

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**NANOVARILLAS DE ORO CON PROPIEDADES PLASMÓNICAS EN LA
SEGUNDA VENTANA BIOLÓGICA (NIR-II) PARA LA DESAGREGACIÓN DE
 β -AMILOIDE**

Tesis presentada en la Universidad de Chile para optar al grado de:

Doctora en Química

Elizabeth Nicole Cortés Adasme

Director de Tesis:
Dr. Marcelo J. Kogan

Santiago – Chile
Agosto 2024



INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata

ELIZABETH NICOLE CORTÉS ADASME

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Doctora en Química, en el examen público rendido el día

Directores de Tesis:

Dr. Marcelo J. Kogan

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Nicolás Yutronic (presidente)

Dra. Natalia Hassan

Dr. Paul Jara

Dr. Rodrigo Díaz

Con todo mi amor

A Diego

A mis Padres

A mi Hermana

A mis Sobrinos

A mi Familia

A Rockito...

BIOGRAFÍA DEL AUTOR

Elizabeth Nicole Cortés Adasme, nació el 4 de junio de 1993, en la ciudad de Antofagasta, Chile. Realizó sus estudios de enseñanza básica en la “Escuela Japón D-58” y su enseñanza media en el “Liceo Domingo Herrera Rivera B-13”.

En el año 2007 ingresa a la Facultad de Química de la Universidad Católica del Norte para estudiar la carrera de Licenciatura en Química, donde desarrollo su investigación en el área de Química Inorgánica, bajo la tutela del Dr. Jaime Llanos y co-tutela del Dr. Mauricio Vega. Su investigación se basó en la producción de nuevos sensores de temperatura en base a estannatos de tierras raras.

En el año 2020, es aceptada en el programada de Doctorado en Química de la Facultad de Química y Farmacia en la Universidad de Chile. El mismo año es receptora de la Beca ANID Doctorado Nacional la cual le permitió proceder con sus estudios. Su trabajo de tesis se llevó a cabo en el laboratorio de Nanobiotecnología y Nanotoxicología del profesor Marcelo Kogan quién también se convierte en su tutor. Su trabajo de tesis se enfocó en la síntesis de nanosistemas en base a oro para su potencial diagnóstico y terapia para la enfermedad de Alzheimer.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer al laboratorio de Nanobiotecnología y Nanotoxicología, de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas en donde fue realizada la presente tesis. A los proyectos FONDECYT 1211482, FONDAP 15130011 y a la Beca ANID Doctorado Nacional 21200403 que permitieron realizar este trabajo.

Agradezco a mi tutor de tesis, el Dr. Marcelo Kogan por su guía y apoyo constante durante todo este camino de desarrollo profesional y personal, especialmente por acogerme en su laboratorio y creer en mí. Además, quiero agradecer a los miembros de la comisión evaluadora, el Dr. Nicolás Yutronic, la Dra. Natalia Hassan, el Dr. Paul Jara y al Dr. Rodrigo Díaz por sus aportes, sugerencias y consejos que ayudaron significativamente en el desarrollo de esta tesis. A mi profesor de la Universidad Católica del Norte, Dr. Jaime Llanos por mostrarme lo entretenido de la ciencia y por su apoyo, consejo y guía, gracias a usted llegue a un laboratorio con increíbles personas.

A mis compañeros del NanoLab, gracias por todos sus consejos, apañes, discusiones y rizas, hicieron de esta tesis algo más que trabajo, llevaré siempre conmigo todos los recuerdos y alegrías. Dentro de este increíble grupo quiero mencionar a Karen, Anita, Orlando, Daniela María, Sofi, Yanay y Nachita por sus increíbles risas, por alegrarme los días y por esos viernes de JAJAS en el laboratorio. No puedo no mencionar a cuatro personas muy especiales, Sebastián, Pablo, Andreas y Renzo quienes durante mis años de tesis me hicieron reír y rabiarse casi en un mismo nivel, y que al mismo tiempo me aguataron y apoyaron en los momentos más estresantes de este camino, soy afortunada de no solo tenerlos

como compañeros y colegas sino también como amigos.

A mis amigos, Wendy, Kathy, Paula, Andrea, Cata, Gaby, Caro, Shio, Víctor, Javi, Benja y Feña por ser una fuente constante de alegría durante todos estos años que estuve lejos. Gracias por siempre considerarme y no olvidarse de mí jajajaja, su amistad fue fundamental estando lejos de casa. Quiero agradecer especialmente a mi amiga María, eres familia y fuiste un pilar fundamental en todo este proceso, gracias por creer, escucharme y siempre asombrarte por el trabajo que hacía. A Mauricio por incentivar me a seguir estudiando, a sus consejos, apoyo, pero sobre todo a su amistad.

A mi familia, a mi hermana Valeria por su apoyo constante, verte crecer me hace sentir muy orgullosa y a mi sobrinito Leandro por alegrarme la vida todos los días, cada avance es un logro gigante, tienes un pedacito de mi corazón y soy muy feliz siendo tu tía y madrina. A mis padres por su amor, apoyo y consejos en este viaje, gracias por enseñarme lo que es la perseverancia, el sacrificio y por animarme todos los días que estuve lejos, yo no sería la persona que soy ahora si no fuera por todo lo que ustedes me han entregado, han creído en mí desde el día uno y nunca me han soltado, los amo infinito. A ti Rockito, por acompañarme durante la mitad de mi vida, fuiste un compañero fiel, parte importante de mi familia y de mi vida, te extraño mucho.

Finalmente quiero agradecer al amor de mi vida, mi esposo Diego, eres mi roca, no podría haber llegado tan lejos si no fuera por tu apoyo y sacrificio, creíste en mí desde el primer día que dije que quería embarcarme en este loco viaje llamado doctorado y no dudaste en subirme conmigo, eres mi compañero de vida,

mi mejor amigo, quiero seguir teniendo las mejores aventuras contigo, donde sea que nos lleven. Gracias por los consejos, la paciencia, la contención y tu amor, por ayudarme a superarme, a no rendirme, y por siempre decir que yo podía con todo. Quiero seguir compartiendo logros y superando fracasos juntos, estar en nuestro hogar y ver crecer a nuestra familia, lo que sea, pero juntos.

INDICE DE CONTENIDO

BIOGRAFÍA DEL AUTOR.....	iv
AGRADECIMIENTOS	v
LISTA DE FIGURAS	xvi
LISTA DE TABLAS.....	xxiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xxiv
RESUMEN	xxv
ABSTRACT.....	xxviii
CAPITULO I: INTRODUCCIÓN, HIPOTESIS Y OBJETIVOS	xxx
1. INTRODUCCIÓN.....	xxxi
1.1 La Enfermedad de Alzheimer.....	xxxii
1.2. Causas de la Enfermedad de Alzheimer: Teoría de la cascada amiloide. xxxii	
1.3. Agregación del péptido β -amiloide.....	xxxvi
1.4 La Nanotecnología.....	xxxix
1.5 Nanopartículas de Oro.....	xl
1.6 Nanovarillas de Oro.....	xliii
1.7 Primera y Segunda Ventana Biológica.....	xlv
1.8 El Efecto Fototérmico.....	xlvii

1.9	Nanovarillas de Oro y sus propiedades fototérmicas para el tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer.....	xlix
1.10	Péptidos para la inhibición y desagregación de agregados de A β	li
HIPOTESIS		liv
OBJETIVOS.....		liv
	Objetivo General	liv
	Objetivos Específicos.....	liv
CAPITULO II: MATERIALES Y METODOS.....		lv
2.	Materiales.	lvi
2.1	Síntesis	lvi
2.1.1	Síntesis Nanovarillas de oro.....	lvi
2.1.2	PEGilación de Nanovarillas de oro.....	lviii
2.1.3	Funcionalización de NVOs-PEG con los péptidos D1 y/o D3.....	lix
2.1.4	Cuantificación de NVOs de oro por NanoSight (NTA).....	lx
2.2	Caracterización Fisicoquímica de los nanosistemas.....	lxi
2.2.1	Espectrofotometría de Absorción Molecular (UV-NIR).....	lxi
2.2.2	Dispersión Dinámica de la Luz (DLS).....	lxi
2.2.3	Potencial ζ	lxi
2.2.4	Microscopia Electrónica de Transmisión de Barrido (STEM).	lxii
2.2.5	Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM).	lxii

2.2.6	Microscopia Electrónica de Barrido (SEM).....	lxiii
2.2.7	Estimación del número de moléculas de péptido por NVOs mediante análisis de aminoácidos.....	lxiii
2.2.8	Espectroscopia RAMAN/SERS.	lxiv
2.3	Irradiación NIR.	lxiv
2.3.1	Irradiación de las NVOs para el estudio de eficiencia fototérmica.	lxiv
2.3.2	Estudio del efecto fototérmico sobre los sistemas NVOs-PEG-D1 y NVOs-PEG-D3 a dos potencias diferentes (135mW y 350mW).	lxvi
2.4	Estudio de la Inhibición y Desagregación del péptido A β ₁₋₄₂	lxvii
2.4.1	Inhibición del péptido A β ₁₋₄₂ en presencia de NVOs modificadas con péptidos D1 y/o D3.	lxvii
2.4.2	Desagregación del péptido A β ₁₋₄₂ en presencia de NVOs modificadas con péptidos D1 y/o D3.....	lxviii
2.4.3	Inhibición del péptido A β ₁₋₄₂ en presencia de NVO-modificadas con péptidos D1 y/o D3 e irradiando con láser de 1064 nm a 135mW y 350mW de potencia.	lxix
2.4.4	Desagregación del péptido A β ₁₋₄₂ en presencia de NVO-modificadas con péptidos D1 y/o D3 e irradiando con láser de 1064 nm a 135mW y 350mW de potencia.	lxx
2.4.5	Espectroscopia de Dicroísmo Circular (DC).	lxxi

CAPÍTULO III: RESULTADOS DE SÍNTESIS, FUNCIONALIZACIÓN Y

CARACTERIZACIÓN DE NANOVARILLAS DE OROlxxii

3.1 Determinación y caracterización de los parámetros relevantes para la síntesis de Nanovarillas de Oro (NVOs).lxxiii

3.1.1 Síntesis de Nanovarillas con variación en la concentración de hidroquinona y nitrato de plata para la obtención de plasmón en NIR-II.lxxiii

3.1.2 Síntesis de Nanovarillas con variación en el volumen de borohidruro de sodio (NaBH₄) para la obtención de plasmón en NIR-II..... lxxviii

3.2 Caracterización de Nanovarillas de Oro (NVOs) con los parámetros optimizados.....lxxix

3.2.1 Caracterización de Nanovarillas de Oro (NVOs) estabilizadas con SH-PEG-OMe y SH-PEG-COOH.....lxxxii

3.2.2 Caracterización de Nanovarillas de Oro (NVOs) funcionalizadas con los péptidos D1 y D3 para el reconocimiento de los agregados de A βlxxxv

3.3 Cuantificación de NVOs por análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA).lxxxix

3.4 Determinación de la concentración de péptido D1 y D3 por nanopartícula mediante análisis de aminoácidos.xc

3.5 Análisis RAMAN/SERS de la interacción de los péptidos D1 y D3 con las NVOs.xcii

3.5.1 Espectro SERS de NVOs-PEG.xciii

3.5.2 Espectro RAMAN de D1 (qshyrhispaqv).xciii

3.5.3	Espectro SERS de NVOs-PEG-D1.....	xciv
3.5.4	Espectro RAMAN de D3 (rprrlththnr).....	xcv
3.5.5	Espectro SERS de NVOs-PEG-D3.....	xcv
CAPÍTULO IV: ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES FOTOTÉRMICAS DE LAS NVOs.....		xcix
4.1	Propiedades Fototérmicas de las NVOs.....	c
4.1.1	Estudio del efecto fototérmico a diferentes potencias de láser sobre las NVOs-PEG.....	c
4.1.2	Estudio del efecto fototérmico a diferentes potencias de láser sobre las NVOs-PEG.....	ci
4.1.3	Estudio de estabilidad fototérmica de las nanopartículas. después de irradiación con láser a 1064 nm de los sistemas funcionalizados.....	cvi
4.1.4	Estudio de estabilidad fototérmica de las nanopartículas. después de irradiación con láser a 1064 nm de los sistemas funcionalizados.....	cvii
CAPÍTULO V: ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN Y DESAGREGACIÓN DE LOS AGREGADOS DE β-AMILOIDE CON Y SIN IRRADIAICÓN.....		cx
5.1	Formación de las especies solubles e insolubles del péptido A β	cxii
5.2	Evaluación de la Inhibición y Desagregación del péptido A β	cxii
5.2.1	Evaluación de la Inhibición y Desagregación del péptido A β a potencia de 135mW con los nanosistemas NVOs-PEG-D1 y NVOs-PEG-D3.....	cxii

5.2.2	Evaluación de la Inhibición y Desagregación del péptido A β a potencia de 350mW con los nanosistemas NVOs-PEG-D1 y NVOs-PEG-D3.	cxvi
5.3	Efecto de los nanosistemas irradiados y no irradiados sobre la estructura final del β -amiloide en los ensayos de Inhibición.	cxxi
5.4	Efecto de los nanosistemas irradiados y no irradiados sobre la estructura final del β -amiloide en los ensayos de Desagregación.	cxxv
CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN DE RESULTADOS, CONCLUSIONES Y PROYECCIONES.		cxxix
6.1	Discusión de Resultados.....	cxxx
6.1.1	Caracterización de los nanosistemas con bandas plasmónicas centradas en la región de la segunda ventana biológica.	cxxx
6.1.2	Propiedades fototérmicas.....	cxxxii
6.1.3	Efecto sobre la agregación del β -amiloide con y sin irradiación láser en segunda ventana biológica.	cxxxiv
6.1.4	Efecto de los nanosistemas irradiados y no irradiados sobre la estructura final del β -amiloide en los ensayos de Desagregación e Inhibición.	cxxxviii
7.	Conclusiones.	cxli
7.1	Objetivo I: Síntesis y caracterización de nanovarillas de oro con plasmón longitudinal centrado en NIR-II funcionalizados con el péptido D1 y D3.	cxli
7.2	Objetivo II: Estudio de las propiedades fototérmicas de las nanovarillas.	cxli

7.3	Objetivo III: Evaluar los resultados de la irradiación con luz infrarroja sobre los agregados solubles e insolubles de β -amiloide una vez unidas a las nanovarillas.....	cxli
7.4	Objetivo IV: Evaluar las interacciones de las nanopartículas con las especies solubles e insolubles luego de la irradiación en NIR-II.....	cxlii
8.	Proyecciones.....	cxliii
9.	Actividades Relevantes durante el Doctorado (2020-2024).....	cxliv
10.	Reconocimientos.....	cxlvi
11.	Publicaciones Derivadas de la Tesis.....	cxlvi
12.	Otras Participaciones en Publicaciones.....	cxlvi
13.	BIBLIOGRAFÍA.....	cxlviii
14.	ANEXOS.....	clviii
14.1	Caracterización de los nanosistemas de NVOs.....	clviii
14.1.1	Parámetro Modificado n°1: 900 μ L de AgNO ₃ (10mM) y 500 μ L de Hidroquinona (100mM).....	clviii
14.1.2	Parámetro Modificado n°2: 1000 μ L de AgNO ₃ (10mM) y 500 μ L de hidroquinona (100mM).....	clx
14.1.3	Parámetro Modificado n°3: 900 μ L de AgNO ₃ (10mM) y 400 μ L de hidroquinona (100mM).....	clxii
14.1.4	Análisis de Impurezas.....	clxiv

14.1.5 Espectros RAMAN/SERS de los péptidos libres y los nanosistemas estudiados.	clxv
14.2 Resumen del contenido de estructura secundaria del A β 1-42 para cada condición estudiada.	clxviii

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Comparación entre un cerebro sano (lado izquierdo) y un cerebro enfermo con Alzheimer (lado derecho) (Realizado en BioRender). xxxii
- Figura 2:** Procesamiento de la APP. A la izquierda se observa el proceso no amiloidogénico generando la proteína p3. A la derecha se aprecia la vía amiloidogénica la cual genera el péptido A β de 40 o 42 aminoácidos y su posterior agregación¹⁸ xxxv
- Figura 3:** Mecanismos patogénicos más conocidos de los agregados de A β que causan diferentes disfunciones y finalmente la apoptosis neuronal²³ xxxvi
- Figura 4: (A)** Secuencia de aminoácidos del péptido A β 1-42. **(B)** Representación de las etapas de agregación de los monómeros de A β 1-42 a random coils o fibras amiloides con conformación β -plegada vía intermedios metaestables oligoméricos (oligómeros pequeños y grandes y protofibras)²⁸ xxxvii
- Figura 5:** Imagen comparativas de la escalas macro y nano representadas por diferentes objetos, partículas y biomoléculas⁴³. xl
- Figura 6:** Esquema representativo de conjuntos y morfologías de diferentes nanopartículas de oro más comunes⁴⁷. xli
- Figura 7: A)** Esquema ilustrado de la resonancia plasmónica superficial localizada (RPSL)⁵⁰; **B)** Espectro de absorción de diferentes diámetros de NEs generados por la RPS⁵² xlii
- Figura 8: A)** Esquema ilustrado de la resonancia plasmonica superficial localizada (RPSL) de las NVOs longitudinal y transversal. **B)** Bandas de absorción plasmonica transversal y longitudinal de las NVOs respectivamente⁵⁴ xliv

Figura 9: A) Imagen TEM de dos tamaños de NVOs (largas en rojo y cortas en azul); B) Grafico de distribución largo v/s ancho-obtenidas de las imágenes TEM de ambos tipos de NVOs; C) Espectro de coeficiente de extinción de ambas NVOs ⁵⁷ .	xliv
Figura 10: A) Ilustración de la ventana de transparencia biológica (NIR-I y NIR-II) ⁴⁹ y B) Esquema de penetración de NIR-I y NIR-II junto a nanomateriales utilizados en NIR-II y sus aplicaciones biomédicas in vivo ⁶³ .	xlvi
Figura 11: Diferentes aplicaciones de las NPs de oro en diagnóstico y terapia biomédicas ⁶⁴ .	xlvii
Figura 12: Esquema descriptivo de principio de conversión luz-a-calor por nanoestructuras plasmonicas ⁶⁸ .	xlix
Figura 13: A) Imagen TEM del nanosistema NVOs-CLPFFD; B) Espectro de fluorescencia de muestras de A β -PIAA en presencia de NVOs-CLPFFD con y sin irradiación (808 nm a 450mW); C) Señal normalizada de intensidad de fluorescencia de muestras irradiadas de A β -PIAA en presencia de NVOs-CLPFFD ⁷³ .	l
Figura 14: Análisis de las propiedades amiloide de A β mediante microscopia electrónica en ausencia (A) y en presencia de D3 (B) ⁸⁷ .	liii
Figura 15: Síntesis de NVOs de oro por crecimiento de semilla modificado.	lvii
Figura 16: Proceso de PEGilación de las NVOs de oro.	lviii
Figura 17: Funcionalización de los NVOs-PEG con los péptidos D1 y D3 respectivamente.	lx
Figura 18: Esquema de cámara oscura para la irradiación de los diferentes	

controles.....	lxv
Figura 19: Preparación de oligómeros y fibras de A β ₁₋₄₂	lxix
Figura 20: Esquema ensayo Th-T para inhibición y desagregación de las NVOs con los respectivos péptidos.	lxx
Figura 21: Efecto del desplazamiento del plasmón a diferentes concentraciones de hidroquinona (HQ: 50-100-150 mM) y nitrato de plata (AgNO ₃ : 2-10 mM). Todo el resto de los parámetros se mantuvieron constantes.	lxxiv
Figura 22: Esquema general del proceso de A) oxidación de la hidroquinona y reducción del oro en solución y B) reacción global redox.....	lxxv
Figura 23: Estructura cristalina de AuNRs. A) Imagen HRTEM de una AuNR indicando los índices altos del plano {110}, B) Antiguo y nuevo modelo de la estructura cristalina de los AuNRs los cuales son consistentes con la imagen TEM de costado de un AuNR ⁹⁷	lxxvii
Figura 24: Efecto del desplazamiento del plasmón a diferentes cantidades de NaBH ₄ en la solución semilla. Todo el resto de los parámetros se mantuvieron constantes (AgNO ₃ 10mM e Hidroquinona 100 mM).....	lxxix
Figura 25: A) Espectro de absorbancia de NVOs-CTAB; B) Diámetro hidrodinámico en nm; C) Potencial ζ en mV; D-E) Imágenes TEM de NVOs-CTAB, escala de tamaño 100 y 50 nm respectivamente; F) Imagen SEM de NVOs-CTAB, escala de tamaño de 100 nm.....	lxxx
Figura 26: Histograma de distribución de tamaño de las NVOs. En rojo la distribución del largo, en azul el ancho y en verde la distribución de la relación de aspecto (largo/ancho) de las NPs.	lxxxii

Figura 27: A) Espectro de absorbancia en negro NVO-CTAB y en rojo NVO-PEG; B) Imagen TEM de NVO-PEG.....	lxxxiii
Figura 28: Distribución de tamaño determinada mediante DLS para NVO-PEG y su comparación con las NVO-CTAB.....	lxxxv
Figura 29: Distribución de carga determinada mediante potencial ζ para NVO-PEG (verde) y su comparación con las NVO-CTAB (rojo).	lxxxv
Figura 30: A) Espectro de absorbancia de NVO-CTAB (negro), NVO-PEG (rojo), NVO-PEG-D1 (azul) y NVO-PEG-D3 (magenta); B) Imagen TEM de NVO-PEG-D1 y C) NVO-PEG-D3.....	lxxxvii
Figura 31: Distribución de tamaño determinada mediante DLS para NVO-PEG y su comparación con las NVO-CTAB.....	lxxxviii
Figura 32: Distribución de carga determinada mediante potencial ζ para NVO-PEG (verde), NVO-PEG-D1 (azul), NVO-PEG-D3 (negro) y su comparación con las NVO-CTAB (rojo).	lxxxviii
Figura 33: Promedio FTLA de concentración/tamaño (SD= 35,6±3,1 nm).	lxxxix
Figura 34: Espectros RAMAN de los péptidos D1 (verde) y D3 (lila) y SERS de NVOs-PEG (azul), NVOs-PEG-D1 (negro) y NVOs-PEG-D3 (rojo) con sus señales más significativas.....	xcvii
Figura 35: Representación esquemática de la posible disposición de ambos péptidos sobre la superficie de las NVOs (rojo: D1; morado: D3).....	xcviii
Figura 36: Aumento de la temperatura de NVOs-PEG luego de irradiación NIR-II (1064nm) a diferentes potencias de láser (****P <0,0001) n=3.	ci
Figura 37: Aumento de la temperatura de NVOs-PEG-D1 (rojo) y NVOs-PEG-D3	

(azul) luego de irradiación NIR-II (1064nm) a una potencia de 135mW. En negro control de H₂O (**P <0,0001) n=3 (todos los estudios iniciaron desde 37°C). ciii

Figura 38: Aumento de la temperatura de NVOs-PEG (rojo), NVOs-PEG-D1 (azul) y NVOs-PEG-D3 (verde) luego de irradiación NIR-II (1064nm) a una potencia de 350mW. En negro control de H₂O (**P <0,0001) n=3 (todos los estudios iniciaron desde 34°C)..... ciii

Figura 39: Imagen infrarroja de: superior de izquierda a derecha NVOs sin irradiar, NVOs-PEG luego de irradiar 20 minutos a 135mW, NVOs sin PEG luego de irradiar 20 minutos a 135mW e inferior mismo orden NVOs sin irradiar, NVOs-PEG luego de irradiar 1 minuto a 350mW y NVOs sin PEG luego de irradiar 1 minuto a 350mW. cv

Figura 40: A-B) Curva del perfil fototérmico para ambas potencias de láser 135mW y 350mW respectivamente. **C-D)** Ciclos de On/Off para estabilidad fototérmica de ambas potencias de láser 135-350mW..... cvi

Figura 41: Espectro UV-Vis-NIR de NVOs-PEG-D1 y NVOs-PEG-D3 antes y después de irradiación a 1064nm. cviii

Figura 42: Imagen STEM y TEM de A) NVOs-PEG sin irradiar y B) NVOs-PEG irradiadas a 1064nm a 350mW..... cviii

Figura 43: Imágenes TEM de especies solubles de A β ₁₋₄₂ **A)** oligómeros, **B)** fibras de A β ₁₋₄₂. cxi

Figura 44: Esquema del estudio de inhibición sin irradiar y con irradiación láser de 1064nm..... cxiii

Figura 45: Ensayo de Thioflavina-T luego de 24 hora de incubación para las

siguientes especies solubles de $A\beta_{1-42}$, $A\beta_{1-42} + D1/D3$, $A\beta_{1-42} + NVOs-PEG$ y $A\beta_{1-42} + NVOs-PEG-D1/D3$ para inhibición a 135mW. Todos los sistemas fueron comparados con el control de $A\beta$ (**P= 0.0068; *P= 0.0306 one-way ANOVA diferencia con el control) (n=6)..... cxiv

Figura 46: Esquema del estudio de la desagregación sin irradiar y con irradiación láser a 1064nm. cxiv

Figura 47: Ensayo de Thioflavina-T luego de 24 hora de incubación para las siguientes especies solubles de $A\beta_{1-42}$, $A\beta_{1-42} + D1/D3$, $A\beta_{1-42} + NVOs-PEG$ y $A\beta_{1-42} + NVOs-PEG-D1/D3$ para desagregación a 135mW. Todos los sistemas fueron comparados con el control de $A\beta$. (**P= 0.0050; ***P= 0.0004; ****P= <0.0001 one-way ANOVA diferencia con el control) (n=6). cxv

Figura 48: Ensayo de Thioflavina-T luego de 24 hora de incubación para las siguientes especies solubles de $A\beta_{1-42}$, $A\beta_{1-42} + D1/D3$, $A\beta_{1-42} + NVOs-PEG$ y $A\beta_{1-42} + NVOs-PEG-D1/D3$ para inhibición a 350mW. (**P= 0.0050; ***P= 0.0004; ****P= <0.0001 one-way ANOVA diferencia con el control) (n=6)..... cxviii

Figura 49: Ensayo de Thioflavina-T luego de 24 hora de incubación para las siguientes especies solubles de $A\beta_{1-42}$, $A\beta_{1-42} + D1/D3$, $A\beta_{1-42} + NVOs-PEG$ y $A\beta_{1-42} + NVOs-PEG-D1/D3$ para desagregación a 350mW. (**P= 0.0050; ***P= 0.0004; ****P= <0.0001 one-way ANOVA diferencia con el control) (n=6). cxix

Figura 50: A) β -amiloide fibrilar **B)** β -amiloide irradiado, **C)** β -amiloide incubado con péptido D1 por 24hrs e irradiado, **D)** β -amiloide incubado con péptido D3 por 24hrs e irradiado, **E-F)** β -amiloide incubado con NVOs-PEG-D1 por 24hrs e irradiado y **G-H)** β -amiloide incubado con NVOs-PEG-D3 por 24hrs e irradiado. cxx

Figura 51: Gráfico de porcentajes de composición estructural del péptido A β en presencia y ausencia de los péptidos D1 y D3 y los nanosistemas a evaluar para el estudio de inhibición **A)** Sin irradiación y **B)** con irradiación a 350mW de potencia (comparación realizada v/s el A β control)..... cxxiii

Figura 52: Gráfico de porcentajes de composición estructural del péptido A β en presencia y ausencia de los péptidos D1 y D3 y los nanosistemas a evaluar para el estudio de desagregación **A)** Sin irradiación y **B)** Con irradiación a 350mW de potencia (comparación realizada v/s el A β control)..... cxxvi

Figura 53: **A)** espectro UV-Vis-NIR, **B)** STEM y **C)** histograma de tamaño de los NVOs obtenidos con los siguientes parámetros (900 μ L de AgNO₃ y 500 μ L de hidroquinona)..... clix

Figura 54: **A)** espectro UV-Vis-NIR, **B)** STEM y **C)** histograma de tamaño de los NVOs obtenidos con los siguientes parámetros (1000 μ L de AgNO₃ y 500 μ L de hidroquinona)..... clxi

Figura 55: **A)** espectro UV-Vis-NIR, **B)** STEM y **C)** histograma de tamaño de los NVO obtenidos con los siguientes parámetros (900 μ L de AgNO₃ y 400 μ L de hidroquinona)..... clxiii

Figura 56: **A)** Imagen TEM de nanovarillass y nanoesferas (flechas rojas) y **B)** histograma de tamaño de nanoesferas..... clxv

Figura 57: **A)** Espectro SERS de NVOs-PEG, **B)** Raman del péptido D1, **C)** Raman del péptido D3, **D)** SERS del sistema NVOs-PEG-D1 y **E)** SERS del sistema NVOs-PEG-D3. clxvii

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Resumen de parámetros modificados en la síntesis de NVOs	lxxviii
Tabla 2: Resumen de D_h y potenciales ζ de los nanosistemas sintetizados.	lxxxix
Tabla 3: Cuantificación de péptidos por análisis de aminoácidos.....	xcii
Tabla 4: Eficiencia fototérmica para diferentes potencias de láser para NVOs-PEG.	civ
Tabla 5: Diámetro hidrodinámica y potencial ζ de NVOs-PEG-D1 y NVOs-PEG-D3 antes y después de irradiar.....	cix
Tabla 6: Diámetro hidrodinámica (DLS) y potencial zeta ($p\zeta$) de sistemas de NVOs	clix
Tabla 7: Diámetro hidrodinámica (DLS) y potencial zeta ($p\zeta$) de los sistemas de NVOs.....	clxi
Tabla 8: Diámetro hidrodinámica (DLS) y potencial zeta ($p\zeta$) de las NVOs y NVOs- PEG.....	clxiii
Tabla 9: Asignación de señales RAMAN para los péptidos y SERS para los nanosistemas correspondientes (cm^{-1}).....	clxvii
Tabla 10: Contenido estructura secundaria para inhibición sin irradiación.	clxviii
Tabla 11: Contenido estructura secundaria para inhibición con irradiación a 350mW.	clxviii
Tabla 12: Contenido estructura secundaria para desagregación sin irradiación.	clxix
Tabla 13: Contenido estructura secundaria para desagregación con irradiación a 350mW.....	clxix

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Absorbancia
A β	β -amiloide
BHE	Barrera Hematoencefálica
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio
DC	Dicroísmo Circular
D _h	Diámetro hidrodinámico
DLS	Dispersión dinámica de la luz
EA	Enfermedad de Alzheimer
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
GNRs	Goldnanorods
GNPs	Goldnanoparticles
HFIP	1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol
HQ	Hidroquinona
IR	Irradiación
MEEM	mini-examen del estado mental
NEs	Nanoesferas
NIR	Infrarrojo Cercano
NPO	Nanopartículas de Oro
NPs	Nanopartículas
NTA	Análisis de Seguimiento de Nanopartículas
NVO	Nanovarillas
ONF	Ovillos Neurofibrilares
PDI	Índice de Polidispersidad
PEG	Polietilenglicol
PPA	Proteína Precursora Amiloide
RA	Relación de Aspecto
RC	Random Coil
RPS	Resonancia Plasmonica Superficial
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido
STEM	Microscopía Electrónica de Transmisión de Barrido
Sulfo-NHS	Sulfo-NHydroxysuccinimide
TEM	Microscopía Electrónica de Transmisión
TFT	Terapia Fototérmica
Th-T	Tioflavina T
T _{max}	Temperatura Máxima
T _{surr}	Temperatura Ambiente
UV-Vis-NIR	Espectrofotometría Ultravioleta Visible Infrarrojo Cercano
η_T	Eficiencia Fototérmica

RESUMEN

Una de las características distintivas de la enfermedad de Alzheimer (EA) es la agregación del péptido β -amiloide ($A\beta$). $A\beta$ se forma por la acción de las enzimas β -secretasa y γ -secretasa sobre la proteína precursora de amiloide y se asocia con la formación de oligómeros tóxicos, fibras amiloides y placas seniles, que se depositan en regiones del cerebro relacionadas con la memoria. Por tanto, el $A\beta$ se considera un biomarcador importante para el diagnóstico de la enfermedad, y sus especies solubles, como los oligómeros, y sus formas insolubles, como las fibras, se señalan como uno de los responsables de la muerte neuronal y el posterior deterioro cognitivo en la enfermedad.

Dado el importante papel de la agregación de $A\beta$, su desagregación e inhibición de la agregación para reducir su toxicidad representa una estrategia conveniente para una posible terapia contra la EA. En este contexto, las nanopartículas de oro (NPO) emergen como una herramienta prometedora para un posible diagnóstico y tratamiento de la EA. Esto se debe a sus propiedades fisicoquímicas, baja toxicidad y atractivas aplicaciones biológicas. Los NPO poseen propiedades como la resonancia de plasmón, que provoca la oscilación de los electrones libres cuando interactúan con la radiación electromagnética incidente. Esta propiedad puede ocurrir en el rango de longitud de onda visible al infrarrojo, región del espectro en la que la radiación puede penetrar los tejidos. En el caso de las nanovarillas de oro (NVO), esta resonancia de plasmón se puede desplazar a través de estas longitudes de onda simplemente modificando su tamaño. Esta ventaja les permite operar dentro de la primera y segunda ventana biológica (NIR-I, 700-950 nm o NIR-

II, 1000-1200 nm). La NIR-II es más adecuada para aplicaciones biológicas debido a su mayor profundidad de penetración en el tejido, menor fondo de autofluorescencia, menor dispersión de fotones y mayor exposición máxima permitida en comparación con NIR-I. Sin embargo, es necesario que estas NPO reconozcan específicamente estos agregados tóxicos. Por lo tanto, se han investigado diversas moléculas objetivo que reconocen específicamente los agregados tóxicos de A β . Estas moléculas se pueden funcionalizar en la superficie de las NPO para guiar el nanosistema hacia los objetivos. Entre estas moléculas de direccionamiento se encuentran los péptidos de tipo configuración D como los péptidos D1, que pueden reconocer y unirse predominantemente a agregados fibrilares, y los péptidos D3, que reconocen y se unen a agregados oligoméricos de A β . Además, estos péptidos son capaces de desagregar e inhibir la formación de estos agregados tóxicos.

En esta tesis, se sintetizaron y funcionalizaron NVOs con resonancia de plasmón en el rango NIR-II con polietilenglicol para impartir biocompatibilidad. Se realizó la conjugación con los péptidos D1 y/o D3 como moléculas de reconocimiento para crear un potencial sistema teranóstico para la EA, cuyo objetivo es también la inhibición y desagregación de agregados tóxicos de β -amiloide *in vitro* mediante efecto fototérmico. Las características fisicoquímicas de estos sistemas se determinaron mediante diversas técnicas como espectroscopía UV-Vis-NIR, DLS y potencial ζ , RAMAN/SERS entre otras, junto con la evaluación de la eficiencia de funcionalización de péptidos basada en la concentración de NVO. Los resultados mostraron una inhibición y un efecto de desagregación significativos de nuestros

nanosistemas sobre agregados de A β *in vitro* después de la irradiación con láser NIR-II (1064 nm), principalmente mediante ensayo de Tioflavina-T (Th-T).

ABSTRACT

One of the hallmarks of Alzheimer's disease (AD) is the aggregation of β -amyloid peptide ($A\beta$). $A\beta$ is formed by the action of β -secretase and γ -secretase enzymes on the amyloid precursor protein and is associated with the formation of toxic oligomers, amyloid fibers, and senile plaques, which deposit in brain regions related to memory. Therefore, $A\beta$ is considered an important biomarker for the diagnosis of the disease, and its soluble species such as oligomers and insoluble forms such as fibers are indicated as responsible for neuronal death and subsequent cognitive decline in the disease.

Given the significant role of $A\beta$ aggregation, its disaggregation and inhibition of aggregation to reduce its toxicity represent a convenient strategy for potential AD therapy. In this context, gold nanoparticles (GNPs) emerge as one promising tool for possible diagnosis and treatment of AD. This is due to their physicochemical properties, low toxicity, and attractive biological applications. GNPs possess properties such as plasmon resonance, which causes oscillation of free electrons when interacting with incident electromagnetic radiation. This property can occur in the visible to the infrared wavelength range, spectrum region in which radiation can penetrate tissues. In the case of gold nanorods (GNRs), this plasmon resonance can be tunable across these wavelengths simply by modifying their size. This advantage allows them to operate within the first and second biological windows (NIR-I, 700-950nm or NIR-II, 1000-1200nm). The NIR-II window is more suitable for biological applications due to its greater tissue penetration depth, lower autofluorescence background, reduced photon scattering, and higher maximum

permissible exposure compared to NIR-I. However, it is necessary for these nanoparticles to specifically recognize these toxic aggregates. Therefore, various targeting molecules that specifically recognize A β toxic aggregates have been investigated. These molecules can be functionalized on the surface of these nanoparticles to guide the nanosystem towards the targets. Among these targeting molecules of D-type configurations as D1 peptides, which can recognize and bind predominantly to fibrillar aggregates, and D3 peptides, which recognize and bind to oligomeric aggregates of A β . Additionally, these peptides are capable of disaggregating and inhibiting the formation of these toxic aggregates.

In this thesis GNRs with plasmon resonance in the NIR-II range were synthesized and functionalized with polyethylene glycol to impart biocompatibility. Functionalization with D1 and/or D3 peptides as targeting molecules was performed to create a potential theragnostic system for Alzheimer's disease, aiming at the inhibition and disaggregation of β -amyloid toxic aggregates *in vitro* via photothermal effect. The physicochemical characteristics of these systems were characterized using various techniques like UV-Vis-NIR spectroscopy, DLS and ζ -potential, RAMAN/SERS, NTA among others, along with the evaluation of peptide functionalization efficiency based on nanorod concentration. The results showed inhibition and even better disaggregation effect of our nanosystems over A β aggregates *in vitro* after NIR-II laser irradiation (1064 nm) seeing mainly by thioflavin T essay (Th-T).

CAPITULO I: INTRODUCCIÓN, HIPOTESIS Y OBJETIVOS

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La Enfermedad de Alzheimer.

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la forma más común de demencia alcanzando entre un 50%-60% en la población sobre los 65 años y entre un 30 a 40% en menores de 65 años. Con respecto a los costos, se estima que anualmente la demencia tiene un costo mundial de \$1B de dólares, lo que equivale al 1% del PIB¹. Por otro lado, estimaciones recientes muestran que la EA afecta a alrededor de 33 millones de personas en el mundo al 2019, número que seguirá aumentando en los siguientes años^{2,3}.

Esta enfermedad causa un deterioro lento del sistema nervioso, caracterizado principalmente por una pérdida progresiva de la memoria, que resulta en dificultades tales como poder recordar nombres, el no poder realizar actividades cotidianas, dificultad para no comprender el significado de lo que se ve e incluso llegar a ignorar la enfermedad en su totalidad (Afasia, Apraxia, Agnosia y Anosognosia)^{4,5}. El Alzheimer no solo afecta a la persona enferma, sino que también a su círculo más cercano tanto física, psicológica como económicamente¹, en Chile, por ejemplo, se estima que el costo anual por persona con demencia es de aproximadamente \$11.500 dólares⁶.

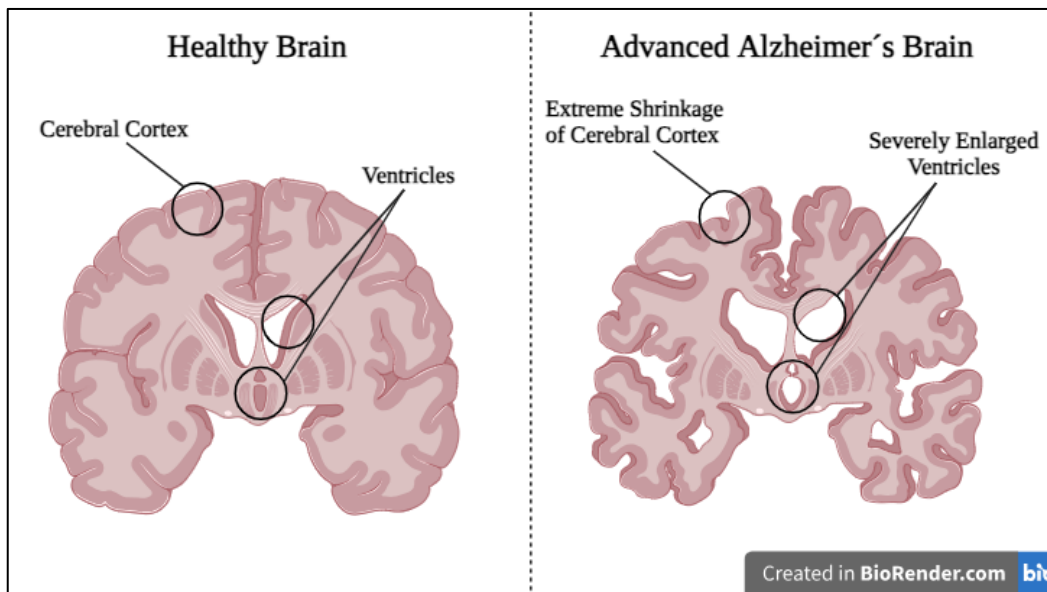


Figura 1: Comparación entre un cerebro sano (lado izquierdo) y un cerebro enfermo con Alzheimer (lado derecho) (Realizado en BioRender).

