



UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

**OBTENCIÓN DE CONJUGADOS PÉPTIDOS-NANOPARTÍCULAS METÁLICAS
PARA EL DESARROLLO DE UNA NUEVA ESTRATEGIA TERAPÉUTICA PARA LA
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

PATROCINANTE

Dr. Marcelo J. Kogan

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA

DIRECTOR DE MEMORIA

Dr. Marcelo J. Kogan

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA

Memoria para optar al Título de Químico Farmacéutico

ELÍAS DANIEL MEDINA CONSUEGRA

Santiago, Chile

2006

AGRADECIMIENTOS

A Grisel Medina, mi hermana y compañera de carrera, y a mis padres y hermanos, por su afecto y apoyo invaluable.

A Marcelo J. Kogan, mi profesor guía, por su gran espíritu de trabajo, colaboración, y ayuda incondicional.

A Jon Robertson y Shauna Robertson, por su invaluable amistad, por dar a mi vida un giro tan radical en muchos sentidos, y por proveer muchos de los medios que hicieron más fácil esta tarea.

A mis amigos Evelyn Mora, María Galdámez, Cristian Uribe, Alejandro Cortés, Miguel Morales, Jorge Poblete, Ivonne Olmedo, Gustavo Espinosa, Pablo Marambio, Cristian Lasaña, y tantos otros que de nombrarlos no tendría el espacio suficiente. ¡Gracias por esa chispa humana que hace de este mundo un lugar más hermoso!

A Guisela Muñoz y Benito Cataldo, que no sólo dan vida a nuestro laboratorio, sino que también hicieron posible cada palabra de esta tesis a través de su silenciosa y dedicada labor.

A todos y cada una de las personas pertenecientes al equipo del laboratorio de bioelectroquímica por la ayuda prestada, por los equipos facilitados y la sonrisa cálida que les caracteriza.

A Nancy Olea y a su equipo de trabajo, por su ayuda en la realización de micrográficas a través de microscopía electrónica de transmisión y por su excelente disposición.

A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile por financiar este trabajo a través del proyecto memorias 2005, y al proyecto Fondecyt 1061142.

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
Agradecimientos	ii
Tabla de contenidos	iii
Abreviaturas	v
Resumen	vi
Summary	vii
1. Introducción	1
1.1. Marco teórico	4
1.1.1. Síntesis, estabilidad y caracterización de AuNP	4
1.1.2. Síntesis y caracterización de péptidos	9
1.1.3. Conjugación de AuNP a péptidos y caracterización de los conjugados	13
1.1.4. Estabilidad de conjugados AuNP-Péptidos	14
1.1.5. Interacción del conjugado AuNP-INH con Aβ	15
1.2. Hipótesis	19
1.3. Objetivos	20
1.3.1. Objetivo general	20
1.3.2. Objetivos específicos	20
2. Materiales y métodos	21
2.1. Síntesis de AuNP	21
2.2. Síntesis de péptidos	22
2.3. Conjugación de AuNP a los péptidos	23
2.3.1. Centrifugación para la eliminación del péptido libre	23
2.3.2. Determinación de la cantidad de péptido libre posterior a la conjugación y diálisis (Ensayo de Ellman)	24
2.4. Caracterización de AuNP y sus conjugados	25
2.5. Estimación del grado de recubrimiento peptídico de AuNPt con INH, i1 e i2	26
2.6. Estabilidad	27

2.7. Interacción de los conjugados de AuNPt-INH, AuNPt-i1 y AuNPt-i2 con $A\beta_{1-42}$	27
3. Resultados y discusión	29
3.1. Caracterización AuNPt y AuNPc	29
3.2. Caracterización de los conjugados AuNP-Péptido obtenidos	32
3.3. Estabilidad	40
3.4. Interacción de AuNPt-Péptidos con $A\beta_{1-42}$	46
Conclusiones y proyecciones	47
Bibliografía	50

ABREVIATURAS

Aβ	: Proteína beta amiloide
Aβ₁₋₄₂	: Proteína beta amiloide de 42 residuos de aminoácido
AA	: Análisis de aminoácidos
AFM	: Microscopía de fuerza atómica
APP	: Proteína precursora del amiloide
AuNP	: Nanopartículas de oro
AuNPc	: Nanopartículas de oro de 5 nm sintetizadas a través del método descrito por Liu
AuNPt	: Nanopartículas de oro de 10 nm sintetizadas a través del método descrito por Turkevich
BHE	: Barrera hematoencefálica
CMO	: Campo magnético oscilante
DTNB	: 5,5'-ditiobis(2-ácido nitrobenzoico)
ESI-MS	: Electrospray
HPLC	: Cromatografía líquida de alta resolución
i1	: Péptido isómero CDLPFFDNH ₂
i2	: Péptido isómero CLPDDFNH ₂
INH	: Péptido CLPFFDNH ₂
MALDI-TOF	: Ionización por desorción láser matriz asistida con analizador de tiempo de vuelo
NPM	: Nanopartícula metálica
PBS	: Amortiguador fosfato
SPPS	: Síntesis de péptidos en fase sólida
TEM	: Microscopía electrónica de transmisión
XPS	: Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X

RESUMEN

El desafío que plantea el tratamiento de patologías producidas por el plegamiento incorrecto y la agregación de proteínas que dan origen a especies tóxicas, ha llevado a nuestro grupo de investigación al desarrollo de una nueva estrategia terapéutica basada en el empleo de nuevos nanobiomateriales. Nanopartículas de oro (AuNP) conjugadas a péptidos con afinidad por los agregados proteicos tóxicos que desencadenan estas enfermedades, podrían ser dirigidas específicamente a éstos y efectuar localmente una suerte de “cirugía molecular” al ceder la energía que se les puede entregar a través de campos magnéticos oscilantes, convirtiéndolos de esta manera en especies menos tóxicas. Así, esta tesis se enmarca dentro de la primera etapa de este proyecto y pretende obtener conjugados AuNP-Péptidos estables y capaces de unirse selectivamente a los agregados tóxicos de la proteína β -amiloide ($A\beta$) involucrada en la enfermedad de Alzheimer.

En consecuencia, se sintetizaron AuNP a través de la reducción de ácido tetracloroáurico ($HAuCl_4$) con citrato de sodio dihidratado en presencia y ausencia de β -ciclodextrinas, se conjugaron al péptido CLPFFDNH₂ (INH), péptido modificado a partir del péptido disruptor de láminas β LPFFDNH₂ que posee afinidad por los agregados tóxicos de $A\beta$, y a dos de los isómeros de INH para evaluar si el grado de interacción con los agregados de $A\beta$ es secuencia dependiente. Finalmente, se evaluó la estabilidad de los conjugados obtenidos en diferentes condiciones de pH, temperatura, y fuerza iónica, teniendo en cuenta realidades cercanas a las fisiológicas. Se obtuvieron AuNP con tamaños promedio de 6 y 10 nm, y conjugados AuNP-Péptido que mostraron afinidad por $A\beta$ y ser estables a pHs que se aproximan a los fisiológicos y concentraciones cercanas a 100 mM de NaCl, lo que traza un camino prometedor hacia el desarrollo de esta nueva estrategia terapéutica para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades conformacionales.

SUMMARY

Obtainment of peptides-metallic nanoparticles conjugates toward a new therapeutic strategy development for Alzheimer's disease.

The challenge depicted by the treatment of pathologies resulting from the protein misfolding and aggregation that brings forth toxic species, has lead our researching group to the development of a new therapeutic strategy based on the manipulation of new nanobiomaterials. Gold nanoparticles (AuNP) coated with peptides of high affinity for toxic protein deposits that triggers this diseases, could be targeted specifically to them and give rise to a sort of local “molecular surgery” when delivering of energy taken from an applied oscillating magnetic fields occurs through them, turning the deposits in a less toxic species. Thus, this thesis is framed as the first stage of this project and pursues to obtain stable AuNP-Peptides conjugates able to selectively attach to the toxic deposits of the amyloid β protein ($A\beta$) involved in Alzheimer's disease.

In consequence, AuNP were synthesized through tetrachloroauric acid ($HAuCl_4$) reduction performed with dihydrated sodium citrate in presence and absence of β -cyclodextrins, then conjugated to the peptide CLPFFDNH₂ (INH), peptide resulting from the modification of the high affinity $A\beta$ deposits β -sheet breaker peptide LPFFDNH₂, and two INH isomeric peptides to evaluate if the interaction level with $A\beta$ deposits is sequence subjected. Finally, AuNP-Peptide stability were evaluated under several pH, temperature, and ionic force conditions, considering parameters closer to physiological frames. AuNP of 6 and 10 nm size and conjugates of AuNP-Peptides that showed $A\beta$ deposits affinity were obtained, exhibiting stability under pH conditions around the physiological and NaCl concentrations closer to 100 mM, which trace a promising road toward the development of a new therapeutic strategy for the treatment of Alzheimer's disease and related conformational diseases.

1. INTRODUCCIÓN

Un número considerable de enfermedades, entre las que se incluyen la enfermedad de Alzheimer (1), la enfermedad de Huntington (2), la enfermedad de Creutzfeld-Jacob y otras patologías priónicas (3), la amiloidosis (4), la diabetes de tipo II (5) y la enfermedad de Parkinson (6), han mostrado un patrón molecular común que ha llevado a proponer al plegamiento incorrecto de proteínas en forma de conformaciones tóxicas como la causa de estas patologías recientemente denominadas enfermedades conformacionales (EC) (7), siendo la característica común más relevante la conversión de proteínas solubles en estructuras cuaternarias insolubles con abundante contenido de hojas β (8).

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un desorden cerebral de carácter degenerativo para el cual aún no hay cura o tratamiento efectivo. Análisis histopatológicos de tejido cerebral se caracterizan por alteraciones que involucran a $A\beta$ y a la proteína Tau (9) siendo un factor clave, en la pérdida de la integridad sináptica y de las células neuronales (10), la presencia de placas amiloides (11) compuestas por depósitos de $A\beta$ y componentes de la matriz extracelular (12). Aún cuando $A\beta$ se encuentra fisiológicamente en el cerebro (13), en condiciones patológicas se autoagrega formando diferentes especies anómalas que incluyen desde pequeños oligómeros hasta fibras (14-15) que finalmente derivan en los depósitos tóxicos ya mencionados (figura 1).

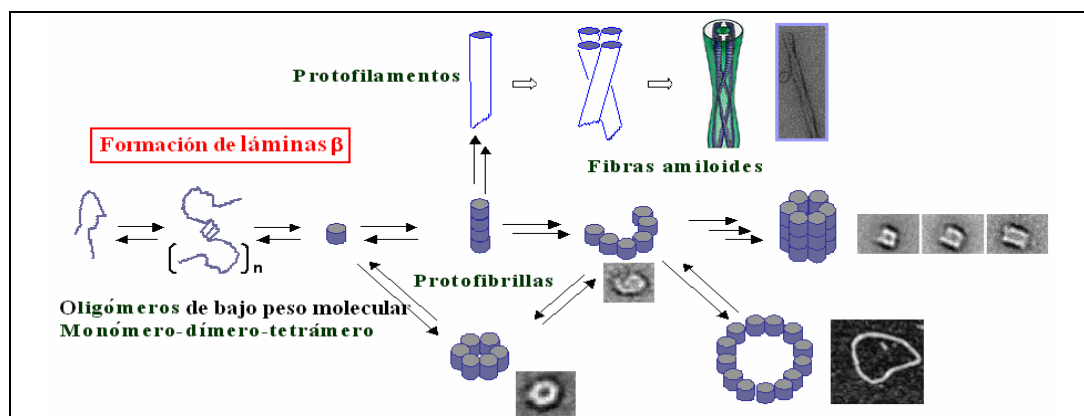


Figura 1: Esquema teórico de la formación de las diferentes especies tóxicas a partir de monómeros de $A\beta$.

Se ha sugerido que el efecto tóxico de las fibras amiloides se produce por un notable incremento en la interacción de A β con proteínas neuronales de membrana incluyendo la propia proteína precursora amiloide (APP) (16) y que especies solubles de A β , como oligómeros y protofibrillas, son potencialmente neurotóxicos y podrían ser responsables de la pérdida neuronal y muerte en la EA (14). Cabe señalar que el proceso parece ser dinámico, ya que estudios recientes apuntan a la formación de fibras amiloides como un proceso reversible (17).

A la luz de estas consideraciones, es posible distinguir al menos cinco formas de evitar el efecto tóxico de los depósitos de A β : 1) Reducción de la expresión genética de APP, 2) Inhibición y/o disrupción de las enzimas involucradas en el procesamiento de APP, 3) Aceleración de la depuración fisiológica de las placas amiloides o del A β soluble, 4) Prevención de la neurotoxicidad de A β , y 5) Disrupción o inhibición del plegamiento y agregación de A β . Cada estrategia representa un campo poco explorado y con efectos colaterales desconocidos o poco controlables, sin embargo, es evidente que la intervención en el grado de agregación proteica representa una diana terapéutica sumamente atractiva para esta y otras EC, siendo la directriz a través de la cual se conduce este trabajo. En este último respecto, a través del empleo de nanopartículas metálicas (NPM), la nanotecnología aparece como una alternativa original e innovadora para manipular el grado de agregación de A β . La explosión reciente de estudios que involucran NPM como inhibidores enzimáticos (18), agentes ADN-enlazantes (19-21) y vectores de transfección (22-24), muestran la gran variedad de aplicaciones biológicas que éstas pueden tener. Al mismo tiempo, las NPM son especies que ante la aplicación de campos magnéticos oscilantes (CMO) absorben energía pudiendo disiparla localmente en forma de calor por lo que se han utilizado para el tratamiento regional de ciertos tumores (25-27). Recientemente en nuestro laboratorio, se observó que es posible desagregar especies tóxicas de A β y transformarlas en especies de bajo peso molecular mediante el uso de nanopartículas de oro (AuNP) y CMO (28), por otra parte, a pesar de que las AuNP requieren mayores frecuencias (GHz) que nanopartículas magnéticas como Co y Fe (KHz) para ser calentadas, las ventajas que atañen a la simpleza de su síntesis, su baja toxicidad, su elevada estabilidad en medios acuosos, su tamaño, y la facilidad para conjugarse a través de enlaces tiólicos a péptidos (con residuos de cisteína) que pudieran servirles como lanzadera hacia dianas específicas, hacen de estos coloides herramientas sumamente atractivas para la aplicación en biomedicina.

Introducción

Por otro lado, debido a que la región 17-20 (¹⁷LVFF²⁰) de A β (figura 2) actúa como el núcleo hidrofóbico a partir del cual se produce la autoagregación, esta zona se ha convertido en un punto clave para el diseño de moléculas peptídicas con la capacidad de inhibir la agregación de A β (29). Entre estas moléculas se encuentran algunos péptidos (30) que, debido a su eficacia *in vivo*, ya se encuentran en una fase avanzada de investigación clínica.



Figura 2: Secuencia de A β . En rojo se representan los aminoácidos hidrofóbicos que forman parte del núcleo hidrofóbico de agregación. En el inserto, se muestra la secuencia de uno de los péptidos con afinidad por los agregados tóxicos de A β . En azul se destacan los aminoácidos modificados en la secuencia basada en el fragmento 17-20 de A β .

De entre los péptidos que se han diseñado (tema que se abordará en detalle en la sección 1.1.5), el péptido LPFFDNH₂ (figura 2) reveló la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) en estudios llevados a cabo *in vivo*, además de poseer un reducido tamaño y una elevada afinidad y selectividad por los agregados de A β (30) al conservar los aminoácidos claves para el reconocimiento y anclaje de este péptido a esta diana (L y F) e incorporar prolina, que debido a su particular estructura química le confiere la capacidad de actuar como un potente agente disruptor de láminas β (30) evitando no sólo la agregación de A β , sino también la posible autoagregación del péptido en sí. Estas propiedades convierten al péptido LPFFDNH₂ en una alternativa atractiva como lanzadera de las AuNP, ya que permitiría el desarrollo de conjugados AuNP-Péptido con la capacidad de atravesar barreras biológicas, alcanzar específicamente la diana terapéutica, desagregar los depósitos tóxicos de A β al disipar la energía que se les puede entregar a través de CMO, y finalmente impedir la formación de nuevos agregados, realizando así una suerte de “cirugía molecular” con precisión nanométrica (figura 3).

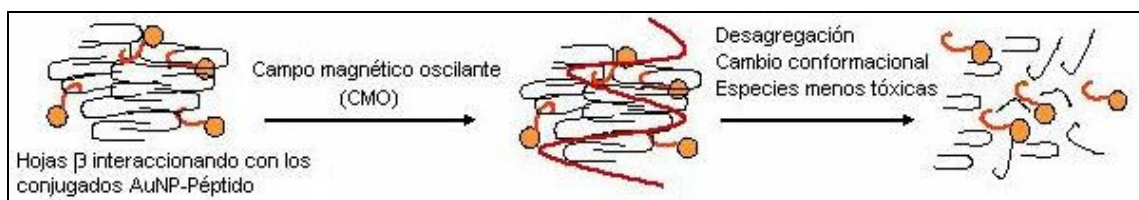


Figura 3. Representación gráfica de lo que podría denominarse una “Cirugía molecular”.

Debido a lo anteriormente expuesto, surge la idea de obtener conjugados AuNP-Péptido para el desarrollo de una nueva estrategia terapéutica para la enfermedad de Alzheimer y evaluar si estos conjugados presentan afinidad por los agregados de A β además de ser estables en medios acuosos. Por lo tanto, se diseñó un esquema experimental de trabajo sistemático y ordenado fundamentado en las siguientes etapas, las cuales serán abordadas una a una en lo que sigue de esta sección:

1. Síntesis, evaluación de la estabilidad, y caracterización de AuNP
2. Síntesis y caracterización de péptidos
3. Conjugación de AuNP a péptidos y caracterización de los conjugados
4. Evaluación de la estabilidad de los conjugados
5. Evaluación de la interacción AuNP-Péptidos con fibras de A β

1.1. Marco teórico

1.1.1. Síntesis, estabilidad y caracterización de AuNP

Síntesis de AuNP de 5 y 10 nm: Las dispersiones coloidales (coloides) corresponden a sistemas compuestos por partículas de materia (fase dispersa) con tamaños comprendidos entre 1,0 nm y 500 nm distribuidas en un medio continuo (fase dispersante), en los que el tamaño ha mostrado una clara relación con el color de la dispersión coloidal si se trata de coloides metálicos (31). Las AuNP son dispersiones coloidales de carácter liofóbico, es decir, presentan afinidad prácticamente nula por la fase dispersante, y sólo pueden obtenerse a través de metodologías de síntesis que pueden agruparse en dos categorías: (a) Métodos de dispersión, en los cuales partículas de tamaños superiores a los coloidales son reducidas de tamaño, y (b) Métodos de condensación, en los que partículas de tamaños subcoloidales son inducidas a la agregación hasta alcanzar tamaños coloidales.

Las aplicaciones biomédicas que las AuNP puedan tener dependen en gran medida del tamaño de éstas, ya que si se considera que la rapidez de penetración de una sustancia a través

de la BHE u otras barreras biológicas está relacionada de forma inversa con el tamaño molecular (32), que el diámetro promedio de las fibras amiloides es de alrededor de 10 nm (15), y que la eliminación final de los conjugados podría darse a nivel renal, el tamaño de éstas se convierte en un factor crítico (figura 4).

