

**UNIVERSIDAD DE CHILE
PROGRAMA DOCTORADO EN BIOQUIMICA**



**“EFECTO DE LA CURVATURA DE NANOPARTÍCULAS DE ORO
FUNCIONALIZADAS Y SU INFLUENCIA SOBRE LA AGREGACIÓN
DEL PÉPTIDO β -AMILOIDE”**

**Tesis presentada a la Universidad de Chile
para optar al Grado de Doctor en Bioquímica**

Por:

ANDREAS LEONARDO TAPIA ARELLANO

Directores de Tesis

DR. MARCELO JAVIER KOGAN

DR. MAURICIO BAEZ

**SANTIAGO-CHILE
2021**

**UNIVERSIDAD DE CHILE
PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOQUÍMICA**

**INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO**

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

ANDREAS LEONARDO TAPIA ARELLANO

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Doctor en Bioquímica, en el examen de defensa de Tesis rendida el día de de 2021

Directores de tesis:

Dr. Marcelo J. Kogan

Dr. Mauricio Baez Larach

Comisión informante:

Dra. Jenny Fiedler T. (Presidenta)

Dr. Luis Aguayo H.

Dr. Danilo González N.

Dr. Pedro Zamorano M.

**A mi madre
Por su inagotable entrega**

“allí donde crece el peligro crece también la salvación”

Agradecimientos

La presente tesis se desarrolló en los Laboratorio de Nanobiotecnología y Nanotoxicología, y Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, gracias al financiamiento de los proyectos FONDECYT 1170929; 1211482; 1191153, FONDAP 15130011, y a ANID por la beca Doctorado Nacional 2015 21151461 y 23190312.

Agradecer a mis tutores de tesis Dr. Marcelo Kogan y Dr. Mauricio Baez quienes no tan sólo me acogieron en sus laboratorios sino también por ser una guía, por sus consejos y apoyo en el transcurso de todo este camino de formación profesional. También un saludo afectuoso a la Dra. Natàlia quien me acogió en la pasantía en su laboratorio de β -amiloide (Université de Bordeaux, CBMN (UMR 5248) – CNRS – IPB, Institut Européen de Chimie et Biologie, Pessac, France) y no tan sólo me guió por los pasajes oscuros de la tesis sino que también de quien aprendí una nueva forma de ver, hacer y vivir la ciencia.

A mis compañeros de laboratorio de nano y de bioquímica que gracias a sus consejos, su apañe, sus conversas, discusiones de resultados o de la vida hicieron de esta tesis algo más amigable y provechoso. Y en este sentido un saludo especial a Eduardo, Edu, con quien iniciamos este camino de los nanoprismas hace muchos años. Luchando codo a codo para obtener resultados contra todos los problemas que surgían y que incluso cuando nuestras pasantías nos separaron por un momento seguimos a la distancia conectados. Y no puedo olvidar a la Pachi, Pedro, Pablo e Italo, quienes en mi último pasar de esta tesis tuvieron que soportar todas mis rabias jajajajaja. A mis compañeros de pasantía

Sonia, Valia, James, Eduard, Marti con quienes compartí gratos momentos que hicieron que mi pasantía fuese mucho más llevadera y de quienes aprendí mucho en estas foráneas tierras.

A mis amigos Pauli, Crosis, Chicho, Mique, Javier, Ame, Matías, Maira, Andrés quienes han sido un gran apoyo y uno de los pilares fundamentales durante todo este tiempo. Gracias a sus consejos, palabras de aliento, anécdotas y discusiones que hacen que este camino fuese más enriquecedor. A Bárbara, por permitirme conocer un mundo maravilloso y de quien aprendí y a la vez con quien crecí mucho. Gracias por las largas, interminables y fructíferas conversaciones y discusiones que tuvimos.

Mi familia, quienes de una u otra forma siempre han estado ahí para mí sea donde sea que estén.

Finalmente, a mi mamá, mi ima. Me quedo sin palabras para expresar lo que siento. Uno de los pilares fundamentales en mi vida y quien incondicionalmente se ha mantenido a mi lado. Sin todo su esfuerzo, cariño, energía y amor no hubiera llegado a estar donde estoy ni a convertirme en quien soy ahora. Este grado académico no es tan sólo mío sino un fruto a todo el esfuerzo que has puesto desde que llegué a este mundo.

Índice de Contenidos

Índice de Figuras	9
Índice de Tablas	12
Resumen	13
Abstract	15
Capítulo 1: Introducción, Hipótesis y Objetivos	17
1.1 La Enfermedad de Alzheimer	18
1.2 Etiología de la EA: la hipótesis amiloidogénica	19
1.3 Agregación de proteínas y péptido A β	22
1.4 Nanobiotecnología	24
1.4.1 Uso y aplicaciones de Nanopartículas de Oro para interferir la agregación del péptido A β	25
1.4.2 Efecto de Nanopartículas sobre el proceso de agregación de A β	28
1.5 Estudios cinéticos del proceso de agregación de beta amiloide	32
HIPÓTESIS	38
OBJETIVOS	38
OBJETIVO GENERAL	38
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
Capítulo 2: Materiales y Métodos.....	39
2.1 Nanoprismas de Oro (NPrO)	40
2.1.1 Síntesis de Nanoprismas de Oro	40
2.1.2 Evaluación de la influencia de la temperatura en la síntesis de NPrO.....	40
2.1.3 Funcionalización de NPrO con HS-PEG-COOH	40
2.1.4 Purificación de NPrO-PEG COOH mediante centrifugación diferencial.....	41
2.1.5 Segunda funcionalización de NPrO con HS-PEG-COOH (NprO-PEGx2).....	42
2.1.6 Cuantificación de NPrO mediante NanoSight.....	42
2.2. Nanoesferas de oro (NeO)	43
2.2.1 Síntesis de nanoesferas de oro de 40nm	43
2.2.2 Funcionalización de NeO con HS-PEG-COOH	43
2.3 Espectrofotometría de Absorción Molecular (visible-NIR).....	43
2.4 Dispersión Dinámica de la Luz (DLS)	44
2.5 Potencial ζ	44
2.6 Microscopía electrónica de transmisión de barrido (STEM)	45
2.7 Microscopía electrónica de Transmisión (TEM)	45

2.8 Preparación de las muestras de A β 42 para los estudios de agregación	46
2.9 Ensayo de cinética de agregación péptido A β 42	46
2.10 Ajustes globales de las cinéticas de agregación del péptido A β 42	47
2.11 Ensayo de cinética de agregación péptido A β 42 en presencia de NPO	47
2.12 Espectroscopia de Dicroísmo circular (DC)	48
2.13 Espectroscopia Raman	48
Capítulo 3: Síntesis, funcionalización y caracterización de NPO.....	50
3.1 Determinación y caracterización de los parámetros relevantes para la síntesis de Nanoprismas de Oro (NPrO)	51
3.1.1 Concentración de solución áurica	51
3.1.2 Concentración del primer volumen de Na ₂ S ₂ O ₃	53
3.1.3 Segunda adición de Na ₂ S ₂ O ₃ y formación de NPrO	54
3.1.4 Volumen de la segunda adición	57
3.1.5 Cinéticas de formación de NPrO a distintas temperaturas	58
3.1.6 Caracterización de los Nanoprismas de Oro (NPrO) obtenidos.....	63
3.2 Obtención y caracterización de NPrO con PEG.....	65
3.2.1 Enriquecimiento de NPrO mediante funcionalización con PEG y centrifugación diferencial	66
3.2.2 Segunda funcionalización de NPrO con HS-PEG-COOH.....	72
3.3 Síntesis de NeO	76
3.4 Funcionalización de NeO desnudas con PEG	79
Capítulo 4: Evaluación del efecto de la curvatura de NPO sobre la cinética de agregación del péptido A β	83
4.1 Purificación del péptido A β 42 sintético	84
4.2 Estandarización de las cinéticas de agregación del péptido A β 42.....	85
Capítulo 5: Determinación de la interacción entre curvatura de NPO con A β 42.....	99
4.1 Efecto de NPO sobre la estructura final de las fibras de A β 42.....	100
5.2 Evaluación de la morfología de fibras de A β 42 mediante TEM.....	101
5.3 Evaluación de la interacción de NPO con fibras de A β 42.....	106
5.4 Análisis Raman de la interacción de A β 42 sobre cada NPO	107
Capítulo 6: Discusión de resultados, conclusiones y proyecciones	113
6.1 Discusión de Resultados	114
6.1.1 Síntesis y caracterización de NPO	114
6.1.2 Efecto de la curvatura de NPO sobre las cinéticas de A β 42	118
6.1.3 Morfología de las fibras de A β 42 en presencia de NPO.....	122

6.1.4 Determinación de la interacción de NPO con A β 42.....	123
6.1.5 Efecto de la curvatura de NPO en la interacción con A β 42.....	125
6.2 Conclusiones.....	132
6.3 Proyecciones.....	133
Publicaciones	134
Congresos	134
Presentaciones formato Oral Internacional.....	134
Presentaciones formato Oral Nacional	135
Presentaciones formato Panel Internacional	135
Presentaciones formato Panel Nacional.....	135
Referencias	136

Índice de Figuras

Figura 1.1 Comparación esquemática entre un cerebro sano y con Alzheimer	19
Figura 1.2 Procesamiento de la proteína precursora del amiloide (APP).....	21
Figura 1.3 Representación esquemática del proceso de agregación del péptido A β	24
Figura 1.4 Esquema de absorción en la ventana biológica	27
Figura 1.5 Parámetros utilizados en el diseño racional de nanomateriales para aplicaciones biomédicas	30
Figura 1.6 Curva sigmoideal característica de agregación de proteínas amiloides.....	33
Figura 1.7 Procesos microscópicos que dirigen la formación de amiloides donde cada proceso depende de distintas constantes de velocidad	34
Figura 1.8 Mecanismo molecular del proceso de agregación de A β 42.....	35
Figura 3.1 Espectro de absorbancia Vis-NIR utilizando diferentes concentraciones de HAuCl ₄	52
Figura 3.2 Espectro de absorbancia Vis-NIR de HAuCl ₄ (2 mM) reducido con diferentes concentraciones de tiosulfato de sodio.	54
Figura 3.3 Espectro de absorbancia Vis-NIR de HAuCl ₄ 2 mM reducido con tiosulfato de sodio 0,625 mM (x2)	55
Figura 3.4 Imágenes TEM de nanoprismas de oro sintetizados a distintos tiempos.....	56
Figura 3.5 Espectros Vis-NIR de nanoprismas de oro sintetizados con diferentes volúmenes de tiosulfato en la segunda adición	58
Figura 3.6 Ensayo cinético de formación NPrO a distintas temperaturas	60
Figura 3.7 Caracterización a tiempo final de la síntesis de NPrO a distintas temperaturas mediante STEM.....	62
Figura 3.8 Resumen de espectro Visible-IR del producto final de cada cinética de formación de NPrO a diferentes temperaturas	62
Figura 3.9 Síntesis de NPrO	63
Figura 3.10 Distribución de tamaños determinado mediante DLS para NPrO obtenidos de la síntesis.....	64
Figura 3.11 Distribución de cargas determinado mediante el potencial zeta para NPrO obtenidos de la síntesis	65
Figura 3.12 Espectro Visible-IR para cada etapa de la centrifugación diferencial.....	67
Figura 3.13 Caracterización de la muestra mediante TEM, tamaño del largo de arista de los NPrO y diámetro de las NeO luego de cada centrifugación.....	69
Figura 3.14 Caracterización de NPrO obtenidos luego de la quinta (NPrO PEG P5) y sexta centrifugación (NPrO PEG P6) mediante espectrofotometría Visible-IR.	69
Figura 3.15 Caracterización de la muestra mediante TEM, tamaño del largo de arista de los NPrO y diámetro de las NeO luego de ambas centrifugación a 3300 g	70

Figura 3.16 Distribución de cargas determinado mediante potencial zeta para NPrO PEG P6.....	72
Figura 3.17 Distribución de tamaños determinado mediante DLS para NPrO PEG P6 ...	72
Figura 3.18 Caracterización de NPrO obtenidos después de la segunda funcionalización con HS-PEG-COOH	74
Figura 3.19. Distribución de cargas determinado mediante potencial zeta para NPrO PEGx2	75
Figura 3.20 Distribución de tamaños determinado mediante DLS para NPrO PEGx2	76
Figura 3.21 Caracterización de NeO desnudas.....	77
Figura 3.22 Distribución de tamaños determinado mediante DLS para NeO desnudas ..	78
Figura 3.23 Distribución de cargas determinado mediante potencial ζ para NeO desnudas	79
Figura 3.24 Caracterización de NeO funcionalizadas con PEG.....	80
Figura 3.25 Distribución de tamaños determinado mediante DLS para NeO desnudas ..	81
Figura 3.26 Distribución de cargas determinado mediante potencial zeta para NeO PEG	82
Figura 4.1 Cromatograma representativo del péptido A β 42 sintético obtenido por purificación con exclusión molecular y HPLC.....	85
Figura 4.2 Ensayo de cinética de agregación con distintas concentraciones de ThT	86
Figura 4.3 Cinética de agregación péptido A β 42.....	88
Figura 4.4 Gráfico que relaciona el logaritmo del tiempo medio de cada cinética (Half time) con el logaritmo de la concentración inicial de péptido A β sintético	90
Figura 4.5 Cinéticas de agregación a diferentes concentraciones del péptido A β 42 analizadas mediante el software AmyloFit	91
Figura 4.6 Comparación de los tiempos medios de las cinéticas de agregación para cada concentración de A β 42 en ausencia o presencia de NPO	94
Figura 4.7 Cinéticas de agregación a diferentes concentraciones del péptido A β 42 analizadas a diferentes concentraciones de NPrO.....	96
Figura 4.8 Cinéticas de agregación a diferentes concentraciones del péptido A β 42 analizadas a diferentes concentraciones de NeO	97
Figura 4.9 Dependencia de las constantes combinadas como función de la concentración de NPrO y de NeO.....	98
Figura 5.1 Espectro DC péptido A β 42 monomérico purificado mediante SEC-FPLC y antes de ser usado en el ensayo de cinética de agregación.	100
Figura 5.2 Evaluación mediante DC de las fibras de A β 42 en ausencia o presencia de NPO al tiempo final de 18 hrs del ensayo de agregación.....	101
Figura 5.3 Imágenes TEM de la interacción y colocalización entre A β 42 ya sea con NPrO o con NeO	102

Figura 5.4 Imágenes TEM en ausencia y presencia de NPO representativas para cada condición.	104
Figura 5.5 Análisis estadístico mediante un diagrama de caja y bigotes para el largo de las fibras de A β 42 en ausencia o presencia de NPO.	105
Figura 5.6 Imagen STEM de NPrO (A) o NeO (B) incubadas con fibras de A β 42 posterior a su proceso de formación.....	106
Figura 5.7 Espectro Raman de fibras de A β en ausencia o presencia de NPO	111
Figura 5.8 Espectro Raman de NPO funcionalizadas con PEG, solubilizadas en el buffer fosfato de las cinéticas de agregación en presencia o ausencia de ThT	112
Figura 6.1 Modelo propuesto para el mecanismo molecular de las NPO sobre el proceso de agregación.....	131

Índice de Tablas

Tabla 3.1 Resumen de caracterización de cada cinética de formación de NPrO para cada temperatura.	63
Tabla 3.2 Tabla resumen de la caracterización de cada una de las etapas de centrifugación	71
Tabla 3.3 Caracterización fisicoquímica antes y después de funcionalización de NPrO con PEG.....	76
Tabla 3.4 Caracterización fisicoquímica antes y después de funcionalización de NeO con PEG.....	82
Tabla 4.1 Modelos matemáticos para el ajuste global de las cinéticas obtenidas con el péptido A β 42 en ausencia o presencia de NPO.....	90
Tabla 4.2 Comparación constantes combinadas obtenidas del ajuste global.	92
Tabla 5.1 Comparación fisicoquímica de NPrO y NeO recuperadas a tiempo final de la cinética de agregación en ausencia y presencia de A β 42.....	107
Tabla 5.2 Asignaciones específicas de las señales Raman para las muestras de fibras de A β en ausencia o presencia de NPO.	109

Resumen

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una de las patologías neurodegenerativas más importantes y una de las formas más comunes de demencia. Esta enfermedad se caracteriza por presentar el proceso de agregación del péptido β amiloide ($A\beta$). En condiciones fisiológicas, monómeros de $A\beta$ se encuentran en una forma soluble pero en condiciones patológicas éste comienza a agregar, produciendo diferentes especies intermediarias tóxicas hasta generar las denominadas fibras de $A\beta$ y finalmente las placas seniles. De esta manera es que el proceso de agregación del péptido $A\beta$ se ha convertido en un blanco para una potencial terapia de la EA. Sin embargo, todas estas aproximaciones han fallado ya sea porque el uso de fármacos no ha logrado alcanzar una concentración adecuada a nivel cerebral o porque no han logrado atravesar la barrera hematoencefálica. Asimismo, muchos de los tratamientos probados se realizan en etapas tardías de la enfermedad no lográndose buenos resultados.

Las Nanopartículas de Oro (NPO) han sido utilizadas en diferentes aplicaciones en biomedicina y se han propuesto su uso para tratar la EA mediante la inhibición de la agregación de $A\beta$. Sin embargo, cómo la curvatura de las NPO puede afectar el mecanismo de agregación de $A\beta$ aún se mantiene sin esclarecer. En el presente trabajo, se caracterizaron dos diferentes formas de NPO: los nanoprismas de oro (NPrO) con una forma plana, y las nanoesferas de oro (NeO) con una forma curva, los cuales además fueron funcionalizadas con polietilenglicol (PEG) para darles estabilidad en sistemas biológicos. A continuación, se evaluó y estudió el efecto de cada NPO sobre la formación de fibras de $A\beta_{42}$ *in vitro*

mediante ensayos cinéticos monitoreados por una sonda fluorescente, la tioflavina T. Estas cinéticas fueron analizadas mediante un ajuste global con diversos modelos que describen el proceso de agregación. Mientras los NPrO aceleraron el proceso de agregación sin modificar el mecanismo molecular de éste, las NeO desaceleraron el proceso de agregación y modificaron el mecanismo molecular hacia uno de fragmentación/nucleación secundaria, con respecto al control que es nucleación secundaria multipasos. Además, mediante microscopía electrónica se determinó que la forma de las NPO modificó el largo de las fibras de A β 42 obtenidas, siendo éstas más largas en presencia de los NPrO y más cortas en presencia de las NeO. Estos resultados fueron explicados gracias a una interacción diferencial del péptido A β 42 con la superficie de cada una de las NPO, determinado mediante espectroscopía Raman. Mientras la forma plana de los NPrO expuso hacia el solvente aminoácidos hidrofóbicos importantes para el proceso de agregación de A β 42, la forma curva de las NeO los esconde impidiendo su apropiada interacción lo cual se traduce en una inhibición del proceso de agregación. De esta forma, este estudio demuestra el rol clave que posee la curvatura de las NPO y de su mecanismo molecular sobre el proceso de agregación del péptido A β 42.

Abstract

Alzheimer's disease is one of the most important neurodegenerative illness and the most common kind of dementia. One of the hallmarks of this disease is the aggregation process of amyloid- β peptide ($A\beta$). In physiological conditions, the $A\beta$ monomer is maintained in a soluble form but in pathological conditions it begins to aggregate, producing different toxic intermediaries until generating the $A\beta$ fibrils and senile plaques. Thus, the $A\beta$ aggregation process has become in a main strategy to inhibit, but all these strategies have failed because they cannot either reach an adequate concentration in the brain or cross the brain blood barrier.

Gold nanoparticles (GNP) have been used for different applications in biomedicine and proposed to treat Alzheimer's disease (EA) through the inhibition of $A\beta$ peptide aggregation. However, how the GNP's curvature affects the mechanism of $A\beta$ aggregation is not yet well understood. In this work, we characterized two different GNP's curvature, a flat gold nanoprisms (GNPr) and curved gold nanospheres (GNS), and functionalized with poly ethilenglycol (PEG) to stabilized them. Then, we evaluate and studied the effect of these GNP on *in vitro* $A\beta$ 42 fibril formation by using ThT-based kinetic assay and global fitting analysis with several models of aggregation. Whereas GNPr accelerated the aggregation process and maintained the molecular mechanism of aggregation, GNS decelerated the aggregation process and modify the molecular mechanism to fragmentation/secondary nucleation regarding the control situation. By transmission electronic microscopy, it was observed the GNP's shape was found to modify length's population of $A\beta$ 42 fibril: longer fibrils in presence of GNPr and shorter fibrils with GNS. These results

were explained by a differential interaction between A β peptide with each GNP's curvature observed by Raman spectroscopy. While the flat shape of GNPs exposed hydrophobic amino acids of A β peptide that participate in accelerating the aggregation process, the curved shape of GNPs hid these amino acids and hindered the proper interaction decelerating the fibrillation. Thus, this study provides the role of the GNPs' curvature and their molecular mechanisms on the A β aggregation process.

Capítulo 1: Introducción, Hipótesis y Objetivos

1.1 La Enfermedad de Alzheimer

La **Enfermedad de Alzheimer** (EA) es una patología neurodegenerativa y es la forma más común de demencia, la cual representa cerca del 50-60% de todos los casos de demencia conocidos. Debido a esto, es que en la actualidad, la EA es un gran desafío para la salud pública mundial, además de tener un alto impacto en la economía. Se estima que en el año 2010 los gastos asociados a demencias a nivel mundial ascendieron a US\$600 billones de dólares¹. Junto con estos datos, estimaciones recientes indican que a nivel mundial, cerca de 24 millones de personas padecían de EA en el 2001, y que para el 2040, cerca de 81 millones de personas padecerán este tipo de enfermedad².

La EA se presenta como un paulatino deterioro del sistema nervioso (Fig. 1.1), el cual se caracteriza por la pérdida de funciones cognitivas, tales como la memoria y el aprendizaje, y por alteraciones conductuales asociadas a la enfermedad, como trastornos en el lenguaje, cambios de humor, agresión, confusión, irritabilidad, entre otros síntomas. Debido a este deterioro gradual es que los pacientes con EA conforme avanzan en edad terminan sus días postrados requiriendo cuidados médicos y supervisión continua.

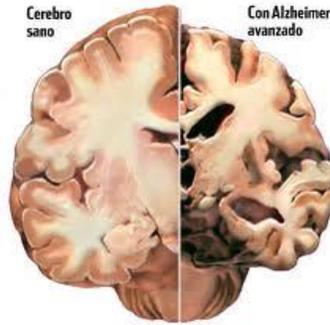


Figura 1.1 Comparación esquemática entre un cerebro sano (lado izquierdo) y un cerebro de un paciente con Alzheimer (derecha)³.

