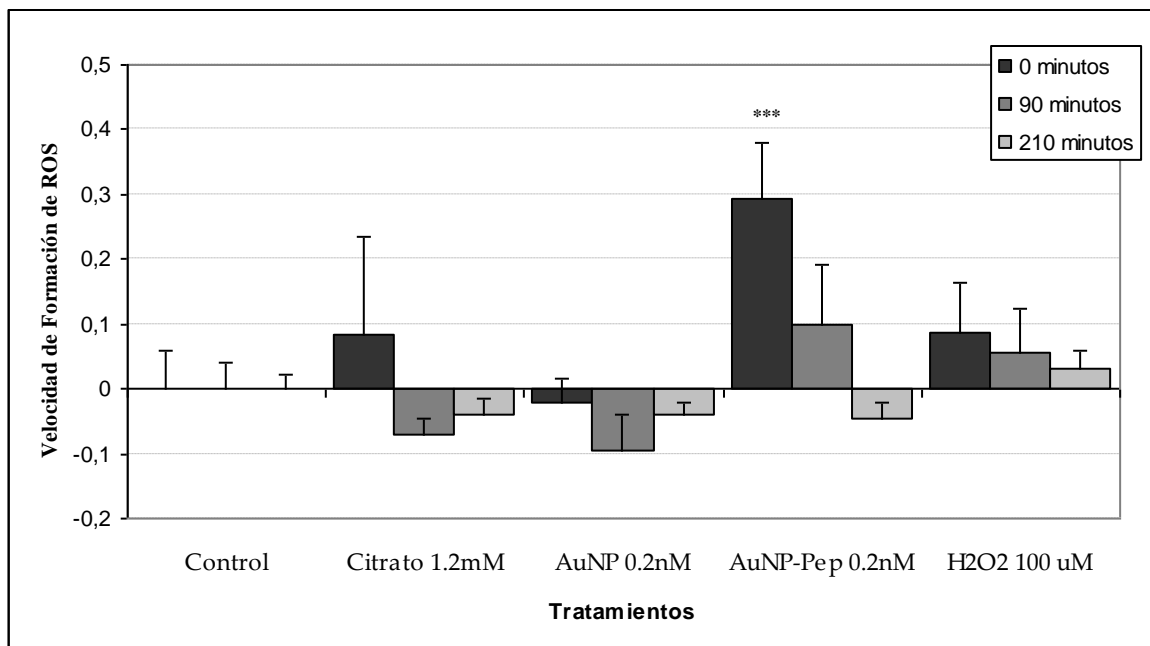


Fig.26 Gráfica de las variaciones de fluorescencia con respecto al tiempo v/s los tratamientos, durante 75 minutos de lectura. Para todas las muestras, n = 9, \*\*\* p < 0,001, \*\* p < 0,01, \* p < 0,05 ± SD.

Estos resultados, manifiestan un comportamiento, según el tratamiento al cual fueron sometidas:

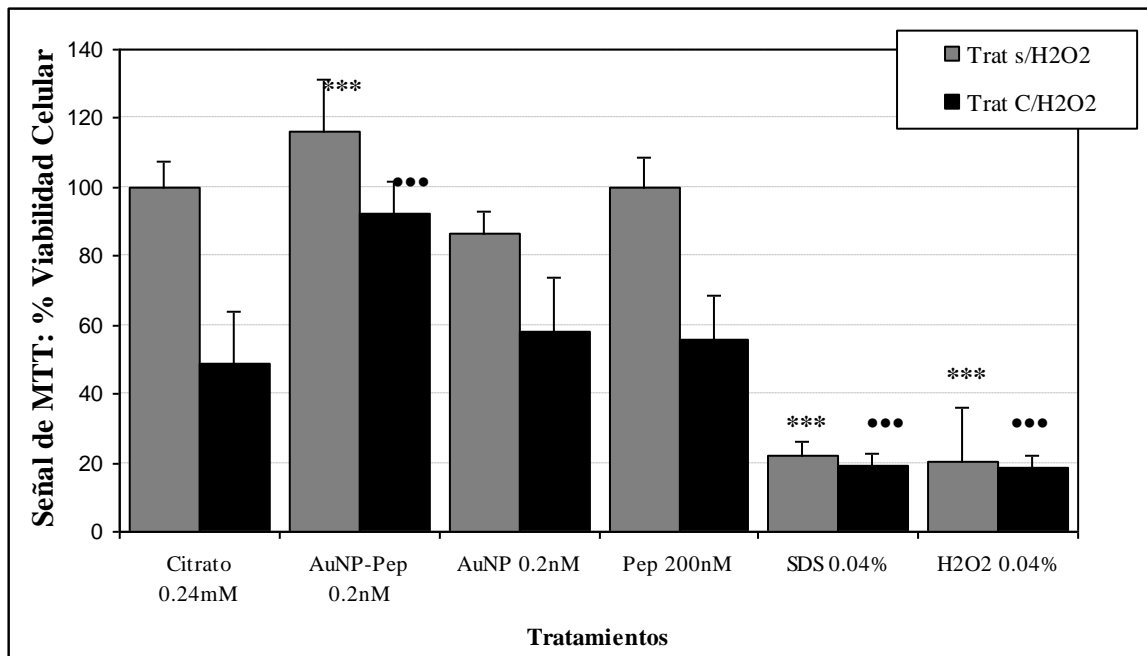
*Citrato 0.24mM*: en la primera lectura, se ve un aumento en la producción de fluorescencia. Pero este efecto se ve disminuido luego de los 90 minutos de preincubación, pero la señal disminuye luego de este tiempo. Explicándose porque, dado que el Citrato de Sodio es un antioxidante, en proceso oxidativo ya no se produce, dando una fluorescencia menor al control.

*AuNP 0.2 nM*: a los dos primeros tiempos, muestra una señal por bajo el blanco, lo cual muestra una acción antioxidante. Pero luego en un tiempo entre los 90-210 minutos, la señal de fluorescencia es mayor que el blanco, lo que indica un posible efecto como agente oxidante. Lo cual explicaría el efecto tóxico reportado en los ensayos de viabilidad.

*AuNP-Pep 0.2nM*: A tiempos tempranos, este tratamiento muestra un efecto oxidante fuerte, de hecho, mucho mayor al mostrado por el control positivo de daño oxidativo. Pero va disminuyendo a lo largo del tiempo, llegando a tener una diferencia, estadística, no significativa con respecto al blanco. Lo cual puede estar mostrando un “pulso de estrés oxidativo”, llevando a un posible “preacondicionamiento” que llevaría a las células a ser más viables, a tiempos posteriores (como lo informado en el punto 3.2.)

*Efecto de los tratamientos, sobre el comportamiento celular, frente al estrés oxidativo producido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:*

Una vez concluidas las 48 horas de tratamiento con las nanopartículas, se sometió a las células a un daño por estrés oxidativo, mediante el uso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 300µM. Los resultados se encuentran descritos en la figura 27.



**Fig. 27** Gráfica de los porcentajes de viabilidad de neuronas de hipocampo E18 por ensayo de MTT, expuestas a los distintos tratamientos durante **48 horas**, donde la Serie: **Trat s/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**: Muestra los valores de las muestras a las que no se les agregó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 300µM (no estresadas). La serie **Trat C/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**: Muestra los valores de los pocillos a los que **si** se les adicionó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 300µM (estresadas) por 3 horas. Para todas las muestras n = 12, \*\*\* o ●●● p < 0,001, \*\* o ●● p < 0,01, \* o ● p < 0,05 ± SD

En este resultado, se puede observar, que las células que fueron previamente sometidas al tratamiento con AuNP-Pep 0.2nM, sufren una disminución en su señal de viabilidad por la acción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 300µM por 3 horas, pero menor que la disminución que sufren las células que fueron sometidas a los demás tratamientos.