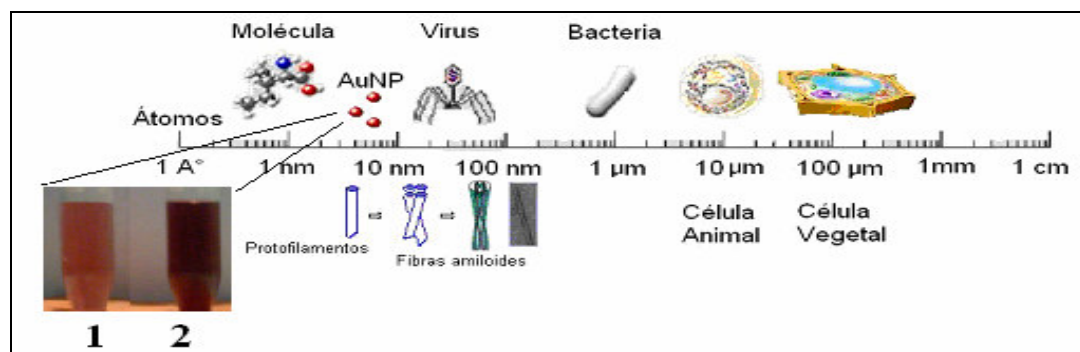


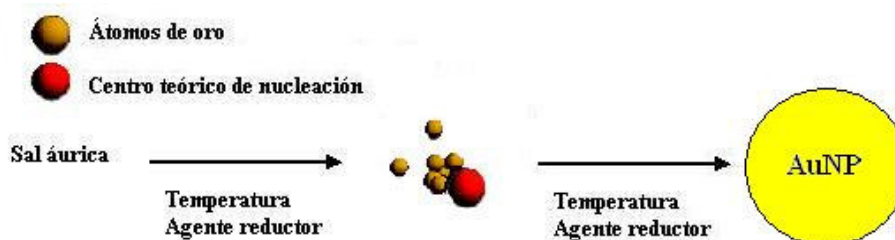
Figura 4. Esquema comparativo del tamaño de AuNP de 10 nm sintetizadas sin β -ciclodextrinas (1) y de 5 nm sintetizadas con β -ciclodextrinas (2) respecto de átomos, moléculas, agregados de A β , células, virus, y bacterias.

Partículas de tamaños inferiores a 10 nm han mostrado difundir rápidamente a través de espacios intercelulares (33, 34) y, por otra parte, AuNP de 6,6 nm conjugadas a albúmina han mostrado tener la capacidad de atravesar la BHE (35), haciendo así interesante la obtención de partículas del orden de los tamaños antes mencionados.

Así, limitados al marco de estudio de esta tesis, nos hemos aventurado en la síntesis de partículas de aproximadamente 5 y 10 nm empleando dos métodos de condensación:

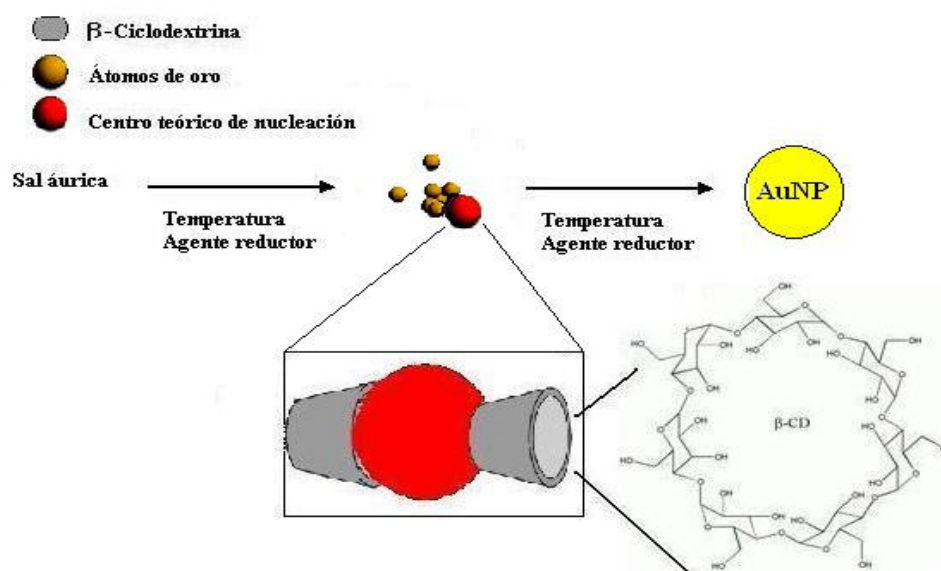
1. El método descrito por Turkevich y cols. (36). Este método permite obtener tamaños de AuNP de diámetros del orden de los 10 nm o superiores usando citrato de sodio dihidratado (agente reductor suave) y temperatura, además de permitir el control de tamaños de partícula variando la relación [Citrato/HAuCl₄] (37). Como puede observarse en el esquema 1, teóricamente se formaría un centro de nucleación constituido por átomos de oro en torno al cual se adsorberían capas sucesivas de átomos de oro hasta alcanzar el tamaño permitido por el método. Las AuNP sintetizadas a través de este método serán llamadas AuNPt de aquí en adelante.

Esquema 1.



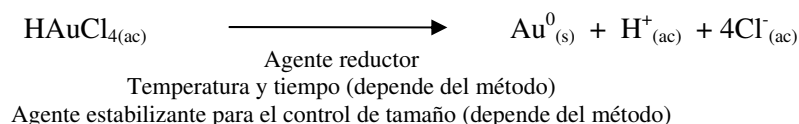
2. El método descrito por Liu y cols. (38). Este método permite alcanzar tamaños de aproximadamente 5 nm al incluir β -ciclodextrinas como agentes estabilizantes. Como se observa en el esquema 2, teóricamente, se formaría un centro de nucleación con ciclodextrinas adsorbidas que harían más difícil la interacción entre el centro de nucleación y los átomos de oro alcanzándose tamaños de AuNP menores al estabilizarse el sistema. Se cree que la estabilidad de las AuNP obtenidas estaría dada por interacciones hidrofóbicas entre las β -ciclodextrinas y éstas, haciendo más difícil la agregación de AuNP sintetizadas a través de este método, sin embargo, el mecanismo a través del cual se logra la reducción del tamaño de AuNP aún permanece en incógnita (38). Las partículas sintetizadas por este método serán llamadas AuNPc de aquí en adelante.

Esquema 2.



Para la síntesis de AuNP existen diferentes métodos químicos y físicos (37) entre los que podemos destacar métodos químicos como la reducción del HAuCl_4 con diferentes agentes reductores como NaBH_4 y estabilizantes de carácter tiólico, y métodos físicos como la ablación láser, radiolisis, etc. En este trabajo se escogieron dos métodos de carácter químico basados en la reducción de una sal de oro en medio acuoso (según los protocolos mencionados al comienzo de este apartado) debido a su simpleza, reproducibilidad, accesibilidad, limpieza en cuanto a sustancias de síntesis potencialmente tóxicas, homogeneidad en el tamaño alcanzado y en especial, por estar diseñados para medios acuosos, lo que es favorable para la conjugación subsiguiente a péptidos.

Ahora bien, en términos de una ecuación química general, los métodos químicos de condensación de partículas que permiten la síntesis de AuNP a través del uso de un agente reductor (en este caso a través del empleo de citrato de sodio dihidratado) estarían definidos en función de la siguiente relación general:



Schmid y cols concluyen en sus experimentos que las AuNPt crecerían a partir de un átomo de oro que comenzaría a revestirse de otros átomos de acuerdo a la relación $10n^2 + 2$ (37), en donde n correspondería al número de revestimientos o capas. Así, el conjunto áurico más pequeño contendría 13 átomos (el átomo central más los 12 átomos de la primera capa), el siguiente 55 y así sucesivamente para finalmente dar lugar al tamaño de AuNP que el método empleado permita (figura 4).

Estabilidad de AuNP: Al ser coloides liofóbicos, las AuNP son termodinámicamente inestables por lo que la capacidad para conservar sus propiedades fisicoquímicas a lo largo del tiempo depende estrictamente de la distancia entre las partículas dispersas en el medio acuoso, siendo factores clave para la estabilidad de estos sistemas, la magnitud de la carga y del movimiento browniano, lográndose por tanto un incremento de la estabilidad al proveer de carga a la partícula o de un solvente protector que impida la colisión entre ellas producto del

movimiento browniano. Debido al reducido tamaño de las AuNP, algunos de los electrones de sus átomos de superficie pasan al medio confiriéndole una carga superficial de partícula levemente positiva (potencial de Nernst) que provoca la adsorción de aniones provenientes del medio en una monocapa inmediatamente contigua a la superficie de la partícula que terminan por conferirle una carga final levemente negativa (potencial zeta negativo) (31, 39). En consecuencia, las AuNP presentan un potencial zeta negativo y muy cercano a cero lo que sugiere que las AuNP requieren de una carga muy pequeña para estabilizarse (31). Estas observaciones llevaron a Derjaguin, Landau, Verwey y Overbeek a explicar la estabilidad de los sistemas coloidales liofóbicos a través de lo que hoy se conoce como la teoría DLVO (31). De acuerdo a esta teoría, las fuerzas entre las partículas de una dispersión liofóbica estarían dadas por repulsiones electrostáticas y atracciones de van der Waals que resultarían en energías potenciales de repulsión y atracción, existiendo un gran potencial de atracción cerca del origen de la partícula y una barrera de repulsión a distancias moderadas que, superada, daría lugar a la agregación de las partículas (31). En otras palabras, las AuNP no se alejarían ni acercarían excesivamente debido a las fuerzas de atracción y repulsión que existen entre ellas, encontrándose proclives a la precipitación de superarse esta última barrera. Nótese entonces que el pequeño potencial negativo (potencial zeta) en las AuNPt y AuNPc es producido por la adsorción del citrato presente en el medio a la superficie de las partículas, permitiendo la estabilización de las AuNP a través del equilibrio producido entre las fuerzas de repulsión y atracción en estos sistemas.

Por otra parte, cuando las AuNP alcanzan un tamaño del orden de la longitud de onda de “de Broglie” correspondiente a los electrones de valencia de los átomos de su superficie, se produce una oscilación colectiva de estos electrones (efecto plasmón) que da lugar a un máximo de absorción al UV-Visible de aproximadamente 530 nm si los diámetros de partícula se encuentran entre 5 y 20 nm (37), y de aproximadamente 520 nm, si las partículas miden alrededor de 10 nm. Al ojo desnudo, las AuNP son de un color rojizo que se torna violeta si éstas se agregan, lo que además se traduce en el desplazamiento del lambda máximo de absorción hacia valores mayores, fenómeno que se ha atribuido al acoplamiento del plasmón entre las partículas. Así, se ha observado una relación directa entre la agregación de las AuNP y el desplazamiento del lambda máximo de absorción, lo que hace posible evaluar la estabilidad relativa del coloide a través de espectroscopía UV-Visible (39).

Caracterización de AuNP: Entre las técnicas más comúnmente reportadas para caracterizar AuNP (37), y que sirvieron para caracterizar las nanopartículas obtenidas en nuestro laboratorio, se encuentran técnicas como a) Microscopía electrónica de transmisión (TEM), que brinda información acerca del tamaño y la forma de las nanopartículas al irradiar la muestra con un haz de electrones que permite obtener una imagen producto del contraste entre los electrones absorbidos, retenidos o dispersados por la muestra, y los que no interaccionan con la muestra e impactan sobre una pantalla fluorescente, b) Espectrofotometría UV-Visible que, comparando la radiación luminosa absorbida o transmitida por una solución respecto de un blanco, permite obtener información acerca de la concentración (absorbancia en el pico de máxima absorción), tamaño (posición del pico) y homogeneidad de tamaños (ancho del pico) de la muestra si se analiza la información obtenida en conjunto con otras técnicas, c) Microscopía de fuerza atómica (AFM), que proporciona imágenes topográficas detalladas de la superficie analizada mediante el barrido de una punta sobre ella.

1.1.2. Síntesis y caracterización de péptidos

Síntesis de péptidos: Desde 1950 la síntesis de péptidos de secuencia definida se ha venido desarrollando progresivamente, siendo común el uso de la síntesis lineal de péptidos en fase sólida (SPPS) a partir de 1963 debido al elevado rendimiento y pureza alcanzada a través de esta metodología (40). En la SPPS, el péptido es sintetizado sobre un soporte polimérico mediante la adición sucesiva de aminoácidos requiriendo del empleo de grupos temporalmente protectores de funciones α -amino, α -carboxilo, y cadenas laterales, para dar lugar a una secuencia definida (figura 5). De no emplearse estas funciones, productos de síntesis secundarios serían obtenidos junto al péptido disminuyendo la pureza del mismo. De esta manera, la adición del primer aminoácido a la resina se realiza por su extremo C-terminal dando lugar a un crecimiento peptídico a través del extremo N-terminal de los péptidos (41) (figura 5).

De cara al logro de una secuencia peptídica definida, los grupos protectores son imperiosamente necesarios por lo que su elección se hace de acuerdo a a) La facilidad que tengan para introducirse en la molécula, b) La capacidad de proteger al grupo funcional en las condiciones de formación de la amida y c) La capacidad de eliminarse eficazmente en

condiciones que no afecten al nuevo enlace peptídico formado. Así, supeditado al grupo empleado para la protección temporal de la función α -amino y α -carboxilo, existen dos métodos para la obtención de péptidos por SPPS, a saber, Boc/Bzl y Fmoc/tBu (41).

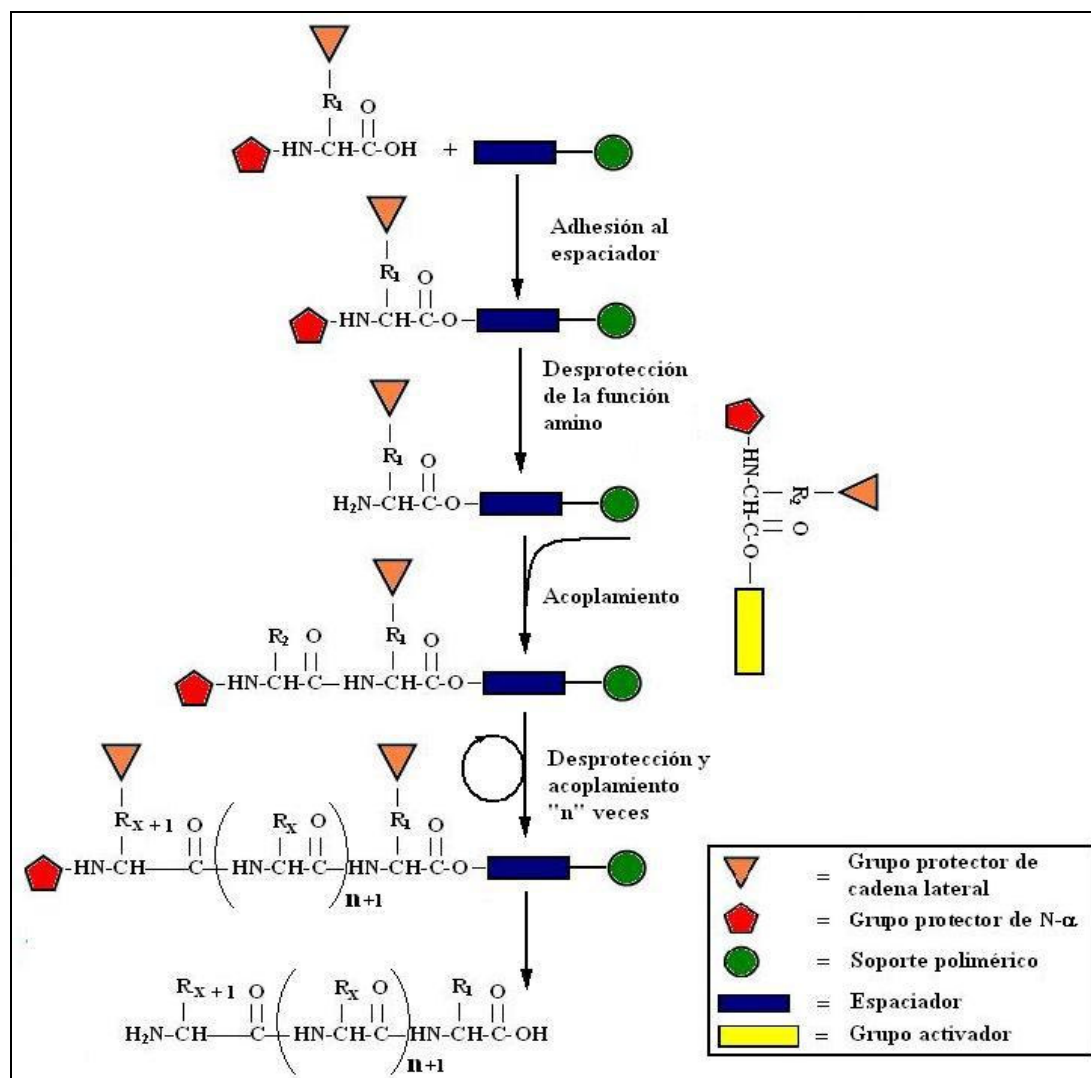


Figura 5. Esquema general de síntesis de péptidos en fase sólida

Como se observa en el esquema general de síntesis de la figura 5, ésta se realiza ubicando un espaciador sobre un soporte de resina para luego colocar el primer aminoácido. Uno a uno, los aminoácidos son añadidos en forma secuencial desprotegiendo selectivamente los grupos aminoterminales con piperidina en dimetilformamida sin afectar a los grupos protectores de las

cadena laterales (que se desprotegen en medio ácido), para luego acoplar el aminoácido subsiguiente mediante la activación con agentes acoplantes hasta obtener la secuencia deseada. De este modo, el péptido INH y sus isómeros respectivos fueron sintetizados mediante SPPS a través del método de protección Fmoc/tBu, que emplea el grupo lábil en medio básico 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) y el grupo lábil en medio ácido terc-butilo (tBu), los cuales son removidos con piperidina y ácido trifluoracético respectivamente. Una vez obtenido el péptido, se procede a escindirlo de la resina y a remover los grupos protectores ácido sensibles (como el tBu) en presencia de ácido trifluoracético.

Caracterización de péptidos: Para la caracterización de los péptidos se utilizan principalmente las siguientes técnicas: Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), Ionización por desorción láser matriz asistida con analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF), Electro spray (ESI-MS) y análisis de aminoácidos (AA).

La HPLC es útil para establecer la pureza del crudo obtenido después de la síntesis, e incluso, esta técnica en forma preparativa puede utilizarse para la purificación de los péptidos.

La espectrometría de masas MALDI-TOF y la ESI-MS son técnicas utilizadas para el análisis de muestras biológicas (como péptidos y proteínas) generalmente polares y no volátiles, y permiten obtener las “masas completas de los compuestos analizados”. En MALDI-TOF, la muestra se mezcla con la matriz en exceso sobre una superficie metálica de tal forma que ambas co-cristalizan cuando se evapora el solvente. Esta preparación es sometida a pulsos cortos de láser en alto vacío, lo que provoca que la absorción de energía por parte de la matriz sea convertida en energía de excitación y en transferencia de H^+ a la muestra (ionización) dando normalmente lugar a especies monocargadas. Así, las pocas micras de área irradiada se calientan dando lugar a la desorción de los iones de fase sólida a fase gaseosa (figura 6). El TOF es el analizador que más comúnmente se asocia con experimentos de MALDI, determinando la masa en una región de alto vacío mediante la medición precisa del período de tiempo transcurrido desde la aceleración de los iones en la fuente, hasta que impactan con el detector. La velocidad de migración de las especies cargadas formadas en la fuente de ionización depende de la relación m/z (masa/carga) de las mencionadas especies.