1.2 Etiología de la EA: la hipótesis amiloidogénica

La EA se caracteriza por la pérdida de sinapsis y neuronas en la corteza cerebral y algunas regiones subcorticales. Esto conlleva a una gran atrofia de las regiones afectadas, incluyendo reducción en el lóbulo temporal y parietal, y parte de la corteza frontal, entre otros⁴. Además, en cortes histopatológicos realizados en muestras *postmortem* de estas zonas se aprecian lesiones a nivel extracelular denominadas placas seniles, y a nivel intracelular alteraciones denominadas ovillos neurofibrilares⁵. Las placas seniles están constituidas por agregados proteicos insolubles del péptido β -amiloide ($A\beta$), los cuales se acumulan y agregan afuera de las neuronas⁶. Por otro lado, los ovillos neurofibrilares están compuestos de fibras retorcidas insolubles de la proteína Tau hiperfosforilada la cual agrega, y se postula que pierde su función de estabilizar los microtúbulos, provocando un deterioro de los axones neuronales y por consiguiente una pérdida progresiva de la función neuronal⁷. Aun cuando este tipo de lesiones, placas y ovillos, son comunes en cerebros de personas adultas mayores, aquellos que padecen Alzheimer las presentan en mucha mayor cantidad y en distintas zonas del

cerebro⁸. El diagnóstico definitivo de la EA requiere de la visualización *postmortem* de placas y ovillos en cortes histopatológicos del cerebro.

La principal hipótesis actualmente aceptada, es que la producción y acumulación del péptido A β desencadena el desarrollo de la EA, la cual se denomina hipótesis de la cascada amiloide⁹. El péptido A β proviene del procesamiento de la proteína precursora del amiloide (APP), la cual es una proteína transmembrana que puede seguir dos rutas de procesamiento (Fig. 1.2). La primera, denominada vía no amiloidogénica, APP es procesada por la enzima α -secretasa y luego proteolizada por la enzima γ -secretasa generando un fragmento denominado p3 del cual su función aún no está del todo clara. En la segunda vía, denominada vía amiloidogénica, APP es procesada por la enzima β -secretasa y luego por la enzima γ -secretasa, dando origen al péptido A β 40 o A β 42^{10, 11}. Mientras el péptido A β se encuentre como monómero es inocuo, pero en condiciones patológicas éste agrega generando oligómeros o fibras enriquecidas en estructura β -plegada y es altamente neurotóxico participando en daño neuronal^{12, 13} (Fig. 1.2). Diversos estudios han mostrado que estos agregados amiloides interactúan tanto con neuronas como con células gliales generando una activación de las cascadas proinflamatorias, disfunción mitocondrial, incremento del estrés oxidativo, deterioro de vías de señalización intracelular y de plasticidad sináptica, incremento de la fosforilación de tau, desregulación del metabolismo de calcio e inducción de apoptosis que conlleva finalmente a la muerte neuronal en ensayos realizados tanto *in vitro* como *in vivo*^{13, 14} (Fig. 1.2).

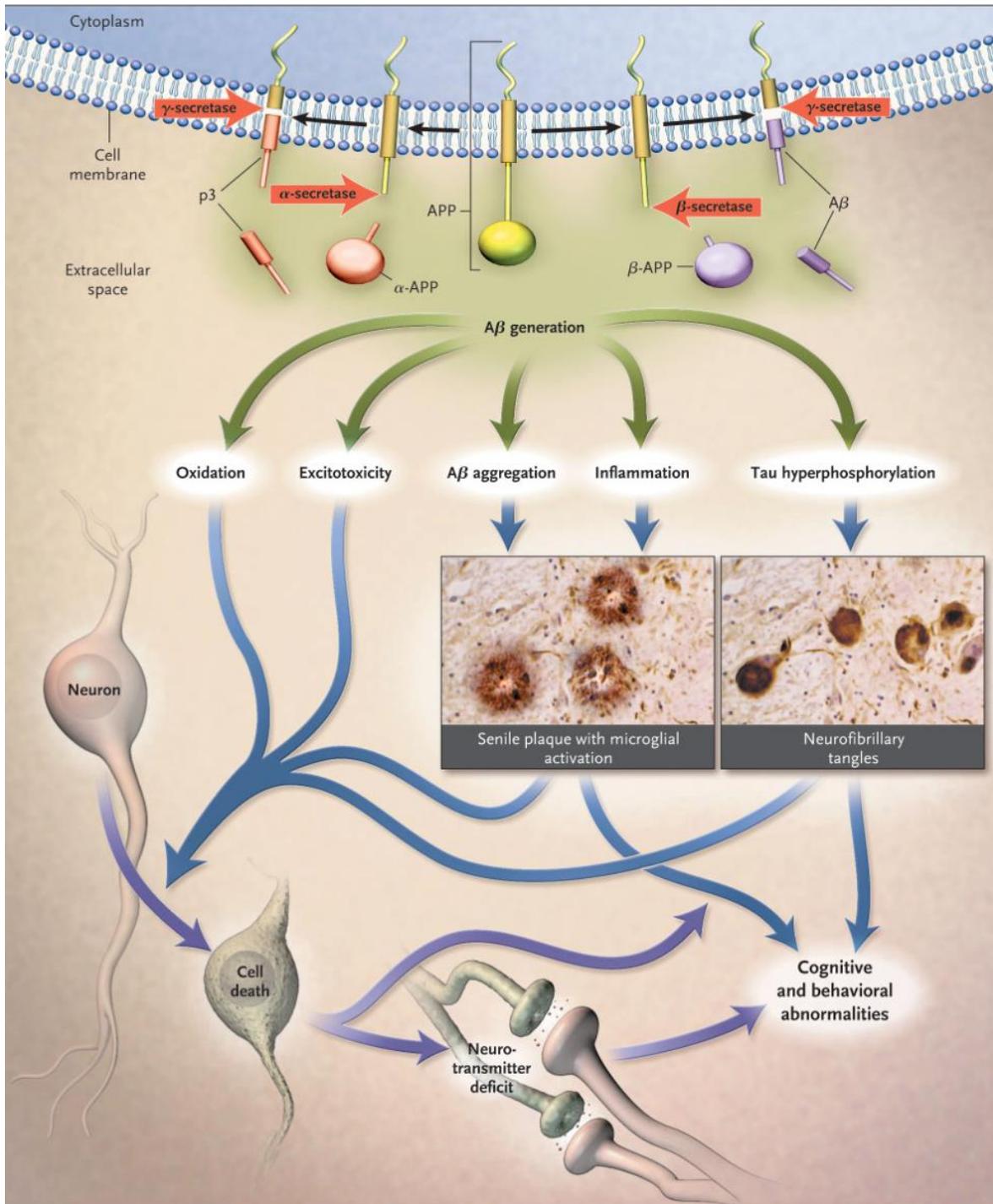


Figura 1.2 Procesamiento de la proteína precursora del amiloide (APP). En el lado izquierdo de la imagen se observa el procesamiento por la vía no amiloidogénica la cual genera el péptido p3. Mientras que en el lado derecho de la imagen se observa el procesamiento por la vía amiloidogénica la cual genera el péptido A β de 40 o 42 aminoácidos con el consecuente daño que generan en los distintos niveles en el cerebro¹⁵.

1.3 Agregación de proteínas y péptido A β

La agregación de proteínas hacia la formación de fibras amiloides se debe a un incorrecto o mal plegamiento que conlleva a que las proteínas no funcionen correctamente¹⁶. De esta forma, el proceso de agregación proteica es una consecuencia de que la cadena polipeptídica no alcance su correcta estructura tridimensional. El mal plegamiento de proteínas se ha asociado comúnmente con diversas enfermedades, sobre todo del tipo neurodegenerativas como la EA, Parkinson, Huntington y Prion entre otras, así como también enfermedades sistémicas como la diabetes tipo II o agregados que se forman debido a la diálisis crónica en algunos pacientes¹⁷⁻¹⁹. Sin embargo, el proceso de agregación no sólo puede generar diversas enfermedades, sino que también posee un significado funcional. En microorganismos como es el caso de la *Escherichia coli*, se ha visto que producen agregados amiloides como puntos de anclaje o ensamblaje para otras proteínas²⁰. Por otro lado, en células que componen los lentes oculares de los mamíferos se ha determinado la presencia de estos agregados tipo amiloide los cuales otorgan estabilidad estructural a largo plazo así como transparencia a estos lentes²¹.

Dentro de los agregados amiloides, podemos encontrar el péptido A β el cual pasa por diferentes estados de agregación antes de llegar a su estado final estable como placas seniles²². Como bien se mencionó anteriormente, el péptido A β es producido desde la proteína APP a través de la vía amiloidogénica. Bajo condiciones patológicas, el proceso de agregación comienza cuando los monómeros del péptido A β cambian hacia una conformación β plegada y se unen

mediante contactos formando núcleos de agregación, tales como dímeros, trímeros, oligómeros, y estos pequeños núcleos a su vez serán utilizados como superficies sobre las cuales se continuarán uniendo más y más monómero hasta generan una fibra amiloide (Fig. 1.3). De esta forma, las fibras que se forman en el proceso de agregación son altamente organizadas y se extienden con una estructura de sábanas β orientadas perpendicularmente al eje de elongación²³. Estas fibras finalmente se depositan sobre el lecho neuronal junto a otro tipo de proteínas que quedan atrapadas, las que se denominan placas seniles. Antiguamente se creía que eran estas placas seniles las que generaban la EA, pero hoy en día se ha demostrado que son los oligómeros de $A\beta$ los cuales por diversos mecanismos generan neurotoxicidad, tanto en experimentos *in vitro* como *in vivo*²⁴⁻²⁶.

Diversas estrategias se han planteado para bloquear o desplazar el proceso de agregación, ya sea hacia la formación de monómeros o de placas seniles, mostrando con éxito la disminución de la toxicidad de $A\beta$ *in vitro*. Sin embargo, *in vivo* estas promisorias terapias no han logrado mostrar los mismos resultados debido a la presencia de la barrera hematoencefálica (BHE), la cual rodea al sistema nervioso central y que impide lograr tener concentraciones terapéuticas adecuadas y por ende una baja efectividad a nivel cerebral.

De esta forma, la búsqueda y desarrollo de una estrategia terapéutica que permita elevar la concentración de fármacos a nivel cerebral, utilizando como blanco terapéutico el proceso de agregación del péptido $A\beta$, se mantiene en la actualidad como una estrategia promisoriosa.

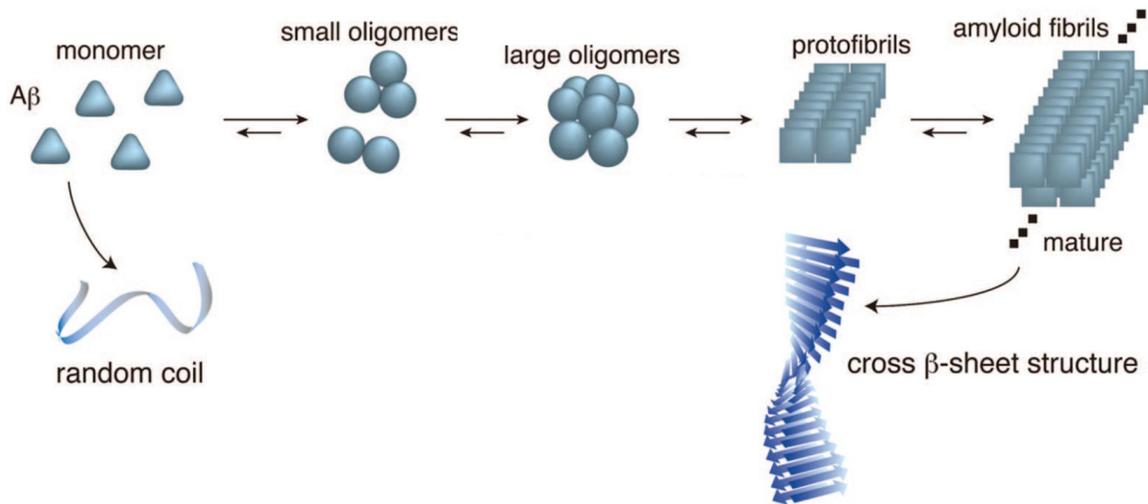


Figura 1.3 Representación esquemática del proceso de agregación del péptido A β . Los monómeros en un estado fisiológico poseen una estructura *random coil*. En condiciones patológicas cambian hacia una estructura hoja β y comienzan a agregar entre ellos generando oligómeros, sobre los cuales se adicionan más monómeros generando protofibrillas y finalmente fibras amiloides²⁷.

1.4 Nanobiotecnología

En la actualidad, los nanomateriales (NM) han adquirido relevancia en el campo de la nanobiotecnología y específicamente en el área de la nanomedicina²⁸, donde los esfuerzos se han concentrado en la detección, diagnóstico y terapia de enfermedades²⁹. De hecho, los NM poseen ciertas ventajas sobre otro tipo de terapias debido a que su escala nanométrica les permite interactuar con la mayoría de las estructuras y moléculas biológicas, presentan una relativa baja toxicidad (depende del tipo de NM utilizado) y pueden atravesar barreras biológicas para alcanzar eficazmente sitios de interés³⁰.

1.4.1 Uso y aplicaciones de Nanopartículas de Oro para interferir la agregación del péptido A β

Dentro de los NM utilizados en el campo de la nanomedicina, las nanopartículas de oro (NPO) han cobrado una vital relevancia gracias a diversas características que les confieren una gran versatilidad, tales como: su tamaño que oscila entre los 10 a 150 nm, son muy estables, inertes, biocompatibles, fáciles de sintetizar y de ser visualizadas mediante microscopía electrónica³¹. Además, estas NPO poseen un gran área superficial que puede ser funcionalizada, es decir, se pueden unir o adsorber diversos tipos de moléculas a la superficie de la NPO y transformarlas en verdaderos transportadores o *carriers* de moléculas y dirigirlas específicamente hacia un tejido u órgano dentro del organismo, e incluso atravesando la barrera BHE³²⁻³⁴. Esta funcionalización es gracias a que el oro (Au) puede reaccionar con grupos sulfhidrilos (SH) generándose un enlace de tipo covalente³⁵. Debido a este enlace Au-tiol, las NPO han sido funcionalizadas con diversos tipos de moléculas como fármacos, DNA/RNA, péptidos, anticuerpos, polímeros, etc. Otra funcionalización que es de gran importancia y muy comúnmente utilizada es el polietilenglicol (PEG)³⁶, el cual permite aumentar la estabilidad de las NPO tanto *in vitro* como *in vivo* y evitar su eliminación por el sistema endotelio reticular, aumentando considerablemente la vida media de las NPO en sistemas biológicos³⁷. Además, las moléculas de PEG pueden poseer grupos funcionales en el extremo libre mediante el cual también se pueden unir una amplia gama de otras moléculas^{29, 38}. Dada esta gran versatilidad, la funcionalización de la superficie de las NPO las ha convertido en una excelente herramienta en diversas aplicaciones biomédicas como en diagnóstico y detección

de enfermedades, como agentes de contraste en imagenología³⁹, biosensores⁴⁰ y transporte de fármacos⁴¹⁻⁴³ (*drug delivery*).

El uso de NPO funcionalizadas posee ventajas únicas por sobre la administración directa de un fármaco debido al incremento de la concentración local del fármaco funcionalizado, reducción de efectos secundarios en tejidos sanos, mejora la solubilidad y el perfil farmacocinético y farmacodinámico del fármaco. Aumenta su estabilidad debido a la disminución de la degradación en el torrente sanguíneo y puede generar una liberación controlada del fármaco en cuestión³³.

Además, estas NPO poseen una propiedad óptica en la cual los electrones que están en la superficie de la NP pueden interaccionar con un campo electromagnético, fenómeno conocido como resonancia del plasmón superficial (RPS)^{44, 45}, el cual corresponde a una oscilación colectiva de los electrones en la superficie de la NPO cuando una longitud de onda mayor al tamaño de la NPO incide sobre ella. La longitud de onda necesaria para generar RPS depende del tamaño y de la forma de la NPO, siendo para nanoesferas de oro (NeO) cercano a los 520 nm mientras que para NPO anisotrópicas como nanovarillas de oro (NvO) o nanoprismas de oro (NPrO) cercana a los 800 nm o mayores⁴⁶. Esto implica que las NeO absorben en el rango visible del espectro electromagnético³⁹ mientras que para el caso de las NPO anisotrópicas corresponde al espectro infrarrojo cercano de radiación. Esta interacción con las ondas electromagnéticas infrarrojas le confiere la capacidad a la NPO de absorber grandes cantidades de energía de forma local y disiparla en forma de calor^{45, 47}, proceso denominado fototermia y el

que ha sido utilizado para destruir tanto células tumorales⁴⁸ como agregados proteicos. Este último fue desarrollado en nuestro laboratorio donde mediante el uso de la fototerapia se logró desagregar agregados del péptido A β e impedir su reagregación, reduciendo también la toxicidad de dichos agregados^{49, 50}. El hecho de que estas NPO absorban en el infrarrojo permite trabajar en la denominada ventana biológica que está entre los 700 y 900 nm de longitud de onda⁵¹, donde las moléculas biológicas (como hemoglobina o el agua) absorben mínimamente. Es así, como las NPO anisotrópicas se han abierto camino en el ámbito de la nanomedicina y en particular los NPrO, los cuales se caracterizan por poseer un plasmón fácilmente modificable (entre 800 a 1000 nm), son de fácil síntesis, con una síntesis limpia y sin uso de agentes contaminantes y por lo cual ya se han utilizado como potencial terapia contra el cáncer mediante fototerapia, además de su uso para la entrega de fármacos o *drug delivery* e imagenología hacia tejidos tumorales en modelos murinos⁵².

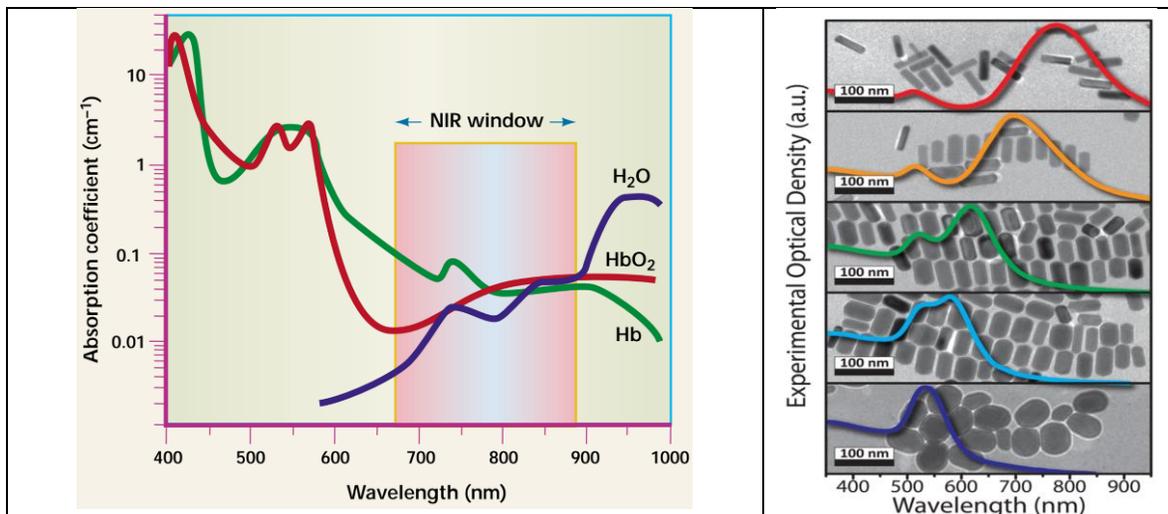


Figura 1.4 (A) Esquema de absorción en la ventana biológica en donde moléculas como agua o hemoglobina absorben mínimamente⁵¹. (B) Espectros de absorción de diferentes NPO dependiente de la forma de la NPO⁴⁶.

1.4.2 Efecto de Nanopartículas sobre el proceso de agregación de A β

Una de las formas de impedir el efecto patológico del péptido A β es bloquear su agregación mediante el uso de diversos tipos de nanomateriales, entre los que destacan las nanopartículas. Sin embargo, los resultados que se han descrito en la literatura suelen ser contradictorios ya que no se ha logrado obtener una correlación entre la nanopartícula utilizada y el efecto esperado sobre el proceso de agregación. En este sentido, por ejemplo, se ha observado que nanopartículas de poliestireno pueden presentar un rol dual sobre la agregación del péptido A β , es decir, a una baja concentración de esta nanopartícula se promueve la agregación del péptido A β mientras que a altas concentraciones de la misma nanopartícula el efecto es inhibitorio sobre el proceso de agregación⁵³. Por otro lado, nanopartículas copoliméricas han mostrado que inhiben la agregación del péptido A β ⁵⁴, pero a concentraciones similares poseen la capacidad de acelerar el proceso de agregación de otro tipo de proteínas amiloides, como es el caso de β 2 microglobulina⁵⁵. Para el caso de las NPO se ha reportado en literatura que inhiben el proceso de agregación de A β ^{56, 57}, sin embargo, al analizar el efecto sobre otro tipo de proteínas amiloides, como es el caso de IAPP, aceleran el proceso de agregación⁵⁸.

Estos estudios se han enfocado en evaluar la presencia de una determinada nanopartícula y su efecto modificando diversas variables como: la concentración, el tamaño o la composición de las nanopartículas y observar si modifican o no el proceso de agregación de A β y otras proteínas amiloides. No obstante, no se ha indagado en un posible mecanismo molecular que explique el

efecto de una nanopartícula en particular y cuál o cuáles serían las etapas del proceso de agregación que estarían siendo alteradas por la presencia de esa nanopartícula.