Estos datos pueden traducirse en que las células, que estuvieron en contacto con AuNP-Pep 0.2nM, se encontrarían “mejor preparadas” para soportar un daño oxidativo, lo que quiere decir que este tratamiento no solo estaría aumentando la viabilidad celular, a las 48 horas sino que su resistencia a algún posible estrés ambiental fuerte, como lo es el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 300µM por 3 horas.

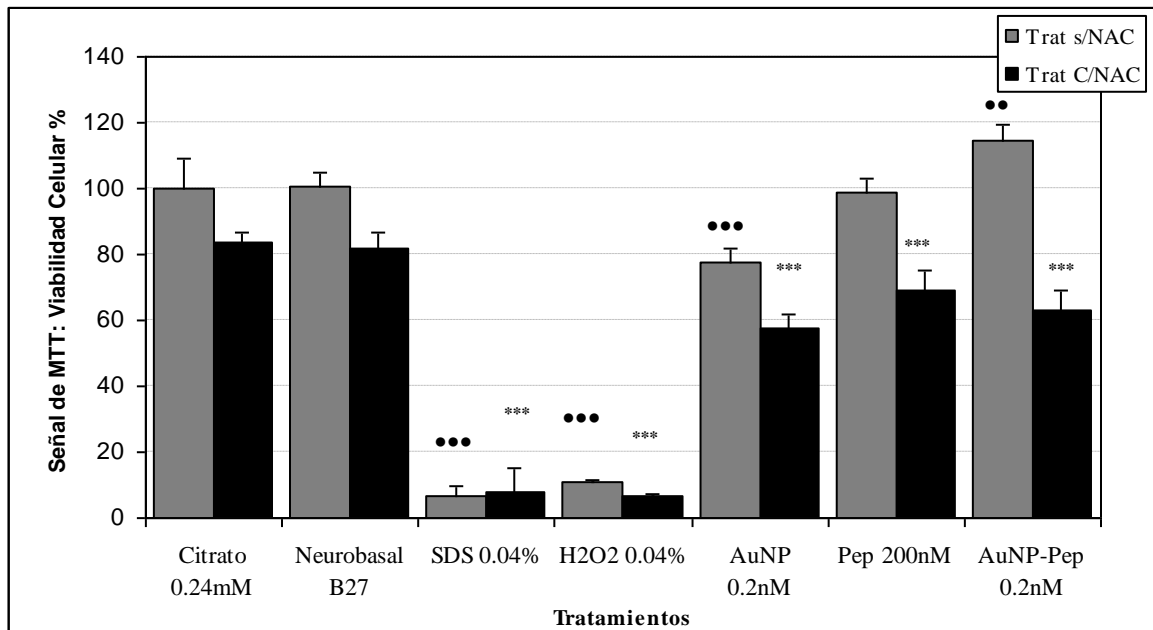
*Bloqueo del estrés oxidativo, mediante la acción de N-Acetil-Cisteina (NAC) y determinación del efecto del bloqueo de ROS sobre la viabilidad celular:* Los resultados reportados en el ensayo con DCF para medir la producción de ROS, sugieren un posible “pulso de estrés oxidativo”, lo cual podría traducirse en un aumento en la viabilidad a tiempos posteriores (48 horas de tratamiento).

Con el fin de refutar o confirmar esta idea, es que se realizó un ensayo con NAC 50 $\mu$ M (21). El cual bloquearía este “pulso de estrés” llevando a que no se muestre un efecto sobre la viabilidad celular.

En este ensayo, se estudiaron los efectos de Citrato 0.24mM, AuNP 0.2nM, Pep 200nM y AuNP-Pep 0.2nM, mas un control de viabilidad solo con medio de cultivo Neurobasal® B27 y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y SDS a 0.04% como controles de muerte.

Estos resultados se encuentran resumidos en la figura 28, y se puede observar que al haber agregado NAC 50 $\mu$ M, se pudo bloquear el aumento en la viabilidad que se observa en las células tratadas con AuNP-Pep 0.2nM, demostrado en el punto 3.2 de esta memoria de titulo. Lo cual, puede demostrar, que es necesario un pulso de estrés oxidativo para producir un posterior aumento en la viabilidad celular.

Esto también se puede definir, como un posible “preacondicionamiento celular” que llevaría a las células a ser más fuertes, frente a posteriores daños mediante estrés oxidativo.

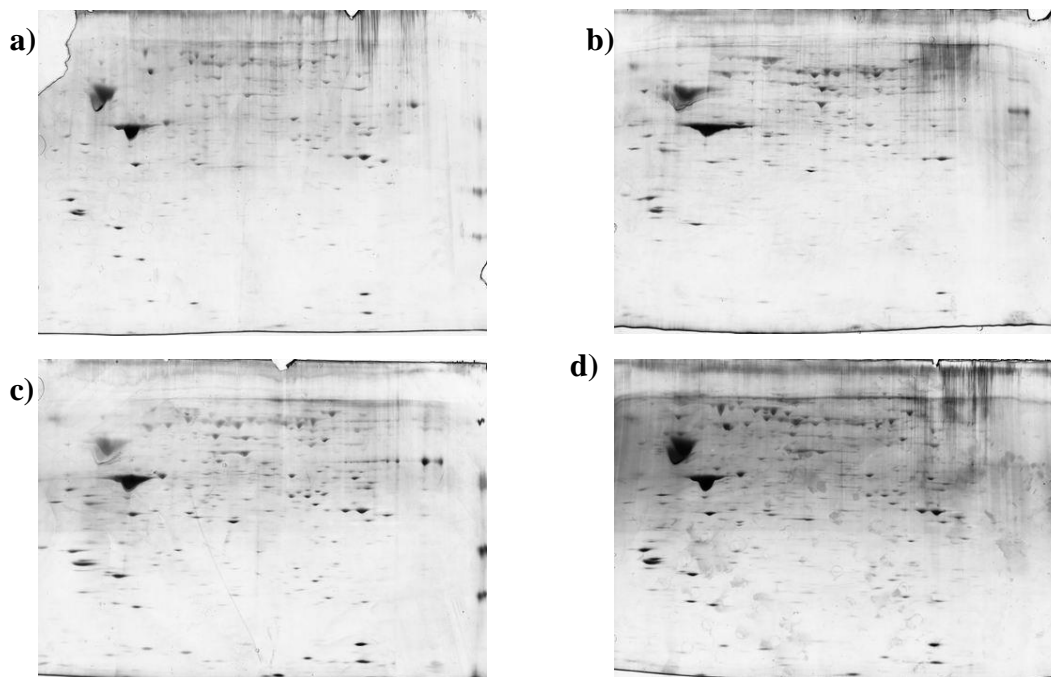


**Fig. 28** Gráfica de los porcentajes de viabilidad de neuronas de hipocampo E18 por ensayo de MTT, expuestas a las distintos tratamientos durante **48 horas**, donde la Serie: **Trat s/NAC**: muestra los valores de las muestras a las que no se les agregó NAC 50 $\mu$ M (no preincubadas). La serie **Trat C/NAC**: Muestra los valores de los pocillos a los que **si** se les adicionó NAC 50 $\mu$ M (preincubadas). Para todas las muestras n = 12, \*\*\* o ●●● p < 0,001, \*\* o ●● p < 0,01, \* o ● p < 0,05  $\pm$  SD

Los estudios estadísticos, se llevaron a cabo, comparando los valores de viabilidad con su respectivo control Citrato 0.24mM. A pesar que las diferencias entre los valores de AuNP 0.2nM+NAC, AuNP-Pep 0.2nM+NAC, sean significativamente diferentes con en control, entre ellos no poseen diferencias significativas. Lo cual podría relacionarse con el hecho de que la producción de ROS producida por AuNP-Pep 0.2nM en presencia de NAC se encuentra completamente bloqueada no pudiendo ocurrir el “preacondicionamiento” que conlleva una mayor supervivencia de las neuronas.