1.2. Causas de la Enfermedad de Alzheimer: Teoría de la cascada amiloide.

La EA es la forma de demencia más común y se caracteriza por un deterioro cognitivo progresivo que puede ser vinculado a la reducción significativa del volumen del cerebro en comparación a un cerebro sano (**Figura 1**). Esta atrofia resulta de la degeneración en la sinapsis y la muerte neuronal, especialmente en el hipocampo, región que juega un rol fundamental en la memoria y en la orientación espacial, síntomas característicos de la EA, causando así un déficit cognitivo y mental en las personas que sufren de esta enfermedad^{5,7,8}.

Los marcadores patológicos más importantes de esta enfermedad fueron descubiertos de manera *postmortem* en pacientes con EA. Estos consisten en la deposición extracelular de placas seniles formadas por agregados insolubles de β -amiloide ($A\beta$), péptido que consiste en entre 39-43 aminoácidos. Los mencionados

agregados pueden interrumpir la homeostasis del calcio (Ca^{2+}) e inducir muerte neuronal y puede estimular la inflamación de la microglía sobreestimando la liberación de $\text{IL-1}\beta$ que puede conllevar a diversos problemas como a la neuroinflamación crónica o al estrés oxidativo de estas⁹, y a la acumulación intracelular de ovillos neurofibrilares (ONF) debido a una hiperfosforilación de la proteína tau. Esto último conlleva a que la neurona pierda la capacidad de estabilizar los microtúbulos provocando por consiguiente el deterioro de los axones neuronales teniendo como consecuencia una pérdida progresiva de las funciones neuronales^{3,9-13}. El diagnóstico *premortem* de la enfermedad de Alzheimer se realiza usualmente luego de la aparición de síntomas asociados a la enfermedad mediante las aplicaciones de pruebas de deterioro cognitivo como el mini-examen del estado mental (MEEM) o la escala de evaluación de la EA (ADAS)³. Sin embargo, el diagnóstico exacto de la enfermedad en etapas tempranas es todo un desafío y el diagnóstico definitivo de ésta requiere de un examen y análisis *postmortem* mediante cortes histopatológicos del cerebro para la detección de estas placas y de los ovillos neurofibrilares.

En 1906 esta enfermedad fue descrita y estudiada por el Dr. Aloisius Alzheimer, neuropatólogo alemán, pero no fue hasta 1984 que Glenner y Wong aislaron agregados de $\text{A}\beta$ en pacientes con EA y plantearon que la acumulación de este péptido era la principal causa del Alzheimer^{14,15}. El péptido β -amiloide se forma por la escisión de la proteína precursora amiloide (PPA), proteína que normalmente existe en la membrana plasmática de las células y que se expresa en abundancia en el cerebro pero que es rápidamente metabolizada⁸. Esta proteína puede ser

procesada por diferentes enzimas, denominadas α -, β -, y γ -secretasas, por dos vías (**Fig.2**). La vía no amiloidogénica consiste en la ruptura de la APP, en primer lugar, por la α -secretasa produciendo un fragmento N-terminal denominado PPA α y un C-terminal en la membrana de 83 aminoácidos (C83). Este fragmento es luego procesado por la γ -secretasa generando un fragmento extracelular soluble denominado p3, un péptido que contiene entre 24 o 26 aminoácidos que es luego secretado al medio extracelular. Esta escisión es formada dentro de la región A β , impidiendo así la formación de las especies amiloidogénicas. Por otro lado, la vía amiloidogénica es iniciada por la β -secretasa produciendo una escisión en el aminoácido 99 del C-terminal (C99), subsecuentemente la γ -secretasa hidroliza la APP entre los residuos de aminoácidos 38 y 43 transmembranales liberando así el péptido A β extracelularmente^{8,12,15-18}. Alrededor de un 90% de los residuos de A β corresponden a residuos de 40 aminoácidos (A β_{40}), mientras que el 10% restante corresponden a 42 aminoácidos (A β_{42}). Este residuo es más hidrofóbico debido a la extensión de dos aminoácidos extras en el C-terminal, la alanina y la isoleucina (AI), volviéndola más propensa a la auto agregación y, en consecuencia, a la formación de sus agregados tóxicos^{14,15,19}.

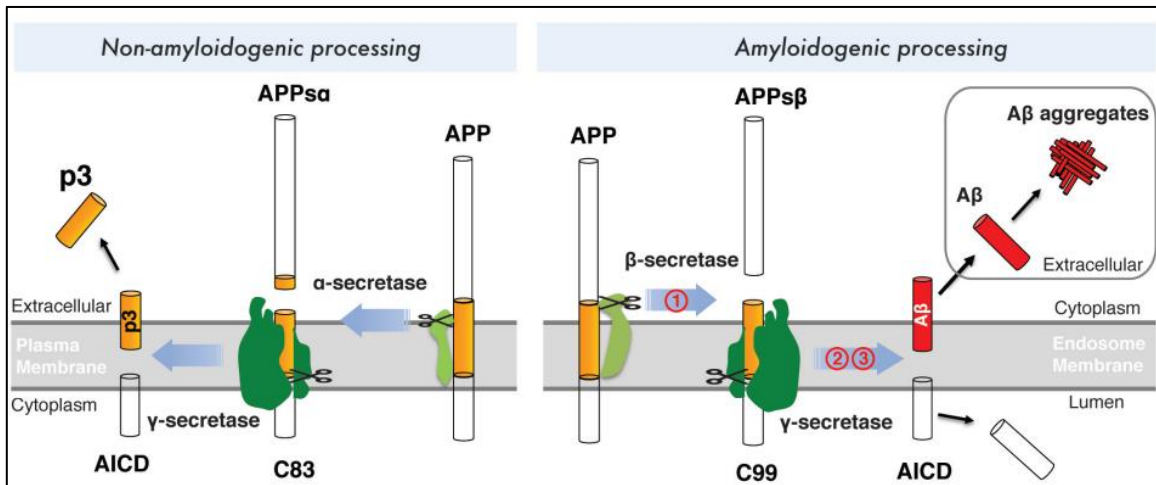


Figura 2: Procesamiento de la APP. A la izquierda se observa el proceso no amiloidogénico generando la proteína p3. A la derecha se aprecia la vía amiloidogénica la cual genera el péptido A β de 40 o 42 aminoácidos y su posterior agregación¹⁸.

En su forma monomérica el péptido A β es inocuo e incluso en diversos estudios se ha establecido que, bajo condiciones fisiológicas normales, el A β puede regular funciones sinápticas e incluso puede poseer propiedades antimicrobianas^{20,21}, por otro lado, bajo condiciones patológicas la producción del β -amiloide agregándose, generando oligómeros, protofibras y fibras conformaciones ricas en estructuras β -plegadas altamente neurotóxicas capaces de producir daño neuronal^{21,22}. Estos agregados interactúan tanto con las neuronas como con las células gliales produciendo estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, desregulación de la homeostasis del Ca²⁺, disfunción de la sinapsis neuronal, suprimiendo los canales de la membrana o afectando sus mecanismos de transporte y selectividad, llevando finalmente a la muerte neuronal^{21,23} (**Figura 3**).

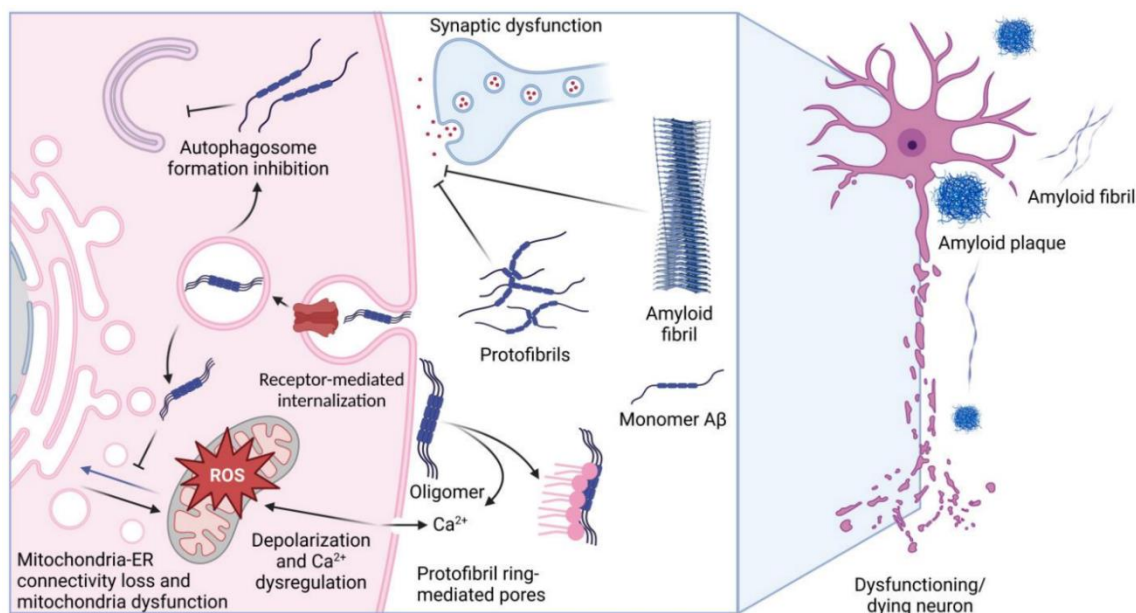


Figura 3: Mecanismos patogénicos más conocidos de los agregados de A β que causan diferentes disfunciones y finalmente la apoptosis neuronal ²³.

1.3. Agregación del péptido β -amiloide.

Se entiende que el mal plegamiento de proteínas amiloides puede conducir a formar agregados insolubles que se depositan en espacios extracelulares en enfermedades denominadas amiloidogénicas, algunas de estas enfermedades más fatales incluyen la enfermedad de Parkinson, Huntington y Alzheimer^{24,25}. La agregación del péptido β -amiloide por la vía amiloidogénica en fibras amiloides es debido a este mal plegamiento, lo que trae como consecuencia que estas proteínas no funcionen correctamente y produzcan los problemas de neurotoxicidad antes mencionados²⁶⁻²⁸.

Las etapas de agregación del β -amiloide antes de llegar a la etapa final, que es la formación de placas seniles, comienza por la fragmentación de la proteína APP mediante la vía amiloidogénica, los monómeros formados interaccionan entre

si formando diversos núcleos de agregación como dímeros, trímeros, oligómeros, aumentando así la conformación β -plegada. A su vez estos funcionan como nuevas especies de nucleación que a través de interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrogeno forman protofibras y estas a su vez se auto ensamblan por medio de una fase de elongación formando fibras maduras de A β (**Figura 4**) y finalmente, estas se depositan en el lecho neuronal junto a otras proteínas que quedan atrapadas en ellas, formando las denominadas placas seniles²⁸⁻³¹.

Actualmente existen tres enfoques principales dirigidos al tratamiento y prevención de la EA, estos consisten en la inhibición, desagregación y eliminación de los agregados tóxicos de A β .

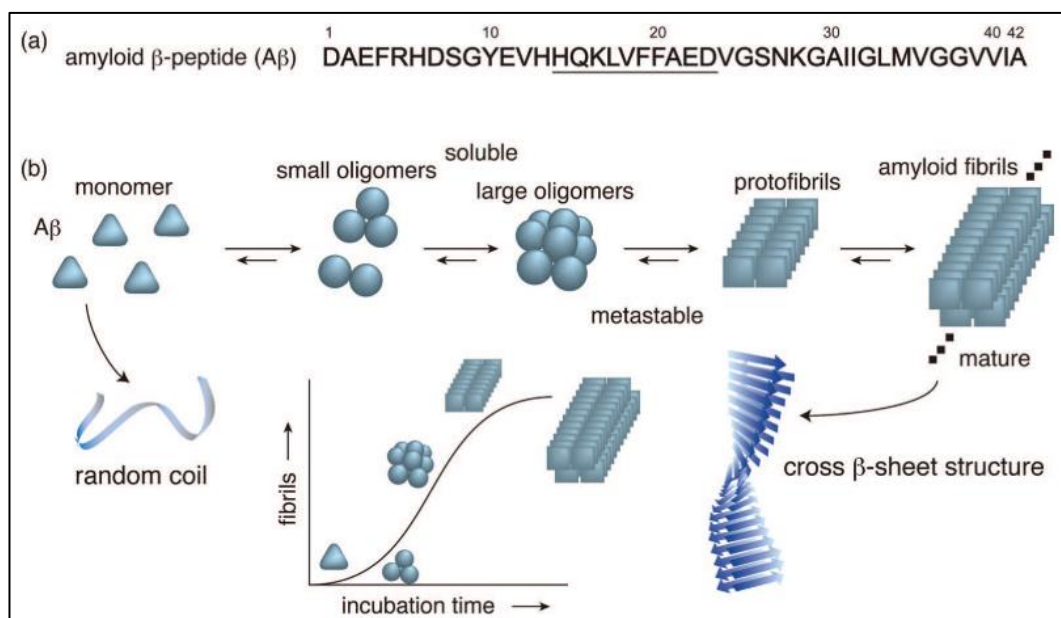


Figura 4: (A) Secuencia de aminoácidos del péptido A β 1-42. (B) Representación de las etapas de agregación de los monómeros de A β 1-42 a *random coils* o fibras amiloides con conformación β -plegada vía intermedios metaestables oligoméricos (oligómeros pequeños y grandes y protofibras

28.

A la fecha se han desarrollado diversas estrategias terapéuticas contra agregados del péptido A β que se encuentran en diferentes fases de ensayos clínicos. Por ejemplo, inhibidores de la β -secretasa^{32,33}, vacunas³⁴, potenciadoras de α -secretasa^{35,36}, y una variedad de medicamentos aprobados por la FDA³⁶⁻⁴⁰. Estas terapias no han podido obtener resultados clínicos satisfactorios debido a su baja efectividad, a efectos tóxicos de las mismas o debido a la baja eficiencia de direccionamiento y por la presencia de la barrera hematoencefálica (BHE), la cual se encuentra rodeando el sistema nervioso central e impide el transporte adecuado de los fármacos hacia el mismo resultando en una baja en la concentración terapéutica en el cerebro. En cuanto a los tratamientos aprobados por la FDA estos tienen el problema de tener efectos secundarios peligrosos y ser administrados vía oral o intravenosa lo que implicaría que deberían ser administrado en altas dosis o en periodos largos de tiempo para producir el efecto deseado. Adicionalmente, estos tratamientos son administrados en etapas avanzadas de la enfermedad o en periodos en que ya hay un daño irreversible.

Es por ello por lo que la búsqueda por nuevas terapias y herramientas de diagnóstico que permitan aumentar la eficiencia en las concentraciones de fármacos en el cerebro, produzcan el menor daño adverso, sean poco invasivos, puedan ser de bajo costo y que tengan como blanco específico el proceso de agregación y los agregados tóxicos del β -amiloide se vuelven cada vez más necesarias y promisorias en la actualidad.

1.4 La Nanotecnología.

La nanotecnología ha alcanzado un avanzado nivel en su investigación. Es uno de los campos de mayor crecimiento con amplias aplicaciones en diversos sectores como son la salud y medicina, la industria cosmética, ciencia de materiales y alimentos, y alimentos entre otros⁴¹. Las nanopartículas (NPs) pueden ser definidas como partículas sólidas, coloidales con tamaños que van en el rango de 10 nm a 300 nm. Sin embargo, los comités internacionales reducen el rango de estas NPs de entre 1 nm a 100 nm (**Figura 5**). Estas nanopartículas poseen propiedades muy diferentes del material *bulk* o de tamaño macro. Estos nano materiales poseen una alta relación volumen-superficie lo que le otorga una alta sensibilidad a la naturaleza dieléctrica del entorno que las rodea. Es por ello por lo que cambios en su entorno como la modificación de su superficie, solventes, o agregación de partículas resultan en alteraciones en sus propiedades electrónicas superficiales⁴². Dentro de estas propiedades se incluyen las eléctricas, físicas, y ópticas características lo que hace a estos materiales prometedores para un amplio rango de aplicaciones biomédicas, como son la imagenología celular, el diagnóstico molecular y la terapia dirigida, los cuales dependen fundamentalmente de su estructura, composición y forma^{41,43-45}.

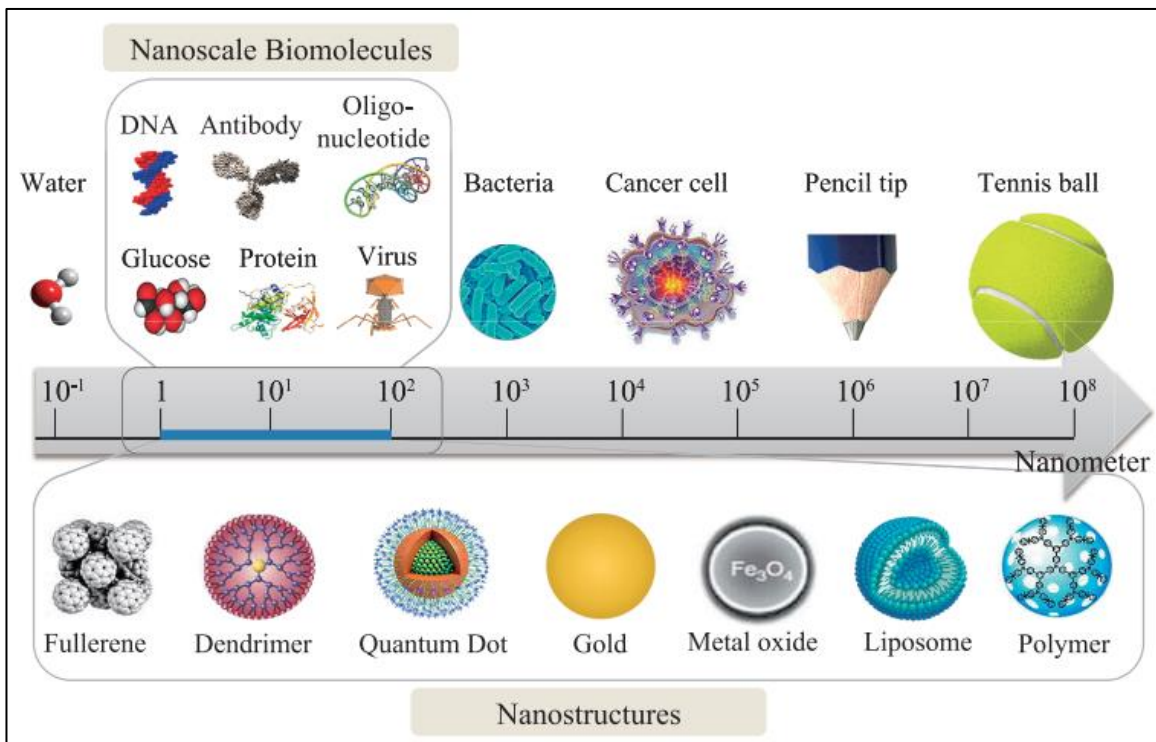


Figura 5: Imagen comparativas de la escalas macro y nano representadas por diferentes objetos, partículas y biomoléculas⁴³.

1.5 Nanopartículas de Oro.

Las nanopartículas (NPs) de metales nobles, especialmente las de oro (NPOs), han sido exploradas intensamente por la comunidad científica debido a sus particulares propiedades. La naturaleza “noble” de estas nanopartículas comparadas con otras, por ejemplo, las de hierro, níquel o cobalto, así como también su baja toxicidad las hace candidatas atractivas para aplicaciones ambientales y biológicas⁴⁶. Como se mencionó anteriormente la modificación de la morfología de estas NPs influye en cambios en sus propiedades. La morfología más utilizada para el estudio en aplicaciones biomédicas son las esferas, pero el estudio de NPs anisotrópicas para terapia y diagnóstico de diversas enfermedades

han aumentado en el último tiempo. Entre ellas se encuentran las nanovarillas (NVO), nanoprismas, nanoestrellas y nanojaulas entre otras, debido a sus diferentes propiedades en comparación a las nanoesferas (NEs) ^{46,47} (**Figura 6**). Estas NPs de oro tienen propiedades únicas, como características ópticas y electrónicas dependientes del tamaño y forma, una alta relación superficie/volumen, como se mencionó anteriormente, y una superficie que puede ser fácilmente modificada con ligandos que contengan diversos grupos funcionales como tioles, fosfinas y aminas, las cuales exhiben afinidad por la superficie del oro⁴⁸.

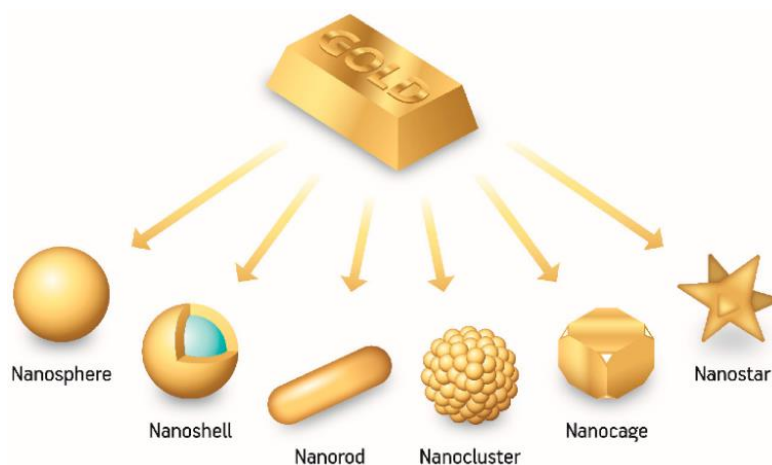


Figura 6: Esquema representativo de conjuntos y morfologías de diferentes nanopartículas de oro más comunes⁴⁷.

Las propiedades únicas de estas NPs son causadas por la llamada resonancia de plasmón superficial (RPS). Cuando estos nanomateriales son irradiados por un campo electromagnético, la oscilación de los electrones de conducción de las NPs metálicas estarán en fase con el campo incidente (**Figura 7**), y a una determinada frecuencia, el campo electromagnético puede estar en resonancia con la oscilación de los electrones de conducción. Esto conducirá a un

aumento significativo en la absorción de la luz incidente resultando en el fenómeno de RPS⁴⁹⁻⁵¹. En las NEs por ejemplo, se observa una banda de absorción característica en la región visible del espectro (aproximadamente 520 nm **Figura 7b**), la cual puede ser desplazada hasta aproximadamente 600 nm, al aumentar el diámetro de estas, sin perder el rango bajo los 100 nm⁵². Debido a que la frecuencia de la onda electromagnética incidente a 520 nm se encuentra en resonancia con la oscilación de la nube electrónica de los electrones de conducción a la misma longitud de onda, es que se observa el tono rojizo de las NEs en solución.

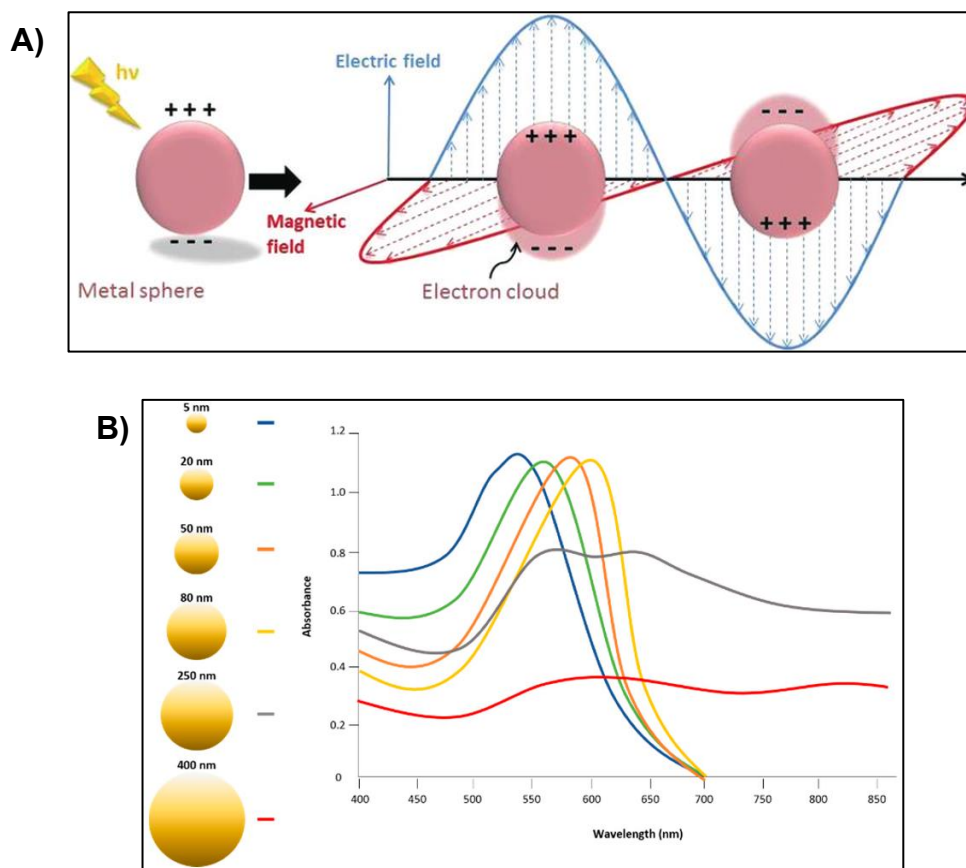


Figura 7: A) Esquema ilustrado de la resonancia plasmónica superficial localizada (RPSL)⁵⁰; **B)** Espectro de absorción de diferentes diámetros de NEs generados por la RPS⁵².

Comparado a otros nanomateriales, las propiedades plasmónicas de estas NPs de metales nobles sobresalen por sobre otros nanomateriales. Las propiedades ópticas de las NPs de oro que incluyen una gran absorción, dispersión, y mejora de campo, permiten un amplio rango de aplicaciones asociados a opto-señales o señales químicas mejoradas para imagen y sensores⁵³. Debido a la RPS de estas NPs de oro, las cuales tienen una alta eficiencia de conversión de luz-a-calor, estas han sido consideradas tanto como agentes fototérmicos y fotosensibilizadores aumentando así el ya amplio abanico de posibles usos en terapias biomedicas⁵².

1.6 Nanovarillas de Oro.

En las nanopartículas anisotrópicas, como las NVOs, es posible observar más de una banda de absorción. En el espectro UV/Vis-NIR de las NVOs se presentan dos máximos característicos. El primero, llamado banda de resonancia plasmónica superficial transversal, la cual se encuentra localizada entre los 520 nm y se origina por la oscilación de los electrones a lo largo del ancho de la NVOs. El segundo máximo es debido a la banda de resonancia plasmónica superficial longitudinal y es debido a la oscilación de la nube electrónica a lo largo de la nanovarillas, apareciendo a una longitud de onda mayor^{46,51} (**Figura 8**).

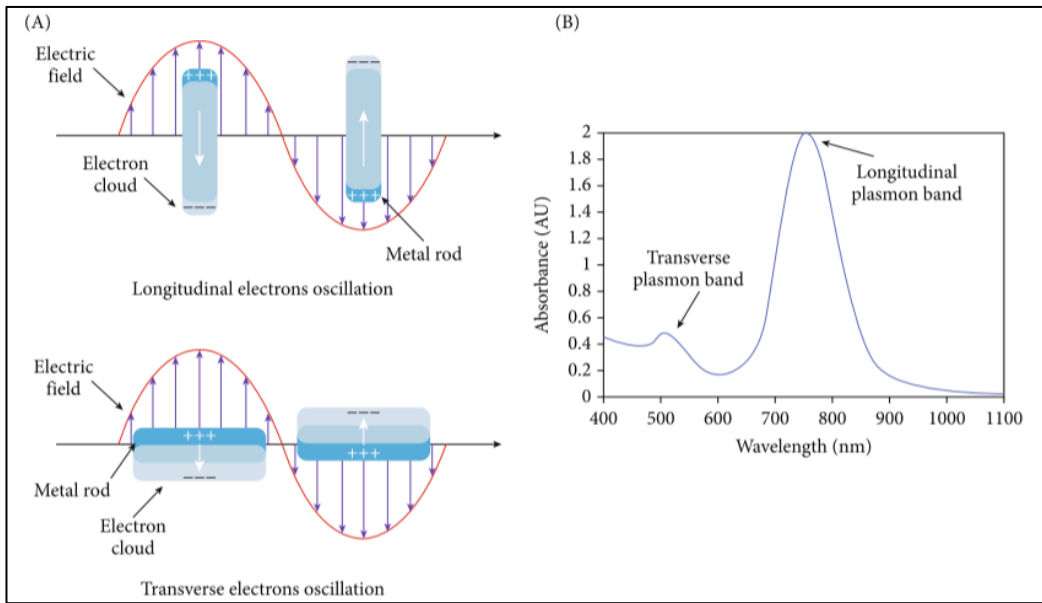


Figura 8: A) Esquema ilustrado de la resonancia plasmonica superficial localizada (RPSL) de las NVOs longitudinal y transversal. **B)** Bandas de absorción plasmonica transversal y longitudinal de las NVOs respectivamente⁵⁴.

Adicionalmente, las nanobarras ofrecen la posibilidad de ajustar la banda RPS longitudinal en un amplio rango que va desde el visible a la región del infrarrojo por modificación en sus dimensiones (**Figura 9**), es decir al modificar la relación de aspecto (RA: largo/ancho) de estas NVOs ^{46,55} . El controlar el tamaño y la morfología de las NPS de oro hace posible ajustar la posición espectral de la longitud de onda de máxima absorberancia y por ende ajustarla a la “ventana óptica” de tejidos biológicos ^{56,57} .

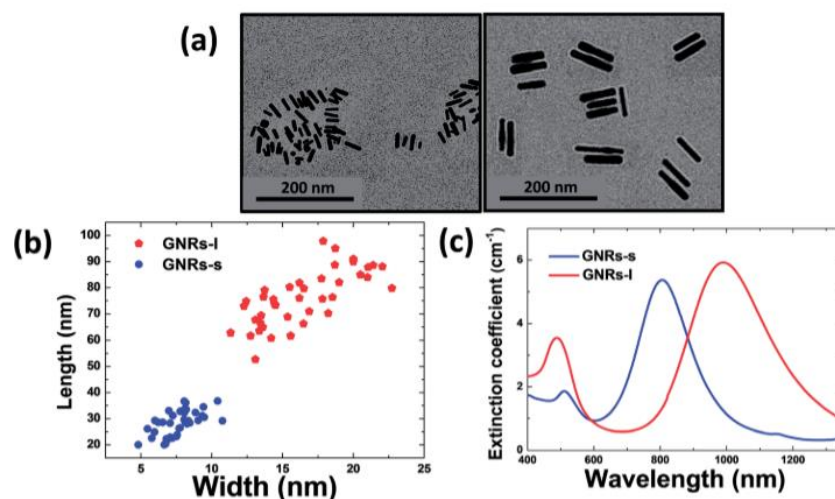


Figura 9: **A)** Imagen TEM de dos tamaños de NVOs (largas en rojo y cortas en azul); **B)** Grafico de distribución largo v/s ancho-obtenidas de las imágenes TEM de ambos tipos de NVOs; **C)** Espectro de coeficiente de extinción de ambas NVOs⁵⁷.

1.7 Primera y Segunda Ventana Biológica.

Una de las aplicaciones de estas nanopartículas, aprovechando sus propiedades plasmonicas, es su uso en la primera y segunda ventana biológica (NIR-I y NIR-II, respectivamente). La primera ventana se ha utilizado para resolver problemas biomédicos básicos, como la interacción dinámica entre moléculas de fármacos y células tumorales, el transporte y mecanismo de moléculas en particular que influyen el comportamiento de tumores u otras moléculas objetivos. Particularmente, la imagen de fluorescencia NIR, la cual se beneficia de una baja absorción de tejido, dispersión y autofluorescencia en la ventana NIR, es favorable para imágenes *in vivo* con una alta relación señal-ruido (SBR)⁵⁸. Sin embargo, la limitación de la imagen de fluorescencia sub-800 nm, como su poca profundidad de penetración y un solapamiento no deseable con la autofluorescencia, reducen las potenciales aplicaciones de estas nanopartículas a nivel clínico⁵⁹.

Por otro lado, se ha demostrado que la radiación electromagnética en la segunda ventana biológica o NIR-II, la cual tiene un rango de 1000-1300 nm, es más apropiada para aplicaciones biológicas debido a su mayor profundidad de penetración de tejido, menor fondo de autofluorescencia, menor dispersión de fotones reducida y mayor valor de exposición máxima permitida (EMP)⁶⁰⁻⁶² (**Figura 10**).

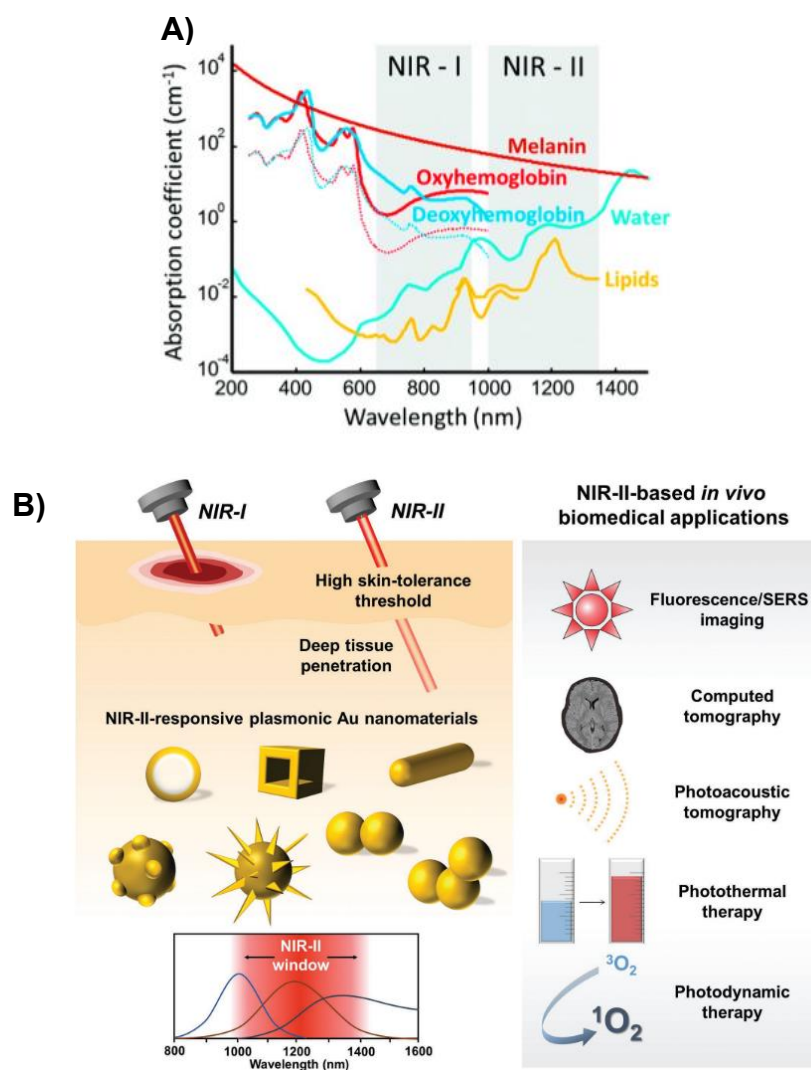


Figura 10: **A)** Ilustración de la ventana de transparencia biológica (NIR-I y NIR-II)⁴⁹ y **B)** Esquema de penetración de NIR-I y NIR-II junto a nanomateriales utilizados en NIR-II y sus aplicaciones biomédicas in vivo⁶³.

1.8 El Efecto Fototérmico.

En varios estudios se han reportado la funcionalización de las NPOs para aplicaciones en diferentes campos como en biología celular o molecular, microbiología, inmunobiológica y fisiología. La funcionalización de estas NPs con anticuerpos y enzimas la hacen útiles para aplicaciones como fototermólisis de células cancerígenas o de microorganismos infecciosos, la producción de medicamentos de administración dirigida, la bio-imagen y la terapia fototérmica (TFT), entre otras (**Figura 11**)⁶⁴.

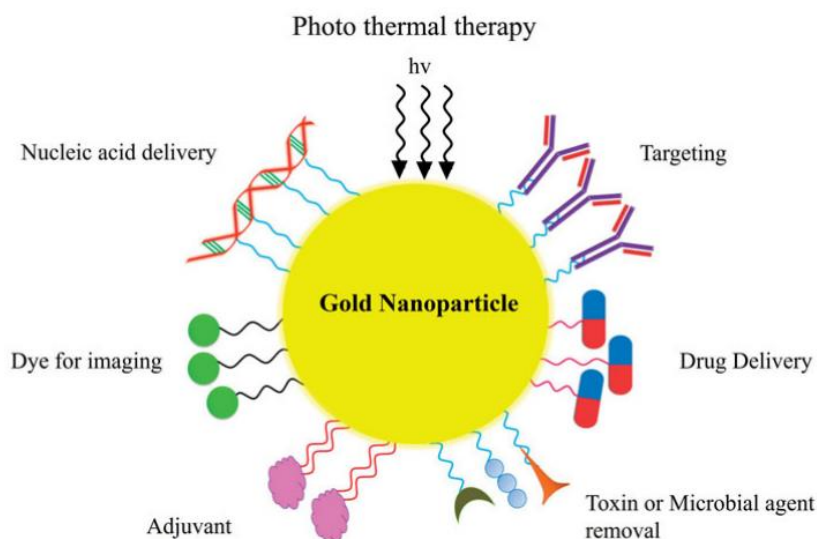


Figura 11: Diferentes aplicaciones de las NPs de oro en diagnóstico y terapia biomédicas⁶⁴.

Las NPs de oro son especialmente útiles para la TFT debido a que pueden dar un gran efecto de calentamiento al ser irradiadas con láser⁴⁵. Las NPOs son especialmente utilizables no solo para bioimagen sino también para este tipo de terapia (TFT) tanto *in vitro* e *in vivo*^{45,65}. No obstante, la mayoría de estos estudios

se enfocan en la primera ventana biológica (NIR-I) utilizando excitación laser de unos 800 nm ya que las nanovarillas de oro cortas, con su banda RPS a ~800 nm, pueden ser fácilmente sintetizadas⁵⁵. Sin embargo, gracias a su capacidad de desplazamiento del plasmón al modificar su relación de aspecto, como se mencionó anteriormente, es posible correr el plasmón de absorción de estas NVOs hacia la segunda ventana biológica y así aprovechar sus ventajas por sobre la primera ventana en el tratamiento fototérmico en tejido biológico^{63,66}.

El efecto fototérmico de estas NPs se debe a su plasmón de resonancia superficial. Al foto-excitar los electrones de conducción, los cuales oscilan en la superficie de las nanoestructuras de oro, resulta en un calentamiento no equilibrado. La excitación electrónica inicial es seguida por una relajación en un tiempo de sub-picosegundos por dispersión electrón-electrón el cual resulta en un rápido aumento en la temperatura superficial del metal. Este aumento de calor es seguido por un enfriamiento de regreso al equilibrio por intercambio energético entre los electrones y los fonones de la red. En los primeros cientos de picosegundos después de la excitación, la red se enfría *vía* acoplamiento fonón-fonón resultando en la disipación del calor al medio que rodea la nanoestructura **(Figura 12)** ^{67,68}.

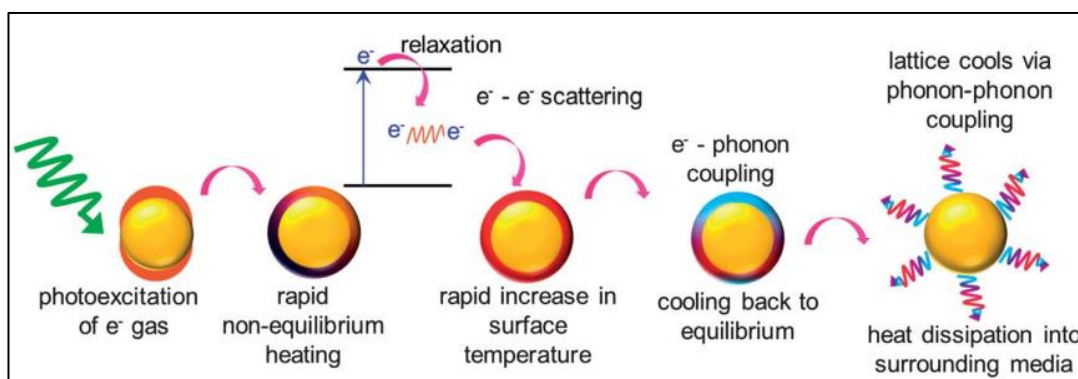


Figura 12: Esquema descriptivo de principio de conversión luz-a-calor por nanoestructuras plasmonicas⁶⁸.

1.9 Nanovarillas de Oro y sus propiedades fototérmicas para el tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer.

Como se mencionó anteriormente la deposición o el mal plegado del péptido A β resulta en la formación de agregados tóxicos del péptido por lo que su desagregación e inhibición de la agregación para reducir su toxicidad representa una estrategia para una potencial terapia del Alzheimer^{69,70}.