A escala nano, una de las principales características que se ha establecido para explicar este efecto diferencial en las nanopartículas es la geometría presente en la interfase bio-nano, es decir, la curvatura presente en la superficie de una nanopartícula⁵⁹⁻⁶⁵. Esta curvatura, también denominado efecto de curvatura a escala nano, gobierna las propiedades fisicoquímicas que presenta una nanopartícula como son el tamaño, la forma, la funcionalización con diversos ligandos, la porosidad, interacciones con células, adsorción de proteínas, e interacciones con proteínas (Fig. 1.5)⁶⁵⁻⁶⁸. En particular, la curvatura de una nanopartícula genera un alto impacto mediante el tamaño y la forma de las nanopartículas modulando las fuerzas e interacciones moleculares. De esta forma, modificando la curvatura de una superficie, por ejemplo haciéndola más plana o curva, se pueden incrementar o disminuir la superficie local de contacto y por ende las interacciones generadas en la interfase bio-nano. Esto es debido a que al interactuar una molécula con la superficie de una nanopartícula se reduce su entropía conformacional y traslacional con respecto a la molécula libre en solución, y esta restricción será resultado de la forma geométrica que imponga la superficie de la nanopartícula. Es así como modificando la forma de una nanopartícula en cuestión se puede promover o disminuir las interacciones intermoleculares entre proteínas amiloides, por ejemplo, con la superficie de NPO lo cual se traduciría en

una alteración del plegamiento de éstas que puede modificar el proceso de agregación ya sea incrementando o disminuyendo la tasa de agregación proteica.

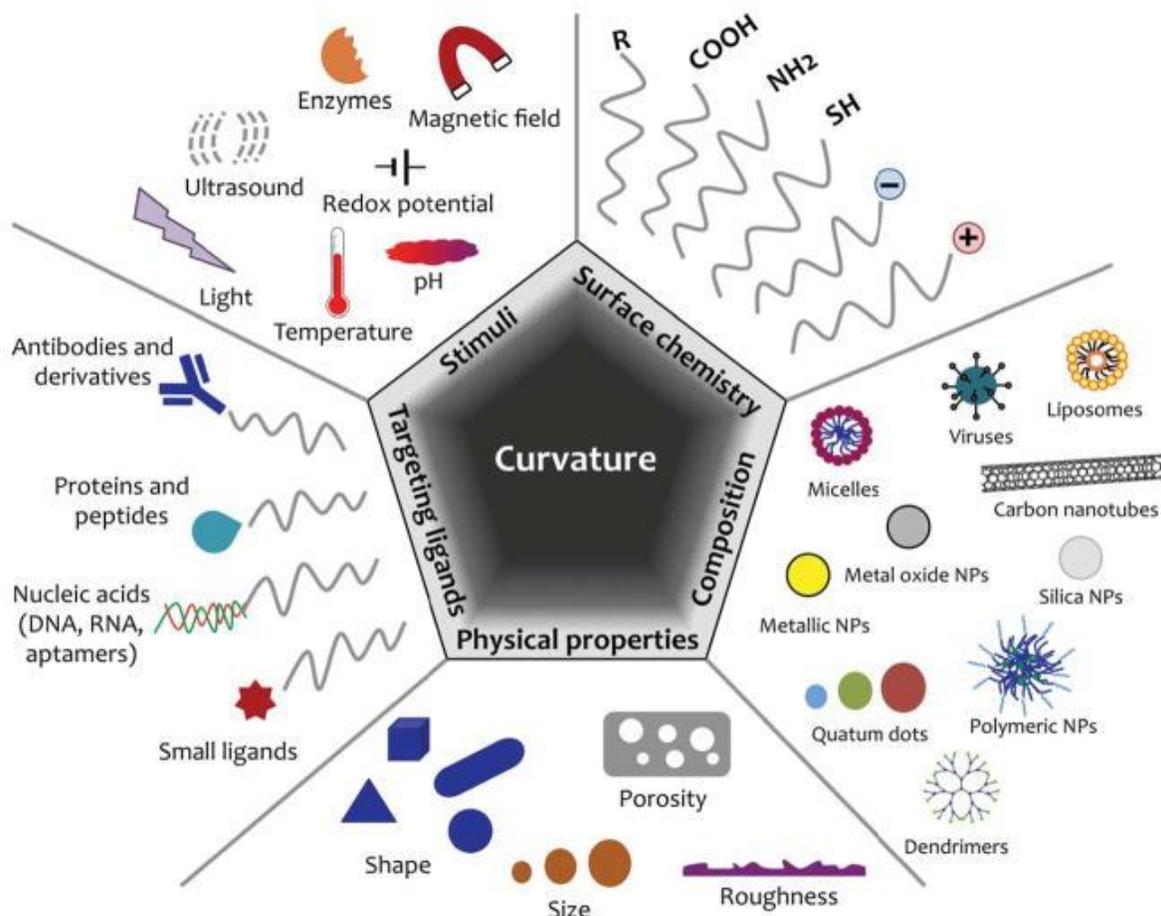


Figura 1.5 Parámetros utilizados en el diseño racional de nanomateriales para aplicaciones biomédicas. El grado de curvatura utilizado puede modificar o alterar parámetros o propiedades determinantes para cada nanopartícula como la cantidad de moléculas que se pueden funcionalizar sobre la superficie de una nanopartícula en cuestión, aumentar la superficie de interacción con moléculas de interés, la forma y el tamaño de la nanopartícula, etc.

Actualmente, el entendimiento de cuál es el rol de la curvatura de las nanopartículas se ha convertido en objeto de estudio para entender el tipo de interacciones moleculares que se generan en la interfase nanopartícula-proteína⁶⁹⁻⁷¹, y así poder realizar un diseño racional de qué tipo de nanopartícula será

utilizada en un estudio en particular. Por ejemplo, en estudios *in silico* mediante dinámica molecular, se ha propuesto que la curvatura de NPO puede alterar el proceso de agregación del péptido A β ⁶⁸. En este estudio se comparó una NPO esférica (alto grado de curvatura) con una varilla (bajo grado de curvatura) donde se determinó que al disminuir la curvatura de una NPO se promueven los procesos de fibrilación del péptido A β . Este tipo de resultados también fueron observados experimentalmente con otro tipo de proteínas y comparando su grado de oligomerización sobre superficies planas con curvas. Este estudio determinó que la superficie plana aumenta el grado de oligomerización, como una medida de agregación proteica, mientras que en la superficie curva se encontraron adsorbidos más proteínas en su forma monomérica⁷². Otro estudio interesante fue el realizado por Kim y cols, en el cual se demostró que distintas formas de NPO inducen un cambio diferencial en la morfología final de los agregados de A β . En este sentido se observaron fibras más largas en presencia de nanoestructuras planas, lo cual fue determinado mediante microscopía electrónica de transmisión⁷³.

Aun cuando existen diversos estudios que evalúan el efecto de la presencia de nanopartículas sobre el proceso de agregación de A β , estos estudios no han indagado en cómo la curvatura de las NPO altera la interacción con el péptido A β y cómo esta interacción modifica etapas moleculares claves en el mecanismo de agregación de A β . Actualmente, los estudios en este ámbito se han limitado al seguimiento de la aparición de estructura secundaria del proceso de agregación del péptido A β mediante ensayos cinéticos o de *time course*, o al aumento o disminución de la intensidad de fluorescencia a tiempo final, mediante el uso de

sondas fluorescentes que reconocen agregados proteicos, como es la Tioflavina T⁵³⁻⁵⁷. Sin embargo, este tipo de estudios no dan cuenta ni describen que estaría ocurriendo a nivel molecular ni cuáles etapas del proceso de agregación estarían siendo afectados por la presencia de la NPO (Fig. 1.3). Determinar esta información es clave ya que al alterar el proceso de agregación se puede estar promoviendo la presencia de especies intermediarias oligoméricas, las cuales como se mencionó anteriormente, están asociadas a un mayor daño neuronal.

1.5 Estudios cinéticos del proceso de agregación de beta amiloide

Una característica común de los diversos agregados amiloides es que poseen cinéticas de agregación que presentan una forma sigmoideal⁷⁴ donde se distinguen tres etapas: la fase *lag* o de nucleación, la fase de elongación o de crecimiento de fibras, y finalmente una fase *plateau* o meseta en la cual el sistema fibras-monómeros ha alcanzado su equilibrio (Fig. 1.6). Sin embargo, esta es una descripción que no permite evaluar las etapas de agregación que hay detrás de la formación de agregados. Por esta razón, se ha propuesto que las cinéticas de agregación sean ajustadas mediante modelos cinéticos que permiten obtener constantes cinéticas y relacionar éstas a etapas o procesos microscópicos específicos del proceso de agregación.

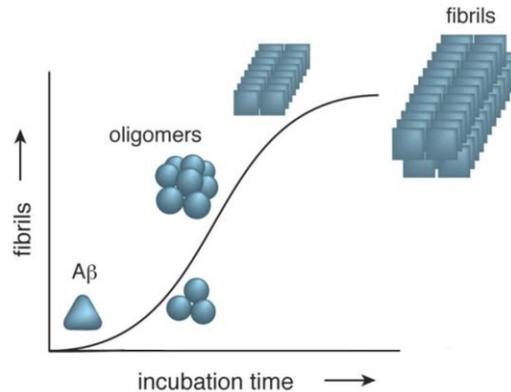


Figura 1.6 Curva sigmoide característica de agregación de proteínas amiloides. Presenta tres etapas: la fase lag con la presencia de monómeros y formación de pequeños oligómeros, la fase de crecimiento donde se adicionan más monómeros sobre los núcleos de agregación generando oligómeros y pequeñas fibras, y la fase *plateau* o meseta donde el sistema monómero/fibra ha alcanzado su equilibrio²⁷.

Un ejemplo muy simple corresponde a la agregación de proteínas como la actina y tubulina⁷⁵. En este caso, los contactos que se generan entre monómeros permiten la formación de núcleos sobre los cuales se adicionarán más monómeros que conllevan a la elongación de la fibra. Sin embargo, este mecanismo de nucleación, denominado nucleación primaria o k_n , no da cuenta de todos los procesos moleculares involucrados en el proceso de agregación de A β 42. Es así como se han propuesto modelos cinéticos más complejos que incluyan otros procesos microscópicos como se observa en la figura 1.7: elongación (k_+), que permite el alargamiento de la fibra; nucleación secundaria (k_2), donde la superficie de las fibras ya formadas cataliza la formación de nuevos agregados; o fragmentación (k_-), que describe la ruptura de fibras preformadas generando nuevos extremos donde nuclear. De esta forma, la contribución diferencial de estos eventos al proceso de agregación permite proponer diferentes mecanismos moleculares que explicarían la formación de fibras amiloides.

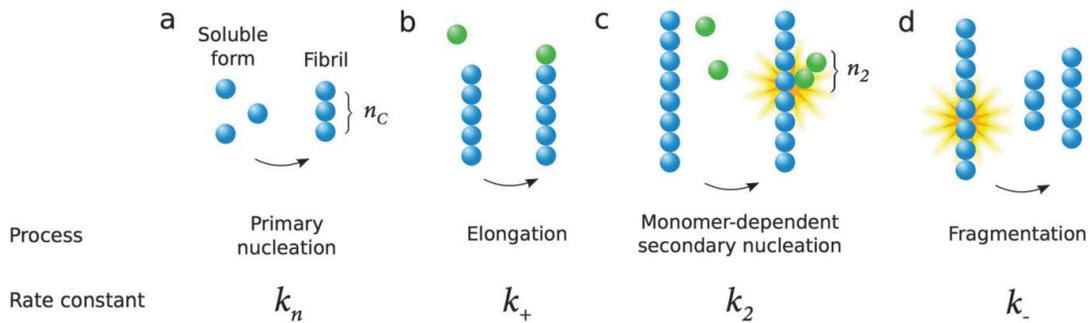


Figura 1.7 Procesos microscópicos que dirigen la formación de amiloides donde cada proceso depende de distintas constantes de velocidad: A, la nucleación primaria (k_n) que corresponde a la formación de núcleos de agregación (n_c). B, la elongación (k_+) que permite la elongación de la fibra. C, la nucleación secundaria (k_2) donde la superficie de las fibras ya formadas cataliza la formación de nuevos núcleos de agregación (n_2). D, la fragmentación (k_-) que corresponde a la ruptura de fibras ya formadas aumentando tanto el número de fibras como de sitios disponibles para que se alarguen estas fibras⁷⁴.

El grupo de Knowles y cols.⁷⁶, analizó las cinéticas de agregación del péptido A β 42 bajo diversos modelos cinéticos de formación de fibras que consideran los eventos microscópicos descritos en la figura 1.7. Según estos estudios, el modelo que mejor se ajusta a la forma que presentan las curvas de las cinéticas de agregación de A β 42 es el modelo de nucleación secundaria multi pasos. Como se observa en la figura 1.8, además de los procesos de nucleación primaria y elongación, la velocidad de formación de fibras está influenciada principalmente por el proceso de nucleación secundaria (k_2) donde la superficie de las fibras ya formadas actúa como un punto de anclaje para los monómeros lo cual promueve y cataliza la formación de nuevos agregados o núcleos de agregación. Adicionalmente, existe otro evento que participa en el proceso de agregación de A β 42 que es la fragmentación de las fibras ya formadas, lo cual implica un aumento en el número de fibras presentes pero además un aumento del número

de extremos disponibles sobre los cuales se puedan adicionar más monómeros permitiendo el alargamiento de las fibras. Sin embargo, su contribución a aumentar el número de fibras es menor comparado con la nucleación secundaria. De esta forma, gracias a la predicción que realiza este modelo, es que se ha podido reproducir las cinéticas de agregación del péptido A β 42 y dilucidar que el mecanismo de nucleación secundaria contribuye principalmente en el proceso de formación de fibras de A β 42⁷⁷⁻⁷⁹.

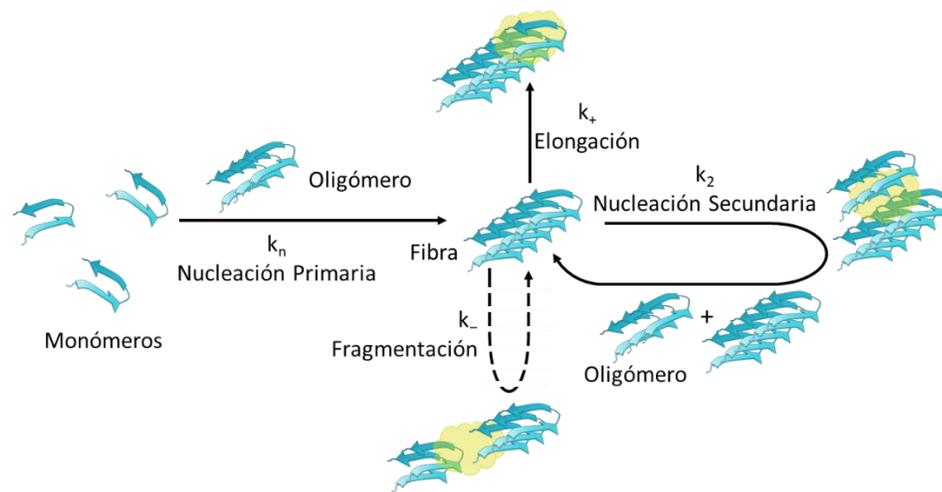


Figura 1.8 Mecanismo molecular del proceso de agregación de A β 42. Los nuevos agregados son producidos por las etapas de nucleación primaria (k_n) y nucleación secundaria (k_2), en la cual la superficie de la fibra cataliza la formación de nuevos agregados, mientras que la etapa de elongación (k_+) permite el alargamiento de estos agregados (línea continua). Adicionalmente, en algunas situaciones se puede generar una mayor contribución a la formación de agregados mediante la fragmentación (k_-) de las fibras ya formadas (línea segmentada)⁷⁷⁻⁷⁹.

Actualmente, estos modelos matemáticos están disponibles en la página AmyloFit⁷⁹ y han sido utilizados con éxito para analizar, determinar y entender el efecto que poseen diversas moléculas sobre las cinéticas del proceso de agregación de A β 42⁸⁰⁻⁸³. Sin embargo, en literatura no se cuenta con estudios de este tipo sobre NPO ni menos como la forma de las NPO podría estar alterando el

proceso de agregación de A β 42. *De esta manera, se genera una interesante posibilidad de estudio de evaluar el efecto que tiene la forma de las NPO sobre el proceso de agregación de A β 42 mediante análisis cinéticos y, por lo tanto, poder determinar cuáles serían los eventos moleculares involucrados.* Obtener y determinar el mecanismo molecular que subyace el efecto de la forma de una NPO sobre el proceso de agregación del péptido A β 42 permitiría no tan sólo comprender cuál es la etapa que la NPO está alterando sino también utilizar esta información para mejorar el diseño de futuras terapias contra la EA.

En la presente tesis, se estudiaron dos NPO con diferentes curvaturas, NPrO que son planos y NeO que son curvas, los cuales fueron funcionalizados con PEG y evaluados sobre las cinéticas de agregación del péptido A β 42 mediante el uso de la sonda fluorescente ThT⁵³⁻⁵⁷. Estas cinéticas se ajustaron mediante el uso de modelos matemáticos que describen la formación de fibras gracias al software AmyloFit⁸⁰⁻⁸⁵. En ausencia de NPO el mecanismo de agregación de A β 42 fue el mismo que el descrito en literatura: nucleación secundaria multipasos. En presencia de NPrO se observó que el proceso de agregación fue acelerado incrementando las constantes asociadas a las etapas de nucleación secundaria y elongación en dos órdenes de magnitud sin modificar el mecanismo molecular que subyace el proceso de agregación. Por otro lado, en presencia de las NeO, el mecanismo de agregación de A β 42 fue modificado hacia el modelo de nucleación secundaria/fragmentación, donde tanto la nucleación secundaria como la fragmentación presentan una contribución a la formación de nuevos agregados. Además, las NeO desaceleraron el proceso de agregación en las mismas

constantes que los NPrO en un orden de magnitud. Estos cambios en las cinéticas de agregación fueron acompañados por modificaciones en los histogramas de largo de las fibras de A β 42 para ambas NPO observadas por TEM^{57, 86, 87}. Todos estos resultados fueron explicados por una interacción diferencial entre cada NPO con el péptido A β 42 determinado mediante espectroscopía Raman^{88, 89}, en el cual los NPrO expusieron hacia el solvente aminoácidos hidrofóbicos de A β 42 que participan en el proceso de agregación, mientras que las NeO escondieron estos mismos aminoácidos lo que conlleva a una interrupción en el correcto proceso de agregación. De esta forma, se demostró cómo la curvatura de las NPO modifica el mecanismo molecular del proceso de agregación de A β 42. Es así, como la información obtenida en la presente tesis se convierte de gran relevancia no tan solo por su potencial uso en futuras aplicaciones biomédicas y de diseño racional de nanomateriales, sino también en la comprensión de las implicancias de la presencia de NPO en procesos biológicos como es la agregación de péptidos amiloides.

HIPÓTESIS

La curvatura de nanopartículas de oro modifica la exposición de residuos hidrofóbicos del péptido A β alterando el mecanismo molecular del proceso de agregación.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar el mecanismo mediante el cual diferentes nanoestructuras de oro con distinta curvatura y funcionalizadas con polietilenglicol modifican el proceso de agregación del péptido A β .

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Diseñar y obtener nanopartículas de oro funcionalizadas con polietilenglicol que posean una distinta curvatura y propiedades fisicoquímicas comparables tales como potencial zeta y área superficial.
2. Determinar el efecto de nanopartículas de oro esféricas y planas sobre el mecanismo de formación fibras del péptido A β .
3. Determinar el modo de interacción del péptido A β sobre la superficie de nanopartículas de oro esféricas y planas.

Capítulo 2: Materiales y Métodos

2.1 Nanoprismas de Oro (NPrO)

2.1.1 Síntesis de Nanoprismas de Oro

La síntesis de NPrO fue realizada mediante una modificación del protocolo de Pelaz y cols⁹⁰. A una solución 2mM de HAuCl_4 se le adicionó una solución 0.625 mM de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Se dejó reaccionar esta mezcla durante 9 minutos y finalmente se adicionó un nuevo volumen de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. La solución resultante se dejó reposar al menos durante 30 minutos antes de su caracterización.

2.1.2 Evaluación de la influencia de la temperatura en la síntesis de NPrO

El protocolo constó en que a una solución de oro 2 mM se le adicionó una solución 0.625 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ y se dejó reaccionando durante nueve minutos. Una vez cumplido este tiempo se adicionó nuevamente un volumen de tiosulfato de sodio 0.625 mM y la mezcla se dejó reposar hasta completar 120 minutos antes de caracterizar la solución mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (por sus siglas en inglés TEM). La reacción se monitoreó mediante espectrofotometría visible-IR midiendo cada 15 segundos durante toda la síntesis (120 minutos). Estos ensayos se realizaron a diferentes temperaturas: 15°, 20°, 27° y 50°C.

2.1.3 Funcionalización de NPrO con HS-PEG-COOH

Se procedió a funcionalizar los NPrO con polietilenglicol-COOH (HS-PEG-COOH) debido a que los NPrO son inestables y agregan cuando se les cambia de

solución o cuando son centrifugados. De esta forma, a 5 mL de NPrO con una unidad de absorbancia se les ajustó el pH a 12. Luego, se masaron 0.2 mg de PEG-COOH el cual se resuspendió en 15 µL de agua a pH 10. Esta solución de PEG se adicionó a los 5 mL de NPrO y se dejó agitando durante 3 horas a temperatura ambiente.

2.1.4 Purificación de NPrO-PEG COOH mediante centrifugación diferencial

Una vez obtenidos los NPrO funcionalizados con PEG, el volumen total de muestra se alicuotó en 5 tubos de microcentrífuga con 1 mL de solución cada uno. Los 5 tubos con 1 mL con solución fueron centrifugados durante 20 minutos a 5900 g a temperatura ambiente. La pella formada se resuspendió en un 1 mL de agua a pH 7, se sonicó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se procedió a centrifugar la muestra resuspendida de NPrO a 3300 g por 20 minutos a temperatura ambiente y una vez terminada esta etapa se sonicó durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 1 mL de agua a pH 7 la pella. A continuación, esta muestra de NPrO se centrifugó a 1500 g durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el sobrenadante y la pella se resuspendió en 1 mL de agua a pH 7 y se sonicó durante 5 minutos. Finalmente, los NPrO se centrifugaron a 400 g por 20 minutos a temperatura ambiente. Luego se sonicó durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió la pella en 1 mL de agua a pH 7⁹¹. Finalmente, la muestra fue centrifugada dos veces más a 3300 g, completando así seis etapas de centrifugación.

2.1.5 Segunda funcionalización de NPrO con HS-PEG-COOH (NprO-PEGx2)

A 5 mL de una solución de NPrO-PEG COOH con una absorbancia de valor 1 se ajustó el pH a 10 y se le adicionó 0.2 mg de HS-PEG-COOH. Esta solución se agitó suavemente durante 17 horas a temperatura ambiente. A continuación, la solución fue centrifugada a 3300 g por 20 min a temperatura ambiente. Las pellas se juntaron y se llevaron a un volumen final de 500 μ L con agua Milli-Q.

