

# UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***Nanopartículas plasmónicas para la detección de agregados del péptido  $\beta$ -amiloide mediante fluorescencia aumentada por superficie***

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en Bioquímica área de Especialización en Toxicología y Diagnóstico Molecular y Memoria para optar al Título de Químico Farmacéutico por:

***Pablo Ignacio Cabrera Pino***

Directores de Tesis:

Dr. Marcelo Kogan

Dra. Rebeca Aldunate

Santiago-CHILE

Abril 2020

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER**

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

**Pablo Ignacio Cabrera Pino**

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Toxicología y Diagnóstico Molecular y Título de Químico Farmacéutico, en el examen público rendido el día

---

**Directores de Tesis:**

**Dra. Marcelo Kogan** \_\_\_\_\_

**Dra. Rebeca Aldunate** \_\_\_\_\_

**Comisión Evaluadora de Tesis:**

**Dr. Mauricio Baez (Presidente)** \_\_\_\_\_

**Dra. Soledad Bollo** \_\_\_\_\_

**Dra. Alicia Minniti** \_\_\_\_\_

## Asistencia a congresos

1. **Pablo Cabrera**, María Paz Oyarzún, Pedro Jara-Guajardo, Freddy Celis, Marcelo Campos, Rebeca Aldunate, Marcelo J. Kogan, Nanopartículas Plasmónicas para la detección del péptido Ab *in vivo*, mediante espectroscopía Raman y por fluorescencia, 1er Congreso Chileno de Espectroscopia RAMAN, CHILE, Santiago, 2020.
2. **Pablo Cabrera**, María Paz Oyarzún, Mónica Soler, Pedro Jara-Guajardo, Rebeca Aldunate, Marcelo J. Kogan, Nanopartículas de oro funcionalizadas con el peptido D1 para el desarrollo de una herramienta para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer: evaluación *in vivo*, Jornadas Chilenas de Química, CHILE, Puerto Varas, 2020.
3. P. Jara-Guajardo, M. Oyarzún, **P. Cabrera**, F. Morales-Zavala, N. Parra, M. Soler, M.J. Kogan, Nanopartículas plasmónicas para la detección de agregados de beta amiloide., XXIII Jornadas Chilenas de Química, CHILE, Santiago, 2020.
4. **Pablo Cabrera**, María Paz Oyarzún, Pedro Jara-Guajardo, Mónica Soler, Rebeca Aldunate, Marcelo Kogan, Nanopartículas de oro funcionalizadas con péptido D1 como potencial herramienta diagnóstica para enfermedad de Alzheimer, 3er Workshop "Péptidos Terapéuticos para Bioaplicaciones", CHILE, Valparaíso, 2019.
5. **Pablo Cabrera**, María Paz Oyarzún, Mónica Soler, Pedro Jara-Guajardo, Rebeca Aldunate, Marcelo J. Kogan, Gold nanoparticles enhance the fluorescence of CRANAD dye for the detection of beta- amyloid aggregates *in vivo*., XXXIII Reunión Anual Sociedad de Biología Celular de Chile, CHILE, Puerto Varas, 2019.
6. **Pablo Cabrera**, Catalina de la Fuente, María Paz Oyarzún, Pedro Jara-Guajardo, Francisco Morales-Zavala, Alejandra Álvarez, Rebeca Aldunate, Marcelo J. Kogan, Nanopartículas plasmónicas para la detección de beta amiloide mediante fluorescencia aumentada por superficie, V Congreso de Nanotecnología, CHILE, Pucón, 2018.
7. María Paz Oyarzún, **Pablo Cabrera**, Pedro Jara, Mónica Soler, Marcelo J. Kogan, Nanovarillas de oro recubiertas con sílice para incrementar el efecto SEF en la detección de beta amiloide, V Congreso de Nanotecnología, CHILE, Pucón, 2018.

## Publicaciones

1. Pedro Jara, **Pablo Cabrera**, Freddy Celis, Mónica Soler, Isadora Berlanga, Nicole Parra-Muñoz, Gerardo Acosta, Fernando Albericio, Marcelo Campos, Alejandra Alvarez, Francisco Morales-Zavala, Marcelo Kogan. Gold nanoparticles mediate improved detection of  $\beta$ -amyloid aggregates by fluorescence. *Nanomaterials*, 10, 4, 690.

## **Financiamiento.**

Esta tesis fue desarrollada en el Laboratorio de Nanobiotecnología y Nanotoxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile y en el Laboratorio de *C. elegans* de la Facultad de Ciencias, Universidad Santo Tomás. El trabajo fue financiado por el proyecto FONDECYT 1170929, Fondap 15130011, UST 34827, Fondecyt Postdoctoral 3180651 y Beca Magister Nacional CONICYT 22190752.



# Índice.

Asistencia a congresos .....	3
Publicaciones.....	3
Financiamiento. ....	4
Índice. ....	5
Índice de Figuras. ....	7
Índice de Tablas.....	9
Abreviaturas. ....	10
Resumen. ....	11
Abstract. ....	12
Introducción.....	13
Enfermedad de Alzheimer, etiología y péptido $\beta$ -amiloide. ....	13
Diagnóstico de la Enfermedad de Alzheimer. ....	16
Detección de agregados de $\beta$ -amiloide <i>in vivo</i> por fluorescencia. ....	17
Nanopartículas plasmónicas para aumentar la sensibilidad de detección de agregados de $\beta$ -amiloide. ....	23
Uso de nanopartículas plasmónicas y CRANAD para la detección de $\beta$ -amiloide.....	26
Direccionamiento de las nanopartículas de oro a agregados $\beta$ -amiloides.....	26
Hipótesis. ....	32
Objetivo general. ....	32
Objetivos Específicos.....	32
Metodología.....	33
Reactivos.....	33
Síntesis de nanovarillas de oro y modificación superficial con péptido D1. ....	33
Caracterización de nanopartículas metálicas.....	34
Dispersión dinámica de luz (DLS).....	34
Potencial Z.....	34
Espectroscopía UV-Visible-NIR. ....	35
Análisis de aminoácidos de NVO funcionalizadas. ....	35
Cultivo y crecimiento de cepas de <i>C. elegans</i> . ....	36
Incubación de <i>C. elegans</i> con CRANAD-2/58.....	37
Incubación de <i>C. elegans</i> con NVO-PEG-D1 o NVO-PEG. ....	37

Tinción con ThS.....	38
Evaluación de la incorporación de CRANAD en <i>C. elegans</i> mediante Fluorimetría.....	38
Análisis por microscopía de los animales tratados con CRANAD y NVO.....	39
Análisis estadístico.....	39
<b>Resultados.</b> .....	<b>40</b>
<b>Objetivo 1: Evaluar la señal fluorescente emitida por CRANAD-2 en la detección de agregados insoluble de A<math>\beta</math> en el modelo transgénico de <i>C. elegans</i> CI2102 al co-administrar NVO-PEG-D1, en distintas edades de los individuos tratados.</b> .....	<b>40</b>
<b>Caracterización de nanovarillas de oro.</b> .....	<b>40</b>
<b>Análisis de aminoácidos presentes en NVO funcionalizadas.</b> .....	<b>43</b>
<b>Evaluación de la internalización y de la toxicidad de CRANAD en <i>C. elegans</i>.</b> .....	<b>43</b>
<b>Evaluación <i>in vivo</i> del efecto de NVO-PEG o NVO-PEG-D1 en la señal fluorescente de CRANAD-2/58.</b> .....	<b>45</b>
<b>Objetivo 2: Detectar y cuantificar los oligómeros del péptido A<math>\beta</math> en el modelo <i>C. elegans</i> CL2006, mediante fluorescencia aumentada por superficie, al ser expuestos a CRANAD-58 y NVO-PEG-D1.</b> .....	<b>52</b>
<b>Discusión.</b> .....	<b>61</b>
<b>Conclusiones.</b> .....	<b>66</b>
<b>Bibliografía.</b> .....	<b>67</b>

## Índice de Figuras.

<b>Fig. 1 :</b> Prevalencia de demencias según edad en mayores de 60 años. ....	13
<b>Fig. 2:</b> El crecimiento en el número de personas con demencia (en millones) en países de bajos, medianos y altos ingresos. ....	14
<b>Fig. 3:</b> Imagen que muestra el procesamiento proteolítico de la proteína precursora de amiloide (APP). ....	15
<b>Fig. 4:</b> Estructura de la curcumina y de los curcuminoides CRANAD-2 y CRANAD-58. ....	18
<b>Fig. 5:</b> Ventana de absorción biológica de compuestos celulares. ....	19
<b>Fig. 6:</b> Representación de las diferentes especies de agregados de A $\beta$ monomérico, oligomérico y en fibrilla. ....	20
<b>Fig. 7:</b> Espectros de fluorescencia de CRANAD-2 sólo con agregados A $\beta$ 40 y con monómeros A $\beta$ 40 y monómeros A $\beta$ 42;. Dos sitios de unión aparentes para CRANAD-2 en los agregados de A $\beta$ 40; canal hidrofóbico formado por residuos de aminoácidos. ....	22
<b>Fig. 8:</b> El modelo de interacción entre CRANAD-58 y A $\beta$ . ....	22
<b>Fig. 9:</b> Diversas formas de nanopartículas de oro. ....	23
<b>Fig. 10:</b> Espectros de absorción de nanoesferas, nanovarillas y nanoprismas observar los diferentes máximos de absorción para las diferentes nanopartículas. Representación de un plasmón superficial localizado de una partícula esférica. ....	24
<b>Fig. 11:</b> Fluorescencia amplificada por superficie. ....	25
<b>Fig. 12:</b> Aumento de la fluorescencia de octadecil rodamina B (R18). ....	25
<b>Fig. 13:</b> Co-incubación de CRANAD-2/58 y NVO-PEG-D1 aumenta la señal fluorescente emitida por CRANAD-2/58 al unirse a agregados de A $\beta$ . ....	27
<b>Fig. 14:</b> Fluorescencia relativa de CRANAD-2 o CRANAD-58 al ser incubado con agregados de A $\beta$ <i>in vitro</i> en presencia y ausencia de NVO-PEG-D1 a distintas concentraciones aumenta la señal de fluorescencia emitida por CRANAD-2/58. ....	28
<b>Fig. 15:</b> Imágenes obtenidas mediante microscopia electrónica e histogramas de relación de aspecto de nanovarillas de oro sin funcionalización, NVO funcionalizadas con PEG y NVO-PEG con péptido D1. ....	29
<b>Fig. 16:</b> Histogramas del tamaño de nanovarillas de oro sin funcionalización, funcionalizado con PEG y con péptido D1. ....	29
<b>Fig. 17:</b> <i>C. elegans</i> . Es posible evaluar la presencia de RFP (Proteína Fluorescente Roja) <i>in vivo</i> . ....	30
<b>Fig. 18:</b> Espectros de absorbancia UV-Vis-NIR de NVO, NVO-PEG y NVO-PEG-D1. ....	40
<b>Fig. 19:</b> Distribución de tamaño de NVOs por intensidad. ....	42
<b>Fig. 20:</b> Espectro de emisión en el Fluorímetro individuos <i>C. elegans</i> tratados CRANAD-2. ....	44
<b>Fig. 21:</b> <i>C. elegans</i> que expresan A $\beta$ <sub>(1-42)</sub> (CL2120) sometidos a tratamiento con distintas concentraciones de CRANAD-2. ....	45

<b>Fig. 22:</b> La co-incubación de CRANAD-2 y NVO-PEG-D1 aumenta la sensibilidad de CRANAD-2 en el reconocimiento de los agregados insolubles de A $\beta$ .....	47
<b>Fig. 23:</b> La co-incubación de los nemátodos con CRANAD-2 y NVO-PEG-D1 aumenta la sensibilidad en la detección de A $\beta$ insoluble en todas las edades de los individuos analizados. .....	48
<b>Fig. 24:</b> La ausencia de D1 en las NVO reprime el efecto de aumento de la señal de fluorescencia emitida por CRANAD-2 en la detección de A $\beta$ insoluble. ....	50
<b>Fig. 25:</b> El tratamiento NVO-PEG o NVO-PEG-D1 no cambia la señal fluorescente emitida por CRANAD-58.....	51
<b>Fig. 26:</b> El tratamiento de NVO-PEG-D1 y CRANAD-58 aumenta la señal fluorescente emitida por CRANAD-58 en la cepa CL2006 ( A $\beta$ soluble) en la detección de A $\beta$ .....	53
<b>Fig. 27:</b> El tratamiento de NVO-PEG-D1o NVO-PEG y CRANAD-58 aumenta la señal fluorescente emitida por CRANAD-58 en la cepa CL2006 ( A $\beta$ soluble) en la detección de A $\beta$ .....	55
<b>Fig. 28:</b> El tratamiento con CRANAD-2 y NVO-PEG-D1 muestra un aumento en la señal de fluorescencia emitida por CRANAD-2 en nemátodos de la cepa CL2006 (A $\beta$ soluble).56	
<b>Fig. 29:</b> Tinción con ThS solo puede detectar agregados de A $\beta$ en la cepa CL2120 (A $\beta$ insoluble), no así en cepa CL2006 (A $\beta$ soluble).....	57
<b>Fig. 30:</b> El tratamiento con CRANAD-2 o CRANAD-58 no muestra diferencia en la detección de A $\beta$ al co-incubar con NVO-PEG o NVO-PEG-D1 en individuos viejos de la cepa CL2006.....	58

## Índice de Tablas.

<b>Tabla 1:</b> Métodos, alteraciones detectadas y las sondas más relevantes empleadas para el diagnóstico de EA. ....	17
<b>Tabla 2:</b> Características fisicoquímicas de CRANAD-2/58.....	20
<b>Tabla 3:</b> Las NVO muestran cambios en los parámetros como el diámetro hidrodinámico, Pdl y potencial Z cuando son modificadas. pH corresponde al cual se realizaron las determinaciones.....	41
<b>Tabla 4:</b> Tabla de resumen donde se compara la intensidad de fluorescencia de las sondas en los diferentes tratamientos y cepas de <i>C. elegans</i> estudiadas.....	60

## Abreviaturas.

A $\beta$ : Péptido  $\beta$ -amiloide (1-42)

APP: proteína precursora amiloide

CTAB: Bromuro de cetiltrimetilamonio

D1: Péptido D1

DLS: dispersión dinámica de la luz

EA: Enfermedad de Alzheimer

EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida

CRANAD-2: Sonda fluorescente  $\beta$ -amiloide del infrarrojo cercano

CRANAD-58: Sonda fluorescente  $\beta$ -amiloide del infrarrojo cercano

LB: Lenox L Broth Base

M9: Medio mínimo M9 (Buffer fosfato)

NGM: Medio de crecimiento de nemátodos

NHS: N-hidroxisuccinimida

NVO: Nanovarillas de oro

NVO-PEG: Nanovarillas de oro funcionalizadas con polietilenglicol

NVO-PEG-D1: Nanovarillas de oro funcionalizadas con polietilenglicol y conjugadas con el péptido D1

OP50: *E. coli* de la cepa OP50

PBS: Buffer fosfato

PEG: Polietilenglicol

pZ: potencial Z

SEF: Fluorescencia aumentada por superficie

TEM: Microscopia electrónica de transmisión

ThS: Tioflavina S

ThT: Tioflavina T

## Resumen.

Una de las hipótesis más aceptada para la etiología de la enfermedad de Alzheimer (EA) es la “hipótesis de la cascada amiloide”. Esta hipótesis se centra en la acumulación de agregados tóxicos del péptido  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ), los que son producidos por la acción proteolítica de las enzimas  $\beta$ -secretasa y  $\gamma$ -secretasa sobre la proteína precursora amiloide (APP). Los agregados de  $A\beta$  se depositan principalmente en regiones del cerebro relacionadas con la memoria. La acumulación del péptido  $A\beta$  produce un desbalance en la homeostasis neuronal que provoca su muerte, lo que posteriormente se manifestará como un deterioro cognitivo. El péptido  $A\beta$  es uno de los principales biomarcadores utilizados tanto para diagnóstico como para el seguimiento de la patología de EA. Sin embargo, su detección sólo es posible cuando ya existe un gran daño a nivel del sistema nervioso central y por tanto ya se manifiesta el deterioro cognitivo. Es así que un diagnóstico certero solo se realiza mediante examinación *post-mortem* (*Gold Standard*). En este contexto, la presente tesis apunta a desarrollar una metodología que en el futuro permitirá el diagnóstico temprano de la enfermedad. El desarrollo de diversas sondas fluorescentes que se unen a  $A\beta$  como el CRANAD y que emiten en la región del infrarrojo, muestran un potencial interesante para aplicaciones biomédicas como posibles herramientas de diagnóstico para la EA. No obstante, dichas sondas poseen un rendimiento cuántico de fluorescencia bajo, por lo que es importante aumentar la eficiencia de emisión de su fluorescencia.

Por otro lado, una de las áreas de la ciencia que nos ofrece una posible solución a esta problemática es la nanotecnología, principalmente debido a la gran versatilidad de las características fisicoquímicas de los nanomateriales. Una de estas características es la Resonancia del Plasmón Superficial de las nanopartículas de oro que permite aumentar la señal fluorescente emitida por un fluoróforo lo que se conoce como Fluorescencia Amplificada por Superficie.

En este trabajo se propuso la utilización conjunta de las sondas CRANAD-2 y CRANAD-58 y de nanopartículas para la detección selectiva de diferentes agregados de  $A\beta$  (insolubles y solubles, respectivamente) *in vivo*. Para esto se utilizaron dos cepas transgénicas del modelo de *C. elegans* (CI2006 y CL2120), que expresan  $A\beta_{(1-42)}$  humano en células musculares, donde cada una de ellas producen diferentes agregados de  $A\beta$  (solubles e insolubles respectivamente). Nuestros resultados muestran que la administración conjunta de CRANAD y nanopartículas genera un aumento de la señal fluorescente del orden de 2,8 para CRANAD-2 y de 1,9 para CRANAD-58. También se observó un aumento en el número de agregados de  $A\beta$  detectados, indicando que la técnica utilizada fue más sensible, con respecto al empleo del fluoróforo en ausencia de las nanopartículas.

## Abstract.

One of the most accepted hypotheses for the etiology of Alzheimer's disease (AD) is the "amyloid cascade hypothesis", which focuses on the accumulation of toxic aggregates of the  $\beta$ -amyloid peptide ( $A\beta$ ). This peptide is produced by the proteolytic action of the  $\beta$ -secretase and  $\gamma$ -secretase enzymes on the amyloid precursor protein (APP). Mainly,  $A\beta$  aggregates are deposited in regions of the brain related to memory. The accumulation of the  $A\beta$  peptide produces an imbalance in neuronal homeostasis that causes death, which will subsequently manifest as cognitive impairment.

The  $A\beta$  peptide is one of the main biomarkers used both for diagnosis and for monitoring the pathology of AD. However, its detection is only possible when there is already great damage at the level of the central nervous system and therefore cognitive impairment has already manifested. Thus, an accurate diagnosis is only made by post-mortem examination (Gold Standard). In this context, this thesis aims to develop a methodology that will allow early diagnosis of the disease. The development of various fluorescent probes that bind  $A\beta$ , such as CRANAD-2 and CRANAD-58, show an interesting potential for biomedical applications as possible diagnostic tools. These probes bind specifically to  $A\beta$  and as a consequence of this binding they emit a strong fluorescence signal in the infrared region, which makes it especially interesting for their biomedical applications. However, these probes have a low fluorescence quantum yield, so it is important to increase the emission efficiency of their fluorescence.

On the other hand, one of the areas of research that offers us a possible solution to this problem is nanotechnology, because the physicochemical characteristics of nanomaterials make them very versatile. One of these characteristics is the Surface Plasmon Resonance, which through the dispersion effect, can increase the fluorescent signal emitted by a given fluorophore. This effect is known as Surface Amplified Fluorescence.

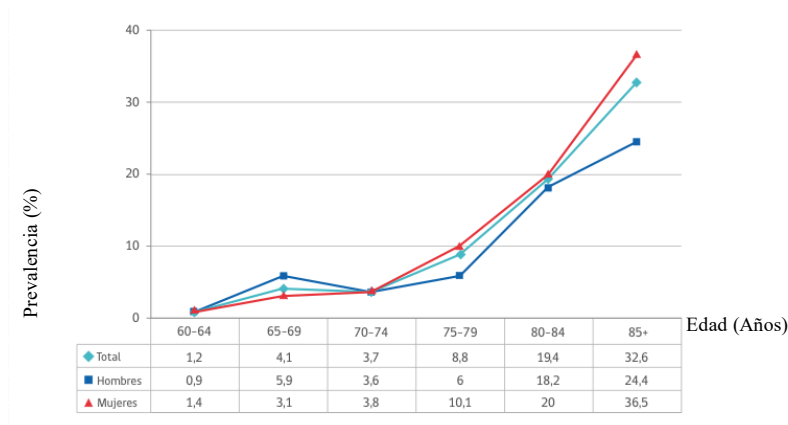
In this work, the combined use of CRANAD-2 and CRANAD-58 and nanoparticle probes for the selective detection of different  $A\beta$  aggregate species (insoluble and soluble, respectively) *in vivo* was proposed. For this, two transgenic strains of the *C. elegans* model were used (C12006 y CL2120), which express human  $A\beta_{(1-42)}$  in muscle cells, where each one expresses different  $A\beta$  aggregates (soluble and insoluble respectively). Our results show that the co-administration of CRANAD and Nanoparticles generates an increase in the fluorescent signal of 2.8 times for CRANAD-2 and 1.9 times for CRANAD-58. An increase in the number of  $A\beta$  aggregates detected was also observed, indicating that the technique used was more sensitive, with respect to the use of fluorophore in the absence of nanoparticles.



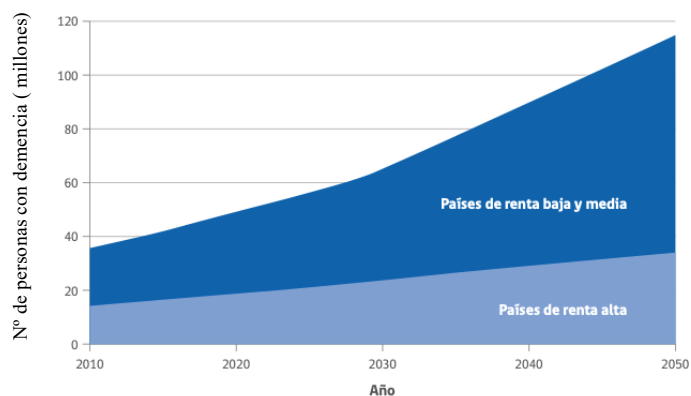
# Introducción.

## Enfermedad de Alzheimer, etiología y péptido $\beta$ -amiloide.

En las últimas décadas, la población humana ha mostrado un envejecimiento acelerado y con ello, la prevalencia de enfermedades relacionadas con la edad ha aumentado (COPRAD – Corporación Profesional Alzheimer y otras Demencias, n.d.; Ministerio de Salud, 2017; Pietrzak et al., 2018) (Fig.1). Una de estas enfermedades es la enfermedad de Alzheimer (EA), que es una enfermedad neurodegenerativa que afecta principalmente a la población de mayor edad, esta enfermedad ha presentado un gran aumento en su prevalencia como una consecuencia del aumento en la esperanza de vida. Este aumento también es significativo en países con ingresos medios-bajos como Chile (Fig. 2).



**Fig. 1 : Prevalencia de demencias según edad en mayores de 60 años. (ENADEM 2009).** Prevalencia de la demencia aumenta de forma significativa a partir del rango entre 65-69 años, este valor aumenta al avanzar en la edad de la población. En el cuadro inferior se muestra la prevalencia porcentual según los grupos etarios (hombres, mujeres y población total) (Ministerio de Salud, 2017).

