



UNIVERSIDAD DE CHILE

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

**OBTENCIÓN DE CONJUGADOS DE PÉPTIDOS NANOPARTÍCULAS METÁLICAS
CON POTENCIALES APLICACIONES BIOMÉDICAS**

PATROCINANTE

Dr. Marcelo J. Kogan

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA

DIRECTORES

Dr. Marcelo J. Kogan

Dr. Alejandro Álvarez-Lueje
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA

Memoria para optar al Título de Químico Farmacéutico

IVONNE ODETTE OLMEDO ALEGRIA

Santiago, Chile

2007

AGRADECIMIENTOS

A mi madre por su apoyo y afecto incondicional, a mis hermanos Natalia, Ignacio, Lisette y a mi abuelo Edgardo por todo su cariño.

A mis directores Marcelo J. Kogan y Alejandro Álvarez-Lueje por su constante ayuda, colaboración y enseñanzas.

A mis amigas por toda su confianza y cariño; por permanecer a mi lado en los buenos y malos momentos.

A mis compañeros de laboratorio por su colaboración y ayuda en el día a día.

A mis amigos del laboratorio Pharmamar y del laboratorio de Diseño, Síntesis y Estructura de Péptidos y Proteínas del Parque Científico de Barcelona por su gran calidez humana, compañerismo y ayuda en todo momento.

A cada una de las personas pertenecientes al laboratorio de Bioelectroquímica y Farmacoquímica por los equipos facilitados y por su excelente disposición.

Al laboratorio de Inmunobioquímica por los equipos facilitados.

A cada una de las personas pertenecientes al laboratorio de Transducción de Señales Moleculares, especialmente al Dr. Juan Pablo Muñoz y a Fidel Albornoz por su ayuda y apoyo invaluable.

A Guisela Muñoz por su carisma y buena voluntad, su trabajo diligente colaboró en gran parte al desarrollo de esta memoria.

Finalmente se agradece a los proyectos Fondecyt 1061142, Fondap 11980002 y A/3995/05 por financiar este trabajo.

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
Agradecimientos	ii
Tabla de contenidos	iii
Abreviaturas	v
Resumen	vi
Summary	vii
I. Introducción	1
1. Marco teórico	2
1.1. Obtención de nanopartículas de oro	2
1.2. Obtención de nanopartículas de óxido de hierro	4
1.3. Síntesis y caracterización de péptidos de interés biológico	6
1.4. Obtención de conjugados peptídicos de nanopartículas con potencial aplicación terapéutica para la Enfermedad de Alzheimer	8
1.5. Obtención de conjugados peptídicos de nanopartículas con potencial aplicación terapéutica en el cáncer	10
1.6. Caracterización de conjugados péptido-nanopartículas	13
1.7. Toxicidad de nanopartículas metálicas	15
1.7.1. Toxicidad de nanopartículas de oro	15
1.7.2. Toxicidad de nanopartículas de óxido de hierro	16
1.8. Estrategias para dirigir nanopartículas a diferentes blancos terapéuticos	17
1.8.1. Reconocimiento de los agregados de la proteína β amiloide involucrados en la Enfermedad de Alzheimer	17
1.8.2. Reconocimiento de células tumorales	19
Hipótesis	22
Objetivos	22
Objetivo general	22
Objetivos específicos	22

II. Materiales y métodos.....	24
2.1. Reactivos.....	24
2.2. Materiales.....	25
2.3. Equipos.....	25
2.4. Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro.....	26
2.5. Síntesis y caracterización de nanopartículas de óxido de hierro.....	28
2.6. Síntesis y caracterización de péptidos de interés biológico.....	30
2.7. Obtención de conjugados péptidos-nanopartículas de oro con posibles aplicaciones terapéuticas en la Enfermedad de Alzheimer y cáncer.....	32
2.8. Obtención de conjugados péptidos-nanopartículas de óxido de hierro con posibles aplicaciones terapéuticas en la Enfermedad de Alzheimer y cáncer.....	32
2.9. Caracterización de los conjugados péptido-nanopartículas de oro.....	33
2.10. Caracterización de los conjugados péptido-nanopartículas de óxido de hierro.....	36
2.11. Toxicidad de nanopartículas metálicas.....	37
2.11.1. Toxicidad de nanopartículas de oro.....	37
2.11.2. Toxicidad de nanopartículas de óxido de hierro.....	38
2.12. Interacción de conjugados de nanopartículas de oro con Aβ.....	40
III. Resultados y discusión.....	42
3.1. Caracterización de nanopartículas de oro	42
3.2. Caracterización de nanopartículas de óxido de hierro.....	44
3.3. Caracterización de péptidos de interés biológico.....	45
3.4. Caracterización de los conjugados nanopartículas de oro y nanopartículas de óxido de hierro.....	49
3.5. Toxicidad de nanopartículas metálicas.....	58
3.6. Interacción de conjugados péptidos-AuNPs con Aβ.....	65
Conclusiones y proyecciones.....	67
Bibliografía.....	72
Apéndices.....	79

ABREVIATURAS

Aβ	:Proteína beta amiloide
AuNPs	:Nanopartículas de oro
PPA	:Proteína precursora amiloide
BN	:Péptido Ac-QWAVGHLM-ácido capríco-KKKNH ₂ derivado del péptido antitumoral bombesina
CMO	:Campo magnético oscilante
Cys-BN	:Péptido Ac-C-ácido capríco-QWAVGHLMNH ₂ derivado del péptido antitumoral bombesina
Cys-INH	:Péptido CLPFFDNH ₂ disruptor de láminas β modificado con cisteína
Cys-i1	:Péptido isómero CDLPFFNH ₂
Cys-i2	:Péptido isómero CLPDDFNH ₂
Cys-RAF	:Péptido Ac-GISNGFGFKKACNH ₂ derivado del péptido antitumoral Raf-1
EA	:Enfermedad de Alzheimer
METAR	:Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución
INH	:Péptido LPFFDNH ₂ disruptor de láminas β
i1	:Péptido isómero DLPFFNH ₂
i2	:Péptido isómero LPDDFNH ₂
NPs	:Nanopartículas
NPs γ-Fe₂ O₃	:Nanopartículas de óxido de hierro del tipo maghemita
RAF	:Péptido Ac-GISNGFGFKKKNH ₂ derivado del péptido antitumoral Raf-1
MET	:Microscopía electrónica de transmisión

RESUMEN

Uno de los avances de la nanotecnología es la aplicación de nanopartículas metálicas (NPs) en el campo de la biomedicina. Estas NPs en presencia de campos magnéticos oscilantes (CMO) pueden absorber energía en forma eficaz y disiparla localmente efectuando una especie de *cirugía molecular*, produciendo la desagregación de agregados proteicos tóxicos o la muerte de células tumorales. La clave para el uso de NPs metálicas es que las mismas puedan dirigirse específicamente al sitio de acción. Mediante el uso de péptidos es posible dirigir selectivamente NPs a agregados tóxicos de la proteína β -amiloide ($A\beta$), presentes en cerebro de pacientes que padecen la enfermedad de Alzheimer (EA) o a células tumorales en el caso de cáncer.

Con este fin, se sintetizaron NPs de oro (AuNPs) y NPs de óxido de hierro (NPs de γ - Fe_2O_3), las cuales se conjugaron a los péptidos BN y RAF que son capaces de reconocer células tumorales y a los péptidos INH, i1 e i2 con capacidad de unirse a los agregados tóxicos de $A\beta$. Asimismo, para evaluar el grado de toxicidad que presentan estos conjugados, se realizaron ensayos de citotoxicidad en diferentes líneas celulares, mientras que para determinar si los péptidos INH, i1 e i2 conjugados a las NPs mantienen su actividad biológica, se estudió la interacción *in vitro* de los conjugados con agregados de $A\beta$. De esta manera, se obtuvieron AuNPs de 12 nm y NPs de γ - Fe_2O_3 de 8 nm conjugadas a los péptidos de interés. Los conjugados de los péptidos INH, i1 e i2 a las AuNPs presentaron un bajo grado de toxicidad *in vitro*, manteniendo su capacidad de unirse a los agregados tóxicos de $A\beta$. Por otra parte, los mismos péptidos conjugados a NPs de γ - Fe_2O_3 presentaron la toxicidad inherente a las NPs, mientras que las NPs de γ - Fe_2O_3 conjugadas al péptido BN presentaron, de la misma manera, el efecto tóxico propio de las NPs, no incrementándose dicho efecto por la presencia del péptido en cuestión. La conjugación de NPs de γ - Fe_2O_3 con el péptido RAF produjo una disminución de la toxicidad dosis dependiente, posiblemente por un efecto biocompatibilizador del péptido.

OBTENTION OF CONJUGATES PEPTIDE METALLIC NANOPARTICLES WITH POTENTIAL BIOMEDICAL APPLICATIONS

SUMMARY

One of the developments in nanotechnologies is the application of metallic nanoparticles (NPs) in biomedicine field. When exposed to oscillating magnetic fields (OMF), NPs are able to absorb energy and deliver it with nanometrical accuracy, carrying out a sort of *molecular surgery*, resulting in the disruption of toxic protein conglomerates or tumour cells death. The main feature that metallic NPs could have is related with the ability to reach specific therapeutic sites. NPs coated with adequate peptides could be targeted to toxic aggregates of beta amyloid ($A\beta$), which is involved in Alzheimer disease (AD), or toward tumour cells in cancer.

In consequence, gold NPs (AuNPs) and iron oxide NPs (γ - Fe_2O_3 NPs) were synthesized and subsequently conjugated to a BN and RAF peptides, which are able to recognize tumour cells. In the other hand, AuNPs and γ - Fe_2O_3 NPs were also conjugated to other peptides with high affinity for toxic deposits of $A\beta$. In this regard, toxicity assays were performed in order to evaluate the toxicity level of those conjugates using different cell tumour lines, whereas *in vitro* interaction between conjugates peptide-NPs and $A\beta$ fibers was studied to determinate if peptides maintain its biological activity. Consequently, AuNPs of 12 nm and γ - Fe_2O_3 NPs of 8 nm were obtained and subsequently conjugated to the peptides in matter. *In vitro*, AuNPs conjugated to the peptides with high affinity for toxic deposits of $A\beta$, showed a low toxicity degree maintaining its ability to interact with those toxic deposits. Finally, γ - Fe_2O_3 NPs showed to be toxic either conjugated or not to the same peptides that showed affinity for $A\beta$ deposits exposed before. Besides, a characteristic toxic effect of the γ - Fe_2O_3 NPs was observed, which was not increased by the presence of BN peptide, nevertheless, a decrease in the toxicity dose dependent was produced by γ - Fe_2O_3 NPs conjugated to RAF probably due to a biocompatibility effect of this peptide.

I. INTRODUCCIÓN

La nanotecnología, hoy en día, apunta principalmente al diseño de materiales y dispositivos a nivel nanométrico (1). En este sentido, recientes investigaciones han contribuido de manera importante al estudio de la producción y aplicación de NPs metálicas en el campo de la biomedicina (2). El mayor interés sin duda, en estos últimos años, ha sido el avance de la nanomedicina, definida como el monitoreo, reparación, construcción y control de sistemas biológicos usando nanoestructuras (3). El término NP representa a todas aquellas partículas cuyo tamaño es inferior a 1 micrómetro (μm), pudiendo llegar incluso a unos pocos nanómetros (nm), lo que las sitúa en dimensiones inferiores a las de una célula (10-100 μm), de un virus (20-450 nm), de proteínas (5-50 nm) e incluso de los genes (2 nm de ancho por 10-100 nm de largo) (4). Esta característica hace que sean muy interesantes, ya que debido a su tamaño nanométrico son potencialmente capaces de llegar muy cerca de ciertas entidades biológicas, como por ejemplo, al núcleo de una célula (5). Por otro lado, las NPs metálicas en presencia de campos magnéticos oscilantes (CMO) pueden absorber energía de forma eficaz y disipar localmente el calor absorbido, en este sentido es posible distinguir dos tipos de NPs metálicas, las magnéticas y las no magnéticas. Las primeras responden muy sensiblemente a CMO de baja frecuencia (1000 KHz) como es el caso de algunos óxidos de hierro (6,7), en cambio las NPs que no son magnéticas, como las de oro, responden por aplicación de frecuencias mayores (GHz), (8) es por esta razón que NPs de tipo magnético han sido utilizadas como agentes de hipertermia en el tratamiento de ciertos tumores cancerígenos (9). El uso de NPs metálicas en diagnóstico y tratamiento de enfermedades estaría estrechamente relacionado con su baja toxicidad, biocompatibilidad y estabilidad en medios biológicos, es así como estas partículas están sujetas a experimentar modificaciones de tipo biológico y/o químico con el fin de cumplir estos requisitos. Este proceso depende en gran medida del tipo de NP metálica (oro, óxido de hierro, cobalto, plata, entre otras) ya que la superficie de cada una de ellas provee de sitios específicos de interacción con diferentes moléculas biológicas, entre las que se encuentran anticuerpos (y sus fragmentos), lectinas, proteínas, péptidos, hormonas y ligandos de bajo peso molecular

(10) los cuales permiten el reconocimiento e interacción de estos nanomateriales con diferentes blancos terapéuticos. Estas NPs al poseer propiedades ópticas únicas, pueden ser utilizadas como biosensores moleculares, permitiendo el diagnóstico y la investigación de algunos tipos de cáncer *in vivo* e *in vitro* (11). Paralelamente, NPs de tipo magnético, como las de óxido de hierro ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ó Fe_3O_4), las que pueden ser dirigidas mediante un campo magnético externo, se han funcionalizado con polímeros y fármacos anticancerígenos con el fin de ser utilizadas, vía intravenosa, como agentes liberadores de drogas en el tratamiento del cáncer (12,13). De la misma manera, han sido biocompatibilizadas con anticuerpos monoclonales, transferrina, albúmina, insulina y factores de crecimiento, con el fin de obtener células que incorporen las NPs magnéticas, y así separarlas por aplicación de un campo magnético de una matriz biológica (14). En el campo de la imagenología, se han utilizado como agentes de contraste en resonancia magnética nuclear (RMN), ya que la inclusión de partículas magnéticas en ciertos tejidos permite un incremento de la intensidad de las señales que se obtienen mediante esta técnica, mejorando así las imágenes obtenidas por RMN (15).

Es por ello que en virtud de la extrema versatilidad de estos materiales nace el proyecto de obtener conjugados péptidos con NPs de oro (no magnéticas) y óxido hierro (magnéticas), con el fin de explorar sus potenciales aplicaciones biomédicas en el campo del diagnóstico y terapia de enfermedades como Alzheimer y cáncer. Para ello, en una primera instancia, es necesario determinar la toxicidad de los nanomateriales obtenidos así como también evaluar si los péptidos anclados a las NPs mantienen la capacidad de reconocer a sus dianas.

1. Marco teórico

1.1 Obtención de AuNPs

Las suspensiones coloidales corresponden a sistemas físicos compuestos por dos fases, una continua, normalmente fluida y otra dispersa en forma de partículas. Los

coloides cubren un amplio intervalo de tamaños que va desde unos pocos nanómetros hasta unas pocas micras (16). Las interacciones electrostáticas en estos sistemas juegan un rol muy importante, ya que en general, la carga superficial de las partículas suspendidas en el líquido, forma una doble capa eléctrica alrededor de ellas. La repulsión de las cargas entre partículas vecinas, es lo que finalmente otorga la estabilidad al coloide (17). Las AuNPs se clasifican como coloides de carácter liofóbico, es decir, presentan baja afinidad por el medio dispersante y se obtienen principalmente a través de dos metodologías de síntesis agrupadas en dos categorías: (a) Métodos de condensación, en los cuales partículas de tamaños subcoloidales son inducidas a agregarse hasta alcanzar tamaños coloidales, y (b) Métodos de dispersión en los que partículas de tamaños superiores a los coloidales son reducidas de tamaño (18).

De cara a futuras aplicaciones terapéuticas, se debe considerar sin duda, el estudio de factores farmacocinéticos tales como la absorción y distribución de las AuNPs en el organismo. Este proceso depende considerablemente de la vía de administración, composición y carga superficial de la NP así como también de su tamaño (19,20). Este último es un factor crítico, ya que la rapidez de penetración de una sustancia a través de barreras biológicas, está inversamente relacionada con el tamaño molecular (18). Es así como estudios en ratones han demostrado que AuNPs de 4 y 10 nm son capaces de ser absorbidas eficientemente en el tracto gastrointestinal (21).

De esta manera y dependiendo del tamaño de AuNP que se quiera obtener, es que existen numerosos protocolos de síntesis. El método sintético descrito por Turkevich y col. (22) y también el de Levy y col. (23) permiten la obtención de partículas de tamaños de 7 nm o superiores, según sea el caso, mediante la reducción de una sal aúrica (HAuCl_4) con citrato de sodio en presencia de calor. El control de tamaño de las AuNPs está dado por la variación en la relación citrato/ HAuCl_4 . En la figura 1 se observa la formación de un centro teórico de nucleación, sobre el cual se adsorberían capas sucesivas de átomos de oro, hasta alcanzar el tamaño de partícula permitido por el método (18,24).

Entre las técnicas más utilizadas para caracterizar AuNPs se encuentra la espectrofotometría UV visible, la cual brinda información sobre la concentración, el tamaño y homogeneidad de tamaño de las partículas, comparando la radiación luminosa absorbida o transmitida por una solución de AuNPs respecto de un blanco. De este modo la concentración se relaciona con la absorbancia en el pico máximo de absorción, el tamaño con la posición del pico, mientras que la homogeneidad de tamaño con el ancho del pico. Los coloides de oro, los cuales se caracterizan por su intenso color rojo, absorben luz en la región verde-azul del espectro (25). Esta absorción depende de ciertos factores como el tamaño de las NPs, su estado de agregación y de la frecuencia de resonancia del plasmón de superficie, característico de las partículas metálicas (26). De esta manera las AuNPs de 10 nm absorben a los 520 nm de longitud de onda (27). Otra técnica de caracterización utilizada es la microscopía electrónica de transmisión (MET), la cual permite obtener principalmente información acerca del tamaño y forma de las AuNPs, ya que la muestra es irradiada por un haz de electrones, lo que permite obtener una imagen aumentada producto del contraste de los electrones retenidos, absorbidos o dispersados por las AuNPs (24).

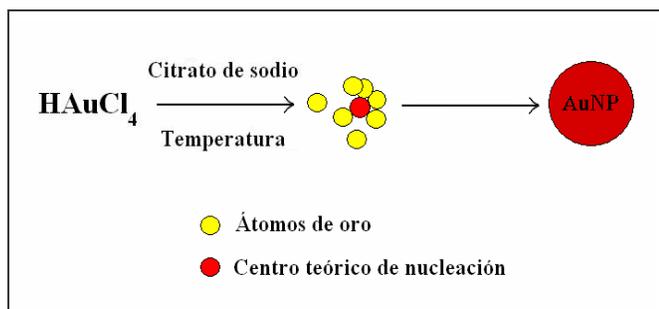


Figura 1. Centro teórico de nucleación sobre el cual se adsorberían los átomos de oro para dar origen a las AuNPs.

1.2 Obtención de NPs de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$

Como intermediarios entre el estado molecular y sólido, las NPs combinan la accesibilidad química en solución con las propiedades físicas del estado *bulk*. La aplicación de pequeñas partículas de hierro en diagnóstico *in vitro* ha sido practicada

desde hace 40 años, principalmente utilizando óxidos de maghemita y magnetita (γ - Fe_2O_3 y Fe_3O_4 , respectivamente). Estas NPs son capaces de formar suspensiones homogéneas llamadas ferrofluidos, las cuales pueden interactuar con un campo magnético externo y por ende ser posicionadas en un área específica dentro del organismo, no reteniendo magnetización alguna después de la exposición a este campo, lo cual es muy importante de cara a una futura aplicación terapéutica, ya que de esta manera se reduce la posibilidad de agregación de las NPs a causa de la fuerte atracción magnética que se pueda originar entre las partículas (14).

Dentro de los métodos de síntesis de NPs de γ - Fe_2O_3 , encontramos los métodos físicos y químicos. En el primer caso, se destacan técnicas como la deposición en fase de gas y la litografía en corriente de electrones, sin embargo la principal desventaja de estos métodos es que el tamaño de la NP no puede ser controlado durante la síntesis (28). Por otro lado las rutas químicas, caracterizadas por su simpleza y eficiencia, son capaces de controlar el tamaño, composición y a veces incluso, la forma de las NPs (29,30).

El método sintético desarrollado por Yu y col. (31) para la obtención de NPs de γ - Fe_2O_3 biocompatibilizadas, se basa en la coprecipitación de soluciones de iones férrico y ferroso en una solución de hidróxido de sodio (Figura 2). Posterior a esta etapa, las NPs sintetizadas son recubiertas con ácido metacrílico, el cual al entrar en contacto con el coloide de γ - Fe_2O_3 se adhiere fuertemente a su superficie a causa de la alta afinidad que posee este reactivo por los óxidos metálicos. De esta manera y luego de la polimerización del ácido metacrílico adsorbido sobre el óxido, es posible obtener NPs magnéticas de γ - Fe_2O_3 funcionalizadas con ácido polimetacrílico, las cuales poseen grupos carboxilos libres en la superficie (Figura 3).

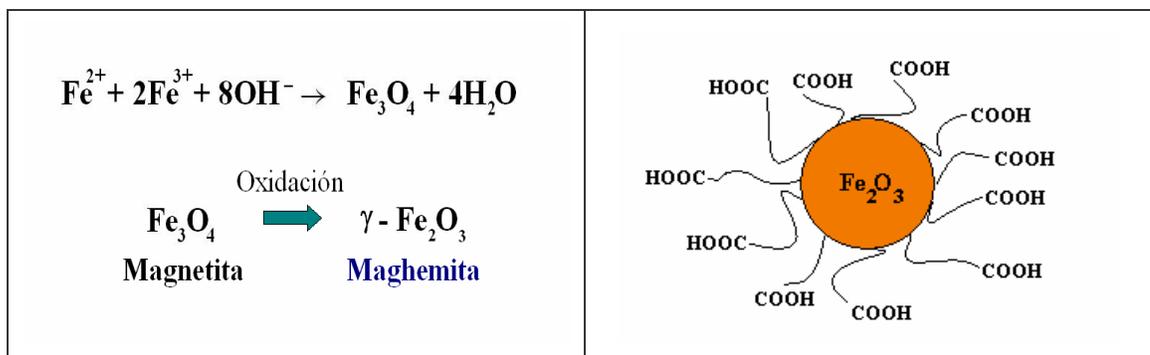


Figura 2. Esquema del mecanismo de formación de NPs de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ a partir de una mezcla acuosa de cloruros férrico y ferroso, mediante la adición de una base.

Figura 3. NP de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ recubierta con ácido polimetacrílico, exponiendo los grupos carboxilos en la superficie.

Se han desarrollado numerosas técnicas para la caracterización de NPs de óxido de hierro, entre las que se encuentran: (a) MET, la cual brinda información sobre el tamaño, forma y estado de agregación de las partículas, (b) espectroscopía de absorción atómica para determinar la concentración de hierro presente en las NPs sintetizadas y (c) la microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (METAR), la cual se emplea principalmente para caracterizar la ultraestructura de las partículas sintetizadas, lo que en conjunto con la difracción de electrones posibilita caracterizar la fase cristalina de las NPs, pudiéndose diferenciar los óxidos de hierro sintetizados, ya sea $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ o Fe_3O_4 , de los hidróxidos de hierro u otras impurezas que pueda presentar la muestra (31).

1.3 Síntesis y caracterización de péptidos de interés biológico

La técnica de elección para la síntesis de péptidos, hoy en día, es la síntesis en fase sólida (SPFS) introducida por Merrifield en 1960 (32), en la cual una estrategia de pasos sincronizados, es utilizada para la obtención de secuencias peptídicas (33). La SPFS, específicamente, se basa en la unión del primer aminoácido de cada secuencia a un soporte sólido, insoluble e inerte (resina). Las reacciones son llevadas a cabo

Para la caracterización de los péptidos obtenidos, se utilizan principalmente la cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) (35) y la espectroscopía de masas ionización por desorción láser matriz asistida con analizador de vuelo (MALDI-TOF) (36).

1.4 Obtención de conjugados peptídicos de NPs con potencial aplicación terapéutica para la Enfermedad de Alzheimer:

Las enfermedades neurodegenerativas, de carácter crónico y progresivo, como la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson (EP), la enfermedad de Huntington (EH) y las enfermedades priónicas, se caracterizan por una pérdida selectiva y simétrica de neuronas en los sistemas motores, sensoriales o cognitivos. Del mismo modo poseen mecanismos celulares y moleculares en común, entre los que se incluyen la agregación de proteínas y formación de cuerpos de inclusión (37,38). La EA es un desorden que se caracteriza principalmente por una pérdida de memoria a corto plazo, lo que finalmente se traduce en una pérdida total de la función cognitiva. El diagnóstico definitivo de la EA se lleva a cabo mediante los análisis histopatológicos de tejido cerebral, los cuales solamente se realizan *post mortem*. Los cerebros de las personas que padecieron EA presentan una pérdida selectiva de neuronas del hipocampo y corteza (39,40). Además presentan dos tipos de lesiones características, en las que están involucrados dos grandes tipos de agregados de proteínas. Por un lado los agregados extracelulares conocidos como placas seniles, que tienen como mayor constituyente el péptido A β (39-43 aminoácidos), el cual deriva del proceso proteolítico de una glicoproteína de transmembrana llamada proteína precursora del amiloide (APP), y los agregados intracelulares llamados ovillos neurofibrilares, cuyo componente principal es la proteína Tau hiperfosforilada. Esta proteína está asociada a los microtúbulos neuronales y se encuentra en abundancia en los axones de las neuronas. (41,42).