2.1.6 Cuantificación de NPrO mediante NanoSight

Con el fin de determinar el número de nanopartículas por mililitro, se realizó un análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) con el equipo NanoSight NS3000 (Malver Instruments, UK), y la acumulación de datos y posterior análisis fue hecho con el software NanoSight, versión NTA 3.2. El NTA es una aproximación rápida que puede ser usada para mediciones cuantitativas. Se estableció una relación lineal entre la concentración de las nanopartículas y el valor de absorbancia de la banda plasmónica. Cinco muestras de NPrO-PEG o NEO-PEG con diferentes valores de absorbancia, entre 0.1 y 1, fueron diluidas y medidas. Los datos fueron obtenidos usando un nivel de cámara de 15, videoclips de 50 segundos, y un límite de detección de 3. En el caso de los NPrO-PEG, las mediciones fueron realizadas con 3 láseres de distinta longitud de onda (405, 488, y 642 nm) para corroborar de que no existiera influencia del tipo de láser usado y el resultado obtenido. El láser de 642 nm, fue usado para las mediciones de NEO-

PEG. Todas las mediciones se llevaron a cabo a una temperatura de 25°C y con agua Milli-Q como solvente.

2.2. Nanoesferas de oro (NeO)

2.2.1 Síntesis de nanoesferas de oro de 40nm

A 50 mL de agua milli Q se le adicionaron 500 µL de una solución 29.4 mM HAuCl₄ y se llevó a reflujo a 194°C durante 10 min. Luego se adicionó 500 µL 1% P/V de citrato de sodio y se mantuvo durante 20 minutos reaccionando esta solución a reflujo (baño externo 194°C). Luego se dejó enfriar y se ajustó el pH a 8, se filtró y se caracterizó.

2.2.2 Funcionalización de NeO con HS-PEG-COOH

A 50 mL de solución de NeO se adicionaron 7.5 mg de HS-PEG-COOH y se dejaron con agitación suave durante toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, se centrifugaron a 3300 g por 20 minutos y este paso se repitió 3 veces para eliminar el exceso de PEG. Finalmente, la pella se resuspendió en 500 µL.

2.3 Espectrofotometría de Absorción Molecular (visible-NIR)

Los NPrO fueron caracterizados mediante espectrofotometría de absorción molecular a temperatura ambiente utilizando un espectrofotómetro Perkin Elmer

Lambda 25 para realizar un espectro, con la finalidad de observar las dos bandas de absorción de los plasmones característicos de las NvO, el transversal aproximadamente en 520 nm y el longitudinal centrado en los 800 nm.

2.4 Dispersión Dinámica de la Luz (DLS)

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

2.5 Potencial ζ

La medición del potencial ζ (Zeta sizer 3000, Malvern Instruments, UK) de NP consiste en 5 repeticiones de cada solución de NPrO. Dado que las mediciones del potencial zeta es realizada en agua, la aproximación de Smolochowski (Doane, Chuang et al. 2012) ha sido usada para calcular el potencial zeta a partir de la movilidad electroforética de la NP en solución. Las determinaciones electroforéticas de potencial zeta fueron comúnmente realizadas en medio acuoso y a 25°C y se usa un índice de refracción de 1,332. Se empleó una celda capilar plegada desechable (DTS1070).

2.6 Microscopía electrónica de transmisión de barrido (STEM)

Los NPrO fueron observados por microscopía electrónica usando un microscopio electrónico de barrido con módulo de transmisión electrónica (STEM) FEI Inspect F50. Las muestras fueron preparadas depositando una gota de una suspensión de NPrO sobre grillas de cobre tratadas con Formvar carbón y dejándose secar al aire.

2.7 Microscopía electrónica de Transmisión (TEM)

Tanto NPrO o NeO fueron observados por microscopía electrónica usando un microscopio electrónico de transmisión Philips CM120 con un voltaje de aceleración de 120 kV. Las muestras fueron preparadas depositando una gota de una suspensión de la muestra sobre grillas de cobre tratadas con Formvar carbón y dejándose secar al aire durante toda una noche. Las muestras de A β 42 coincubadas con las NPO fueron registradas a tiempo final de las cinéticas de reacción. Para esto, 20 μ L de cada muestra se colocaron en una grilla 300 mesh Formvar/Carbon-Coated Copper durante 2 minutos. Luego la grilla fue lavada con agua Milli-Q por un minuto, secada con papel absorbente Whatman y teñida con 1% de ácido fosfotungstico durante dos minutos. Las grillas fueron visualizadas en un equipo TEM Hitachi HT7700 con un voltaje de aceleración de 120 kV.

2.8 Preparación de las muestras de A β 42 para los estudios de agregación

Para llevar a cabo este objetivo se procedió a utilizar el péptido A β 42 humano (rPeptide, Bogart, GA, USA). 1 mg de este péptido se disolvió en 200 μ L de HFIP (Hexafluoroisopropanol) agregándole posteriormente 800 μ L de agua. Esta solución se dividió en 20 alícuotas que contenían 0.05 μ g por tubo de microcentrífuga de 0,6 mL. Luego se liofilizaron durante toda la noche. Al día siguiente, se procedió a resuspender un tubo con A β 42 en 300 μ L de HFIP y se liofilizó durante toda la noche. Para obtener el péptido en su estado monomérico, y al otro día, el liofilizado se procedió a resuspender en 550 μ L de cloruro de guanidinio y se inyectó la muestra en un sistema HPLC acoplado a una columna de exclusión molecular sephadex 75. La muestra se trató en una fase móvil de solución 20mM de fosfato (pH 7.8) y 5mM EDTA a una velocidad de 0.8 mL/min. Los cromatogramas se realizaron siguiendo las señales tanto a 210 nm como 280 nm.

2.9 Ensayo de cinética de agregación péptido A β 42

El péptido se recolectó en frío en un tubo Eppendorf (Eppendorf® LoBind microcentrifuge tubes, Sigma) y se procedió a diluirlo para lograr tener las diferentes concentraciones a analizar en tubos Eppendorf *low binding*. Toda la manipulación del péptido se realizó en frío, ya que se trata de un péptido de muy fácil agregación. Por lo cual tanto los tubos, soluciones y la placa de 96 pocillos se mantuvieron por al menos 1 hora a 4°C antes de empezar a trabajar. Las

diferentes concentraciones de péptido A β 42 se diluyeron en la solución de corrida del HPLC y se suplementó cada concentración de péptido con Tioflavina T (ThT) 20 μ M. A continuación, se procedió a agregar 100 μ L de la mezcla a cada pocillo en una placa de 96 pocillos que posee baja adherencia por proteínas (*Corning 96 Well Half Area Black with Clear Flat Bottom Polystyrene NBS*). Las placas fueron selladas mediante una lámina transparente (*Axygen Microplate Sealing Film, UC500*). El ensayo de agregación del péptido A β 42 se realizó mediante la medición de la fluorescencia emitida por la ThT cuando se une a estructuras con una conformación beta. La medición de la fluorescencia se realizó en un lector de placas Synergy MX Biotek con una excitación a 440 nm y una emisión a 480 nm (ambos monocromadores se usaron con un ancho de banda de 9 nm). Las mediciones se realizaron cada 6 minutos a 37°C sin agitar durante diversos tiempos (entre 15 a 72 hrs).

2.10 Ajustes globales de las cinéticas de agregación del péptido A β 42

Una vez obtenidas estas curvas, se realizó un ajuste matemático global mediante el programa AmyloFit (G Meisl, J Kirkegaard and T Knowles) el cual es de acceso gratuito (<https://www.amylofit.ch.cam.ac.uk/fit>).

2.11 Ensayo de cinética de agregación péptido A β 42 en presencia de NPO

A continuación, se analizó el efecto de diversas formas de NPO, NPrO o NeO, sobre la cinética de agregación del péptido A β 42. La concentración de

muestra de NPrO-PEG-D1 analizada fue de 0,2 nM por pocillo, la cual se incubó desde un inicio con el péptido A β 42 para observar el posible efecto inhibitorio de la agregación. Las concentraciones de péptido A β 42 sintético analizadas con ambas NPO fueron de 2; 2,5; 3; 4; 6,5 y 8 μ M. El ensayo se realizó de forma idéntica a lo descrito en el ensayo de cinética de agregación del péptido A β 42 sin NPO.

2.12 Espectroscopia de dicroísmo circular (DC)

El contenido de estructura secundaria de tanto el péptido A β 42 monomérico y las fibras de A β 42 en ausencia o presencia de NPO fue determinado mediante espectroscopía DC. 1mL de cada muestra obtenida al final de los ensayos de agregación fue colocado en una cubeta de cuarzo con un paso óptico de 5 mm. Los espectros fueron registrados desde 190 a 250 nm usando el equipo modelo No. J-1500 instrument (JASCO corporation Japan). Además, el porcentaje de estructura secundaria de cada una de las muestras fue determinado por la deconvolución de los espectros mediante el software libre BeStSel.

2.13 Espectroscopia Raman

Todas las mediciones Raman fueron realizadas usando el espectrómetro Renishaw micro-Raman RM 1000 acoplado a un microscopio Leica DMLM y equipado con un láser de 785 nm y una cámara CCD enfriada eléctricamente. El equipo fue automáticamente calibrado siguiendo la línea a 520 nm^{-1} de silicona del espectro Raman. Las muestras fueron depositadas sobre una delgada lámina de

oro para disminuir la fluorescencia intrínseca de la muestra. La intensidad del láser sobre la muestra fue cuidadosamente considerada (0,2 mW) lo cual es menos del 1% del poder total del láser. La adquisición de los datos se realizó cada 10 segundos para cada espectro con una resolución de 4 cm^{-1} . Los espectros fueron registrados entre 100 y 1800 cm^{-1} después de evaporar el solvente sin exposición a la luz.

Capítulo 3: Síntesis, funcionalización y caracterización de NPO

3.1 Determinación y caracterización de los parámetros relevantes para la síntesis de Nanoprismas de Oro (NPrO)

La síntesis de NPrO se realizó mediante el protocolo descrito por Pelaz y cols⁹¹, en el cual una solución acuosa de HAuCl_4 se mezcla con el agente reductor tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), bajo agitación suave durante 9 minutos, y a continuación se agrega un nuevamente $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. La primera adición de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ permite la formación de “semillas” sobre las cuales se bloquearán las caras (1,1,1) y permitirá la generación de la forma de prisma en la nanopartícula⁹². Debido a que la síntesis de nanopartículas anisotrópicas exhibe diversas variables que afectan el producto final y a que en la presente tesis se necesitan NPrO de un tamaño determinado, es que se procedió en primera instancia a la caracterización de la síntesis para determinar los parámetros más adecuados de esta: concentración de oro, concentración de primer volumen de tiosulfato, tiempo de reacción, volumen segunda adición de tiosulfato y temperatura de reacción. De esta forma, el determinar estos parámetros permite tener las condiciones óptimas de reacción de formación de prismas para aumentar el rendimiento de la reacción.

3.1.1 Concentración de solución áurica

El primer parámetro analizado fue la concentración inicial de la solución de oro manteniendo constante la concentración de 0.5 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Para llevar a cabo este objetivo, se evaluaron dos concentraciones de oro, 2 y 2,5 mM, mediante el seguimiento de la aparición y desplazamiento del plasmón en el tiempo. Cabe destacar, que los NPrO exhiben dos plasmones: el primero a 530

nm el cual corresponde a la banda transversal del prisma y a contaminación por la presencia de esferas que es un producto secundario de la síntesis, y a un segundo plasmón en el infrarrojo cercano (NIR) cuya longitud de onda es directamente proporcional al tamaño del prisma y que por lo tanto es sensible a las variaciones en la síntesis. El seguimiento de ambas muestras se realizó mediante espectrofotometría Vis-NIR y la aparición del plasmón en el NIR da cuenta de la presencia de semillas que darán origen posterior a la forma del prisma. De esta manera, mientras más alejado en el NIR se encuentre este plasmón más grandes son las semillas. Como se observa en la figura 3.1, ambas muestras exhiben un patrón bastante similar en la aparición de ambos plasmones. Sin embargo, la intensidad del plasmón en el infrarrojo para la muestra a 2mM H_{AuCl}₄ es levemente mayor y presenta un desplazamiento hacia el azul (Fig. 3.1a) al mismo tiempo comparado a 2,5 mM H_{AuCl}₄ (Fig. 3.1b), lo cual se correlaciona con la presencia de semillas de menor tamaño.

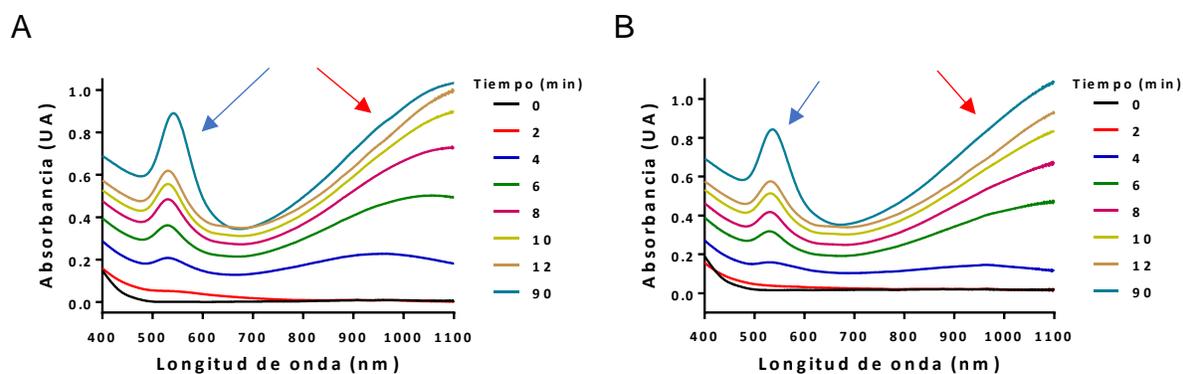


Figura 3.1 Espectro de absorbancia Vis-NIR utilizando A) 2, y B) 2,5 mM de H_{AuCl}₄ reducido con 0,5 mM de tiosulfato. El crecimiento de las semillas fue evaluado en el tiempo (0-90 min) a 20°C. Las flechas en azul muestra el crecimiento del plasmón correspondiente a la banda transversal del prisma y a la contaminación por esferas, mientras que las flechas en rojo muestran el crecimiento del plasmón correspondiente al prisma.

De acuerdo con los resultados obtenidos por Pelaz et al. (2012), los NPrO que presentan un plasmón superior a los 1100 nm, poseen un tamaño de la arista de 165 nm en promedio, y ya que en esta tesis se busca obtener NPrO de un tamaño menor a los 100 nm, es que se continuó trabajando con la concentración de oro de 2 mM.

3.1.2 Concentración del primer volumen de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

La segunda variable que se evaluó fue usar diferentes concentraciones de la primera adición del agente reductor $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, manteniendo constante la concentración inicial de oro de 2 mM. Las diferentes concentraciones de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ fueron: 0,25; 0,5; 0,625; y 1 mM. En la figura 2 se puede observar que a medida que se aumenta la concentración de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ el plasmón en el NIR aparece más rápido y además el plasmón final se estabiliza en longitudes de onda más desplazadas hacia el azul o hipsocrómico. Esto quiere decir que a mayor concentración de tiosulfato de sodio el tamaño final de las semillas es menor. Ya que tanto la muestra a 0,25 mM (Fig. 3.2a) y 0,5 mM (Fig. 3.2b) poseen el plasmón muy desplazado hacia NIR implica que las semillas formadas son de un gran tamaño y se descarta trabajar con ellas. En contraste, la muestra a 1 mM (Fig. 3.2d) posee un plasmón menor a las 800 nm lo que implica semillas de menor tamaño que originarán prismas muy pequeños y que dificulta su posterior purificación. Esto junto con que la absorbancia del plasmón a 530 nm es levemente mayor al plasmón en el NIR, lo cual sugiere que la concentración de esferas es mayor a la de semillas para prismas, fue utilizado como parámetros

para descartar esta muestra. Ya que la muestra a 0,625 mM de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ posee un plasmón con una adecuada longitud de onda y que además su absorbancia es mayor que la presentada por el plasmón a 530 nm es que se seleccionó esta concentración para los análisis posteriores (Fig. 3.2d).

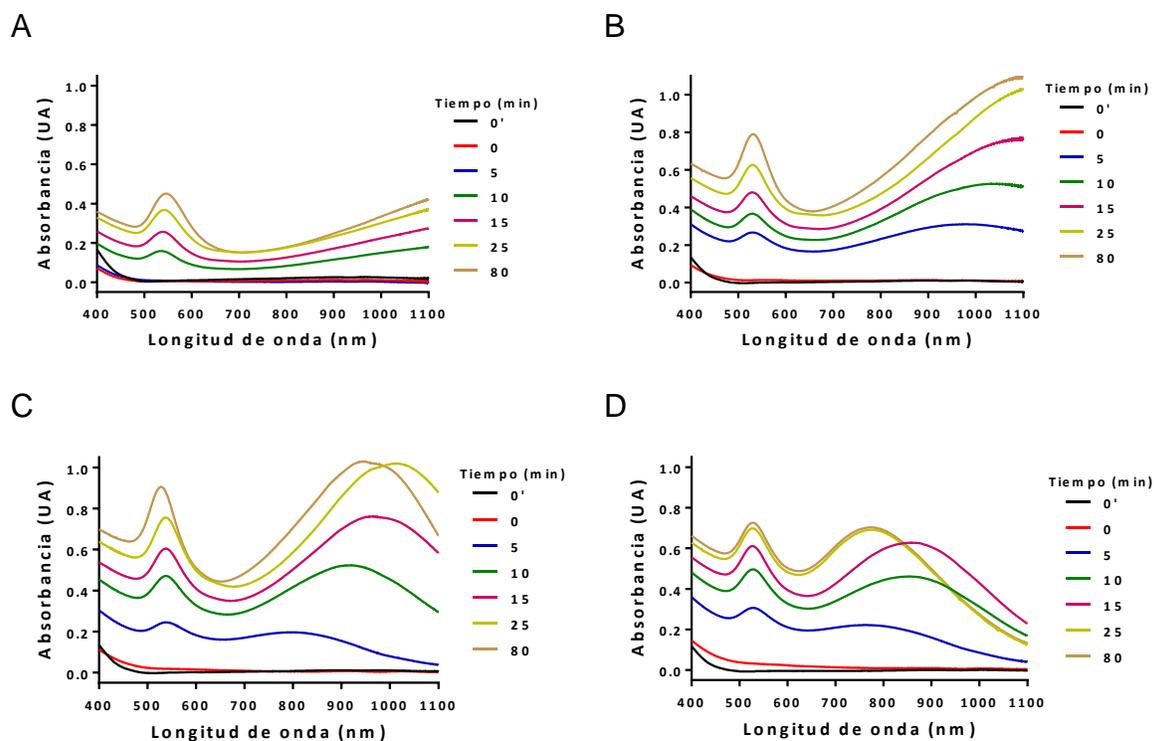


Figura 3.2 Espectro de absorbancia Vis-NIR de HAuCl_4 (2 mM) reducido con A) 0,25; B) 0,5; C) 0,625 y D) 1 mM de tiosulfato. El crecimiento de las semillas fue evaluado en el tiempo (0-80 min) a 20°C. Pevio a la adición de tiosulfato, la solución de oro fue medida (0' min).

3.1.3 Segunda adición de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ y formación de NPrO

De acuerdo con los experimentos anteriormente analizados, el tiempo es un factor determinante en donde se localizará el plasmón a tiempo final. Además, ya que la segunda adición de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ permite dar la forma del prisma a las semillas y terminar la reacción es que se procedió a evaluar el tiempo al cual se adiciona el segundo volumen de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Como se observa en la figura 3.3, las muestras a

los tiempos de 8 min (Fig. 3.3a), 9 min (Fig. 3.3b) y 10 min (Fig. 3.3c) de adición de tiosulfato presentan un plasmón final a una longitud de onda en el infrarrojo bastante similar. La muestra a la cual se adicionó el segundo volumen de tiosulfato a los 15 min presenta un plasmón sobre los 1000 nm, lo cual según la literatura son prismas que poseen un largo de arista mayor a los 100 nm lo que podría dificultar su utilización en aplicaciones en biomedicina.

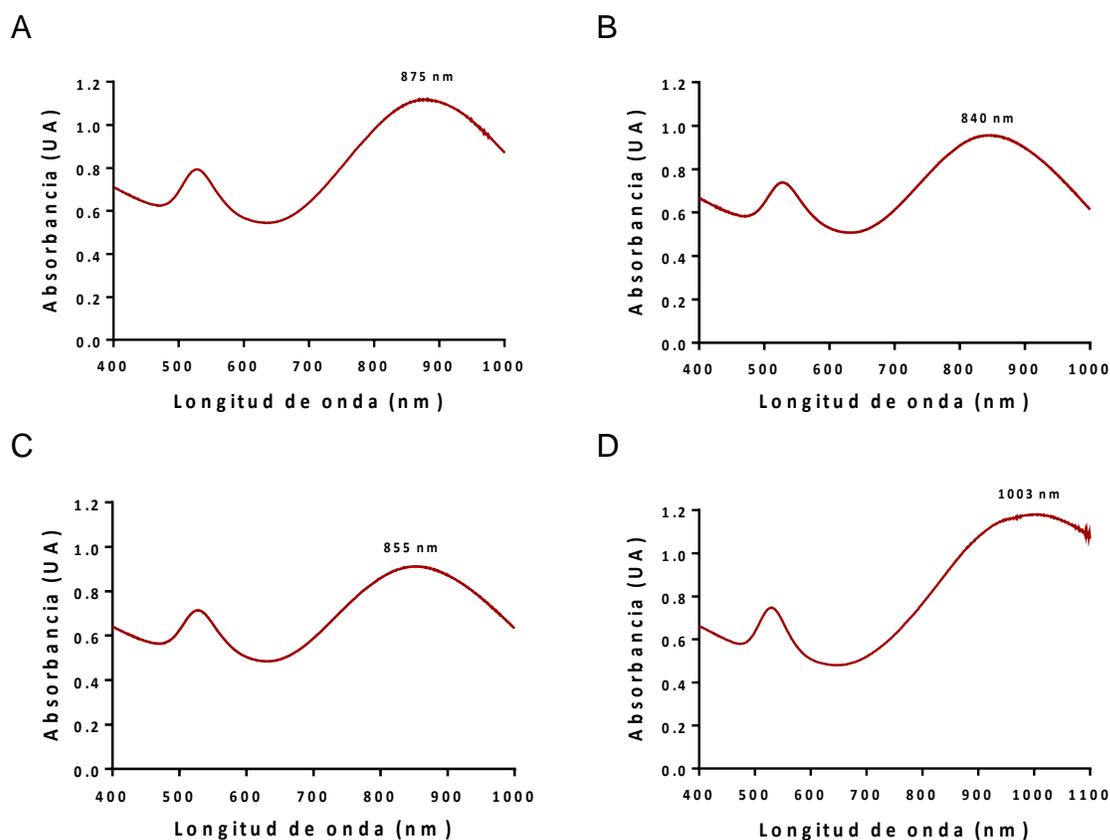
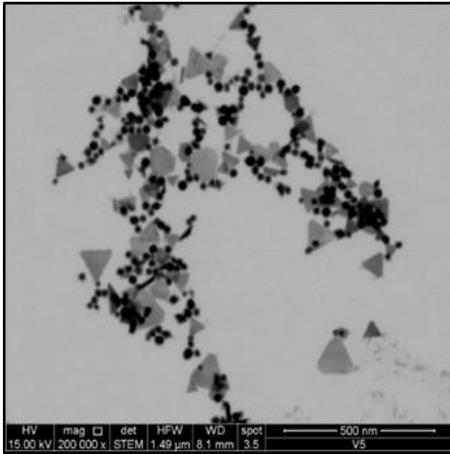


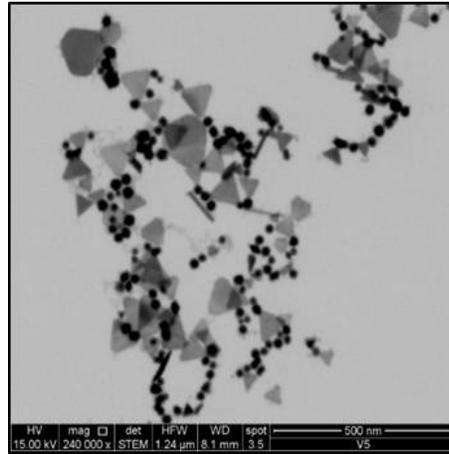
Figura 3.3 Espectro de absorbancia Vis-NIR de HAuCl_4 2 mM reducido con tiosulfato de sodio 0,625 mM (x2). La segunda adición se realizó a los 8 (A), 9 (B), 10 (C), y 15 (D) minutos luego de la primera adición.