Actualmente, la terapia fototérmica con nanopartículas es utilizada ampliamente como estrategia poco invasiva y no toxica contra diversos tipos de cáncer⁷¹. Con respecto a la EA, se han utilizado diversas estrategias para su tratamiento como fármacos ya aprobados por la FDA o en proceso de estudio que apuntan a diversas etapas de la enfermedad pero que hasta el momento solo logran retrasar la enfermedad y amortiguar sus síntomas⁷². La ablación fototérmica de los agregados tóxicos de β -amiloide resulta en un enfoque alternativo para la terapia contra la EA. La hipertermia local puede desarmar los depósitos del amiloide, por ejemplo, por medio de interferencia en su crecimiento⁶⁹. El NIR-I ha sido el más

estudiado últimamente para el uso en esta terapia con resultados prometedores^{56,70,73}, como por ejemplo los descritos por Adura y col⁷³. Ellos irradiaron agregados amiloidogénicos intermedios prefibrilares (A β -PIAA) luego de ser incubados con NVOs de oro en primera ventana obteniendo una disminución de la intensidad de fluorescencia, luego de realizado el ensayo de Th-T, indicando una baja en la formación de agregados fibrilares del péptido A β (**Figura 13**). Por otro lado, debido a sus desventajas, como su baja penetración de tejido y a la alta exposición de este durante la irradiación es que NIR-II aparece como una alternativa para superar estos problemas ya que posee una alta penetración en el tejido, bajo *scattering* de fotones y una mayor exposición máxima permitida indicando de esta manera que la segunda ventana es más adecuada para ser utilizada en contextos biológicos que la primera ventana.

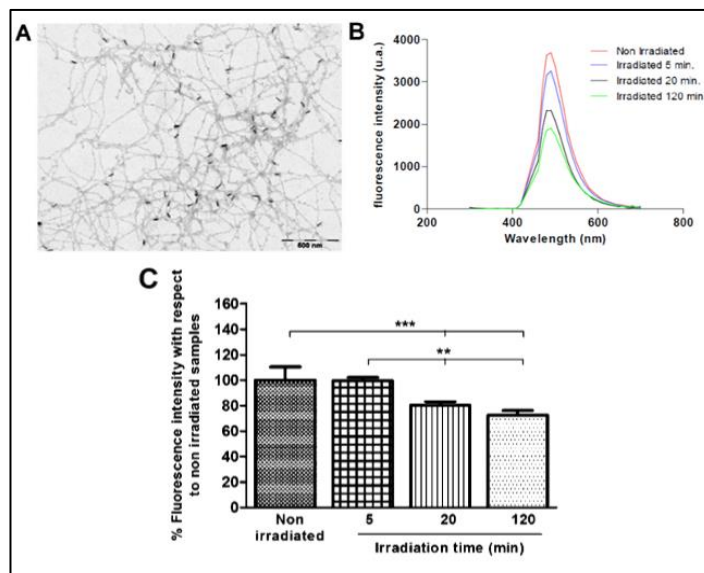


Figura 13: **A)** Imagen TEM del nanosistema NVOs-CLPFFD; **B)** Espectro de fluorescencia de muestras de A β -PIAA en presencia de NVOs-CLPFFD con y sin irradiación (808 nm a 450mW); **C)** Señal normalizada de intensidad de fluorescencia de muestras irradiadas de A β -PIAA en presencia de NVOs-CLPFFD⁷³.

Adicionalmente, se ha observado que la irradiación en NIR-II puede penetrar hasta bajo el cuero cabelludo y cráneo⁷⁴ generando una bio ventana efectiva y probablemente más valiosa para el tratamiento de la EA que en NIR-I⁷⁵. Es en este contexto que las NVOs de oro adquieren mayor protagonismo gracias a la posibilidad de modular su plasmón longitudinal hacia longitudes de onda mayores, es decir modular su plasmón en NIR-II y de esta manera aprovechar sus propiedades fototérmicas para la inhibición y desagregación de agregados tóxicos de β -amiloide.

1.10 Péptidos para la inhibición y desagregación de agregados de A β .

Diferentes péptidos se han utilizado para nanopartículas de oro para el direccionamiento o *targeting* de agregados de β -amiloide. Por ejemplo, Martins y colaboradores utilizaron apolipoproteína E3 (ApoE3)⁷⁶, Bastus y col. sintetizaron el péptido H-Cys-Leu-Pro-Phe-Phe-AspNH₂ (Cys-PEP) como detector de A β ⁷⁷, Morales-Zavala y col. utilizaron el péptido CLPFFD^{78 79} y Jara-Guajardo junto a su grupo sintetizaron nanobarras de oro y las conjugaron con péptidos tipo “D”⁸⁰.

Los péptidos de la llamada familia “D” contienen D-aminoácidos lo que les confiere estabilidad frente a proteasas endógenas, siendo más resistentes a la degradación in vivo, y presentando menos efectos inmunogénicos, en comparación con péptidos L-aminoácidos⁸¹. Por ejemplo, el péptido D1 (qshyrhispaqv)^{3,11} se une selectivamente a fibras amiloides de A β ₁₋₄₂, promoviendo también una inhibición de la agregación de este último^{11,82}. Kogan y colaboradores

funcionalizaron AuNRs con PEG, para su estabilización y con el péptido D1 para la detección de agregados de β -amiloide como también para reducir su agregación y su toxicidad (in vitro y ex vivo)⁸⁰.

Li y colaboradores, mediante terapia fototérmica y utilizando dos inhibidores de $A\beta$, lograron desagregar agregados de $A\beta$ mediante irradiación NIR ⁷⁰. Martins y colaboradores reportaron una reducción en la agregación de $A\beta$ en un 60%, más importante aún, la irradiación con NIR-I (570 nm) resultó en una desagregación fototérmica de los agregados $A\beta$ ⁷⁶.

Otro péptido que se une selectivamente a agregados oligoméricos de $A\beta_{1-42}$ es el denominado D3 (rprtrlhthnr). Este péptido puede reducir la agregación de fibrillas, eliminar oligómeros $A\beta$ y transformar las fibrillas preformadas en agregados no amiloidogénicos y no tóxicos ⁸³. También se ha demostrado que el D3 tiene una preferencia por oligómeros $A\beta_{1-42}$ en lugar de fibrillas o monómeros ⁸⁴. Van Groen y colaboradores observaron también la efectividad del péptido de reducir el tamaño y número de depósitos de $A\beta$ en el hipocampo ^{85,86}. Funke y colaboradores demostraron, in vivo, la eficiencia del péptido D3 ante agregados solubles de $A\beta$, en donde pudieron indicar la eliminación de estos agregados (**Figura 14**) ⁸⁷.

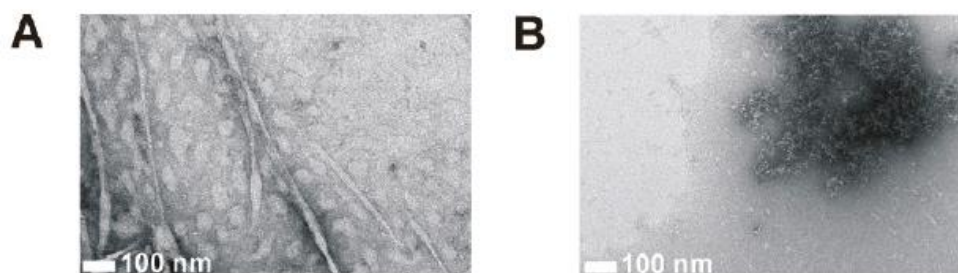


Figura 14: Análisis de las propiedades amiloide de A β mediante microscopía electrónica en ausencia **(A)** y en presencia de D3 **(B)** ⁸⁷.

Por lo expuesto anteriormente se entiende que las nanopartículas de oro han sido utilizadas ampliamente en la detección y tratamiento de diversas enfermedades debido a sus propiedades ya mencionadas, a su biocompatibilidad y baja toxicidad. En el caso de los agregados tóxicos de A β , es de vital importancia crear un sistema teranóstico eficiente en base a estas nanopartículas. En el caso de las nanovarillas la principal limitación es crear NVOs con una relación de aspecto (largo/ancho) de 6 para que estén dentro de las limitaciones para ser utilizados *in vitro* e *in vivo* y, de esta manera obtener un plasmón que absorba en la segunda ventana biológica (NIR-II), que además sea funcionalizado con un péptido que reconozca agregados tóxicos de A β e inhiba o desagreguen estos mismos.

De esta manera, en esta tesis se propone la síntesis de nanovarillas de oro para ser utilizados en NIR-II, aprovechando así sus ventajas por sobre el NIR-I, y posteriormente funcionalizarlas con los péptidos tipo D1 y D3 para dirigirlos selectivamente a los agregados del β -amiloide y posteriormente, mediante irradiación con láser NIR-II se producir la desagregación e inhibición del amiloides. De esta manera, se podrá avanzar en el desarrollo de una potencial terapia teranóstico para la enfermedad de Alzheimer.

HIPOTESIS

Nanovarillas con plasmones centrados en la segunda ventana biológica (NIR-II) funcionalizadas con los péptidos D1 o D3, se unen selectivamente a oligómeros y fibras de β -amiloide, respectivamente, permitiendo así la inhibición y/o desagregación de estas últimas mediante irradiación con luz infrarroja (NIR-II).

OBJETIVOS

Objetivo General

Desarrollar nanosistemas basados en nanovarillas de oro funcionalizadas con péptidos específicos para detectar y desagregar o inhibir la formación de agregados tóxicos de β -amiloide mediante la irradiación con láser en segunda ventana biológica.

Objetivos Específicos

- i. Sintetizar y caracterizar nanovarillas de oro con plasmones longitudinal centrados en NIR-II funcionalizados con los péptidos D1 y D3.
- ii. Estudiar las propiedades fototérmicas de las nanovarillas de oro funcionalizadas.
- iii. Evaluar los resultados de la irradiación con luz infrarroja sobre los agregados solubles e insolubles de β -amiloide una vez unidas a las nanovarillas.
- iv. Evaluar las interacciones de las nanopartículas con las especies solubles e insolubles luego de la irradiación en NIR-II.

CAPITULO II: MATERIALES Y METODOS

2. Materiales.

Los reactivos ácido tetracloroaurico (HAuCl_4), Bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), borhidruro de sodio (NaBH_4), nitrato de plata (AgNO_3), Thioflavina T (Th-T), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), Sulfo-NHydroxysuccinimide (Sulfo-NHS), fueron adquirido en Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA). Los reactivos 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (HFIP) fue adquirido en Merk (Darmstadt, Alemania). Los reactivos HS-PEG-OMe y HS-PEG-COOH se adquirieron en JenKem Technology (Texas, USA).

El péptido A β fue adquirido de r-Peptide (Georgia, USA) y los péptidos D1 y D3 fueron obtenidos por la Dr. Fanny Guzmán y su equipo “*Acuapeptide Synthesis*” en el centro de investigación Núcleo de Biotecnología de Curauma, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.

2.1 Síntesis

2.1.1 Síntesis Nanovarillas de oro.

Se estudio la influencia que tienen sobre el desplazamiento del plasmón de las nanobarras el cambio en determinados parámetros durante la síntesis, como fue el volumen de AgNO_3 (900-1000 μL), Hidroquinona (400-500 μL) y semillas (280-360-400 μL) manteniendo el resto de los parámetros fijos: HAuCl_4 , NaBH_4 y CTAB. Por otro lado, también se estudió el cambio que generan las diferentes concentraciones de hidroquinona (50-100-150 mM) y AgNO_3 (0.18-0.87 mM final). Por ende, las nanovarillas los protocolos de síntesis fueron sistematizados como se

puede observar en la **figura 15** mediante el método mediado por semilla modificado y a una temperatura de 27°C en baño de agua ⁸⁸.

En primer lugar, se adicionaron en un vial 4.915 µL de CTAB (0.1 M) como agente estabilizante y 85 µL de HAuCl₄ (29.4 mM) como precursor de las semillas de oro y se agitó la mezcla por 5 minutos. Pasado el tiempo se adicionó a la mezcla 400 µL de una solución de NaBH₄/NaOH (10 mM/0.01 M) frío y se agitó por 30 minutos. Una vez obtenidas las semillas se procedió a realizar la solución de crecimiento: en ella se mezclaron en un frasco 170 µL de HAuCl₄ (29.4 mM) y 9.83 µL de CTAB (0.1 M) y se agitó por 10min, trascurrido el tiempo se agregaron a la mezcla 1000 µL de AgNO₃ (10 mM) y se agitó por 30 segundos, a continuación, se agregaron 500 µL de Hidroquinona (100 mM) y se agitó por otros 30 segundos para finalmente adicionar 160 µL de la solución semilla previamente formada y se dejó reposar por toda la noche. El producto final fue centrifugado a 12.000xg x 30 minutos (3 veces) y resuspendido en 10mL de agua Milli-Q para luego ser analizado por UV-Vis-NIR, TEM/STEM, DLS/potencial Z.

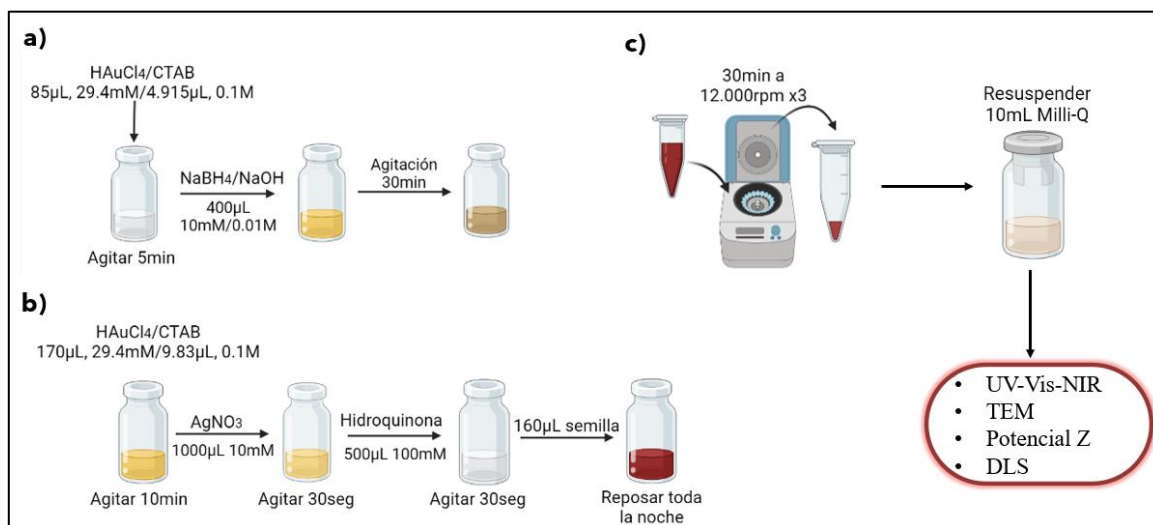


Figura 15: Síntesis de NVOs de oro por crecimiento de semilla modificado.

2.1.2 PEGilación de Nanovarillas de oro.

La PEGilación se llevó a cabo como se observa en la **figura 16**. En primer lugar, se tomaron los 10mL de solución de nanopartículas y se adicionaron 100 μ L de KOH 1M con agitación constante por 10 minutos. Transcurrido el tiempo se procedió con la adición de 100 μ L del PEG metoxilo (OME-PEG₅₀₀₀-SH 1 mM), la mezcla se agito por 10 min y se sonicó la solución por 5 minutos. Una vez finalizado el proceso se centrifugó a 13.200xg x 1 hora y se re-disperso en 10mL de agua Milli-Q. A continuación, se volvió a agregar el KOH en las mismas proporciones y se agito por 30 segundos. Luego se agregaron 600 μ L del PEG carboxilo (COOH-PEG₅₀₀₀-SH) y se dejó agitando por 2hrs y se procedió de igual manera que con la primera PEGilación ⁸⁸. La PEGilación fue confirmada mediante UV-Vis-NIR, DLS, potencial Z y RAMAN/SERS.

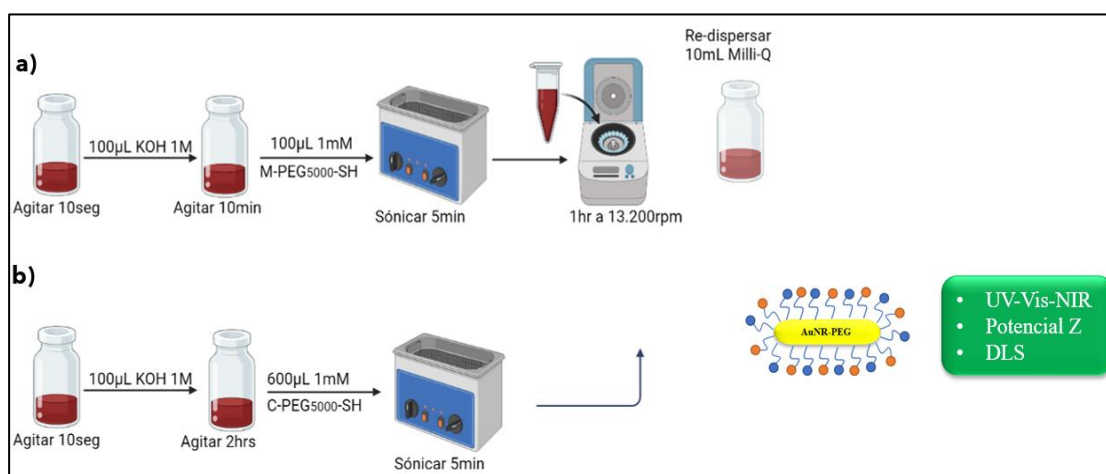


Figura 16: Proceso de PEGilación de las NVOs de oro.

2.1.3 Funcionalización de NVOs-PEG con los péptidos D1 y/o D3.

Se procedió a la formación de los siguientes sistemas NVOs-PEG-D1 y NVOs-PEG-D3 mediante la funcionalización con los péptidos D1 y D3 utilizando el mismo método en ambos casos como se esquematiza en la **figura 17**. En primer lugar, se centrifugaron los 10mL de solución NVOs-PEG a 13.200rpm x 1 hora y el *pellet* obtenido se juntó en un solo eppendorf al cual se le adicionaron 100 μ L de una solución de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida hidrocioruro o EDC (0.4mg) y sulfo-N-hydroxisuccinimida o sulfo-NHS (1mg) en buffer MES (pH= 5.5) para luego proceder a sonicar en agua fría por 15 minutos. Pasado el tiempo indicado se centrifugó por 1 hora y 30 minutos a 13.200xg, se removió el exceso de EDC/sulfo-NHS y se agregaron 500 μ L del péptido D1 o D3 y se dejó agitando durante toda la noche. Finalmente, se centrifugó la solución a 13.200xg x 1 hora y 50 minutos y los pellets obtenidos se re-suspendieron en 1mL de agua Milli-Q para luego proceder a caracterizar las muestras por medio de espectroscopia UV-Vis-NIR, RAMAN/SERS, TEM/STEM, DLS y potencial ζ ⁷⁸.

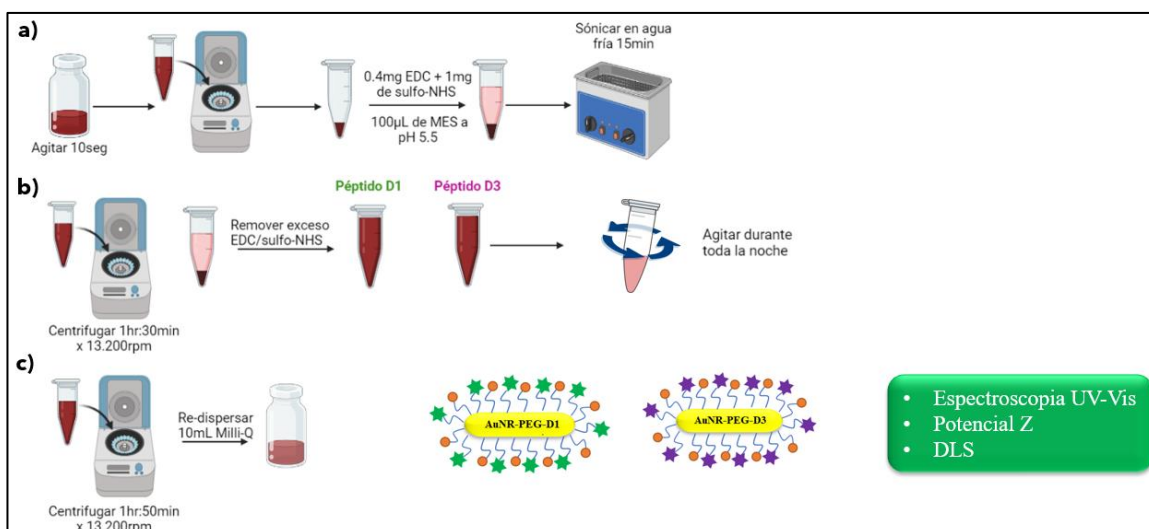


Figura 17: Funcionalización de los NVOs-PEG con los péptidos D1 y D3 respectivamente.

2.1.4 Cuantificación de NVOs de oro por NanoSight (NTA).

Con el fin de determinar el número de nanopartículas por mililitro, se realizó un análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) con el equipo NanoSight NS3000 (Malver Instruments, UK), y la acumulación de datos y posterior análisis fue hecho con el software NanoSight, versión NTA 3.2. El NTA es una aproximación rápida que puede ser usada para mediciones cuantitativas. Se estableció una relación lineal entre la concentración de las nanopartículas y el valor de absorbancia de la banda plasmónica. Cinco muestras de NVOs-PEG con diferentes valores de absorbancia, entre 0.1 y 1, fueron diluidas y medidas. Los datos fueron obtenidos usando un nivel de cámara de 15, videoclips de 50 segundos, y un límite de detección de 3. El láser de 642 nm fue usado para las mediciones de las NVOs-PEG manteniendo una temperatura de 25°C y utilizando agua Milli-Q como solvente.

2.2 Caracterización Fisicoquímica de los nanosistemas.

2.2.1 Espectrofotometría de Absorción Molecular (UV-NIR).

Las NVOs 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 NVOs, el transversal aproximadamente en 520 nm y el longitudinal que va desde los 700 a los 1000 nm, dependiendo de su relación de aspecto.

2.2.2 Dispersión Dinámica de la Luz (DLS).

Las NVOs fueron caracterizadas mediante dispersión dinámica de la luz (DLS) con el objetivo de determinar sus diámetros hidrodinámicos y su estabilidad coloidal. Estas mediciones fueron realizadas por triplicado en un equipo Zetasizer 3000 de Malvern Instruments y se utilizó una celda capilar plegada desechable (DTS1070), dispersante agua a 25°C y el índice de refracción usado fue 1,332.

2.2.3 Potencial ζ .

La medición del potencial ζ (Zeta sizer 3000, Malvern Instruments, UK) de NP consiste en 5 repeticiones de cada solución de NVOs. Dado que las mediciones del potencial zeta son realizadas en agua, la aproximación de Smolochowski (Doane, Chuang et al. 2012) ha sido usada para calcular el potencial ζ a partir de

la movilidad electroforética de la NPs en solución. Las determinaciones electroforéticas de potencial ζ fueron comúnmente realizadas en medio acuoso y a 25°C y se usa un índice de refracción de 1.332. Se empleó una celda capilar plegada desechable (DTS1070).

2.2.4 Microscopia Electrónica de Transmisión de Barrido (STEM).

Las NVOs 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 NVOs sobre grillas de cobre tratadas con Formvar carbón y dejándose secar al aire.

2.2.5 Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM).

Las NVOs fueron observadas por microscopía electrónica usando un microscopio electrónico de transmisión Philips CM120 con un voltaje de aceleración de 120 kV. Las muestras fueron preparadas depositando una gota de una suspensión de la muestra sobre grillas de cobre tratadas con Formvar carbón y dejándose secar al aire durante toda una noche. Las muestras de A β ₁₋₄₂ solas y co-incubadas con las NPs fueron evaluadas antes y después de la irradiación. Para esto, 5 μ L de cada muestra se colocaron en una grilla 300 mesh Formvar/Carbon-Coated Copper durante 2 minutos. Luego la grilla fue lavada con agua Milli-Q por un minuto, secada con papel absorbente Whatman y teñida con 1% de acetato de

uranilo ($\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) durante dos minutos para su posterior visualización en el equipo.

Mediante esta técnica se determinó su tamaño y la relación de aspecto (largo/ancho) mayoritaria para la población de NVOs. Para obtener datos poblacionales se midieron 200 partículas empleando el programa ImageJ representándose los datos como histogramas de frecuencia vs largo, ancho y relación de aspecto.

2.2.6 Microscopia Electrónica de Barrido (SEM).

Las NVOs también fueron caracterizadas mediante microscopía electrónica de barrido utilizando el microscopio GeminiSEM 360 Zeiss. Para la preparación de las muestras se dejó una gota sobre un fragmento de silicio (*silicon wafer*) y se dejó secar toda la noche para su posterior medición en el equipo.

2.2.7 Estimación del número de moléculas de péptido por NVOs mediante análisis de aminoácidos.

Como se indicó anteriormente el análisis de aminoácidos fue realizado en España en el centro científico de la Universidad de Barcelona. Las muestras fueron tratadas de la siguiente forma. Se hidrolizó todo el contenido de los eppendorf enviados (3 muestras de 1mL para cada nanosistema; NVOs-PEG-D1 y NVOs-PEG-D3) y se llevaron a un volumen final de 300 μL , Se añadieron 36 μL de AABA 2.5 mM para todas las muestras. Finalmente se realizó el análisis de aminoácidos

por HPLC, el volumen de inyección fue de 20 μ L de muestra y un tiempo de análisis de 50 minutos.

2.2.8 Espectroscopia RAMAN/SERS.

Para los espectros RAMAN las muestras fueron depositadas en una superficie de oro para eliminar cualquier posible fluorescencia intrínseca y se registraron utilizando un microscopio WITec SNOM/Raman Alpha 300 (785nm, objetivo 50x). Las condiciones de adquisición espectral fueron las siguientes: La región analizada oscila entre 200 y 1800 cm^{-1} , con un tiempo de integración por espectro de 10 segundos y 10 acumulación espectrales.

2.3 Irradiación NIR.

2.3.1 Irradiación de las NVOs para el estudio de eficiencia fototérmica.

Para el estudio fototérmico de las nanopartículas se procedió a tomar 300 μ L de NVOs-PEG y adicionarlas en una campana Durham de 20 mm de largo x 1.5 mm de diámetro, posteriormente se posicionó a unos 20 cm bajo el láser en una cámara oscura y se procedió con las mediciones captando el aumento de temperatura cada 1 minuto utilizando una cámara térmica FLIR E8xt como se observa en la **figura 18**.

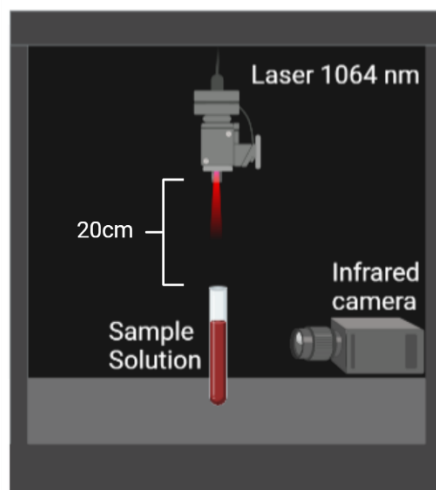


Figura 18: Esquema de cámara oscura para la irradiación de los diferentes controles.

La capacidad de transformar o de convertir la luz incidente en calor fue estudiada a diferentes potencias de láser en NIR-II (1064 nm) (100-120-130-140-145-150-200 mW) a una concentración de 7.06×10^{-11} mol/L en una cámara oscura, utilizando el láser de 1064 nm (Power Technology). La eficiencia fototérmica (η_T) es determinada por la siguiente ecuación^{89,90}:

$$\eta_T = \frac{hA(T_{max} - T_{room}) - Q_0}{I(1 - 10^{-A_\lambda})} * 100 \quad (1)$$

Donde: h es el coeficiente de transferencia de calor; A es el área de superficie de la cubeta; T_{max} y T_{room} corresponden a la temperatura más alta alcanzada por cada sistema y la temperatura ambiente; Q_0 es la contribución energética del blanco, calculada iluminando el sistema sin las NVOs; I es la intensidad de salida del láser, y A_λ es la absorbancia de cada solución de NVOs a 1064 nm.

Para la determinación de h , se aplicó el balance de masas propuesto por

Roper y col. Primero, se introduce una temperatura de fuerza motriz adimensional, θ , escalada utilizando la temperatura máxima de los sistemas:

$$\theta = \frac{(T_{room} - T)}{T_{room} - T_{max}} \quad (2)$$

Se asigna una constante de tiempo del sistema de muestra τ_s en el balance de masas:

$$\tau_s = \frac{\sum_i m_i C_{p,i}}{hA} \quad (3)$$

Por lo que estos dos parámetros (θ y τ_s) están relacionados por la siguiente ecuación:

$$\theta = e^{(-\theta/\tau_s)} \quad (4)$$

Luego de resolver las ecuaciones (2-4) se procedió con la obtención de η_T (ecuación 1) para cada potencial utilizado.

2.3.2 Estudio del efecto fototérmico sobre los sistemas NVOs-PEG-D1 y NVOs-PEG-D3 a dos potencias diferentes (135mW y 350mW).

En el caso de la potencia a 135mW la irradiación fue continua por 20 minutos iniciando a una temperatura de 36.5°C, para simular temperatura fisiológica. Para la potencia de 350mW el tiempo de irradiación fue acortado a 1 minuto y la temperatura de inicio fue de 33°C aproximadamente. En ambos casos se procedió de igual manera que en el apartado anterior en procedimiento y en medición de temperatura.

2.4 Estudio de la Inhibición y Desagregación del péptido A β ₁₋₄₂.

2.4.1 Inhibición del péptido A β ₁₋₄₂ en presencia de NVOs modificadas con péptidos D1 y/o D3.

Para el estudio de inhibición por la formación de las fibras del péptido A β , alícuotas de 0,05 mg del péptido A β se trataron con 200 μ L de HFIP (1, 1, 1, 3, 3, 3-Hexafluoro-2-propanol) durante 30 min a temperatura ambiente para luego ser liofilizadas por 24hrs. Posteriormente fueron resuspendidas en 16 μ L de HFIP y se adicionaron 5 μ L de esta a tres *ependors* con 310 μ L de agua Milli-Q, todo el procedimiento fue llevado a cabo a 4°C. Luego se agregaron las NVOs (resuspendidas en agua) quedando a una concentración de 80 pM. La concentración final del péptido A β fue de 20 μ M en todos los casos. El péptido fue incubado durante 72 horas a 37°C con agitación mecánica de 300 rpm.

Para el estudio de la inhibición se realizó el ensayo de fluorescencia de Th-T. Este cromóforo fluórese a 470 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 (inhibición) o aumento de estas⁹¹.

Después de la incubación y para el ensayo Th-T, 25 μ L de las muestras se depositaron en pocillos de placas de fondo negro Nunc® MaxiSorp™ 384 *well plates*, que contenían 9.03 μ L de agua Milli-Q y en el momento antes de realizar la medición se agregaron 15.97 μ L de Th-T 15 μ M a cada pocillo (**Figura 19**). Estos

experimentos fueron realizados en un espectrofluorímetro de placas BioTek, modelo *synergy* MX, excitando a 450 nm y leyendo la fluorescencia a 470 nm. Todos los datos de fluorescencia de Th-T realizados se expresan como porcentaje con respecto a un control de fibras de A β sin tratamiento de NVOs, solamente con el vehículo (100%).

2.4.2 Desagregación del péptido A β ₁₋₄₂ en presencia de NVOs modificadas con péptidos D1 y/o D3.

Para el estudio de desagregación se procedió con la formación de las fibras del péptido A β , alícuotas de 0,05 mg del péptido A β se trataron con HFIP (1, 1, 1, 3, 3, 3-Hexafluoro-2-propanol) durante 30 min a temperatura ambiente para luego ser liofilizadas por 24hrs. Posteriormente fueron resuspendidas en 16 μ L de HFIP y se adicionaron 5 μ L de esta a tres eppendors con 310 μ L de agua Milli-Q, todo el procedimiento fue llevado a cabo a 4°C. El péptido fue incubado durante 72 horas a 37°C con agitación mecánica de 300 rpm hasta formación de las fibras. Luego se agregaron las NVOs (resuspendidas en agua) quedando a una concentración de 80 pM. La concentración final del péptido A β fue de 20 μ M en todos los casos. En la figura 19 se muestra un esquema de la formación de oligómeros y fibras de A β ₁₋₄₂.

Para el estudio de desagregación se realizó, de igual manera que en la inhibición, el ensayo de Th-T en donde se adicionaron 25 μ L de las muestras en pocillos de placas de fondo negro Nunc® MaxiSorp™ 384 *well plates*, que contenían 9 μ L de agua Milli-Q y en el momento antes de realizar la medición se

agregaron 16 μL de Th-T 15 μM a cada pocillo, resultando en una concentración final de 5 μM , y las mediciones se llevaron a cabo en el mismo espectrofluorímetro de placas y con las mismas condiciones.

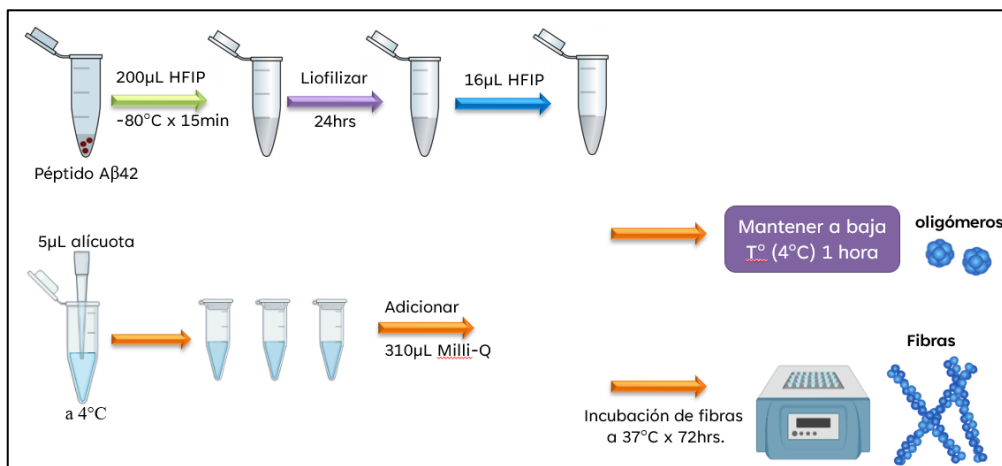


Figura 19: Preparación de oligómeros y fibras de A β_{1-42} .

2.4.3 Inhibición del péptido A β_{1-42} en presencia de NvO-modificadas con péptidos D1 y/o D3 e irradiando con láser de 1064 nm a 135mW y 350mW de potencia.

Se repitió el mismo protocolo de la sección 2.4.1 con la diferencia que previo al proceso de incubación con el A β , las muestras fueron divididas en dos grupos y una de ellas fue irradiada por 20 minutos con potencia de 135mW y el otro grupo por 1 minuto a 350mW. Posterior a la irradiación, se sigue con el proceso de inhibición del crecimiento y evaluación de esta como se describe en 2.4.1.

2.4.4 Desagregación del péptido A β 1-42 en presencia de NVO-modificadas con péptidos D1 y/o D3 e irradiando con láser de 1064 nm a 135mW y 350mW de potencia.

De igual manera que en el punto anterior se repitió el mismo protocolo que en 2.4.2 y previo a la incubación se dividieron las muestras en dos grupos, uno de ellos irradiado por 20 minutos a potencia de 135mW y el segundo grupo por 1 minuto a potencia de 350mW. Posterior a ello se procedió de igual manera que el apartado 2.4.2.

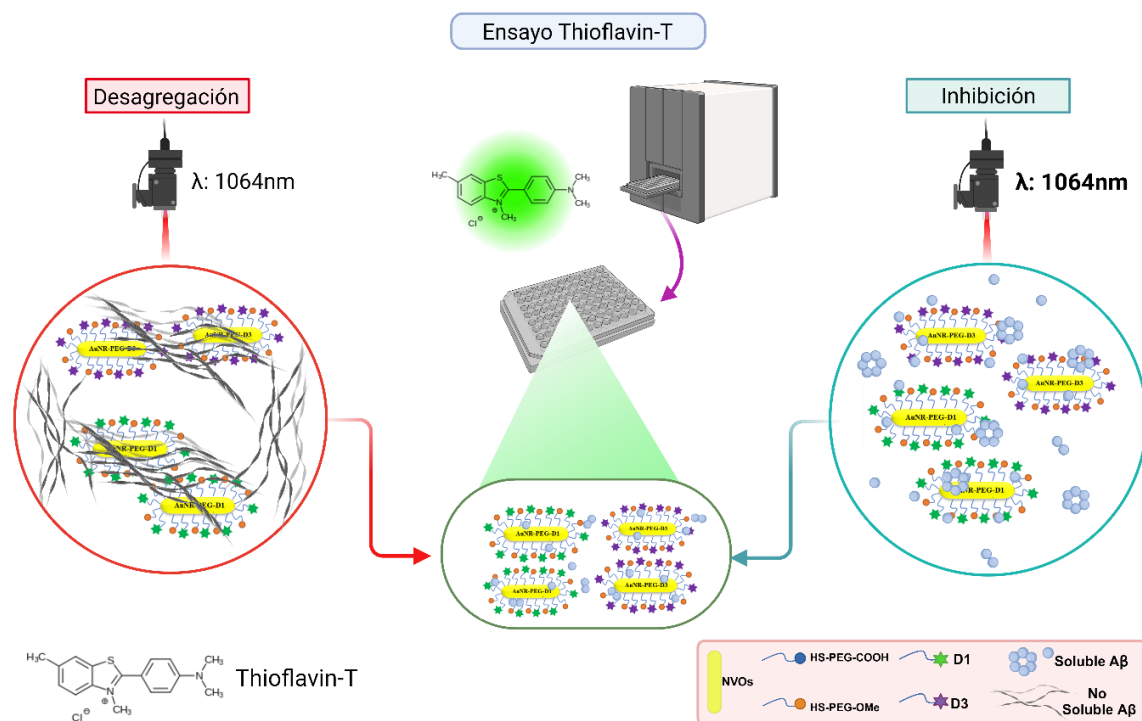


Figura 20: Esquema ensayo Th-T para inhibición y desagregación de las NVOs con los respectivos péptidos.

2.4.5 Espectroscopia de Dicroísmo Circular (DC).

El contenido de estructura secundaria de tanto del péptido A β ₁₋₄₂ en ausencia o presencia de NVOs fue determinado mediante espectroscopía DC. 600 μ L de cada muestra obtenida al final de los ensayos de agregación fue colocado en una cubeta de cuarzo con un paso óptico de 5 mm. Los espectros fueron registrados desde 190 a 300 nm usando el equipo modelo No. J-1500 instrument (JASCO corporation Japan). Además, el porcentaje de estructura secundaria de cada una de las muestras fue determinado por la deconvolución de los espectros mediante el software libre BeStSel.

**CAPÍTULO III: RESULTADOS DE SÍNTESIS, FUNCIONALIZACIÓN Y
CARACTERIZACIÓN DE NANOVARILLAS DE ORO**

3.1 Determinación y caracterización de los parámetros relevantes para la síntesis de Nanovarillas de Oro (NVOs).

Se estudio la influencia que tienen sobre el desplazamiento del plasmón de las nanobarras el cambio en determinados parámetros durante la síntesis, como las diferentes concentraciones de hidroquinona (50-100-150mM) y AgNO_3 (2-10 mM). Adicionalmente, se estudió la influencia de las semillas sobre la solución de crecimiento mediante diferentes volúmenes de NaBH_4 . Las Nanovarillas fueron sintetizadas mediante el método mediado por semilla modificado y a una temperatura de 27°C en baño de agua ⁸⁸ como se explicó en el apartado 2.1.1.

Todas las síntesis realizadas fueron caracterizadas por espectrofotometría UV-Vis-NIR, microscopia electrónica de transmisión (TEM), microscopía electrónica de barrido (SEM), dispersión dinámica de la luz (DLS) y potencial ζ . Para calcular la concentración de las NVO se realizó análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA).

3.1.1 Síntesis de Nanovarillas con variación en la concentración de hidroquinona y nitrato de plata para la obtención de plasmón en NIR-II.

En primer lugar, se realizó el estudio de los cambios en los diferentes parámetros y el efecto de estos sobre el plasmón de las Nanovarillas. Una de las variables modificadas fue la concentración de hidroquinona (HQ) y de AgNO_3 . Se utilizaron tres concentraciones una a 50 mM, a 100 mM y otra a 150 mM en el caso

de la hidroquinona y en el caso del AgNO_3 2 mM y 10 mM. El resultado se observa en la **figura 21**.

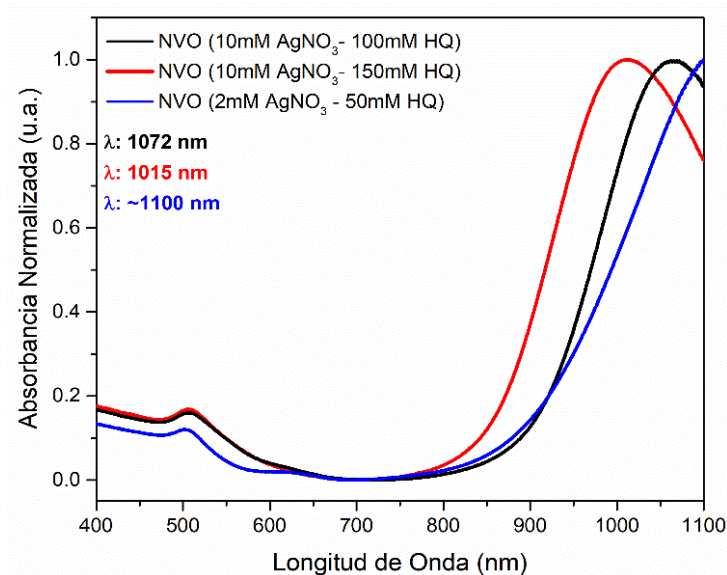


Figura 21: Efecto del desplazamiento del plasmón a diferentes concentraciones de hidroquinona (HQ: 50-100-150 mM) y nitrato de plata (AgNO_3 : 2-10 mM). Todo el resto de los parámetros se mantuvieron constantes.