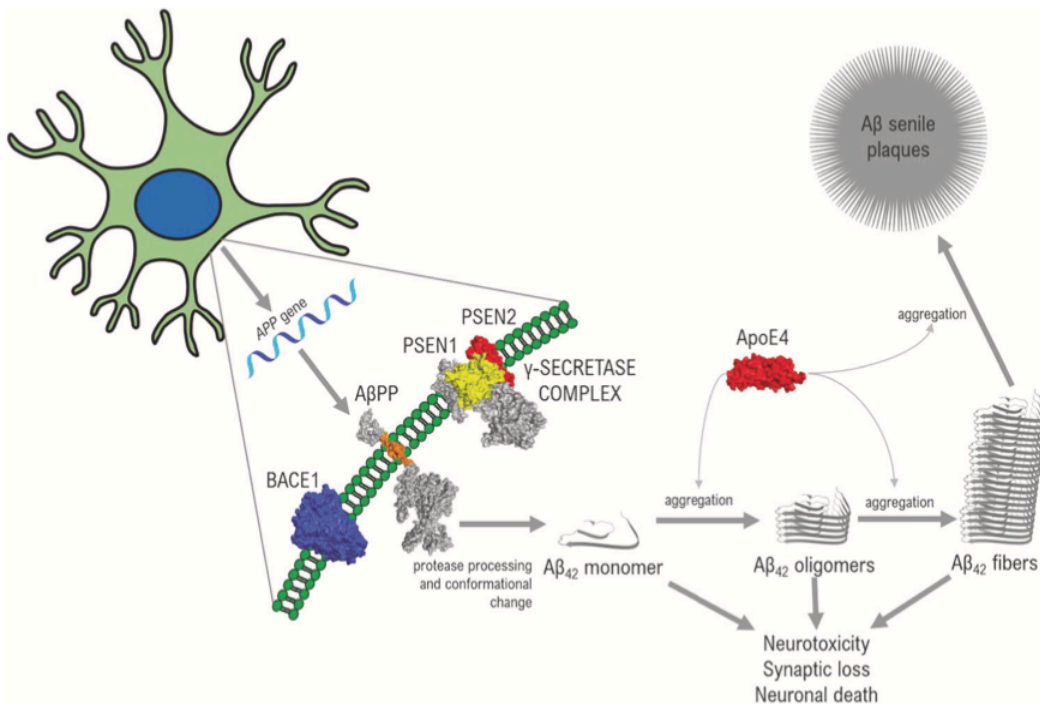


**Fig. 2: El crecimiento en el número de personas con demencia (en millones) en países de bajos, medianos y altos ingresos (ADI, 2009).** En países de renta baja y media el número de personas que se proyecta con demencia es mayor, mientras que en países de renta alta el aumento es menor, debido al estilo de vida asociado relacionado al ingreso. (Ministerio de Salud, 2017)

Se estima que actualmente en Chile el 1,06% de la población sufre algún tipo de demencia (Ministerio de Salud, 2017). Según el Servicio Nacional del Adulto Mayor (SENAMA), en el año 2009 se da cuenta de que el 7,1% de las personas con 60 años o más (7,7% mujeres y 5,9% hombres) tienen deterioro cognitivo. Esta cifra aumenta exponencialmente a partir de los 75 años a un 13% y alcanzando un 36% en personas de más de 85 años. De esta manera, debido al aumento en la incidencia de EA y los altos costos que significa en términos de salud pública (*COPRAD – Corporación Profesional Alzheimer y otras Demencias*, n.d.; Ministerio de Salud, 2017), nos encontramos en un inminente problema de salud pública a nivel nacional. Es por esto que es necesario realizar un esfuerzo mayor por desarrollar metodologías de diagnóstico y de tratamiento que sean seguras, efectivas y accesibles económicamente.

Desde el punto de vista etiológico para la EA existen varias hipótesis, una de las más aceptadas es la de la cascada amiloide, que se centra en la deposición de agregados tóxicos del péptido  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) (Permanne et al., 2002; Suh & Checler, 2002). La hipótesis de la cascada amiloide sugiere que a partir de la escisión proteolítica de la proteína precursora del amiloide (APP) por las enzimas  $\gamma$ -secretasa y  $\beta$ -secretasa, se forman los monómeros del

péptido A $\beta$ . Sin embargo, en condiciones patológicas estos monómeros comienzan a agregarse dando lugar en primera instancia a dímeros, trímeros, oligómeros, etc (Castellani et al., 2019). Estas formas de A $\beta$  se conocen como especies solubles de A $\beta$ , que son responsables de la toxicidad neuronal en EA (Fig. 3) y que según los últimos informes tienen especial relevancia en las etapas tempranas de la EA (Sakono & Zako, 2010). Por otro lado, estas formas solubles de A $\beta$  pueden agregarse y formar las llamadas especies insolubles de A $\beta$  que son fibras de mayor tamaño y finalmente placas seniles, que normalmente se detectan mediante la metodología *Gold Standard* para diagnosticar esta enfermedad a través de la tinción histológica con tioflavina T o S en pacientes ya fallecidos (Pietrzak et al., 2018). Sin embargo, estas sondas fluorescentes no se pueden utilizar en imagenología *in vivo* o como una herramienta de diagnóstico temprano, ya que detectan especies de tamaños mayores a los 100 nm, que son insolubles. Asimismo, dichas sondas atraviesan en bajo grado la barrera hematoencefálica y están presentes cuando ya existe una gran cantidad de neuronas muertas y, por lo tanto, el deterioro cognitivo ya se ha manifestado y es irreversible (Snowdon et al., 1996).



**Fig. 3: Imagen que muestra el procesamiento proteolítico de la proteína precursora de amiloide (APP).** APP es escindida por las enzimas  $\gamma$ -secretasa y  $\beta$ -secretasa (BACE1), produciéndose el péptido  $\beta$ -amiloide que contiene entre 39 y 43 aminoácidos. Este péptido

se agrega generando diferentes especies de A $\beta$  solubles de pequeño tamaño e insolubles de mayor tamaño siendo las primeras las principales causantes de la neurodegeneración en el sistema nervioso central (Sakono & Zako, 2010).

### **Diagnóstico de la Enfermedad de Alzheimer.**

Desde el punto de vista del diagnóstico de la enfermedad de EA, se han desarrollado varias metodologías innovadoras con el objetivo de obtener un diagnóstico temprano. En este contexto una de las metodologías más prometedoras es la tomografía por emisión de positrones (PET) (Pietrzak et al., 2018). Los compuestos empleados como sondas para la detección que se utilizan en esta técnica son los radiotrazadores ([<sup>11</sup>C] PIB, [<sup>18</sup>F] Flutametamol) (Pietrzak et al., 2018) que han sido aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration*). A pesar de ello no han mostrado resultados concluyentes como una metodología diagnóstica precisa y son útiles más bien para el seguimiento de la enfermedad (Pietrzak et al., 2018). Estos radiotrazadores no permiten la detección de especies solubles de A $\beta$  por lo que no sería posible realizar un diagnóstico temprano, ya que solo detectan especies insolubles de A $\beta$  (Pietrzak et al., 2018). Además, esta técnica posee un gran costo monetario siendo necesario contar con un sincrotrón cerca para la obtención del radiotrazador. Lamentablemente en nuestro país hay poca disponibilidad de ser implementada, restringiendo el acceso a la población. Por otro lado, existen otras metodologías como la tomografía computarizada de emisión monofotónica (SPECT) o la resonancia magnética (MRI), que entregan información más bien estructural y funcional del cerebro afectado por la EA. No obstante, empleando estas técnicas no es posible hacer un diagnóstico temprano, dado que cuando el sistema nervioso central posee daño estructural, el deterioro cognitivo ya es irreparable (Pietrzak et al., 2018). Cabe señalar que se han realizado esfuerzos en la búsqueda de biomarcadores, como es el caso de la detección de A $\beta$  en el líquido cefalorraquídeo (LCR). Sin embargo, los resultados no son concluyentes, ya que en el caso de A $\beta$ , no hay correlación entre el estado de deterioro cognitivo y la concentración de A $\beta$  en el LCR (Lewczuk et al., 2014; Niemantsverdriet et al., 2017). Para este propósito se consideran las relaciones entre las concentraciones de A $\beta$  en el LCR y en la sangre lo que en realidad podría ser más un factor de riesgo que un signo de la

enfermedad (Pietrzak et al., 2018). En la tabla 1 podemos encontrar un resumen de diversas técnicas orientadas al diagnóstico de EA de forma no invasiva. Sin embargo, estas técnicas no han dado resultados concluyentes en términos de especificidad y sensibilidad.

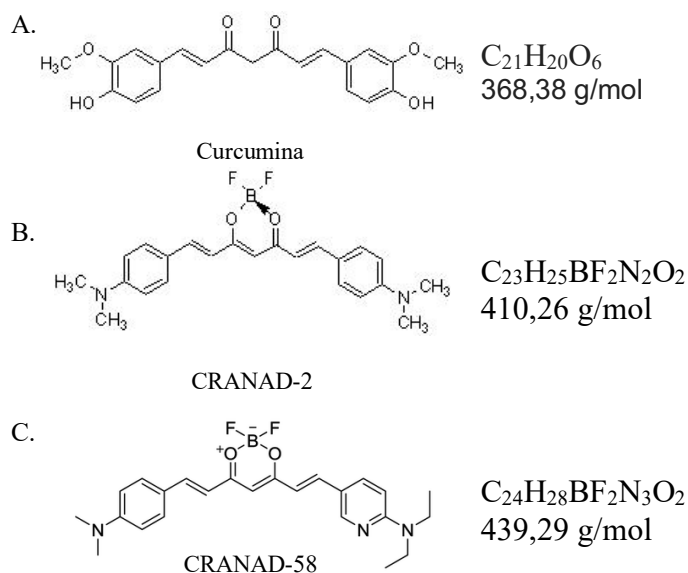
Method		Detected Alteration	Compound
PET		- Regional glucose metabolism	- [ <sup>18</sup> F]FDG
		- β-amyloid plaques	- [ <sup>11</sup> C]PIB - [ <sup>18</sup> F]Florb - [ <sup>18</sup> F]Flutametamol
		<b>Future directions:</b> - Tau-tangles - AChE radiotracers	-
SPECT		- Regional cerebral blood flow (hypoperfusion)	- [ <sup>99m</sup> Tc]ECD - [ <sup>99m</sup> Tc]HMPAO
		- Functioning of acetylcholine vesicular transporter	- [ <sup>123</sup> I]IBVM
		<b>Future directions: senile plaques</b>	-
MRI	Functional MRI	- Altered regional blood flow (oxygenation)	-
	Volumetric MRI	- Enlarged CSF spaces	
	Hippocampus volumetry	- Hippocampal atrophy	
Biomarkers		<b>CSF biomarkers:</b> - Elevated Aβ <sub>42</sub> peptide concentration - Tau-protein	-
		<b>Future directions: blood-based directions</b>	

**Tabla 1: Métodos, alteraciones detectadas y las sondas más relevantes empleadas para el diagnóstico de EA (Pietrzak et al., 2018).**

### **Detección de agregados de β-amiloide *in vivo* por fluorescencia.**

En la búsqueda de nuevas metodologías de diagnóstico temprano de EA, se han desarrollado diversas moléculas que apuntan al diagnóstico mediante imagenología *in vivo*. Uno de estos casos son las sondas fluorescentes pertenecientes a la familia CRANAD, curcuminoides que poseen características fisicoquímicas que los hacen interesantes desde un punto de vista de imagenología *in vivo*. La molécula CRANAD-2 (Chongzhao et al., 2009) (Fig. 4) es un curcuminóide que cuando se une a los agregados de Aβ, posee un

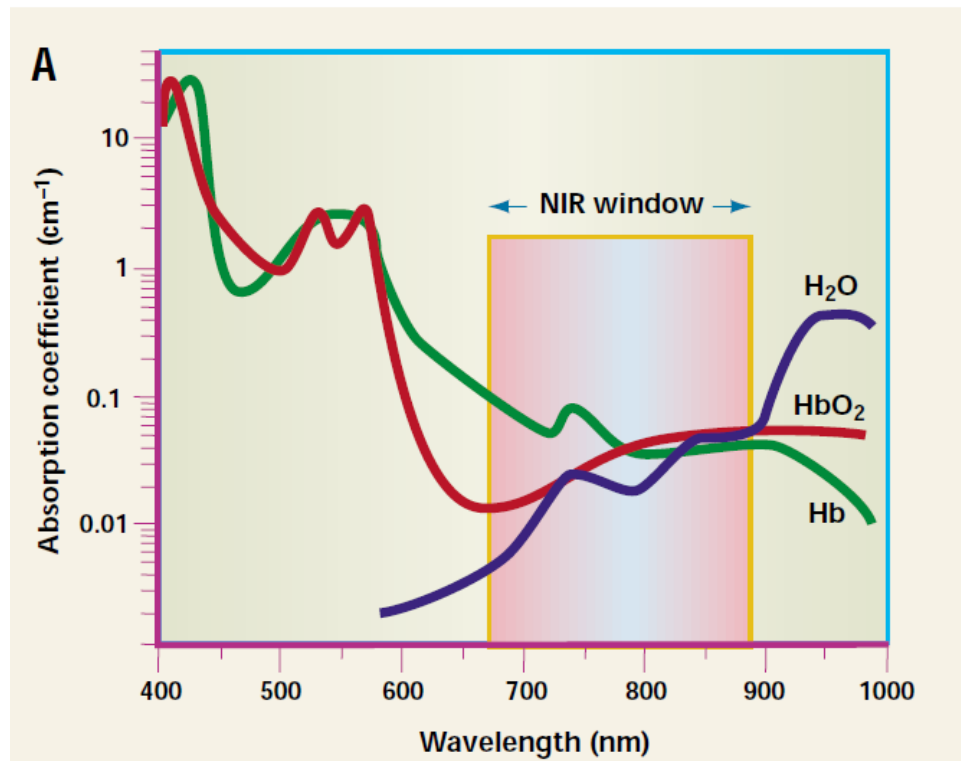
máximo de emisión de fluorescencia a 715 nm (Chongzhao et al., 2009b). CRANAD-2 tiene una alta afinidad por los agregados insolubles de A $\beta$  (K $_d$  = 38 nM) (Chongzhao et al., 2009) y también tiene un coeficiente de partición n-octanol / agua (P $_{ow}$ ) apropiado (expresado como un Log P $_{ow}$  igual a 3) para penetrar el sistema nervioso central por difusión a través de la barrera hematoencefálica (BHE) (Bellavance et al., 2008; Chongzhao et al., 2009). Además de las propiedades mencionadas, CRANAD-2 tiene una alta estabilidad en el suero sanguíneo y una baja interacción con la albúmina (Chongzhao et al., 2009).



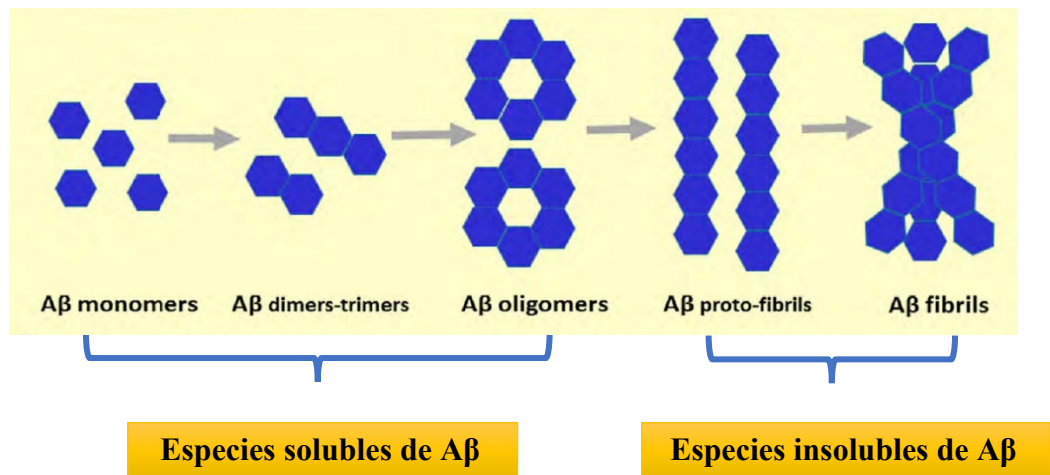
**Fig. 4: Estructura de la curcumina y de los curcuminoides CRANAD-2 y CRANAD-58.** A. Estructura de la Curcumina, colorante natural proveniente de la cúrcuma. B. Estructura de CRANAD-2, difluoroboro derivado de curcumina que permite la detección de especies insolubles de A $\beta$ . C. Estructura de CRANAD-58, difluoroboro derivado de la curcumina que permite la detección de especies solubles e insolubles de A $\beta$  (Chongzhao et al., 2009; Zhang et al., 2013).

Desde el punto de vista de la detección, la molécula de CRANAD-2 emite fluorescencia en la región infrarroja al unirse a los agregados de A $\beta$  siendo esta una longitud de onda comprendida en la denominada ventana biológica (700-900 nm) en la que los tejidos biológicos absorben mínimamente (Fig. 5). Por lo tanto, es posible detectar A $\beta$  *in vivo* a diferencia de otros fluoróforos utilizados como la tioflavina. Por otro lado, Zhang et al, 2013 reportaron una nueva molécula derivada de curcumina, CRANAD-58 (Fig. 4), con excelentes propiedades fisicoquímicas como las descritas para CRANAD-2 (Tabla 2). A

diferencia de CRANAD-2, CRANAD-58 tiene la particularidad de unirse tanto a especies insolubles de  $A\beta$  como a solubles (Fig. 6). Los oligómeros de  $A\beta$  corresponden a las especies  $\beta$ -amiloides más tóxicas presentes en la enfermedad (Sakono & Zako, 2010). Por lo tanto, CRANAD-58 es particularmente interesante para el estudio de las primeras etapas de la EA (Zhang et al., 2013).



**Fig. 5: Ventana de absorción biológica de compuestos celulares.** Es posible apreciar que esta ventana se encuentra entre los 700 nm y los 900 nm que corresponde al infrarrojo cercano, donde las moléculas como el agua, la hemoglobina y la oxihemoglobina absorben mínimamente (Weissleder, 2001).



**Fig. 6: Representación de las diferentes especies de agregados de Aβ monomérico, oligomérico y en fibrilla .** Monómeros, dímeros, trímeros y oligómeros corresponden a las llamadas especies solubles de Aβ, siendo los oligómeros una de las especies más tóxicas y por tanto las principales causantes de la muerte neuronal y posterior deterioro cognitivo en EA. Estas especies solubles son susceptibles a agregarse entre sí, formando así las especies insolubles de Aβ, las cuales son detectadas con los métodos convencionales de diagnóstico (Bernabeu-Zornoza et al., 2019).

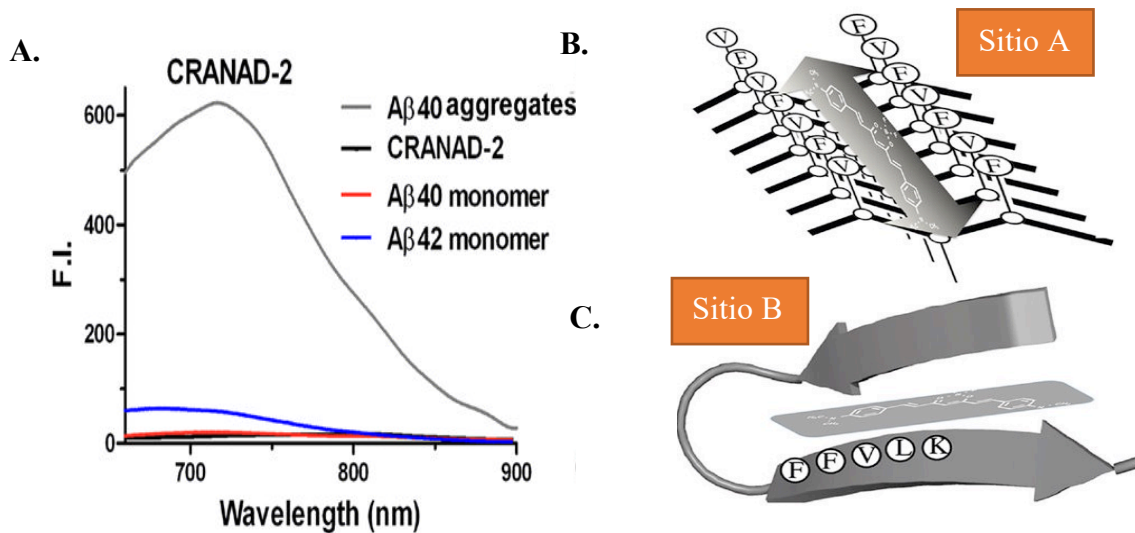
	CRANAD-2 ( $A\beta_{1-40}$ )	CRANAD-58 ( $A\beta_{1-40}$ - $A\beta_{1-42}$ )
Longitud de onda máxima de emisión	805 nm	750 nm
Longitud de onda máxima de emisión unido a Aβ	715 nm	672 nm
Incremento de señal (times)	70	91,9 - 113,6
$K_d$	38 nM	105,8nM - 45,8 nM
LogP	3	1,94

**Tabla 2: Características fisicoquímicas de CRANAD-2/58** (Chongzhao et al., 2009; Zhang et al., 2013).



CRANAD-2 presenta un desplazamiento de su máximo de emisión de fluorescencia al unirse a A $\beta$  (especies insolubles) pasando de un máximo de 805 nm a otro de 715 nm. Asimismo, aumenta su señal de fluorescencia en 70 veces al unirse a los agregados insolubles de A $\beta$  lo que se conoce como *Switch-on* (Fig. 7 A). Se ha planteado que la unión de este fluoróforo a los agregados de A $\beta$  podría ser a través de 2 sitios hidrofóbicos relevantes, definidos como el Sitio A y el Sitio B de la secuencia de A $\beta$ . En el caso del Sitio A, este se encontraría en la superficie de especies insolubles de A $\beta$  como fibras o protofibrillas (Fig. 7 B), mientras que el llamado Sitio B, corresponde a un segmento de la secuencia específica de A $\beta$  (segmento HHQKLVFF del péptido A $\beta$ ), el cual estaría mayormente expuesto en especies solubles de A $\beta$  como monómeros, dímeros u oligómeros ( Fig. 7 C y Fig. 8 A).

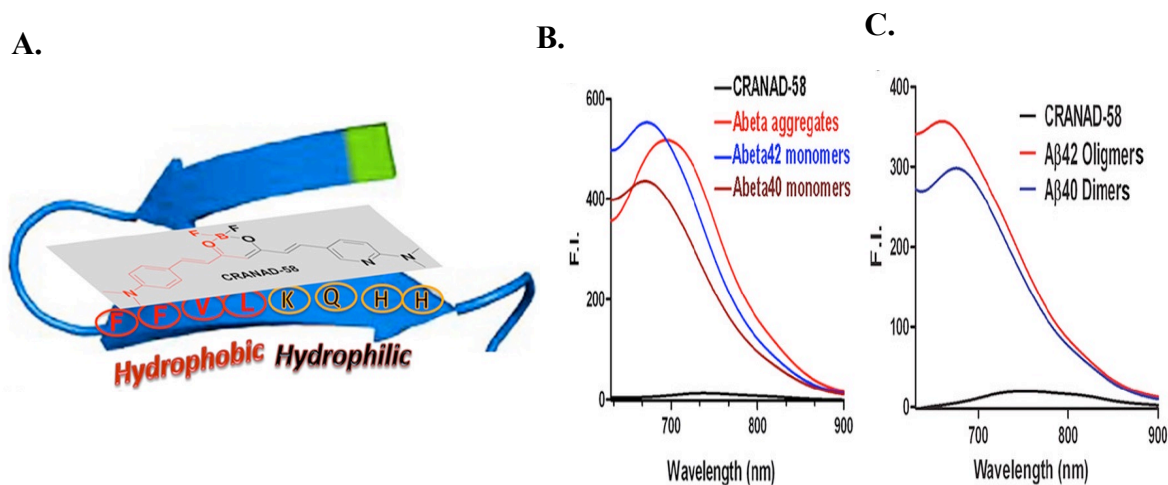
Desde un punto de vista estructural, el sitio A se encuentra situado sobre la estructura  $\beta$ -plegada. En este sitio se encontrarían expuestos residuos de aminoácidos hidrofóbicos como fenilalanina (F) y valina (V) lo que facilitaría la unión de CRANAD-2 que es un compuesto de naturaleza hidrofóbica. Por otro lado, el sitio B se encuentra en el monómero de A $\beta$ , donde existe el núcleo hidrofóbico del péptido (FFVLK) que también podría interaccionar con CRANAD-2. Sin embargo, la capacidad de unión de CRANAD-2 al sitio B es muy baja, por lo que se requiere una gran concentración de la sonda para generar una señal fluorescente significativa con el monómero.. En dicho monómero también se encuentran presentes aminoácidos hidrofílicos como glutamina (Q) e histidina (H) cuya interacción con el CRANAD-2 no es tan favorable debido a la naturaleza hidrofóbica del mismo (Fig. 8 A). Por otro lado, CRANAD-58, gracias a sus propiedades anfipáticas debido a la presencia del grupo piridina, aparentemente se une con elevada afinidad al segmento HHQKLVFF de A $\beta$  (Fig. 8 A), por lo que se requieren bajas concentraciones de la sonda para generar una señal de fluorescencia significativa para detectar las formas solubles de A $\beta$  ( Fig. 8 B y 8 C) (Zhang et al., 2013)



Secuencia aminoacídica del Peptido  $\beta$ -amiloide:

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA

**Fig. 7:** Espectros de fluorescencia de A. CRANAD-2 sólo (negro, superpuesto con línea roja), con agregados A $\beta$ 40 (gris) y con monómeros A $\beta$ 40 (rojo) y monómeros A $\beta$ 42 (azul) Dos sitios de unión aparentes (sitio A y B) para CRANAD-2 en los agregados de A $\beta$ 40. **B.** canal hidrofóbico formado por residuos de aminoácidos hidrofóbicos tales como F (fenilalanina) y V (valina) entre las moléculas de A $\beta$  (Sitio A); **C.** Fragmento de núcleo hidrofóbico (KLVFF) (sitio B) dentro del péptido A $\beta$ 40 / 42 (Zhang et al., 2013).