Además, estas tres muestras (8, 9 y 10 min) fueron evaluadas mediante TEM para determinar el tamaño de los NPRo y la presencia de nanoesferas de oro (NeO) (Fig. 3.4).

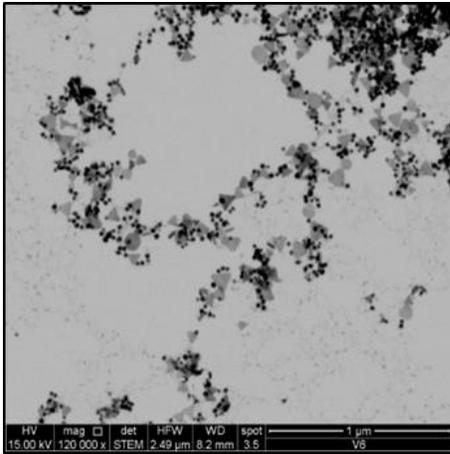
A



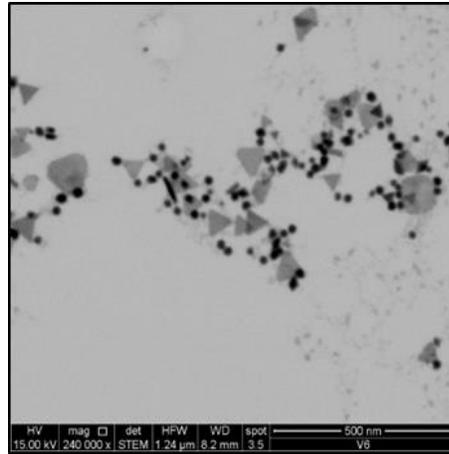
B



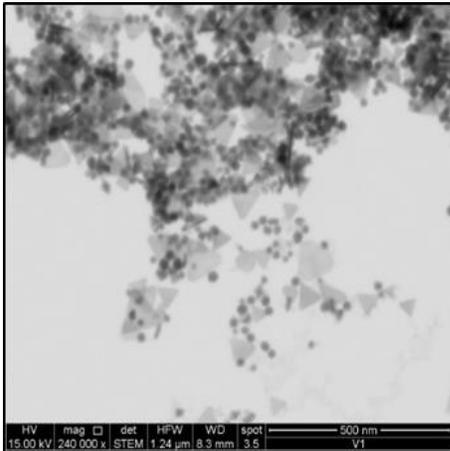
C



D



E



F

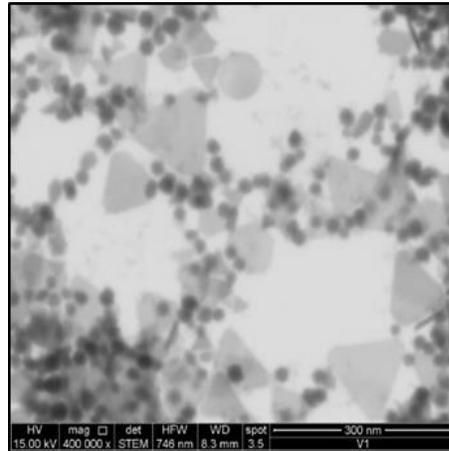


Figura 3.4 Imágenes TEM representativas de nanoprismas de oro sintetizados a distintos tiempos: 8 (A y B), 9 (C y D), y 10 (E y F) minutos.

Aun cuando las tres muestras presentan plasmones medianamente cercanos en valor, las muestras obtenidas a los 8 y 10 min exhiben una población de prismas de gran tamaño donde incluso se pueden encontrar algunos tan grandes como de 150 nm de largo de arista. Por otro lado, la muestra a los 9 minutos posee un tamaño de población entre los 50 a 80 nm, lo cual se correlaciona con un plasmón de longitud de onda más bajo que el resto de las muestras. De esta forma, considerando la relación entre el plasmón y el tamaño de los nanoprismas obtenido por TEM es que se seleccionó el tiempo de 9 minutos como el apropiado para la síntesis de los NPrO.

3.1.4 Volumen de la segunda adición

Una vez determinados los parámetros necesarios para la síntesis de NPrO en las secciones anteriores, se procedió a determinar si la variación en el volumen de la segunda adición de tiosulfato posee alguna influencia sobre la síntesis de NPrO. En la sección anterior, se utilizó una razón en volumen de 1:1.2:0.2 para $\text{HAuCl}_4:\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3(\text{x}1):\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3(\text{x}2)$, por lo cual se evaluó el doble (1:1.2:0.4) y la mitad (1:1.2:0.1) de volumen en la segunda adición. La figura 3.5 muestra los espectros obtenidos para ambas muestras, en el cual al aumentar al doble el volumen de la segunda adición de tiosulfato se producen NPrO con un plasmón de menor longitud de onda (Fig. 3.5a) comparado a la situación control observada en la figura 3.3b. Al contrario, al disminuir el volumen a la mitad (Fig. 3.5b) se producen NPrO con un plasmón mayor al control. Este resultado demuestra que el

plasmón y por ende el tamaño de los NPrO es sensible a los volúmenes de tiosulfato usados.

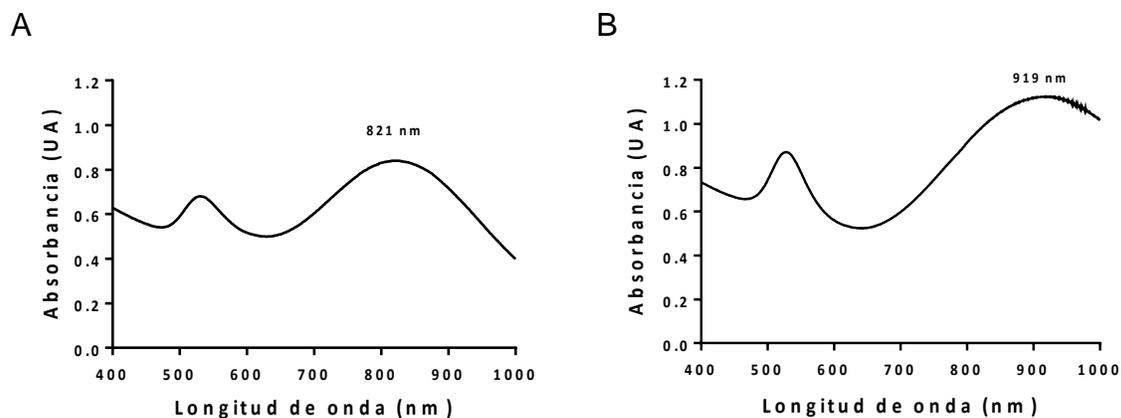


Figura 3.5 Espectros Vis-NIR de nanoprismas de oro sintetizados con diferentes volúmenes de tiosulfato en la segunda adición. A) Razón de volumen 1:1.2:0.4, y B) razón de volumen 1:1.2:0.1.

De esta forma, considerando todos los resultados obtenidos se fijaron los siguientes parámetros para la síntesis de NPrO de ~60 nm de largo de arista y 840 nm de plasmón:

- Solución HAuCl_4 2 mM y $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.625 mM
- Relación de volúmenes de 1,0:1,2:0,2
- Tiempo de 9 minutos entre primera y segunda adición

3.1.5 Cinéticas de formación de NPrO a distintas temperaturas

La síntesis de NPrO posee como desventaja la contaminación con un producto secundario en la formación de los NPrO, que son las NeO. Debido a la forma que estas últimas poseen, es más sencilla su generación ya que sólo implica la generación de núcleos de oro los cuales se van agregando o van

creciendo por la reducción de oro, mientras que en el caso de los prismas se requiere del bloqueo de ciertas caras (1,1,1) lo cual permite la generación de la forma de prisma^{92, 93}. Debido a esto, es que en literatura se ha descrito que en la síntesis de NPrO se puede disminuir el grado de contaminación con NeO mediante la modificación de la temperatura de reacción⁹⁴. De esta forma, se evaluó la síntesis de NPrO a cuatro temperaturas distintas mediante espectrofotometría visible-IR durante dos horas. Este experimento se realizó a 15°C (Fig. 3.6a), 20°C (Fig. 3.6b), 27°C (Fig. 3.6c) y a 50°C (Fig. 3.6d) en el cual se observaron varios fenómenos con respecto a la formación de los NPrO. Conforme se aumenta la temperatura, la reacción de síntesis es mucho más rápida la cual se observa por la aparición de ambos plasmones a menores tiempos lográndose también una estabilización de estos. Además, la longitud de onda del plasmón final está más desplazado hacia el rojo (900 nm a 15°C) y conforme se aumenta la temperatura de reacción se observa un desplazamiento hacia el azul, siendo las muestra a 27°C y 50°C las que poseen el menor plasmón (764 y 767 nm, respectivamente). Otro fenómeno que se observa es que al aumentar la temperatura, el plasmón correspondiente a los NPrO empieza a disminuir en intensidad y, por el contrario, el plasmón de las NeO empieza a aumentar. Esto se observa de forma más clara al obtener la razón de intensidad de ambos plasmones, siendo de 1,48 a 15°C y 0,65 a 50°C, lo cual daría cuenta que el aumento de la temperatura promueve la formación de más NeO por sobre NPrO.

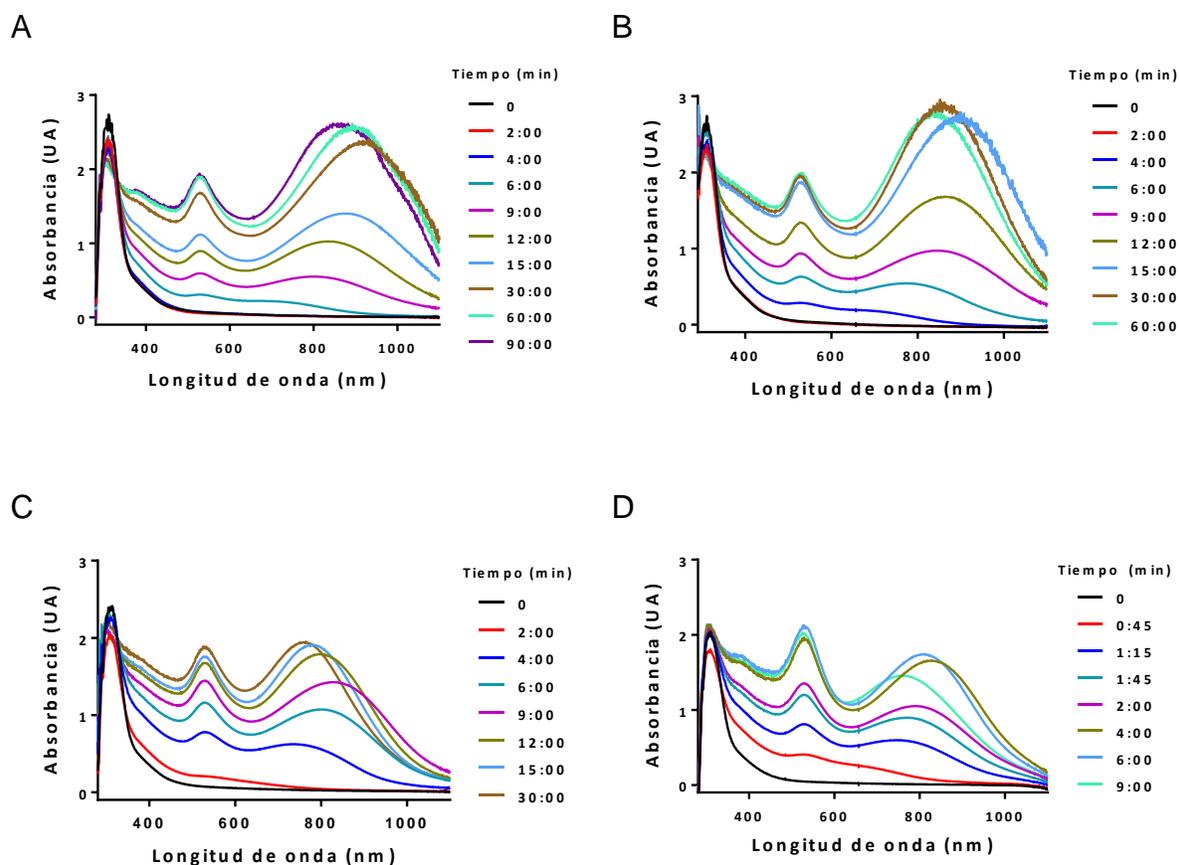
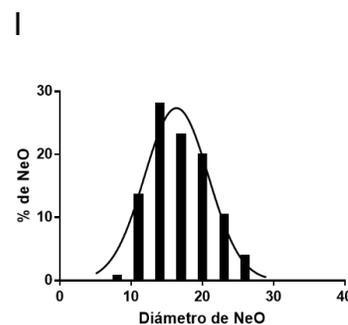
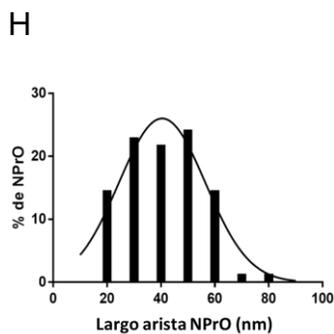
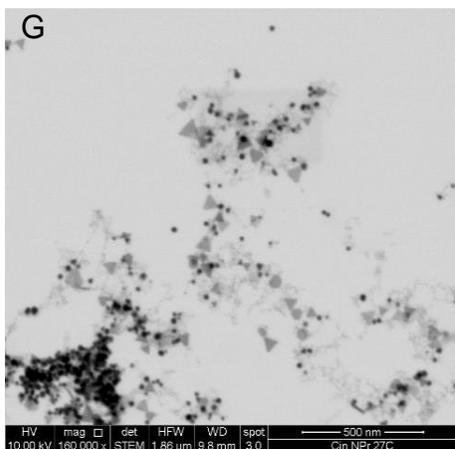
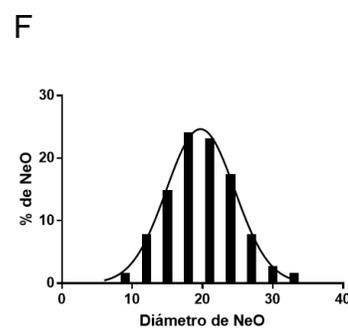
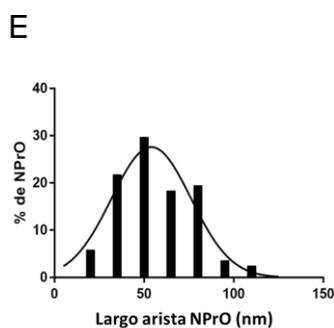
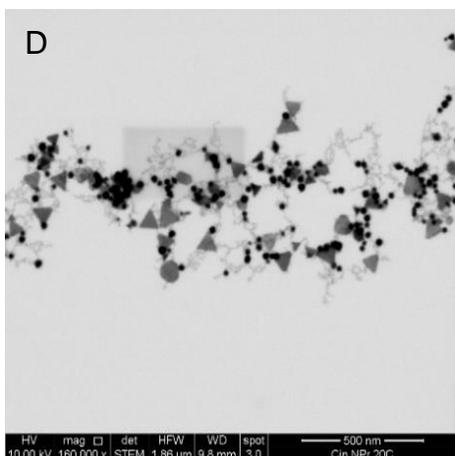
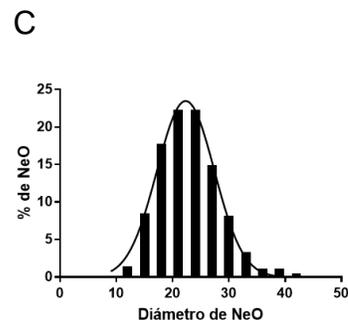
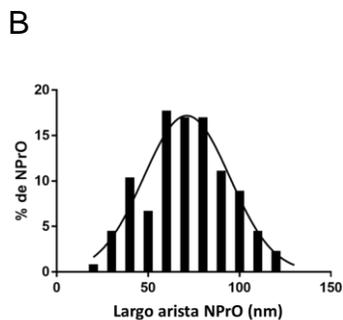
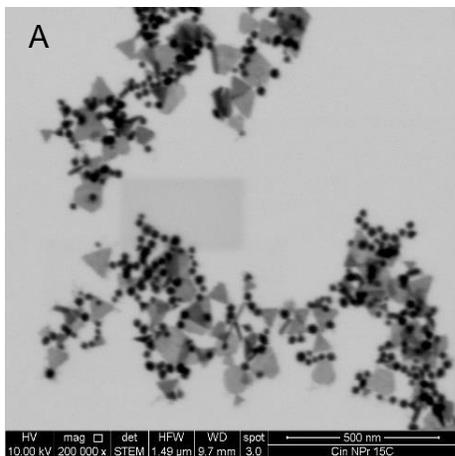


Figura 3.6 Ensayo cinético de formación NPRo a distintas temperaturas. El seguimiento se realizó mediante espectrofotometría Visible-IR y las mediciones se realizaron cada 15 segundos (se muestran los tiempos más representativos). El plasmón que se desplaza en el IR corresponde a los NPRo mientras que el que está a 530 nm corresponde a las NeO. A, 15°C. B, 20°C. C, 27°C. D, 50°C.

Además, cada muestra a tiempo final se evaluó mediante STEM para determinar el tamaño de los NPRo y de las NeO obtenidas. Como se observa en la figura 3.7, conforme se incrementa la temperatura de reacción el tamaño promedio de los NPRo disminuye, y va desde los 71 ± 22 nm (a 15°C) a los 40 ± 13 nm (a 50°C), resultado que se condice con lo observado por espectrofotometría y el valor final del plasmón, mientras que el tamaño de las NeO se mantiene constante a aproximadamente 20 nm. Además, se realizó un conteo de NPO para determinar

la población de cada especie, las que se mantuvieron constantes independiente de las temperaturas analizada: ~70% para NPrO y ~30% para NeO.



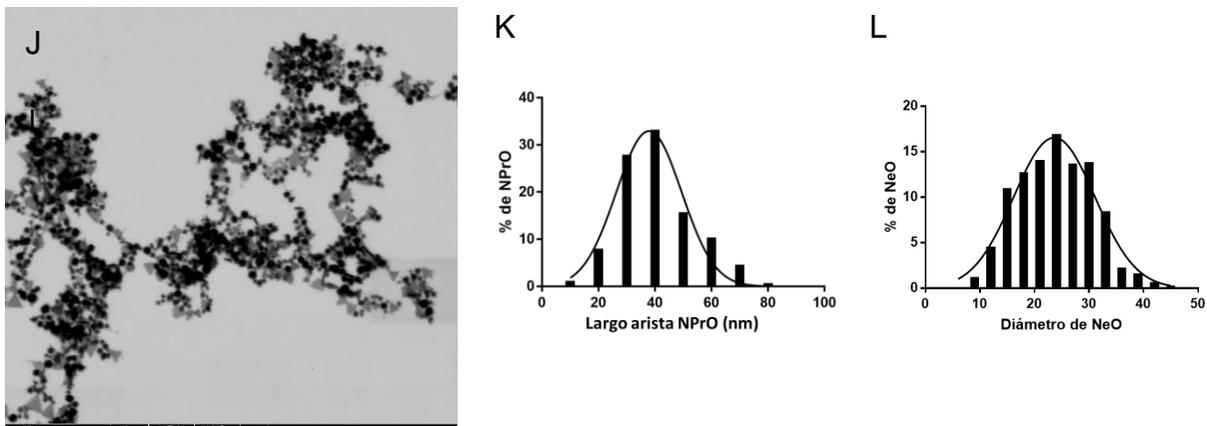


Figura 3.7 Caracterización a tiempo final de la síntesis de NPrO a distintas temperaturas mediante STEM, tamaño del largo de arista de los NPrO y diámetro de las NeO formadas a: 15°C (A, B, C), 20°C (D, E, F), 27°C (G, H, I) y 50°C (J, K, L). Las imágenes son representativas de cada síntesis y los histogramas corresponden a un análisis de 1000 NPO en total.

Luego de 24 horas, las muestras fueron nuevamente analizadas mediante espectrofotometría y no se observó modificación alguna ya sea en el plasmón o en la intensidad de estos (Fig. 3.8). Cada uno de los parámetros de la caracterización de la síntesis a las distintas temperaturas analizadas se resume en la tabla 3.1.