La hidroquinona ($E^\circ = -0.699 \text{ V}$) reduce la sal de oro en solución ($E^\circ = 1.002 \text{ V}$) mediante un proceso de oxidación de $2e^-$ y dos protones, pero esto ocurre siempre que se tengan semillas del metal en solución para que el oro pueda ser reducido de Au^{+3} a Au^0 y se deposite en la superficie de las semillas, aumente el campo eléctrico en las puntas y pueda comenzar a dar forma a la nanopartícula objetivo^{92,93}, la reacción final redox se observa en la **figura 22**. La diferencia en la banda plasmonica a otras concentraciones de hidroquinona puede ser atribuida a una saturación en la superficie de la nanopartícula o a una alta precipitación de oro en la solución por la reducción del HAuCl_4 y no en la superficie de las semillas causando nanopartículas de tamaños y relaciones de aspecto más variadas⁹².

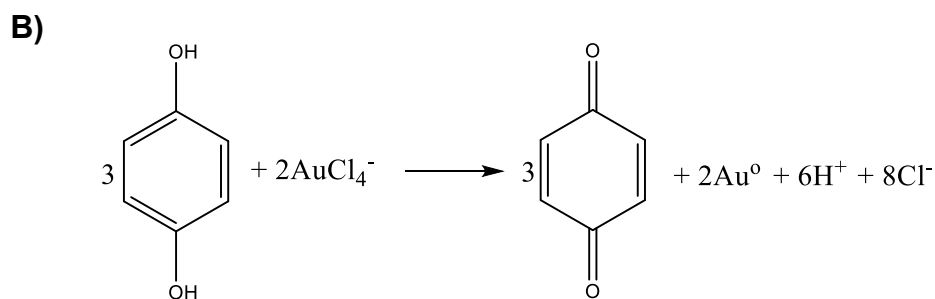
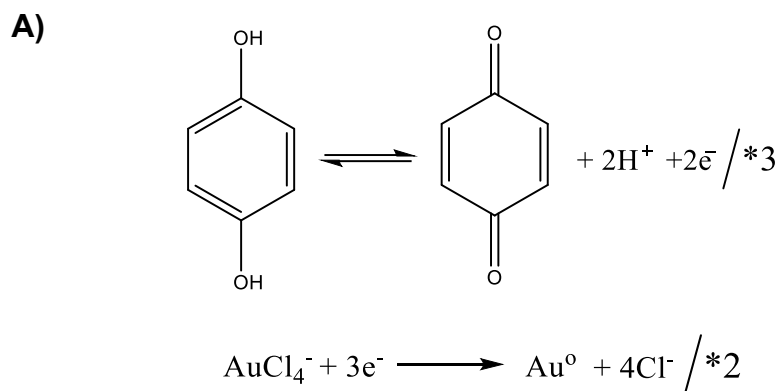


Figura 22: Esquema general del proceso de **A)** oxidación de la hidroquinona y reducción del oro en solución y **B)** reacción global redox.

Por otro lado, Perez-Juste y col. propusieron un mecanismo electroquímico para la formación de las NVOs en donde es necesaria una asimetría del campo eléctrico para su formación y por ende el campo eléctrico es aumentado en las puntas de las varillas, por lo que se produciría selectividad. La interacción con las micelas de CTAB también influye en el crecimiento de las varillas en las puntas, ya que estas tienen una frecuencia de colisión con las semillas muy baja. Estos factores permiten la reducción del Au^{+1} casi exclusivamente en las puntas lo que llevaría a que la hidroquinona realice la reducción selectivamente en estas e influiría en el crecimiento a lo largo de las nanovarillas⁹³⁻⁹⁵. En consecuencia, el aumento en la

concentración de hidroquinona provoca un incremento en la relación de oxidación-reducción, lo que resulta en una alta concentración de Au^0 en la solución. Esto conlleva a que el ritmo de deposición de Au^0 en planos de alta energía, como los planos {110} a lo largo de la varilla, sea mayor que en los planos de menor energía, como el plano {100} en las puntas de la varilla ^{94,95}. Adicionalmente, Perrault y Chan demostraron la selectividad de la HQ por la reducción de oro en presencia de *clusters* o semillas de esta y un aumento en la monodispersidad en comparación a otros agentes reductores como el citrato⁹³.

Un rol importante para la obtención de estas nanovarillas es el del AgNO_3 . Se discute que los iones de Ag^I se unen selectivamente a los planos de más alta energía del nanocristal de oro {110} disminuyendo así el crecimiento en estos planos. Como consecuencia, los átomos de oro se adicionan preferentemente en los planos {100}, lo que conllevaría al crecimiento longitudinal de éstas y la obtención de NVOs más largos con plasmón en NIR-II ⁹⁶ (**Figura 23**). Sin embargo, también existe otra teoría que indicaría que un aumento en el campo eléctrico de las puntas de las NVOs (como el causado por la hidroquinona) llevaría a una mayor colisión con el enlace CTAB- Au^I aumentando el crecimiento anisotrópico ⁹⁷.

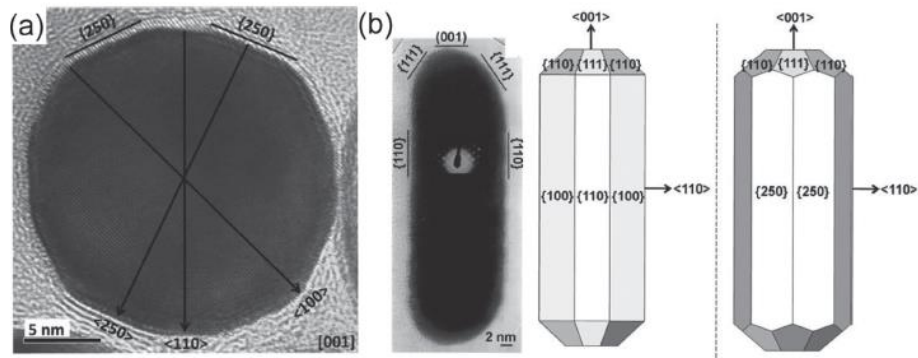


Figura 23: Estructura cristalina de AuNRs. **A)** Imagen HRTEM de una AuNR indicando los índices altos del plano $\{110\}$, **B)** Antiguo y nuevo modelo de la estructura cristalina de los AuNRs los cuales son consistentes con la imagen TEM de costado de un AuNR ⁹⁷.

Como se puede observar en la **tabla 1** en ambos casos, tanto en AgNO_3 2 mM y 10mM al aumentar la concentración de HQ se observa un cambio. En el caso de la menor concentración de nitrato de plata al aumentar la HQ el plasmón se desplaza al rojo y su relación de aspecto aumenta y, por otro lado, cuando se tiene una concentración de nitrato mayor y se aumenta la concentración de la HQ el plasmón se va desplazando hacia longitud de onda menores y su relación de aspecto disminuye. Estos resultados son concordantes con lo expuesto anteriormente en lo que respecta a que el AgNO_3 prefiere posicionarse y bloquear los planos de mayor energía que estas a lo largo de la varilla y que la hidroquinona aumenta el campo eléctrico en las puntas y la reducción del oro y crecimiento sucede preferentemente en los planos de menor energía que se encuentran en estas puntas.

Tabla 1: Resumen de parámetros modificados en la síntesis de NVOs					
Hidroquinona (mM)	Nitrato de Plata (mM)	Plasmón Longitudinal (nm)	Largo (nm)	Ancho (nm)	R/A
50	2	782	76.6	21.4	3.6
100	2	929	73.3	14.7	5.0
150	2	1000	59.5	10.5	5.7
50	10	1257	87.9	10.5	8.4
100	10	1055	49.2	7.3	6.8
150	10	1054	51	8.5	6

3.1.2 Síntesis de Nanovarillas con variación en el volumen de borohidruro de sodio (NaBH_4) para la obtención de plasmón en NIR-II.

En la siguiente modificación se agregaron diferentes volúmenes de $\text{NaBH}_4/\text{NaOH}$ (10 mM/0.01 M) a la solución semilla. Lo que se observó fue que en los primeros en todos los casos el plasmón se encontraba sobre los 1100 nm siendo el más alto a un volumen de 360 μL de $\text{NaBH}_4/\text{NaOH}$ como se observa en la **figura 24**. Esto puede deberse a lo ya explicado previamente sobre la hidroquinona y al AgNO_3 y en el caso del NaBH_4 su capacidad reductora puede afectar el tamaño de semilla que se forme y su concentración por lo que agregar mayor cantidad de solución de borohidruro de sodio podría generar semillas más pequeñas pero en mayor concentración y, por el contrario, una menor cantidad produciría semillas más grandes pero en menor concentración por lo que los 280 μL serían la cantidad óptima para obtener un plasmón desplazado hacia el rojo ^{94,98} y con ancho de banda

más cercano a la longitud a utilizar en posteriores experimentos.

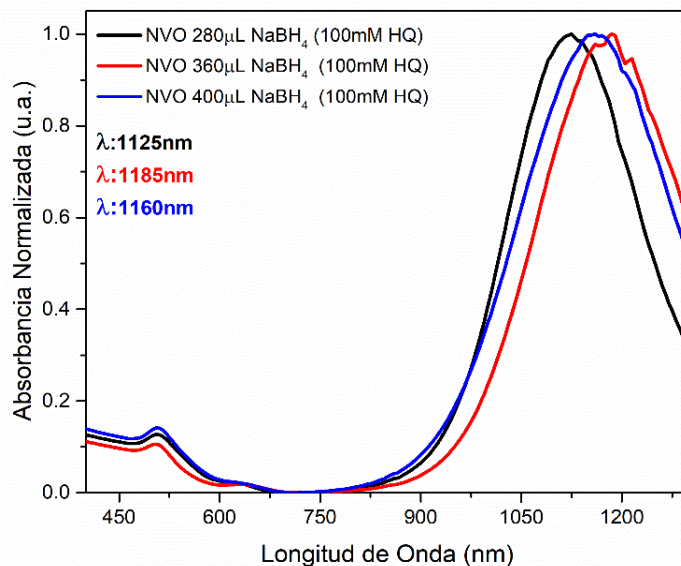


Figura 24: Efecto del desplazamiento del plasmón a diferentes cantidades de NaBH₄ en la solución semilla. Todo el resto de los parámetros se mantuvieron constantes (AgNO₃ 10mM e Hidroquinona 100 mM).

3.2 Caracterización de Nanovarillas de Oro (NVOs) con los parámetros optimizados.

Luego de estudiados los parámetros modificados para la optimización de la síntesis de las NPs se procedió a realizar la caracterización del nanosistema obtenido, cabe mencionar que los ajustes mencionados anteriormente no fueron los únicos realizados y en ANEXO 14.1 se encuentran las demás modificaciones realizadas. La síntesis se llevó a cabo como se indicó anteriormente en el punto 3.1 utilizando 280 µL de NaBH₄ para la formación de semilla y en el caso de la solución de crecimiento se utilizaron finalmente 10 mM de AgNO₃ y 100 mM de hidroquinona.

La primera etapa de caracterización luego de la síntesis consistió en

realizar espectrofotometría Vis-NIR para confirmar el plasmón de nuestras NVOs en segunda ventana biológica. Como se puede observar en la **figura 25A** el plasmón trasversal se encuentra a 507 nm y el longitudinal a 1061 nm confirmando la obtención de NPs en NIR-II haciéndolas adecuadas para una posible aplicación fototérmica.

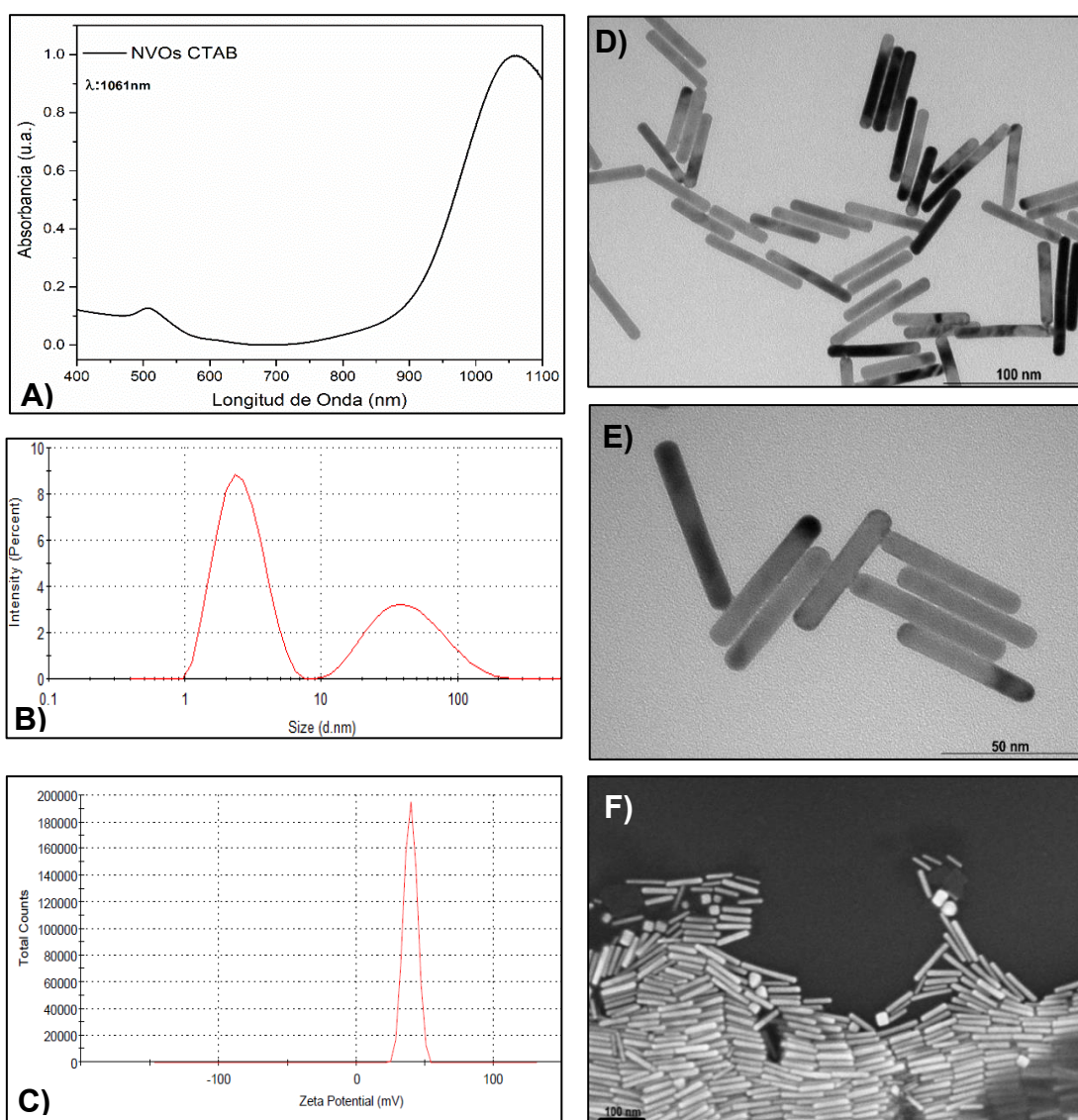


Figura 25: **A)** Espectro de absorbancia de NVOs-CTAB; **B)** Diámetro hidrodinámico en nm; **C)** Potencial ζ en mV; **D-E)** Imágenes TEM de NVOs-CTAB, escala de tamaño 100 y 50 nm respectivamente; **F)** Imagen SEM de NVOs-CTAB, escala de tamaño de 100 nm.

Una vez obtenido el espectro de absorbancia de las NPs se procedió con la caracterización por DLS y potencial ζ . El D_h de estas fue de 3.00 ± 0.04 nm y 51 ± 5 nm como se observa en la **figura 25B**. Los tamaños pueden ser atribuidos a la dispersión de la luz por las NVOs rotacional y traslacional respectivamente. En el caso del potencial ζ , este resultó ser de 38 ± 3 mV, el cual se condice con lo reportado, la carga positiva del potencial es atribuida a la presencia del CTAB como agente estabilizante de las NVOs⁹⁹.

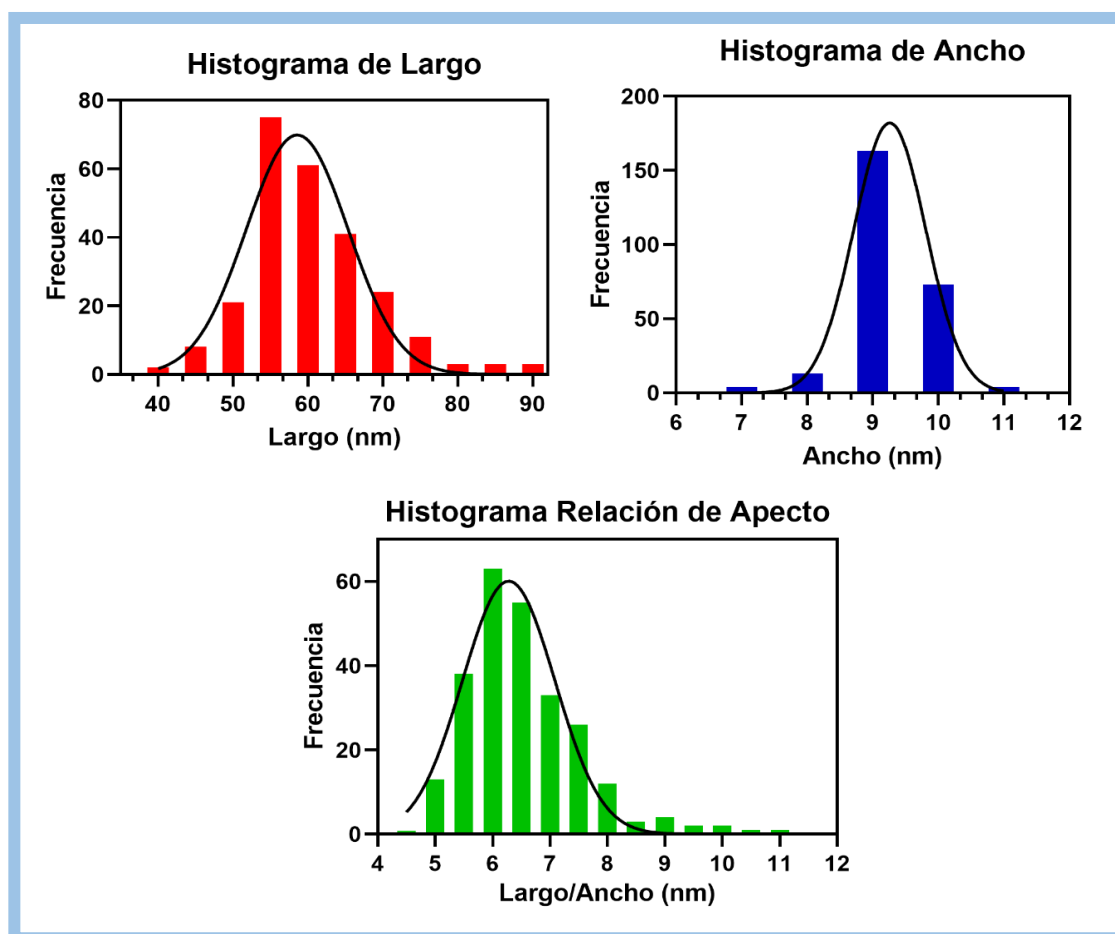


Figura 26: Histograma de distribución de tamaño de las NVOs. En rojo la distribución del largo, en azul el ancho y en verde la distribución de la relación de aspecto (largo/ancho) de las NPs.

Las imágenes TEM y SEM muestran una morfología de varillas homogéneas las cuales tienen un largo promedio de 58 ± 6 nm y un ancho de 9 ± 0.5 nm lo que resulta en una relación de aspecto promedio de 6.4 ± 0.8 nm como se observa en la **figura 26** lo cual se condice con lo reportado para nanovarillas con plasmón por sobre los 1000 nm^{100,101}. Cabe mencionar que mediante imágenes TEM también se observó la presencia de esferas el análisis se muestra en el ANEXO 14.1.

3.2.1 Caracterización de Nanovarillas de Oro (NVOs) estabilizadas con SH-PEG-OMe y SH-PEG-COOH.

Las cantidades excesivas de CTAB, molécula conocida por ser citotóxica, luego de la síntesis de las NPs resulta en una alta toxicidad y a largo plazo en inestabilidad de estas NPs lo que no las hace adecuadas para aplicaciones biomédicas¹⁰² por lo que debe ser reemplazo por otro surfactante o ligando biocompatible. Los polímeros son buenos candidatos para funcionar como agentes estabilizantes, especialmente el polietilenglicol (PEG) con grupo funcional tiol (-SH) el cual tiene una alta afinidad por el oro a través de su quimisorción en la superficie, generando un enlace fuerte similar a un enlace covalente¹⁰³. El PEG por ende es biocompatible, aumenta el tiempo de circulación en la sangre de las NVOs reduciendo la unión no específica de las proteínas y disminuyendo la toxicidad siendo el PEG con peso molecular de 5000 Da (PEG₅₀₀₀) es la que conlleva a la menor toxicidad y mayor circulación¹⁰²⁻¹⁰⁴.

En este trabajo se utilizaron dos tipos de HS-PEG₅₀₀₀, uno con terminación O-metilo (HS-PEG₅₀₀₀-OMe) y otro con terminación COOH (HS-PEG₅₀₀₀-COOH). El HS-PEG-OMe se utilizó para darle estabilidad a las NVOs y disminuir las interacciones con proteínas presentes en medios biológicos y, por otra parte, el HS-PEG-COOH fue utilizado para unir los péptidos D1 (qshyrhispaqv) y D3 (rprtrlhthrn) que tienen grupos aminos libres, mediante enlaces amida con el ácido carboxílico del PEG^{105,106}. Este último se adiciona en mayor proporción para asegurar una mayor conjugación de péptido a la nanopartícula.

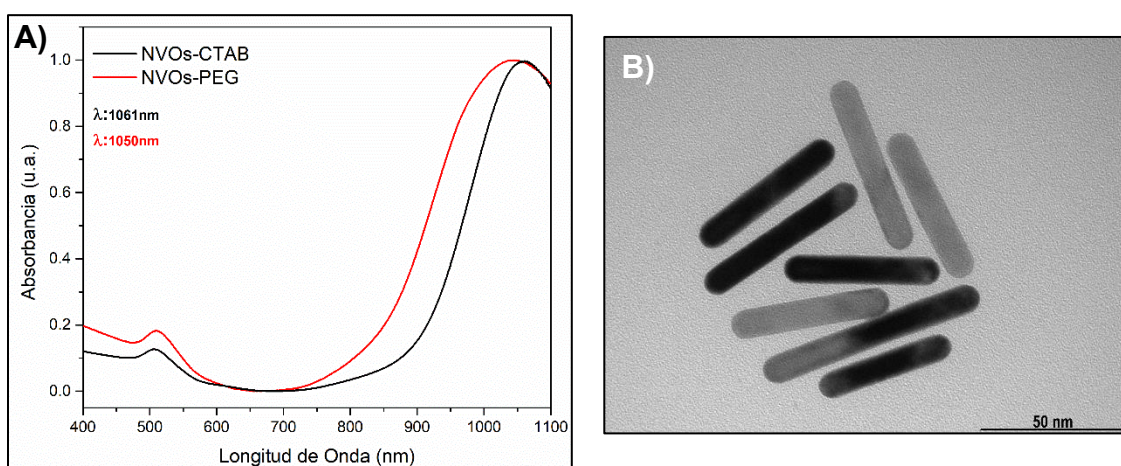


Figura 27: A) Espectro de absorbancia en negro NVO-CTAB y en rojo NVO-PEG; **B)** Imagen TEM de NVO-PEG.

Luego de la PEGilación se observó un desplazamiento hipsocrómico de la banda plasmónica longitudinal de 1061 nm a 1050 nm (**Figura 27A**). Este desplazamiento es generalmente atribuido a un cambio en la constante dieléctrica de la superficie de la nanopartícula al conjugar los PEG en su superficie y desplazar el CTAB, cambio observado en literatura^{104,107}. La imágenes TEM no muestran un cambio en la morfología de la nanopartícula luego de su PEGilación como se puede

observar en la **figura 27B**. El cambio en el diámetro hidrodinámico y en el potencial ζ también fueron evaluados, como se observa en la **figura 28**, el D_h sufrió un aumento tanto de forma transversal como longitudinal siendo de 7 ± 0.5 y 92 ± 17 nm respectivamente, este aumento es esperado debido a la funcionalización en los PEG. El coeficiente de difusión de las nanopartículas se encuentra directamente ligado a la forma de estas y también a su superficie química. En este caso fue posible observar un aumento del D_h debido a la modificación superficial de las nanovarilla al adicional PEG (**Figura 28**). Por otro lado, también es posible observar que el primer pico que se observa tiene una mayor intensidad (%) que el segundo. Al parecer la relación de aspecto de las NVOs está directamente ligada a la forma de los picos del DLS, entre mayor es la relación de aspecto mayor es el primer pico y entre menor es esta relación menor es la intensidad de este ¹⁰⁸. El potencial ζ , luego de la incorporación de ambos PEG, fue de -35 ± -2.5 mV (**Figura 29**), esto debido al aumento de la densidad de cobertura superficial de la cadena del PEG o al incremento de tamaño de la cadena que puede aumentar el grosor de la capa del PEG, lo que resulta en una disminución del potencial ζ o a la carga del PEG utilizado, en este caso el PEG carboxilo que puede quedar con carga negativa HS-PEG-COO⁻ (pKa 4.8) debido a que las mediciones fueron realizadas a pH= 5.5 ¹⁰⁹.

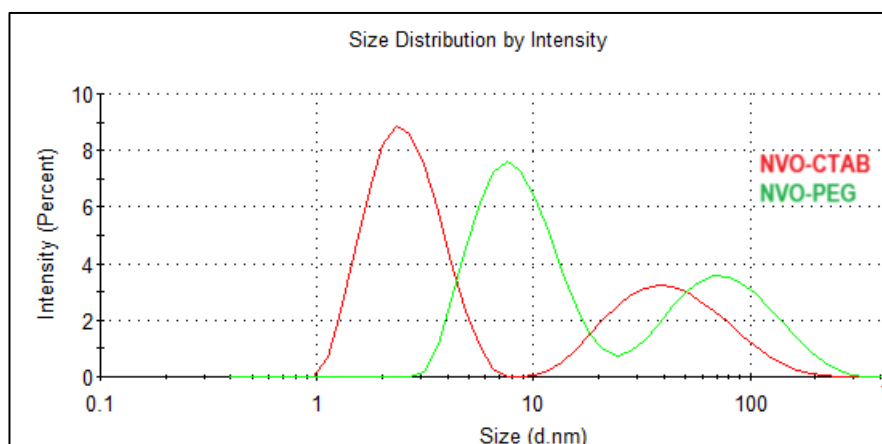


Figura 28: Distribución de tamaño determinada mediante DLS para NVO-PEG y su comparación con las NVO-CTAB.

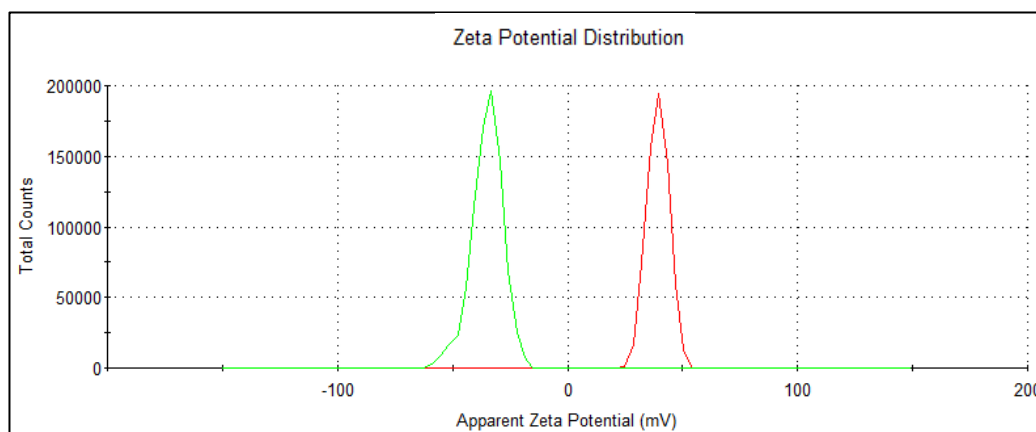


Figura 29: Distribución de carga determinada mediante potencial ζ para NVO-PEG (verde) y su comparación con las NVO-CTAB (rojo).

3.2.2 Caracterización de Nanovarillas de Oro (NVOs) funcionalizadas con los péptidos D1 y D3 para el reconocimiento de los agregados de A β .

Una vez estabilizadas las NVOs con los PEG se procedió a funcionalizar estas con los péptidos D1 y D3 con el fin de direccionar la nanopartículas hacia los agregados de β -amiloides y de esta manera acercarnos hacia una posible terapia para la EA. El péptido D1, cuya secuencia es *qshyrhispaqv* y el péptido D3, cuya

secuencia es *rprrlhthmr* fueron utilizados debido a su capacidad para reconocer y unirse al péptido A β y a su capacidad para desagregar e inhibir la agregación de este. Adicionalmente, estos péptidos poseen una ventaja al ser péptidos con aminoácidos D ya que son menos sensibles a la degradación por proteasa y son menos inmunogénicos en comparación a los aminoácidos L, por lo que una mayor circulación en animales que estos últimos ^{3,84}.

La funcionalización de los péptidos en las NVOs fue mediante la reacción de EDC/Sulfo-NHS con los péptidos para la formación de un enlace amida que posteriormente formará un enlace con el ácido carboxílico del PEG. Luego de realizada la reacción de funcionalización se procedió con las caracterización correspondientes, en primera instancia se realizó espectrofotometría Vis-NIR en donde fue posible observar un desplazamiento plasmónico en ambas instancias, tanto en la funcionalización con D1 como con D3 (**Figura 30A**) el cual es atribuido a que estos se encuentran en la superficie de las NVOs por lo que se encontrarían realizando cambio en su tamaño y en el medio de rodea la nanopartícula por lo que se producirían cambios en la constante dieléctrica.

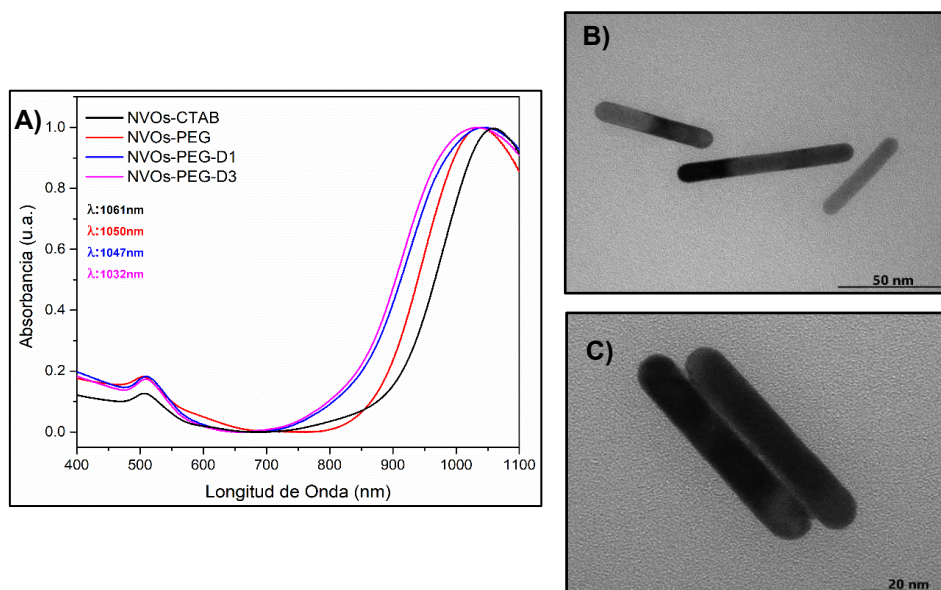


Figura 30: **A)** Espectro de absorbancia de NVO-CTAB (negro), NVO-PEG (rojo), NVO-PEG-D1 (azul) y NVO-PEG-D3 (magenta); **B)** Imagen TEM de NVO-PEG-D1 y **C)** NVO-PEG-D3.

La **figura 31** muestra los D_h correspondientes a los sistemas previamente mencionados. Donde es posible observar cómo fue aumentando el D_h transversal (dispersión rotacional) hasta 9 ± 0.3 nm para NVOs-PEG-D1 y 10 ± 0.5 nm para NVOs-PEG-D3. En el caso del D_h longitudinal (dispersión traslacional) el aumento fue desde de 108 ± 11 nm para las funcionalizadas con D1 y 117 ± 28 nm para las NPs con D3. Por otro lado, los potenciales ζ se volvieron menos negativos pasando de -35 ± -2 mV con PEG a -9 ± 1 mV para las NPs con D1 y -3 ± 2 mV para el D3 (**Figura 32**). El aumento en el potencial ζ observado luego de la funcionalización con los péptidos se puede deber a que al poseer un pH ácido la solución de nanopartículas (pH=4) ya que el punto isoelectrico de cada péptido (D1: 8,76 y D3: 12,60) es > 7 los grupos amino de los aminoácidos, como son la arginina y la histidina, se encuentran protonados otorgándole una carga positiva al péptido que

posteriormente se ve reflejada en el cambio a un potencial ζ menos negativo al final de la reacción ¹¹⁰. Este potencial también es un indicativo de la estabilidad coloidal de las nanopartículas, valores $> +25\text{mV}$ y $< -25\text{mV}$ poseen usualmente una alta estabilidad coloidal, lo que se observaría en nuestro caso ¹¹¹.

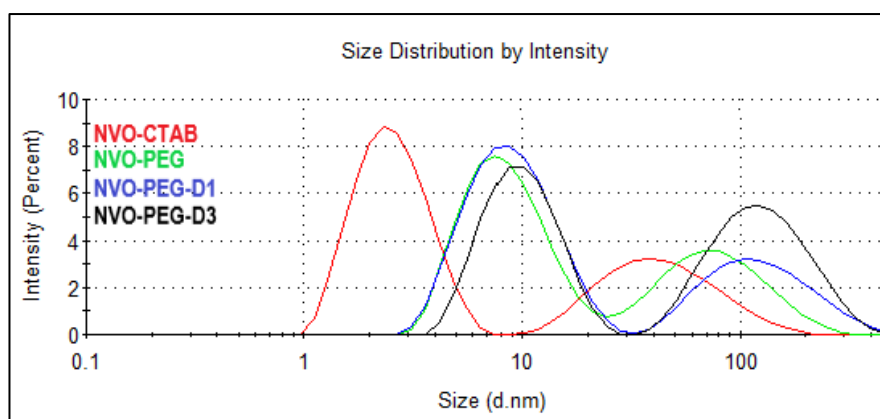


Figura 31: Distribución de tamaño determinada mediante DLS para NVO-PEG y su comparación con las NVO-CTAB.

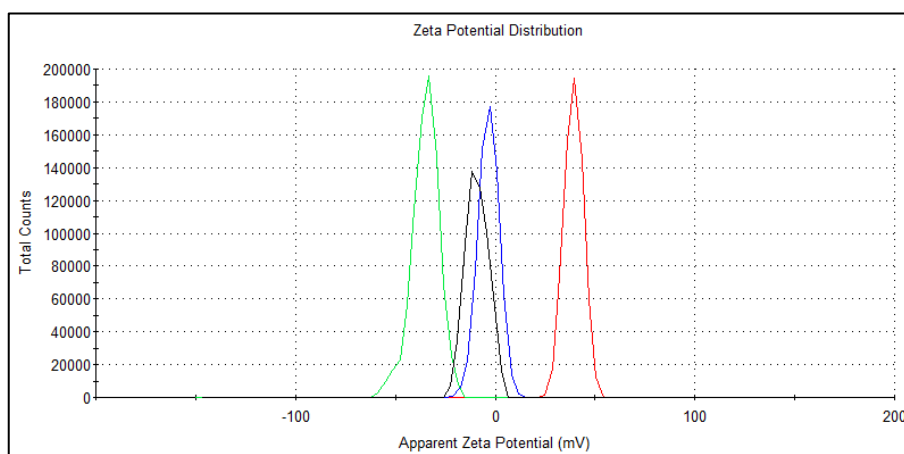


Figura 32: Distribución de carga determinada mediante potencial ζ para NVO-PEG (verde), NVO-PEG-D1 (azul), NVO-PEG-D3 (negro) y su comparación con las NVO-CTAB (rojo).

A continuación, se muestra una tabla resumen de todos los D_h y potenciales ζ realizados durante la síntesis de las NVOs.

Tabla 2: Resumen de D_h y potenciales ζ de los nanosistemas sintetizados.

Nanosistema	D_h transversal (nm)	D_h longitudinal (nm)	Potencial ζ (mV)	PDI
NVO-CTAB	3 ± 0.04	51 ± 5	38 ± 3	0.5 ± 0
NVO-PEG	7 ± 0.5	92 ± 17	-35 ± 2.5	0.5 ± 0.1
NVO-PEG-D1	9 ± 0.3	108 ± 11	-9 ± 1	0.6 ± 0.1
NVO-PEG-D3	10 ± 0.5	117 ± 28	-3 ± 2	0.6 ± 0.1

3.3 Cuantificación de NVOs por análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA).

Para obtener la concentración de nuestras NVOs se llevó a cabo el análisis de seguimiento de nanopartículas o NTA. Este análisis utiliza la dispersión de la luz y el movimiento Browniano de las partículas para obtener la concentración y la distribución de tamaño en solución de estas.

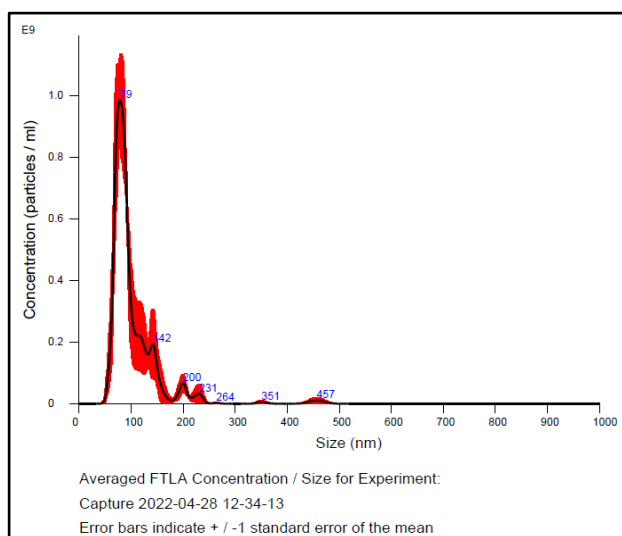


Figura 33: Promedio FTLA de concentración/tamaño (SD= 35,6±3,1 nm).

En la **figura 33** se puede observar la concentración y distribución de tamaño de las NVOs luego del análisis de NTA. Fue posible observar una concordancia entre la distribución de tamaño del NTA y las medidas del DLS indicadas previamente (**Tabla 2**). El NTA detecta la presencia de agregados que poseen tamaños desde 142 nm hasta 457 nm. El promedio de distribución de tamaño entregado por análisis fue de 103 ± 4 nm para las NVOs. Este análisis consiste en la dispersión de la luz debido al movimiento Browniano de las nanopartículas en solución, específicamente de nanopartículas esféricas, de igual manera que el DLS, por lo que la estimación del tamaño de las nanovarillas difiere del tamaño real de estas vistas por ejemplo mediante imágenes TEM^{108,112}.

Por otro lado, el análisis nos entrega en paralelo la concentración de nanopartículas en número de partículas por mililitro de solución (partículas/ml). La concentración obtenida de las NVOs sintetizadas fue de $1.73 \times 10^{12} \pm 1.29 \times 10^{11}$ partículas/ml, lo que se puede traducir en una concentración de 2.87 ± 0.21 nM.

3.4 Determinación de la concentración de péptido D1 y D3 por nanopartícula mediante análisis de aminoácidos.

Como se indicó anteriormente el análisis de aminoácidos fue realizado en España en el centro científico de la Universidad de Barcelona. Las muestras fueron tratadas como se indica en el apartado 2.3.8. Este análisis nos permitió estimar la cantidad por NVOs cuantificando la cantidad de al menos tres aminoácidos tanto

en D1 como en el D3, en el caso del primero se utilizó la arginina (R), prolina (P) e histidina (H), en el caso del D3 se utilizó la (R) igualmente, la leucina (L) y la treonina (T). Los resultados de la cuantificación de péptidos por NVOs se resumen en la **tabla 3**.

