



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

Memoria de Título

Estudio de la Agregación de la Proteína Beta Amiloide a Través de
Técnicas de Microscopía de Fuerza Atómica Empleando el Péptido
Disruptor LPFFD y Nanopartículas de Oro

Director de Memoria y Patrocinante

Dr. Marcelo J. Kogan
Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico

Aurora De Las Nieves Morales Álvarez

Santiago, Chile

2008

Agradecimientos

Se agradece a los proyectos FONDECYT 1061142 y FONDAP 11980002 (17 07 002).

A los profesionales Dr. Marcelo J. Kogan, Leonardo Caballero, Dr. Francisco Melo, Francisco Vivanco, Nancy Olea, María Soledad Fernández y Ariel Guerrero.

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Departamento de Física, Facultad de Ciencia, Universidad de Santiago de Chile.

Centro para la Investigación Interdisciplinaria Avanzada en Ciencias de los Materiales, CIMAT.

Beca Juan Gómez Millas y Beca para Estudiante Hijo(a) de Profesional de la Educación, Ministerio de Educación, Chile (2001-2007).

Beca Ayudantía de Investigación de Pregrado en Ciencias Básicas e Ingeniería de Materiales en el Área de Microscopía de Fuerza Atómica, Dirigida por Dr. Francisco Melo, CIMAT (2007).

Agradezco profundamente a mi familia, especialmente a mis padres y hermanos.

Índice general

Índice general	III
Índice de cuadros	VI
Índice de figuras	VII
1. Introducción	1
1.1. Marco Teórico	1
1.1.1. Agregación de la proteína beta amiloide ($A\beta$) involucrada en la enfermedad de Alzheimer	1
1.1.2. Modelos para la estructura molecular de agregados amiloides de $A\beta_{1-42}$	2
1.1.3. Caracterización de los agregados de $A\beta_{1-42}$	4
1.1.4. Inhibidores de la agregación de $A\beta_{1-42}$	6
1.2. Planteamiento del problema	9
1.3. Hipótesis	9
1.4. Objetivos	10
1.4.1. Objetivo General	10
1.4.2. Objetivos Específicos	10

2. Diseño Experimental	11
2.1. Obtención de agregados de $A\beta_{1-42}$	11
2.2. Análisis de las características estructurales de los agregados de $A\beta_{1-42}$.	11
2.3. Estudio de la interacción entre LPFFD y los agregados tóxicos de $A\beta_{1-42}$ a través de AFM	16
2.4. Reconocimiento de sitios de unión entre NPAu conjugadas a CLPFFD y agregados de $A\beta_{1-42}$	17
3. Materiales y Métodos	18
3.1. Obtención de agregados de $A\beta_{1-42}$	18
3.2. Características de los agregados de $A\beta_{1-42}$	19
3.2.1. Observaciones por Microscopía Electrónica de Transmisión, TEM	19
3.2.2. Observaciones por Microscopía de Efecto Fuerza, AFM.	20
3.3. Estudio de la interacción entre LPFFD y los agregados tóxicos de $A\beta_{1-42}$ a través de AFM	23
3.3.1. Interacción entre LPFFD y agregados de $A\beta_{1-42}$ <i>in volumen</i> . . .	23
3.3.2. Estudio de la interacción entre LPFFD y agregados de $A\beta_{1-42}$ a través de espectroscopía de fuerzas	24
3.3.3. Determinación <i>in situ</i> del efecto del péptido LPFFD sobre los agregados de $A\beta_{1-42}$	25
3.4. Reconocimiento de sitios de unión entre NPAu conjugadas a CLPFFD y agregados de $A\beta_{1-42}$	26
4. Resultados y Análisis	27
4.1. Obtención y caracterización de los agregados de $A\beta_{1-42}$	27
4.2. Interacción entre LPFFD y los agregados de $A\beta_{1-42}$ <i>in volumen</i>	38

4.3. Interacción entre LPFFD y los agregados de $A\beta_{1-42}$ a través de espectroscopía de fuerzas (FV)	40
4.4. Determinación <i>in situ</i> del efecto del péptido LPFFD sobre los agregados de $A\beta_{1-42}$	46
4.5. Reconocimiento de sitios de unión entre de NPAu conjugadas a CLPFFD y AT de $A\beta_{1-42}$	52
5. Discusión	58
6. Conclusiones	64
Bibliografía	66
7. Anexos	71

Índice de cuadros

4.1. Radio nominal de la sondas, fuerza de adhesión y energía de adhesión de curvas de fuerza obtenidas en los experimentos de FV	44
4.2. Dimensiones en zonas bajas y altas de FA de estudiados sobre Mica- en TM AFM en aire	56

Índice de figuras

1.1. Modelo hipotético de la agregación <i>in vitro</i> de $A\beta_{1-42}$. --→ No favorece la formación. —→ Favorece la formación (Adaptado de [1, 2])	3
1.2. A: Modelo de dos monómeros de $A\beta_{1-42}$ paralelos basado en datos RMN [3]; B: Modelo Estructural de dos monómeros de $A\beta_{1-42}$ antiparalelos basado en datos RMN [4, 5, 6]; C: Secuencia Peptídica de monómero de $A\beta_{1-42}$. Azul: aminoácidos hidrofóbicos; Gris: aminoácidos polares \ominus a pH 7,4; Rojo: aminoácidos polares \oplus a pH 7,4; Lila: aminoácidos polares sin carga a pH 7,4; G es neutro (Adaptado de [5])	5
1.3. Caracterización de la estructura de $A\beta_{1-42}$ en distintos estadios de crecimiento a través de AFM. A: Imagen de Altura; Grupos de protofibrillas sobre HOPG; tiempo incubación = 2 días. La barra representa 50 nm. B: Imagen de Amplitud; Fibras helicoidales sobre HOPG. C: Imagen de Amplitud; Fibras nodulares sobre HOPG; tiempo incubación = 2-3 y hasta 5 días. Las barras representan: 100 nm (Adaptado de [7])	6
1.4. Secuencia Peptídica de $A\beta_{1-42}$ y su región hidrofóbica capaz de interactuar con LPFFD	7

1.5. Diagrama del conjugado NPAu-CLPFFD y disposición del péptido CLPFFD sobre su superficie. Derecha: Imagen adquirida en TEM de fibras amiloides de A β ₁₋₄₂ incubadas con NPAu-CLPFFD. Barra: 200 nm [8]	8
2.1. Esquema del funcionamiento del AFM. Adaptado de [9]	14
2.2. Curva típica de fuerza-distancia. Adaptado de [9]	15
3.1. Izquierda: Sonda NP Veeco en sus caras frontal y lateral [10]; Derecha: Sonda TESPA-7, serie ESP Veeco en sus caras frontal y lateral [11]	21
3.2. Esquema del funcionamiento del AFM durante la espectroscopía de fuerza	25
4.1. Fibras amiloides de A β ₁₋₄₂ observadas sobre rejilla de cobre recubierta con una membrana Formvar y carbón en TEM con 50000 aumentos (80 kV)	28
4.2. Imágenes TM AFM en fluido. A: Amiloesferoides (AEs) y protofibrillas de A β ₁₋₄₂ incubadas 24 h 20°C, lavadas con BF 5 mM. Imagen de Amplitud: 1,5 μ m; 384 pixeles; sonda Veeco NP; Rango en Z: 50 mV. <i>Escáner J</i> . B: Protofibrillas y fibras de A β ₁₋₄₂ incubadas 20 h 23°C, lavadas con BF 5 mM. Imagen de Amplitud: 10 μ m; 512 pixeles; sonda Veeco NP; Rango en Z: 150 mV. <i>Escáner PF</i> . C: Paquete de fibras helicoidales de A β ₁₋₄₂ incubadas 30 h 23°C, lavadas con BF 5mM. Imagen de Amplitud: 1,13 μ m; 384 pixeles; sonda Veeco NP; Rango en Z: 50 mV. <i>Escáner J</i> . La flecha indica la presencia de una monocapa de A β ₁₋₄₂	30

4.3.	Imágenes TM AFM en fluido de altura, amplitud y fase de fibras de $A\beta_{1-42}$ sobre HOPG obtenidas según protocolo (detallado en 3.1) más 42 horas a 37°C . <i>Escáner</i> PF A: Imagen de Altura: $3\mu\text{m}$; Rango en Z: 5 nm. B: Imagen de Amplitud: $3\mu\text{m}$; Rango en Z: 50 mV; C: Imagen de Fase: $3\mu\text{m}$; Rango en Z: 7°	31
4.4.	Imagen TM AFM en fluido de altura, amplitud y fase, de fibras amiloides sobre HOPG incubadas según protocolo (ver sección 3.1). 384 pixeles; sonda Veeco NP; <i>Escáner</i> E. A: Imagen de Altura: $10\mu\text{m}$, Rango en Z: 50 nm. B: Imagen de Amplitud: $10\mu\text{m}$, Rango en Z: 150 mV. C: Imagen de Fase: $10\mu\text{m}$, Rango en Z: 180°	32
4.5.	Imagen de altura TM AFM en fluido sobre HOPG de FAs $100\mu\text{M}$ incubada según protocolo (ver sección 3.1) que presenta estructura helicoidal. Sonda de oro Olympus TR400PB. <i>Escáner</i> PF. Rango en Z: 10 nm. Nótese en el perfil topográfico la longitud de onda de 100 nm y la altura máxima de 5 nm de la fibra. Abajo: Modelo de la disposición de las hebras de fibras helicoidales de $A\beta_{1-42}$. Cada hebra se gira sobre si misma cada ~ 100 nm sobre su eje escondiendo los aminoácidos hidrofóbicos en el centro del eje. Rojo y verde: Caras externas idénticas de la hebra de $A\beta_{1-42}$ constituida con dímeros antiparalelos de $A\beta_{1-42}$	33

- 4.6. Imágenes TM AFM en fluido sobre Mica de FAs de $A\beta_{1-42}$ obtenidas a diferentes tiempos de incubación. Sonda Veeco NP; *Escáner* J. A: $A\beta_{1-42}$ 100 μ M incubadas 24 h 25°C. Lavada con BF 5mM. Imagen de Amplitud: 2,0 μ m; 384 pixeles; Rango en Z: 100 mV. B: $A\beta_{1-42}$ 5 μ M incubadas 48 h a 23°C. Lavada con BF 5 mM. Imagen de Altura: 6,0 μ m; 256 pixeles; Rango en Z: 100 nm. C: $A\beta_{1-42}$ 5 μ M incubadas 96 h a T amb. Lavado con BF 5 mM. Imagen de Altura: 4,0 μ m; 256 pixeles; Rango en Z: 50 nm 35
- 4.7. Imágenes en el TM del AFM en aire de altura y fase sobre Mica-Mg⁺² de FAs de $A\beta_{1-42}$ incubadas 20 h 23°C. 512 pixeles; sonda Veeco NP; *Escáner* PF. A: Imagen de Altura: 4 μ m; Rango en Z: 50 nm. B: Imagen de Fase: 4 μ m; Rango en Z: 77,6°. C: Imagen de Fase: 1 μ m; Rango en Z: 77,6° 37
- 4.8. Interacción entre LPFFD y $A\beta_{1-42}$ *in volumen* observada sobre HOPG. A: $A\beta_{1-42}$ 37,5 μ M (0,17 μ g/ μ L) incubadas 20 horas a 23°C, observadas en TM AFM sobre HOPG. Imagen de Amplitud: 10 μ m; Rango en Z: 500 mV; *Escáner* PF. B: Imagen posterior a 144 horas a 25°C de interacción de $A\beta_{1-42}$ 0,17 μ g/ μ L con LPFFD 1,6 μ g/ μ L *in volumen* (67 mol LPFFD/1 mol $A\beta_{1-42}$). Imagen de Amplitud: 10 μ m; Rango en Z: 100 mV 39
- 4.9. Desarrollo de la Espectroscopía de Fuerzas (FV) sobre HOPG en imágenes. A: Imagen de Altura 3 μ m, 512 pixeles; sonda Olympus TR400PB funcionalizada con CLPFFD; Rango en Z: 10 nm. B: Misma zona, imagen de Altura 3 μ m, 64 pixeles. C: Misma zona, imagen de Fuerzas sonda-superficie 3 μ m, 64 pixeles *Escáner* J. 41
- 4.10. A: Curva de fuerza de adhesión entre Au-CLPFFD y FAs adsorbidas a HOPG; B: Curva de fuerza entre Au-CLPFFD y FAs adsorbidas a HOPG 42

4.11. A: Curva de fuerza entre oro y HOPG; B: Curva de fuerza entre Au-CLPFFD y HOPG	43
4.12. Desarrollo de la Espectroscopía de Fuerzas (FV) sobre Mica en imágenes y mapa de zonas de interacción entre CLPFFD y $A\beta_{1-42}$ (más azul, mayor interacción). A: TM en AFM en fluido de FAs de $A\beta_{1-42}$ 5 μ M incubadas 96 h a T ambiente, sobre mica clivada. Lavado con BF 5 mM. Imagen de Altura: 4 μ m; 256 pixeles; sonda Veeco NP; Rango en Z: 50 nm. <i>Escáner</i> J. B: Imagen de Altura 4 μ m; 64 pixeles; sonda Olympus TR400PB de Au-CLPFFD. C: Imagen de Fuerza 4,0 μ m; 64 pixeles. D: Imagen en plano 64 \times 64 pixeles que entrega información de los mínimos de cada curva de <i>retracting</i> de la Espectroscopía de Fuerzas. E: Imagen en perspectiva y gráfica.	45
4.13. Flujo de LPFFD 1 mM sobre FAs de $A\beta_{1-42}$ adsorbidas en HOPG. <i>Escáner</i> PF, 384 pixeles, sonda Veeco NP. A: TM AFM en fluido de $A\beta_{1-42}$ 100 μ M; 20h a 23°C. Imagen del inicio del flujo de LPFFD 1mM 2mL/hora; Imagen de Amplitud: 3 μ m; Rango en Z: 300 mV. B: Flujo de LPFFD 1mM de 4 horas a 2 mL/hora más reposo por 23 horas a T ambiente en la celda de fluido del AFM. Imagen de Amplitud: 3 μ m; Rango en Z: 300 mV. C: Imagen de Amplitud: 1 μ m; Rango en Z: 300 mV.	47

4.14. Flujo de LPFFD 8 mM sobre FAs de $A\beta_{1-42}$ adsorbidas en HOPG. <i>Escáner</i> PF, 384 pixeles, sonda Veeco NP. A: Fibras cortas helicoidales 100 μM agregadas según protocolo. Flujo de LPFFD 8 mM a 2 mL/hora, pasados 0,44 mL de flujo. Imagen de Fase 3,31 μm , Rango en Z: 20°. B: Imagen de Amplitud: 3,31 μm , Rango en Z: 500 mV; C: Pasados 2 mL de flujo. Imagen de Amplitud: 1 μm , Rango en Z: 500 mV. D: Imagen de Fase: 1 μm , Rango en Z: 20°	50
4.15. Interacción entre HOPG y LPFFD 8 mM. <i>Escáner</i> PF, sonda Veeco NP. 384 pixeles. A: LPFFD 8mM (sobresaturado) sobre HOPG; zona característica a las 0 horas de reposo. Imagen de Amplitud: 10 μm ; Rango en Z: 100 mV. B: LPFFD 8mM (sobresaturado) sobre HOPG. Imagen capturada a las 5 horas de interacción con el HOPG. Imagen de Amplitud: 5 μm , Rango en Z: 150 mV. C: Agregados de LPFFD con orientación angular. Imagen de Amplitud: 1 μm , Rango en Z: 150 mV.	51
4.16. Imagen de TEM en aire a 140000 aumentos y 80 kV de NPAu-CLPFFD sobre rejilla de cobre recubierta con una membrana Formvar y carbón. Derecha: Gráfico de barras con histograma de NPAu-CLPFFD.	52
4.17. Imágenes de $A\beta_{1-42}$ 100 μM sobre Mica- Mg^{+2} en TM AFM en aire. A: Imagen de Altura: 1 μm ; Rango en Z: 15 nm; 512 pixeles; <i>Escáner</i> E; Sección Roja: Altura: 3,9 nm; Sección azul: Diámetro: 43 nm. B: Otra zona, Sección Roja: Altura: 3,5 nm; Sección azul: Diámetro: 47 nm . . .	53
4.18. Imágenes de $A\beta_{1-42}$ 100 μM mezcladas con NPAu-CLPFFD sobre Mica- Mg^{+2} en TM AFM en aire. Imágenes de altura: 1 μm ; Rango en Z: 15 nm; 512 pixeles, <i>Escáner</i> E. A: Diámetro: 79 nm; B: Longitud de onda: 101 nm; C: Altura de AEs: 1,3 nm; D: Altura: 8,6 nm.	55

5.1. Interacción de diferentes agregados amiloides con las superficies estudiadas. +++: Interacción elevada; ++: Interacción media; +: Interacción muy pobre o nula.	59
5.2. A: Modelo antiparalelo de la disposición de dos monómeros de A β ₁₋₄₂ . B: Modelo en perspectiva de la formación helicoidal de varios dímeros de A β ₁₋₄₂ [4, 5, 6]. C: Disposición de A sobre mica-Mg ⁺² D: Disposición de A sobre HOPG. Zona roja: región hidrofílica; zona azul: región hidrofóbica.	59
5.3. Modelo de interacción de agregados de A β ₁₋₄₂ con las superficies estudiadas (Basado en Figura 5.2). A: Amiloesferoides sobre HOPG. B: Fibra amiloide sobre HOPG. C: AEs sobre micaMg ⁺² D: FAs sobre mica-Mg ⁺² . Nótese que existe un crecimiento lateral de las hebras que se colocan adyacentemente manteniendo una altura de 5 nm.	60

Abreviaturas

- HOPG : Grafito pirrolítico altamente ordenado
- CLPFFD: Secuencia peptídica Cys-Leu-Pro-Phe-Phe-Asp
- LPFFD: Secuencia peptídica Leu-Pro-Phe-Phe-Asp
- $A\beta_{1-42}$: Proteína amiloide beta de 42 aminoácidos
- PPA: Proteína Precursora de Amiloide
- FA: Fibra amiloide
- AT : Agregado tóxico
- BF: Tampón fosfato
- HFIP: Hexafluoroisopropanol
- TEM: Microscopio electrónico de transmisión
- RMN: Resonancia magnética nuclear
- AFM: Microscopio de fuerza atómica
- TM: Modo contacto intermitente
- FV: Modo fuerza en volumen
- LB: Langmuir-Blodgett
- NPAu-CLPFFD: Nanopartícula de oro conjugada al péptido CLPFFD
- k: Constante elástica del *cantilever* (N/m)
- f: Frecuencia de resonancia del *cantilever* (kHz)
- N/m (Newton/metro) = J/m^2 (Joule/metro²)
- γ_{SL} : Energía hidrofóbica en medio acuoso
- R: Radio nominal
- F_a : Fuerza de adhesión
- D.E.: Desviación estándar

Resumen

La proteína beta amiloide ($A\beta$), involucrada en la enfermedad de Alzheimer, cambia su conformación en condiciones patológicas formando agregados tóxicos (AT) que tienen un efecto neurodegenerativo. La estructura molecular de los AT todavía no se ha dilucidado debido a que $A\beta$ no cristaliza. Su conocimiento contribuirá al diseño de fármacos capaces de interferir eficientemente en el proceso de agregación. En este, $A\beta_{1-42}$ puede formar estructuras como protofibrillas, amiloesferoides o fibras amiloides (FAs). Para obtener información estructural y sondear si existe exposición de grupos hidrofóbicos en los AT de $A\beta_{1-42}$, se emplearon diferentes técnicas como AFM, TEM, FV, y sondas de nanopartículas (NP) metálicas. Se estudió la interacción de los AT con sustratos hidrofílicos e hidrofóbicos y también se usaron NP de oro conjugadas al péptido CLPFFD, que reconocen selectivamente los AT. A través de espectroscopía de fuerza (FV), se estudió la interacción de los AT adsorbidos a HOPG (grafito pirrolítico altamente ordenado) con una sonda de oro funcionalizada con CLPFFD. Una de las interacciones observadas fue la adhesión, atribuible a la interacción entre residuos hidrofóbicos de los AT y CLPFFD. Además, se estudió la interacción entre LPFFD y FAs *in volumen* observándose la desagregación de FAs. Paralelamente, se realizaron experimentos *in situ* observándose que LPFFD no produce desagregación de FAs sobre HOPG, debido a que los sitios de interacción con LPFFD se encuentran bloqueados por la interacción con el HOPG. Los resultados obtenidos revelaron interesantes propiedades fisicoquímicas de los agregados, que concuerdan con algunos de los modelos actuales para la agregación de la proteína $A\beta_{1-42}$.

Abstract

The amyloid beta peptide ($A\beta$), involved in Alzheimer's disease, can change its conformation in pathologic conditions forming toxic aggregates (TA) with a neurodegenerative effect. Structure of $A\beta$ at a molecular level is unknown yet due to this protein has not been crystalized. The knowledge of the structure will contribute to the design of new drugs that can efficiently halt the aggregation process. In the aggregation process, is possible to recognize clear structures of $A\beta_{1-42}$, like protofibrils, globular aggregates or amyloid fibrils (AF). To obtain information about the structure of amyloid aggregates and to probe whether exist exposition of hydrophilic or hydrophobic groups in different regions, AFM, TEM, FV and metal nanoparticles probes will be used. The interaction between the TA and hydrophobic and hydrophilic substrates has been studied. In addition, gold nanoparticles (AuNP) were linked to the peptide CLPFFD that selectively attaches to the AF of $A\beta_{1-42}$. We study with force spectroscopy (FV) mode, the interaction of the TA of $A\beta_{1-42}$ adsorbed in a HOPG surface, with a gold-CLPFFD linked probe. The force curves gave information of the interaction between the AF of $A\beta_{1-42}$ and the peptide sequence CLPFFD. One of the interactions observed was the adhesion, attributable to the interaction between hydrophobic residues. Therefore, we study the interaction between LPFFD and AF of $A\beta_{1-42}$ *in volumen* observing the disaggregation. In contrast, in experiments done *in situ*, disaggregation was not observed due to the blocking of the AF by HOPG to LPFFD that avoid the interaction. The obtained results reveals interesting physicochemical properties of the TA which are in agreement with some of the recently proposed models for the $A\beta_{1-42}$ aggregation.