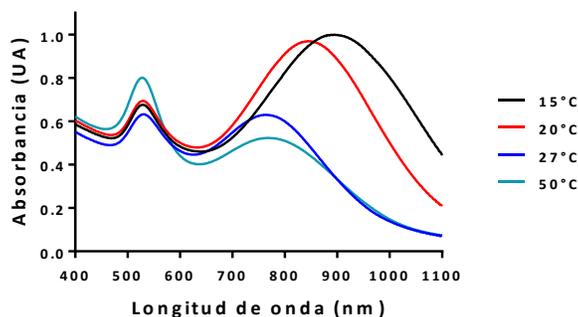


Figura 3.8 Resumen de espectro Visible-IR del producto final de cada cinética de formación de NPrO a las diferentes temperaturas analizadas luego de 24 horas.

Tabla 3.1 Resumen de caracterización de cada cinética de formación de NPrO para cada temperatura.

Síntesis a:	Plasmón (nm)	Razón IR/visible	Tamaño NPrO (nm)	Población NPrO	Tamaño NeO (nm)	Población NeO
15°C	894	1.48	71 ± 22	30%	23 ± 5	70%
20°C	845	1.2	56 ± 21	31%	20 ± 5	69%
27°C	765	0.99	41 ± 15	31%	17 ± 4	69%
50°C	767	0.65	40 ± 13	29%	24 ± 7	71%

3.1.6 Caracterización de los Nanoprismas de Oro (NPrO) obtenidos

A continuación, se evaluó la reproducibilidad de la síntesis de NPrO bajo los parámetros obtenidos en la caracterización previamente realizada (Fig. 3.9). La síntesis se realizó por triplicado y se registró el espectro de absorbancia Visible-IR donde se observan los dos plasmones característicos de una muestra de NPrO (Fig. 3.9). Las tres muestras exhiben una alta reproducibilidad en el primer plasmón a 840 nm y el segundo plasmón a 530 nm, el cual corresponde a NeO y a la banda del plasmón transversal de los NPrO. En la figura 3.9b, se observa una imagen STEM representativa para estas muestras con la presencia de NPrO y de una gran cantidad de NeO, que corresponden a un subproducto de esta síntesis.

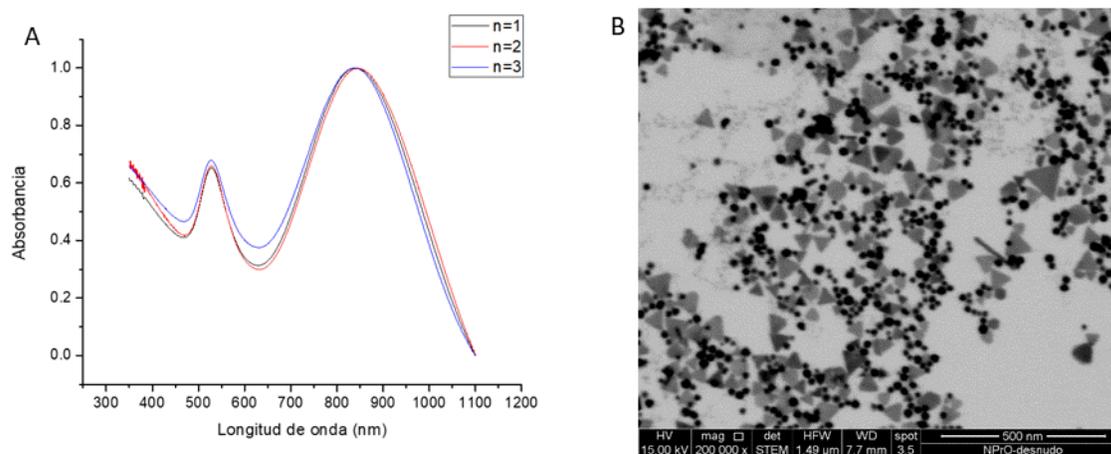


Figura 3.9 Síntesis de NPrO. A, espectro Visible-IR de tres síntesis distintas en las cuales se obtiene un plasmón a 840 nm. B, imagen TEM representativa de una de las síntesis. Se observa la presencia tanto de NPrO como de NeO.

Además, estas muestras se caracterizaron mediante el diámetro hidrodinámico (DLS por sus siglas en inglés). La distribución de tamaño se analizó utilizando el parámetro de intensidad donde se observa la presencia de dos poblaciones para estas muestras (Fig. 3.10): una de 58 ± 3 nm y otra de 4 ± 1 nm.

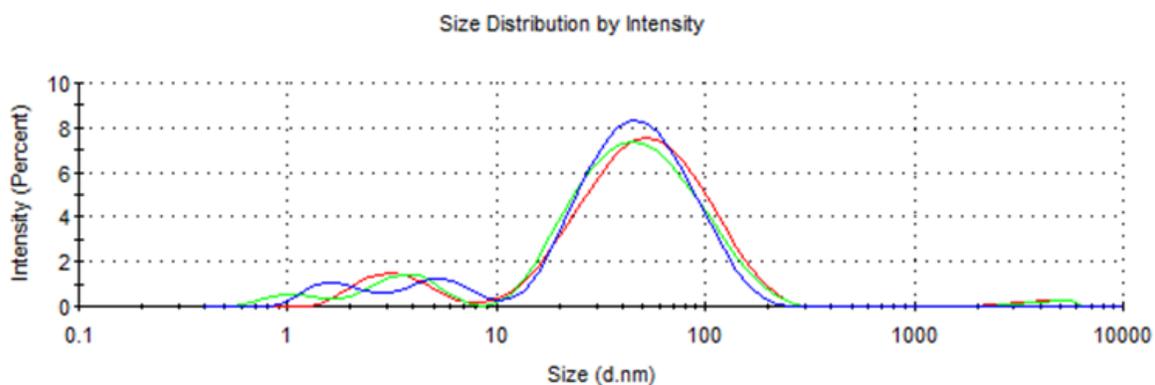


Figura 3.10 Distribución de tamaños determinado mediante DLS para NPrO obtenidos de la síntesis (n=3, muestras independientes).

Finalmente, se evaluó el potencial ζ de estas muestras, el cual es una medida indirecta de la carga superficial de las NPO, a través de la movilidad electroforética de las NPO entre los polos de la cubeta. Como se observa en a figura 3.11, las muestras presentan un potencial ζ de -40 ± 1 mV, valor que se condice con la presencia del agente reductor y estabilizante utilizado, tiosulfato de sodio, el cual presenta carga negativa.

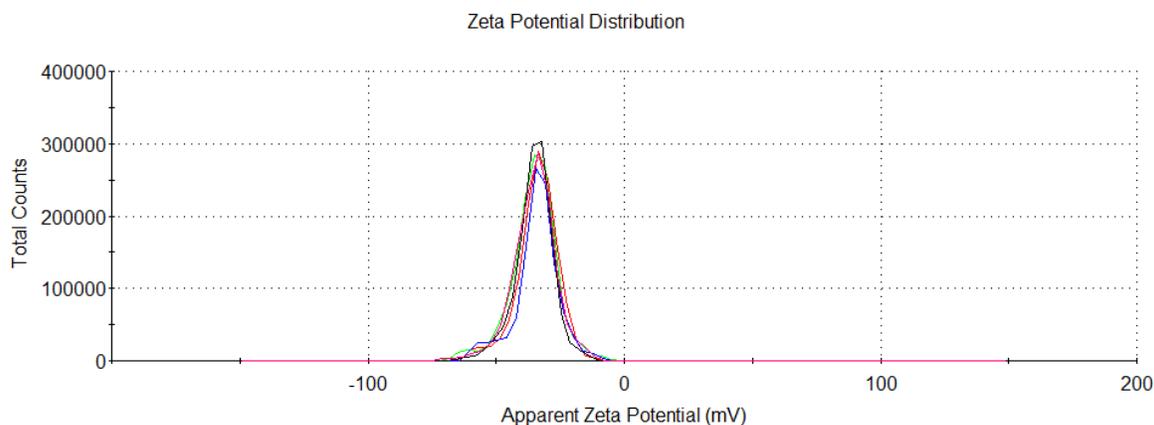


Figura 3.11 Distribución de cargas determinado mediante el potencial zeta para NPrO obtenidos de la síntesis (n=3, muestras independientes).

Tanto los valores del plasmón, DLS como de potencial ζ serán de gran ayuda en el seguimiento de las siguientes etapas de funcionalización, ya que al reemplazar el tiosulfato de sodio de la superficie del NPrO se traducirá en una variación del valor de estos parámetros y darán cuenta de la correcta funcionalización de nuestra muestra.

3.2 Obtención y caracterización de NPrO con PEG

Ya que esta síntesis genera una alta contaminación con NeO es que se procedió a enriquecer la muestra con NPrO. Para llevar a cabo esto, primeramente las muestras fueron funcionalizadas con HS-PEG-COOH (PEG) el cual cumple una doble función: por un lado, la conjugación con PEG es uno de los agentes más usados en la funcionalización de nanopartículas por su alta biocompatibilidad para futuras aplicaciones en sistemas biológicos, y por otro lado, las moléculas de PEG confieren estabilidad a los NPrO (Pelaz y cols., 2012,B) ya que estos son

sensibles a cambios en el solvente y tienden fácilmente a agregar. De esta forma, el PEG desplaza al tiosulfato de sodio rodeando a los NPO y promoviendo un efecto estérico que disminuye la interacción interpartícula que evita su posterior agregación. Junto con esto, cabe mencionar que el proceso de enriquecimiento de los NPrO está basado en un método de centrifugación diferencial, por lo cual necesitamos NPrO lo suficientemente estables para soportar las diversas centrifugaciones y el cambio de solvente, que en este caso será agua el utilizado como agente redispersante.

3.2.1 Enriquecimiento de NPrO mediante funcionalización con PEG y centrifugación diferencial

Primero, la muestra obtenida de la síntesis se funcionalizó con PEG y a continuación se centrifugó a diversas velocidades de forma decreciente: 5900 g (NPrO PEG P1), 3300 g (NPrO PEG P2), 1500 g (NPrO PEG P3), 400 g (NPrO PEG P4). Entre cada centrifugación, la pella obtenida fue resuspendida en agua Milli-Q y el sobrenadante descartado. De esta forma, después de cada centrifugación se obtuvo una pella rica en NPrO mientras que las NeO, que son más livianas, se quedan en el sobrenadante.

En la figura 3.12 se registró el espectro de absorbancia de la muestra luego de cada centrifugación. Se observa que el plasmón sufre un desplazamiento batocrómico conforme se avanza en las centrifugaciones realizadas, desde 840 nm para los NPrO desnudos a 905 nm para los NPrO PEG P4, lo cual daría cuenta de la presencia de NPrO de mayor tamaño. Además, se observa una

disminución en la intensidad del plasmón correspondiente a las NeO, lo queda más claro al calcular la razón de intensidades plasmón IR/plasmón visible que va desde 1,3 a 2,3. Esta variación implicaría que la población de NeO presentes en la muestra disminuye gracias a este procedimiento.

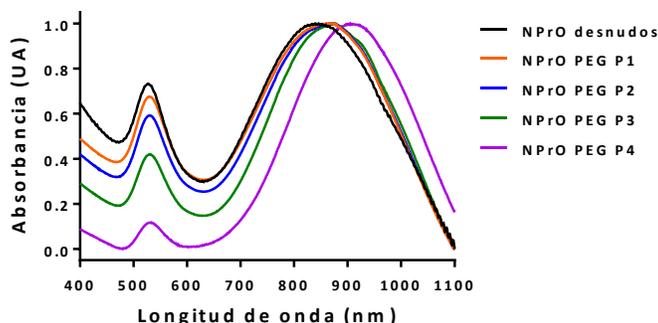
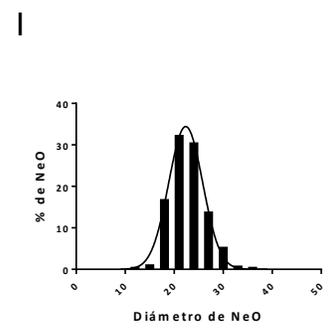
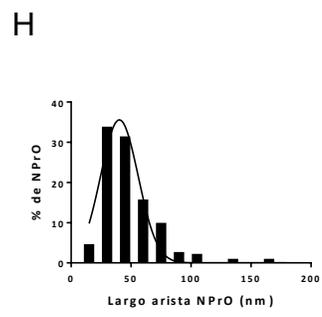
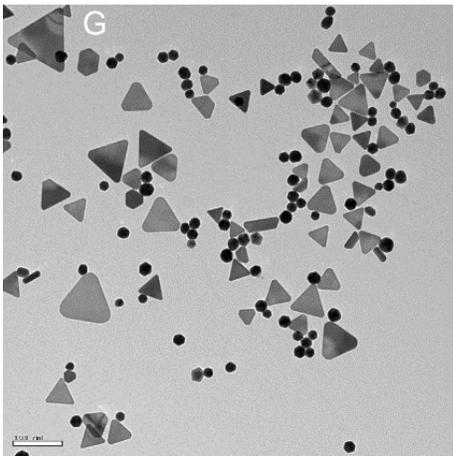
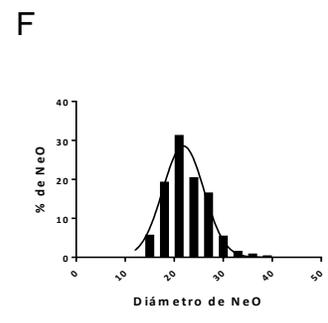
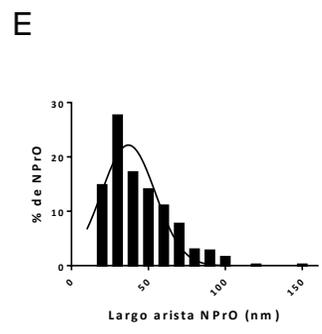
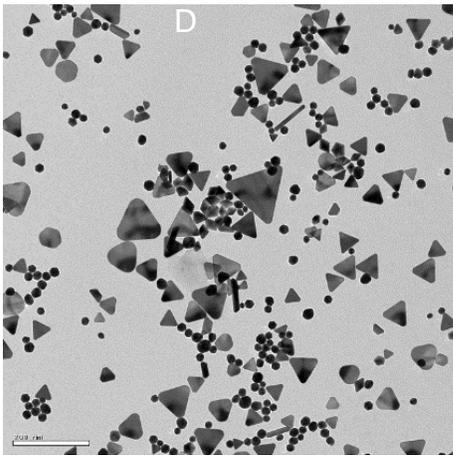
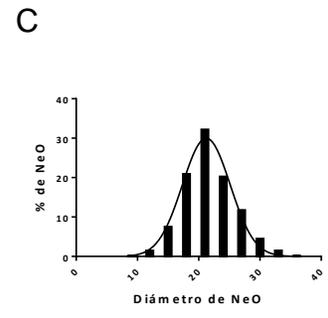
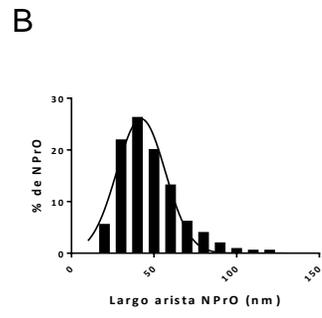
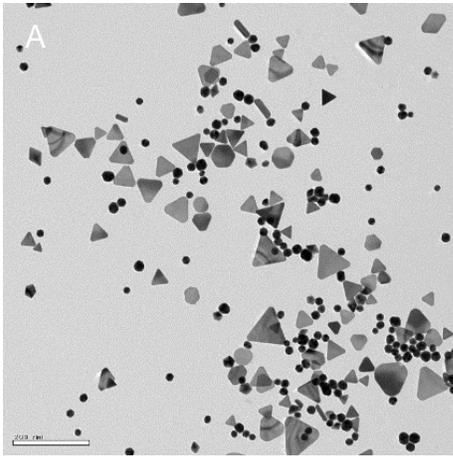


Figura 3.12 Espectro Visible-IR para cada etapa de la centrifugación diferencial. La pella obtenida luego de cada centrifugación fue resuspendida en agua Milli-Q y medida su absorbancia. 5900 g (A, B, C), 3300 g (D, E, F), 1500 g (G, H, I) y 400 g (J, K, L).

Adicionalmente, la pella obtenida de cada una de las centrifugaciones fue caracterizada mediante TEM. Como se muestra en la figura 3.13 hay un incremento en la presencia de NPrO con cada centrifugación. Al calcular el número de NPO presentes se observa un incremento de la población de NPrO desde un 42% (NPrO PEG P1) a 58% (NPrO PEG P4). Además, el tamaño de las NPO fue determinado mediante histogramas realizados de las imágenes TEM. Mientras los NPrO aumentan en tamaño las NeO, presentes aún en la muestra, se mantienen constantes en su diámetro promedio. De esta forma, se logra enriquecer la muestra con NPrO aumentando a casi el doble la población de estos con respecto a la muestra inicial de NPrO desnudos. En la tabla 3.2 se resume la caracterización de cada una de las etapas de la centrifugación diferencial.



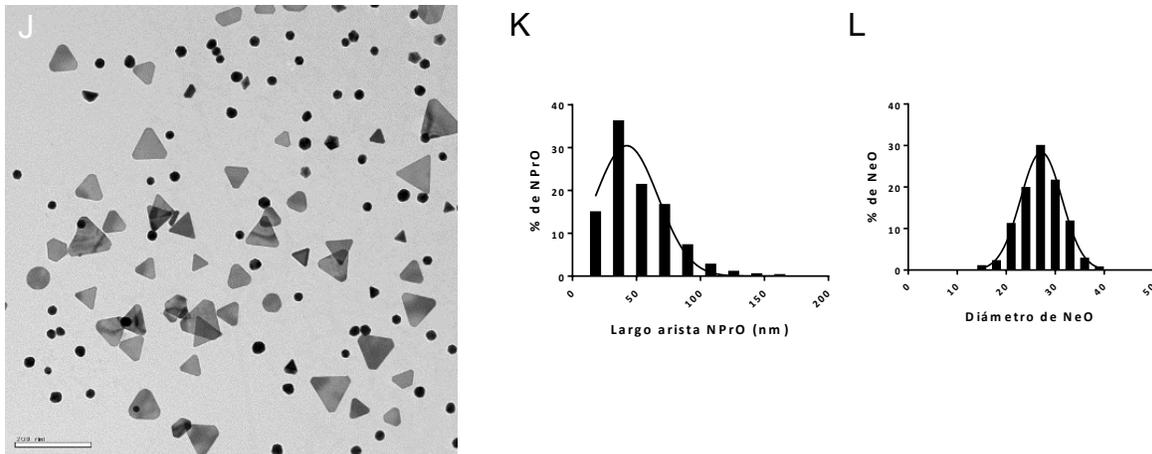


Figura 3.13 Caracterización de la muestra mediante TEM, tamaño del largo de arista de los NPrO y diámetro de las NeO luego de cada centrifugación a: 5900 g (A, B, C), 3300 g (D, E, F), 1500 g (G, H, I) y 400 g (J, K, L). Las imágenes TEM son representativas de cada etapa y los histogramas corresponden a un análisis de 1000 NPO en total.

A continuación, se realizó una segunda tanda de centrifugaciones con el fin de enriquecer aún más la población de NPrO presentes en la muestra. En esta etapa se procedió a realizar dos centrifugaciones a 3300 g (Fig. 3.14). Mediante espectrofotometría Visible-IR se observa una disminución de la intensidad del plasmón correspondiente a las NeO con ambas centrifugaciones, incrementando la razón plasmón IR/plasmón Vis de 2,3 a 2,8 lo que daría cuenta de una disminución en la población de NeO presentes en la muestra.

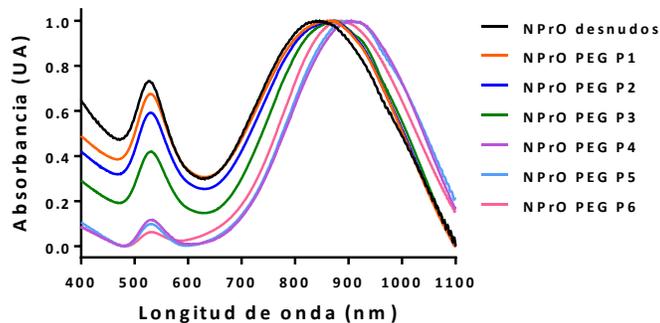


Figura 3.14 Caracterización de NPrO obtenidos luego de la quinta (NPrO PEG P5) y sexta centrifugación (NPrO PEG P6) mediante espectrofotometría Visible-IR.

Como era de esperarse, al observar las muestras mediante TEM el número de NPrO presentes en la muestra es mucho mayor con cada nueva centrifugación NPrO PEG P5 (70%) NPrO PEG P6 (79%) (Fig. 3.15). El tamaño de los NPrO en ambas centrifugaciones aumenta en 10 nm con respecto a la cuarta centrifugación mientras que el diámetro de las NeO vuelve a mantenerse relativamente constante. De esta manera, gracias a la segunda etapa de centrifugación se logró aumentar aún más la población de NPrO obteniendo un incremento de NPrO del 30 al 79% para el proceso completo. La caracterización, comparación y seguimiento de cada uno de los parámetros analizados se resume en la tabla 3.2.