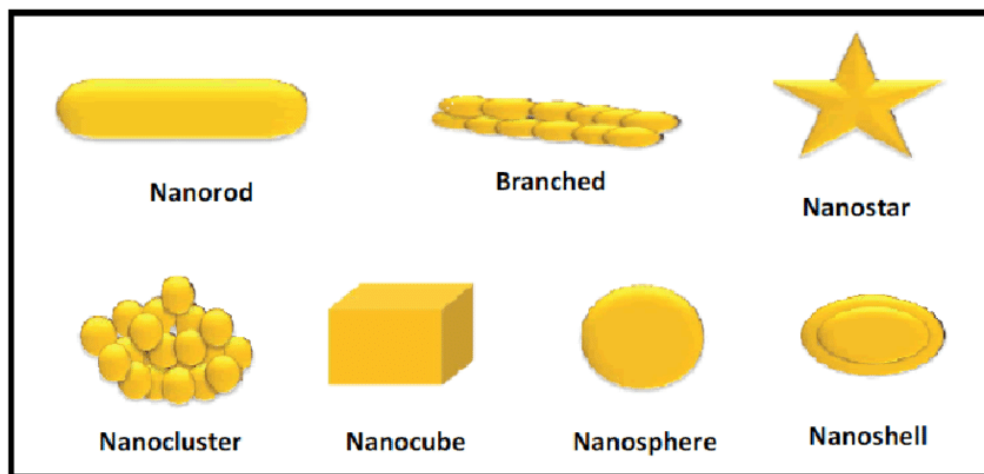


**Fig. 8:** **A.** Modelo de interacción entre CRANAD-58 y A $\beta$  **B.** Espectros de fluorescencia de CRANAD-58 sólo (negro) y con monómeros A $\beta$ 40 (rojo intenso), monómeros A $\beta$ 42 (azul) y agregados A $\beta$ 40 (rojo). **C.** Espectros de fluorescencia de CRANAD-58 sólo (negro) y con dímeros A $\beta$ 40 (azul), oligómeros A $\beta$ 42 (rojo) (Zhang et al., 2013).

Aunque CRANAD-2 y sus análogos como CRANAD-58 tienen propiedades muy atractivas para ser usadas como sonda en la detección de A $\beta$  *in vivo*. La sensibilidad de la detección no es apropiada para la detección ultrasensible de agregados de A $\beta$  *in vivo*. Esto es porque la eficiencia del proceso de disipación de la energía emitida en forma de fluorescencia es bajo una vez que el fluoróforo es excitado, lo que se traduce como un bajo rendimiento cuántico ( $\phi$ ) de las sondas CRANAD (Tong et al., 2015). Es por esto que es necesario desarrollar nuevas metodologías que aumenten esta sensibilidad. Por otro lado, se ha demostrado que mediante el uso de nanopartículas plasmónicas es posible aumentar el rendimiento cuántico de las sondas fluorescentes y por ende la señal de fluorescencia, lo que permitiría desarrollar una metodología más sensible para la detección por fluorescencia de los agregados de A $\beta$  (Elbassal et al., 2017; Jara-Guajardo et al., 2020).

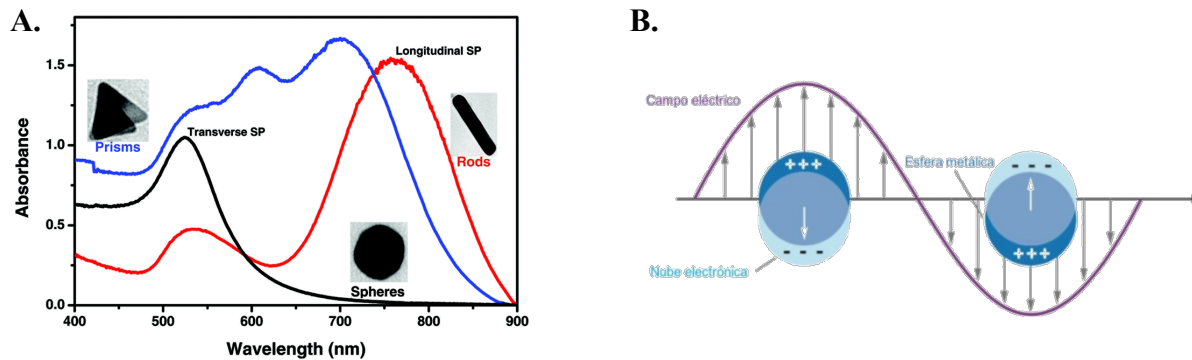
### **Nanopartículas plasmónicas para aumentar la sensibilidad de detección de agregados de $\beta$ -amiloide.**

Las nanopartículas (Fig. 9) debido a su pequeño tamaño y gran área de superficie tienen diferentes propiedades ópticas y electrónicas que varían dependiendo de su tamaño, morfología y composición (Willets & Van Duyne, 2007).



**Fig. 9: Diversas formas de nanopartículas de oro (Ali et al., 2017).**

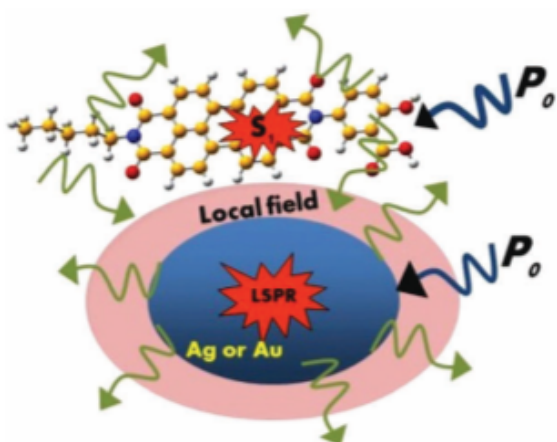
Dentro de las nanopartículas están las denominadas “nanopartículas plasmónicas”, esto se debe a que poseen una propiedad llamada Resonancia de Plasmón Superficial Localizada o LSPR (Fig. 10), que corresponde a la oscilación sincronizada o colectiva de los electrones de la última capa de valencia de la superficie de los átomos de la nanoestructura, como resultado de su interacción con la luz (Willets & Van Duyne, 2007). Como consecuencia de esta interacción de la luz con la materia, los fotones pueden dispersarse (*scattering*) o absorberse de manera muy eficiente (Petryayeva & Krull, 2011). Las propiedades plasmónicas dependen del tamaño, de la forma y de la composición de la nanopartícula. Esto es posible de observar en una solución coloidal de nanoesferas de oro (AuNES) con un diámetro de 20 nm que tiene un color rojo y una absorción máxima a una longitud de onda de 520 nm. Por lo tanto, al aumentar el diámetro de la nanoesfera, la absorción máxima correspondiente al fenómeno de LSPR cambia a mayores longitudes de onda (Huang & El-Sayed, 2010; S. Link & El-Sayed, 1999). De esta manera, las nanovarillas de oro (NVO) pueden presentar bandas plasmónicas en la región infrarroja donde se encuentra la ventana biológica, lo que las hace muy útiles para aplicaciones biomédicas.



**Fig. 10:** **A.** Espectros de absorción de nanoesferas, nanovarillas y nanoprismas. Se pueden observar los diferentes máximos de absorción para las diferentes nanopartículas. **B.** Representación de un plasmón superficial localizado de una partícula esférica que muestra el movimiento de electrones en fase por interacción con un campo electromagnético (Attia et al., 2015).

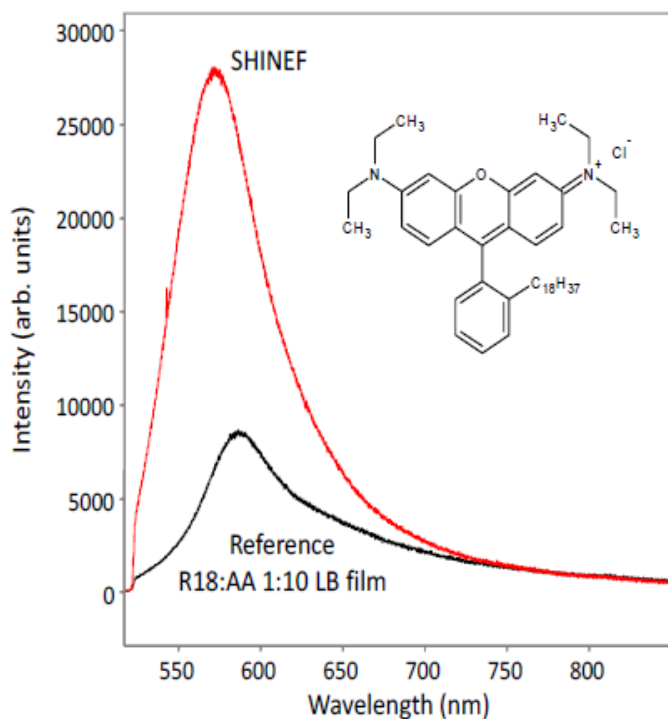
Las nanopartículas plasmónicas se pueden usar para aumentar la señal fluorescente de varios fluoróforos, mediante Fluorescencia Amplificada por Superficie o efecto SEF. Este aumento en la fluorescencia se debe al efecto de dispersión o *scattering*. Es así que las

ondas electromagnéticas de una determinada longitud de onda incidente en las nanopartículas, son dispersadas por ella y de esta manera el fluoróforo será excitado tanto por la fuente de luz externa como por la luz dispersada por las nanopartículas vecinas, como se ilustra en la Fig. 11 (Li et al., 2017; Willets & Van Duyne, 2007) aumentándose de esta forma la señal fluorescente emitida por el fluoróforo excitado .



**Fig. 11: Fluorescencia amplificada por superficie.** P0 (Azul) corresponde a la luz incidente tanto en la nanopartícula como en el fluoróforo, mientras que el verde muestra la re-radiación que ocurre debido a la dispersión producida por la nanopartícula (Li et al., 2017)

Este aumento de fluorescencia como se muestra en la Fig. 12, depende del tamaño de partícula, la longitud de emisión de la sonda utilizada, y la distancia a la que se encuentra el fluoróforo de la nanopartícula (Li et al., 2017).



**Fig. 12: Aumento de la fluorescencia de octadecil rodamina B (R18),** usando nanopartículas de oro recubiertas con sílice. (El espectro de emisión con nanopartículas es rojo y en ausencia de nanopartículas es negro) (Guerrero et al., 2012).

## **Uso de nanopartículas plasmónicas y CRANAD para la detección de $\beta$ -amiloide.**

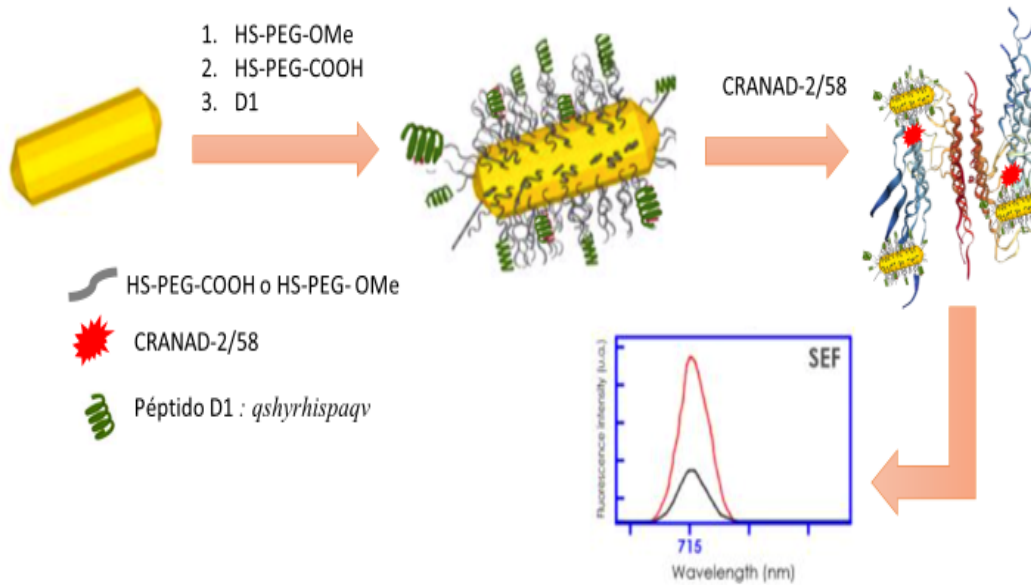
Como se mencionó anteriormente, tanto CRANAD-2 como su análogo CRANAD-58 tienen fluorescencia en la región de la ventana biológica, por lo que para lograr un óptimo efecto SEF es necesario aproximar el plasmón de la nanopartícula que se utilizará con el máximo de emisión del fluoróforo. De esta manera, utilizando el efecto de dispersión, es posible amplificar la fluorescencia emitida por un fluoróforo específico como CRANAD-2 o CRANAD-58. Por lo tanto, en este trabajo, se utilizaron NVOs con una relación de aspecto de 4 con una absorción máxima (plasmón) en la región infrarroja del espectro (Huang & El-Sayed, 2010).

## **Direccionamiento de las nanopartículas de oro a agregados $\beta$ -amiloides.**

Para aplicaciones de las nanopartículas en diagnóstico es necesario dirigir selectivamente las nanopartículas hacia el analito o biomarcador que en el caso de EA es el péptido  $\beta$ -amiloide.

Las nanopartículas tienen la particularidad de poder funcionalizarse con diferentes moléculas de interés biológico, con esto es posible otorgar selectividad y sensibilidad en la detección de diversos analitos en fluidos biológicos, además de que también pueden usarse para la administración de fármacos de una forma más específica para el tratamiento de enfermedades (Funke et al., 2012; Xue et al., 2012). De acuerdo con lo anterior, los NVO que se utilizaron en este trabajo se funcionalizaron con PEG5000 (HS-PEG-OMe y HS-PEG-COOH) para aumentar la estabilidad coloidal de nuestro sistema, biocompatibilizarlo y permitir la conjugación posterior con un péptido que reconoce los agregados de  $\beta$ -amiloide. Para este propósito, se empleó el péptido D1 que es un péptido pequeño compuesto por la secuencia de **qshyrhispaqv** de la serie D, que se une a los agregados de  $A\beta_{(1-42)}$  con una  $K_d$  de  $0,5 \mu M$ , produciendo también la desagregación de fibras amiloides e inhibiendo la agregación de especies solubles de  $A\beta$  (Funke et al., 2012; Xue et al., 2012). De esta manera, se propuso que este péptido proporcionaría una herramienta de direccionamiento para las nanopartículas a agregados tóxicos de  $A\beta$  lo que produciría un

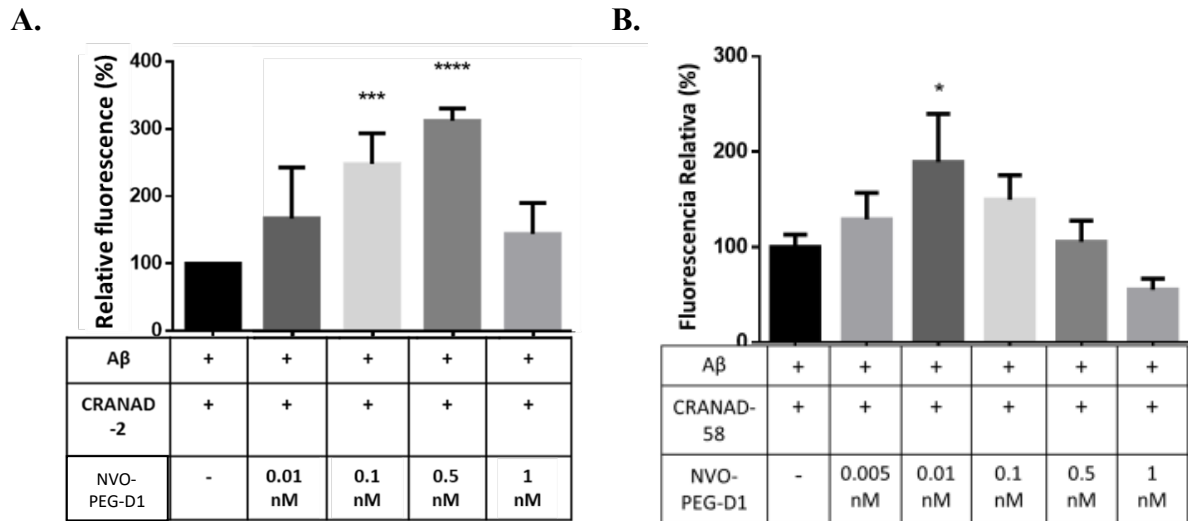
aumento de la señal fluorescente al co-incubar con CRANAD-2/58 y NVO-PEG-D1 a un sistema que contiene A $\beta$  (Fig. 13).



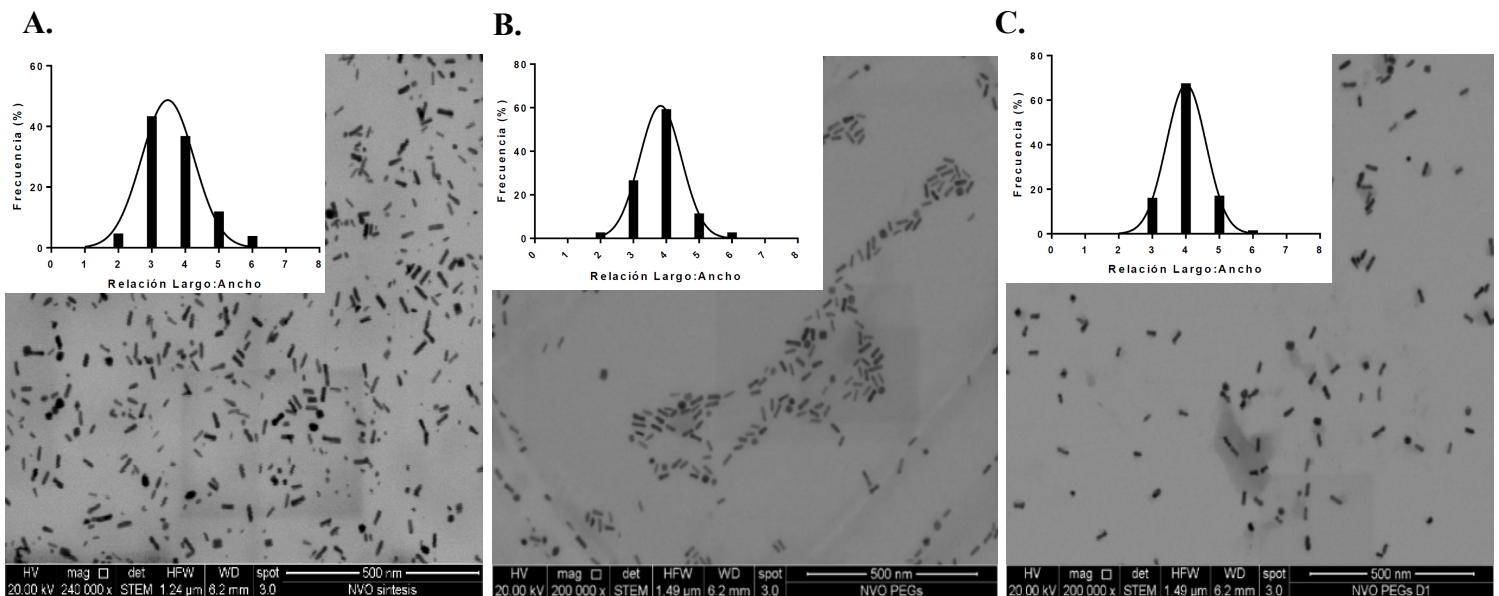
**Fig. 13: Co-incubación de CRANAD-2/58 y NVO-PEG-D1 aumenta la señal fluorescente emitida por CRANAD-2/58 al unirse a agregados de A $\beta$ .** Nanovarillas de oro desnudas son biocompatibilizadas, aumentando su estabilidad coloidal modificando su superficie con HS-PEG-OMe en una primera etapa. Luego se modifica la superficie de las NVOs con HS-PEG-COOH, lo que permite la unión del péptido D1, el cual permite el direccionamiento del nanosistema a los agregados de A $\beta$ . Tanto el nanosistema como la sonda fluorescente empleada (CRANAD-2 o CRANAD-58) unidos a A $\beta$  y proporcionando una fuente de luz de excitación para el fluoróforo, eventualmente se produciría el efecto SEF, obteniéndose un aumento de la señal de fluorescencia.

Este mismo nanosistema (NVO-PEG-D1) ya ha sido evaluado anteriormente en nuestro laboratorio en ensayos *in vitro* y *ex vivo*, dando como resultado aumento de la señal fluorescente de CRANAD-2 y CRANAD-58. En la Fig. 14 A es posible apreciar cómo las NVO-PEG-D1 aumentan la intensidad de fluorescencia emitida por CRANAD-2 en la detección de A $\beta$  *in vitro* a las concentraciones de 0,5 y 0,1 nM. En el caso de los ensayos de CRANAD-58 *in vitro* (Fig. 14 B) se encontró que el aumento de fluorescencia no fue tan notorio como en el caso de CRANAD-2, sin embargo, el aumento de la señal debido al efecto SEF se produjo a una menor concentración de NVO-PEG-D1 (0,01 nM), cabe mencionar que los ensayos tanto de CRANAD-2 como CRANAD-58 se realizaron con A $\beta$  insoluble (fibras) incubado *in vitro*.