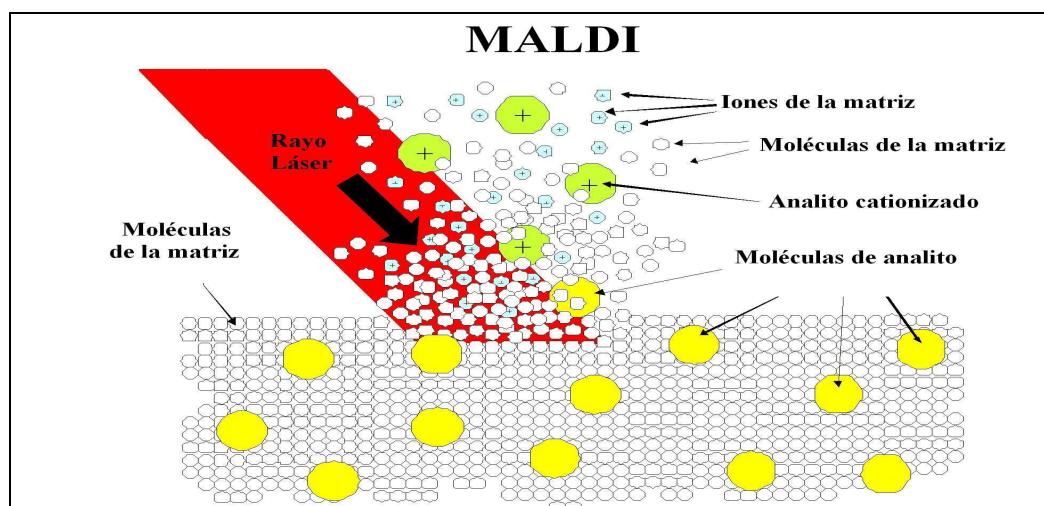


Figura 6. Representación esquemática de MALDI. El rayo láser impacta la muestra que, una vez desorbida, se hace pasar por un analizador de tiempo de vuelo (TOF).

ESI-MS en cambio, emplea la muestra en solución haciéndola pasar a través de un capilar al que se aplica un alto potencial eléctrico. A la salida del capilar la solución se dispersa en forma de spray dando lugar a pequeñas gotas cargadas las cuales se evaporan rápidamente, bien por un proceso de desorción del campo eléctrico o de evaporación del solvente, liberando moléculas (péptidos en este caso) protonadas a la fase gaseosa (figura 7) para luego ser separadas en un analizador cuadrupolar. Los iones generados pueden estar protonados de forma múltiple, por lo que dan lugar a diferentes especies para una misma molécula. En el caso de péptidos y proteínas, el extremo N-terminal y los residuos de histidina, arginina y lisina, son los candidatos susceptibles a protonarse.

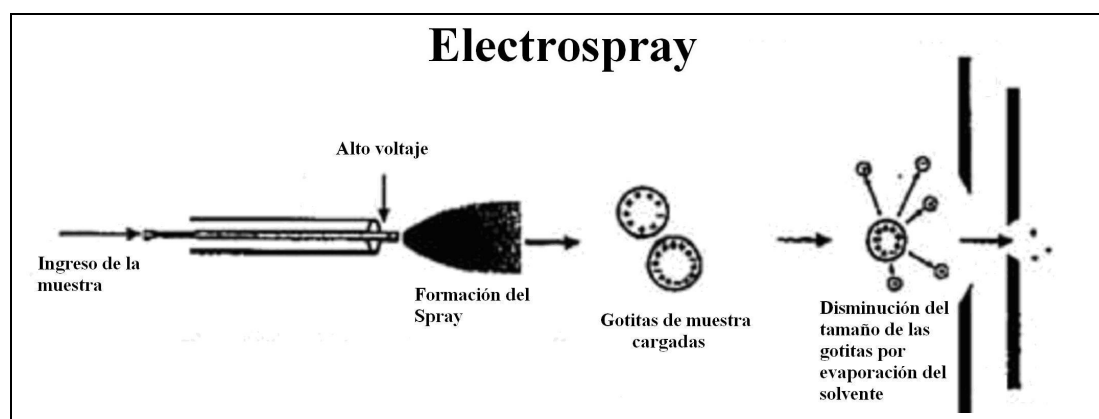


Figura 7. Representación esquemática de ESI-MS.

Por último, el AA se utiliza para establecer la composición y cantidad de aminoácidos del péptido en cuestión. Es importante mencionar que los péptidos son especies muy higroscópicas que pueden venir acompañadas de sales producto del proceso de síntesis, por lo cual es necesario realizar un AA que permita cuantificarlos. Para el AA, es necesario realizar una hidrólisis ácida en presencia de ácido clorhídrico 6N que permite romper los enlaces de la estructura primaria del péptido, para luego derivatizar los aminoácidos obtenidos empleando el reactivo 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato y analizar por HPLC el contenido de aminoácidos de la muestra, estableciendo así la composición y cantidad de éstos.

1.1.3. Conjugación de AuNP a péptidos y caracterización de los conjugados

Conjugación de AuNP a péptidos: Las características que presentan separadamente las AuNP y los péptidos disruptores de láminas β como LPFFDNH₂ podrían fusionarse a través de la conjugación de ambas sustancias permitiendo obtener un conjugado selectivo, estable, y con la capacidad de absorber y ceder la energía proveniente de un CMO a nivel local, donde la capacidad de absorber y ceder energía localmente estaría dada por las AuNP, la selectividad por A β estaría dada por el péptido LPFFDNH₂, y la estabilidad, por el aumento del potencial zeta negativo en la AuNP. La estrategia utilizada para la conjugación de los péptidos a las AuNP se basa en la interacción que presenta el grupo tiol, presente en la cisteína de la posición N-terminal, con el oro. Es sabido que los grupos tiólicos y el oro reaccionan espontáneamente para formar un enlace de carácter covalente (42, 43), por lo que basados en este conocimiento, el proceso de conjugación AuNP-Péptidos se llevó a cabo modificando el péptido LPFFDNH₂ mediante la adición de una cisteína en la posición N-terminal (CLPFFDNH₂), debido a que la presencia del grupo tiólico en la cadena lateral de este aminoácido (42) permite la interacción entre este grupo y las AuNP. Finalmente, la purificación de los conjugados se puede realizar a través de una diálisis, o centrifugación y posterior eliminación del sobrenadante, siendo necesario evaluar la presencia de péptidos libres en el coloide resultante por medio del ensayo de Ellman ya que este ensayo permite la detección de tioles libres en solución, o en otras palabras, la cantidad de péptido no unido a AuNP en la solución coloidal.

Caracterización de los conjugados entre AuNP y péptidos: Desde el punto de vista metodológico, la caracterización de conjugados AuNP-Péptido representa un desafío por no existir protocolos bien establecidos para la realización de esta tarea, motivo por el que se puso a punto protocolos utilizados en las áreas de bioquímica, síntesis de péptidos, y síntesis de AuNP paralelamente. Es así que, a través de TEM y AFM se estudió la morfología de los conjugados y a través de espectrofotometría UV-Visible se determinó la homogeneidad de los tamaños, evaluando el grado de agregación que pudiera darse en las muestras por uno u otro motivo. A través de la electroforesis en gel de agarosa (15, 44), se pudo determinar la unión de AuNP a péptidos observando el cambio de movilidad electroforética producido por la carga negativa que el péptido le confiere al conjugado una vez que recubre a la partícula. Finalmente, se empleó la técnica de espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS) para evidenciar la unión azufre-oro.

1.1.4. Estabilidad de conjugados AuNP-Péptido

La carga negativa que se observa en el grupo carboxílico presente en el aspártico a pHs cercanos al fisiológico puede perfectamente incrementar el potencial zeta negativo de las AuNP, y en consecuencia la estabilidad, al conjugar el péptido modificado CLPFFDNH₂ (INH) a éstas. Cabe mencionar que a pHs ácidos la carga del aspártico no sólo se anula, sino que además es esperable la aparición de una carga positiva en el grupo amino terminal de la cisteína (figura 8).

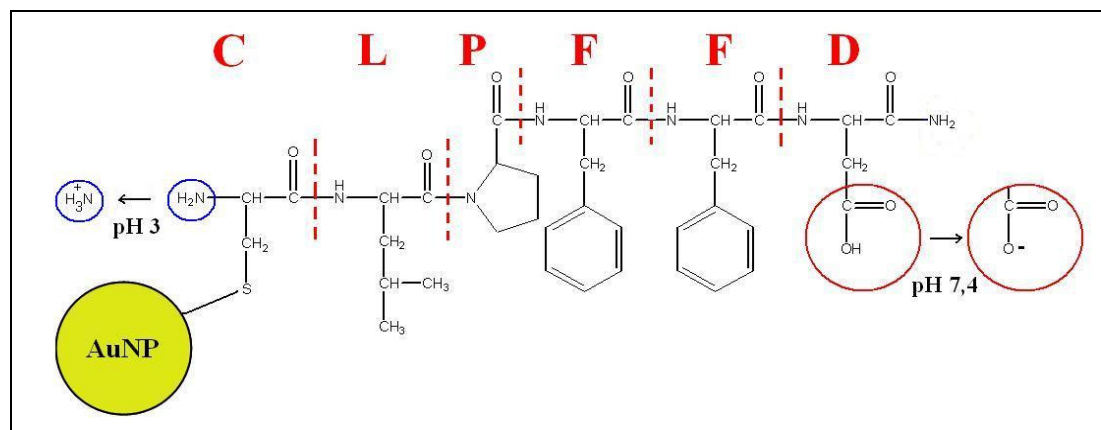


Figura 8. Representación de una AuNP conjugada a INH y las cargas esperadas a pH ácido y básico. Los círculos rojo y azul representan el lugar donde se espera la aparición de la carga negativa y positiva respectivamente.

La estabilidad que los conjugados presenten en condiciones fisiológicas determinará en gran medida el avance o retroceso que se logre en el desarrollo de esta nueva estrategia terapéutica. Por este motivo, se evaluó la estabilidad de los conjugados mediante espectrofotometría UV-Visible (técnica fundamentada en la absorción característica del plasmón como se explicó anteriormente) a pHs que se aproximan a los fisiológicos y concentraciones de NaCl cercanas a los 100 mM además de evaluar la estabilidad a -20 °C con el objeto de analizar el impacto de este parámetro en el almacenamiento del potencial fármaco.

1.1.5. Interacción del conjugado AuNP-INH con Aβ

Interacción de LPFFDNH₂ con Aβ: Aβ es una proteína soluble constituida por 39 a 42 aminoácidos que puede encontrarse habitualmente en la sangre y fluido cerebrospinal por ser fisiológicamente producida en la mayoría de las células de los diferentes tejidos (30). Ésta, deriva del procesamiento de una proteína transmembranal constitutiva denominada proteína precursora del amiloide (APP) y cuyo gen se encuentra ubicado en el cromosoma 21 (45). Aβ comienza su dominio en la superficie externa de la membrana celular y termina en el interior de ella (figura 9), siendo secuencialmente fragmentada desde APP por una β-secretasa en el extremo N-terminal y por una γ-secretasa en el extremo C-terminal ocurriendo así el desprendimiento fisiológico de APP (30) como se observa en la figura 9.

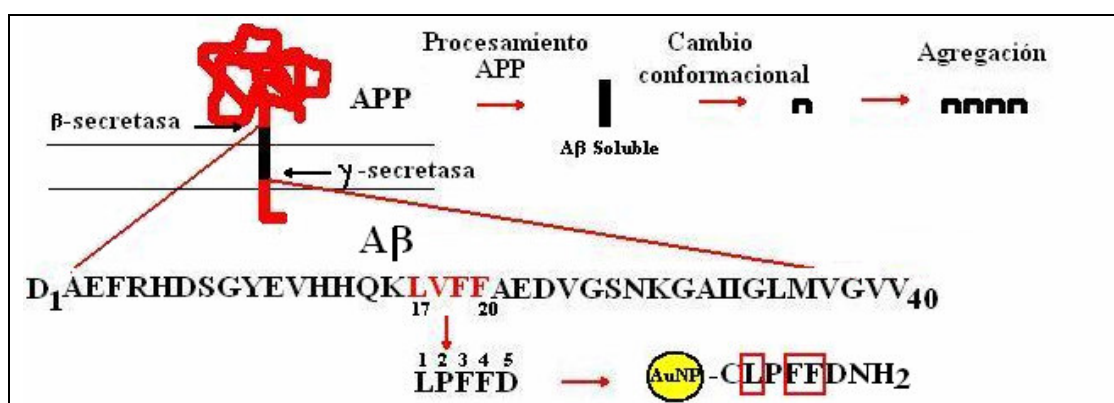


Figura 9. Representación esquemática del origen de los agregados de Aβ. El reconocimiento entre el conjugado AuNP-INH y Aβ estaría dado por los aminoácidos encerrados en recuadros rojos.

Introducción

Soto y colaboradores apuntan a la región 17-20 (¹⁷LVFF²⁰) de A β (figura 9) como el núcleo hidrofóbico a partir del cual se produce la autoagregación por lo que, empleando como base esta secuencia de autoreconocimiento, desarrollaron péptidos de elevada selectividad y afinidad capaces de inhibir la formación de depósitos tóxicos de A β y desagregar los depósitos ya formados (30), basando el diseño en el hecho de que los aminoácidos hidrofóbicos leucina y fenilalanina ubicados en las posiciones 17, 19, y 20 de A β parecen jugar un papel importante en el reconocimiento e interacción A β -A β y no así la valina en posición 18 (figura 10), que sólo estabilizaría los agregados formados. Así, debido a la poca importancia que la valina (de la región 17-20) tiene respecto al reconocimiento y anclaje de A β , la secuencia del péptido de síntesis de Soto contempló el reemplazo de este aminoácido por prolina, ya que su capacidad disruptora de configuraciones β por excelencia permite no sólo impedir la agregación de A β sin afectar el proceso de anclaje, sino también evitar la posible autoagregación del péptido diseñado o su participación como núcleo de agregación. Consecuentemente con lo anterior, estudios de estructura-actividad realizados con los péptidos desarrollados por Soto confirman que los aminoácidos prolina y fenilalanina ubicados en las posiciones 2 y 3 del péptido juegan un papel importante en la actividad de estos péptidos (30), información que se suma a estudios previos que señalan al aminoácido fenilalanina en la posición 19 (equivalente a la posición 3 del péptido inhibidor), como un aminoácido crítico en la interacción A β -A β y formación de amiloide.

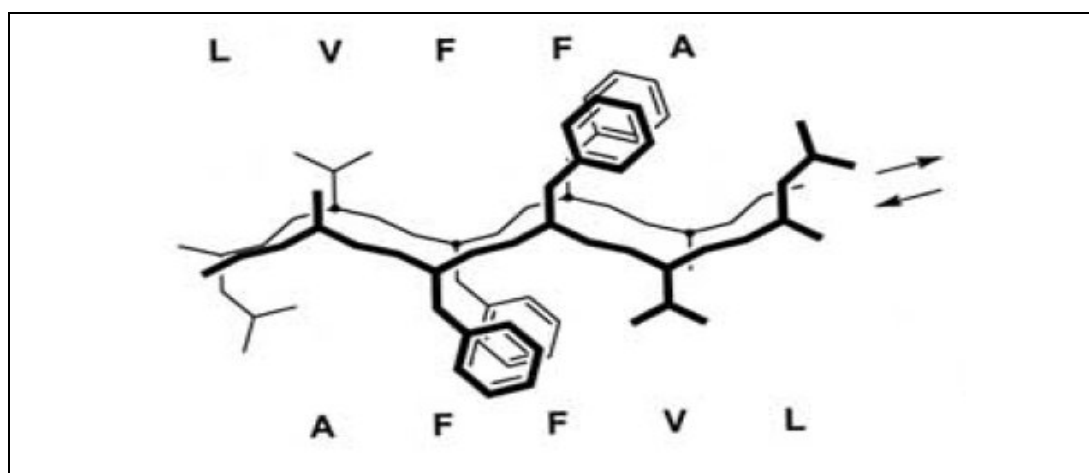


Figura 10. Representación esquemática de la interacción entre los núcleos centrales de dos fibras de A β . Las flechas indican la secuencia peptídica de A β desde el extremo N terminal al C terminal.

Finalmente, el diseño de los péptidos consideró el aumento de la solubilidad adicionando aspártico al extremo C-Terminal debido a su carácter polar y, pensando en la farmacocinética del péptido, se disminuyó levemente la proteólisis fisiológica a través de la amidación C-Terminal de estos péptidos dando lugar al péptido de síntesis LPFFDNH₂, que modificado en su extremo N-Terminal a través de la adición de una cisteína da lugar al péptido INH.

Además de los péptidos descritos por Soto y cols, otros péptidos han sido diseñados por diferentes investigadores destacando Colil-LVFFA-OH (13), Ac-LPFFDNH₂ (30), y KLVFFK (30), por desagregar e inhibir eficazmente la formación de placas amiloides además de un alto grado de especificidad por ellas y baja toxicidad, lo que los convierte en posibles candidatos para la conjugación a AuNP a pesar de su baja vida media *in vivo*. Aún cuando no es del todo conocido el mecanismo molecular de inhibición del crecimiento de la fibra amiloide por parte de estos péptidos, se postula en función de los fundamentos para el diseño, que actuarían bloqueando el crecimiento de los agregados a través de interacciones con los residuos del núcleo hidrofóbico de moléculas de A β de la fibra (residuos 17-20) formando finalmente especies de menor toxicidad.

Evaluación de la interacción entre los agregados de A β y los conjugados AuNP-Péptidos: Debido a lo expuesto hasta ahora, la interacción entre los conjugados y los agregados de A β estaría dada por la leucina y fenilalaninas de la estructura base del diseño de los péptidos permitiendo el anclaje específico de los conjugados (figura 9), siendo el tamaño, la especificidad, y la capacidad de atravesar barreras biológicas, lo que condujo a la elección del péptido LPFFDNH₂ como lanzadera para las AuNP una vez modificado (INH). Por consiguiente, se espera que la técnica de TEM muestre la interacción de las partículas de AuNP-INH con los agregados de A β . La evaluación de esta interacción requiere de la elaboración de fibras de A β a partir de especies monoméricas solubles de este péptido, ya que de lo contrario, el ensayo es poco reproducible debido a que el A β adquirido en el comercio tiende a formar especies oligoméricas de bajo peso molecular durante su almacenamiento, que no necesariamente terminan formando fibras amiloides. Así, A β fue preparado de acuerdo a protocolos bien establecidos como el descrito por Zagorsky (46) en donde A β es tratado con sustancias que no afectan su estructura primaria, tales como el ácido trifluoracético y agentes

desestructurantes como el hexafluorisopropanol, dando así lugar a la formación del monómero. Posteriormente se preparan alícuotas de 40 μM del monómero de $\text{A}\beta$ obtenido (concentración superior a la concentración micelar crítica de $\text{A}\beta$ de 10 μM) y se adicionan las AuNPt y sus conjugados. La solución resultante se incuba a 37°C con agitación continua para promover la formación de fibras amiloides, las que ya son observables a las 24 horas de incubación y luego en gran cantidad a los 7 días.

En resumen, la obtención de fibras de $\text{A}\beta$ contempló la preparación de la forma monomérica de este péptido a través de protocolos previamente descritos, su incubación por 7 días con AuNPt-Péptido a concentraciones en que la agregación de $\text{A}\beta$ es también reproducible y alcanza la madurez necesaria para el análisis, para luego teñir la muestra con acetato de uranilo y hacer los agregados visibles al microscopio electrónico de transmisión, y en consecuencia, observar la interacción de los conjugados con los agregados de $\text{A}\beta$.

Es así que el diseño experimental de este trabajo permitió el avance fluido en la búsqueda de resultados, siendo evidente, a la luz de este marco teórico, el impacto positivo que podría provocar el conjugar NPM a péptidos que le confieran selectividad por una diana terapéutica definida, llegando a ser sumamente atractivo en este sentido, el conjugar AuNP a péptidos como LPFFDNH₂ debido a las características que ambos componentes exhiben y a la precisión molecular que esta nueva estrategia terapéutica supone.

