

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS



**“NANOPARTÍCULAS DE ORO
MODIFICADAS CON PÉPTIDOS:
BIODISTRIBUCIÓN Y EFECTOS
SOBRE LA AGREGACIÓN DE β -
AMILOIDE”**

Tesis presentada a la Universidad de Chile
para optar al grado de Doctor en Bioquímica por:

FRANCISCO MORALES ZAVALA

Directores de Tesis

Dr. Marcelo Kogan B.

Dra. Alejandra Alvarez R.

SANTIAGO - CHILE
2016

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato:

FRANCISCO ANDRES MORALES ZAVALA

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Bioquímica, en el examen de defensa de Tesis rendida el día _____ de _____ de 2016.

Directores de Tesis:

Dr. Marcelo J. Kogan.

Dra. Alejandra Alvarez

Comisión Informante de Tesis:

Dra. María Antonieta Valenzuela P. (Presidente)

Dr. Alejandro Roth M.

Dr. Pedro Zamorano M.

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi familia, especialmente a mis padres, mami y tata, y a mi hermana. Este logro es tanto de ellos como mío por los años de formación, dedicación, apoyo, consejos y cariño incondicional. Sin ellos no habría podido completar esta etapa. También a mi polola Camila Figueroa quien me acompañó en este proceso, me apoyó y ha estado conmigo en los momentos más complejos.

Al Dr. Marcelo Kogan por la confianza y respaldarme como profesional, han sido años en los que he aprendido de su trabajo y me ha marcado en mi formación y vocación profesional. A mis compañeros Ana, Naty, Simón, Caro, Edison, Claudia V, Claudia F, Eduardo, Rodrigo Torres, Pancho, Rodrigo Sierpes, Pablo, Sujey, Cote, Valentina, Ariel, Julian, Carlos, Camilo y Andreas. Con ustedes compartí alegrías y frustraciones de la ciencia, siempre dispuestos a ayudarme, muchas gracias. También a Nathalie Casanova, notable científica y amiga que conocí durante este proceso, a Renzo Zanocco, Ignacio Niechi y a mis compañeros del doctorado.

A la Dra. Alejandra Alvarez, excelente directora quien me abrió las puertas de su laboratorio y estuvo siempre presente, estoy muy agradecido. También a David y Nicole por su ayuda y excelente disposición, y a América por su apoyo.

A Hector, excelente persona e incondicional amigo, quien me ayudó a completar los experimentos realizados en el laboratorio de la Dra. Rebeca Aldunate, a quien también le agradezco.

A mis amigos de siempre, Roberto y Samuel, por estar siempre, por la lealtad y la incondicionalidad. A Samanta, Paulina y Gloria por la preocupación y el cariño.

A la comisión, por las críticas constructivas y disposición para ayudarme a lo largo de estos años.

Finalmente a todos los que estuvieron conmigo de alguna manera, muchas gracias.

El desarrollo de esta tesis de doctorado se realizó gracias al trabajo en colaboración entre los laboratorios de Nanobiotecnología y Nanotoxicología, Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica, Universidad de Chile (Dr. Marcelo Javier Kogan) y el Laboratorio de Señalización Celular, Facultad de ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile (Dra. Alejandra Alvarez).

FINANCIAMIENTO:

Este trabajo contó con el apoyo y financiamiento de los siguientes proyectos:

- Beca CONICYT Doctorado Nacional año 2012 folio 21120617 (Francisco Morales Zavala)
- Proyecto FONDECYT 1130425 (Marcelo Kogan)
- Proyecto FONDAP 15130011 (Marcelo Kogan)

TABLA DE CONTENIDOS

TABLA DE CONTENIDOS	I
INDICE DE FIGURAS	III
INDICE DE TABLAS	VII
LISTADO DE ABREVIATURAS	VIII
RESUMEN	IX
ABSTRACT	IX
1 CAPÍTULO 1	1
1.1. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	2
1.2. USO DE PÉPTIDOS COMO INHIBIDORES DE LA AGREGACIÓN DE A β .	6
1.3. NANOPARTÍCULAS METÁLICAS PARA LA DESAGREGACIÓN DE A β	9
1.4. CÓMO FAVORECER EL CRUCE DE NANOPARTÍCULAS A TRAVÉS DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA	13
1.5. MODIFICACIÓN DE NPS METÁLICAS CON PÉPTIDOS PARA FAVORECER LA TRANSCITOSIS MEDIADA POR RECEPTORES.	16
1.6. USO DE MODELOS ANIMALES DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER PARA PROBAR LA DISTRIBUCIÓN DE NANOMATERIALES Y LA DESAGREGACIÓN DE A β	19
1.7. HIPÓTESIS DE TRABAJO	22
1.8. OBJETIVO GENERAL	22
1.9. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
2. CAPÍTULO 2	24
2.1. PREPARACIÓN DE NANOVARILLAS DE ORO (NVO) ESTABILIZADAS CON CTAB.	26
2.2. ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN MOLECULAR	27
2.3. DISPERSIÓN DINÁMICA DE LA LUZ (DLS)	27
2.4. POTENCIAL Z (PZ)	28
2.5. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM)	28
2.6. ESTABILIZACIÓN DE NVO CON PEGS Y CONJUGACIÓN CON LIGANDOS PEPTÍDICOS	29
2.7. CALCULO DE LA CONCENTRACIÓN DE NVO	31
2.8. ESTIMACIÓN DEL NÚMERO DE MOLÉCULAS DE PÉPTIDO POR NVO	32
2.9. CULTIVO CELULAR DE LA LÍNEA DE NEUROBLASTOMA SH-SY5Y	34
2.10. CULTIVO CELULAR DE LA LÍNEA CELULAR ENDOTELIAL DE CEREBRO DE RATÓN INMORTALIZADA BEND.3	34
2.11. CULTIVO DE NEURONAS HIPOCAMPALES	34
2.12. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR PARA LA LÍNEA CELULAR DE NEUROBLASTOMA HUMANO SH-SY5Y	35
2.13. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR PARA LA LÍNEA CELULAR ENDOTELIAL DE CEREBRO DE RATÓN BEND.3.	36
2.14. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR EN CULTIVO DE NEURONAS HIPOCAMPALES.	37
2.15. CUANTIFICACIÓN DE ORO EN CULTIVO LÍNEA CELULAR DE NEUROBLASTOMA HUMANO SH-SY5Y	37
2.16. CUANTIFICACIÓN DE ORO EN CULTIVO PRIMARIO DE HIPOCAMPO	38

2.17. MARCAJE DE NVO-MULTIMODIFICADAS CON ALEXA FLUOR 647.	39
2.18. EVALUACIÓN DE LA PENETRACIÓN CELULAR DE NVO-MULTIMODIFICADAS MARCADAS CON ALEXA FLUOR 647 EN LA LÍNEA CELULAR BEND.3 MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO.	40
2.19. PREPARACIÓN DE CÉLULAS BEND.3 INCUBADAS CON NVO-D1/ANG2 PARA EVALUAR INTERNALIZACIÓN MEDIANTE TEM.	41
2.20. AGREGACIÓN DEL PÉPTIDO AB 1-42 EN PRESENCIA DE NVO-MODIFICADAS CON PÉPTIDOS.	42
2.21. AGREGACIÓN DEL PÉPTIDO AB 1-42 EN PRESENCIA DE NVO-MODIFICADAS CON PÉPTIDOS E IRRADIADAS CON LÁSER DE 808 NM Y 350 MW DE POTENCIA.	43
2.22. PROPAGACIÓN DE <i>C. ELEGANS</i> 2120 Y TRATAMIENTOS.	44
2.23. ANÁLISIS DE MOVIMIENTO	46
2.24. TINCIÓN CON TIOFLAVINA S DE <i>C. ELEGANS</i> 2120	46
2.25. EVALUACIÓN DE LA LLEGADA DE LAS NVO-D1/ANG2 AL CEREBRO DEL RATÓN APPSWE/PSEN1DE9 , MODELO MURINO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.	47
2.26. COLOCALIZACIÓN <i>EX VIVO</i> DE LAS NVOs MODIFICADAS CON PLACAS AMILOIDES EN CORTES DE CEREBRO DE RATÓN MODELO DE EA	49
2.27. EVALUACIÓN DE LA COLOCALIZACIÓN <i>IN VIVO</i> DE NVO-D1/ANG2 CON PLACAS AMILOIDES.	52
2.28. DETECCIÓN DE NVO-D1/ANG2 EN CEREBRO DE RATÓN APPSWE/PSEN1DE9 POR TEM	53
3. CAPÍTULO 3	55
3.1. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOVARILLAS DE ORO (NVO)	56
3.2. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NVO ESTABILIZADAS CON PEGs	61
3.3. MODIFICACIÓN DE LAS NVO-PEGs CON PÉPTIDOS PARA RECONOCER AB Y ATRAVESAR LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA (BHE)	65
4. CAPÍTULO 4	72
4.1. EFECTOS SOBRE LA VIABILIDAD Y LA PENETRACIÓN CELULAR DE LAS NANOVARILLAS MODIFICADAS.	73
4.2. EVALUAR EL EFECTO DE LAS NVO-D1/ANG2 SOBRE LOS AGREGADOS DE AB <i>IN VITRO</i> .	88
5. CAPÍTULO 5	99
5.1. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS NANOVARILLAS MODIFICADAS EN EL MODELO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER <i>C. ELEGANS</i> 2120.	100
5.2. EVALUACIÓN DE NANOVARILLAS MODIFICADAS EN RATÓN TRANSGÉNICO MODELO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.	106
6. CAPÍTULO 6	120
6.1. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	121
6.2. CONCLUSIONES	138
6.3. PROYECCIONES	139

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.1 IMAGEN ESQUEMÁTICA DE CÓMO SE VERÍA UN CEREBRO NORMAL EN COMPARACIÓN A UN CEREBRO QUE PRESENTA LA EA (ALZHEIMER_ASSOCIATION)	2
FIGURA 1.2 ESQUEMA DEL PROCESO DE FORMACIÓN DE LA FIBRAS DE A β (FINDER & GLOCKSHUBER, 2007).....	7
FIGURA 1.3 SECUENCIA PEPTÍDICA DE A β , EN ROJO NÚCLEO HIDROFÓBICO (SOTO ET AL., 1998).	8
FIGURA 1.4 ESQUEMA DE ABSORCIÓN DE ENERGÍA Y ESPECTRO UV-VIS-NIR DE UNA NVO Y EJEMPLO DE ABSORCIÓN EN LA VENTANA BIOLÓGICA.....	11
FIGURA 1.5 ESQUEMA DE LA UNIDAD NEUROVASCULAR QUE CONSTITUYE LA BHE Y LAS PRINCIPALES RUTAS DE INGRESO AL SNC (VELASCO-AGUIRRE ET AL., 2015).....	14
FIGURA 3.2 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE NVO. A) MICROGRAFÍA ELECTRÓNICA DE NVO OBTENIDAS CON EL MÉTODO DE SÍNTESIS MEDIADA POR SEMILLAS Y B) HISTOGRAMA DE RELACIÓN DE ASPECTOS.	58
FIGURA 3.3 DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑOS CARACTERÍSTICA PARA NVO-CTAB DETERMINADA MEDIANTE DLS	59
FIGURA 3.4 DISTRIBUCIÓN DE CARGAS DE TRES MUESTRAS DE NVO-CTAB	60
FIGURA 3.5 ESPECTRO DE ABSORCIÓN MOLECULAR REPRESENTATIVOS DE NVO-CTAB Y NVO-PEGS.	63
FIGURA 3.6 DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑOS DETERMINADA MEDIANTE DLS DE NVO-CTAB Y NVO-PEGS.	64
FIGURA 3.7 DISTRIBUCIÓN DE CARGAS DE NVO-CTAB Y NVO-PEGS.....	65
FIGURA 3.8 ESPECTRO DE ABSORCIÓN MOLECULAR DE NVO-CTAB, NVO-PEGS, NVO-D1, NVO-ANG2 Y NVO-D1/ANG2.....	67
FIGURA 3.9 DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑOS DETERMINADA MEDIANTE DLS PARA (A) NVO-CTAB, NVO-PEGS Y (B) NVO-D1, NVO-ANG2 Y NVO-D1/ANG2.....	68
FIGURA 3.10 DISTRIBUCIÓN DE CARGAS DE NVO-CTAB, NVO-PEGS, NVO-D1, NVO-ANG2 Y NVO-D1/ANG2.	69
FIGURA 4.2 ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR MTS EN CULTIVO PRIMARIO DE NEURONAS HIPOCAMPALES DE EMBRIONES DE RATA. SE INCUBARON LAS CÉLULAS CON NVO-D1/ANG2 A CONCENTRACIONES 0,1, 0,2 Y 0,4 NM, POR 24 HRS A 37°C. SE REALIZÓ 3 VECES POR QUINTUPLICADO Y SE EVALUÓ CON T STUDENT.....	75
FIGURA 4.3 CUANTIFICACIÓN DE ORO ASOCIADA A CÉLULAS. A) CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA SH-SY5Y Y (B) CULTIVO PRIMARIO DE NEURONAS HIPOCAMPALES. FUERON INCUBADAS A DIFERENTES TIEMPOS CON NVO-D1/ANG2 0,4 NM. LA DETERMINACIÓN DE ORO FUE REALIZADA SOBRE LAS	

CÉLULAS MEDIANTE ACTIVACIÓN NEUTRÓNICA (CCHEN). SE REALIZÓ 3 VECES POR QUINTUPLICADO.	77
FIGURA 4.5 PENETRACIÓN DE NVO MODIFICADAS MARCADAS CON ALEXA 647 EN CÉLULAS BEND.3. SE INCUBARON POR 24 HRS. A UNA CONCENTRACIÓN 0,05 NM Y NORMALIZADAS POR LA INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA DE CADA NVO-MODIFICADA A UNA MISMA CONCENTRACIÓN. SE REALIZÓ 3 VECES EN EXPERIMENTOS INDEPENDIENTES.	80
FIGURA 4.6 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN DE CÉLULAS BEND.3 INCUBADAS CON NVO-D1/ANG2 [0,05 NM] DURANTE 24 HRS. LAS FLECHAS BLANCAS INDICAN LAS NVO-D1/ANG2.	82
FIGURA 4.7 PORCENTAJE DE LA POBLACIÓN CELULAR POSITIVA A LA INCORPORACIÓN DE NVO-MODIFICADAS. SE INCUBO POR 2 HRS CÉLULAS BEND.3 CON LAS DIFERENTES NVO MODIFICADAS, A UNA CONCENTRACIÓN 0,05 NM. LAS NVO SE MARCAN CON ALEXA 647 PARA PODER SER DETECTADAS Y EVALUADO POR CITOMETRÍA DE FLUJO. SE REALIZÓ POR TRIPLICADO EN EXPERIMENTOS INDEPENDIENTES. SE ANALIZÓ CON ANOVA Y LA BARRA MUESTRA LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR.	84
FIGURA 4.8 PORCENTAJE DE LA POBLACIÓN CELULAR POSITIVA A LA INCORPORACIÓN DE NVO-MODIFICADAS A 4°C. SE INCUBO POR 2 HRS A 4°C, LAS CÉLULAS BEND.3 CON LAS DIFERENTES NVO MODIFICADAS, A UNA CONCENTRACIÓN 0,05 NM. LAS NVO SE MARCAN CON ALEXA FLUOR 647 PARA PODER SER DETECTADAS Y EVALUADO POR CITOMETRÍA DE FLUJO. SE REALIZÓ POR TRIPLICADO EN EXPERIMENTOS INDEPENDIENTES. LA BARRA MUESTRA LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR.	86
FIGURA 4.9 POBLACIÓN CELULAR POSITIVA A LA INCORPORACIÓN DE NVO-D1, NVO-PAPOE, NVO-ANG2, NVO-D1/ANG2, NVO-D1/PAPOE. SE INCUBO POR 2 HRS CÉLULAS BEND.3 CON LAS DIFERENTES NVO MODIFICADAS, A UNA CONCENTRACIÓN 0,05 NM. LAS NVO SE MARCARON CON ALEXA FLUOR 647 PARA PODER SER DETECTADAS Y EVALUADO POR CITOMETRÍA DE FLUJO. UN GRUPO DE CÉLULAS FUE INCUBADA A 4°C DURANTE LAS DOS HORAS DE INCUBACIÓN CON NVO, Y OTRO GRUPO FUE PRE TRATADO CON CLORPROMAZINA (CPZ) DURANTE 15 MINUTOS A UNA CONCENTRACIÓN DE 50 MM. LOS EXPERIMENTOS FUERON REALIZADOS TRES VECES EN EXPERIMENTOS INDEPENDIENTES. LA BARRA REPRESENTA LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR.	88
FIGURA 4.10 NVO-D1/ANG2 INHIBEN LA AGREGACIÓN DEL PÉPTIDO A B . RESULTADOS DEL ENSAYO DE THT. INTENSIDAD DE LA SEÑAL FLUORESCENTE DE LAS MUESTRAS DE FIBRAS DE A B EN PRESENCIA DE NVO-D1/ANG2 Y EL PÉPTIDO D1. LOS RESULTADOS SON EXPRESADOS COMO PORCENTAJE CON RESPECTO AL A B CONTROL. LOS EXPERIMENTOS FUERON REALIZADOS TRES VECES EN	

QUINTUPLICADO EN EXPERIMENTOS INDEPENDIENTES. LA BARRA REPRESENTA LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR. SE UTILIZÓ T TEST PARA EVALUAR LA DIFERENCIA ESTADÍSTICA.....	90
FIGURA 4.11 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN DE RESTOS DE FIBRAS DE A B INCUBADAS CON NVO-D1/ANG2 DURANTE SU PROCESO DE FORMACIÓN DE FIBRAS.	91
FIGURA 4.12 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN DE FIBRAS DE A B INCUBADAS CON NVO-D1/ANG2 POSTERIOR A SU PROCESO DE FORMACIÓN.	93
FIGURA 4.13 IRRADIACIÓN NO POTENCIA LA INHIBICIÓN EN LA AGREGACIÓN DE A B GENERADA POR NVO-D1/ANG2. RESULTADOS DEL ENSAYO DE THT. INTENSIDAD DE LA SEÑAL FLUORESCENTE DE LAS MUESTRAS DE FIBRAS DE A B EN PRESENCIA DE NVO-D1/ANG2 CON Y SIN TRATAMIENTO LÁSER. LOS RESULTADOS SON EXPRESADOS COMO PORCENTAJE CON RESPECTO AL A B CONTROL NO IRRADIADO. LOS EXPERIMENTOS FUERON REALIZADOS DOS VECES EN QUINTUPLICADO EN EXPERIMENTOS INDEPENDIENTES. LA BARRA REPRESENTA LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR. SE UTILIZÓ T TEST PARA EVALUAR LA DIFERENCIA ESTADÍSTICA.	95
FIGURA 4.14 STEM DE FIBRAS DE A B . A) CONTROL E INCUBADAS CON NVO-D1/ANG2 B) SIN IRRADIAR Y C) IRRADIADAS.....	96
FIGURA 4.15 NVO-PEG INHIBEN LA AGREGACIÓN DEL PÉPTIDO A B . INTENSIDAD DE LA SEÑAL FLUORESCENTE DE LAS MUESTRAS DE FIBRAS DE A B EN PRESENCIA DE NVO-PEGS Y PEG LIBRE CON Y SIN TRATAMIENTO LÁSER. LOS RESULTADOS SON EXPRESADOS COMO PORCENTAJE CON RESPECTO AL A B CONTROL NO IRRADIADO. LOS EXPERIMENTOS FUERON REALIZADOS TRES VECES EN QUINTUPLICADO EN EXPERIMENTOS INDEPENDIENTES. LA BARRA REPRESENTA LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR. SE UTILIZÓ T TEST PARA EVALUAR LA DIFERENCIA ESTADÍSTICA.....	97
FIGURA 5.1 CUANTIFICACIÓN DEL MOVIMIENTO DEL NEMÁTODO TRANSGÉNICO EN MEDIO LÍQUIDO. LOS NEMÁTODOS FUERON INCUBADOS CON NVO-D1/ANG2 [1,5 NM], EL PÉPTIDO D1 [0,5 MM] Y [1 MM] Y SE EVALUÓ SU MOTILIDAD EN MEDIO LÍQUIDO A DIFERENTES DÍAS DE TRATAMIENTO. EL GRUPO CONTROL FUE INCUBADO CON EL MEDIO SALINO M9. LOS EXPERIMENTOS FUERON REALIZADOS DOS VECES CON 20 ANIMALES EVALUADOS PARA CADA EXPERIMENTO INDEPENDIENTE. LA BARRA REPRESENTA LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR. SE UTILIZÓ T TEST PARA EVALUAR LA DIFERENCIA ESTADÍSTICA.	103
FIGURA 5.2 EVALUACIÓN DE PLACAS AMILOIDES EN CL2120 CON THS. (A) IMÁGENES DE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA Y EN BLANCO Y NEGRO DE CL2120 TRATADOS CON NVO-D1/ANG2 Y PÉPTIDO D1. (B) CUANTIFICACIÓN DEL NÚMERO DE PLACAS Y (C) EVALUACIÓN DEL TAMAÑO DE LAS PLACAS. LOS EXPERIMENTOS FUERON REALIZADOS DOS VECES CON 20 ANIMALES EVALUADOS PARA CADA	

EXPERIMENTO INDEPENDIENTE. LA BARRA REPRESENTA LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR. SE UTILIZÓ T TEST PARA EVALUAR LA DIFERENCIA ESTADÍSTICA.	105
FIGURA 5.3 MAYOR LLEGADA DE ORO EN ANIMAL TRATADO CON NVO-D1/ANG2. PORCENTAJE DE LA DOSIS DE ORO QUE LLEGA AL CEREBRO. SE INYECTARON POR LA VENA DE LA COLA 100 ML [10 NM]. SE SACRIFICÓ EL ANIMAL A LOS 15 MIN. LA CUANTIFICACIÓN DE ORO SE REALIZÓ MEDIANTE ACTIVACIÓN NEUTRÓNICA (CCHEN) Y EL N=4. LA BARRA REPRESENTA LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR. SE UTILIZÓ T TEST PARA EVALUAR LA DIFERENCIA ESTADÍSTICA.....	107
FIGURA 5.4 PORCENTAJE DE LA DOSIS DE ORO QUE ES RETENIDA EN HÍGADO. SE INYECTO POR LA VENA DE LA COLA 100 ML [10 NM]. SE SACRIFICÓ EL ANIMAL A LOS 15 MIN. LA CUANTIFICACIÓN DE ORO SE REALIZÓ MEDIANTE ACTIVACIÓN NEUTRÓNICA (CCHEN) Y EL N=4. LA BARRA REPRESENTA LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR. SE UTILIZÓ T TEST PARA EVALUAR LA DIFERENCIA ESTADÍSTICA.....	108
FIGURA 5.6 PORCENTAJE DE COLOCALIZACIÓN DE LAS NVO CON LAS PLACAS AMILOIDES EN EXPERIMENTO DE INCUBACIÓN <i>EX VIVO</i> . LA BARRA REPRESENTA EL ERROR ESTÁNDAR MEDIO...	112
FIGURA 5.9 PORCENTAJE DE COLOCALIZACIÓN DE LAS NVO CON LAS PLACAS AMILOIDES DEL EXPERIMENTO <i>IN VIVO</i> . LA BARRA REPRESENTA EL ERROR ESTÁNDAR MEDIO. SE UTILIZÓ T TEST PARA EVALUAR LA DIFERENCIA ESTADÍSTICA.....	115
FIGURA 5.11 NVO-D1/ANG2 EN HIPOCAMPO DE CEREBRO DE RATÓN. MICROGRAFÍAS OBTENIDAS POR TEM DE CORTES DE CEREBRO EN LAS REGIONES DE HIPOCAMPO PARA LA DETECCIÓN DE NVO-D1/ANG2. LAS FLECHAS BLANCAS INDICAN LAS NVO-D1/ANG2. BARRA DE TAMAÑO 500 NM.....	118
FIGURA 5.12 NVO-D1/ANG2 EN HIPOCAMPO DE CEREBRO DE RATÓN. MICROGRAFÍAS OBTENIDAS POR TEM DE CORTE DE CEREBRO EN LA REGION DEL HIPOCAMPO PARA LA DETECCIÓN DE NVO-D1/ANG2. LAS FLECHAS BLANCAS INDICAN LAS NVO-D1/ANG2. BARRA DE TAMAÑO 200 NM.....	119
FIGURA 6.1 PROPUESTA DE CÓMO SE PEGAN LAS CADENAS DE PEGS EN UN PROCESO ACUOSO (NGUYEN ET AL., 2014).....	124

INDICE DE TABLAS

TABLA 1.1 EJEMPLOS DE TRANSPORTE DE MACROMOLÉCULAS A TRAVÉS DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA. (ABBOTT ET AL., 2010).....	15
TABLA 3.1 RESUMEN DE LA MAGNITUD DE LOS PICOS OBTENIDOS, MEDIANTE DLS, DE LA DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO PARA LAS DIFERENTES NVO MODIFICADAS.	68
TABLA 3.2 RESUMEN DE LOS PZ, MEDIANTE DLS PARA LAS DIFERENTES NVO MODIFICADAS.....	70
TABLA 3.3 CUANTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS POR NVO MEDIANTE ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS.....	70
TABLA 4.1 PORCENTAJES DE INHIBICIÓN EN LA POBLACIÓN CELULAR POSITIVA PRODUCIDO POR CLORPROMAZINA PARA LAS DIFERENTES MODIFICACIONES DE NVO	87

LISTADO DE ABREVIATURAS

Ang2: angiopep 2

APP: proteína precursora amiloide

AuNP: nanopartícula de oro

BHE: Barrera hematoencefálica

CCHEN: Comisión Chilena de Energía Nuclear

Dh: diametro hidrodinámico

DLS: dispersión dinámica de la luz

EA: Enfermedad de Alzheimer

Neo: nanoesferas de oro

NPs: nanopartículas

NvO: nanovarillas de oro

pZ: potencial Z

SER: sistema retículoendotelial

SNC: sistema nervioso central

STEM: Scanning Transmission electron microscopy

Tioflavina S: ThS

Tioflavina T: ThT

RESUMEN

En esta tesis de Doctorado se sintetizaron nanovarillas de oro (NvO) las cuales fueron estabilizadas con dos tipos de polietilenglicol y luego modificadas con dos péptidos: D1, que reconoce agregados tóxicos del péptido A β , involucrados en la Enfermedad de Alzheimer (EA), y con el péptido, Angiopep 2 (Ang2), que es utilizado como lanzadera de diversas moléculas al sistema nervioso central. Las NvO fueron caracterizadas por espectrofotometría de absorción molecular, dispersión dinámica de la luz (DLS), potencial zeta (pZ) y microscopía electrónica de transmisión (TEM). El grado de funcionalización de las NvO con los péptidos se confirmó mediante análisis de aminoácidos. Se determinó que el nanoconjugado no es citotóxico y logra penetrar células endoteliales de cerebro, como también inhibir la agregación del péptido A β *in vitro*. *In vivo*, en el modelo amiloide *C. elegans* se observó que disminuyen la toxicidad de las especies agregadas del péptido A β y en el modelo murino de la enfermedad de Alzheimer APP^{swe}/PSEN1^{dE9} se determinó que llegan al cerebro de manera dirigida, aumentando su proporción cerca de 4 veces con respecto al control de NvO-PEG.

Esta tesis muestra un promisorio nanosistema basado en NvO con potenciales aplicaciones para el tratamiento de la EA, el cual no muestra efectos citotóxicos, inhibe la agregación, disminuye la toxicidad del péptido A β y tiene una mejorada llegada al cerebro.

ABSTRACT

In this PhD thesis gold nanorods were synthesized and stabilized with two types of polyethylene glycol and then modified with two peptides: D1, which recognizes toxic aggregates of A β peptide, involved in Alzheimer's Disease and the other, Angiopep 2, that is used as a shuttle of molecules to the central nervous system. The nanoconjugates were characterized by different techniques, absorption spectrophotometry, dynamic light scattering, zeta potential and transmission electron microscopy, among others. It was determined that the nanoconjugate is not cytotoxic and penetrates brain endothelial cells, and also diminishes the aggregation of the A β peptide *in vitro*. In the disease model *C. elegans* was observed that decreases the toxicity of aggregated peptide A β species and in the mouse model of the Alzheimer's Disease APP^{swe}/PSEN1^{dE9} we determined that

the nanoconjugate reach the brain in a targeted manner when we compared with the control group.

This thesis shows a promising system based on gold nanorods for the treatment of Alzheimer's Disease, which show no cytotoxic effects, inhibit the aggregation and toxicity of A β peptide and has an improved arrival to the brain.

1 Capítulo 1

**INTRODUCCION, OBJETIVOS E HIPOTESIS DE LA PRESENTE
TESIS**

1.1. Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una condición neurodegenerativa progresiva en donde hay una pérdida de la capacidad cognitiva y la memoria, impidiendo el normal desarrollo de las actividades cotidianas (Jalbert, Daiello, & Lapane, 2008). Esta enfermedad posee una incidencia significativa en adultos por los sobre 65 años. Según datos de Alzheimer's Disease International, 46,7 millones de personas padecen la enfermedad de Alzheimer a nivel mundial, proyectándose al 2050 que este número aumente a 131,5 millones (Alzheimer's Disease International, 2015). En Chile más de 170 mil personas padecen de esta enfermedad (Corporación_Alzheimer).

Normal Alzheimer

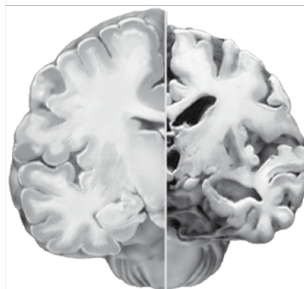


Figura 1.1 Imagen esquemática de cómo se vería un cerebro normal en comparación a un cerebro que presenta la EA (Alzheimer_Association)

La EA es una patología multifactorial, caracterizada por la pérdida de sinapsis y muerte neuronal en la corteza límbica e hipocampo, regiones que están relacionadas con la memoria y el aprendizaje (Wenk, 2003). Molecularmente se caracteriza por la hiperfosforilación de la proteína Tau y la agregación del péptido β -amiloide ($A\beta$). La proteína Tau es una proteína que regula la estabilidad de los microtúbulos y presenta alta expresión en axones (Trojanowski, Schuck, Schmidt, & Lee, 1989). La hiperfosforilación de esta proteína puede desencadenar una serie de eventos como la desestabilización de los microtúbulos comprometiendo el transporte axonal y la disminución de la plasticidad sináptica que pueden conducir al desarrollo de la EA (Bramblett et al., 1993; Lacor et al., 2004). Asimismo, el péptido $A\beta$ juega un rol fundamental en la patogénesis de la EA según la hipótesis amiloide establecida a principios de los 90 (Hardy & Higgins, 1992; Klein, 2013). El péptido $A\beta$ corresponde a una familia de péptidos de entre 39 y 43 aminoácidos producidos a partir de la proteína precursora del péptido $A\beta$ (APP), proteína transmembrana de tipo I, que sufre cortes proteolíticos secuenciales que pueden ser amiloidogénicos o no amiloidogénicos. Los cortes correspondientes a la ruta no amiloidogénica

son generados por las enzimas α -secretasa y luego por la γ -secretasa, formando el péptido p3, el cual no es tóxico. Por otra parte, en la ruta amiloidogénica, la APP es cortada primero por la enzima β -secretasa y luego por la enzima γ -secretasa, generándose el péptido $A\beta_{1-42}$ (Klein, 2013).