**Fig. 14:** Fluorescencia relativa de CRANAD-2 o CRANAD-58 al ser incubado con fibras de A $\beta$  *in vitro* en presencia y ausencia de NVO-PEG-D1 a distintas concentraciones aumenta la señal de fluorescencia emitida por CRANAD-2/58. **A.** A $\beta$  incubado con CRANAD-2 con o sin NVO-PEG-D1. **B.** A $\beta$  incubado con CRANAD-58 con o sin NVO-PEG-D1. Siendo un valor  $p < 0,0001$  para \*\*\*\* y un valor  $p = 0,0006$  para \*\*\* ( $n = 3$ ) a una longitud de onda de excitación de 640 nm y emisión de 715 nm (Jara-Guajardo et al., 2020). (Datos Presentados en Memoria de Título de Pedro Jara)



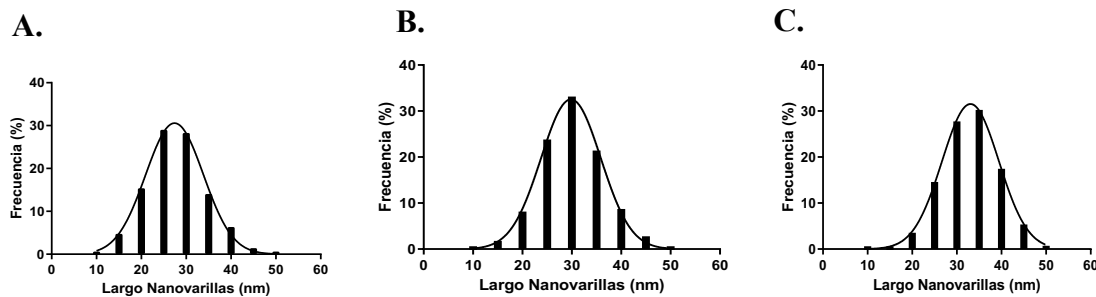
**Fig. 15:** Imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica e histogramas de relación de aspecto de nanovarillas de oro. NVO sin funcionalización (A), NVO funcionalizadas con PEG (B) y NVO-PEG con péptido D1 (C), los datos muestran que las



nanopartículas tienen una relación de aspecto aproximadamente de 4.  $n = 3$  (Jara-Guajardo et al., 2020). (Datos Presentados en Memoria de Título de Pedro Jara).

En el presente trabajo y en los trabajos *in vitro* anteriormente mencionados se emplearon NVOs con relación de aspecto aproximadamente de 4 (Fig. 15), con un tamaño promedio de 30 nm (Fig. 16).

Los histogramas del tamaño de las respectivas imágenes tomadas en las diferentes etapas de modificación de la superficie de las nanopartículas nos muestran que la mayor población de nanopartículas se encuentra centrada entre aproximadamente 30-40 nm (Fig. 16). Por otro lado, gracias al análisis de las imágenes se determinó que la relación de aspecto de las nanopartículas utilizadas es de aproximadamente 4 (Fig. 15), lo cual es óptimo para el propósito de nuestro trabajo, ya que con esta relación de aspecto la banda plasmónicas está centrada en la región infrarroja.

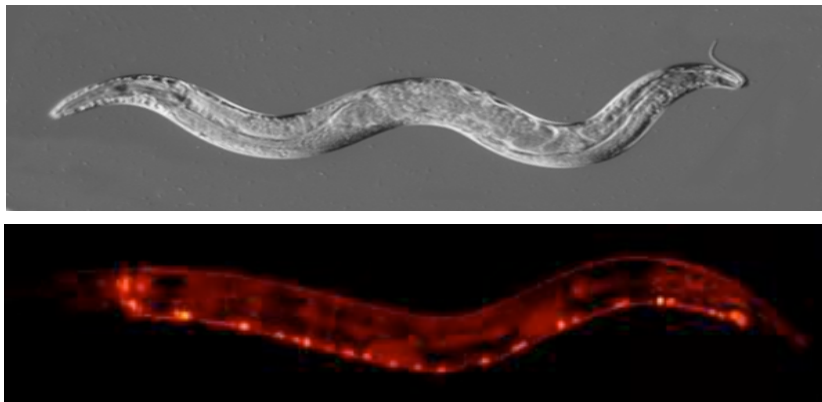


**Fig. 16: Histogramas del tamaño de nanovarillas de oro sin funcionalización (A), funcionalizado con PEG (B) y con péptido D1 (C), los datos muestran que las nanopartículas tienen un largo aproximadamente de 30 nm.  $n = 3$ . (Datos Presentados en Memoria de Título de Pedro Jara).**

### **Evaluación *in vivo* del efecto de nanopartículas funcionalizadas con péptido D1.**

Las pruebas preclínicas en modelos animales corresponden a una de las etapas más importantes en el desarrollo de nuevas tecnologías para el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades como EA. Uno de estos modelos es el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, que es un nemátodo microscópico, no patológico, de vida libre y que se encuentra distribuido ampliamente en ambientes terrestres en la naturaleza. Este modelo animal presenta varias ventajas para el trabajo de laboratorio, donde se destaca su alta capacidad reproductiva, ciclo de vida rápido, de fácil mantenimiento y cultivo en condiciones

controladas de laboratorio (Corsi et al., 2015). Una importante característica de este nemátodo es que es transparente (Fig. 17), lo cual es una ventaja si se tiene como objetivo detectar moléculas fluorescentes *in vivo* como es el caso de la Fig. 17, donde se muestra la proteína fluorescente RFP expresada en el sistema nervioso en nemátodos vivos mediante microscopía.



**Fig. 17:** *C. elegans*. Es posible evaluar la presencia de RFP (Proteína Fluorescente Roja) *in vivo*, ya que este organismo es transparente.

Los individuos silvestres de *C. elegans* producen la proteína APL1, proteína que tiene un alto grado de identidad con los dominios extra e intracelular de la APP humana. Sin embargo, esta proteína no es amiloidogénica, es decir, no forma agregados A $\beta$  (Ewald & Li, 2012). Debido a esto, el grupo de C. D. Link, en 1995 desarrollaron cepas transgénicas, genéticamente modificadas a las que se les incorporó en las células musculares el gen que codifica para el péptido A $\beta$ <sub>(1-42)</sub> humano (C. D. Link, 1995). En esta cepa el péptido A $\beta$  genera agregados en el sistema muscular que determinan la pérdida de su movilidad a lo largo de su ciclo de vida de manera similar a lo que podría ocurrir en el progreso de la EA. Este fenotipo ha sido evaluado y caracterizado *in vivo*, monitoreando así el progreso de la enfermedad desde sus inicios y durante diferentes etapas del ciclo de vida (Minniti et al., 2009; Rebolledo et al., 2011). Desde este punto de vista, este modelo presenta numerosas ventajas para el desarrollo de nuevas formas de detección del péptido A $\beta$  y sus agregados.

En esta tesis se emplearon dos cepas transgénicas que expresan A $\beta$ <sub>(1-42)</sub> humano en las células musculares (C. D. Link, 1995). La primera cepa, expresa A $\beta$  constitutivamente desde las etapas larvarias, acumulándose agregados fibrilares en las etapas adultas (Minniti et al., 2009). La acumulación de agregados puede detectarse con tioflavina S (ThS) y cuantificarse mediante microscopía fluorescente, aunque *ex vivo*, ya que es necesario fijar y permeabilizar al animal antes de hacer la tinción (Minniti et al., 2009). La segunda cepa, expresa mayoritariamente especies oligoméricas de A $\beta$  y presenta un fenotipo característico de parálisis (Fay et al., 2002; C. D. Link, 1995). Este fenotipo es mucho más violento, porque la forma principal en que se expresa A $\beta$  en esta cepa es su forma oligomérica (C. D. Link, 1995), que es la más tóxica y cuya detección es más difícil por ThS. En este estudio se propuso comparar la detección específica de diferentes especies de agregados en el modelo animal de *C. elegans*, utilizando diferentes sondas de CRANAD. Así como también, se propuso evaluar el aumento de la señal fluorescente mediante la presencia o ausencia de nanopartículas funcionalizadas con péptidos que se unen a A $\beta$ .

## **Hipótesis.**

Nanovarillas de oro funcionalizadas con el péptido D1 aumentan la intensidad de fluorescencia de CRANAD mejorando la detección de especies solubles e insolubles de  $\beta$ -amiloide *in vivo* en modelos transgénicos de *C. elegans* que expresan el péptido A $\beta$  (1-42) humano.

## **Objetivo general.**

Evaluar si la detección *in vivo* por fluorescencia de los agregados del péptido  $\beta$ -amiloide en el modelo de *C. elegans* se mejora en presencia de Nanovarillas de oro funcionalizadas con el péptido D1.

## **Objetivos Específicos.**

1. Evaluar la señal fluorescente emitida por CRANAD-2 en la detección de agregados insoluble de A $\beta$  en el modelo transgénico de *C. elegans* Cl2102 al co-administrar NVO-PEG-D1, en distintas edades de los individuos tratados.
2. Detectar y cuantificar los oligómeros del péptido A $\beta$  en el modelo *C. elegans* CL2006, mediante fluorescencia aumentada por superficie, al ser expuestos a CRANAD-58 y NVO-PEG-D1.

## **Metodología.**

### **Reactivos.**

Los siguientes reactivos se adquirieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, EE. UU.): Reactivos  $\text{HAuCl}_4$ , bromuro de cetiltrimetilamonio, borhidruro de sodio, ácido ascórbico,  $\text{AgNO}_3$ , tioflavina S, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), los reactivos Sulfo-N-Hidroxisuccinimida (Sulfo-NHS), solución salina tamponada con fosfato (PBS), HS-PEG-OMe y HS-PEG-OMe se adquirieron de JenKem Technology (Texas, EE. UU.).

### **Síntesis de nanovarillas de oro y modificación superficial con péptido D1.**

La síntesis de NVOs se realizó de acuerdo con el protocolo de síntesis mediado por semillas o núcleos descritos por Nikoobakht y El-Sayed (2003). Este protocolo consta de 2 pasos fundamentales. En primer lugar, se preparó una solución de semillas o núcleos para lo cual en un vial se añadieron 4,7 mL de CTAB 0,1 M a 27°C y se dejó bajo agitación durante 5 minutos. A esta solución se le agregó 42,5  $\mu\text{L}$  de 29,4 mM  $\text{HAuCl}_4$ . Finalmente, para generar los núcleos a partir de los cuales se obtuvieron las NVO, se agregó 300  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaBH}_4$  10 mM. Se agitó vigorosamente durante 10 segundos y se mantuvo bajo agitación suave hasta su uso a 27 ° C. El segundo paso de la síntesis consistió en la preparación de una solución de crecimiento. Para lo cual en un vial se añadió 10 mL de CTAB 0,1 mM a 27°C, luego se adicionaron 170  $\mu\text{L}$  de  $\text{HAuCl}_4$  29,4 mM y se agitó vigorosamente durante 10 minutos. Finalmente, se añadieron 75  $\mu\text{L}$  de ácido ascórbico 100 mM y 80  $\mu\text{L}$  de  $\text{AgNO}_3$  5 mM a la solución de crecimiento dejándose bajo agitación durante 30 segundos para luego añadir 120  $\mu\text{L}$  de solución de semilla previamente preparada, dejándose agitar durante 30 minutos para finalmente centrifugar el producto de la síntesis a 8000 rpm. El sedimento se resuspendió en 9,9 mL de agua Milli-Q. Con esto se obtuvo una solución de NVO de relación de aspecto 4, con una concentración aproximada de 1 nM (Jara-Guajardo et al., 2020)

Una vez que se obtuvieron las NVO, se les añadió 100  $\mu\text{L}$  de KOH 1 M. Se agitó durante 10 segundos y se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de HS-PEG5000-OMe 1 mM (pH = 12), se agitó durante 10 minutos, luego se centrifugó durante 15 minutos a 8600 rpm. Finalmente, el sedimento

obtenido se resuspendió en 9,9 mL de agua Milli-Q, se añadió 100 µL de KOH 1 M y después se agregaron 300 µL de HS-PEG5000-COOH 1 mM, se agitó durante 1 hora. La muestra se sonicó durante 10 minutos y se centrifugó durante 20 minutos a 13200 rpm. El producto obtenido de la modificación de la superficie de las NVO se almacenó a 4°C hasta su uso posterior.

La funcionalización de las NVO con el péptido D1 se llevó a cabo con NVO modificadas superficialmente con PEG5000, de acuerdo con el protocolo del párrafo anterior. Al *pellet* previamente recolectado en un tubo *ependorf* se le añadió 100 µL de NHS/EDC en una proporción de 2,5 respectivamente en tampón MES pH 5,5. La solución obtenida se sometió a sonicación durante 15 minutos, luego se centrifugó a 8600 rpm durante 10 minutos. Al *pellet* obtenido se le añadió 500 µL de péptido D1 en PBS, la solución se incubó durante la noche. Finalmente, el producto se centrifugó durante 20 minutos a 8600 rpm, el sedimento se resuspendió en agua Milli-Q y se almacenó a 4°C.

## **Caracterización de nanopartículas metálicas.**

### **Dispersión dinámica de luz (DLS).**

Las nanopartículas utilizadas en este trabajo se caracterizaron por dispersión dinámica de la luz (DLS), que proporciona información sobre sus diámetros hidrodinámicos y su estabilidad coloidal. Las determinaciones se realizaron por triplicado en el equipo Zetasizer 3000 de Malvern Instruments utilizando celda capilar plegable desechable (DTS1070) empleándose agua como dispersante a 25°C y teniendo en cuenta un índice de refracción de 1,332.

### **Potencial Z.**

La medición del potencial Z nos brinda información relativa sobre la carga superficial de la muestra de nanopartículas, lo cual es importante desde el punto de vista de la estabilidad coloidal. Estas mediciones se realizaron por triplicado en el equipo Zetasizer 3000 de Malvern Instruments. Como todas las mediciones se realizaron en agua, la aproximación de Smolochowski (Doane et al., 2012) se utilizó para calcular el potencial superficial Z a partir

de la movilidad electroforética de la nanopartícula. Para realizar estas mediciones, se usó un medio acuoso a 25°C usando un índice de refracción de 1,332. Se utilizaron celdas capilares plegadas desechables (DT1070).

### **Espectroscopía UV-Visible-NIR.**

La caracterización mediante esta metodología se basa en la identificación del plasmón superficial, expresado en absorbancias máximas específicas según el tipo de nanopartícula y con que está funcionalizada. De esta manera, es posible rastrear las diferentes etapas de modificación de una nanopartícula para obtener una herramienta adecuada para los ensayos posteriores. En el caso de la NVO, las bandas de absorción correspondientes a los plasmones son aproximadamente 520 nm, longitudinales, entre 700 y 1000 nm, transversales, dependiendo de la relación de aspecto de la nanopartícula (S. Link & El-Sayed, 2003). Se utilizó un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25, utilizando cubetas desechables de paso óptico de 1 cm. Como blanco de cada muestra se utilizó agua Milli-Q.

### **Análisis de aminoácidos de NVO funcionalizadas.**

El número de péptidos por nanopartícula se determinó usando muestras de concentración conocida de nanopartículas (determinado por espectroscopía de absorción atómica). Estas muestras se concentraron por centrifugación a 5900 g durante 20 minutos para obtener una solución concentrada de 40 µL. Posteriormente, se realizó un análisis de aminoácidos obteniendo la concentración de péptido en la muestra. Para esto se realizó una hidrólisis de las NVO modificadas superficialmente (NVO-PEG-D1) agregando HCl 6 N junto con un patrón interno de concentración conocida (ácido aminobutírico). La muestra se calentó en un tubo cerrado a 110°C durante 72 horas. Luego se enfrió el tubo eliminando además el HCl hasta sequedad mediante el empleo de rotavapor. Lo obtenido se resuspendió en 200 µL de HCl 20 mM. Se tomó una alícuota de 20 µL de la muestra resuspendida y se le agregó 60 µL de tampón borato. La muestra se derivatizó agregando 20 µL de 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato (AQC), el cual se dejó por 1 minuto a temperatura ambiente para luego mantenerlo por 10 minutos a 55°C. Una vez preparada la muestra, se llevó a cabo el proceso de inyección de la muestra en un equipo HPLC-PDA, el cual contenía una columna AccQ-Tag (C18; 4 µm, 3,9 x 15 mm), así se obtuvieron los correspondientes picos

cromatográficos de los distintos aminoácidos presentes en la muestra. De esta manera se obtuvo el número de moléculas de péptidos por nanopartícula.

### **Cultivo y crecimiento de cepas de *C. elegans*.**

Se utilizaron cepas de *C. elegans* transgénicas que expresan el péptido A $\beta$ <sub>(1-42)</sub> humano en sus células musculares. Estas cepas están disponibles en el banco de cepa de CAENORHABDITIS GENETICS CENTER (CGC) de la Universidad de Minnesota que es mantenido por el National Institutes of Health de USA. Las cepas de *C. elegans* utilizadas en este trabajo son:

- CL2122: dvIs15 [(pPD30,38) unc-54(vector) + (pCL26) mtl-2::GFP]. Control de la cepa CL2120, fenotipo Wild-type(University of Minnesota, 2018).
- CL2120: dvIs14 [pCL12- (unc-54::hu-A $\beta$ 1-42+(CL26) mtl-2::GFP](University of Minnesota, 2018).
- CL2006: dvIs2 [pCL12 (unc-54 :: hu-A $\beta$  1-42 minigen) + pRF4] sensible a temperatura a 20°C, mantención a 15°C (University of Minnesota, 2018).

#### *Medios de cultivo y mantención de C. elegans:*

Los medios que se utilizaron para esta sección serán los que se describen a continuación:

- Medio M9: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 44 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 36 mM, MgSO<sub>4</sub> 0,5 mM, NaCl 86 mM.
- Medio de crecimiento sólido NGM: 1,7% de agar, 0,3% de NaCl y 0,25% de bactopectona. Autoclavado por 50 minutos.
- Solución de cloro para sincronización: 28% NaOH 4%, 40% hipoclorito de sodio (cloro comercial) y 32% de agua destilada (Stiernagle, 2006).

#### *Cultivo y mantención de C. elegans:*

Los nemátodos fueron cultivados en medio NMG en placas Petri de 60 mm durante todo el ciclo de desarrollo, alimentados con OP50 (*E. coli*) y mantenidos en incubadoras a 20°C, según lo establecido en los protocolos por Stiernagle, 2006. Para trabajar con individuos hermafroditas de la misma edad, la población de nemátodos se debió sincronizar en la misma etapa de desarrollo, para esto los nemátodos hermafroditas en edad reproductiva fueron tratados de acuerdo con el método descrito por Stiernagle, 2006. En resumen,



aproximadamente 100 individuos adultos reproductivos se incubaron en la solución de Cloro por 4 min, se centrifugaron los huevos y se resuspendieron en 1 mL de M9 para eliminar el Cloro de la solución y se resuspendieron los huevos en 200 uL de M9 para sembrarlos en placas nuevas de NGM sembradas con bacterias OP50 (Stiernagle, 2006).

Las cepas de *C. elegans* denominadas CL2120 y CL2006 se cultivaron y mantuvieron en medio NGM de acuerdo con el protocolo descrito por Stiernagle, 2006. Ambas cepas se mantuvieron en placas que se inocularon previamente con *Escherichia coli* OP50, que se cultivaron previamente en medio LB (Lenox Broth Base Invitrogen Life Technologies USA).

Para los ensayos, los nemátodos fueron recolectados en la etapa larval L4 (48h desde huevo) por medio de lavado de la placa con medio M9 y posteriormente se precipitaron por centrifugación suave, desechando el sobrenadante. Obteniendo así al día siguiente individuos hermafroditas adultos de 1 día en condiciones óptimas de experimentación, esto es válido para las 2 cepas con las que se trabajó.

### **Incubación de *C. elegans* con CRANAD-2/58.**

Individuos adultos sincronizados en diferentes edades de adulto fueron incubados durante 1 hora con CRANAD-2 o CRANAD-58 4,7  $\mu$ M en medio M9. Posteriormente, los nemátodos se recolectaron por centrifugación suave y se pasaron a placas de crecimiento normal durante 4 horas (lavado). Los ensayos para la cepa CL2120 se realizaron con poblaciones sincronizadas de animales adultos de 2, 3 y 5 días. Los días se consideraron a partir de la etapa larval L4 (48 horas después del estado de huevo). En el caso de la cepa CL2006, los análisis se llevaron a cabo en nemátodos adultos de 2 y 5 días después de la etapa larval L4.

### **Incubación de *C. elegans* con NVO-PEG-D1 o NVO-PEG.**

Observación del efecto SEF en individuos adultos de 2, 3 o 5 días: para ello se recolectaron nemátodos en estado larval L4, que luego se sedimentaron por centrifugación suave y se

desechó el sobrenadante. Luego se incubaron, con NVO-PEG-D1 o NVO-PEG a una concentración de 2 nM durante 4 horas. Posteriormente se pasaron los nemátodos a la placa de agar con bacterias. En esta etapa se les permite a los *C. elegans* alimentarse durante 2 horas incubándose nuevamente con NVO-PEG-D1 o NVO-PEG 2 nM durante 4 horas. Seguidamente los nemátodos fueron dispuestos en placas de crecimiento normal durante un período de 12 horas. Al día siguiente fueron tratados con CRANAD-2 o CRANAD-58 de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente (Morales-Zavala F et al, 2017).

### **Tinción con ThS.**

La tinción de los nemátodos con Tioflavina S se realizó de acuerdo con el protocolo descrito por Fay, Fluet et al., (1998). Primero, se recogieron los nemátodos de las placas de cultivo y posteriormente se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS, pH 7,4, durante 24 horas a 4°C. La solución de fijación se desechó y se añadió la solución de permeabilización (Tris 125 mM, pH 7,4, 1% Triton X-100, 5% de  $\beta$ -mercaptoetanol), los animales se incubaron con esta solución durante 24 horas a 37°C. Luego se realizaron tres lavados con PBS-T (PBS más Triton X-100 al 0,1%). Tinción con 0,125 % ThS (Sigma) en etanol al 50% durante dos minutos y finalmente el desteñido se realizó con etanol al 50% durante dos minutos. Después de terminar el proceso de desteñido, las muestras se resuspendieron en PBS y se montaron en portaobjetos usando Fluoromount como medio de montaje. El análisis de los nemátodos se realizó mediante microscopía confocal, obteniendo imágenes de la región de la cabeza donde es posible ver mejor las placas amiloides.

### **Evaluación de la incorporación de CRANAD en *C. elegans* mediante Fluorimetría.**

Nemátodos CL2120 y CL2122 adultos de 2 días post etapa larvaria previamente sincronizados, se incubaron con CRANAD-2 (47  $\mu$ M) según el protocolo descrito anteriormente. Los individuos tratados se recolectaron y se dispusieron 100 nemátodos por grupo experimental en una placa de 96 pocillos Corning 3573. De esta forma se evaluó la incorporación del fluoróforo directamente en estos animales mediante un Fluorímetro de placas BioTek, modelo synergy MX, excitando a 639 nm, obteniendo espectros de emisión de CL2120 y CL2122 tratados con CRANAD-2 , utilizando además como blanco PBS.

### **Análisis por microscopía de los animales tratados con CRANAD y NVO.**

Los individuos de diferentes cepas tratadas con NVO-PEG-D1 o NVO-PEG y posteriormente incubados con CRANAD-2 o CRANAD-58, se montaron en portaobjetos para ser observados en el microscopio confocal. Los individuos fueron analizados mientras estaban vivos, utilizando como paralizante la droga llamada Levamisol (35 mM) o Azida de Sodio (25 mM) para así inmovilizar a los nemátodos durante la toma de imágenes. Las muestras se analizaron en un microscopio confocal Zeiss modelo LSM 700, con la lente 40x, para capturar imágenes de las muestras para el procesamiento posterior de datos. Las condiciones de toma de imágenes fueron las mismas para todos los ensayos: láser de 649 nm, potencia al 4%, ganancia de 600, tiempo de exposición de 1,94 segundos y tamaño de píxel de 0,10  $\mu\text{m}$ . Las imágenes se centraron en la región de la cabeza, ya que es una región rica en tejido muscular y no tiene sitios autofluorescentes como el intestino de los nemátodos que recorre todo el cuerpo. Las imágenes obtenidas fueron analizadas con el software ImageJ.

Para el análisis de imágenes mediante ImageJ, se seleccionó la sección de la cabeza del nemátodo, se eliminó el *background* (parámetros por defecto), se le cambió el formato de la imagen a 8 bits y posteriormente se realizó ajuste de *threshold* de tal forma que solo sean cuantificados los elementos que corresponden a agregados. Finalmente se realizó “*Analyze particles*” contabilizando partículas superiores a 5 píxeles de tamaño, circularidad de 0,00 – 1,00, excluyendo los elementos de los bordes. Los resultados se recolectaron en forma de intensidad integrada (IntDen) promedio de la imagen analizada, número de partículas y área promedio de las partículas presentes en la imagen.