### 3.5. Expresión de proteínas en cultivos neuronas hipocampales E18:

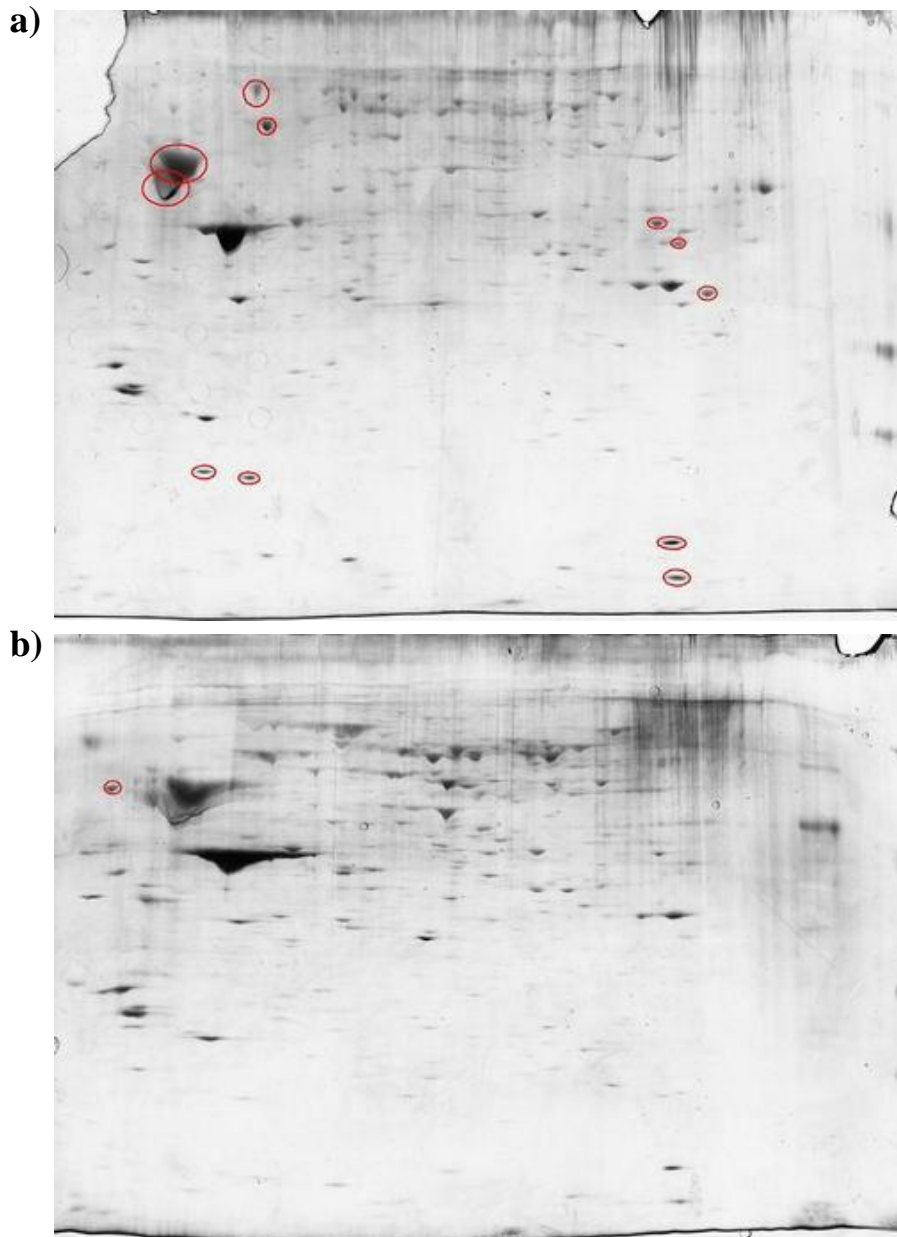
Los cultivos fueron sometidos a 48 horas de tratamiento con citrato 0.24mM, AuNP y AuNP-Pep a 0.2nM y Pep a 200nM (Fig.29)



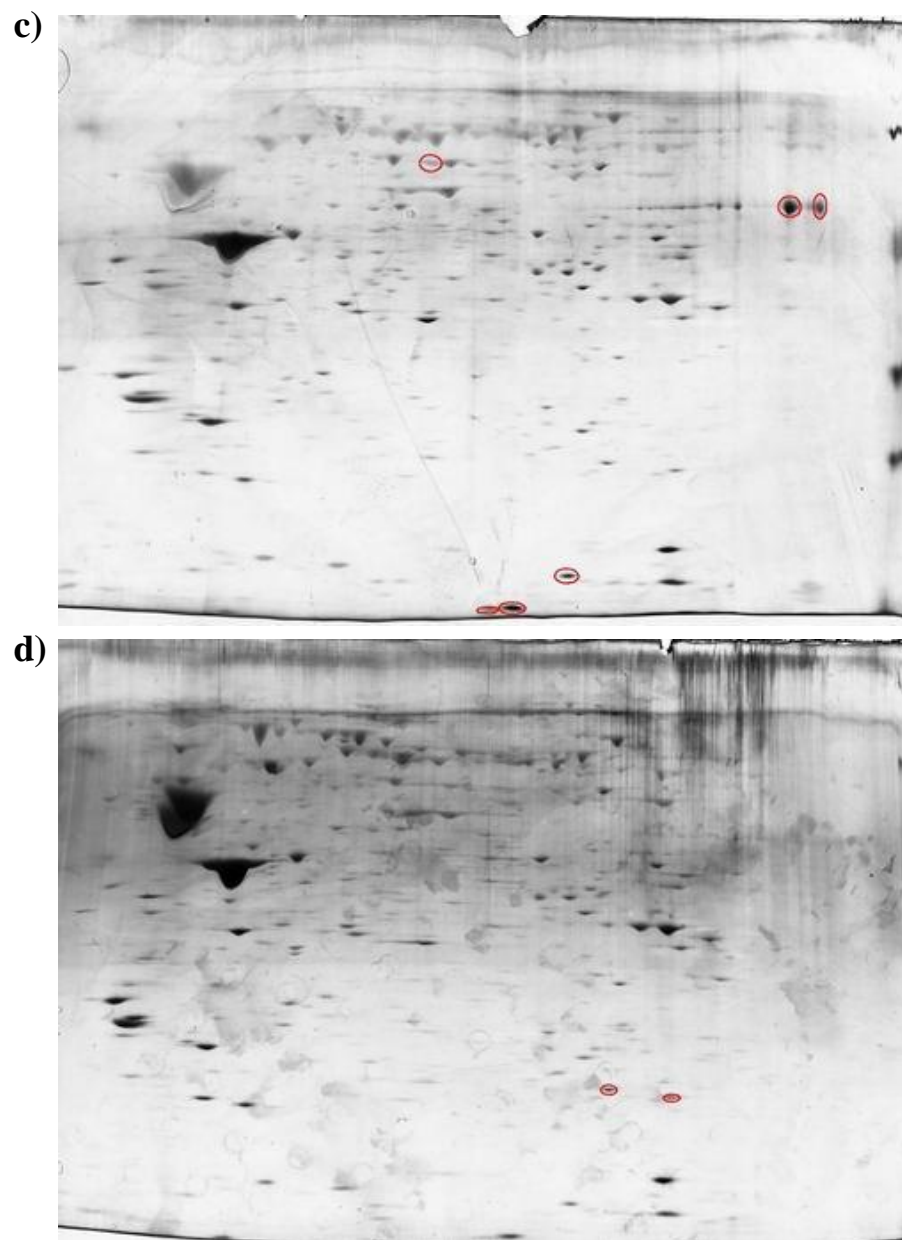
**Fig. 29** Imágenes de los gels 2-D de separación electroforética de las proteínas de los extractos totales de cultivos de neuronas de hipocampo E18. **a)** Citrato 0.24mM, **b)** AuNP 0.2nM, **c)** AuNP-Pep 0.2nM y **d)** Pep 200nM.