En condiciones patológicas el péptido $A\beta$ se agrega para dar origen a especies tóxicas como las fibras amiloides ($A\beta_f$) y especies oligoméricas ($A\beta_o$), éstas últimas las más tóxicas, y producen efectos neurotóxicos como disfunción y pérdida de las sinapsis, cambios en el citoesqueleto y morfología neuronal y la muerte de neuronas lo que conlleva a una pérdida de conectividad (Lacor et al., 2004; Zhao et al., 2008). Estas formas agregadas del péptido $A\beta$ se relaciona con la hiperfosforilación de Tau. De Felice y cols. observaron en experimentos *ex vivo* que oligómeros de $A\beta$ inducen la hiperfosforilación de tau (De Felice et al., 2008), por lo cual el desarrollo de nuevas terapias y fármacos tienen como blanco a éste péptido y sus diferentes estados de agregación.

Actualmente los tratamientos contra la EA están enfocados en retener la funcionalidad del paciente y retrasar o desacelerar la progresión de la enfermedad o sus síntomas. Dentro de éstos tratamientos se incluyen

inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChE) como donepezil, rivastigmina y galantamina. Estos tratamientos aminoran los síntomas, sin embargo, la progresión de la enfermedad continúa (Cummings, Morstorf, & Zhong, 2014; Qian, Hamad, & Dias-Lalcaca, 2015).

Dentro de las nuevas terapias que se están desarrollando, una estrategia propuesta para el tratamiento de la EA es evitar que se formen los oligómeros de A β o favorecer la desagregación de estas especies tóxicas (Klein, 2013). A la fecha, se han probado diferentes estrategias dirigidas contra los agregados de A β como el uso de anticuerpos monoclonales anti A β (Rinne et al.), vacunas (Schenk et al., 1999), moduladores/inhibidores de γ Secretasa (He et al., 2010), Resveratrol (Mouchiroud, Molin, Dalliere, & Solari, 2010) y algunos fenoles (Gandy & DeKosky, 2013), no obteniéndose todavía resultados clínicos satisfactorios debido a la baja efectividad o a efectos tóxicos por lo cual es relevante explorar nuevas estrategias para el tratamiento de la mencionada enfermedad (Qian et al., 2015).

Debido a que los tratamientos que tienen como blanco el péptido A β han fallado, ha surgido un nuevo paradigma, el cual apunta a tratar la enfermedad antes de que aparezcan los síntomas, indicando que los

tratamientos han fallado debido a que se aplican en etapas en que la EA se encuentra muy avanzada. Por lo cual el desarrollo de técnicas que nos permitan realizar un diagnóstico precoz de la enfermedad son necesarias (Harrison & Owen, 2016).

1.2. Uso de péptidos como inhibidores de la agregación de A β .

La formación de los agregados de A β ocurre mediante diversos intermediarios, incluyendo oligómeros que van desde 2 a 50 unidades de A β , oligómeros anulares, protofibrillas, fibrillas y finalmente las placas (Finder & Glockshuber, 2007) (Figura 1.2).

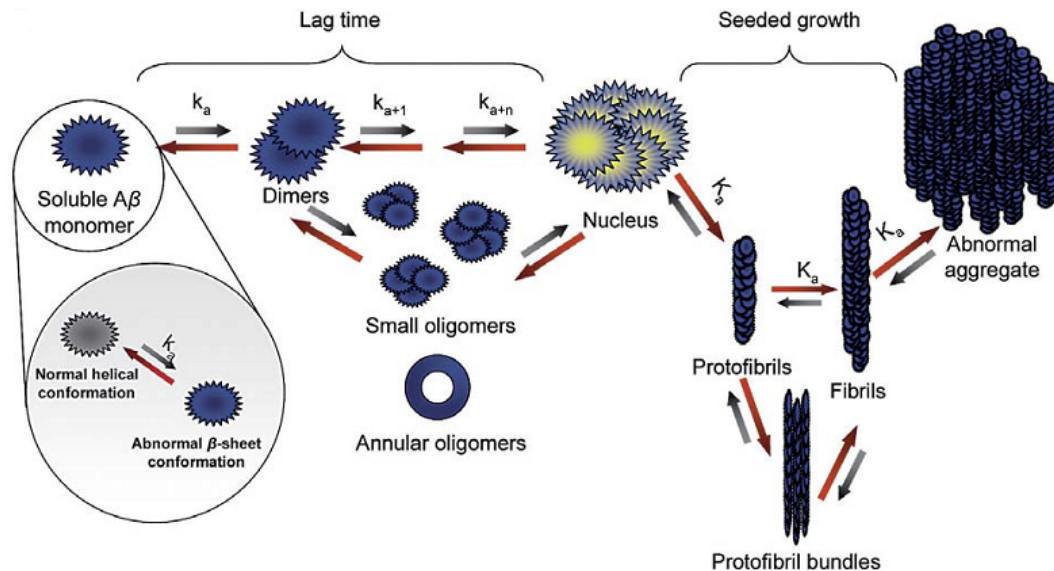
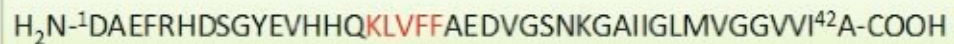


Figura 1.2 Esquema del proceso de formación de la fibras de Aβ (Finder & Glockshuber, 2007)

El estudio del proceso de agregación ha permitido identificar secuencias en el péptido Aβ, como la secuencia KLVFF comprendida entre el residuo 16 y el 20, que es necesaria para la interacción monómero-monómero y la agregación del péptido (Tjernberg et al., 1996) (Ver figura 1.3). En base a esta información se han diseñado diferentes péptidos, que al unirse a las secuencias claves para el proceso de agregación que da origen a las fibras, inhiben el proceso de agregación de Aβ {Bieler, 2004 #87}. Un conocido ejemplo es el péptido LPFFD (Soto et al., 1998), derivado de la secuencia $^{17}\text{LVFF}^{21}\text{A}$. En la secuencia LPFFD diseñada por Soto y cols. se reemplazó el aminoácido ^{18}V de la secuencia original $^{17}\text{LVFF}^{21}\text{A}$ por una P de manera

de evitar la formación de lámina β impidiendo así la auto agregación que da origen el proceso amiloidogénico. Asimismo, se reemplazó el residuo ^{21}A por un D para aumentar la solubilidad del péptido. Si bien LPFFD es un inhibidor de la agregación de $\text{A}\beta$ *in vivo* e *in vitro*, que se encuentra en fase clínica de investigación, requiere de concentraciones muy elevadas para producir el efecto terapéutico, lo que puede conllevar a efectos no deseados (Soto et al., 1998).



H₂N-¹DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVI⁴²A-COOH

Figura 1.3 Secuencia peptídica de $\text{A}\beta$, en rojo núcleo hidrofóbico (Soto et al., 1998).

Recientemente, mediante la técnica *mirror image phage display* y utilizando como blanco agregados de $\text{A}\beta_{1-42}$, se han identificado nuevos péptidos que se unen selectivamente a $\text{A}\beta$. Uno de estos péptidos, llamado D1, que posee la secuencia qshyrhispaqv (señalado en minúscula por tratarse de aminoácidos de la serie D), presenta una afinidad aproximadamente mil veces mayor que LPFFD por $\text{A}\beta$. *In vitro*, este péptido se une al agregado de $\text{A}\beta_{1-42}$ con una K_D de $5,38e^{-05}$, produciendo la

desagregación de las fibras de A β (Xue et al., 2012). Además este péptido está constituido por D-aminoácidos, por lo cual es menos sensible a proteasas, más resistente a la degradación y menos inmunogénico en comparación a los péptidos constituidos por L-aminoácidos (Funke et al., 2012).

1.3. Nanopartículas metálicas para la desagregación de A β

Las nanopartículas de oro (AuNPs) son estructuras de oro esféricas con dimensiones nanométricas que poseen propiedades electrónicas, ópticas y estructurales relacionadas directamente a su tamaño y a su composición. Al interactuar con la radiación electromagnética se genera una oscilación coherente (misma frecuencia) de los electrones de la banda de conducción del metal y la radiación incidente. Esta oscilación es conocida como resonancia de plasmón superficial (RPS) (S. Link & El-Sayed, 2003) y depende de la forma, tamaño y composición de la NP de oro y de las propiedades del medio que las rodea. El RPS se desplaza a mayores longitudes de onda a medida que aumenta el diámetro de la NP esférica o al variar la forma y composición de la misma (S. Link & El-Sayed, 1999). Un

ejemplo es el de las nanovarillas de oro (NvO) que poseen dos bandas RPS características, relacionadas con la longitud y el ancho de la barra, y se denominan bandas longitudinal y transversal, respectivamente. A medida que aumenta la relación de aspecto (largo/ancho) de la NvO, la banda longitudinal RPS se desplaza hacia la región infrarroja del espectro (S. Link, Mohamed, & El-Sayed, 1999). Es así que NvO con una relación de aspecto de 4 poseen una banda longitudinal centrada en los 800 nm, en la denominada “ventana biológica” (700 – 950 nm) (C. Adura et al., 2013), en la cual los tejidos y moléculas biológicas presentan su más baja absorción (ver Figura 1.4) (Stolik, Delgado, Perez, & Anasagasti, 2000). Esta propiedad convierte a las NvO en una excelente opción para el tratamiento de algunas enfermedades como cáncer, en donde es posible producir la destrucción selectiva de células tumorales unidas a NvO mediante la aplicación de radiación infrarroja.

En nuestro grupo, hemos desarrollado una nueva aplicación para las AuNPs; promover la desagregación de fibras de A β . Mediante el uso de radiación electromagnética, debido a la absorción y disipación local de energía por parte de las AuNPs produciendo un calentamiento local. Las AuNPs se recubrieron con el péptido CLPFFD que permite un

reconocimiento selectivo de agregados de A β , evitando la formación de fibras amiloides o produciendo la desagregación de la misma, de manera tal de reducir su toxicidad (Araya et al., 2008; M. J. Kogan et al., 2006). En particular el uso de NvO y la aplicación de radiación infrarroja, que conduce a la absorción y disipación local de energía dando lugar a una efectiva desagregación de fibras de A β , reduciendo también su toxicidad, por lo cual estas representan una potencial herramienta para el tratamiento de la EA (C. Adura et al., 2013).

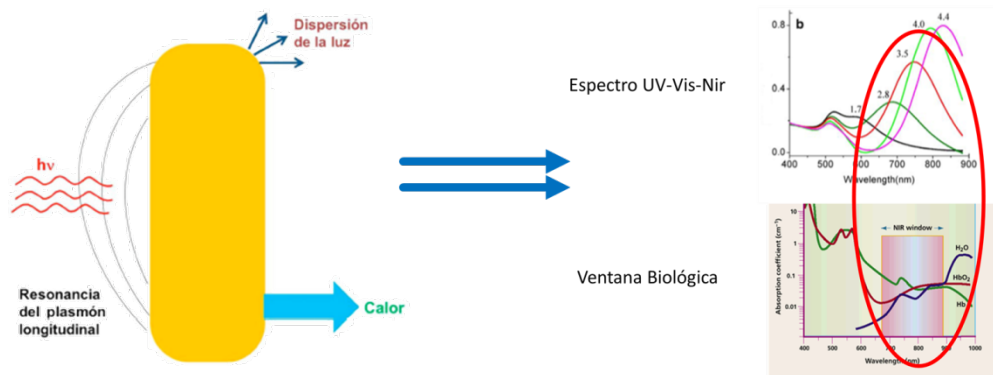


Figura 1.4 Esquema de absorción de energía y espectro UV-Vis-Nir de una NvO y ejemplo de absorción en la ventana biológica.

Para el tratamiento de la EA se han desarrollado otras estrategias utilizando NPs. NPs magnéticas fluorescentes, que tienen inmovilizadas en su superficie un anticuerpo monoclonal anti A β , evaluadas *ex vivo* en

cortes de cerebro de animales transgénicos para la Enfermedad de Alzheimer y mediante resonancia magnética y microscopía óptica permitieron detectar e inhibir la fibrilación del péptido A β , comprobando las potencialidades teragnosticas (terapia y diagnostico en un mismo procedimiento) para la EA (Skaat et al., 2013).

Otra aproximación ha sido el uso de nanopartículas (NPs) poliméricas de quitosano conjugadas con Magnevist (agente de contraste para Resonancia Magnética de Imagen (RMI)) cargadas con el inmunosupresor de ciclofosfamida, y funcionalizadas con un anticuerpo anti-amiloide IgG4.1. Los ensayos *in vivo* de estas NPs demostraron su utilidad para detectar amiloides cerebrovasculares mediante RMI y por tomografía computarizada de emisión de un fotón único (SPECT por sus siglas en inglés) (Agyare et al., 2014).

Una última estrategia ha sido acoplar quelantes de metales a nanopartículas, debido a que se a demostrados que el exceso de algunos metales favorece la agregación del A β lo que promovería el desarrollo de la EA (G. Liu, Men, Perry, & Smith, 2009).

Si bien el uso de NPs metálicas puede ser una herramienta promisoría para el desarrollo de una nueva estrategia terapéutica para la EA es

importante destacar que la llegada de las mismas al sistema nervioso central es muy baja (Guerrero et al., 2010) por lo cual en el presente proyecto se modificaron NvO con péptidos que favorecen el pasaje a través de la barrera hematoencefálica (BHE).

1.4. Cómo favorecer el cruce de nanopartículas a través de la Barrera Hematoencefálica

Uno de los aspectos que se debe tener en mente al momento de considerar un tratamiento contra la EA es la dificultad que existe en lograr acumular ciertos fármacos en el cerebro debido a la presencia de la BHE. Esta barrera está constituida por células endoteliales que forman una extensa superficie de intercambio sangre-cerebro (Abbott, Patabendige, Dolman, Yusof, & Begley, 2010) y es crucial para mantener la homeostasis. Las células endoteliales que constituyen la barrera, la membrana basal, pericitos, astrocitos y microglías componen la unidad neurovascular. Las células endoteliales, que forman la BHE, generan complejos de uniones estrechas y adherentes, creando una barrera física que bloquea el transporte paracelular. Los pericitos y astrocitos juegan un importante papel en la formación en la vascularización del sistema nervioso central.

Aproximadamente un tercio de la circunferencia del tubo endotelial está cubierto por pericitos y dos tercios por astrocitos, formando una barrera física y metabólica (ver Figura 1.5) (Velasco-Aguirre et al., 2015).

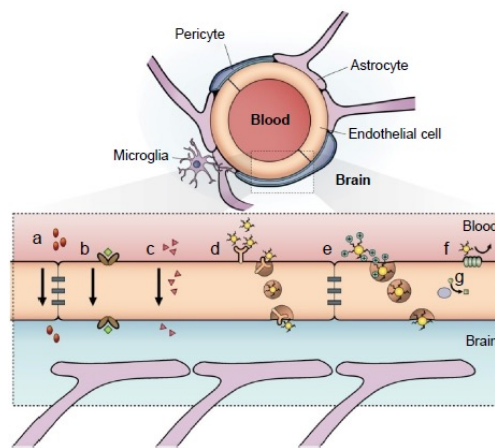


Figura 1.5 Esquema de la unidad neurovascular que constituye la BHE y las principales rutas de ingreso al SNC (Velasco-Aguirre et al., 2015).

Las diversas estrategias farmacéuticas que se emplean para mejorar el cruce a través de la BHE se basan en utilizar los mecanismos fisiológicos que existen para el transporte de moléculas como: la difusión pasiva, la difusión facilitada, el transporte paracelular y la endocitosis mediada por receptores. El mecanismo principal propuesto para favorecer el paso de NPs es la transcitosis mediada por receptores (RMT) siendo los principales involucrados los descritos en la tabla 1.1 (Abbott et al., 2010).

Tabla 1.1 Ejemplos de transporte de macromoléculas a través de la barrera hematoencefálica. (Abbott et al., 2010).

Transport system	Abbreviation (receptor)	Example ligands	Type	BBB direction	Reference
Transferrin	TfR	Fe-transferrin	RMT	Blood to brain	Visser et al., 2004
Melanotransferrin	MTfR	Melanotransferrin (p97)	RMT	Blood to brain	Demeule et al., 2002
Lactoferrin	LfR	Lactoferrin	RMT	Blood to CSF	Talukder et al., 2003
Apolipoprotein E receptor 2	ApoER2	Lipoproteins and molecules bound to ApoE	RMT	Blood to brain	Herz and Marschang, 2003
LDL-receptor-related protein 1 and 2	LRP1 LRP2	Lipoproteins, Amyloid- β , lactoferrin, α 2-macroglobulin, melanotransferrin (p97), ApoE	RMT	Bi-directional	Herz and Marschang, 2003; Gaillard et al., 2005
Receptor for advanced glycosylation end-products	RAGE	Glycosylated proteins, Amyloid- β , S-100, amphotericin	RMT	Blood to brain	Stern et al., 2002; Deane et al., 2004
Immunoglobulin G	Fc γ -R	IgG	RMT	Blood to brain	Zlokovic et al., 1990
Insulin	-	Insulin	RMT	Blood to brain	Banks, 2004
Leptin	-	Leptin	RMT	Blood to brain	Banks et al., 2002
Tumour necrosis factor	-	TNF α	RMT	Blood to brain	Pan and Kastin, 2002
Epidermal growth factor	-	EGF	RMT	Blood to brain	Pan and Kastin, 1999
Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (diphtheria toxin receptor)	HB-EGF (DTR)	Diphtheria toxin and CRM197 (protein)	RMT	Blood to brain	Gaillard et al., 2005
Leukaemia inhibitory factor	LIFRa (gp190)	LIF	RMT	Blood to brain/ spinal cord	Pan et al., 2000
Cationised proteins	+	Cationised albumin	AMT	Blood to brain	Pardridge et al., 1990
Cell penetrating peptides	+	SynB5/pAnt-(43-58)	AMT	Blood to brain	Drin et al., 2003

Un agente de tipo peptídico, de diseño, utilizado como lanzadera hacia el sistema nervioso central (SNC), es Angiopep 2, de la familia de péptidos Angiopep producidos a partir de derivados del dominio de Kunits de aprotinin (M. Demeule, Regina, et al., 2008), los cuales atraviesan la BHE a través de un mecanismo de transcitosis mediada por el receptor de lipoproteínas de baja densidad asociado a la proteína 1 (LRP1) (M. Demeule, Currie, et al., 2008). A nivel fisiológico la Apolipoproteína E emplea este receptor para el transporte de colesterol hacia el SNC (Sagare, Deane, & Zlokovic, 2012). LRP1 es un miembro de la familia de receptores de LDL que es multifuncional y que actúa como receptor endocítico y de

señalización. Este receptor se sobreexpresa en endotelio cerebral y también se expresa en neuronas, músculo liso, astrocitos, macrófagos, fibroblastos y hepatocitos. Se encuentra en dos formas: unido a membrana (LRP1) y en forma soluble (sLRP1), el cual se encuentra en el plasma (Sagare et al., 2012).

1.5. Modificación de NPs metálicas con péptidos para favorecer la transcitosis mediada por receptores.

En experimentos llevados a cabo en nuestro laboratorio se demostró que la modificación de NPs de oro de 10 nm con el péptido CLPFFD favorece el pasaje a través de la BHE, lo que podría deberse a un proceso de endocitosis mediada por el receptor RAGE que promueve el influjo de A β al sistema nervioso central (Guerrero et al., 2010). No obstante, es importante mencionar que la proporción de NPs que llegan al cerebro es muy baja respecto de la dosis inyectada. Es importante destacar que la penetración de las NpO-CLPFFD al SNC no produce efectos tóxicos aparentes como la formación de perforaciones a nivel de la BHE (Guerrero et al., 2010). En un trabajo más reciente se conjugaron NPs de oro de 10 nm al péptido THR que reconoce el receptor de transferrina, favoreciéndose el

cruce a través de la BHE, sin embargo, los niveles de oro alcanzados siguieron siendo bajos (Prades et al., 2012).

En este proyecto se propuso la modificación de NvO con el péptido Angiopep 2, con el objetivo de favorecer el pasaje a través de la BHE por endocitosis mediada por receptor, y con el péptido D1 con el fin de aumentar la afinidad por agregados de A β .

Otro de los inconvenientes que pueden presentarse al inyectar NPs *in vivo* es la interacción de las mismas con los componentes sanguíneos. Dichos componentes podrían unirse a su superficie, cambiando sus propiedades (tamaño, carga, etc.) y conduciendo a efectos tóxicos y retención en diversos órganos, disminuyendo así el tiempo de circulación en plasma y reduciendo la penetración a través de la BHE (Moghimi, Hunter, & Murray, 2001).

En nuestro grupo de investigación se ha demostrado que AuNPs de 12,5 nm se acumulan en hígado y bazo excretándose por la vía biliar (Lasagna-Reeves et al., 2010). Según Sadauska y cols. la acumulación en los mencionados órganos podría deberse a la captación de las NPs por células

del sistema retículo endotelial (SRE) lo que dificulta en gran medida la biodisponibilidad para llegar al cerebro (Sadauskas et al., 2009). Otros aspectos claves que se relacionan con el comportamiento farmacocinético de las NPs son la carga, el tamaño y el recubrimiento con proteínas del plasma para formar la denominada corona de proteínas. Es así que NPs con carga superficial positiva (potencial zeta aprox. +50 mV) producen efectos tóxicos debido a la formación de poros en las membranas celulares, desencadenando procesos de hemólisis y agregación plaquetaria (Li & Huang, 2008; Xiao et al., 2011). Asimismo, la “corona de proteínas” que se forma alrededor de la NP puede contener inmunoglobulinas que son reconocidas por el SRE favoreciéndose la acumulación en bazo e hígado. También, en la mencionada corona, las proteínas podrían cambiar su estructura terciaria al unirse a la NP perdiendo sus actividades biológicas (Xiao et al., 2011). Por otra parte, el tamaño de la NP puede jugar un papel clave en su biodistribución, es así que NPs de 300 nm quedan acumuladas en bazo e hígado principalmente, en comparación a NPs de 10 nm que pueden distribuirse en todo el organismo llegando al cerebro, teniendo una alta permeabilidad y también una alta tasa de eliminación (Li & Huang, 2008).

Una estrategia para reducir la interacción con proteínas del plasma que favorezcan la interacción con el SRE y así evitar la retención en hígado y bazo, es recubrir las NPs con polímeros biocompatibles como el polietilenglicol (PEG), el cual es hidrofílico e inerte. Este recubrimiento disminuye las interacciones con proteínas plasmáticas, disminuyendo su captura por el SRE. Asimismo, el mencionado recubrimiento puede cambiar la carga superficial, disminuyendo el potencial Z (pZ) a niveles cercanos a la neutralidad lo cual también reduce la toxicidad (Li & Huang, 2008).

1.6. Uso de modelos animales de la enfermedad de Alzheimer para probar la distribución de nanomateriales y la desagregación de A β

Un paso clave en el diseño y desarrollo de nuevas herramientas terapéuticas es el uso de modelos *in vivo*, que contemplan más variables que los modelos *in vitro*, de manera que permiten dar un paso más cerca a los resultados que se podrían tener en humanos. En ese sentido, en el estudio de la EA, se ha utilizado un modelo básico empleando el organismo *Caenorhabditis elegans*, el cual en su forma *wild type* produce la proteína APP: APL1. Ésta proteína posee una alta identidad dentro del dominio extracelular e intracelular con la APP humana, sin embargo no posee la

secuencia de A β (Ewald & Li, 2012). No obstante, se ha desarrollado un modelo de *C. elegans* manipulado genéticamente, al que se le incorporó un mini gen que codifica para el péptido A β_{1-42} (C. D. Link, 1995). En ambos casos el gen se ha puesto bajo el dominio de un promotor exclusivo de las células musculares, de manera de localizar en ese tejido los agregados tóxicos de A β_{1-42} , lo que conduce a una pérdida de la motilidad del nematodo con el paso del tiempo de vida del animal. Este sistema es ideal para realizar experimentos preliminares para evaluar la eficacia de un fármaco a ser empleado para deshacer los agregados tóxicos de A β_{1-42} .

Otro modelo *in vivo* que se utiliza para estudiar la enfermedad de Alzheimer es el modelo de ratón. Debido a que los eventos que llevan a una persona a desarrollar la enfermedad de Alzheimer no se conocen con certeza, este modelo animal ha sido desarrollado basándose en mutaciones características de la EA con un origen familiar o hereditario. Se valida esta manera de recrear la enfermedad, ya que se asume que los eventos río abajo de la iniciación de la enfermedad son muy similares entre la enfermedad con un origen hereditario y la de origen idiopático. Este modelo es esencial para determinar mecanismos moleculares en la progresión de la enfermedad y para evaluar potenciales terapias (LaFerla & Green, 2012). En este

trabajo usamos la cepa doble transgénica APP^{swe}/PS1, la cual expresa los transgenes para la APP humana mutante Swedish y la presenilina 1 humana mutante con la delección E9, ambas dirigidas a neuronas del SNC (Filali, Lalonde, & Rivest, 2011).

De esta manera, en este proyecto, NvOs recubiertas con polietilenglicol se multimodificaron con el péptido D1 que se une con gran afinidad a agregados tóxicos de A β y con el péptido Angiopep 2, para favorecer la transcitosis a través de la barrera hematoencefálica, de manera de dirigir las NvO hacia el SNC y que puedan alcanzar las diferentes formas de agregados tóxicos del péptido A β y potencialmente producir su desagregación *in vivo* mediante la aplicación de radiación infrarroja.

1.7. Hipótesis de Trabajo

NvO multifuncionalizadas con polietilenglicol (PEG), el péptido Angiopep-2 y con el péptido D1, presentan una mejor llegada al cerebro, reconocen agregados del péptido β -amiloide y afectan la agregación del péptido $A\beta$ *in vitro*, respecto a una NvO-PEG sin los péptidos.

1.8. Objetivo General

Determinar si NvOs multifuncionalizadas con polietilenglicol (PEG), con el péptido Angiopep-2 y con el péptido D1, presentan una mejor llegada al cerebro y si se codistribuyen con los agregados $A\beta$ *in vivo* en un modelo animal de la EA.

Estudiar el efecto *in vitro* de la irradiación sobre la agregación del péptido $A\beta$ incubado con NvOs multifuncionalizadas.

1.9. Objetivos Específicos

1. Sintetizar y caracterizar NvO multifuncionalizadas con PEG, D₁ y Angiopep2.
2. Evaluar la capacidad de las NvO multifuncionalizadas de penetrar modelos celulares de Barrera Hematoencefálica.
3. Evaluar el efecto de las NvO modificadas sobre la agregación del péptido A β .
4. Evaluar la capacidad de las NvO multifuncionalizadas de llegar al cerebro de ratones APP^{swe}/PSEN1^{d9}, un modelo murino de la EA.
5. Evaluar el efecto de las NvO modificadas en la cepa 2120 de *C. elegans*, un modelo de la EA.

2. Capítulo 2

MATERIALES Y METODOS

Reactivos

Los reactivos HAuCl_4 , Bromuro de cetiltrimetilamonio, borhidruro de sodio, ácido ascórbico, AgNO_3 , Thioflavina T, Thioflavina S, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), Sulfo-*N*-Hydroxysuccinimide (Sulfo-NHS), buffer fosfato salino (PBS), fueron comprados en Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA).

Los reactivos suero fetal bovino (SFB), suplemento b27, medio Neurobasal, GlutaMax, medio DMEM, AlexaFluor647 se adquirieron en Gibco/Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)

Los reactivos HFIP y HCl fueron adquiridos en Merk (Darmstadt, Alemania).

Los reactivos HS-PEG-OMe y HS-PEG-OMe se adquirieron en JenKem Technology (Texas, USA).

AccQ-Tag kit fue comprado a Waters Corporation (Milford, Massachusetts, USA).

El péptido $\text{A}\beta_{1-42}$ fue adquirido de rPeptide (Georgia, USA), Paraformaldehido (PHF) fue adquirido a Electron Microscopy Sciences (Pensilvania, USA) y el reactivo MTS se adquirió de Promega (Madison, USA).

2.1. Preparación de Nanovarillas de oro (NvO) estabilizadas con CTAB.

Las NvO fueron sintetizadas usando el método mediado por semillas, en el cual se forman en una primera etapa pequeñas esferas y a partir de ellas se produce el crecimiento de la NvO (MacQueen, 2007). En un primer paso, se preparó una solución de semillas reduciendo 250 μl de HAuCl_4 con 9,75 ml de Bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) 0,1 M y 600 μl de borhidruro de sodio (0,01 M) preparado en frío. Las semillas se mantuvieron a 27°C por dos hrs antes de ser usadas. A continuación se preparó una solución de crecimiento en la cual se le agregaron 55 μl de ácido ascórbico 0,1 M, 75 μl AgNO_3 0,01 M, 9,5 ml de CTAB 0,1 M y 500 μl de HAuCl_4 0,01 M. Luego se agregaron 250 μl de HCl 0,1 M y 12 μl de la solución de semillas preparadas previamente. La solución se dejó reaccionar por 10 min a 27°C para luego centrifugar a 7030 g por 15 min.

Luego de la centrifugación, el sobrenadante fue descartado, y el *pellet* fue resuspendido en agua mili Q.

2.2. Espectrofotometría de Absorción Molecular

Las NvO fueron caracterizadas mediante espectrofotometría de absorción molecular a temperatura ambiente utilizando un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25 para realizar un espectro, con la finalidad de observar las dos bandas de absorción de los plasmones característicos de las NvO, el transversal aproximadamente en 520 nm y el longitudinal que va desde los 700 a los 1000 nm, dependiendo de su relación de aspecto (S. Link & El-Sayed, 2003).

2.3. Dispersión Dinámica de la Luz (DLS)

Las NvO también fueron caracterizadas mediante dispersión dinámica de la luz (DLS) con el objetivo de determinar sus diámetros hidrodinámicos (D_h) y su estabilidad coloidal. Estas mediciones fueron realizadas por triplicado en un equipo Zeta sizer 3000 de Malvern Instruments y se usó una celda capilar plegada desechable (DTS1070).

2.4. Potencial Z (pZ)

La medición de potencial Z (pZ) (Zeta sizer 3000, Malvern Instruments, UK) de nanopartículas consiste en 3 repeticiones de cada solución de NvO. Dado que las mediciones del potencial zeta es realizada en agua, la aproximación de Smolochowski (Doane, Chuang, Hill, & Burda, 2012) ha sido usada para calcular el potencial zeta a partir de la movilidad electroforética de la nanopartícula en solución. Las determinaciones electroforéticas de potencial zeta fueron comúnmente realizadas en medio acuoso y una solución moderada de electrolitos. Se uso una celda capilar plegada desechable (DTS1070).

2.5. Microscopía electrónica de Transmisión (TEM)

Las NvO fueron observadas por microscopía electrónica usando un microscopio electrónico de barrido con módulo de transmisión electrónica (STEM) FEI Inspect F50. Las muestras fueron preparadas depositando una gota de una suspensión de NvO sobre grillas de cobre tratadas con Formvar carbón y dejarlas secar. Para las muestras con fibras del péptido A β , la

muestra se preparó de la misma manera, añadiendo un último paso de tinción con ácido fosfotúngstico 1% por dos minutos.