### **Análisis estadístico.**

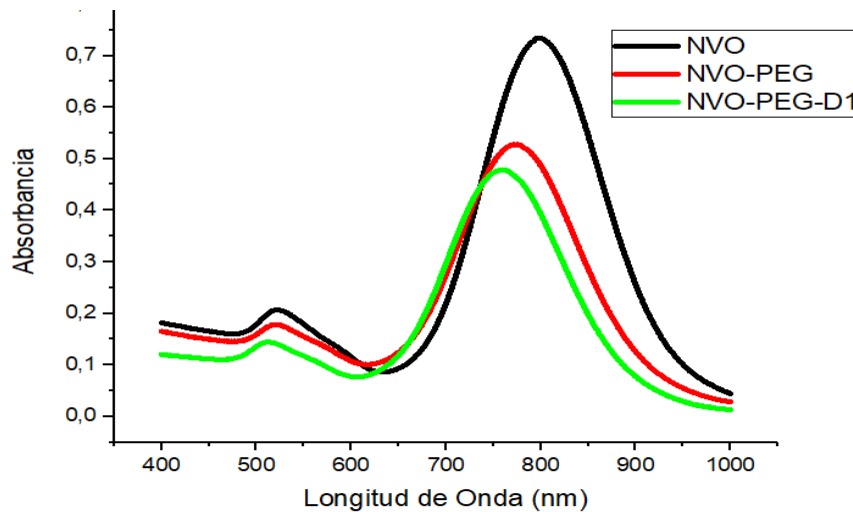
Todo el análisis estadístico de los datos obtenidos mediante el análisis de imágenes por microscopía se realizó en Graph Pad Prism 8, utilizando *Ordinary one-way ANOVA* (Brown-Forsythe test, Bartlett's test y Dunnett's multiple comparisons test).

## Resultados.

**Objetivo 1: Evaluar la señal fluorescente emitida por CRANAD-2 en la detección de agregados insoluble de A $\beta$  en el modelo transgénico de *C. elegans* CI2102 al co-administrar NVO-PEG-D1, en distintas edades de los individuos tratados.**

### Caracterización de nanovarillas de oro.

Las nanopartículas se sintetizaron según el método de crecimiento mediado por semillas (Nikoobakht & El-Sayed, 2003). Las NVO sintetizadas presentaron dos bandas plasmónicas características ubicadas aproximadamente en la región de 520 nm (plasmón transversal) y 700-800 nm (plasmón longitudinal) (Fig. 18). Luego de la modificación de las NVO con PEG y con D1 fue posible observar el desplazamiento de las curvas en las bandas plasmónicas hacia la región UV, lo que se puede relacionar con una modificación efectiva de la superficie de la nanopartícula (Adura et al., 2013) (Fig. 18 líneas roja y verde).



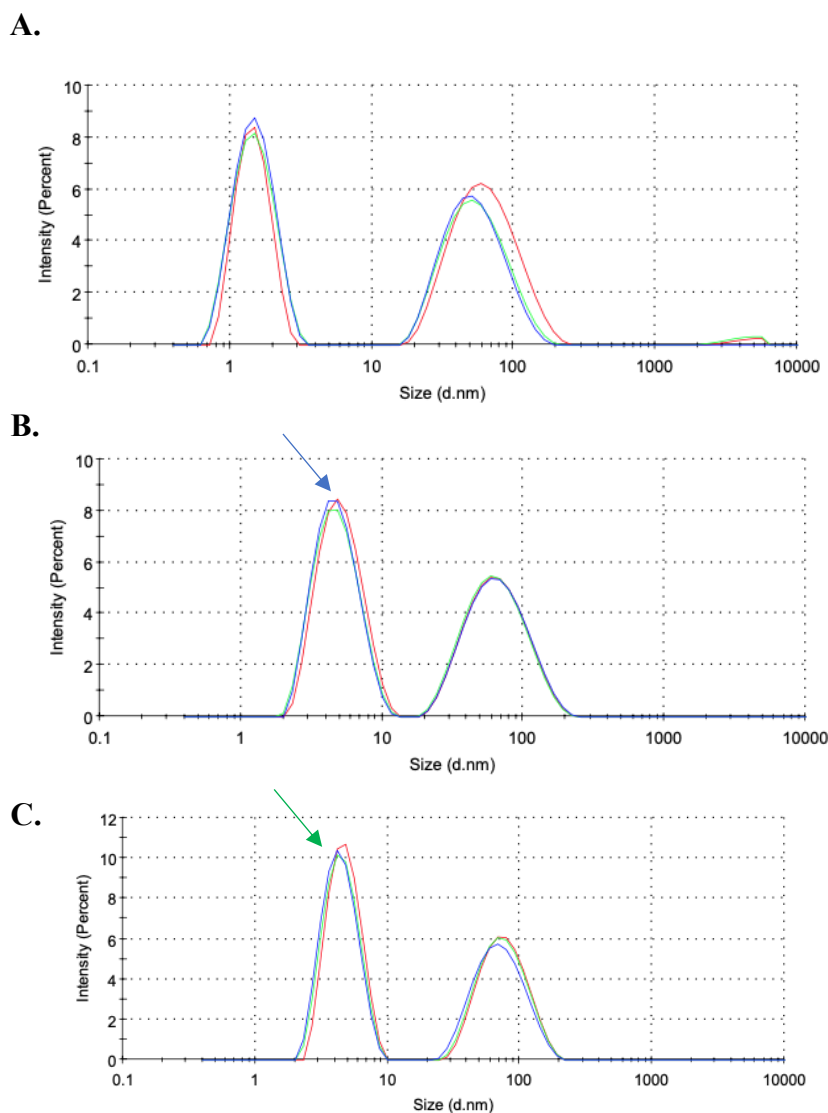
**Fig. 18: Espectros de absorción UV-Vis-NIR de NVO, NVO-PEG y NVO-PEG-D1.** En el gráfico es posible apreciar un desplazamiento del máximo de absorción de las NVO cuando la superficie está modificada.

Mediante el análisis de la dispersión dinámica de la luz (DLS), no se observaron cambios en los valores del diámetro hidrodinámico promedio (d.nm) (Tabla 3). En cambio al

analizar la distribución de tamaños por intensidad tal como se detalla en la figura 19 las nanovarillas obtenidas exhibieron dos máximos en términos de intensidad. Uno de estos está relacionado con el eje transversal de la NVO (menores tamaños), mientras que el segundo máximo, se relaciona con el eje longitudinal de la NVO (mayores tamaños). Estos datos muestran que al modificar la superficie de la NVO con PEG, la señal del primer máximo se desplaza hacia la derecha, indicando un aumento de tamaño (Fig. 19 B indicado por la flecha azul). Por otro lado el desplazamiento que sufre el primer máximo al funcionalizar las NVO-PEG con el péptido D1 es mínimo, sin embargo, se presenta un aumento en la intensidad de la señal (Fig. 19 C indicado por la flecha azul verde). El segundo máximo no presenta cambios significativos en ninguna de las etapas de modificación superficial.

Sistema	d.nm(nm)	PdI	Z (mV)	pH
NVO	10,0 ± 2,0	0,5	36,2 ± 0,9	7
NVO-PEG	10,0 ± 0,2	0,5	-18 ± 1	12
NVO-PEG-D1	9,4 ± 0,3	0,4	-25,3 ± 0,4	7,4

**Tabla 3:** Las NVO muestran cambios en los parámetros como el diámetro hidrodinámico, PdI y potencial Z cuando son modificadas. pH corresponde al cual se realizaron las determinaciones.



**Fig. 19: Distribución de tamaño de NVOs por intensidad.** **A.** Distribución de tamaño de NVO desnudas. **B.** Distribución de tamaño de NVO-PEG. **C.** Distribución de tamaño de NVO-PEG-D1. Curvas roja, verde y azul corresponden a triplicados. La flecha azul indica el corrimiento de los tamaños de las NVO cuando se funcionalizan con PEG. La flecha verde indica el aumento de la intensidad de la señal cuando se funcionalizaron las NVO-PEG con el péptido D1.

Los valores del potencial Z de las NVO muestran cambios debido a variaciones en las cargas dispuestas en la superficie del nanosistema. El cambio de una carga neta positiva (NVO) a una carga negativa (NVO-PEG) en el proceso de funcionalización de PEG (Tabla 3), se debe a que las NVO están rodeadas por CTAB (tensoactivo catiónico que proporciona estabilidad coloidal), sin embargo, después de la modificación de la superficie con HS-PEG-COOH, el nanosistema queda con una carga negativa, esto se debe al grupo

carboxilo, que se encuentra desprotonado al pH de trabajo (pH=12). También podemos apreciar que la carga negativa aumenta (NVO-PEG-D1) como consecuencia de la presencia del péptido D1 en el nanosistema (Tabla 3).

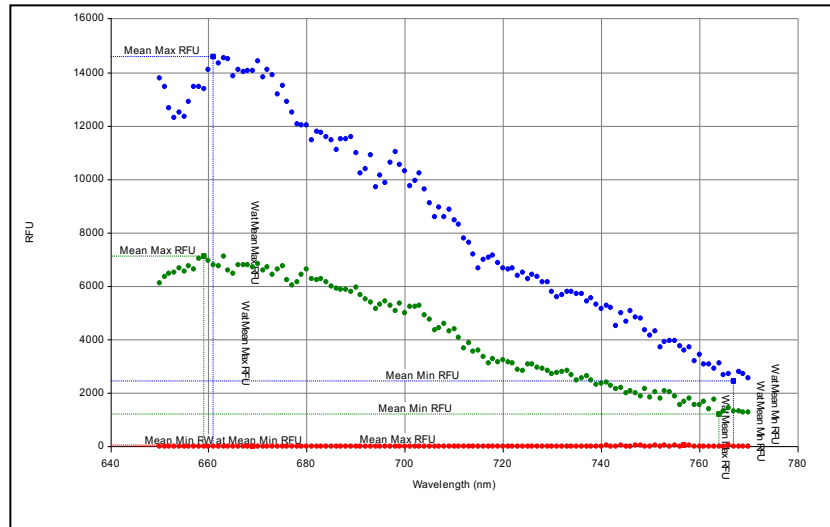
#### **Análisis de aminoácidos presentes en NVO funcionalizadas.**

Con el fin de determinar el número de moléculas de péptido en la superficie de la nanopartícula se realizó un análisis de aminoácidos de las NVO funcionalizadas. Este análisis permitió estimar la cantidad total de péptido por NVO. En primer lugar, se concentraron las muestras con NVO-PEG-D1 mediante centrifugación, para luego llevar a cabo el análisis. De forma paralela se tomó una alícuota de las mismas muestras y se determinó su concentración mediante espectrofotometría. Así se obtuvo la concentración molar de péptido y de NVO presentes en las muestras. Finalmente, se calculó la razón entre ambas concentraciones obteniendo el valor de  $1176 \pm 203$  moléculas de péptido/NVO.

#### **Evaluación de la internalización y de la toxicidad de CRANAD en *C. elegans*.**

Con el objetivo de evaluar si las sondas de CRANAD-2 o CRANAD-58 podrían tener un efecto tóxico sobre los nemátodos, primero se evaluó la incorporación directa de estos fluoróforos en el medio de cultivo o en el alimento OP50. Aunque no mostró ningún efecto de toxicidad en el crecimiento o movimiento de los individuos expuestos, esta estrategia fue descartada porque la concentración que se puede alcanzar es muy baja (menor a  $1 \mu\text{M}$ ). Posteriormente, se probó realizar una incubación directa de las sondas sobre los nematodos mantenidos en el medio líquido M9 (buffer fosfato donde los individuos pueden sobrevivir por rangos cortos de tiempo entre 1 a 4 horas). Se seleccionaron 100 individuos y se expusieron a  $47 \mu\text{M}$  CRANAD-2 en medio M9. Las pruebas se realizaron tanto para la cepa control que no expresan  $A\beta$  (CL2122), como para la cepa de transgénicos que expresan  $A\beta_{(1-42)}$  (CL2120). Se probaron períodos de 1 y 2 horas de exposición con CRANAD-2 y posteriormente los animales se sometieron a una etapa de recuperación de 4 horas en medio de crecimiento y régimen de alimentación normal. Luego de la etapa de recuperación los nemátodos fueron dispuestos en una placa de 96 pocillos según lo descrito en la metodología y se procedió a realizar un análisis mediante fluorimetría. Como se muestra en la Fig. 20, ambas cepas presentaron fluorescencia. Sin embargo, la cepa

transgénica CL2120 (espectro azul) mostró una mayor señal con respecto al control no transgénico CL2122 (espectro verde), resultado que indica mayor retención del fluoróforo en la cepa CL2120 que expresa A $\beta$ . Esto nos sugiere que el CRANAD-2 fue incorporado en el tejido de los individuos tratados.

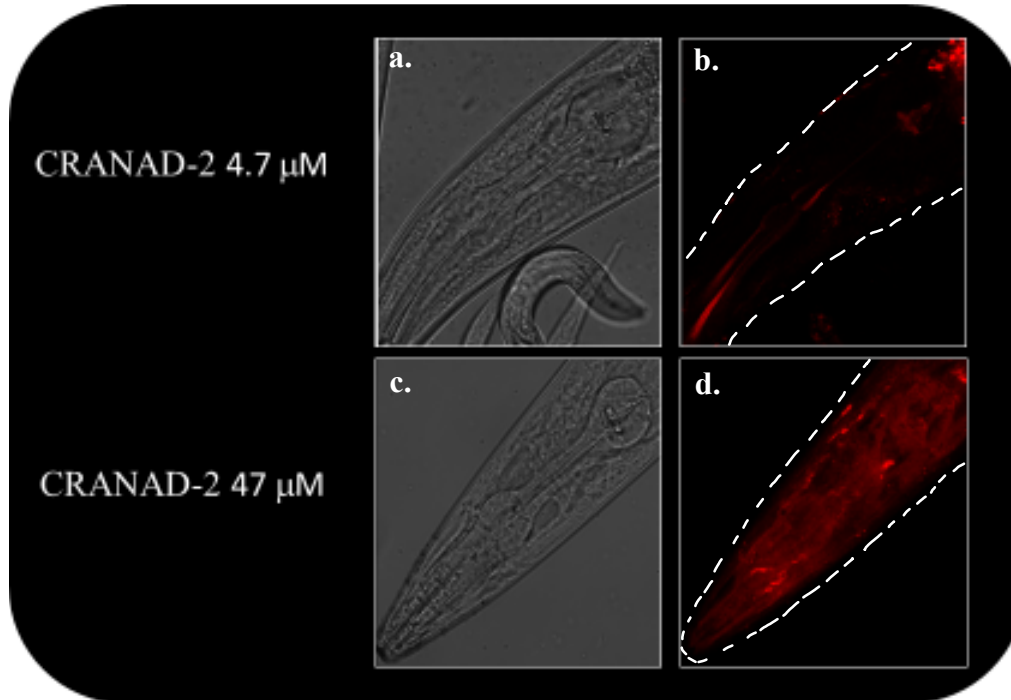


**Fig. 20: Espectro de emisión en el Fluorímetro de individuos *C. elegans* tratados con CRANAD-2.** Individuos de la cepa sin-A $\beta$  (Verde), individuos de la cepa con A $\beta$  (azul), blanco del medio de incubación (Rojo). El espectro de emisión asociado al tratamiento con CRANAD-2 en la cepa transgénica (Azul), muestra una señal de fluorescencia significativamente mayor (2 veces) con respecto al control no transgénico (verde), indicando mayor retención del fluoróforo en la cepa que expresa A $\beta$ .

Posteriormente, se realizó un ensayo para determinar la concentración óptima para el tratamiento: la mínima concentración de CRANAD-2, que permita obtener una señal cuantificable por microscopía confocal, pero con la mínima toxicidad para los nemátodos. Para estos ensayos se incubaron individuos adultos jóvenes (aproximadamente 100 por cada ensayo) de la cepa CL2120, donde se probaron concentraciones de CRANAD-2 de 47  $\mu$ M, 4,7  $\mu$ M y 0,47  $\mu$ M. En este ensayo se determinó que la concentración de 47  $\mu$ M es tóxica para los nemátodos ya que estos morían durante el proceso de incubación. Por otro lado, la concentración de 0,47  $\mu$ M no mostró una señal fluorescente significativa en microscopía confocal. De esta manera, la concentración considerada óptima fue de 4,7



$\mu\text{M}$ , la cual no presentó evidencias de toxicidad en los nemátodos y otorga una señal fluorescente detectable cuando son observados por microscopía confocal (Fig. 21b).



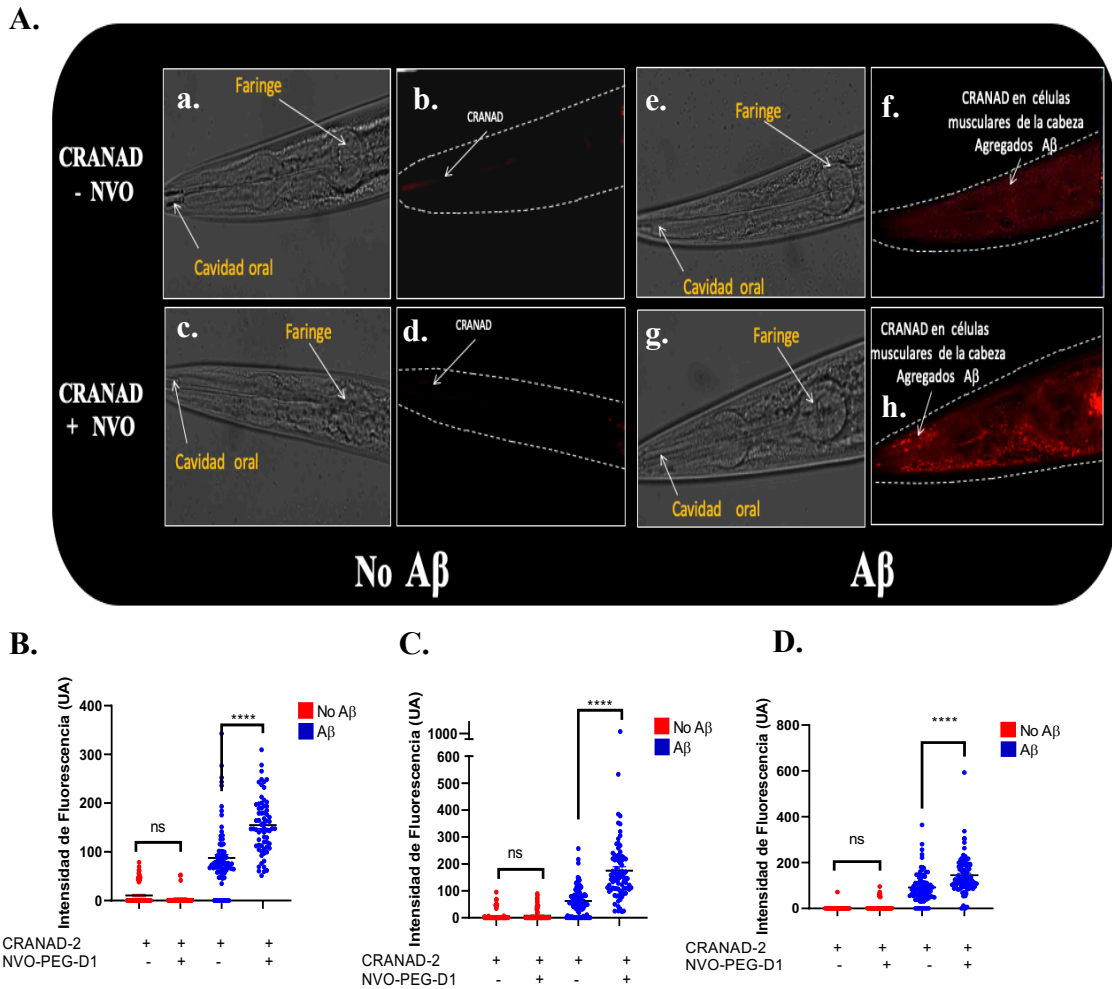
**Fig. 21:** *C. elegans* que expresan  $A\beta_{(1-42)}$  (CL2120) sometidos a tratamiento con distintas concentraciones de CRANAD-2. Imágenes de microscopía confocal de la cabeza de *C. elegans* adultos de 2 días. Las imágenes **a** y **c** corresponden al campo claro de las respectivas imágenes de fluorescencia **b** y **d**. Las imágenes fueron obtenidas usando un láser de 639 nm correspondiente al infrarrojo cercano, en las mismas condiciones de exposición, intensidad del láser 4% y usando el objetivo de 40x. **a** y **b** corresponden a nemátodos tratados con CRANAD-2 4,7  $\mu\text{M}$ . **c** y **d** corresponden a nemátodos tratados con CRANAD-2 47  $\mu\text{M}$ .

#### **Evaluación *in vivo* del efecto de NVO-PEG o NVO-PEG-D1 en la señal fluorescente de CRANAD-2/58.**

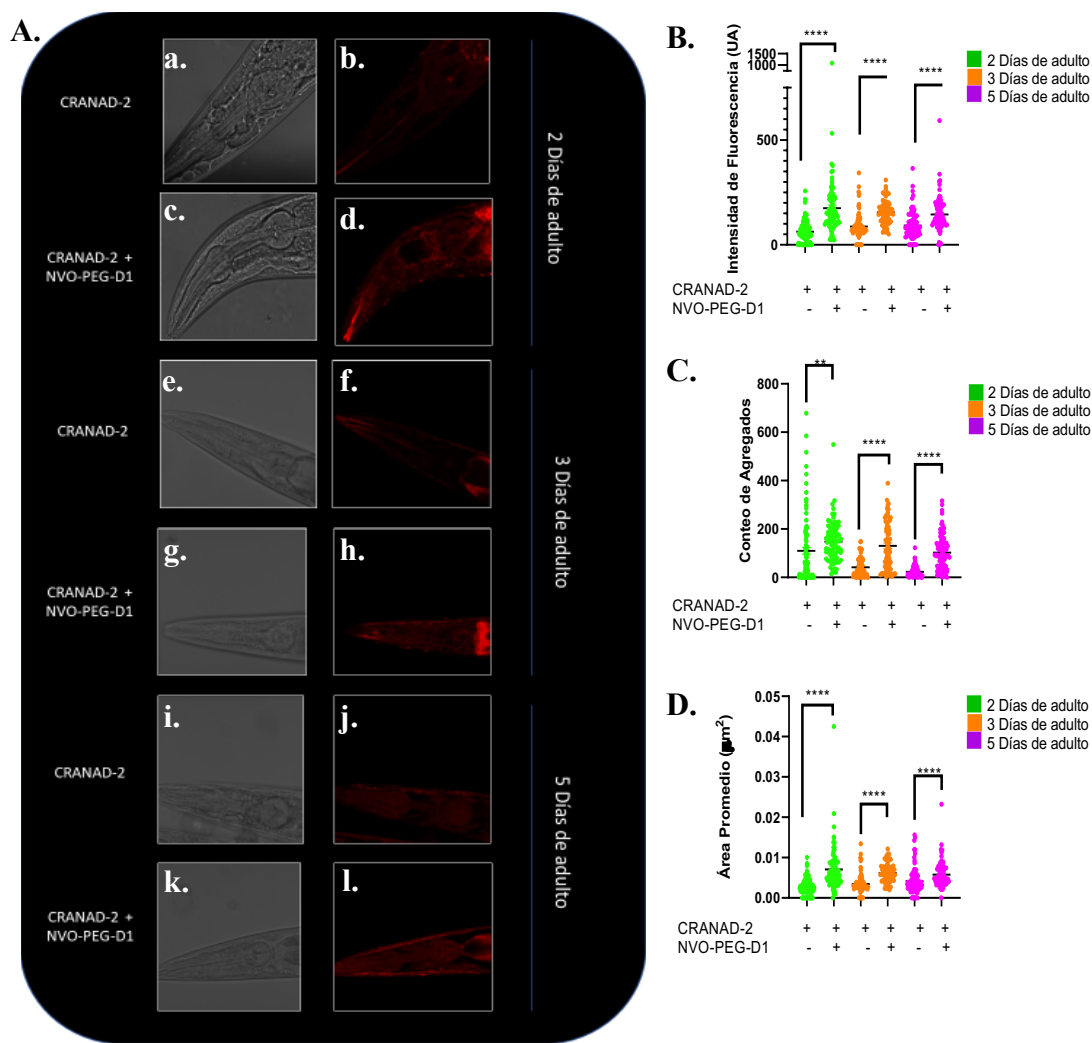
Para la detección *in vivo* de  $A\beta$  por medio de la sonda fluorescente CRANAD-2, se utilizó la cepa CL2120, que presenta principalmente especies insolubles de  $A\beta$  (Minniti et al., 2009; Rebolledo et al., 2011). La Fig. 22 A muestra que la sonda CRANAD-2 presenta una señal de fluorescencia solo en el caso de aquellos individuos de la cepa que expresa  $A\beta$

CL2120 (Fig.22 Ae, f) y no en la cepa control CL2122, que no expresa A $\beta$  (Fig.22 Aa, b). Si bien la sensibilidad es baja aún, la Fig. 22 Af muestra que se logra una señal cuantificable, es por esto, que el siguiente paso fue evaluar el aumento de esta señal utilizando nanovarillas de oro (NVOs). Estudios anteriores de Morales-Zavala F *et al*, 2017 indican que individuos de *C. elegans* de la cepa CL2120 cuando eran tratados con NVO-PEG-D1, a una concentración de 2 nM por 8 horas, eran capaces de incorporar a las NVOs. Considerando estos antecedentes, nemátodos adultos de 1 día se incubaron con NVO-PEG-D1 a 2nM durante 8 horas. Posteriormente se trataron durante 1 hora con CRANAD-2 a 4,7  $\mu$ M y luego fueron tratados durante 4 horas bajo condiciones de alimentación normal. En esta última etapa se produjo un efecto de lavado de las sondas dejando solo aquellas que se incorporen en los tejidos de los animales tratados.