Capítulo 1

Introducción

1.1. Marco Teórico

1.1.1. Agregación de la proteína beta amiloide ($A\beta$) involucrada en la enfermedad de Alzheimer

El plegamiento incorrecto de ciertas proteínas conduce a la formación de especies tóxicas, causantes de las denominadas enfermedades conformacionales [12]. En este grupo de enfermedades se incluye la enfermedad de Alzheimer (EA) [13], la enfermedad de Huntington [14], la diabetes tipo II [15], y la enfermedad de Parkinson [16], entre otras. En el caso de la EA, la proteína beta amiloide ($A\beta$) proviene de una proteína transmembrana de 695 a 770 aminoácidos, la proteína precursora de amiloide (PPA), que en condiciones patológicas es escindida por dos proteasas (secretasa α y γ) [2]. $A\beta$ constituye una familia de moléculas que contienen secuencias peptídicas de 39 a 43 aminoácidos [17], siendo la más tóxica la de 42 aminoácidos, es decir $A\beta_{1-42}$ [18]. En condiciones fisiológicas, los monómeros de $A\beta$ son solubles, pero en condiciones patológicas su conformación

cambia a lámina beta plegada (β -sheet) [19], los monómeros se pliegan incorrectamente, se autoagregan y dan origen a agregados tóxicos (AT) [20]. En el proceso patológico de la agregación de $A\beta$ pueden encontrarse intermediarios neurotóxicos como oligómeros no fibrilares pequeños, solubles y difusibles, denominados protofibrillas, amiloesferoides y fibras amiloides (FAs) [21]. Los AT continúan agregándose dando origen a placas amiloides, que pueden ser observadas en tejido cerebral de pacientes que padecen EA [22]. El proceso de agregación de $A\beta$ es muy complejo, y aunque existen diversos grupos investigándolo, hasta el presente la estructura molecular de los AT de $A\beta$ no se conoce. Algunos autores han propuesto mediante experimentos *in vitro*, que los oligómeros o protofibrillas no son intermediarios obligados en la vía de formación de fibras, y que existe otro tipo de estructuras intermediarias que puede formar fibras sin formación previa de oligómeros, llamadas intermediarios I, siendo la estructura de éstos aún desconocida. (Figura 1.1)

1.1.2. Modelos para la estructura molecular de agregados amiloides de $A\beta_{1-42}$

El estudio de la estructura a nivel molecular de los AT de $A\beta_{1-42}$ (la forma más tóxica de $A\beta$), en cualquiera de sus etapas de formación, es importante para una comprensión del proceso de formación de fibras y placa amiloide. La estructura peptídica de $A\beta$ es insoluble, no forma cristales [23], lo que ha sido un impedimento para conocer su estructura al emplear técnicas convencionales de la biología estructural, como la cristalografía de rayos X.

Los modelos estructurales acerca de la disposición de los aminoácidos en monómeros de $A\beta_{1-42}$ que forman AT, se basan en datos experimentales obtenidos a través de

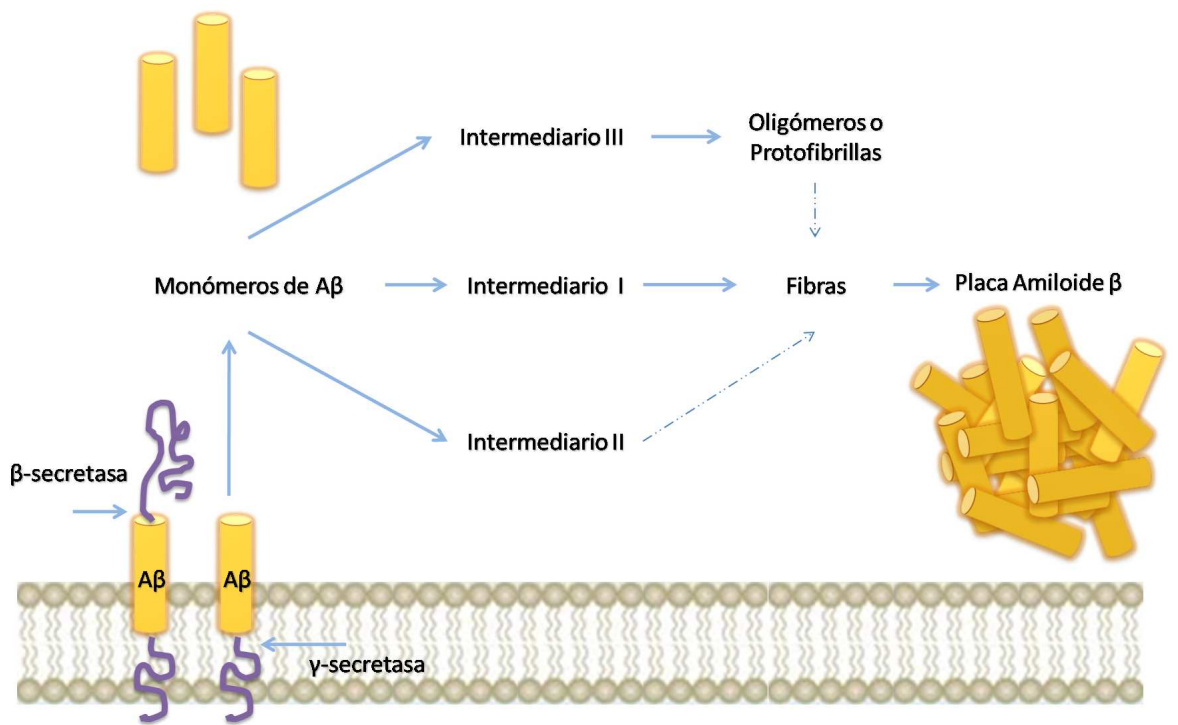


Figura 1.1: Modelo hipotético de la agregación *in vitro* de $A\beta_{1-42}$. --> No favorece la formación. —> Favorece la formación (Adaptado de [1, 2])

Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) en solución o en fase sólida, usando protección frente a solvente con intercambio Hidrógeno/Deuterio. En uno de los modelos se sugiere que en los AT los monómeros de $A\beta_{1-42}$ tienen una disposición paralela, ocultando del agua los residuos hidrofóbicos de la cadena que abarca desde el aminoácido 29 al 42 (Figura 1.2A). Mientras que en otro modelo se postula que existe una estructura base constituida por dos monómeros de $A\beta_{1-42}$ dispuestos en forma antiparalela, manteniendo las interacciones hidrofóbicas, y que por interacciones de tipo puente de hidrógeno e hidrofóbicas entre cada monómero, logra formar intermediarios, oligómeros y fibras de longitud variable (Figura 1.2B). *Aún no existen modelos definitivos acerca de la disposición paralela o antiparalela de estas moléculas.*

1.1.3. Caracterización de los agregados de $A\beta_{1-42}$

Para estudiar la estructura de $A\beta_{1-42}$ se han utilizado técnicas especializadas de sondeo, pero con menor capacidad general de detectar a nivel molecular las estructuras. La microscopía electrónica de transmisión (Transmission Electronic Microscopy, TEM) y la microscopía de fuerza atómica (Atomic Force Microscopy, AFM) son los instrumentos que entregan mayor información sobre la topología y morfología fibrilar como el largo, ancho, espaciado entre cadenas, número de protofilamentos y forma de ensamblaje de las fibras. Las estructuras de $A\beta_{1-42}$ han sido caracterizadas *in vitro* con estas técnicas [7, 24], que han aportado información sobre las características estructurales a escala nanométrica y acerca del proceso de agregación. En AFM, Arimon y colaboradores [7], han observado que existen estructuras amiloides de tamaño y características definidas. Por ejemplo, se han observado sobre superficies hidrofóbicas, protofibrillas de tamaños que promedian los 64 nm (Figura 1.3A). También se han observado FAs que presentan una formación helicoidal periódica de 92,5 nm (Figura 1.3B), y estructuras formadas por grupos de fibras,

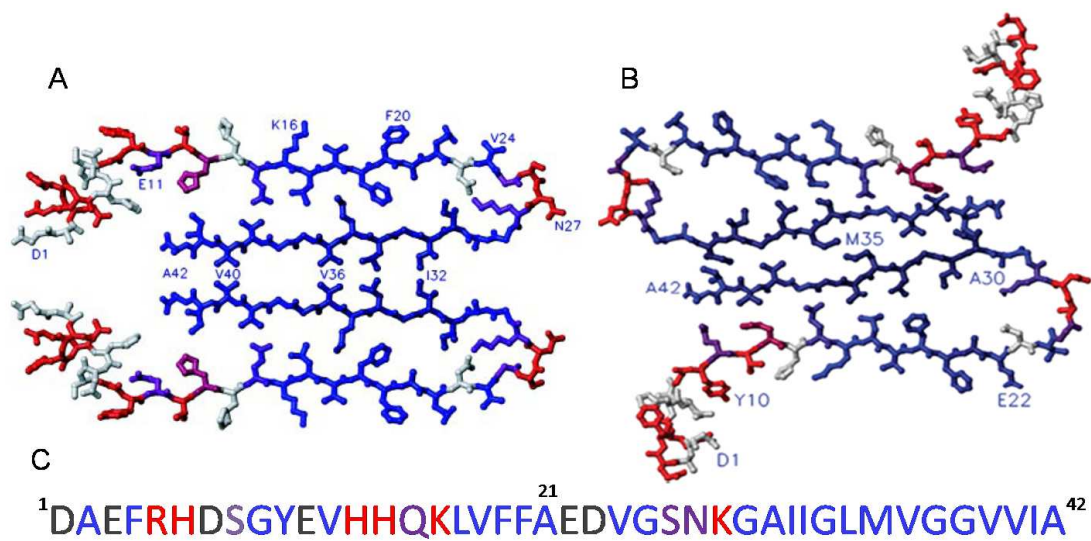


Figura 1.2: A: Modelo de dos monómeros de Aβ₁₋₄₂ paralelos basado en datos RMN [3]; B: Modelo Estructural de dos monómeros de Aβ₁₋₄₂ antiparalelos basado en datos RMN [4, 5, 6]; C: Secuencia Peptídica de monómero de Aβ₁₋₄₂. Azul: aminoácidos hidrofóbicos; Gris: aminoácidos polares \ominus a pH 7,4; Rojo: aminoácidos polares \oplus a pH 7,4; Lila: aminoácidos polares sin carga a pH 7,4; G es neutro (Adaptado de [5])

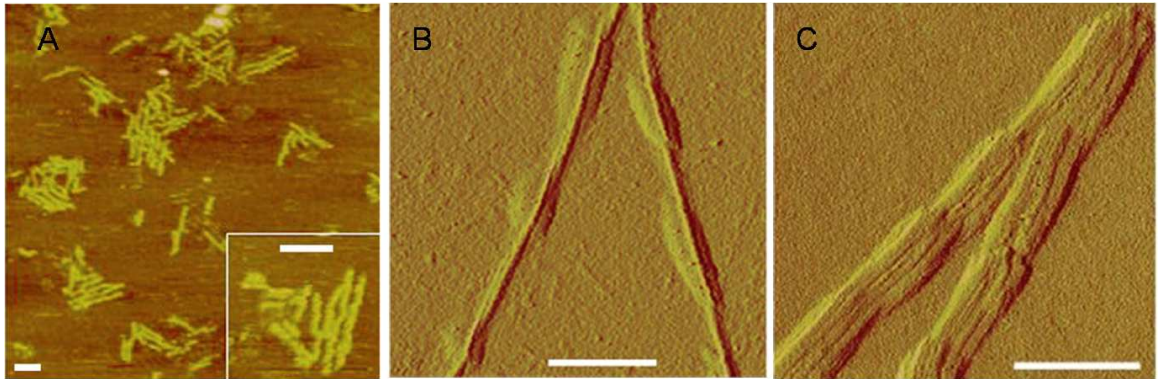


Figura 1.3: Caracterización de la estructura de $A\beta_{1-42}$ en distintos estadios de crecimiento a través de AFM. A: Imagen de Altura; Grupos de protofibrillas sobre HOPG; tiempo incubación = 2 días. La barra representa 50 nm. B: Imagen de Amplitud; Fibras helicoidales sobre HOPG. C: Imagen de Amplitud; Fibras nodulares sobre HOPG; tiempo incubación = 2-3 y hasta 5 días. Las barras representan: 100 nm (Adaptado de [7])

llamadas fibras nodulares, que presentan una periodicidad cada 93,5 nm (Figura 1.3C), y que podrían ser etapas intermedias a la formación de placas amiloides.

1.1.4. Inhibidores de la agregación de $A\beta_{1-42}$

Existen varias estrategias terapéuticas para enfrentar la EA y el proceso de agregación, algunas de ellas en fases iniciales de estudios clínicos. Estas han emergido ante el creciente conocimiento de la proteína $A\beta$, de cómo se genera y de los efectos que provocan sus intermediarios en la función sináptica. Una de las estrategias estudiadas es la posibilidad de inhibir las enzimas α o γ secretasa para disminuir la generación de $A\beta$. Sin embargo, esto bloquearía funciones biológicas de estas enzimas, como la señal de muerte celular (secretasa 32) o la mielinización (secretasa 89), causando potencialmente una serie de efectos secundarios inesperados [25]. La inmunoterapia también ha sido estudiada e intentada,

¹DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA⁴²

Figura 1.4: Secuencia Peptídica de $A\beta_{1-42}$ y su región hidrofóbica capaz de interactuar con LPFFD

a través del uso de anticuerpos, neutralizar selectivamente los oligómeros de $A\beta$, lo que podría prevenir su formación y/o disrumpir su estructura [26]. Otra estrategia terapéutica ha llevado a la síntesis de medicamentos antiagregantes, los cuales previenen o disrumpen oligómeros, transformándolos en formas no tóxicas. En esta línea algunos autores han propuesto bloquear la agregación de $A\beta$ para disminuir su toxicidad, usando moléculas peptídicas que interaccionen con grupos de residuos hidrofóbicos o mediante puentes de hidrógeno con los agregados de $A\beta$, impidiendo que estos crezcan. A partir de la secuencia de aminoácidos presentes en las estructuras de $A\beta$, Soto y colaboradores [27], diseñaron moléculas peptídicas inhibitoras de la agregación de $A\beta_{1-40}$ y $A\beta_{1-42}$, basadas en los residuos 17 al 21 de $A\beta_{1-42}$ (¹⁷LVFFA²¹). Esta región es muy importante para el proceso de agregación, ya que funciona como un núcleo de agregación [27]. Una de estas secuencias peptídicas inhibitoras está compuesta por 5 aminoácidos: Leucina (Leu, L), Prolina (Pro, P), Fenilalanina (Phe, F), Fenilalanina y Ácido Aspártico (Asp, D), y tiene el nombre de $iA\beta^5$ o LPFFD (Figura 1.4). Se ha observado que esta secuencia es capaz de inhibir selectivamente la formación tanto de $A\beta_{1-40}$ como de $A\beta_{1-42}$ y, que es capaz de desagregar estructuras fibrilares ya formadas usando concentraciones muy elevadas.

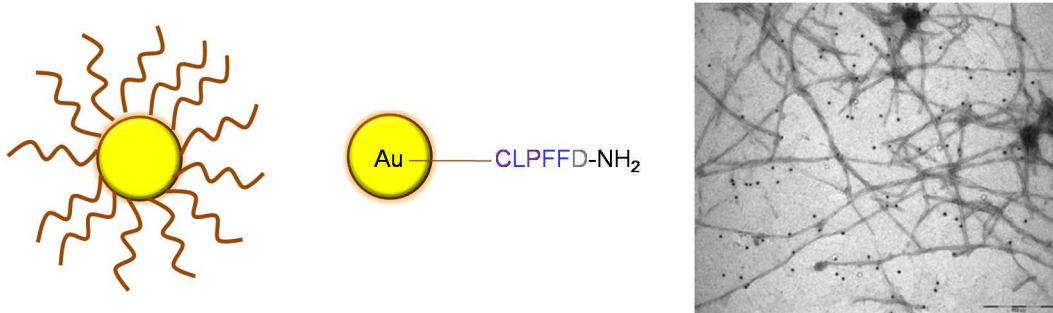


Figura 1.5: Diagrama del conjugado NPAu-CLPFFD y disposición del péptido CLPFFD sobre su superficie. Derecha: Imagen adquirida en TEM de fibras amiloides de $A\beta_{1-42}$ incubadas con NPAu-CLPFFD. Barra: 200 nm [8]

Por otra parte, Kogan y colaboradores [8], observaron por TEM que nanopartículas metálicas de oro (NPAu) conjugadas al péptido CLPFFD (conjugados NPAu-CLPFFD) interaccionan *in vitro* con FAs de $A\beta_{1-42}$ al incubarlas por 48 horas, colocándose a lo largo de la fibra a distancias de aproximadamente ~ 100 nm (Figura 1.5). Este hecho podría estar relacionado con que en las fibras se exponen, con una cierta periodicidad, residuos que presentan afinidad por LPFFD. *Conocer este patrón podría proporcionar información acerca de la disposición de las moléculas en los agregados de $A\beta_{1-42}$.*

1.2. Planteamiento del problema

Según se describió anteriormente, existe controversia y desconocimiento acerca de la estructura molecular de los agregados amiloides y de las etapas de formación de placas amiloides, por lo tanto, se hace muy difícil explicar el ordenamiento de los monómeros de $A\beta_{1-42}$ en dichos agregados. La exposición periódica de residuos hidrofílicos e hidrofóbicos en los agregados, deja al descubierto un patrón que podría ser reconocido a través de la observación de estructuras definidas y periódicas. Conocer dicho patrón contribuirá a formular modelos moleculares para los agregados de $A\beta$. También, conocer el mecanismo de agregación de $A\beta$ es útil para el diseño de nuevos inhibidores, que impidan la formación o desagreguen los agregados tóxicos. Para esto, es necesario conocer en qué regiones de las estructuras de los agregados protofibrilares y fibrilares de $A\beta_{1-42}$ existe mayor interacción con moléculas como el péptido inhibidor LPFFD, y si existe alguna relación entre la periodicidad presente en los agregados y la interacción con LPFFD. Los resultados obtenidos contribuirán a proponer un modelo para explicar la estructura molecular de agregados como protofibrillas y fibras cortas.

1.3. Hipótesis

En los agregados de $A\beta_{1-42}$ existen zonas que exponen aminoácidos hidrofóbicos y/o hidrofílicos, localizados a lo largo de protofibrillas y fibras amiloides.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo General

Encontrar si existen zonas (hidrofílicas o hidrofóbicas) que se localizan en las protofibrillas y en las fibras amiloides pequeñas (menos de 1 μm de longitud), mediante el uso de técnicas de microscopía de fuerza atómica, empleando el péptido LPFFD que reconoce fragmentos de la secuencia de $A\beta_{1-42}$ en estos agregados.

1.4.2. Objetivos Específicos

- Obtener *in vitro* agregados de $A\beta_{1-42}$ (oligómeros, protofibrillas y fibras amiloides)
- Analizar las características estructurales de los agregados de $A\beta_{1-42}$
- Estudiar la interacción entre CLPFFD (unido a oro) y los agregados de $A\beta_{1-42}$
- Determinar *in situ* si existe efecto diferencial del péptido LPFFD en diferentes zonas de los agregados de $A\beta_{1-42}$
- Reconocer mediante conjugados de nanopartículas metálicas con el péptido LPFFD, si existen sitios preferenciales de unión de dicho péptido a los agregados de $A\beta_{1-42}$

Capítulo 2

Diseño Experimental

2.1. Obtención de agregados de $A\beta_{1-42}$

Para la obtención de oligómeros, protofibrillas y fibras amiloides se puede utilizar el método de agregación detallado en la referencia 26. Este método consiste en realizar una disolución del péptido $A\beta_{1-42}$ en NaOH (1 mM) y luego NaOH (10 mM), de manera tal de obtener $A\beta_{1-42}$ en su forma monomérica. Finalmente tampón fosfato (BF) pH 7,4, para reproducir las condiciones fisiológicas del proceso de agregación. [28]

2.2. Análisis de las características estructurales de los agregados de $A\beta_{1-42}$

Los agregados de $A\beta_{1-42}$ pueden estudiarse utilizando Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) y Microscopía de Fuerza Atómica (AFM), entre otras técnicas. Esta última técnica, se desarrolló en los años 80 y deriva de técnicas de barrido de muestras

conductoras (Scanning Tunneling Microscopy, STM). Una de las ventajas de trabajar con AFM es que se pueden observar muestras biológicas como ADN y proteínas, que son básicamente no conductoras. Según la muestra estudiada, la AFM es una técnica capaz de generar imágenes con resoluciones menores al Angstrom. Además, se pueden analizar otras propiedades de la muestra, tales como:

- Interacción electrostática y magnética
- Propiedades químicas: interacción hidrofílica, hidrofóbica, enlaces fuertes y débiles
- Propiedades físicas: dureza, rugosidad y fuerzas moleculares

Para observar la muestra de interés, ésta debe ser montada en el *escáner* piezoeléctrico tubular del AFM. Para generar una imagen de la superficie de la muestra se debe utilizar una sonda, que es un trampolín (*cantilever*) con una punta afilada unida en un extremo que esta sujeta en un porta *cantilever* que es controlado electrónicamente por un computador para que haga contacto con la superficie de la muestra. Un diodo emisor de láser se enfoca sobre el borde del *cantilever*. Ya iniciado el contacto, el *escáner* se mueve en las coordenadas X e Y, mientras que el *cantilever* defleca debido a las interacciones entre éste y la superficie, reflejando el láser hacia un fotodiodo de cuatro cuadrantes, que detecta los movimientos del rayo (Figura 2.1). La señal de deflexión se utiliza en el sistema de retroalimentación del computador como un indicio en los cambios de altura. La señal *setpoint* permite ajustar manualmente cuánta deflexión del *cantilever* debe ser permitida, para no dañar la muestra o la punta de la sonda. El sistema de retroalimentación en el computador mantiene constante la señal de deflexión del *cantilever*, ajustando el voltaje en el eje Z del *escáner* piezoeléctrico. Mientras el *escáner* trabaja, las señales análogas al *escáner* piezoeléctrico son convertidas por el computador en lecturas de posición y altura, generándose a partir de estas una imagen. La información entregada es topográfica, y con

ella se generan tres imágenes: altura, amplitud y fase. La imagen de altura representa un plano topográfico de la superficie con una escala en nanómetros; en esta imagen se puede observar las diferencias de altura entre una zona y otra de la superficie de la muestra. La calidad de la imagen topográfica depende del área en que se realiza la imagen, la resolución elegida, la rugosidad de la superficie, largo del *cantilever* y su constante de fuerza elástica (k) de deflexión. La imagen de amplitud se genera a partir de información de variaciones de la señal entre el *cantilever* y la muestra que es medida como voltaje. La imagen de fase entrega información de la interacción entre la punta de la sonda y la superficie, dependiendo del material de la sonda y de la superficie de la muestra, es el tipo de interacción detectada; esta información se mide en grados ($^{\circ}$) de corrimiento respecto a la frecuencia de resonancia a la que oscila el *cantilever*. Si la interacción es atractiva la frecuencia de resonancia disminuye, generando una señal angular que provoca que el computador devuelva la frecuencia de resonancia al valor inicial, y por tanto, un menor ángulo de fase. La interacción de repulsión se observa en la imagen de fase como un mayor ángulo de fase. [9]

Los AT de $A\beta_{1-42}$ y sus estructuras se estudiaron en un Microscopio de Sonda de Barrido Multimodal (MultiMode Scanning Probe Microscopy) Digital Instruments, que ejecuta las técnicas de AFM que se utilizaran en esta memoria:

- **Modo Contacto Intermitente (*Tapping Mode*, TM):** Genera imágenes topográficas de muestras suaves tocando intermitentemente la superficie. La punta clava suavemente la superficie a una frecuencia de resonancia constante, disminuyendo el tiempo de contacto, y la hace elevarse a una altura variable de la superficie (Figura 2.1). Este modo se puede utilizar en aire y en fluido. Los experimentos de caracterización, *in volumen* e *in situ* se realizaron en este modo.