Si bien es cierto que el péptido A β se encuentra fisiológicamente en el cerebro, es en condiciones patológicas cuando se autoagrega, formando diferentes especies

que van desde pequeños oligómeros hasta fibras, lo que finalmente se traduce en la formación de los agregados tóxicos mencionados anteriormente. Esta tendencia a la agregación se produce por el cambio en la conformación de A β , normalmente soluble, en estructuras ricas en lámina β (43). Se ha postulado que el efecto tóxico de estas fibras amiloides es consecuencia de un notable aumento en la interacción del péptido A β con proteínas neuronales de membrana y del daño oxidativo, además de la peroxidación de lípidos en membranas celulares, inflamación y el aumento en la excitotoxicidad glutamatergica, consecuencia de una variedad de mecanismos secundarios (44). Son estos procesos los que en definitiva podrían ser responsables de la pérdida neuronal y muerte en la EA (45). Las estrategias neuroprotectivas apuntan entonces, en su mayoría, a reducir el daño celular asociado con la generación y agregación del péptido A β (46).

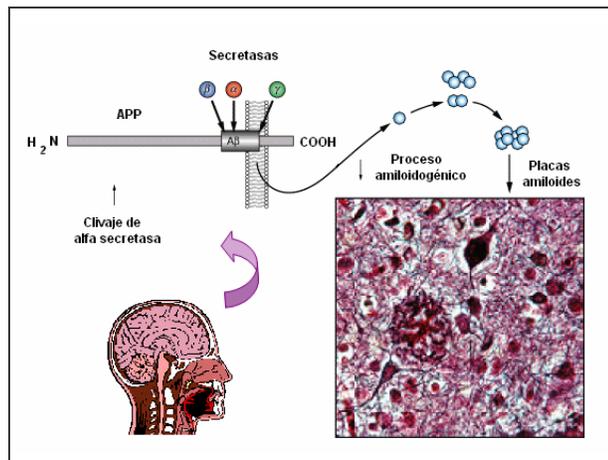


Figura 5. Esquema representativo de la formación de placas amiloides.

A β posee la región ¹⁷LVFF²⁰ que actúa como núcleo hidrofóbico, a partir del cual se produce la autoagregación; es así como una sustitución de aminoácidos en esta región, produce enormes cambios en la conformación del péptido y su habilidad para formar fibras amiloides (47). Esta zona se ha convertido en el punto clave para el diseño de péptidos disruptores de láminas β , los cuales son capaces de inhibir y revertir el mal plegamiento de esta proteína, mediante el reconocimiento de esta secuencia hidrofóbica (43). Entre los disruptores de láminas β que se han diseñado, se

encuentra el péptido LPFFDNH₂ (INH), el cual presenta una alta selectividad por los agregados tóxicos de A β ; este disruptor conserva en su estructura los aminoácidos claves para el reconocimiento y anclaje a A β (leucina y fenilalanina), la incorporación de la prolina en su estructura le confiere la capacidad de actuar como agente disruptor de láminas β , evitando no sólo la agregación de A β , si no que también su posible autoagregación y por último, el ácido aspártico contribuye a mejorar la solubilidad del péptido. Este péptido además de poseer un pequeño tamaño, es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y en este sentido, es importante destacar que INH posee la capacidad de desagregar las placas amiloides *in vivo*, aunque para ello se deben utilizar dosis muy elevadas que llevan, en los pacientes, a efectos adversos importantes (47).

De esta manera, considerando las propiedades que ofrece el péptido INH, sumado al efecto que produce un CMO sobre NPs metálicas, permitiría el desarrollo de conjugados péptido-NPs con capacidad de atravesar barreras biológicas y alcanzar específicamente el blanco de interés, en este caso los agregados de A β . Estudios preliminares llevados a cabo en nuestro laboratorio evidenciaron que los conjugados de AuNPs con el péptido INH atraviesan la barrera hematoencefálica *in vivo* (48). En este caso, los conjugados potencialmente podrían interactuar y desagregar los depósitos tóxicos de A β , junto con impedir la formación nuevos agregados, realizando una especie de *cirugía molecular*, en donde la selectividad del conjugado hacia A β la otorga el péptido INH y la capacidad de absorber energía y disiparla localmente, la otorga las NPs mediante la aplicación del CMO (49).

1.5 Obtención de conjugados peptídicos de NPs con potencial aplicación terapéutica en el cáncer:

En la última década se ha visto un crecimiento exponencial en el desarrollo de péptidos para diagnóstico y aplicación terapéutica, particularmente en enfermedades cancerígenas (50). El cáncer se caracteriza por ser una enfermedad altamente heterogénea, es decir, posee grandes diferencias moleculares en la expresión y

distribución de marcadores celulares sobre la superficie de diferentes tumores (51). El objetivo último de la terapia anticancerígena es la eliminación completa de toda célula cancerosa mediante métodos quirúrgicos, radioterápicos y farmacológicos, sin embargo las células del tumor, al poseer distintas características bioquímicas, morfológicas e inmunológicas, presentan diferencias de sensibilidad frente a la acción de los fármacos citotóxicos, los cuales debido a la baja especificidad que poseen ocasionan en su mayoría abundantes, frecuentes y graves efectos nocivos sobre otros órganos y tejidos que se encuentran en condiciones normales (52). Para prevenir los efectos adversos causados por el uso de terapias anticancerígenas citotóxicas y de paso mejorar su efectividad, se necesita por un lado dirigir la terapia directamente a las células malignas, sin afectar a las sanas y además perfilar en cada paciente los blancos celulares específicos del tumor a tratar antes de comenzar el tratamiento farmacológico. Es aquí donde entra en juego el diseño y desarrollo de péptidos con actividad específica para terapias anticancerígenas (51-53).

Los receptores para hormonas peptídicas en células tumorales, sirven como dianas terapéuticas para ciertos ligandos peptídicos, los cuales además pueden ser unidos a varios agentes citotóxicos actuando así como vectores de los mismos. Se han sintetizado péptidos análogos de la hormona liberadora de gonadotropinas, somatostatina y de bombesina como potenciales agentes anticancerígenos, los cuales han sido dirigidos a ciertos tumores como por ejemplo los de tipo neuroendocrino y gástrico (54). Por otro lado, están los péptidos liberadores de gastrina (PLG), los cuales contienen 27 aminoácidos y están ampliamente distribuidos en el pulmón y el tracto gastrointestinal, son producidos principalmente en el cáncer prostático, pancreático y de mama, donde funcionan como factores de crecimiento, activando múltiples vías de transducción de señales, las cuales actúan de modo sinérgico y combinatorio para transmitir la señal mitógena al núcleo y así promover la proliferación celular (55). El descubrimiento de que bombesina, péptido de 14 aminoácidos aislado originalmente de la piel de una rana o PLG, pueden funcionar como un factor de crecimiento autocrino en varios tumores, ha estimulado el desarrollo de antagonistas bombesina/PLG, así como también la aplicación de análogos de bombesina radio-marcados para la detección de tumores, principalmente de próstata (50).

De la misma manera, la vía Ras/Raf/MEK/ERK (Figura 6) es otro blanco importante para dirigir agentes terapéuticos anticancerígenos (56). Esta vía, es una cascada de reacciones acopladas, que van desde los receptores de superficie de membrana hasta la transcripción de factores que regulan la expresión génica. También regula la actividad de muchas proteínas envueltas en la apoptosis, ya que es capaz de causar profundos efectos sobre moléculas regulatorias apoptóticas, a través de fosforilaciones post transduccionales. La familia Raf tiene tres miembros, Raf-A, Raf-1 y Raf-B, los cuales son activados a través de su interacción con la proteína Ras, en el cáncer existe una activación anormal de esta vía, debido a mutaciones que van desde los receptores de membrana, incluyendo Ras y Raf-B hasta genes de otras rutas asociadas (57,58).

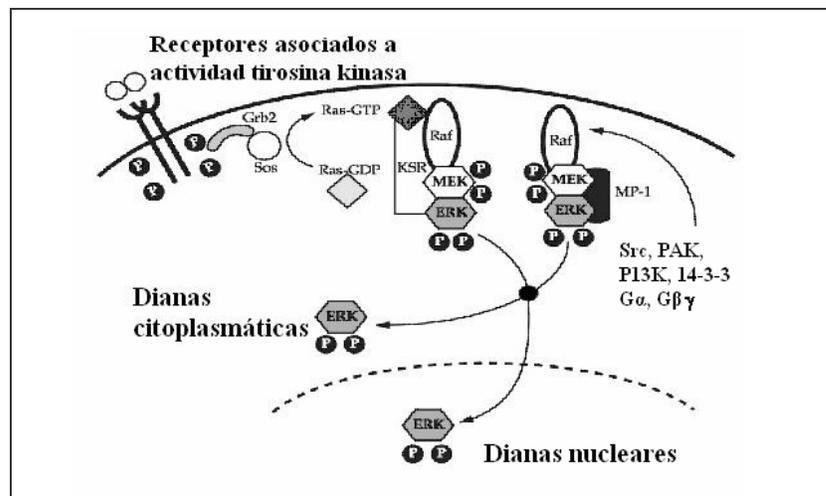


Figura 6. Esquema representativo de la cascada Ras/Raf/MEK/ERK

En este sentido, estudios recientes se ha demostrado que Raf-1 puede fisiológica y funcionalmente interactuar con Rb, la proteína supresora de tumor de retinoblastoma, mediante la fosforilación de Rb por Raf-1, contribuyendo de esta manera a su inactivación y por ende facilitando la proliferación celular. Esta interacción entre Rb y Raf-1, es probablemente uno de los mecanismos mediante el cual señales mitógenas recibidas en receptores extracelulares se contacten con la maquinaria de ciclo celular en el núcleo. A raíz de estos antecedentes, se diseñó un péptido de 9

aminoácidos, formado por los residuos 10-18 de la proteína Raf-1, el cual es capaz de inhibir significativamente la fosforilación de Rb, sin afectar otras proteínas de la vía antes mencionada, lo que se traduce en una disminución en el crecimiento tumoral y angiogénesis *in vivo*, demostrando que este péptido al ser capaz de interrumpir la interacción Rb-Raf-1 tiene un potencial valor terapéutico en el tratamiento de desórdenes proliferativos (59).

A raíz de estos antecedentes, bombesina, el péptido derivado de Raf-1 y sus análogos, se convierten en atractivos candidatos para ser conjugados a las NPs metálicas, tanto de oro como de óxido de hierro, ya que posiblemente sean capaces de reconocer dianas específicas y efectivamente dirigir a las NPs a ciertos tumores cancerígenos.

1.6 Caracterización de conjugados péptido-NPs

El principal objetivo que deben poseer las técnicas a utilizar para llevar a cabo la caracterización de los conjugados péptido-NPs, es sin duda, demostrar que el péptido se encuentra unido a la NP metálica. Dentro de las principales metodologías que se utilizan para realizar esta tarea se encuentran:

- a. Electroforesis en gel de agarosa, en la cual partículas cargadas migran en una matriz porosa (gel) bajo un determinado campo eléctrico, donde la movilidad de las partículas depende de su carga y tamaño (60). En base a esto, la electroforesis permite observar el cambio en la movilidad electroforética de las AuNPs, con respecto a las AuNPs recubiertas con péptido (49).
- b. Espectrofotometría UV-visible, que además de determinar la concentración y homogeneidad de tamaño, en el caso de los conjugados péptido-AuNPs, permite observar un desplazamiento del λ máximo, el cual podría atribuirse a una modificación en el plasmón superficial de la partícula, indicando que la misma se encuentra recubierta por el péptido (18, 24).

- c. Imágenes de tinción negativa y observación por MET, mediante las cuales se puede visualizar la presencia de péptido sobre la AuNP, en este caso se realiza una tinción del péptido unido a la NP con acetato de uranilo y se observa por MET (61).
- d. Fotoespectroscopía de rayos X (FEX), la cual permite realizar un análisis químico de la superficie de la AuNP y por ende determinar el estado químico y electrónico de los elementos que existen en su superficie. En este caso la presencia de azufre indicaría que el péptido se encuentra efectivamente unido a la AuNP.
- e. Estimación del grado de recubrimiento peptídico de las AuNPs, en donde luego de la conjugación se toman dos muestras del mismo lote de síntesis, a una fracción se le estima la concentración de NPs presentes en la muestra, mientras que a la otra se le determina la cantidad de péptido conjugado a las NPs. La estimación de la concentración de AuNPs se obtiene directamente a través del valor de absorbancia, el cual se correlaciona con la absorptividad molar (62). La cuantificación del péptido unido a la NP se realiza mediante un análisis de aminoácidos (AA), procedimiento que se utiliza principalmente para determinar la composición y cantidad de aminoácidos del péptido utilizado en la conjugación y por ende el unido a la NP metálica. Este método se basa principalmente en la hidrólisis de la secuencia peptídica con HCl 6N, previa liofilización del conjugado, lo que permite la obtención de las unidades aminoacídicas. Luego se realiza una derivatización de estas unidades con 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil-carbamato, para su posterior análisis por CLAE.
- f. Espectroscopía de absorción atómica, mediante la cual se determina la cantidad de hierro presente en las NPs de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ y por ende el número de NPs presentes en las muestras a estudiar.

- g. Estimación de la eficiencia de la conjugación del péptido unido a la NP, para lo cual se determina el porcentaje de péptido no conjugado a la NP mediante CLAE (63)

1.7 Toxicidad de NPs metálicas

El gran avance de la nanotecnología en estos últimos años, trajo consigo un aumento en la utilización de nanomateriales en una amplia variedad de aplicaciones, como en las descritas en el campo de la biomedicina (64). Las NPs, caracterizadas por su pequeño tamaño y gran área superficial, poseen características físicas y químicas particulares, las cuales podrían repercutir en la toxicidad de las mismas sobre los seres vivos, tanto a nivel de salud humana como medioambiental (65). Por otro lado, desde un punto de vista farmacológico y toxicológico, varias son las interrogantes por responder, como por ejemplo cómo es su distribución, metabolismo y excreción (66).

El grado de toxicidad de las NPs metálicas podría ser un inconveniente para su posterior uso en el campo de la biomedicina. Para solucionar dichos inconvenientes es que las NPs se pueden biocompatibilizar conjugándolas a péptidos, logrando así, que su toxicidad disminuya (67).

1.7.1 Toxicidad de AuNPs

Sandhu y cols. reportaron que AuNPs poseen toxicidad a elevadas dosis en cultivos de células mamarias (Cos-1) (68). Estudios recientes evidenciaron que AuNPs recubiertas con especies catiónicas, tienen una toxicidad moderada, mientras que las recubiertas con especies aniónicas, como podría ser un péptido cargado negativamente, presentan un bajo grado de toxicidad frente a cultivos bacterianos de *E.coli*, glóbulos rojos y/o células mamarias siendo, posiblemente, esta toxicidad dosis-dependiente mediada por características electroestáticas de las AuNPs (69). De esta manera y con el fin de determinar los posibles efectos tóxicos de las AuNPs y sus

conjugados, es necesario realizar ensayos de citotoxicidad *in vitro*, empleando para ello cultivos de la línea celular de neuroblastoma SHSY5Y.

Uno de los ensayos comúnmente utilizados para evaluar la citotoxicidad inducida por un factor externo a las células, es el basado en la reducción de sales de tetrazolio en un compuesto llamado formazán, reacción llevada a cabo sólo por células viables (Figura 7). De aquí se desprende que la cantidad de formazán producido está directamente relacionado con el número de células metabólicamente activas, mientras que las células dañadas, inevitablemente perderán su capacidad de mantener y proporcionar la energía necesaria para su correcto funcionamiento, siendo incapaces de reducir estas sales de tetrazolio (70,71).

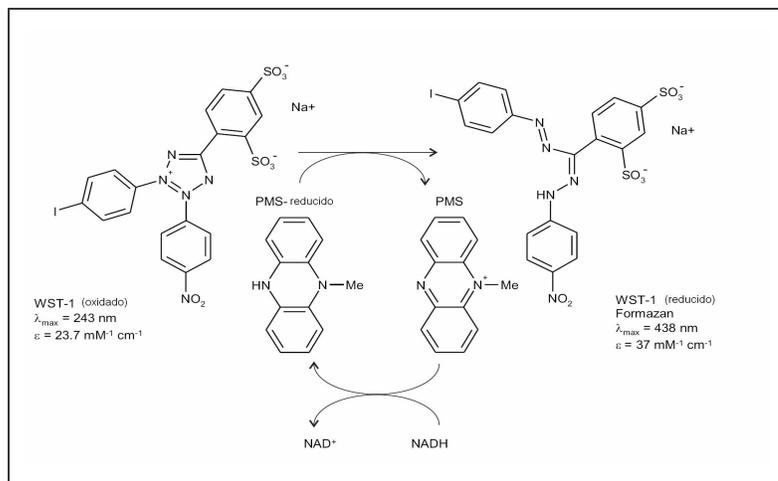


Figura 7. Estructura molecular y reducción a formazán de la sal monosódica (2-(4-Iodofenil)- 3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio y su correspondiente producto de reacción vía NADH.

1.7.2 Toxicidad de NPs de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$

Históricamente, el uso de NPs de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ en el área clínica evidencia que dichas NPs ha sido bien tolerado, sin embargo los efectos directos que provocan las NPs sobre la función celular a diferentes concentraciones aún permanece en estudio. Es así como se. han investigado los efectos de NPs magnéticas funcionalizadas con

diferentes ligandos de superficie, demostrando que el nivel de exposición de las NPs a las células, así como también el ligando utilizado, determinan directamente su efecto sobre la morfología celular (72). A la luz de estos antecedentes, es de vital importancia determinar el grado de toxicidad que poseen las NPs de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ así como la de sus correspondientes conjugados peptídicos, mediante la realización de estudios de toxicidad *in vitro* en la línea celular de neuroblastoma SHSY5Y y en la línea celular HeLa derivada del cáncer cervical, mediante el ensayo de citotoxicidad basado en la reducción de sales de tetrazolio.

1.8 Estrategias para dirigir NPs a diferentes blancos terapéuticos

1.8.1 Reconocimiento de los agregados de A β involucrados en la EA.

Las llamadas enfermedades conformacionales, dentro de las cuales encontramos la EA, se caracterizan principalmente por el mal plegamiento de proteínas a causa de cambios en su estructura secundaria y/o terciaria. Este cambio conformacional puede originar un efecto tóxico directo o simplemente bloquear la función de la proteína en su condición fisiológica (73). El péptido LPFFDNH₂ diseñado por Soto y col. apunta a la región 17-20 (LVFF) del péptido A β (Figura 8), como zona de reconocimiento para este disruptor de láminas β (47). Es importante destacar que a este péptido se le adiciona un residuo Asp en su extremo C-terminal para incrementar su solubilidad. En nuestro caso es de vital importancia evaluar si el péptido INH una vez unido a la AuNP (INH-AuNP) mantiene la capacidad de reconocer a las fibras amiloides, para lo cual es necesario evaluar el grado de interacción que presenta este conjugado frente a las fibras, además de evaluar el comportamiento de los conjugados de AuNPs con sus isómeros i1 e i2, para determinar si esta interacción es secuencia dependiente.

Es así como la interacción entre los conjugados péptidos-AuNPs y los agregados A β , se evalúa mediante imágenes de MET (24) y por la determinación cuantitativa de las AuNPs que son capaces de interaccionar con las fibras amiloides.

La evaluación de esta interacción requiere de la elaboración de fibras amiloides a partir de las especies monoméricas de A β utilizando para ello existen protocolos bien establecidos, como el de Zagorsky y col. (74). Este protocolo contempla el tratamiento de A β con sustancias tales como ácido trifluoroacético y hexafluoroisopropanol que no afectan su estructura primaria, dando lugar a la formación de monómeros.

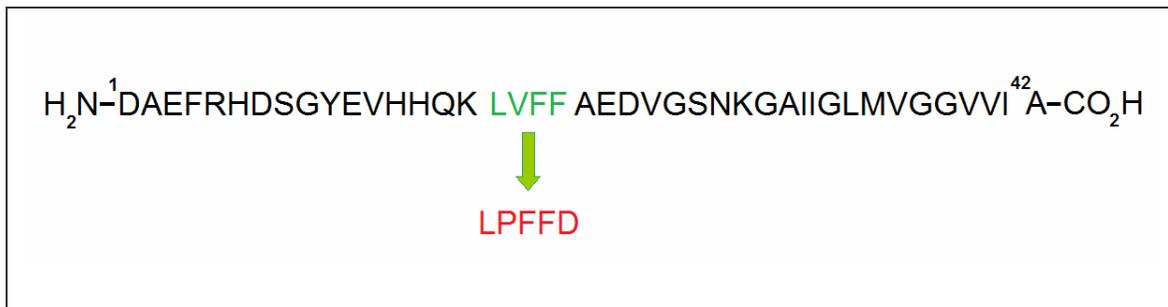


Figura 8. Secuencia de A β . En verde se representan los aminoácidos hidrofóbicos que forman parte del núcleo de agregación. En rojo se muestra la secuencia del péptido INH que presenta afinidad por los agregados tóxicos de A β .

En esta Memoria de Título se obtendrán conjugados de NPs metálicas (AuNPs y NPs de γ -Fe₂O₃) con los péptidos INH y dos de sus isómeros (i1 e i2), los cuales son capaces de reconocer el péptido A β (21). De la misma manera se evaluará tanto la citotoxicidad de dichos conjugados frente a la línea celular de neuroblastoma SHSY5Y, así como también si los péptidos al estar conjugados a las NPs, mantienen la capacidad de reconocer los agregados de A β . Es importante destacar que en caso de utilizar estos conjugados en una potencial terapia frente a la EA los conjugados deben dirigirse al sistema nervioso central, por lo cual será necesario evaluar la neurotoxicidad que los mismos presentan. Por tal motivo emplear un cultivo celular de neuroblastoma es apropiado para estos fines.

De esta manera, la obtención de los conjugados péptido-AuNP, se basa principalmente en reacciones descritas donde los grupos tiólicos interaccionan espontánea y rápidamente con superficies de oro (75). De acuerdo con este conocimiento, es que el proceso de conjugación se llevará a cabo modificando el péptido INH mediante la adición de una cisteína en la posición N-terminal, originando la secuencia CLPFFDNH₂ (cys-INH), la cual permite la interacción directa de la AuNP

con el péptido (23,24). De la misma manera se modificarán los péptidos isómeros originando CDLPFFNH₂ (cys-i1) y CLPDDFFNH₂ (cys-i2). En el caso de las NPs de γ -Fe₂O₃, la obtención de los conjugados se realiza mediante la reacción entre los grupos carboxilos que se encuentran en la superficie de la NP y N-hidroxisuccinimida, originando así un éster activado, el cual es capaz de reaccionar con los grupos amino de los residuos amino libres correspondientes a los residuos N-terminales que contienen los péptidos INH, i1 e i2. (76).

1.8.2 Reconocimiento de células tumorales.

Uno de los objetivos en la obtención de péptidos conjugados a NP es dirigir las mismas al blanco terapéutico que en cáncer son las células tumorales. En la presente Memoria se conjugan las NPs a péptidos anticancerígenos que *per se* presentan efecto citotóxico pero que lo podrían perder al conjugarse a las NP. En cuyo caso el agente antitumoral actuaría como un vector, pero si el mismo no pierde sus propiedades antitumorales se tendría en el conjugado un efecto dual, es decir citotóxico y paralelamente de direccionalidad de la NP. Aunque el péptido sirva solamente como un vector de la NP, es necesario evaluar el potencial tóxico que presentan los conjugados péptido-NPs.

En esta Memoria de Título se obtendrán péptidos derivados de bombesina, con el fin de conjugarlos paralelamente a AuNPs y NPs de γ -Fe₂O₃ y evaluar el efecto citotóxico sobre la línea tumoral HeLa proveniente de cáncer cervical. Para el caso de los péptidos derivados de bombesina (BN) y el péptido Raf-1 (RAF), la obtención de los conjugados con AuNPs se llevará a cabo modificando ambas secuencias y adicionando el aminoácido cisteína, obteniendo los péptidos cys-BN (Ac-C-ácido caproíco-QWAVGHLMNH₂) y cys-RAF (Ac-GISNGFGFKKACNH₂) (Figura 9). Además de adicionar la cisteína, las secuencias fueron levemente modificadas, debido a que en estos casos las lisinas no son necesarias para la conjugación con las AuNPs, conservando solamente la lisina perteneciente al Raf-1 original, en el caso del péptido RAF.

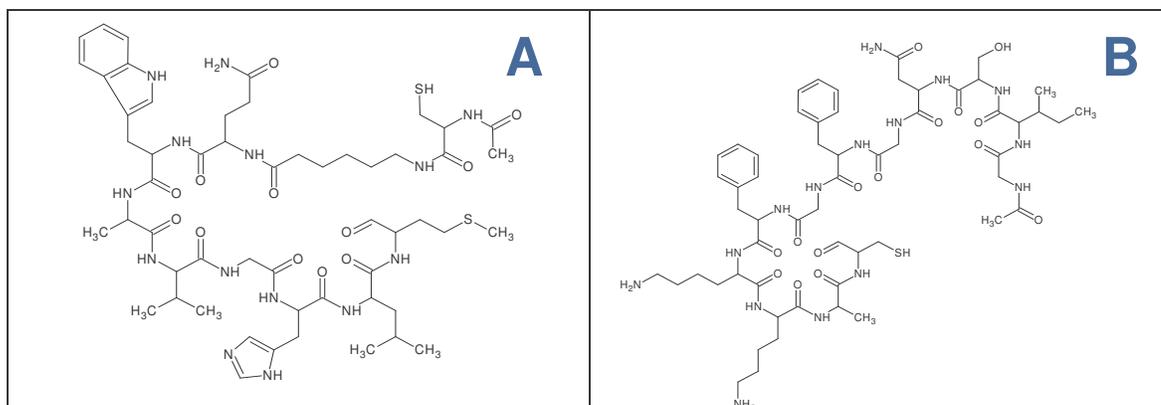


Figura 9. Secuencias peptídicas correspondientes a los péptidos cys-BN (**A**) y cys RAF (**B**).