Los resultados de la Fig. 22 muestran que hay un aumento en la sensibilidad de CRANAD-2 en la detección de agregados de A $\beta$ , cuando los nemátodos son tratados previamente con NVO-PEG-D1. Esto se ve reflejado en el aumento de 2,8; 1,8 y 1,6 veces de la señal fluorescente de CRANAD-2 para los nemátodos adultos de 2, 3 y 5 días, respectivamente (Fig. 22 gráficos B, C y D). Es interesante que este efecto de las NVOs también se correlaciona con el recuento del número de agregados de A $\beta$  detectados en las diferentes edades. Las cuantificaciones muestran un aumento de 1,3, 3,2 y 4,4 veces del control, a medida de que los individuos son más viejos (Fig. 23 gráfico C). Se puede observar que el efecto de aumento en la señal fluorescente se mantiene en todas las edades de los individuos tratados, siendo mayor el aumento en los más jóvenes (2 días de adulto), con 2,8 veces más alta la intensidad en el grupo tratado con NVO-PEG-D1 (Fig. 22 B). Contrariamente, el conteo de agregados es más alto en animales más viejos (5 días de adulto), mostrando un valor de 4,4 veces superior respecto del control (Fig. 23 C). Por otro lado se realizaron determinaciones del área promedio de los agregados, lo cual es indicativo de su tamaño, al igual que en los parámetros anteriores, se observa un aumento significativo de 2,9, 1,8 y 1,3 para los nemátodos CL2120 de 2, 3 y 5 días de adulto, respectivamente (Fig. 23 D).



**Fig. 22: La co-incubación de CRANAD-2 y NVO-PEG-D1 aumenta la sensibilidad de CRANAD-2 en el reconocimiento de los agregados insolubles de  $A\beta$ .** **A.** Imágenes representativas obtenidas por microscopía confocal de la cabeza de adultos de *C. elegans* de 2 días. Imágenes **a**, **c**, **e** y **g** corresponden al campo claro de las imágenes **b**, **d**, **f** y **h** obtenidas usando un láser de 639 nm correspondiente al infrarrojo cercano. Para todas las imágenes se utilizaron las mismas condiciones de exposición e intensidad del láser 4%, usando el objetivo de 40x. **a**, **b**, **c** y **d** corresponden a cepas controles (CL2122) que no expresan el péptido  $A\beta_{(1-42)}$ . **e**, **f**, **g** y **h** corresponden a imágenes de la cepa transgénicas que expresan  $A\beta_{(1-42)}$  (CL2120) **B.** Gráfico que compara la intensidad de la fluorescencia de los agregados detectados en nemátodos adultos de 2 días. **C.** Gráfico que compara la intensidad de fluorescencia en nemátodos adultos de 3 días. **D.** Gráfico que compara la intensidad de fluorescencia de los agregados detectados en nemátodos adultos de 5 días. Los datos corresponden a promedios  $\pm$  SEM de al menos tres ensayos independientes. Se utilizó ANOVA para el análisis estadístico. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , \*\*  $p < 0,01$ . Se analizaron al menos 30 animales por ensayo y por cada condición.



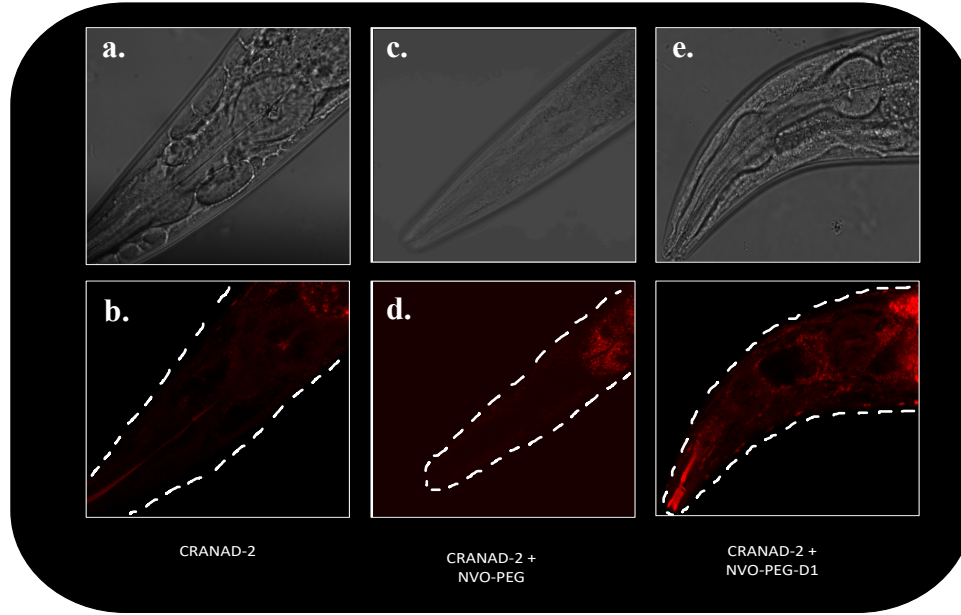
**Fig. 23: La co-incubación de los nemátodos con CRANAD-2 y NVO-PEG-D1 aumenta la sensibilidad en la detección de A $\beta$  insoluble en todas las edades de los individuos analizados.** **A.** Imágenes de la cabeza de adultos de *C. elegans* obtenidas por microscopía confocal. Imágenes izquierdas corresponden al campo claro y las derechas corresponden a imágenes obtenidas usando un láser de 639 nm correspondiente al infrarrojo cercano del mismo individuo. Para todas las imágenes se utilizaron las mismas condiciones de exposición e intensidad del láser 4%, usando el objetivo de 40x. **a, b, c y d** nemátodos CL2120 adultos de 2 días. **e, f, g y h** nemátodos CL2120 de adultos 3 días. **i, j, k y l** nemátodos CL2120 adultos de 5 días. **B.** Gráfico que compara la Intensidad de fluorescencia de los nemátodos CL2120 en las 3 edades analizadas (2, 3 y 5 días) tratados con CRANAD-2 con o sin incubación con NVO-PEG-D1. **C.** Gráfico que compara el número de agregados detectados en las 3 edades analizadas (2, 3 y 5 días) tratados con CRANAD-2 con o sin incubación con NVO-PEG-D1. **D.** Gráfico que compara el área promedio de los agregados detectados en adultos de 2, 3 y 5 días, tratados con CRANAD-2 con o sin incubación con NVO-PEG-D1. Los datos corresponden a promedios  $\pm$  SEM de al

menos tres ensayos independientes. ANOVA se utilizó para el análisis estadístico. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , \*\*  $p < 0,01$ . Se analizaron al menos 30 animales en cada ensayo independiente.

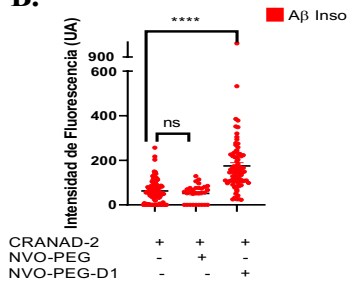
Con el objetivo de evaluar la participación del péptido D1 en el efecto observado anteriormente de las NVOs sobre de CRANAD-2, comparamos la señal fluorescente de CRANAD-2 co-incubando individuos de la cepa CL2120 con NVO funcionalizadas solo con PEG (NVO-PEG) vs la incubación de NVO-PEG-D1. Los resultados de la Fig. 24 muestran que estas nanopartículas sin péptido D1 no generaron un aumento en la señal de fluorescencia de CRANAD-2. Esto sugiere que se requiere del péptido D1 para obtener una unión correcta entre las nanopartículas y el agregado insoluble de  $A\beta$ , ya que no hay cambio en la fluorescencia emitida por CRANAD-2 en nemátodos CL2120 adultos de 2 días (Fig. 24 B). La disminución en el número de los agregados si bien es estadísticamente significativa con respecto al control, esto se puede deber a la gran dispersión de los datos (Fig. 24 C).

Posteriormente se evaluó la sonda CRANAD-58 que posee una mayor sensibilidad para detectar especies solubles de  $A\beta$ . Para esto los nemátodos CL2120 (que presentan  $A\beta$  insoluble) de 2 días de adulto se incubaron con CRANAD-58 siguiendo el mismo protocolo de CRANAD-2. La Fig. 25 muestra que la detección de agregados solubles en esta cepa es similar cuando se tratan con NVO-PEG o NVO-PEG-D1 (Fig. 25 B). Tampoco se observaron diferencias en el conteo de agregados indicando que la incubación de los nemátodos con NVO-PEG-D1 o NVO-PEG y CRANAD-58 (Fig. 25 C), no aumentó la sensibilidad de la detección de  $A\beta$ . En cuanto al área promedio de los agregados, se mostró una disminución en el grupo tratado con NVO-PEG, sin embargo esto se puede deber a la alta dispersión de los datos, por otro lado el grupo tratado con NVO-PEG-D1 no mostró diferencias significativas con respecto al control (Fig. 25 D). Cabe destacar que la escala de valores en la detección CRANAD-58 tanto en el conteo, número y área de los agregados (Fig. 25) es menor al detectado por CRANAD-2 (Fig. 24), en el caso del área puede llegar a ser 10 veces menor.

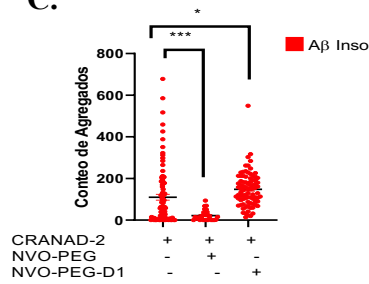
A.



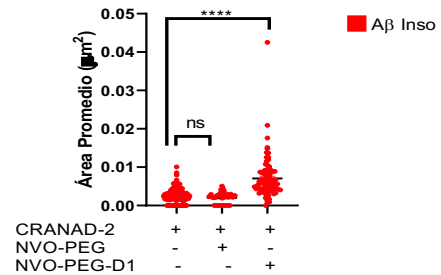
B.



C.

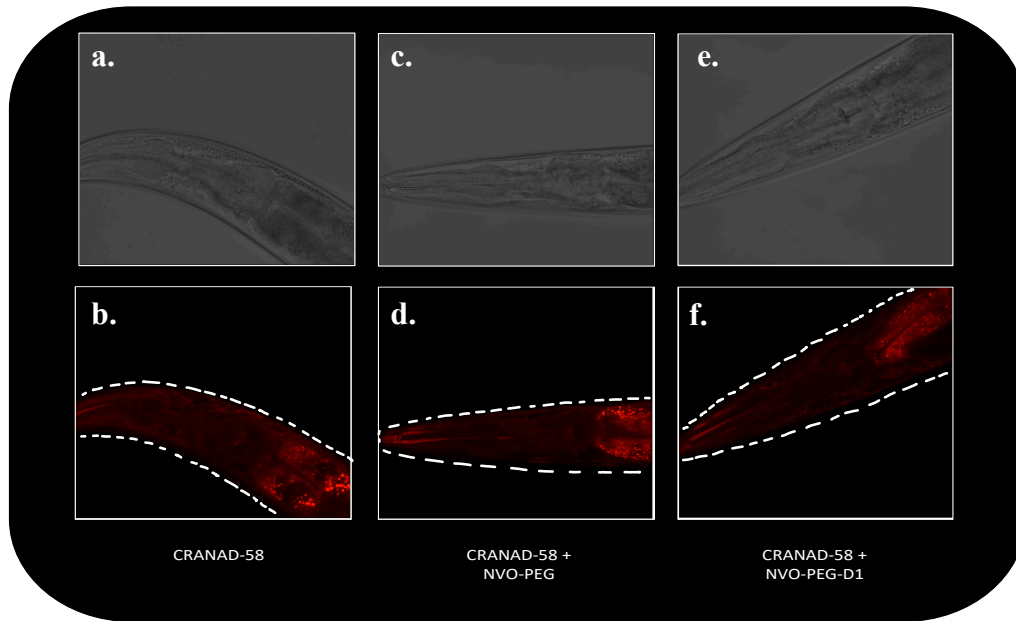


D.

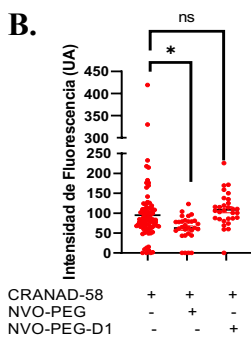


**Fig. 24: La ausencia de D1 en las NVO reprime el efecto de aumento de la señal de fluorescencia emitida por CRANAD-2 en la detección de Aβ insoluble.** A. Imágenes representativas de la cabeza de *C. elegans* adultos de 2 días obtenidas por microscopía confocal. a, c y e Imágenes de campo claro correspondientes al mismo individuos de las imágenes de fluorescencia b, d y f obtenidas usando un láser de 639 nm correspondiente al infrarrojo cercano. Para todas la imágenes se utilizaron las mismas condiciones de exposición e intensidad del láser 4% y un objetivo de 40x. a y b corresponden a imágenes de nemátodos tratados solamente con CRANAD-2. c y d corresponden a imágenes de nemátodos tratados con CRANAD-2 y NVO-PEG. e y f corresponden a imágenes de nemátodos tratados con CRANAD-2 y NVO-PEG-D1. B. Gráfico que compara la intensidad de fluorescencia de los agregados de Aβ detectados C. Gráfico que compara el número de agregados de Aβ D. Gráfico que compara el área promedio de los agregados Aβ. Los datos son promedios ± SEM de al menos tres ensayos independientes (A excepción del grupo tratado con NVO-PEG). ANOVA se utilizó para el análisis estadístico. \*\*\*\* p <0,0001, \*\* p <0,01. Se analizaron al menos 30 animales en cada ensayo independiente.

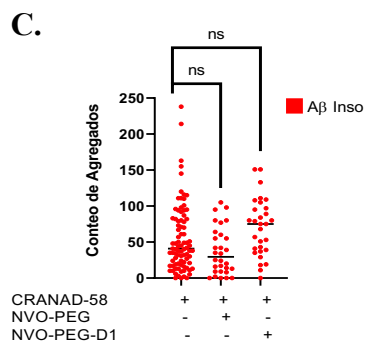
A.



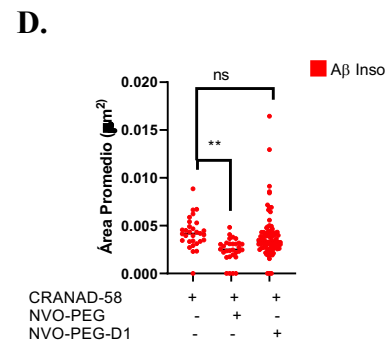
B.



C.



D.



**Fig. 25: El tratamiento NVO-PEG o NVO-PEG-D1 no cambia la señal fluorescente emitida por CRANAD-58.** A. Imágenes de la cabeza de *C. elegans* adultos obtenida por microscopía confocal, a, c y e corresponden a imágenes de campo claro b, d y f obtenidas usando un láser de 639 nm correspondiente al infrarrojo cercano. Para todas las imágenes se utilizaron las mismas condiciones de exposición e intensidad del láser 4% y el objetivo 40x. a, b, c, y d corresponden a nemátodos CL2120 de 2 días de adulto. a y b Corresponden a nemátodos tratados solamente con CRANAD-58. c y d corresponden a nemátodos tratados con CRANAD-58 y NVO-PEG. e y f corresponden a nemátodos tratados con CRANAD-58 y NVO-PEG-D1. B. Gráfico que compara la intensidad de fluorescencia de los agregados detectados en adultos de 2 días C. Gráfico que compara el número de agregados en nemátodos adultos de 2 días D. Gráfico que compara el área de los agregados detectados en nemátodos adultos de 2 días. Los datos son promedios  $\pm$  SEM de al menos tres ensayos independientes (A excepción del grupo tratado con NVO-PEG). ANOVA se utilizó para el análisis estadístico. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , \*\*  $p < 0,01$ . Se analizaron al menos 30 animales en cada ensayo independiente.

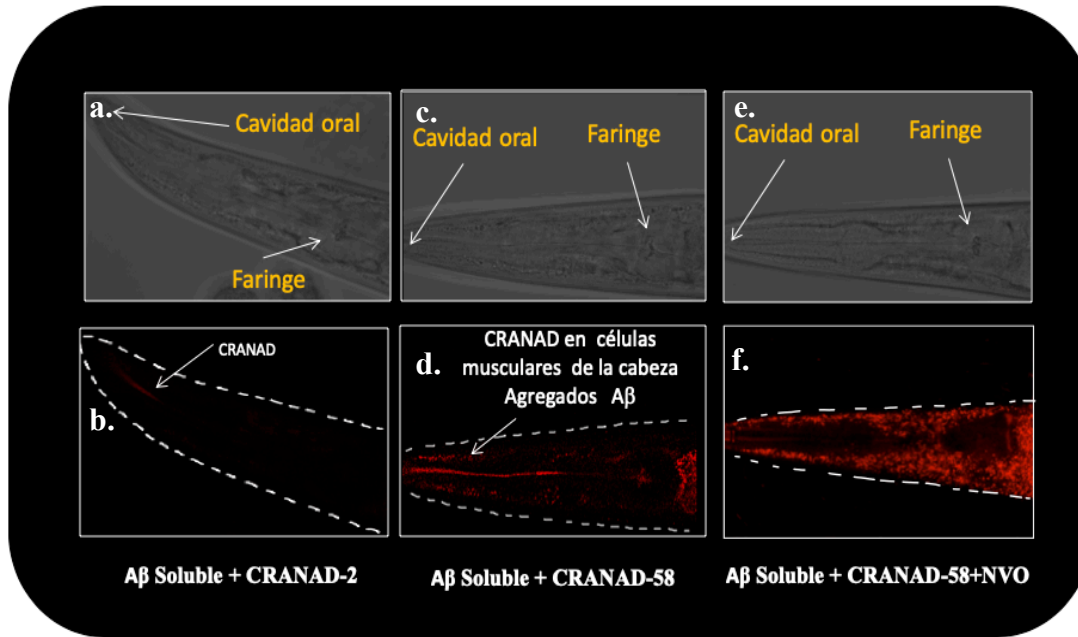
**Objetivo 2: Detectar y cuantificar los oligómeros del péptido A $\beta$  en el modelo *C. elegans* CL2006, mediante fluorescencia aumentada por superficie, al ser expuestos a CRANAD-58 y NVO-PEG-D1.**

Con el objetivo de evaluar la detección de especies solubles de A $\beta$  *in vivo* se utilizó la sonda CRANAD-58, un fluoróforo que tiene la particularidad de unirse a especies de A $\beta$  tanto solubles como insolubles. Así como en el caso de CRANAD-2, en esta oportunidad se utilizó la misma estrategia para mejorar la sensibilidad de CRANAD-58 mediante el uso de nanopartículas. Se usó la cepa CL2006, que expresa principalmente especies A $\beta$  solubles. Para este ensayo, se utilizaron nemátodos adultos de 2 días, que se incubaron con NVO-PEG o NVO-PEG-D1, de acuerdo con el protocolo descrito en la metodología, y luego se trataron con CRANAD-58 o con CRANAD-2 (Minniti et al., 2009; Rebolledo et al., 2011).

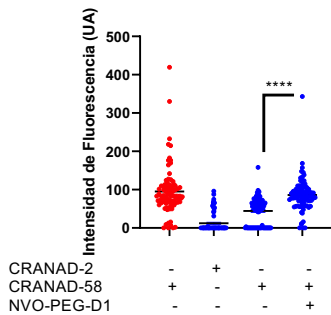
En primer lugar se comparó la sensibilidad de detección de ambas sondas en la cepa CL2006. La Fig. 26 muestra que en la cepa CL2006 (A $\beta$  soluble) el CRANAD-2 no es capaz de detectar agregados de A $\beta$ , lo que se observa en las imágenes de microscopía que no muestran ninguna señal (Fig. 26 Ab). Además en los gráficos de la Fig. 26 muestra los bajos valores tanto del número de agregados (Fig. 26 C) como del área promedio ( Fig. 26 D) cuantificados para la señal de CRANAD-2 en la cepa CL2006. Por otro lado, cuando se incubaron los nemátodos CL2006 con NVO-PEG-D1 y CRANAD-58, la señal de fluorescencia aumentó en 1,9 veces con respecto al control solo incubado con CRANAD-58 (Fig. 26 B). Esto se ve reflejado también en el aumento del conteo de agregados de 4,1 veces (Fig. 26 C) y un aumento del área promedio de los agregados de 1,5 veces con respecto al control (Fig. 26 D).



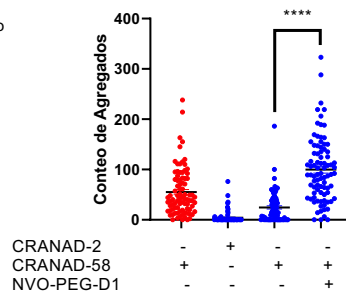
A.



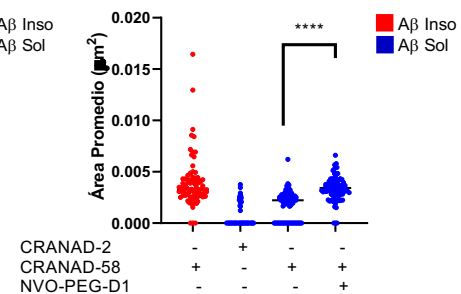
B.



C.



D.