1.2. Hipótesis

Los conjugados de AuNP con péptidos que presentan afinidad por los agregados de A β son estables en medios acuosos y se unen a los agregados tóxicos de A β .

Esta hipótesis se basa en que el recubrimiento de AuNP con péptidos incrementa su estabilidad (42) y en que el conjugar las AuNP a péptidos que presentan afinidad por los agregados de A β (30) permitirá dirigir a las AuNP hacia los depósitos de éste péptido.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Esta tesis se enmarca dentro de la primera etapa del desarrollo de una nueva estrategia terapéutica para abordar enfermedades conformacionales como el Alzheimer, y pretende obtener y caracterizar conjugados de AuNP con el péptido LPFFDNH₂ modificado (INH) y dos de sus isómeros con secuencias diferentes, a saber, CDLPFFNH₂ (i1) y CLPDDFNH₂ (i2), además de evaluar la interacción de estos conjugados con fibras de A β ₁₋₄₂.

1.3.2. Objetivos específicos

1. Sintetizar AuNP de tamaño controlado. El objetivo específico es poner a punto protocolos que permitan controlar la homogeneidad de las AuNP y alcanzar tamaños de aproximadamente 5 y 10 nm, lo que será clave para el pasaje a través de membranas biológicas y su potencial uso terapéutico.
2. Obtener péptidos de diferentes secuencias para formar conjugados que se unan selectivamente a los agregados de A β potencialmente tóxicos. Se obtendrá el péptido CLPFFDNH₂ en base a la secuencia descrita por Soto y cols (29) y se obtendrán dos isómeros de éste con cambios en la secuencia con el fin de evaluar si este cambio afecta la unión de los conjugados a los agregados de A β . Todos los péptidos serán obtenidos a partir de la modificación de LPFFDNH₂ añadiendo una cisteína N-terminal para facilitar la unión del tiol con el oro, y conservando el grupo amida en el extremo C-terminal por su contribución en retardar la proteólisis apuntando a mejorar las propiedades farmacocinéticas del péptido INH.
3. Conjugar los péptidos obtenidos anteriormente con las AuNP.
4. Esclarecer las diferentes condiciones de pH y fuerza iónica en medios acuosos en que los conjugados presenten mayor estabilidad.
5. Evaluación de la interacción entre los conjugados AuNP-Péptido y los agregados de A β .

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Síntesis de AuNP

La síntesis fue realizada a través de dos métodos, el método descrito por Turkevich y cols. (AuNP de aproximadamente 10 nm) y el método descrito por Liu y cols. (AuNP de aproximadamente 5 nm). Todo el material se lavó con Extran al 2 % en agua Mili-Q, se enjuagó con agua Mili-Q, se secó en estufa a 37 °C, y posteriormente se lavó con agua regia (Ácido nítrico/ácido clorhídrico 1:3). Todas las soluciones se prepararon empleando agua Mili-Q (18 MΩ cm).

Método de Turkevich: Se prepararon 106 mL de una solución 2,2 mM de citrato de sodio dihidratado (Fluka, pureza 99,5%, PM 294), para lo cual se pesaron 68,5 mg de esta sustancia. La reacción se realizó en un matraz de fondo redondo de tres cuellos de 250 mL, se conectó el cuello central del matraz a un condensador de reflujo, y se colocó todo el sistema en un manto de calefacción de aluminio con un agitador magnético para la agitación y mezcla continua. Se preparó 1 mL de una solución 24,3 mM de HAuCl₄ hidratado (Aldrich, pureza 99,9%, PM 339,79) pesando 8,0 mg de esta sustancia. La solución 2,2 mM de citrato fue llevada a ebullición para añadir rápidamente, pero gota a gota, el mL de la solución 24,3 mM de HAuCl₄ una vez alcanzado el reflujo. Después de aproximadamente 7 minutos (o hasta alcanzar color rojo característico) se retiró el matraz del calor y se esperó hasta que la solución alcanzara la temperatura ambiente para luego almacenarla a 4 °C.

Método de Liu: La reacción se realizó en un matraz de fondo redondo de tres cuellos de 250 mL. Se unió el cuello central a un condensador de reflujo y se colocó el matraz en un manto de calefacción de aluminio con un agitador magnético para la mezcla continua. Se colocaron 20 mL de una solución 5 mM de HAuCl₄ y se añadieron 70 mL de agua Mili-Q. Se pesaron 1,7 g de β-ciclodextrinas (Fluka, pureza ≥ 99%, PM 1135) y se agregaron al matraz a través de uno de los cuellos abiertos para obtener una concentración final de 15 mM de esta sustancia. La solución resultante fue llevada a ebullición. Una vez alcanzado el reflujo, se añadieron

Materiales y métodos

rápidamente 10 mL de una solución 40 mM de citrato de sodio dihidratado al matraz. A los pocos segundos, la solución pasó de un color claro a un gris oscuro, indicando nucleación. Transcurridos 2 minutos el color cambió a rojo borgoña, lo que es un indicativo de la formación de AuNP. El coloide se mantuvo a reflujó durante 15 minutos para luego enfriarlo hasta temperatura ambiente y filtrarlo con filtros hidrofílicos de 450 nm (Millipore Millex-HV) y almacenarlo a 4 °C.

Las AuNP obtenidas en ambas síntesis fueron caracterizadas a través de espectros de absorción realizados en un espectrofotómetro (UV-Visible ATI UNICAM UV 3) en función del tiempo de reacción. Las muestras fueron tomadas a tiempo cero (al comenzar la reacción), 2, 5, 10, y 15 minutos y se dejaron reposar durante un día para luego medir el lambda máximo y evaluar lo que se obtendría si se detuviera la reacción a estos tiempos. Se depositaron las muestras sobre rejillas de cobre para TEM recubiertas con formvar, sobre una placa de Petri con papel Whatman número 1 ubicando la rejilla con una pinza sobre el papel Whatman y colocando 10 µL de la muestra sobre la rejilla y esperando la sequedad, repitiendo esta última operación 3 veces para posteriormente obtener las micrografías por TEM y medir sus tamaños empleando el programa Adobe Photoshop. Para establecer las dimensiones de las partículas se realizó la medida de 150 nanopartículas obtenidas en tres regiones diferentes de la grilla.

2.2. Síntesis de péptidos

Los péptidos fueron sintetizados por el Dr. Marcelo Kogan en el laboratorio de Síntesis, diseño, y estructura de péptidos y proteínas del Parque Científico de Barcelona (España), siguiendo un protocolo de síntesis en fase sólida empleando un esquema Fmoc/tBu, por contar allí con todas las facilidades para la realización de esta tarea. La relación arrojada por el análisis de aminoácidos es como sigue: Para CLPFFDNH₂, D, 0,96 experimental, 1 teórico, P, 0,97 experimental, 1 teórico, C, 0,64 experimental, 1 teórico, L, 0,98 experimental, 1 teórico, F, 2,09 experimental, 2 teórico. Para CDLPFFNH₂, D, 0,92 experimental, 1 teórico, P, 1,01 experimental, 1 teórico, C, 0,49 experimental, 1 teórico, L, 0,98 experimental, 1 teórico, F, 2,09 experimental, 2 teórico. Para CLPDDFNH₂, D, 0,90 experimental, 1 teórico, P, 0,99

experimental, 1 teórico, C, 0,35 experimental, 1 teórico, L, 0,98 experimental, 1 teórico, F, 2,14 experimental, 2 teórico.

La caracterización a través de MALDI-TOF para INH, i1, e i2, mostró un $[M+H]^+$ experimental de 740 (M^+ calculado, 739,34), y el electrospray, $[M+H]^+$ experimental de 740 (M^+ calculado, 739,34).

2.3. Conjugación de AuNP a los péptidos

Los conjugados AuNP-Péptido se obtuvieron empleando protocolos descritos para la conjugación de tioles de naturaleza no peptídica (42, 43, 47). Se tomaron 20 mL de AuNPt y 20 mL de AuNpc y se procedió separadamente de la siguiente manera: Se pesó 1 mg del péptido a conjugar y se disolvió en 1 mL de agua Mili-Q. Se colocaron 20 mL de las AuNP a conjugar en un matraz de boca ancha de 50 mL con un agitador magnético para la agitación continua y se llevó el coloide a pH 8 con NaOH 0,5 M (Merck, pureza > 99%, PM 40) con el fin de estabilizar las AuNP y prevenir la precipitación durante el proceso de conjugación. Una vez preparados el coloide y el péptido, se añadió rápidamente el mL de péptido al matraz manteniendo el coloide bajo agitación continua durante 15 minutos. El coloide resultante fue sometido a diálisis por tres días empleando una bolsa de diálisis (Spectra/por MWCO 6-8,000) y 2 litros de solución 1,2 mM de citrato de sodio dihidratado para sumergir la bolsa. La diálisis se realizó manteniendo la bolsa sumergida bajo agitación continua a 4 °C de temperatura y cambiando la solución cada 24 horas.

2.3.1. Centrifugación para la eliminación del péptido libre

Se centrifugaron alícuotas de 2 mL de AuNP-Péptido con el objeto de eliminar el péptido libre que pudiera haber quedado luego de la diálisis. Los coloides de AuNPt fueron centrifugados a 13.200 rpm durante 5 minutos y los coloides de AuNpc fueron centrifugados a 13.200 rpm por 15 minutos, siendo los pasos siguientes, para ambos tipos de coloides, los mismos. Es decir, se eliminó el sobrenadante y se reconstituyó con citrato 1,2 mM, sometiendo

cada solución a centrifugación y reconstitución 2 veces para finalmente medir su lambda máximo en el espectro UV-Visible.

2.3.2. Determinación de la cantidad de péptido libre posterior a la conjugación y diálisis (Ensayo de Ellman)

Se hizo una curva de calibración para INH, i1, e i2 de acuerdo al siguiente protocolo: Se prepararon 4 mL de una solución 0,33725 mM de péptido (Solución 1), una solución amortiguador fosfato 10 mM pH 7,4 (Sigma) (Solución 2) y una solución de 5,5'- ditiobis (2-ácido nitrobenzoico) (DTNB) 2 mM (Aldrich, 99% pureza, PM 396,95) (Solución 3). Cinco muestras de diferentes concentraciones de péptido, de 2 mL cada una, fueron preparadas agregando una alícuota de la solución 1 y completando a 1 mL con la solución 2. Luego, se añadió 1 mL de la solución 3 a cada muestra para obtener la solución final de 2 mL de concentración deseada como de indica en la tabla 1. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro UV-Visible a 412 nm empleando una solución blanco de amortiguador fosfato 10 mM pH 7,4 y DTNB 2 mM 1:1, para posteriormente hacer la curva de calibración concentración/Absorbancia que permitió medir la concentración de péptido libre en las muestras de AuNP conjugadas a INH, i1 e i2 interpolando en la curva la medición obtenida en estas muestras. El blanco fue preparado con DTNB y amortiguador fosfato en relación 1:1, y la muestra fue preparada añadiendo 0,5 mL de amortiguador fosfato 10 mM pH 7,4 a 0,5 mL del conjugado AuNP-Péptido, para luego añadir 1 mL de DTNB 2 mM, esperar 2 minutos, y realizar la medición.

Tabla 1. Preparación de muestras de 2 mL para curva de calibración a partir de una solución de péptido 0,33725 mM

INH	Alícuota*	PBS**	i1	Alícuota*	PBS**	i2	Alícuota*	PBS**
[] mM	µL	µL	[] mM	µL	µL	[] mM	µL	µL
0,006	35,5	964,5	0,05	296	704	0,05	296	704
0,005	29,6	970,4	0,04	237	763	0,04	237	763
0,004	23,7	976,3	0,03	178	822	0,03	178	822
0,003	17,8	982,2	0,02	118,6	881,4	0,02	118,6	881,4
0,002	11,8	988,2	0,01	59,3	940,7	0,01	59,3	940,7

*Solución 1; ** Solución 2; PBS: Amortiguador fosfato

Los valores de absorbancia obtenidos de las muestras de conjugados de AuNP se interpolaron en las curvas de calibración correspondientes.

2.4. Caracterización de AuNP y sus conjugados

Las AuNP obtenidas y sus conjugados fueron caracterizados a través de espectrofotometría UV-Visible, electroforesis en gel de agarosa, TEM, AFM y XPS en el caso de los conjugados AuNPt-INH. Las mediciones realizadas a través de espectrofotometría UV-Visible se realizaron empleando un espectrofotómetro ATI UNICAM UV3 y cubetas plásticas de 1 cm de longitud. La caracterización de AuNP y sus conjugados se realizó entre longitudes de onda de 350 nm y 900 nm empleando como blanco citrato de sodio dihidratado 1,2 mM y buscando λ máximos de 520 nm (absorción característica para AuNP de 10 nm). Todas las mediciones que requirieron del uso de espectrofotometría UV-Visible emplearon los mismos equipos e instrumental.

La electroforesis se realizó en gel de agarosa (Sigma) al 2% a 114 mV, para lo cual se llevó a ebullición en microondas una solución de 50 mL de amortiguador TAE 1X con 1 g de agarosa y se depositó el gel obtenido en una placa de electroforesis (Bio-Rad). Luego, se colocó una peineta de ocho dientes para formación de alvéolos de carga de muestra y se esperó hasta que el gel solidificara. Una vez solidificado el gel, se colocó en la cámara de electroforesis (Bio-Rad) y se cubrió con 250 mL de una solución de amortiguador TAE 1X. Separadamente, las muestras de AuNP y sus conjugados se llevaron a pH 8 con NaOH 0,5 M y se mezclaron con glicerol en una proporción 1:9, se ubicaron en los alvéolos y se dejó correr la electroforesis durante 5 minutos.

La caracterización por TEM fue realizada en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss con rejillas de cobre recubiertas con Formvar. Las rejillas para TEM fueron preparadas en una placa de Petri con papel Whatman número 1 ubicando la rejilla con una pinza sobre el papel Whatman y colocando 10 μ L de la muestra sobre la rejilla y esperando la sequedad, repitiendo esta última operación 3 veces.

La caracterización por AFM fue realizada por el Dr. Marcelo Kogan en el laboratorio de Síntesis, diseño, y estructura de péptidos y proteínas del Parque Científico de Barcelona (España), por contar allí con todas las facilidades para la realización de esta tarea. La labor se

realizó colocando una gota de muestra sobre una superficie de mica recién exfoliada y secando con nitrógeno gaseoso. Las muestras se observaron en aire empleando el modo de “*Tapping*”.

La caracterización por XPS fue realizada por el Dr. Marcelo Kogan en el laboratorio de Síntesis, diseño, y estructura de péptidos y proteínas del Parque Científico de Barcelona (España), por contar allí con todas las facilidades para la realización de esta tarea. Los espectros se realizaron colocando una gota del coloide sobre una superficie de nitruro de silicio tratada con ácido fluorhídrico y luego con agua, y secando la muestra en la cámara de pre-vacío de un equipo ESCA.

2.5. Estimación del grado de recubrimiento peptídico de AuNPt con INH, i1 e i2:

Para establecer la relación del número de moléculas de péptido por nanopartícula, se realizó paralelamente una determinación de la concentración de nanopartículas en las muestras de los distintos conjugados y un AA a *pellets* obtenidos luego de la diálisis y centrifugación de estas muestras. Así, mediante la ley de Beer ($A = abc$, donde a corresponde a la absorptividad molar [$3,8 \times 10^8 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$], b al ancho de la cubeta, y c a la concentración molar) se obtuvo la concentración de nanopartículas después de medir el λ máximo de absorción de cada una de las muestras AuNPt-Péptido en un espectrofotómetro ATI UNICAM UV3 con cubetas plásticas de 1 cm de longitud empleando citrato de sodio dihidratado 1,2 mM como blanco, y mediante un AA, se estimó el número de moléculas de péptido hidrolizando los *pellets* (previamente obtenidos) en ácido clorhídrico 6 N durante 3 días, para luego derivatizar con 6-aminoalquil-N-hidroxisuccinimidil carbamato, y finalmente determinar el contenido, la composición, y cantidad de aminoácidos en las distintas muestras mediante HPLC. Una vez obtenidos ambos valores, se dividió la concentración de péptidos (referida a la solución de AuNPt antes de la diálisis y centrifugación) por la concentración de nanopartículas en la muestra del conjugado de la solución original (antes de la diálisis y centrifugación) obteniendo el número de moléculas de péptido por nanopartícula como resultado de esta división.

2.6. Estabilidad

Se estudió la estabilidad de las AuNPt, AuNPc, y sus respectivos conjugados, a diferentes **pHs y concentraciones de NaCl** a tiempo cero y a los treinta minutos además de su estabilidad frente al proceso de congelación y descongelación. La estabilidad frente al pH se estudió observando la variación del pico de absorción máximo en espectrofotometría UV-Visible a pH 3, 5, 6, 7, 8 y 10 a tiempo cero (a los pocos segundos de obtenido el pH) y treinta minutos. Los diferente pHs se alcanzaron empleando NaOH 0,5 M y/o HCl 0,5 M (Purom, pureza 36,5-38%, PM 36,5), y el pH fue medido a 25 °C a través de un peachímetro (Microprocessor pH/ion meter pmx 3000). El estudio de la estabilidad a diferentes concentraciones de NaCl se realizó analizando la variación del pico de absorción máximo en espectrofotometría UV-Visible a concentraciones de NaCl (Synth, 99% de pureza, PM 58,44) de 0 mM, 20 mM, 60 mM y 100 mM a tiempo cero (a los pocos segundos de exponer las muestras a NaCl) y 30 minutos. Para el estudio de estabilidad frente al proceso de congelación y descongelación se tomaron 2 mL de AuNPt y AuNPc y sus respectivos conjugados, y se midió el lambda máximo de absorción en el espectrofotómetro UV-Visible antes de llevar las muestras a -20 °C. Una vez hecha la medición, se almacenaron las muestras a -20 °C por 24 horas para posteriormente descongelarlas, llevarlas a temperatura ambiente (sin calentamiento), y medir nuevamente el lambda máximo empleando citrato de sodio dihidratado 1,2 mM como blanco.

2.7. Interacción de los conjugados de AuNPt-INH, AuNPt-i1 y AuNPt-i2 con A β ₁₋₄₂

Esta tarea requirió de la obtención de la forma monomérica del péptido amiloide (A β ₁₋₄₂, Peptide Institute) y su incubación, con la consecuente formación de fibras, junto a los conjugados AuNPt-INH, AuNPt-i1, y AuNPt-i2, durante 7 días. Así, se preparó una suspensión madre pesando aproximadamente 1 mg de A β ₁₋₄₂ y sonicándolo en 200 μ L de agua Mili-Q durante un minuto a temperatura ambiente. Luego, por medio de una microcuantificación de proteínas con el reactivo de Bradford (Bio-Rad protein assay) se hizo una curva de calibración con un patrón de albúmina a concentraciones de 0, 2, 4, 8, 14, y 20 μ g/mL, y se cuantificó el péptido A β ₁₋₄₂ evaluando la cantidad de éste en una alícuota de 10 μ L de la suspensión madre a

Materiales y métodos

595 nm en UV-Visible. Hecho esto, se procedió a la obtención de la forma monomérica del péptido amiloide $A\beta_{1-42}$ a través del tratamiento de Zagorsky (46) tomando una alícuota de la solución madre y preparando 600 μL de $A\beta_{1-42}$ 40 μM . Se evaporó el agua, y se añadieron 20 μL de ácido trifluoracético al secado volviendo a evaporar el solvente en corriente de nitrógeno. Se agregaron 20 μL de hexafluorisopropanol y se secó la muestra una vez más, repitiendo esta última acción tres veces para luego dejar la muestra durante toda la noche en un desecador al vacío con hidróxido de sodio y parafina. Al día siguiente, se disolvió $A\beta_{1-42}$ añadiendo 107 μL de NaOH 10 mM, 432 μL de agua Mili-Q, y 60 μL de amortiguador fosfato 200 mM (Sigma-Aldrich), y los 600 μL obtenidos ($A\beta_{1-42}$ 40 μM y amortiguador fosfato 20 mM) fueron vortexeados por el espacio de un minuto e incubados durante 4 horas a 37 °C para dar lugar a la formación de centros de nucleación. Inmediatamente, se dividió la muestra en tres alícuotas añadiendo citrato 1,2 mM a la primera, AuNPt a la segunda, y AuNPt-Péptido a la tercera, en cantidades suficientes como para alcanzar una concentración 10 μM de $A\beta_{1-42}$ y 5 mM de amortiguador fosfato (pH 7,4) respectivamente permitiendo así la obtención paulatina de fibras de $A\beta_{1-42}$ durante el proceso de incubación siguiente de siete días.