Luego del análisis de las imágenes, se encontraron diferencias en las intensidades de las señales de las proteínas (*spots*), así como diferencias en su presencia dentro de las separaciones. Las cuales se muestran en la figura 30. Estas diferencias, fueron luego analizadas con un *software* de análisis de imágenes de separaciones electroforéticas 2-D, **Image Master 2D v4.01**, el cual entregó una numeración arbitraria sobre la intensidad de las señales en el gel 2-D Control (Fig.31)



**Fig. 30** Imágenes de los gels 2-D de separación electroforética, los *spots* encerrados en rojo, son los que mostraron diferencias entre los diferentes extractos. **a)** Citrato 0.24mM, **b)** AuNP 0.2nM.



**Fig. 30** Imágenes de los geles 2-D de separación electroforética, los *spots* encerrados en rojo, son los que mostraron variaciones entre los diferentes extractos. **c)** AuNP-Pep 0.2nM, **d)** Pep 200nM.

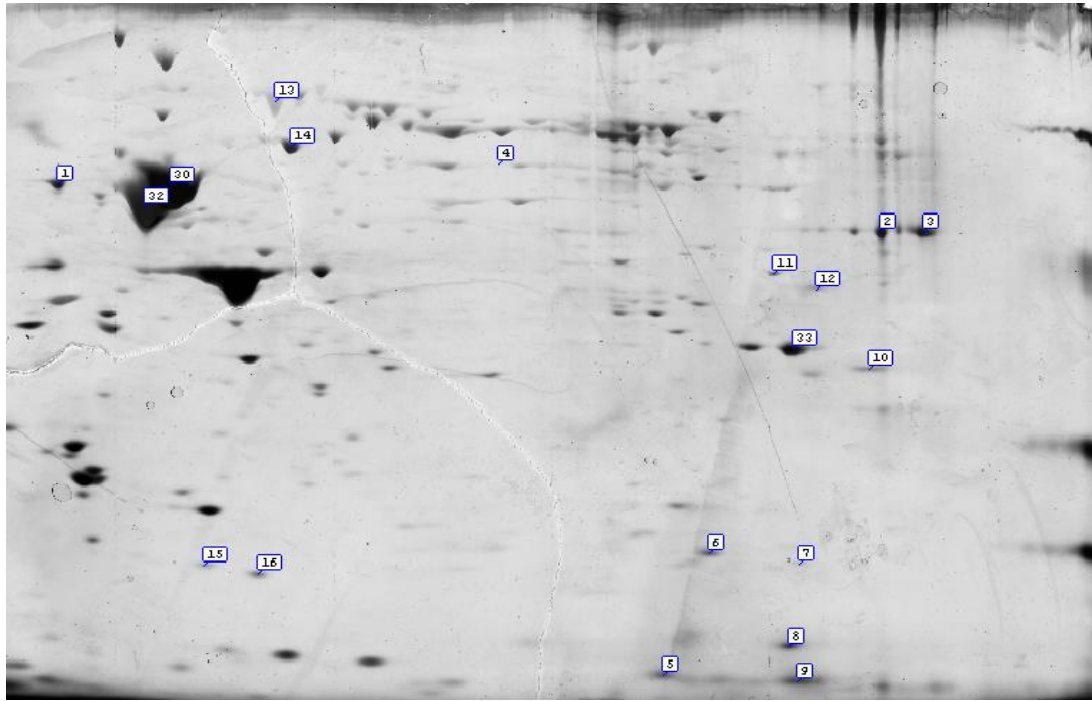


Fig.31 Numeración arbitraria de los *spots*, que mostraron diferencias en los tratamientos, entregada por **Image Master 2D v4.01**.

Luego de identificadas las diferencias por inspección visual, se llevó a cabo la digestión y secuenciación de los *spots*, para luego someter los péptidos trípticos a una identificación en línea, donde fue utilizada la base de datos MASCOT, que entregó un puntaje de fiabilidad de los resultados (*score*), a las proteínas que pudieron ser identificadas. Las cuales se encuentran resumidas en la tabla 1.

N° en Gel	Proteínas Identificadas (MASCOT)	Score
1	Calreticulina	456
4	proteína ligadora de ácidos grasos	327
7	peroxiredoxina-2	223
8	cofilina-1	534
9	peptidilprolil isomerasa A	302
10	malato deshidrogenasa, mitocondrial	874
11	fosfoglicerato kinasa	355
12	Aldolasa	473
13	proteína de shock térmico (Hsp 70)	716
14	proteína de shock térmico, precursor mitocondrial (Hsp 65)	761
16	proteína ligadora de fosfatidiletanoamina (inhibidora de Raf)	364
30	$\alpha$ -tubulina	460
32	$\beta$ -tubulina	723

**Tabla 1.** Proteínas que lograron ser identificadas, mediante MASCOT. El valor de Score, corresponde al grado de fiabilidad de los resultados, mientras mas alto sea mayor es la probabilidad que sea la proteína nombrada.

Una vez que, las proteínas, fueron identificadas, se procedió a la comparación de la intensidad de la señal, mediante el mismo software, comparándola con el gel control, el cual fue normalizado para que los datos se refirieran a él.

A las intensidades de las *spots* en el gel control, se les asignó un valor unitario y luego al compararse, se obtuvieron valores numéricos, que indicarían una regulación positiva o negativa en la expresión de las proteínas, resultados resumidos en la tabla 2.