Mediante esta técnica se determinó su tamaño y la relación de aspecto (largo/ancho) mayoritaria para la población de NvO. Para obtener datos poblacionales se midieron 100 partículas empleando el programa ImageJ representándose los datos como histogramas de frecuencia vs relación de aspecto.

2.6. Estabilización de NvO con PEGs y conjugación con ligandos peptídicos

Los péptidos Angiopep 2 y D1 fueron conjugados a las NvO en un procedimiento de tres pasos: Primero, 50 μ l de una solución de SH-PEG-OMe 1 mM fue agregada a 10 ml de una suspensión de NvO-CTAB 1 nM, y la solución se dejó reaccionar bajo agitación magnética durante 10 min. Las NvO-PEG-OMe fueron centrifugadas a 20.800 g por 10 min y luego el sobrenadante fue descartado. El *pellet* fue resuspendido en 10 ml de agua mili Q. Posteriormente, se agregó a la suspensión de NvO-PEG-OMe 300 μ l de una solución de SH-PEG-COOH 1 mM y se dejó reaccionar durante

una hora en agitación mecánica, resultando en una capa mixta de PEG-OMe y PEG-COOH sobre la superficie de la NvO (NvO-PEGs). La suspensión fue luego centrifugada a 20.800 g por 10 min y el sobrenadante fue descartado. El *pellet* fue resuspendido en 100 μ l de la solución amortiguadora MES 0,1M pH 5,5. Posteriormente, se agregaron 0,2 mg de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y 0,5 mg de sulfo N-hidroxisuccinimida (Sulfo-NHS) en 100 μ l de MES y luego fueron incubadas con la suspensión de NvO-PEGs por 15 min para activar los grupos carboxilos en la superficie de la NvO. El exceso de EDC/Sulfo-NHS fue removido posteriormente por centrifugación a 20.800 g por 10 min. Las NvO-PEGs activadas fueron mezcladas con los péptidos, en una relación 1:9 de D1 y Ang2 respectivamente, en la solución amortiguadora PBS pH 7,4 en una relación NvO:péptido 1:1.000. La solución se mantuvo en agitación suave durante 2 hrs a temperatura ambiente y es guardada a 4°C. Previo a su uso, las NvO-péptidos fueron centrifugadas a 20.800 g por 10 min para eliminar los péptidos no unidos.

2.7. Calculo de la concentración de NvO

Una alícuota de un volumen conocido de una suspensión de NvO fue liofilizada y el contenido de oro fue determinado por activación neutrónica, (CAu) (Comisión Chilena de Energía Nuclear, CCHEN).

Las muestras fueron selladas y expuestas por 17 hrs a un flujo de neutrones de 0,25–1,3 n/cm²s con un poder de 5 mW usando un reactor RECH-1 en la Comisión Chilena de Energía Nuclear, CCHEN, gatillando la conversión de ¹⁹⁷Au a ¹⁹⁸Au. Después de 7-12 días de bombardeo con neutrones, los rayos γ emitidos por las muestras fueron contados y separados por energía usando un detector de germanio acoplado espectrómetro multicanal de rayos γ acoplado a un computador. El espectro de rayos γ fue analizado usando el software SAMPO90 Canberra. Una vez obtenida la concentración de oro presente en la muestra y conociendo el número de átomos por AuNP así como la densidad de este elemento en el nanocrystal y el tamaño de las mismas mediante observaciones de TEM (realizando una estadística sobre 100 AuNP) se determinó la concentración molar de las AuNP siguiendo la ecuación 1.1 publicada por Link y cols (S. Link & El-Sayed, 2001).

Ecuación 1.1:

$$C_{AuNV} = \frac{4 \times C_{Au}}{\rho_{Au} \times \pi \times W^2 \times L}$$

Dónde:

ρ_{Au} : densidad de átomos de oro en el bulk (59 átomos/nm³)

C_{Au} : concentración de oro determinada por activación neutrónica (CCHEN)

L: largo de las NV determinadas por TEM

W: ancho de las NV determinadas por TEM

2.8. Estimación del número de moléculas de péptido por NvO

Para estimar el número de moléculas de péptido acopladas a cada NvO-modificada se hizo un análisis de los aminoácidos presentes en las muestras de NvO. Se realizó una hidrólisis de las NvO-modificadas agregando HCl 6N y un patrón de concentración conocida (ácido aminobutírico) calentándose la muestra en un tubo cerrado a 110°C durante 72 hrs. Posteriormente, el tubo se enfrió eliminándose todo el ácido clorhídrico mediante evaporación rotatoria (hasta sequedad). El sólido obtenido fue

resuspendido en 200 μl de HCl 20 mM. Posteriormente, se tomaron 20 μl , a los cuales se le agregaron 60 μl de tampón borato (reactivo comercializado junto al AccQ-Tag kit de Waters como AccQ-Fluor Borate buffer). Posteriormente, la muestra se derivatizó agregando 20 μl de 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato (AQC) (reactivo comercializado como AccQ-Fluor por Waters), el cual se dejó durante 1 min a temperatura ambiente y luego 10 min a 55°C. Una vez realizado este proceso la muestra se inyectó en un equipo de HPLC-PDA conteniendo una columna AccQ-Tag (C18; 4 μm ; 3,9 x 15mm) obteniéndose los picos correspondientes a los aminoácidos presentes en la muestra, para poder realizar la comparación se cuenta con un estándar de aminoácidos (pico-Tag comercializado junto al kit AccQ-Tag por Waters). Finalmente, siguiendo un aminoácido que sea único para cada péptido, se determinó la concentración que hay del mismo. Al conocer la cantidad de NvO que se colocaron en un inicio se puede determinar la relación péptido/NvO.

2.9. Cultivo celular de la línea de neuroblastoma SH-SY5Y

La línea celular SH-SY5Y fue mantenida en DMEM bajo en glucosa (Biological Industries) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) inactivado, 2 mM de glutamina, 50 U/ml de penicilina y 0,05 g/ml de estreptomicina. Se hicieron crecer y se mantuvieron a 37°C en atmosfera de CO₂ al 5%.

2.10. Cultivo celular de la línea celular endotelial de cerebro de ratón inmortalizada bEnd.3

La línea celular bEnd.3 fue mantenida en DMEM alto en glucosa (Gibco) suplementado con 10% de SFB inactivado, 2 mM de glutamina, 50 U/ml de penicilina y 0,05 g/ml de estreptomicina. Las células se hicieron crecer y se mantuvieron a 37 °C en atmosfera de CO₂ al 5%.

2.11. Cultivo de neuronas Hipocampales

El cultivo primario de neuronas de hipocampo de embriones de rata

Sprague-Dawley fue preparado como describe Stefanie Kaech y Gary Banker (Kaech & Banker, 2006). Primero, ratas preñadas de 18 días fueron anestesiadas mediante inhalación en cámara de CO₂, se removieron los embriones y se disectó el hipocampo en solución salina balanceada de Hank (HBSS). Después, el tejido fue resuspendido en HBSS con tripsina al 1% y se incubó por 20 min a 37°C. Luego, el tejido se disoció de forma mecánica en medio de cultivo DMEM bajo en glucosa, suplementado con 10% SFB. Posteriormente, las células hipocampales fueron sembradas en placas tratadas con polilisina y mantenidas con medio neurobasal suplementado con B27 y GlutaMax durante 6 días antes de ser usadas.

2.12. Ensayo de viabilidad celular para la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y

Para determinar el efecto de las NvO-D1/Ang2 sobre la viabilidad celular en la línea SH-SY5Y se utilizó el ensayo de viabilidad celular de MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium). Este ensayo permite establecer una relación entre el número de células viables y la absorbancia a una longitud de onda

determinada. Para este ensayo, se sembraron células a una densidad de 5.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos y fue mantenido con medio de cultivo DMEM. Luego, las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de NvO-D1/Ang2 (0,1, 0,2 y 0,4 nM). Después de 24 hrs de incubación, se evaluó la viabilidad celular por quintuplicado, en tres experimentos independientes usando el ensayo de MTS de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las sales de tetrazolium del MTS necesitan un reactivo acoplante de electrones (metosulfato de fenazina, PMS), los cuales (PMS y MTS) fueron disueltos en PBS a un pH óptimo en el rango de 6 a 6,5. PMS y MTS y fueron mezclados para obtener en el ensayo 333 µg/ml de MTS and 25 µM de PMS. Esta mezcla fue agregada a las células por un rango de entre 1 a 3 hrs a 37°C. Finalmente se determinó la absorbancia a 490 nm.

2.13. Ensayo de viabilidad celular para la línea celular endotelial de cerebro de ratón bEnd.3.

Para este ensayo, se sembraron células a una densidad de 10.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos y fue mantenido con medio de

cultivo DMEM. Luego, las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de NvO-D1/Ang2 (0,1, 0,2 y 0,4 nM). Después de 24 hrs de incubación, se evaluó la viabilidad celular por quintuplicado, en tres experimentos independientes usando el ensayo de MTS de acuerdo a las instrucciones del fabricante, como se ha descrito en la sección 2.12.

2.14. Ensayo de viabilidad celular en cultivo de neuronas hipocampales.

Las células hipocampales fueron sembradas en una placa de 96 pocillos a una densidad de 60.000 células por pocillo, mantenidos en medio Neurobasal suplementado con B27 y Gluta Max. Las células neuronales fueron tratadas con NvO-D1/Ang2 a diferentes concentraciones (0,1, 0,2 y 0,4 nM). 24 hrs después la viabilidad celular fue evaluada mediante un ensayo de MTS, como se describió en la sección 2.12.

2.15. Cuantificación de oro en cultivo línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y

La línea celular SH-SY5Y fue sembrada en una placa de 24 pocillos a

una densidad de 60.000 células por pocillo y luego mantenida con medio DMEM. Las células SH-SY5Y fueron incubadas con NvO-D1/Ang2 (0,4 nM) a diferentes tiempos (0-24 hrs.). Las células fueron luego lavadas cinco veces con una solución amortiguadora salina de fosfato (PBS) pH 7,4 y tratadas con tripsina al 1% para recolectarlas luego en 500 μ l de PBS. Luego la solución correspondiente a cada muestra fue liofilizada y el contenido de oro fue determinado por el análisis de activación neutrónica en la Comisión Chilena de Energía Nuclear (CCHEN).

2.16. Cuantificación de oro en cultivo primario de hipocampo

Las células hipocampales fueron sembradas en una paca de 96 pocillos a una densidad de 60.000 células por pocillo, luego mantenidas con medio Neurobasal suplementado con B27 y GlutaMax. Las células hipocampales fueron incubadas con NvO-D1/Ang2 (0,4 nM) a diferentes tiempos (0-24 hrs.). Las células fueron luego lavadas cinco veces con una solución amortiguadora salina de fosfato (PBS) pH 7,4 y tratadas con tripsina al 1% para recolectarlas luego en 200 μ L de PBS. Luego la solución correspondiente a cada muestra fue liofilizada y el contenido de oro fue

determinado por el análisis de activación neutrónica en la Comisión Chilena de Energía Nuclear (CCHEN).

2.17. Marcaje de NvO-multimodificadas con Alexa Fluor 647.

Las NvO multimodificadas (NvO-PEGs, NvO-D1, NvO-Ang2, NvO-D1/Ang2, NvO-pApoE y NvO-D1/pApoE) fueron marcadas con la sonda fluorescente Alexa Fluor 647 activada con una hidrazida. Este grupo reacciona en solución acuosa con ácidos carboxílicos, aldehídos y cetonas.

500 µl de una suspensión de NvO-modificadas (20 nM), se lavaron con agua mili Q mediante centrifugación (20.800 g por 10 minutos) 3 veces para eliminar el exceso de péptido libre remanente del proceso de conjugación. Luego, se resuspendieron en 100 µl de agua mili Q y se le agregaron 10 µl de una solución 1 mg/ml de Alexa fluor 647 (ThermoFisher) activada con hidrazina. Se incubó la solución protegida de la luz durante toda la noche con agitación mecánica a temperatura ambiente, para posteriormente ser guardada a 4°C. Antes de ser utilizada, fue lavada con agua mili Q tres veces por centrifugación, para eliminar la sonda

fluorescente no unida. Se evaluó la presencia de la sonda fluorescente en la NvO-modificada realizando un barrido de emisión entre 630 nm y 700 nm.

2.18. Evaluación de la penetración celular de NvO-multimodificadas marcadas con Alexa Fluor 647 en la línea celular bEnd.3 mediante citometría de flujo.

Las células bEnd.3 se sembraron a una densidad de 40.000 células por pocillo una placa de 24 pocillos y luego de 24 hrs de cultivo éstas formaron una monocapa confluyente. Luego, las células fueron incubadas con NvO-multimodificadas (NvO-PEGs, NvO-D1, NvO-Ang2, NvO-D1/Ang2, NvO-pApoE y NvO, D1/pApoE) marcadas con Alexa Fluor 647 a una concentración de 0,05 nM por 2 o 24 hrs a 37°C. Luego de eso, las células fueron lavadas 3 veces, tripsinizadas y recolectadas. Las células fueron lavadas una vez más y se realizó el análisis de citometría de flujo utilizando un equipo Beckman Coulter CyAn ADP equipado con 3 lasers 488, 643 y 405 nm. Se evaluaron 10.000 células por muestra y todos los ensayos se hicieron por triplicado.

2.19. Preparación de células bEnd.3 incubadas con NvO-D1/Ang2 para evaluar internalización mediante TEM.

Para la fijación celular, las células bEnd.3 fueron sembradas en una placa petri de 90x15 mm y se incubaron a 37 °C en un atmosfera de CO₂ hasta que alcance una confluencia mínima de 70%. Luego de 24 horas de incubación con las muestras de NV (NvO-D1/Ang2, 0,05 nM) las células fueron lavadas con medio fresco y se fijaron con glutaraldehído 2,5% en buffer fosfato 0,1 M. Las células fueron raspadas desde la superficie celular y recolectadas en un tubo Eppendorf para luego dejar fijar durante la noche a 4°C. Luego el *pellet* fue post fijado con OsO₄ 1% en solución amortiguadora de fosfato por 90 min, deshidratado en soluciones con gradiente de acetona y finalmente embebido en Epon. Se cortaron secciones de 80 nm de grosor y se colocaron grillas de cobre cubiertas con carbón, posteriormente teñidas con acetato de uranilo.

2.20. Agregación del péptido A β 1-42 en presencia de NvO-modificadas con péptidos.

Para la formación de las fibras del péptido A β , alícuotas de 0,05 mg del péptido A β ₁₋₄₂ se trataron con HFIP (1, 1, 1, 3, 3, 3-Hexafluoro-2-propanol) durante 30 min a temperatura ambiente. Luego las muestras fueron liofilizadas y resuspendidas en 28 μ l de H₂O MiliQ y se incubaron a 4°C toda la noche. Luego se agregaron las NvO (resuspendidas en agua) quedando a una concentración de 0,48 nM. La concentración final del péptido A β fue de 20 μ M en todos los casos. El péptido fue incubado durante 48 hrs a 37°C con agitación mecánica de 300 rpm.

A las fibras ya crecidas se les realizó el test de fluorescencia de ThT. Este cromóforo fluoresce a 480 nm al ser excitado a 450 nm en presencia de fibras de A β , siendo la intensidad de fluorescencia emitida por esta molécula directamente proporcional a la cantidad de fibras de A β presentes. De esta manera se puede detectar la presencia de fibras como así también se pudo evaluar la desaparición o aumento de las mismas (Sabaté & Estelrich, 2005; Sabaté & Saupe, 2007). Después de la incubación, 25 μ l de las muestras se depositaron en pocillos de placas de fondo negro Nunc®

MaxiSorp™ 384 well plates, que contenían 20 µl del buffer glicina 0,1 M a pH 8,4 y en el momento antes de realizar la medición se agregaron 5 µl de tioflavina t (ThT) 100 µM a cada pocillo. Estos experimentos fueron realizados en un espectrofluorímetro de placas BioTek, modelo synergy MX, excitando a 450 nm y leyendo la fluorescencia a 480 nm. Todos los datos de fluorescencia de ThT realizados en esta tesis se expresan como porcentaje con respecto a un control de fibras de Aβ sin tratamiento de NvO, solamente con el vehículo (100%). Las diferencias significativas entre el conjunto de datos contables y los experimentos fueron determinados utilizando la prueba de Student para muestras no pareadas. El índice de significancia de un 95%, ($p < 0,05$), fue considerado estadísticamente significativo.

2.21. Agregación del péptido Aβ1-42 en presencia de NvO-modificadas con péptidos e irradiadas con láser de 808 nm y 350 mW de potencia.

Se repitió el protocolo de incubación descrito en la sección 2.20, con la diferencia que previo al proceso de crecimiento de las fibras, las muestras

se dividieron en dos y una de ellas es irradiada con un láser de 808 nm y 350 mW de potencia durante dos horas, y la otra alícuota no es irradiada. Posterior a la irradiación, se sigue con el proceso de crecimiento y evaluación del crecimiento de las fibras como se describe en 2.20.

2.22. Propagación de *C. elegans* 2120 y tratamientos.

Los medios y soluciones utilizadas para trabajar con éste modelo fueron las siguientes:

- Medio M9: 44 mM KH_2PO_4 , 36 mM Na_2HPO_4 , 0,5 mM MgSO_4 , 86 mM NaCl.
- Medio NGM: 1,7% de agar, 0.3% NaCl y 0,25% bactopectona. Autoclavado por 50 min.
- Solución de cloro para sincronización: 28% NaOH 4%, 40% Hipoclorito de sodio (cloro comercial) y 32% de agua.

Para sincronizar una población de gusanos en la misma etapa de desarrollo, gusanos hermafroditas en edad reproductiva fueron tratadas con el método de hipoclorito (Lewis & Fleming, 1995), y los huevos que se obtuvieron son sembrados en una placa de agar, como las que se describieron

previamente en esta sección. Los animales luego fueron recolectados al tiempo indicado (etapa larvaria L4) mediante el lavado de la placa con la solución salina M9 y precipitados por centrifugación suave descartándose el sobrenadante. Los gusanos hermafroditas fueron usados para todos los experimentos que incluyen la cepa CL2120.

Los nematodos *C. elegans* cepa CL2120 se cultivaron y se mantuvieron en medio NGM según protocolo (Stiernagle, 2006), en placas inoculadas con *Escherichia coli* OP50 cultivadas previamente en medio LB (Brenner, 1974). La cepa CL2120 fue mantenida a 20°C.

Para el tratamiento con NvO-D1/Ang2 o el péptido D1 se utilizó el siguiente protocolo durante 5 días:

Los gusanos fueron recolectados mediante el lavado de las placas con la solución salina M9 en etapa larvaria L4. Luego se precipitaron por centrifugación suave y el sobrenadante fue descartado. Luego de eso, los gusanos fueron incubados con NvO-D1/Ang2 1,5 nM o el péptido D1 a 0,5 o 1 uM, por cuatro hrs. Posteriormente los gusanos se colocaron nuevamente en una placa con agar y bacterias y alimentándose por dos horas. Luego los gusanos fueron nuevamente recolectados e incubados con NvO-D1/Ang2 1,5 nM o el péptido D1 a 0,5 o 1 uM, por cuatro hrs más.

Finalmente, los gusanos son dejados en una nueva placa alimentándose durante toda la noche (13 hrs aproximadamente).

2.23. Análisis de Movimiento

A los días 3 y 5 de tratamiento, algunos gusanos fueron tomados y se registró su movimiento grabándolos mientras nadaban en una gota de la solución salina M9. Estos videos luego fueron analizados usando el programa WormLab 3.0 (MBF Bioscience).

2.24. Tinción con Tioflavina S de *C. elegans* 2120

La tinción con Tioflavina S (ThS) fue realizada como se describe previamente (Fay, Fluet, Johnson, & Link, 1998). Primero, los gusanos fueron recolectados desde las placas y fijados con paraformaldehído al 4% en PBS, pH 7,4, por 24 hrs a 4 °C. Luego, la solución de fijación fue removida y reemplazada por una solución de permeabilización (125 mM Tris, pH 7,4, 1% Triton X-100, 5% β -mercaptoethanol) y los gusanos fueron incubados a 37 °C por 24 hrs. Los animales luego fueron lavados

tres veces con PBS-T (PBS más 0.1% Triton X-100), teñidos con 0,125% de ThS (Sigma) en etanol 50% por dos minutos y posteriormente desteñidos por dos minutos más en etanol 50%. Las muestras teñidas fueron resuspendidas en PBS y montadas en un portaobjeto usando medio de montaje fluorescente (Fluoromount). Las fotografías se obtuvieron usando un microscopio de fluorescencia fotografiándose específicamente la cabeza de los animales para no tener interferencia de la autofluorescencia del intestino del nematodo. El análisis de las imágenes se realizó con el programa gratuito ImageJ.

2.25. Evaluación de la llegada de las NvO-D1/Ang2 al cerebro del ratón APP^{swe}/PSEN1^{dE9} , modelo murino de la Enfermedad de Alzheimer.

En este estudio se emplearon los ratones transgénicos modelo de la Enfermedad de Alzheimer, APP^{swe}/PSEN1^{dE9} (The Jackson Laboratory). Este modelo es un doble transgénico que expresa una proteína precursora amiloide la cual es una quimera ratón/humana (Mo/HuAPP695^{swe}) la presenilina 1 humana mutante (PS1-dE9), ambas dirigidas a neuronas del

sistema nervioso central. Ambas mutaciones están asociadas en humanos a la EA precoz o hereditaria. Cada animal fue anestesiado con ketamina xilazina (40 mg/kilo y 15 mg/kilo respectivamente) administrada por vía intraperitoneal, para posteriormente administrar vía intravenosa, por la vena lateral de la cola, 100 µl de una suspensión 10 nM de NvO-D1/Ang2 o NvO-PEGs. Luego de 15 min post inyección, el animal aún anestesiado, fue perfundido con PBS. Luego de que no perfundió más sangre y el hígado fue blanqueado lo más posible se obtuvieron los órganos de interés, y se congelaron en nitrógeno líquido para luego ser liofilizados a -50°C con una presión de 0,137 mBar. Una vez liofilizados, los órganos relativamente secos fueron molidos en un crisol de porcelana, para así homogeneizar las muestras y una vez molidas se colocaron en una estufa a 120°C hasta conseguir un peso constante. Una vez obtenidos los órganos liofilizados y en su peso constante, se analizaron por análisis de activación neutrónica (AAN). Este análisis se realizó por la Comisión Chilena de Energía Nuclear (CCHEN) en la planta nuclear de la Reina.

2.26. Colocalización *ex vivo* de las NvOs modificadas con placas amiloides en cortes de cerebro de ratón modelo de EA

Los ratones transgénicos APP^{swe}/PSEN1^{dE9} (The Jackson Laboratory) controles, sin tratamiento alguno, fueron sacrificados como aparece descrito en el protocolo de perfusión en la sección 2.25 al igual que la recolección de los órganos. Posteriormente los cerebros fueron fijados por inmersión con una solución de paraformaldehído 4% en PBS por 24 hrs a temperatura ambiente. Una vez fijados los cerebros fueron mantenidos en una solución de sacarosa al 30% y almacenados a 4°C hasta su utilización. Luego los cerebros fueron cortados en un criostato con un ancho de 30 µm. Luego los cortes seleccionados fueron permeabilizados con TBS-Triton X-100 al 0,4%, y luego bloqueados con glicina 0,15 M por 15 min, NaBH₄ (10 mg/ml) 3 veces por 10 min, cloruro de amonio 50 mM por 10 min y luego con PBS 1X-Tritón 0,2%-BSA 5% por 1 hora. Los cortes fueron incubados por 24 horas con el anticuerpo W02 (dilución 1:200 en solución de bloqueo) que marca selectivamente las placas amiloides. Posteriormente los tejidos fueron lavados 4 veces por 10 min con PBS y fueron incubados con anticuerpos secundarios conjugados con anti-IgG de ratón-Alexa Fluor 488

(1:2.000 en solución de bloqueo) por 1 hr a temperatura ambiente. Finalmente, los cortes fueron lavados 4 veces por 10 min con PBS y después incubados con las NvO-modificadas por 5 min a una concentración 0,1 nM. Luego los cortes fueron lavados 4 veces por 10 min con PBS y montados en medio de montaje DAKO.

Finalmente se obtuvieron imágenes usando un microscopio marca Carl Zeiss modelo Axio Imager A1 equipado con una cámara CCD color Carl Zeiss modelo AxioCam MRc5. Para microscopia de fluorescencia se utilizó como fuente de luz una Lámpara de Mercurio (Zeiss HBO 100) y los siguientes sets de filtros:

- Verde: Zeiss filter set 09, Excitación: 450-490, Emisión: LP 515.
- Rojo: Zeiss filter set 45, Excitación: 560/40, Emisión: 630/75.

Para la adquisición de imágenes se utilizó el software Carl Zeiss AxioVision versión 4.8. Se utilizó un tiempo de exposición de 400 ms para el canal verde y 1000 ms para el canal rojo. Para cuantificar las imágenes obtenidas se siguió el siguiente protocolo:

Se optimizaron las imágenes, previo al paso de segmentación y detección automatizada usando el software gratuito ImageJ-FiJi

- Sustracción de *background*: rojas rolling ball 50px/verdes rolling ball 100px.

- Ajustes de brillo y contraste (incluye redistribución de histograma)

Segundo, segmentación y obtención de datos usando el software gratuito

Cell Profiler:

- Identificación y segmentación de núcleos celulares.

- Identificación y segmentación de marca específica.

- Medición de correlación entre ambas imágenes.

- Relación entre objetos: marca específica relacionada con las placas amiloides.

- Clasificación de objetos: clasifica los objetos identificados como colocalizados o no colocalizados según la relación de la marca específica con las placas amiloides.

- Enmascaramiento de objetos para cálculo de región de placas amiloides que colocaliza con la marca específica para NvO-D1/Ang2.

- Medida del área ocupada por la región colocalizada.

- Cálculo de la colocalización entre marcas como porcentaje de colocalización respecto al total de marca.

- Exportar datos a hoja Excel.

2.27. Evaluación de la colocalización *in vivo* de NvO-D1/Ang2 con placas amiloides.

En este estudio se emplearon ratones transgénicos modelos de la Enfermedad de Alzheimer, APP^{swe}/PSEN1^{dE9} (The Jackson Laboratory), y se le administró a un grupo de animales NvO-D1/Ang2 marcadas con Alexa Fluor 647 y a otro animal blanco se le administraron NvO-PEGs. Luego se siguió el tratamiento como se describe en la sección 2.25, se obtuvieron cortes de cerebros y se tiñeron las placas amiloides mediante inmunohistoquímica como se describe en la sección 2.26. Luego, se evaluó, mediante microscopía de fluorescencia, la presencia de las NvO-D1/Ang2 marcadas con Alexa Fluor 647 en la cercanía de las placas amiloides marcadas con Alexa fluor 488. La colocalización se determinó como aparece descrito en la sección 2.26.

2.28. Detección de NvO-D1/Ang2 en cerebro de ratón

APP^{swe}/PSEN1^{dE9} por TEM

Para confirmar la presencia de NvO en el cerebro del animal se utilizó TEM. El animal tratado con NvO-D1/Ang2 fue perfundido con PBS como se describe en la sección 2.26, para posteriormente ser perfundido con una solución de paraformaldehído al 2% con 2,5% de glutaraldehído en amortiguador fosfato de sodio 0,1M. Luego se extrajo el cerebro del animal y se aisló el hipocampo, el cual fue fijado por inmersión con una solución al 1% de tetróxido de osmio durante 1 hr. Posteriormente la muestra se lavó 3 veces en buffer fosfato de sodio por 10 minutos y luego se deshidrata la muestra en etanol siguiendo la secuencia: 30%-50%-70%-90%-96% 7 min en cada paso, para lavar luego dos veces en etanol 100% y 2 veces más con acetona para luego infiltrarla con resina de Epon por 2 días, embebida en la misma resina, se polimerizó a 70°C por 48 hrs. Se realizaron cortes de 1 μ (Ultramicrotomo Sorvall Porter Blum) que fueron teñidos con azul de toluidina 1% en borato de sodio 1% para localizar área de corte fino. Cortes ultra delgados de 60 nm se obtuvieron empleando el mismo ultra microtomo, y luego fueron montados en rejillas de Cu cubiertas con

formvar. Finalmente las muestras fueron teñidas con acetato de uranilo al 2% en agua y citrato de plomo. Posteriormente se obtuvieron micrografías mediante TEM.

3. Capítulo 3

**SINTESIS Y CARACTERIZACION DE NANOVARILLAS DE ORO
Y SUS CONJUGADOS**

3.1. Síntesis y Caracterización de Nanovarillas de Oro (NvO)

Para la síntesis de nanovarillas de oro (NvO) con una relación de aspecto cercana a 4 se realizó una síntesis mediada por semillas descrita previamente (Nikoobakht & El-Sayed, 2003). Brevemente, primero se sintetizaron los núcleos de oro, para lo cual la sal áurica fue reducida con NaBH_4 frío en presencia de Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB). Luego, se preparó la solución de crecimiento que contenía la sal áurica (H_4ClAu), CTAB, ácido ascórbico y AgNO_3 , a esta solución se le agregó la solución de núcleos para obtener las NvOs después de varias horas. Para eliminar el CTAB en exceso se realizó una centrifugación a 4.000 g durante 1 h. (Carolina Adura et al., 2013). Las NvO se caracterizaron por: a) Espectrofotometría UV-visible, b) Microscopía electrónica de transmisión (TEM), c) Potencial Z y Dispersión dinámica de la luz (DLS). Para determinar la concentración molar de NvO se liofilizó un volumen de solución de NvO y se cuantificó el oro mediante activación neutrónica de oro (Comisión Chilena de Energía Nuclear, CCHEN).

La primera etapa de caracterización fue evaluar la presencia de NvO estabilizadas con CTAB (NvO-CTAB) mediante espectrofotometría de absorción molecular, en donde se observaron los dos picos característicos del plasmón transversal (512 nm) y longitudinal (773 nm aprox), descritos para las NvO. Esto se observa en la figura 3.1

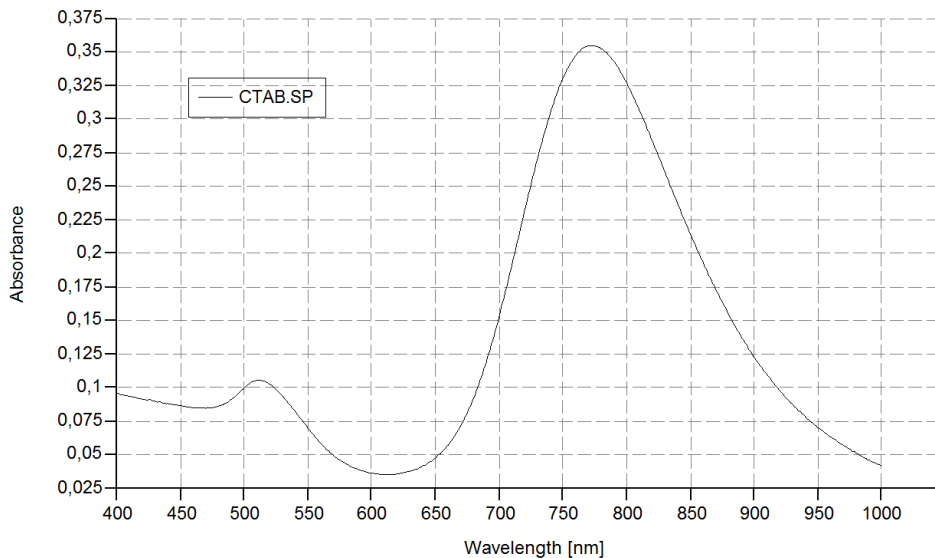


Figura 3.1 Espectro de absorción molecular característico de NvO-CTAB, espectro representativo.