Tabla 3: Cuantificación de péptidos por análisis de aminoácidos.	
Sistema	Cuantificación (péptido/NVOs)
NVOs-PEG-D1	3264 ± 1839
NVOs-PEG-D3	2065 ± 669

Si comparamos el número de moléculas de péptido por nanopartícula, en este caso del D1, con otros trabajos realizados por nuestro laboratorio, esferas, prismas y nanovarillas más cortas, es posible observar una diferencia entre los tres sistemas comparados. En el caso de las esferas estas tenían un área superficial de 7235 nm² y 4800 moléculas de péptido y, en el caso de los prismas estos tenían un área de 8000 nm² y 1300 moléculas de D1¹¹³. Por otro lado, las nanovarillas de 30nm aproximadamente tenían un área superficial igual a 3267 nm² y un número de moléculas de D1 de 605⁸⁰. En el caso de las NVOs en NIR-II estas poseen un área superficial de 2177 nm² y, como se observa en la tabla 3, 3264 moléculas de péptido D1 con un error de ±1839 moléculas por NP. Comparando los sistemas es posible indicar que nuestras NVOs se encuentran en un término medio entre los otros nanosistemas. Adicionalmente, se debe

considerar la cantidad de PEG que se adhiere a cada sistema, por lo que como se observa en los ejemplos anteriores, poseer una amplia área superficial no garantiza una alta funcionalización de péptido.

Por lo expuesto anteriormente es posible indicar que tanto el péptido D1 como D3 se funcionalizan en cantidades similares a la NVO y que se encuentra dentro de lo esperado comparando con otros trabajos^{80,113}.

3.5 Análisis RAMAN/SERS de la interacción de los péptidos D1 y D3 con las NVOs.

Para estudiar la interacción entre los péptidos funcionalizados y las NVOs se procedió a realizar espectroscopia RAMAN/SERS. El fenómeno de RAMAN consiste en la dispersión inelástica de la luz monocromática, la cual interactúa con las vibraciones de las moléculas, sus fonones u otras formas de excitación del sistema produciendo un cambio de energía la cual entrega información de los modos fonónicos del sistema y en consecuencia puede identificar especies específicas de sus estructuras únicas (huella dactilar de cada especie). Sin embargo, la señal RAMAN es muy débil. Afortunadamente, se ha encontrado que algunas nanopartículas metálicas son capaces de aumentar estas señales alcanzando niveles casi comparables a fluorescencia¹¹⁴.

A continuación, se describirán las señales características para cada nanosistema y péptido para de esta manera poder vislumbrar su posicionamiento sobre la superficie de las NPs (**Figura 34**). En la **tabla 4** (ANEXO 14.1) se resumen

todas las señales RAMAN/SERS y sus asignaciones correspondiente las cuales están basadas en publicaciones anteriores de señales RAMAN/SERS del PEG y de los péptidos D1 y D3^{115–122}.

3.5.1 Espectro SERS de NVOs-PEG.

El espectro SERS del sistema NVOs-PEG muestra una banda de gran intensidad relativa alrededor de 255 cm^{-1} , correspondiente a la vibración de estiramiento Au-S y sustenta la interacción química entre el PEG y la superficie de la NP. La señal de baja intensidad relativa que se observa a los 803 cm^{-1} , se asigna a vibraciones del esqueleto del PEG, asignadas en la tabla 4 como “*Body*”. Por otro lado, una serie de señales de mayor intensidad relativa se observan en el rango 1100 a 1600 cm^{-1} y están asociadas a vibraciones de los grupos $-\text{CH}_2$ del polietilenglicol. En este sentido, existen regiones establecidas para diferentes modos vibracionales de este polímero: $1110\text{-}1150\text{ cm}^{-1}$ $-\text{CH}_2$ *twisting*; $1300\text{-}1370$ $-\text{CH}_2$ *wagging*; y $1370\text{-}1600$ $-\text{CH}_2\text{-CH}_2$ *anti-symmetric* y *symmetric bending*. Esta serie de señales características del PEG nos indicaría que efectivamente se encontraría en la superficie de la NP de oro.

3.5.2 Espectro RAMAN de D1 (qshyrhispaqv).

La banda fuerte a 811 cm^{-1} se atribuye a una vibración $-\text{CCN}$ de la tirosina (Y), que también está acompañada por dos señales adicionales a 1297 y 645 cm^{-1} asignadas a deformaciones $-\text{CH}$ y $-\text{COH}$, respectivamente. La intensidad de la

señal a 811 cm^{-1} sugiere la posibilidad de una vibración acoplada de tirosina (Y) y alanina (A). Respecto del último aminoácido, se observa una segunda banda débil a 609 cm^{-1} , que se asigna a vibraciones fuera del plano del grupo carboxilato. Por otro lado, la histidina (H) se identifica mediante su banda característica a los 710 cm^{-1} . La señal ubicada a los 408 cm^{-1} se asocia a la deformación que sufre la fracción estructural $-\text{CN}$ de los aminoácidos en D1. Finalmente, la arginina (R) también muestra bandas asociadas a diversos modos vibracionales a 965 y 916 cm^{-1} , con una intensidad relativa débil.

3.5.3 Espectro SERS de NVOs-PEG-D1.

Basado en el cambio del perfil espectral de D1 con respecto al mismo, pero en las NPs, es posible asegurar una interacción entre el péptido y las nanovarillas. En este sentido, la intensidad relativa del espectro del NVOs-PEG-D1 da cuenta de esto en concordancia con las reglas de selección SERS¹²³. Este cambio de intensidades se debe a que el espaciador PEG impide que el péptido logre acercarse considerablemente a la superficie de las NPs. Un dato adicional que ayuda a soportar esto es un hombro visible a 288 cm^{-1} en el espectro de la **figura 33** que, originalmente, se observaba en el espectro de D1 a 272 cm^{-1} demostrando la modificación conformacional que ha sufrido el péptido. Por otro lado, la señal de tirosina (Y) que sufre un corrimiento desde 645 a 635 cm^{-1} y que a su vez sufre una disminución en su intensidad relativa, es otra prueba que este aminoácido no se encuentra en las cercanías de la superficie nanoestructurada y que al mismo tiempo

ha sufrido modificaciones en sus parámetros geométricos como consecuencia del entorno químico que entrega el PEG.

3.5.4 Espectro RAMAN de D3 (rprtrlhthrn).

El espectro Raman de D3 es más bien simple, con pocas señales y baja intensidad relativa que puede ser atribuido a la poca cantidad de aminoácidos que se repite en el péptido no, así como ocurre en el espectro Raman del péptido D1. Una de las señales características es a 440 cm^{-1} y se atribuye a una vibración de deformación del esqueleto del péptido, al igual que aquella señal que aparece a los 418 cm^{-1} . Adicionalmente, una cantidad importante de señales se acoplan con vibraciones entre dos o tres aminoácidos, principalmente His y Arg. a 951 y 976 cm^{-1} , así como una tercera y cuarta señal que se observa a 1138 y 1442 cm^{-1} .

3.5.5 Espectro SERS de NVOs-PEG-D3.

El espectro SERS de D3 se encuentra dominado por señales con intensidad considerable a 492 , 957 , 1065 , 1282 , 1482 y 1537 cm^{-1} . De estas señales, aquellas que aparecen a los 957 y 1482 cm^{-1} están asociadas al grupo guanidina de la Arginina. La intensidad relativa de estas señales corrobora su cercanía y, por lo tanto, su afinidad a la superficie. También es posible observar que señales asignadas a vibraciones de Prolina son amplificadas y visibles en este espectro, no así en el D3 solo, es por ello por lo que observamos la banda a 1282 cm^{-1} , asociadas a deformaciones de Pro. Adicionalmente, el aminoácido His,

próximo a Arg, también se observa en el espectro SERS a los 1537 y a los 1167 cm^{-1} . El análisis de las señales mencionadas nos ayuda a corroborar la preferencia de aminoácidos con grupos *R*, cargados positivamente, a interaccionar con la superficie de las NPs, en este caso particular (H) y (R). Para más detalle de todas las señales RAMAN/SERS pueden ser observadas en el ANEXO 14.1.

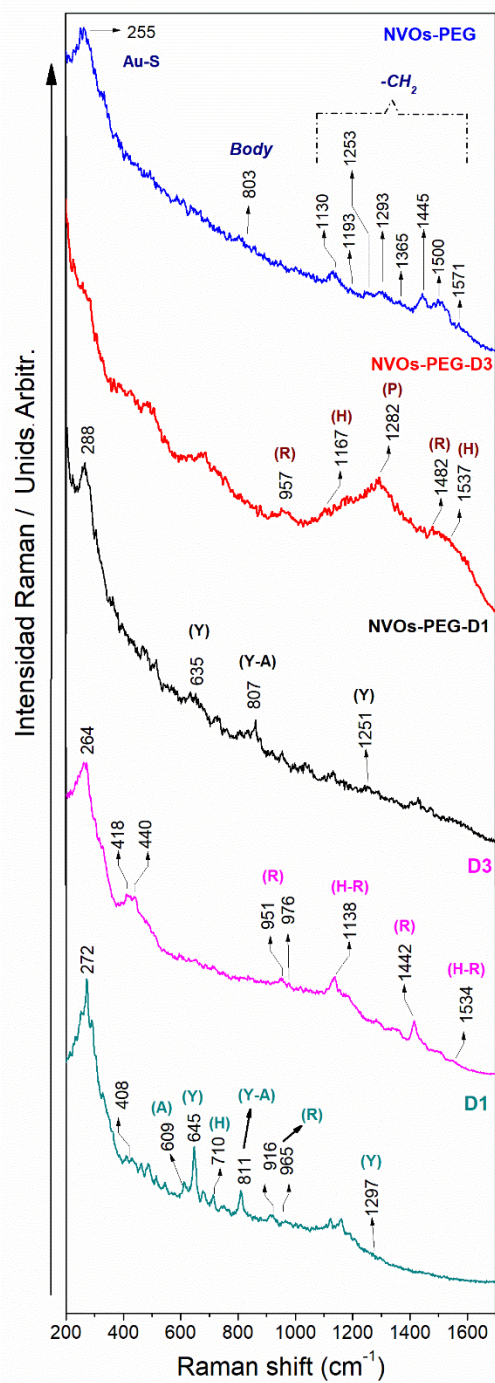


Figura 34: Espectros RAMAN de los péptidos D1 (verde) y D3 (lila) y SERS de NVOs-PEG (azul), NVOs-PEG-D1 (negro) y NVOs-PEG-D3 (rojo) con sus señales más significativas.

De esta forma fue posible corroborar la presencia de los péptidos D1 y D3 en la superficie de las NVOs y adicionalmente, visualizar cómo estas se encontrarían

dispuestas sobre ellas, en donde gracias a las intensidades y aparición de señales se observó que el péptido D1 estaría más alejado de la superficie del oro en comparación con el péptido D3, el cual estaría más cercano a la misma (**Figura 35**).

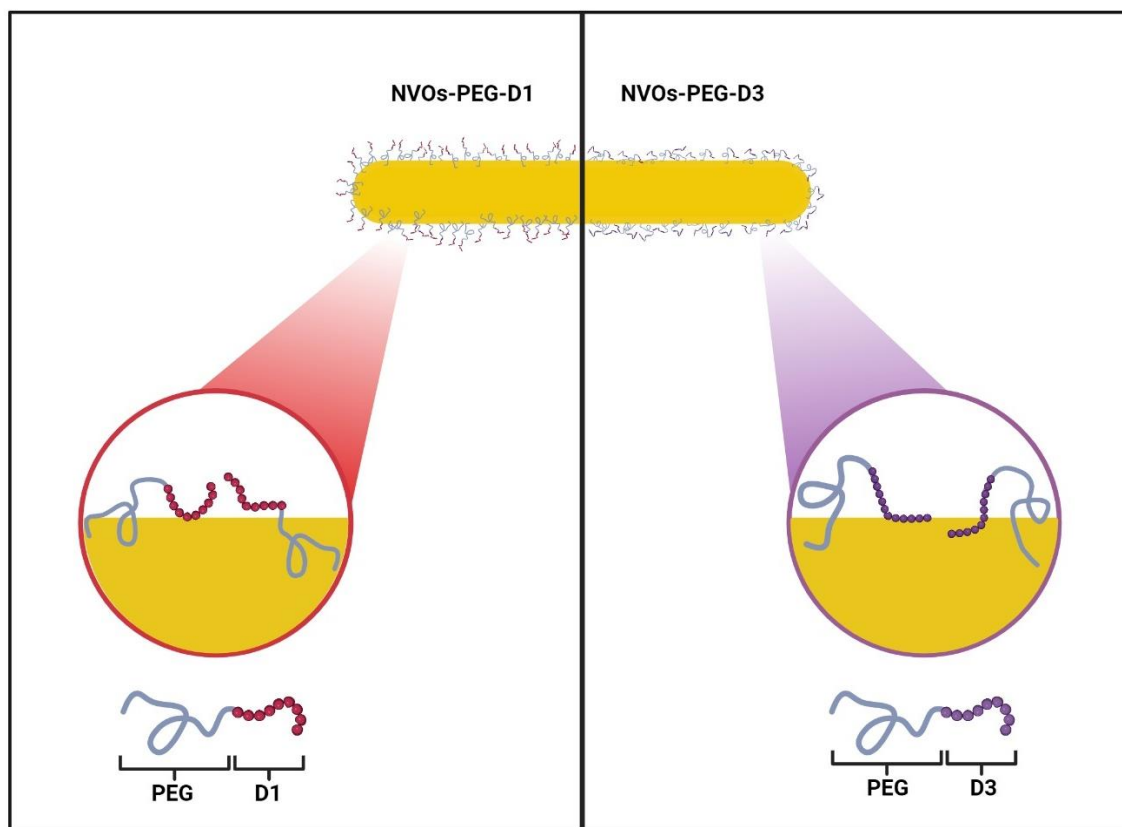


Figura 35: Representación esquemática de la posible disposición de ambos péptidos sobre la superficie de las NVOs (rojo: D1; morado: D3).

**CAPÍTULO IV: ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES FOTOTÉRMICAS DE LAS
NVOs.**

4.1 Propiedades Fototérmicas de las NVOs.

4.1.1 Estudio del efecto fototérmico a diferentes potencias de láser sobre las NVOs-PEG.

La capacidad de transformar o de convertir la luz incidente en calor fue estudiada a diferentes potencias de láser en NIR-II (1064 nm) (100-120-130-140-145-150-200mW) a una concentración de 8.61×10^{-12} mol/L en una cámara oscura, utilizando el láser de 1064 nm (Power Technology). Es posible observar que a medida que aumentamos la potencia de láser la temperatura aumenta significativamente desde los 140mW de potencia, en donde el máximo alcanzado se logró a 200mW aumentando 20°C aproximadamente desde su temperatura inicial, alcanzando así los 51°C a los 10 minutos de ser irradiada la muestra cómo se observa en la **figura 36**. Comparando los resultados obtenidos con otras NVOs en NIR-I (808 nm) podemos observar una ventaja en aumento de temperatura y tiempo de irradiación. Por ejemplo, es posible encontrar un ΔT° de hasta 35°C , pero en un tiempo de 40 minutos de irradiación⁹⁰. También encontramos ΔT° de 34°C en 2 minutos con la diferencia de que la potencia de láser utilizado es mayor (3.9W) a lo utilizado en nuestro trabajo¹²⁴. Por otro lado, si comparamos con NVOs en NIR-II (1064 nm) podemos observar trabajos con un aumento de temperatura de 38.1°C en un tiempo de 20 minutos y a una densidad de potencia de $1\text{W}/\text{cm}^2$ ²⁵⁵ y, por otro lado, a la misma potencia de láser, pero a una concentración de $200\mu\text{g}/\text{mL}$ de nanosistema otro trabajo reportó un aumento de temperatura desde 14°C hasta 32.4°C en 10 minutos¹²⁵. Estos antecedentes indican que nuestro nanosistema se

encontraría en un rango similar a lo reportado.

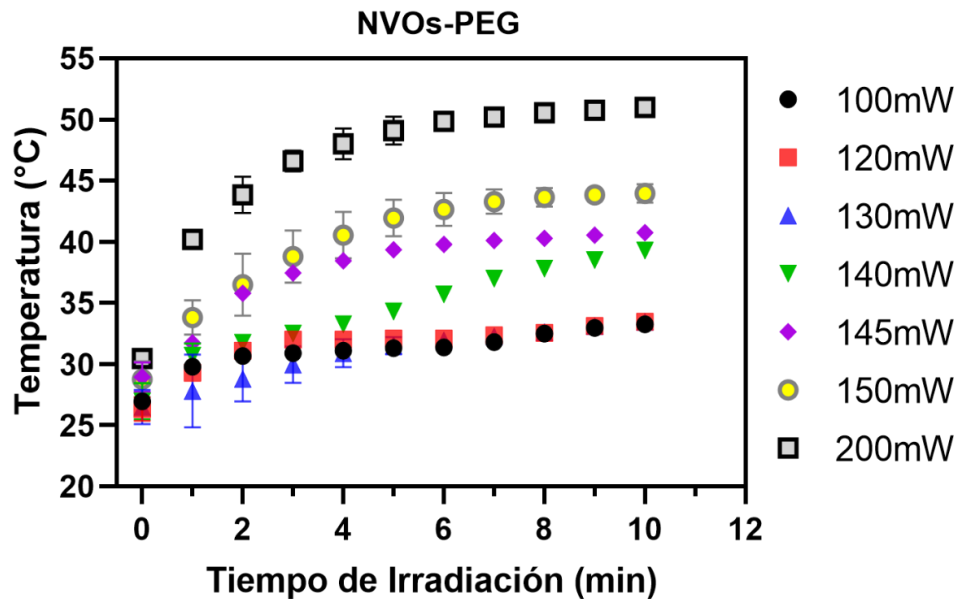


Figura 36: Aumento de la temperatura de NVOs-PEG luego de irradiación NIR-II (1064nm) a diferentes potencias de láser (****P <0,0001) n=3.

4.1.2 Estudio del efecto fototérmico a diferentes potencias de láser sobre las NVOs-PEG.

Como se puede observar en las **figuras 37-38** ambas potencias de láser alcanzan temperaturas elevadas en tiempos relativamente cortos. En el caso de la potencia a 135mW la irradiación fue continua por 20 minutos iniciando a una temperatura de 36.5°C para el sistema NVOs-PEG-D1 y aumentando 6.3°C hasta alcanzar una temperatura de 42.8°C y para el sistema NVOs-PEG-D3 la temperatura final fue de 43.8°C, siendo el aumento total de 7.3°C no mostrando una diferencia significativa con el primer sistema (**Figura 37**). Cabe mencionar que la temperatura inicial de todos los sistemas fue de 36.6° con el objetivo de imitar la

temperatura en condiciones fisiológicas.

Posteriormente se procedió a reducir el tiempo de irradiación de las muestras por lo que la potencia de láser fue aumentada a 350mW y el tiempo fue acortado a 1 minuto. La **figura 38** muestra que, para los tres sistemas, el tiempo se redujo a 60 segundos de irradiación llegando hasta 49°C en el caso del sistema NVOs-PEG, 46.4°C para las NVOs con D1 y 45.4°C para las nanovarillas con D3, iniciando desde 33°C aproximadamente en este caso.

La reducción del tiempo de irradiación y el aumento de la potencia fueron pensados para exponer lo menos posible al individuo a la irradiación. Por lo que, tomando ventaja de la mayor penetración y menor daño del tejido del NIR-II en comparación al NIR-I, esta ventana asoma como una alternativa para tratamiento por sobre la primera ventana biológica. Ambos sistemas presentan un aumento de temperatura sobre o al límite de los 43°C, temperatura que empieza a ser dañina para el organismo vivo, en menos tiempo y a menor potencia en comparación con otros trabajos publicados anteriormente^{55,126,127} o en comparación con el láser en NIR-I (808 nm)^{73,128,129}.

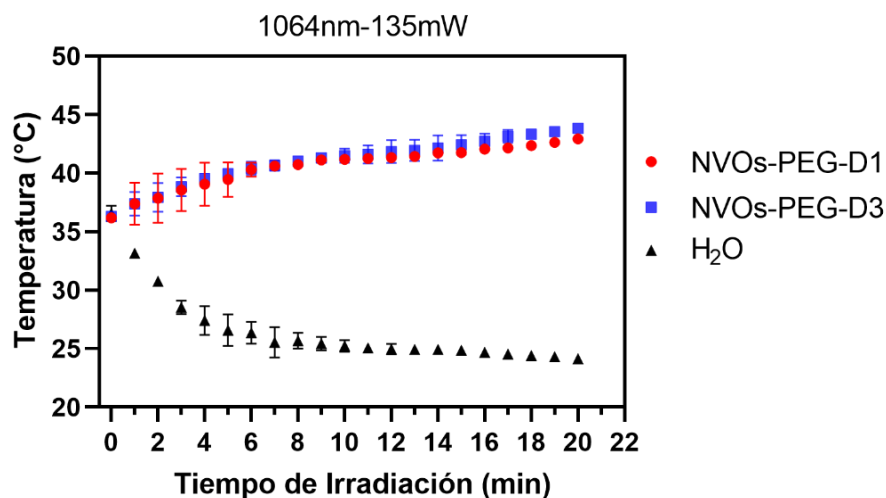


Figura 37: Aumento de la temperatura de NVOs-PEG-D1 (rojo) y NVOs-PEG-D3 (azul) luego de irradiación NIR-II (1064nm) a una potencia de 135mW. En negro control de H₂O (**P <0,0001) n=3 (todos los estudios iniciaron desde 37°C).

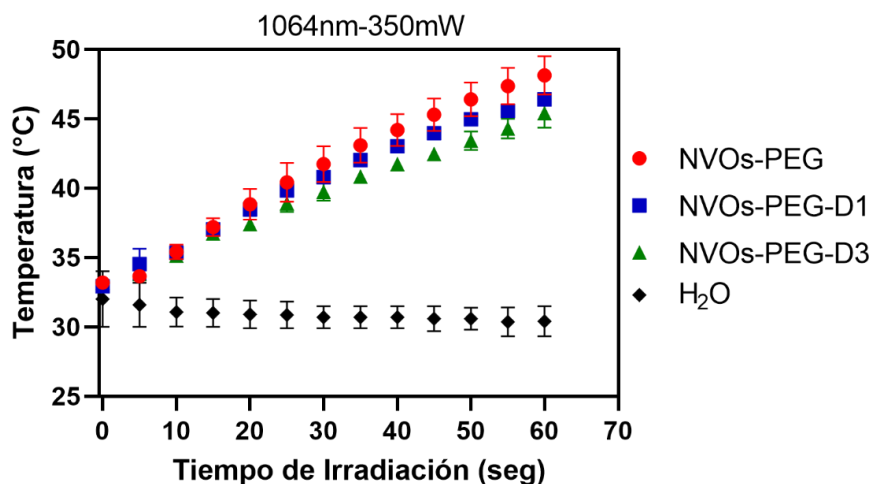


Figura 38: Aumento de la temperatura de NVOs-PEG (rojo), NVOs-PEG-D1 (azul) y NVOs-PEG-D3 (verde) luego de irradiación NIR-II (1064nm) a una potencia de 350mW. En negro control de H₂O (**P <0,0001) n=3 (todos los estudios iniciaron desde 34°C).

Como se indicó anteriormente uno de los parámetros, sino el más importante, para evaluar el efecto fototérmico de las NPs es su eficiencia fototérmica (η_T) la cual puede ser obtenida mediante la ecuación (4).

$$\eta_T = \frac{hA(T_{max} - T_{room}) - Q_0}{I(1 - 10^{A\lambda})} * 100 \quad (4)$$

En la **tabla 4** se muestran las eficiencias fototérmicas calculadas para cada potencia de láser medidas en el nanosistema de NVOs-PEG.

Tabla 4: Eficiencia fototérmica para diferentes potencias de láser para NVOs-PEG.							
Potencia (mW)	T_{max} (K)	T_{surr} (K)	Delta (K)	A (1064nm)	Q_o (W)	h (W*m⁻²*K⁻¹)	η_T (%)
100	306,5	300,2	6,3	0,7116	5,64x10 ⁻⁰⁴	1,29 x10 ⁻⁰²	31
120	306,6	299,5	7,15	0,7116	7,46x10 ⁻⁰⁴	1,30 x10 ⁻⁰²	29
130	306,6	299,4	7,25	0,7116	1,13x10 ⁻⁰³	1,54 x10 ⁻⁰²	33
135	317,05	306,45	10,6	0,3122	1,20x10 ⁻⁰³	1,03 x10 ⁻⁰²	49
140	312,5	300,2	12,3	0,7116	2,14x10 ⁻⁰³	1,39 x10 ⁻⁰²	45
145	314,0	302,2	11,8	0,7116	2,37x10 ⁻⁰³	2,23 x10 ⁻⁰²	70
150	317,2	302,0	15,2	0,7116	2,70x10 ⁻⁰³	2,69 x10 ⁻⁰²	100*
200	324,2	303,7	20,5	0,7116	3,20x10 ⁻⁰³	2,39x10 ⁻⁰²	93
350	318,6	309,6	9,05	0,3122	6,72x10 ⁻⁰⁴	7,79x10 ⁻⁰²	100*

(*Sobre el límite)

Adicionalmente se realizó la irradiación de las nanopartículas sin PEGilar para observar si esta influía de alguna manera en el aumento de temperatura de las nanopartículas. Lo que se puede observar en la **figura 39** es que ambas potencias de láser 135mW (superior) y 350mW (inferior) muestran incluso un mayor aumento de la temperatura, demostrando así que el entorno de la nanopartícula, en este caso lo que se encuentra unida a ella, influye directamente en la transferencia de calor hacia el medio.

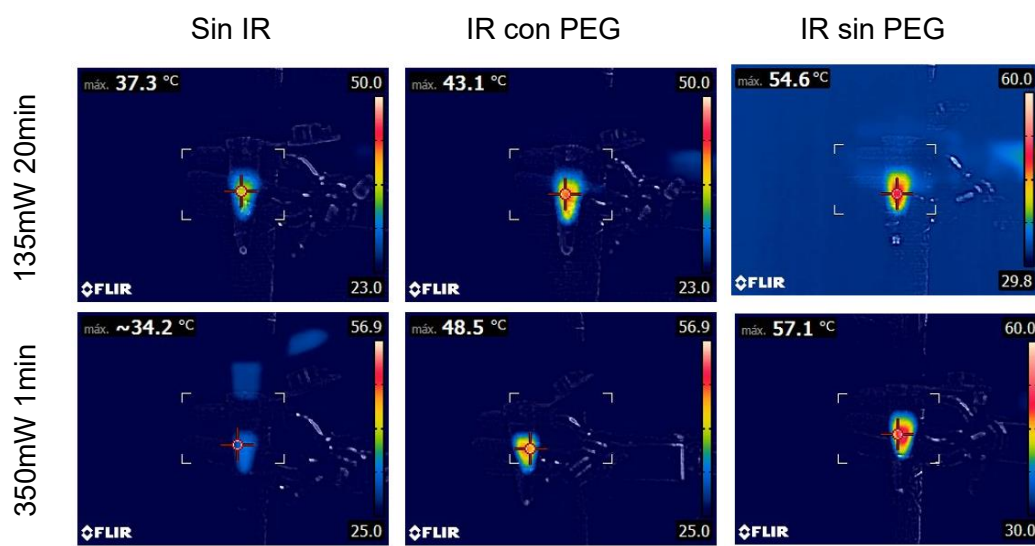


Figura 39: Imagen infrarroja de: superior de izquierda a derecha NVOs sin irradiar, NVOs-PEG luego de irradiar 20 minutos a 135mW, NVOs sin PEG luego de irradiar 20 minutos a 135mW e inferior mismo orden NVOs sin irradiar, NVOs-PEG luego de irradiar 1 minuto a 350mW y NVOs sin PEG luego de irradiar 1 minuto a 350mW.

El estudio fototérmico demostró la alta eficiencia que poseen las nanopartículas sintetizadas para transformar la irradiación incidente en calor y que esta se mantiene luego de funcionalizarlos con los péptidos D1 y D3. Adicionalmente, fue posible acortar el tiempo de irradiación de 20min. a 1min. Al aumentar la potencia del láser de 135mW hasta 350mW. Cabe mencionar que para estudios fototérmicos en primera ventana biológica el tiempo de irradiación es elevado, llegando incluso a irradiaciones de hasta 1 hora, por lo que la obtención de sistemas en dónde el tiempo sea el menor posible sería un avance importante en futuros tratamientos para el Alzheimer. Por lo que nuestro sistema de NVOs con plasmón en la segunda ventana biológica con tiempos de irradiación de 1 minuto y potencias bajas, como lo es 350mW, se posiciona como una alternativa prometedora para su uso en teranosis.

4.1.3 Estudio de estabilidad fototérmica de las nanopartículas después de irradiación con láser a 1064 nm de los sistemas funcionalizados.

Para tener un estudio completo del efecto fototérmico de las nanopartículas se realizó un análisis de estabilidad y un perfil de enfriamiento en ambas potencias de láser utilizadas (**Figura 40**).

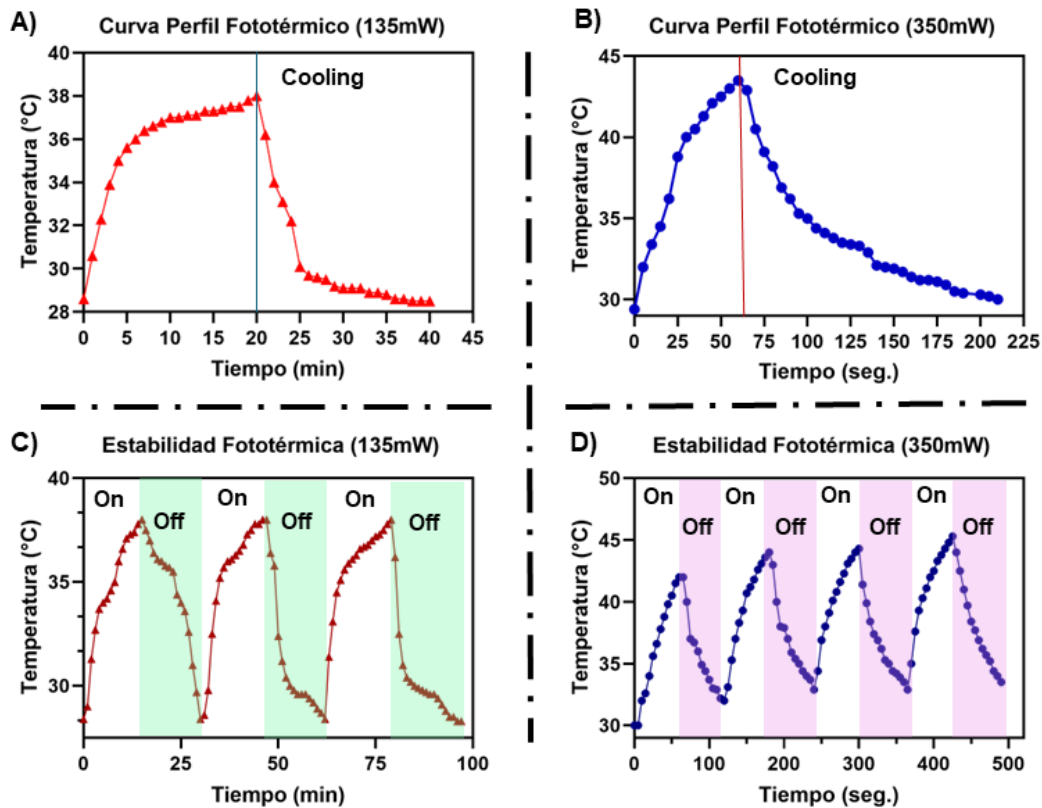


Figura 40: A-B) Curva del perfil fototérmico para ambas potencias de láser 135mW y 350mW respectivamente. C-D) Ciclos de On/Off para estabilidad fototérmica de ambas potencias de láser 135-350mW.

Como se puede observar en las **figura 40A-B** la curva del perfil fototérmico en ambos casos muestra un aumento de temperatura significativo, como se observó anteriormente (**Figura 37-38**). En el caso de la irradiación a 350mW se observa un

aumento mucho más rápido, en tan solo 1 minuto, y una caída más paulatina pero igual de rápida en comparación a la irradiación a 135mW demostrando de esta manera su ventaja sobre una menor potencia, estos perfiles se encuentran en concordancia con otros trabajos sobre NVOs^{61,130,131}. Por otro lado, la estabilidad fototérmica de los sistemas fue comprobada por medio de los ciclos On/Off de calentamiento y enfriamiento. Como se puede observar en las **figuras 40C-D** en ambos casos no se observa cambios considerables en el máximo de temperatura y tampoco en el proceso de enfriamiento, demostrando una alta estabilidad fototérmica en ambas potencias de láser, estabilidad consistente con otros estudios sobre NVOs^{127,130,132,133}. De esta manera es posible confirmar la estabilidad fototérmica de nuestras NVOs para futuras aplicaciones en terapia.

4.1.4 Estudio de estabilidad de las nanopartículas después de irradiación con láser a 1064 nm de los sistemas funcionalizados.

Como se puede apreciar de la **figura 41**, luego de la irradiación se observa un leve corrimiento hipsocrómico del plasmón longitudinal y un aumento, igual leve, en la intensidad del plasmón transversal. También se observa la aparición de un leve hombro alrededor de los 600 nm. Estos cambios podrían suponer la aparición de algún agregado de nanovarillas o un cambio en la morfología de estas mismas por lo que se procedió a analizar las imágenes TEM de los sistemas completos de nanovarillas irradiados (flechas verdes) y no irradiadas (flechas rojas) en la **figura 42** y no fue posible observar cambios morfológicos en las NVOs.

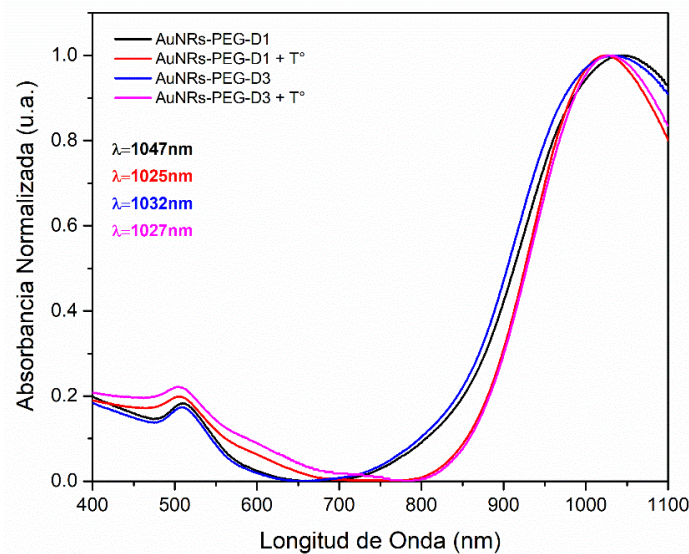


Figura 41: Espectro UV-Vis-NIR de NVOs-PEG-D1 y NVOs-PEG-D3 antes y después de irradiación a 1064nm.

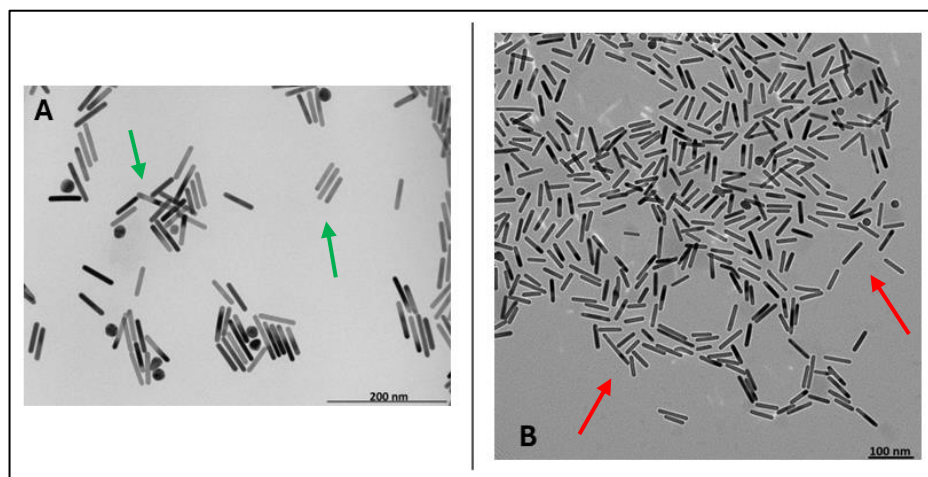


Figura 42: Imagen STEM y TEM de A) NVOs-PEG sin irradiar y B) NVOs-PEG irradiadas a 1064nm a 350mW.

El DLS y potencial ζ (**Tabla 5**) no mostraron cambios significativos entre los sistemas sin irradiación e irradiados. De esta manera es posible indicar que nuestros sistemas son lo bastante estables luego de irradiarlos en NIR-II.

Tabla 5: Diámetro hidrodinámica y potencial ζ de NVOs-PEG-D1 y NVOs-PEG-D3 antes y después de irradiar.

Nanosistema	Dh Transversal (nm)	Dh Longitudinal (nm)	pζ (mV)
NVOs-PEG-D1	7 \pm 0,2	95 \pm 12	-11 \pm 0,8
NVOs-PEG-D1 + T°	8 \pm 0,7	98 \pm 12	-7 \pm 2,5
NVOs-PEG-D3	9 \pm 0,7	104 \pm 19	-4 \pm 1,0
NVOs-PEG-D3 + T°	9 \pm 0,8	135 \pm 11	-4 \pm 0,5

**CAPÍTULO V: ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN Y DESAGREGACIÓN DE LOS
AGREGADOS DE β -AMILOIDE CON Y SIN IRRADIACIÓN.**

5.1 Formación de las especies solubles e insolubles del péptido A β .

Para la formación de los oligómeros y fibras de β -amiloide se procedió con la metodología descrita en el punto 2.4. Las imágenes TEM, obtenidas mediante microscopio Talos F200C G2 utilizando micro grillas de cobre recubiertas de carbón Formvar de la **figura 43**, muestran las especies solubles e insolubles respectivamente de agregados de β -amiloide. En ellas se aprecian morfologías de oligómeros (A) y fibras (B) con un tamaño aproximado de 15 nm y ~176 nm respectivamente.^{134,135}

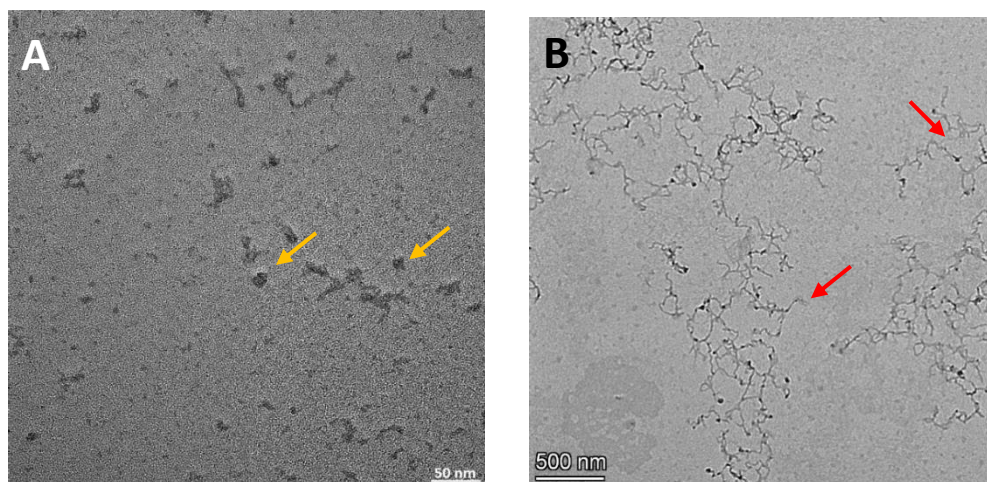


Figura 43: Imágenes TEM de especies solubles de A β ₁₋₄₂ **A)** oligómeros, **B)** fibras de A β ₁₋₄₂.

Gracias a las imágenes obtenidas fue posible observar la formación de ambas especies, las cuales posteriormente fueron utilizadas para los estudios de desagregación e inhibición de estos agregados de A β ₁₋₄₂. Sin embargo, no es posible tener un control total de las especies formadas y de sus tamaños durante la experimentación.

5.2 Evaluación de la Inhibición y Desagregación del péptido A β .

El estudio de la inhibición y desagregación se llevó a cabo en dos partes. La primera parte consistió en evaluar solamente la inhibición del péptido A β sin y con irradiación a ambas potencias de láser 135 y 350mW incubando con ambos nanosistemas, NVOs-PEG-D1 y NVOs-PEG-D3. A modo de control, se realizó el mismo procedimiento para el β -amiloide solo y el mismo incubado sólo con las NVOs-PEG. La segunda parte consistió en realizar los mismo grupos y controles, pero estudiando la desagregación del péptido A β . Para evaluar la efectividad de la inhibición o desagregación de nuestros nanosistemas se llevó a cabo para cada control y grupo el ensayo de tioflavina T (Th-T) como se mencionó anteriormente en la metodología (**Figura 20**).

5.2.1 Evaluación de la Inhibición y Desagregación del péptido A β a potencia de 135mW con los nanosistemas NVOs-PEG-D1 y NVOs-PEG-D3.

Para la evaluación de inhibición de fibras se procedió a incubar los nanosistemas a estudiar por 72 horas con solución de A β ₁₋₄₂ con y sin irradiar previamente como se observa en la **figura 44**. Los resultados se observan en la **figura 45**.