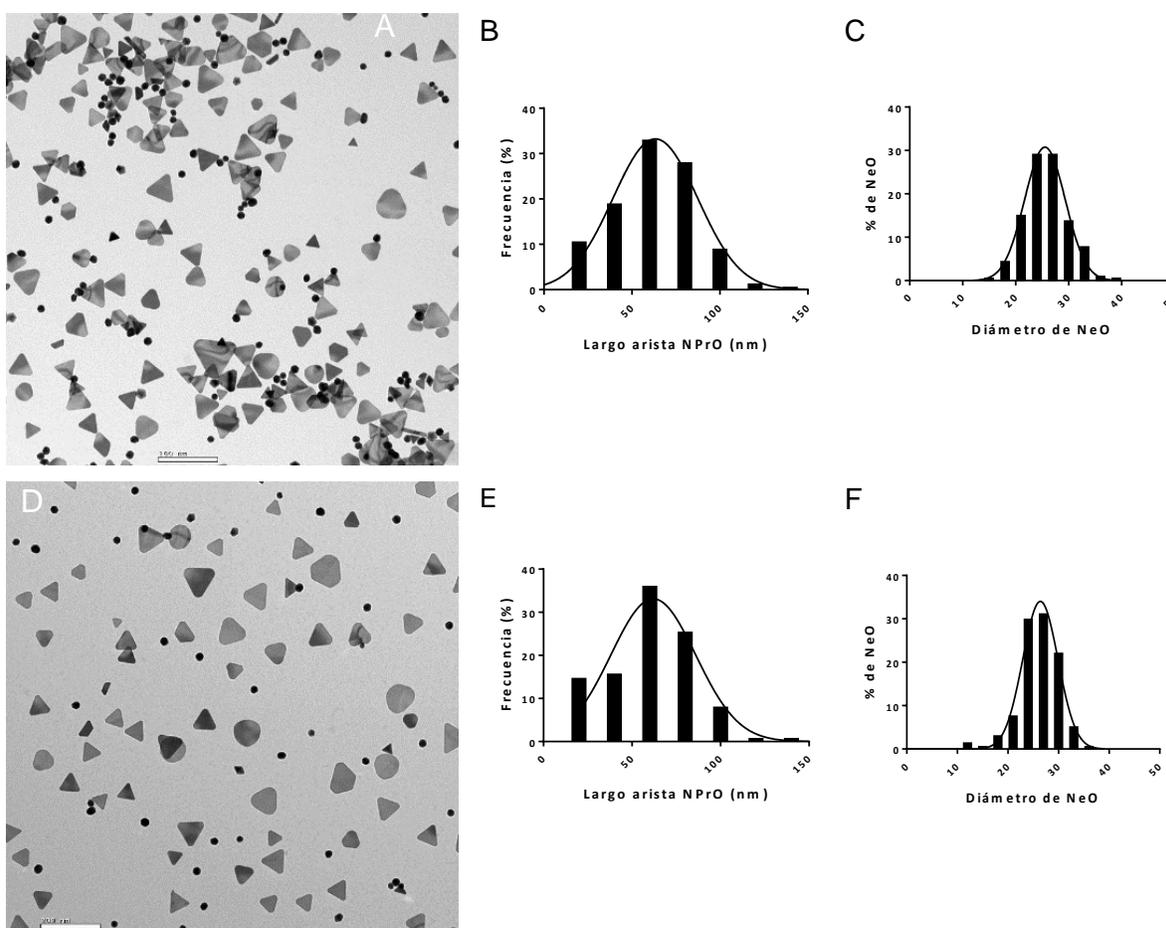


Figura 3.15 Caracterización de la muestra mediante TEM, tamaño del largo de arista de los NPrO y diámetro de las NeO luego de ambas centrifugación a 3300 g: NPrO PEG P5 (A, B, C) y NPrO PEG P6 (D, E, F). Las imágenes son representativas de cada etapa y los histogramas corresponden a un análisis de 1000 NPrO en total.

Tabla 3.2 Tabla resumen de la caracterización de cada una de las etapas de centrifugación.

	P1	P2	P3	P4	P5	P6
Plasmón	861 nm	864 nm	873 nm	905 nm	896 nm	885 nm
Razón IR/Visible	1,3	1,4	1,6	2,3	2,3	2,8
Tamaño TEM (NPrO)	47 ± 17 nm	44 ± 20 nm	47 ± 22 nm	50 ± 24 nm	62 ± 23 nm	60 ± 23 nm
Tamaño TEM (NeO)	22 ± 4 nm	23 ± 4 nm	23 ± 4 nm	27 ± 4 nm	26 ± 4 nm	26 ± 4 nm
Población NPrO	42%	54%	56%	58%	70%	79%
Población NeO	58%	46%	44%	42%	30%	21%

Adicionalmente, se caracterizó el potencial ζ y el diámetro hidrodinámico de la muestra enriquecida en NPrO. El valor del potencial ζ fue de -37 ± 1 mV (Fig. 3.16), valor que se condice con la presencia del grupo carboxilo del PEG que aporta la carga negativa a la muestra medida a pH 5,5. Este valor es bastante similar al obtenido por la síntesis inicial (-40 ± 1 mV), lo que es esperable ya que hay un desplazamiento del tiosulfato que posee carga negativa y que rodea los NPrO por PEG que también posee una carga negativa. Por otro lado, mediante DLS el diámetro hidrodinámico de la muestra mostró dos picos de población: uno de 69 ± 1 nm y otro de 8 ± 1 nm (Fig. 3.17), siendo el primer pico correspondiente al largo de arista de los prismas mientras que el segundo pico correspondería al ancho de estos. En este sentido, ambos valores aumentan con respecto a la síntesis inicial (58 ± 3 nm y otra de 4 ± 1 nm), lo cual también da cuenta del aumento de tamaño de los NPrO debido a la presencia del PEG sobre la superficie de estos.

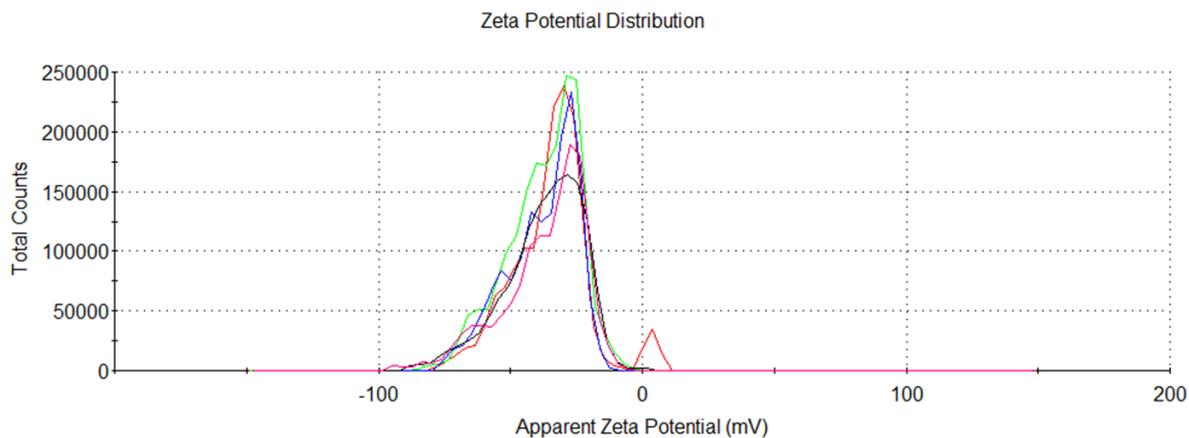


Figura 3.16 Distribución de cargas determinado mediante potencial zeta para NPrO PEG P6 (n=3, muestras independientes).

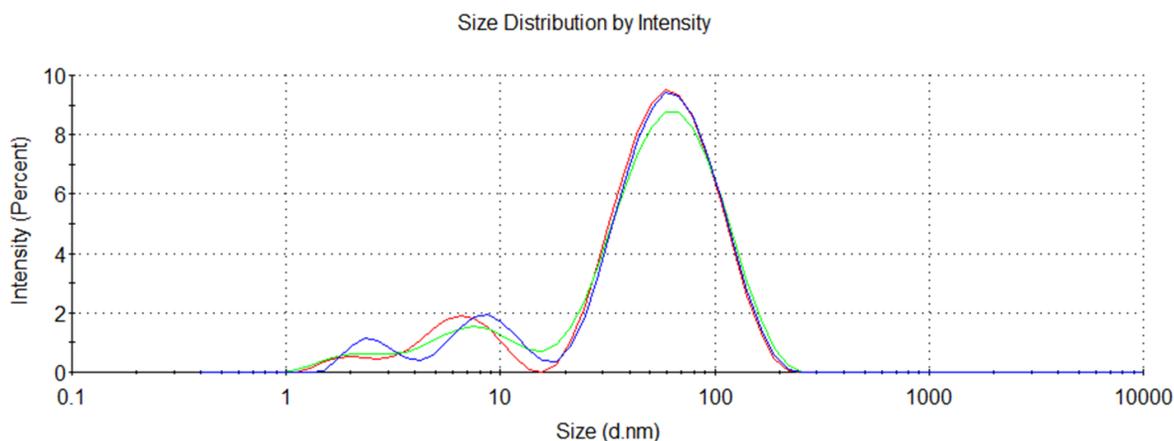
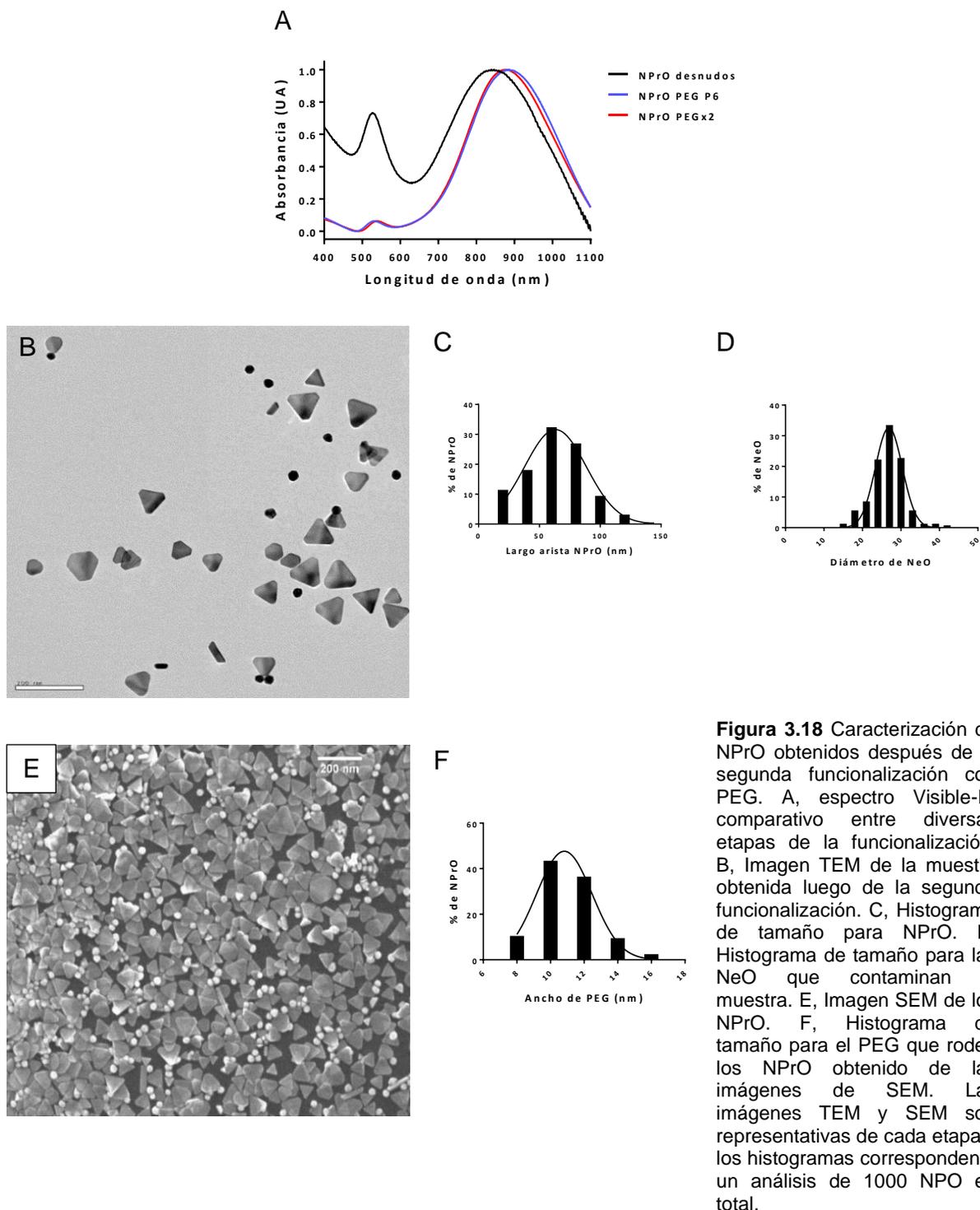


Figura 3.17 Distribución de tamaños determinado mediante DLS para NPrO PEG P6 (n=3, muestras independientes).

3.2.2 Segunda funcionalización de NPrO con HS-PEG-COOH

Ya que parte del PEG utilizado en la funcionalización de la muestra también funcionalizó las NeO, es que se procedió a una segunda funcionalización de la muestra con PEG para asegurarnos de que toda la superficie del NPrO estuviera recubierta (NPrO PEGx2). A continuación, esta muestra se caracterizó mediante

espectrofotometría, TEM, SEM, potencial ζ y DLS. Como se observa en la figura 3.18a, el plasmón correspondiente a los NPrO se desplazó levemente hacia el azul y, además, la intensidad del plasmón a 530 nm disminuyó lo cual sugeriría que la población de NPrO presentes en la muestra aumentó. De las imágenes SEM y TEM (Fig. 3.18b, e), se observa que tanto tamaño de ambas NPO como el valor estimado de sus poblaciones no se vieron mayormente modificados con respecto a los valores obtenidos en el paso anterior (Fig. 3.18 d, e). Adicionalmente, de las imágenes SEM se calculó el ancho del PEG que rodea cada NPrO obteniéndose un valor de 12 ± 2 nm el cual se correlaciona con lo reportado en literatura para este tipo de PEG de 5000 g/mol (Fig. 3.18 f). En la tabla 3.3 se comparan estos parámetros de las principales muestras: NPrO desnudos, NPrO PEG P6 y los NPrO PEGx2.



Aun cuando los parámetros anteriores se mantuvieron casi sin modificaciones con respecto al paso anterior, la caracterización mediante potencial ζ y DLS sí mostró cambios en las propiedades fisicoquímicas para la muestra

NPrO PEGx2. Esta muestra presentó una disminución del valor absoluto potencial ζ de -51 ± 1 mV (Fig. 3.19), es decir, se hizo más negativo este valor lo cual es un indicador de que hay un aumento de carga negativa sobre la superficie de los NPrO que está dado por la presencia de una mayor cantidad de grupos carboxílicos, provenientes del PEG, sobre la superficie de estos. Por otro lado, el diámetro hidrodinámico de esta muestra también aumento a 77 ± 3 nm (Fig. 3.20), lo cual también se condice con la presencia de una mayor cantidad de PEG sobre la superficie de los NPrO. De esta forma, se concluye que la segunda etapa de funcionalización permitió aumentar la cantidad de PEG sobre la superficie del nanosistema final. La comparación completa de los tres sistemas: NPrO desnudo, NPrO PEG P6 y NPrO PEGx2 se muestra en la tabla resumen 3.3.

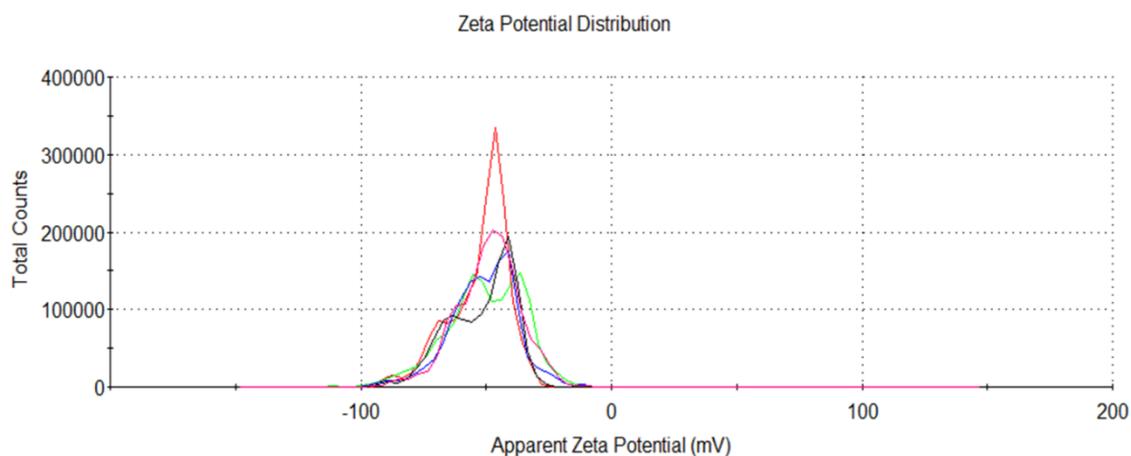


Figura 3.19. Distribución de cargas determinado mediante potencial zeta para NPrO PEGx2 (n=3, muestras independientes).

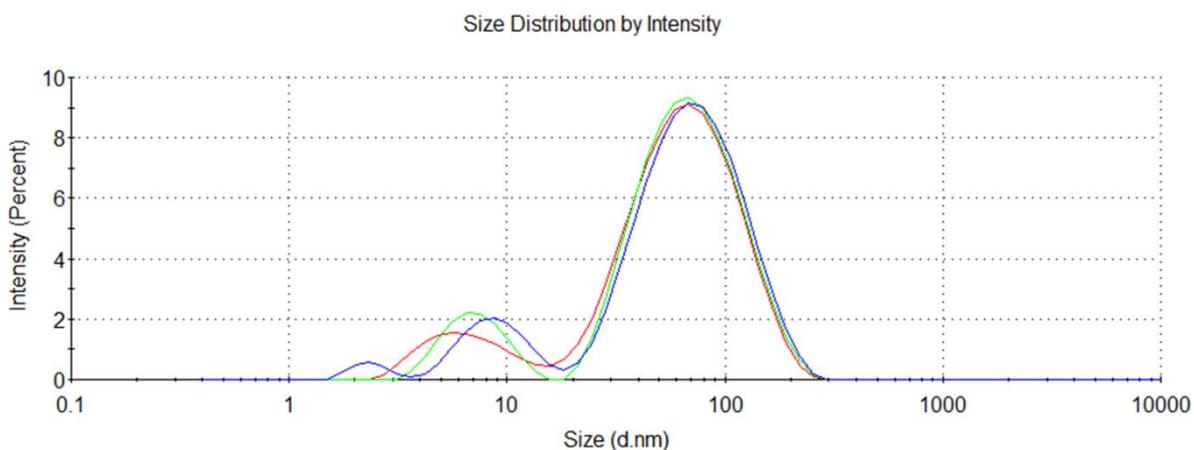


Figura 3.20 Distribución de tamaños determinado mediante DLS para NPrO PEGx2 (n=3, muestras independientes).

Tabla 3.3 Caracterización fisicoquímica antes de funcionalización de NPrO con PEG (NPrO desnudos), después de la primera funcionalización con PEG (NPrO PEG P6) y después de la segunda funcionalización con PEG (NPrO PEGx2).

	NPrO desnudos	NPrO PEG P6	NPrO PEGx2
Plasmón	845nm	885 nm	877 nm
Razón IR/Visible	1,2	2,8	3,1
Tamaño TEM (NPrO)	56 ± 21 nm	60 ± 23 nm	63 ± 24 nm
Población NPrO	30%	79%	80%
Tamaño TEM (NeO)	20 ± 5 nm	26 ± 4 nm	27 ± 4 nm
Población NeO	70%	21%	20%
DLS (primer pico)	58 ± 3 nm	69 ± 1 nm	77 ± 3
Potencial ζ	-40 ± 1 mV	-37 ± 1 mV	-51 ± 1

3.3 Síntesis de NeO

La síntesis de NeO se realizó mediante una modificación del método de Turkevich en base a la cual se varió la concentración de citrato en la reacción para así obtener NeO de un diámetro cercano a 40 nm⁹⁵. Este tamaño de NPO posee un área superficial similar a la de los NPrO, por lo que permite realizar una comparación adecuada de la forma de ambas NPO manteniendo el resto de los parámetros fisicoquímicos constantes. De esta forma al tener dos nanosistemas

que difieran solamente en la forma de la NPO, cualquier efecto que se pueda observar en los siguientes objetivos de esta tesis es atribuible solamente a esta variable.

Las NeO desnudas obtenidas de la síntesis fueron caracterizadas mediante espectrofotometría Vis-IR, STEM, DLS y potencial ζ . Como se observa en la figura 3.21a, las NeO desnudas poseen un plasmón a 530 nm el cual está descrito en literatura que corresponde a NeO de un diámetro aproximado de 40 nm. Para corroborar el tamaño se visualizó la muestra por STEM (Fig. 3.21b) donde se puede observar la forma esférica y en algunos casos se observa una forma levemente como si fuesen un grano de arroz, lo cual también se ha descrito para este tamaño de esferas. De las imágenes STEM se realizó un análisis del histograma de tamaño obteniéndose un diámetro promedio de 41 ± 6 nm (Fig. 3.21c), tamaño que se condice con lo observado por espectrofotometría.

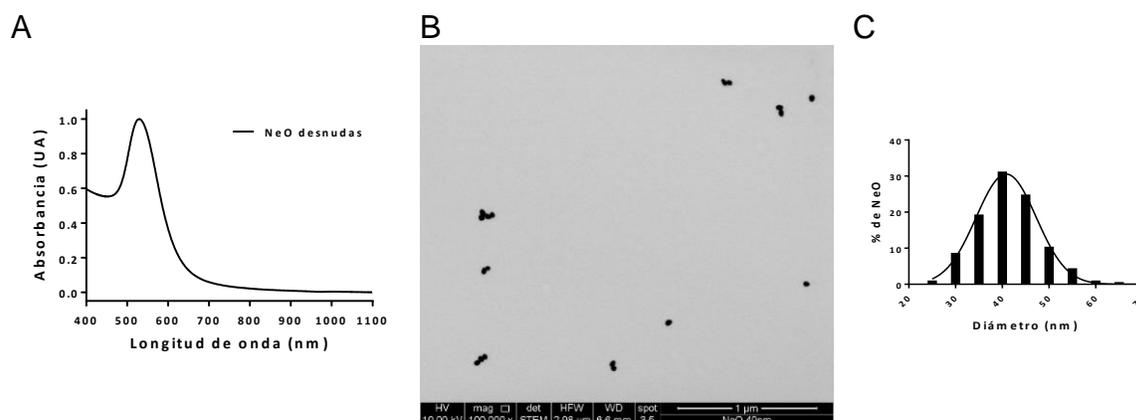


Figura 3.21 Caracterización de NeO desnudas. A, espectro Visible-IR. B, Imagen TEM representativa de la muestra. C, Histograma de tamaño para NeO (se consideraron 1000 NeO para el análisis).

Las NeO desnudas también se caracterizaron mediante el diámetro hidrodinámico que presenta la muestra en solución. Al observar el espectro por

DLS se visualizan dos picos característicos: 65 ± 3 nm y $3,3 \pm 0,1$ nm (Fig. 3.22). Cabe destacar, que el tamaño de las NeO desnudas mediante DLS es mayor ya que el obtenido por TEM ya que se encuentran en solución. La aparición de un segundo pico en el espectro de DLS es algo característico para NPO anisotrópicas, y en este caso ya que las NeO no son completamente esféricas es esperable observar este segundo pico⁹⁶. Con respecto al potencial ζ , se determinó que la carga superficial de la muestra es de -39 ± 3 mV (Fig. 3.23), cuyo valor negativo corresponde a que las NeO desnudas están rodeadas por el agente reductor/estabilizante citrato, el cual al pH del análisis (5,5) posee una carga negativa.