Una vez obtenido el espectro de absorción de las NvO-CTAB y corroborada la existencia de éstas debido a las bandas plasmónicas características, la muestra fue observada por STEM (*Scanning Transmission electron microscopy*) (Figura 3.2).

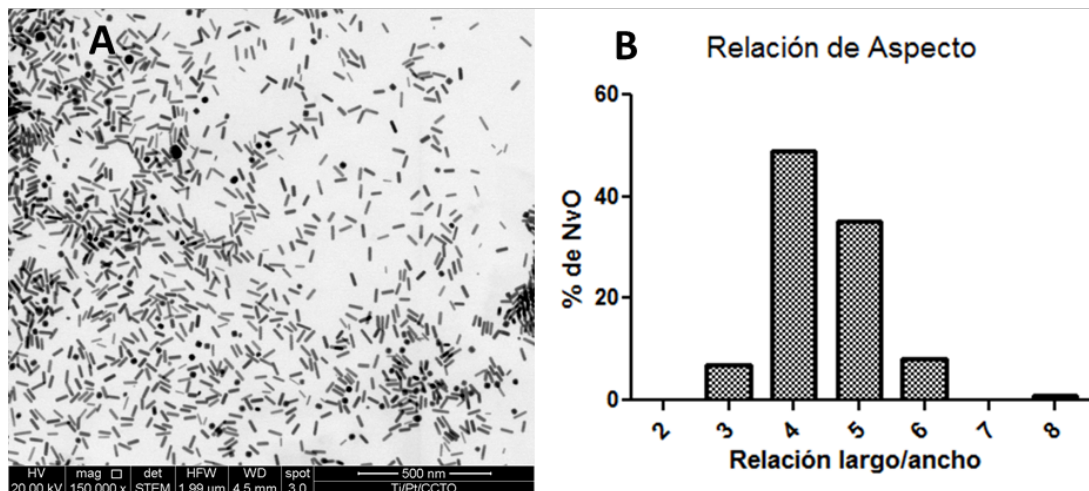


Figura 3.2 Microscopía electrónica de NvO. A) Micrografía electrónica de NvO obtenidas con el método de síntesis mediada por semillas y B) histograma de relación de aspectos.

En la Figura 3.2 se observa una imagen STEM de NvO-CTAB, y un histograma de relación de aspectos (largo/ancho) realizado sobre una población de 100 nanopartículas determinándose que la población mayoritaria de NvO-CTAB tiene una relación de aspecto de 4, siendo el largo promedio $48,8 \pm 5$ nm y el ancho promedio 11 ± 1 nm.

Otra técnica empleada para la caracterización de éstas NvO fue la Dispersión Dinámica de la Luz, o DLS por sus siglas en inglés. En la Figura 3.3 se observa las distribución de tamaño para una solución de NvO. Esta técnica tiene como principio determinar el diámetro hidrodinámico (Dh) de

las partículas en suspensión mediante fluctuaciones de la luz dispersada por el coloide.

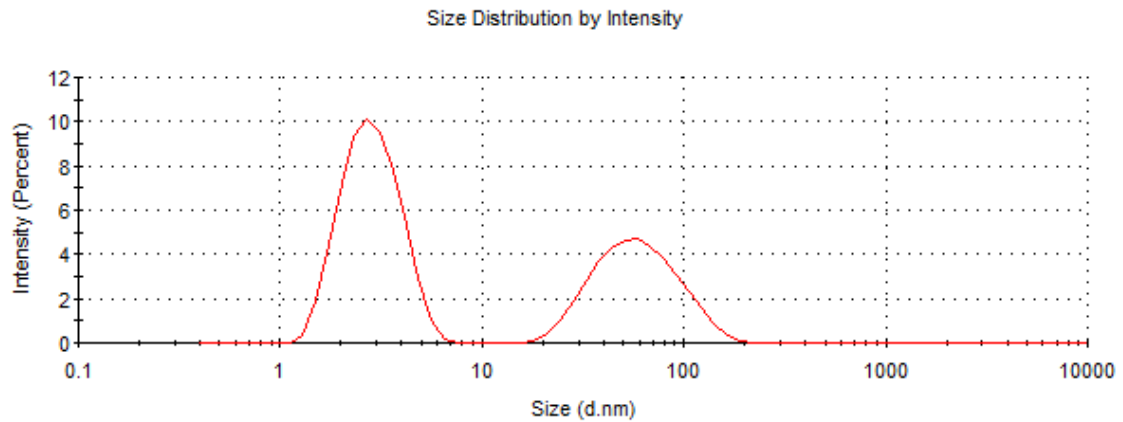


Figura 3.3 Distribución de tamaños característica para NVO-CTAB determinada mediante DLS.

Se observa en la Figura 3.3 que aparecen dos poblaciones, la más pequeña aproximadamente de 3 nm y la segunda de aproximadamente 63 nm.

La última caracterización realizada a las NVO-CTAB fue la determinación del potencial Z (pZ), la cual es una medida indirecta de la carga superficial, ya que se determina a través de la movilidad electroforética de la nanopartícula, medida que en éste equipo es entregada utilizando la misma cubeta usada para medir el diámetro hidrodinámico, por

lo cual se utiliza la misma muestra. En la Figura 3.4 se muestra la distribución de carga de una solución de NvO-CTAB.

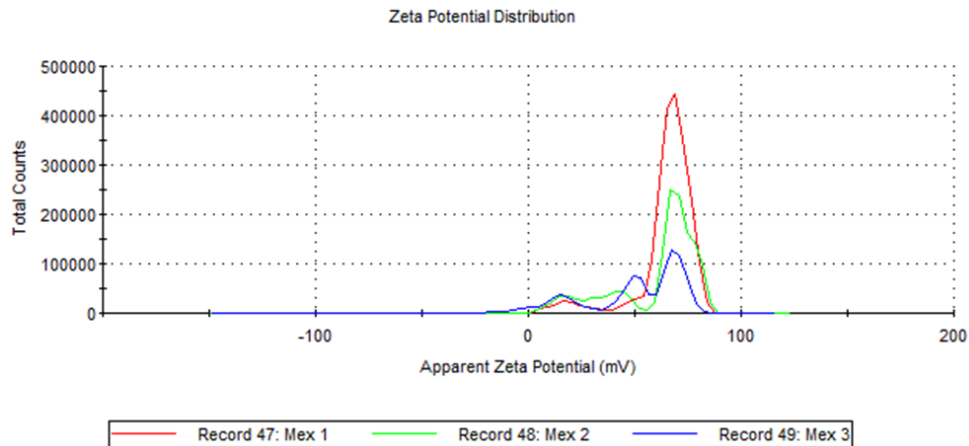


Figura 3.4 Distribución de cargas de tres muestras de NvO-CTAB.

Como se aprecia en la Figura 3.4 hay una población mayoritaria de carga muy positiva, con un promedio a 53 ± 5 mV.

El pZ será de utilidad en las siguientes etapas de funcionalización de la NvO, ya que al ir reemplazando el CTAB por otro tipo de moléculas estabilizadoras/funcionales el pZ irá variando de acuerdo a las propiedades eléctricas que éstas moléculas posean. De ésta manera, el pZ es una herramienta valiosa al momento de evaluar la funcionalización de nanopartículas.

3.2. Obtención y Caracterización de NvO estabilizadas con PEGs

Una vez obtenidas las NvO-CTAB y caracterizadas, es necesario funcionalizar las NvO para aplicarlas en medios biológicos. Las NvO no son consideradas tóxicas por sí solas, sin embargo, el CTAB, agente surfactante que se usa para estabilizar las NvO, es altamente tóxico (C. Adura et al., 2013; Wang et al., 2008), por lo tanto debe ser reemplazado por algún otro surfactante biocompatible. Con este fin se empleó polietilenglicol o PEG, el cual es un polieter ampliamente usado en bionanotecnologías. El PEG es biocompatible, aumenta el tiempo de circulación en sangre de las nanopartículas, disminuye la retención hepática (Harris, 1992; Kingshott & Griesser, 1999; Ogris, Brunner, Schüller, Kircheis, & Wagner, 1999) y disminuye la formación de la denominada “corona de proteínas” (Groll et al., 2004; Harder, Grunze, Dahint, Whitesides, & Laibinis, 1998; Lee, Lee, & Andrade, 1995).

En este trabajo utilizamos PEGs tiolados, el grupo SH permite su quimisorción sobre la superficie de oro, generando un enlace muy fuerte equivalente a un enlace covalente. Se usó dos tipos de PEGs-tiolados: uno presenta una terminación O-Metilo (HS-PEG-OMe) y el otro con un una

terminación COOH (HS-PEG-COOH). El HS-PEG-OMe se utiliza para darle estabilidad a la NvO y disminuir las interacciones con proteínas presentes en medios biológicos, por otra parte para poder unir péptidos u otra molécula que tenga grupos aminos libres, se usa el ácido carboxílico del PEG, mediante enlaces amida (Huang et al., 2011). Este último, se utiliza en una mayor proporción, aumentando el número de moléculas de péptidos puedan conjugarse a la NvO. Se realizó la reacción de conjugación de las NvOs con los PEGs en una relación 1/6.000.

Para nuestras NvO, no se obtuvieron diferencias en las bandas plasmónicas al evaluarlas mediante espectrofotometría de absorción molecular tal como se observa en la Figura 3.5, en donde el máximo del plasmón longitudinal para NvO-CTAB y NvO-PEGs se encuentra a 773 nm y 772 nm, respectivamente, lo cual era esperable y está de acuerdo con la literatura.

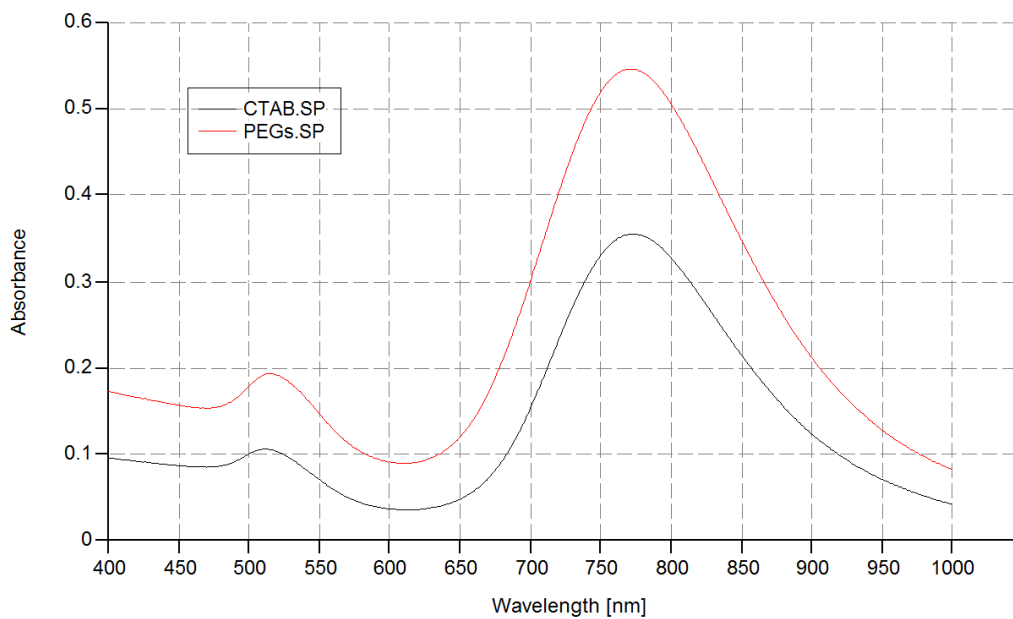


Figura 3.5 Espectro de absorción molecular representativos de NvO-CTAB y NvO-PEGs.

El siguiente paso fue evaluar el D_h mediante DLS, en donde sí se observaron diferencias de las NvO-PEGs con respecto a la NvO-CTAB. Como se observa en la figura 6, hay un desplazamiento de ambos picos pasando de 3 nm (NvO-CTAB) a 6 nm (NvO-PEGs) para el primer pico, y de 63 nm (NvO-CTAB) a 98 nm (NvO-PEGs) para el segundo.

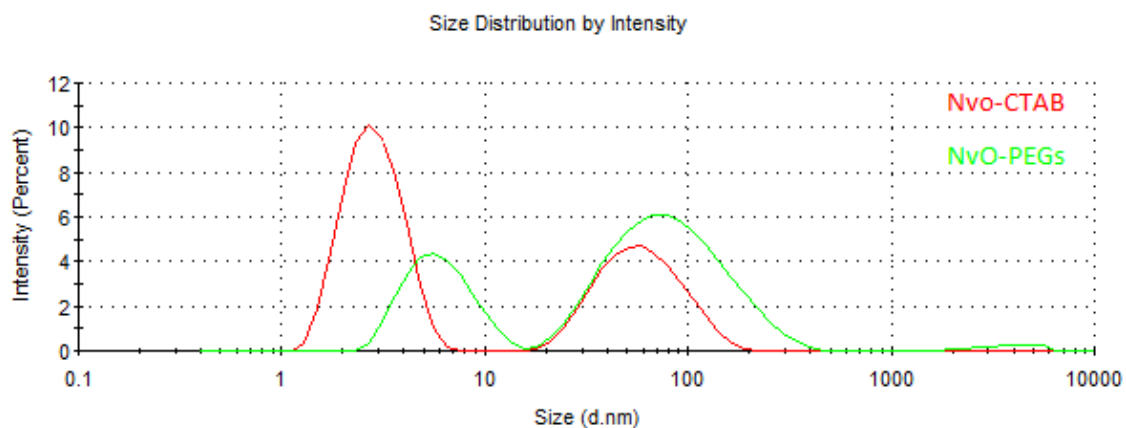


Figura 3.6 Distribución de tamaños determinada mediante DLS de NvO-CTAB y NvO-PEGs.

El desplazamiento del CTAB y la funcionalización con PEGs también fue evaluada mediante pZ. En la figura 3.7 se puede observar la distribución de cargas para las NvO-CTAB y NvO-PEGs, en donde hay un importante cambio en el pZ, pasando de un potencial muy positivo (NvO-CTAB) a uno negativo (NvO-PEGs) con un promedio de -38 ± 2 mV, cabe mencionar que la diferencia en la intensidad de los picos es debido a las diluciones utilizadas.

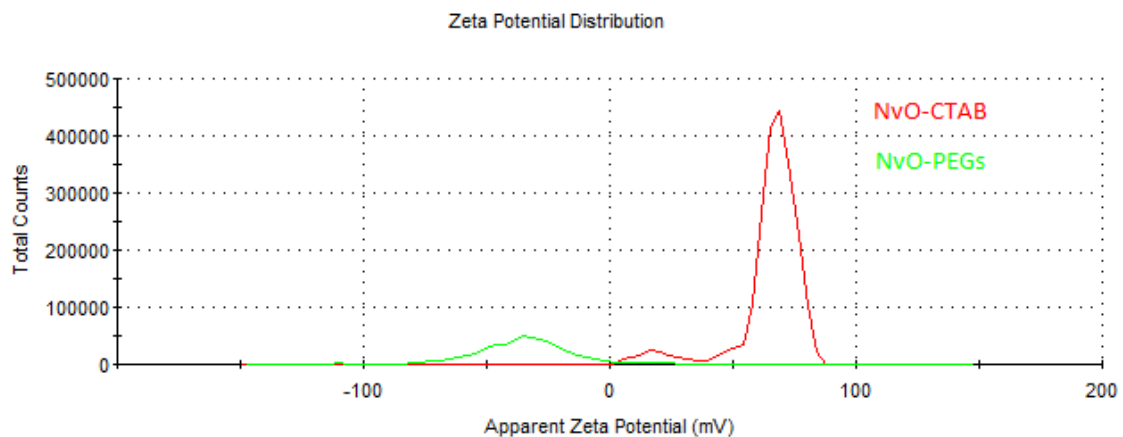


Figura 3.7 Distribución de cargas de NvO-CTAB y NvO-PEGs.

3.3. Modificación de las NvO-PEGs con péptidos para reconocer A β y atravesar la Barrera Hematoencefálica (BHE)

Con el fin de promover el direccionamiento de las NvO hacia los agregados del péptido A β presentes en el cerebro, y de esta forma acercarse hacia una potencial terapia para la EA, se conjugaron las NvO –PEG con dos péptidos. El péptido D1, cuya secuencia aminoacídica es qshyrhispaqv, es utilizado con la finalidad de destinar las NvO a los agregados amiloides ya que este péptido tiene la capacidad de unir el A β con alta afinidad e inhibir la agregación del mismo.

Además el péptido es sintetizado con aminoácidos D con el fin que sea menos sensible a la degradación por proteasas y tenga un mayor tiempo de circulación en animales (Funke et al., 2012).

Asimismo, se funcionalizaron con un segundo péptido de secuencia TFFYGGSRGKRNNFKTEEY, denominado Angiopep 2 (Ang2), que favorece el paso a través la BHE. El péptido Ang2 se seleccionó ya que pertenece a la familia de péptidos Angiopep, derivados del dominio Kunits de aprotinin que se ha descrito favorece el cruce de la BHE a través del receptor LRP1 (M. Demeule, Regina, et al., 2008).

La unión de estos péptidos a las NvO-PEGs fue mediante sus aminos libres, favoreciendo la formación de enlaces amidas con el ácido carboxílico del SH-PEG-COOH, por lo que de ahora en adelante no se mencionará más la cadena de PEGs cuando se nombre la NvO modificada con algún péptido.

La primera caracterización fue evaluar mediante espectroscopía de absorción molecular posibles cambios en el plasmón de las NvO, observando que no los hay, como se muestra en la figura 3.8.

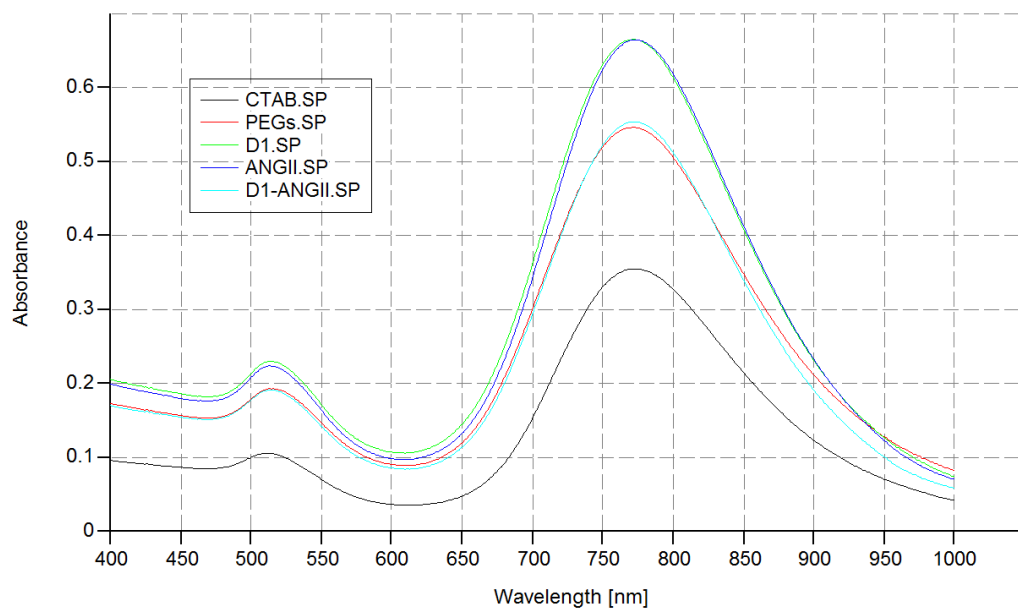


Figura 3.8 Espectro de absorción molecular de NvO-CTAB, NvO-PEGs, NvO-D1, NvO-Ang2 y NvO-D1/Ang2

Se evaluaron las NvO con las nuevas modificaciones mediante DLS, en donde no se observan grandes diferencias en los picos para las NvO-péptidos, en comparación a NvO-CTAB y NvO-PEGs, lo cual se muestra en la figura 3.9 y se encuentra resumido en la tabla 3.1.

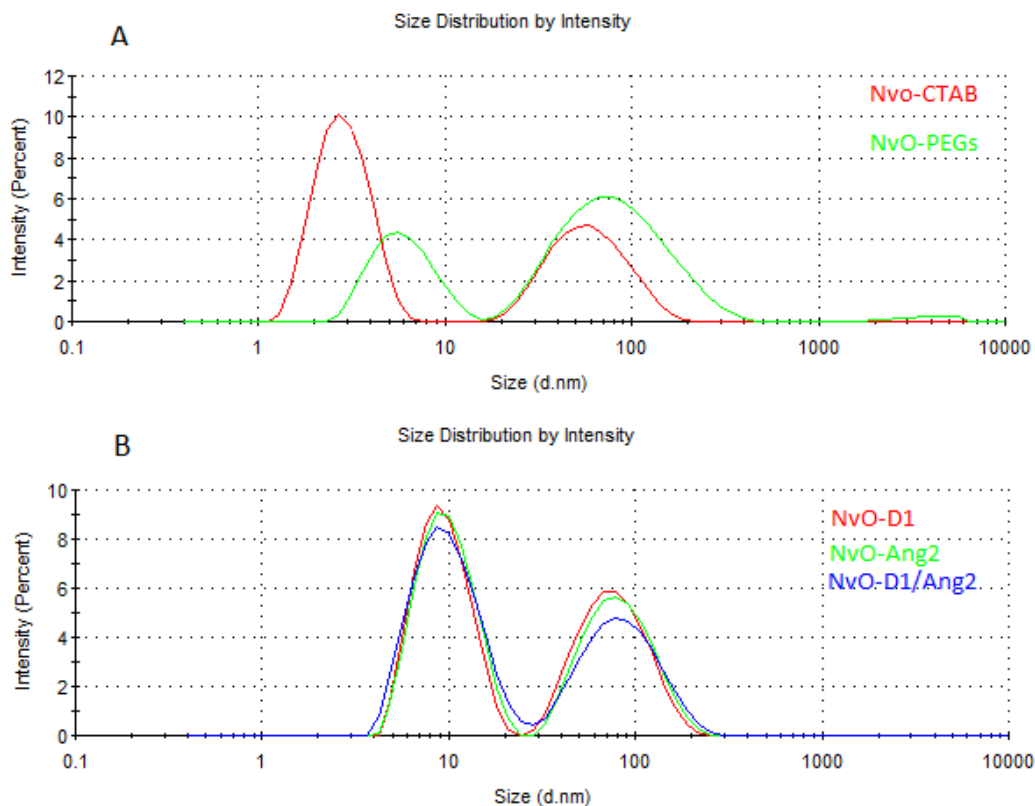


Figura 3.9 Distribución de tamaños determinada mediante DLS para (A) NvO-CTAB, NvO-PEGs y (B) NvO-D1, NvO-Ang2 y NvO-D1/Ang2.

Tabla 3.1 Resumen de la magnitud de los picos obtenidos, mediante DLS, de la distribución de tamaño para las diferentes NvO modificadas.

	Pico 1(nm)	Pico 2(nm)
NvO-CTAB	3	61
NvO-PEGs	6	96
NvO-D1	9	80
NvO-Ang2	10	84
NvO-D1/Ang2	10	99

Se evaluó a continuación el efecto que tienen los péptidos sobre el pZ, los resultados se grafican en la figura 3.10 y están resumidos en la tabla 3.2. Sin considerar que las NvO-CTAB son las únicas que presentan un pZ positivo, como ya se mencionó con anterioridad, se aprecia una diferencia entre las NvO-PEGs y las NvO-peptidos, las últimas con un pZ no tan negativos como el NvO-PEGs y más cercano a la neutralidad. Este desplazamiento corresponde a la carga que confieren los péptidos que se agregan a la NvO, ya que a pH 7 el péptido D1 tiene una carga 1,2, y el péptido Ang2 tiene carga 2, por lo tanto, este desplazamiento en el pZ es indicativo de que los péptidos se han unido a la superficie de la NvO.

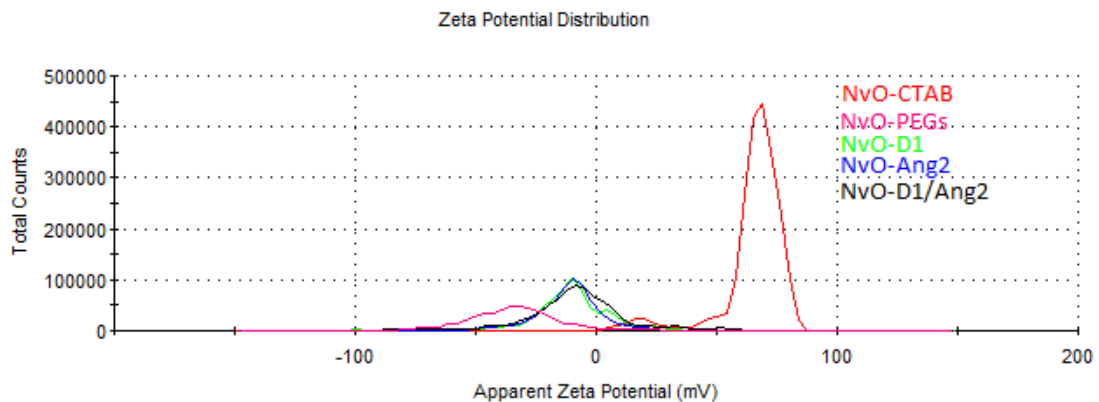


Figura 3.10 Distribución de cargas de NvO-CTAB, NvO-PEGs, NvO-D1, NvO-Ang2 y NvO-D1/Ang2.

Tabla 3.2 Resumen de los pZ, mediante DLS para las diferentes NvO modificadas.

Modificación	pZ (mV)
NvO-CTAB	53±7
NvO-PEGs	-38±2
NvO-D1	-10±0,2
NvO-Ang2	-13±2
NvO-D1/Ang2	-10±2

Finalmente, para estimar la relación de D1 y Ang2 que se conjugaron a las NvO se realizó un análisis de aminoácidos. El análisis de aminoácidos permite estimar la cantidad total de péptidos por NvO siguiendo un aminoácido particular que sea exclusivo para cada péptido, en este caso se siguió la valina para determinar la cantidad del péptido D1 y la treonina para seguir al Ang2. Se realizó una hidrólisis de las NvO-D1/Ang2 usando HCl concentrado, a 110°C durante tres días, para hidrolizar completamente los péptidos y posteriormente determinar las concentraciones mediante HPLC. Los resultados se resumen en la tabla 3.3.

Tabla 3.3 Cuantificación de péptidos por NvO mediante análisis de aminoácidos

Modificación	péptidos/NvO
NvO-D1/Ang2	D1 439±23
	Ang2 173±36

De esta manera se pudo confirmar la presencia de los péptidos sobre la superficie de la NvO, validando la estrategia de modificación.

4. Capítulo 4

**EVALUACION CELULAR DE NANOVARILLAS DE ORO
MODIFICADAS Y EFECTOS SOBRE LA AGREGACION DEL
PEPTIDO A β**

4.1. Efectos sobre la viabilidad y la penetración celular de las nanovarillas modificadas.

Considerando el potencial uso del nanoconjugado NvO-D1/Ang2 para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, se realizaron ensayos de citotoxicidad. Se utilizaron dos líneas celulares: la línea neuroblastoma SH-SY5Y y la línea de células endoteliales neurovasculares de cerebro bEnd.3. Estos modelos celulares están caracterizados por su capacidad de incorporar lipoproteínas y la presencia del receptor LRP1. También se evaluó la citotoxicidad en cultivo primario de neuronas hipocampales de embriones rata de 18 días.

El ensayo que se empleó para evaluar los efectos sobre la viabilidad fue el de MTS, el cual permite evaluar la viabilidad celular mediante la actividad redox mitocondrial, midiendo la formación de un producto coloreado el cual es directamente proporcional al porcentaje de células vivas. Se evaluaron tres concentraciones de NvO-D1/Ang2: 0,1, 0,2 y 0,4 nM, a un tiempo fijo de 24 hrs y una densidad de 5.000 células por pocillo para SH-SY5Y y 10.000 células por pocillo para bEnd.3. Se debe mencionar que en trabajos anteriores de nuestro laboratorio se había

determinado que las NvO-CTAB son tóxicas a concentraciones mayores a 0,1 nM en células de neuroblastoma SH-SY5Y luego de 24 hrs de incubación (C. Adura et al., 2013).

Luego de 24 hrs de incubación, para las tres concentraciones evaluadas de los nanoconjugados (0,1, 0,2 y 0,4 nM), no se observó disminución (respecto al control) de la viabilidad celular para ninguna de las líneas celulares ensayadas (Figura 4.1).

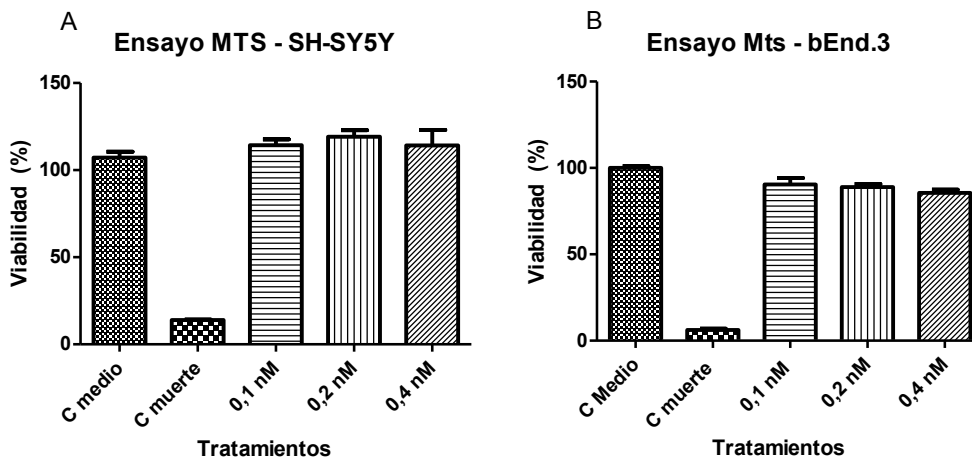


Figura 4.1 Ensayo de viabilidad celular en líneas celulares. (A) línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y y (B) línea celular endotelial de cerebro bEnd.3. Se incubaron las células con NvO-D1/Ang2 [0,1, 0,2 y 0,4 nM], por 24 hrs a 37°C. El control medio correspondió a las células en el medio de cultivo y el control muerte a células incubadas con SDS 23%. Se realizó 3 veces por quintuplicado y se evaluó con t student.

El ensayo de citotoxicidad en cultivo primario de neuronas hipocampales es muy buen modelo para evaluar toxicidad neuronal, debido a las ventajas que posee un cultivo primario ya que no ha sufrido mutaciones ni modificaciones y es menos resistente a citotóxicos en comparación a líneas celulares inmortalizadas o derivadas de células cancerígenas. En la figura 4.2 se detalla el resultado del ensayo MTS en estas células, las cuales se utilizaron a una densidad de 60.000 células por pocillo, no observándose disminución significativa de la viabilidad celular a las concentraciones y tiempo evaluado.