Una vez alcanzados los siete días de incubación entre las fibras de $A\beta_{1-42}$ y los conjugados, las muestras fueron analizadas por TEM. Las rejillas para TEM fueron preparadas homogeneizando la muestra y depositando 10 μL de ésta sobre un trozo de parafilm y, separadamente, dos gotas contiguas de agua Mili-Q y una de acetato de uranilo 2% (tinción para TEM) de 10 μL cada una. La cara correspondiente de la rejilla se puso en contacto con la muestra durante un minuto, se secó en papel Whatman número 1 y se puso en contacto con la gota contigua de agua Mili-Q durante un minuto más secándola nuevamente con un papel Whatman, repitiendo el proceder al hacer pasar la rejilla por el resto de las gotas. Una vez seca, la rejilla se llevó a TEM. Un protocolo similar al expuesto se realizó para los conjugados con los dos isómeros restantes.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este trabajo corresponde a la primera etapa del proyecto que persigue el desarrollo de una nueva estrategia terapéutica para la enfermedad de Alzheimer, por lo que viene a ser evidente que algunas interrogantes hallarán respuesta sólo en trabajos posteriores, llegando a ser en este sentido, la base para futuros estudios. Desde este punto de vista y a la luz de los eventos observados, discutiremos nuestros resultados en la medida en que éstos se presentan.

3.1. Caracterización AuNPt y AuNPc

Caracterización por espectrofotometría UV-Visible: Las AuNPt mostraron un λ de absorción máximo entre rangos de 520-522 nm lo que puede relacionarse con tamaños de 10-15 nm (el resultado de los tamaños se expondrá más adelante), lo que es un indicativo de partículas cercanas a los tamaños esperados en este método. Por otro lado, las AuNPc mostraron un λ de absorción máximo que oscila entre los 518-520 nm pudiendo relacionarse con tamaños más pequeños. En la figura 11 se observan picos estrechos para ambos métodos de síntesis, lo que sería un indicativo de la obtención de una distribución de tamaños relativamente homogéneos en ambos casos. Por otra parte, obsérvese que los valores de absorbancia correspondientes a los máximos de absorción difieren en las dos síntesis debido a que ambas metodologías emplean diferentes cantidades iniciales de HAuCl_4 , dando lugar a concentraciones de síntesis diferentes (ver capítulo 5).

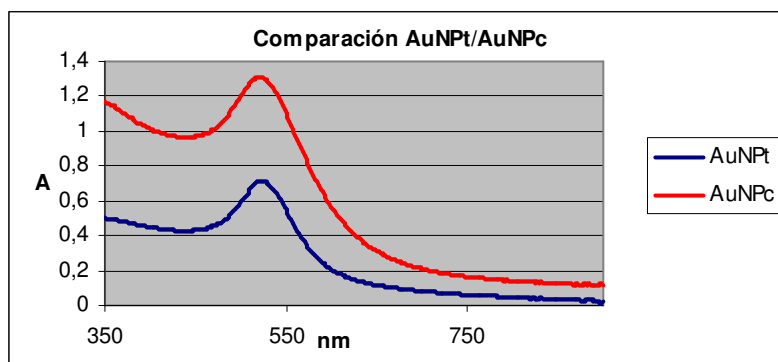


Figura 11. Espectrofotometría UV-Visible de AuNPt y AuNPc.

Resultados y discusión

Para establecer los tiempos a los cuales se debe detener el calentamiento, se tomaron muestras durante la síntesis de AuNPt y AuNPc y se realizaron espectros de absorción que mostraron absorbancias cercanas a las esperables para AuNP de 10 nm (AuNPt) y de 5 nm (AuNPc) a tiempos entre los 5 y 10 minutos (tabla 2), observándose un λ máximo en las AuNPc de 520 nm a los 15 minutos que presupondría nanopartículas más grandes de lo esperado. Por otro lado, la técnica de TEM evidenció tiempos óptimos de síntesis de 7 minutos para AuNPt y 15 para AuNPc (datos no mostrados), por lo que es importante destacar que la técnica de TEM es la que finalmente muestra el tamaño y forma real de las partículas y la espectrofotometría UV-Visible ofrece sólo datos tentativos de la muestra del coloide analizado. Cabe señalar además, que la reacción continúa hasta que el coloide alcanza la temperatura ambiente, por lo que los datos de la tabla 2 reflejan el resultado obtenido al detener la síntesis a determinados tiempos y esperar hasta que las muestras alcancen la temperatura ambiente, por el contrario, mediciones instantáneas que no contemplen el alcance de la temperatura ambiente por parte del coloide sólo reflejarían lo ocurrido en el momento, obviando la continuidad de la reacción mientras disminuye su temperatura, por lo que no serían representativas.

Tiempo (minutos)	Lambda máximo AuNPt (nm)	Lambda máximo AuNPc (nm)
0	532	526
2	520	524
5	520	520
7	520	520
10	520	520
15	522	520

Con el fin de eliminar el exceso de β -ciclodextrinas presentes en la síntesis de AuNPc, se realizó una diálisis y centrifugación y mediante $^1\text{HRMN}$ se corroboró la ausencia de β -ciclodextrinas en las AuNPc (datos no mostrados) por lo que, si existen ciclodextrinas en las AuNPc, éstas se encontrarían en muy baja cantidad y posiblemente adheridas a la superficie de las partículas.

Caracterización por TEM Y AFM: Las AuNPt revelaron tamaños de $10,1 \text{ nm} \pm 1,8 \text{ nm}$ destacándose tamaños $10,6 \text{ nm}$ (figura 12), y las AuNPc revelaron tamaños de $6,0 \text{ nm} \pm 1 \text{ nm}$ destacándose tamaños de $5,6 \text{ nm}$ (figura 13). Asimismo, AFM mostró tamaños de 11 y 7 nm

Resultados y discusión

para las muestras de AuNPt y AuNPc respectivamente. Las muestras empleadas para la caracterización por AFM correspondieron a otros lotes de síntesis.

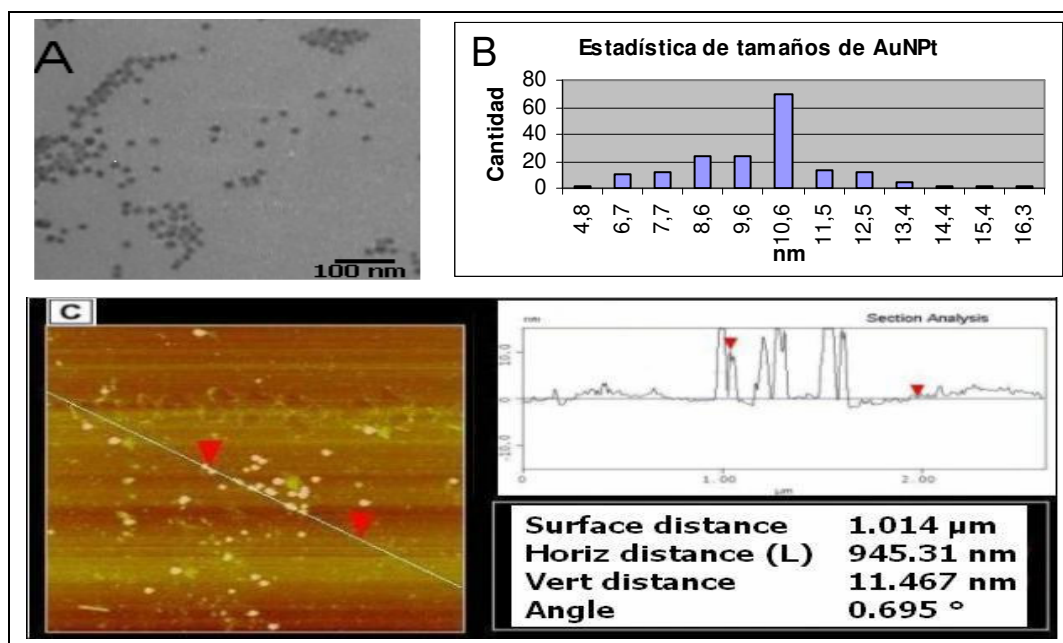


Figura 12. Fotografías de AuNPt tomadas por TEM a 50.000 X (A), estadística de tamaños de AuNPt sintetizadas (B), e imágenes topográficas de AFM (C).

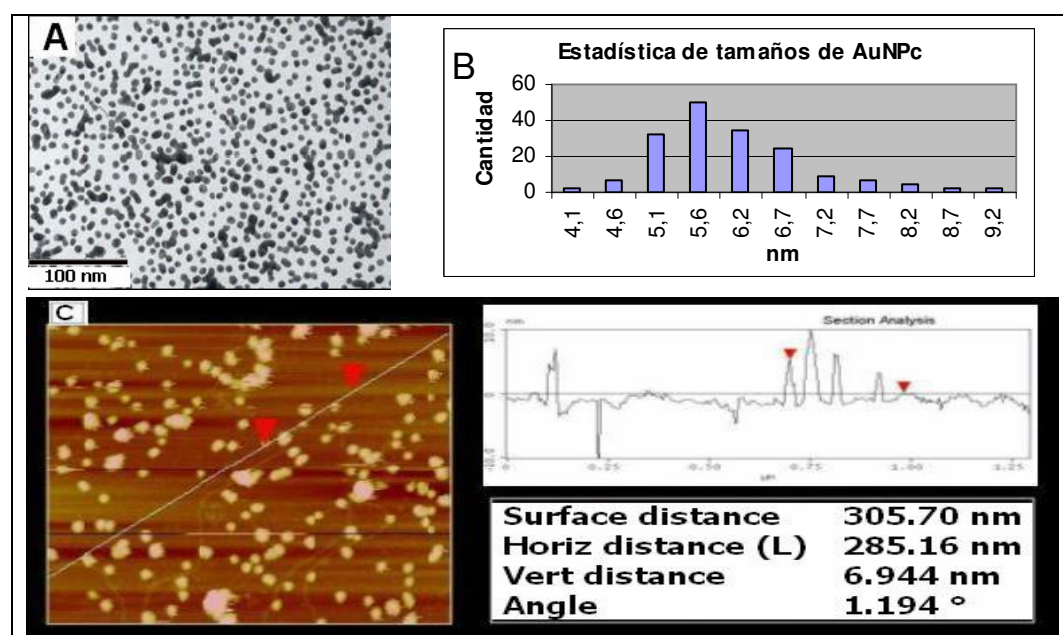


Figura 13. Fotografías de AuNPc tomadas por TEM a 50.000 X (A), estadística de tamaños de AuNPc sintetizadas (B), e imágenes topográficas de AFM (C).

3.2. Caracterización de los conjugados AuNP-Péptido obtenidos

Caracterización por espectrofotometría UV-Visible: Una vez sintetizadas, las AuNP fueron conjugadas y caracterizadas. Los conjugados de AuNPt con INH, i1 e i2 mostraron picos máximos de absorbancia de 528nm, 528nm y 526 nm respectivamente (figura 14). Este aumento en el λ máximo de absorción de las partículas se debería al cambio ocurrido en la superficie de la partícula producto de la conjugación, que genera un cambio en el índice de refracción que se traduce en un desplazamiento hacia el rojo (37). Las AuNPc y AuNPc-INH, mostraron picos de absorción máximos de 520 nm y 520 nm respectivamente (figuras 11 y 14 respectivamente) lo que sugiere que la presencia de β -ciclodextrinas, el tamaño obtenido de las partículas, o su forma, afectarían de diferente manera el efecto plasmón de las AuNPc respecto de las AuNPt al conjugarlas, conservando así su máximo de absorción original (520 nm).

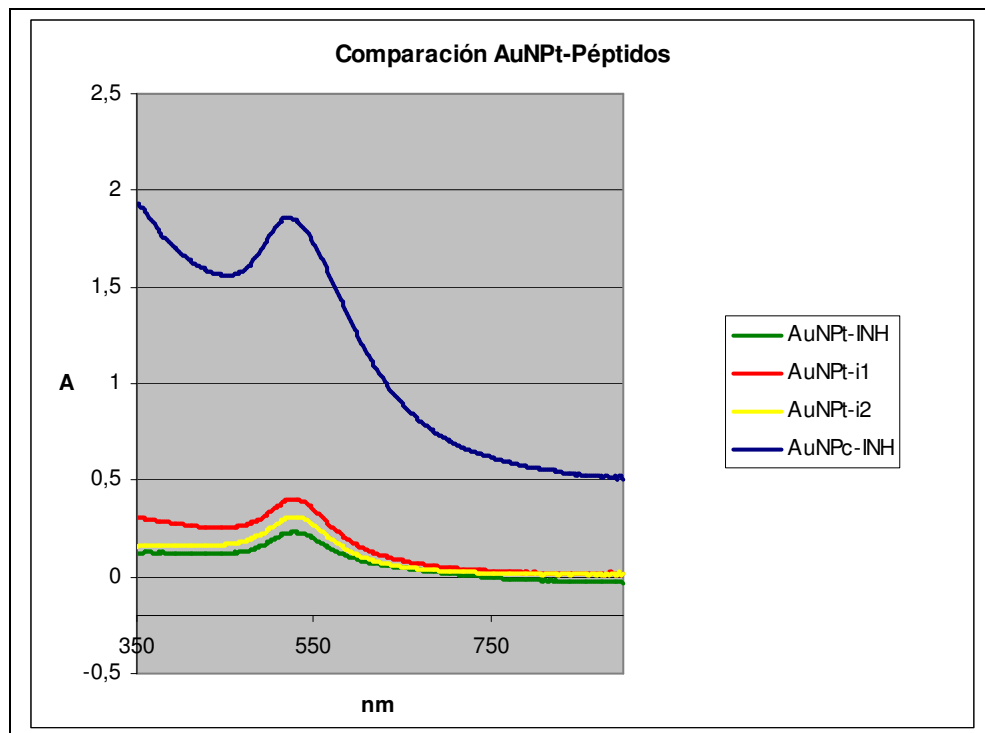


Figura 14. Espectrofotometría UV-Visible comparativa de conjugados de AuNPt-INH, i1, i2, y AuNPc-INH.

Resultados y discusión

Caracterización por TEM: Las AuNPt-INH revelaron tamaños de $9,3 \text{ nm} \pm 1,7 \text{ nm}$ predominando tamaños de $9,8 \text{ nm}$ (figura 15). Las AuNPt-i1 mostraron tamaños de $8,3 \text{ nm} \pm 1,2 \text{ nm}$ con tamaños predominantes de $9,4 \text{ nm}$ (figura 16). AuNPt-i2 mostraron tamaños de $20,1 \pm 6,1 \text{ nm}$ con tamaños predominantes de 19 nm (figura 17). La diferencia de tamaños respecto a las mediciones de AuNPt sin conjugar se debe a que las muestras conjugadas pertenecen a diferentes lotes de síntesis.

Por otra parte, las AuNPc-INH revelaron tamaños de $6,0 \text{ nm} \pm 1,1 \text{ nm}$ (figura 18). En este caso, las AuNPc conjugadas a INH correspondieron al mismo lote de síntesis que las AuNPc sin conjugar, de ahí los tamaños similares.

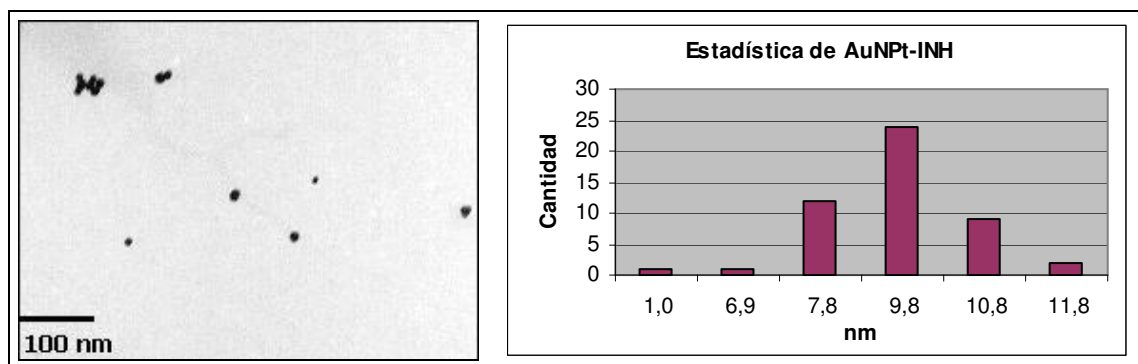


Figura 15. Foto de TEM (Izquierda) y estadística de tamaños de AuNPt-INH (Derecha).

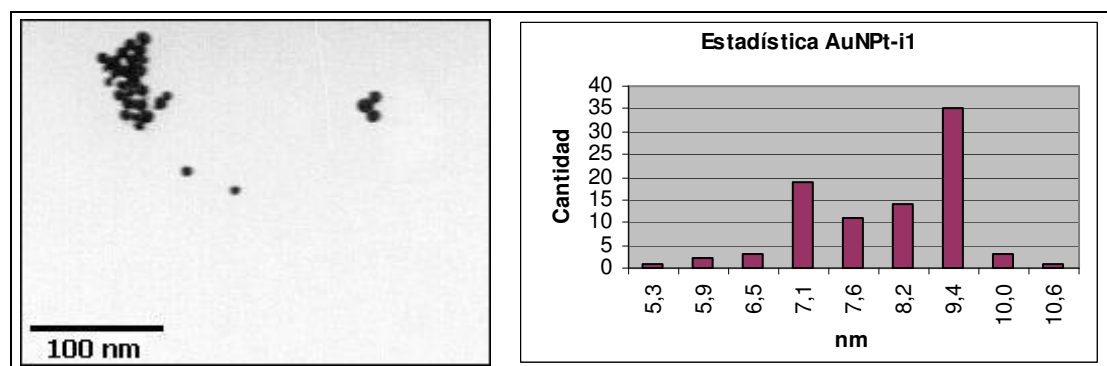


Figura 16. Foto de TEM (izquierda) y estadística de tamaños de AuNPt-i1 (Derecha).