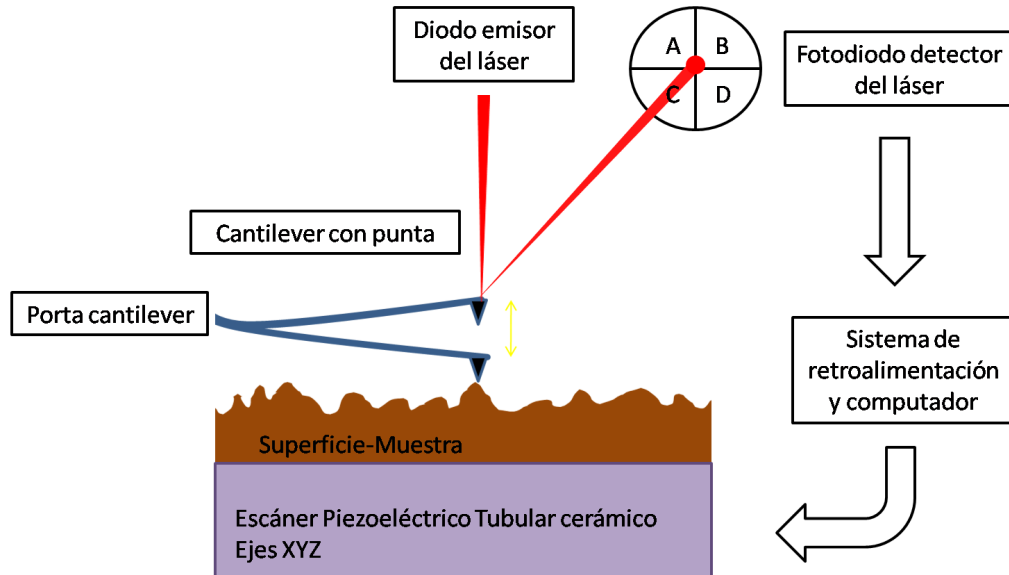


Figura 2.1: Esquema del funcionamiento del AFM. Adaptado de [9]

- Modo Efecto Fuerza en Volumen (FV):** El modo Efecto Fuerza en Volumen es una combinación de la medición de fuerzas de superficie y la captura de imágenes del modo contacto. Durante el barrido, la punta guarda una curva de fuerza en cada punto de la superficie y despliega los resultados como una imagen de dos dimensiones. El mapa químico de la superficie se genera si se presentan fuerzas de adhesión o electrostáticas en la imagen. Las curvas de fuerza se obtienen en cada punto de una red cuadrículada (*grid*), definida e igualmente espaciadas por toda la superficie. Como se puede observar en la Figura 2.2, el *cantilever* inicia en el punto A, sin tocar la superficie. En esta región se perciben fuerzas atractivas de largo alcance y, si son suficientemente fuertes, la punta impactará la superficie en B. Una vez que la punta está en contacto con la superficie, el *cantilever* se deflectará más y más, hasta alcanzar un valor de fuerza constante fijado por el operador (*setpoint*) en

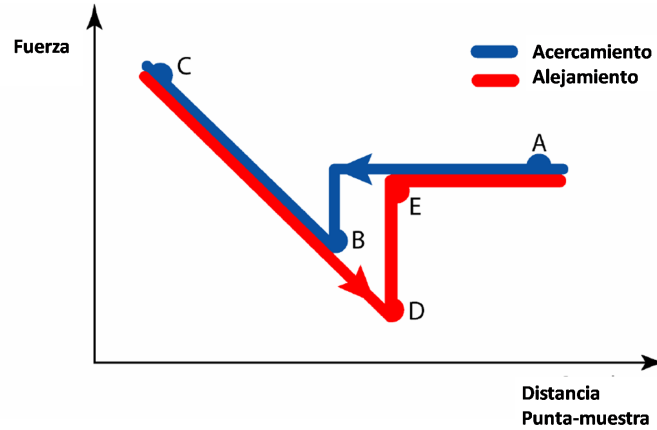


Figura 2.2: Curva típica de fuerza-distancia. Adaptado de [9]

C, donde el proceso se revierte. Cuando la punta se aleja de la muestra, los puentes y la adhesión formados durante el contacto pueden causar que la punta se adhiera a la superficie incluso pasada la distancia del impacto inicial en D. En E la fuerza de adhesión se rompe y la punta se separa de la superficie. Esta técnica se utiliza para obtener mapas de fuerzas de interacción y se empleará para observar la interacción entre $A\beta_{1-42}$ y CLPFFD como se describirá en 3.3.2.

El funcionamiento del microscopio y el tratamiento de los datos son controlados por el programa Nanoscope IIIa versión 5.30r3sr3 o 6.14r1. El microscopio se equipó con un *escáner* E de $12\ \mu\text{m} \times 12\ \mu\text{m}$, *escáner* J de $120\ \mu\text{m} \times 120\ \mu\text{m}$ o *escáner* A o PF (Pico Force) de $60\ \mu\text{m} \times 60\ \mu\text{m}$, según el experimento. Además, posee un microscopio óptico de 10x (aumentos) con una microcámara digital, que se utiliza para controlar la posición de la sonda sobre la muestra. La amplitud de la oscilación y la velocidad del barrido se determinan según las condiciones del experimento realizado. El equipo se encuentra en el Departamento de Física de la Facultad de Ciencia de la Universidad de Santiago de Chile.

2.3. Estudio de la interacción entre LPFFD y los agregados tóxicos de $A\beta_{1-42}$ a través de AFM

Interacción entre LPFFD y agregados de $A\beta_{1-42}$ *in volumen*

La acción antiagregante e inhibidora del péptido LPFFD sobre la agregación de $A\beta_{1-42}$ fue estudiada por Soto y colaboradores [27]. A través de TEM y otras técnicas, demostraron las propiedades de esta secuencia peptídica. Ante estos antecedentes, se establecerá el comportamiento de LPFFD sobre los agregados de $A\beta_{1-42}$ incubados en nuestro laboratorio. En esta línea, se pueden realizar una serie de experimentos semejantes a los propuestos por Soto y colaboradores, para estudiar cómo interacciona LPFFD con los agregados de $A\beta_{1-42}$, mezclándolos *in volumnen* y luego observando esta mezcla sobre HOPG ó Mica V-1 en el TM del AFM.

Interacción entre LPFFD y agregados de $A\beta_{1-42}$ a través de espectroscopía de fuerzas

El objetivo de este experimento es sondear los agregados de $A\beta_{1-42}$, para determinar si existen zonas que interaccionan con el péptido CLPFFD que se encuentra funcionalizando una sonda de oro. Para ello, se preparan los agregados de $A\beta_{1-42}$ *in volumen* y se observan sobre el sustrato. Posteriormente, se hace una imagen para localizar los agregados de interés y, finalmente, se hace la espectroscopía de fuerzas en volumen (FV), estudiando la interacción entre la punta funcionalizada y los agregados de $A\beta_{1-42}$ adsorbidos a la superficie. De esta manera se hace un mapa en el que se observan interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas, entre otras.

Determinación *in situ* del efecto del péptido LPFFD sobre los agregados de $A\beta_{1-42}$

En este experimento se espera observar a través de AFM en el modo contacto intermitente (TM) en fluido, si la desagregación de las estructuras de $A\beta_{1-42}$ adsorbidas a una superficie de HOPG se produce en zonas específicas de los agregados, lo cual indicaría la existencia de sitios preferenciales para la interacción de éstos con el péptido LPFFD. Para esto, se preparan los agregados de $A\beta_{1-42}$ *in volumen*, se adsorben sobre una superficie hidrofóbica, y luego se entrega un flujo de LPFFD a diferentes concentraciones.

2.4. Reconocimiento de sitios de unión entre NPAu conjugadas a CLPFFD y agregados de $A\beta_{1-42}$

Kogan y colaboradores [8] observaron por TEM que nanopartículas metálicas de oro (NPAu) conjugadas al péptido CLPFFD (conjugados NPAu-CLPFFD) interaccionan *in vitro* con FAs de $A\beta_{1-42}$, colocándose a lo largo de la fibra a distancias aproximadas a 100 nm. Esto indicaría que las fibras podrían exponer periódicamente residuos que presentan afinidad por la secuencia LPFFD. Estas observaciones no se han realizado por AFM, herramienta que entregaría información más acabada de la disposición de las NPAu-CLPFFD sobre las fibras, si se usa el modo contacto intermitente (TM) en aire y en fluido.

Capítulo 3

Materiales y Métodos

3.1. Obtención de agregados de $A\beta_{1-42}$

Se utilizó proteína humana $A\beta_{1-42}$ en su forma trifluoroacetato, r-Peptide, USA. Luego de ser adquirido, se dividió en alícuotas de 0,05 mg cada una y se liofilizó en tubos de plástico con tapa de 1,5 mL (Tubos Eppendorf) y se guardaron a -20°C . Para obtener una solución de $A\beta_{1-42}$ de 100 μM de concentración, homogénea, libre de agregados, se re-suspende el liofilizado en NaOH 1 mM en relación 4,3 mg de $A\beta_{1-42}$ /mL. Luego de mezclar, se minimiza la precipitación isoeléctrica de $A\beta_{1-42}$ (pH 5,5 [28]), agregando NaOH 10 mM (155 μL de NaOH/mg de péptido), hasta obtener en la solución un pH entre 7 y 7,5 [28]. A partir de este preparado se inicia la agregación adicionando 91,4 μL de tampón fosfato (BF) 20 mM (pH=7,4) filtrado en membrana de 0,22 μm de poro. Para obtener estructuras de $A\beta_{1-42}$ en estadios de crecimiento adecuados a los experimentos, el proceso de crecimiento de los agregados se ajustó a tiempos entre 16 y 24 horas y temperaturas entre 19 y 25°C , siguiendo la relación en que a menor tiempo y temperatura de incubación, menor es el grado de agregación obtenido. Para obtener fibras cortas de

$A\beta_{1-42}$ se utilizó un tiempo de incubación de 20 horas a 23°C en un Thermomixer Comfort 5355, Eppendorf, que entrega una exactitud de la temperatura de $\pm 2^\circ\text{C}$, lo que puede variar según la temperatura ambiente. Al término del periodo de incubación, la muestra contenida en el tubo eppendorf se mantiene por 90 minutos a temperatura ambiente en las dependencias del AFM.

3.2. Características de los agregados de $A\beta_{1-42}$

3.2.1. Observaciones por Microscopía Electrónica de Transmisión, TEM

Los agregados de $A\beta_{1-42}$ se adsorben sobre una rejilla de cobre recubierta con una membrana de Formvar y carbón. Para esto, se depositó sobre parafilm 20 μL de $A\beta_{1-42}$ 100 μM , cercano a esa gota se depositaron 2 gotas de agua nanopura (Milli-Q) de 20 μL cada una, y también una gota de 20 μL de acetato de uranilo al 2 % previamente filtrado en membrana de 0,22 μm de poro y protegido de la luz. La rejilla de cobre se depositó sobre la primera gota, dejando interactuar por 2 minutos su cara recubierta por la membrana. Luego se retiró la rejilla y se colocó de igual forma en la gota de agua por 1 minuto, luego en la siguiente gota de agua nanopura por otro minuto más, y finalmente 2 minutos sobre el acetato de uranilo al 2 %. El exceso de solución sobre la rejilla se secó con papel absorbente que no deja residuos (papel Whatman). Las rejillas de cobre con agregados de $A\beta_{1-42}$ adsorbidos, se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 109, presente en la Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

3.2.2. Observaciones por Microscopía de Efecto Fuerza, AFM.

Las sondas para AFM utilizadas según el experimento fueron:

- **Sonda NP, serie NP (Veeco):** Sonda de Nitruro de Silicio, punta de forma piramidal, altura de punta de 2,5-3,5 μm . Su Radio nominal (R) es 20 nm; su ángulo de cono frontal es de 35°; su Constante elástica del *cantilever* (nominal) (k) es 0,58 N/m; y su Frecuencia de resonancia media nominal (f) es de 57 kHz. Esta sonda se montó en experimentos en el TM AFM en fluido, por ejemplo, para caracterización de FAs, estudio de mezclas *in volumen*, estudios *in situ* de FAs y LPFFD en HOPG y Mica. (Figura 3.1)
- **Sonda TESP-7, serie ESP (Veeco):** Es una sonda de Antimoniato de Silicio, con una punta de forma anisotrópica, con un altura de punta 10-15 μm . El Radio nominal (R) de la punta es 8 nm; su ángulo de cono frontal es de 25°; su constante elástica del *cantilever* (nominal) (k) es 40 N/m; y su Frecuencia de resonancia media nominal (f) es de 320 kHz. Esta sonda se empleó en experimentos en TM AFM en aire, por ejemplo, en el estudio de FAs sobre Mica V-1 funcionalizada con Mg^{+2} . (Figura 3.1)
- **Sonda TR400PB, serie OMCL (Olympus):** Es una sonda de Nitruro de Silicio con una punta recubierta con una capa de Oro de 40 nm de grosor, punta de forma piramidal, altura de punta de 2,9 μm . El Radio nominal (R) de la punta es menor a 40 nm; su ángulo de cono frontal es de 25-45° de cara a cara; la constante elástica del *cantilever* (k) es 0,2-0,9 N/m; y la frecuencia de resonancia nominal (f) está en el rango 10-32 kHz. Esta sonda se usó en los experimentos de caracterización de FAs y también se funcionalizó con CLPFFD para estudiar FAs, a través de FV en AFM.

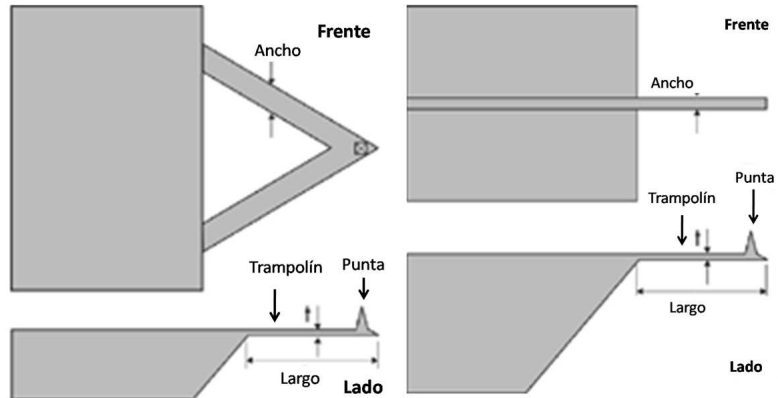


Figura 3.1: Izquierda: Sonda NP Veeco en sus caras frontal y lateral [10]; Derecha: Sonda TESPA-7, serie ESP Veeco en sus caras frontal y lateral [11]

- **Sonda PT.GS.AU (Novascan):** Es una sonda de Nitruro de Silicio con una partícula adjunta de vidrio de borosilicato (Dióxido de Sílice) de $5,0 \mu\text{m}$, recubierta con una capa de Oro de grosor 30 nm . El Radio nominal (R) de la partícula adjunta es de $2,5 \mu\text{m}$; la constante elástica del *cantilever* (k) es $0,01\text{-}0,58 \text{ N/m}$ [29]. Esta sonda se utilizó en los experimentos de FV en AFM para comparar las fuerzas entre oro y oro-CLPFFD, y la superficie estudiada (HOPG).

La constante elástica del *cantilever* (k) define su frecuencia de resonancia (f), según el medio en que se encuentra la sonda. Si la sonda es rígida tiene un k elevado y su frecuencia de resonancia es más alta, esto significa que el *cantilever* oscila más y por esto barre una zona más rápido. Si la sonda está siendo utilizada para barrer una superficie en aire, estas características aportarán mayor resolución a la imagen obtenida. Este es el caso de la sonda TESPA-7, que tiene un $k = 40 \text{ N/m}$ y una frecuencia de resonancia de 320 kHz , ambos parámetros muy altos. Las sondas que se usan en fluido son blandas y tienen un k menor a 1 N/m . Esto entrega una frecuencia de resonancia baja, menor oscilación del

cantilever y, por lo tanto, menor velocidad de oscilación, lo que permite obtener imágenes en medio líquido con mayor resolución. También son factores que aportan a mejorar la resolución de las imágenes el radio nominal de la punta y la curvatura o ángulo del cono. Los agregados de $A\beta_{1-42}$ se adsorben en tres tipos de superficies utilizando diferentes técnicas:

- **Superficie hidrofóbica, grafito pirolítico altamente orientado (HOPG):** Sobre la superficie recién clivada se depositan 30 μL de $A\beta_{1-42}$ 100 μM incubado como se indicó en 3.1. Se mantiene en reposo por 15 minutos, y luego se lava muy suavemente con 100 μL de tampón fosfato (BF) 5 mM (pH = 7,4) recién filtrado en membrana de 0,22 μm de poro. Terminado el lavado, se depositan 30 μL del mismo tampón usado para lavar y se monta sobre el *escáner*, para observar en el modo contacto intermitente (TM) en fluido. El HOPG tiene gran afinidad por estructuras de $A\beta_{1-42}$ en estadios pre-fibrilares y fibrilares de pequeño tamaño. [30]
- **Superficie polar o hidrofílica, Mica V-1 clase I:** Sobre la superficie recién clivada, se depositan 30 μL de la preparación $A\beta_{1-42}$ de concentración 100 μM . Se mantiene en reposo por 15 minutos, luego se lava muy suavemente con 100 μL de tampón fosfato (BF) 5 mM (pH = 7,4) recién filtrado en membrana de 0,22 μm de poro. Terminado el lavado se depositan 30 μL del mismo tampón usado para lavar y se monta sobre el *escáner*, para observar en el TM en fluido. A esta superficie se adsorben estructuras de agregados amiloides muy pequeños [24] o de gran tamaño.
- **Superficie polar con carga positiva, Mica V-1 clase I funcionalizada con Mg^{+2} :** Sobre la superficie recién clivada se depositan 30 μL de MgCl_2 9 mM y se mantienen por 10 minutos. Pasado el tiempo se lava muy suavemente con 200 μL de agua nanopura. Se seca la superficie con N_2 por un minuto y se agregan 30 μL de la

muestra de $A\beta_{1-42}$. Se deja en reposo por 15 minutos, luego se lava suavemente con 100 μL de agua nanopura y se seca la superficie estilada con N_2 por 4 minutos. La superficie se monta sobre el *escáner* y se observa en el TM en aire.

Las imágenes adquiridas en el modo contacto intermitente (TM) en líquido, se realizaron colocando en el cabezal una celda de fluido, en la que se monta la sonda adecuada al experimento (Veeco NP; Olympus OMCL-TR400PB), y que se cierra herméticamente al tocar la superficie a estudiar colocando un *O-ring*, lo que permite que la sonda quede en una celda llena de líquido. Después de colocar la superficie en el *escáner* piezoeléctrico del AFM, se monta, sobre la muestra, el cabezal que lleva el porta *cantilever* o la celda de fluido con la sonda instalada. Luego, se debe localizar la sonda por sobre la superficie a estudiar. Este proceso se realiza observando a través del microscopio óptico de 10x (aumentos) con una microcámara digital que está conectada a una pantalla, en la que se puede observar cualquier sustancia presente en la solución.

3.3. Estudio de la interacción entre LPFFD y los agregados tóxicos de $A\beta_{1-42}$ a través de AFM

3.3.1. Interacción entre LPFFD y agregados de $A\beta_{1-42}$ *in volumen*

Para estos experimentos, la incubación de $A\beta_{1-42}$ se realizó según protocolo presentado en 3.1. Obtenidos los agregados, se mezclaron 60 μL de $A\beta_{1-42}$ 100 μM (0,45 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) con 100 μL de LPFFD 4 mM (1,6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) en un tubo eppendorf, la razón obtenida en volumen correspondió a 1:67, lo que entrega una presencia de 0,17 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de AT y 1,6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de LPFFD en el volumen final, lo que se enmarca en los trabajos de Soto y colaboradores. Esta mezcla se mantuvo en reposo a temperatura ambiente (24-27°C) por

6 días y, a las 20, 48 y 144 horas de interacción, se tomaron alicuotas de 30 μL de para observarlas en el TM en fluido en el AFM, y se contrastó su presencia en HOPG.

3.3.2. Estudio de la interacción entre LPFFD y agregados de $\text{A}\beta_{1-42}$ a través de espectroscopía de fuerzas

Una sonda de oro, Olympus TR400PB o Novascan PT-GS-AU, se introdujo en una cámara de baja presión presente en el Departamento de Física de la Facultad de Ciencia, Universidad de Santiago de Chile. Con la sonda en el interior, se aplicó una presión de 10^{-2} mbar durante 30 segundos, mientras se generó una corriente de plasma a alta velocidad (*Plasma Etching*), que retiró parte de la superficie metálica de la punta (~ 2 nm) [31]. La conjugación con el péptido CLPFFD se realizó inmediatamente después de retirar la sonda de la cámara, usando el método de Langmüir-Blodgett (LB) [32]. Este método consiste en introducir y retirar lentamente la superficie a funcionalizar, en una solución que contiene muy baja concentración de soluto afin con la superficie, lo que permite formar una monocapa de soluto sobre ésta. La sonda de oro se introdujo en una solución 1×10^{-7} M de CLPFFD, de inmediato se realizó un lavado muy suave con 500 μL de agua nanopura, para retirar las moléculas no unidas al oro y dejar una monocapa pura de CLPFFD adsorbida a la superficie de oro de la sonda.