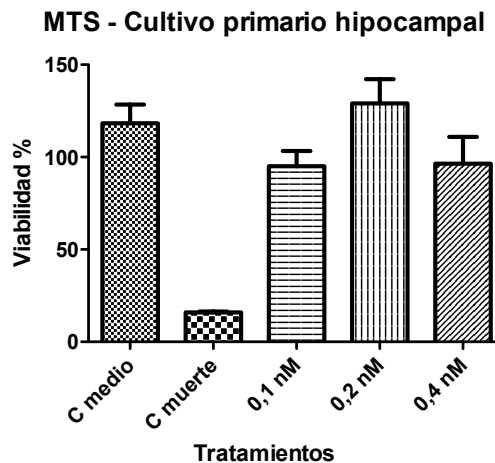


Figura 4.2 Ensayo de viabilidad celular MTS en cultivo primario de neuronas hipocampales de embriones de rata. Se incubaron las células con NvO-D1/Ang2 a concentraciones 0,1, 0,2 y 0,4 nM, por 24 hrs a 37°C. Se realizó 3 veces por quintuplicado y se evaluó con t student.

Luego de haber evaluado la citotoxicidad del nanoconjugado NvO-D1/Ang2, se evaluó la capacidad del mismo de penetrar células. Es importante aclarar que el nanoconjugado obtenido está diseñado para actuar en el SNC a nivel de las placas amiloides extracelulares, por lo que es relevante conocer tanto los potenciales efectos de las nanopartículas a nivel neuronal como su penetración celular. Así primero se evaluó la penetración de la NvO-D1/Agn2 en la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y y en cultivo primario de neuronas hipocampales de embriones de rata, aun cuando estos dos tipos celulares no presentan una sobreexpresión del receptor LRP1 que es reconocido por el péptido Ang2.

En la figura 4.3 se muestra la incorporación de oro en células SH-SY5Y y neuronas hipocampales, incubados a diferentes tiempos utilizando una concentración de 0,4 nM de NvO-D1/Ang2. Para ambos modelos se usó el mismo número de células (60.000) y la determinación de oro fue realizada por activación neutrónica en la Comisión Chilena de Energía Nuclear (CCHEN) a partir de los extractos liofilizados de estas.

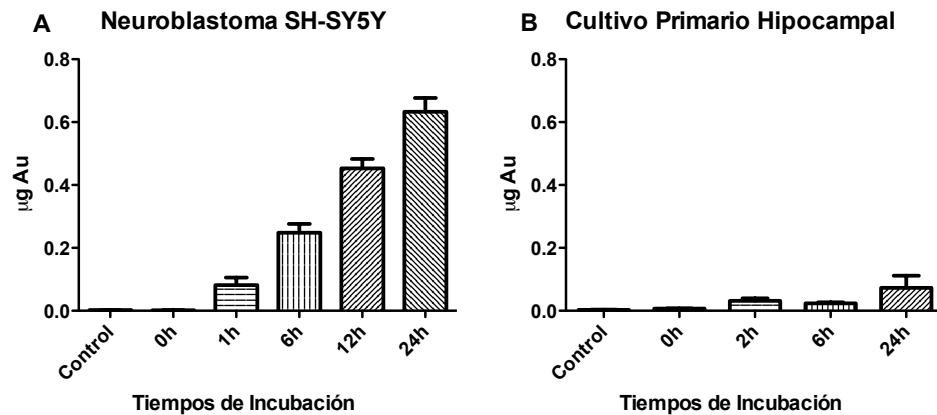


Figura 4.3 Cuantificación de oro asociada a células. A) células de neuroblastoma SH-SY5Y y (B) cultivo primario de neuronas hipocampales. Fueron incubadas a diferentes tiempos con NvO-D1/Ang2 0,4 nM. La determinación de oro fue realizada sobre las células mediante activación neutrónica (CCHEN). Se realizó 3 veces por quintuplicado.

Lo primero observable es que la cantidad de oro es dispar para ambos modelos celulares, siendo mucho mayor las cantidades incorporadas por la línea celular de neuroblastoma en comparación al cultivo primario de neuronas hipocampales. Luego, el valor elevado de oro incorporado en la línea celular SH-SY5Y en comparación al cultivo primario es interesante desde el punto de vista de ser empleados para reducir tumores en el SNC, donde éste tipo de nanoconjugados podrían ser incorporados preferentemente por células neoplásicas con un metabolismo acelerado (Hanahan & Weinberg, 2011) en comparación a las células que componen

el tejido sano circundante, pudiendo ser un buen sistema para la entrega de fármacos (Paciotti, Kingston, & Tamarkin, 2006) o de sensibilización-eliminación de éstas células por terapia fototérmica localizada (Zhang, 2010).

Posteriormente se evaluó la penetración de las NvO modificadas en una monocapa de células endoteliales de cerebro bEnd.3 mediante citometría de flujo, para lo cual se marcaron las NvO modificadas con Alexa 647, de manera que se considera población positiva para la incorporación del nanoconjugado la que presenta la marca del fluoróforo Alexa Fluor 647. Para este experimento se usaron: NvO-PEGs, NvO-D1, NvO-Ang2 y NvO-D1/Ang2. El marcaje con Alexa Fluor 647 se realizó mediante incubación con éste fluoróforo que contiene un grupo hidrazida, el cual reacciona con el carboxilo libre de los péptido anclados a la NvO, formando un enlace azilhidracina.

Muy importante es eliminar el exceso de la sonda fluorescente, para lo cual se evaluó la fluorescencia del sobrenadante en lavado sucesivos, y desde el tercer lavado no se logró detectar fluorescencia en el sobrenadante. También se evaluó la fluorescencia de la sonda unida a la NvO, y se logró detectar la emisión del fluoróforo desde la suspensión de NvO lavadas

reiteradas veces para quitar el exceso de la sonda fluorescente, esto se muestra en la figura 4.4.

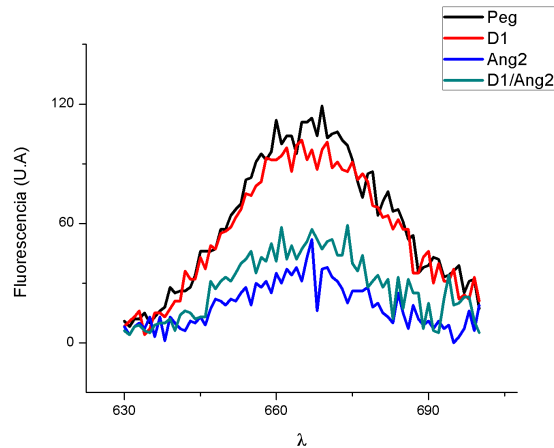


Figura 4.4 Espectro de emisión entre 630 nm y 700 nm para Alexa Fluor 647 unido a NvO-PEGs, NvO-D1, NvO-Ang2 y NvO-D1/Ang2. Espectros representativos

En una primera aproximación se realizaron incubaciones de las células bEnd.3 con una suspensión de NvO-modificadas-Alexa Fluor 647 [0,05 nM] a 24 hrs, para luego ser evaluadas mediante citometría de flujo la intensidad de fluorescencia promedio por célula. Para este experimento también se utilizó un fragmento peptídico de la apolipoproteína E (pApoE) para modificar las NvO, el cual ha sido utilizado como lanzadera de fármacos al SNC al igual que Ang2 (Böckenhoff et al., 2014; Michel Demeule et al., 2014). Las NvO funcionalizadas con pApoE o D1/pApoE

muestran una tendencia similar a las funcionalizadas con Ang2, ya sea sólo o acompañado con D1. Esto se ve en la figura 4.5, donde se muestra la fluorescencia promedio por célula y se observa que las diferentes modificaciones de las NvO no presentan grandes variaciones, siendo la que presenta una menor fluorescencia NvO-D1, para el resto de las modificaciones se muestran muy similares.

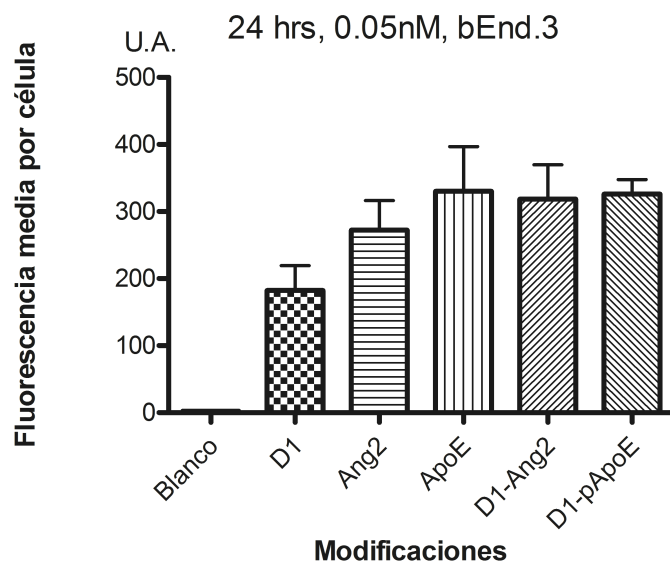


Figura 4.5 Penetración de NvO modificadas marcadas con Alexa 647 en células bEnd.3. Se incubaron por 24 hrs. a una concentración 0,05 nM y normalizadas por la intensidad de fluorescencia de cada NvO-modificada a una misma concentración. Se realizó 3 veces en experimentos independientes.

Para este experimento se muestran los resultados de intensidad de fluorescencia por célula debido a que no había diferencia en el porcentaje

de población celular positiva para la marca de alexa fluor 647 entre los distintos tratamientos, todas las poblaciones presentan 90 – 98 % de población celular positiva para la marca fluorescente, seguramente debido al alto tiempo de incubación.

La confirmación de la internalización celular se realizó por TEM para las NvO-D1/Ang2, en las mismas condiciones del experimento anterior (24 hrs, [0,05 nM]), en donde se observaron NvO-D1/Ang2 dentro de las células bEnd.3, en su mayoría dentro de cuerpos multivesiculares, como se muestra en la figura 4.6.

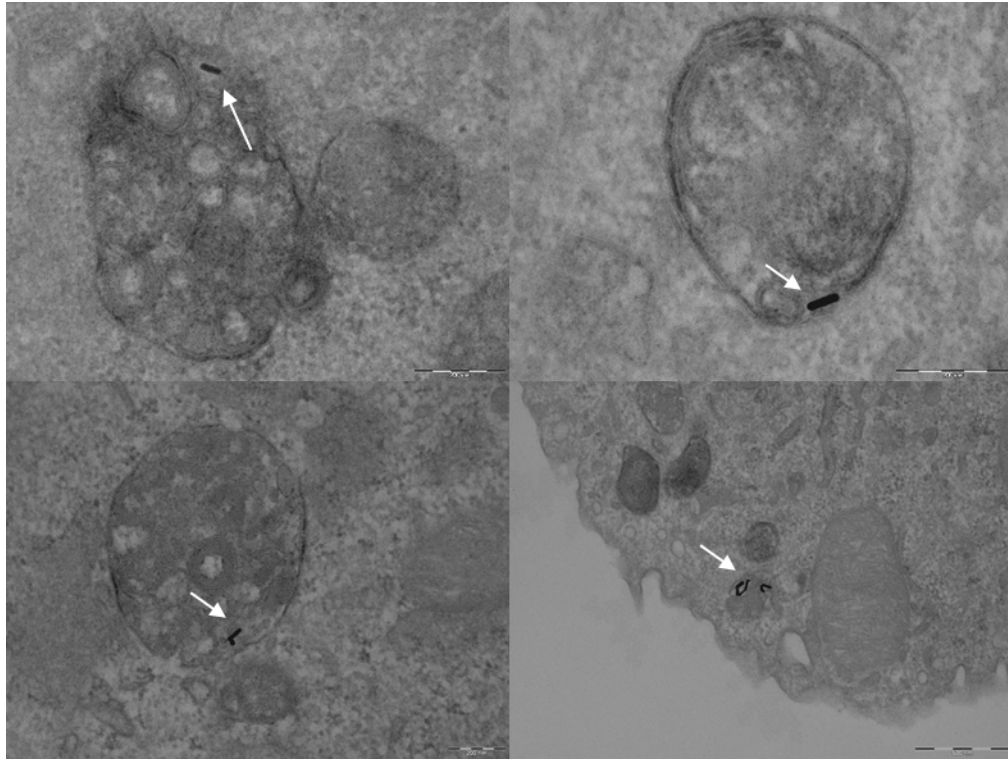


Figura 4.6 Microscopia electrónica de transmisión de células bEnd.3 incubadas con NvO-D1/Ang2 [0,05 nM] durante 24 hrs. Las flechas blancas indican las NvO-D1/Ang2.

Encontrar las NvO-D1/Ang2 dentro de cuerpos multivesiculares resulta coherente con la estrategia de usar Angiopep2 para dirigir el nanoconjugado, ya que como se ha mencionado Angiopep2 es reconocido por LRP1 y se ha descrito que la endocitosis mediada por el receptor LRP1, la cual es dependiente de clatrina, en un estado tardío de internalización puede ser dirigido hacia cuerpos multivesiculares (Yameen et al., 2014).

Se utilizaron tiempos más cortos de incubación para poder evaluar diferencias en el porcentaje de la población celular que incorpora las NvO para las diferentes modificaciones y poder realizar tratamientos con inhibidores de endocitosis para evaluar la ruta de penetración de las NvO, los cuales no se pueden utilizar en incubaciones de 24 hrs por afectar la viabilidad celular. Se observó que con 2 hrs de incubación, existen diferencias en las poblaciones positivas a la marca fluorescente para cada NvO modificada (Figura 4.7), presentando la menor población positiva las células tratadas con NvO-D1-Alexa Fluor 647. Se agregó a este experimento un control de NvO-PEGs, el cual está descrito que tienen baja tasa de internalización celular (Kelf et al., 2010). Las modificaciones Ang2 y D1/Ang2 presentan un porcentaje de la población celular positivo muy similar. Para este experimento, la media de las diferentes condiciones varía de manera estadísticamente significativa.

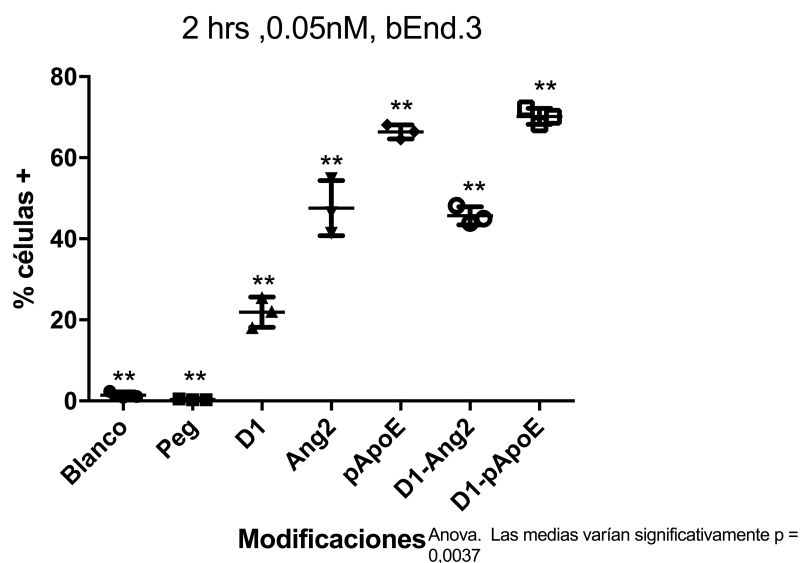


Figura 4.7 Porcentaje de la población celular positiva a la incorporación de NvO-modificadas. Se incubo por 2 hrs células bEnd.3 con las diferentes NvO modificadas, a una concentración 0,05 nM. Las NvO se marcan con Alexa 647 para poder ser detectadas y evaluado por citometría de flujo. Se realizó por triplicado en experimentos independientes. Se analizó con Anova y la barra muestra la desviación estándar.

El control de NvO-PEGs presenta un porcentaje de células positivas muy bajo, comparable con el blanco sin NvO, por lo que el porcentaje de penetración que muestra cada una de las diferentes modificaciones puede ser atribuida a los péptidos unidos a las cadenas de PEGs que tienen las NvO.

Para evaluar la ruta de entrada de estas nanopartículas a las células, como primera aproximación se utilizó baja temperatura (4°C) al momento

de incubar las células con NvO modificadas, para inhibir los procesos dependientes de energía, como la endocitosis. Como se muestra en la figura 4.8, para todas las modificaciones se ven cambios en el porcentaje de población positiva a las 2 hrs de incubación, disminuyendo a niveles comparables con el blanco, mostrando que la incorporación celular de los nanosistemas evaluados en este trabajo es un proceso activo, dependiente de energía.

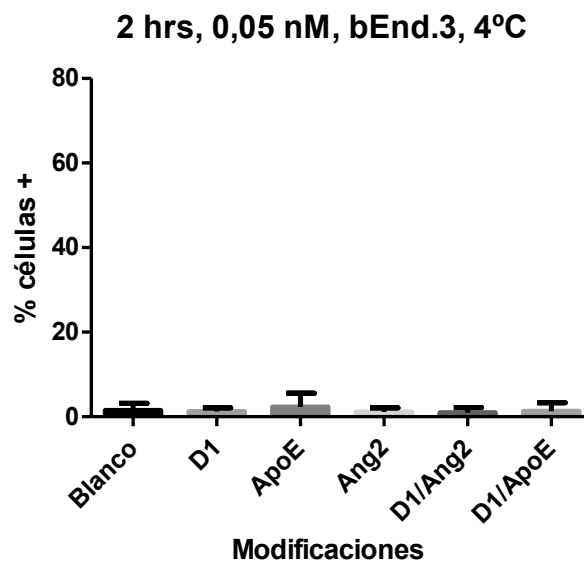


Figura 4.8 Porcentaje de la población celular positiva a la incorporación de NvO-modificadas a 4°C. Se incubó por 2 hrs a 4°C, las células bEnd.3 con las diferentes NvO modificadas, a una concentración 0,05 nM. Las NvO se marcan con Alexa fluor 647 para poder ser detectadas y evaluado por citometría de flujo. Se realizó por triplicado en experimentos independientes. La barra muestra la desviación estándar.

Luego de determinar que es un proceso activo, se evaluó mediante el uso del fármaco clorpromazina (CPZ), el cual es un inhibidor de endocitosis dependiente de clatrina, que vía en particular están usando para entrar. Los resultados de éste experimento fueron evaluados nuevamente por citometría de flujo y los resultados se muestran en la Figura 4.9, que resume los últimos resultados. Se puede observar que cuando se preincuba con el inhibidor CPZ, hay una disminución considerable en el porcentaje de

células positivas, que van desde un 60% de inhibición para la modificación pApoE, hasta un 84% de inhibición para el caso de la modificación con D1/Ang2. Estos datos inhibición se resumen en la tabla 4.1.

Tabla 4.1 Porcentajes de inhibición en la población celular positiva producido por clorpromazina para las diferentes modificaciones de NvO

	% de disminución con CPZ
D1	73
pApoE	60
Ang2	74
D1/Ang2	84
D1/pApoE	65

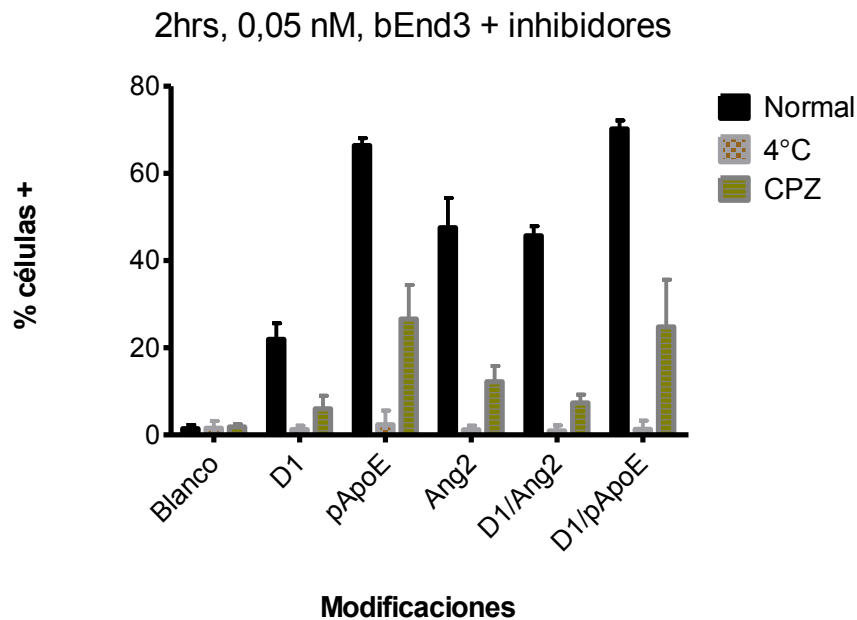


Figura 4.9 Población celular positiva a la incorporación de NvO-D1, NvO-pApoE, NvO-Ang2, NvO-D1/Ang2, NvO-D1/pApoE. Se incubo por 2 hrs células bEnd.3 con las diferentes NvO modificadas, a una concentración 0,05 nM. Las NvO se marcaron con Alexa fluor 647 para poder ser detectadas y evaluado por citometría de flujo. Un grupo de células fue incubada a 4°C durante las dos horas de incubación con NvO, y otro grupo fue pre tratado con clorpromazina (CPZ) durante 15 minutos a una concentración de 50 μ M. Los experimentos fueron realizados tres veces en experimentos independientes. La barra representa la desviación estándar.

4.2. Evaluar el efecto de las NvO-D1/Ang2 sobre los agregados de A β *in vitro*.

Para evaluar el efecto de las NvO-D1/Ang2 sobre el crecimiento de las fibras de A β *in vitro*, se incubaron con NvO-D1/Ang2. La formación de las fibras fue evaluada mediante el ensayo de fluorescencia de Tioflavina T

(ThT). En este ensayo la cantidad de fibras en suspensión puede ser cuantificado por la intensidad de la señal fluorescente, la cual es proporcional a la cantidad o largo e las fibras que se forman (C. Adura et al., 2013). La figura 4.10 muestra el porcentaje de intensidad de fluorescencia de las muestras tratadas con NvO-D1/Ang2 y el péptido D1, con respecto al grupo control el cual es el 100%, en donde se observa una inhibición en la formación de fibras con el tratamiento de Nvo-D1/Ang2 con una inhibición cercana al 40%.

Para este ensayo también se probaron tres concentraciones del péptido D1 (0,2, 0,5 y 1 μM) y tomando en cuenta el número de moléculas de D1 por NvO la concentración equivalente de D1 en la muestra de NvO-D1/Ang2 es 0,2 μM . La concentración final del péptido A β para los ensayos fue 20 μM siendo importante mencionar que para este ensayo las relaciones molares de D1/A β fueron 0.01/1, 0.025/1 y 0.05/1 para las concentraciones 0,2, 0.5 y 1 μM , respectivamente. La mencionada relación es muy relevante para entender los efectos sobre el crecimiento de las fibras de A β (Wiesehan et al., 2008).

Para las muestras tratadas con el péptido D1 se observan diferentes

comportamientos, para la concentración 1 μM se observa una inhibición en el crecimiento de las fibras cercana al 50%, pero a menores concentraciones del péptido D1 se observa un aumento en la intensidad de la fluorescencia cercana al 30%.

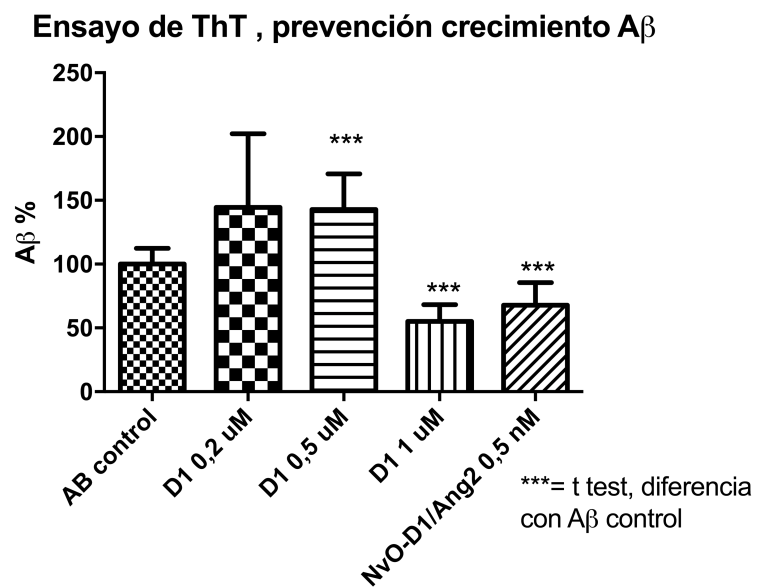


Figura 4.10 NvO-D1/Ang2 inhiben la agregación del péptido $\text{A}\beta$. Resultados del ensayo de ThT. Intensidad de la señal fluorescente de las muestras de fibras de $\text{A}\beta$ en presencia de NvO-D1/Ang2 y el péptido D1. Los resultados son expresados como porcentaje con respecto al $\text{A}\beta$ control. Los experimentos fueron realizados tres veces en quintuplicado en experimentos independientes. La barra representa la desviación estándar. Se utilizó t test para evaluar la diferencia estadística.

Se realizó microscopía electrónica de barrido en modo STEM de las

fibras tratadas con NvO-D1/Ang2 para evaluar si al final del proceso de crecimiento de las fibras, éstas se encontraban decoradas por las NvO, lo cual sucede como se muestra en el panel de la figura 4.11.

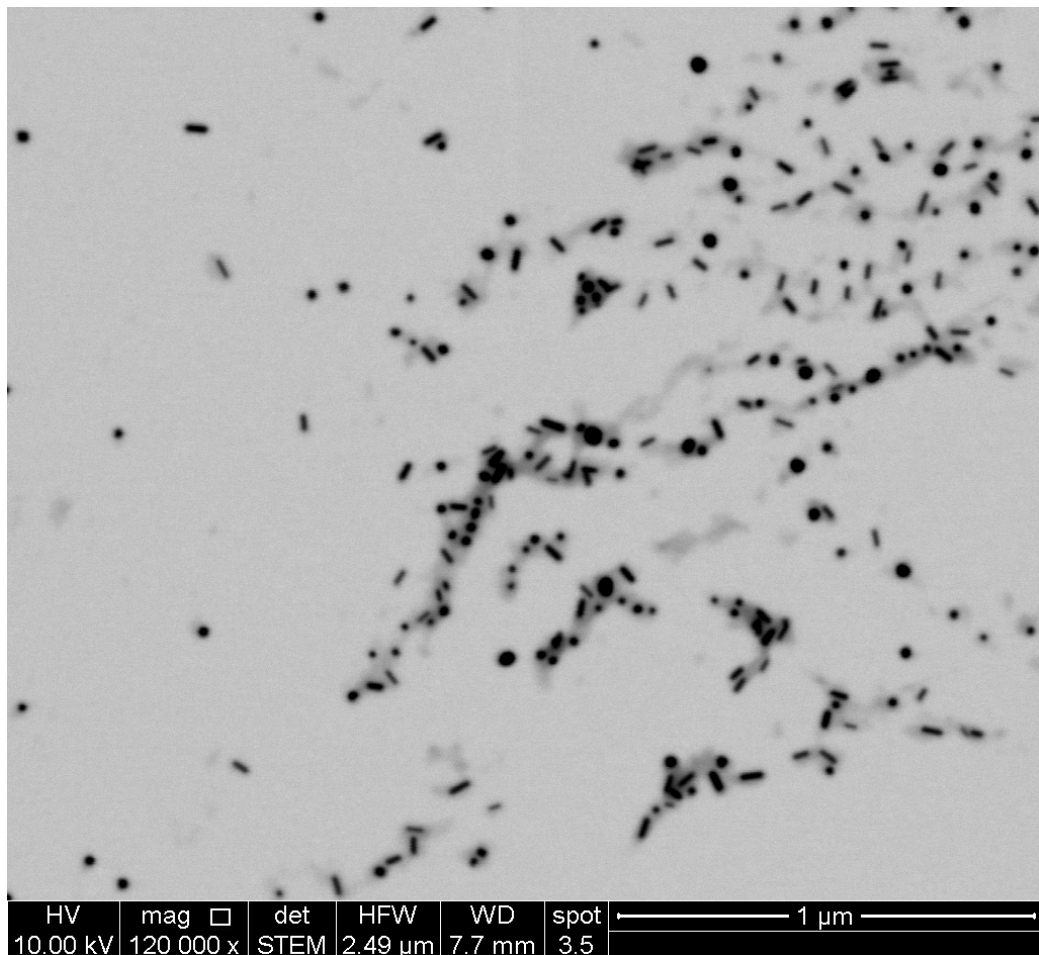


Figura 4.11 Microscopía electrónica de transmisión de restos de fibras de A β incubadas con NvO-D1/Ang2 durante su proceso de formación de fibras.

Se observa en la imagen de la figura 4.11 que no hay grandes fibras largas, solamente pequeños fragmentos de fibras, y en su mayoría se encuentran decorados con NvO-D1/Ang2. Sin embargo, para evaluar la unión de NvO-D1/Ang2 a fibras crecidas, se realizó nuevamente el experimento, pero agregando las NvO-D1/Ang2 a la suspensión de fibras de A β después del crecimiento de éstas, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Como se observa en la figura 4.12 las NvO-D1/Ang2 se unen a las fibras .

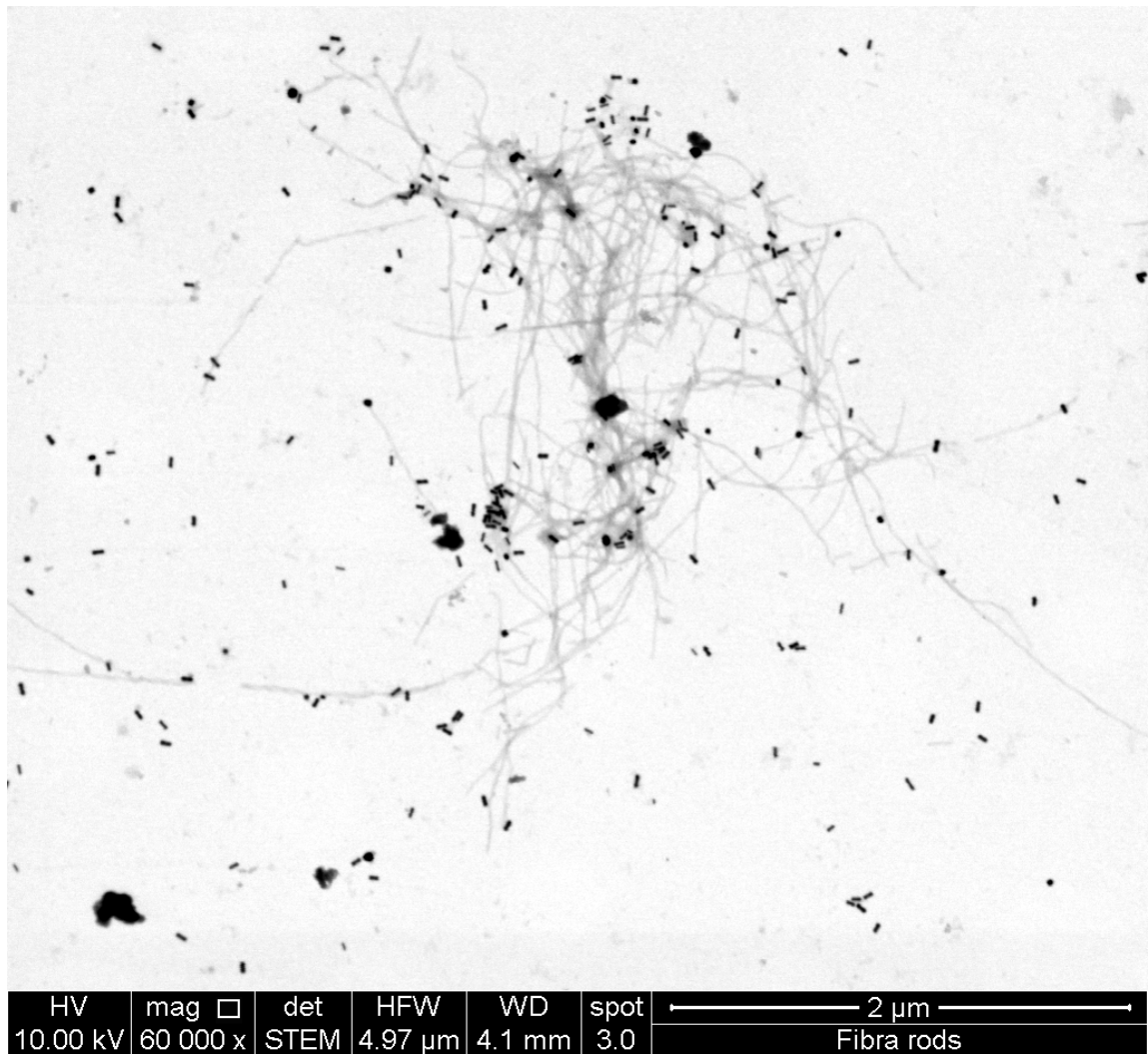


Figura 4.12 Microscopía electrónica de transmisión de fibras de A β incubadas con NvO-D1/Ang2 posterior a su proceso de formación.