Figura 44: Esquema del estudio de inhibición sin irradiar y con irradiación láser de 1064nm.

Como se puede observar el péptido D1 ($0.2\mu\text{M}$) por sí solo, con y sin irradiación no produce una disminución de fluorescencia, por lo que no es capaz de inhibir la formación de fibras de β -amiloide. Este resultado es esperable ya que por estudios realizados por nuestro laboratorio los efectos sobre $A\beta_{1-42}$ se comienzan a observar a concentraciones sobre $0.5\mu\text{M}$ ¹³⁶. Por otro lado, el sistema NVOs-PEG-D1 con irradiación tiene un efecto sobre la formación de fibras alcanzando un 72% menos de fluorescencia que el control y sin irradiar la disminución de la fluorescencia solo alcanza un 46%. En el caso del sistema estudiado con D3 se puede observar que no hay cambios con el péptido sólo y tampoco es posible observar una disminución de la fluorescencia para ninguno de los sistemas irradiados estudiados, exceptuando el sistema completo NVOs-PEG-D3 que disminuyó su fluorescencia en un 60%. Cabe mencionar que cada sistema es comparado con su control de $A\beta$ correspondiente (irradiado y sin irradiar).

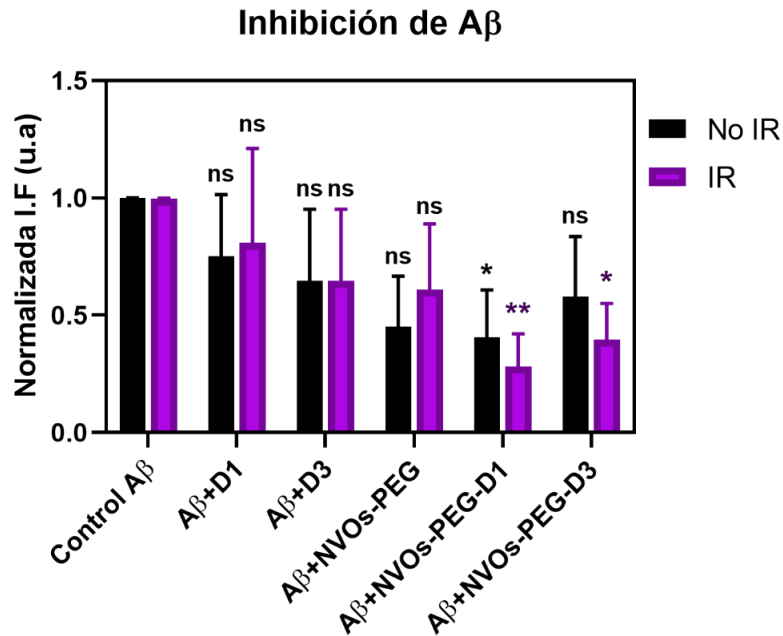


Figura 45: Ensayo de Thioflavina-T luego de 24 hora de incubación para las siguientes especies solubles de A β_{1-42} , A β_{1-42} + D1/D3, A β_{1-42} + NVOs-PEG y A β_{1-42} + NVOs-PEG-D1/D3 para inhibición a 135mW. Todos los sistemas fueron comparados con el control de A β (**P= 0.0068; *P= 0.0306 one-way ANOVA diferencia con el control) (n=6).

Por otro lado, los resultados obtenidos luego de 24 horas de incubación para el estudio de desagregación con y sin irradiación (esquema en **figura 46**) se muestran en la **figura 47**.

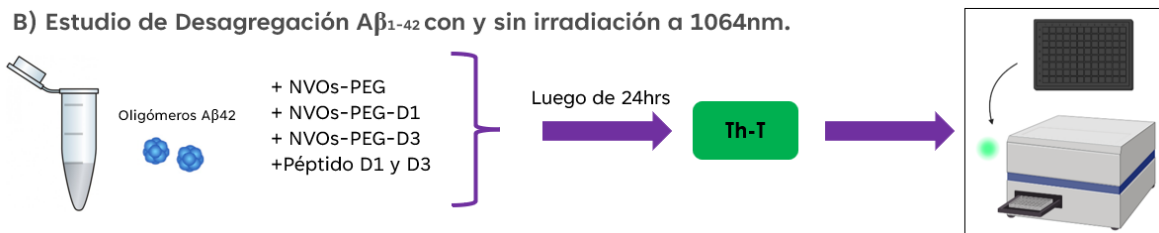


Figura 46: Esquema del estudio de la desagregación sin irradiar y con irradiación láser a 1064nm.

Se puede apreciar una disminución significativa para los tres sistemas irradiados, péptido D3, NVOs-PEG, NVOs-PEG-D1 y NVOs-PEG-D3, alcanzando

disminuciones de fluorescencia de 46%, 79%, 56% y 79% respectivamente. Estos resultados nos corroboran que es el efecto de las nanopartículas durante la irradiación y su aumento de la temperatura lo que produce un mayor efecto de desagregación sobre las fibras de β -amiloide y que aparentemente poseen un efecto sinérgico una vez funcionalizadas con los péptidos respectivos. Por otro lado, el estudio de desagregación sin irradiación no mostró cambios significativos con el control exceptuando el sistema NVOs-PEG-D1 el cual tuvo una disminución de un 70,4%, lo que es concordante con lo descrito en literatura sobre el péptido D1 y su preferencia de interacción con fibras de $A\beta_{1-42}$ y efecto de desagregación sobre ellas pero que luego de 24 horas su efecto comienza a disminuir ⁸⁰.

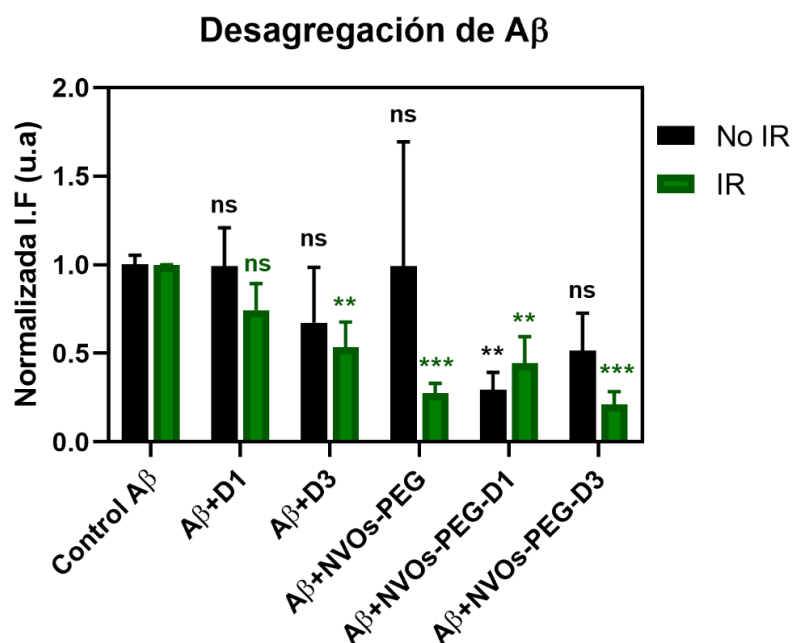


Figura 47: Ensayo de Thioflavina-T luego de 24 hora de incubación para las siguientes especies solubles de $A\beta_{1-42}$, $A\beta_{1-42}$ + D1/D3, $A\beta_{1-42}$ + NVOs-PEG y $A\beta_{1-42}$ + NVOs-PEG-D1/D3 para desagregación a 135mW. Todos los sistemas fueron comparados con el control de $A\beta$. (**P= 0.0050; ***P= 0.0004; ****P= <0.0001 one-way ANOVA diferencia con el control) (n=6).

Con lo observado anteriormente es posible indicar que en el caso de la inhibición los sistemas que presentan una menor disminución de fluorescencia son aquellos que fueron irradiados lo que demostraría la efectividad de esta con respecto a los sistemas sin irradiar. Adicionalmente, el efecto de la disminución de fluorescencia del nanosistema NVOs-PEG-D1 tanto en inhibición y desagregación sin irradiar puede verse atribuido a la disposición del péptido D1 sobre la superficie de la nanopartícula como se puede inferir a partir de los espectros SERS (apartado 3.5), el cual indicaría una mayor disposición hacia fuera de la superficie lo que se traduciría en un mayor contacto con el A β en comparación al péptido D3 el cual estaría dispuesto mayormente sobre la superficie de la nanopartícula.

5.2.2 Evaluación de la Inhibición y Desagregación del péptido A β a potencia de 350mW con los nanosistemas NVOs-PEG-D1 y NVOs-PEG-D3.

La principal diferencia entre este estudio y el anterior, a parte de la potencia utilizada, es la disminución del tiempo de irradiación de las muestras de 20 minutos a 1 minutos. La **figura 48** nos muestra los resultados del ensayo de inhibición de A β . Se puede observar que ninguno de los sistemas sin irradiar presenta cambios significativos en su fluorescencia con respecto al control exceptuando el sistema NVOs-PEG-D1 el cual presenta una disminución de alrededor de un 46%. Esto podría deberse a la cantidad de péptido funcionalizado a la nanopartícula, que en el caso del péptido D1 (3264 moléculas) es mayor que la del péptido D3 (2065 moléculas). En el caso de los sistemas con irradiación todos los sistemas menos el

péptido D3 presento disminución significativa en su fluorescencia. Los nanosistemas de NVOs-PEG-D1 y NVOs-PEG-D3 tuvieron una disminución de un 60% y 40% respectivamente y el péptido D1 libre en un 46%, en el caso de las NVOs-PEG estas disminuyeron en un 82% su fluorescencia en comparación al control siendo esta la más alta de todos los sistemas, pero no significativa al comparar con los dos nanosistemas antes mencionados.

Realizando una comparación del efecto inhibitor del estudio a 135mW y 350mW de potencia es posible indicar que hay una diferencia significativa entre ambas. En primer lugar, para el sistema NVOs-PEG-D1 se obtuvo una disminución de hasta un 60%, algo menor al 72% de la irradiación a 135mW, pero no significativas entre sí al comparar, la diferencia es que a 350mW el tiempo de irradiación fue de 1 minuto comparado a los 20 minutos de la última, demostrando una ventaja significativa por sobre la de menor potencia de irradiación. Por otro lado, el nanosistema de NVOs-PEG-D3 demostró en ambos casos disminución de fluorescencia siendo mayor a 135mW que a 350mW de potencia, pero no significativas entre sí, 60% y 40% respectivamente. Una diferencia observada durante el ensayo es que a irradiación con potencia de 350mW el sistema de NVOs-PEG tiene efecto significativo a diferencia de la irradiación a 135mW, la cual no tiene siendo ésta bastante elevada, corroborando nuevamente que es el efecto fototérmico de la nanopartícula al ser irradiada la que mayor efecto tiene sobre la disminución de fluorescencia.

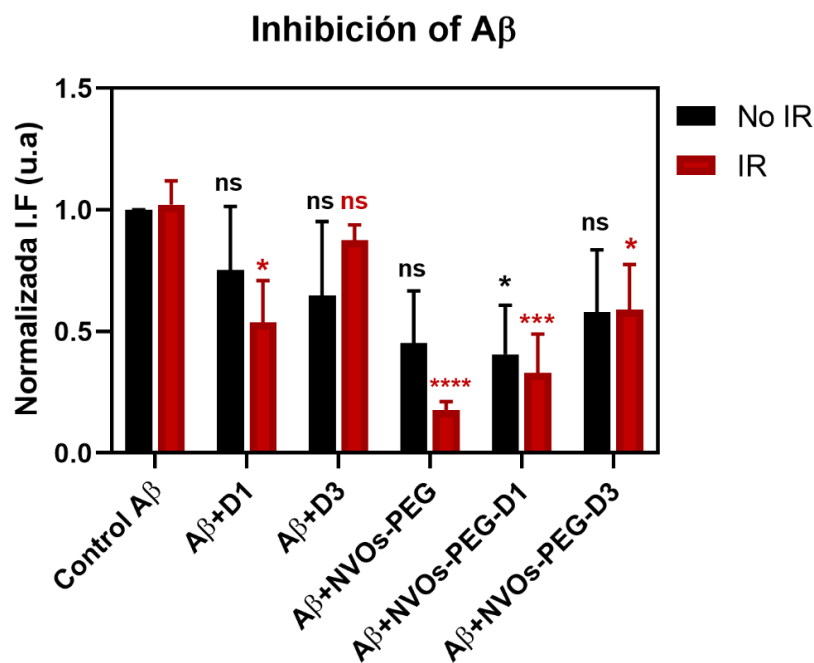


Figura 48: Ensayo de Thioflavina-T luego de 24 hora de incubación para las siguientes especies solubles de A β_{1-42} , A β_{1-42} + D1/D3, A β_{1-42} + NVOs-PEG y A β_{1-42} + NVOs-PEG-D1/D3 para inhibición a 350mW. (**P= 0.0050; ***P= 0.0004; ****P= <0.0001 one-way ANOVA diferencia con el control) (n=6).

Teniendo en consideración que los controles sin irradiación son los mismos para ambas comparaciones (135mW y 350mW) y estos fueron mencionados en el primer estudio esta sección se enfocará en los resultados obtenidos luego de la irradiación.

En la **figura 49** se puede observar, para los sistemas con D1, que todos aquellos irradiados tienen una disminución de fluorescencia, para el péptido libre esta fue de 66% y para el sistema NVOs-PEG-D1 este alcanzó hasta un 86% en disminución de fluorescencia con respecto al control. En el caso del estudio de los sistemas con el péptido D3, se observó un resultado parecido al del péptido D1, en donde el péptido libre disminuyó su fluorescencia en un 62% y el nanosistema en

un 93%. Finalmente, para el caso del sistema de NVOs-PEG también se observó una disminución significativa llegando a un 85% con respecto al control.

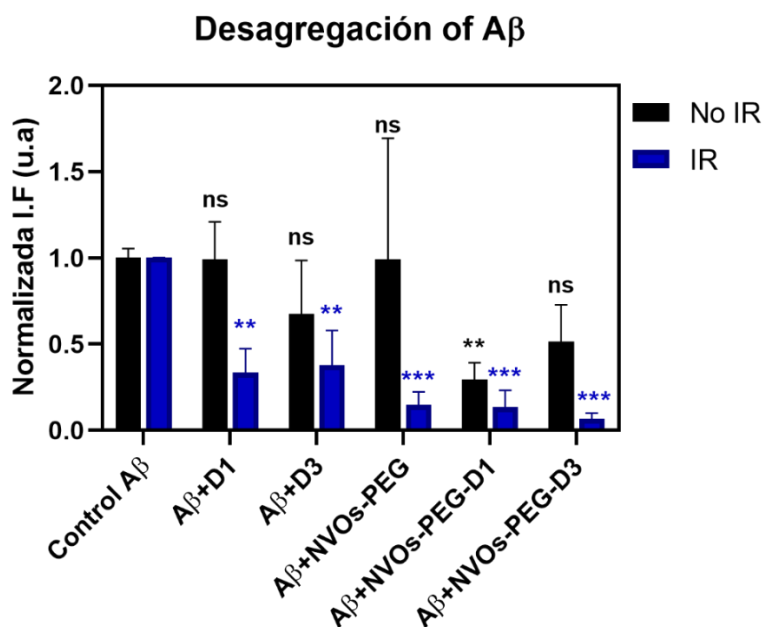


Figura 49: Ensayo de Thioflavina-T luego de 24 hora de incubación para las siguientes especies solubles de A β_{1-42} , A β_{1-42} + D1/D3, A β_{1-42} + NVOs-PEG y A β_{1-42} + NVOs-PEG-D1/D3 para desagregación a 350mW. (**P= 0.0050; ***P= 0.0004; ****P= <0.0001 one-way ANOVA diferencia con el control) (n=6).

Una característica observable durante el estudio fue el hecho de que los sistemas sin irradiar, al momento de estudiar la desagregación, poseían leves aumentos de fluorescencia por sobre el control o disminuciones no significativas. Esto puede deberse en el caso del péptido libre a la baja concentración de éstos para producir un efecto neto sobre los agregados de A β_{1-42} y en el caso de los sistemas con PEG fue reportado que puede fomentar la agregación de fibras de β -amiloide y por otro lado producir un efecto de inhibición a la formación de las mismas gracias a los átomos de oxígenos presentes en el PEG que pueden estar

interactuando con la cadena lateral polar mediante puente de hidrogeno o por el extremo hidrofóbico por interacción π o interacción de *van der Waals*^{56,137} Por otro lado el aumento de temperatura que se genera al irradiar el control, es lo suficientemente alta para promover la formación de fibras de β -amiloide, pero no para producir una desagregación de las ya formadas¹³⁸⁻¹⁴⁰.

Adicionalmente, se realizaron estudios de la morfología del β -amiloide luego de su irradiación mediante TEM y STEM los cuales se pueden observar en la **figura 50**.

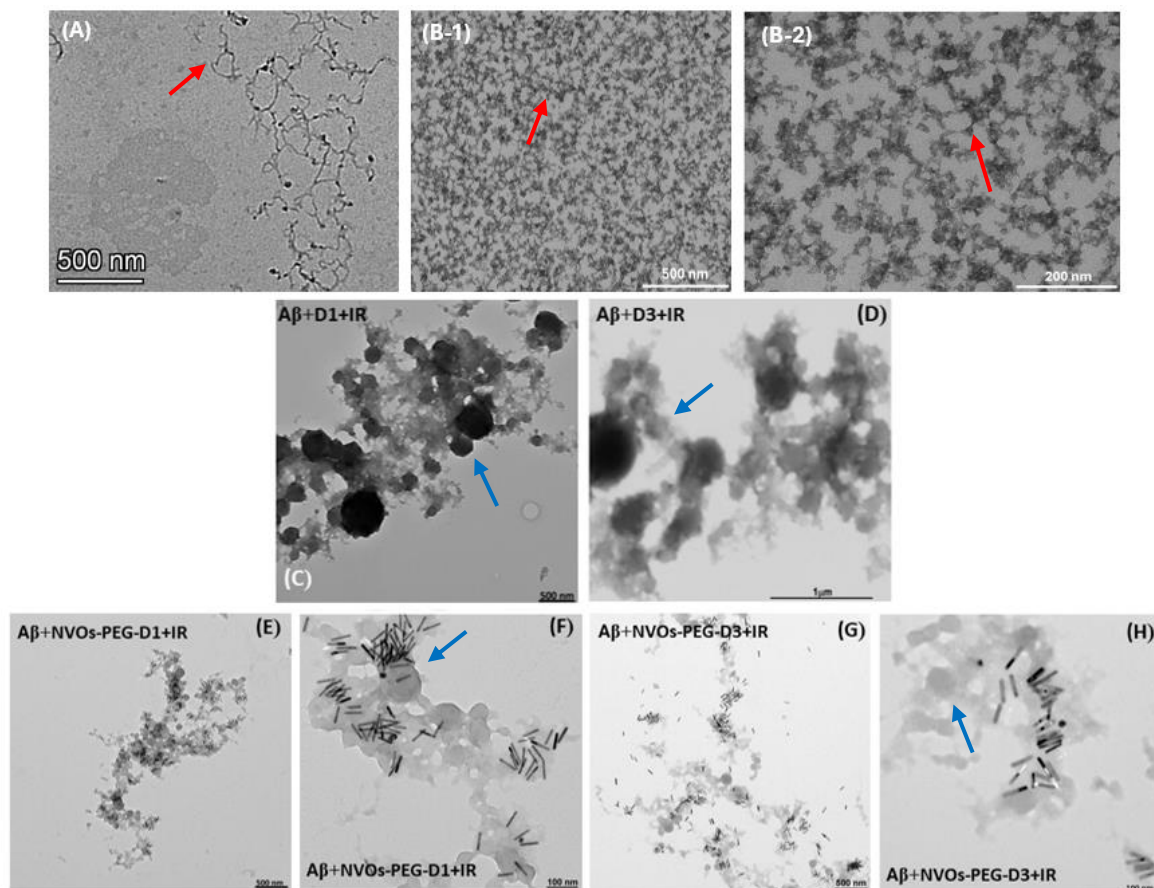


Figura 50: **A)** β -amiloide fibrilar **B-1)** β -amiloide irradiado, **B-2)** β -amiloide *ampliación de B-1*, **C)** β -amiloide incubado con péptido D1 por 24hrs e irradiado, **D)** β -amiloide incubado con péptido D3 por 24hrs e irradiado, **E-F)** β -amiloide incubado con NVOs-PEG-D1 por 24hrs e irradiado y **G-H)** β -amiloide incubado con NVOs-PEG-D3 por 24hrs e irradiado.

Lo que se observó luego de la irradiación tanto en las imágenes **49 B-D** son la formación de agregados semicirculares (flecha rojas) con forma pseudo fibrilar, pero más densas y dispersas que aquellas en **49 E-H**. Estas últimas muestras formaciones menos densas y más amorfas las cuales concuerdan con estudios previos de desagregación de $A\beta_{1-42}$ con péptidos “D”⁸⁰. Si bien estos se encuentran rodeados por las NVOs en ambos casos estos resultados son concordantes con la formación de estructuras de $A\beta_{1-42}$ luego de ser expuestas a irradiación láser y que según estudios no serían formaciones tóxicas¹⁴¹⁻¹⁴⁴. Adicionalmente, se puede determinar que la irradiación en ambas potencias no causa una deformación en las nanopartículas ya que estas siguen conservando su forma de barra luego de hacer incidir el láser durante 20 minutos y 1 minutos lo que las hace bastante estables morfológicamente a las temperaturas alcanzadas.

5.3 Efecto de los nanosistemas irradiados y no irradiados sobre la estructura final del β -amiloide en los ensayos de Inhibición.

Para evaluar si los efectos observados en los ensayos de Th-T sobre los procesos de inhibición y desagregación con y sin irradiación influyen en la estructura del β -amiloide, como se observa en las imágenes TEM (**figura 50**), y sean concordantes con lo observado se procedió a realizar dicroísmo circular (DC) sobre el péptido $A\beta_{1-42}$ en presencia y ausencia de los péptidos D1 y D3 y los nanosistemas NVOs-PEG y NVOs-PEG-D1/D3 sin y con irradiación (350mW), teniendo como control el β -amiloide fibrilar. El Dicroísmo Circular es una técnica no

destruictiva y un método excelente para determinar estructuras secundarias^{145,146} y los cambios estructurales ocurridos luego de la interacción con las nanopartículas y la irradiación. Los resultados obtenidos se pueden observar en las **figuras 51-52**.

Las figuras mencionadas muestran las cuatro estructurales principales observadas del A β , α -*helix*, β -*sheet*, β -*Turn* y otros (*Random Coils*). En el caso de las fibras de β -amiloide la estructura más abundante es la conformación β -*sheet*, la cual se divide en dos estructuras que son la paralela y antiparalela¹⁴⁷. Lo que se puede observar en el caso del estudio de inhibición sin irradiación (**figura 51A**), en el caso de las estructuras β -*sheet*, que los nanosistemas de NVOs-PEG-D1 y NVOs-PEG-D3 disminuyeron su estructura a un 39% y 38% respectivamente, en comparación al A β control que poseía un 49% de estructura β -*sheet*. Las NVO-PEG tuvieron un aumento de un 58% y el D1 libre un 51%. Por otro lado, el porcentaje de *Random Coil (RC)* inicial del control fue de 35% mientras que, al ser el A β incubado con las NVOs-PEG-D1 y NVOs-PEG-D3 este tuvo un aumento a un 48% y 49% respectivamente, en el caso de los péptidos libres el D3 aumento a un 37% mientras que el D1 disminuyo a un 33% de igual manera que el sistema con PEG a un 30%.

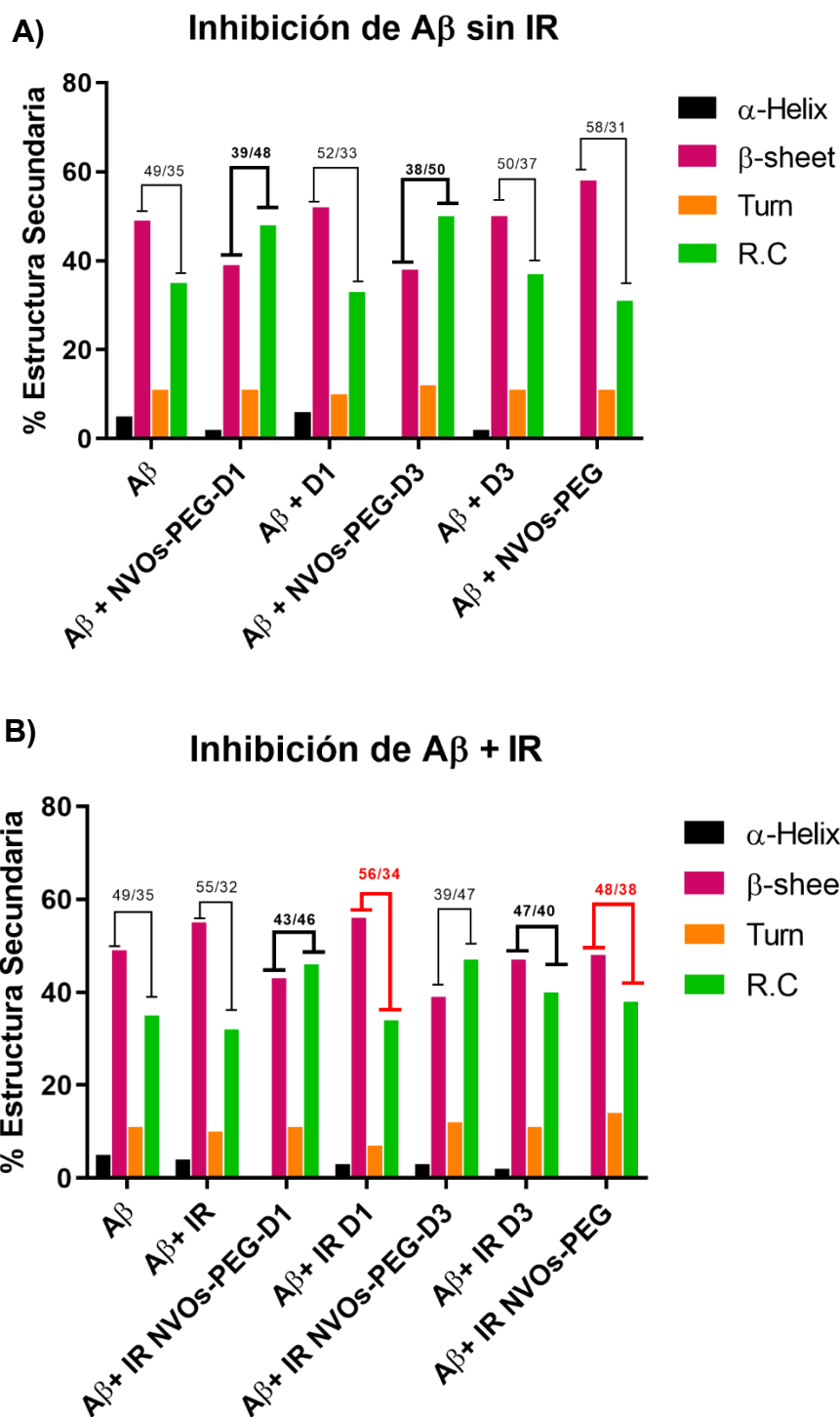


Figura 51: Gráfico de porcentajes de composición estructural del péptido A β en presencia y ausencia de los péptidos D1 y D3 y los nanosistemas a evaluar para el estudio de inhibición **A)** Sin irradiación y **B)** con irradiación a 350mW de potencia (comparación realizada v/s el A β control).

Para los casos de inhibición con irradiación (**figura 51B**) lo que se observó fue que tanto el péptido libres D3 como todos los sistemas con NVOs (NVOs-PEG, NVOs-PEG-D1 y NVOs-PEG-D3) disminuyeron su porcentaje de estructura β -sheet desde un 49% correspondiente al control de péptido A β fibrilar a un 47%, 48%, 43% y 39% respectivamente y solo el péptido D1 aumento su porcentaje en un 56%¹³⁶. Adicionalmente, los porcentajes de *Random Coil* también tuvieron cambios con respecto a las fibras de A β control. Lo que se observó fue que todos los sistemas indicados anteriormente mostraron un aumento de esta estructura siendo las más altas la de las NVOs-PEG-D1 y NVOs-PEG-D3 46% y 47% respectivamente, el D3 aumento un 40% y finalmente las NVOs-PEG obtuvieron un 38% de *Random Coil* en comparación a los 35% del control.

En resumen, de lo antes mencionado, se logró observar que el A β irradiado sufre un aumento en su porcentaje de estructura β -sheet desde 49%, correspondiente al control, a un 55%. Esto indicaría que el aumento de temperatura durante la irradiación fomentaría la formación estructuras lamina β como se observó en los ensayos de Th-T lo cual se encontraría en concordancia con lo reportado ya en literatura¹³⁸⁻¹⁴⁰. Por otro lado, es posible indicar que los sistemas que fueron irradiados demostraron en su mayoría un cambio en su estructura secundaria, ya que fueron los que disminuyeron sus porcentajes de estructura β -sheet y aumentaron el de *Random Coil*.

5.4 Efecto de los nanosistemas irradiados y no irradiados sobre la estructura final del péptido β -amiloide en los ensayos de Desagregación.

De igual forma que el punto anterior se procedió a realizar DC para dilucidar cuales son los cambios en la estructura del péptido $A\beta$. Para el estudio sin irradiación (**figura 52A**) se observó en el control de fibras de $A\beta$ un porcentaje de estructura β -sheet de un 57% y un 35% de RC. Con respecto a los tratamientos, el péptido libre D3 disminuyó su porcentaje de estructura a un 50%, las NVOs-PEG-D1 y NVOs-PEG-D3 a un 47% y 46% respectivamente, mientras que el péptido D1 aumento a un 59% y las NVOs-PEG a un 61%. En el caso de los RC el patrón se repite, tanto el péptido libre D3, las NVOs-PEG-D1 y NVOs-PEG-D3 aumentan su porcentaje desde un 35% que corresponde al control de fibras de $A\beta$ a un 38%, 35% y 39% respectivamente, mientras que el péptido D1 y las NVOs-PEG disminuyeron a un 33% y la última a un 21%.

Estos datos se encuentran parcialmente en concordancia con lo observado en otros trabajos en que es posible observar una disminución de la estructura β -sheet y un aumento del *Random Coil* luego de someter al péptido β -amiloide a irradiación láser¹³⁸⁻¹⁴⁰.

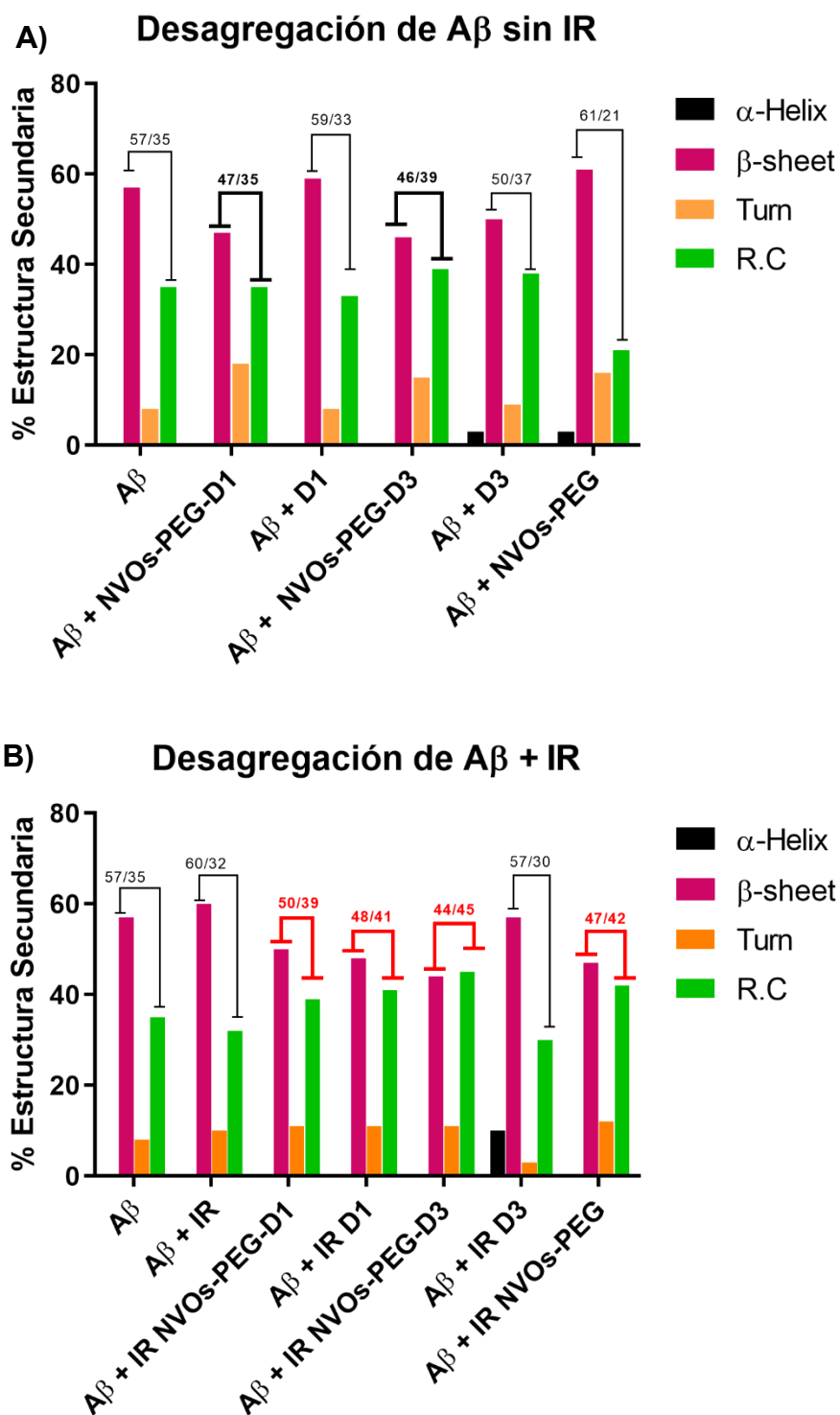


Figura 52: Gráfico de porcentajes de composición estructural del péptido A β en presencia y ausencia de los péptidos D1 y D3 y los nanosistemas a evaluar para el estudio de desagregación **A)** Sin irradiación y **B)** Con irradiación a 350mW de potencia (comparación realizada v/s el A β control).

Para el caso del análisis a las muestras irradiadas (**figura 52B**) se obtuvieron los siguientes resultados. Tanto los péptidos libres como los nanosistemas mostraron una baja en el porcentaje de estructura *β-sheet*. Los péptidos libres D1 y D3 disminuyeron desde 60% que corresponde al control de A β irradiado a un 48% y 57% respectivamente. Los sistemas de NVOs-PEG, NVOs-PEG-D1 y NVOs-PEG-D3 disminuyeron en 47%, 50% y 44% su contenido de *β-sheet*. Adicionalmente, los *RC* aumentaron en casi todos los sistemas, exceptuando el péptido D3 libre que disminuyó a un 30% en comparación al control que fue de un 32%. Los otros sistemas aumentaron en un 41% para el D1 libre, 42% para las NVOs-PEG, 39% las NVOs-PEG-D1 y por último 45% las NVOs-PEG-D3. Una de las razones por la cual el péptido D3 libre posee un menor porcentaje de estructura *RC* es debido a que es el único sistema que posee además un porcentaje de *α-Helix*, siendo este de un 10%.

De igual forma que en el ensayo mencionado todos los sistemas tienen un impacto en la estructura *β-sheet*, en este caso una disminución en el % total de la estructura presente en el A β incubado con los sistemas y posteriormente irradiados. De igual manera se observa un aumento en el porcentaje de *Random Coil* y en el caso del D3 también en la estructura *Helix* lo que podría ser concordante con lo observado en el ensayo de Th-T, debido a que este fluoróforo se une selectivamente a fibras del β -amiloide que en su mayoría se encuentra conformado por estructura *β-sheet* y que se traduciría que al producirse una disminución en el porcentaje de contenido de esta estructura la tioflavina no se uniría a los *Random Coil*, que son la estructura que comienza a aumentar y de la que en su mayoría están

conformadas los monómeros del amiloide¹⁴⁸.

Las disminuciones en el porcentaje de estructura *β -sheet* luego de la irradiación se encuentra en concordancia con otros trabajos similares^{144,149,150}. De igual manera la irrupción o inhibición de la agregación del A β ₁₋₄₂ también se encuentra en línea con otros trabajos que, si bien no utilizan nanopartículas en sus ensayos, sí utilizan disruptivos de fibras amiloides obteniendo resultados similares en nuestro trabajo con los sistemas con péptidos D1 y D3¹⁵¹.

Para un resumen de los resultados obtenidos ver ANEXO 14.2.

**CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN DE RESULTADOS, CONCLUSIONES Y
PROYECCIONES.**

6.1 Discusión de Resultados.

6.1.1 Caracterización de los nanosistemas con bandas plasmónicas centradas en la región de la segunda ventana biológica.

A modo de conclusión fue posible la optimización de la síntesis de las nanovarillas de oro con plasmón centrado en la segunda ventana biológica la cual corresponde a la utilización de 10mM (0.87mM en solución) de AgNO_3 y una concentración de 100mM de hidroquinona y un volumen de NaBH_4 de 280 μL , llegando incluso a los 1125 nm en su plasmón. La caracterización mostró una morfología acorde a la literatura y homogénea, obteniendo en este caso una relación de aspecto de 6.4 ± 0.8 nm para un largo de 58 ± 6 nm y un ancho de 9.0 ± 0.5 nm. Posteriormente fue posible obtener la concentración de nuestras NVOs mediante análisis de NTA entregando una concentración de 2.84 ± 0.21 nM.

Fue posible la funcionalización de las nanovarillas de oro la cual fue seguida mediante UV-Vis-NIR, DLS y potencial ζ . El espectro UV-Vis-NIR mostró un corrimiento hacia longitudes de onda menores a medida que se iba modificando la superficie de las nanopartículas, primero con PEG y luego con los péptidos D1 y D3 atribuibles a una baja en la dispersión de la luz debido a estos elementos en la superficie. El DLS mostró un aumento al PEGilar y funcionalizar con los péptidos corroborando la adición de especie en la superficie de estas aumentando su volumen y, el cambio de un potencial ζ positivo (38 ± 3) a uno negativo (-35 ± 2.5) luego de la PEGilación confirma el desplazamiento del CTAB por ambos PEG y su posterior aumento de potencial (-9 ± 1 para el D1 y -3 ± 2 para el D3) luego de la

funcionalización con los péptidos, debido al punto isoelectrico de cada péptido (D1: 8.76 y D3: 12.60) como se explicó en la sección 3.2.2, serían indicativos de la unión de estos al sistema debido a las cargas positivas de algunos de sus aminoácidos como es la arginina, unión que luego fue corroborada por los espectros RAMAN/SERS.

También fue posible cuantificar la cantidad de péptido D1 y D3 que se unió a la nanopartícula mediante análisis de aminoácidos. Mediante el análisis de 3 aminoácidos, como se mencionó anteriormente, obteniendo concentraciones de 3264 ± 1839 péptidos D1/NVOs y 2065 ± 669 péptidos D3/NVOs las cuales se encuentran dentro de los rangos esperados para el área superficial de las NVOs (2177 nm^2) luego de ser comparadas con otros nanosistemas sintetizados por nuestro laboratorio como son nanoesferas, nanoprismas y nanovarillas de primera ventana biológica. Adicionalmente, se debe considerar el grado de PEGilación ya que influye directamente en la cantidad de péptido que se une a la NPO como se explicó en la sección 3.4.

La corroboración de la funcionalización de estos péptidos en las nanovarillas fue llevada a cabo por RAMAN/SERS el cual arrojó, en el caso de las NVOs-PEG-D1, una interacción leve con la superficie del oro esto debido a las pocas señales observadas y a la baja intensidad de estas específicamente de la (A) y la (Y) que además sufre un corrimiento de su banda desde 645 a 635 cm^{-1} . En cambio, para las NVOs-PEG-D3 las señales obtenidas indicarían una mayor cercanía a la superficie de las nanopartículas ya que es posible observar una mayor cantidad de señales y mayor intensidad, específicamente las señales de (R), (H) y

(P). Estos resultados nos indicarían que el péptido D1 se encontraría más alejado de la NVOs quizás perpendicular a esta mientras que el péptido D3 se encontraría paralelo a la NPs debido a la intensidad y número de señales de (R) presentes.

Estos resultados se condicen con estudios previos realizados por nuestro laboratorio en dónde se estudió la disposición del péptido D1 sobre la superficie de nanoesferas y nanoprismas. En el primer caso ellos indican dos posibles posicionamientos del D1 en la superficie uno para los NPr y otro para las nanoesferas (NEO)¹¹³. Debido a que las nanovarillas tiene superficies esféricas (puntas) como las NEO y planas (largo) como los NPr no es posible indicar con seguridad la disposición del péptido D1 cómo en los casos anteriores en donde el péptido D1 se encontraría muy cercano a la superficie del oro en el caso de los prismas y con una sección alejada de la superficie en el caso de las esferas, pero debido a las señales observadas por el RAMAN/SERS y a la comparación con el trabajo mencionado, es posible indicar que parte importante se encontraría lejos de la superficie de la nanopartícula. La figura 34 muestra una ilustración de la posible disposición de ambos péptidos sobre las nanovarillas de oro.