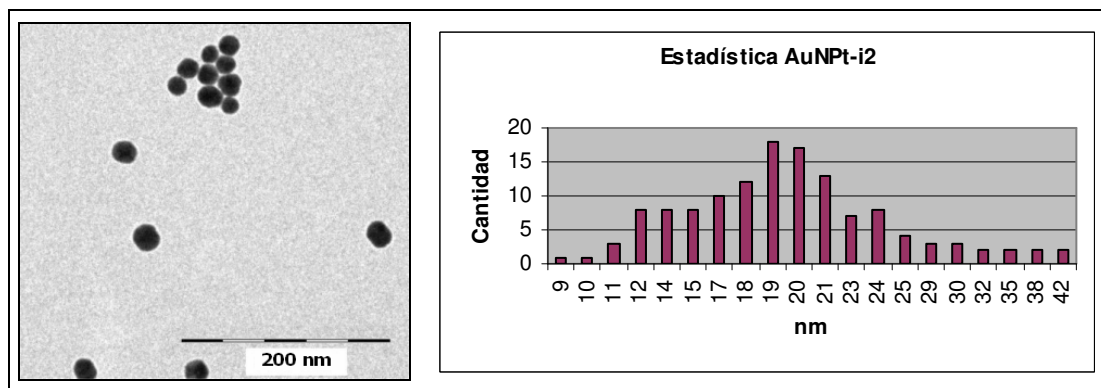


Figura 17. Foto de TEM (izquierda) y estadística de tamaños de AuNPt-i2 (derecha).

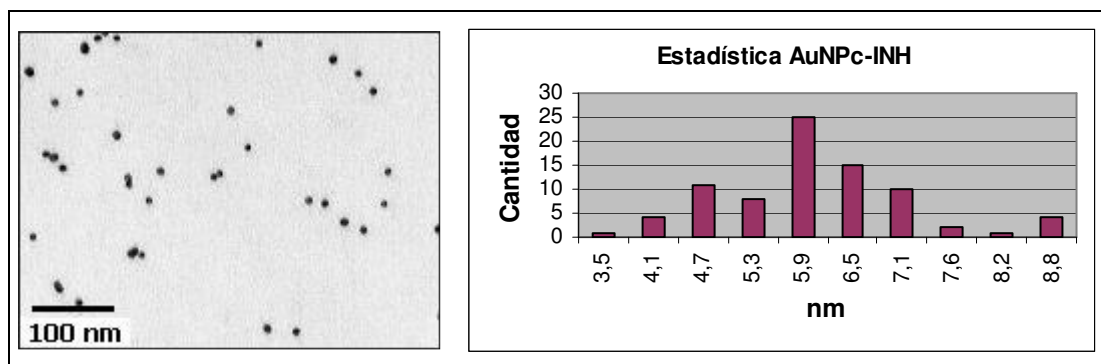


Figura 18. Foto de TEM (izquierda) y estadística de tamaños de AuNPc-INH (derecha).

La importancia del tamaño de los conjugados radica en el uso terapéutico que se les pretende dar, siendo evidente el impacto que éste tendrá en los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción que, supeditados a la vía de administración, permitirán a los conjugados alcanzar la diana terapéutica. Orientados en este contexto y con miras a las siguientes etapas del proyecto decidimos sintetizar AuNP de 5 y 10 nm concientes de la dificultad de excreción que estos tamaños tendrían a nivel renal, debido a que la información que se busca en esta etapa del proyecto pretende sentar las bases de las etapas siguientes. Sin embargo, destáquese que AuNP de tamaños inferiores a 10 nm han mostrado difundir rápidamente a través de espacios intercelulares (33, 35) y otras de tamaños cercanos a 6,6 nm han mostrado tener la capacidad de atravesar la BHE (35), por lo que la elección de los tamaños de AuNP es adecuada dentro del marco de estudio elegido. En el futuro se deberán desarrollar nuevas estrategias de síntesis de AuNP de tamaños menores que harán posible no sólo el

Resultados y discusión

traspaso de barreras biológicas, sino también el metabolismo de los conjugados y la excreción renal, de resultar ser esta última una de las vías de excreción en juego para los conjugados.

Electroforesis: Los conjugados de AuNPt (figura 19, carriles 2, 3, y 4) y AuNPc (figura 19, carril 6) mostraron diferentes movilidades electroforéticas respecto a las AuNP sin conjugar (figura 19, carriles 1 y 5. No migran), desplazándose 1,3 cm (carril 2, 3 y 4) y 1,9 cm (carril 6) del origen respectivamente (figura 19).

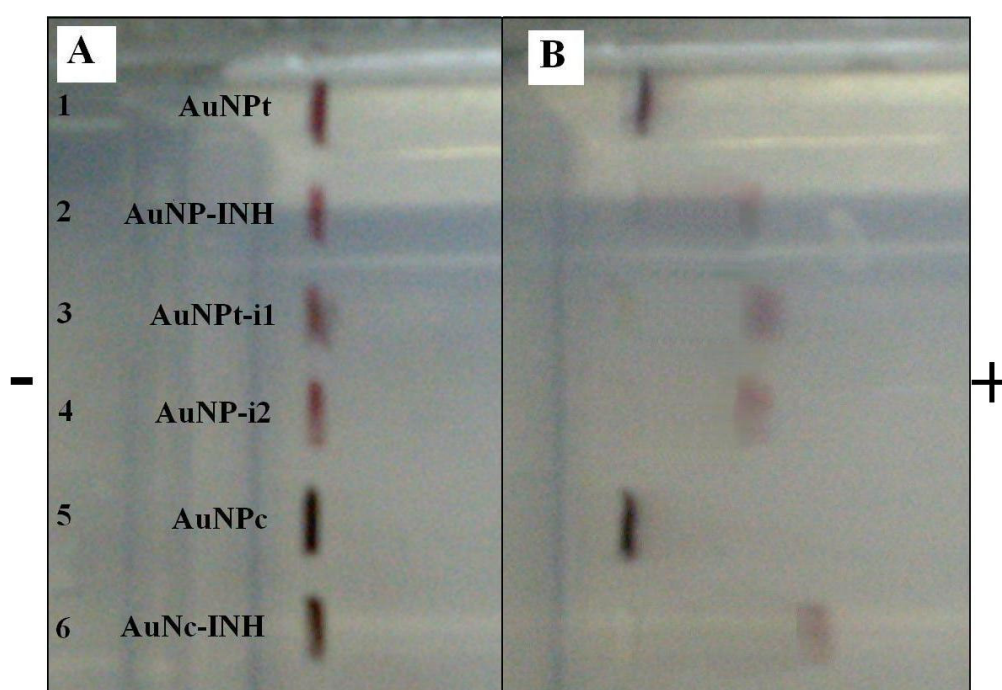


Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa de AuNPt y AuNPc y sus respectivos conjugados. La figura muestra la posición de los polos y las AuNP a tiempo cero (A) y a los 5 minutos (B). Nótese que AuNPt y AuNPc (carriles 1 y 5), sin conjugar, no migran en la electroforesis. La electroforesis fue realizada a 114 mV en gel de agarosa 2% empleando amortiguador TAE 1X.

La movilidad electroforética que se observa en los conjugados (figura 19, carriles 2, 3, 4, y 6) se debe a que los péptidos INH, i1, e i2, poseen una carga negativa producto de la pérdida del protón del grupo carboxílico (COO⁻) presente en el aspártico de dichos péptidos a pHs básicos (figura 20), lo que resulta en la movilidad de los conjugados hacia el polo positivo al ser sometidos a campos eléctricos.

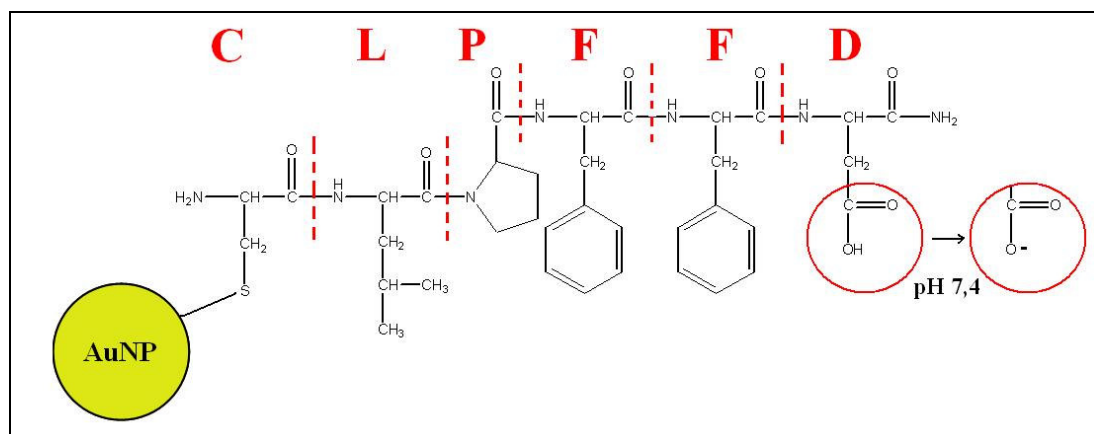


Figura 20. Representación de un conjugado AuNP-INH. Las líneas rojas punteadas muestran la ubicación de los enlaces peptídicos y el círculo rojo muestra el lugar del péptido donde se encuentra la carga que a pH básico promueve la estabilidad y migración del conjugado en la electroforesis. La representación es válida para i1 e i2, ya que corresponden a isómeros de INH.

Por otra parte, puede observarse claramente que el conjugado AuNPc-INH (figura 19, carril 6) presentó mayor movilidad electroforética que los conjugados de AuNPt (figura 19, alvéolos 2, 3, 4). Esto puede deberse a que las AuNPc, al ser de menor tamaño, pueden moverse con mayor facilidad que las AuNPt entre los polímeros entrecruzados del gel. A pesar de que esta técnica no da cuenta de cuántas moléculas de péptido están recubriendo cada AuNP, es importante destacar que las bandas son homogéneas y definidas por lo que podemos concluir que existe mayoritariamente un tipo de especie conjugada, siendo uniforme el grado de recubrimiento.

Presencia de péptidos libres luego de la conjugación: Posterior a la diálisis, la cantidad de péptidos libres se determinó a través del ensayo de Ellman interpolando en las curvas de calibración mostradas en la tabla 3.

Tabla 3. Curvas de calibración para el ensayo de Ellman		
Péptido	Curva de calibración	R ²
INH	$Y = 84,9X + 0,0906$	0,9775
i1	$Y = 13,4X + 0,0228$	0,9916
i2	$Y = 15,95X + 0,0279$	0,9928

Resultados y discusión

Al interpolar, se encontraron concentraciones de 0,0041 mM para las AuNPt-INH, 0,0326 para AuNPt-i1, 0,0266 mM para AuNPt-i2, y 0,0029 mM para AuNPc-INH, evidenciando la escasa presencia de péptidos libres en el conjugado obtenido y que, en las mismas condiciones de diálisis, la unión de INH a las AuNP es mayor que la de i2 y la unión de i2 mayor que la de i1. Como se observa en la figura 21, esto podría deberse a un fenómeno de repulsión de cargas entre la superficie de la AuNP y al aspártico presente en cada péptido, así, a mayor distancia AuNP-aspártico, menor repulsión, mayor facilidad de conjugación, y menor cantidad de péptido libre post-diálisis. Por tanto, la facilidad de conjugación de mayor a menor sería: $\text{INH} > \text{i2} > \text{i1}$.

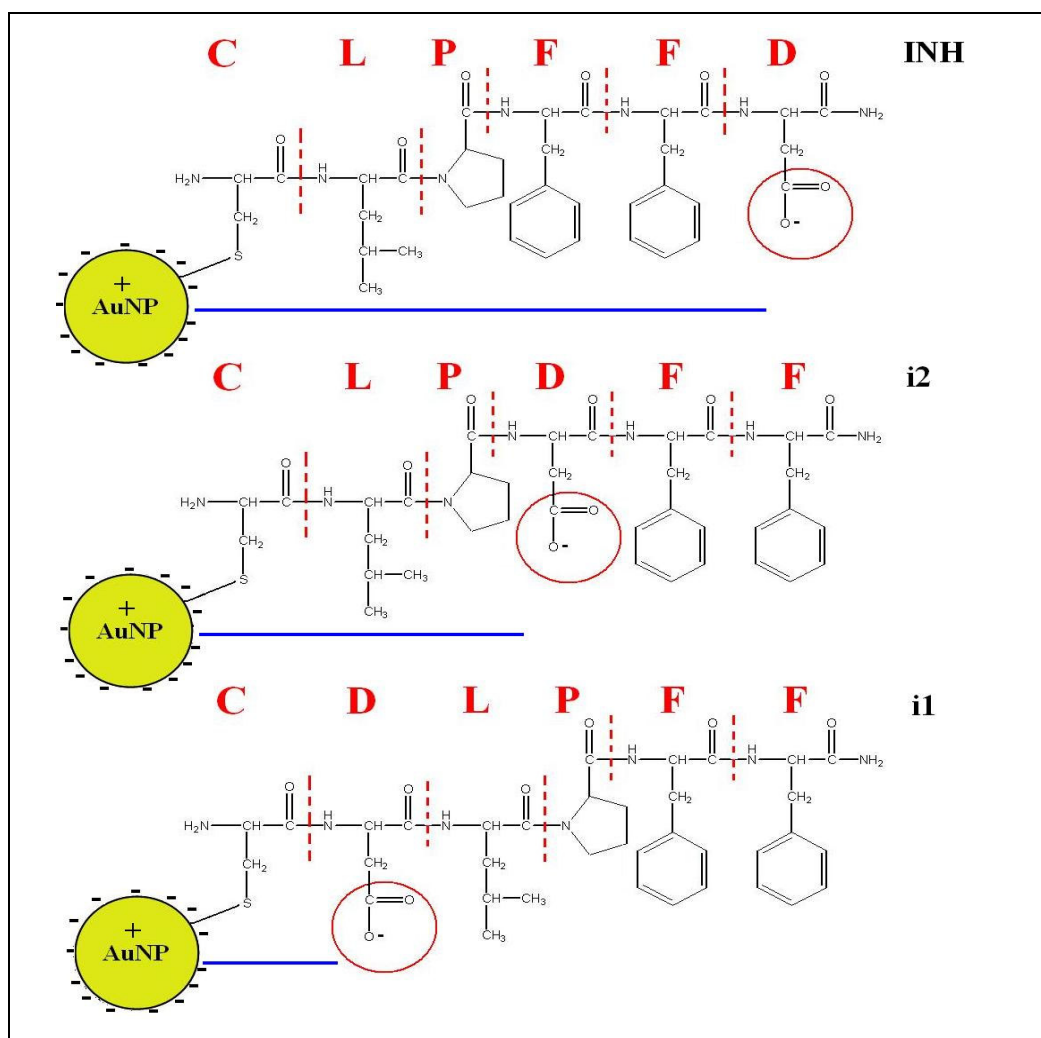


Figura 21. Representación teórica de las distancias (líneas azules) entre las cargas negativas de los distintos péptidos (INH, i2, i1) y las cargas negativas de la superficie de las AuNP. A menor tamaño de las bandas azules mayor repulsión AuNP-Péptido y por tanto, mayor dificultad de interacción.

Resultados y discusión

Posterior a la centrifugación, remoción del sobrenadante y ulterior lavado de las muestras con citrato 1,2 mM, se obtuvieron cantidades no detectables de tioles libres que evidencian la ausencia de péptidos no unidos en las muestras analizadas. Cabe señalar que al realizar el ensayo de Ellman a las AuNPc se observa una interferencia posiblemente debida a la presencia de β -ciclodextrinas. Al realizar un blanco de reactivos, se encontró que las β -ciclodextrinas reaccionan levemente con el DTNB (resultados no mostrados). Por otra parte, destáquese que algunas de las soluciones aumentaron su λ máximo de absorción (datos no mostrados) al ser sometidas a más de dos centrifugaciones y reconstituciones con citrato 1,2 mM, por lo que el proceso de centrifugación puede afectar la estabilidad de las partículas si no se realiza con cuidado.

Determinación de la presencia de oro unido a azufre por XPS: El análisis de la muestra de AuNPt-INH a través de este ensayo permitió establecer la proporción de átomos de oro que se encuentran unidos al azufre en la superficie de los conjugados de AuNP-Péptidos al observar los picos característicos del oro que, al ajustarlos, mostraron la presencia de los picos correspondientes al oro unido a azufre (20%) y a oro sin unir (80%) como se muestra en la figura 22.

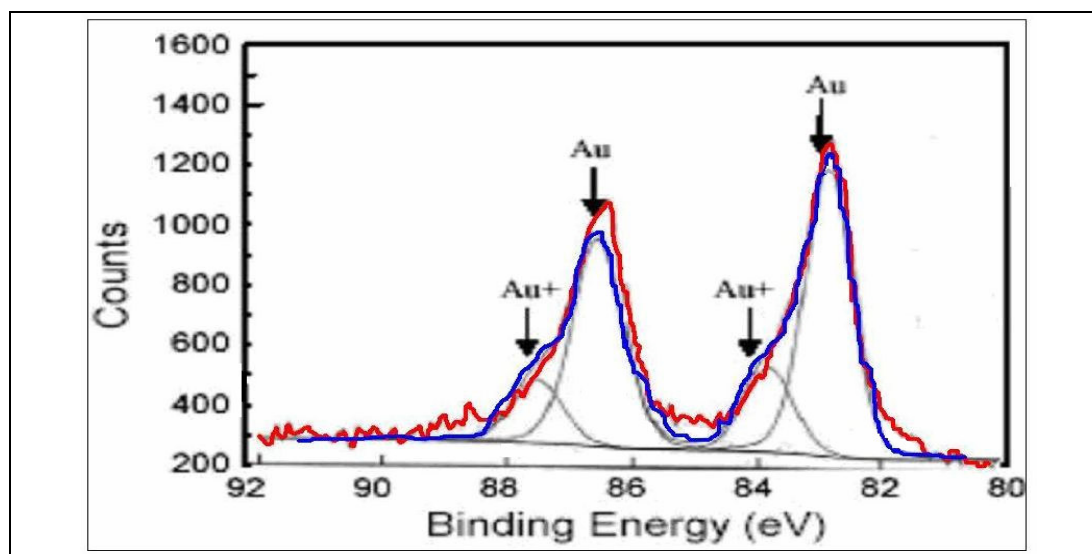


Figura 22. Espectro de XPS para AuNP-INH. (A) Los picos en gris corresponden a simulaciones teóricas de Au solo (Au) y Au unido a azufre (Au+) que juntas dan paso a la simulación en azul. La simulación teórica resultante de la suma de los picos de Au y Au+ (azul) coincide con el espectro obtenido experimentalmente (rojo), encontrándose proporciones relativas de oro libre y Au unido a azufre de 4:1.

Resultados y discusión

Estimación del grado de recubrimiento peptídico de AuNPt con INH, i1, e i2: Para establecer el número de moléculas de péptido por nanopartícula se realizó paralelamente una determinación de la concentración de nanopartículas en las muestras del conjugado y un AA del mismo, luego de la diálisis y centrifugación. Así, la concentración de nanopartículas se obtuvo empleando la ley de Beer ($A = abc$, donde A corresponde a la absorbancia, a , a la absorptividad molar, b al ancho de cubeta y c a la concentración) después de medir los conjugados en el espectrofotómetro, y el número de moléculas de péptido por AuNP se estimó a través de un AA a los conjugados para luego dividir la concentración de péptidos por la concentración de nanopartículas en la muestra del conjugado en la solución original (antes de la centrifugación y la diálisis). La estimación del número de moléculas de péptido por nanopartícula (Péptido/AuNP) se encuentra en la tabla 4 y es congruente con los datos encontrados a través de XPS ya que la superficie de la partícula de oro no está completamente recubierta.

Conjugado	AuNP (μM)	Péptido (μM)*	Péptido/AuNP	a ($\text{cm}^{-1}\text{mol}^{-1}\text{L}$)
AuNPt-INH	0,25	5,4	21,6	$3,8 \times 10^8$
AuNPt-i1	0,178	1,8	10,1	$3,8 \times 10^8$
AuNPt-i2	0,2	2,85	14,3	$3,8 \times 10^8$

*Referidos a la solución original antes de la diálisis y la centrifugación.