Luego se evaluó el efecto de la irradiación sobre el crecimiento de fibras de A β en presencia de NvO-D1/Ang2. Como se mencionó en el capítulo 1 las NvO tienen propiedades ópticas particulares que les permiten absorber

energía a una longitud de onda específica y luego disipar esta energía en forma de calor, entre otra. De ésta manera, irradiando previo al proceso de crecimiento de las fibras, se espera producir un efecto fototérmico que afecte la agregación del péptido A β , como se ha demostrado en otros trabajos de nuestro laboratorio (Marcelo J. Kogan et al., 2006). Como se muestra en la figura 4.13, la presencia de NvO-D1/Ang2 sumado al tratamiento láser produce una disminución, estadísticamente significativa, en la intensidad de fluorescencia de ThT al comparar con el control de A β sin tratamiento y sin irradiación. La diferencia que se muestra para el grupo A β control (sin NvO-D1/Ang2) irradiado y sin irradiar, no es estadísticamente significativa. La disminución en la emisión de ThT se asocia a una menor cantidad de fibras.

No se observaron diferencias en el tratamiento con NvO-D1/Ang2 irradiado y sin irradiar, lo cual se corroboró por microscopía electrónica en la Figura 4.14, donde no se ven fibras para ninguno de los dos casos, solo pequeños restos. Algunos de ellos presentan NvO adheridas a ellos.

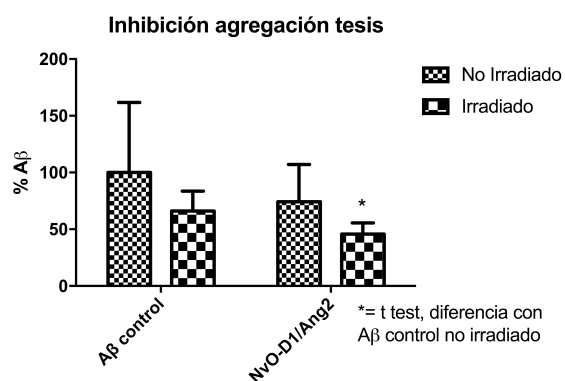


Figura 4.13 Irradiación no potencia la inhibición en la agregación de Aβ generada por NvO-D1/Ang2. Resultados del ensayo de ThT. Intensidad de la señal fluorescente de las muestras de fibras de Aβ en presencia de NvO-D1/Ang2 con y sin tratamiento láser. Los resultados son expresados como porcentaje con respecto al Aβ control no irradiado. Los experimentos fueron realizados dos veces en quintuplicado en experimentos independientes. La barra representa la desviación estándar. Se utilizó t test para evaluar la diferencia estadística.

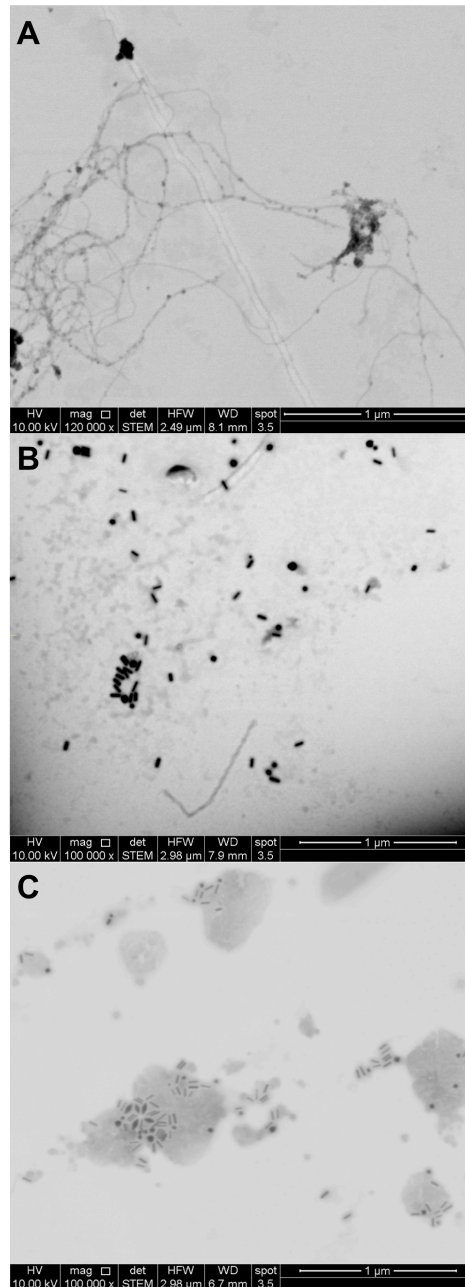


Figura 4.14 STEM de fibras de A β . A) control e incubadas con NvO-D1/Ang2 B) sin irradiar y C) irradiadas.

Se evaluó también el efecto de NvO-PEGs (0,48 nM) y PEG libre (1 μ M) sobre la agregación del péptido A β , con y sin irradiación. Los efectos

se evaluaron mediante el ensayo de fluorescencia de thioflavina y se muestran en la figura 4.15.

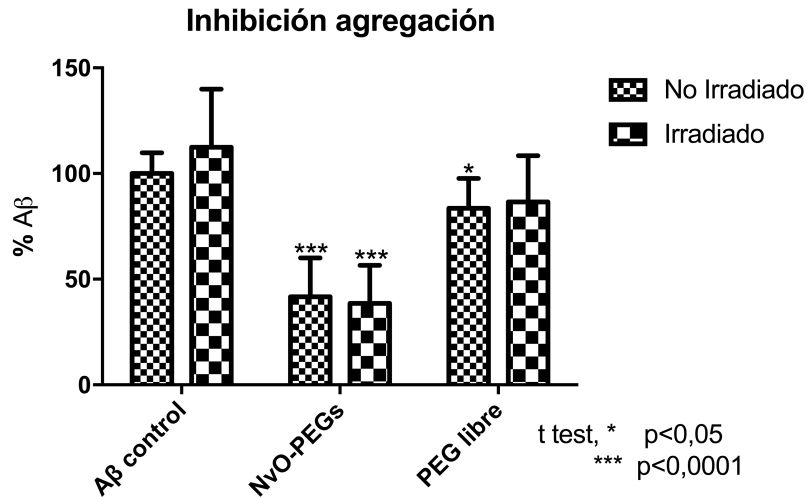


Figura 4.15 NvO-PEG inhiben la agregación del péptido Aβ. Intensidad de la señal fluorescente de las muestras de fibras de Aβ en presencia de NvO-PEGs y PEG libre con y sin tratamiento láser. Los resultados son expresados como porcentaje con respecto al Aβ control no irradiado. Los experimentos fueron realizados tres veces en quintuplicado en experimentos independientes. La barra representa la desviación estándar. Se utilizó t test para evaluar la diferencia estadística.

Se observa que NvO-PEGs sobre la nanopartícula disminuyen la intensidad de fluorescencia de la ThT, lo cual se puede asociar a una menor formación de fibras del péptido Aβ, esto independiente de la irradiación con láser. El PEG libre por otra parte, si bien la condición no irradiada disminuye en comparación al Aβ control, lo hace en menor medida que el

tratamiento con NvO-PEGs, el cual se muestra más efectivo para éste propósito y está de acuerdo a lo que se ha descrito en literatura sobre el PEG unido a nanopartículas (Brambilla et al., 2012).

5. Capítulo 5

**EVALUACIÓN DE NANOVARILLAS DE ORO MODIFICADA CON
LOS PÉPTIDOS D1 Y ANGIOPEP2 EN MODELOS ANIMALES DE
LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

5.1. Evaluación del efecto de las Nanovarillas modificadas en el modelo de la Enfermedad de Alzheimer *C. elegans* 2120.

La baja biodisponibilidad de las nanopartículas hacia el SNC ha vuelto muy complejo el determinar la efectividad de nanoconjugados *in vivo* debido a que las concentraciones que se logran no son suficientes para generar el efecto terapéutico esperado. Considerando esto último hemos utilizado el modelo *C. elegans* 2120, el cual expresa el péptido A β ₁₋₄₂ en sus células musculares lo que conduce a que el animal pierda capacidad motora a causa de la toxicidad del péptido A β en éstas células, para evaluar *in vivo* el efecto de NvO-D1/Ang2 en un modelo animal de la EA (Rebolledo et al., 2011). También éste modelo ofrece la posibilidad de evaluar la formación de placas amiloides en el animal completo mediante la tinción con Thioflavina S (ThS) (Fay et al., 1998).

Este modelo ofrece la posibilidad de evaluar *in vivo*, con un alto número de animales, de manera económica y efectiva nuestro nanoconjugado. Pese a que éste animal posee barreras que impiden la entrada de algunas moléculas, éstas son mucho menores que las que presentan otros modelos

como rata y ratón, haciendo de éste nematodo un buen modelo para evaluar efectos de los fármacos (Kaletta & Hengartner, 2006).

El primer paso fue evaluar la incorporación de oro por el animal, para lo cual se incubó por 24 hrs al nematodo en una suspensión de NvO-D1/Ang2 [1,5 nM] y el control fue incubado con la solución M9, para posteriormente evaluar el oro presente en los animales control y experimental por activación neutrónica.

El grupo control presentó valores muy bajos de oro, siendo 0,0005 µg de oro por mg de gusanos. En comparación, el grupo experimental presenta valores de 1,6 µg de oro por mg de gusanos.

Luego, se evaluó el efecto de NvO-D1/Ang2 en la cepa de *C. elegans* 2120. Para ello se incubó al nematodo con NvO-D1/Ang2 [1,5 nM], dos veces al día por 4 hrs, por 5 días. El control fue la misma cepa de gusanos pero incubado en una solución salina de uso común para el manejo de éste animal. Lo mismo se realizó pero incubando al nematodo con diferentes concentraciones del péptido D1, siendo la más cercana al tratamiento con NvO-D1/Ang2 la concentración 0,5 µM, debido a que la carga de péptido D1 por NvO-D1/Ang2 es de 440 péptidos aproximadamente, por lo que a

una concentración de 1,5 nM de NvO-D1/Ang2 hay una concentración cercana a 0,6 μ M del péptido.

Al día 3 y 5 de tratamiento se realizó un video del nematodo nadando y mediante el software WormLab 3.0 se cuantificó el movimiento del animal, representado por el número de giros que éste realiza por minuto. El control fue la misma cepa de gusanos pero incubado en una solución salina de uso común para el manejo de éste animal. En paralelo a la evaluación del movimiento del animal, se tomaron algunos nemátodos a los días 3 y 5 para evaluar las placas amiloides a través de la tinción con ThS para posteriormente analizar las imágenes con el programa gratuito ImageJ.

Luego, se evaluaron los efectos sobre la motilidad del nemátodo y se observaron diferencias significativas en los movimientos de los animales tratados para el día 5, en comparación al grupo control (figura 5.1).

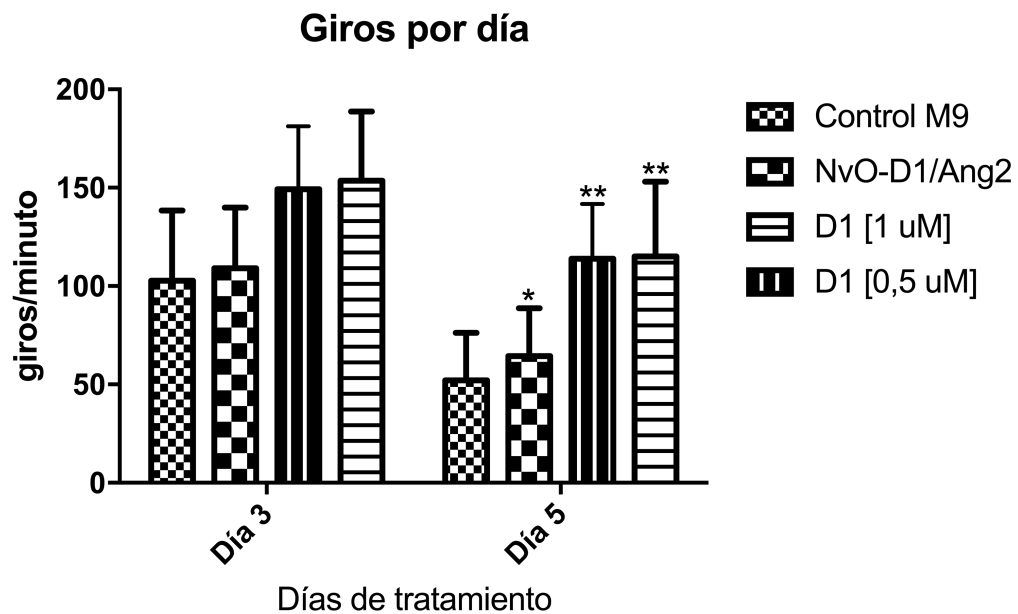


Figura 5.1 Cuantificación del movimiento del nemátodo transgénico en medio líquido. Los nemátodos fueron incubados con NvO-D1/Ang2 [1,5 nM], el péptido D1 [0,5 μ M] y [1 μ M] y se evaluó su motilidad en medio líquido a diferentes días de tratamiento. El grupo control fue incubado con el medio salino M9. Los experimentos fueron realizados dos veces con 20 animales evaluados para cada experimento independiente. La barra representa la desviación estándar. Se utilizó t test para evaluar la diferencia estadística.

Este experimento muestra que tanto el tratamiento con NvO-D1/Ang2 como con el péptido D1 libre retrasa la pérdida de movimiento, disminuyendo la toxicidad del péptido A β en las células musculares de éste nemátodo lo que se ve reflejado en una mejor capacidad motora.

Se evaluó la formación de placas amiloides en el animal control y con los diferentes tratamientos, lo cual se muestra en la figura 5.2. Se observa en la figura 5.2 A que las placas son visibles para todas las condiciones, lo cual se aprecia mejor en la imagen en blanco y negro. Luego del análisis de la imagen utilizando el programa ImageJ se cuantificó el número de placas para cada condición a los días 3 y 5 de tratamiento como se muestra en la figura 5.2 B, en donde se observa que para el día 3 de tratamiento el grupo control presenta un número de placas mayor que el de los tratamientos con NvO-D1/Ang2 y péptido D1. Sin embargo, el tamaño de las placas del grupo control son más pequeñas que para los grupos tratados, lo cual se muestra en la figura 5.2 C.

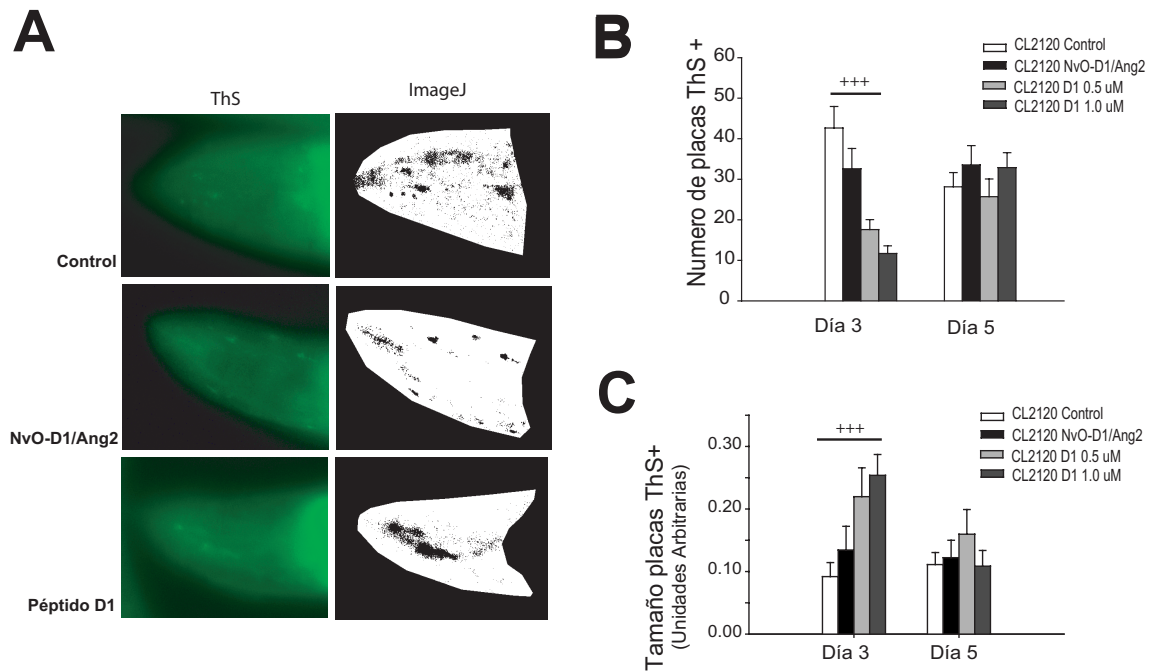


Figura 5.2 Evaluación de placas amiloides en CL2120 con ThS. (A) Imágenes de microscopía de fluorescencia y en blanco y negro de CL2120 tratados con NvO-D1/Ang2 y péptido D1. (B) Cuantificación del número de placas y (C) evaluación del tamaño de las placas. Los experimentos fueron realizados dos veces con 20 animales evaluados para cada experimento independiente. La barra representa la desviación estándar. Se utilizó t test para evaluar la diferencia estadística.

Estos ensayos fueron realizados en el laboratorio de *C. elegans* de la Universidad Santo Tomas bajo la dirección de la Dra. Rebeca Aldunate.

5.2. Evaluación de Nanovarillas modificadas en ratón transgénico modelo de la Enfermedad de Alzheimer.

Si bien el modelo *C. elegans* 2120 es un buen modelo para evaluar la actividad antiamiloidogénica de nuestro nanoconjugado, no nos permite evaluar el paso a través de la BHE, por lo que para evaluar la llegada del nanoconjugado NvO-D1/Ang2 al cerebro, se utilizó otro modelo animal de la EA, el cual es el ratón transgénico APP^{swe}/PSEN1^{dE9}. Se administró por vía intravenosa 100 µl de una suspensión de NvO-D1/Ang2 a una concentración 10 nM. Luego de 15 min, se anestesió al animal para posteriormente perfundirlo para eliminar la sangre residual y cuantificar el oro en cerebro e hígado mediante activación neutrónica y así poder calcular el porcentaje de la dosis que llega a éstos órganos. El control fue el animal transgénico tratado con NvO-PEGs.

En la figura 5.3 se gráfica el porcentaje de la dosis que llega al cerebro para el grupo experimental (NvO-D1/Ang2) y control (NvO-PEGs), siendo $0,043 \pm 0,005\%$ y $0,016 \pm 0,015\%$ de la dosis, respectivamente, y la diferencia entre ellos es estadísticamente significativa.

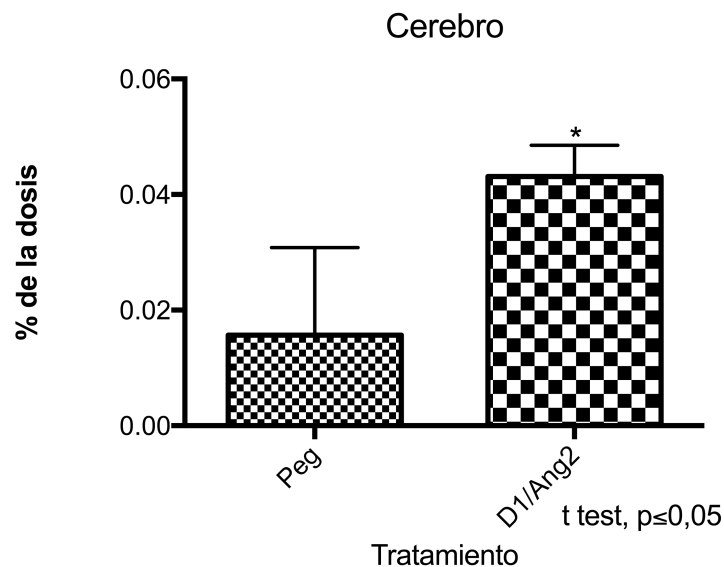


Figura 5.3 Mayor llegada de oro en animal tratado con NvO-D1/Ang2. Porcentaje de la dosis de oro que llega al cerebro. Se inyectaron por la vena de la cola 100 μ l [10 nM]. Se sacrificó el animal a los 15 min. La cuantificación de oro se realizó mediante activación neutrónica (CCHEN) y el N=4. La barra representa la desviación estándar. Se utilizó t test para evaluar la diferencia estadística.

Este resultado nos indica que NvO-D1/Ang2 llegan más al cerebro o son retenidos en el cerebro, en comparación a NvO-PEG, lo cual concuerda con lo esperado según nuestro diseño racional.

A nivel hepático los niveles de oro que se midieron no mostraron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo experimental, teniendo valores de retención cercanos a 30% de la dosis para ambos grupos (Figura 5.4).

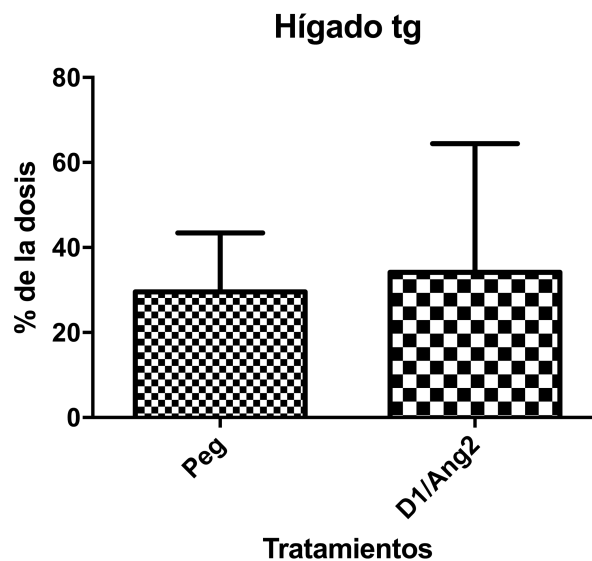


Figura 5.4 Porcentaje de la dosis de oro que es retenida en hígado. Se inyectó por la vena de la cola 100 μ l [10 nM]. Se sacrificó el animal a los 15 min. La cuantificación de oro se realizó mediante activación neutrónica (CCHEN) y el N=4. La barra representa la desviación estándar. Se utilizó t test para evaluar la diferencia estadística.

Una vez determinada la llegada al cerebro del nanoconjugado, se evaluó la capacidad de los nanoconjugados de distribuirse preferencialmente en regiones del cerebro donde hay placas amiloides. La primera aproximación para responder esta pregunta fue usar cortes de cerebros de ratones transgénicos y de ratones control e incubarlos con NvO modificadas marcadas con Alexa fluor 647. Se evaluaron las modificaciones con PEGs,

con D1, Ang2 y D1/Ang2. Las placas amiloides en los cortes de cerebro fueron marcadas previamente a la incubación con las NvO modificadas mediante inmunohistoquímica con un anticuerpo primario anti A β (WO2) y luego un anticuerpo secundario marcado con Alexa fluor 488.

Posteriormente se incubaron los cortes por 5 min en presencia de 0,4 nM de las distintas NvO. En la figura 5.5 se muestran imágenes representativas para las diferentes modificaciones, separadas por canales, en rojo se observan las NvO que fueron marcadas con Alexa fluor 647, en verde las placas amiloides marcadas con Alexa fluor 488 y una superposición de las imágenes para evaluar localización de las señales.

En un análisis visual, se puede observar que con algunos tratamientos hay una superposición de las señales en los canales rojo y verde, sin embargo, no es suficiente con un análisis descriptivo.

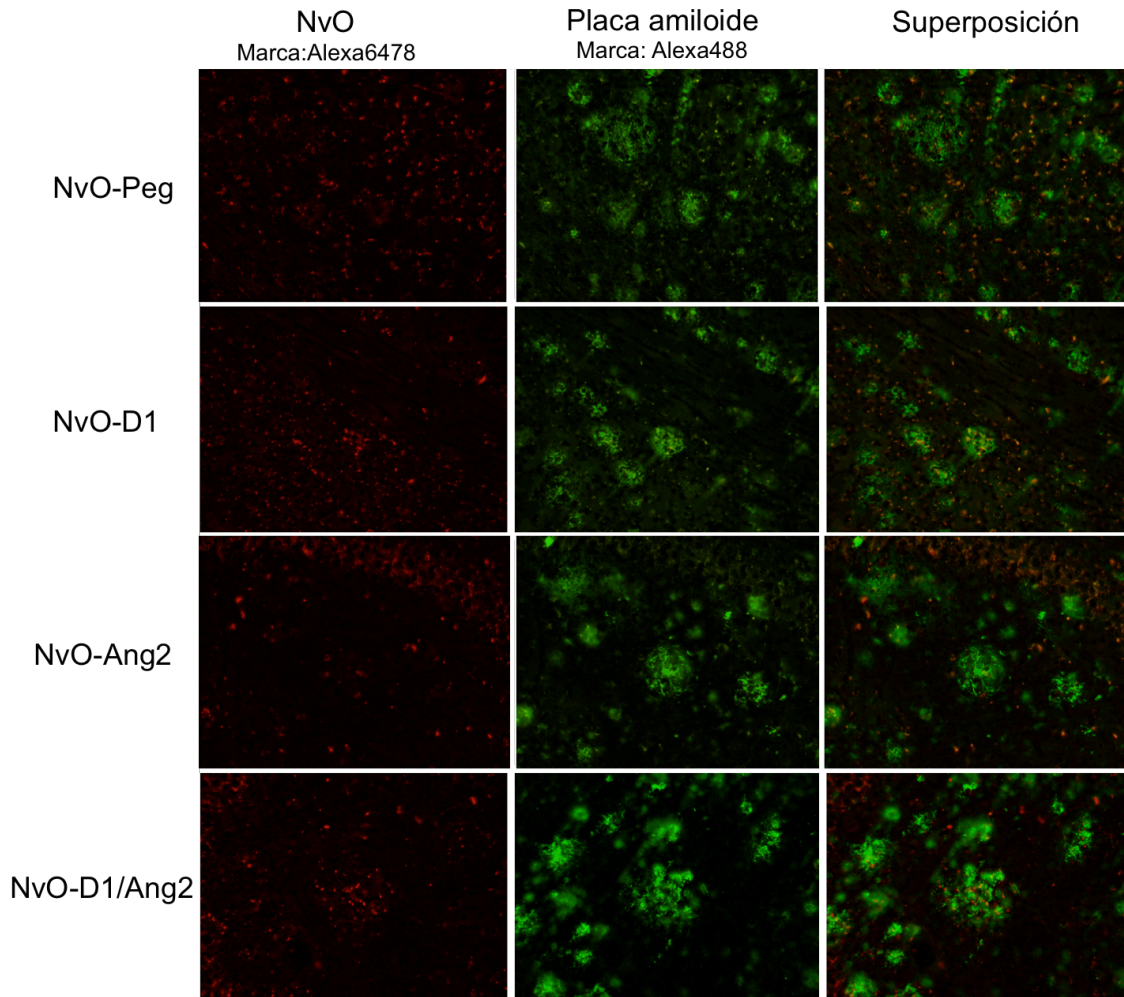


Figura 5.5 Inmunohistoquímica de fluorescencia de cortes de cerebro de ratones transgénicos para la enfermedad de Alzheimer. Se incubados durante 5 min con NvO-PEGs, NvO-D1, NvO-Ang2 y NvO-D1/Ang2 [0,4 nM], todos marcados con Alexa Fluor 647. Las placas amiloides se ven en verde.

Para un análisis más preciso, se utilizó en una primera etapa el programa ImageJ-Fiji para optimizar las fotografías: substraer el ruido de fondo y

ajustar el brillo y el contraste, tomando en consideración no hacer aparecer ni cambiar ningún patrón que no se hubiese encontrado en la imagen original. Posteriormente a la optimización de las fotografías, éstas se analizaron mediante el uso del programa Cell profiler para identificar y segmentar las marcas asociadas a las placas amiloides y a las NvO, para posteriormente realizar una correlación entre ambas fotografías (roja y verde) y evaluar la relación entre los objetos seleccionados en ambas fotografías. El resultado de éste análisis se muestra en la figura 5.6, en donde se gráfica el porcentaje de localización para todas las condiciones, indicando que todas las modificaciones tienen un porcentaje de colocación cercano al 26% promedio. Se realizó el control de colocación rotando la imagen roja (correspondiente a las NvO) en 90° y se realizó el mismo análisis, mostrando una disminución en la colocación comparable al blanco (figura 5.7).

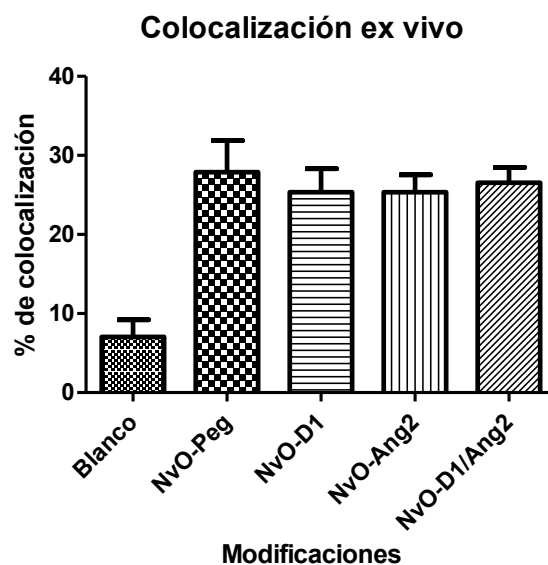


Figura 5.6 Porcentaje de colocalización de las NvO con las placas amiloides en experimento de incubación *ex vivo*. La barra representa el error estándar medio.