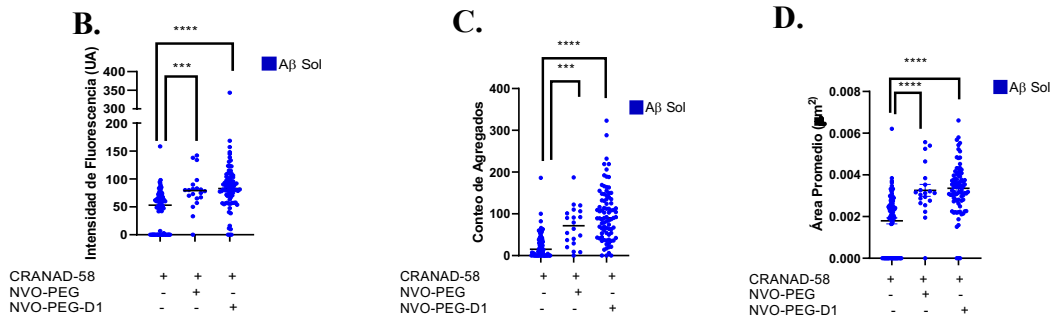
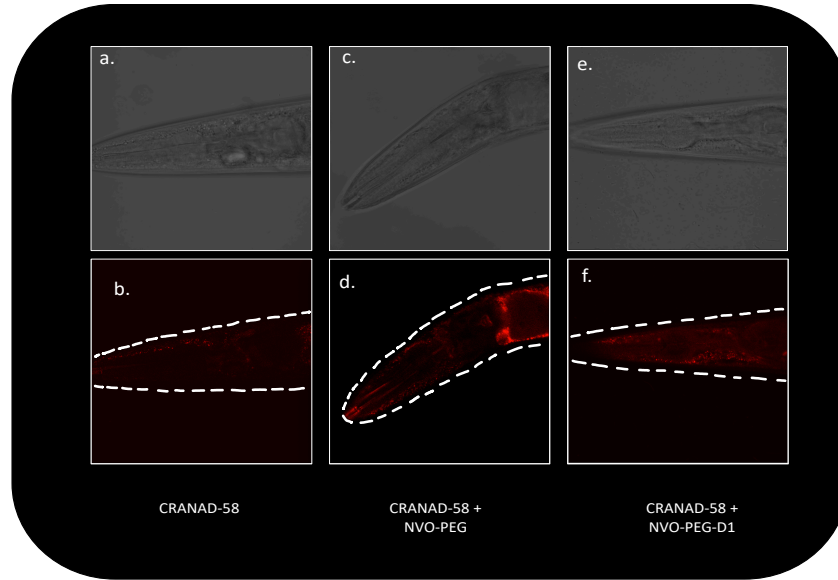


**Fig. 26:** El tratamiento de NVO-PEG-D1 y CRANAD-58 aumenta la señal fluorescente emitida por CRANAD-58 en la cepa CL2006 ( A $\beta$  soluble) en la detección de A $\beta$ . **A.** Imágenes de microscopía confocal de la cabeza de adultos CL2006 de 2 días. **a, c** y **e** Imágenes de campo claro correspondientes a las imágenes fluorescentes **b, d** y **f** obtenidas usando un láser de 639 nm correspondiente al infrarrojo cercano. En la obtención de las imágenes se utilizaron las mismas condiciones de exposición e intensidad del láser 4% y utilizando el objetivo de 40x. **a** y **b** nemátodos CL2006 tratados solamente con CRANAD-2. **c** y **d** nemátodos CL2006 tratados solamente con CRANAD-58. **e** y **f** nemátodos CL2006 tratados con CRANAD-58 y NVO-PEG-D1. **B.** Gráfico que compara la intensidad de fluorescencia de los agregados de A $\beta$ . **C.** Gráfico que compara el número de agregados de A $\beta$ . **D.** Gráfico que compara el área promedio de los agregados de A $\beta$  detectados. Los datos son promedios  $\pm$  SEM de al menos tres ensayos independientes ANOVA se utilizó para el análisis estadístico. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , \*\*  $p < 0,01$ . Se analizaron al menos 30 animales en cada ensayo independiente.

Cuando los nemátodos CL2006 (A $\beta$  soluble) de 2 días de adulto se incubaron con NVO-PEG y posteriormente con CRANAD-58, mostraron un aumento tanto en la intensidad de fluorescencia, como en el recuento de agregados y en el área promedio (Fig. 27 B, C ,D) de 1,5, 3,0 y 1,8 veces respectivamente, con respecto al control (cuando se incubaba solo con CRANAD-58). Estos resultados son similares a los obtenidos al incubar estos nemátodos con CRANAD-58 y NVO-PEG-D1, fenómeno que no ocurre en la cepa Cl2120 (A $\beta$  insoluble) y con CRANAD- 2 (Fig. 24).

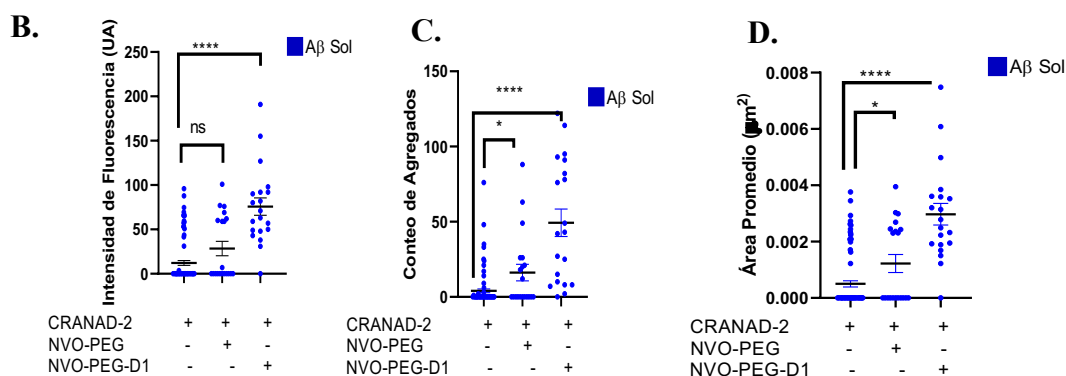
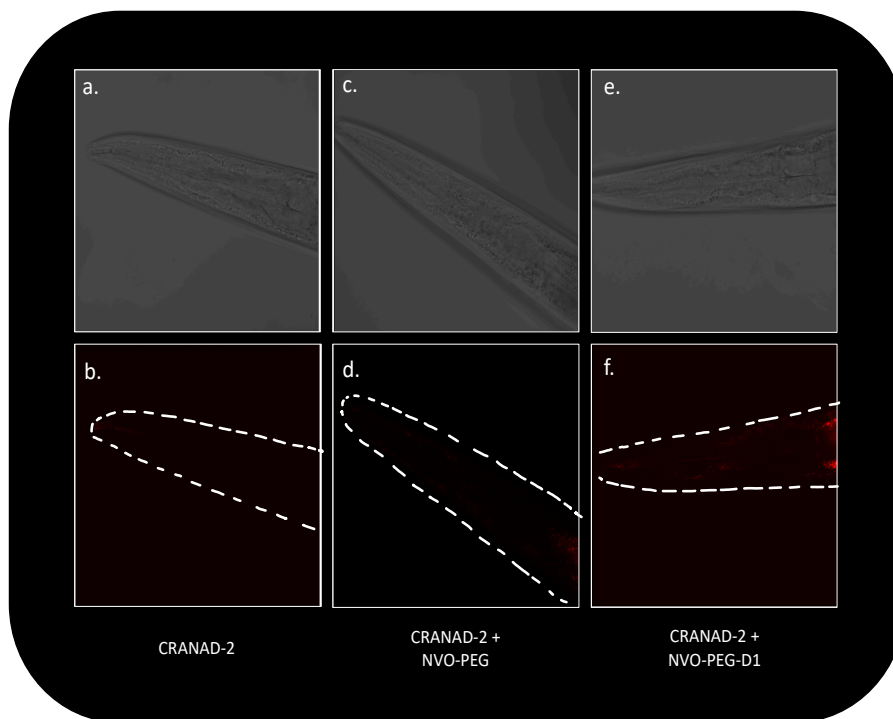
Los nemátodos CL2006 no presentaron una señal fluorescente cuando se incubaron con CRANAD-2. Sin embargo, esta señal aumentó en 6,3 veces al ser tratados con NVO-PEG-D1 (Fig. 28 Ae, B). Cuando se trataron los nemátodos CL2006 con las nanopartículas funcionalizadas con PEG y con D1, se observó un aumento en el recuento de agregados, esto se puede deber al aumento en la señal fluorescente y por lo tanto, a un aumento en la sensibilidad asociada con el método de detección. Sin embargo, el grupo tratado con NVO-PEG su significancia estadística no es lo suficientemente robusta debido a la alta dispersión de datos (Fig. 28 C).

A.



**Fig. 27:** El tratamiento de NVO-PEG-D1 o NVO-PEG y CRANAD-58 aumenta la señal fluorescente emitida por CRANAD-58 en la cepa CL2006 ( A $\beta$  soluble) en la **detección de A $\beta$** . **A.** Imágenes representativas de la cabeza de adultos de 2 días de la cepa CL2006 obtenidas por microscopía confocal. **a, c, y e** Imágenes de campo claro correspondientes a las imágenes de fluorescencia **b, d, y f** Imágenes de fluorescencia obtenidas usando un láser de 639 nm correspondiente al infrarrojo cercano. Para todas las imágenes se utilizaron las mismas condiciones de exposición e intensidad del láser 4% y se usó el objetivo de 40x. **a y b** corresponden a nemátodos CL2006 tratados solamente con CRANAD-58. **c y d** corresponden a nemátodos CL2006 tratados solamente con CRANAD-58 y NVO-PEG. **e y f** corresponden a nemátodos CL2006 tratados con CRANAD-58 y NVO-PEG-D1. **B.** Gráfico que compara la intensidad de fluorescencia de los agregados detectados en adultos de 2 días **C.** Gráfico que compara el número de agregados detectados en nemátodos adultos de 2 días **D.** Gráfico que compara el área promedio de los agregados detectados en nemátodos adultos de 2 días. Los datos son promedios  $\pm$  SEM de al menos tres ensayos independientes ANOVA se utilizó para el análisis estadístico. \*\*\*\* p <0,0001, \*\* p <0,01. Se analizaron al menos 30 animales en cada ensayo independiente.

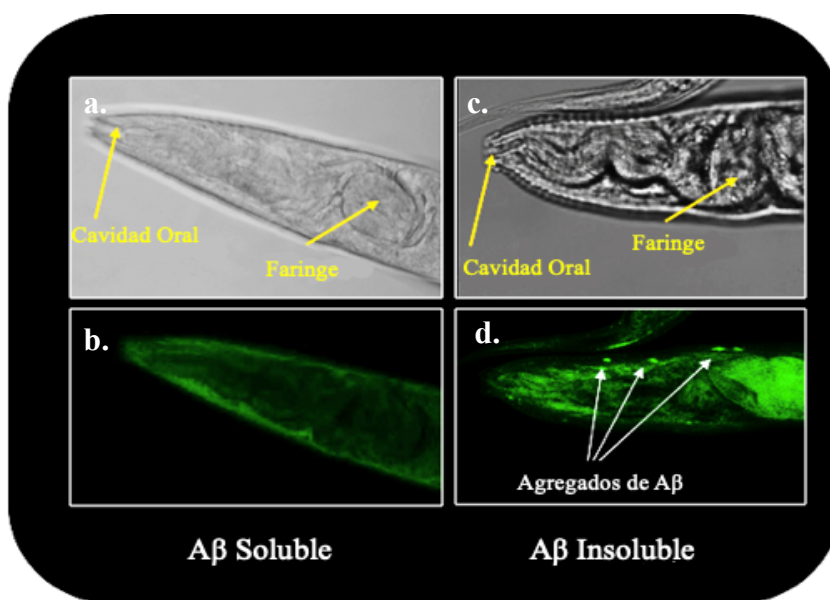
A.



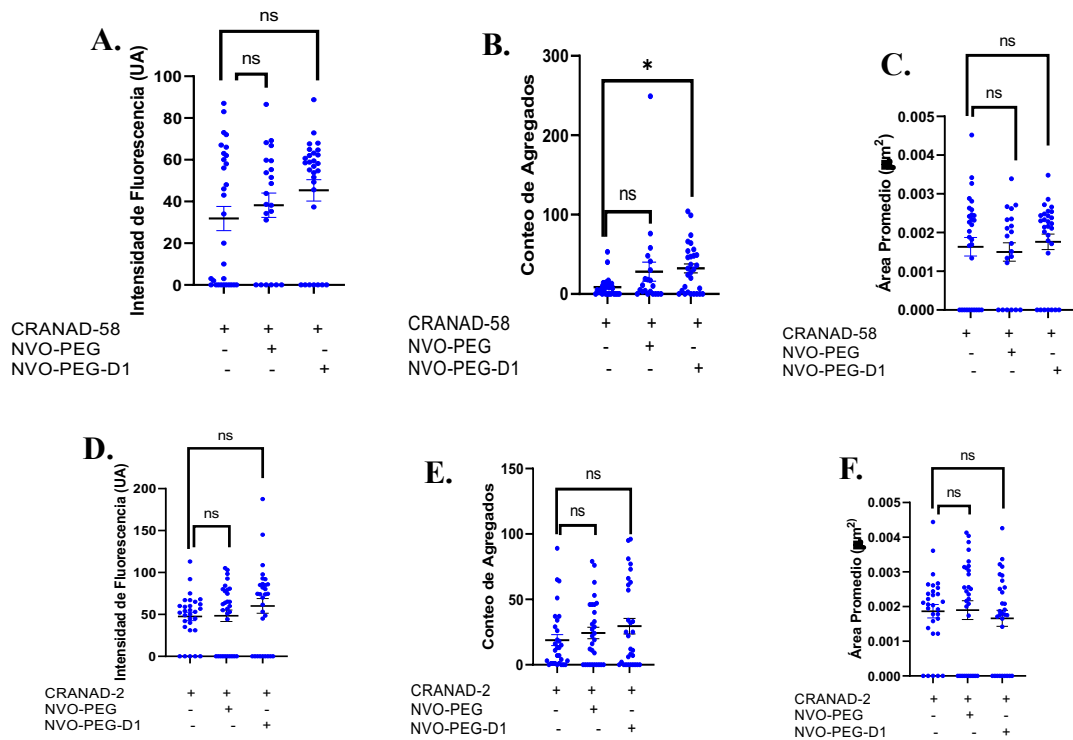
**Fig. 28: El tratamiento con CRANAD-2 y NVO-PEG-D1 muestra un aumento en la señal de fluorescencia emitida por CRANAD-2 en nemátodos de la cepa CL2006 (Aβ soluble).** A. Imágenes representativas de la cabeza de adultos de 2 días de la cepa CL2006 obtenidas por microscopía confocal. a, c, y e imágenes de campo claro correspondientes a las imágenes fluorescentes de b, d, y f, obtenidas usando un láser de 639 nm correspondiente al infrarrojo cercano. Para todas las imágenes se utilizaron las mismas condiciones de exposición e intensidad del láser 4% y el objetivo 40x. a y b Nemátodos CL2006 tratados solo con CRANAD-2. c y d Nemátodos tratados con CRANAD-2 y NVO-PEG. e y f Nemátodos tratados con CRANAD-2 y NVO-PEG-D1. B. Gráfico que compara la intensidad de fluorescencia de los agregados de Aβ detectados C. Gráfico que compara el número de agregados de Aβ detectados D. Gráfico que compara el área promedio de los agregados de Aβ detectados. Los datos son promedios ± SEM de al menos tres ensayos independientes (A excepción del grupo tratado con NVO-PEG y NVO-PEG).

ANOVA se utilizó para el análisis estadístico. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , \*\*  $p < 0,01$ . Se analizaron al menos 30 animales en cada ensayo independiente.

Por otro lado, se llevaron a cabo ensayos en nemátodos de 2 días de adultos con el fin de comparar nuestros resultados con la técnica habitual empleada para la detección de agregados de  $\beta$ -amiloide en *C. elegans*, la tinción con ThS. Esta tinción a diferencia de la realizada con CRANAD-2 o CRANAD-58, requiere fijar a los individuos mediante el uso de paraformaldehído. Los resultados de la Fig. 29 muestran que en la cepa CL2120 fue posible detectar agregados de  $A\beta$  (Fig. 29 d) mientras que en la cepa CL2006 no fue posible la detección de  $A\beta$  con esta sonda (Fig. 29 b). Este resultado puede atribuirse a que ThS solo detecta especies insolubles de  $A\beta$  mientras que CRANAD-58 posibilita la detección de ambos tipos de especies (solubles e insolubles).



**Fig. 29: Tinción con ThS solo puede detectar agregados de  $A\beta$  en la cepa CL2120 ( $A\beta$  insoluble), no así en cepa CL2006 ( $A\beta$  soluble).** Imágenes de microscopía confocal de la cabeza de adultos de 2 días de las cepas CL2006 y CL2120. Las imágenes superiores **a** y **c** corresponden al campo claro y las imágenes inferiores **b** y **d**, corresponden a imágenes obtenidas usando un láser de 488 nm correspondiente al verde. Para todas la imágenes se utilizaron las mismas condiciones de exposición e intensidad del láser 4% y con el objetivo de 40x. **a** y **b** corresponden a nemátodos CL2006 a los cuales se les realizó una tinción con ThS. **c** y **d** corresponden a nemátodos CL2120 a los cuales se les realizó tinción con ThS.



**Fig. 30:** El tratamiento con CRANAD-2 o CRANAD-58 no muestra diferencia en la detección de A $\beta$  al co-incubar con NVO-PEG o NVO-PEG-D1 en individuos viejos de la cepa CL2006. **A.** Gráfico que compara la intensidad de fluorescencia de los agregados detectados en adultos de CL2006 de 5 días tratados con CRANAD-58 en presencia o ausencia de NVO-PEG o NVO-PEG-D1. **B.** Gráfico que compara el número de agregados de adultos de CL2006 de 5 días tratados con CRANAD-58 en presencia o ausencia de NVO-PEG o NVO-PEG-D1. **C.** Gráfico que compara el área de los agregados detectados en los nemátodos CL2006 de 5 días tratados con CRANAD-58 en presencia o ausencia de NVO-PEG o NVO-PEG-D1. **D.** Gráfico que compara la intensidad de fluorescencia de los agregados detectados en nemátodos CL2006 de 5 días de adulto tratados con CRANAD-2 en presencia o ausencia de NVO-PEG o NVO-PEG-D1. **E.** Gráfico que compara el número de agregados detectados en nemátodos CL2006 de 5 días de adulto tratados con CRANAD-2 en presencia o ausencia de NVO-PEG o NVO-PEG-D1. **F.** Gráfico que compara el área de los agregados detectados en los nemátodos CL2006 de 5 días de adulto tratados con CRANAD-2 en presencia o ausencia de NVO-PEG o NVO-PEG-D1. Los datos son promedio  $\pm$  SEM (ANOVA se utilizó para el análisis estadístico. \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , \*\*  $p < 0.01$ . Se analizaron al menos 30 animales en cada ensayo independiente.

Para determinar si la detección de agregados de A $\beta$  podía cambiar con la edad de los individuos en la cepa CL2006, se realizó un ensayo con nemátodos más viejos de 5 días de adulto. Los resultados se muestran en la Fig. 30, donde se observa que la fluorescencia presente en los nemátodos debido a la incubación solo con CRANAD-2 o CRAND-58 tiene un basal que no cambia al ser tratados con NVOs (Fig. 30 D, E y F). A diferencia de los resultados anteriores para la cepa CI2120. En el caso de la cepa CL2006, el uso de ambos fluoróforos en animales CL2006 de 5 días de adultos no muestra un aumento de fluorescencia cuando se incubó con NVO-PEG o NVO-PEG-D1 y con CRANAD-58 o CRANAD-2. En la tabla 4 se muestra un resumen de los resultados obtenidos en este trabajo, observándose claras diferencias en términos de intensidad de fluorescencia de CRANAD-2 o CRANAD-58 en ambos grupos experimentales, siendo esta diferencia mayor en los nemátodos más jóvenes de 2 días de adulto en ambas cepas transgénicas utilizadas.

	CL2120 (A $\beta$ Insoluble)			CL2006 (A $\beta$ Soluble)	
Edad	Adultos 2 Días	Adultos 3 Días	Adultos 5 Días	Adultos 2 Días	Adultos 5 Días
CRANAD-2	++	++	++	+	+
CRANAD-2 + NVO-PEG	++	-	-	+	+
CRANAD-2 + NVO-D1	++++	++++	++++	+	++
CRANAD-58	+++	-	-	+	+
CRANAD-58 + NVO-PEG	++	-	-	++	+
CRANAD-58 + NVO-D1	+++	-	-	+++	++

0 – 40	+
60- 80	++
80-120	+++
120 <	++++

**Tabla 4:** Tabla de resumen donde se compara la intensidad de fluorescencia de las sondas en los diferentes tratamientos y cepas de *C. elegans* estudiadas. En rojo se encuentran marcados los grupos de tratamientos que exhibieron una marca de fluorescencia más alta que los controles marcados en recuadros verde oscuro. Recuadro azul presenta los intervalos de intensidad de fluorescencia y su respectiva significancia .



## Discusión.

Los nanosistemas obtenidos en la presente tesis se caracterizaron fisicoquímicamente obteniéndose espectros UV-Vis-NIR, y diámetros hidrodinámicos similares a los reportados por Jara et al y Morales et al (Jara-Guajardo et al., 2020; Morales-Zavala et al., 2017). Los datos entregados por DLS en las gráficas de intensidad en función del tamaño de partícula, dan cuenta de la efectiva modificación superficial de las NVO. En primera instancia se obtuvo un desplazamiento hacia mayores tamaños del máximo relacionado al eje transversal de la nanopartícula, al modificar las NVO con PEG. Esto indica que la superficie de la NVO fue modificada y por ende aumenta en tamaño, además esta modificación es preferentemente producida en los extremos de la NVO (Chen et al., 2013), lo que se ve reflejado en el desplazamiento del primer máximo y no del segundo relacionado con el eje longitudinal de la NVO. Por otro lado, al funcionalizar las NVO-PEG con el péptido D1, no hubo cambios en ninguno de los 2 máximos en términos de tamaño, sin embargo el primer máximo aumentó su intensidad, lo cual es consistente con lo reportado anteriormente dentro de nuestro laboratorio (Jara-Guajardo et al., 2020).

Con respecto a los resultados de potencial Z, que corresponde a una medida de la carga eléctrica asociada a las moléculas dispuestas en el nanosistema, se obtuvo que en primer lugar las NVO poseían una carga eléctrica positiva de valor  $36,2 \pm 0,9$  mV, valor que cambió a  $-18 \pm 1$  mV al modificar su superficie con PEG. Esto puede atribuirse a los grupos carboxilos que posee el PEG, los cuales se encuentran cargados al pH de trabajo (pH = 12). Se debe tener en cuenta que el alto pH (pH = 12) al cual se realizó la determinación del potencial Z de las NVO-PEG, (ajustado con KOH 1M) puede alterar la medición, ya que la presencia de iones altamente concentrados en el medio, disminuye la carga en términos de valor absoluto (Selvamani, 2019), por lo que se estaría subestimando el valor obtenido si comparamos los resultados reportados por Jara-Guajardo et al. 2020, el cual reportó un valor de -23 mV para las NVO-PEG a un pH de trabajo de 5.

Por otro lado la carga aumenta en valor absoluto al funcionalizar el nanosistema con el péptido D1, obteniéndose un valor de  $-25,3 \pm 0,4$  mV. En este caso el pH de trabajo fue de 7,4, ya que se utiliza PBS para resuspender las nanopartículas una vez funcionalizadas. Es

importante destacar que los resultados de potencial Z obtenidos en las distintas etapas de funcionalización no son comparables entre sí, ya que los valores de pH de trabajo no son equivalentes. Por otra parte, es importante mencionar que el potencial Z de NVO-PEG-D1 obtenido en esta tesis difiere al reportado por Jara-Guajardo et al. 2020 ( Potencial Z -6,6 mV, obtenido a pH = 5).

Sin embargo, de igual manera estos datos no son del todo consistentes, ya que el punto isoeléctrico del péptido D1 posee un valor de 9,95 y al pH de trabajo debería presentar carga positiva, disminuyendo de esta manera la carga negativa del nanosistema. El aumento del valor de la carga negativa (  $-18 \pm 2$  mV a  $-25,3 \pm 0,4$  mV, pH = 12 y pH = 7,4 respectivamente) puede deberse a que en primer lugar la metodología que se empleó para eliminar el exceso de reactivo, es por centrifugación pudiendo quedar los grupos carboxilo activados formando un complejo con EDC o NHS. Esto último puede deberse a que en el protocolo realizado para conjugar las NVO con el péptido D1, no se consideró un “bloqueo” de los grupos carboxilos que no reaccionaron en el proceso de funcionalización.