Por otra parte, para la conjugación del péptido BN (Ac-QWAVGHLM-ácido caprónico-KKKNH₂) con NPs de γ -Fe₂O₃ se añadirán tres residuos de lisina (K) en los extremos C terminales, que tienen como finalidad dirigir la conjugación de las NPs en esa dirección, es decir, la NP se unirá a los péptidos mediante la interacción con los grupos aminos presentes en esos aminoácidos, a través de la formación del éster activado. Asimismo la incorporación de Lys en una secuencia peptídica contribuye a mejorar la penetración de los péptidos en las células (77). El ácido caprónico presente en BN actuaría como sitio de corte enzimático, en caso de que la NP unida al péptido efectivamente ingresara a la célula, dejando libres por un lado el péptido intacto y por otro a la NP de γ -Fe₂O₃.

Por otro lado, en el caso de RAF (Ac-GISNGFGFKKKNH₂), derivado del Raf-1 que naturalmente posee una lisina en su extremo C-terminal, el adicionar lisinas extras favorece que la unión con la NP se efectúe sobre ellas y afecte lo menos posible la lisina perteneciente a su secuencia original. (Figura 10)

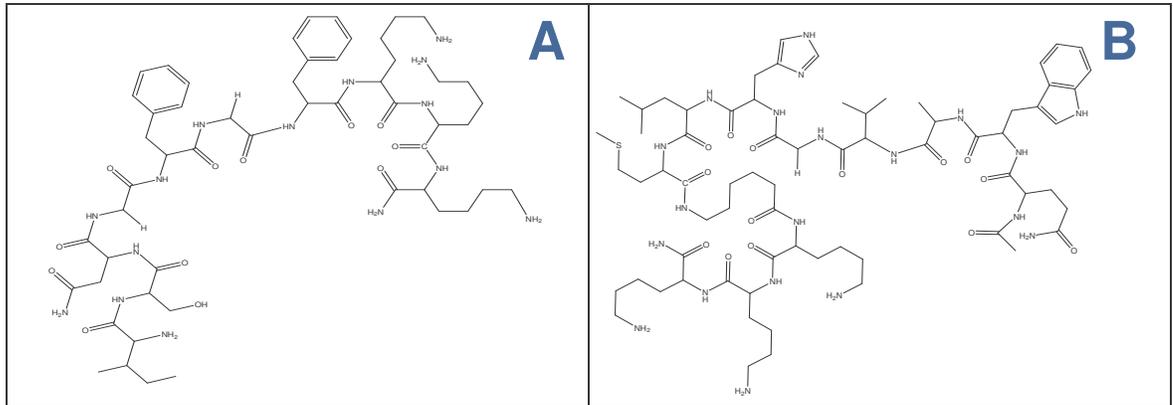


Figura 10. Secuencias peptídicas correspondientes a los péptidos BN (A) y RAF (B).

HIPÓTESIS

Los péptidos cargados negativamente a pHs fisiológicos INH, i1 e i2 conjugados a las NPs metálicas actúan disminuyendo la toxicidad de las NPs y aunque estén conjugados a NPs son capaces de reconocer los agregados tóxicos de A β .

Los péptidos RAF y BN mantienen sus propiedades citotóxicas al estar conjugados a NPs de γ -Fe₂O₃

OBJETIVOS

Objetivos generales

Obtener conjugados de NPs metálicas magnéticas y no magnéticas con los péptidos capaces de reconocer los agregados tóxicos de la proteína amiloide A β y de disminuir la toxicidad de las NPs por un efecto biocompatibilizador de los péptidos conjugados que presentan una carga negativa a pHs cercanos a los fisiológicos.

Obtener conjugados de NPs de γ -Fe₂O₃ con los péptidos BN y RAF, con el fin de evaluar su efecto citotóxico.

Objetivos específicos

- a. Obtener y caracterizar AuNPs de aproximadamente 12 nm.
- b. Obtener y caracterizar NPs de γ -Fe₂O₃.
- c. Sintetizar péptidos con capacidad de reconocer los agregados tóxicos de A β .
- d. Conjugar las NPs a péptidos capaces de reconocer agregados de A β y evaluar su toxicidad.
- e. Determinar si existe interacción de los conjugados con los agregados tóxicos de A β .

- f. Sintetizar análogos de los péptidos antitumorales BN y RAF, con grupos funcionales que permitan la conjugación a AuNPs y NPs de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$.
- g. Obtener conjugados de NPs metálicas con péptidos antitumorales para dirigirlos a células tumorales.
- h. Evaluar la toxicidad de los conjugados NPs de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ frente a líneas celulares.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Reactivos

Acetonitrilo: Merck, pureza 99,9%, PM 41,05

Agarosa: Sigma Aldrich, Cat. 6B100

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

Acido clorhídrico (HCl): Merck, pro análisis, PM 36,46

Acido metacrílico monómero: Aldrich, pureza 99%, PM 86,09

Acido trifluoroacético (TFA): Aldrich, pureza 99%, PM 114,02

Anhídrido acético: Merck, pro análisis, PM 102,09

6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidilcarbamato: AccQ-Fluor, Kit Waters, WAT 52880

7-Aza- 1- hidroxibenzotiazol (HOAt): Medalchemy S.L, PM 136,14

Benzotriazol-1-yl-N-oxi-tris(pirrolidino)fosfonio hexafluorofosfato (PyBOP): Iris Biotech GmbH, PM 520,30

Bicarbonato de sodio (NaHCO₃): Winkler, PM 84,01

Citrato de sodio dihidratado: Fluka, pureza 99,5%, PM 294,00

Cloruro de calcio dihidratado (CaCl₂ × 2H₂O): Merck, 95% pureza, PM 110,99

Diclorometano (CH₂Cl₂): Merck, grado laboratorio, PM 84,93

Diisopropiletilamina (DIEA): Aldrich, pureza 99%, PM 129,25

Diisopropilcarbodiimida (DIPCDI): Aldrich, pureza 99%, PM 126,20

Dimetilformamida (DMF): Merck, pro análisis, PM 73,00

Dodecilsulfato de sodio (SDS): Sigma, ≥ 98,5% pureza, PM 288,38

Eluente cromatográfico A: Kit Waters, WAT 52880

Hidróxido de sodio (NaOH): Merck, pureza 99%, PM 40,00

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

MES buffer: Aldrich, pureza ≥ 99%, PM 195,20

N-hidroxisuccinimida: Aldrich, pureza 98%, PM 115,09

N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida : Sigma, pureza 99%, PM 191,70

Peroxodisulfato de potasio (K₂S₂O₈): Aldrich, pureza 98 %, PM 270,32

Resina 4-benziloxi-2',4'-dimetoxibenzidrilamina (MBHA AM Fmoc Rink amida): Iris Biotech GmbH, sustitución 0,72 mmoles/g de resina

Sal tetracloroaúrica monohidratada ($\text{HAuCl}_4 \times \text{H}_2\text{O}$): Aldrich, pureza 99,9%, PM 339,79

Sal cloruro de hierro (II) tetrahidratada ($\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$): Aldrich, pureza 99 %, PM 198,81

Sal cloruro de hierro (III) (FeCl_3): Aldrich, pureza 98 %, PM 162,21

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

Tampón TAE 50X: Tampón Tris Base 2M, Ácido Acético Glacial (ajuste pH 8,3) y EDTA 0,05 M

Tripsina: GIBCO Invitrogen, Cat. 15400-054

2.2 Materiales

- Concentrador de partículas magnético: Dynal MPC-50, Dynal Biotech
- Filtros hidrofílicos de 0,45 μM Millipore Millex-HV
- Filtros no pirogénicos de 0,22 μm : Schleicher & Schuell
- Membrana de diálisis: Spectra/por MWCO 6-8,000
- Papel filtro N° 1: Whatman, 55 nm, Cat. 1001055

2.3 Equipos

- Agitador Heidolph DSG 304
- Cámara y placa de electroforesis Bio-RAD
- Campana de seguridad biológica Nuaire UN-425-400E
- Centrífuga Eppendorf AG 5415 D
- Centrífuga Hettich Rotofix 32
- Centrífuga Varifuge 3.0 Heraeus Sepatech
- Espectrofotómetro ATI UNICAM UV3
- Estufa Nuaire US con sistema de filtración HEPA y autoflujo de CO_2
- Lector ELISA Bio-RAD 550
- Liofilizador VIRTIS 12EL

- Microscopio Electrónico de Transmisión Zeiss EM 109
- Microscopio Electrónico de Transmisión con cañón de emisión por efecto campo, modelo Jeol 2010F
- Peachímetro WTW Microprocessor pH Meter
- Sistema cromatográfico: Bomba WatersTM 600 Controller Millipore Model Code 6CE, detector con arreglo de fotodiodos WatersTM 996, columna cromatográfica Kromasil 100-5C-18 (4,6 mm×150 mm), precolumna C18 μ Bondapak (30 mm×4,6 mm), inyector Rheodyne de 20 μ L, horno columna WatersTM 600, computador Pentium II con programa de adquisición y tratamiento de datos MILLENIUM versión 3.05
- Microflex MALDI-TOF, Bruker Daltonics, Inc., MA-USA
- Sonicador Ultrasons P-Selecta
- Vortex Eurolab MeIB1719

2.4 Síntesis y caracterización de AuNPs

Síntesis de AuNPs: Para la obtención de AuNPs de tamaños cercanos a 10 nm, se siguió el protocolo desarrollado por Turkevich y col. (22) y Levy y col. (23). El material utilizado en las diferentes síntesis fue dejado en Extrán al 2% durante una noche, al día siguiente se enjuagó con agua y posteriormente se lavó con agua regia, finalizando con un último enjuague en agua. Todas las soluciones que se prepararon y los lavados de material se realizaron con agua Milli-Q (18.2 M Ω cm).

Método de Turkevich: Se prepararon 106 mL de una solución acuosa 2.2 mM de citrato de sodio dihidratado, para lo cual se pesaron 68,5 mg de este reactivo. Esta solución se colocó en un balón de tres cuellos de 250 mL, se conectó un condensador de reflujo en el cuello principal y un *septum* en cada uno de sus cuellos laterales, todo este sistema se depositó sobre un manto de calefacción de aluminio con agitador magnético incorporado, para obtener una mezcla continua. Por otro lado, se preparó 1 mL de una solución 24,3 mM de HAuCl₄ hidratado pesando 8,0 mg de esta sustancia.

La solución de citrato fue llevada a ebullición y una vez alcanzado el reflujo, se añadió gota a gota, pero rápidamente el mL de la solución 24,3 mM de HAuCl_4 preparada con anterioridad a través de uno de los cuellos laterales del balón. Después de transcurridos aproximadamente 8 minutos, la solución alcanzó un color rojo característico indicativo de la formación de las AuNPs, con lo cual se retiró el balón del calor y se esperó a que la solución alcanzara la temperatura ambiente, para luego almacenarla a 4 °C.

Método de Levy: Se prepararon 100 mL de una solución acuosa 1mM de HAuCl_4 , para lo cual se pesaron 33,9 mg de este reactivo. Esta solución se colocó en un balón de tres cuellos de 250 mL, sobre su cuello central se conectó un sistema de reflujo y un *septum* en cada cuello lateral, el balón se dejó sobre un manto de calefacción con agitador magnético incorporado para lograr una mezcla continua y fue llevado a ebullición. Por otro lado se prepararon 10 mL de una solución acuosa 38,8 mM de citrato de sodio dihidratado, para lo cual se pesaron 114,1 mg de este reactivo y una vez preparada fue calentada en microondas hasta alcanzar los 60°C. Una vez alcanzado el reflujo de la solución de HAuCl_4 contenida en el balón, se esperó 8 minutos, tiempo después del cual la tibia solución de citrato de sodio, preparada anteriormente, fue agregada rápidamente por uno de los cuellos laterales del balón. De inmediato apareció un color negro intenso, el cual transcurrido 3 minutos pasó a un color rojo borgoña intenso, indicativo de la formación de las AuNPs. 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 0,45 μm y las AuNPs obtenidas se almacenaron a 4 °C.

Caracterización de AuNPs: Las AuNPs sintetizadas mediante los diferentes métodos, fueron caracterizadas por espectrofotometría UV-Visible y MET (18,24). Las mediciones realizadas en el espectrofotómetro UV-visible se llevaron a cabo en cubetas plásticas de 1 cm de longitud. Se realizaron barridos entre longitudes de onda de 400 y 700 nm buscando lambdas de absorción característicos para AuNPs. Como blanco se utilizó una solución 1,2 mM de citrato de sodio dihidratado. Todas las mediciones en el espectrofotómetro se realizaron de la misma manera y bajo las

mismas condiciones de trabajo. La caracterización por MET se llevó a cabo en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss utilizando rejillas de cobre recubiertas con formvar. Las rejillas para este experimento se prepararon sobre una placa de Petri recubierta con papel Whatman N°1. Sobre la placa y utilizando una pinza metálica, se ubicó la rejilla y sobre ella se añadieron 20 μL de la muestra de AuNPs, esto con el fin de obtener microfotografías y por ende las dimensiones y la distribución de tamaño de las partículas, empleando para lo último el programa computacional Image J. Se realizó la medida de 200 NPs obtenidas desde diferentes zonas de la rejilla.

2.5 Síntesis y caracterización de NPs $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$

Síntesis de NPs de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$: Fueron sintetizadas según el método descrito por Yu y col. (31) El material utilizado en la síntesis fue dejado en Extrán al 2% durante una noche, se enjuagó con agua Milli-Q y posteriormente se lavó con agua regia, finalizando el proceso con un último enjuague de agua Milli-Q. Para eliminar el oxígeno presente en las soluciones, estas fueron burbujeadas con argón por cinco minutos antes de comenzar las correspondientes reacciones.

Se prepararon 50 mL de una solución de NaOH 1 M, pesándose 2 g de esta sustancia que se disolvieron en agua Milli-Q. La solución fue depositada dentro de un balón de tres cuellos de 100 mL, provisto de un equipo de agitación magnética continua, sobre el cuello central del balón se conectó una ampolla de retorno la cual contenía una solución de iones férrico y ferroso, cuyas concentraciones se encontraban en una relación molar de 0,5. Para lograr esta relación se pesaron 1,625 g de FeCl_3 y 1 g de $\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ y se disolvieron en 30 mL de HCl 0,02 N, este último se obtuvo mezclando 6 mL de HCl 1 M con 24 mL de agua Milli-Q. Para obtener la atmósfera inerte de argón, los cuellos laterales del balón fueron sellados con un *septum*, en uno de ellos se colocó una aguja lo suficientemente larga como para llegar al fondo de la solución, a través de la cual se burbujeo el argón hasta finalizar la reacción, mientras que en el otro *septum* se dispusieron dos agujas pequeñas para la salida del gas. Una vez armado el sistema, la solución contenida en la ampolla de

retorno fue agregada gota a gota sobre el NaOH 1 M que se encontraba dentro del balón bajo agitación continua. Ocurrido esto, la solución de NaOH alcanzó un color negro producto de la formación de las NPs. Después de haber agregado por completo la solución de iones de hierro, la reacción se dejó agitando por 30 minutos a temperatura ambiente. La solución coloidal obtenida fue centrifugada a 5000 rpm y el sobrenadante fue removido por decantación. El precipitado se resuspendió en 250 mL de agua Milli-Q, se depositó en un matraz y se almacenó a 4°C.

Posteriormente, se midieron 45 mL de la solución de NPs de hierro obtenidas y se pesaron 1,15 g de SDS, los cuales fueron agregados a 200 mL de agua Milli-Q en un balón de tres cuellos de 250 mL, el cual se depositó en un manto de calefacción de aluminio equipado con un sistema de agitación magnética para lograr una mezcla continua. Sobre el cuello central del balón se conectó un sistema de reflujo, en cuyo extremo terminal se ubicó una trampa anhidra, confeccionada con cloruro de calcio. El sistema de atmósfera de argón se preparó de la misma forma explicada anteriormente. La reacción fue llevada hasta los 70 °C y en este punto se añadieron 960 µL de ácido metacrílico por una de las agujas de salida del sistema. Transcurridos 45 minutos, 1,98 g de $K_2S_2O_8$ fueron agregados a la reacción por la parte superior del condensador de reflujo y arrastrados con una pequeña cantidad de agua Milli-Q. Se continuó agitando por 2 horas manteniendo los 70 °C de temperatura. Una vez cumplido el tiempo de reacción, la solución alcanzó un color café oscuro y se dejó enfriar a temperatura ambiente.

Para remover el polimetacrilato no unido a las partículas coloidales, los excesos de reactivos y los subproductos de la reacción, las NPs fueron lavadas utilizando un concentrador de partículas magnéticas, este concentrador fue capaz de retener a las partículas en su imán y en cada separación el sobrenadante era eliminado por decantación, luego las NPs eran disueltas nuevamente en agua Milli-Q. Este proceso se repitió cinco veces y una vez finalizado, se almacenaron a 4 °C.

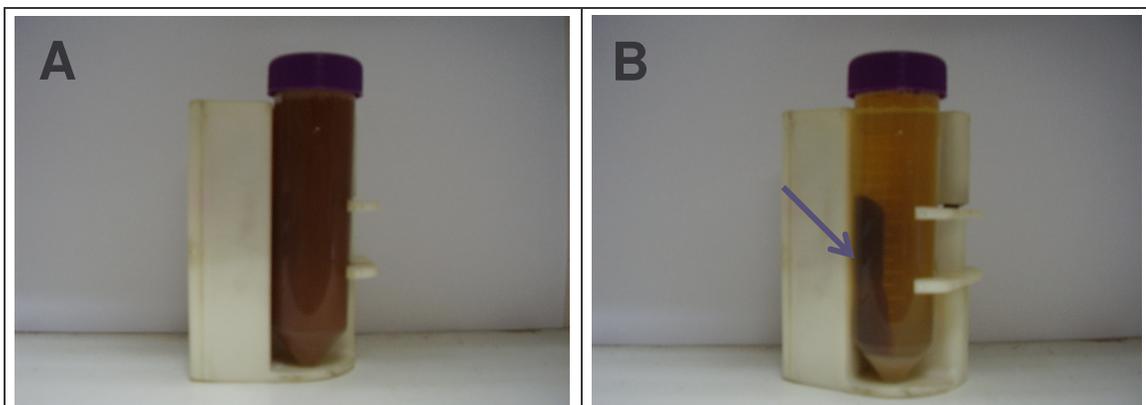


Figura 11. (A) Lavado de NPs de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ a $t=0$ minutos. (B) Lavado de NPs de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ a $t=15$ minutos en donde se puede observar el efecto del extractor de partículas magnéticas. Las NPs se encuentran adheridas al imán dejando en el sobrenadante las impurezas de la reacción como lo indica la flecha.

Caracterización de NPs de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$: Las NPs magnéticas fueron caracterizadas por MET, METAR y difracción de electrones (31). La caracterización por MET se llevó a cabo utilizando iguales condiciones e igual procedimiento de preparación de muestra que el descrito en la sección 2.4 para el caso de las AuNPs. En el caso de la METAR y difracción de electrones, se preparó una rejilla de carbono sobre la cual se adicionaron 20 μL de muestra sobre papel Whatman N^o 1.

2.6 Síntesis y caracterización de péptidos de interés biológico

Síntesis de péptidos: La elongación del péptido en fase sólida fue llevada a cabo en jeringas de polipropileno equipadas con discos porosos de polietileno. Los solventes y reactivos solubles fueron removidos por succión. Se utilizó como soporte polimérico la resina MBHA AM Fmoc Rink amida, la cual posee un grado de funcionalización de 0,72 mmoles/g de resina. Para llevar a cabo la síntesis se pesaron 300 mg de la resina, los cuales se colocaron dentro de la jeringa de polipropileno. Antes de comenzar la síntesis la resina fue lavada como sigue: DMF (2 veces x 1 min), CH_2Cl_2 (1 vez x 5 min) y nuevamente DMF (1 vez x 5 min) con volúmenes aproximados de 5 mL. La remoción del Fmoc se realizó con piperidina-DMF (1:4) (1 vez x 1 min, 2 veces x 10 min). Los lavados entre desprotección, acoplamiento de

aminoácidos y los subsecuentes pasos de desprotección, se llevaron a cabo con DMF (3 veces x 1 min) y CH₂Cl₂ (3 veces x 1 min), usando 5 mL de solvente cada vez.

Las reacciones de acoplamiento se llevaron a cabo con Fmoc-aminoácido (4 equivalentes), HOAt (4 equivalentes) y DIPCDI (4 equivalentes), los cuales fueron secuencialmente agregados a la resina, dejando la mezcla reaccionar por 90 minutos. Una vez evaluada la efectividad del paso de acoplamiento mediante el ensayo de ninhidrina, se continuó con la desprotección correspondiente para realizar el siguiente acoplamiento o bien se reacopló el aminoácido en cuestión. Para el reacople se utilizó Fmoc-aminoácido (8 equivalentes), HOAt (8 equivalentes), PyBOP (8 equivalentes) y DIEA (12 equivalentes), los cuales fueron agregados a la resina y se dejaron reaccionar por otros 60 minutos. Una vez terminada la elongación del péptido, una mezcla de TFA-agua 95% fue agregada sobre la resina y se dejó reaccionar por 1 hora para producir la escisión del péptido desde la resina. Luego de evaporar el solvente bajo corriente de nitrógeno, fueron realizadas sucesivas precipitaciones con una mezcla de *ter*-butilmetileter/hexano en una relación 1:1. En este proceso el péptido fue clivado de la resina y posteriormente resuspendido en una mezcla acetonitrilo-agua 1:1. Luego de eliminar la resina de la solución mediante filtración, se procedió a congelar y liofilizar el producto obtenido.

Caracterización de péptidos: Se pesaron 80 mg del liofilizado obtenido en la etapa anterior y se disolvieron en 4 mL de una mezcla acetonitrilo: agua (1:1), posteriormente se filtraron y se inyectaron en el CLAE semi-preparativo para ser purificados. Luego de la purificación, se midió un volumen de 20 µL de cada péptido puro y se inyectó en el CLAE para su caracterización final, mientras que para realizar el análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF se utilizó como matriz el ácido 2,5-dihidrobenzóico (DHB) a una concentración de 10 mg/mL en acetonitrilo/ácido fórmico 0,1% v/v (1:2) y se mezcló 1 µL del péptido obtenido con 1 µL de la matriz, colocándose sobre una placa porta muestra micro scout. Los espectros se obtuvieron en un equipo Microflex MALDI-TOF.

2.7 Obtención de conjugados péptidos AuNPs con posibles aplicaciones terapéuticas en la EA y cáncer:

Para la obtención de los conjugados AuNPs-péptido, se emplearon los protocolos descritos para la conjugación de tioles de naturaleza no peptídica (75). Para ello, se midió un volumen de 20 mL de AuNPs y se depositaron en un matraz de vidrio de 50 mL provisto de un equipo de agitación magnética, posterior a esto el coloide fue ajustado a pH 8 con NaOH 0,1 M con el fin de evitar precipitaciones durante la conjugación. Paralelamente, se pesó 1 mg del péptido y se disolvió en 1 mL de agua Milli-Q. Rápidamente se añadió el mL de péptido al matraz y se dejó agitando a temperatura ambiente por 15 minutos. El conjugado AuNP-péptido resultante fue sometido a diálisis por tres días, empleando una membrana de diálisis y 2 L de solución de citrato de sodio dihidratado 1,2 mM, equivalentes a 705,8 mg del reactivo, en la cual se sumergió la membrana. La diálisis se llevó a cabo bajo agitación constante a temperatura ambiente, realizando cambios de la solución de citrato cada 24 horas.

2.8 Obtención de conjugados péptidos NPs de γ -Fe₂O₃ con posibles aplicaciones terapéuticas en la EA y cáncer:

La conjugación de las NPs magnéticas a los péptidos siguió el protocolo descrito por Quaroni y Chumanov (76) el cual se basa en la activación de ácidos carboxílicos. Antes de comenzar la conjugación con los péptidos, las NPs fueron sonicadas por 30 minutos y ajustadas a pH 8 con NaOH 1 M con el fin de desagregarlas. Se prepararon 100 mL de una solución amortiguadora acuosa MES 0,1 M, pesando 1,952 g de esta sustancia, luego se ajustó a pH 5,5 con NaOH 1 M. Por otro lado, utilizando la solución amortiguadora MES se prepararon 4,1 mL de solución de N-hidroxisuccinimida (NHS) 10 mg/mL y 1,8 ml de solución de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDAC) 1 mg/mL. Se tomaron 1,8 mL de MES y se colocaron en un matraz de 50 mL, el cual se dispuso sobre un agitador para así

lograr una mezcla continua, luego se agregaron 10 mL de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ NPs, seguidos de 4,1 mL de NHS y 1,8 mL de EDAC. La reacción se dejó por 1 hora, con agitación vigorosa y a temperatura ambiente, esto con el fin de activar los grupos carboxilos presentes en la superficie de la NP. Transcurrido el tiempo, se pesó 1 mg del péptido a conjugar y se disolvió en agua Milli-Q, rápidamente fue agregado a las NPs y se dejó el sistema en funcionamiento por otra hora. Para eliminar los residuos de los reactivos utilizados, se ocupó el concentrador de partículas magnéticas de la misma forma explicada anteriormente. Los conjugados péptido- NPs de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ quedaron resuspendidos finalmente en agua, nuevamente fueron sonicados por treinta minutos y ajustados a pH 8 con NaOH 1 M.