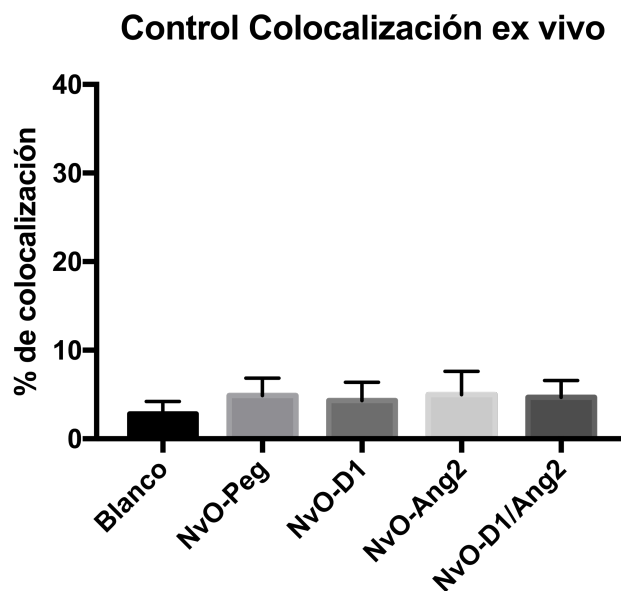


Figura 5.7 Control de colocalización rotando la imagen roja (NvO) 90°. La barra representa el error estándar medio.

Finalmente, se evaluó la capacidad de marcar las placas amiloides de nuestro nanoconjugado NvO-D1/Ang2 *in vivo*. Para esto se administró la NvO-D1/Ang2-Alexa Fluor 647 vía intravenosa, luego de 15 min el animal fue anestesiado, perfundido y sacrificado. El cerebro fue fijado y se realizaron cortes histológicos. Las placas amiloides fueron marcadas mediante inmunohistoquímica con el anticuerpo primario WO2 y un secundario marcado con Alexa fluor 488. Los cortes se evaluaron en un microscopio de epifluorescencia y el control que corresponde a un animal inyectado con NvO-PEGs sin marca fluorescente.

En la figura 5.8 se muestra un panel de imágenes para el Control y el grupo experimental NvO-D1/Ang2, en donde se separan los canales correspondientes a las NvO (Alexa fluor 647 en rojo) y para las placas amiloides (Alexa fluor 488 en verde), para finalmente hacer una superposición de las imágenes. Se observa que para el animal inyectado con NvO-D1/Ang2-Alexa fluor 647 hay una distribución concordante entre las placas amiloides y la señal roja correspondiente a las NvO.

De igual manera que en el experimento *ex vivo*, las imágenes fueron analizadas con el software ImageJ-Fiji y Cell profiler y se determinó el porcentaje de colocalización, lo que arrojó un valor cercano al 22% de

colocalización entre las marcas asociadas a las NvO y las placas amiloides, como se ve en la figura 5.9. Para el blanco el porcentaje de colocalización es cercano al 7%.

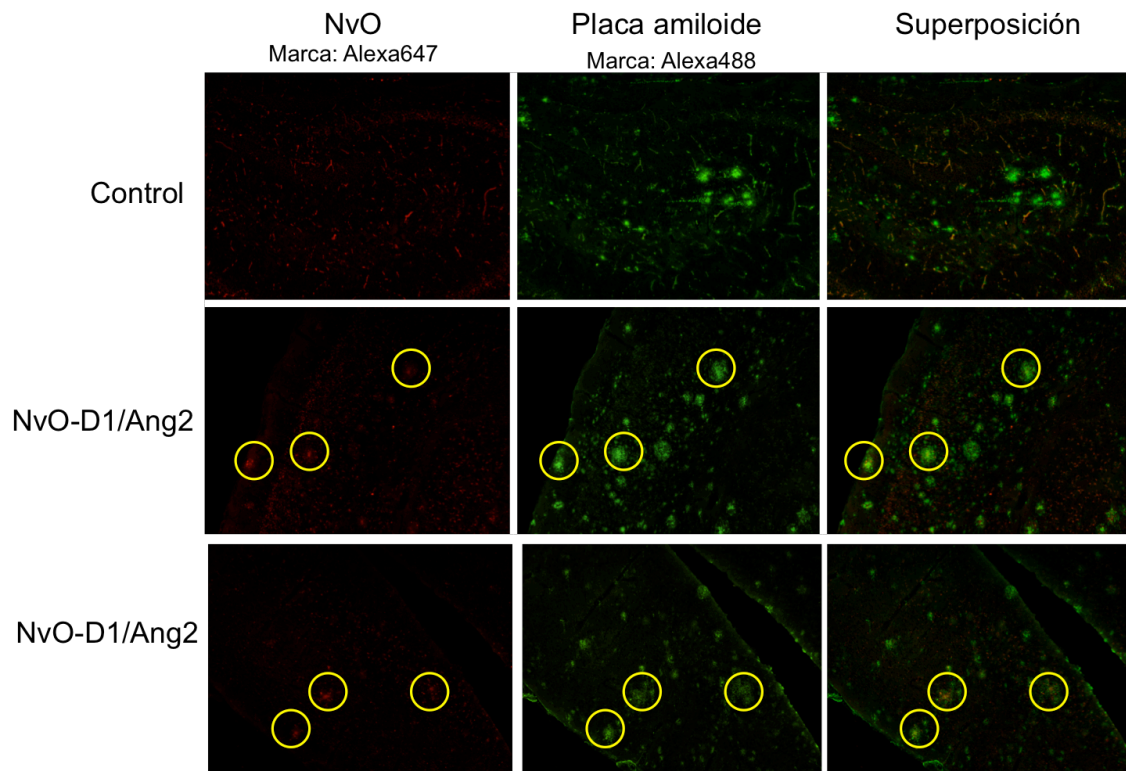


Figura 5.8 Colocalización de NvO-D1/Ang2 con placas amiloides *in vivo*. Imágenes de fluorescencia de inmunohistoquímica de cortes de cerebro de ratones transgénicos para la enfermedad de Alzheimer inyectados con 100 μ l NvO-D1/Ang2-Alexa Fluor 647 [10 nM]. Las placas amiloides se ven en verde, el control fue inyectado con NvO-PEGs.

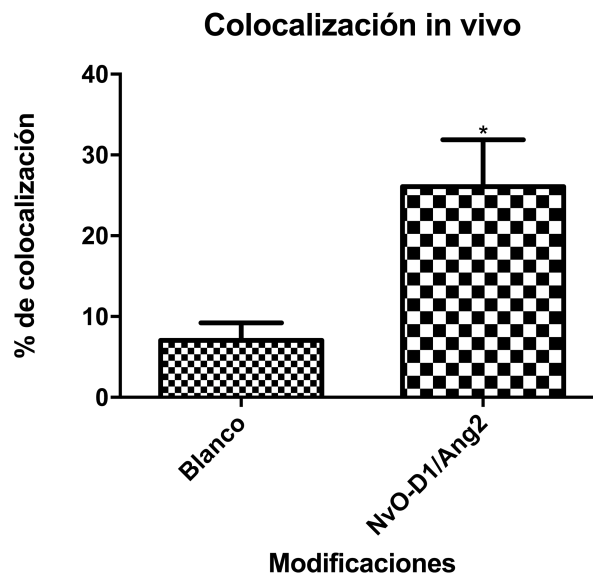


Figura 5.9 Porcentaje de colocalización de las NvO con las placas amiloides del experimento *in vivo*. La barra representa el error estándar medio. Se utilizó t test para evaluar la diferencia estadística.

El control de colocalización se realizó también para este grupo de imágenes, rotando la imagen roja (NvO) en 90° y luego realizar el análisis. Como se ve en la figura 5.10, la colocalización disminuye drásticamente a niveles comparables con el blanco.

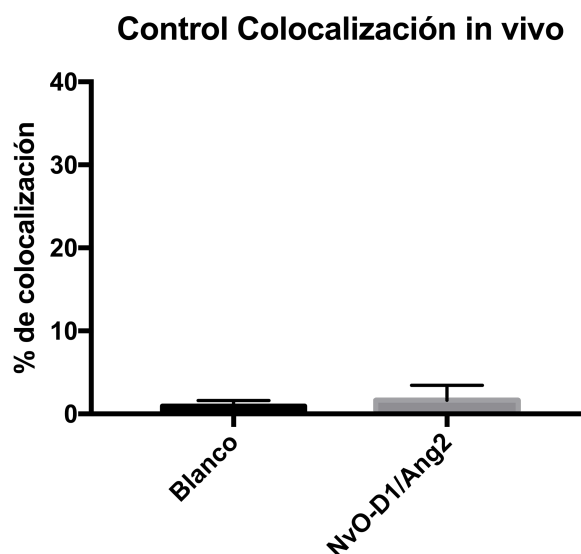


Figura 5.10 Control de colocalización rotando la imagen roja (NvO) 90° y luego realizar el análisis. La barra representa el error estándar medio.

Finalmente un ratón transgénico fue tratado con NvO-D1/Ang2, como se describe previamente en esta tesis, y se evaluó la presencia de las NvO en el cerebro mediante TEM. Para lo cual el animal tuvo una perfusión extra a la normal realizada con PBS, la cual es una solución de glutaraldehído con paraformaldehído llamada Karnovsky, la cual se describe en la sección 2.28. Luego se extrajo el cerebro y se obtuvo el hipocampo, el cual se llevó a la Unidad de Microscopía Electrónica del Centro de Equipamiento y Servicios de Apoyo Tecnológico (CESAT) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, donde fue procesado por la Profesora Marta Gacitua,

Jefa de Unidad de Microscopía Electrónica en Facultad de Medicina, para poder ser observada en TEM.

En la Figura 5.11 y 5.12 se observan micrografías de TEM de hipocampo de ratón inyectado con NvO-D1/Ang2, en donde se logran observar a las NvO.

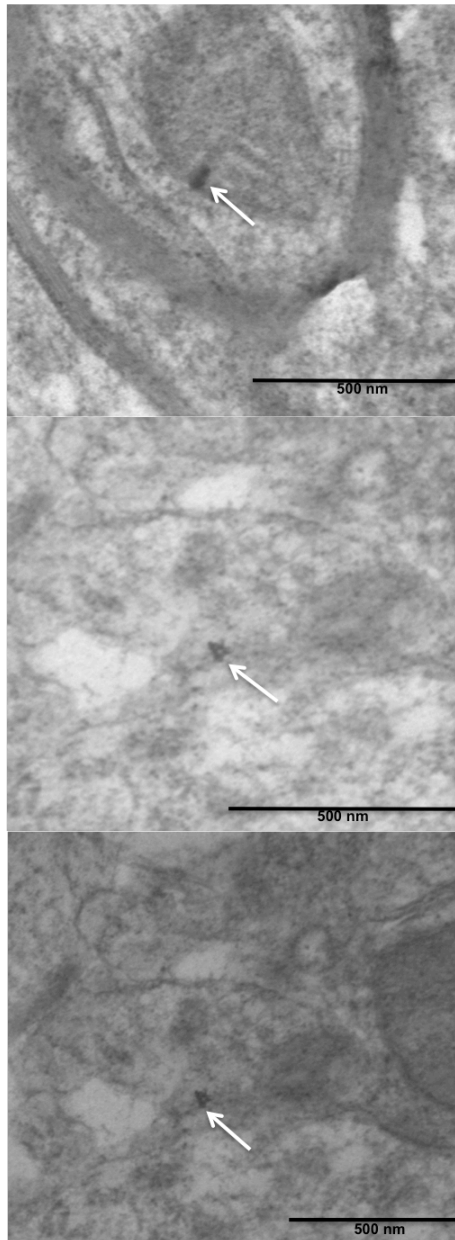


Figura 5.11 NvO-D1/Ang2 en hipocampo de cerebro de ratón. Micrografías obtenidas por TEM de cortes de cerebro en las regiones de hipocampo para la detección de NvO-D1/Ang2. Las flechas blancas indican las NvO-D1/Ang2. Barra de tamaño 500 nm.

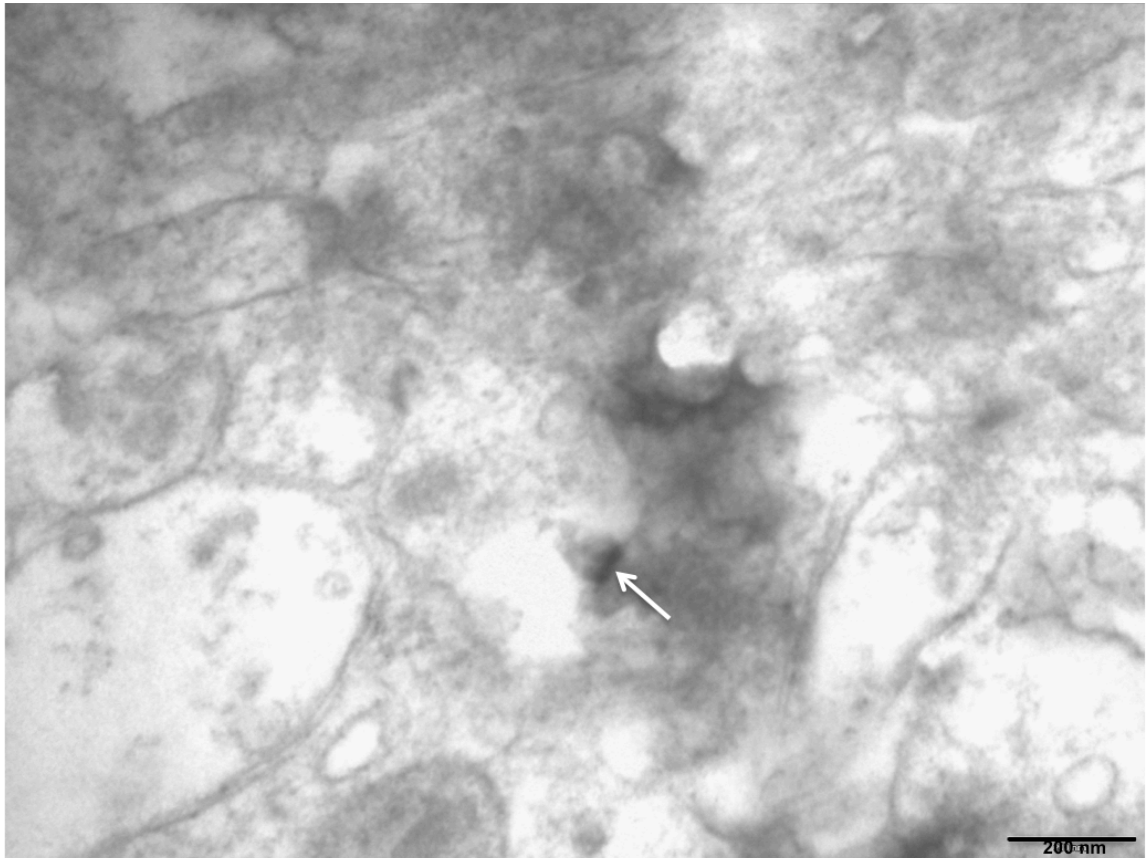


Figura 5.12 NvO-D1/Ang2 en hipocampo de cerebro de ratón. Micrografías obtenidas por TEM de corte de cerebro en la region del hipocampo para la detección de NvO-D1/Ang2. Las flechas blancas indican las NvO-D1/Ang2. Barra de tamaño 200 nm.

6. Capítulo 6

DISCUSIÓN DE RESULTADOS, CONCLUSIONES Y PROYECCIONES

6.1. Discusión de Resultados

Síntesis y Caracterización

En esta tesis de doctorado, el primer paso fue la síntesis de NvO mediada por semillas, las cuales fueron caracterizadas por pZ, DLS, TEM y en un último paso por análisis de aminoácidos.

La conjugación de moléculas a la superficie de una NvO podría evaluarse por un desplazamiento de la banda de la resonancia plasmónica. Sin embargo, para nanopartículas grandes como las usadas en esta tesis, no hay cambios considerables, en cambio para nanopartículas más pequeñas es esperable un desplazamiento batocrómico al conjugarse las mismas con diferentes ligandos (Pramod, Joseph, & Thomas, 2007).

De los datos obtenidos por DLS de las NvO-CTAB, de acuerdo al tamaño reportado para el primer pico (3 nm) esta dimensión no puede ser atribuida al diámetro transversal de la NvO, ya que de acuerdo a lo obtenido por STEM, el ancho de la NvO es cercano a los 11 ± 1 nm, por lo que se ha propuesto en literatura que este pico pudiese corresponder a micelas del surfactante CTAB (Movchan, Soboleva, Plotnikova, Shchekin, & Rusanov, 2012) las cuales se encuentran presentes en la solución y estabilizando a la

NvO. También se ha asociado este pico a la difusión rotacional de la NvO (H. Liu, Pierre-Pierre, & Huo, 2012). El segundo pico de 63 nm se atribuye al largo de la NvO, que a partir de las imágenes de STEM se obtuvo un valor cercano a los 48 ± 5 nm. Es de esperar que el valor obtenido por DLS sea mayor al obtenido por TEM, debido a que la técnica de DLS entrega el valor correspondiente al diámetro hidrodinámico, el cual incluye las contracciones que están rodeando a la NvO que aumentan el valor en comparación al TEM, en donde el cálculo del tamaño es directo sobre la región electrónica correspondiente al oro.

El pZ obtenido de las NvO-CTAB es de esperarse debido a la carga positiva del CTAB, éste resultado confirma la estabilización de las NvO por éste agente surfactante.

Luego de que las NvO son modificadas con los dos PEGs (NvO-PEGs), se observó mediante DLS que el segundo pico del análisis del Dh presentó un corrimiento hacia un valor mayor (de 63 nm a 98 nm). Este cambio indica un aumento del Dh de las NvO e indica que las moléculas de PEGs se han unido a la superficie de las NvO. El PEG utilizado tiene un peso molecular de 5.000 g/mol y en literatura se ha descrito que modificaciones en la superficie de nanopartículas con PEGs de éste peso molecular

aumenta el diámetro hasta en 11 nm, medido por HRTEM (Cauda, Argyo, & Bein, 2010). Esto es coherente con el cambio observado. Más aun considerando que se estima que los PEGs se unirían preferencialmente a los extremos de las NvO (C. Adura et al., 2013; Nguyen, Gigault, & Hackley, 2014), como se muestra esquemáticamente en la Figura 6.1, lo que aumentaría principalmente el diámetro longitudinal de la NvO. La unión preferencial de las cadenas de PEGs a los extremos de las NvOs, se asume se debe a que ésta región no está recubierta por átomos de Ag y es principalmente Au, a diferencia de las secciones intermedias en donde estarían presentes Ag y AgBr (C. Adura et al., 2013). Si bien los valores obtenidos por DLS son mayores a la suma del tamaño inicial de la NvO más el largo esperado de las cadenas de PEGs (48 nm + 11x2 nm aproximadamente), se debe mencionar que el valor obtenido por DLS es el D_h y que también puede haber algún grado de agregación, lo cual puede aumentar la aparente distribución de tamaños (Kobler, Moller, & Bein, 2008).

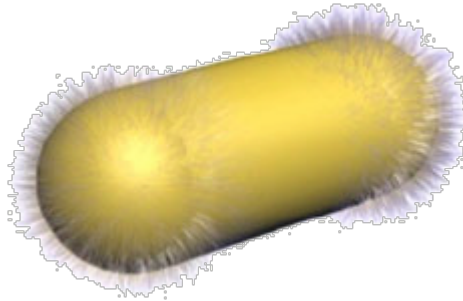


Figura 6.1 Propuesta de cómo se pegan las cadenas de PEGs en un proceso acuoso (Nguyen et al., 2014).

El aumento en el D_h para el primer pico de 3 nm (NvO-CTAB) a 6 nm (NvO-PEGs), nos puede estar indicando que hay un desplazamiento del CTAB desde la solución y el aporte de las micelas de CTAB, que se ha descrito que se reportan en ese rango de tamaños por DLS, disminuye (Movchan et al., 2012). Esto indicaría que en éste punto éste pico podría corresponder en mayor medida a la difusión rotacional de la NvO.

El pZ de las NvO-PEGs indica un viraje de la carga pasando de un valor muy positivo, de las NvO-CTAB, a uno negativo para NvO-PEGs. Este resultado nos indica que el componente que otorga carga positiva a las NvO, el agente surfactante CTAB, ha sido desplazado considerablemente por las moléculas de PEGs. Debido a que el pZ de las NvO-PEGs es altamente negativo, el PEG que debe estar presente de manera mayoritaria

es el HS-PEG-COOH, de manera desprotonada aportando carga negativa al nanoconjugado, ya que las medidas se hacen a pH 5,5.

En este mismo punto, una vez que la NvO-PEGs es modificada con los péptidos D1 y Ang2 el pZ se acerca mucho más a la neutralidad debido a la carga que confieren los péptidos que se agregan a la NvO, ya que a pH 7 el péptido D1 tiene una carga 1.2, y el péptido Ang2 tiene carga 2. Por lo tanto este desplazamiento en el pZ es indicativo de que los péptidos se han unido a la superficie de la NvO, lo cual fue corroborado finalmente por el análisis de aminoácidos.

Evaluación Celular

Obtenido y caracterizado el nanosistema se realizaron las pruebas celulares, en donde no se observaron efectos sobre la viabilidad celular a concentraciones y tiempos en que NvO-CTAB mostraron efectos sobre la viabilidad celular, lo cual es un resultado indicativo del desplazamiento del CTAB de la superficie de la NvO, talvez no total, pero si en gran medida.

En los ensayos de internalización celular evaluada por cuantificación de oro hay es mucho mayor para en la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y. Este resultado es interesante, ya que es deseable que este

nanoconjugado no sea incorporado por las neuronas sanas en el contexto de la Enfermedad de Alzheimer, donde los agregados amiloides son extracelulares (Querfurth & LaFerla, 2010), por lo tanto tener valores bajos para el cultivo primario de neuronas es positivo para una potencial terapia basada en el uso de los nanoconjugados.

En los ensayos de internalización celular evaluada por citometría de flujo se observó que la incorporación es dependiente de energía y un componente importante de la internalización es dependiente de clatrina. Este resultado es interesante, ya que se ha descrito que el péptido Ang2 realiza su endocitosis y transcitosis mediante el reconocimiento del receptor LRP1, el cual está descrito que genera endocitosis dependiente de clatrina (M. Demeule, Currie, et al., 2008). Por lo tanto, que la incorporación de las NvO que contienen el péptido Ang2 se vea fuertemente inhibida por CPZ, es un indicativo de que éste péptido pudiese estar dirigiendo la penetración celular de la NvO mediante el receptor LRP1. Cabe recordar que CPZ inhibe la internalización dependiente de clatrina mediante el cambio de la distribución subcelular de componentes que forman el complejo formado por clatrina (Subtil, Hemar, & Dautry-Varsat, 1994). Este resultado es concordante con lo encontrado mediante TEM, en donde las NvO-D1/Ang2

están presente principalmente dentro de cuerpos multivesiculares. Esto concuerda con la estrategia de usar Angiopep2 para dirigir el nanoconjugado, ya que como se ha mencionado Angiopep2 es reconocido por LRP1 y se ha descrito que la endocitosis mediada por el receptor LRP1 (dependiente de clatrina) en un estado tardío de internalización puede ser dirigido hacia cuerpos multivesiculares (Yameen et al., 2014).

Un resultado interesante también es la disminución de la incorporación de la NvO-D1 al usar CPZ, en donde no se encuentra descrita alguna ruta de ingreso del péptido D1 a las células, por lo que saber que su incorporación también es inhibida por CPZ nos indicaría que éste proceso podría ser dependiente de clatrina. Esto último, puede tener explicación a través de que el receptor LRP1 tiene como ligando el péptido A β , entre otros (Sagare et al., 2012; Zlokovic, Deane, Sagare, Bell, & Winkler, 2010), de manera que si D1 tiene la capacidad de reconocer A β cabe la posibilidad que D1 comparta algún motivo estructural que le permita ser reconocido por LRP1 u otro receptor que reconozca A β y que promueva su endocitosis de manera clatrina dependiente.

Efectos sobre la agregación de A β

En los ensayos para evaluar el efecto de NvO-D1/Ang2 sobre la agregación del péptido A β , la disminución en la intensidad de la fluorescencia de la señal de ThT para la concentración 1 μ M de D1 (ratio D1/A β : 0,05/1) puede ser atribuida a un menor crecimiento de fibras de A β con respecto a la condición control. Este resultado es concordante con los resultados reportados por Wiesehan y cols. donde demostraron que cuando la razón de D1/A β aumenta, hay una disminución en la señal de fluorescencia de ThT que se puede atribuir a una inhibición en el crecimiento de fibras. Contrariamente, cuando la razón D1/A β disminuye hay un aumento en la señal de fluorescencia de ThT posiblemente debido a la formación de un mayor número de fibras, pero más cortas, lo cual puede atribuirse a un efecto de nucleación producido por el péptido D1 (Wiesehan et al., 2008). Sin embargo, el tratamiento de A β con NvO-D1/Ang2 a una concentración de 0,48 nM (equivalente a 0,2 μ M del péptido D1 teniendo en cuenta el grado de funcionalización) produce una disminución en la señal de ThT. Este resultado puede ser atribuido a un efecto sinérgico de nucleación entre el péptido D1 y la NvO. Como se ha descrito en literatura, las nanopartículas de oro pueden inhibir o promover procesos

amiloidogénicos (Liao, Chang, Yoshiike, Chang, & Chen, 2012). Este resultado se corroboró mediante STEM, en donde se observó que las NvO-D1/Ang2 se encuentran unidas a pequeños segmentos de fibras de A β y no se aprecian en la muestra fibras de mayor tamaño (Figura 4.11). Se realizó un control agregando las NvO-D1/Ang2 después del crecimiento de las fibras y se incubó durante media hora. Se pudieron apreciar fibras de A β de mayor tamaño y decoradas con las NvO (Figura 4.12).

El efecto de la irradiación sobre la agregación de fibras de A β incubadas con NvO-D1/Ang2 se evaluó igualmente a través del ensayo de ThT y se observó que la irradiación de las muestras que fueron incubadas con NvO-D1/Ang2 muestra una pequeña disminución en la formación de fibras. Sin embargo esta diferencia no es estadísticamente significativa en comparación al tratamiento de NvO-D1/Ang2 sin irradiar, lo cual fue corroborado mediante STEM, en donde las muestras irradiadas y no irradiadas se aprecian muy similares, sin presencia de grande fibras.

En literatura se ha descrito que cadenas de PEG libre pueden interactuar con el péptido A β pero con baja afinidad, sin embargo, cuando el PEG está colocado sobre una matriz nanoparticulada, se ha descrito que logra unir al péptido A β con alguna selectividad y alterando su cinética de agregación,

incluso cuando las cadenas de PEGs se encuentran con diferentes disposiciones espaciales sobre la nanopartícula o con modificaciones, como podría ser una molécula fluorescente (Brambilla, Verpillot, De Kimpe, et al., 2010; Brambilla et al., 2012; Brambilla, Verpillot, Taverna, et al., 2010). Es por eso que se evaluó el efecto de las moléculas PEG sobre la agregación del péptido A β . Se observa que, independiente de la irradiación, NvO-PEGs y PEG libre disminuyen la formación de fibras, sin embargo, el PEG unido a la NvO (NvO-PEGs) disminuye la formación de fibras en mayor medida, lo cual es coherente con lo descrito en literatura (Brambilla et al., 2012). Se ha reportado que las cadenas de PEG podrían unirse al péptido A β de manera inespecífica mediante puentes de hidrógeno dependientes de los oxígenos en las cadenas del PEG, y también algunas interacciones hidrofóbicas (Brambilla et al., 2012).

Para nanopartículas de oro se ha descrito que, sin funcionalizar, afectan el proceso de agregación del péptido A β , específicamente nanoesferas de oro (NeO) inhiben la agregación y desagregan las fibras del péptido A β . Lo mismo se demostró para estas mismas NeO pero funcionalizadas con un grupo carboxilo que les otorgaba carga negativa, y además se determinó que tenían un efecto citoprotector en cultivos celulares tratados con agregados

del péptido A β . Ninguna de estas características se observa cuando las NeO son funcionalizadas con grupos amino, confiriéndoles carga positiva (Liao et al., 2012).

En consideración a esto es posible que la diferencia observada en la inhibición de la agregación del péptido A β entre el PEG libre y unido a la NvO pueda corresponder a un efecto de la misma NvO y a la carga final de las NvO-PEGs, la cual es negativa.

Pese a que *in vitro* nuestros resultados muestran a las NvO-PEGs muy efectivas para inhibir el proceso de formación de agregados del péptido A β , cabe destacar que los resultados celulares obtenidos en esta tesis y que también se pueden encontrar en literatura, posicionan a la NvO-PEGs con una muy baja penetración celular por sí sola, lo que indicaría que su capacidad de atravesar la BHE, paso crucial para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, podría ser insuficiente siendo necesaria la conjugación a moléculas que favorezcan la transcitosis.

Modelos *in vivo* de la Enfermedad de Alzheimer

En la última etapa de esta tesis, se evaluó el conjugado NvO-D1/Ang2 en modelos *in vivo* de la EA. El primer modelo utilizado fue el de *C. elegans* 2120 el cual expresa el péptido A β en sus células musculares, por lo que con el tiempo éste animal pierde su capacidad locomotora por la toxicidad de los agregados amiloides en sus células musculares. Primero se determinó que las NvO-D1/Ang2 son incorporadas por el nemátodo. Esto fue determinado por cuantificación de oro por activación neutrónica.

La incorporación de las NvO-D1/Ang2 en el animal puede ser principalmente por la ingesta de las NvO-D1/Ang2 y luego atravesar la barrera intestinal. Otra forma es mediante la cutícula, lo cual es muy poco probable que sea mediante difusión debido al tamaño de las nanopartículas, sin embargo hay un homólogo del receptor LRP1 en la superficie apical de las células hipodermales hyp6 e hyp7 (Yochem, Tuck, Greenwald, & Han, 1999), él cual podría ser reconocido por el péptido Ang2 presente en la superficie de la NvO, sin embargo esto no ha sido comprobado.

En los ensayos de motilidad realizados en el nematodo *C. elegans* 2120, incubado con NvO-D1/Ang2 y el péptido D1 libre, se observó que los

animales tratados, ambos tratamientos por separado, retienen mayor movimiento en el tiempo, lo cual indica menor toxicidad en sus células musculares. Este resultado es muy interesante ya que es la primera vez que se reporta en un modelo *in vivo* que nanosistemas basados en AuNPs disminuyen la toxicidad de las formas agregadas del péptido A β .

En las cepas de *C. elegans* que expresan de manera constitutiva el péptido A β en sus células musculares, se ha correlacionado una mejoría en la motilidad con un aumento en la formación de placas amiloides, ya que se ha descrito que la forma de agregación más tóxica del péptido A β son las especies oligoméricas y que el desplazamiento del equilibrio hacia la formación de placas es un mecanismo de protección frente a la toxicidad de oligómeros (Minniti et al., 2015; Minniti et al., 2009; Rebolledo et al., 2011).

El análisis placas amiloides por THS para los nemátodos tratados indica que para el día 3 de tratamiento con NvO-D1/Ang2 y el péptido D1, se está desplazando el equilibrio del péptido A β , desde las especies oligoméricas hacia la formación de placas, lo cual se ve reflejado en la capacidad locomotora del nemátodo evaluada al día 5, posiblemente por la menor

toxicidad producida por las formas agregadas del péptido A β por los tratamientos con NvO-D1/Ang2 y péptido D1. Este efecto es concentración dependiente para el péptido D1 libre. Estos resultados son concordantes con los reportados por Wisehan y cols. quienes observaron que el pretratamiento del péptido A β con el péptido D1 disminuye la citotoxicidad de las especies resultantes del péptido A β , todo esto evaluado *in vitro* (Wiesehan et al., 2008).