Para obtener información detallada de los dominios estructurales de los AT de $\text{A}\beta_{1-42}$, se usó la función de espectroscopía de fuerza en volumen (FV) del AFM. Durante la FV, la punta recogió información de la magnitud de la interacción entre la sonda funcionalizada y la superficie de HOPG con FA adsorbidas (Figura 3.2). Se eligieron zonas de 3 μm divididas en 64 pixeles. Cada pixel representó un promedio de 64 curvas de fuerza de interacción y evaluó zonas de 47 nm^2 . Toda la información obtenida de las espectroscopías

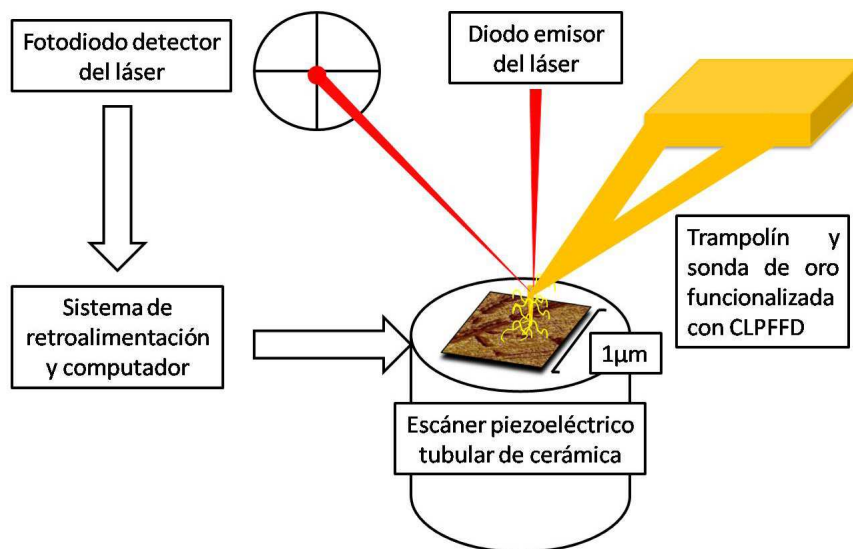


Figura 3.2: Esquema del funcionamiento del AFM durante la espectroscopía de fuerza de fuerza en volumen (FV) realizadas, se estudió con un programa diseñado en MATLAB R2007a, que permitió definir el valor numérico de las interacciones en cada pixel de las zonas estudiadas y permitió hacer un mapa de las zonas de mayor y menor interacción.

3.3.3. Determinación *in situ* del efecto del péptido LPFFD sobre los agregados de $A\beta_{1-42}$

En este experimento, los agregados de $A\beta_{1-42}$ 100 μM preparados (ver sección 3.1) se adsorbieron sobre HOPG según la metodología (ver sección 3.2.2). Luego de colocar la superficie en un *escáner J*, se montó el cabezal con la celda de fluido una sonda Veeco NP y con un *O-ring*. Se seleccionó una zona con FA que presentaron estructuras de interés. Se introdujo un flujo de LPFFD en BF 5 mM por una de las entradas de la celda de fluido, usando una manguera conectada a una jeringa, que contiene la solución de LPFFD. A la

celda de fluido se conecta una segunda manguera por la que sale la solución al llenarse la celda. La jeringa con la solución está montada en un controlador de velocidad de flujo, al que se puede programar la cantidad de solución y la velocidad con la que se entrega a la celda. La concentración de la solución de LPFFD fue de 100 nM, 1 μ M, 1 mM y 8 mM, mientras que la velocidad de flujo utilizada fue de 1 ó 2 mL/hora. Estos experimentos se realizaron a la temperatura del laboratorio (22-27°C) y las imágenes se adquirieron durante el paso del flujo de la solución y posterior al término del flujo.

3.4. Reconocimiento de sitios de unión entre NPAu conjugadas a CLPFFD y agregados de $A\beta_{1-42}$

Se mezcló en un tubo eppendorf 1 μ L de NPAu-CLPFFD (6 nM-2 μ M) con 30 μ L de $A\beta_{1-42}$ (100 μ M) en relación molar 1:1. Este preparado se mantuvo entre 4 y 20 horas bajo agitación mecánica para aumentar la probabilidad de interacción entre partículas. Luego se observó sobre mica funcionalizada con Mg^{+2} en TM AFM en aire. Las NPAu-CLPFFD (6 nM-2 μ M) se observaron en TEM. Para esto, sobre una rejilla de cobre recubierta con una membrana de Formvar y carbón, se depositó 20 μ L de coloide de NPAu-CLPFFD (6 nM-2 μ M), se lavó con 2 gotas de agua nanopura (Milli-Q) de 20 μ L y se esperó 2 minutos entre la adición de cada gota. El exceso de solución sobre la rejilla se secó con papel Whatman.

Capítulo 4

Resultados y Análisis

4.1. Obtención y caracterización de los agregados de $A\beta_{1-42}$

Los agregados tóxicos de $A\beta_{1-42}$ se obtuvieron utilizando el protocolo detallado en 3.1, ajustándose el tiempo y la temperatura para definir el proceso de agregación en estos términos. Esta metodología debe seguirse cuidadosamente para tener reproducibilidad en los experimentos de agregación. Como primera etapa en la caracterización de los agregados de $A\beta_{1-42}$, éstos fueron observados a través de TEM a 50000 y 85000 aumentos, empleando voltajes de 50 y 80 kV. En la Figura 4.1 se presenta una imagen característica de FAs cortas de $A\beta_{1-42}$ incubadas 20 horas a 23°C, que son adsorbidas en la rejilla de cobre y luego observadas en aire. Se puede observar que las FAs están muy agrupadas, lo que posiblemente se debe a las interacciones de las FAs sobre la superficie de la rejilla.

La siguiente etapa en la caracterización de los agregados de $A\beta_{1-42}$ fue su observación

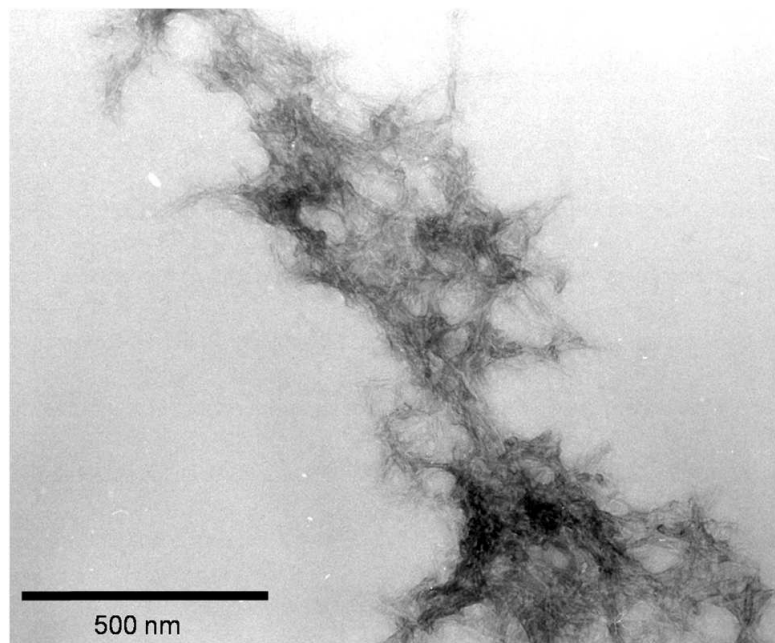


Figura 4.1: Fibras amiloides de $A\beta_{1-42}$ observadas sobre rejilla de cobre recubierta con una membrana Formvar y carbón en TEM con 50000 aumentos (80 kV)

sobre HOPG en TM AFM en fluido (Tampón Fosfato 5 mM). En muestras incubadas entre 20 y 30 horas se observaron **amiloesferoides (AEs), fibras amiloides (FAs) y fibras nodulares**. En la Figura 4.2 se presentan tres imágenes de amplitud, en que se pueden observar las diferencias entre los tres estadios de crecimiento de los agregados de $A\beta_{1-42}$. Cuando se siguió el protocolo de agregación detallado en 3.1, *se encontraron dos tipos de intermediarios adsorbidos en la superficie de HOPG: AEs y FAs*. Su coexistencia indica que ese tiempo de incubación y temperatura, no es suficiente para iniciar el proceso de agregación en todos los monómeros de $A\beta_{1-42}$. Por esto, en la adsorción sobre HOPG es difícil determinar si existe algún grado de competencia o alguna diferencia de afinidad entre los intermediarios de $A\beta_{1-42}$ por la superficie.

Es importante destacar que previo a la observación de la superficie, la suspensión de agregados de $A\beta_{1-42}$ que se encuentra en la celda de fluido es observada con el microscopio óptico del AFM, y en todas las ocasiones en la que se observaron fibras en la superficie, también se observaron grandes estructuras amorfas en el óptico, que no son capaces de interactuar con la superficie. Esto puede ser causa de su gran tamaño o resultado de una estructuración de los agregados en estadios superiores, que permite mantener hacia el exterior de la estructura regiones hidrofílicas que incapaces de interactuar con la superficie de HOPG. *Esto sugiere que los intermediarios de $A\beta_{1-42}$ de tamaños menores a 10 μm de largo y 70 nm de ancho, tienen afinidad por la superficie hidrofóbica del HOPG, en cambio las estructuras de tamaños mayores no tienen afinidad por este tipo de superficie.*

Las fibras nodulares o helicoidales son estructuras formadas por paquetes de fibras helicoidales de 70-100 nm de ancho y de longitud menor a 10 μm , son superiores a las FAs y es posible observarlas sobre HOPG con regular frecuencia. En la Figura 4.2C se puede observar una capa homogénea de agregados de $A\beta_{1-42}$ sobre el HOPG, que indican que el

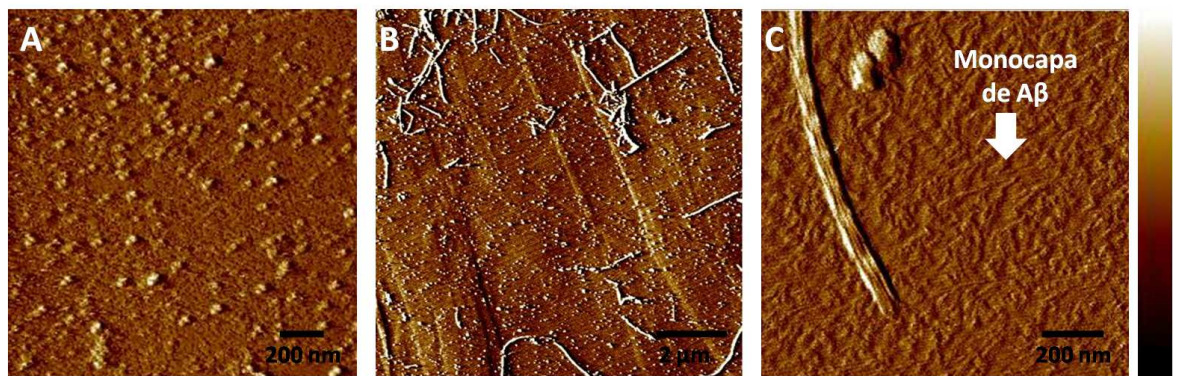


Figura 4.2: Imágenes TM AFM en fluido. A: Amiloesferoides (AEs) y protofibrillas de $A\beta_{1-42}$ incubadas 24 h 20°C , lavadas con BF 5 mM. Imagen de Amplitud: $1,5\ \mu\text{m}$; 384 pixeles; sonda Veeco NP; Rango en Z: 50 mV. Escáner J. B: Protofibrillas y fibras de $A\beta_{1-42}$ incubadas 20 h 23°C , lavadas con BF 5 mM. Imagen de Amplitud: $10\ \mu\text{m}$; 512 pixeles; sonda Veeco NP; Rango en Z: 150 mV. Escáner PF. C: Paquete de fibras helicoidales de $A\beta_{1-42}$ incubadas 30 h 23°C , lavadas con BF 5 mM. Imagen de Amplitud: $1,13\ \mu\text{m}$; 384 pixeles; sonda Veeco NP; Rango en Z: 50 mV. Escáner J. La flecha indica la presencia de una monocapa de $A\beta_{1-42}$

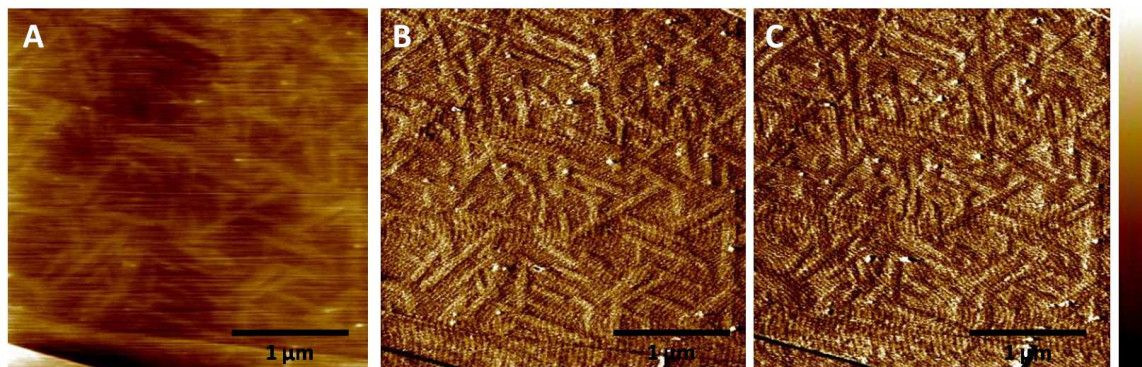


Figura 4.3: Imágenes TM AFM en fluido de altura, amplitud y fase de fibras de $A\beta_{1-42}$ sobre HOPG obtenidas según protocolo (detallado en 3.1) más 42 horas a 37°C . Escáner PF A: Imagen de Altura: $3\mu\text{m}$; Rango en Z: 5 nm. B: Imagen de Amplitud: $3\mu\text{m}$; Rango en Z: 50 mV; C: Imagen de Fase: $3\mu\text{m}$; Rango en Z: 7° .

paquete de fibras no estaría adsorbido sobre la superficie, sino que sobre esta monocapa. Esto ocurre en la mayoría de las imágenes captadas en las que se estudiaron FAs y fibras nodulares; éstas son visibles en fluido bien adheridas a una monocapa de estructuras de altura variable y difícil de determinar con la técnica utilizada en la caracterización.

Cuando al protocolo de agregación de 20 horas a 23°C se le sumaron 42 horas a 37°C de temperatura, la cantidad de estructuras de gran tamaño aumentó considerablemente al observar la suspensión en el microscopio óptico del AFM, por lo que se lavó fuerte y repetidas veces la superficie con BF 5 mM y se llenó la celda de fluido con esta misma solución tampón. Las imágenes de la Figura 4.3 muestran la misma zona en altura, amplitud y fase, en las que se puede observar que las FAs fueron adsorbidas en la superficie adoptando una orientación de aproximadamente 60° , que es la orientación que posee el HOPG. Esto indica que las FAs están realmente adsorbidas a la superficie, y no son parte de una monocapa de agregados como se ha observado en otras imágenes de FAs. Por el

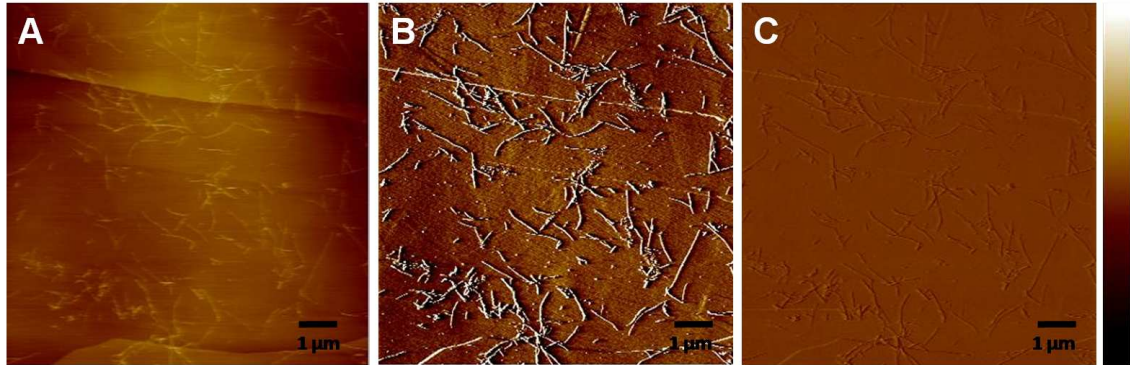


Figura 4.4: Imagen TM AFM en fluido de altura, amplitud y fase, de fibras amiloides sobre HOPG incubadas según protocolo (ver sección 3.1). 384 pixeles; sonda Veeco NP; Escáner E. A: Imagen de Altura: 10 μm , Rango en Z: 50 nm. B: Imagen de Amplitud: 10 μm , Rango en Z: 150 mV. C: Imagen de Fase: 10 μm , Rango en Z: 180°

tamaño de estos agregados, se puede constatar la baja presencia en la zona de AEs. Con este tiempo y temperatura de agregación es muy probable que la gran mayoría de los AEs hayan alcanzado el estado fibrilar. Además, es posible que en el proceso de lavado se hayan removido AEs y otros intermediarios.

Enfocándose en los objetivos planteados, las FAs obtenidas con el protocolo de agregación de 20 horas a 23°C (detallado en 3.1) fueron caracterizadas en imágenes de altura, amplitud y fase, a escalas de 10 y 5 μm con una sonda Veeco NP, como se muestra en la Figura 4.4. En estas imágenes se observan zonas características en las que las FAs están distribuidas sobre la superficie de HOPG aleatoriamente y sin una orientación o ángulo que responda a las características de la superficie, por lo que se sospecha que las FAs están adsorbidas sobre una monocapa de AEs u otros intermediarios de carácter hidrofóbico. Las FAs y fibras nodulares que se posan solitarias sobre la monocapa, son adecuadas para el estudio más detallado de su estructura. Para su observación se trabajó a escalas de 1 μm

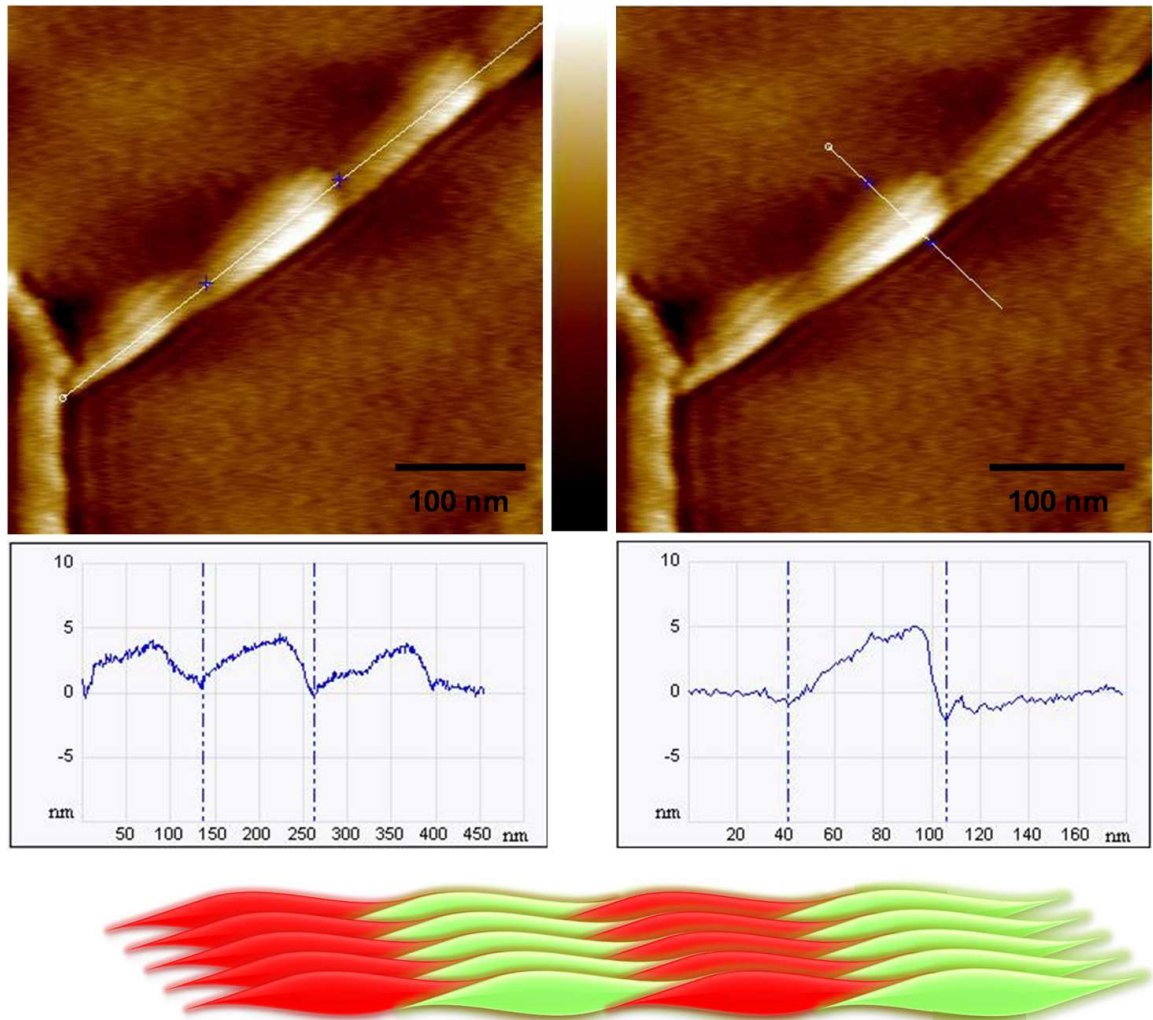


Figura 4.5: Imagen de altura TM AFM en fluido sobre HOPG de FAs $100 \mu\text{M}$ incubada según protocolo (ver sección 3.1) que presenta estructura helicoidal. Sonda de oro Olympus TR400PB. Escáner PF. Rango en Z: 10 nm. Nótese en el perfil topográfico la longitud de onda de 100 nm y la altura máxima de 5 nm de la fibra. Abajo: Modelo de la disposición de las hebras de fibras helicoidales de $A\beta_{1-42}$. Cada hebra se gira sobre si misma cada ~ 100 nm sobre su eje escondiendo los aminoácidos hidrofóbicos en el centro del eje. Rojo y verde: Caras externas idénticas de la hebra de $A\beta_{1-42}$ constituida con dímeros antiparalelos de $A\beta_{1-42}$.

o menores con sonda Olympus TR400PB, que entrega imágenes de mayor resolución en medio líquido. Las imágenes de la Figura 4.5 son de altura y fueron obtenidas con esta sonda. *En ellas, los paquetes de fibras son estructuras ordenadas; a lo largo, cada 100 nm presentan un punto de mínima altura y, entre éstos, uno de máxima altura, la diferencia entre mínima y máxima altura es de ~ 5 nm y se presenta como un valor constante. El ancho de la fibra en el punto de máxima altura es entre 60-70 nm, ancho que puede reducirse a 50 nm en los puntos de menor altura.* El punto de máxima altura a lo largo de la fibra nodular no se encuentra equidistante a los puntos de mínima altura, como se puede observar en la topografía de la imagen de la izquierda en la Figura 4.5. La estructura nodular podría estar constituida por pares de hebras de ~ 5 nm de altura, entrelazadas helicoidalmente y que se encuentran unidas paralelamente entre ellas.