2.9 Caracterización de conjugados péptido-AuNPs.

La caracterización de los conjugados péptidos-AuNPs se realizó mediante las técnicas que a continuación se describen:

- a. Espectrofotometría UV-visible, la cual se llevó a cabo utilizando el mismo procedimiento descrito en la sección 2.4, esta vez buscando desplazamientos en el máximo de absorbancia obtenido para las AuNPs, lo que daría cuenta de la alteración en el plasmón de superficie de la partícula producto de la conjugación.
- b. Electroforesis, para lo cual se preparó un gel de corrida al 1,5%, disolviendo 0,75 g de agarosa en 50 mL de amortiguador TAE 1X, esta mezcla se llevó a ebullición en microondas y el gel obtenido se depositó en una placa de electroforesis. A continuación una peinetas de ocho dientes se colocó sobre el gel para formación de alvéolos de carga de muestra y se esperó a que el gel solidificara a temperatura ambiente. Una vez solidificado, se colocó en la cámara de electroforesis y se cubrió con 250 mL de una solución amortiguadora TAE 1X. Paralelamente, las muestras de AuNPs y los conjugados se ajustaron a pH 8 con NaOH 0,1 M y se centrifugaron a 13200 rpm por 8 minutos, el

precipitado obtenido se mezcló con glicerol al 30% en una proporción 1:1, esta mezcla se colocó en los alvéolos y se dejó correr la electroforesis por 8 minutos con una diferencia de potencial aplicado de 120 V.

- c. Estimación del grado de recubrimiento peptídico de las AuNPs, para lo cual se realizó por un lado la estimación de la concentración de AuNPs en las muestras de los distintos conjugados y por otro, se llevó a cabo un AA de las muestras obtenidas después de la diálisis. La concentración se estimó utilizando la Ley de Beer ($A = abc$, donde a corresponde a la absorptividad molar: $5,14 \times 10^7 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ (62), b al ancho de la cubeta y c a la concentración molar). Con esto se obtuvo la concentración de AuNPs después de medir el λ máximo de absorción en el espectrofotómetro UV-visible, utilizando cubetas plásticas de 1 cm de longitud y como blanco una solución de citrato de sodio dihidratado 1,2 mM. Para realizar los AA se tomaron 2 mL de cada conjugado péptido-AuNP, los cuales se centrifugaron por 8 minutos a 13200 rpm, para luego reconstituir el *pellet* obtenido en citrato 1,2 mM y se depositaron en un tubo de vidrio para hidrólisis, se congelaron con nitrógeno líquido y luego fueron liofilizados. Una vez liofilizados, se les agregó 300 μL de HCl 6N al 1% en fenol y 20 μL de ácido aminobutírico (patrón primario). El tubo de hidrólisis fue sellado y se dejó toda la noche en una estufa a 110 $^{\circ}\text{C}$, esto con el fin de reducir el péptido a unidades aminoacídicas. Una vez realizada la hidrólisis, se abrieron los tubos y se evaporó en evaporador rotatorio hasta sequedad, el residuo obtenido se resuspendió en 300 μL de HCl 20 mM. De esta solución se filtraron a un *eppendorf* 10 μL para su posterior derivatización y análisis por CLAE. El proceso de derivatización se realizó siguiendo el protocolo que a continuación se describe: los 10 μL de muestra obtenidos anteriormente se colocaron en un tubo de vidrio pequeño, sobre esta solución se agregaron 70 μL de amortiguador borato, luego de homogenizar en vórtex por unos 20 segundos se añadieron 20 μL de 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato 10 mM, nuevamente se homogenizó en vórtex y se colocó el tubo en un bloque térmico a 55 $^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos. Transcurrido este tiempo el tubo se dejó enfriar a temperatura ambiente, luego de lo cual se agregaron 100 μL de eluente

cromatográfico A, esto con el fin de llevar a cabo la separación cromatográfica. La solución obtenida se depositó en un microvial y se inyectó en el CLAE.

Una vez obtenidos ambos valores (cuantificación de AuNPs y péptidos), se dividió la concentración de péptido obtenida en el AA por la concentración de AuNPs obtenida por espectrofotometría, con lo cual se obtuvo el número de moléculas de péptido por AuNP.

- d. Para el caso de las AuNPs conjugadas al péptido cys-INH se obtuvieron imágenes de tinción negativa y se observaron por MET. Para ello, una rejilla de carbono fue depositada sobre una gota de 20 μ L de muestra durante 2 minutos, posterior a esto se realizaron dos lavados de la rejilla con agua MilliQ, utilizando el mismo procedimiento de la gota y por último se realizó la tinción del péptido conjugado a la AuNP utilizando acetato de uranilo al 2%, para lo cual la rejilla se dispuso sobre una gota de acetato de uranilo durante 2 minutos. Luego de este proceso la rejilla se depositó sobre un papel Whatman N°1 y se guardó en el desecador hasta el momento de la medición.
- e. FEX, para llevar a cabo este experimento se tomaron 20 mL de AuNPs y sus conjugados con los péptidos cys-INH, cys-i1 y cys- i2 los cuales se centrifugaron a 13200 rpm por 8 minutos, con el fin de separar el péptido libre del conjugado y obtener un *pellet*. Posteriormente el *pellet* de cada muestra fue liofilizado y el sólido obtenido fue analizado en los Servicios Científico Técnico de la Universidad de Barcelona en donde se llevaron a cabo las mediciones de FEX.
- f. Estimación de la eficiencia en la conjugación del péptido a la AuNP, para lo cual se determinó mediante CLAE la cantidad de péptido libre presente en el coloide. Por un lado se realizaron curvas de calibración para cada péptido estudiado (Apéndice 1) y posteriormente se determinó el porcentaje de péptido sin conjugar en las muestras, mediante la interpolación de los resultados obtenidos por CLAE en las curvas anteriormente mencionadas.

Curvas de Calibración: Se realizaron curvas de calibración área bajo la curva (ABC) vs. concentración molar (M), cada una de ellas contó con seis puntos, abarcando un intervalo de concentraciones de 6.27×10^{-3} M a 2.0×10^{-5} M. Los péptidos fueron disueltos en una mezcla agua: acetonitrilo (1:1), para luego ser inyectados en el equipo, previa filtración de estas soluciones. Los cromatogramas obtenidos fueron procesados y tratados con el software MILLENIUM 3.01. (Apéndices 1).

Preparación de las muestras: Una vez realizadas las curvas de calibración para cada péptido, se procedió a la preparación de la muestra a analizar. Se tomaron 20 mL de los conjugados péptido-AuNP, se centrifugaron a 13200 rpm por 8 minutos con el fin de separar las AuNPs conjugadas y dejar el posible péptido no conjugado en el sobrenadante. Este último fue congelado con nitrógeno líquido y luego liofilizado. Posteriormente se procedió a resuspender el liofilizado en 200 μ L de una mezcla acetonitrilo: agua (1:1) para el caso de los péptidos BN, RAF, cys-BN y cys-RAF, mientras que para los restantes (INH, i1, i2, cys-INH, cys-i1 y cys-i2) se resuspendieron en 200 μ L de agua 0,045% en TFA. Antes de ser inyectados en el CLAE fueron cuidadosamente filtrados y el ABC obtenida se interpoló en la correspondiente curva de calibración.

2.10 Caracterización de los conjugados péptidos-NPs óxido de hierro

Los conjugados péptidos-NPs magnéticas fueron caracterizados por MET, siguiendo igual procedimiento que el descrito en la sección 2.4 para las AuNPs en cuanto a la preparación de la muestra.

La eficiencia en el grado de conjugación del péptido a la NP de óxido de hierro se realizó siguiendo igual procedimiento que el descrito para las AuNPs en la sección 2.9, a excepción de la preparación de las muestras a inyectar en el CLAE. En este caso las NPs de γ -Fe₂O₃ fueron depositadas en un extractor de partículas magnéticas

con la finalidad de separar el sobrenadante y por ende dejar el péptido no conjugado en esta fracción. El sobrenadante de cada conjugado fue liofilizado y resuspendido en los correspondientes solventes como se explicó anteriormente en dicha sección.

Por otro lado, se determinó el número de carboxilos presentes por NP, ya que este número corresponde a los sitios activos a los cuales se unen las moléculas de péptido, para lo cual se realizó una valoración ácido-base de las NPs de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Con este fin se midieron 15 mL de una suspensión de NPs magnéticas ajustadas a pH 8 con NaOH 1 M y se valoraron con una solución de HCl 5×10^{-4} M (estandarizada frente a NaOH). Se agitó manualmente para evitar la agregación de las partículas al estar en contacto con un agitador magnético. Paralelamente se cuantificó el número de NPs/L de los distintos conjugados, lo cual se llevó a cabo cuantificando el hierro total presente en las muestras mediante espectroscopia de absorción atómica para luego, por estequiometría, calcular la concentración de óxido de hierro (los análisis de absorción atómica se realizaron en el Centro para el desarrollo de la Química CEPEDQ ubicado Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas). Finalmente se estimó el número de NPs, para lo cual se hizo un cálculo relacionando los mg de óxido de hierro presentes en la muestra con el número de NPs contenidas en una muestra de 45 mg de óxido de hierro (que corresponde a 3.5×10^{16} partículas), según referencia (31).

2.11 Toxicidad de NPs metálicas

2.11.1 Toxicidad de AuNPs

Se realizaron estudios de toxicidad de AuNPs y sus conjugados en la línea celular neuroblastoma SHSY5Y, entre los pasos de división de cultivo 8 y 20, utilizando como marcador de viabilidad celular MTT (bromuro de 3-(4,5 dimetiliazol-2-il) 2,5 difeniltetrazolio). Estos experimentos se realizaron bajo vitrina de seguridad biológica.

El subcultivo de esta línea celular se llevó a cabo en botellas estériles de 75 cm^2 . Como medio de mantención celular se utilizó DME de alta glucosa (4500 mg/mL

glucosa), el cual además contenía glutamina en concentración de 2 mM, 10% de suero fetal bovino, 50 µg/mL de penicilina y 50 µg/mL de estreptomina. Las células fueron incubadas en una estufa a 37 °C bajo una atmósfera compuesta por 95% de aire y 5% de CO₂.

El ensayo de MTT se llevó a cabo en placas de 96 pocillos, los cuales fueron sembrados con 3000 células cada uno, en un volumen de 50 µL de medio DME. Luego de 24 horas de incubación las células fueron tratadas con diferentes concentraciones nanomolares de AuNPs y sus conjugados (nM lo cual corresponde a concentraciones micromolares de oro) hasta completar un volumen de 100 µL por pocillo, como control de muerte positivo se utilizó H₂O₂ en una concentración de 0,2% en 100 µL. Posteriormente las células fueron incubadas por 24 horas a 37°C y una vez transcurrido este período se agregaron a cada pocillo 20 µL de MTT manteniéndose la placa a 37°C por 4 horas adicionales. De esta manera se obtuvieron los cristales de formazán, los cuales se disolvieron en 100 µL de isopropanol, previa aspiración del medio en cada pocillo. Por último se midió la absorbancia de cada pocillo en un lector de placas a 570 nm de longitud de onda. Cada concentración estudiada se sembró por triplicado y el ensayo fue realizado tres veces, por lo tanto, cada condición fue repetida en 9 pocillos.

2.11.2 Toxicidad de NPs de γ -Fe₂O₃

Los estudios de toxicidad *in vitro* se llevaron a cabo utilizando dos líneas celulares diferentes, células de neuroblastoma SHSY5Y (entre los pasos de división de cultivo 8 y 20) y células HeLa (entre los pasos de división de cultivo 11 y 23) provenientes de cáncer cervical. Como marcador de viabilidad celular se utilizó la sal monosódica (2-(4-Iodofenil)- 3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio (WST-1). En el caso de la línea SHSY5Y se estudiaron las NPs de γ -Fe₂O₃ y los conjugados con los péptidos INH, i1 e i2 a diferentes concentraciones, mientras que en la línea HeLa se estudiaron de igual forma las NPs de γ -Fe₂O₃ pero conjugadas a los péptidos BN y

RAF. Estos experimentos se realizaron en el área de cultivos celulares bajo vitrina de seguridad biológica.

El subcultivo de cada línea celular se llevó a cabo en botellas de 75 cm² utilizando las mismas condiciones de cultivo que el descrito en la sección 2.11.1.

Estudios de viabilidad en cultivos SHSY5Y: El ensayo de viabilidad se llevó a cabo en placas de 96 pocillos, los cuales fueron sembrados con 1500 células cada uno, en un volumen de 50 µL de medio DME. Es importante destacar que en este ensayo se utilizó una menor cantidad de células que el mencionado en la sección 2.11.1 ya que se empleó WST-1 en lugar de MTT, siendo el primero más sensible que este último. Luego de 24 horas de incubación las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de NPs de γ -Fe₂O₃ y sus conjugados (µg/mL), hasta completar un volumen final de 90 µL por pocillo utilizándose como control de muerte positivo SDS en una concentración de 0,2%. Posteriormente las células fueron incubadas por 21 horas a 37°C y una vez transcurrido este período se agregaron a cada pocillo 10 µL de WST-1 manteniéndose la placa a 37°C por 3 horas adicionales, tiempo después del cual se midió la absorbancia de cada pocillo en un lector de placas a 490 nm de longitud de onda. Cada concentración estudiada se sembró por triplicado y el ensayo fue realizado cuatro veces, por lo tanto, cada condición fue repetida en 12 pocillos.

Estudios de viabilidad en cultivos HeLa: El ensayo se llevó a cabo igualmente en placas de 96 pocillos los cuales fueron sembrados con 3000 células cada uno, en un volumen de 100 µL de medio DME. Luego de 24 horas de incubación, se realizó una renovación del medio de cultivo de la placa, para lo cual se agregaron 50 µL de DME, previa aspiración del medio anterior. Luego las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de NPs de γ -Fe₂O₃ y sus conjugados (µg/mL), hasta completar un volumen final de 90 µL por pocillo utilizándose como control de muerte positivo SDS en una concentración de 0,2%. Posteriormente las células fueron incubadas por 22 horas a 37°C y una vez transcurrido este período se agregaron a cada pocillo 10 µL de WST-1 manteniéndose la placa a 37°C por 2 horas adicionales, tiempo después del cual se midió la absorbancia de cada pocillo en un lector de placas

a 490 nm de longitud de onda. Cada concentración estudiada se sembró por triplicado en cada placa y el ensayo fue realizado cuatro veces, por lo tanto, cada condición fue repetida en 12 pocillos.

Se realizaron análisis estadísticos paramétricos (ANOVA y Test Tukey-Kramer) con los resultados obtenidos de los ensayos de toxicidad *in vitro*, utilizando el programa **GraphPad Prism 4.0**.

2.12 Interacción de conjugados AuNPs con A β

Se preparó una solución homogénea de A β ₁₋₄₂ libre de agregados, utilizando una variante del protocolo de Zagorsky (74). En un primer paso, el péptido A β ₁₋₄₂, fue disuelto en agua y fraccionado en viales de vidrio para su posterior liofilización. En el mismo vial donde fue liofilizado A β ₁₋₄₂ se adicionó un pequeño volumen de ácido trifluoroacético (TFA) para eliminar los agregados preexistentes. Con la finalidad de eliminar el TFA, la muestra fue evaporada utilizando una corriente de nitrógeno, luego se añadió 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol, evaporando la solución nuevamente. Este último paso fue repetido tres veces antes de desecar la muestra. Posteriormente la alícuota desecada fue cuidadosamente resuspendida en 18 μ L de NaOH y 10 μ L de tampón fosfato 200 mM por cada 100 μ L de la solución A β ₁₋₄₂ a preparar. De acuerdo a lo anterior se obtuvo una solución de A β ₁₋₄₂ con una concentración final de 40 μ M la cual fue fraccionada en cuatro alícuotas de 50 μ L cada una e incubada a 37°C por 4 horas, bajo suave agitación. Todas las soluciones fueron cuidadosamente filtradas utilizando un filtro de 0,22 μ m.

Finalizadas las cuatro horas de tratamiento se evaluó la interacción entre los conjugados péptidos-AuNPs y A β ₁₋₄₂, para lo cual se añadió a la muestra 150 μ L de una solución 1 nM de los conjugados CLPFFD-NH₂-AuNP, CDLPFF-NH₂-AuNP, CLPDFF-NH₂-AuNP y AuNP sin conjugar, obteniéndose una concentración final del péptido A β ₁₋₄₂ de 10 μ M. Las muestras fueron incubadas a 37°C bajo suave agitación, por un período de 44 y 164 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación las muestras fueron analizadas por MET para lo cual se utilizaron rejillas de cobre recubiertas con carbono. La preparación de la rejilla se llevó a cabo diluyendo 1 μ L de cada muestra incubada (10 mM) hasta alcanzar una concentración 1 mM del péptido A β ₁₋₄₂, utilizando para ello tampón fosfato salino 20 mM (pH= 7,4). Luego las muestras fueron adsorbidas por un minuto sobre la rejilla de carbono y después de un par de lavados con agua Milli-Q se llevó a cabo la tinción con acetato de uranilo al 2%, para posterior visualización en el microscopio electrónico.

Posterior a la preparación de las rejillas de MET y con el fin de evaluar cuantitativamente la unión de las AuNPs y sus conjugados a las fibras amiloides, las muestras fueron centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos. El *pellet* obtenido fue lavado con buffer fosfato 20 mM, centrifugando nuevamente otros 5 minutos. Así los sobrenadantes provenientes de la primera y segunda centrifugación, fueron mezclados para luego liofilizarlos junto a los *pellets* obtenidos en una primera fase. El oro presente en cada fracción fue cuantificado utilizando la técnica Espectrometría de masa acoplada inductivamente a plasma (ICP-MS), determinación que se llevó a cabo en el Centro para el desarrollo de la Química, CEPEDQ, ubicado Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización de AuNPs

Caracterización por espectrofotometría UV-Visible de AuNPs: Las AuNPs obtenidas por el método de Turkevich mostraron una longitud de onda de absorción máxima a 520-522 nm, mientras que las AuNPs obtenidas por el método de Levy a 518-520nm, lo cual puede correlacionarse con tamaños de partícula menores para el caso de las últimas, respecto a las primeras (a mayor λ máximo mayor es el tamaño de las partículas) (23). La figura 12 muestra los picos de absorción para ambas AuNPs obtenidas siguiendo los dos métodos de síntesis, destacándose en el gráfico las AuNPs obtenidas según el método de Levy, las cuales presentaron un pico más estrecho, lo cual indica una distribución de tamaños más homogénea. Sin embargo los valores máximos de absorbancia difieren entre sí, debido a que en ambas metodologías se emplean diferentes cantidades iniciales de HAuCl_4 , originando diferentes concentraciones de AuNPs.

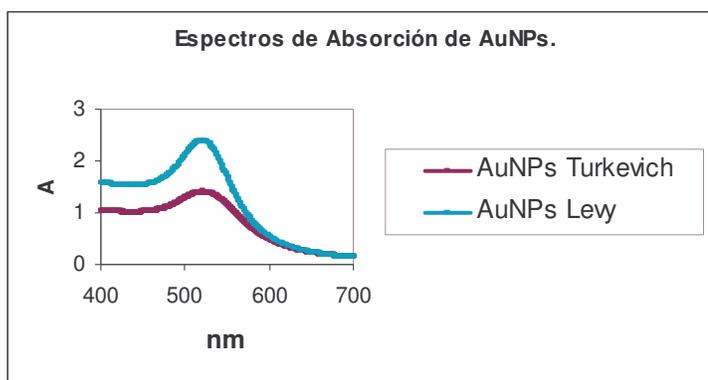


Figura 12. Espectro de absorción UV-visible de AuNPs.

Caracterización por MET de las AuNPs: Las AuNPs sintetizadas por el método de Turkevich presentaron tamaños de $20,6 \text{ nm} \pm 3,7 \text{ nm}$ (promedio total de las mediciones \pm la desviación estándar), destacándose tamaños de partícula de 20 nm (Figura 13). Por otro lado las AuNPs sintetizadas por el método de Levy presentaron

tamaños del orden de los $12,5 \text{ nm} \pm 1,7 \text{ nm}$ (promedio total de las mediciones \pm la desviación estándar), destacándose tamaños de partícula de 12-13 nm (Figura 14). Las imágenes obtenidas por MET mostraron una clara diferencia en la regularidad de los tamaños para cada una de las síntesis, en este caso las partículas de Levy mostraron un menor tamaño y más homogéneo, sugiriendo que un cambio en la relación sal de oro/agente reductor (1:3), en comparación al método de Turkevich (1:8), sería el responsable de dicho fenómeno.

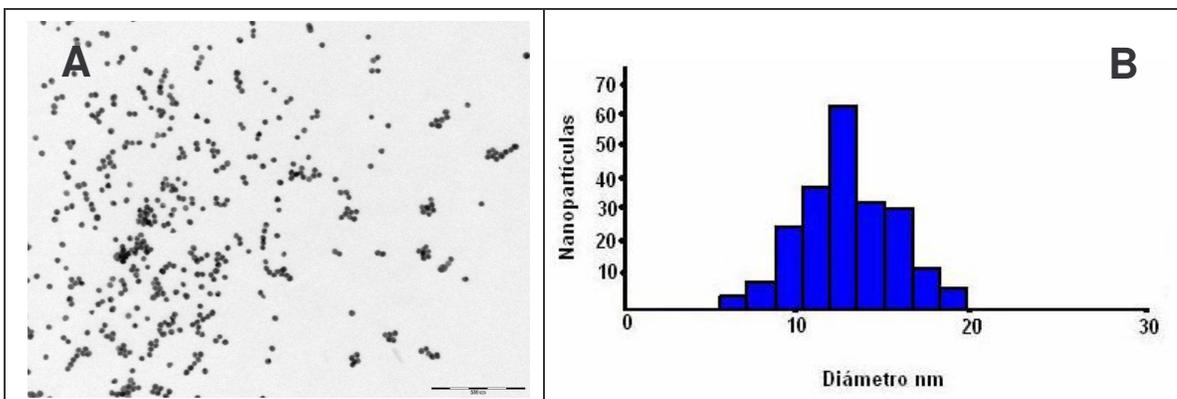


Figura 13. (A) Fotografía de AuNPs de Levy obtenidas por MET, (B) Distribución de tamaños de AuNPs sintetizadas por el método de Levy. La distribución de tamaños de la gráfica corresponde a la medición de 200 partículas desde las fotos obtenidas por MET, utilizando el programa **Image J**. El promedio total de las mediciones con la correspondiente desviación estándar fue calculado utilizando el programa **Origin Pro 7.5**.

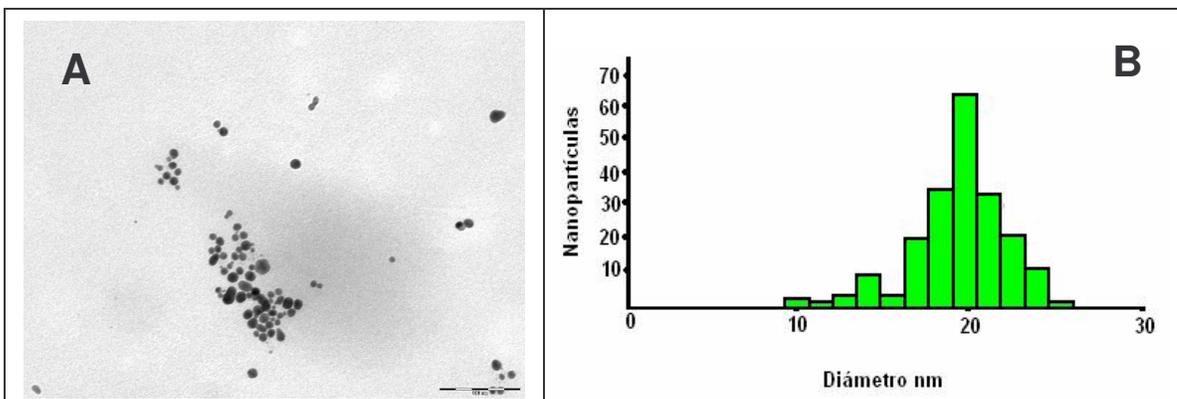


Figura 14. (A) Fotografía de AuNPs de Turkevich obtenidas por MET, (B) Distribución de tamaños de AuNPs sintetizadas por el método de Turkevich. La distribución de tamaños de la gráfica corresponde a la medición de 200 partículas tomadas desde las fotos obtenidas por MET, utilizando el programa **Image J**. El promedio total de las mediciones con la correspondiente desviación estándar fue calculado utilizando el programa **Origin Pro 7.5**.

3.2 Caracterización de NPs de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$

Caracterización por MET de NPs de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$: La figura 15 muestra la imagen de MET obtenida para las NPs sintetizadas. El tamaño de partícula fue de $8,0 \text{ nm} \pm 2,0 \text{ nm}$, observándose además un importante grado de agregación, posiblemente debido a la presencia de una red de polimetacrilato en la superficie de las NPs o bien que durante el proceso de polimerización se produjo un recubrimiento inespecífico, abarcando a más de una partícula.