Obsérvese en la tabla 4 que la cantidad de péptido por AuNPt, de mayor a menor, es INH>i2>i1, lo que puede deberse a la repulsión producida por la cercanía o lejanía del aminoácido aspártico respecto de la superficie negativa de la AuNPt al pH de conjugación (figura 21), fenómeno comparable con la cantidad de péptido libre en la muestra, tópico que previamente fue analizado.

3.3. Estabilidad

Estabilidad frente a diferentes pHs y concentraciones de NaCl: La absorbancia del plasmón de las AuNP de 10 nm se presenta a los 520 nm. Este valor puede verse afectado por la forma de las AuNP, y se ha observado que existe una relación directa entre la agregación de las AuNP y el desplazamiento de este valor hacia longitudes mayores, lo que nos permite evaluar la estabilidad a través de espectroscopía UV-Visible. Los resultados obtenidos muestran que las AuNPt tienen mayor estabilidad a pHs 6 a 10 (figura 23, gráfica A), lo que puede explicarse debido a que la carga negativa de los residuos de citrato que las cubren se ve realzada a pHs básicos, aumentando las fuerzas de repulsión entre ellas. Los conjugados de AuNPt también presentan la misma tendencia, a pesar de que existe una leve desestabilización a pH 10 en las AuNPt-i1 y AuNPt-i2. En este último caso, pese a que la carga negativa de los péptidos provoca un aumento del potencial zeta a este pH, la repulsión tiende a ser pronunciada inestabilizando levemente el sistema por exceso de cargas.

Analizando la gráfica A de la figura 23, se observa además que el sistema AuNPt (longitud máxima de absorción de 520 nm) permanece estable a todos los pHs, siendo el cambio de la longitud máxima de absorción muy poco significativo a pHs 3 y 5 (gráfica A, figura 23). En cambio, las AuNPt-INH (gráfica B, figura 23, longitud máxima de absorción de 528 nm) se desestabilizan notoriamente a pH 3 y levemente a pH 5. Este hecho podría deberse al predominio de una carga positiva en el amino terminal de la cisteína a estos pHs (el punto isoeléctrico del péptido en solución es 6,1) con la consecuente anulación de las cargas negativas de superficie de partícula y desestabilización del sistema. Puede apreciarse además que la estabilidad a pH 3 de las AuNPt-i1 (gráfica C, figura 23, longitud máxima de absorción de 528 nm), comparada con la estabilidad a este mismo pH de AuNPt-INH (gráfica B, figura 23) y AuNPt-i2 (gráfica D, figura 23) es superior, lo que sugiere que la cercanía entre el grupo carboxílico del aspártico y el grupo amino de la cisteína, y de éstos a su vez, a la superficie de la partícula en AuNPt-i1 ($\text{AuNP}^- + \text{C}^{(\text{COOH})}\text{DLPPFNH}_2$), podría conferir cierto grado de estabilidad debido a un posible equilibrio entre las cargas, lo que no ocurriría con la misma fuerza en AuNPt-i2 debido a que se alejaría el grupo carboxílico del aspártico del grupo amino de la cisteína ($\text{AuNP}^- + \text{CLP}^{(\text{COOH})}\text{DFFNH}_2$).

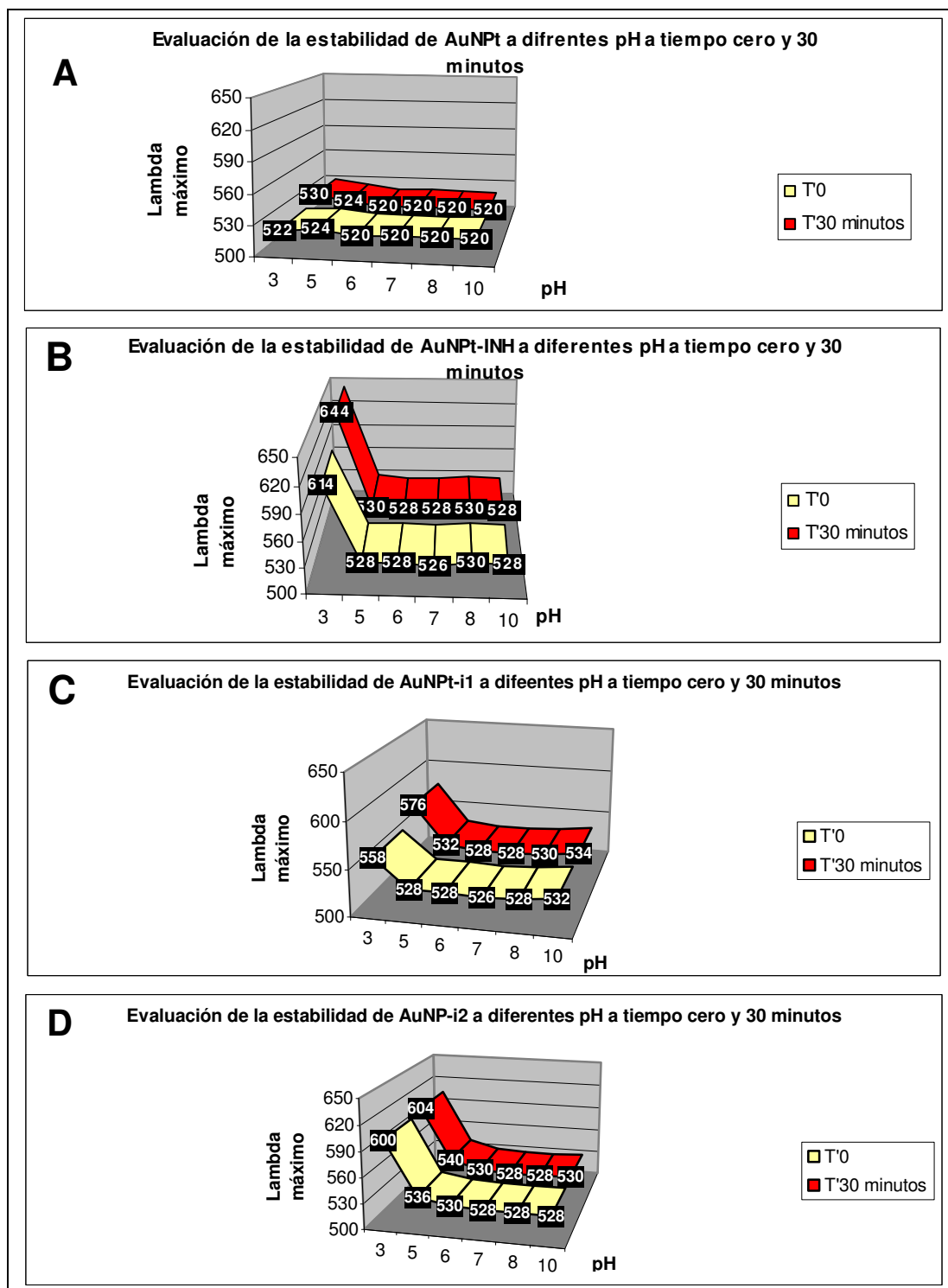


Figura 23. Variación del lambda máximo de absorción en función del pH a tiempo cero (T'0) y 30 minutos (T'30) para AuNPt (A), AuNPt-INH (B), AuNPt-i1 (C) y AuNPt-i2 (D).

Resultados y discusión

Las muestras de AuNPc y AuNPc-INH (lambdas máximos de absorción de 520 nm para ambas) evidencian tendencias similares a las AuNPt como se observa en la figura 24, es decir, presentan estabilidad por sobre el pH 7 (figura 24, graficas A, B) y a pH 3 son más estables sin conjugar (gráfica A, figura 24) que con inhibidor (gráfica B, figura 24), lo que nos indica que a tamaños pequeños el patrón de comportamiento de las AuNPc es similar al de las AuNPt al someterlas a la conjugación con INH.

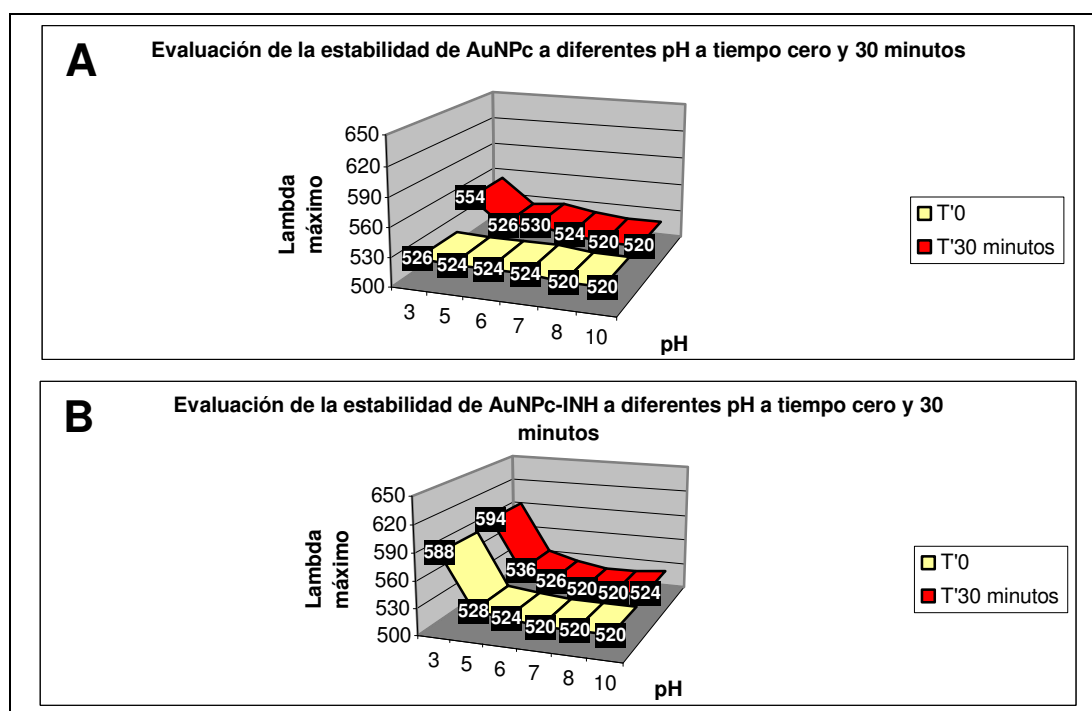


Figura 24. Variación del lambda máximo de absorción en función del pH a tiempo cero (T'0) y 30 minutos (T'30) para AuNPc (A), AuNPc-INH (B).

A diferentes concentraciones de NaCl, las AuNPt (gráfica A, figura 25) mostraron estabilidad a concentraciones inferiores a 20 mM y las AuNPt-INH (gráfica B, figura 25) a concentraciones menores a 60 mM. Se observó que los conjugados de AuNPt con i1 (gráfica C, figura 25) e i2 (gráfica D, figura 25), fueron más estables que los conjugados obtenidos con INH a diferentes concentraciones de NaCl, lo que podría deberse a que los isómeros tienen el aminoácido aspártico menos expuesto que el péptido INH, lo que haría más difícil la interacción de este residuo con las cargas del medio haciendo a su vez más difícil la anulación de las cargas del conjugado y la consecuente precipitación como producto de este fenómeno. Así, la

Resultados y discusión

estabilidad estaría dada de acuerdo al siguiente orden: AuNPt-i1 > AuNPt-i2 > AuNPt-INH. La estabilidad de AuNPt-i1 e i2, se mantuvo a concentraciones menores a 100 mM.

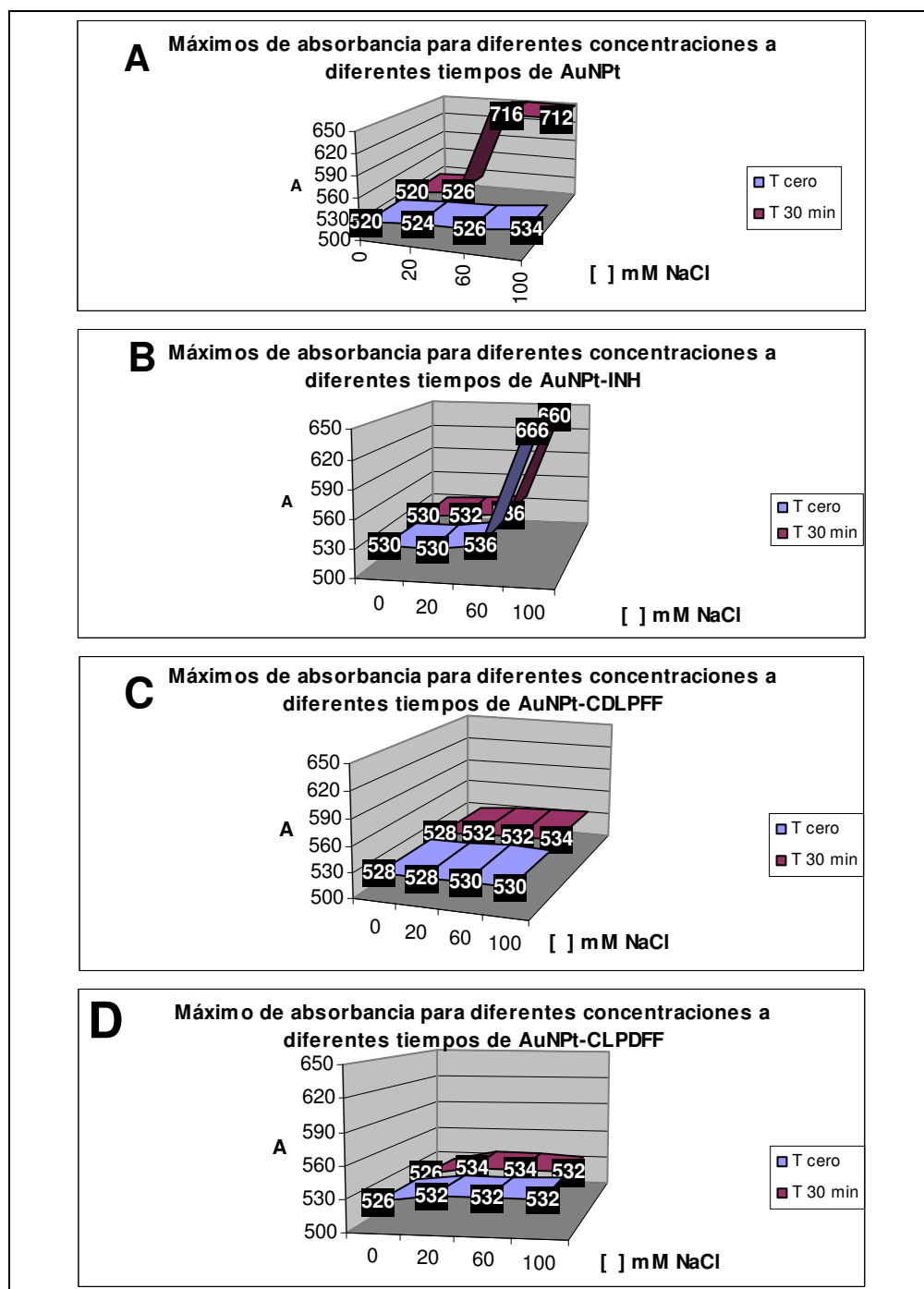


Figura 25. Lambdas máximos de absorbancia de AuNPt (A) y sus conjugados con INH (B), i1 (C), i2 (D) a diferentes concentraciones de NaCl a tiempo 0 y 30 minutos

Resultados y discusión

Por otra parte, las AuNPc (gráfica A, figura 26) y las AuNPc-INH (gráfica B, figura 26) muestran mayor estabilidad frente a las diferentes concentraciones de NaCl respecto de las AuNPt (figura 25, gráfica A y B) bajo las mismas condiciones, lo que podría deberse a un efecto protector de las moléculas de β -ciclodextrinas probablemente adsorbidas sobre la superficie de la partícula. Posiblemente la presencia de β -ciclodextrinas protege la capa de citrato manteniendo a las AuNPc en estado coloidal. Es importante destacar que las AuNPc-INH son levemente inestables a concentraciones elevadas de NaCl (figura 26, gráfica B) a diferencia de lo que ocurre con AuNPt-INH a partir de 60 mM (figura 25, gráfica B), lo que podría explicarse por el efecto protector de las ciclodextrinas adsorbidas sobre la superficie.

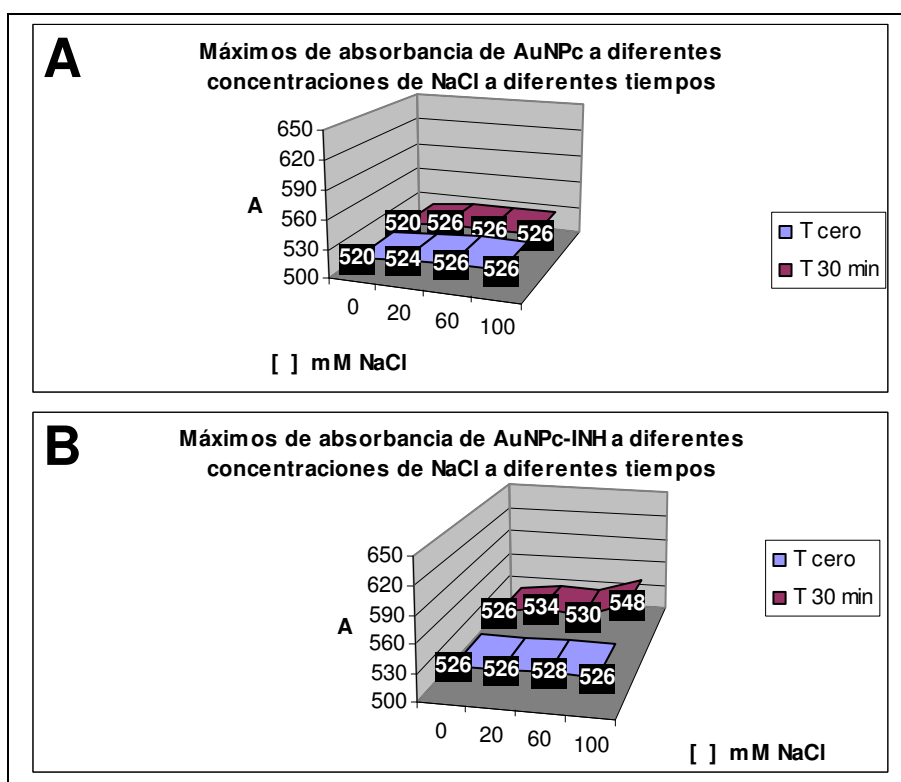


Figura 26. Estabilidad de las AuNPc frente a NaCl. Máximos de absorción de AuNPc y AuNPc-INH a diferentes concentraciones de NaCl a tiempo 0 y 30 minutos.

Estabilidad a -20 °C: El análisis de las muestras de AuNPt por espectrofotometría UV-Visible mostró un pico de absorción máximo de 520 nm, antes de la congelación, y un pico de 802 nm después de ella. Las AuNPc mostraron picos de absorción máximos de 520 nm antes de

Resultados y discusión

la congelación y 526 nm después de ella (figura 27), por lo que puede concluirse que el grado de estabilidad de las AuNPc es mayor que el de las AuNPt. Por otra parte, los conjugados AuNPt-INH, AuNPt-i1, AuNPt-i2 y AuNPc-INH, mostraron picos de absorción máximos, antes de la congelación, de 528 nm, 528 nm, 526 nm y 526 nm respectivamente (figura 28). Al descongelar las muestras al día siguiente, mostraron picos de absorción de 530 nm, 534 nm, 528 nm y 530 nm respectivamente (figura 28). Los cambios son mínimos, por lo cual se puede concluir de este ensayo preliminar que la conjugación les da estabilidad frente al proceso de congelación y posterior descongelación. En conclusión las AuNPc y las AuNP unidas a péptidos presentan mayor estabilidad en este ensayo que las AuNPt sin conjugar.