El perfil topográfico de la imagen de la derecha nos indica como está posicionada la fibra nodular sobre la monocapa de la superficie. La altura entre la monocapa y el punto máximo fluctúa entre 5 y 10 nm. La disminución de la altura que presenta la topografía es brusca desde el punto máximo hacia la derecha y con pendiente menor hacia el lado izquierdo, lo que podría ser indicio de que la fibra nodular tiene un ángulo de asentamiento o está recostada sobre la monocapa.

Los AT también fueron caracterizados sobre una superficie de mica de calidad analítica V-1 y en TM AFM en fluido. En la Figura 4.6 los AT de $A\beta_{1-42}$ están adsorbidos sobre la mica en distintos estadios de crecimiento. En 4.6A, a 24 horas de agregación a 25°C , se observaron estructuras similares a fibras cortas adsorbidas en la superficie, que se presentan en escasa cantidad. Este tipo de estructura no tiene una forma definida, y es de gran dificultad captar imágenes de su estructura. Esto puede tener una explicación en el carácter polar que posee la mica y en el hecho de que las observaciones se hacen en fluido.

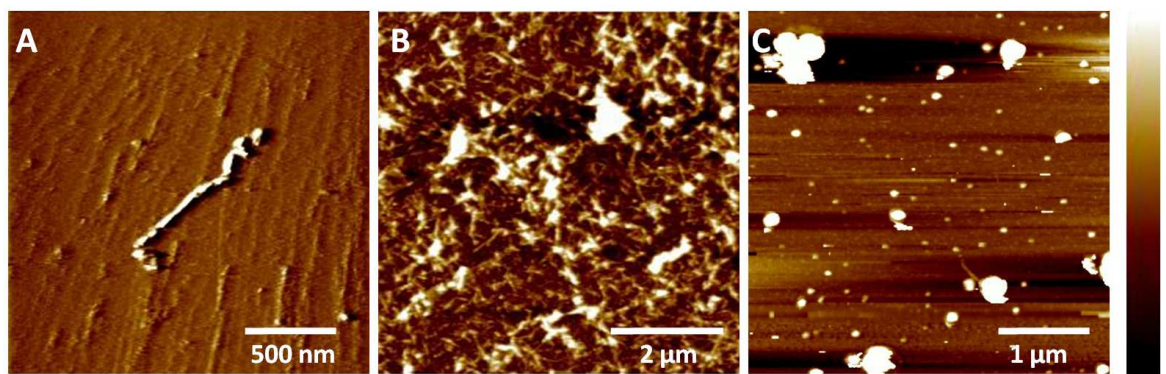


Figura 4.6: Imágenes TM AFM en fluido sobre Mica de FAs de $A\beta_{1-42}$ obtenidas a diferentes tiempos de incubación. Sonda Veeco NP; Escáner J. A: $A\beta_{1-42}$ 100 μM incubadas 24 h 25°C. Lavada con BF 5mM. Imagen de Amplitud: 2,0 μm ; 384 pixeles; Rango en Z: 100 mV. B: $A\beta_{1-42}$ 5 μM incubadas 48 h a 23°C. Lavada con BF 5 mM. Imagen de Altura: 6,0 μm ; 256 pixeles; Rango en Z: 100 nm. C: $A\beta_{1-42}$ 5 μM incubadas 96 h a T amb. Lavado con BF 5 mM. Imagen de Altura: 4,0 μm ; 256 pixeles; Rango en Z: 50 nm

En 4.6B, los AT se incubaron por 48 horas a 23°C, y es posible observar que la adsorción sobre la superficie de la mica es completa. La atracción entre la mica polar y los agregados de A β ₁₋₄₂ ocurre a una concentración de A β ₁₋₄₂ de 5 μ M, lo que es menor a los 100 μ M utilizados en el protocolo. Todos los espacios presentan fibras formando aglomerados en diferentes ordenamientos y sin que sea posible distinguir la superficie. Con este tiempo de agregación es posible generar imágenes estables de la superficie, pero no es posible observar la estructura individual de FAs. En 4.6C, al aumentar el tiempo de agregación a 96 horas a temperatura ambiente, se observan estructuras globulares planas adsorbidas a la superficie, presentando una altura promedio de 40 nm y un diámetro entre 80 y 500 nm. Estas planicies indican que la interacción entre la mica polar y los AT de gran tamaño existe, y es más estable en medio líquido si las estructuras alcanzan un tamaño superior a 40 nm de altura. La estructura globular que adoptan los agregados y la estabilidad que presentan en este medio polar, indica que a mayores estadios de crecimiento es posible que los agregados adopten una formación de carácter polar hacia el exterior, que permite una interacción estable con la superficie en medio líquido y que esconda hacia el interior las zonas hidrofóbicas que posee.

Además, los AT se caracterizaron sobre una superficie de mica de calidad analítica V-1 funcionalizada con Mg⁺² en el TM AFM en aire. Como se aprecia en la figura 4.7, las FAs se observan agregadas y en forma individual, generalmente rodeadas de agua que no se logra secar con N₂. Las imágenes de fase en 4.7B y C indican con certeza la presencia de AT. *La interacción que permite la adhesión de los AT sobre la superficie, es entre la carga positiva del magnesio adsorbido a la superficie de la mica y los aminoácidos polares con carga negativa presentes en los monómeros de A β ₁₋₄₂.* Es importante destacar que el punto isoelectrónico de A β ₁₋₄₂ es a pH 5,5 [28], por lo cual a pH 7,4 A β ₁₋₄₂ estará cargada negativamente. Además, este tipo de interacción por cargas no es estable si las imágenes

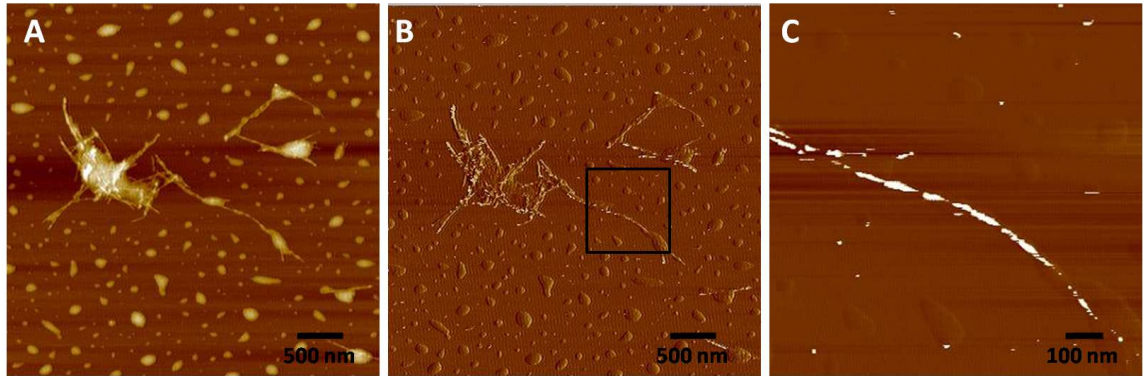


Figura 4.7: Imágenes en el TM del AFM en aire de altura y fase sobre Mica-Mg⁺² de FAs de Aβ₁₋₄₂ incubadas 20 h 23°C. 512 pixeles; sonda Veeco NP; Escáner PF. A: Imagen de Altura: 4 μm; Rango en Z: 50 nm. B: Imagen de Fase: 4 μm; Rango en Z: 77,6°. C: Imagen de Fase: 1 μm; Rango en Z: 77,6°

se adquieren en medio líquido. Esta caracterización permite observar las estructuras de Aβ₁₋₄₂ secadas sobre la superficie, pero de igual manera nos entrega información de cómo es su estructura, cuando la interacción con la superficie es diferente a la hidrofóbica que fue más estudiada.

Los AEs estudiados sobre esta superficie presentaron una altura de 2,0 nm (±1,9) y 31,5 nm (±7,4) de diámetro. Este diámetro está entre 20 y 40 nm, lo que representa una situación diferente a los AEs típicos observados en HOPG de 64 nm. En la sección 4.5 se estudia la estructura y conformación de las FAs adheridas a esta superficie. .

4.2. Interacción entre LPFFD y los agregados de $A\beta_{1-42}$ *in volumen*

El efecto antiagregante del péptido LPFFD sobre $A\beta_{1-42}$ fue observado por Soto y colaboradores [27]. Para esto emplearon $0,5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de $A\beta_{1-42}$ a los que adicionaron $1,5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de LPFFD, e incubaron por 7 días a 37°C . También observaron el efecto antiagregante al incubar $A\beta_{1-42}$ $0,5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ por 7 días a 37°C , adicionando luego, LPFFD $1,5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ y continuando la incubación por 4 días a 37°C .

En esta investigación se comprobó el efecto antiagregante del péptido LPFFD sobre $A\beta_{1-42}$ $0,17 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ya agregado, al que se adicionó $1,6 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de LPFFD y posteriormente se incubó durante 144 horas a 25°C . El experimento ocurre a temperatura ambiente y el medio acuoso contiene BF, lo que es propicio para el proceso de agregación y la formación de fibras amiloides.

En la Figura 4.8A, los agregados $A\beta_{1-42}$ $0,17 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ incubados según protocolo, previo a la interacción con LPFFD, se observaron sobre HOPG. Iniciada la incubación con LPFFD se observaron alícuotas de la solución a las 48 horas y 144 horas de interacción. En el microscopio óptico del AFM se observan grandes estructuras a las 48 horas y en menor cantidad agregados sobre el HOPG.

A partir de las 144 horas de interacción entre LPFFD y los agregados de $A\beta_{1-42}$, en el microscopio óptico no se observan estructuras en el medio y sobre HOPG *lo más característico es una vasta presencia de pequeñas estructuras sobre la superficie, diferentes a AEs y FAs, lo que se corresponde con las observaciones de Soto y colaboradores [27]*, que indicarían que el péptido LPFFD es capaz, en una primera etapa, de inhabilitar o bloquear los residuos hidrofóbicos expuestos de AEs y FAs cortas, impidiendo su adsorción sobre la superficie y posteriormente es capaz de desagregar

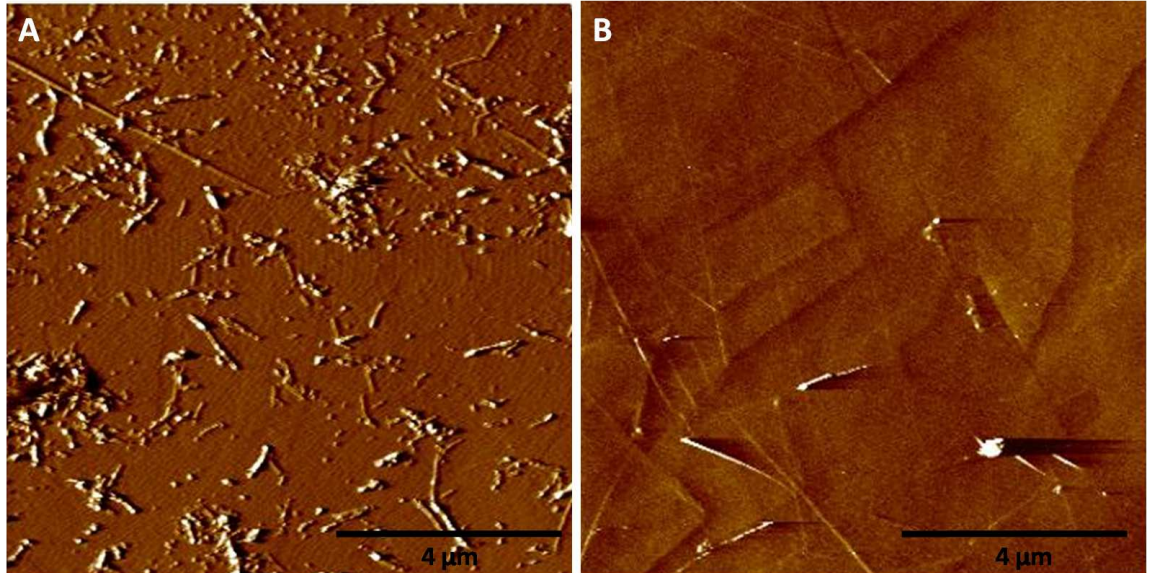


Figura 4.8: Interacción entre LPFFD y $A\beta_{1-42}$ *in volumen* observada sobre HOPG. A: $A\beta_{1-42}$ $37,5 \mu\text{M}$ ($0,17 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) incubadas 20 horas a 23°C , observadas en TM AFM sobre HOPG. Imagen de Amplitud: $10 \mu\text{m}$; Rango en Z: 500 mV; Escáner PF. B: Imagen posterior a 144 horas a 25°C de interacción de $A\beta_{1-42}$ $0,17 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ con LPFFD $1,6 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ *in volumen* (67 mol LPFFD/1 mol $A\beta_{1-42}$). Imagen de Amplitud: $10 \mu\text{m}$; Rango en Z: 100 mV

estas estructuras de $A\beta_{1-42}$ a estructuras intermediarias inferiores (ver Figura 4.8B). Las concentraciones de $A\beta_{1-42}$ y de LPFFD están en el margen utilizado por Soto y cols [27], una relación molar de 1:67. Con esta relación se observa un efecto diferencial del péptido sobre las fibras de $A\beta_{1-42}$ a los 6 días (144 horas) a 25°C , temperatura menor a los 37°C detallados en sus experimentos.

4.3. Interacción entre LPFFD y los agregados de $A\beta_{1-42}$ a través de espectroscopía de fuerzas (FV)

Durante la espectroscopía de fuerza en volumen (FV), la punta recoge información de fuerzas de interacción cuando se acerca a la superficie (*approaching*) y cuando se aleja de ésta (*retracting*). Durante el *approaching*, la punta es capaz de reconocer fuerzas de van der Waals, fuerza electrostática (atractiva y repulsiva) y la fuerza elástica, entre otras; y en el *retracting* la punta identifica fuerza de adhesión, la distensión de polímeros y la fuerza electrostática (repulsión), entre otras. Para obtener un mapa de interacción entre la punta funcionalizada con CLPFFD y la superficie con agregados de $A\beta_{1-42}$ adsorbidas, se hizo un barrido en una zona de $3 \times 3 \mu\text{m}$ en el TM del AFM en fluido con la sonda Olympus TR400PB, funcionalizada previamente con CLPFFD, obteniendo una imagen de 512 píxeles (Figura 4.9A). Terminada la imagen se inicia el modo FV, que realiza una imagen de altura en la misma zona de 64×64 píxeles con 256 cuadros de 47 nm^2 c/u, y a la vez, el mapa de interacciones en la misma zona de 64×64 píxeles (Figura 4.9B y C). Cada píxel del mapa de interacciones representa un valor de la curva de fuerza de interacción, que proviene del promedio de 64 repeticiones seguidas de *approaching* y *retracting* sobre un punto de cada uno de los 256 cuadros. En total, se obtienen 256 curvas de interacción de esta FV. En esta espectroscopía la zona de barrido elegida presenta FAs y protofibrillas, que son imposibles de distinguir en el mapa de fuerzas por la resolución elegida. La duración de la FV a esta resolución es de ~ 4 horas. Si la resolución se aumenta a 128 píxeles, el tiempo de duración de la FV aumenta exponencialmente, lo que hace imposible mantener estables los parámetros, principalmente por el medio fluido en que se realiza el experimento. Esta baja resolución no permite generar un mapa de interacciones sobre una fibra individual, ya que existe una curva de interacción por cada 47 nm de largo o de ancho,

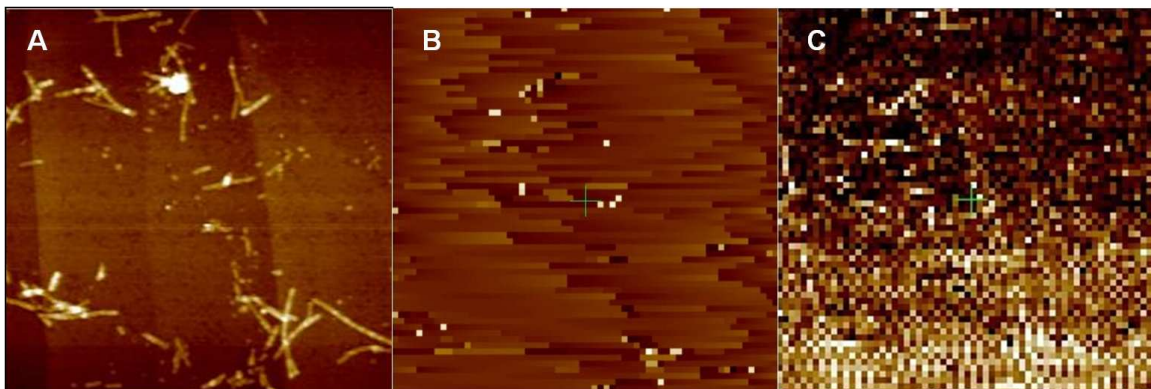


Figura 4.9: Desarrollo de la Espectroscopía de Fuerzas (FV) sobre HOPG en imágenes. A: Imagen de Altura 3 μm , 512 pixeles; sonda Olympus TR400PB funcionalizada con CLPFFD; Rango en Z: 10 nm. B: Misma zona, imagen de Altura 3 μm , 64 pixeles. C: Misma zona, imagen de Fuerzas sonda-superficie 3 μm , 64 pixeles *Escáner J*.

lo que no permite hacer conclusiones al evaluar la una fibra. De igual manera, el mapa de interacciones generado con esta técnica permite establecer qué tipo de fuerza es la que permite la interacción entre el péptido y los agregados de $\text{A}\beta_{1-42}$.

En el mapa de interacciones generado se puede observar cada cuadro o pixel con la curva de interacción correspondiente. Como se muestra en la Figura 4.10, en el experimento de FV entre la punta de Au-CLPFFD y agregados de $\text{A}\beta_{1-42}$ adsorbidos al HOPG, se observaron curvas representando fuerza de adhesión y curvas sin interacción o de contacto duro. Al analizar las interacciones entre la sonda Novascan PT-GS-AU de oro y la superficie de HOPG se observaron curvas de fuerza de contacto duro, como la curva de la Figura 4.11A, y cuando se analizaron las curvas de interacción entre la sonda Novascan PT-GS-AU de oro conjugada con CLPFFD (con la misma técnica) y la superficie de HOPG, se obtuvieron curvas de interacción representando fuerza de adhesión como se muestra en la Figura 4.11B. Se debe destacar que en esta última prueba las curvas se realizaron con dos

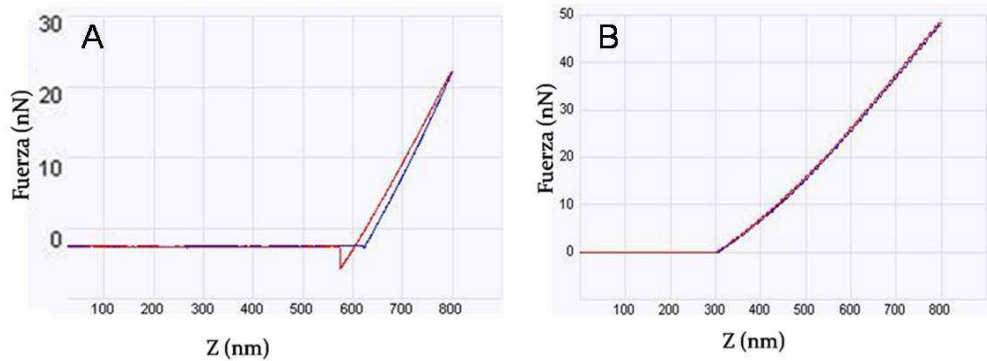


Figura 4.10: A: Curva de fuerza de adhesión entre Au-CLPFFD y FAs adsorbidas a HOPG; B: Curva de fuerza entre Au-CLPFFD y FAs adsorbidas a HOPG

medios diferentes: agua o BF 5mM, presentándose pequeñas diferencias en la fuerza de adhesión tendientes a la disminución de ésta en agua, lo que indicaría un pequeño grado de interferencia provocado por el BF 5 mM.

Las curvas de interacción entre la punta de Au-CLPFFD y los agregados de $A\beta_{1-42}$ adsorbidos al HOPG, fueron tratadas para transformar los valores de fuerza obtenidos a valores de energía. Se utilizó el punto mínimo de las curvas de *retracting* (punto D, Figura 2.2). Este valor representa Fuerza de adhesión (F_a) entre la punta y el punto de contacto en la superficie (con agregados de $A\beta_{1-42}$ adsorbidos). Las curvas presentaron $F_a < 8$ nN y mayoritariamente de contacto duro 0 nN. Esta condición se repitió en las curvas de fuerza entre la punta de oro sin funcionalizar y HOPG. Las curvas de interacción entre Au-CLPFFD y HOPG presentaron fuerzas de adhesión $< 2,5$ nN.