El ensayo realizado mediante fluorimetría para evaluar incorporación del fluoróforo CRANAD-2 en los nemátodos CL2120 y CL2122, mostró que el fluoróforo posee una mayor retención en la cepa transgénica que expresa A $\beta$  (CL2120) (Fig. 20), lo cual es consistente con lo reportado por grupo de Chongzhao, R en el año 2009, quienes administraron CRANAD-2 en un modelo murino de EA (Tg 2576) y a su respectivo control (*wild type*). Los resultados reportados en aquel trabajo indicaron que en el animal Tg 2576 se presentaba una mayor retención del fluoróforo en el cerebro observándose el mismo comportamiento para CRANAD-58 (Zhang et al., 2013). Los resultados de este estudio sugieren que ambos fluoróforos son retenidos en el nemátodo transgénico, debido a la expresión de A $\beta$  (especies solubles e insolubles).

La detección de especies insolubles de A $\beta$  mediante microscopía confocal fue específica para la cepa de *C. elegans* que expresa el péptido de A $\beta$ . Al adicionar el tratamiento con NVOs en estos nemátodos, se produjo un aumento de la señal en entre 2,8, 1,8 y 1,6 veces en todas las edades tratadas respectivamente (Fig. 22 B, C y D). Esto es concomitante con

el aumento del número de los agregados y el área promedio de los mismos. El aumento del número de agregados se debe al aumento de la señal fluorescente, es decir, que mediante la incubación con NVO-PEG-D1, la sensibilidad en la detección de A $\beta$  mediante la sonda CRANAD-2 aumentó. El área promedio de los agregados también sufre un aumento como consecuencia de la incubación de los nemátodos con NVO-PEG-D1, esto es debido a que el aumento de fluorescencia y el aumento del conteo de agregados interfiere en el reconocimiento de elementos individuales por el *software* utilizado para realizar los análisis, por lo que se puede estar subestimando la cantidad de agregados detectados al incubar con NVO-PEG-D1. Los datos de aumento de la señal de fluorescencia en la cepa CL2120 son consistentes con lo reportado por Jara-Guajardo et al., 2020, obteniendo valores similares para el mismo nanosistema y la misma sonda (CRANAD-2) para detectar fibras de A $\beta$  pero en ensayos *in vitro* y *ex vivo*.

Por otro lado, la incubación de nemátodos CL2120 con NVO-PEG, no mostró diferencias en los parámetros analizados, esto quiere decir que es requerido el péptido D1 para que el nanosistema se una al agregado de A $\beta$  y eventualmente se produzca el efecto SEF ( Fig. 24 B). Esto mismo no ocurre con NVO-PEG, ya que las nanopartículas no se unen a agregados insolubles de A $\beta$  y por ende no se produce un aumento de la señal de fluorescencia debido a que el PEG hace disminuir las interacciones con A $\beta$ . Estos nemátodos de la cepa CL2120 al ser incubados con CRANAD-58, no muestran aumentos en ninguno de los parámetros analizados al ser tratados con NVO-PEG o NVO-PEG-D1 (Fig. 25). Esto se debe a que CRANAD-58 puede detectar tanto especies solubles como insolubles de A $\beta$  (Zhang et al., 2013), obteniendo una gran señal de fluorescencia, ya que se detectaron ambas especies, que se encuentran en equilibrio (Dayeh et al., 2018; Novo et al., 2018). Por tal motivo no sería observable un aumento de fluorescencia al incubar los nemátodos con NVO-PEG-D1, ya que estos nanosistemas podrían reconocer de forma diferencial a los agregados solubles respecto de los insolubles no observándose un efecto neto de aumento de la fluorescencia.

En este estudio se detectó por primera vez en la cepa CL2006 de *C. elegans* especies solubles de A $\beta$  *in vivo*, utilizando la sonda CRANAD-58, además fue posible aumentar la sensibilidad de la detección en 1,9 veces cuando estos individuos se trataron con NVOs

(Fig. 28 B). Esto se observa también en otros parámetros como el aumento del número de agregados en 4,1 veces y un aumento del área promedio de los mismos en 1,5 veces (Fig. 26 C y D respectivamente). En esta cepa también se evaluó la fluorescencia de CRANAD-2, dando como resultado una señal nula o muy baja, siendo esta en promedio 0,9 veces menor a la fluorescencia presentada al incubar con CRANAD-58 (Fig. 26 B). Esto se debe a que CRANAD-2 solo se une a especies insolubles de A $\beta$  ( Chongzhao, R et al, 2009), las cuales se encuentran de forma minoritaria en esta cepa, que presenta principalmente especies solubles de A $\beta$  (Fay et al., 2002; Minniti et al., 2009). Esto mismo se corroboró con la tinción con ThS, en donde solo fue posible la detección de agregados en la cepa CL2120 (Fig. 29).

Al incubar individuos adultos de 2 días de la cepa CL2006 con la sonda CRANAD-58 y NVO-PEG, se generó un efecto de aumento de la señal de fluorescencia comparable al obtenido al incubar con NVO-PEG-D1 (Fig. 27 B). Es por esto, que es posible afirmar que las NVO-PEG se unen a las especies solubles de A $\beta$  produciéndose un efecto SEF, produciendo una señal 1,5 veces mayor con respecto al control solo incubado con CRANAD-58. Esta hipótesis es plausible ya que existe evidencia que plantea que el PEG, puede interaccionar con las especies solubles de A $\beta$  por medio de la estructura hélice alfa, que es minoritaria en especies insolubles de A $\beta$ , donde encontramos principalmente estructura de hoja  $\beta$  (Brambilla et al., 2012). Por ello la afinidad a este tipo de formas de A $\beta$  sería menor, teniendo así una mayor afinidad por las formas solubles de A $\beta$ , posibilitando de esta manera el efecto SEF al incubar los nemátodos CL2006 con CRANAD-58 y NVO-PEG, fenómeno que no ocurre en el caso de la cepa CL2120 incubada con CRANAD-2 y NVO-PEG (Fig. 24 B), debido a que el PEG, no interacciona con las formas insolubles de A $\beta$ .

Al incubar CL2006 de 2 días de adulto con CRANAD-2 y NVO-PEG, no se mostró un cambio en la fluorescencia, es decir no se detectaron agregados o la detección fue mínima, ya que CRANAD-2 solo se une a especies insolubles de A $\beta$ . Sin embargo, al incubar estos nemátodos con CRANAD-2 y NVO-PEG-D1, se obtuvo una señal de fluorescencia significativa (Fig. 28 B), lo que indica que la presencia del péptido D1, podría cambiar la estructura de las especies solubles de A $\beta$ , posiblemente exponiendo sitios hidrofóbicos y

por ende favoreciendo la unión de CRANAD-2, permitiendo la detección de estas especies de A $\beta$ . Esta afirmación está respaldada por la evidencia (Xue et al., 2012) que afirma que el péptido D1 produce desagregación de las fibras de A $\beta$  y además impide la formación de nuevos agregados, esto también se puede ver en el trabajo de nuestro laboratorio (Morales-Zavala et al., 2017). De esta forma si el péptido D1 interfiere en el proceso de formación de las especies insolubles de A $\beta$  como las fibras, quiere decir que existe una interacción a nivel de las unidades más básicas de A $\beta$  como las especies solubles de A $\beta$ .

Asimismo, se realizaron ensayos con la cepa CL2006 de 5 días de adulto, incubando los nemátodos con CRANAD-2 o CRANAD-58 y con NVO-PEG o NVO-PEG-D1. Los resultados obtenidos de estos ensayos mostraron un nulo efecto de la incubación de los dos tipos de nanosistemas (NVO-PEG y NVO-PEG-D1), en la intensidad de fluorescencia, conteo de agregados y área promedio de estos (Fig. 30). Esto se puede deber a que los nemátodos ya se encontraban en una edad avanzada y por ende ya presentaban especies insolubles de A $\beta$  (Wu et al., 2006). Esto se observó en la señal mostrada al incubar estos *C. elegans* con solo CRANAD-2, lo cual no ocurría en los animales más jóvenes de 2 días de adulto. Este nulo efecto de la incubación con los nanosistemas se puede deber a la misma razón por la que no se observó el aumento de fluorescencia en los nemátodos CL2120 tratados con CRANAD-58 y NVO-PEG-D1, que es la coexistencia de tanto especies solubles como insolubles dentro del nemátodo, teniendo por ende una gran fluorescencia solo incubando con los fluoróforo e impidiendo ver aumentos asociados a efecto SEF.

Como proyecciones de este trabajo, se puede plantear el perfeccionamiento del nanosistema, en el sentido de unir de forma covalente CRANAD-2 o CRANAD-58 a las NVO. De esta forma se podría modular por medio de diversas técnicas la distancia entre el fluoróforo y la nanopartícula, aumentando la eficiencia del efecto SEF y por ende posibilitando un aumento mucho mayor de la sensibilidad de la detección. Este nuevo sistema ya se encuentra en desarrollo en nuestro laboratorio y esperamos que se obtengan resultados prometedores *in vitro*, para luego ser evaluado *in vivo* en modelos como *C. elegans* o bien modelos murinos de EA.

## Conclusiones.

1. Las cepas transgénicas de *C. elegans* que expresan A $\beta$  en el sistema muscular, son capaces de incorporar el fluoróforo CRANAD-2/58 y se unen específicamente a los agregados de A $\beta$ .
2. Por primera vez, se detectó *in vivo* agregados de A $\beta$  usando CRANAD-2/58 en un modelo transgénico de *C. elegans*, esto convierte a esta metodología como una potencial herramienta para estudios para la detección temprana del desarrollo de EA.
3. El efecto SEF de las NVOs aumentó la sensibilidad de la detección de agregados de A $\beta$  en *C. elegans* en aproximadamente 2,8 veces y 1,9 veces para CRANAD-2 y CRANAD-58, respectivamente.
4. El efecto SEF de las NVOs sobre CRANAD-2 para la detección de agregados fibrilares de A $\beta$  es efectivo tanto para individuos jóvenes como para individuos más viejos.
5. El efecto SEF de las NVOs en la cepa CL2006, que presenta mayoritariamente especies solubles de A $\beta$ , solo es efectivo en los individuos más jóvenes.

## Bibliografía.

- Adura, C., Guerrero, S., Salas, E., Medel, L., Riveros, A., Mena, J., Arbiol, J., Albericio, F., Giralt, E., & Kogan, M. J. (2013). Stable conjugates of peptides with gold nanorods for biomedical applications with reduced effects on cell viability. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 5(10), 4076–4085. <https://doi.org/10.1021/am3028537>
- Ali, I., Mukhtar, S. D., Lone, M. N., Ali, H. S., & Aboul-Enein, H. Y. (2017). Recent Advances in Mesoporous Silica and Gold Based Nanovectors in Anticancer Drug Delivery System. *Current Organic Chemistry*, 21(23). <https://doi.org/10.2174/1385272820666161025161853>
- Attia, Y. A., Altalhi, T. A., & Gobouri, A. A. (2015). Thermal Stability and Hot Carrier Dynamics of Gold Nanoparticles of Different Shapes. *Advances in Nanoparticles*, 04(04), 85–97. <https://doi.org/10.4236/anp.2015.44010>
- Bellavance, M. A., Blanchette, M., & Fortin, D. (2008). Recent advances in blood-brain barrier disruption as a CNS delivery strategy. In *AAPS Journal* (Vol. 10, Issue 1, pp. 166–177). <https://doi.org/10.1208/s12248-008-9018-7>
- Bernabeu-Zornoza, A., Coronel, R., Palmer, C., Monteagudo, M., Zambrano, A., & Liste, I. (2019). Physiological and pathological effects of amyloid- $\beta$  species in neural stem cell biology. *Neural Regeneration Research*, 14(12), 2035. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.262571>
- Brambilla, D., Verpillot, R., Le Droumaguet, B., Nicolas, J., Taverna, M., Kóna, J., Lettiero, B., Hashemi, S. H., De Kimpe, L., Canovi, M., Gobbi, M., Nicolas, V., Scheper, W., Moghimi, S. M., Tvaroška, I., Couvreur, P., & Andrieux, K. (2012). PEGylated nanoparticles bind to and alter amyloid-beta peptide conformation: Toward engineering of functional nanomedicines for alzheimer's disease. *ACS Nano*, 6(7), 5897–5908. <https://doi.org/10.1021/nn300489k>
- Castellani, R. J., Plascencia-Villa, G., & Perry, G. (2019). The amyloid cascade and Alzheimer's disease therapeutics: theory versus observation. In *Laboratory Investigation* (Vol. 99, Issue 7, pp. 958–970). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41374-019-0231-z>
- Chen, H., Shao, L., Li, Q., & Wang, J. (2013). Gold nanorods and their plasmonic properties. *Chemical Society Reviews*, 42(7), 2679–2724. <https://doi.org/10.1039/c2cs35367a>
- Chongzhao, R., Xiaoyin, X., Raymond, S. B., Ferrara, B. J., Neal, K., Bacskai, B. J., Medarova, Z., & Moore, A. (2009). Design, synthesis, and testing of difluoroboron-derivatized curcumins as near-infrared probes for in vivo detection of amyloid- $\beta$  deposits. *Journal of the American Chemical Society*, 131(42), 15257–15261. <https://doi.org/10.1021/ja9047043>
- COPRAD – *Corporación Profesional Alzheimer y otras Demencias*. (n.d.). Retrieved January 22, 2020, from <https://www.coprad.cl/>
- Corsi, A. K., Wightman, B., & Chalfie, M. (2015). A Transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. *WormBook: The Online Review of C. Elegans*

- Biology*, 1–31. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.177.1>
- Dayeh, M. A., Livadiotis, G., & Elaydi, S. (2018). A discrete mathematical model for the aggregation of  $\beta$ -Amyloid. *PLoS ONE*, 13(5), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196402>
- Doane, T. L., Chuang, C.-H., Hill, R. J., & Burda, C. (2012). Nanoparticle  $\zeta$ -Potentials. *Accounts of Chemical Research*, 45(3), 317–326. <https://doi.org/10.1021/ar200113c>
- Elbassal, E. A., Morris, C., Kent, T. W., Lantz, R., Ojha, B., Wojcikiewicz, E. P., & Du, D. (2017). Gold Nanoparticles as a Probe for Amyloid- $\beta$  Oligomer and Amyloid Formation. *Journal of Physical Chemistry C*, 121(36), 20007–20015. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b05169>
- Ewald, C. Y., & Li, C. (2012). *Caenorhabditis elegans* as a model organism to study APP function. In *Experimental Brain Research* (Vol. 217, Issues 3–4, pp. 397–411). <https://doi.org/10.1007/s00221-011-2905-7>
- Fay, D. S., Fluet, A., Johnson, C. J., & Link, C. D. (2002). In Vivo Aggregation of  $\beta$ -Amyloid Peptide Variants. *Journal of Neurochemistry*, 71(4), 1616–1625. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1998.71041616.x>
- Funke, S. A., Bartnik, D., Glück, J. M., Piorkowska, K., Wiesehan, K., Weber, U., Gulyas, B., Halldin, C., Pfeifer, A., Spenger, C., Muhs, A., & Willbold, D. (2012). Development of a small D-enantiomeric Alzheimer's amyloid- $\beta$  binding peptide ligand for future in vivo imaging applications. *PLoS ONE*, 7(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041457>
- Guerrero, A. R., Zhang, Y., & Aroca, R. F. (2012). Experimental Confirmation of Local Field Enhancement Determining Far-Field Measurements with Shell-Isolated Silver Nanoparticles. *Small*, 8(19), 2964–2967. <https://doi.org/10.1002/smll.201200750>
- Huang, X., & El-Sayed, M. A. (2010). Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. *Journal of Advanced Research*, 1(1), 13–28. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2010.02.002>
- Jara-Guajardo, P., Cabrera, P., Celis, F., Soler, M., Berlanga, I., Parra-Muñoz, N., Acosta, G., Albericio, F., Campos, M., Alvarez, A., Morales-Zavala, F., & Kogan, M. J. (2020). Gold nanoparticles mediate improved detection of  $\beta$ -amyloid aggregates by. *Nanomaterials*.
- Lewczuk, P., Lelental, N., Spitzer, P., Maler, J. M., & Kornhuber, J. (2014). Amyloid- $\beta$  42/40 cerebrospinal fluid concentration ratio in the diagnostics of Alzheimer's disease: Validation of two novel assays. *Journal of Alzheimer's Disease*, 43(1), 183–191. <https://doi.org/10.3233/JAD-140771>
- Li, J. F., Li, C. Y., & Aroca, R. F. (2017). Plasmon-enhanced fluorescence spectroscopy. *Chemical Society Reviews*, 46(13), 3962–3979. <https://doi.org/10.1039/c7cs00169j>
- Link, C. D. (1995). Expression of human  $\beta$ -amyloid peptide in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(20), 9368–9372. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.20.9368>
- Link, S., & El-Sayed, M. A. (1999). Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B*,



103(21), 4212–4217. <https://doi.org/10.1021/jp984796o>

- Link, S., & El-Sayed, M. A. (2003). OPTICAL PROPERTIES AND ULTRAFAST DYNAMICS OF METALLIC NANOCRYSTALS. *Annual Review of Physical Chemistry*, 54(1), 331–366. <https://doi.org/10.1146/annurev.physchem.54.011002.103759>
- Ministerio de Salud, C. (2017). Plan Nacional De Demencia. *Atención Primaria*, 60. <https://doi.org/10.1177/0964663912467814>
- Minniti, A. N., Rebolledo, D. L., Grez, P. M., Fadic, R., Aldunate, R., Volitakis, I., Cherny, R. A., Opazo, C., Masters, C., Bush, A. I., & Inestrosa, N. C. (2009). Intracellular amyloid formation in muscle cells of A-transgenic *Caenorhabditis elegans*: Determinants and physiological role in copper detoxification. *Molecular Neurodegeneration*, 4(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-4-2>
- Morales-Zavala, F., Arriagada, H., Hassan, N., Velasco, C., Riveros, A., Álvarez, A. R., Minniti, A. N., Rojas-Silva, X., Muñoz, L. L., Vasquez, R., Rodriguez, K., Sanchez-Navarro, M., Giralt, E., Araya, E., Aldunate, R., & Kogan, M. J. (2017). Peptide multifunctionalized gold nanorods decrease toxicity of  $\beta$ -amyloid peptide in a *Caenorhabditis elegans* model of Alzheimer's disease. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 13(7), 2341–2350. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.06.013>
- Niemantsverdriet, E., Ottoy, J., Somers, C., De Roeck, E., Struyfs, H., Soetewey, F., Verhaeghe, J., Van Den Bossche, T., Van Mossevelde, S., Goeman, J., De Deyn, P. P., Mariën, P., Versijpt, J., Slegers, K., Van Broeckhoven, C., Wyffels, L., Albert, A., Ceysens, S., Stroobants, S., ... Engelborghs, S. (2017). The Cerebrospinal Fluid A $\beta$ 1-42/A $\beta$ 1-40 Ratio Improves Concordance with Amyloid-PET for Diagnosing Alzheimer's Disease in a Clinical Setting. *Journal of Alzheimer's Disease*, 60(2), 561–576. <https://doi.org/10.3233/JAD-170327>
- Nikoobakht, B., & El-Sayed, M. A. (2003). Preparation and growth mechanism of gold nanorods (NRs) using seed-mediated growth method. *Chemistry of Materials*, 15(10), 1957–1962. <https://doi.org/10.1021/cm0207321>
- Novo, M., Freire, S., & Al-Soufi, W. (2018). Critical aggregation concentration for the formation of early Amyloid- $\beta$  (1-42) oligomers. *Scientific Reports*, 8(1), 3–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19961-3>
- Permanne, B., Adessi, C., Saborio, G. P., Fraga, S., Frossard, M. J., Van Dorpe, J., Dewachter, I., Banks, W. A., Van Leuven, F., & Soto, C. (2002). Reduction of amyloid load and cerebral damage in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease by treatment with a beta-sheet breaker peptide. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 16(8), 860–862. <https://doi.org/10.1096/fj.01-0841fje>
- Petryayeva, E., & Krull, U. J. (2011). Localized surface plasmon resonance: Nanostructures, bioassays and biosensing-A review. *Analytica Chimica Acta*, 706(1), 8–24. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.08.020>
- Pietrzak, K., Czarnecka, K., Mikiciuk-Olasik, E., & Szymanski, P. (2018). New Perspectives of Alzheimer Disease Diagnosis – the Most Popular and Future Methods.

- Rebolledo, D. L., Aldunate, R., Kohn, R., Neira, I., Minniti, A. N., & Inestrosa, N. C. (2011). Copper reduces A $\beta$  oligomeric species and ameliorates neuromuscular synaptic defects in a *C. Elegans* model of inclusion body myositis. *Journal of Neuroscience*, 31(28), 10149–10158. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0336-11.2011>
- Sakono, M., & Zako, T. (2010). Amyloid oligomers: Formation and toxicity of A $\beta$  oligomers. *FEBS Journal*, 277(6), 1348–1358. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07568.x>
- Selvamani, V. (2019). Stability Studies on Nanomaterials Used in Drugs. In *Characterization and Biology of Nanomaterials for Drug Delivery*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814031-4.00015-5>
- Snowdon, D. A., Kemper, S. J., Mortimer, J. A., Greiner, L. H., Wekstein, D. R., & Markesbery, W. R. (1996). Linguistic ability in early life and cognitive function and Alzheimer's disease in late life: Findings from the Nun Study. *Journal of the American Medical Association*, 275(7), 528–532. <https://doi.org/10.1001/jama.275.7.528>
- Stiernagle, T. (2006). Maintenance of *C. elegans*. In *WormBook: the online review of C. elegans biology* (pp. 1–11). <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.101.1>
- Suh, Y. H., & Checler, F. (2002). Amyloid precursor protein, presenilins, and  $\alpha$ -synuclein: Molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. In *Pharmacological Reviews* (Vol. 54, Issue 3, pp. 469–525). <https://doi.org/10.1124/pr.54.3.469>
- Tong, H., Lou, K., & Wang, W. (2015). Near-infrared fluorescent probes for imaging of amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5(1), 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2014.12.006>
- University of Minnesota. (2018). *Strain: CL2331, Genotype: dvIs37. - Caenorhabditis Genetics Center (CGC) - College of Biological Sciences*. Caenorhabditis Genetics Center. <https://cgc.umn.edu/strain/CL2122>
- University of Minnesota. (2018). *Strain: CL2331, Genotype: dvIs37. - Caenorhabditis Genetics Center (CGC) - College of Biological Sciences*. Caenorhabditis Genetics Center. <https://cgc.umn.edu/strain/CL2120>
- University of Minnesota. (2018). *Strain: CL2331, Genotype: dvIs37. - Caenorhabditis Genetics Center (CGC) - College of Biological Sciences*. Caenorhabditis Genetics Center. <https://cgc.umn.edu/strain/CL2006>
- Weissleder, R. (2001). A clearer vision for in vivo imaging: Progress continues in the development of smaller, more penetrable probes for biological imaging. *Nature Biotechnology*, 19(4), 316–317. <https://doi.org/10.1038/86684>
- Willets, K. A., & Van Duyne, R. P. (2007). Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Sensing. *Annual Review of Physical Chemistry*, 58(1), 267–297. <https://doi.org/10.1146/annurev.physchem.58.032806.104607>
- Wu, Y., Wu, Z., Butko, P., Christen, Y., Lambert, M. P., Klein, W. L., Link, C. D., & Luo,

- Y. (2006). Amyloid- $\beta$ -induced pathological behaviors are suppressed by Ginkgo biloba extract EGB 761 and ginkgolides in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Neuroscience*, 26(50), 13102–13113. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3448-06.2006>
- Xue, D., Zhao, M., Wang, Y. J., Wang, L., Yang, Y., Wang, S. W., Zhang, R., Zhao, Y., & Liu, R. T. (2012). A multifunctional peptide rescues memory deficits in Alzheimer's disease transgenic mice by inhibiting A $\beta$ 42-induced cytotoxicity and increasing microglial phagocytosis. *Neurobiology of Disease*, 46(3), 701–709. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.03.013>
- Zhang, X., Tian, Y., Li, Z., Tian, X., Sun, H., Liu, H., Moore, A., & Ran, C. (2013). Design and synthesis of curcumin analogues for in vivo fluorescence imaging and inhibiting copper-induced cross-linking of amyloid beta species in Alzheimer's disease. *Journal of the American Chemical Society*, 135(44), 16397–16409. <https://doi.org/10.1021/ja405239v>