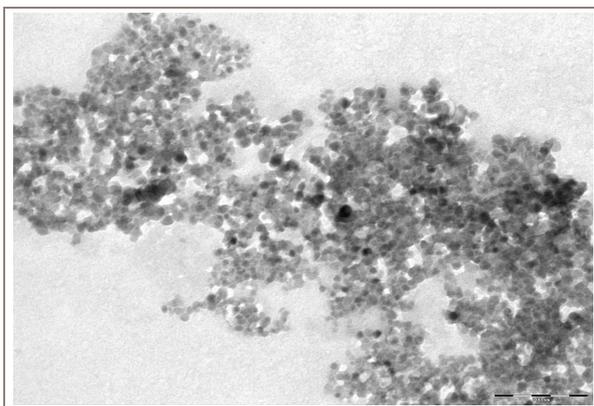


Figura 15. Fotografía de NPs de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ obtenidas por MET.

Caracterización por METAR y difracción de electrones: Se obtuvieron imágenes por METAR de las partículas sintetizadas, mediante las cuales se identificó la ultraestructura (Figura 16). En el análisis por difracción de electrones se obtuvo un patrón de difracción policristalino característico de las partículas de óxido de hierro, para lo cual fue necesario comparar los resultados de la difracción con valores estándares para este óxido. Para ello se realizó una búsqueda en una base de datos, encontrándose patrones de difracción que podrían corresponder a la magnetita ($4,9$; $2,5$ y $1,7 \text{ \AA}$) o a la maghemita ($2,9$; $2,5$ y $1,4 \text{ \AA}$). Los valores experimentales observados fueron $2,9$; $2,5$ y $1,7 \text{ \AA}$, por lo tanto las NPs sintetizadas podrían ser de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), magnetita (Fe_3O_4) o una mezcla de ambos óxidos de hierro, sin embargo como las NPs de magnetita se oxidan en presencia de aire, lo más probable

es que las NPs obtenidas en la síntesis sean de maghemita, según se describe en la referencia de Yu (31), sobre la cual se basó este trabajo para la obtención de este óxido de hierro en particular. Por otra parte, mediante el presente estudio puede descartarse que las NPs sean de hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) (2,69; 1,9; 2,51; 2,53; 1,48 y 2,97 Å).

Otras de las determinaciones que podrían realizarse para confirmar el tipo de cristal obtenido es la difracción de rayos X, medidas que actualmente se están llevando a cabo. Es importante destacar que tanto la magnetita como la maghemita son empleadas en biomedicina y aunque la magnetita pueda ser más tóxica, lo que se busca es estabilizar y biocompatibilizar NPs de óxido de hierro estables, de manera de reducir su toxicidad.

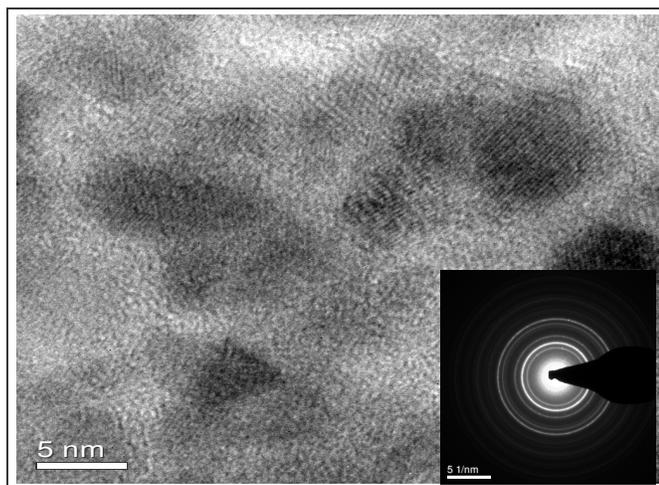


Figura 16. Fotografía de NPs de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ obtenidas por METAR a 490000X. La imagen inserta en la fotografía, corresponde al patrón de difracción de electrones obtenido para las NPs sintetizadas.

3.3 Caracterización de péptidos de interés biológico: Los péptidos purificados fueron analizados por CLAE y se obtuvieron los cromatogramas que se detallan en las figuras 17 y 18 para los péptidos disruptores de $\text{A}\beta$ y figuras 19 y 20 para los péptidos BN y RAF derivados de secuencias antitumorales.

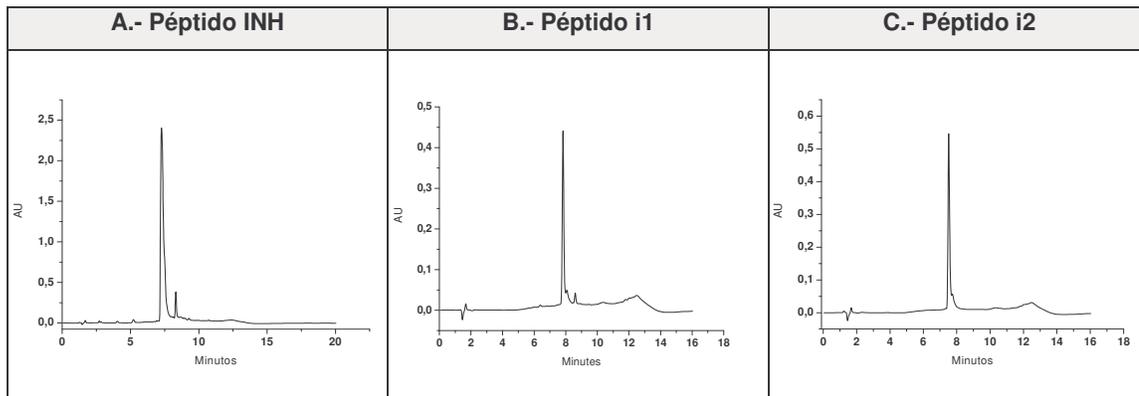


Figura 17. A, B y C cromatogramas de los péptidos INH, i1 e i2, respectivamente. Gradiente lineal de 20% a 80% de B en A en un tiempo de 15 minutos. Donde A agua/0,045% TFA (v/v) y B acetonitrilo/0,036% TFA (v/v), flujo 1,2 mL/minuto, rampa 0,2 mL/minuto, temperatura de columna 45°C, volumen inyectado 20 μ L.

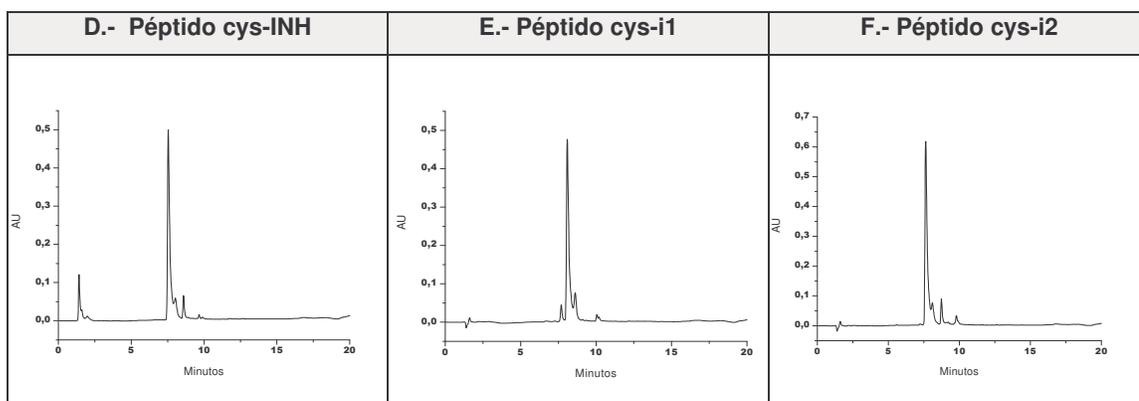


Figura 18. D, E y F cromatogramas de los péptidos cys-INH, cys-i1 y cys-i2, respectivamente. Gradiente lineal de 25% a 75% de B en A en un tiempo de 15 minutos. Donde A agua/0,045% TFA (v/v) y B acetonitrilo/0,036% TFA (v/v), flujo 1,2 mL/minuto, rampa 0,2 mL/minuto, temperatura de columna 45°C, volumen inyectado 20 μ L.

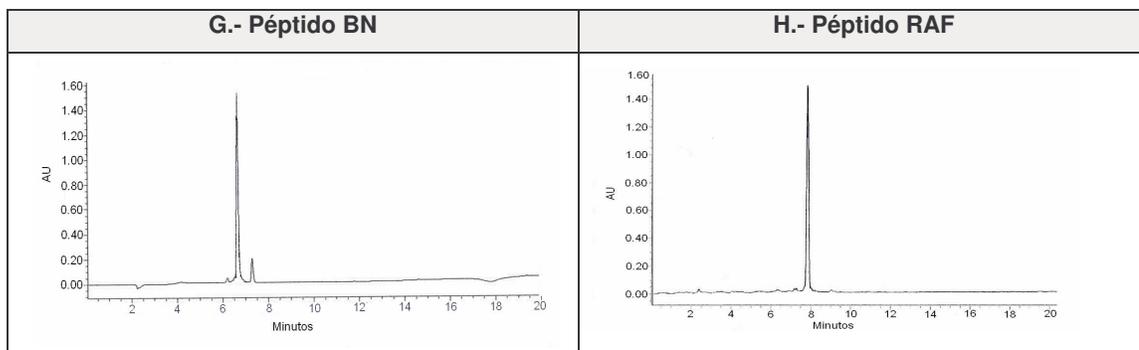


Figura 19. G y H cromatogramas de los péptidos BN y RAF respectivamente. Gradiente lineal de 0% a 100% de B en A en un tiempo de 15 minutos. Donde A agua/0,045% TFA (v/v) y B acetonitrilo/0,036% TFA (v/v), flujo 1,0 mL/minuto, rampa 0,2 mL/minuto, temperatura de columna 25°C, volumen inyectado 20 μ L.

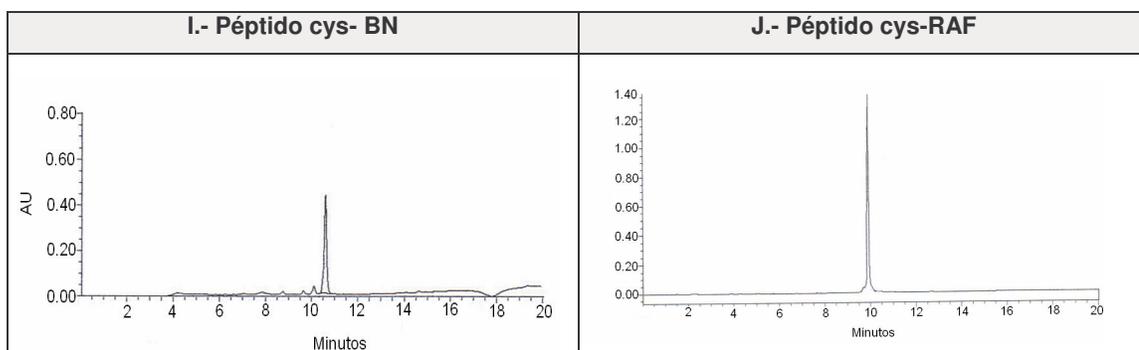


Figura 20. I y J cromatogramas de los péptidos cys-BN y cys-RAF, respectivamente. Gradiente lineal de 20% a 50% de B en A en un tiempo de 15 minutos. Donde A agua/0,045% TFA (v/v) y B acetonitrilo/0,036% TFA (v/v), flujo 1,0 mL/minuto, rampa 0,2 mL/minuto, temperatura de columna 25°C, volumen inyectado 20 μ L.

En los análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF se obtuvieron los iones cuasimoleculares de los péptidos sintetizados (Figuras 21, 22 y 23)

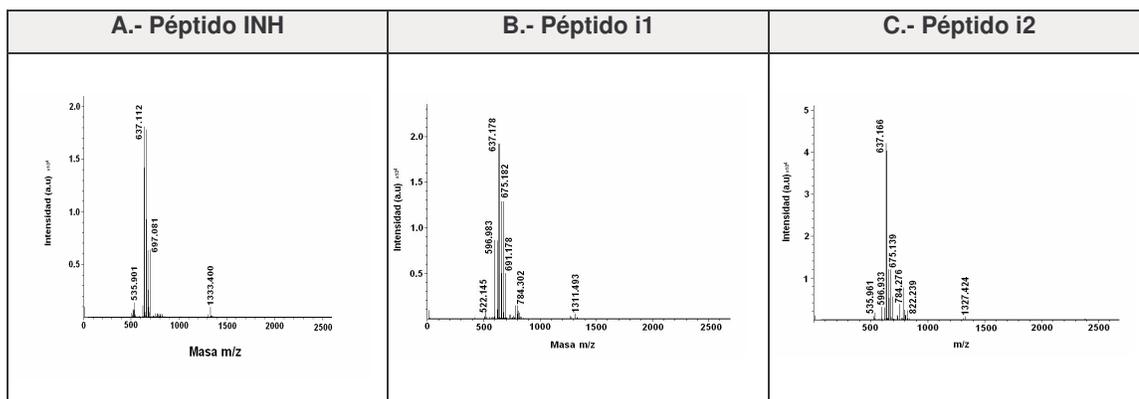


Figura 21. Principales picos observados en los espectros de masa de los crudos correspondientes a los péptidos: INH $[M+ H+]$ 637.112 (638.8) (**A**), i1 $[M+ H+]$ 637.178 (638.8) y $[M+ K+]$ 675.182 (676.8) (**B**), i2 $[M+ H+]$ 637.166 (638.8) y $[M+ K+]$ 675.139 (676.8) (**C**).

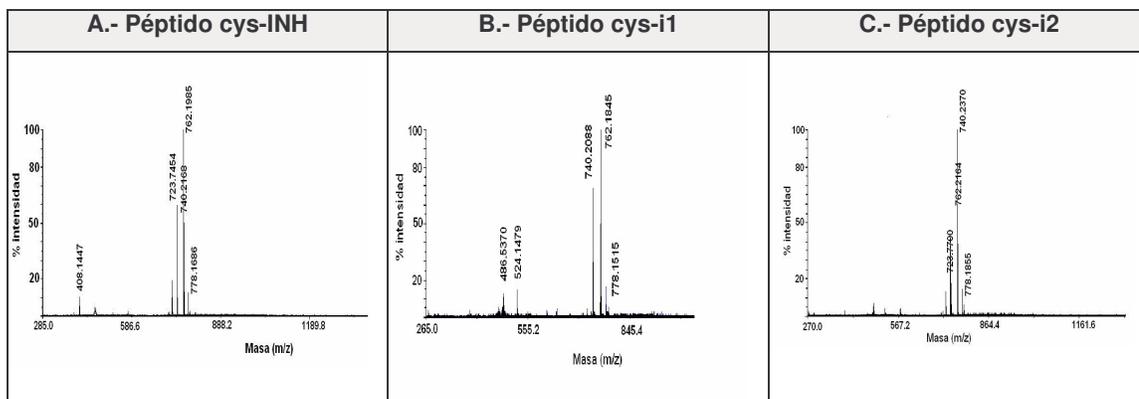


Figura 22. Principales picos observados en los espectros de masa de los crudos correspondientes a los péptidos: cys-INH [M+ H⁺] 740.208 (741.0), [M+ Na⁺] 762.184 (764.0) y [M+ K⁺] 778.151 (780.0) **(A)**, cys i1 [M+ H⁺] 740.216 (741.0), [M+ Na⁺] 762.199 (764.0) y [M+ K⁺] 778.169 (780.0) **(B)**, cys i2 [M+ H⁺] 740.237 (741.0), y [M+ K⁺] 778.185 (780.0) **(C)**.

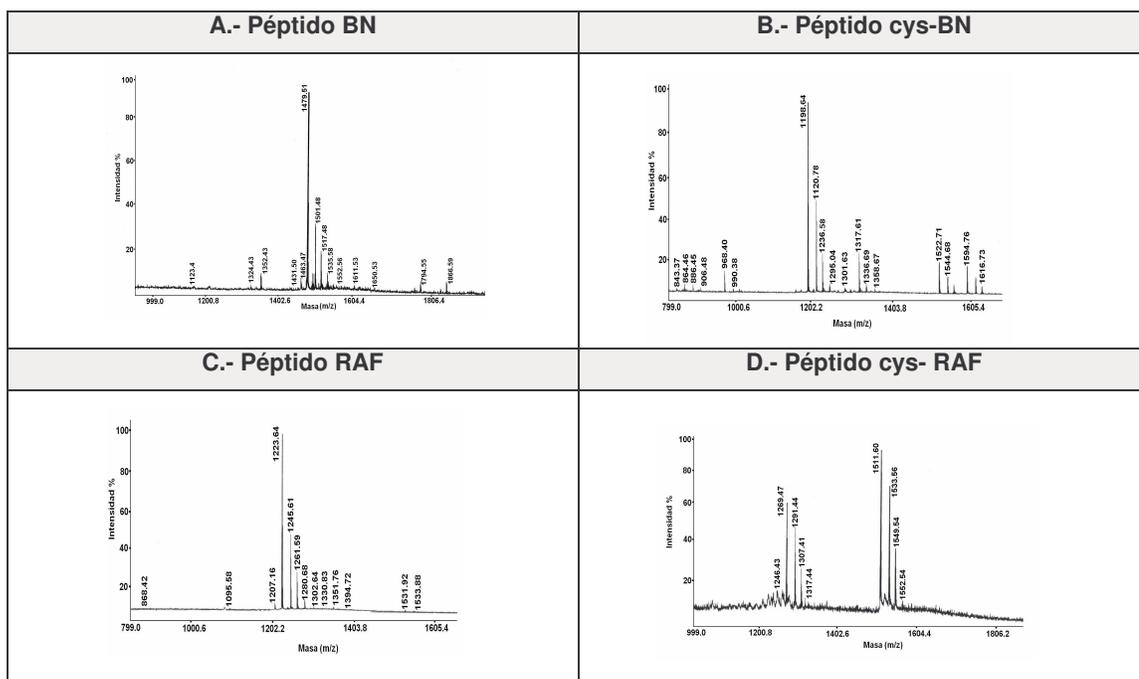


Figura 23. Principales picos observados en los espectros de masa de los crudos correspondientes a los péptidos: BN [M+ H⁺] 1479.51 (1479.85), [M+ Na⁺] 1501.48 (1501.85) y [M+ K⁺] 1517.48 (1517.85) **(A)**, cys BN [M+ H⁺] 1198.64 (1198.58), [M+ Na⁺] 1120.78 (1220.58) y [M+ K⁺] 1236.74 (1236.58) **(B)** RAF [M+ H⁺] 1223.64 (1223.68), [M+ Na⁺] 1245.61 (1245.68) y [M+ K⁺] 1261.59 (1261.68) **(C)**, y cys-RAF [M+ H⁺] 1269.47 (1269.63), [M+ Na⁺] 1291.44 (1291.63) y [M+ K⁺] 1307.63 (1307.63) **(D)**.

3.4 Caracterización de los conjugados AuNP y NP de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$

Caracterización de conjugados de AuNPs: La conjugación a los diferentes péptidos se llevó a cabo utilizando las AuNPs sintetizadas por el método de Levy y col. (23), ya que estas partículas demostraron tener un menor tamaño y a su vez una mayor homogeneidad de tamaños. Al conjugar las AuNPs a los péptidos cys-INH, cys-i1 y cys- i2 se obtuvieron coloides que fueron estables por varios meses. En cambio, los conjugados de AuNPs con los péptidos cys-BN y cys-RAF mostraron un grado de agregación importante, observándose un brusco cambio de color; desde el rojo oscuro (característico de los coloides de Au) a un color azul intenso con presencia de un precipitado, razón por la cual no fue posible caracterizarlas ni tampoco realizar los ensayos de toxicidad y actividad biológica. Es importante destacar que este fenómeno de agregación puede deberse al gran carácter hidrofóbico que presentan estas moléculas.

Espectrofotometría UV-Visible: Los conjugados de AuNPs con los péptidos cys-INH, cys-i1 y cys-2 mostraron máximos de absorción a los 527, 526 y 528 nm, respectivamente (Figura 24). El desplazamiento en el máximo de absorbancia observado en los conjugados con respecto a las AuNPs sin cubrir, podría atribuirse a una modificación en el plasmón superficial de la partícula, como consecuencia de su conjugación con el péptido.

A pesar de que esta técnica no da cuenta de la cantidad de péptido unido a la NP, la definición de las bandas y la homogeneidad de las mismas podrían dar cuenta de que el grado de recubrimiento del péptido sobre la partícula es relativamente uniforme.

Estimación del grado de recubrimiento peptídico de las AuNPs: Para establecer el número de moléculas de péptido por AuNP se dividió la concentración de cada péptido obtenida mediante el AA con la concentración de AuNPs en la muestra del conjugado en la solución original (Tabla 1). La concentración de las AuNPs se determinó en cada conjugado (antes de la centrifugación y diálisis), empleando la Ley de Beer ($A = abc$).

Tabla 1. Número de moléculas de péptido por AuNP				
Conjugado	AuNPs μM	Péptido μM	*Péptido/AuNP	**a ($\text{cm}^{-1} \text{mol}^{-1}\text{L}$)
INH-AuNP	0,043	19,77	460	$5,14 \times 10^4$
i1-AuNP	0,040	8,27	207	$5,14 \times 10^4$
i2-AuNP	0,042	17,66	420	$5,14 \times 10^4$
* corresponde al número de moléculas de péptido por AuNP.				
** a corresponde a la absorptividad molar (62).				

Obsérvese en la tabla 1, que la cantidad de péptido por AuNP de mayor a menor es de cys-INH>cys-i2>cys-i1, considerando que el tamaño de la AuNP es aproximadamente de 13 nm existe una superficie de 531 nm^2 para ser ocupada por el péptido. En este sentido los péptidos cys-INH y cys-i2 estarían recubriendo la superficie de la AuNP, encontrándose las moléculas dispuestas transversalmente respecto la superficie (considerando que cada uno de ellos ocupara alrededor de 1 nm^2 , siendo el diámetro de $0,6 \text{ nm}$ si la molécula adopta una conformación extendida según cálculos de modelado molecular realizados con el programa Insight II), en cambio en el caso del péptido cys-i1 las moléculas estarían dispuestas adyacentemente a la superficie de la NP. Para el caso de cys-INH y cys-i2, la disposición transversal de las moléculas puede explicarse por la repulsión existente entre los grupos carboxílicos pertenecientes a los residuos aspárticos, que se encontrarían más lejanos a la superficie de la AuNP, evitando así que se produzca la autoagregación de las moléculas de péptido y la formación de dominios que impidan la

conjugación de nuevas moléculas. Por otro lado, en el caso de cys-i1 los grupos hidrofóbicos (LFF) expuestos al agua se aglomerarían impidiendo la incorporación de nuevas moléculas (Figura 26).

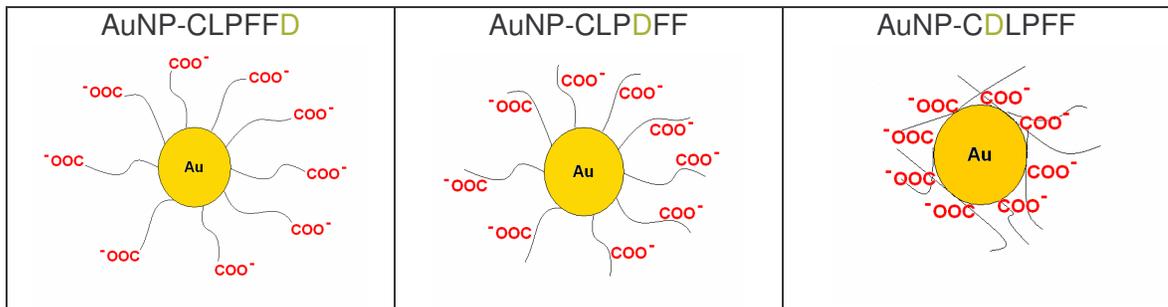


Figura 26. Esquema que muestra como el ácido aspártico influye en la interacción de los conjugados con las fibras amiloides, lo que explicaría la diferencia en los resultados tabulados en la tabla 1.

Tinción negativa y observación por MET: Se obtuvieron imágenes de tinción negativa para el conjugado INH-AuNP. En la figura 27 se observa como el péptido se encuentra recubriendo a las AuNPs (flecha negra).

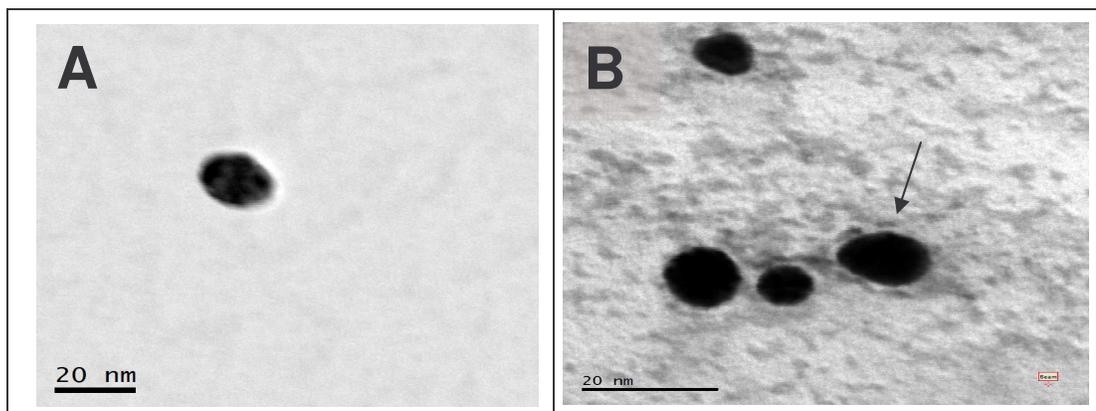


Figura 27. Fotografía control del conjugado INH-AuNPs. **(A).** Fotografía de MET del conjugado INH-AuNP después de realizar la tinción con acetato de uranilo al 2%. **(B)**

FEX: En la figura 28 se observan los resultados que dan cuenta de la presencia de azufre en aquellos *pellets* de AuNPs conjugadas a los péptidos cys-INH, cys-i1 y

cys-i2. Estos resultados indican que efectivamente el péptido se encuentra unido a la AuNPs, ya que el azufre detectado proviene del grupo tiol perteneciente a la cisteína que forma parte de los péptidos antes mencionados. Muy diferente es el caso de AuNPs sin conjugar a péptidos, en las cuales no se observa la presencia de azufre.