N° en Gel	Proteínas Identificadas (MASCOT)	Score	Control	AuNP	Pep	AuNP-Pep
1	calreticulina	456	1	1.66	1.27	0.62
4	proteína ligadora de ácidos grasos	327	1	4.58	5.53	5.39
7	peroxiredoxina-2	223	1	7.95	8.13	7.67
8	cofilina-1	534	1	2.14	1.47	2.23
9	peptidilprolil isomerasa A	302	1	0.88	0.9	1.27
10	malato deshidrogenasa, mitocondrial	874	1	1.58	1.16	1.39
11	fosfoglicerato kinasa	355	1	1.55	1.44	1.64
12	aldolasa	473	1	1.29	1.43	1.71
13	proteína de shock térmico (Hsp 70)	716	1	2.18	3.16	1.42
14	proteína de shock térmico (Hsp 65)	761	1	1.15	1.25	0.69
16	proteína ligadora de fosfatidiletanoamina	364	1	1.94	1.86	1.79
30	$\alpha$ -tubulina	460	1	1.38	0.73	0.47
32	$\beta$ -tubulina	723	1	1.10	0.81	0.47

**Tabla 2.** Resultados numéricos luego de ser comparadas las imágenes por **Image Master 2D v4.01**. Se considera como regulación positiva cuando el valor es  $>2.0$  y regulación negativa cuando el valor es  $<0.5$

Finalmente, las proteínas identificadas, se agruparon según su función dentro de la célula. Entregando información de que efecto pueden estar causando los tratamientos en el funcionamiento celular. Las proteínas identificadas, fueron clasificadas según su función, tanto por su relación con el **metabolismo** (fosfoglicerato kinasa, aldolasa y malato deshidrogenasa), **estrés** (calreticulina, peroxiredoxina-2, proteína de shock térmico (Hsp 70), proteína de shock térmico (Hsp 65), proteína ligadora de ácidos grasos y peptidilprolil isomerasa A) y proteínas de **citoesqueleto** ( $\alpha$ -tubulina,  $\beta$ -tubulina y cofilina-1). Esta información se resume en la tabla 3.

<b>Función</b>	<b>Proteínas Identificadas (MASCOT)</b>	<b>Score</b>	<b>Control</b>	<b>AuNP</b>	<b>Pep</b>	<b>AuNP-Pep</b>
<b>Citoesqueleto</b>	$\alpha$ -tubulina	460	1	1.38	0.73	0.47
	$\beta$ -tubulina	723	1	1.10	0.81	0.47
	cofilina-1	534	1	2.14	1.47	2.23
	proteína ligadora de fosfatidiletanoamina	364	1	1.94	1.86	1.79
<b>Estrés</b>	calreticulina	456	1	1.66	1.27	0.62
	proteína ligadora de ácidos grasos	327	1	4.58	5.53	5.39
	peroxiredoxina-2	223	1	7.95	8.13	7.67
	peptidilprolil isomerasa A	302	1	0.88	0.9	1.27
	proteína de shock térmico (Hsp 70)	716	1	2.18	3.16	1.42
	proteína de shock térmico (Hsp 65)	761	1	1.15	1.25	0.69
<b>Metabolismo</b>	fosfoglicerato kinasa	355	1	1.55	1.44	1.64
	aldolasa	473	1	1.29	1.43	1.71
	malato deshidrogenasa, mitocondrial	874	1	1.58	1.16	1.39

**Tabla 3.** Resumen de las proteínas identificadas y clasificadas según su función dentro de la célula. Los valores en rojo son los que muestran diferencias significativas con el gel 2-D control.

Aunque la mayor parte de los valores numéricos, entregados por el software **Image Master 2D v4.01**, muestran una diferencia que se encuentra dentro del rango aceptable, para decir que no existen variaciones importantes en la expresión de las proteínas. Existen algunas, cuya diferencia con el control es clara y si se relacionan con el tratamiento al cual fueron sometidas, se encuentran tanto similitudes como diferencias entre los tratamientos.

*Cofilina-1*: que es una proteína miembro de la familia ADF/cofilina, de hecho comparte un 70% de homología con la ADF (factor de depolimerización de la actina), teniendo una pequeña parte que une ADP (Esta proteína une monómeros y filamentos de actina, G actina y F actina, respectivamente)(59), la cofilina-1 causa la depolimerización de los filamentos, previniendo que se vuelva a reensamblar(59) y si se encuentra aumentada en las células que fueron tratadas con ambas AuNP 0.2nM (AuNP y AuNP-Pep), significaría que este proceso se encuentra favorecido. Traduciéndose en que, estos tratamientos, median un remodelamiento celular, llevando a cambios en la estructura celular.

*$\alpha$ -tubulina y  $\beta$ -tubulina*: son subunidades globulares, que al unirse (fuertemente) dan lugar a un heterodímero llamado **tubulina** que da lugar a los microtubulos del citoesqueleto (60). Se ven levemente disminuidas en el tratamiento con AuNP-Pep 0.2nM, lo cual podría estar evidenciando un posible remodelamiento de las células. Lo cual se podría traducir, junto con el aumento en la cofilina-1, que este tratamiento tiene un mayor efecto sobre la mecánica celular, llevando a que cambie en su estructura interna, tal vez haciéndose más resistente.

*Proteína ligadora de ácidos grasos*: o FABP (*Fatty acid binding protein*) es miembro de una familia conservada de proteínas, cuya función es mantener el delicado balance de los lípidos en la célula (60) y cuando se encuentran con estrés metabólico o inflamatorio, vuelven el ambiente intracelular inhóspito con un desenlace negativo para la célula (61). Este aumento, es similar en todos los tratamientos, lo cual evidencia una influencia posiblemente negativa en la homeostasis celular.

*Peroxiredoxina-2*: proteína detoxificadora de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, necesaria para la activación del factor de transcripción Pap1 en respuesta al oxidante (62), encargado de activar la transcripción de genes antioxidantes en situaciones de estrés oxidativo moderado y no tiene lugar a dosis más altas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (62). Se ve aumentada en todos los casos, mostrando una respuesta antioxidante a los tratamientos y evidenciando que tienen relación con la formación de ROS en las células. Lo que se puede traducir, en que los tratamientos, producen una respuesta antioxidante de la célula. Pero

esta respuesta es moderada, tal vez lo suficiente para que en ciertos casos ocurra el preacondicionamiento reportado en el punto 3.4 de esta memoria de título.

*Proteína de shock térmico (Hsp70)*: también llamada **proteína de estrés**, presente en todos los tipos celulares (63). Son inducidas por estrés ambientales, como calor, frío, y privación de oxígeno (63). En condiciones normales sirven como chaperonas en respuestas inmunes, estando relacionadas con la activación de la respuesta inmune mediada por los TLR (63). Esta proteína, está ligada a condiciones de estrés, y se ve aumentada en los tratamientos de AuNP 0.2nM y Pep 200nM, el primer resultado, puede afirmar que las AuNP producen estrés a las células, lo que explicaría su mediana toxicidad demostrada en los ensayos de viabilidad. No así en las células tratadas con AuNP-Pep, donde el aumento no es tan marcado. En el caso de las células tratadas con Pep 200nM, se ve este aumento, debido, posiblemente a una respuesta inmunogénica mediada por el Pep en el medio de cultivo. Lo cual podría traducirse en que, dado que el tratamiento con AuNP-Pep, no estimula esta respuesta, significa que, las células, se pueden encontrar en menos estrés que en los otros tratamientos, relacionándose con un aumento en la viabilidad de los cultivos.

Todas estas variaciones se encuentran resumidas en la tabla 4.