Los valores de F_a se utilizaron para calcular la energía de adhesión (γ) entre sólidos elásticos, en una interfase sólido-líquido o energía hidrofóbica en medio acuoso (γ_{SL}) [33] entre CLPFFD y los agregados de $A\beta_{1-42}$ adsorbidos a HOPG. La energía de superficie al contacto entre sólidos elásticos es influenciada por el tamaño del contacto y la fuerza de

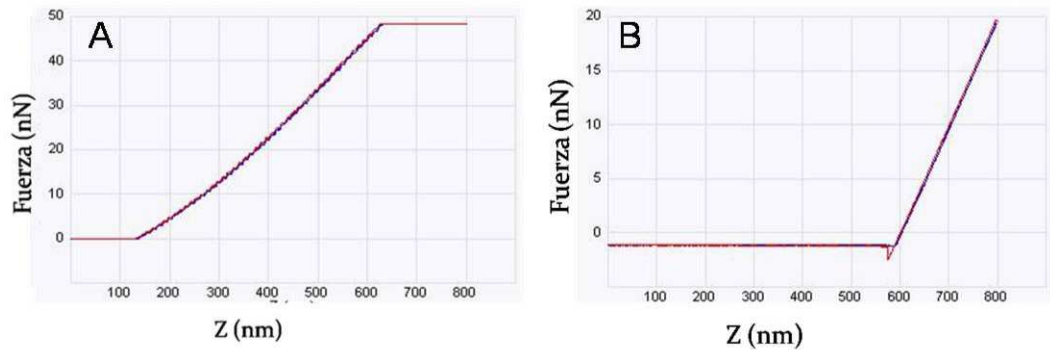


Figura 4.11: A: Curva de fuerza entre oro y HOPG; B: Curva de fuerza entre Au-CLPFFD y HOPG

adhesión entre superficies sólidas elásticas en medio acuoso (ver fórmula abajo). *En este caso, la energía de adhesión puede presentarse al poner en contacto el CLPFFD (sólido hidrofóbico) con los agregados de $A\beta_{1-42}$ (sólido elástico mayoritariamente hidrofóbico) y con la superficie de HOPG (un sólido hidrofóbico).* Los valores obtenidos de energía de adhesión resultaron menores a 57 mJ/m^2 para las curvas oro-CLPFFD y agregados de $A\beta_{1-42}$ sobre HOPG. En las curvas de oro con HOPG no se presenta energía de adhesión y en las curvas de oro-CLPFFD contra HOPG, resultaron valores de energía de adhesión menores a $0,1 \text{ mJ/m}^2$, como se indica en el Cuadro 4.1.

$$\gamma_{SL} = \frac{F_a}{R3\pi}$$

Para obtener otra perspectiva del mapa de interacción, se realizó una FV utilizando $A\beta_{1-42}$ $5 \mu\text{M}$ agregados durante 96 horas a 25°C y adsorbidos sobre mica en medio fluido. Las características de los agregados son globulares de 50 nm de altura y 200 nm aprox. de ancho. Se eligió una zona de $4 \times 4 \mu\text{m}$, que fue barrida con una sonda Veeco NP (Figura 4.12A). Posterior a la elección de la zona, la sonda se retira de la celda de fluido y se

Cuadro 4.1: Radio nominal de la sondas, fuerza de adhesión y energía de adhesión de curvas de fuerza obtenidas en los experimentos de FV

Curvas de Fuerza	Radio Sonda	F_a	γ_{SL}
Oro-CLPFFD/HOPG+FA	$\sim 15\text{nm}$	$< 8\text{ nN}$	$0-57\text{ mJ/m}^2$
Oro-HOPG	$\sim 2,5\mu\text{m}$	0	0
Oro-CLPFFD/HOPG	$\sim 2,5\mu\text{m}$	$< 2,5\text{ nN}$	$0,1\text{ mJ/m}^2$

coloca la sonda de oro Olympus TR400PB funcionalizada con CLPFFD, con ella se barre la misma zona a 256 pixeles y luego se inicia la FV a 64 pixeles, que entrega una imagen de altura (Figura 4.12B) y una imagen de FV o mapa de interacciones (Figura 4.12C).

La interpretación y obtención de gráficas de *approaching* y *retracting* de la FV se realizó a través de aplicaciones MATLAB. La espectroscopía entregó 524288 datos numéricos que se trabajaron en 4096 graficas, cada una contiene una curva de *approaching* de 64 puntos y una de *retracting* de 64 puntos. La versión MATLAB 7.4.0 r2007A se utilizó para generar un pequeño programa que tomó el valor del punto mínimo de cada curva, que es la máxima fuerza de adhesión (expresada en nN). Cada punto es representado en un mapa de interacciones de similares características al de la FV, pero que difiere en que en la FV las curvas va cambiando el punto de referencia en el sistema de coordenadas, en cambio, en el mapa de interacciones generado en MATLAB, el punto de referencia es el mismo para todas las curvas. Esto permitió aumentar las diferencias entre los puntos que mostraron fuerzas de adhesión. En la Figura 4.12D se observa el mapa de interacciones obtenido en MATLAB y en E, se observa un mapa en perspectiva de las fuerzas de adhesión. En el eje X el número de datos es 64 y (1 a 64); en el eje Y se graficaron las unidades de fuerza de adhesión ejercida entre 0 y 6 (nN); en el eje Z se graficó el número de curvas (64).

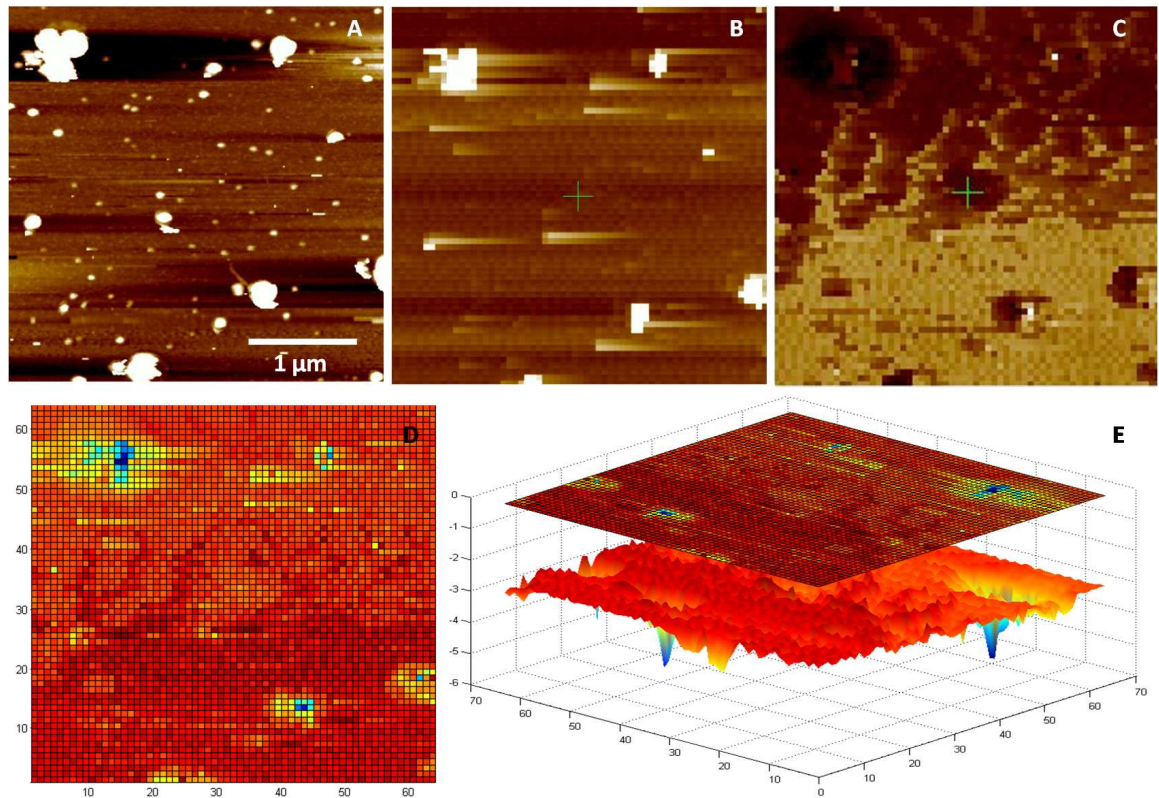


Figura 4.12: Desarrollo de la Espectroscopía de Fuerzas (FV) sobre Mica en imágenes y mapa de zonas de interacción entre CLPFFD y $A\beta_{1-42}$ (más azul, mayor interacción). A: TM en AFM en fluido de FAs de $A\beta_{1-42}$ 5 μM incubadas 96 h a T ambiente, sobre mica clivada. Lavado con BF 5 mM. Imagen de Altura: 4 μm ; 256 pixeles; sonda Veeco NP; Rango en Z: 50 nm. *Escáner* J. B: Imagen de Altura 4 μm ; 64 pixeles; sonda Olympus TR400PB de Au-CLPFFD. C: Imagen de Fuerza 4,0 μm ; 64 pixeles. D: Imagen en plano 64 \times 64 pixeles que entrega información de los mínimos de cada curva de *retracting* de la Espectroscopía de Fuerzas. E: Imagen en perspectiva y gráfica.

En estos mapas se puede observar que los agregados de $A\beta_{1-42}$ globulares de gran tamaño adsorbidos sobre esta superficie polar, presentan mayor adhesión al péptido CLPFFD en el centro de la estructura que en los alrededores. Este hecho calza con la idea de que el medio fluido y el gran tamaño alcanzado por los agregados, permite que la mayoría de los residuos hidrofóbicos se mantengan ocultos del medio acuoso, y los residuos hidrofílicos se mantengan en contacto permanente con el medio y la superficie hidrofílica de la mica. Es imposible generar a partir de estos datos un análisis profundo de la conformación estructural de los agregados de $A\beta_{1-42}$, sobre esta superficie hidrofílica en medio acuoso.

4.4. Determinación *in situ* del efecto del péptido LPFFD sobre los agregados de $A\beta_{1-42}$

El efecto del péptido disruptor LPFFD sobre los agregados de $A\beta_{1-42}$, adsorbidos a una superficie de HOPG, se estudió con flujos de LPFFD de 100 nM, 1 μ M y 1 mM, mientras que la velocidad de flujo utilizada fue de 1 ó 2 mL/hora. En los experimentos en que se utilizó LPFFD 100 nM y 1 μ M no se observó un efecto del péptido sobre los agregados de $A\beta_{1-42}$ o sobre la superficie de HOPG a 1 y 2 mL/hora por 24 horas. En cambio, cuando la concentración de LPFFD empleada fue de 1 mM se observaron algunos cambios, principalmente sobre la superficie de HOPG. En la Figura 4.13A se observa una imagen de amplitud de la superficie de HOPG que tiene adsorbidos agregados de $A\beta_{1-42}$ 100 μ M (obtenidos según protocolo), y enfocada especialmente sobre una FA helicoidal que atraviesa la zona. Después de capturar esta imagen el flujo de LPFFD 1mM se inició con una velocidad de 2 mL/hora. A las 4 horas de flujo la zona presenta idénticas

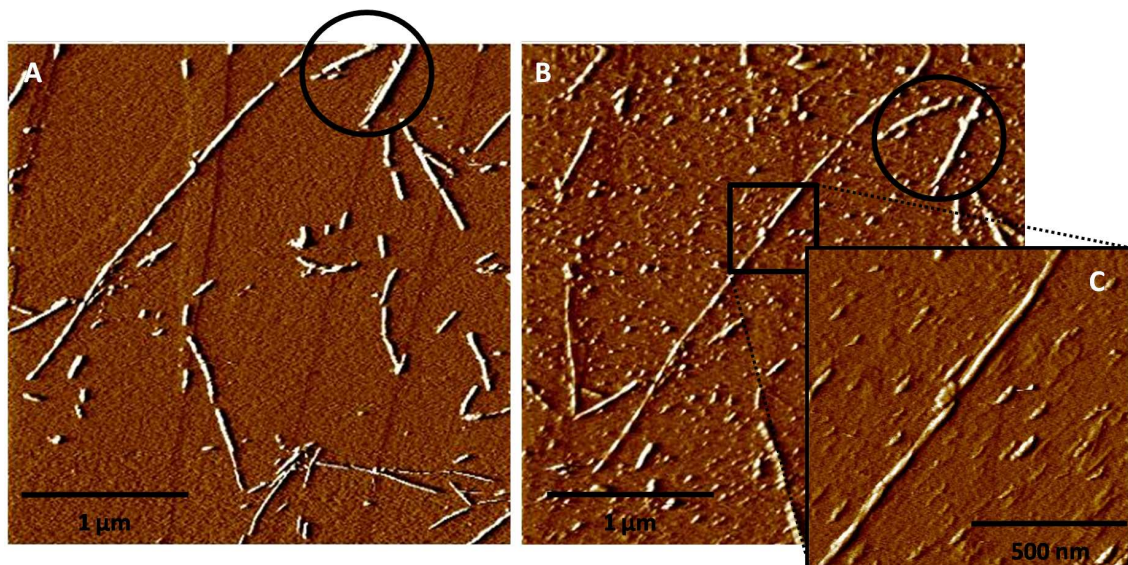


Figura 4.13: Flujo de LPFFD 1 mM sobre FAs de $A\beta_{1-42}$ adsorbidas en HOPG. Escáner PF, 384 pixeles, sonda Veeco NP. A: TM AFM en fluido de $A\beta_{1-42}$ 100 μM ; 20h a 23°C. Imagen del inicio del flujo de LPFFD 1mM 2mL/hora; Imagen de Amplitud: 3 μm ; Rango en Z: 300 mV. B: Flujo de LPFFD 1mM de 4 horas a 2 mL/hora más reposo por 23 horas a T ambiente en la celda de fluido del AFM. Imagen de Amplitud: 3 μm ; Rango en Z: 300 mV. C: Imagen de Amplitud: 1 μm ; Rango en Z: 300 mV.

características en cuanto al estado de los agregados, de las fibras y de la superficie. Por esta razón, se mantuvo la celda de fluido llena de LPFFD 1 mM por 23 horas en reposo a temperatura ambiente y se observó nuevamente la zona. En la Figura 4.13B se observan cambios en la zona: el HOPG se cubre de una capa de estructuras de menos de 100 nm de longitud, que se reparten aleatoriamente y no permiten distinguir los pliegues del grafito. Estas estructuras parecen amiloesferoides adsorbidos tardíamente a la superficie, pero es necesario señalar que el flujo de LPFFD por 4 horas es capaz de remover la mayoría, o todos los agregados de $A\beta_{1-42}$ que no se adsorbieron a la superficie y quedaron en el

medio. Por lo tanto, estas nuevas estructuras adsorbidas, corresponderían a algún tipo de estructura mayor de los residuos de LPFFD ó, a estructuras de $A\beta_{1-42}$ que interaccionaron con LPFFD, se separaron de la superficie o de un agregado de mayor tamaño unido a la superficie. En la Figura 4.13C *se destaca que la FA estudiada durante el flujo no ha sufrido cambios visibles a esta escala en su estructura, por lo que se podría deducir que el LPFFD no tiene sitios preferenciales sobre fibras amiloides adsorbidas en HOPG; o más lógico aún, que las fibras amiloides helicoidales están conformadas de tal manera sobre el HOPG, que ocupan sus residuos hidrofóbicos para situarse adecuadamente sobre esta superficie en el medio acuoso, lo que no permitiría la interacción de éstos con las moléculas de LPFFD presentes en el medio a elevada concentración.*

Para apreciar si el péptido LPFFD en exceso puede generar un efecto diferencial sobre las estructuras de $A\beta_{1-42}$ adsorbidas a HOPG, se utilizó un flujo de LPFFD 8 mM (saturado). En la Figura 4.14 se aprecia la superficie y los agregados de $A\beta_{1-42}$ luego de pasar un flujo de 0,44 mL de LPFFD 8 mM. La imagen de fase (Figura 4.14A), indica que fibras amiloides y algunos pequeños agregados en la superficie son las estructuras que más interaccionan con la sonda utilizada. La imagen de amplitud (Figura 4.14B) muestra, en el cuadrante superior derecho de la imagen, una zona que tiene albergadas algunas estructuras como hilos, diferentes a fibras amiloides, que no estaban presentes al inicio del flujo en esa zona. En la Figura 4.14C y D se observan dos imágenes de amplitud y fase respectivamente capturadas cuando ya se ha pasado 2 mL de flujo de LPFFD 8 mM, y se aprecia sobre la superficie una gran cantidad de estas estructuras delgadas (como hilos) de menos de 15 nm de ancho, ubicadas sobre la superficie de HOPG. Estas estructuras están adsorbidas sobre el HOPG o están unidas sobre la monocapa de agregados de $A\beta_{1-42}$. Esta interacción tendría las mismas características que la que se produce entre los agregados de $A\beta_{1-42}$ y el HOPG. La imagen de fase (Figura 4.14D) indica que estas nuevas estructuras

posadas sobre la superficie de HOPG o la monocapa, interactúan de manera diferente con la sonda utilizada para el barrido. A partir de esta diferencia en la interacción, se podría especular que estos agregados no serían de $A\beta_{1-42}$, sino que de LPFFD, y se formarían ante la saturación de la solución entregada a la celda y la disponibilidad de sitios hidrofóbicos en la superficie, abonados por el HOPG o por pequeños agregados de $A\beta_{1-42}$ con residuos hidrofóbicos libres. Esta situación sobre la superficie se mantuvo ante el lavado de la superficie con agua Milli-Q.

Ante estos antecedentes, se procedió a entregar un flujo de LPFFD 8 mM a una superficie de HOPG recién clivada sin agregados adsorbidos. Para esta prueba se llenó la celda de fluido sobre el HOPG con LPFFD 8 mM. Se capturó una primera imagen de la superficie (Figura 4.15A) en la que se aprecian estructuras delgadas como hilos que están posadas sobre la superficie sin someterse a los ángulos del HOPG, dando la idea que están unidas a otras capas inferiores de LPFFD, que sí están adsorbidas a la superficie del grafito. Se mantuvo la celda de fluido llena de LPFFD 8 mM por 5 horas y luego se introdujo un fuerte flujo de la misma solución a la celda, para retirar la mayor cantidad de estructuras no unidas a la superficie. En las imágenes adquiridas se pueden apreciar zonas en las que no hay presencia de estructuras delgadas como hilos, pero sí hay pequeñas estructuras globulares de menos de 40 nm repartidas aleatoriamente sobre la superficie. Existen otras zonas, pero menos características (Figura 4.15B), en las que se observa que el LPFFD está adsorbido al HOPG manteniendo la orientación angular que lo caracteriza (60°), lo que indica que el LPFFD es capaz de unirse hidrofóbicamente con el HOPG a las concentraciones estudiadas.

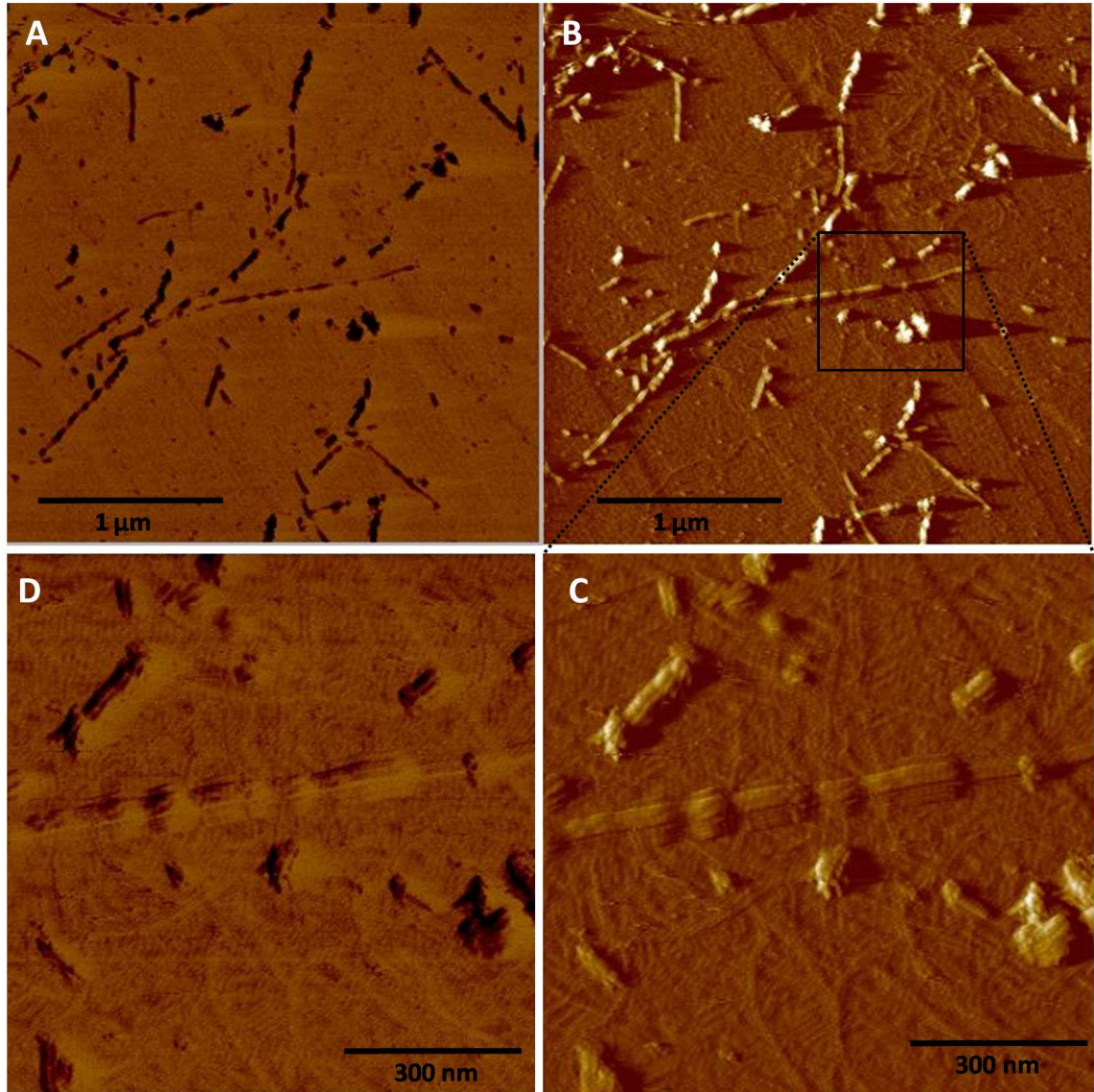


Figura 4.14: Flujo de LPFFD 8 mM sobre FAs de $A\beta_{1-42}$ adsorbidas en HOPG. Escáner PF, 384 pixeles, sonda Veeco NP. A: Fibras cortas helicoidales 100 μ M agregadas según protocolo. Flujo de LPFFD 8 mM a 2 mL/hora, pasados 0,44 mL de flujo. Imagen de Fase 3,31 μ m, Rango en Z: 20°. B: Imagen de Amplitud: 3,31 μ m, Rango en Z: 500 mV; C: Pasados 2 mL de flujo. Imagen de Amplitud: 1 μ m, Rango en Z: 500 mV. D: Imagen de Fase: 1 μ m, Rango en Z: 20°

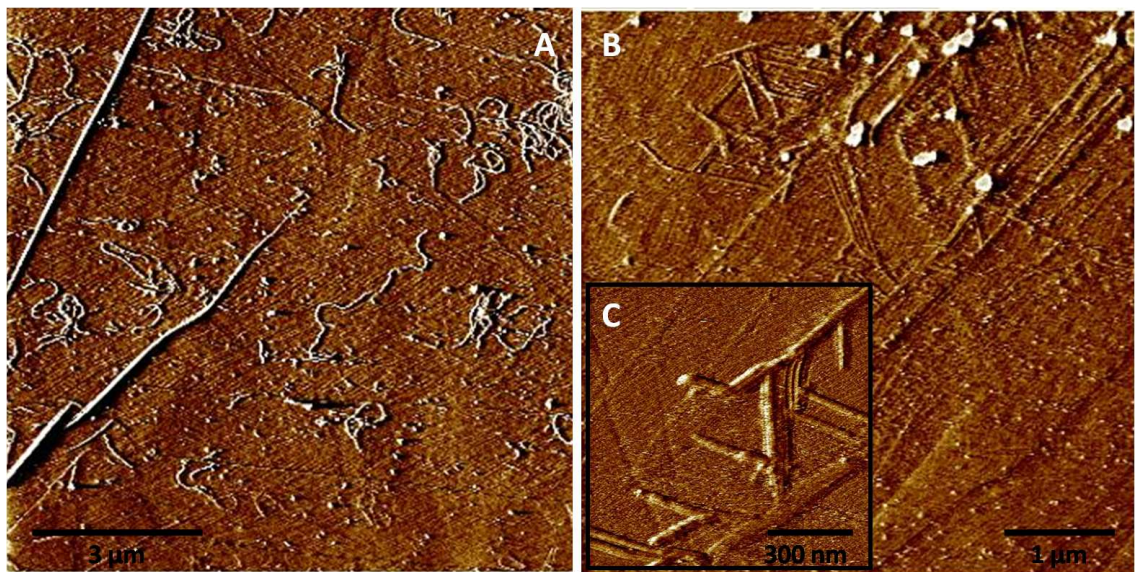


Figura 4.15: Interacción entre HOPG y LPFFD 8 mM. *Escáner* PF, sonda Veeco NP. 384 pixeles. A: LPFFD 8mM (sobresaturado) sobre HOPG; zona característica a las 0 horas de reposo. Imagen de Amplitud: 10 μm ; Rango en Z: 100 mV. B: LPFFD 8mM (sobresaturado) sobre HOPG. Imagen capturada a las 5 horas de interacción con el HOPG. Imagen de Amplitud: 5 μm , Rango en Z: 150 mV. C: Agregados de LPFFD con orientación angular. Imagen de Amplitud: 1 μm , Rango en Z: 150 mV.