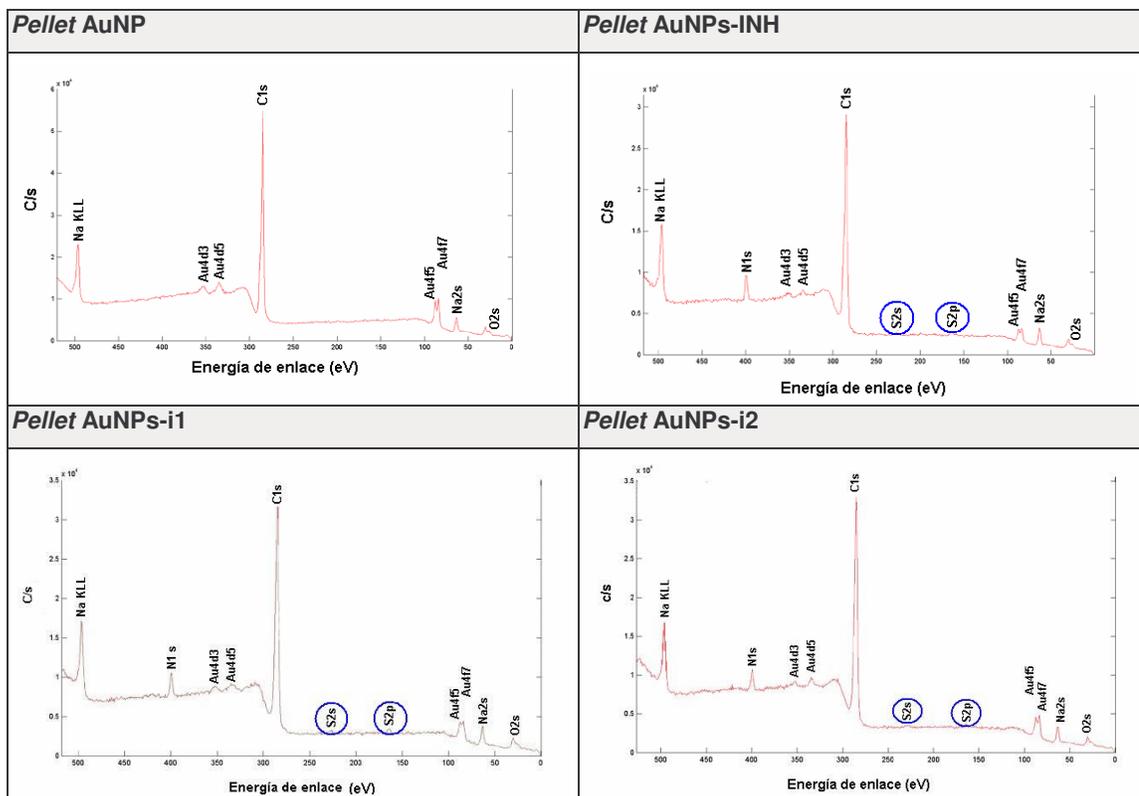


Figura 28. Espectros obtenidos por FEX para los conjugados de AuNPs con los péptidos cys-INH, cys-i1 y cys-i2. El círculo azul destaca la presencia de azufre en los conjugados, lo cual es indicativo de que efectivamente los péptidos se unieron a las AuNPs mediante la reacción del grupo tiol de la cisteína con el oro.

Estimación de la eficiencia en la conjugación del péptido a la AuNP: Se determinó el porcentaje de conjugación de los diferentes péptidos unidos a las AuNPs, ya que en el proceso de conjugación se utiliza un exceso de péptido (1 mg/mL). Para ello se interpolaron las áreas bajo la curva (ABC), obtenidas para cada sobrenadante, en las curvas de calibración (Apéndice 1) preparadas previamente, con las cuales se

obtuvo la molaridad (M) del péptido no conjugado a la NP y por ende el porcentaje unido a ella. (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentaje de conjugación de los diferentes péptidos a las AuNPs.			
Péptido	ABC	M	% de péptido conjugado
Cys- INH	10.720.668	$1,59 \times 10^{-3}$	74
Cys-i1	28.596.848	$3,68 \times 10^{-3}$	58
Cys-i2	9.655.230	$1,47 \times 10^{-3}$	83

Gradiente lineal de 25% a 75% de B en A en un tiempo de 15 minutos. Donde A agua/0,045% TFA (v/v) y B acetonitrilo/0,036% TFA (v/v), flujo 1,2 mL/minuto, rampa 0,2 mL/minuto, temperatura de columna 45°C, volumen inyectado 20 μ L. Los % de conjugación basados en la cantidad inicial de péptido agregado a las NPs (1 mg), lo que correspondería al 100%.

Correlacionando estos resultados con el número de moléculas de péptido por AuNP determinado anteriormente, podemos observar que los péptidos INH e i2 estarían recubriendo en un gran porcentaje a la AuNP, ya que paralelamente, mediante CLAE, observamos una mayor eficiencia en la conjugación de estos péptidos a la AuNP comparado con el péptido cys-i1.

Caracterización de los conjugados de NPs de γ -Fe₂O₃: En las microfotografías obtenidas por MET de los conjugados de los péptidos INH, i1 e i2 (Figura 29) con las NPs de γ -Fe₂O₃ se observa un importante grado de agregación. Desde este punto de vista, resultó imposible realizar el estudio de interacción con las fibras amiloides, ya que al estar agregadas no podríamos visualizar la posible interacción entre los agregados tóxicos y los conjugados de NPs. Este es un punto que sin duda debemos corregir, es por ello que en nuestro laboratorio estamos trabajando en la obtención de NPs de γ -Fe₂O₃ recubiertas con oro, biocompatibilizadas y estabilizadas con los péptidos, para evitar la agregación de las partículas pero conservando sus propiedades magnéticas.

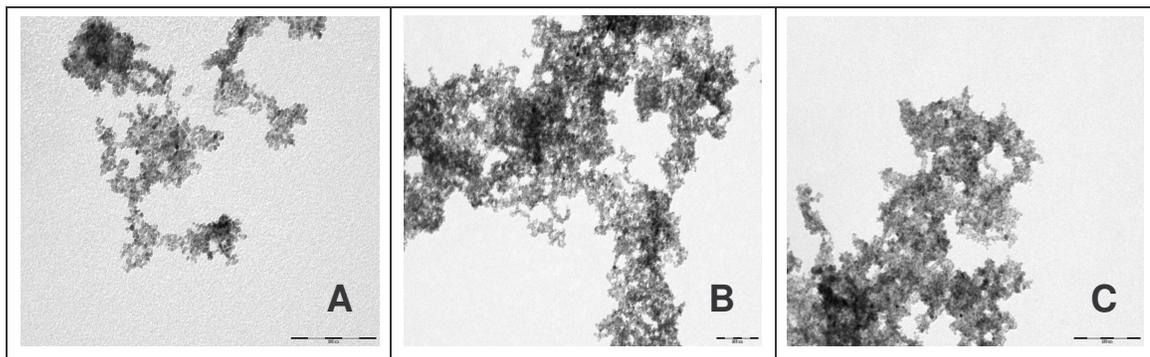


Figura 29. Fotografía obtenida por MET de los conjugados de los péptidos INH, i1 e i2 con NPs de γ -Fe₂O₃. La barra de aumento corresponde a 200 nm donde (A) conjugado INH- NPs de γ -Fe₂O₃ NPs (B) conjugado i1- NPs de γ -Fe₂O₃ NPs y (C) conjugado i2- NPs de γ -Fe₂O₃.

Estimación de la eficiencia en la conjugación del péptido a la NP de óxido de hierro: Para establecer la eficiencia en la conjugación de los péptidos a las NPs, en una primera instancia se determinó el porcentaje de conjugación de los diferentes péptidos unidos a las NPs γ -Fe₂O₃, para lo cual se interpolaron las áreas bajo la curva (ABC) obtenidas para cada sobrenadante mediante CLAE, en las curvas de calibración (Apéndice 1) preparadas previamente, con las cuales se obtuvo la molaridad del péptido no conjugado a la NP y por ende el porcentaje unido a ella. (Tabla 3). En el caso de los péptidos INH, i1 e i2 se pesaron 1,13 mg, 0,70 mg y 1,11 mg, respectivamente.

Tabla 3. Porcentaje de conjugación de los diferentes péptidos a las NPs de γ -Fe ₂ O ₃ .			
Péptido	ABC	Concentración M	% de péptido conjugado
INH	9220096	$1,59 \times 10^{-3}$	10
I1	8231338	$1,30 \times 10^{-3}$	24
I2	8583268	$1,17 \times 10^{-3}$	32
BN	4150579	$1,39 \times 10^{-4}$	72
RAF	3071033	$3,21 \times 10^{-4}$	64

Para los péptidos **INH, i1 e i2**: Gradiente lineal de 20% a 80% de B en A en un tiempo de 15 minutos. Donde A agua/0,045% TFA (v/v) y B acetonitrilo/0,036% TFA (v/v), flujo 1,2 mL/minuto, rampa 0,2 mL/minuto, temperatura de columna 45°C, volumen inyectado 20 μ L. Para los péptidos **BN y RAF**: Gradiente lineal de 0% a 100% de B en A en un tiempo de 15 minutos. Donde A agua/0,045% TFA (v/v) y B acetonitrilo/0,036% TFA (v/v), flujo 1,0 mL/minuto, rampa 0,2 mL/minuto, temperatura de columna 25°C, volumen inyectado 20 μ L. Los porcentajes de conjugación se referenciaron a la solución inicial como 100%, que corresponde a la cantidad de péptido agregado inicialmente a 10 mL de NPs.

Posteriormente se determinó la cantidad de grupos carboxilos presentes en la superficie de las NP de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, lo cual se correlaciona directamente con la cantidad de moléculas de péptido que podrían conjugarse por NP. Con este valor fue posible comprobar si efectivamente los porcentajes de eficiencia obtenidos por CLAE reflejaban realmente la cantidad de péptido unido a la NP. Para ello se realizó una curva de valoración frente a ácido clorhídrico. En la figura 30 observamos la curva de pH versus mL de titulante gastados (HCl 5×10^{-4} M) en la valoración de los carboxilatos presentes en 15 mL de muestra. Mediante el análisis de estos datos en el programa **OriginPro** se determinó el punto de equivalencia y por ende los equivalentes de ácido que reaccionaron con los grupos carboxilos ubicados en la superficie de las NPs. Se realizó de la misma manera una valoración de las NPs magnéticas sin recubrir con polimetacrilato, como blanco, sin observarse consumo de valorante.

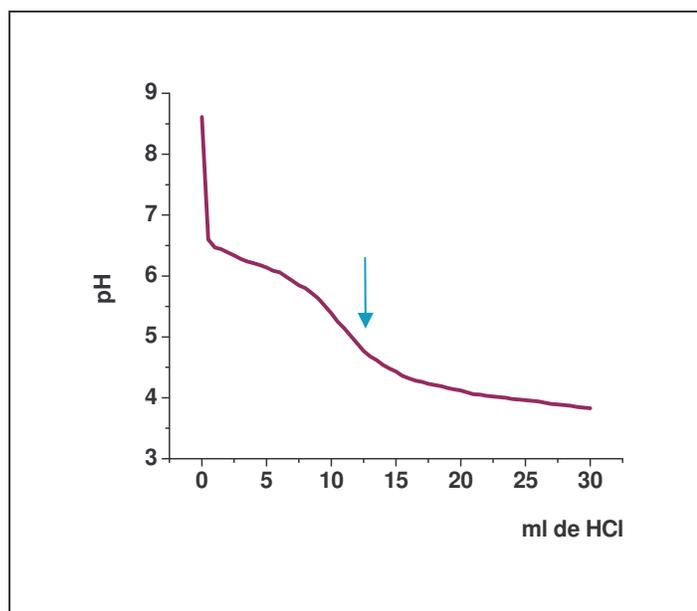


Figura 30. Curva de valoración de los carboxilatos presentes en las NPs de óxido de hierro. La flecha indica el punto en el que se produjo el salto de pH indicativo de la valoración de todos los carboxilatos presentes en la muestra. El experimento se llevó a cabo utilizando peachímetro y el análisis de los datos se realizó en el programa OriginPro.

Una vez determinados los equivalentes de ácido, se procedió a calcular el número de grupos carboxilos presente por NP, con este fin se obtuvo la concentración

de óxido de hierro presente en los 15 mL del coloide valorado anteriormente. Luego este valor sirvió para determinar los nanomoles de partículas de maghemita presentes en la muestra, teniendo en cuenta que 45 mg de este óxido contienen 3.5×10^{16} partículas de 8 nm (31) y posterior a esto se procedió a dividir los nanomoles de carboxilos (determinado por la valoración) con los nanomoles de partículas de maghemita, obteniendo como resultado que existen 646 grupos carboxilos por NP de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$.

De esta manera, conociendo el número de grupos carboxilos disponibles en cada NPs para ser conjugado con el péptido, fue posible calcular la cantidad en mg de péptido necesario para cubrir los 646 sitios disponibles por NP y por cada 10 mL de muestra, lo que correspondería a la cantidad máxima de péptido a conjugar, es decir, el 100% de eficiencia. En la tabla 4 se observan las concentraciones de hierro para cada conjugado de NP, el número de NPs de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ por L y la máxima cantidad de péptido a conjugar en 10 mL (sección 2.8) para cada muestra, según las partículas presentes en ella.

Tabla 4. Estimación del número de NPs de óxido de hierro por L y la cantidad máxima de péptido a conjugar por cada 10 mL de muestra.			
Conjugado péptido-NP	Concentración de hierro*	Número de NPs/ L **	Cantidad máxima de péptido a conjugar por 10 mL (en mg)***
INH $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	19 mg/L	2.1×10^{16}	0.14 mg
I1 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	23 mg/L	2.5×10^{16}	0.17 mg
I2 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	30 mg/L	3.3×10^{16}	2.25 mg
BN $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	156 mg/L	1.73×10^{17}	2.74 mg
RAF $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	189 mg/L	2.10×10^{17}	2.75 mg

* Valores obtenidos por absorción atómica.
 ** Cálculo en base a la cantidad de NPs presentes en 45 mg de óxido de hierro: 3.5×10^{16} partículas (31)
 *** Cálculo que se realizó considerando que los 646 carboxilos disponibles en la superficie de la NP reaccionan con 646 moléculas de péptido (1:1) y que además reaccionan todas las NPs contenidas en los 10 mL de muestra.

Con estos valores se pudo correlacionar los resultados de eficiencia obtenidos mediante CLAE, con el grado de eficiencia teórico de las NPs según número de carboxilos presentes en la superficie. (Tabla 5)

Tabla 5. Eficiencia teórica en la conjugación de los diferentes péptidos a las NPs de óxido de hierro basado en el número de grupos carboxilos presentes en la superficie.			
Conjugado péptido-NP	Cantidad máxima de péptido a conjugar por 10 mL (en mg)	Porcentaje de conjugación basado en COOH por NP	Porcentaje de conjugación detectado por CLAE
INH γ - Fe ₂ O ₃	0,14 mg	80	10
I1 γ - Fe ₂ O ₃	0,17 mg	100	24
I2 γ - Fe ₂ O ₃	2,25 mg	18	32
BN γ - Fe ₂ O ₃	2,74 mg	27	72
RAF γ - Fe ₂ O ₃	2,75 mg	24	64

Es importante destacar que la gran diferencia observada en los porcentajes de conjugación es porque en cada muestra existe diferente número de NPs, por lo tanto para lograr un 100% de conjugación la cantidad de péptido necesaria difiere de una muestra a otra. Por otro lado, a todos los conjugados se les agregó alrededor de 1 mg/mL del correspondiente péptido y por lo que observamos en la tabla 5, en el caso del RAF y BN no fue suficiente 1 mg, pero si lo fue en el caso de INH e i1. En este sentido, otro punto importante a considerar es que si en algunas muestras no fue suficiente 1 mg y de todas maneras se observó presencia de péptido en el sobrenadante por CLAE, cuando en realidad no se debería encontrar, es muy probable que en estos casos la conjugación no se llevó a cabo del todo por razones de la metodología: tiempo de activación del carboxilo, cantidad de reactivos activantes, tiempo de contacto entre el péptido y el carboxilo o que una red de polimetacrilato impidiera en algunos caso la unión péptido-NP.

3.5 Toxicidad de NPs metálicas

Toxicidad de AuNPs: se realizaron ensayos de viabilidad frente cultivos celulares neuroblastoma SHSY5Y, a las 24 horas de exposición de las células con las distintas muestras de AuNPs y sus conjugados, fueron graficados y analizados estadísticamente.

En las gráficas de la figura 31, se observa que los conjugados de péptidos con AuNPs son menos tóxicos comparado con las AuNPs sin recubrir, las cuales si presentan un grado de toxicidad a las concentraciones estudiadas. Por otro lado, cabe destacar que en la AuNPs recubiertas con el péptido cys-INH se observa un aumento en la reducción del MTT, el cual es significativamente diferente al control vivo. Este punto está siendo analizado por nuestro grupo de laboratorio.

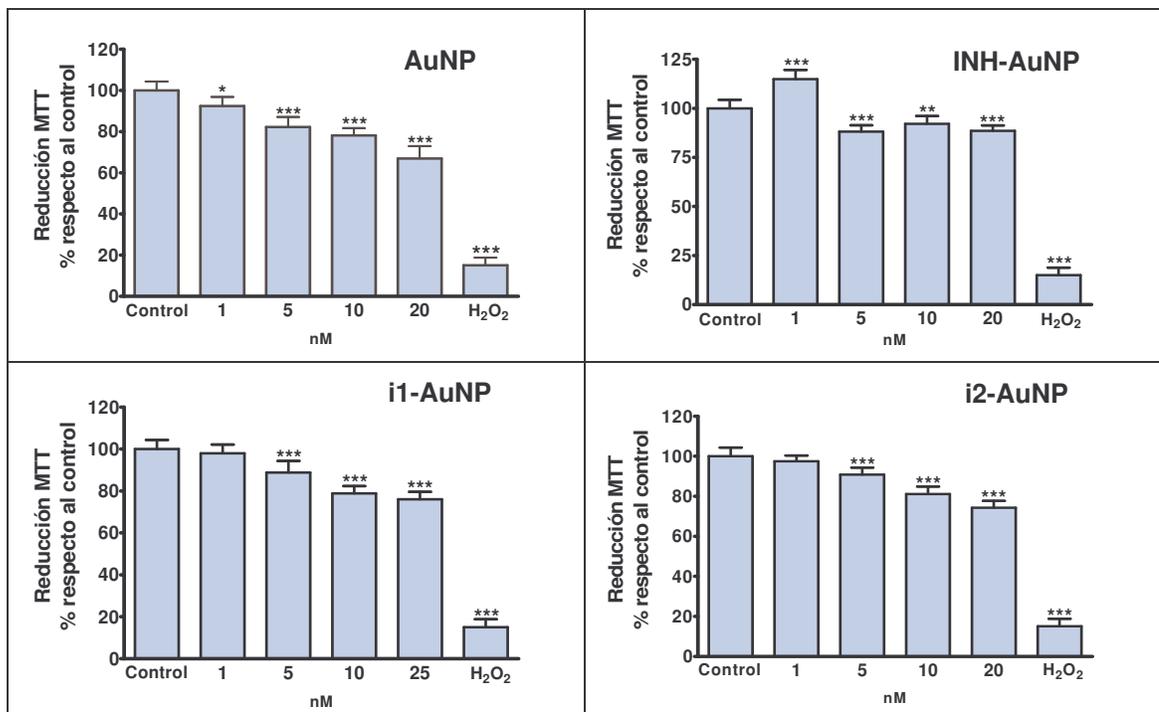


Figura 31. Gráficas de los porcentajes de viabilidad de la línea celular neuroblastoma SHSY5Y expuestas a las distintas concentraciones de AuNPs expresadas en nM, control H₂O₂ en una concentración de 0,2 %. Para todas las muestras n = 9, *** p < 0,001, ** p < 0,01, * p < 0,05 ± SD. Los resultados corresponden a tres experimentos independientes realizados por triplicado. Los controles de las gráficas representan a las células de la línea SHSY5Y cuyos pocillos contenían sólo medio de cultivo DME con un 10% de suero fetal bovino. Los ensayos realizados sólo con péptidos mostraron una viabilidad cercana a la del control con medio de cultivo.

Toxicidad de NP γ -Fe₂O₃: Se realizaron ensayos de viabilidad frente cultivos celulares (neuroblastoma SHSY5Y y HeLa), a las 24 horas de exposición de las células

con las distintas muestras de AuNPs y sus conjugados, fueron graficados y analizados estadísticamente.

Toxicidad frente a cultivos SHSY5Y: En las gráficas de la figura 32, se observan los efectos que producen las NP $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ por sí solas, así como también las unidas a los diferentes péptidos, respecto del control con células que contenían sólo medio de cultivo. La gráfica A representa el efecto que producen las NPs sin conjugar, en donde a concentraciones de 2; 1,5 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se observa que los resultados son relativamente diferentes respecto del control que contenía sólo medio de cultivo, es decir, presentarían algún grado de toxicidad frente a las células. En el caso de la gráfica B, se muestra el efecto sobre las células del conjugado INH-NP $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Aquí en la mayoría de las concentraciones, excepto a los 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de conjugado INH-NP $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, encontramos diferencias significativas con el control, aunque en este caso se observa que el efecto tóxico de la muestra va disminuyendo a medida que disminuye la concentración del conjugado. En la gráfica C, el conjugado i1-NP $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, presenta un grado de toxicidad respecto al control principalmente a las concentraciones más altas. Por último en la gráfica D se observa que el conjugado i2- NP $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ prácticamente no presenta diferencias significativas en relación al control vivo, por lo que presentarían un menor grado de toxicidad. En todos los casos el porcentaje de viabilidad se encuentra sobre el 50%.

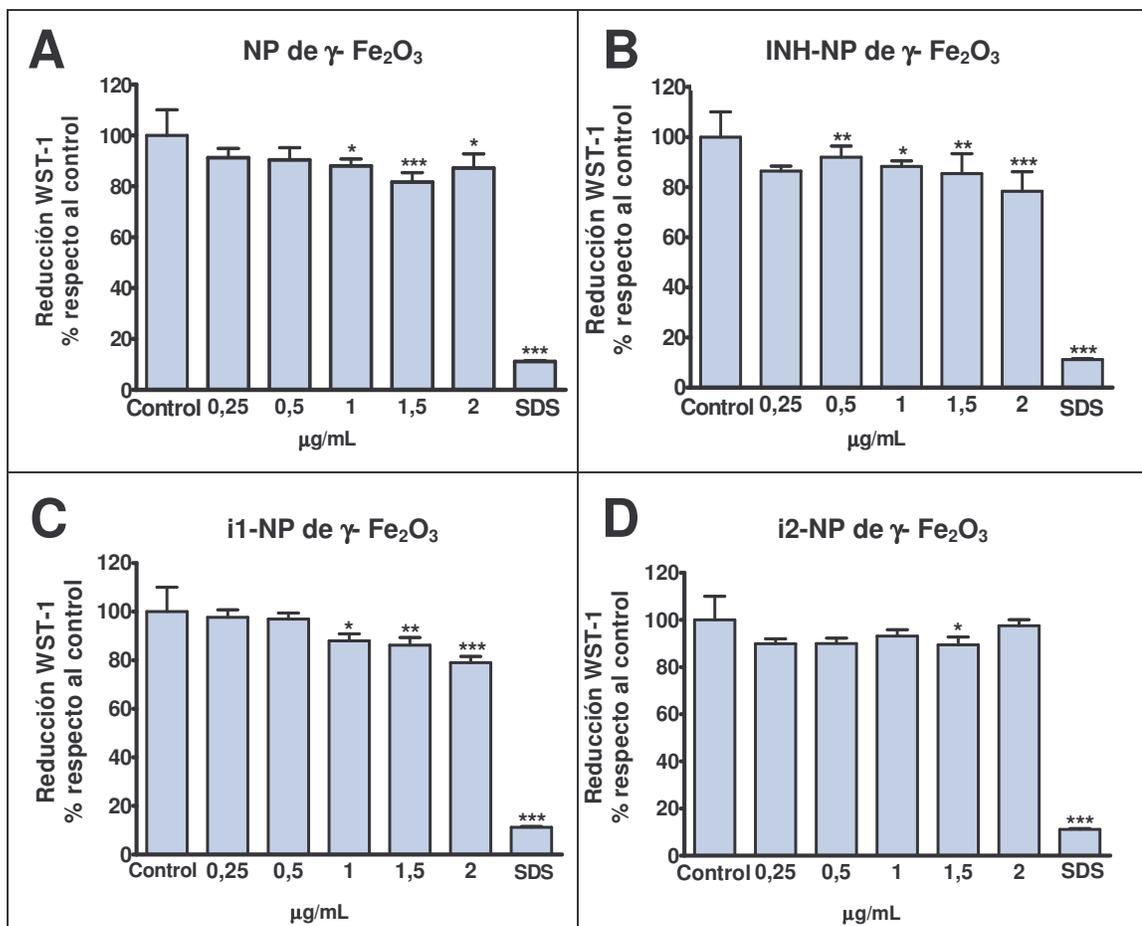


Figura 32. Gráficas de los porcentajes de viabilidad de la línea celular neuroblastoma SHSY5Y expuestas a las distintas soluciones de NPs de γ -Fe₂O₃ y sus conjugados. Las unidades expresadas en µg/mL y el SDS en una concentración de 0,2 %. Para todas las muestras n=12, *** p < 0,001, ** p < 0,01, * p < 0,05 ± SD. Los resultados corresponden a cuatro experimentos independientes realizados por triplicado. Los controles de las graficas representan a las células de la línea SHSY5Y cuyos pocillos contenían sólo medio de cultivo DME con un 10% de suero fetal bovino. Los ensayos realizados sólo con los péptidos empleados en concentraciones cercanas a las utilizadas en estos ensayos mostraron una viabilidad cercana a la del control con medio de cultivo.