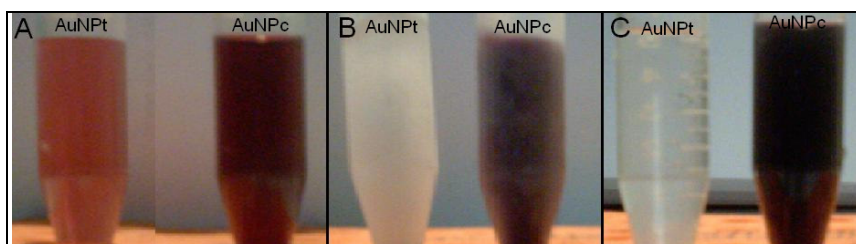


Figura 27. Estabilidad a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ de AuNPt y AuNPc. Las partículas a temperatura ambiente (A) fueron llevadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas (B) y posteriormente descongeladas hasta aproximadamente $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (C).

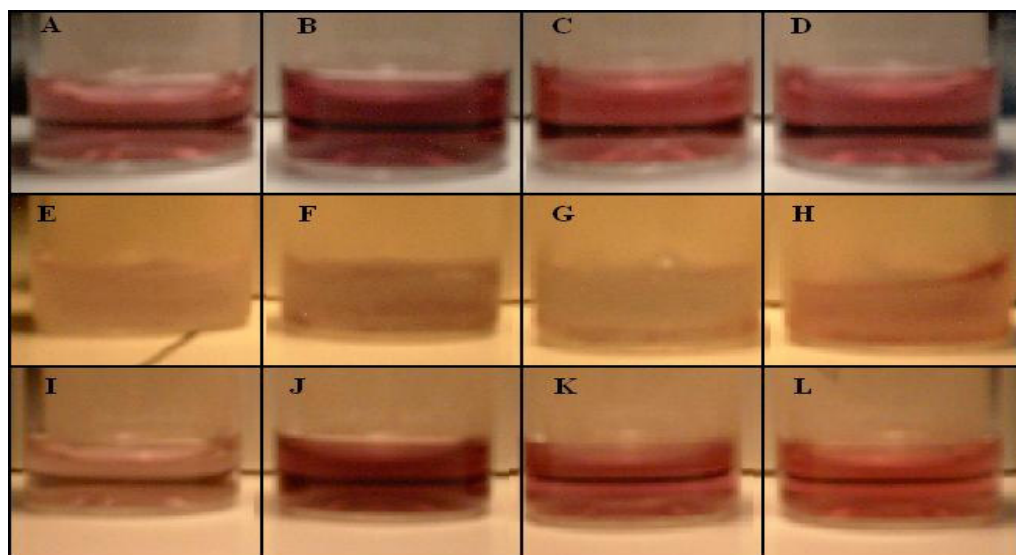


Figura 28. Estabilidad a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ de AuNPt-INH (A, E, I), AuNPc-INH (B, F, J), AuNPt-i1 (C, G, K), y AuNPt-i2 (D, H, L). Las partículas a temperatura ambiente (A, B, C, D) fueron llevadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas (E, F, G, H) y posteriormente descongeladas hasta aproximadamente $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (I, J, K, L).

3.4. Interacción de AuNpt-Péptidos con $A\beta_{1-42}$

Los datos arrojados por TEM muestran que existe interacción entre el conjugado AuNpt-INH y las fibras de $A\beta_{1-42}$ (figura 29, imagen B), no observándose interacción de las fibras con las AuNP sin conjugar (figura 29, imagen A). Por otra parte, las AuNpt conjugadas con los isómeros i1 (figura 29, imagen C) e i2 (figura 29, imagen D) muestran también afinidad por las fibras de $A\beta_{1-42}$, dando una idea de que la afinidad de los isómeros de INH no fuese dependiente de la secuencia, sin embargo, habría que determinar el grado de unión de estos conjugados con las fibras amiloides, siendo este un tópico aún por explorar. Posiblemente la interacción de i1 e i2 (CDLPFFNH₂, CLPDDFFNH₂ respectivamente) se deba a la presencia de los residuos de leucina y fenilalanina que permiten la adhesión del péptido a las moléculas de $A\beta_{1-42}$ pertenecientes a las fibras amiloides, en especial en i1 que conserva la secuencia LPFF.

En el futuro deberán probarse otras sustancias, como peptidomiméticos o anticuerpos, que permitan aumentar la selectividad de las AuNP por $A\beta_{1-42}$ respecto de otras macromoléculas biológicas. Asimismo es importante que se estudie la interacción de los conjugados con agregados de $A\beta_{1-42}$ de bajo peso molecular.

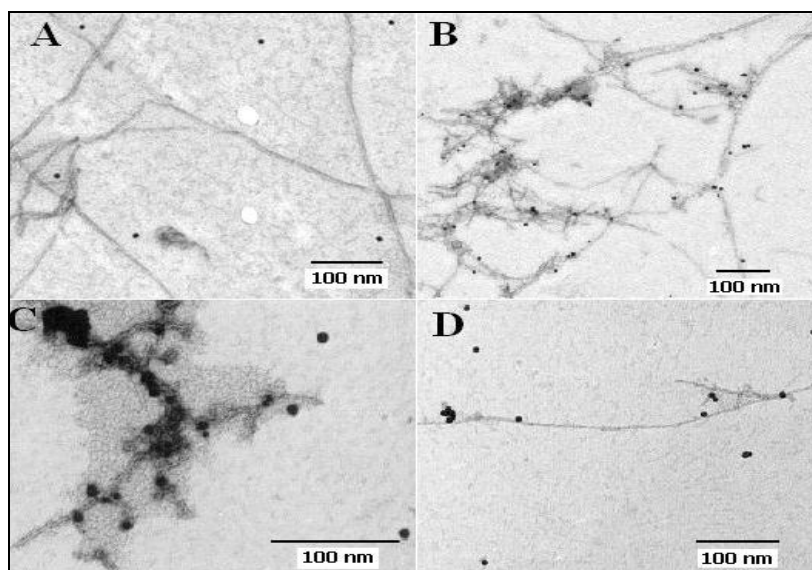


Figura 29. Interacción entre las fibras de $A\beta_{1-42}$ y AuNpt (A), AuNpt-INH (B), AuNpt-i1 (C), AuNpt-i2 (D). Muestras incubadas por 7 días. Fotos tomadas por TEM.

CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES

Se obtuvieron AuNP de 6 y 10 nm y se demostró que las AuNPt y las AuNPc se conjugan efectivamente a los péptidos INH, i1 e i2. Igualmente, los conjugados AuNP-INH son estables en medios acuosos a pHs que se aproximan a los fisiológicos y a concentraciones de NaCl cercanas a 100 mM además de unirse considerablemente a los agregados tóxicos de $A\beta_{1-42}$ en comparación con las AuNP sin conjugar, observándose que los conjugados de péptidos i1 e i2 también se unen a las fibras amiloides. En este último aspecto cabe señalar que i1 parece ser otro excelente candidato para esta nueva estrategia terapéutica debido a que no sólo evidenció interactuar con las fibras de $A\beta_{1-42}$, sino que también mostró ser más estable que el resto de los conjugados. Esto puede deberse a que el cambio en la secuencia sólo acerca el aspártico a la superficie de la partícula y aumenta la estabilidad (ver resultados y discusión), pero no modifica la secuencia fundamental para la interacción (LPFF) con las fibras de $A\beta_{1-42}$.

Por otra parte, los datos obtenidos muestran que las modificaciones efectuadas al péptido LPFFDNH₂ que dieron origen a INH, y la conjugación a AuNPt, no impiden la unión del péptido con los agregados amiloides, lo que hace de INH una excelente lanzadera para dirigir las AuNP hacia los agregados de $A\beta_{1-42}$, en especial si se considera que LPFFDNH₂ ha mostrado atravesar satisfactoriamente la BHE (30). Además, al ser los conjugados estables a pHs cercanos a los fisiológicos y al aumentar su estabilidad a diferentes concentraciones de NaCl cuando la secuencia peptídica manifiesta una corta distancia entre el aspártico y la superficie de la AuNPt, proyectan este trabajo hacia un posible uso terapéutico en el futuro.

El empleo de técnicas que permitan la obtención limpia de AuNP de diámetros del orden de los 2 a 3 nm, la evaluación de la toxicidad *in Vitro* e *in Vivo* de los conjugados, y probar su traspaso efectivo a través de barreras biológicas, son algunas de las tareas que seguirán a este trabajo, y aún cuando es cierto que el tamaño de los conjugados obtenidos en esta tesis no es el indicado para una excreción renal si nos ubicamos en el contexto del *clearance* farmacológico de éstos, este trabajo entrega bases sólidas para los futuros pasos que se darán en nuestro laboratorio en este respecto. En consecuencia, el surgimiento de esta suerte de "cirugía

Conclusiones y proyecciones

molecular" basada en los hallazgos de esta tesis, abriría las puertas hacia una nueva etapa en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y otras EC.

Ahora bien, de cara al futuro, los estudios de toxicidad deben considerar no sólo la capacidad lesiva de los conjugados y sus residuos de síntesis, sino también la de las especies de menor peso molecular que se originarán una vez realizada la cirugía molecular, ya que de resultar tóxicos, la estrategia sería inviable.

En cuanto a la accesibilidad de la población a esta nueva estrategia terapéutica, no deja de ser importante lo relacionado al costo del tratamiento, sin embargo, este es un punto que debe evaluarse una vez alcanzados los objetivos del proyecto madre, ya que debe considerarse la maquinaria, la mano de obra, materiales, y otros aspectos que no forman parte de esta primera etapa. Bástenos decir por ahora que la preparación de 107 mL de AuNPt no supera los \$ 30.000 pesos Chilenos en materiales.

La aplicación de esta estrategia terapéutica puede ser variada debido al número de patologías que siguen el mismo patrón, sin embargo, la viabilidad de la aplicación para cada una de ellas requerirá de estudios de toxicidad para las especies de menor peso molecular que se formen una vez realizada la cirugía molecular.

Finalmente, es de mencionar que esta memoria dio origen a las siguientes jornadas, congresos, y publicaciones:

- “Obtención de conjugados péptido-nanopartícula de oro para el desarrollo de una nueva estrategia para el tratamiento de enfermedades conformacionales”. Medina E., Medina G., Kogan M. VI Jornadas de Investigación en Ciencias y Tecnología. Santiago, marzo 2005.
- “Evaluación de la toxicidad de conjugados de péptidos-nanopartículas de oro con potenciales usos para el tratamiento de enfermedades conformacionales”. Medina G., Medina E., Muñoz J.P., Kogan M. XXVII Congreso de Farmacología. Huechuraba, noviembre 2005.

Conclusiones y proyecciones

- “Desarrollo y evaluación de la toxicidad de nuevos conjugados de péptidos y nanopartículas metálicas para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer”. Medina E., Medina G., Kogan M. Congreso de la Sociedad Chilena de Química. Concepción, enero 2006.
- “Evaluación de la toxicidad de conjugados péptido-nanopartículas metálicas con potencial uso para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer”. Medina G., Muñoz J.P., Medina E., Guerrero A., Olmedo I., Marambio H.P., Espinoza G., Pannes O., Kogan M. VII Jornadas de Investigación en Ciencias y Tecnología. Santiago, abril 2006.
- Actualmente se encuentra en redacción una publicación para una revista ISI.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) ROHER A.E. "et al". Morphology and toxicity of A β -(1-42) dimer derived from neuritic and vascular amyloid deposits of Alzheimer's disease. J. Biol. Chem., 271 (34): 20631-20635, 1996.
- (2) PERUTZ M.F. Glutamine repeats and inherited neurodegenerative diseases: molecular aspects. Curr. Opin. Struct. Biol., 6 (6): 848-858, 1996.
- (3) PRUSINER S.B. Prions. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 95 (23): 13363-13383, 1998.
- (4) SIPE J.D. Amyloidosis. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci., 31 (4): 325-354, 1994.
- (5) KAYED R. "et al". Conformational transitions of islet amyloid polypeptide (IAPP) in amyloid formation in vitro. J. Mol. Biol., 287 (4): 781-796, 1999.
- (6) CONWAY K.A., Harper J.D., Lansbury P.T. Fibrils formed in vitro from alpha-synuclein and two mutant forms linked to Parkinson's disease are typical amyloid. Biochemistry, 39 (10): 2552-2563, 2000.
- (7) STEFANI M., Dobson C.M. Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. J. Mol. Med., 81 (11): 678-699, 2003.
- (8) KELLY J.W. The environmental dependency of protein folding best explains prion and amyloid diseases. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 95 (3): 930-932, 1998.
- (9) ST GEORGE-HYSLOP P.H. Piecing together Alzheimer's. Sci. Am., 283 (6): 76-83, 2000.
- (10) KISILEVSKY R., Fraser P.E. A β amyloidogenesis: unique, or variation on a systemic theme? Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol., 32 (5): 361-404, 1997.
- (11) SELKOE D.J. The molecular pathology of Alzheimer's disease. Neuron, 6 (4): 487-498, 1991.
- (12) SMALL G. W. The pathogenesis of Alzheimer's disease. J. Clin. Psychiatry., 59 (9): 7-14, 1998.
- (13) FINDEIS M. A., Peptide inhibitors of beta amyloid aggregation. Curr. Top. Med. Chem. 2: 417-423, 2002.
- (14) CAUGHEY B., Lansbury P.T. Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. J. Annu. Rev. Neurosci., 26: 267-98, 2003.

Bibliografia

- (15) ARIMON M. "et al". Fine structure study of A β 1-42 fibrils with atomic force microscopy. FASEB J., 19 (7): doi: 10.1096/fj.04-3137fje, 2005.
- (16) LORENZO A. "et al". Amyloid beta interacts with the amyloid precursor protein: a potential toxic mechanism in Alzheimer's disease. Nat. Neurosci., 3 (5): 460-464, 2000.
- (17) PEPYS M.B "et al". Targeted pharmacological depletion of serum amyloid P component for treatment of human amyloidosis. Nature, 417 (6886): 254-259, 2002.
- (18) FISCHER N.O. "et al". Inhibition of chymotrypsin through surface binding using nanoparticle-based receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 99 (8): 5018-5023, 2002.
- (19) MCINTOSH C.M. "et al". Inhibition of DNA transcription using cationic mixed monolayer protected gold clusters. J. Am. Chem. Soc., 123 (31): 7626-7629, 2001.
- (20) WANG G.L., Zhang J., Murray R.W. DNA binding of an ethidium intercalator attached to a monolayer-protected gold clusters. Anal. Chem., 74 (17): 4320-4327, 2002.
- (21) GEARHEART L.A., Ploehn, H.J., Murphy, C.J. (2001) Oligonucleotide adsorption to gold nanoparticles: A surface enhanced Raman spectroscopy study of intrinsically bent DNA. J. Phys. Chem. B, 105 (50): 12609-12615, 2001.
- (22) SANDHU K.K., "et al". Gold nanoparticle mediated transfection of mammalian cells. Bioconjug. Chem., 13 (1): 3-6, 2002.
- (23) O'BRIEN J., Lummis, S.C.R. An improved method of preparing microcarriers for biolistic transfection. Brain Res. Protoc., 10 (1): 12-15, 2002.
- (24) MUANGMOONCHAI R. "et al". Transfection of liver in vivo by biolistic particle delivery: its use in the investigation of cytochrome P450 gene regulation. Mol. Biotechnol., 20 (2): 145-151, 2002.
- (25) ALEXIOU C. "et al". Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting. Cancer Res., 60 (23): 6641-6648, 2000.
- (26) HERGT R "et al". Physical limits of hyperthermia using magnetite fine particles. IEEE Trans. Magn., 34 (5): 3745- 3754, 1998.
- (27) PANKHURST Q.A. "et al". Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. J Phys D- Appl. Phys., 36 (13): R167-R181, 2003.
- (28) KOGAN MJ "et al". Nanoparticle-Mediated Local and Remote Manipulation of Protein Aggregation. Nano Lett., 6 (1): 110-115, 2006.
- (29) SOTO C. "et al". Beta-sheet breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis: Implications for Alzheimer's therapy. Nat. Med., 4 (7): 822-826, 1998.

Bibliografía

- (30) BIELER S., Soto C., Beta-Sheet breakers for Alzheimer's disease therapy. Curr. Drug Targets, 5 (6): 553-558, 2004.
- (31) MARTIN A. Colloids. En su: Physical Pharmacy. 4th edition. U.S.A., Lippincott Williams & Wilkins, 1993. pp. 393-422.
- (32) GANNONG W. Circulación a través de regiones especiales. En su: Fisiología Médica. 14^a edición. México, Editorial El manual moderno, 1994. pp. 647-669.
- (33) BERRY C.C., Curtis A.S.G. Functionalization of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. J Phys D-Appl. Phys., 36 (13): R198-R206, 2003.
- (34) HILLYER J.F., Albrecht R.M. Gastrointestinal persorption and tissue distribution of differently sized colloidal gold nanoparticles. J. Pharm. Sci., 90 (12): 1927-1936, 2001.
- (35) VANGELDER W. "et al". Transcytosis of 6,6-nm gold-labeled transferrin: an ultrastructural study in cultured porcine blood-brain barrier endothelial cells. Brain Res., 746 (1-2): 105-116, 1997.
- (36) TURKEVICH J, Stevensen P.C., Hillier J., Nucleation and growth process in synthesis of colloidal gold. Discuss Faraday Soc., 11: 55-75, 1951.
- (37) DANIEL MC., Astruc D. Gold Nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, quantum size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. Chem. Rev., 104 (1): 293-346, 2004.
- (38) LIU Y. "et al". Control of the size and distribution of gold nanoparticles by unmodified cyclodextrins. Chem. Mater., 15 (22): 4172-4180, 2003.
- (39) SHIPWAY A.N. "et al". Investigations into the electrostatically induced aggregation of Au nanoparticles. Langmuir, 16 (23): 8789-8795, 2000.
- (40) BOHINSKY R. Aminoácidos y péptidos. En su: Bioquímica. 5^a edición. U.S.A. Addison-Wesley Iberoamericana, 1991. pp 63-111.
- (41) FERNÁNDEZ A., Explorando los cambios conformacionales de péptidos ricos en prolina mediante microscopía de fuerza atómica. Master experimental en química orgánica. Barcelona, España. Universidad de Barcelona, Departamento de Química Orgánica, 2004. Página 9.
- (42) LEVY R. "et al". Rational and combinatorial design of peptide capping ligands for gold nanoparticles. J. Am. Chem. Soc., 126 (32): 10076-10084, 2004.
- (43) ZHU T. "et al". Surface modification of citrate-reduced colloidal gold nanoparticles with 2-mercaptosuccinic acid. Langmuir, 19 (22): 9518-9525, 2003.

Bibliografia

- (44) ZANCHET "et al". Electrophoretic isolation of discrete Au nanocrystal/DNA conjugates. Nano Lett., 1 (1): 32-35, 2001.
- (45) SELKOE D.J. Neuroscience-Alzheimer's disease: Genotypes, phenotypes, and treatments. Science, 275 (5300) : 630-631, 1997.
- (46) Bitan G., Temprow D.B. Preparation of aggregate-free, low molecular weight amyloid- β for assembly and toxicity assays. En: SINGURDSSON E.M. Amyloid Proteins: Methods and protocols. U.S.A. Humana Press, 2005. pp. 3-9.
- (47) FAN J., Chen S., Gao Y., Coating gold nanoparticles with peptide molecules via a peptide elongation approach. Colloids surf. B Biointerfaces, 28 (2-3): 199-207, 2003.