Tratamiento	Proteínas Identificadas (MASCOT)	Score	↑ o ↓ según el gel control
AuNP	cofilina-1	534	2.14 (↑ con respecto al control)
	proteína ligadora de ácidos grasos	327	4.58 (↑ con respecto al control)
	peroxiredoxina-2	223	7.95 (↑ con respecto al control)
	proteína de shock térmico (Hsp 70)	716	2.18 (↑ con respecto al control)
Pep	proteína ligadora de ácidos grasos	327	5.53 (↑ con respecto al control)
	peroxiredoxina-2	223	8.13 (↑ con respecto al control)
	proteína de shock térmico (Hsp 70)	716	3.16 (↑ con respecto al control)
AuNP-Pep	cofilina-1	534	2.23 (↑ con respecto al control)
	α-tubulina	460	0.47 (↓ con respecto al control)
	β-tubulina	723	0.47 (↓ con respecto al control)
	proteína ligadora de ácidos grasos	327	5.39 (↑ con respecto al control)
	peroxiredoxina-2	223	7.67 (↑ con respecto al control)

**Tabla 4.** Resumen de las proteínas identificadas y ordenadas según su aumento o disminución en cada uno de los tratamientos estudiados.

#### 4. CONCLUSION Y PROYECCIONES

En primer lugar, mediante los ensayos de MTT y de Azul de Tripan, se demostró que los tratamientos tienen un efecto sobre la viabilidad celular. Este efecto es dosis dependiente, siendo las AuNP más tóxicas mientras se aumenta su concentración.

En el caso de las AuNP-Pep, se pudo demostrar que los cultivos celulares, al estar en contacto con una concentración de 0.2nM se aumenta la sobrevivencia de las células respecto de los controles, evidenciándose en claro un efecto citoprotector de este tratamiento. Por otra parte, es importante destacar que a más altas dosis de AuNP-Pep se observa un efecto de citotoxicidad reflejado en una disminución de la viabilidad neuronal.

Cabe destacar, que este efecto citoprotector, es exclusivo de esta secuencia (CLPFFD-NH<sub>2</sub>), ya que, como se reportó en la figura 19, no se observa cuando AuNP, se encuentra conjugada a isómeros de esta secuencia (CDLPFF- NH<sub>2</sub> y CLPDFF-NH<sub>2</sub>).

También, se reportó que el efecto citoprotector perdura en el tiempo, ya que a los 14 días desde que las neuronas fueron sembradas (pasando por el tratamiento con AuNP-Pep), se vio un marcado aumento en la viabilidad células, mediante en ensayo de Azul de Tripan.

Dado que es la viabilidad la que es promovida por el tratamiento con AuNP-Pep, se debió estudiar que tipo de muerte es el mayoritario en los cultivos de neuronas de hipocampo E18 y se pudo demostrar que en el caso de la *apoptosis*, esta ocurre pero en una proporción muy baja, por lo que se podría descartar que la viabilidad esté siendo promovida mediante el bloqueo de la mecánica apoptótica. En el caso de la *autofagia*, se demostró que es un proceso presente en todos los tratamientos, y la diferencia entre ellos es estadísticamente despreciable, no dando un resultado concluyente, de que este sea, el método mayoritario de muerte de las células que son



sometidas a estos tratamientos. Finalmente, en el caso de la *necrosis*, se pudo demostrar que si hay una diferencia estadísticamente aceptable, de hecho en todos los tratamientos se presenta este tipo de muerte, pero es en el tratamiento con AuNP que conduce a un aumento en la necrosis por sobre el control de vida, no así en el caso de AuNP-Pep, cuya diferencia fue no significativa con respecto al control.

En lo que respecta a la formación de ROS, se observó un comportamiento variable en función del tiempo de incubación, en el caso de las células tratadas con AuNP-Pep existiría un “pulso” de estrés oxidativo, donde se produce un fuerte aumento en la producción de ROS, a tiempos tempranos, pero que va descendiendo mientras pasa el tiempo. Una vez producido el estrés se produce un “preacondicionamiento” que permite a la célula “defenderse” frente a posibles injurias futuras, como el conocido en caso de *pretratamiento hipoxico*, que lleva a un posterior aumento en la viabilidad celular (64), o incluso una especie de *preacondicionamiento isquémico*, el cual produce una neuroprotección (65). O como en el caso de un estrés oxidativo inducido como lo reportado en la figura 27. Este mecanismo de defensa de la célula conduce a un aumento en la viabilidad de las neuronas, lo cual se encuentra sustentado por el ensayo con *N*-acetil-cisteína (NAC), donde se bloquea el efecto citoprotector de este tratamiento.

En los ensayos de extracción de proteínas, se observó que los tratamientos tienen un efecto sobre la mecánica celular, manifestando variaciones en la expresión de proteínas relacionadas con el estrés y con remodelamiento celular. Lo cual muestra que las células reaccionan positivamente a los estímulos, llevando en ciertos casos (como en el tratamiento con AuNP-Pep) a un aumento en la viabilidad celular. De hecho, cabe destacar que el aumento de una proteína ligada estrechamente con estrés, como es la Hsp70, fue mucho menor en las células tratadas con AuNP-Pep en comparación con AuNP, mostrando una biocompatibilización de las AuNP al estar conjugadas al Pep, el cual también pierde su efecto sobre la producción de esta proteína al estar conjugado a AuNP. Pudiendo demostrar, que es el conjugado AuNP-Pep, el más biocompatible de los compuestos ensayados.

Dado que, es este conjugado AuNP-Pep, es el de importancia terapéutica, estos resultados son muy promisorios para que pueda realmente ser utilizado, como una herramienta, en contra de patologías relacionadas con agregados protéicos, ya que han demostrado ser no tóxica, biocompatible y por sobretodo, citoprotectora.

Finalmente, esta Memoria de Título contribuyó a la elaboración de un artículo (ya aceptado para ser publicado) y además dio origen a la presentación de trabajos en diferentes jornadas y congresos:

- **Ni/Ni Oxides Nanoparticles with Potential Biomedical Applications Obtained by Displacement of a Nickel-Organometallic Complex.** Saddys Rodríguez-Llamazares, Juan Merchán, Ivonne Olmedo, Héctor Pablo Marambio, Juan Pablo Muñoz, Paul Jara, Juan Carlos Sturm, Boris Chornik, Octavio Peña, Nicolás Yutronic, and Marcelo Javier Kogan. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* [en imprenta]
- Medina G., Muñoz J.P., Medina E., Guerrero A., Olmedo I., Marambio HP., Espinoza G., Pannes O., Kogan M. “Evaluación de la toxicidad de conjugados péptido-nanopartículas metálicas con potencial uso para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer”. VII Jornadas de Investigación en Ciencias y Tecnología, Santiago, abril 2006.
- Marambio HP., Olmedo I, Medina G, Muñoz JP, Guerrero A, Giralt E, Albericio F, Díez-Pérez I, Araya E, Álvarez-Lueje A. y Kogan MJ. “Citotoxicity of Nanobiomaterials With Potential Use For The Treatment Of Alzheimer’s Disease”. XXVIII Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile. Olmué, 20-22 de agosto de 2006.
- Kogan MJ, Marambio HP., Olmedo I, Medina G, Muñoz JP, Guerrero A, Giralt E, Albericio F, Díez-Perez I, Araya E, Álvarez-Lueje A. “Nanotoxicología: Riesgos

Asociados al Uso de Nanobiomateriales en Biomedicina”. XXVIII Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile. Olmué, 20-22 de agosto de 2006.