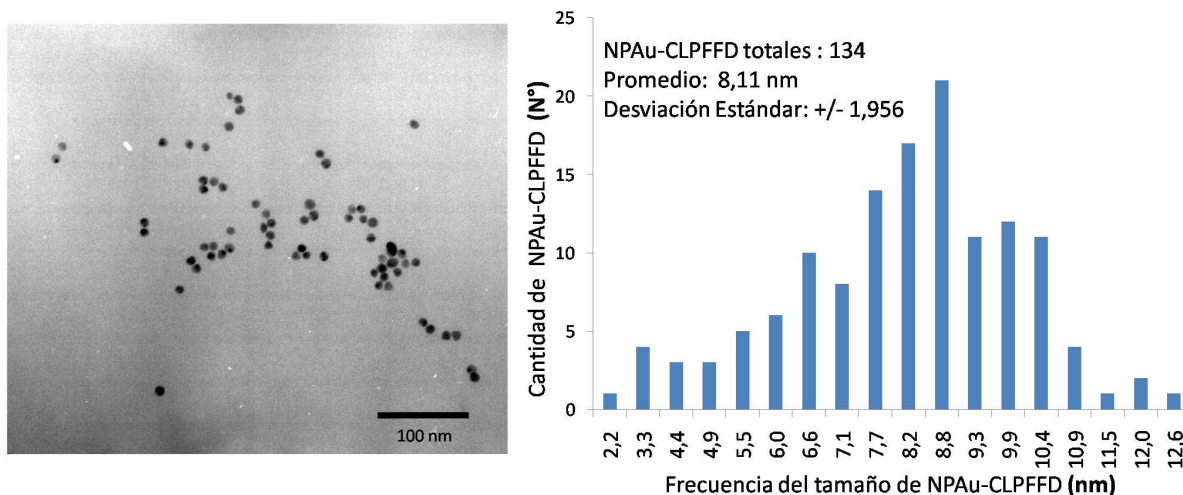


Figura 4.16: Imagen de TEM en aire a 140000 aumentos y 80 kV de NPAu-CLPFFD sobre rejilla de cobre recubierta con una membrana Formvar y carbón. Derecha: Gráfico de barras con histograma de NPAu-CLPFFD.

4.5. Reconocimiento de sitios de unión entre de NPAu conjugadas a CLPFFD y AT de $A\beta_{1-42}$

Las NPAu-CLPFFD (6 nM-2 μ M) utilizadas en estos experimentos fueron observadas en TEM. A partir de estas observaciones se realizó un histograma de la frecuencia de su tamaño versus la cantidad (Figura 4.16). De éste, se obtuvo que las NPAu-CLPFFD estudiadas tienen un diámetro promedio de 8,11 nm, siendo la mayor cantidad de 8,8 nm y presentando una D.E. de $\pm 1,956$ nm. Entre las 134 unidades estudiadas el diámetro mínimo es de 2,2 nm y el máximo de 12,6 nm.

En la Figura 4.16 se observa una de las imágenes capturadas en TEM de las esferas de NPAu-CLPFFD repartidas aleatoria e individualmente sobre la membrana, sin mostrar

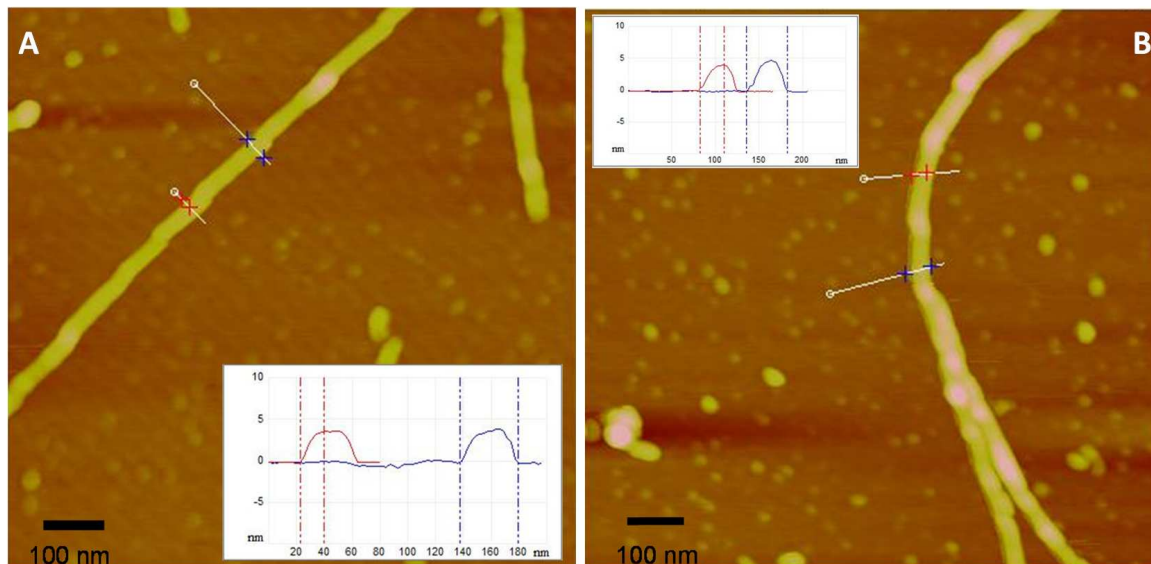


Figura 4.17: Imágenes de $A\beta_{1-42}$ $100 \mu\text{M}$ sobre Mica- Mg^{+2} en TM AFM en aire. A: Imagen de Altura: $1 \mu\text{m}$; Rango en Z: 15 nm ; 512 pixeles; Escáner E; Sección Roja: Altura: $3,9 \text{ nm}$; Sección azul: Diámetro: 43 nm . B: Otra zona, Sección Roja: Altura: $3,5 \text{ nm}$; Sección azul: Diámetro: 47 nm

focos de agregación, lo que es óptimo para la potencial interacción con los agregados de $A\beta_{1-42}$.

Los agregados de $A\beta_{1-42}$ han sido estudiados en mica en esta investigación y en otras publicaciones [34, 24], pero no han sido estudiados en una superficie de carga positiva. La mica funcionalizada con Mg^{+2} entrega una capa de carga positiva, que sería capaz de interaccionar con los residuos polares de carga negativa de los agregados de $A\beta_{1-42}$. En la etapa de caracterización de los agregados de $A\beta_{1-42}$, éstos se observaron sobre mica en fluido, sin lograr observar estructuras definidas como las fibras amiloides. Al inicio de este experimento se observaron los agregados de $A\beta_{1-42}$ sobre mica funcionalizada con carga positiva en fluido, a través del TM del AFM, resultando imágenes en que

las fibras amiloides presentes no estaban fijas a la superficie, pero si existía una unión que las mantenía sobre ella pero en movimiento. Por la dificultad de lograr imágenes de calidad en fluido, se procedió a adaptar el procedimiento para observar los agregados de $A\beta_{1-42}$ en aire, lo que disminuye la veracidad de la fortaleza de la interacción pero entrega más información sobre las características de los agregados unidos a la superficie con carga positiva. Pasado el tiempo de agitación mecánica se depositó 30 μL de $A\beta_{1-42}$ 100 μM sobre mica funcionalizada con Mg^{+2} , se secó la superficie con un flujo de N_2 para observarlas usando el TM del AFM en aire. Se capturaron 10 imágenes de zonas de 1 μm^2 usando 512 pixeles de resolución con un *Escáner E*, en la versión 6.14r1 del programa Nanoscope. Se observaron y midieron fibras amiloides (FAs) de $A\beta_{1-42}$ 100 μM sobre la superficie de la mica funcionalizada con Mg^{+2} .(ver histogramas en ANEXOS 3 y 4)

En la Figura 4.17A se presenta uno de los perfiles topográficos de la fibra amiloide (FA) en dos gráficas, la curva roja que indica la altura de la FA desde la superficie de 3,9 nm, y en la curva azul, el diámetro (ancho) de la FA de 43 nm. En la Figura 4.17B se observa el mismo tipo de topografía de la FA sobre la superficie y también se puede observar en la curva roja la altura de la FA, 3,5 nm y en la azul el ancho de 47 nm.

Para hacer comparaciones topográficas, se efectuó el mismo procedimiento anterior a agregados de $A\beta_{1-42}$ 100 μM , mezclados con NPAu-CLPFFD; éstos se unieron a mica funcionalizada con Mg^{+2} y se capturaron 10 imágenes en las mismas condiciones que el experimento anterior. Se observaron y midieron fibras amiloides (FA) sobre esta superficie (ANEXOS 3 y 4). Como se puede observar en la Figura 4.18A, el perfil topográfico indica que el ancho de la FA es de 79 nm, observándose en la curva azul una altura más abultada; en 4.18B se observa el perfil topográfico transversal al eje de la fibra presentando una longitud de onda de 101 nm. En la Figura 4.18C, se observa el perfil topográfico de una estructura que presenta una altura de 1,3 nm que, así como el resto de estructuras pequeñas

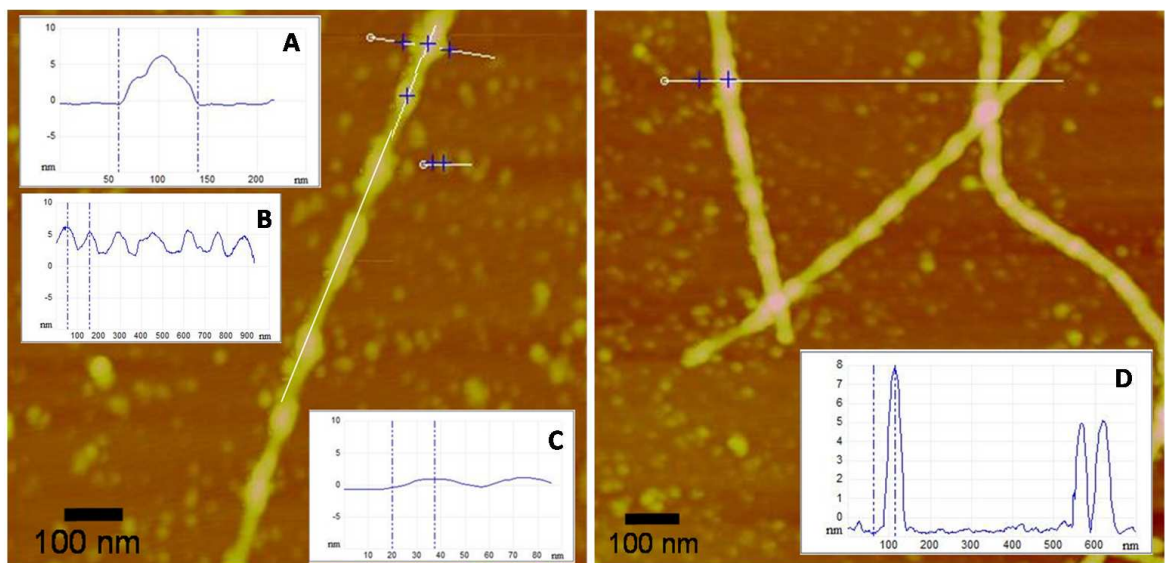


Figura 4.18: Imágenes de $A\beta_{1-42}$ $100 \mu\text{M}$ mezcladas con NPAu-CLPFFD sobre Mica- Mg^{+2} en TM AFM en aire. Imágenes de altura: $1 \mu\text{m}$; Rango en Z: 15 nm; 512 píxeles, Escáner E. A: Diámetro: 79 nm; B: Longitud de onda: 101 nm; C: Altura de AEs: 1,3 nm; D: Altura: 8,6 nm.

Cuadro 4.2: Dimensiones en zonas bajas y altas de FA de estudiados sobre Mica- en TM AFM en aire

Fibra Amiloide	Altura zona	Diámetro zona	Altura zona	Diámetro zona
	Baja (nm)	Baja (nm)	Alta (nm)	Alta (nm)
Con NPAu-CLPFFD	5 ±1	44 ±7	6,2 ±0,6	48 ±6
Sin NPAu-CLPFFD	4,9 ±0,8	41 ±4	5,7 ±1,1	42,6 ±4,7

en la superficie, puede corresponder a un amiloesferoide, a una NPAu-CLPFFD individual o a amiloesferoides unidos a NPAu-CLPFFD, aunque esto último es menos común [27]. En 4.18D se observa que la altura de la fibra amiloide es de 8,6 nm y que las fibras a su lado tienen una altura de 5-6 nm.

A partir de los datos obtenidos de distancias horizontales y verticales en cortes longitudinales y transversales, de los perfiles topográficos de los agregados de $A\beta_{1-42}$ incubados con NPAu-CLPFFD y no incubados con NPAu-CLDFFD, se realizaron y agruparon en tablas de datos para obtener la media, desviación estándar e histograma de los tamaños de estas estructuras. (ver ANEXOS 3 y 4)

Al estudiar la topografía de fibras amiloides con y sin NPAu-CLPFFD (ver cuadro 4.2), no se observaron diferencias significativas en los parámetros indicados en el cuadro, pero sí se observó diferencias en la dispersión del histograma de diámetro en las zonas altas (ANEXO 3). Allí, la diferencia entre fibras con NPAu-CLPFFD y sin NPAu-CLPFFD está en que la frecuencia máxima de fibras con NPAu-CLPFFD está compartida por más clases de datos, en cambio, sin NPAu-CLPFFD, la frecuencia máxima es una sola al centro del histograma. Esto puede dar luces ante una posible unión entre fibras amiloides y NPAu-CLPFFD, pero considerando los valores de estos diámetros, se puede suponer que sólo

NPAu-CLPFFD menores a 5 nm serían capaces de unirse a la estructura para afectar la altura casi desapercibidamente. Otra situación a analizar es que la concentración utilizada para estos experimentos debería aumentarse para observar un efecto diferencial.

Capítulo 5

Discusión

Obtención y Caracterización de los agregados de $A\beta_{1-42}$

Los AEs y FAs son adsorbidas abundante y homogéneamente al HOPG (ver Figura 5.1; 4.2). Tanto AEs como FAs presentan un carácter hidrofóbico que les permite interactuar y adsorberse sobre la superficie hidrofóbica del grafito, exponiendo sus grupos hidrofílicos hacia la solución (Figura 5.2; 5.3). Las FAs que mantienen una periodicidad cada 100 nm, presentan una topografía compatible con los modelos actuales de su estructura molecular que indican que estas FAs adoptan conformaciones helicoidales [4, 5, 6] para ocultar del agua sus dominios hidrofóbicos, resultando estructuras como las observadas por AFM (Figura 4.5).

Asimismo, estas estructuras interactúan con la superficie de mica funcionalizada con Mg^{+2} (Figura 5.3; 4.7; 4.18). Esta interacción puede atribuirse a la exposición de 4 residuos cargados negativamente que se encuentran en la región de 1 a 11 de la cadena del $A\beta_{1-42}$ (1D , 3E , 7D y ^{11}E) (Figura 5.2). De esta manera, los residuos que se encontraban ocultos al estar en contacto con el grafito, se encuentran expuestos cuando están en contacto con mica. Es importante destacar que estos agregados no se adhieren a mica sin funcionalizar,

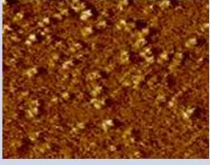
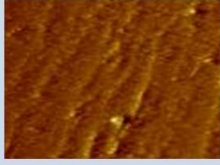
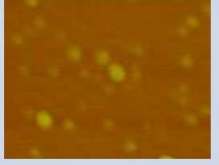
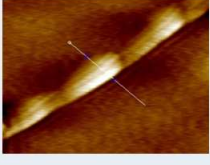
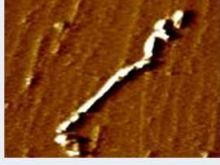

AGREGADO Y TIEMPO DE AGREGACIÓN	SUPERFICIE HIDROFÓBICA HOPG	SUPERFICIE HIDROFÍLICA MICA	SUPERFICIE POLAR CARGA POSITIVA
AMILOESFEROIDE (18 horas 23°C)	+++ 	+ 	+ 
FIBRA AMILOIDE (20 horas 23°C)	+++ 	++ 	+++ 

Figura 5.1: Interacción de diferentes agregados amiloides con las superficies estudiadas.

+++ : Interacción elevada; ++ : Interacción media; + : Interacción muy pobre o nula.

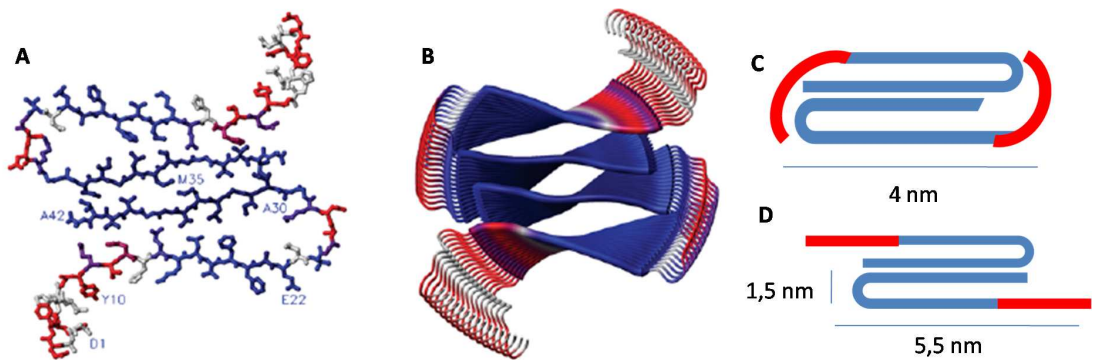


Figura 5.2: A: Modelo antiparalelo de la disposición de dos monómeros de $A\beta_{1-42}$. B: Modelo en perspectiva de la formación helicoidal de varios dímeros de $A\beta_{1-42}$ [4, 5, 6]. C: Disposición de A sobre mica- Mg^{+2} D: Disposición de A sobre HOPG. Zona roja: región hidrofílica; zona azul: región hidrofóbica.

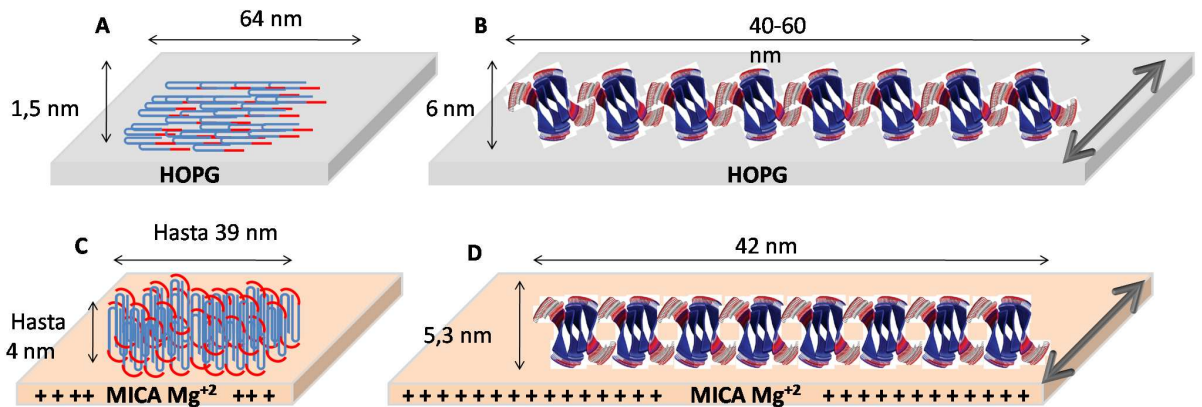


Figura 5.3: Modelo de interacción de agregados de $A\beta_{1-42}$ con las superficies estudiadas (Basado en Figura 5.2). A: Amiloesferoides sobre HOPG. B: Fibra amiloide sobre HOPG. C: AEs sobre mica Mg^{+2} D: FAs sobre mica- Mg^{+2} . Nótese que existe un crecimiento lateral de las hebras que se colocan adyacentemente manteniendo una altura de 5 nm.

lo cual se puede relacionar con que los residuos cargados positivamente son sólo dos (5R y 6H en la región 1 a 11), dificultando de esta manera una interacción estable.

Con estos experimentos no es posible dilucidar si el proceso de agregación responde a un orden secuencial desde el monómero hasta la formación de placa, pasando por amiloesferoides o fibras, o si ocurre por vías diferentes como han afirmado algunos autores [1, 2]. Las interacciones hidrofóbicas con HOPG disminuyen al aumentar el tiempo de agregación a más de 36 horas, por lo que se postula que los sitios hidrofóbicos pueden mantenerse ocultos o participando de interacciones intramoleculares, mientras que los sitios hidrofílicos quedan expuestos (Ver Figuras 4.2 y 4.3).