A la luz de estos resultados, se realizaron análisis estadísticos paramétricos (ANOVA y Test Tukey-Kramer) adicionales para determinar si efectivamente la presencia de péptido sobre la superficie de la NP influye en la toxicidad que éstas causaron en la línea estudiada. Estos análisis revelaron que efectivamente los péptidos capaces de reconocer los agregados amiloides se encuentran biocompatibilizando a la AuNPs, razón por la cual se observó la reducción en la toxicidad de la AuNP una vez

que ésta se encontraba conjugada a dichos péptidos (Figura 31). Por otro lado, las NPs de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ no presentaron diferencias importantes, por lo que a las concentraciones estudiadas, el péptido unido a la NP de óxido de hierro no representa una ventaja sobre la partícula sin conjugar desde el punto de vista de la toxicidad. (Apéndice 2, tablas 1 y 2)

Toxicidad frente a cultivos de células HeLa: En primer lugar se determinó si los péptidos libres presentaban toxicidad frente a esta línea tumoral. Para ello se realizó una curva dosis respuesta encontrándose que los péptidos no presentaron efecto citotóxico siendo los valores de viabilidad similares al de los controles. Este hecho resultó ser llamativo ya que resultados previos de nuestro laboratorio habían arrojado resultados positivos. Este efecto podría atribuirse a una pérdida de los receptores en las células utilizadas. Para probar este hecho debería tipificarse las células del cultivo y determinar si en las mismas se encuentra expresado el receptor celular. No obstante con el fin de evaluar la toxicidad frente a estas células se realizaron los ensayos de citotoxicidad de los conjugados con las NPs $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, ya que en esta Memoria de Título se pretende evaluar este efecto. En las gráficas de la figura 33 se observa el efecto que poseen las NPs $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ y los conjugados con los péptidos BN y RAF, en relación a un control que contenía sólo células y medio cultivo. En la gráfica A y B representadas por NP $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ sin recubrir y el conjugado BN-NP $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ respectivamente, se observa el efecto que producen a distintas concentraciones sobre las células HeLa, siendo estos efectos significativamente diferentes con respecto al control que contenía sólo medio de cultivo, es decir, presentan un marcado efecto tóxico principalmente a altas concentraciones. En relación al conjugado de NPs con BN, también se observó que la presencia del péptido no potencia la toxicidad de las NPs sin recubrir. Sorprendentemente se observó que el conjugado RAF-NPs $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ presentó un comportamiento diferente, detallado en la gráfica C de la figura 33, ya que no sigue un patrón dosis-respuesta como el observado en los dos casos anteriores, aún así es posible observar que causa un aumento en la señal del WST-1 a una concentración de 25 $\mu\text{g/mL}$, lo cual no se correlaciona con el efecto que se observa tanto de las NPs sin recubrir como las conjugadas a BN a esta misma concentración.

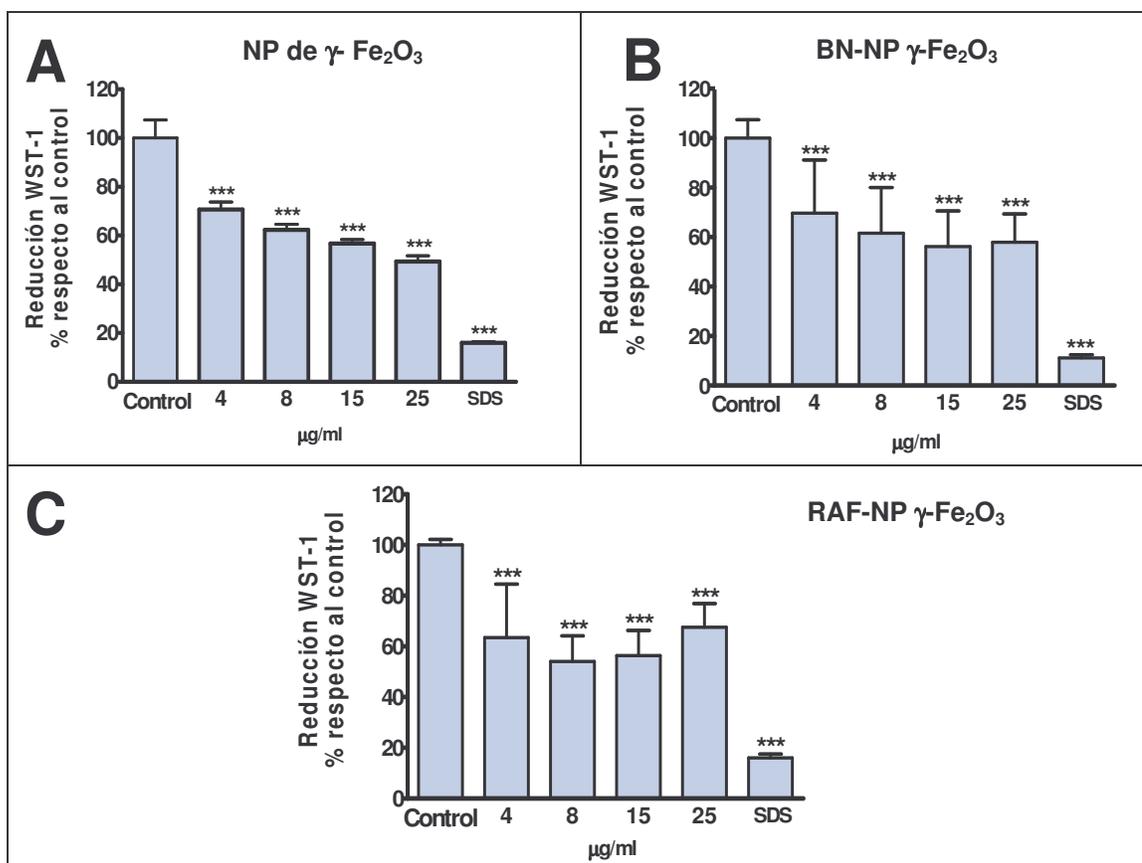


Figura 33. Graficas de los porcentajes de viabilidad de la línea celular HeLa expuestas a las distintas soluciones de NPs de γ -Fe₂O₃ y sus conjugados con los péptidos BN y RAF. Las unidades expresadas en µg/ml y el SDS a una concentración de 0,2 %. Para todas las muestras n=12, *** p < 0,001, ** p < 0,01, * p < 0,05 ± SD. Los datos corresponden a cuatro experimentos independientes realizados por triplicado. Los controles de las graficas representan a las células de la línea HeLa cuyos pocillos contenían solamente medio DME con un 10% de suero fetal bovino. Los ensayos realizados sólo con los péptidos empleados en concentraciones cercanas a las utilizadas en estos ensayos mostraron una viabilidad cercana a la del control con medio de cultivo.

El aumento en la señal de WST-1, el cual se puede correlacionar con un aumento en la viabilidad celular, observada a 25 µL del conjugado RAF-NP γ -Fe₂O₃ fue igualmente analizada mediante análisis estadísticos paramétricos (Apéndice 2, tabla 3) de los cuales se desprende que probablemente el péptido RAF estaría de cierta manera biocompatibilizando a la NP, no así el péptido BN. Es sabido que péptidos que recubren NPs de óxido de hierro contribuyen a aumentar la estabilidad y biocompatibilidad de las mismas, actuando como una barrera de contención que no

deja exponer los centros reactivos de la partícula disminuyendo en algunas ocasiones la toxicidad de las mismas (72).

Por otro lado, este aumento en la reducción del WST-1 mediada por el conjugado RAF-NP γ -Fe₂O₃ podría explicarse desde el punto de vista de estrés oxidativo, es decir, si el conjugado al interactuar con la célula, es capaz de inducir la formación de radicales libres como el anión superóxido, aumentaría la reducción del WST-1 ya que esta reducción también es catalizada por el anión superóxido (78), por lo tanto se sumaría a las sales formadas vía deshidrogenada mitocondrial. En este sentido, si en la célula los niveles de anión superóxido se encontraran efectivamente más elevados, esto llevaría a pensar que la enzima encargada de la eliminación de este radical libre, la superóxido dismutasa (SOD), se encontraría inhibida. Ahora bien, como primer paso es necesario determinar si efectivamente la señal de WST-1 encontrada para este conjugado está directamente relacionada con el número de células viables para lo cual sería necesario llevar a cabo otro tipo de experimentos como el ensayo de viabilidad azul de tripán, el cual daría cuenta del número de células viables, y en el caso de que resultados por azul de tripán no se correlacionaran con los obtenidos con el WST-1 en las mismas condiciones, entonces sería importante investigar la actividad de la SOD dentro de la célula y evaluar si este conjugado es capaz de inducir algún nivel de inhibición en la enzima.

Es importante resaltar que los péptidos derivados de secuencias antitumorales actuarían como vectores, que ayudan a dirigir las NPs al sitio de acción deseado, por lo cual el hecho de que no se manifieste su efecto citotóxico, en principio no sería un obstáculo de cara a una futura aplicación. De todas maneras en estudios posteriores deberá probarse que estos conjugados tienen la habilidad de penetrar selectivamente a las células tumorales, permitiendo una posterior irradiación selectiva y destrucción de estas células sin afectar a tejidos sanos. El hecho de reducir la toxicidad de las NPs en principio sería un efecto positivo, ya que así se reducirían los efectos sobre otras células.

3.6 Interacción de conjugados péptidos-AuNPs con A β

Las imágenes obtenidas por MET muestran que existe una interacción entre las fibras A β_{1-42} y el conjugado INH-AuNP (Figura 34, imagen B), mientras que en el caso de las AuNP sin conjugar no se observa este comportamiento. (Figura 34, imagen A). Por otro lado, los conjugados de AuNPs con los isómeros cys-i1 y cys-i2 también muestran afinidad por las fibras A β_{1-42} (Figura 34, imágenes C y D, respectivamente).

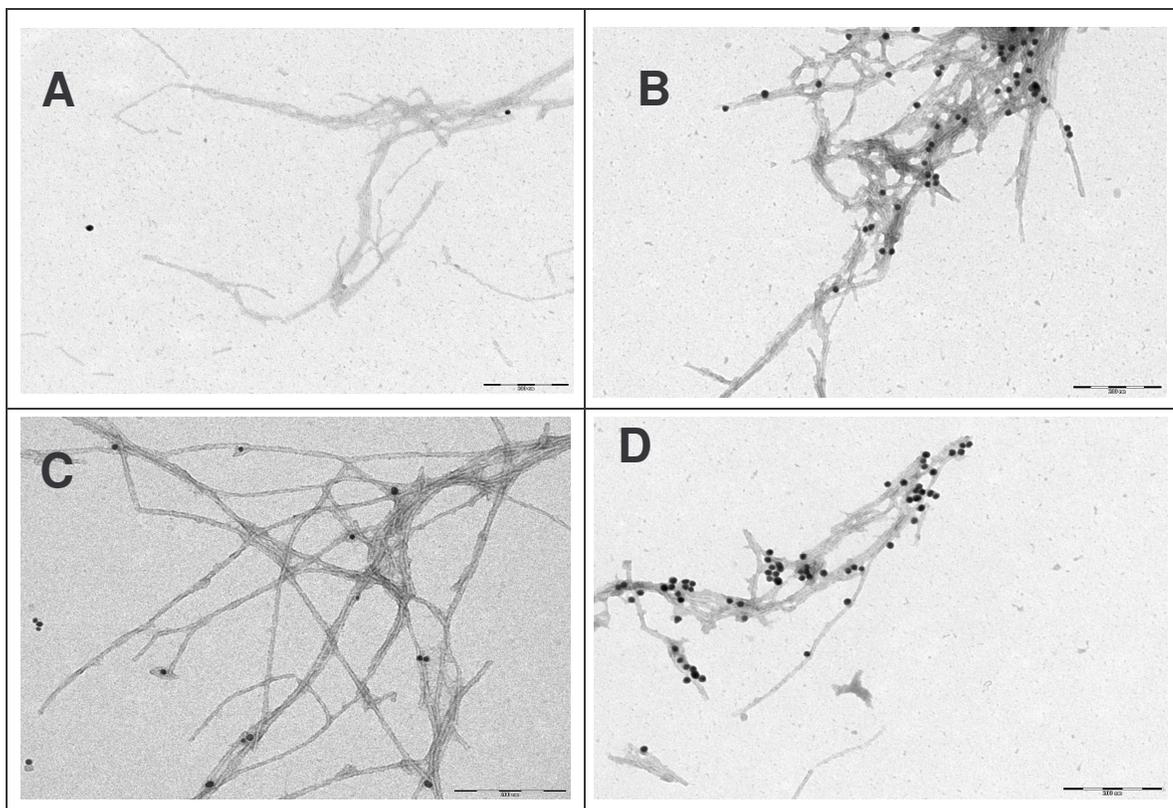


Figura 34. Interacción entre las fibras A β_{1-42} con AuNPs (A) INH-AuNP (B) i1-AuNP (C) i2-AuNP (D). Muestras incubadas por siete días. Microfotografías obtenidas por MET.

Para determinar la cantidad de oro que queda unido a la fibra y la cantidad de oro que queda en la solución, se empleó la técnica de ICP-MS, analizándose tanto el *pellet* como el sobrenadante de las muestras incubadas por 2 y 7 días. La relación (proporción) de las cantidades de oro obtenida, da cuenta del grado de interacción

entre las fibras amiloides y las AuNP conjugadas a los péptidos cys-INH, cys-i1 y cys-i2, la cual es superior a la interacción de las fibras con las AuNP sin conjugar (Tabla 6).

Tabla 6. Cantidades de oro encontradas en <i>pellet</i> y sobrenadante de las muestras incubadas con A β ₁₋₄₂ por 2 y 7 días.		
	*Relación de oro <i>pellet</i> /sobrenadante 2 días	*Relación de oro <i>pellet</i> /sobrenadante 7 días
AuNP + fibras	6,5 ± 0,2	0,2 ± 0,1
AuNP-CDLPFF-NH ₂ + fibras	3,5 ± 0,15	0,1 ± 0,05
AuNP-CLPDDFF-NH ₂ + fibras	3,0 ± 0,12	0,1 ± 0,1
AuNP-CLPFFD-NH ₂ + fibras	1,5 ± 0,15	0,03 ± 0,01
*Relación corresponde a: μg de oro en el sobrenadante / μg de oro en el <i>pellet</i>		

Tanto en cys-INH como en cys-i2 existe una repulsión de cargas de los grupos carboxílicos de los residuos Asp, que evitarían la autoagregación de los residuos de Phe. Sin embargo, es importante destacar que la interacción es mayor en el caso del conjugado CLPFFDNH₂ que con los otros dos isómeros. Posiblemente, el aminoácido aspártico al estar orientado hacia el exterior, como es el caso de las AuNP-CLPFFD, provoque una repulsión entre los grupos que forman el péptido manteniendo a las cadenas hidrofóbicas de FF alejadas, facilitando de esta manera la interacción con las fibras amiloides. En cambio en el caso del isómero AuNP-i2, el aminoácido aspártico se encuentra ubicado en el interior del conjugado, permitiendo que exista interacción entre los grupos hidrofóbicos FF, que actúan agregándose frente al agua e impidiendo la interacción con las fibras (Figura 26).

CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES

Se obtuvieron AuNPs de tamaños de 12 nm, las cuales fueron conjugadas efectivamente a los péptidos disruptores de láminas β . Los conjugados péptidos AuNPs demostraron unirse considerablemente a los agregados tóxicos de $A\beta_{1-42}$ en comparación a las AuNPs sin conjugar, encontrándose que el conjugado INH-AuNP presenta la mayor interacción con las fibras amiloides a las 48 horas y a los 7 días de incubación, seguido del conjugado i2- AuNP y el i1-AuNP. Los resultados indicaron, de la misma manera, que las modificaciones efectuadas al péptido LPFFDNH₂ que dieron origen a cys-INH y su posterior conjugación a la AuNP, no impiden la unión del péptido a los agregados amiloides, así como tampoco la de sus isómeros.

En cuanto a los ensayos de toxicidad de las AuNPs y sus conjugados, realizados frente a la línea SHSY5Y, se puede concluir que los conjugados de péptidos con partículas de oro presentan una menor toxicidad comparado con las AuNPs sin recubrir, destacándose que células tratadas con AuNPs recubiertas con el péptido cys-INH presentan un aumento en la señal de MTT. Este punto está siendo analizado en nuestro grupo de laboratorio.

En el caso de la conjugación a los péptidos antitumorales BN y RAF, las AuNPs mostraron un importante grado de agregación, lo cual se explica mediante el hecho de que las partículas se ven afectadas por el tipo de péptido que se unen a ellas, lo que nos lleva a pensar en la importancia de obtener partículas de oro capaces de mantenerse estables, frente a cualquier molécula biológica que pueda actuar como vector y por ende dirigirlas al blanco terapéutico.

Por otro lado, se obtuvieron NPs de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ las cuales igualmente fueron conjugadas a los péptidos disruptores de láminas $A\beta$ y a los péptidos antitumorales. El principal problema tanto de las NPs de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ como la de sus conjugados con INH, i1 e i2, es la agregación producida por la presencia del magnetismo inducido por el campo externo y/o por el recubrimiento con el polimetacrilato, razón por la cual no fue

posible realizar los estudios de interacción con las fibras amiloides. Sobre este punto se está trabajando en la obtención de NPs de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ recubiertas con oro, con el fin de disminuir la agregación de ellas, pero a la vez conservando sus propiedades magnéticas.

En relación a los estudios de toxicidad *in vitro*, éstos indicaron que los conjugados con los péptidos INH, i1 e i2 presentan un moderado grado de toxicidad en la línea celular estudiada, a excepción de i2, lo cual de cara a una futura aplicación en la EA, necesitaría de mayor estudio en otras líneas celulares, ya que en este trabajo sólo se realizó una primera aproximación la cual no es concluyente para este punto.

En el caso de los conjugados NPs de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ con BN y de las NPs de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, se observó un importante grado de toxicidad frente a las células tumorales HeLa, principalmente a las concentraciones más altas, sin que el péptido BN potencie la citotoxicidad de las NPs de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Por otra parte, un hecho interesante es que el conjugado de NPs de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ con RAF, produce un aumento del porcentaje de reducción de la señal de WST-1, que podría estar relacionado con un aumento de la viabilidad, un aumento de la proliferación o un cambio en la capacidad metabólica de las células. Por otro lado, este aumento en la señal de WST-1 mediada por el péptido RAF unido a las NPs magnéticas, podría estar relacionado con el estrés oxidativo, ya que si este conjugado es capaz de inducir la formación de radicales libres como el anión superóxido, dentro de la célula, puede interaccionar con esta sal de tetrazolio y reducirla al formazán soluble correspondiente, lo cual se sumaría a las sales formadas vía deshidrogenasa. En caso de estar produciéndose un aumento de la viabilidad, el péptido RAF estaría actuando como un agente biocompatibilizador de las NPs. Este resultado indicaría que las propiedades estructurales del péptido pueden cambiar al unirse a NPs, produciéndose cambios en la actividad biológica. Por lo cual es importante estudiar la estructura de los péptidos anclados a las NPs, ya que estos estudios contribuirán al diseño de nuevos vectores que se podrán conjugar a las NPs.

Otro de los tópicos que deben investigarse en futuros trabajos es el de determinar si los péptidos RAF y BN dirigen selectivamente a las a las NPs hacia las

células tumorales, para lo cual se deberán marcar los péptidos con sondas fluorescentes y estos péptidos marcados unirán a las NPs.

En la actualidad no es cuestionable el sinnúmero de aplicaciones biomédicas que poseen las nanotecnologías basadas en NPs metálicas, sin embargo muchas de ellas se encuentran aún en estadios tempranos de experimentación y todavía es necesario seguir investigando para hacer de estas NPs herramientas seguras y eficientes, que se puedan implementar clínicamente.

Finalmente, esta Memoria de Título contribuyó a la elaboración de tres artículos (uno de ellos publicado, otro enviado y otro en preparación) y además dio origen a la presentación de trabajos en diferentes jornadas y congresos:

- **Peptides and metallic nanoparticles for biomedical applications**, Marcelo J Kogan, Ivonne Olmedo, Leticia Hosta, Ariel Guerrero, Luis J. Cruz, Fernando Albericio. *Nanomedicine* 2(3), 287-306 (2007).
- **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 (enviado a publicar).
- **Effect of changes in the peptide sequence on the stability and interaction of the peptide CLPFFD conjugated to gold nanoparticles with A β fibrils**. Ivonne Olmedo, Eyleen Araya, Elías Medina, Pedro Toledo, Alejandro Álvarez, Ernest Giralt y Marcelo J. Kogan (en redacción).
- Medina G., Muñoz J.P., Medina E., Guerrero A., Olmedo I., Marambio H.P., 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-Pérez 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.
- Cristian Lasagna, Lisbell Estrada, Ivonne Olmedo, Claudio Soto y Marcelo Kogan. Explorando el transporte in vivo y la localización de conjugados de péptidos-nanopartículas de oro con potencial aplicación para el tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer. 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.
- Olmedo I, Guerrero-Hernández A, Espinoza GJ, Giralt E, Albericio F, Álvarez-Lueje A y Kogan MJ. Evaluación de la eficiencia en la conjugación de péptidos a nanopartículas metálicas mediante HPLC y métodos espectroscópicos. VIII

Encuentro de Química Analítica y Ambiental. Iquique, 16-19 de octubre de 2006, Universidad Arturo Prat, Campus Playa Brava.

- 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.

BIBLIOGRAFIA

- (1) STEVENS M. G., Owens C., Wuhrer R. Nanotechnology in Society. Australian Science Teachers Journal, 48 (3): 22-27, 2002.
- (2) BALBUS J., Denison R., Florini K., Walsh S. Getting nanotechnology right the first time. Issues in Science and Technology, 21 (4): 65-71, 2005.
- (3) SONVICO F., Dubernet C., Colombo P., Couvreur P. Metallic Colloid Nanotechnology, Applications in Diagnosis and Therapeutics. Current Pharmaceutical Design, 11 (16): 2091-2105, 2005.
- (4) PANKHURST Q.A., Connolly J., Jones S. K., Dobson J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. Journal of Physics D: Applied Physics, 36: 167-181, 2003.
- (5) XU Z. P., Zeng Q. H., Lu G. Q., Yu A. B. Inorganic nanoparticles as carriers for efficient cellular delivery. Chemical Engineering Science, 61: 1027-1040, 2006.
- (6) BABINCOVA M., Leszczynska D., Sourivong P., Babinec P. Selective Treatment of neoplastic cells using ferritin-mediated electromagnetic hyperthermia. Medical Hypotheses, 54 (2): 177-179, 2000 a.
- (7) BABINCOVA M., Sourivong P., Leszczynska D., Babinec P. Blood specific whole-body electromagnetic hyperthermia. Medical Hypotheses, 55 (6): 459-460, 2000 b.
- (8) HAMAD-SCHIFFERLI K. Schwartz J. J., Santos A. T., Zhang S., Jacobson J. M. Remote electronic control of DNA hybridization through inductive coupling to an attached metal nanocrystal antenna. Nature, 415: 152-155, 2002.
- (9) BERRY C., Curtis A. Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. Journal of Physics D: applied Physics, 36: 198-206, 2003.
- (10) SUDIMACK J., Lee R. J. Targeted drug delivery via the folate receptor. Advanced Drug Delivery reviews, 41: 147-162, 2000.
- (11) EL-SAYED I. H., Huang X., El-Sayed M. Surface plasmon resonance scattering and absorption of anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles in cancer diagnostics: applications in oral cancer. Nano Letters, 5 (5): 829-834, 2005.
- (12) LUBBE A. S., Bergemann C., Brook J., MacClure D. G. Physiological aspects in magnetic drug targeting. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 194 (1-3): 149-155, 1999.