- Guerrero-Hernández A, Olmedo I, Marambio HP, Meneses A, Araya E, Lasagna C, Arias I, Fernández S, Álvarez-Lueje A, Arias JL, Kogan MJ. “Development of Nanobiomaterials for the Treatment and Diagnosis of Alzheimer’s Disease”.IV Jornada de Trabajo del CIMAT (Centro para la Investigación Interdisciplinaria Avanzada en Ciencias de los Materiales) Reñaca, 9-10 de octubre de 2006, Conference Town de Reñaca.
- Kogan MJ, Olmedo I, Marambio HP, Guerrero A, Araya E. “Development of New Nanobiomaterials with Biomedical Applications”. IV Latin American Scanning Probe Microscopy Symposium. Mar del Plata 5 de mayo de 2007.
- HP. Marambio, JP. Muñoz, E. Araya, E.de Oliveira, E. Giralt, S. Lavandero y MJ. Kogan. “Evaluación de la citotoxicidad de nanopartículas conjugadas al péptido CLPFFD”. 50ª Reunión anual de la Sociedad de Biología de Chile. Pucon 21-24 Noviembre 2007.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

- (1) BERRY C., Curtis A. “Functionalization of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine”. *Journal of Physics D: applied Physics*, 36: 198-206, 2003.
- (2) TARTAJ P., Morales M., Veintemillas S., González T., Serna C. “The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine”. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 36: R182-R197, 2003.
- (3) HAMAD-SCHIFFERLI K. Schwartz JJ., Santos AT., Zhang S., Jacobson JM., “Remote electronic control of DNA hybridization through inductive coupling to an attached metal nanocrystal antenna”. *Nature*, 415: 152-155, 2002.
- (4) SANDHU KK., McIntosh CM., Simard JM., Smith SW., Rotello VM., “Gold nanoparticle - mediated transfection of mammalian cells”. *Bioconjugate Chemistry*, 13 (1): 3-6, 2002.
- (5) STEFANI M., Dobson C.M. “Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution”. *J. Mol. Med.*, 81 (11): 678-699, 2003.
- (6) PERUTZ M.F. “Glutamine repeats and inherited neurodegenerative diseases: molecular aspects”. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 6 (6): 848-858, 1996.
- (7) PRUSINER S.B. “Prions.” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95 (23): 13363-13383, 1998.
- (8) SIPE JD., “Amyloidosis”. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 31 (4): 325-354, 1994.
- (9) KAYED R., Bernhagen J, Greenfield N, Sweimeh K, Brunner H, Voelter W, Kapurniotu A., “Conformational transitions of islet amyloid polypeptide (IAPP) in amyloid formation in vitro”. *J. Mol. Biol.*, 287 (4): 781-796, 1999.
- (10) CONWAY K.A., Harper JD, Lansbury PT Jr., “Fibrils formed in vitro from alpha-synuclein and two mutant forms linked to Parkinson's disease are typical amyloid”. *Biochemistry*, 39 (10): 2552-2563, 2000.
- (11) ROHER A.E., Chaney MO, Kuo YM, Webster SD, Stine WB, Haverkamp LJ, Woods AS, Cotter RJ, Tuohy JM, Krafft GA, Bonnell BS, Emmerling MR., “Morphology and toxicity of

Ab-(1-42) dimer derived from neuritic and vascular amyloid deposits of Alzheimer's disease". *J. Biol. Chem.*, 271 (34): 20631-20635, 1996.

(12) KOGAN MJ., Bastus NG., Amigo R., Grillo-Bosch D., Araya E., Turiel A., Labarta A., Giralt E., Puentes VF., "Nanoparticle-Mediated Local and Remote Manipulation of Protein Aggregation". *Nano Letters*, 6 (1): 110-115, 2006.

(13) SOTO C., Sigurdsson EM, Morelli L, Kumar RA, Castaño EM, Frangione B., "Beta-sheet breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis: Implications for Alzheimer's therapy". *Nature Medicine*, 4 (7): 822-826, 1998.

(14) CONNOR E., Mwachuka J, Gole A, Murphy CJ, Wyatt MD., "Gold Nanoparticles are taken up by Human Cells but do not cause acute cytotoxicity". *Small*, 1 (3): 325-327, 2005.

(15) GOODMAN CM., McCusker CD., Yilmaz T., Rotello VM. "Toxicity of Gold Nanoparticles Functionalized with Cationic and Anionic Side Chains". *Bioconjugate Chemistry*, 15 (4): 897-900, 2004.

(16) MEDINA CONSUEGRA, ELÍAS DANIEL. "Obtención de conjugados péptidos nanopartículas metálicas para el desarrollo de una estrategia terapéutica para la enfermedad de Alzheimer". *Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico*. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, pp. 1-23, 2006.

(17) LÉVY R., Thanh N. T., Doty R. C., Hussain I., Nichols R. J., Schiffrin D. J., Brust M., Fernig D., "Rational and Combinatorial Design of Peptide Capping Ligands for Gold Nanoparticles". *JACS*, 126: 10076-10084, 2004.

(18) TURKEVICH J., Stevensen PC., Hillier J., "Nucleation and growth process in synthesis of colloidal gold". *Discuss Faraday Soc.*, 11: 55-75, 1951.

(19) DANIEL MC., Astruc D., "Gold Nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, quantum size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology". *Chemical Reviews*, 104 (1): 293-346, 2004.

- (20) GANONG W. "Funciones Superiores del Sistema Nervioso": *Reflejos Condicionados, Aprendizaje y Fenómenos Relacionados. En su: Fisiología Médica*. 18ª edición. México, Editorial El Manual Moderno: 291-303, 2002.
- (21) HUGON J., Esclaire F., Lesort M., "Toxic neuronal apoptosis and modifications of Tau and APP gene and Protein expressions". *Drug Metabolism Reviews*, 31 (3): 635- 647, 1999.
- (22) LORENZO A., Yankner B., "β-Amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by Congo red". *PNAS*, 91: 12243-12247, 1994.
- (23) SELKOE D.J. "Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy". *Physiological Reviews*, 81 (2): 741-766, 2001.
- (24) MISIA S., Ciccocioppo F., Lanuti P., Velluto L., Bascelli A., Pierdomenico L., Genovesi D., Di Siena A., Santavenere E., Gambi F., Ausili-C`efaro G., Grimley PM., Marchisio M., Gambi D. "Aβ<sub>1-42</sub> stimulated T cells express P-PKC-δ and P-PKC-ζ in Alzheimer disease". *Neurobiology of Aging*, En Imprinta, 2007.
- (25) MATTSON M.P. "Apoptosis in neurodegenerative disorders". *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 1: 120-129, 2000.
- (26) BECARIA A., Bondy SC., Campbell A., "Aluminum and copper interact in the promotion of oxidative but not inflammatory events: Implications for Alzheimer's disease". *Journal of Alzheimer's Disease*, 5: 31-38, 2003.
- (27) BUTTERFIELD A., Griffin S, Munch G, Pasinetti GM., "Amyloid b-peptide and amyloid pathology are central to the oxidative stress and inflammatory cascades under which Alzheimer's disease brain exists". *Journal of Alzheimer's Disease*, 4: 193-201, 2002.
- (28) BUTTERFIELD D.A., Drake J., Pocernich C., Castegna A., "Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid beta-peptide". *Trends in Molecular Medicine*, 7: 548-554, 2001.
- (29) BIELER S., Soto C. "Beta-Sheet breakers for Alzheimer's disease therapy". *Current Drug Targets*, 5 (6): 553-558, 2004.