6.1.2 Propiedades fototérmicas

Con respecto al estudio del efecto fototérmico de las nanovarillas fue posible realizar un análisis a diferentes potencias de láser (100-120-130-135-140-145-150-200-350mW) y elegir dos de ellas para los estudios de efecto fototérmico. En cada potencia fue posible obtener un aumento de temperatura desde la solución

de nanopartículas, entre más aumentaba la potencia mayor era el aumento de temperatura llegando a los 43° para la potencia de 135mW y a los 49° para la potencia de 350mW. También fue posible disminuir el tiempo de irradiación del láser de 20 minutos a tan solo minuto de irradiación con incluso mejor desempeño en su aumento de temperatura. Todos estos ensayos fueron realizados con el sistema de NVOs-PEG, ya que al utilizar sólo las NVOs la temperatura se escapaba aún más del límite fisiológico permitido, llegando a 54.6°C y 57.1°C para 135mW y 350mW respectivamente. Adicionalmente, fue posible calcular la eficiencia fototérmica de las NVOs-PEG a cada potencia indicada anteriormente llegando a eficiencias por sobre el 100%. Estos resultados son prometedores debido a que se genera un gran aumento de temperatura a baja potencia y a menos tiempo de irradiación de lo usualmente reportado en donde generalmente se utilizan potencias de 1W de potencia y tiempos demasiado prolongados de exposición (hasta 2 horas) y en el caso de la primera ventana biológica estos tiempos son acortados al aumentar la potencia del láser pero que resultan dañinas en una potencial aplicación terapéutica ^{56,67,75,141,152}. Adicionalmente, se llevaron a cabo dos experimentos para comprobar la estabilidad fototérmica de nuestros nanosistemas. Tanto la curva del perfil fototérmico y los ciclos On/Off mostraron comportamientos similares a otros trabajos sobre NVOs. En el caso de la curva la bajada es paulatina en ambos casos y en el caso de los ciclos no se observa anomalías durante el enfriamiento demostrando así su alta estabilidad fototérmica.

Adicionalmente se estudió la estabilidad luego de irradiar las nanopartículas. Estas demostraron ser estables luego de observarlas por imágenes

TEM en donde se apreciaba que mantenían su morfología de NVO y por UV-Vis-NIR, DLS y potencial ζ . Se observó un leve corrimiento hacia el azul del plasmón principal y cambios en el D_h y potenciales no significativos con respecto a las nanobarras sin irradiar, pero, que pueden ser atribuibles a algunos agregados o a deformaciones de las nanobarras imperceptibles por TEM pero que afectan de igual manera sus propiedades ópticas en alguna medida.

Estos resultados fueron mejor de lo esperado, específicamente en la disminución de la exposición del láser a potencia comparable al de 808 nm y de esta manera es posible indicar que nuestro sistema de NVOs es una mejor opción que aquellas en NIR-I debido a lo mencionado anteriormente y a la ventaja de una mayor penetración de tejido y menor daño en el proceso de este.

6.1.3 Efecto sobre la agregación del β -amiloide con y sin irradiación láser en segunda ventana biológica.

Por último, fue posible estudiar el efecto fototérmico de las nanovarillas sobre los agregados de β -amiloide para su desagregación e inhibición.

Para el estudio de inhibición con y sin irradiación a 135mW de potencia fue posible observar que solo dos sistemas mostraron una disminución de intensidad de fluorescencia, los cuales fueron los nanosistemas completos NVOs-PEG-D1 y NVOs-PEG-D3, este último sólo tuvo efecto luego de ser irradiado. Por otro lado, el estudio de desagregación mostró una mayor variación en sus resultados, ya que fue posible observar, en el caso de los sistemas irradiados, una disminución de la

fluorescencia para el A β incubado con el péptido D3 libre, el NVOs-PEG, NVOs-PEG-D1 y NVOs-PEG-D3 alcanzando valores de hasta un 79% con respecto al control, resultados que difieren de lo observado en los ensayos de Th-T sin irradiación en donde solamente el sistema NVOs-PEG-D1 mostró una disminución en su fluorescencia.

Resultados similares fueron observados en los ensayos de Th-T para la inhibición con irradiación, pero a una potencia de 350mW. El péptido libre D1 y los nanosistemas NVOs-PEG, NVOs-PEG-D1 y NVOs-PEG-D3 disminuyeron hasta en aproximadamente un 80% su fluorescencia con respecto al control. En el caso de los estudios de desagregación ambos péptidos libres mostraron una baja en su fluorescencia por sobre el 60%, y para los nanosistemas la disminución en la intensidad de fluorescencia fue aún mayor llegando a un 86% para el NVOs-PEG-D1, 85% para el sistema con PEG y un 93% para el sistema de NVOs-PEG-D3 en comparación al control de A β ₁₋₄₂. También fue posible observar que entre el control de A β irradiado y sin irradiar no hay cambios significativos en su intensidad de fluorescencia lo que llevaría a pensar que el láser por sí sólo no tiene mayor efecto sobre la inhibición o desagregación de los agregados de β -amiloide.

Por lo expuesto anteriormente es posible afirmar que el mayor efecto observable de disminución de la intensidad de fluorescencia se observa cuando los sistemas son irradiados, ya sea a 135mW o a 350mW, tanto para la inhibición como para la desagregación, especialmente cuando las NVOs se encuentran presentes en el β -amiloide. También fue posible observar que en todos los ensayos el sistema NVOs-PEG-D1 tiene un efecto significativo irradiado o no, esto podría ser explicado

por el hecho de que el péptido D1 se encontraría más alejado de la superficie de la NPs, lo que se traduciría en un mayor contacto con su entorno, es decir con el A β , en este sentido evitando su agregación o contribuyendo a su desagregación, estos resultados fueron corroborados por RAMAN/SERS en dónde se observó que el péptido unido a las NVOs mostraba señales de baja intensidad, estos resultados se encuentran en concordancia con otros estudios realizados por nuestro laboratorio³⁶. Por otro lado, es posible observar una disminución de fluorescencia significativa de la Th-T cuándo se irradian los péptidos libres, especialmente durante la desagregación. Esto puede ser explicado por el *folding* o *unfolding* del péptido β -amiloide una vez es irradiado al aumentar la temperatura del sistema. Cuando se irradia el A β_{1-42} sin las NVOs, y con los péptidos D1 y D3, la temperatura del sistema aumenta aproximadamente 2°C, este aumento sería suficiente como para producir un cambio en el *folding* del amiloide lo que podría traducirse en disponibilidad para que los péptidos D puedan interactuar de manera más accesible con los sitios no hidrofóbicos o tengan aminoácidos más accesible para unirse mediante interacciones electroestáticas, que son las que predominan cuando estos péptidos se encuentran en presencia del péptido β -amiloide. Este cambio en el *folding* una vez irradiado el A β fue observado en otros trabajos ya publicados¹⁴⁹. Lamentablemente pocos estudios se han llevado a cabo sobre lo que le sucede al péptido al ser irradiado sin ningún nanosistema de por medio.

Un factor importante a considerar es que si bien se obtuvieron resultados similares entre la irradiación a potencia de 135mW y a 350mW los tiempos fueron totalmente diferentes, en donde pasamos de irradiar los sistemas por 20 minutos a

tan sólo 1 minuto lo que significaría una reducción importante de la exposición muy por debajo de lo reportado por otros estudios donde generalmente se utilizan potencias de 1W y tiempos de hasta 2 horas de exposición y, en el caso de la primera ventana biológica, estos tiempos son acortados al aumentar la potencia del láser pero que resultan dañinas en una potencial aplicación terapéutica 56,67,75,141,152.

A modo de conclusión es posible afirmar que se cumplieron los objetivos propuestos inicialmente en esta tesis como son la obtención optimización y caracterización de nanovarillas de oro con plasmón centrado en la segunda ventana biológica o NIR-II. Además, fue posible la funcionalización, caracterización y cuantificación de los péptidos D1 y D3. Adicionalmente, fue posible evaluar el efecto fototérmico de las nanovarillas a diferentes potencias de láser pudiendo cuantificar cuánto de la luz del láser incidente en las NVOs es convertida en energía térmica o su eficiencia fototérmica por defecto. Finalmente fue posible estudiar el efecto en la desagregación e inhibición de los sistemas propuestos no irradiados e irradiados a dos potencias diferentes de láser, 135mW y 350mW demostrando que es posible obtener resultados similares en la desagregación, de hasta un 93%, con menor tiempo de irradiación, pasando de 20 minutos a 1 minuto, respectivamente. Asimismo, fue posible observar la inhibición o la no agregación de los agregados tóxicos fibrilares cuando estos se encuentran en presencia de los sistemas de nanopartículas e irradiados a una potencia de 350mW por 1 minuto, pero siendo más efectiva la desagregación de estos mismos.

Diversos trabajos se han publicado con respecto a la eficiencia de la

desagregación o inhibición del péptido A β con NVO luego de ser irradiadas en NIR-I (~800 nm). Por ejemplo, Lin y col. irradiaron NVO con fs-laser por 5 minutos y cw-laser por 2 horas y, mediante ensayo Th-T observaron una disminución de la fluorescencia de alrededor de un 70% y un 40% respectivamente¹⁴⁴. Por otro lado, Ruff y col. irradiaron NVO-PEG-CLPFFD a potencia de 450mW con láser continuo de 800 nm por 2 horas obteniendo alrededor de un 80% en su disminución de fluorescencia con respecto a la desagregación de fibras de A β ⁵⁶. Otro caso es el de Li y col. su trabajo consistió en irradiar con láser de 808 nm por 8 min dos nanosistemas de varillas uno con POMs (polyoxometalato) y P (A β 15-20) en donde indican mediante ensayo de Th-T una disminución significativa de la fluorescencia de sus sistemas irradiados tanto en inhibición como en desagregación del péptido A β ₁₋₄₀⁷⁰. Como se puede observar de los trabajos mencionados nuestro nanosistema tiene un igual o mejorado efecto de inhibición y especialmente de desagregación, observados mediante ensayo de Th-T, del β -amiloide una vez irradiado y teniendo la característica y ventaja de encontrarse en NIR-II, reduciendo así los posibles riesgos de exposición y reduciendo el tiempo de esta misma en tan solo 1 minuto.

6.1.4 Efecto de los nanosistemas irradiados y no irradiados sobre la estructura final del β -amiloide en los ensayos de Desagregación e Inhibición.

Como se pudo observar en las imágenes TEM de los sistemas incubados

con el péptido A β luego de la irradiación sufre un drástico cambio en la morfología de los agregados. Este cambio en su morfología se encontraría en acuerdo con previos estudios de irradiación del β -amiloide tanto para su inhibición como para su desagregación^{141-144,150} y que según estos éstos los residuos no serían tóxicos. Para correlacionar el cambio morfológico con posibles cambios en la estructura secundaria del péptido se realizó un estudio de dicromismo circular.

En el caso de los estudios de inhibición y desagregación sin irradiación es posible observar un factor común en ambos y es que tanto las NVOs-PEG-D1 y NVOs-PEG-D3 tienen la disminución de estructura *β -sheet* y aumento de *Random Coil* más alta ($\geq 10\%$) en comparación con los controles. De igual manera, para los sistemas irradiados podemos observar una disminución de estructura *β -sheet* de hasta un 13% y un aumento $\geq 10\%$ en RC. Estos datos se encuentran en concordancia con otros trabajos de irradiación sobre el β -amiloide y su análisis por DC¹⁴⁹. Adicionalmente, el aumento de RC y una disminución de las *β -sheet* se podría traducir en una menor toxicidad del β -amiloide. Si bien, diversos estudios han intentado dar luz sobre la influencia de las estructuras secundarias en la enfermedad de Alzheimer¹⁵³ mayores estudios son requeridos para discernir sobre el complejo proceso de agregación del A β y sus diferentes grados de toxicidad. Por otro lado, comparando lo observado por TEM con lo obtenido por DC es posible indicar una relación entre las estructuras obtenidas luego de irradiar y los cambios morfológicos vistos en las imágenes, pero es necesaria la realización de más estudios para discernir exactamente qué otros tipos de estructuras podrían estar formándose, como espectroscopia RAMAN, resonancia magnética nuclear (NMR),

microscopia de fuerza atómica (AFM), espectroscopia infrarroja, estudios de estructuras terciarias y si efectivamente este cambio estructural implicaría una disminución de la toxicidad de estos agregados.

7. Conclusiones.

7.1 Objetivo I: Síntesis y caracterización de nanovarillas de oro con plasmón longitudinal centrado en NIR-II funcionalizados con el péptido D1 y D3.

Se obtuvieron NVOs con un tamaño y relación de aspecto deseadas, sobre 6, consiguiendo así un plasmón centrado en segunda ventana biológica como se observó por espectroscopía UV-Vis-NIR, TEM, DLS y potencial ζ . Adicionalmente, se estabilizaron con HS-PEG₅₀₀₀-COOH y HS-PEG₅₀₀₀-MetO para otorgarle biocompatibilidad y para su posterior funcionalización, la PEGilación fue confirmada por espectroscopia UV-Vis-NIR, DLS, potencial ζ y RAMAN/SERS y la cuantificación fue obtenida por análisis de NTA. Finalmente, fue posible la funcionalización de las NVOs-PEG con los péptidos D1 y D3 la cual fue corroborada por espectroscopia UV-Vis-NIR, DLS, potencial ζ , RAMAN/SESRS y su posterior cuantificación por análisis de aminoácidos y mediante análisis de los RAMAN/SERS de los nanosistemas de NVOs-PEG-D1 y NVOs-PEG-D3 fue posible estimar la disposición espacial en la que se encontrarían los péptidos sobre la superficie de la NP de oro.

7.2 Objetivo II: Estudio de las propiedades fototérmicas de las nanovarillas.

Los estudios del efecto fototérmico de nuestros nanosistemas demostraron la alta eficiencia fototérmica que poseen las NVOs en NIR-II. Además, fue posible disminuir el tiempo de irradiación y exposición de esta desde 20 minutos a sólo 1 minuto modificando la potencia de láser de 135mW a 350mW y posteriormente se demostró la estabilidad fototérmica que poseen los nanosistemas propuestos mediante curva de perfil fototérmico, ciclos On/Off, TEM y UV-Vis-NIR.

7.3 Objetivo III: Evaluar los resultados de la irradiación con luz infrarroja sobre los agregados solubles e insolubles de β -amiloide una vez unidas a las nanovarillas.

Fue posible la obtención de los agregados solubles e insolubles del péptido $A\beta_{1-42}$ observados mediante imágenes TEM. Posteriormente, los estudios de Th-T demostraron un efecto en la inhibición de la agregación del β -amiloide luego de la irradiación tanto a 135mW como a 350mW de potencia. Por otro lado, el ensayo de Th-T para la desagregación con irradiación utilizando 135mW demostró tener efecto en casi todos los sistemas estudiados mientras que a 350mW todos los sistemas tuvieron efecto de la disminución de fluorescencia, especialmente los sistemas con NVOs.

7.4 Objetivo IV: Evaluar las interacciones de las nanopartículas con las especies solubles e insolubles luego de la irradiación en NIR-II.

Las imágenes TEM sugerían un cambio en la morfología del péptido A β ₁₋₄₂ luego de la irradiación. Paralelamente se evaluaron los cambios producidos en las estructuras secundarias mediante difracción circular.

El DC mostró que efectivamente existía disminución de la estructura *β -sheet* y el aumento de los *Random Coil* cuando el péptido β -amiloide era irradiado, tanto en los estudios de inhibición como en la desagregación con los sistemas de NVOs. Si bien, estos resultados no nos corroboran en su totalidad la inhibición y desagregación exitosa de los agregados tóxicos del péptido sí nos demuestra que nuestros nanosistemas y la irradiación en segunda ventana, a través del efecto fototérmico, tienen un efecto cuantitativo sobre estos agregados y que su toxicidad deberá ser estudiada en modelos *in vivos*, para de esta forma tener certeza de su efecto inhibitorio y desagregación como se observó de manera *in vitro* y que, adicionalmente se encuentra en concordancia con variados estudios ya realizados mediante ensayo de Th-T.

De esta forma es posible indicar que los resultados obtenidos en esta tesis sustentan y validan la hipótesis de que la irradiación en segunda ventana biológica (1064nm) es capaz de inhibir y especialmente desagrega los agregados del péptido β -amiloide medido mediante ensayo de Th-T y observado mediante TEM y DC.

8. Proyecciones.

A futuro, se espera poder estudiar la citotoxicidad de los nanosistemas sintetizados y de la irradiación láser a 1064nm. Adicionalmente, se espera estudiar las interacciones del A β ₁₋₄₂ con los péptidos D1 y D3 en la superficie de las NVOs mediante RAMAN/SERS.

Finalmente se espera evaluar el efecto de nuestras sistemas de NVOs con y sin irradiación en modelos *in vivo* para observar si los resultados *in vitro* son replicables en modelos *C.elegans* GMC 101 o CL2120 mediante ensayos de parálisis ya que estos nematodos expresan el péptido A β en su musculatura.

Algunas de estas proyecciones ya se encuentran siendo estudiadas en nuestro laboratorio en colaboración con la Dra. Rebeca Aldunate de la Universidad Santo Tomás.

9. Actividades Relevantes durante el Doctorado (2020-2024).

- Elizabeth Cortés-Adasme; Pablo Cabrera; Marcelo Kogan: “Síntesis de nanobarras de oro con plasmón longitudinal en la segunda ventana biológica funcionalizadas con el péptido D1 para una potencial terapia para la enfermedad de Alzheimer” (Póster). 4to WorkShop de péptidos terapéuticos para bioplicaciones modalidad online 17-19 de noviembre (2021).
- Elizabeth Cortés-Adasme; Pablo Cabrera; Marcelo Kogan: “Nanomateriales con propiedades plasmónicas en la segunda ventana biológica (NIR-II) para la desagregación de β -amiloide” (Póster). 5to WorkShop de péptidos terapéuticos para bioaplicaciones. Coquimbo 15 y 16 de diciembre (2022).
- Elizabeth Cortés-Adasme; Andreas Tapia-Arellano; Pablo Cabrera; Freddy Celis; Marcelo Kogan. “*Nanovarillas con propiedades plasmónicas en la segunda ventana biológica (NIR-II) para la desagregación de β -amiloide*” (Póster). 1° Jornadas de Investigación, Postgrado y Educación Continua. Santiago 19 y 20 de octubre (2023).
- Elizabeth Cortés-Adasme; Andreas Tapia-Arellano; Pablo Cabrera; Freddy Celis; Marcelo Kogan. “*Nanorods with plasmonic properties in the second biological window (NIR-II) functionalized with peptides capable of inhibit*

and disaggregate β -amyloid aggregates.” (Oral), VII Congreso Nacional de Nanotecnología. Pucón 12-15 de noviembre (2023).

- Elizabeth Cortés-Adasme; Pablo Cabrera; Andreas Tapia-Arellano; Freddy Celis; Rebeca Aldunate; Marcelo Kogan. *“Nanorods with plasmonic properties in the second biological window (NIR-II) functionalized with peptides capable of inhibiting and disaggregating β -amyloid via photothermal effect”* (Oral). XXXIV Jornadas Chilenas de Química. Puerto Varas 9-12 de enero (2024).

- Andreas Tapia-Arellano; Elizabeth Cortés-Adasme; Pablo Cabrera; Karen Bolaños; Freddy Celis; Rebeca Aldunate; Natalia Hassan; Marcelo J. Kogan. *“Study of different shapes of gold nanoparticles as novel candidates in the treatment of Alzheimer’s disease.”* (Póster). XXXIV Jornadas Chilenas de Química. Puerto Varas 9-12 de enero (2024).

- Difusión científica de ACCDiS (Advance Center for Chronic Diseases) realizando entrevistas en radio Atractiva FM 101.3Mhz: “Nanobarras de oro para terapia y diagnóstico de enfermedades”.

- Co-tutela de unidad de investigación de los alumnos: Rodrigo Loyola, Matías Levio y José Lucero alumnos de la Universidad de Chile.

10. Reconocimientos.

- Póster premiado en categoría mejor póster en el 5to WorkShop de péptidos terapéuticos para bioaplicaciones: Nanomateriales con propiedades plasmónicas en la segunda ventana biológica (NIR-II) para la desagregación de β -amiloide. Coquimbo, Chile (2022).

11. Publicaciones Derivadas de la Tesis.

- Sebastián Salazar-Sandoval, Elizabeth Cortés-Adasme, Eduardo Gallardo-Toledo, Ingrid Araya, Freddy Celis, Nicolás Yutronic, Paul Jara*, and Marcelo J. Kogan*: *β -Cyclodextrin-Based Nanosponges Inclusion Compounds Associated with Gold Nanorods for Potential NIR-II Drug Delivery.* *Pharmaceutics*, MDPI (2022). **DOI: 10.3390/pharmaceutics14102206**
- Andreas Tapia-Arellano; Pablo Cabrera; Elizabeth Cortés-Adasme; Ana Riveros; Natalia Hassan; Marcelo J. Kogan. *Tau- and α -synuclein-targeted gold nanoparticles: applications, opportunities, and future outlooks in the diagnosis and therapy of neurodegenerative diseases.* *Journal of Nanobiotechnology* (2024) **DOI: 10.1186/s12951-024-02526-0.**

12. Otras Participaciones en Publicaciones.

- M.Vega, I.R.Martin, E.Cortés-Adasme, J.Llanos: *Enhanced red up-conversion emission in Er³⁺/Yb³⁺ co-doped SrSnO₃ for optical*

temperature sensing based on thermally and non-thermally coupled levels”.

Journal of Luminescence (2022) DOI: **10.1016/j.jlumin.2021.118687**

13. BIBLIOGRAFÍA

1. Wimo, A., Jönsson, L., Bond, J., Prince, M. & Winblad, B. The worldwide economic impact of dementia 2010. *Alzheimer's and Dementia* **9**, 1-11.e3 (2013).
2. *World Alzheimer Report 2023 Reducing Dementia Risk: Never Too Early, Never Too Late*.
3. Funke, S. A. *et al.* Development of a small D-enantiomeric Alzheimer's amyloid- β binding peptide ligand for future in vivo imaging applications. *PLoS One* **7**, (2012).
4. Sankar, R. Controlling hypertension: A brief review View project A Review on Step-by-Step Analytical Method Validation View project. (2016) doi:10.9790/0853-1525108121.
5. Tiraboschi, P., Hansen, ; L A, Thal, ; L J & Corey-Bloom, J. *The Importance of Neuritic Plaques and Tangles to the Development and Evolution of AD*. (2004).
6. Hojman, D. *et al.* The cost of dementia: The case of Chile. Results of the cuideme study. *J Neurol Sci* **357**, e11 (2015).
7. Cheignon, C. *et al.* Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biology* vol. 14 450–464 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.10.014> (2018).
8. Sadigh-Eteghad, S. *et al.* Amyloid-beta: A crucial factor in Alzheimer's disease. *Medical Principles and Practice* vol. 24 1–10 Preprint at <https://doi.org/10.1159/000369101> (2015).
9. Shao, F., Wang, X., Wu, H., Wu, Q. & Zhang, J. Microglia and Neuroinflammation: Crucial Pathological Mechanisms in Traumatic Brain Injury-Induced Neurodegeneration. *Frontiers in Aging Neuroscience* vol. 14 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.825086> (2022).
10. Hettiarachchi, S. D. *et al.* Nanoparticle-mediated approaches for Alzheimer's disease pathogenesis, diagnosis, and therapeutics. *Journal of Controlled Release* vol. 314 125–140 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.10.034> (2019).
11. Liu, H., Funke, S. A. & Willbold, D. *Transport of Alzheimer Disease Amyloid- β -Binding d-Amino Acid Peptides across an In Vitro Blood-Brain Barrier Model*.
12. Mashal, Y., Abdelhady, H. & Iyer, A. K. Comparison of Tau and Amyloid- β Targeted Immunotherapy Nanoparticles for Alzheimer's Disease. (2022) doi:10.3390/biom.
13. Bouras, -, C., Hof, P. R., Giannakopoulos, P., Michel, J.-P. & Morrison, J. H. *Regional Distribution of Neurofibrillary Tangles and Senile Plaques in the Cerebral Cortex of Elderly Patients: A Quantitative Evaluation of a One-Year Autopsy Population from a Geriatric Hospital*. <http://cercor.oxfordjournals.org/>.
14. Liu, W., Dong, X., Liu, Y. & Sun, Y. Photoresponsive materials for intensified modulation of Alzheimer's amyloid- β protein aggregation: A review. *Acta Biomaterialia* vol. 123 93–109 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.01.018> (2021).
15. LaFerla, F. M., Green, K. N. & Oddo, S. Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience* vol. 8 499–509 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrn2168> (2007).
16. Sorrentino, P., Iuliano, A., Polverino, A., Jacini, F. & Sorrentino, G. The dark sides of amyloid in Alzheimer's disease pathogenesis. *FEBS Letters* vol. 588 641–652 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.12.038> (2014).

17. Paroni, G., Bisceglia, P. & Seripa, D. Understanding the Amyloid Hypothesis in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease* **68**, 493–510 (2019).
18. Zhao, J., Liu, X., Xia, W., Zhang, Y. & Wang, C. Targeting Amyloidogenic Processing of APP in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience* vol. 13 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.00137> (2020).
19. Economou, N. J. *et al.* Amyloid β -Protein Assembly and Alzheimer's Disease: Dodecamers of A β 42, but Not of A β 40, Seed Fibril Formation. *J Am Chem Soc* **138**, 1772–1775 (2016).
20. Jeong, H., Shin, H., Hong, S. & Kim, Y. S. Physiological Roles of Monomeric Amyloid- β and Implications for Alzheimer's Disease Therapeutics. *Experimental Neurobiology* vol. 31 65–88 Preprint at <https://doi.org/10.5607/en22004> (2022).
21. Huang, Y. R. & Liu, R. T. The toxicity and polymorphism of β -amyloid oligomers. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 21 1–19 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms21124477> (2020).
22. Panza, F., Lozupone, M., Logroscino, G. & Imbimbo, B. P. A critical appraisal of amyloid- β -targeting therapies for Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology* vol. 15 73–88 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0116-6> (2019).
23. Lazarev, V. F., Dutysheva, E. A., Kanunikov, I. E., Guzhova, I. V. & Margulis, B. A. Protein Interactome of Amyloid- β as a Therapeutic Target. *Pharmaceuticals* vol. 16 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ph16020312> (2023).
24. Khan, A. N. & Khan, R. H. Protein misfolding and related human diseases: A comprehensive review of toxicity, proteins involved, and current therapeutic strategies. *International Journal of Biological Macromolecules* vol. 223 143–160 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.11.031> (2022).
25. Yadav, K., Yadav, A., Vashistha, P., Pandey, V. P. & Dwivedi, U. N. Protein Misfolding Diseases and Therapeutic Approaches. *Curr Protein Pept Sci* **20**, 1226–1245 (2019).
26. Lazarev, V. F., Dutysheva, E. A., Kanunikov, I. E., Guzhova, I. V. & Margulis, B. A. Protein Interactome of Amyloid- β as a Therapeutic Target. *Pharmaceuticals* vol. 16 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ph16020312> (2023).
27. Stefani, M. & Dobson, C. M. Protein aggregation and aggregate toxicity: New insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *Journal of Molecular Medicine* vol. 81 678–699 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00109-003-0464-5> (2003).
28. Takahashi, T. & Mihara, H. Peptide and protein mimetics inhibiting amyloid β -peptide aggregation. *Acc Chem Res* **41**, 1309–1318 (2008).
29. Rajasekhar, K., Chakrabarti, M. & Govindaraju, T. Function and toxicity of amyloid beta and recent therapeutic interventions targeting amyloid beta in Alzheimer's disease. *Chemical Communications* vol. 51 13434–13450 Preprint at <https://doi.org/10.1039/c5cc05264e> (2015).
30. Polanco, D., Carrancho, A., Gracia, P. & Cremades, N. Characterisation of Amyloid Aggregation and Inhibition by Diffusion-Based Single-Molecule Fluorescence Techniques. *Biophysica* **2**, 506–524 (2022).
31. FINDER, V. H. & GLOCKSHUBER, R. Amyloid- β aggregation. *Neurodegenerative Diseases* vol. 4 13–27 Preprint at <https://doi.org/10.1159/000100355> (2007).
32. Cebers, G. *et al.* AZD3293: Pharmacokinetic and pharmacodynamic effects in

- healthy subjects and patients with Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease* **55**, 1039–1053 (2017).
33. Egan, M. F. *et al.* Randomized Trial of Verubecestat for Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine* **378**, 1691–1703 (2018).
 34. Vandenberghe, R. *et al.* Active A β immunotherapy CAD106 in Alzheimer's disease: A phase 2b study. *Alzheimer's and Dementia: Translational Research and Clinical Interventions* **3**, 10–22 (2017).
 35. Payne, A., Nahashon, S., Taka, E., Adinew, G. M. & Soliman, K. F. A. Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG): New Therapeutic Perspectives for Neuroprotection, Aging, and Neuroinflammation for the Modern Age. *Biomolecules* vol. 12 Preprint at <https://doi.org/10.3390/biom12030371> (2022).
 36. Taléns-Visconti, R., de Julián-Ortiz, J. V., Vila-Busó, O., Diez-Sales, O. & Nácher, A. Intranasal Drug Administration in Alzheimer-Type Dementia: Towards Clinical Applications. *Pharmaceutics* vol. 15 Preprint at <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15051399> (2023).
 37. aduhelm-pi.
 38. Pharmaceuticals Corporation, N. *HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION*. www.fda.gov/medwatch.
 39. fda & cder. *HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION*. www.fda.gov/medwatch.
 40. fda & cder. *HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION*. www.fda.gov/medwatch.
 41. Shukla, R. K., Badiye, A., Vajpayee, K. & Kapoor, N. Genotoxic Potential of Nanoparticles: Structural and Functional Modifications in DNA. *Frontiers in Genetics* vol. 12 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.728250> (2021).
 42. Stone, J., Jackson, S. & Wright, D. Biological applications of gold nanorods. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* **3**, 100–109 (2011).
 43. Saallah, S. & Lenggoro, I. W. Nanoparticles carrying biological molecules: Recent advances and applications. *KONA Powder and Particle Journal* vol. 2018 89–111 Preprint at <https://doi.org/10.14356/kona.2018015> (2018).
 44. Huang, X. & El-Sayed, M. A. Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. *Journal of Advanced Research* vol. 1 13–28 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.jare.2010.02.002> (2010).
 45. Klębowski, B., Depciuch, J., Parlińska-Wojtan, M. & Baran, J. Applications of noble metal-based nanoparticles in medicine. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 19 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms19124031> (2018).
 46. Sreepasad, T. S. & Pradeep, T. Noble metal nanoparticles. in *Springer Handbook of Nanomaterials* 303–388 (Springer Berlin Heidelberg, 2013). doi:10.1007/978-3-642-20595-8_9.
 47. De Freitas, L. F., Varca, G. H. C., Batista, J. G. D. S. & Lugão, A. B. An overview of the synthesis of gold nanoparticles using radiation technologies. *Nanomaterials* vol. 8 Preprint at <https://doi.org/10.3390/nano8110939> (2018).
 48. Giljohann, D. A. *et al.* Gold nanoparticles for biology and medicine. *Angewandte Chemie - International Edition* vol. 49 3280–3294 Preprint at <https://doi.org/10.1002/anie.200904359> (2010).
 49. Jauffred, L., Samadi, A., Klingberg, H., Bendix, P. M. & Oddershede, L. B.

- Plasmonic Heating of Nanostructures. *Chemical Reviews* vol. 119 8087–8130 Preprint at <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00738> (2019).
50. Peiris, S., McMurtrie, J. & Zhu, H. Y. Metal nanoparticle photocatalysts: Emerging processes for green organic synthesis. *Catal Sci Technol* **6**, 320–338 (2016).
 51. Cao, J., Sun, T. & Grattan, K. T. V. Gold nanorod-based localized surface plasmon resonance biosensors: A review. *Sensors and Actuators, B: Chemical* vol. 195 332–351 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.01.056> (2014).
 52. Kim, H. S. & Lee, D. Y. Near-infrared-responsive cancer photothermal and photodynamic therapy using gold nanoparticles. *Polymers* vol. 10 Preprint at <https://doi.org/10.3390/polym10090961> (2018).
 53. Wang, L., Hasanzadeh Kafshgari, M. & Meunier, M. Optical Properties and Applications of Plasmonic-Metal Nanoparticles. *Advanced Functional Materials* Preprint at <https://doi.org/10.1002/adfm.202005400> (2020).
 54. Meng, L., Zhang, J., Li, H., Zhao, W. & Zhao, T. Preparation and Progress in Application of Gold Nanorods. *Journal of Nanomaterials* vol. 2019 Preprint at <https://doi.org/10.1155/2019/4925702> (2019).
 55. Zhou, R., Wu, Z., Sun, Z. & Su, X. Synthesis of long gold nanorods as an efficient photothermal agent in the second near-infrared window. *Journal of Nano Research* **40**, 180–189 (2016).
 56. Ruff, J. *et al.* CLPFFD-PEG functionalized NIR-absorbing hollow gold nanospheres and gold nanorods inhibit β -amyloid aggregation. *J Mater Chem B* **6**, 2432–2443 (2018).
 57. Maestro, L. M. *et al.* Gold nanorods for optimized photothermal therapy: The influence of irradiating in the first and second biological windows. *RSC Adv* **4**, 54122–54129 (2014).
 58. Zhao, J., Zhong, D. & Zhou, S. NIR-I-to-NIR-II fluorescent nanomaterials for biomedical imaging and cancer therapy. *Journal of Materials Chemistry B* vol. 6 349–365 Preprint at <https://doi.org/10.1039/c7tb02573d> (2018).
 59. Mateos, S. *et al.* Instantaneous In Vivo Imaging of Acute Myocardial Infarct by NIR-II Luminescent Nanodots. *Small* **16**, (2020).
 60. Cai, K. *et al.* Design of Gold Hollow Nanorods with Controllable Aspect Ratio for Multimodal Imaging and Combined Chemo-Photothermal Therapy in the Second Near-Infrared Window. *ACS Appl Mater Interfaces* **10**, 36703–36710 (2018).
 61. Guo, Y. *et al.* Insights into the deep-tissue photothermal therapy in near-infrared II region based on tumor-targeted MoO₂ nanoaggregates. *Sci China Mater* **63**, 1085–1098 (2020).
 62. Bashkatov, A. N., Genina, E. A. & Tuchin, V. V. Optical properties of skin, subcutaneous, and muscle tissues: A review. *J Innov Opt Health Sci* **4**, 9–38 (2011).
 63. Park, J. E., Kim, M., Hwang, J. H. & Nam, J. M. Golden Opportunities: Plasmonic Gold Nanostructures for Biomedical Applications based on the Second Near-Infrared Window. *Small Methods* vol. 1 Preprint at <https://doi.org/10.1002/smt.201600032> (2017).
 64. Bagheri, S. *et al.* Using gold nanoparticles in diagnosis and treatment of melanoma cancer. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology* vol. 46 462–471 Preprint at <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1430585> (2018).
 65. Huang, X., Jain, P. K., El-Sayed, I. H. & El-Sayed, M. A. Plasmonic photothermal

- therapy (PPTT) using gold nanoparticles. *Lasers in Medical Science* vol. 23 217–228 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s10103-007-0470-x> (2008).
66. Jaque, D. *et al.* Nanoparticles for photothermal therapies. *Nanoscale* **6**, 9494–9530 (2014).
 67. Song, C. *et al.* Gold nanostars for cancer cell-targeted SERS-imaging and NIR light-triggered plasmonic photothermal therapy (PPTT) in the first and second biological windows. *J Mater Chem B* **7**, 2001–2008 (2019).
 68. Webb, J. A. & Bardhan, R. Emerging advances in nanomedicine with engineered gold nanostructures. *Nanoscale* vol. 6 2502–2530 Preprint at <https://doi.org/10.1039/c3nr05112a> (2014).
 69. Lai, Y. *et al.* Engineering Versatile Nanoparticles for Near-Infrared Light-Tunable Drug Release and Photothermal Degradation of Amyloid β . *Adv Funct Mater* **30**, (2020).
 70. Li, M., Guan, Y., Zhao, A., Ren, J. & Qu, X. Using multifunctional peptide conjugated Au nanorods for monitoring β -amyloid aggregation and chemo-photothermal treatment of Alzheimer's disease. *Theranostics* **7**, 2996–3006 (2017).
 71. Liu, D. *et al.* Using near-infrared enhanced thermozyyme and scFv dual-conjugated Au nanorods for detection and targeted photothermal treatment of Alzheimer's disease. *Theranostics* **9**, 2268–2281 (2019).
 72. Briggs, R., Kennelly, S. P. & O'neill, D. *DRUG THERAPIES IN...* *Clinical Medicine* vol. 16 (2016).
 73. Adura, C. *et al.* Stable conjugates of peptides with gold nanorods for biomedical applications with reduced effects on cell viability. *ACS Appl Mater Interfaces* **5**, 4076–4085 (2013).
 74. Guo, B. *et al.* Precise Deciphering of Brain Vasculatures and Microscopic Tumors with Dual NIR-II Fluorescence and Photoacoustic Imaging. *Advanced Materials* **31**, (2019).
 75. Liu, Y. *et al.* NIR-II-Activated Yolk-Shell Nanostructures as an Intelligent Platform for Parkinsonian Therapy. *ACS Appl Bio Mater* **3**, 6876–6887 (2020).
 76. Martins, P. A. T., Alsaiari, S., Julfakyan, K., Nie, Z. & Khashab, N. M. Self-assembled lipoprotein based gold nanoparticles for detection and photothermal disaggregation of β -amyloid aggregates. *Chemical Communications* **53**, 2102–2105 (2017).
 77. Bastus, N. G. *et al.* Gold nanoparticles for selective and remote heating of β -amyloid protein aggregates. *Materials Science and Engineering C* **27**, 1236–1240 (2007).
 78. Morales-Zavala, F. *et al.* Peptide multifunctionalized gold nanorods decrease toxicity of β -amyloid peptide in a *Caenorhabditis elegans* model of Alzheimer's disease. *Nanomedicine* **13**, 2341–2350 (2017).
 79. Velasco-Aguirre, C. Improving gold nanorod delivery to the central nervous system by conjugation to the shuttle Angiopep-2. (2017) doi:10.2217/nmm-20170181.
 80. Jara-Guajardo, P. *et al.* Gold nanoparticles mediate improved detection of β -amyloid aggregates by fluorescence. *Nanomaterials* **10**, (2020).
 81. Wiesehan, K. *et al.* Selection of D-amino-acid peptides that bind to Alzheimer's disease amyloid peptide A β 1-42 by mirror image phage display. *ChemBioChem* **4**, 748–753 (2003).