- (13) LUBBE A. S., Alexiou C., Bergemann C. Clinical applications of magnetic drug targeting. Journal of Surgical Research, 95 (2): 200-206, 2001.
- (14) GUPTA A. K., Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles. Biomaterials, 26: 3995-4021, 2005.
- (15) TARTAJ P., Morales M., Veintemillas S., González T., Serna C. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicina. Journal of Physics D: Applied Physics, 36: R182-R197, 2003.
- (16) BOUSSU K., Belpaire A., Volodin A., Van Haesendonck C., Van der Meeren P., Vandecasteele C., Van der Bruggen B. Influence of membrane and colloid characteristics on fouling of nanofiltration membranes. Journal of Membrane Science, 289: 220-230, 2007.
- (17) KOOIJ E. S., Brouwer E. A. M., Wormeester H., Poelsema B. Formation and optical characterisation of colloidal gold monolayers. Colloids and Surfaces A: Physicochemistry Engineering Aspects, 222: 103-111, 2003.
- (18) MEDINA CONSUEGRA, GRISEL ELISABET. Estudios preliminares de permeabilidad, estabilidad y toxicidad de nanopartículas metálicas conjugadas a péptidos. Tesis (Pregrado para optar al título de Químico Farmacéutico). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, 2006. pp. 1-19.
- (19) FUKUMORI Y., Ichikawa H. Nanoparticles for cancer therapy and diagnosis. Advanced Powder Technology, 17 (1): 1-28, 2006.
- (20) MARTIN G. Nanomedicine: Delivering drugs using bottom up nanotechnology. International Journal of Nanoscience, 4 (5): 855-861, 2005.
- (21) HILLYER J. F., Albrecht R. M. Gastrointestinal persorption and tissue distribution of differently sized colloidal gold nanoparticles. Journal of Pharmaceutical Science, 90 (12): 1927-1936, 2001.
- (22) TURKEVICH J, Stevensen P.C., Hillier J., Nucleation and growth process in synthesis of colloidal gold. Discuss Faraday Society., 11: 55-75, 1951.
- (23) 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.

- (24) MEDINA CONSUEGRA, ELÍAS DANIEL. Obtención de conjugados péptido-nanopartículas metálicas para el desarrollo de una estrategia terapéutica para la enfermedad de Alzheimer. Tesis (Pregrado para optar al título de Químico Farmacéutico). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, 2006. pp. 1-23.
- (25) WANG H., Brandl D. W., Nordlander P., Halas N. J. Plasmonic Nanostructures: Artificial molecules. *Accounts of Chemical Research*, 40: 53-62, 2007.
- (26) SCHULTZ D. A. Plasmon resonant particles for biological detection. *Current Opinion in Biotechnology*, 14: 13-22, 2003.
- (27) SHIPWAY A.N., Lahav M., Gabai R., Willner I. Investigations into the electrostatically induced aggregation of Au nanoparticles. *Langmuir*, 16 (23): 8789-8795, 2000.
- (28) LEE C. S., Lee H., Westervelt R. M. Microelectromagnets for the control of magnetic nanoparticles. *Applied Physics Letters*, 79 (20): 3308-3310, 2001.
- (29) GUPTA A. K., Curtis A. S. G. Lactoferrin and ceruloplasmin derivatized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for targeting cell surface receptors. *Biomaterials*, 25 (15): 3029-3040, 2004.
- (30) LIN X., Samia A. C. S. Synthesis, assembly and physical properties of magnetic nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 305: 100-109, 2006.
- (31) YU S., Chow G. M. Carboxyl group (-CO₂H) functionalized ferrimagnetic iron oxide nanoparticles for potential bio.applications. *Journal of Materials Chemistry*, 14: 2781-2786, 2004.
- (32) MERRIFIELD B. R. Solid-phase synthesis. *Angewandte Chemie*, 97: 801-812, 1985.
- (33) GARCIA- MARTIN F., Quintanar-Audelo M., García-Ramos Y., Cruz L. J., Gravel C., Furic R., Cote S., Tulla-Puche J., Albericio F. ChemMatrix, a poly (ethylene glycol)-Based support for the solid phase synthesis of complex peptides. *Journal of Combinatorial Chemistry*, 8:215-220, 2006.
- (34) ALBERICIO F., Chinchilla R., Dodsworth D. J., Najera C. New trends in peptide coupling reagents. *Organic Preparations and Procedures International*, 33 (2-3): 205-303, 2001.

- (35) SKOOG D., Introducción a las separaciones cromatográficas. En su: Principios de Análisis Instrumental. 5ª edición. España, Editorial McGraw-Hill, 2001. pp 675-775.
- (36) ANDREU D., Espectrometría de Masas de péptidos. En su: Péptidos en Biología y Biomedicina. 1ª edición. España. Editorial Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 1997. pp 5-42.
- (37) BOSSY-WETZEL E., Schwarzenbacher R., Lipton S. A. Molecular pathways to neurodegeneration. Nature medicine, 10: S2-S9, 2004.
- (38) ROSS C. A., Poirier M. A. Protein aggregation and neurodegenerative disease. Nature Medicine, 10: S7-S17, 2004.
- (39) MAYEUX R., Sano M. Treatment of Alzheimer Disease. The New England Journal of Medicine, 341 (22): 1670-1679, 1999.
- (40) NUSSBAUM R. L., Ellis C. E. Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. The New England Journal of Medicine, 348 (14): 1356-1364, 2003.
- (41) NOWOTNY P., Kwon J. M., Goate A. M. (Abril 2001) Alzheimer Disease. En: ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES. John Wiley & Sons, Ltda: Chichester <http://www.els.net/> [doi: 10.1038/npg.els.0000228.]
- (42) DICKSON D. W. Apoptotic mechanism in Alzheimer neurofibrillary degeneration: cause or effect. The Journal of Clinical Investigation, 114 (1): 23-27, 2004.
- (43) BIELER S., Soto C. Beta-Sheet breakers for Alzheimer's disease therapy. Current Drug Targets, 5 (6): 553-558, 2004.
- (44) JIMENEZ LLORT L., Blazquez G., Cañete T., Johansson B., Oddo S., Tobeña A., LaFerla F. M., Fernandez-Toruel A. Modeling behavioral and neuronal symptoms of Alzheimer's disease in mice: A role for intraneuronal amyloid. Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 31: 125-147, 2007.
- (45) BUTTERFIELD A., Griffin S., Munch G., Pasinetti G. M. Amyloid β -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.
- (46) HATÉNYI C., Szabo Z., Klement E., Datki Z., Körtvélyesi T., Zarándi M., Penke B. Pentapeptide amides interfere with the aggregation of Amyloid peptide of Alzheimer's Disease. Biochemical and Biophysical Research Communications, 229: 931-936, 2002.

- (47) SOTO C., Sigurdsson E. M., Morelli L., Kumar R. A., Castaño E. M., 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.
- (48) Cristian Lasagna, Lisbell Estrada, Ivonne Olmedo, Claudio Soto y Marcelo Kogan. Explorando el transporte in vivo y la localización de conjugados de peptidos-nanopartículas de oro con potencial aplicación para el tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer. Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile. Olmué, 20-22 de agosto de 2006.
- (49) KOGAN M. J., Bastus N. G., Amigo R., Grillo-Bosch D., Araya E., Turiel A., Labarta A., Giralt E., Puentes V. F. Nanoparticle-Mediated Local and Remote Manipulation of Protein Aggregation. Nano Letters, 6 (1): 110-115, 2006.
- (50) WEINER R. E., Thakura M. L. Radiolabeled peptides in oncology: Role in diagnosis and treatment. Biodrugs, 19 (3): 141-163, 2005.
- (51) SAMOYLOVA T.I., Morrison N. E., Globa L. P., Cox N. R. Peptide phage display: opportunities of personalized anti-cancer strategies. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, 6: 9-17, 2006.
- (52) FLOREZ J., Crecimiento neoplásico. En su: Farmacología Humana. 4ª edición. España. Editorial Masson, 2003. pp. 1019-1020.
- (53) GUILLEMARD V., Saragovi H. U. Novel approaches for targeted cancer therapy. Current Cancer Drug Targets, 4 (4): 313-326, 2004.
- (54) SCHALLY A. V., Nagy A. New approaches to treatment of various cancers based on cytotoxic analogs of LHRH, somatostatin and bombesin. Life science, 72: 2305-2320, 2003.
- (55) XIAO D., Qu X., Weber H. C. Activation of extracellular signal-regulated kinase mediates bombesin-induced mitogenic responses in prostate cancer cells. Cellular Signalling, 15: 945-953, 2003.
- (56) GARNETT M. J., Marais R. Guilty as charged: B-Raf is a human oncogene. Cancer cell, 6: 313-319, 2004.
- (57) HINDLEY A., Kolch W. Raf-1 and B-Raf promote protein kinase C α interaction with BAD. Cellular Signalling, 19: 547-555, 2007.
- (58) BACCARINI M. Second Nature: Biological functions of the Raf-1 "kinase". FEBS Letters, 579: 3271-3277, 2005.

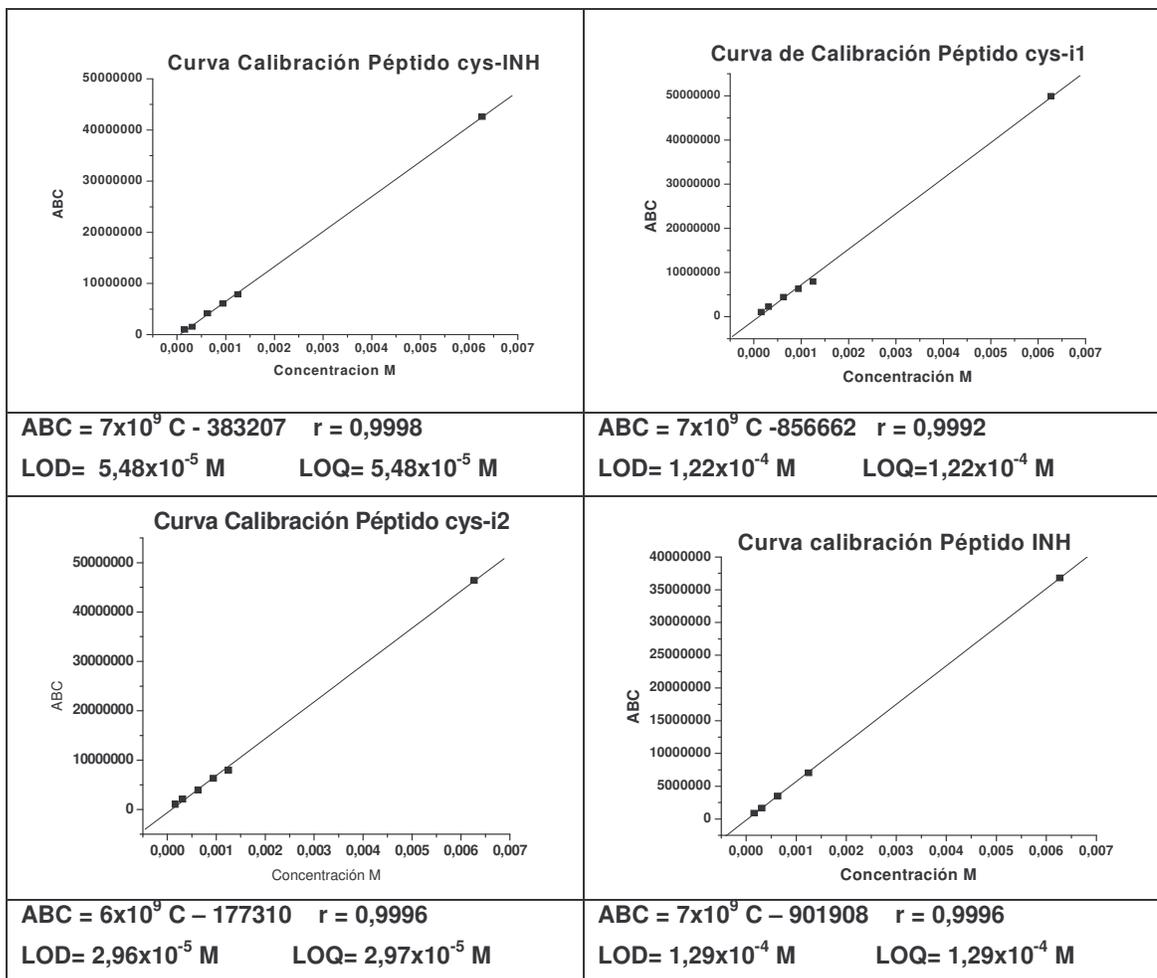
- (59) DASGUPTA P., Sun J., Wang S., Fusaro G., Betts V., Padmanabhan J., Sebti S. M., Chellappan S. P. Disruption of the Rb-Raf-1 interaction inhibits tumor growth and angiogenesis. Molecular and Cellular Biology, 24 (21): 9527-9541, 2004.
- (60) ZANCHET D., Micheel C. M., Parak W. J., Gerion D., Alivisatos A. P. Electrophoretic isolation of discrete Au nanocrystal/DNA conjugates. Nano letters, 1(1): 32-35, 2001.
- (61) HARRIS J. R., Roos C., Djalali R., Rheingans O., Maskos M., Schmidt M. Application of the negative staining technique to both aqueous and organic solvent solutions of polymer particles. Micron, 30: 289-298, 1999.
- (62) 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
- (63) Olmedo I, Guerrero-Hernández A, Espinoza GJ, Giralt E, Albericio F, Álvarez-Lueje A y Kogan MJ. Evaluación de la eficiencia en la conjugación de péptidos a nanopartículas metálicas mediante HPLC y métodos espectroscópicos. VIII Encuentro de Química Analítica y Ambiental. Iquique, 16-19 de octubre de 2006, Universidad Arturo Prat, Campus Playa Brava.
- (64) LIU W.T. Nanoparticles and their biological and environmental applications. Journal of Bioscience and Bioengineering, 102 (1): 1-7, 2006.
- (65) ROSS P-E. Tiny toxins? Technology Review, 109 (2): 66-70, 2006.
- (66) CONNOR E., Mwamuka J., Gole A., Murphy C. J., Wyatt M. D. Gold Nanoparticles Are Taken Up by Human Cells but Do Not Cause Acute Cytotoxicity. Small, 1 (3): 325-327, 2005.
- (67) DE LA FUENTE J. M., Berry C. C., Riehle M. O, Curtis S. G. NPs targeting at cells. Langmuir, 22: 3286-3293, 2006.
- (68) SANDHU K.K., McIntosh C. M., Simard J. M., Smith S. W., Rotello V. M. Gold nanoparticle - mediated transfection of mammalian cells. Bioconjugate Chemistry, 13 (1): 3-6, 2002.
- (69) GOODMAN C. M., McCusker C. D., Yilmaz T., Rotello V. M. Toxicity of Gold Nanoparticles Functionalized with Cationic and Anionic Side Chains. Bioconjugate Chemistry, 15 (4): 897-900, 2004.

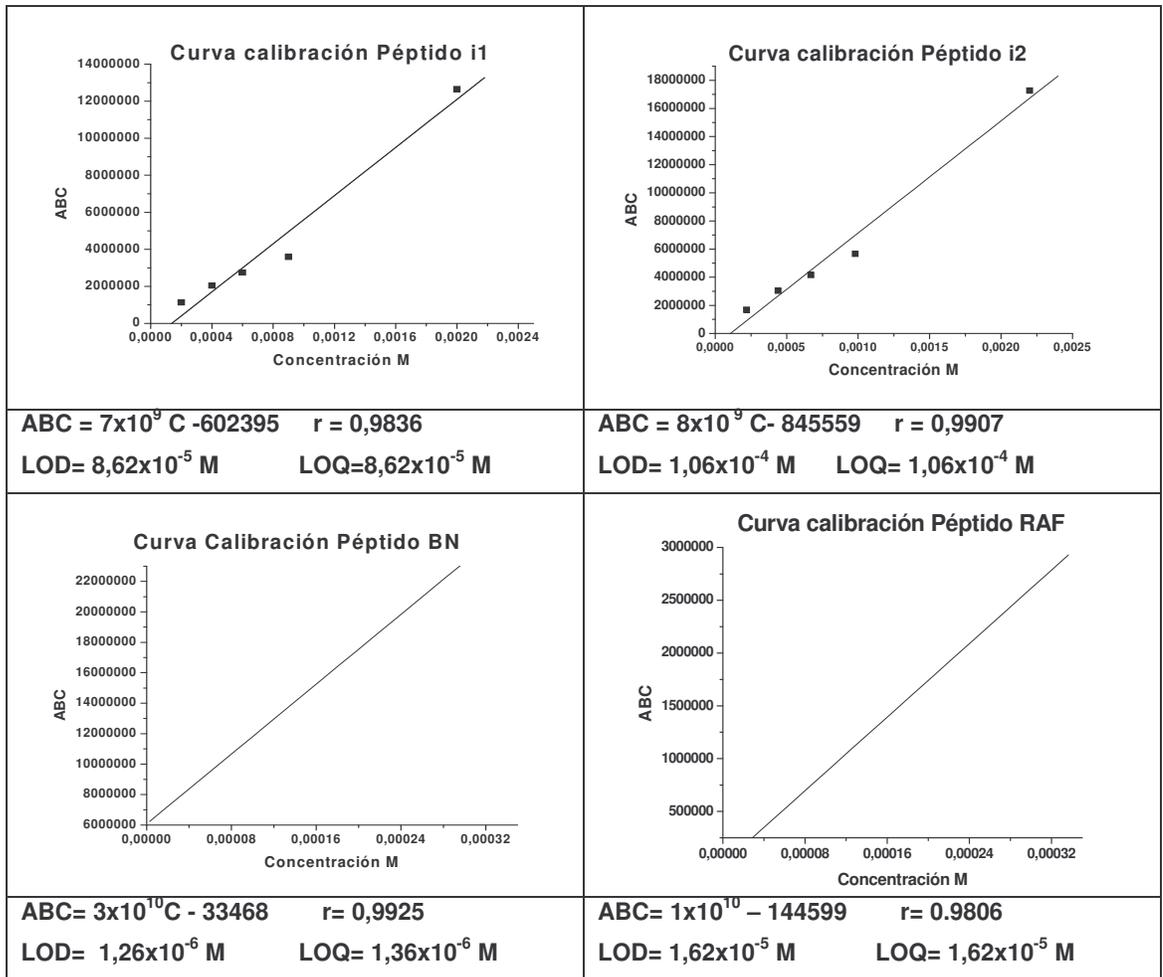
- (70) Roche Applied Science Apoptosis. Cell Death and Cell Proliferation [en línea] Mannheim, Alemania. <<http://www.roche-applied-science/apoptosis>> [Consulta: 01 de mayo 2007].
- (71) LIU Y., Peterson D. A., Kimura H., Schubert D. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *Journal of Neurochemistry*, 69 (2):581-593, 1997.
- (72) PISANIC T. R., Blackwell J., Shubaye V. I., Fiñones R. R., Jin S. Nanotoxicity of iron oxide nanoparticle internalization in growing neurons. *Biomaterials*, 28: 2572-2581, 2007.
- (73) SOTO C. Protein misfolding and disease; protein refolding and therapy. *FEBS Letters*, 498: 204-207, 2001.
- (74) ZAGORSKY M. G., Yang J, Shao H. Y, Ma K, Zeng H., Hong A. Methodological and chemical factors affecting A β amyloidogenicity. *Methods Enzymol*, 309: 189-204, 1999.
- (75) ZHU T., Vasilev K., Kreiter M., Mittler S., Knoll W. Surface modification of citrate-reduced colloidal gold nanoparticles with 2-mercaptosuccinic acid. *Langmuir*, 19 (22): 9518-9525, 2003.
- (76) QUARONI L., Chumanov G. Preparation of polymer Coated functionalized silver nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 121 (45): 10642-10643, 1999.
- (77) FERNANDEZ-CARNEADO J., Kogan M. J., Castel S., Giralt E. Potential Peptide Carriers: Amphipathic Proline-Rich Peptides Derived from the N-Terminal Domain of g-Zein: *Angewandte Chemie*, 116: 1847-1850, 2004.
- (78) UKEDA H., Maeda S., Ishii T., Sawamura M, Spectrophotometric Assay for Superoxide Dismutase Based on Tetrazolium Salt 3'-{1-[(Phenylamino)-carbonyl]-3,4-tetrazolium}-bis(4-methoxy-6-nitro)benzenesulfonic acid hydrate reduction by Xanthine-Xanthine Oxidase. *Analytical Biochemistry*, 251(2): 206-209, 1997.

APENDICES

Apéndice 1

Todas las curvas de calibración fueron representadas gráficamente, el análisis de los datos fueron realizados utilizando el programa OriginPro 7.5. El límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) se especifica en cada curva de calibración.





Apéndice 2

Mediante los análisis paramétricos ANOVA y Test Tukey-Kramer se determinó si existían diferencias significativas en la toxicidad (medida como % de reducción de sales de tetrazolio MTT o WST-1) entre las NPs metálicas sin recubrir y las conjugadas a los diferentes péptidos a iguales concentraciones. Para cada uno de ellos se obtuvo el valor de p los cuales fueron tabulados en las tablas 1, 2 y 3.

❖ Estudio de toxicidad *in vitro* de AuNPs y sus conjugados con péptidos disruptores de A β frente a SHSY5Y.

Tabla 1: Valores de p para AuNPs frente a cada uno de sus conjugados determinados a una misma concentración.	
Parámetro	p
AuNP 25 nM vs INH-AuNP 25 nM	< 0,001
AuNp 25 nM vs i1-AuNP 25 nM	< 0,01
AuNp 25 nM vs i2-AuNP 25 nM	< 0,05
AuNP 10 nM vs INH-AuNP 10 nM	< 0,001
AuNp 10 nM vs i1-AuNP 10 nM	> 0,05
AuNp 10 nM vs i2-AuNP 10 nM	> 0,05
AuNP 5 nM vs INH-AuNP 5 nM	< 0,01
AuNp 5 nM vs i1-AuNP 5 nM	> 0,05
AuNp 5 nM vs i2-AuNP 5 nM	> 0,05
AuNP 1 nM vs INH-AuNP 1 nM	< 0,001
AuNp 1 nM vs i1-AuNP 1 nM	> 0,05
AuNp 1 nM vs i2-AuNP 1 nM	> 0,05

❖ Estudio de toxicidad *in vitro* de NPs γ -Fe₂O₃ y sus conjugados con péptidos disruptores de A β frente a SHSY5Y.

Tabla 2: Valores de para NPs de γ -Fe ₂ O ₃ frente a cada uno de sus conjugados determinados a una misma concentración.	
Parámetro	p
NPs γ - Fe ₂ O ₃ 2 μ g/ml vs INH NPs γ - Fe ₂ O ₃ 2 μ g/ml	>0,05
NPs γ - Fe ₂ O ₃ 2 μ g/ml vs i1 NPs γ - Fe ₂ O ₃ 2 μ g/ml	>0,05
NPs γ - Fe ₂ O ₃ 2 μ g/ml vs i2 NPs γ - Fe ₂ O ₃ 2 μ g/ml	>0,05
NPs γ - Fe ₂ O ₃ 1,5 μ g/ml vs INH NPs γ - Fe ₂ O ₃ 1,5 μ g/ml	>0,05
NPs γ - Fe ₂ O ₃ 1,5 μ g/ml vs i1 NPs γ - Fe ₂ O ₃ 1,5 μ g/ml	>0,05
NPs γ - Fe ₂ O ₃ 1,5 μ g/ml vs i2 NPs γ - Fe ₂ O ₃ 1,5 μ g/ml	>0,05
NPs γ - Fe ₂ O ₃ 1 μ g/ml vs INH NPs γ - Fe ₂ O ₃ 1 μ g/ml	>0,05
NPs γ - Fe ₂ O ₃ 1 μ g/ml vs i1 NPs γ - Fe ₂ O ₃ 1 μ g/ml	>0,05
NPs γ - Fe ₂ O ₃ 1 μ g/ml vs i2 NPs γ - Fe ₂ O ₃ 1 μ g/ml	>0,05
NPs γ - Fe ₂ O ₃ 0,5 μ g/ml vs INH NPs γ - Fe ₂ O ₃ 0,5 μ g/ml	>0,05
NPs γ - Fe ₂ O ₃ 0,5 μ g/ml vs i1 NPs γ - Fe ₂ O ₃ 0,5 μ g/ml	>0,05
NPs γ - Fe ₂ O ₃ 0,5 μ g/ml vs i2 NPs γ - Fe ₂ O ₃ 0,5 μ g/ml	>0,05
NPs γ - Fe ₂ O ₃ 0,25 μ g/ml vs INH NPs γ - Fe ₂ O ₃ 0,25 μ g/ml	>0,05
NPs γ - Fe ₂ O ₃ 0,25 μ g/ml vs i1 NPs γ - Fe ₂ O ₃ 0,25 μ g/ml	>0,05
NPs γ - Fe ₂ O ₃ 0,25 μ g/ml vs i2 NPs γ - Fe ₂ O ₃ 0,25 μ g/ml	>0,05

❖ Estudio de toxicidad *in vitro* de NPs γ -Fe₂O₃ y sus conjugados con péptidos derivados de secuencias antitumorales frente a HeLa

Tabla 3: Valores de para NPs de γ -Fe ₂ O ₃ frente a cada uno de sus conjugados determinados a una misma concentración.	
Parámetro	p
NPs γ -Fe ₂ O ₃ 25 μ g/ml vs RAF NPs γ -Fe ₂ O ₃ 25 μ g/ml	>0,001
NPs γ -Fe ₂ O ₃ 25 μ g/ml vs BN NPs γ -Fe ₂ O ₃ 25 μ g/ml	>0,05
NPs γ -Fe ₂ O ₃ 15 μ g/ml vs RAF NPs γ -Fe ₂ O ₃ 15 μ g/ml	>0,01
NPs γ -Fe ₂ O ₃ 15 μ g/ml vs BN NPs γ -Fe ₂ O ₃ 15 μ g/ml	>0,05
NPs γ -Fe ₂ O ₃ 8 μ g/ml vs RAF NPs γ -Fe ₂ O ₃ 8 μ g/ml	>0,05
NPs γ -Fe ₂ O ₃ 8 μ g/ml vs BN NPs γ -Fe ₂ O ₃ 8 μ g/ml	>0,05
NPs γ -Fe ₂ O ₃ 4 μ g/ml vs RAF NPs γ -Fe ₂ O ₃ 4 μ g/ml	>0,05
NPs γ -Fe ₂ O ₃ 4 μ g/ml vs BN NPs γ -Fe ₂ O ₃ 4 μ g/ml	>0,05