Para el grupo control, posiblemente se ha generado un efecto toxico que se ha ido acumulado en el tiempo, el cual ha sido mayor que el producido en los nematodos tratados con NvO-D1/Ang2 o péptido D1 libre y por lo tanto su capacidad locomotora se ve afectada de mayor manera por la toxicidad de las formas agregadas del péptido A β .

Si bien este efecto es mayor para los tratamientos con el péptido D1 que para el tratamiento con NvO-D1/Ang2, esto puede deberse a diferencias en la concentración efectiva dentro del nematodo, ya que la entrada y difusión del péptido libre es más probable que la del nanosistema propuesto el cual es más voluminoso.

Para evaluar la capacidad del conjugado NvO-D1/Ang2 de atravesar la

BHE y alcanzar el parenquima cerebral se utilizó el modelo murino de la EA APP^{swe}/PSEN1^{dE9}, en donde se determinó que la llegada del nanoconjugado NvO-D1/Ang2 es cerca de 4 veces mayor que el control, NvO-PEGs. Se ha descrito que en estudios post mortem de pacientes con la EA, que la BHE se encuentra dañada y permite un mayor paso de componentes sanguíneos hacia el SNC (Fiala et al., 2002; Hultman, Strickland, & Norris, 2013; Montagne et al., 2015; Sengillo et al., 2013). Por esto, es interesante que nuestro nanosistema propuesto (NvO-D1/Ang2) tenga una mejor llegada al cerebro que el control (NvO-PEGs), ya que nos indica que su llegada no es solamente por la permeabilidad de las BHE, sino que también hay un tropismo de ésta hacia el cerebro (posiblemente dado por la interacción de Angiopep2 con el receptor LRP1 que favorece la transcitosis) que la NvO-PEGs no poseen y no llega logra acumularse en ese órgano.

Luego, *ex vivo* se evaluó la colocalización de los diferentes nanoconjugados propuestos, marcados con Alexa fluor 647, con las placas amiloides utilizando cortes de cerebros del ratón APP^{swe}/PSEN1^{dE9}, se determinó que todos presentan cerca de un 26% de colocalización. Esto

llama la atención ya que indica que todos tiene una afinidad similar por las placas amiloides, sin embargo solamente el péptido D1 ha sido desarrollado con la función de reconocer A β , por lo que los resultados con Ang2 y PEGs llama la atención, aunque para éste último resultados mostrados previamente en ésta tesis y algunos reportes en literatura respaldan éste resultado. Sin embargo, Ang2 está diseñado para atravesar la BHE lo cual lo logra mediante el reconocimiento por parte del receptor LRP1. El receptor LRP1 dentro de sus ligandos se encuentra α -2-macroglobulina (α 2m), apolipoproteína E (apoE), Propteína Precursora Amiloide (APP) y el péptido A β , entre otros ligandos conocidos para éste receptor (Sagare et al., 2012; Zlokovic et al., 2010). Siendo que tanto el péptido Ang2 y el péptido A β son reconocidos por el mismo receptor, cabe la posibilidad que tengan motivos estructurales que puedan ser similares, permitiéndoles interactuar entre ellos, otorgándoles algún grado de afinidad. Lo mismo fue evaluado *in vivo* para el nanoconjugado NvO-D1/Ang2 marcado con alexa fluor 647, corroborandose el resultado. Los controles de colocalización, rotando la imagen en rojo (NvO), muestran una baja considerable para todos los casos, *in vivo* e *in vitro*, indicando que no es al azar o un efecto del ruido de fondo.

Finalmente la llegada de las NvO-D1/Ang2 al cerebro fue comprobada por TEM, como se observa en la Figura 5.9. Cabe mencionar que el contorno de las NvO puede verse alterado en la imagen debido a la gran cantidad de proteínas que se deben agregar sobre su superficie, considerando todas las barreras biológicas que debe atravesar para llegar al cerebro. Este resultado, sumado a los datos de oro y las imágenes de fluorescencia mostradas en el capítulo 5 confirman la llegada de las NvO-D1/Ang2 al cerebro del animal.

6.2. Conclusiones

- Se obtuvieron y caracterizaron NvO-CTAB, NvO-PEGs y NvO-D1/Ang2, no afectan la viabilidad celular y logran penetrar monocapas celulares, internalizándose de manera clatrina dependiente .
- NvO-D1/Ang2 y NvO-PEGs inhiben el proceso de agregación del péptido A β .
- NvO-D1/Ang2 se unen a fibras del péptido A β .
- NvO-D1/Ang2 y el péptido D1 libre reducen la toxicidad de los agregados tóxicos del péptido A β en las células musculares del modelo *C. elegans* 2120 *in vivo*.
- NvO-D1/Ang2 tiene 4 veces mejor llegada al cerebro, *in vivo*, que NvO-PEGs en el modelo transgénico murino de la Enfermedad de Alzheimer y presentan colocalización con placas amiloides.
- NvO-PEGs, NvO-D1, NvO-Ang2 y NvO-D1/Ang2 colocalizan *in situ* con placas amiloides.

6.3. Proyecciones

A futuro se espera poder dilucidar *in vitro* como nanopartículas de oro multifuncionalizadas altera la cinética de agregación del péptido A β y si hay cambios en la estructura secundaria del péptido.

Finalmente se espera poder evaluar *in vivo* si la administración continua del nanoconjugado NvO-D1/Ang2 puede mejorar parámetros conductuales en un modelo murino del a EA, así como disminuir la carga amiloide e inflamación en el cerebro.

Algunas de estas proyecciones ya se están trabajando en nuestro laboratorio.

Referencias

- Alzheimer's Disease International. (2015). World Alzheimer Report 2015.
- Abbott, N. J., Patabendige, A. A., Dolman, D. E., Yusof, S. R., & Begley, D. J. (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis*, 37(1), 13-25. doi: 10.1016/j.nbd.2009.07.030
- Adura, C., Guerrero, S., Salas, E., Medel, L., Riveros, A., Mena, J., . . . Kogan, M. J. (2013). Stable conjugates of peptides with gold nanorods for biomedical applications with reduced effects on cell viability. *ACS Appl Mater Interfaces*, 5(10), 4076-4085.
- Adura, C., Guerrero, S., Salas, E., Medel, L., Riveros, A., Mena, J., . . . Kogan, M. J. (2013). Stable conjugates of peptides with gold nanorods for biomedical applications with reduced effects on cell viability. *ACS Appl Mater Interfaces*, 5(10), 4076-4085. doi: 10.1021/am3028537
- Agyare, E. K., Jaruszewski, K. M., Curran, G. L., Rosenberg, J. T., Grant, S. C., Lowe, V. J., . . . Kandimalla, K. K. (2014). Engineering theranostic nanovehicles capable of targeting cerebrovascular amyloid deposits. *J Control Release*, 185, 121-129. doi: 10.1016/j.jconrel.2014.04.010
- Alzheimer_Association.
- Araya, E., Olmedo, I., Bastus, N. G., Guerrero, S., Puentes, V. F., Giralt, E., & Kogan, M. J. (2008). Gold Nanoparticles and Microwave Irradiation Inhibit Beta-Amyloid Amyloidogenesis. *Nanoscale Res. Lett.*, 3(11), 435-443. doi: 10.1007/s11671-008-9178-5
- Böckenhoff, A., Cramer, S., Wölte, P., Knieling, S., Wohlenberg, C., Gieselmann, V., . . . Matzner, U. (2014). Comparison of five peptide vectors for improved brain delivery of the lysosomal enzyme arylsulfatase A. *J. Neurosci.*, 34(9), 3122-3129.

Brambilla, D., Verpillot, R., De Kimpe, L., Taverna, M., Le Droumaguet, B., Nicolas, J., . . . Andrieux, K. (2010). Nanoparticles against Alzheimer's disease: PEG-PACA nanoparticles are able to link the abeta-peptide and influence its aggregation kinetic. *J Control Release*, *148*(1), e112-113. doi: 10.1016/j.jconrel.2010.07.084

Brambilla, D., Verpillot, R., Le Droumaguet, B., Nicolas, J., Taverna, M., Kona, J., . . . Andrieux, K. (2012). PEGylated nanoparticles bind to and alter amyloid-beta peptide conformation: toward engineering of functional nanomedicines for Alzheimer's disease. *ACS Nano*, *6*(7), 5897-5908. doi: 10.1021/nn300489k

Brambilla, D., Verpillot, R., Taverna, M., De Kimpe, L., Le Droumaguet, B., Nicolas, J., . . . Andrieux, K. (2010). New method based on capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection (CE-LIF) to monitor interaction between nanoparticles and the amyloid-beta peptide. *Anal Chem*, *82*(24), 10083-10089. doi: 10.1021/ac102045x

Bramblett, G. T., Goedert, M., Jakes, R., Merrick, S. E., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. Y. (1993). Abnormal tau phosphorylation at Ser396 in alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding. *Neuron*, *10*(6), 1089-1099. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90057-X](http://dx.doi.org/10.1016/0896-6273(93)90057-X)

Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, *77*(1), 71-94.

Cauda, V., Argyo, C., & Bein, T. (2010). Impact of different PEGylation patterns on the long-term bio-stability of colloidal mesoporous silica nanoparticles. *J. Mater. Chem.*, *20*(39), 8693-8699. doi: 10.1039/C0JM01390K

Corporación Alzheimer. from <http://www.corporacion3alzheimer.cl>

- Cummings, J. L., Morstorf, T., & Zhong, K. (2014). Alzheimer's disease drug-development pipeline: few candidates, frequent failures. *Alzheimer's Res. Ther.*, 6(4), 1-7. doi: 10.1186/alzrt269
- De Felice, F. G., Wu, D., Lambert, M. P., Fernandez, S. J., Velasco, P. T., Lacor, P. N., . . . Klein, W. L. (2008). Alzheimer's disease-type neuronal tau hyperphosphorylation induced by A β oligomers. *Neurobiol. Aging*, 29(9), 1334-1347. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.02.029>
- Demeule, M., Currie, J. C., Bertrand, Y., Che, C., Nguyen, T., Regina, A., . . . Beliveau, R. (2008). Involvement of the low-density lipoprotein receptor-related protein in the transcytosis of the brain delivery vector angiopep-2. *J Neurochem*, 106(4), 1534-1544. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05492.x
- Demeule, M., Lachowicz, J. E., Yang, G., Das, S., Ché, C., Tripathy, S., . . . Castaigne, J.-P. (2014). Utilization of the Angiopep platform to enable brain penetration of therapeutic mAbs or Antibody-Drug Conjugates for treatment of brain tumors. *Cancer Res*, 74, 2657.
- Demeule, M., Regina, A., Che, C., Poirier, J., Nguyen, T., Gabathuler, R., . . . Beliveau, R. (2008). Identification and design of peptides as a new drug delivery system for the brain. *J Pharmacol Exp Ther*, 324(3), 1064-1072. doi: 10.1124/jpet.107.131318
- Doane, T. L., Chuang, C. H., Hill, R. J., & Burda, C. (2012). Nanoparticle zeta -potentials. *Acc Chem Res*, 45(3), 317-326. doi: 10.1021/ar200113c
- Ewald, C. Y., & Li, C. (2012). *Caenorhabditis elegans* as a model organism to study APP function. *Exp Brain Res*, 217(3-4), 397-411. doi: 10.1007/s00221-011-2905-7
- Fay, D. S., Fluet, A., Johnson, C. J., & Link, C. D. (1998). In Vivo Aggregation of β -Amyloid Peptide Variants. *J Neurochem*, 71(4), 1616-1625.

- Fiala, M., Liu, Q. N., Sayre, J., Pop, V., Brahmandam, V., Graves, M. C., & Vinters, H. V. (2002). Cyclooxygenase-2-positive macrophages infiltrate the Alzheimer's disease brain and damage the blood-brain barrier. *Eur. J. Clin. Invest.*, *32*(5), 360-371. doi: 10.1046/j.1365-2362.2002.00994.x
- Filali, M., Lalonde, R., & Rivest, S. (2011). Anomalies in social behaviors and exploratory activities in an APPswe/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *Physiol Behav*, *104*(5), 880-885. doi: 10.1016/j.physbeh.2011.05.023
- Finder, V. H., & Glockshuber, R. (2007). Amyloid-beta aggregation. *Neurodegener Dis*, *4*(1), 13-27. doi: 10.1159/000100355
- Funke, S. A., Bartnik, D., Gluck, J. M., Piorkowska, K., Wiesehan, K., Weber, U., . . . Willbold, D. (2012). Development of a small D-enantiomeric Alzheimer's amyloid-beta binding peptide ligand for future in vivo imaging applications. *PLoS One*, *7*(7), e41457. doi: 10.1371/journal.pone.0041457
- Gandy, S., & DeKosky, S. T. (2013). Toward the Treatment and Prevention of Alzheimer's Disease: Rational Strategies and Recent Progress. *Annu Rev Med.*, *64*(1), 367-383. doi: 10.1146/annurev-med-092611-084441
- Groll, J., Amirgoulova, E. V., Ameringer, T., Heyes, C. D., Röcker, C., Nienhaus, G. U., & Möller, M. (2004). Biofunctionalized, ultrathin coatings of cross-linked star-shaped poly (ethylene oxide) allow reversible folding of immobilized proteins. *J Am Chem Soc*, *126*(13), 4234-4239.
- Guerrero, S., Araya, E., Fiedler, J. L., Arias, J. I., Adura, C., Albericio, F., . . . Kogan, M. J. (2010). Improving the brain delivery of gold nanoparticles by conjugation with an amphipathic peptide. *Nanomedicine (Lond)*, *5*(6), 897-913. doi: 10.2217/nnm.10.74

- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, *144*(5), 646-674.
- Harder, P., Grunze, M., Dahint, R., Whitesides, G. M., & Laibinis, P. E. (1998). Molecular conformation in oligo (ethylene glycol)-terminated self-assembled monolayers on gold and silver surfaces determines their ability to resist protein adsorption. *J. Phys. Chem. B*, *102*(2), 426-436.
- Hardy, J. A., & Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*, *256*(5054), 184-185. doi: 10.1126/science.1566067
- Harris, J. M. (1992). Introduction to biotechnical and biomedical applications of poly (ethylent glycol). *Poly (ethylene glycol) chemistry: Biotechnical and biomedical applications*. Plenum Press. New York, 1-29.
- Harrison, J. R., & Owen, M. J. (2016). Alzheimer's disease: the amyloid hypothesis on trial. *Br J Psychiatry*, *208*(1), 1-3. doi: 10.1192/bjp.bp.115.167569
- He, G., Luo, W., Li, P., Remmers, C., Netzer, W. J., Hendrick, J., . . . Greengard, P. (2010). Gamma-secretase activating protein is a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Nature*, *467*(7311), 95-98. doi: 10.1038/nature09325
- Huang, X., Peng, X., Wang, Y., Wang, Y., Shin, D. M., El-Sayed, M. A., & Nie, S. (2011). A reexamination of active and passive tumor targeting by using rod-shaped gold nanocrystals and covalently conjugated peptide ligands. *ACS Nano*, *5*(8), 6765-6765.
- Hultman, K., Strickland, S., & Norris, E. H. (2013). The APOE varepsilon4/varepsilon4 genotype potentiates vascular fibrin(ogen) deposition in amyloid-laden vessels in the brains of Alzheimer's

- disease patients. *J Cereb Blood Flow Metab*, 33(8), 1251-1258. doi: 10.1038/jcbfm.2013.76
- Jalbert, J. J., Daiello, L. A., & Lapane, K. L. (2008). Dementia of the Alzheimer type. *Epidemiol Rev*, 30, 15-34. doi: 10.1093/epirev/mxn008
- Kaech, S., & Banker, G. (2006). Culturing hippocampal neurons. *Nat Protoc*, 1(5), 2406-2415. doi: 10.1038/nprot.2006.356
- Kaletta, T., & Hengartner, M. O. (2006). Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 5(5), 387-399.
- Kelf, T. A., Sreenivasan, V. K., Sun, J., Kim, E. J., Goldys, E. M., & Zvyagin, A. V. (2010). Non-specific cellular uptake of surface-functionalized quantum dots. *Nanotechnology*, 21(28), 285105. doi: 10.1088/0957-4484/21/28/285105
- Kingshott, P., & Griesser, H. J. (1999). Surfaces that resist bioadhesion. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.*, 4(4), 403-412.
- Klein, W. L. (2013). Synaptotoxic amyloid-beta oligomers: a molecular basis for the cause, diagnosis, and treatment of Alzheimer's disease? *J Alzheimers Dis*, 33 Suppl 1, S49-65. doi: 10.3233/JAD-2012-129039
- Kobler, J., Moller, K., & Bein, T. (2008). Colloidal suspensions of functionalized mesoporous silica nanoparticles. *ACS Nano*, 2(4), 791-799. doi: 10.1021/nm700008s
- Kogan, M. J., Bastus, N. G., Amigo, R., Grillo-Bosch, D., Araya, E., Turiel, A., . . . Puentes, V. F. (2006). Nanoparticle-mediated local and remote manipulation of protein aggregation. *Nano Lett*, 6(1), 110-115.

- Kogan, M. J., Bastus, N. G., Amigo, R., Grillo-Bosch, D., Araya, E., Turiel, A., . . . Puentes, V. F. (2006). Nanoparticle-mediated local and remote manipulation of protein aggregation. *Nano Lett*, 6(1), 110-115. doi: 10.1021/nl0516862
- Lacor, P. N., Buniel, M. C., Chang, L., Fernandez, S. J., Gong, Y., Viola, K. L., . . . Klein, W. L. (2004). Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid beta oligomers. *J Neurosci*, 24(45), 10191-10200. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3432-04.2004
- LaFerla, F. M., & Green, K. N. (2012). Animal models of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(11). doi: 10.1101/cshperspect.a006320
- Lasagna-Reeves, C., Gonzalez-Romero, D., Barria, M. A., Olmedo, I., Clos, A., Sadagopa Ramanujam, V. M., . . . Soto, C. (2010). Bioaccumulation and toxicity of gold nanoparticles after repeated administration in mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 393(4), 649-655. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.02.046
- Lee, J. H., Lee, H. B., & Andrade, J. D. (1995). Blood compatibility of polyethylene oxide surfaces. *Prog. Polym. Sci.*, 20(6), 1043-1079.
- Lewis, J. A., & Fleming, J. T. (1995). Basic culture methods. *Methods in cell biology*, 48, 3-29.
- Li, S. D., & Huang, L. (2008). Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles. *Mol Pharm*, 5(4), 496-504. doi: 10.1021/mp800049w
- Liao, Y. H., Chang, Y. J., Yoshiike, Y., Chang, Y. C., & Chen, Y. R. (2012). Negatively charged gold nanoparticles inhibit Alzheimer's amyloid-beta fibrillization, induce fibril dissociation, and mitigate neurotoxicity. *Small*, 8(23), 3631-3639. doi: 10.1002/sml.201201068

- Link, C. D. (1995). Expression of human beta-amyloid peptide in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, *92*(20), 9368-9372.
- Link, S., & El-Sayed, M. A. (1999). Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem. B*, *103*(21), 4212-4217. doi: 10.1021/jp984796o
- Link, S., & El-Sayed, M. A. (2001). Spectroscopic determination of the melting energy of a gold nanorod. *J. Chem. Phys B*, *114*(5), 2362-2368.
- Link, S., & El-Sayed, M. A. (2003). Optical properties and ultrafast dynamics of metallic nanocrystals. *Annu Rev Phys Chem*, *54*, 331-366. doi: 10.1146/annurev.physchem.54.011002.103759
- Link, S., Mohamed, M. B., & El-Sayed, M. A. (1999). Simulation of the Optical Absorption Spectra of Gold Nanorods as a Function of Their Aspect Ratio and the Effect of the Medium Dielectric Constant. *J. Chem. Phys B*, *103*(16), 3073-3077. doi: 10.1021/jp990183f
- Liu, G., Men, P., Perry, G., & Smith, M. A. (2009). Metal chelators coupled with nanoparticles as potential therapeutic agents for Alzheimer's disease. *J Nanoneurosci*, *1*(1), 42-55.
- Liu, H., Pierre-Pierre, N., & Huo, Q. (2012). Dynamic light scattering for gold nanorod size characterization and study of nanorod-protein interactions. *Gold Bulletin*, *45*(4), 187-195. doi: 10.1007/s13404-012-0067-4
- MacQueen, A. (2007). Factors that Affect the Synthesis of Gold Nanorods: The.
- Minniti, A. N., Arrazola, M. S., Bravo-Zehnder, M., Ramos, F., Inestrosa, N. C., & Aldunate, R. (2015). The Protein Oxidation Repair Enzyme

Methionine Sulfoxide Reductase A Modulates A β Aggregation and Toxicity In Vivo. *Antioxid. Redox Signal.*, 22(1), 48-62.

Minniti, A. N., Rebolledo, D. L., Grez, P. M., Fadic, R., Aldunate, R., Volitakis, I., . . . Bush, A. I. (2009). Intracellular amyloid formation in muscle cells of A β -transgenic *Caenorhabditis elegans*: determinants and physiological role in copper detoxification. *Mol Neurodegener*, 4(1), 1.

Moghimi, S. M., Hunter, A. C., & Murray, J. C. (2001). Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol Rev*, 53(2), 283-318.

Montagne, A., Barnes, Samuel R., Sweeney, Melanie D., Halliday, Matthew R., Sagare, Abhay P., Zhao, Z., . . . Zlokovic, Berislav V. (2015). Blood-Brain Barrier Breakdown in the Aging Human Hippocampus. *Neuron*, 85(2), 296-302. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.032>

Mouchiroud, L., Molin, L., Dalliere, N., & Solari, F. (2010). Life span extension by resveratrol, rapamycin, and metformin: The promise of dietary restriction mimetics for an healthy aging. *Biofactors*, 36(5), 377-382. doi: 10.1002/biof.127

Movchan, T. G., Soboleva, I. V., Plotnikova, E. V., Shchekin, A. K., & Rusanov, A. I. (2012). Dynamic light scattering study of cetyltrimethylammonium bromide aqueous solutions. *Colloid Journal*, 74(2), 239-247. doi: 10.1134/s1061933x1202007x

Nguyen, T. M., Gigault, J., & Hackley, V. A. (2014). PEGylated gold nanorod separation based on aspect ratio: characterization by asymmetric-flow field flow fractionation with UV-Vis detection. *Anal Bioanal Chem*, 406(6), 1651-1659. doi: 10.1007/s00216-013-7318-y

- Nikoobakht, B., & El-Sayed, M. A. (2003). Preparation and growth mechanism of gold nanorods (NRs) using seed-mediated growth method. *Chem. Mater.*, *15*(10), 1957-1962.
- Ogris, M., Brunner, S., Schüller, S., Kircheis, R., & Wagner, E. (1999). PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. *Gene Ther.*, *6*(4), 595-605.
- Paciotti, G. F., Kingston, D. G. I., & Tamarkin, L. (2006). Colloidal gold nanoparticles: a novel nanoparticle platform for developing multifunctional tumor-targeted drug delivery vectors. *Drug Dev. Res.*, *67*(1), 47-54.
- Prades, R., Guerrero, S., Araya, E., Molina, C., Salas, E., Zurita, E., . . . Giralt, E. (2012). Delivery of gold nanoparticles to the brain by conjugation with a peptide that recognizes the transferrin receptor. *Biomaterials*, *33*(29), 7194-7205. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.06.063
- Pramod, P., Joseph, S. T., & Thomas, K. G. (2007). Preferential end functionalization of Au nanorods through electrostatic interactions. *J Am Chem Soc*, *129*(21), 6712-6713. doi: 10.1021/ja071536o
- Qian, X., Hamad, B., & Dias-Lalcaca, G. (2015). The Alzheimer disease market. *Nat Rev Drug Discov*, *14*(10), 675-676. doi: 10.1038/nrd4749
- Querfurth, H. W., & LaFerla, F. M. (2010). Alzheimer's disease. *N Engl J Med*, *362*(4), 329-344. doi: 10.1056/NEJMra0909142
- Rebolledo, D. L., Aldunate, R., Kohn, R., Neira, I., Minniti, A. N., & Inestrosa, N. C. (2011). Copper reduces A β oligomeric species and ameliorates neuromuscular synaptic defects in a *C. elegans* model of inclusion body myositis. *J. Neurosci.*, *31*(28), 10149-10158.

- Rinne, J. O., Brooks, D. J., Rossor, M. N., Fox, N. C., Bullock, R., Klunk, W. E., . . . Grundman, M. ¹¹C-PiB PET assessment of change in fibrillar amyloid- β load in patients with Alzheimer's disease treated with bapineuzumab: a phase 2, double-blind, placebo-controlled, ascending-dose study. *Lancet Neurol.*, 9(4), 363-372. doi: 10.1016/S1474-4422(10)70043-0
- Sabaté, R., & Estelrich, J. (2005). Stimulatory and inhibitory effects of alkyl bromide surfactants on β -amyloid fibrillogenesis. *Langmuir*, 21(15), 6944-6949.
- Sabaté, R., & Saupe, S. J. (2007). Thioflavin T fluorescence anisotropy: an alternative technique for the study of amyloid aggregation. *Biochem Biophys Res Commun*, 360(1), 135-138.
- Sadauskas, E., Danscher, G., Stoltenberg, M., Vogel, U., Larsen, A., & Wallin, H. (2009). Protracted elimination of gold nanoparticles from mouse liver. *Nanomedicine*, 5(2), 162-169. doi: 10.1016/j.nano.2008.11.002
- Sagare, A. P., Deane, R., & Zlokovic, B. V. (2012). Low-density lipoprotein receptor-related protein 1: a physiological $\text{A}\beta$ homeostatic mechanism with multiple therapeutic opportunities. *Pharmacol Ther*, 136(1), 94-105. doi: 10.1016/j.pharmthera.2012.07.008
- Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., . . . Seubert, P. (1999). Immunization with amyloid- β attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature*, 400(6740), 173-177.
- Sengillo, J. D., Winkler, E. A., Walker, C. T., Sullivan, J. S., Johnson, M., & Zlokovic, B. V. (2013). Deficiency in Mural Vascular Cells Coincides with Blood-Brain Barrier Disruption in Alzheimer's Disease. *Brain Pathology*, 23(3), 303-310. doi: 10.1111/bpa.12004

- Skaat, H., Corem-Slakmon, E., Grinberg, I., Last, D., Goetz, D., Mardor, Y., & Margel, S. (2013). Antibody-conjugated, dual-modal, near-infrared fluorescent iron oxide nanoparticles for anti-amyloidogenic activity and specific detection of amyloid-beta fibrils. *Int J Nanomedicine*, 8, 4063-4076. doi: 10.2147/IJN.S52833
- Soto, C., Sigurdsson, E. M., Morelli, L., Kumar, R. A., Castano, E. M., & Frangione, B. (1998). Beta-sheet breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis: implications for Alzheimer's therapy. *Nat Med*, 4(7), 822-826.
- Stiernagle, T. (2006). Maintenance of *C. elegans*, WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community. *WormBook*.
- Stolik, S., Delgado, J. A., Perez, A., & Anasagasti, L. (2000). Measurement of the penetration depths of red and near infrared light in human "ex vivo" tissues. *J Photochem Photobiol B*, 57(2-3), 90-93.
- Subtil, A., Hemar, A., & Dautry-Varsat, A. (1994). Rapid endocytosis of interleukin 2 receptors when clathrin-coated pit endocytosis is inhibited. *J. Cell Sci.*, 107(12), 3461-3468.
- Tjernberg, L. O., Naslund, J., Lindqvist, F., Johansson, J., Karlstrom, A. R., Thyberg, J., . . . Nordstedt, C. (1996). Arrest of beta-amyloid fibril formation by a pentapeptide ligand. *J Biol Chem*, 271(15), 8545-8548.
- Trojanowski, J. Q., Schuck, T., Schmidt, M. L., & Lee, V. M. (1989). Distribution of tau proteins in the normal human central and peripheral nervous system. *J Histochem Cytochem*, 37(2), 209-215.
- Velasco-Aguirre, C., Morales, F., Gallardo-Toledo, E., Guerrero, S., Giralt, E., Araya, E., & Kogan, M. J. (2015). Peptides and proteins used to enhance gold nanoparticle delivery to the brain: preclinical approaches. *Int J Nanomedicine*, 10, 4919-4936. doi: 10.2147/ijn.s82310

- Wang, S., Lu, W., Tovmachenko, O., Rai, U. S., Yu, H., & Ray, P. C. (2008). Challenge in understanding size and shape dependent toxicity of gold nanomaterials in human skin keratinocytes. *Chem. Phys. Lett.*, 463(1), 145-149.
- Wenk, G. L. (2003). Neuropathologic changes in Alzheimer's disease. *J Clin Psychiatry*, 64 Suppl 9, 7-10.
- Wiesehan, K., Stohr, J., Nagel-Steger, L., van Groen, T., Riesner, D., & Willbold, D. (2008). Inhibition of cytotoxicity and amyloid fibril formation by a D-amino acid peptide that specifically binds to Alzheimer's disease amyloid peptide. *Protein Eng Des Sel*, 21(4), 241-246. doi: 10.1093/protein/gzm054
- Xiao, K., Li, Y., Luo, J., Lee, J. S., Xiao, W., Gonik, A. M., . . . Lam, K. S. (2011). The effect of surface charge on in vivo biodistribution of PEG-oligocholic acid based micellar nanoparticles. *Biomaterials*, 32(13), 3435-3446. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.021
- Xue, D., Zhao, M., Wang, Y. J., Wang, L., Yang, Y., Wang, S. W., . . . Liu, R. T. (2012). A multifunctional peptide rescues memory deficits in Alzheimer's disease transgenic mice by inhibiting Abeta42-induced cytotoxicity and increasing microglial phagocytosis. *Neurobiol Dis*, 46(3), 701-709. doi: 10.1016/j.nbd.2012.03.013
- Yameen, B., Choi, W. I., Vilos, C., Swami, A., Shi, J., & Farokhzad, O. C. (2014). Insight into nanoparticle cellular uptake and intracellular targeting. *J Control Release*, 190, 485-499. doi: 10.1016/j.jconrel.2014.06.038
- Yochem, J., Tuck, S., Greenwald, I., & Han, M. (1999). A gp330/megalin-related protein is required in the major epidermis of *Caenorhabditis elegans* for completion of molting. *Development*, 126(3), 597-606.
- Zhang, J. Z. (2010). Biomedical applications of shape-controlled plasmonic nanostructures: a case study of hollow gold nanospheres for

photothermal ablation therapy of cancer. *J. Phys. Chem. Lett.*, 1(4), 686-695.

Zhao, W. Q., De Felice, F. G., Fernandez, S., Chen, H., Lambert, M. P., Quon, M. J., . . . Klein, W. L. (2008). Amyloid beta oligomers induce impairment of neuronal insulin receptors. *FASEB J*, 22(1), 246-260. doi: 10.1096/fj.06-7703com

Zlokovic, B. V., Deane, R., Sagare, A. P., Bell, R. D., & Winkler, E. A. (2010). Low-density lipoprotein receptor-related protein-1: a serial clearance homeostatic mechanism controlling Alzheimer's amyloid beta-peptide elimination from the brain. *J Neurochem*, 115(5), 1077-1089. doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.07002.x