82. van Groen, T., Kadish, I., Wiesehan, K., Funke, S. A. & Willbold, D. In vitro and in vivo staining characteristics of small, fluorescent, A β 42-binding D-enantiomeric peptides in transgenic AD mouse models. *ChemMedChem* **4**, 276–282 (2009).
83. Klein, A. N. *et al.* Optimization of the All-D peptide D3 for A β oligomer elimination. *PLoS One* **11**, (2016).
84. Bartnik, D. *et al.* Differently Selected D-Enantiomeric Peptides Act on Different Ab Species.
85. van Groen, T. *et al.* Reduction of Alzheimer's disease amyloid plaque load in transgenic mice by D3, a D-enantiomeric peptide identified by mirror image phage display. *ChemMedChem* **3**, 1848–1852 (2008).
86. van Groen, T., Kadish, I., Funke, S. A., Bartnik, D. & Willbold, D. Treatment with D3 removes amyloid deposits, reduces inflammation, and improves cognition in aged A β PP/PS1 double transgenic mice. *Journal of Alzheimer's Disease* **34**, 609–620 (2013).
87. Aileen Funke, S. *et al.* Oral treatment with the d-enantiomeric peptide D3 improves the pathology and behavior of alzheimer's disease transgenic mice. *ACS Chem Neurosci* **1**, 639–648 (2010).
88. Garcia, J. *et al.* The Combined Use of Gold Nanoparticles and Infrared Radiation Enables Cytosolic Protein Delivery. *Chemistry - A European Journal* **27**, 4670–4675 (2021).
89. Roper, D. K., Ahn, W. & Hoepfner, M. Microscale heat transfer transduced by surface plasmon resonant gold nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry C* **111**, 3636–3641 (2007).
90. Almada, M. *et al.* Photothermal conversion efficiency and cytotoxic effect of gold nanorods stabilized with chitosan, alginate and poly(vinyl alcohol). *Materials Science and Engineering C* **77**, 583–593 (2017).
91. Sabaté, R. & Saupe, S. J. Thioflavin T fluorescence anisotropy: An alternative technique for the study of amyloid aggregation. *Biochem Biophys Res Commun* **360**, 135–138 (2007).
92. Sirajuddin *et al.* The formation of gold nanoparticles using hydroquinone as a reducing agent through a localized pH change upon addition of NaOH to a solution of HAuCl₄. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* **370**, 35–41 (2010).
93. Perrault, S. D. & Chan, W. C. W. Synthesis and surface modification of highly monodispersed, spherical gold nanoparticles of 50–200 nm. *J Am Chem Soc* **131**, 17042–17043 (2009).
94. Pérez-Juste, J., Liz-Marzán, L. M., Carnie, S., Chan, D. Y. C. & Mulvaney, P. Electric-field-directed growth of gold nanorods in aqueous surfactant solutions. *Adv Funct Mater* **14**, 571–579 (2004).
95. Zhang, X. *et al.* Preparation of gold nanoparticles using hydroquinone derivatives. *Mater Lett* **140**, 180–183 (2015).
96. Chen, H., Shao, L., Li, Q. & Wang, J. Gold nanorods and their plasmonic properties. *Chem Soc Rev* **42**, 2679–2724 (2013).
97. Vigderman, L., Khanal, B. P. & Zubarev, E. R. Functional gold nanorods: Synthesis, self-assembly, and sensing applications. *Advanced Materials* vol. 24 4811–4841 Preprint at <https://doi.org/10.1002/adma.201201690> (2012).
98. Murphy, C. J. *et al.* Anisotropic metal nanoparticles: Synthesis, assembly, and

- optical applications. *Journal of Physical Chemistry B* **109**, 13857–13870 (2005).
99. Nikoobakht, B. & El-Sayed, M. A. Preparation and growth mechanism of gold nanorods (NRs) using seed-mediated growth method. *Chemistry of Materials* **15**, 1957–1962 (2003).
 100. Vigderman, L., Khanal, B. P. & Zubarev, E. R. Functional gold nanorods: Synthesis, self-assembly, and sensing applications. *Advanced Materials* vol. 24 4811–4841 Preprint at <https://doi.org/10.1002/adma.201201690> (2012).
 101. Vigderman, L. & Zubarev, E. R. High-yield synthesis of gold nanorods with longitudinal SPR peak greater than 1200 nm using hydroquinone as a reducing agent. *Chemistry of Materials* **25**, 1450–1457 (2013).
 102. Ruff, J. *et al.* Multivalency of PEG-thiol ligands affects the stability of NIR-absorbing hollow gold nanospheres and gold nanorods. *J Mater Chem B* **4**, 2828–2841 (2016).
 103. Schulz, F. *et al.* Effective PEGylation of gold nanorods. *Nanoscale* **8**, 7296–7308 (2016).
 104. Rahme, K. *et al.* PEGylated gold nanoparticles: Polymer quantification as a function of PEG lengths and nanoparticle dimensions. *RSC Adv* **3**, 6085–6094 (2013).
 105. Hamley, I. W. PEG-peptide conjugates. *Biomacromolecules* vol. 15 1543–1559 Preprint at <https://doi.org/10.1021/bm500246w> (2014).
 106. Huang, X. *et al.* A reexamination of active and passive tumor targeting by using rod-shaped gold nanocrystals and covalently conjugated peptide ligands. *ACS Nano* **4**, 5887–5896 (2010).
 107. Tsekov, R., Georgiev, P., Simeonova, S. & Balashev, K. *QUANTIFYING THE BLUE SHIFT IN THE LIGHT ABSORPTION OF SMALL GOLD NANOPARTICLES.*
 108. Liu, H., Pierre-Pierre, N. & Huo, Q. Dynamic light scattering for gold nanorod size characterization and study of nanorod-protein interactions. *Gold Bull* **45**, 187–195 (2012).
 109. Rabanel, J. M., Hildgen, P. & Banquy, X. Assessment of PEG on polymeric particles surface, a key step in drug carrier translation. *Journal of Controlled Release* vol. 185 71–87 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.017> (2014).
 110. Moldoveanu, S. C. & David, V. Properties of Analytes and Matrices Determining HPLC Selection. in *Selection of the HPLC Method in Chemical Analysis* 189–230 (Elsevier, 2017). doi:10.1016/b978-0-12-803684-6.00005-6.
 111. Shnoudeh, A. J. *et al.* Synthesis, Characterization, and Applications of Metal Nanoparticles. in *Biomaterials and Bionanotechnology* 527–612 (Elsevier, 2019). doi:10.1016/B978-0-12-814427-5.00015-9.
 112. Treuel, L., Malissek, M., Gebauer, J. S. & Zellner, R. The influence of surface composition of nanoparticles on their interactions with serum albumin. *ChemPhysChem* **11**, 3093–3099 (2010).
 113. Gallardo-Toledo, E. *et al.* Intranasal administration of gold nanoparticles designed to target the central nervous system: Fabrication and comparison between nanospheres and nanoprisms. *Int J Pharm* **590**, (2020).
 114. *GOLD NANOPARTICLES PHYSICS, CHEMISTRY AND BIOLOGY.*
 115. Vera, A. M. *et al.* Interaction of the CLPFFD peptide with gold nanospheres. A Raman, surface enhanced Raman scattering and theoretical study. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **134**, 251–256 (2015).

116. Zhu, G., Zhu, X., Fan, Q. & Wan, X. Raman spectra of amino acids and their aqueous solutions. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **78**, 1187–1195 (2011).
117. long2004.
118. Garrido, C. *et al.* Interaction of the C-terminal peptide from pigeon cytochrome C with silver nanoparticles. A Raman, SERS and theoretical study. *Vib Spectrosc* **61**, 94–98 (2012).
119. Culka, A., Jehlička, J. & Edwards, H. G. M. Acquisition of Raman spectra of amino acids using portable instruments: Outdoor measurements and comparison. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **77**, 978–983 (2010).
120. Aliaga, A. E. *et al.* SERS and theoretical studies of arginine. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **76**, 458–463 (2010).
121. Aliaga, A. E. *et al.* Surface-enhanced Raman scattering and theoretical studies of the C-terminal peptide of the β -subunit human chorionic gonadotropin without linked carbohydrates. *Biopolymers* **95**, 135–143 (2011).
122. Garcia-Leis, A. & Sanchez-Cortes, S. Label-Free Detection and Self-Aggregation of Amyloid β -Peptides Based on Plasmonic Effects Induced by Ag Nanoparticles: Implications in Alzheimer's Disease Diagnosis. *ACS Appl Nano Mater* **4**, 3565–3575 (2021).
123. Moskovits, M. Surface selection rules. *J Chem Phys* **77**, 4408–4416 (1982).
124. Liu, X. *et al.* Multidentate polyethylene glycol modified gold nanorods for in vivo near-infrared photothermal cancer therapy. *ACS Appl Mater Interfaces* **6**, 5657–5668 (2014).
125. Wen, X., Bi, S. & Zeng, S. NIR-II Light-Activated Gold Nanorods for Synergistic Thermodynamic and Photothermal Therapy of Tumor. *ACS Appl Bio Mater* **6**, 1934–1942 (2023).
126. Zhang, W. *et al.* Au hollow Nanorods-Chimeric peptide nanocarrier for NIR-II photothermal therapy and real-time apoptosis imaging for tumor theranostics. *Theranostics* **9**, 4971–4981 (2019).
127. Zhang, Y. *et al.* Plasmonic modulation of gold nanotheranostics for targeted NIR-II photothermal-augmented immunotherapy. *Nano Today* **35**, (2020).
128. Bolaños, K. *et al.* Adsorption of bovine serum albumin on gold nanoprisms: Interaction and effect of NIR irradiation on protein corona. *J Mater Chem B* **8**, 8644–8657 (2020).
129. Kang, X. *et al.* Photothermal therapeutic application of gold nanorods-porphyrin-trastuzumab complexes in HER2-positive breast cancer. *Sci Rep* **7**, (2017).
130. Qi, Z., Shi, J., Zhu, B., Li, J. & Cao, S. Gold nanorods/graphene oxide nanosheets immobilized by polydopamine for efficient remotely triggered drug delivery. *J Mater Sci* **55**, 14530–14543 (2020).
131. Zhou, C. *et al.* Activatable NIR-II Plasmonic Nanotheranostics for Efficient Photoacoustic Imaging and Photothermal Cancer Therapy. *Advanced Materials* **33**, (2021).
132. Ye, L. *et al.* Dendrimer-modified gold nanorods as a platform for combinational gene therapy and photothermal therapy of tumors. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* **40**, (2021).
133. Jia, J. *et al.* Fine-Tuning the Homometallic Interface of Au-on-Au Nanorods and Their Photothermal Therapy in the NIR-II Window. *Angewandte Chemie -*

- International Edition* **59**, 14443–14448 (2020).
134. Ahmed, M. *et al.* Structural conversion of neurotoxic amyloid-B 1-42 oligomers to fibrils. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 561–567 (2010).
 135. Yamin, G. & Teplow, D. B. Pittsburgh Compound-B (PiB) binds amyloid β -protein protofibrils. *J Neurochem* **140**, 210–215 (2017).
 136. Morales-Zavala, F. *et al.* In vivo micro computed tomography detection and decrease in amyloid load by using multifunctionalized gold nanorods: A neurotheranostic platform for Alzheimer’s disease. *Biomater Sci* **9**, 4178–4190 (2021).
 137. Brambilla, D. *et al.* PEGylated nanoparticles bind to and alter amyloid-beta peptide conformation: Toward engineering of functional nanomedicines for alzheimer’s disease. *ACS Nano* **6**, 5897–5908 (2012).
 138. Paul, P. S. *et al.* Unconjugated PLGA nanoparticles attenuate temperature-dependent β -amyloid aggregation and protect neurons against toxicity: implications for Alzheimer’s disease pathology. *J Nanobiotechnology* **20**, (2022).
 139. Lin, M. S. *et al.* Investigation of the mechanism of β -amyloid fibril formation by kinetic and thermodynamic analyses. *Langmuir* **24**, 5802–5808 (2008).
 140. Lin, S. Y., Chu, H. L. & Wei, Y. S. Secondary conformations and temperature effect on structural transformation of amyloid β (1–28),(1–40) and (1–42) peptides. *J Biomol Struct Dyn* **20**, 595–601 (2003).
 141. Yin, T., Xie, W., Sun, J., Yang, L. & Liu, J. Penetratin Peptide-Functionalized Gold Nanostars: Enhanced BBB Permeability and NIR Photothermal Treatment of Alzheimer’s Disease Using Ultralow Irradiance. *ACS Appl Mater Interfaces* **8**, 19291–19302 (2016).
 142. Zhang, J. *et al.* Photodynamic micelles for amyloid β degradation and aggregation inhibition. *Chemical Communications* **52**, 12044–12047 (2016).
 143. Zhang, Z. *et al.* Disassembly of Alzheimer’s amyloid fibrils by functional upconversion nanoparticles under near-infrared light irradiation. *Colloids Surf B Biointerfaces* **181**, 341–348 (2019).
 144. Lin, D. *et al.* Highly Efficient Destruction of Amyloid- β Fibrils by Femtosecond Laser-Induced Nanoexplosion of Gold Nanorods. *ACS Chem Neurosci* **7**, 1728–1736 (2016).
 145. Pignataro, M. F., Herrera, M. G. & Doderio, V. I. Evaluation of peptide/protein self-assembly and aggregation by spectroscopic methods. *Molecules* vol. 25 Preprint at <https://doi.org/10.3390/molecules25204854> (2020).
 146. Greenfield, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat Protoc* **1**, 2876–2890 (2007).
 147. Toyama, B. H. & Weissman, J. S. *Amyloid Structure: Conformational Diversity and Consequences*. (2010).
 148. Chen, G. F. *et al.* Amyloid beta: Structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacologica Sinica* vol. 38 1205–1235 Preprint at <https://doi.org/10.1038/aps.2017.28> (2017).
 149. Lin, D. *et al.* Probing the Protein Folding Energy Landscape: Dissociation of Amyloid- β Fibrils by Laser-Induced Plasmonic Heating. *ACS Nano* **17**, 9429–9441 (2023).
 150. Sudhakar, S., Santhosh, P. B. & Mani, E. Dual Role of Gold Nanorods: Inhibition

- and Dissolution of A β Fibrils Induced by Near IR Laser. *ACS Chem Neurosci* **8**, 2325–2334 (2017).
151. Kashyap, P., Kalaiselvan, V., Kumar, R. & Kumar, S. Ajmalicine and reserpine: Indole alkaloids as multi-target directed ligands towards factors implicated in Alzheimer's disease. *Molecules* **25**, (2020).
 152. Zhu, D. *et al.* Stellate Plasmonic Exosomes for Penetrative Targeting Tumor NIR-II Thermo-Radiotherapy. *ACS Appl Mater Interfaces* **12**, 36928–36937 (2020).
 153. Zhaliyazka, K. & Kurouski, D. Nanoscale Characterization of Parallel and Antiparallel β -Sheet Amyloid Beta 1-42 Aggregates. *ACS Chem Neurosci* **13**, 2813–2820 (2022).
 154. Uson, L., Sebastian, V., Arruebo, M. & Santamaria, J. Continuous microfluidic synthesis and functionalization of gold nanorods. *Chemical Engineering Journal* **285**, 286–292 (2016).
 155. Sahu, A. K., Das, A., Ghosh, A. & Raj, S. Understanding blue shift of the longitudinal surface plasmon resonance during growth of gold nanorods. *Nano Express* **2**, (2021).
 156. Tapia-Arellano, A. *et al.* Functionalization with PEG/Angiopep-2 peptide to improve the delivery of gold nanoprisms to central nervous system: in vitro and in vivo studies. *Materials Science and Engineering C* **121**, (2021).

14. ANEXOS

14.1 Caracterización de los nanosistemas de NVOs.

14.1.1 Parámetro Modificado n°1: 900 μL de AgNO_3 (10mM) y 500 μL de Hidroquinona (100mM).

La **figura 53** nos muestra los resultados de la combinación de los siguientes parámetros 900 μL de AgNO_3 (10mM) y 500 μL de hidroquinona (100mM). Como se puede observar el plasmón se encontró a 982 nm para las NVOs con CTAB, 974 nm para los NVOs-PEG y 960 nm para el sistema NVOs-PEG-D3. El largo de las NVOs fue de 50 nm aproximadamente y su ancho de 9,8 nm, obteniendo así una relación de aspecto de 5. Adicionalmente, la tabla 1 muestra el diámetro hidrodinámico y el potencial ζ obtenido para esta síntesis, indicando un diámetro transversal de 1.8 nm y uno longitudinal de 31 nm junto a un potencial ζ promedio de 43mV.

La tabla adicionalmente nos muestra el cambio en diámetro hidrodinámico y potencial ζ a medida que se van funcionalizando las nanovarillas. Al PEGilar la solución se observó un aumento en el diámetro trasversal y longitudinal a 8 nm y 100 nm respectivamente dando un indicio de la unión del PEG a la superficie de las nanopartículas y, un potencial ζ negativo de -22mV indicando el desplazamiento del CTAB de la superficie al ser reemplazado por el PEG carboxilo el cual posee carga negativa. Posteriormente la adición del péptido D3 no procuro un gran cambio en los diámetros hidrodinámicos, pero sí en la carga del sistema ya que esta se vuelve menos negativa debido a las cargas positivas en la superficie debido

al péptido.

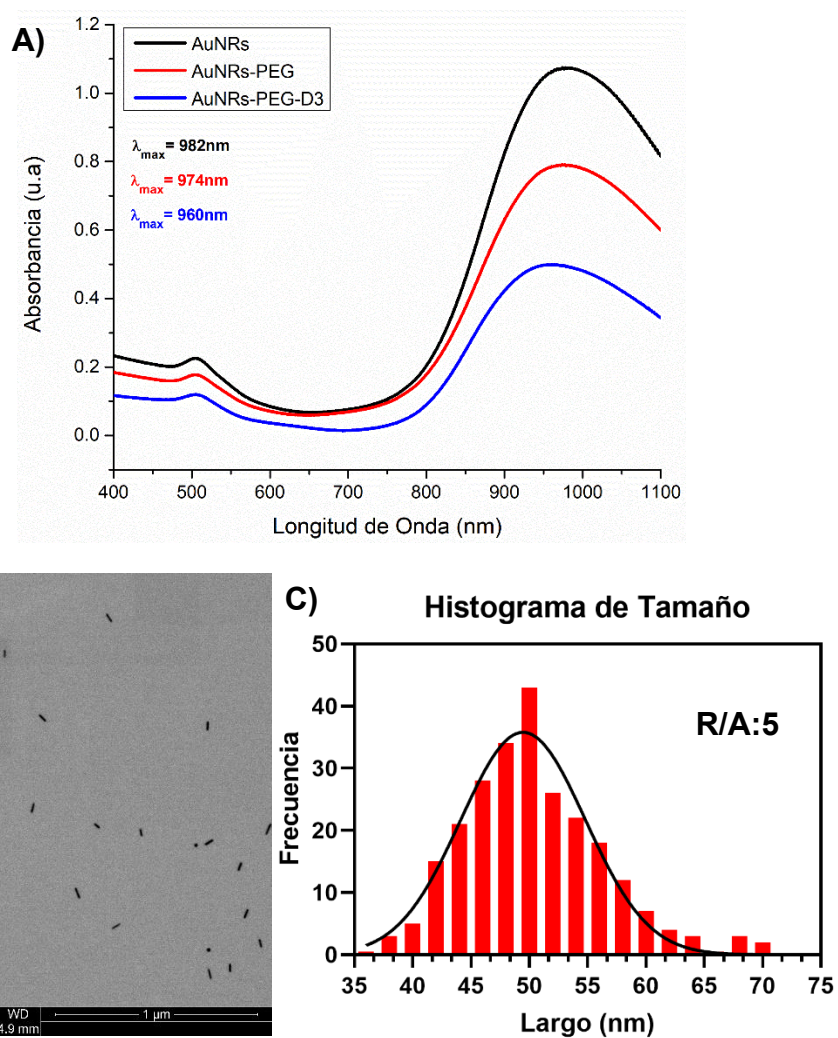


Figura 53: A) espectro UV-Vis-NIR, B) STEM y C) histograma de tamaño de los NVOs obtenidos con los siguientes parámetros (900 μL de AgNO_3 y 500 μL de hidroquinona).

Tabla 6: Diámetro hidrodinámica (DLS) y potencial zeta ($p\zeta$) de sistemas de NVOs

Nanosistema	Dh Transversal (nm)	Dh Longitudinal (nm)	$p\zeta$ (mV)
NVOs	$2 \pm 0,02$	31 ± 6	$+43 \pm 5$
NVOs-PEG	8 ± 0.1	100 ± 8	-22 ± 4
NVOs-PEG-D3	8 ± 0.1	102 ± 8	-7 ± 1

Si bien fue posible el desplazamiento del plasmón a longitudes de onda mayores no fue posible la obtención de este sobre los 1000 nm y, en consecuencia, de nanopartículas en la segunda ventana biológica, por lo que se debió seguir modificando el protocolo de obtención de las nanovarillas.

14.1.2 Parámetro Modificado n°2: 1000 μ L de AgNO₃ (10mM) y 500 μ L de hidroquinona (100mM).

Modificando el segundo parámetro se obtuvieron plasmones en el rango de los 1000 nm. En el caso de las NVOs con CTAB el plasmón fue de 1070 nm, las nanovarillas PEGiladas mostraron un plasmón en 1055 nm y el sistema final mostró un plasmón a 1044 nm. Por otro lado, el largo promedio de las NVO fue de 47 nm y su ancho de 7,8 nm dando en este caso una relación de aspecto de 6. En este caso la variación de tamaños de nanopartículas fue mayor que en el parámetro anterior no teniendo una población mayoritaria en específico, sin embargo, su relación de aspecto de 6 es concordante con el plasmón obtenido en longitudes de ondas sobre 1000 nm. La **tabla 7** muestra los D_h y potencial ζ obtenidos en la síntesis y en la funcionalización de las nanovarillas. En el caso de las NVOs se obtuvo un D_h transversal de 2 nm y un longitudinal de 46 nm con un potencial ζ de 33.8 mV, las nanovarillas PEGiladas tuvieron un aumento en su D_h transversal siendo este de 10 nm y longitudinal de 93 nm, en cambio el potencial ζ cambio a negativo -29 mV. Finalmente, el sistema con el péptido D1 en esta ocasión tuvo un D_h transversal de 9 nm y longitudinal de 108 nm no teniendo un cambio

significativo con el NVOs-PEG, pero su potencial sí aumento en comparación y se volvió menos negativo llegando a 9 mV.

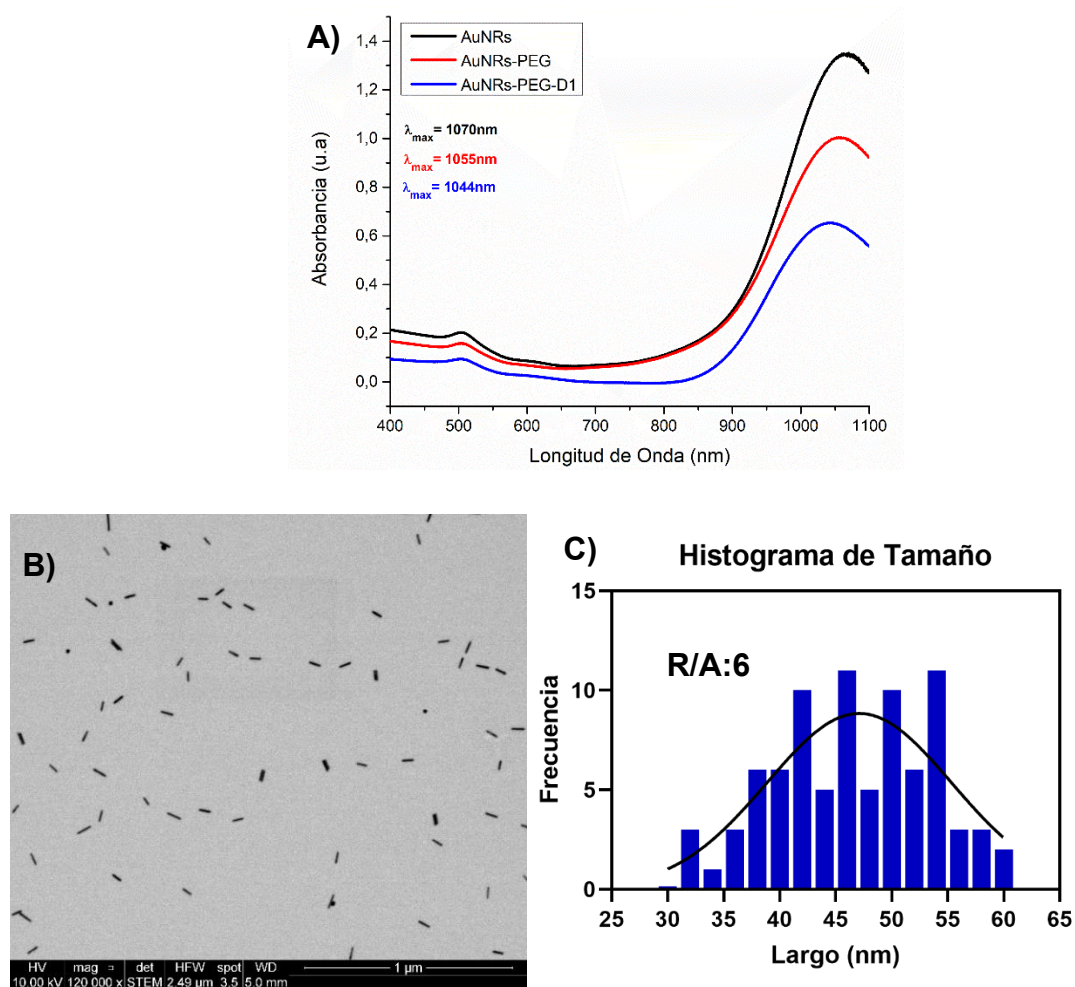


Figura 54: A) espectro UV-Vis-NIR, B) STEM y C) histograma de tamaño de los NVOs obtenidos con los siguientes parámetros (1000 μ L de $AgNO_3$ y 500 μ L de hidroquinona).

Tabla 7: Diámetro hidrodinámica (DLS) y potencial zeta ($p\zeta$) de los sistemas de NVOs.

Nanosistema	Dh Transversal (nm)	Dh Longitudinal (nm)	$p\zeta$ (mV)
NVOs	$2 \pm 0,2$	46 ± 6	$+34 \pm 7$
NVOs-PEG	11 ± 2	92 ± 13	-29 ± 3
NVOs-PEG-D1	9 ± 0.2	109 ± 7	-9 ± 1

El aumento en el volumen de AgNO_3 nos permitió desplazar el plasmón a la segunda ventana biológica y en el rango de los 1040-1070 nm para poder ser irradiados posteriormente a 1064 nm. Este cambio fue propuesto con la idea de que a un mayor volumen de solución mayor será la concentración final de nitrato de plata en la muestra siendo mayor interacción del reactivo con las semillas de oro formadas. Al unirse selectivamente a ciertos planos cristalinos bloqueándolos y de esta manera favoreciendo el crecimiento de otros planos para la formación de las NVO y, por ende, el aumento en concentración de este reactivo daría como consecuencia un mayor bloqueo de planos cristalinos.

14.1.3 Parámetro Modificado n°3: 900 μL de AgNO_3 (10mM) y 400 μL de hidroquinona (100mM).

En el caso del tercer parámetro los resultados obtenidos fueron aún más prometedores, donde fue posible obtener plasmones por sobre los 1100 nm en ambos casos, lamentablemente el equipo utilizado tiene un límite de longitud de 1100 nm por lo que no fue posible observar un plasmón completo y el resultado obtenido es un estimado del máximo del plasmón. Por otro lado, la imagen STEM mostró una distribución de tamaño más homogéneo que los parámetros anteriores y así lo comprobó el histograma de distribución de tamaño. Se obtuvieron nanopartículas en su mayoría con un largo de 45 nm y un ancho de 7,5 nm dando así una relación de aspecto de 6, corroborada por su plasmón sobre 1000 nm. Con respecto a la **tabla 8**, el D_h transversal para solo las NVO fue de 3 nm y el

longitudinal de 58,9 nm menos a las nanovarillas PEGiladas las cuales tuvieron un D_h transversal de 11 nm y longitudinal de 105 nm. En el caso del potencial ζ , los NVOs indicaron un potencial positivo de 28 mV y los NVOs-PEG negativo de -31 mV.

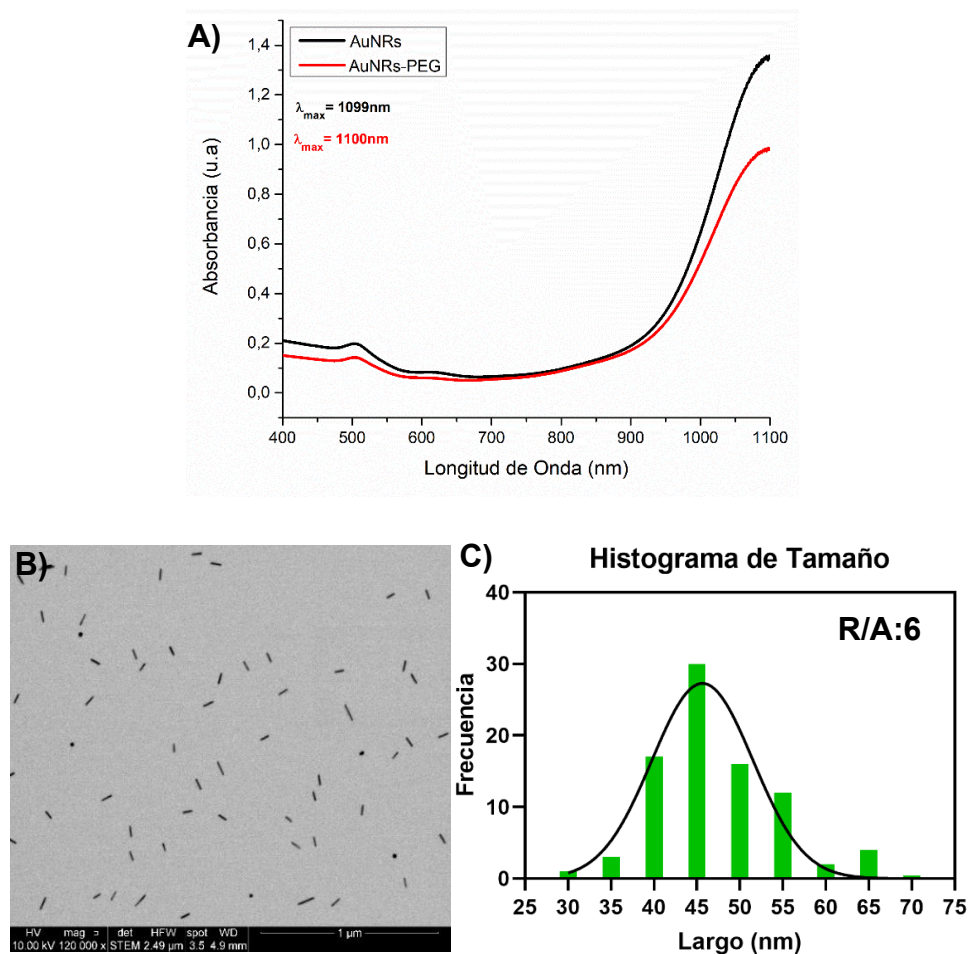


Figura 55: A) espectro UV-Vis-NIR, B) STEM y C) histograma de tamaño de los NVO obtenidos con los siguientes parámetros (900 μL de AgNO_3 y 400 μL de hidroquinona).

Tabla 8: Diámetro hidrodinámica (DLS) y potencial zeta ($p\zeta$) de las NVOs y NVOs-PEG

Nanosistema	D_h Transversal (nm)	D_h Longitudinal (nm)	$p\zeta$ (mV)
NVOs	3 ± 0.2	59 ± 4	$+28 \pm 3$
NVOs-PEG	11 ± 0.8	105 ± 18	-31 ± 6

Para la modificación de los tres parámetros se registró un desplazamiento hipsocrómico que puede estar atribuido, no al tamaño de la nanopartícula anisotrópica, sino más bien con su entorno ^{104,154}. Por lo que, en lugar de dispersar una mayor cantidad de luz al tener mayor superficie sucede todo lo contrario al funcionalizar esta con diferentes sustancias, como en este caso serían el PEG y los péptidos por lo que se generaría una especie de impedimento ¹⁵⁵. Por otro lado, hubo un aumento del diámetro hidrodinámico luego de la PEGilación. Esto se debe al aumento en volumen de la superficie de las nanopartículas al unirse ambos PEG (metoxilo y carboxilo) y de igual manera en el caso de la unión de los péptidos D1 y D3. Por otro lado, el cambio entre la adición de los péptidos y la PEGilación no es significativo y, esto puede ser debido al tamaño pequeño del péptido en comparación al PEG, al nivel de funcionalización del péptido y a la posición en la que se une a la nanopartícula. De igual manera luego de la PEGilación de las nanopartículas el potencial ζ pasa de positivo a negativo.

14.1.4 Análisis de Impurezas.

Mediante imágenes TEM fue posible observar la presencia de nanoesferas que corresponden a una minoría de entre un 10-20% de la población total, con un tamaño promedio de $24\text{nm} \pm 5\text{nm}$ como se puede apreciar en el histograma a continuación. La aparición de esferas durante la síntesis de NPs anisotrópicas no es nada nuevo como se puede observar en otros trabajos^{80,156}.

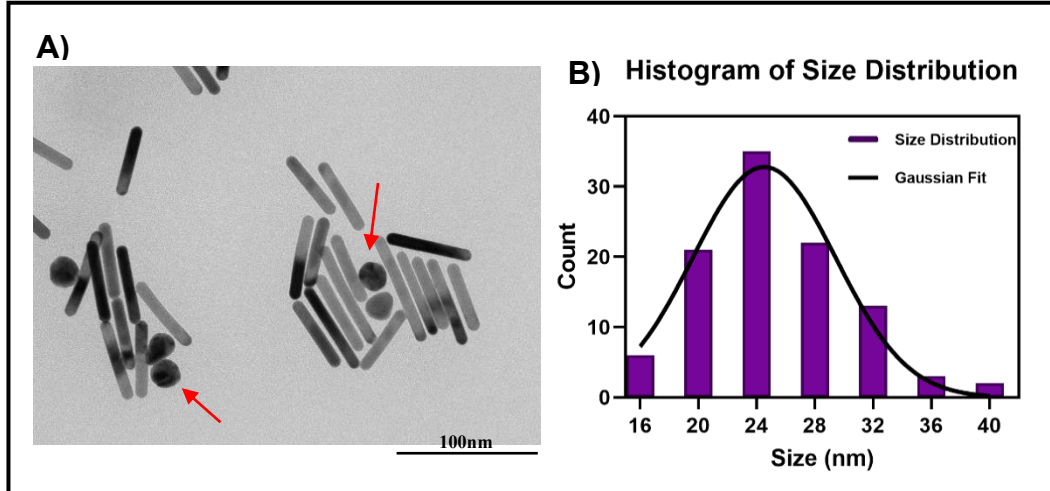


Figura 56: A) Imagen TEM de nanovarillas y nanoesferas (flechas rojas) y B) histograma de tamaño de nanoesferas.

14.1.5 Espectros RAMAN/SERS de los péptidos libres y los nanosistemas estudiados.

14.1.5.1 Espectro SERS de las NVOs-PEG.

El espectro SERS de del sistema NVOs-PEG muestra una banda de gran intensidad relativa alrededor de 255 cm^{-1} , correspondiente a la vibración de estiramiento Au-S y sustenta la interacción química entre el PEG y la superficie de las NVOs. Otras señales de PEG identificable en el espectro son observadas a 803, 1130, 1193, 1253, 1293, 1365, 1445, 1500 y 1571 cm^{-1} de intensidades relativas variables.

14.1.5.2 Espectro RAMAN del péptido D1 (QSHYRHISPAQV).

El espectro Raman del péptido D1 muestra señales con una intensidad relativa a 272, 408, 428, 461, 488, 514, 544, 609, 645, 678, 710,

747, 811, 916, 965, 1122, 1159 y 1297 cm^{-1} .

14.1.5.3 Espectro SERS de las NVOs-PEG-D1.

Basado en el cambio del perfil espectral de D1 con respecto al mismo, pero en el sistema NVOs-PEG-D1, es posible asegurar una interacción entre el péptido y NVOs-PEG. En este sentido, una serie de nuevas señales que son observadas a 635, 731, 833, 864, 1038 y 1430 cm^{-1} dan cuenta de esto.

14.1.5.4 Espectro RAMAN del péptido D3 (*RPRTLHTHRNR*).

El espectro Raman de D3 es más bien simple, con pocas señales y baja intensidad relativa que puede ser atribuido a la poca cantidad de aminoácidos que se repite en el péptido, no así como ocurre en el espectro Raman del péptido D1. En general, el espectro se encuentra dominado por 8 señales de intensidad media observadas a 481, 686, 1197, 1220, 1310, 1340, 1454 y 1534 cm^{-1} .

14.1.5.5 Espectro SERS de las NVOs-PEG-D3.

El espectro SERS de D3 se encuentra dominado por señales con intensidad considerable a 483, 681, 957, 1065, 1282, 1482 y 1537 cm^{-1} . En comparación a las señales observadas para el sistema NVOs-PEG-D1, aquí la intensidad relativa es mayor lo que corrobora su cercanía a la superficie del oro en comparación al otro sistema.

Tabla 9: Asignación de señales RAMAN para los péptidos y SERS para los nanosistemas correspondientes (cm⁻¹)

NVOs-PEG	D1	D3	NVOs-PEG-D1	NVOs-PEG-D3	Asignación
255			-	-	Au-S
803			-	-	Body
1100-1600			1430	-	-CH ₂
	408	418	473	483	CN def.
	609	-	-	-	(A)
	645	-	635	-	(Y)
	710	1534	731	1167-1537	(H)
	811	-	807	-	(Y)(A)
	965-916	951-976-1442	955	957-1482	(R)
	1297	-	1251	-	(Y)
	-	1298	-	1282	(P)

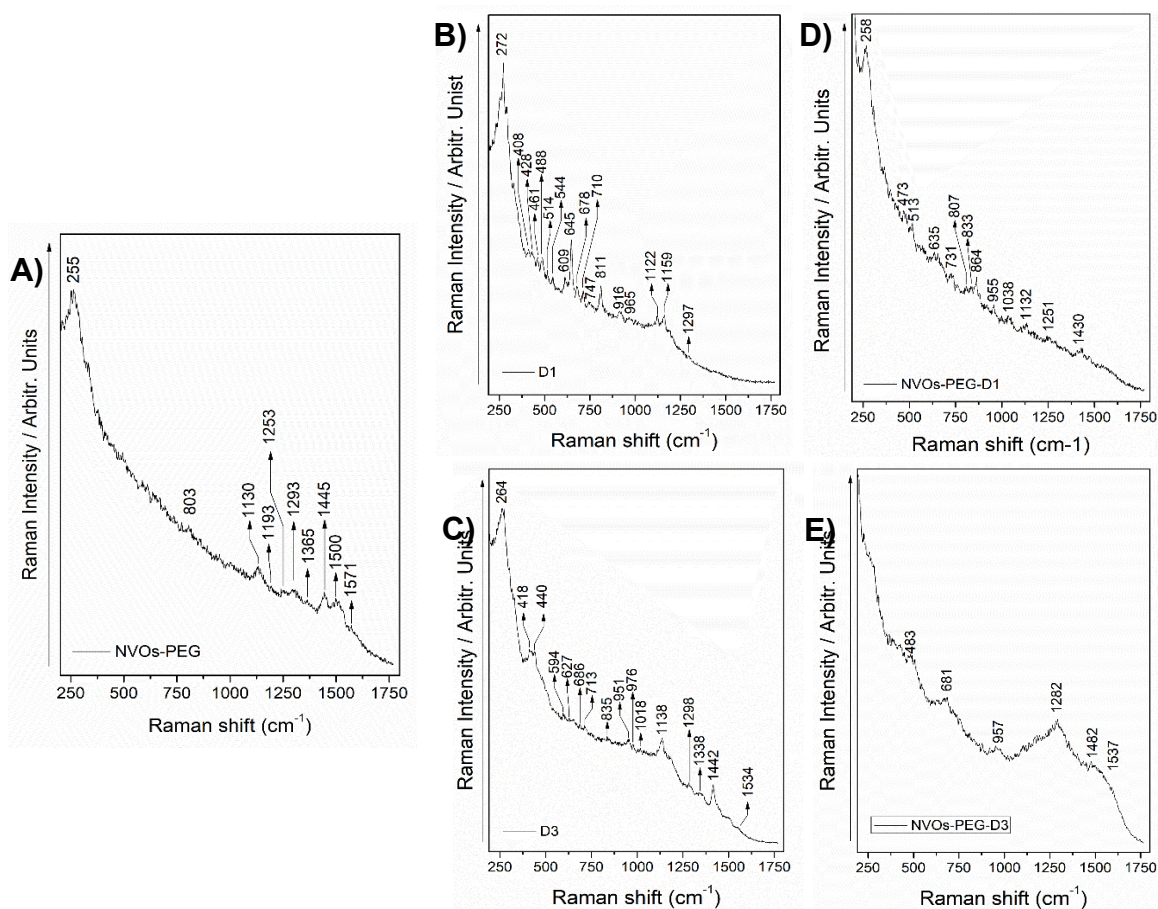


Figura 57: A) Espectro SERS de NVOs-PEG, **B)** Raman del péptido D1, **C)** Raman del péptido D3, **D)** SERS del sistema NVOs-PEG-D1 y **E)** SERS del sistema NVOs-PEG-D3.

14.2 Resumen del contenido de estructura secundaria del A β 1-42 para cada condición estudiada.

A continuación, se presentan deconvolución de los espectros de DC mediante el software *BeStSel* para predecir y calcular el contenido de estructura secundaria del péptido A β 1-42 y de los sistemas estudiados una vez incubados con el péptido. La tabla 10 y 11 muestran los contenidos durante el estudio de la inhibición de la agregación con y sin irradiación NIR a 1064nm a potencia de 350mW.

Tabla 10: Contenido estructura secundaria para inhibición sin irradiación.

	α -helix	β -sheet	β -turn	Random Coil
Aβ	5	49	11	35
D1	6	52	10	33
D3	2	50	11	37
NVO-PEG	0	58	11	31
NVO-PEG-D1	2	39	11	48
NVO-PEG-D3	0	38	12	50

Tabla 11: Contenido estructura secundaria para inhibición con irradiación a 350mW.

	α -helix	β -sheet	β -turn	Random Coil
Aβ+IR	4	55	10	32
D1+IR	3	56	7	34
D3+IR	2	47	11	40
NVO-PEG+IR	0	48	14	38
NVO-PEG-D1+IR	0	43	11	46
NVO-PEG-D3+IR	3	39	12	47

Las tablas 12 y 13 muestran el contenido de estructura secundaria obtenido luego del análisis de DC para los estudios de desagregación del péptido β -amiloide con los péptidos libres D1 y D3 y los nanosistemas de NVOs con y sin irradiación a 1064nm y potencia de 350mW.

Tabla 12: Contenido estructura secundaria para desagregación sin irradiación.

	α -helix	β -sheet	β -turn	Random Coil
Aβ	0	57	8	35
D1	0	59	8	33
D3	3	50	9	38
NVO-PEG	3	61	16	21
NVO-PEG-D1	0	47	18	35
NVO-PEG-D3	0	46	15	39

Tabla 13: Contenido estructura secundaria para desagregación con irradiación a 350mW.

	α -helix	β -sheet	β -turn	Random Coil
Aβ+IR	0	60	10	32
D1+IR	0	48	11	41
D3+IR	10	57	3	30
NVO-PEG+IR	0	47	12	42
NVO-PEG-D1+IR	0	50	11	39
NVO-PEG-D3+IR	0	44	11	45