- (30) ZHU T., Vasilev K., Kreiter M., Mittler S., Knoll W., “Surface modification of citrate-reduced colloidal gold nanoparticles with 2-mercaptopropionic acid”. *Langmuir*, 19(22): 9518-9525, 2003.
- (31) OLMEDO ALEGRIA, IVONNE ODETTE. “Obtención de conjugados de péptidos nanopartículas metálicas con potenciales aplicaciones biomédicas” *Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico*. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, pp. 1-71, 2007.
- (32) PERNODET N., Fang X, Sun Y, Bakhtina A, Ramakrishnan A, Sokolov J, Ulman A, Rafailovich M., “Adverse Effects of Citrate/Gold Nanoparticles on Human Dermal Fibroblasts”. *Small*, 2 (6): 766-773. 2006.
- (33) STROBER W. “Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability”, *National Institute of Allergy and Infectious Disease*, Appendix 3B, 1997.
- (34) KERR JF., Wyllie AH., Currie AR., “Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics”. *Br.J.Cancer* 26, 239–257. 1972.
- (35) WYLLIE AH., Kerr JF., Currie, AR., “Cell death: the significance of apoptosis”. *International, Version. Cytol.* 68, 251–305. 1981.
- (36) DUNN WA. Jr “Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole”. *J.Cell Biol.* 110, 1923–1933. 1990.
- (37) MATHEWS C. & Van Holde KE. “Metabolismo de los hidratos de carbono”, *Bioquímica*, 2ª edición, España, McGraw-Hill: 494-510, 1998.
- (38) ARENDS MJ., Morris RG., Wyllie AH., “Apoptosis; The role of the endonuclease”. *American Journal of Pathology*; 136: 593-608. 1990.
- (39) BORTHER CD., Oldenburg NB, Cidlowski JA., “The role of DNA fragmentation in apoptosis” *Trends Cell Biol.*, 5: 21-26, 1995.
- (40) KÔCHL R., Hu XW., Chan EY., Tooze SA., “Microtubules Facilitate Autophagosome formation and fusion of Autophagosomes with Endosomes” *Traffic*, 7: 129–145, 2006.

- (41) OMATA Y., Lewis JB, Lockwood PE, Tseng WY, Messer RL, Bouillaguet S, Wataha JC., “Gold-induced reactive oxygen species (ROS) do not mediate suppression of monocytic mitochondrial or secretory function” *Toxicology in Vitro*, 20:625–633, 2006.
- (42) MOLECULAR PROBES, Reactive Oxygen Species (ROS) Detection Reagents, *Contents and storage information*.
- (43) JAYALAKSHMI K., Sairam M., Singh SB., Sharma SK., Ilavazhagan G., Banerjee PK. “Neuroprotective effect of N-acetyl cysteine on hypoxia-induced oxidative stress in primary hippocampal culture” *Brain Research* 1046:97 – 104, 2005.
- (44) MATHEWS C. & Van Holde KE. “Oxidaciones biológicas, transporte electrónico y fosforilación oxidativa”, *Bioquímica*, 2ª edición, España, McGraw-Hill: 574-610, 1998.
- (45) GEVAERT K. Vandekerckhove J., “Protein identification methods in proteomics”, *Electrophoresis*, 21, 1145-1154, 2000.
- (46) KARAS M., Hillenkamp F., “Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 D”. *Anal. Chem.* 60: 2299-2301, 1988.
- (47) CLEGG G.A., Dole M., “Molecular beams of macroions. III. Zein and poly(vinylpyrrolidone)”. *Biopolymers*, 10: 821-826. 1971.
- (48) ANDREAU D., Rivas L., “Péptidos en Biología y Biomedicina”, Consejo superior de Investigaciones Científicas, España: 5-34, 1997.
- (49) FENG R., Konishi Y. “Analysis of antibodies and other large glycoproteins in the mass range of 150000-200000 Da by electrospray ionization mass spectrometry”. *Anal. Chem.* 64: 2090-2095, 1992.
- (50) SMITH RD., Loo JA., Edmonds CG., Barinaga CJ., Udseth HR., “New developments in biochemical mass spectrometry: electrospray ionization” *Anal.Chem.* 62: 882-899, 1990.
- (51) HUANG E., Henion JD., “Packed-capillary liquid chromatography/ion spray tandem mass spectrometry determination of biomolecules”. *Anal. Chem.* 63: 732-739, 1991.



- (52) BANKS J.F., Quinn JP, Whitehouse CM., “LC/ESP-MS characterization of proteins using conventional liquid chromatography and ultrasonically assisted electrospray” *Anal. Chem.* 66: 3688-3695, 1994.
- (53) BRUINS AP., Covey TR., Henion JD., “Ion spray interface for combined liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry” *Anal. Chem.* 59: 2642-2646, 1987.
- (54) LIU X., Atwater M., Wang J., Huo Q. “Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands”. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 58(1): 3-7, 2007.
- (55) ZANCHET D., Micheel CM., Parak WJ., Gerion D., Alivisatos AP., “Electrophoretic isolation of discrete Au nanocrystal/DNA conjugates”. *Nano Letters*, 1 (1): 32-35, 2001.
- (56) BRADFORD M., “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254. 1976.
- (57) MELONI B., Van Dyk D, Cole R, Knuckey NW., “Proteome analysis of cortical neuronal cultures following cycloheximide, heat stress and MK801 preconditioning”, *Proteomics*, 5: 4743-4753, 2005.
- (58) LOUIS KS., Siegel AC., Levy GA., “Comparison of Manual versus Automated Trypan Blue Dye Exclusion Method for Cell Counting” *Industrial BioDevelopment Laboratory: Application Note* (www.ibdl.ca)
- (59) HOTULAINEN P., Paunola E., Vartiainen MK., Lappalainen P. “Actin-depolymerizing Factor and Cofilin-1 Play Overlapping Roles in Promoting Rapid F-Actin polymerization in Mammalian Nonmuscle Cells” *Mol. Biology of the cell*, 16(2), 649-664, 2005.
- (60) MATHEWS C. & Van Holde KE. “Proteínas en movimiento: Sistema contractile y de motilidad”, *Bioquímica*, 2ª edición, España, McGraw-Hill: 283-304, 1998.

- (61) MAKOWKI L, Hotamisligil GS. “Fatty acid binding proteins- the evolutionary crossroads of inflammatory and metabolic responses”. *The Journal of Nutrition*, 134(9): 2464S-2468S, 2004.
- (62) SÁNCHEZ-FONT MF, Sebastià J, Sanfeliu C, Cristòfol R, Marfany G, González-Duarte R. “Peroxiredoxin 2 (PRDX2), an antioxidant enzyme, is under-expressed in Down syndrome fetal brains.” *Cell Mol Life Sci.*, 60(7):1513-23, 2003.
- (63) NISHIKAWA M., Takemoto S, Takakura Y. “Heat shock protein derivatives for delivery of antigens to antigen presenting cells” *Int J Pharm.*, [Epub en Imprenta] 2007.
- (64) LIU J, Narasimhan P, Yu F, Chan PH. “Neuroprotection by hypoxic preconditioning involves oxidative stress-mediated expression of hypoxia-inducible factor and erythropoietin” *Stroke*, 36(6):1264-9. 2005
- (65) FURUICHI T, Liu W, Shi H, Miyake M, Liu KJ “Generation of hydrogen peroxide during brief oxygen-glucose deprivation induces preconditioning neuronal protection in primary cultured neurons” *J. Neuroscience Research* 79(6):816–824, 2005.