Interacción entre LPFFD y los agregados de $A\beta_{1-42}$ *in volumen e in situ*

El péptido LPFFD es capaz de desagregar estructuras fibrilares de $A\beta_{1-42}$, usando una concentración de $1,5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ a temperatura ambiente. Las fibras amiloides se transforman en agregados esféricos pequeños de menos de 4 nm de altura al cabo de 144 horas (Figura 4.8), lo cual puede atribuirse al efecto desagregante de LPFFD sobre $A\beta_{1-42}$, como ha sido observado por otros autores [27]. Contrariamente, al realizar los experimentos *in situ* suministrando un flujo de LPFFD, no se observó desagregación ni cambios en la estructura de las fibras adsorbidas a la superficie (ver Figuras 4.13 y 4.14). Este hecho puede atribuirse a que en la interacción de los residuos hidrofóbicos con el grafito, se oculta el núcleo putativo ($^{17}\text{LVFFA}^{21}$) de interacción con LPFFD (Figura 5.3), sobre todo cuando estas fibras adoptan la estructura helicoidal con periodicidad de 100 nm, que hemos observado.

La situación *in situ* podría ser más parecida a la condición patológica, en la que los AT se encuentran formando placas amiloides sobre membranas o estructuras, con determinadas características de hidrofobicidad. Para el diseño de nuevos inhibidores peptídicos de la agregación o desagregantes de $A\beta_{1-42}$ más efectivos desde un punto de vista terapéutico, se debe considerar cómo interaccionan en condiciones extremas de concentración, hidrofobicidad, etc.

Interacción entre CLPFFD y FAs de $A\beta_{1-42}$ a través de espectroscopía de fuerzas

En los experimentos de FV se encontró que no existe una correlación entre la imagen de altura al inicio y durante la FV, y la imagen de FV que indique algún tipo de patrón de interacción cada 100 nm entre la punta con CLPFFD y las FAs adsorbidas al HOPG (ver Figura 4.9). Para obtener una información acabada de la periodicidad de las FAs es necesaria una FV con mayor resolución, lo que no es factible en el tiempo óptimo en que se

ejecuta este experimento. Una mayor resolución se obtiene realizando el experimento durante 48 horas, lo cual no es factible por la inestabilidad del sistema. La fuerza de adhesión entre la sonda con la microesfera y la superficie de HOPG es nula, por lo tanto, todas las adhesiones observadas corresponden a interacciones entre el CLPFFD y el HOPG o entre el CLPFFD y FAs. No obstante, las interacciones observadas presentan valores pequeños, que no se correlacionan con los esperados para interacciones hidrofóbicas entre LPFFD y los residuos pertenecientes a la región hidrofóbica (¹⁷LVFFA²¹) de interacción en las FAs. Este hecho puede relacionarse con la gran adsorción de las FAs sobre el HOPG a través de interacciones hidrofóbicas, ocultando así los residuos hidrofóbicos, y no permitiendo su interacción con LPFFD.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo evidencian que es muy diferente la situación de una FA adsorbida sobre una superficie, respecto de lo que sucede *in volumen*, ya que en estas últimas condiciones sí existe libre interacción entre la FA y LPFFD.

Reconocimiento de sitios de unión entre nanopartículas de oro conjugadas a CLPFFD y agregados de A β ₁₋₄₂ preparados *in volumen* y observados en aire

Las NPAu-CLPFFD interactúan con la superficie de mica funcionalizada con Mg⁺². La interacción de A β ₁₋₄₂ con la mica funcionalizada es posible en aire (ver Figuras 4.7; 4.17; 4.18). Esto puede ser explicado porque la interacción entre las fibras de A β ₁₋₄₂ y la mica funcionalizada con Mg⁺² radica en los aminoácidos con carga negativa a pH 7,4, que son 6 (Aspártico y Glutámico). Esta consideración permite concluir la conformación de la fibra amiloide sobre esta superficie de carga positiva. Como se observa en el modelo de la Figura 5.3, los monómeros de A β ₁₋₄₂ están unidos entre sí como lo han afirmado diferentes autores en literatura [7, 24], pero por las condiciones de la superficie, la fibra adopta una posición de menor energía que una fibra helicoidal, posicionándose sobre las cargas

positivas a través de interacciones con los residuos polares con carga negativa, que se ubican justamente en los primeros aminoácidos de los monómeros. Al menos 28 monómeros podrían conformar esta fibra amiloide a lo ancho.

La interacción de la NPAu-CLPFFD con la FA produce un engrosamiento de la FA (que se detecta una vez unida a la mica funcionalizada con Mg^{+2}) observado especialmente en las zonas de mayor altura, mientras que en las zonas más bajas no se observa ensanchamiento (ANEXO 3). Este hecho podría explicarse por la interacción de la región $^{17}LVFFA^{21}$ con CLPFFD que en solución estaría expuesta. Solamente NPAu-CLPFFD pequeñas son capaces de interactuar, permitiendo el ensanchamiento o crecimiento lateral de las fibras.

Capítulo 6

Conclusiones

Mediante el estudio de la interacción de agregados de $A\beta_{1-42}$ con diferentes superficies, experimentos *in volumen* e *in situ* y el uso de sondas de nanopartículas metálicas, fue posible profundizar en el conocimiento de propiedades fisicoquímicas de los agregados de $A\beta_{1-42}$, que pueden ser complementarios a la información que entregan técnicas tradicionales como RMN y cristalografía de rayos X.

A través de técnicas de microscopía de fuerza atómica, es posible obtener información sobre la estructura de los agregados de $A\beta_{1-42}$ y la disposición de zonas hidrofílicas e hidrofóbicas según la superficie en que se estudien. Pero también, a través de esta técnica, es muy difícil localizar con exactitud las zonas que exponen o no residuos que afectan la interacción con el péptido LPFFD.

La disposición de los agregados de $A\beta_{1-42}$ conduce a conformaciones que se modifican según la superficie en la que se estudian, siendo estas conformaciones compatibles con el modelo de conformación de monómeros antiparalelo, que se postula actualmente para explicar el proceso de agregación.

Tal como se reporta en la literatura, el inhibidor LPFFD es adecuado para producir la

desagregación *in volumen* de fibras amiloides de $A\beta_{1-42}$. Sin embargo, este proceso no ocurre cuando las fibras amiloides están fijas a una superficie hidrofóbica, debido a que los sitios de interacción se encuentran ocultos sobre ésta.

De cara al diseño de inhibidores de la agregación de $A\beta_{1-42}$, la microscopía de fuerza atómica se considera como una técnica adecuada para estudiar la interacción de cualquier inhibidor con agregados de $A\beta_{1-42}$, ya que esta técnica permite recrear una interfase superficie-líquido, similar a la que ocurre en tejido de cerebro de pacientes que padecen la enfermedad de Alzheimer.

Esta investigación ha dado origen a las siguientes publicaciones en congresos:

- 2007. Ariel Guerrero H., Ivonne Olmedo, Aurora Morales, Leonardo Caballero, Francisco Melo, Ricardo Aroca, Alejandro Alvarez-Lueje, Marcelo J. Kogan. VIII Jornadas en Investigación y Ciencias. Santiago. 3 de Abril de 2007. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.
- 2007. Aurora Morales A., Leonardo Caballero, Ariel Guerrero, Francisco Melo, Marcelo J. Kogan. Estudio de interacción entre agregados de beta amiloide y CLPFFD por microscopía de fuerza atómica. XXVII Jornadas Chilenas de Química. Chillán. 20-23 de Noviembre de 2007. Termas de Chillán. Chile.
- 2008. Aurora Morales A., L. Caballero, F. Melo, MJ. Kogan. Study of the interaction between amyloid beta aggregates and the LPFFD disruptor peptide by using atomic force microscopy techniques and gold nanoparticles. International Workshop Frontiers in Materials Research IV. Viña del Mar, 21-24 de Mayo de 2008. Chile. [http://nlplab.usach.cl/publications/presentations %20and %20posters/frontier_aurora_2008.pdf](http://nlplab.usach.cl/publications/presentations%20and%20posters/frontier_aurora_2008.pdf)

Bibliografía

- [1] Necula M. Kaye R. Milton S. Glabe CG. Small molecule inhibitors of aggregation indicate that amyloid β oligomerization and fibrillization pathways are independent and distinct. *Journal of Biological Chemistry*, 14(282):10311–10324, 2007.
- [2] Citron M. Diehl TS. Gordon G. Biere AL. Seubert P. Selkoe DJ. Evidence that the 42 and 40 amino acid forms of amyloid β protein are generated from the β amyloid precursor protein by different protease activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93:13170–13175, Noviembre 1996.
- [3] Olofsson A. Sauer-Eriksson AE. Ohman A. The solvent protection of alzheimer amyloid β_{1-42} fibrils as determined by solution nmr spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry*, 281(1):477–83, 2006.
- [4] Sato T. Kienlen-Campard P. Ahmed M. Liu W. Li H. Elliott JI. Aimoto S. Constantinescu SN. Octave JN. Smith SO. Inhibitors of amyloid toxicity based on β -sheet packing of β_{1-40} and $a\beta_{1-42}$. *Biochemistry*, 45:5503–5516, 2006.
- [5] Olofsson A. Lindhagen-Persson M. Sauer-Eriksson AE. Ohman A. Amide solvent protection analysis demonstrates that a β_{1-42} and a β_{1-42} form different fibrillar structures under identical conditions. *Biochemistry Journal*, (404):6370, 2007.

- [6] Petkova AT. Yau WM. Tycko R. Experimental constraints on quaternary structure in alzheimers β -amyloid fibrils. *Biochemistry*, 45:498–512, 2006.
- [7] Arimon M. Díez-Pérez I. Kogan MJ. Durany N. Giralt E. Sanz F. Fernàndez-Busquets X. Fine structure study of $a\beta_{1-42}$ fibrillogenesis with atomic force microscopy. *FASEB Journal*, 19(10):1344–6, 2005.
- [8] Kogan M.J. Bastus NG. Amigo R. Grillo-Bosch D. Araya E. Turiel A. Labarta A. Giralt E. Puentes VF. Nanoparticle-mediated local and remote manipulation of protein aggregation. *Nano Letters*, 6(1):110–115, 2006.
- [9] *MultiMode SPM Instruction Manual. NanoScope Software Version 5.* Veeco Instruments Inc., 2004.
- [10] Veeco. http://www.veecoprobes.com/probe_detail.asp?classid=84. Technical report, Veeco NP Probe, Np Series, mayo 2008.
- [11] Veeco. http://www.veecoprobes.com/probe_detail.asp?classid=107. Technical report, Veeco NP Probe, NP Series, mayo 2008.
- [12] Stefani M. Dobson CM. Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *Journal of Molecular Medicine*, 81:678–99, 2003.
- [13] Roher AE. Chaney MO. Kuo YM. Webster SD. Stine WB. Haverkamp LJ. Woods AS. Cotter RJ. Tuohy JM. Krafft GA. Bonnell BS. Emmerling MR. Morphology and toxicity of $a\beta_{1-42}$ dimer derived from neuritic and vascular amyloid deposits of alzheimers disease. *Journal of Biological Chemistry*, 271(34):20631–5, 1996.

- [14] Perutz M.F. Glutamine repeats and inherited neurodegenerative diseases: molecular aspects. *Current Opinion in Structural Biology*, 6:848–58, 1996.
- [15] Kaye R. Bernhagen J. Greenfield N. Sweimeh K. Brunner H. Voelter W. Kapurniotu A. Conformational transitions of islet amyloid polypeptide (iapp) in amyloid formation in vitro. *Journal of Molecular Biology*, 287(781-96), 1999.
- [16] Conway KA. Harper JD. Lansbury PT Jr. Fibrils formed in vitro from alpha-synuclein and two mutant forms linked to parkinson's disease are typical amyloid. *Biochemistry*, 39:2552–63, 2000.
- [17] Serpell LC. Alzheimers amyloid fibrils: structure and assembly. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1502(1):16–30, 2000.
- [18] Dahlgren KN. Manelli AM. Stine WB. Jr. Baker LK. Krafft GA. LaDu MJ. Oligomeric and fibrillar species of amyloid- β peptides differentially affect neuronal viability. *Journal of Biological Chemistry*, 277(32):46–53, 2002.
- [19] Kelly JW. The alternative conformations of amyloidogenic proteins and their multi-step assembly pathways. *Current Opinion in Structural Biology*, 8:101–6, 1998.
- [20] Dahlgren KN. Manelli AM. Stine WB. Jr. Baker LK. Krafft GA. LaDu MJ. Oligomeric and fibrillar species of amyloid- β peptides differentially affect neuronal viability. *Journal of Biological Chemistry*, 277(32):046–053, 2002.
- [21] Kaye R. Head E. Thompson JL. McIntire TM. Milton SC. Cotman CW. Glabe CG. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science*, 300:486–9, 2003.

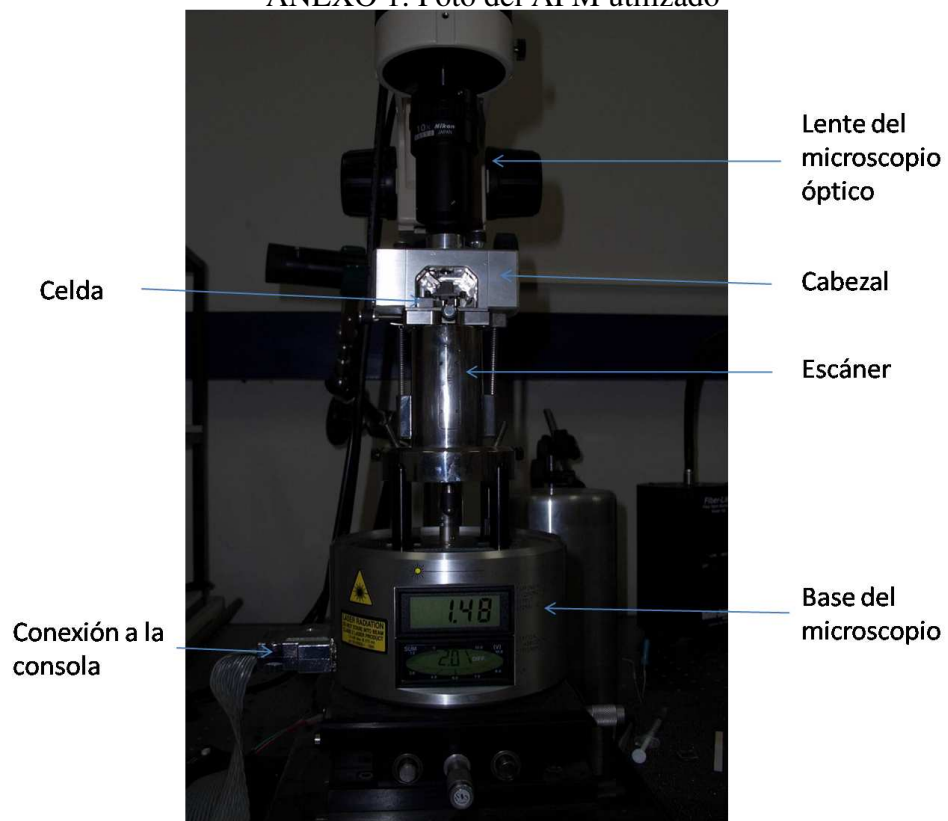
- [22] Pike C.J. Burdick D. Walencewicz AJ. Glabe CG. Cotman CW. Neurodegeneration induced by β -amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state. *Journal of Neuroscience*, 13(167687), 1993.
- [23] Chiti F. Dobson C.M. Protein misfolding, functional amyloid and human disease. *Annual Review of Biochemistry*, 75(333-366), 2006.
- [24] Mastrangelo IA. Ahmed M. Sato T. Liu W. Wang C. Hough P. Smith SO. High-resolution atomic force microscopy of soluble $a\beta_{1-42}$ oligomers. *Journal of Molecular Biology*, 358(1):106–119, abril 2006.
- [25] Pietrzik CU. Golde TE. Wiltfang J. Baumann K. Koo EH. Weggen S. Czirr E. Cottrell BA. Leuchtenberger S. Kukar T. Ladd TB. Esselmann H. Paul S. Schubanel R. Torpey JW. Independent generation of $a\beta_{1-42}$ and $a\beta_{1-38}$ peptide species by gamma-secretase. *Journal of Biological Chemistry*, abril, 21 2008. sin imprimir.
- [26] Pride M. Seubert P. Grundman M. Hagen M. Eldridge J. Black RS. Progress in the active immunotherapeutic approach to alzheimer's disease: clinical investigations into an1792-associated meningoencephalitis. *Neurodegenerative Diseases*, 5(3-4):194–196, marzo,6 2008.
- [27] Soto C. Sigurdsson EM. Morelli L. Kumar RA. Castaño EM. Frangione B. β -sheet breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis: Implications for alzheimers therapy. *Nature Medicine*, 4(7):822–826, 1998.
- [28] Fezoui Y. Hartley DM. Harper JD. Khurana R. Walsh DM. Condron MM. Selkoe DJ. Lansbury PT. Jr. Fink AL. Teplow DB. An improved method of preparing the amyloid β protein for fibrillogenesis and neurotoxicity experiments. *Amyloid*, 7(3):166–78, 2000.

- [29] Novascan. http://www.novascan.com/products/popups/probepopup_pt_gs_au.html. Technical report, Novascan,PT.GS.AU. with particle attached, mayo 2008.
- [30] *Atomic force microscopy for biologists*, chapter Basic Principles, page 332. Imperial College Press, Londres, 1^a ed. edition, 1999.
- [31] Hui X. Guo hua X. Yueet A. A novel colloid probe preparation method based on chemical etching technique. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 7(4):304–309, 2006.
- [32] Duschl C. Liley M. Corradin G. Vogel H. Biologically addressable monolayer structures formed by templates of sulfur-bearing molecules. *Biophysical Journal*, 67(3):1229–37, 1994.
- [33] Johnson KL. Kendall K. Roberts AD. Surface energy and the contact of elastic solids. *Proceedings of the Royal Society Series A*, 324:301–313, 1971.
- [34] Kellermayer M. Karsai Á. Benke M. Soós K. Penke B. Stepwise dynamics of epitaxially growing single amyloid fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(1):141–144, enero 8 2008.

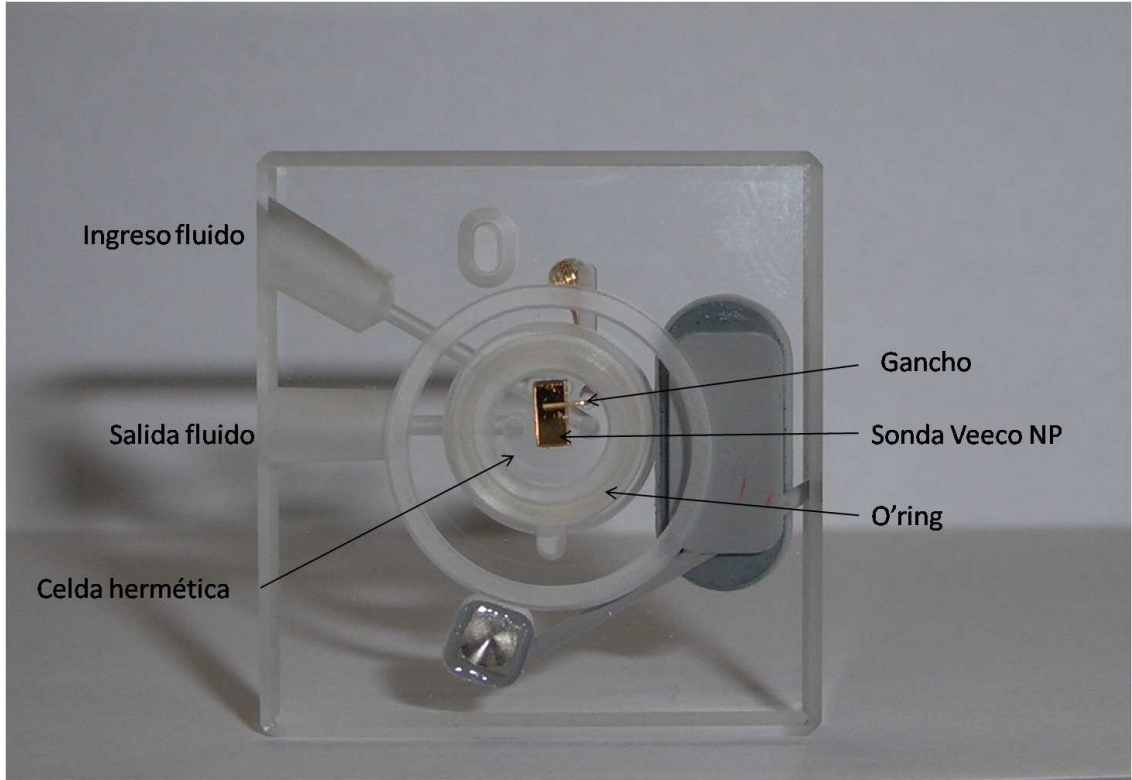
Capítulo 7

Anexos

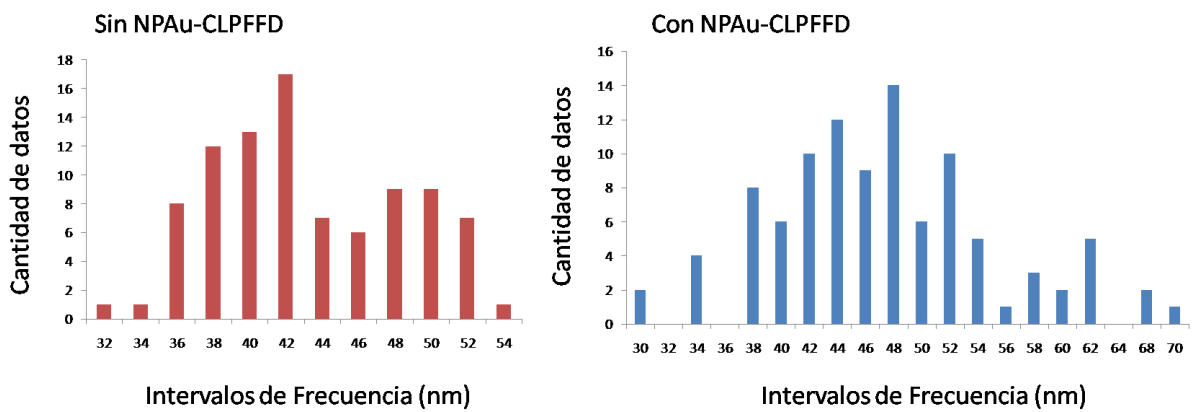
ANEXO 1: Foto del AFM utilizado



ANEXO 2: Foto de la celda de fluido utilizada



ANEXO 3: Histograma de diámetro en zonas altas de FAs con y sin NPAu-CLPFFD sobre mica-Mg⁺²



ANEXO 4: Histograma de altura en zonas altas de FAs con y sin NPAu-CLPFFD sobre mica-Mg⁺²