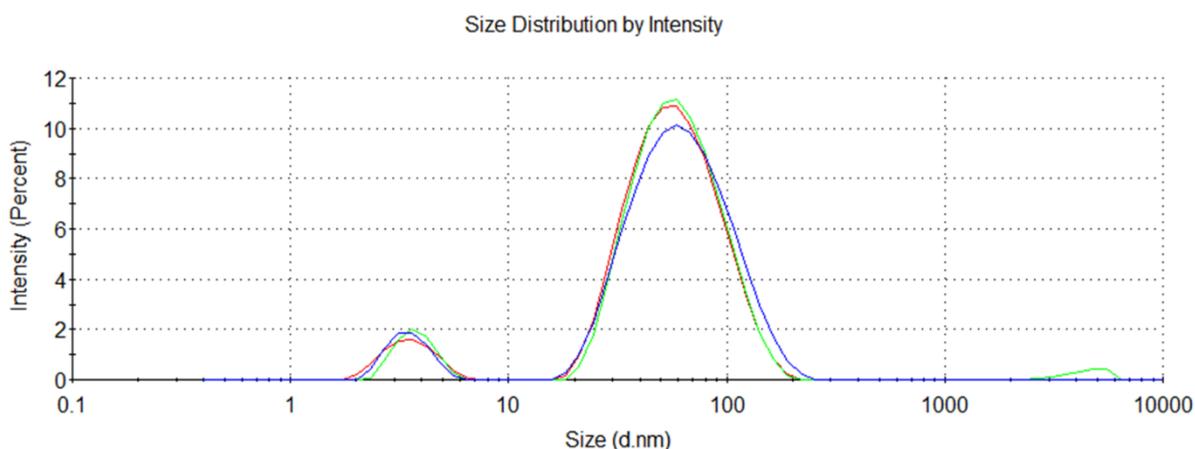


Figura 3.22 Distribución de tamaños determinado mediante DLS para NeO desnudas (n=3, muestras independientes).

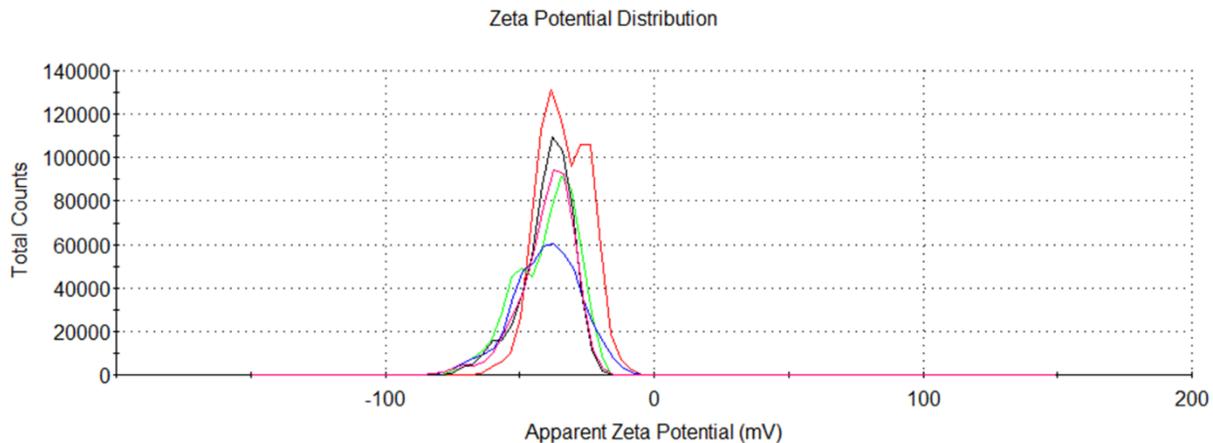


Figura 3.23 Distribución de cargas determinado mediante potencial ζ para NeO desnudas (n=3 muestras independientes).

3.4 Funcionalización de NeO desnudas con PEG

A continuación, se procedió a funcionalizar las NeO desnudas con el agente estabilizante PEG (NeO PEG). Al igual que los NPrO, si se cambia el solvente donde se produce la síntesis de las NeO, citrato, estas se vuelven muy inestables y tienden a agregar. Luego de funcionalizarlas, se caracterizaron mediante espectrofotometría obteniendo un plasmón a 532 nm (Fig. 3.24a), el cual es ligeramente mayor que el de las NeO desnudas y que por lo tanto permite sugerir que las NeO se encuentran rodeadas de PEG. Al analizar la muestra mediante SEM y TEM es posible observar las NeO con el halo de PEG característico que las rodea (Fig. 3.24 b, d). De las imágenes TEM se determinó el diámetro promedio de las NeO el cual fue de 43 ± 6 nm (Fig. 3.24d), valor bastante similar al de las NeO desnudas, mientras que de las imágenes SEM se calculó el ancho promedio del PEG el que fue de 12 ± 1 nm, valor prácticamente idéntico al obtenido para los NPrO.

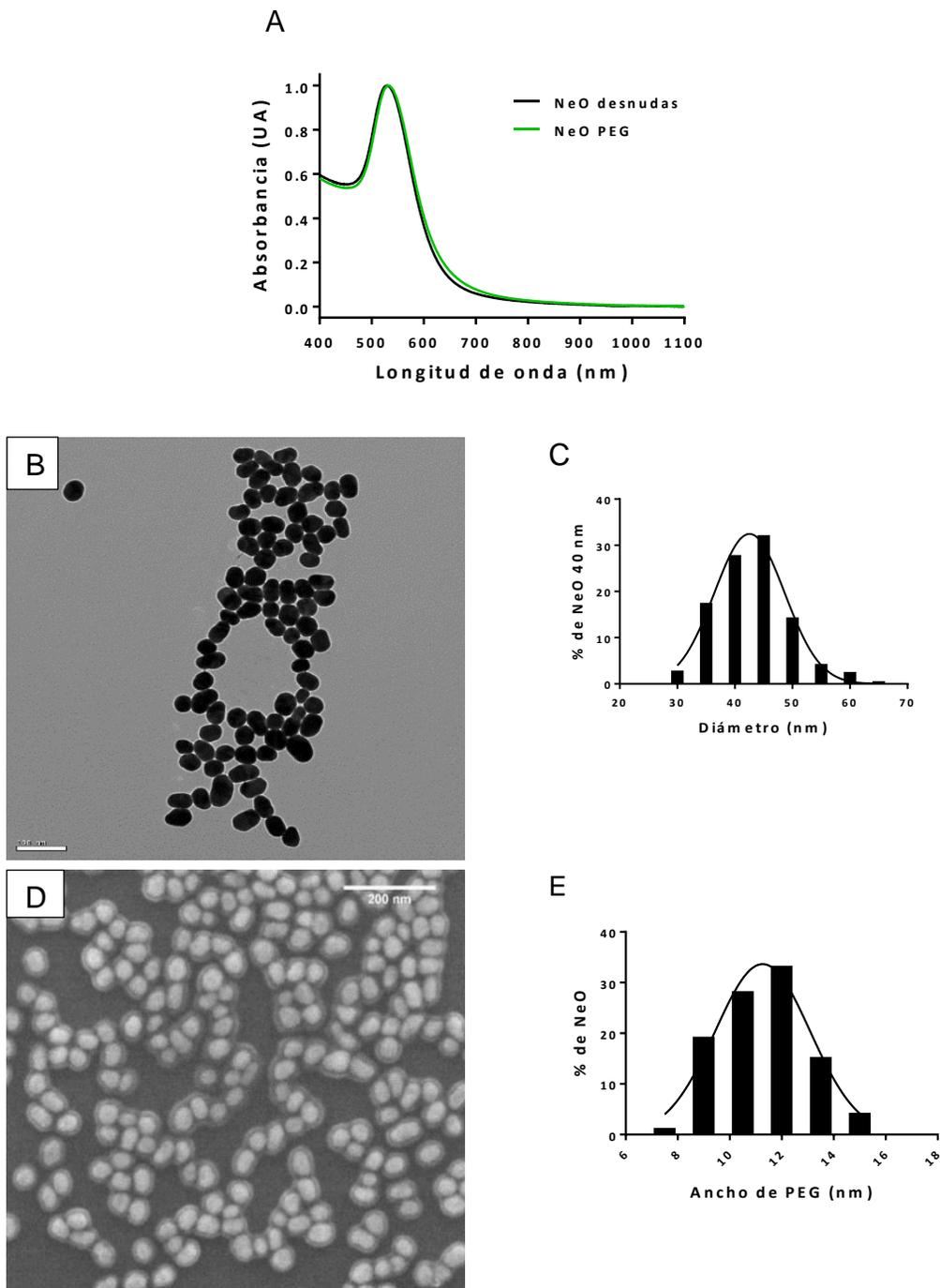


Figura 3.24 Caracterización de NeO funcionalizadas con PEG. A, espectro visible-IR. B, Imagen TEM de la muestra. C, Histograma de tamaño para NeO. C, Imagen SEM de NeO. D, Histograma de tamaño para PEG. Las imágenes TEM y SEM son representativas de cada etapa y los histogramas corresponden a un análisis de 1000 NPO en total.

Finalmente, NeO PEG fueron caracterizadas mediante el DLS y potencial ζ .

El espectro DLS muestra nuevamente dos picos correspondientes a poblaciones

de dos tamaños: 75 ± 1 nm y $8,1 \pm 0,2$ nm (Fig. 3.25). Como era de esperarse, ambos picos aumentaron su valor con respecto a las NeO desnudas lo que da cuenta de la presencia de PEG sobre la superficie de la NeO incrementando su diámetro hidrodinámico. Por otro lado, el valor del potencial ζ fue de -55 ± 1 mV (Fig. 3.26), el cual es un valor más negativo que el de las NeO desnudas y que se condice con la presencia de más grupos carboxílicos del PEG, y por ende, de una mayor carga negativa ya que estos se encuentran desprotonados al pH de la medición, 5,5. De esta forma, gracias a las variaciones fisicoquímicas que presenta esta muestra se puede corroborar la funcionalización de las NeO. En la tabla 3.4 se muestra el resumen y al comparación de las variables fisicoquímicas analizadas tanto para las NeO desnudas como NeO PEG.

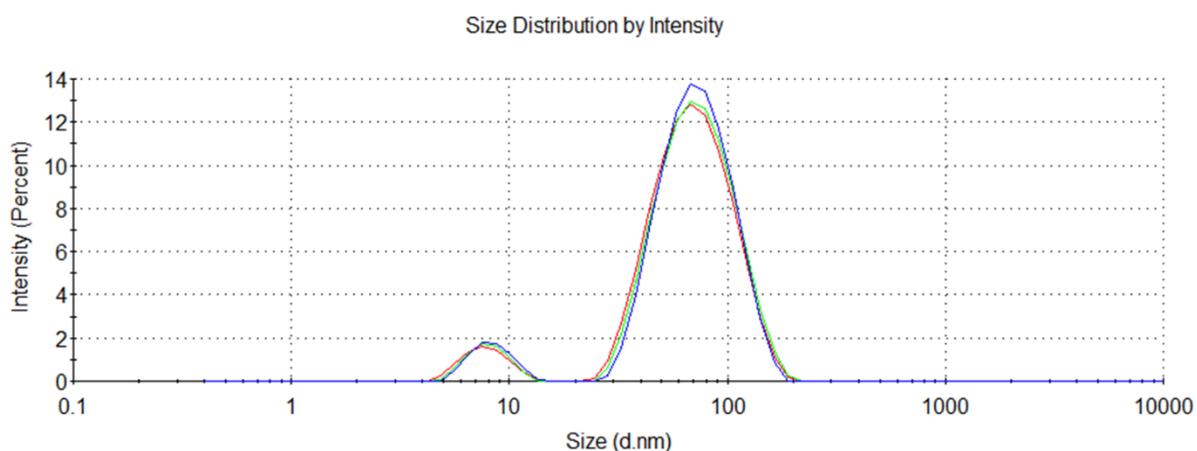


Figura 3.25 Distribución de tamaños determinado mediante DLS para NeO desnudas (n=3, muestras independientes).

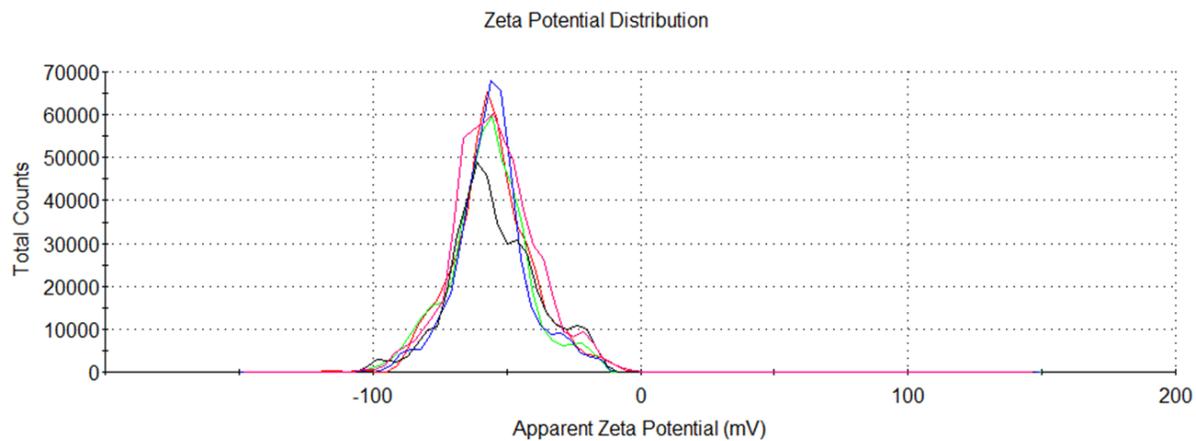


Figura 3.26 Distribución de cargas determinado mediante potencial zeta para NeO PEG (n=3, muestras independientes).

Tabla 3.4 Caracterización fisicoquímica antes y después de funcionalización de NeO con PEG.

	NeO desnudos	NeO PEG
Plasmón	530 nm	532 nm
Tamaño TEM	41 ± 6 nm	43 ± 6 nm
DLS (primer pico)	65 ± 3 nm	75 ± 1 nm
Potencial ζ	-39 ± 3 mV	-55 ± 1 mV

Capítulo 4: Evaluación del efecto de la curvatura de NPO sobre la cinética de agregación del péptido A β

4.1 Purificación del péptido A β 42 sintético

Como antes se mencionó, el mecanismo de agregación de A β 42 se ve acelerado debido a que la superficie de los agregados ya formados cataliza la formación de nuevos agregados. Es por esto, que para obtener cinéticas reproducibles se purificó el péptido A β 42 para evitar la presencia de estos pequeños agregados y que por lo tanto pudieran alterar el proceso de agregación. De esta forma, se asegura que los experimentos son realizados solamente con la forma monomérica del péptido A β 42. El sistema de purificación utilizado fue mediante una columna de exclusión molecular HiLoad Superdex 75 la cual se encuentra a una temperatura de 4°C, temperatura a la cual se enlentece el proceso de agregación para así evitar la formación de pequeños agregados mientras la muestra pasa por la columna. Como se observa en la figura 4.1, el primer pico cromatográfico a los 54 mL, corresponde a pequeños agregados del péptido A β 42 que están aún presentes en la solución. Por otro lado, a los 75 mL comienza a aparecer el pico correspondiente al monómero del péptido A β 42. Una vez recuperado el monómero purificado este se mantuvo a 4°C en un tubo *ependorf low binding* para evitar la formación de pequeños agregados antes de comenzar el ensayo cinético. El seguimiento de los cromatogramas se realizó a tres longitudes de onda diferentes: 280 nm, 220, y 214 nm. El incremento de la absorbancia a volúmenes por sobre 110 ml corresponde a especies pequeñas como tiocianato de guanidinio.

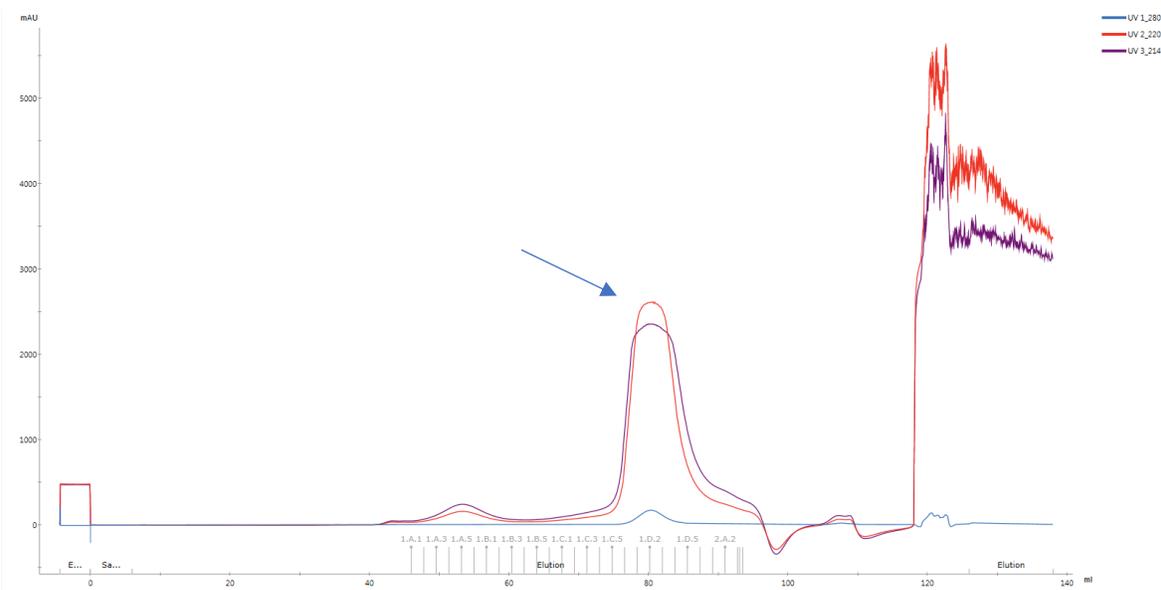


Figura 4.1 Cromatograma representativo del péptido A β 42 sintético obtenido por purificación con exclusión molecular y HPLC. El pico correspondiente a la forma monomérica de A β 42 se indica por la flecha. El seguimiento de la purificación fue mediante absorbancia a UV a 280, 220 y 214 nm.

4.2 Estandarización de las cinéticas de agregación del péptido A β 42

Ya que se requiere que las cinéticas de agregación del péptido A β 42 sean reproducibles para así poder determinar el efecto de las NPO sobre éstas, se evaluaron parámetros claves de estas cinéticas. El seguimiento de las cinéticas de agregación se realizó mediante el uso de la sonda fluorescente Tioflavina T (ThT), la cual aumenta su fluorescencia al unirse a estructuras β como es el caso de la forma agregada del péptido A β 42⁹⁷. Lo primero que se evaluó fue que la concentración de ThT no alterará las cinéticas de agregación, por lo cual se analizaron diferentes concentraciones de esta. En la figura 4.2, se muestran las cinéticas de agregación a un concentración constante de 2 μ M de A β 42 monomérico realizadas con concentraciones de ThT entre 0,25 hasta 20 μ M. Se observa que conforme se aumenta la concentración de ThT se incrementa la

intensidad de fluorescencia para cada una de las cinéticas (Fig. 4.2a). Sin embargo, al normalizar los valores de fluorescencia con respecto al máximo de fluorescencia obtenido en el *plateau* (Fig. 4.2b), se observa que todas las cinéticas se superponen, lo que implica que la ThT no altera las cinéticas de A β 42 en este rango de concentración.

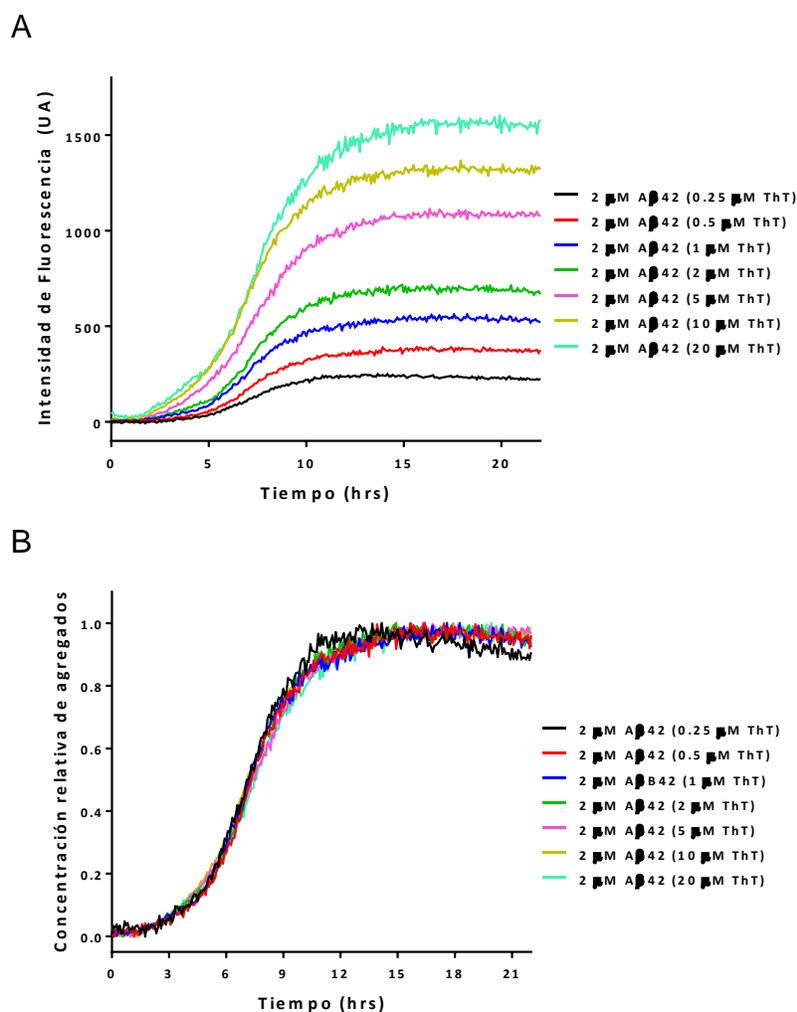


Figura 4.2 Ensayo de cinética de agregación con distintas concentraciones de ThT. A, se analizaron siete concentraciones diferentes de ThT: 0,25; 0,5; 1; 2; 5; 10 y 20 μ M. B, normalización de las cinéticas obtenidas en A. (n=2, muestras independientes).

Como se mencionó en la introducción, al incrementar la concentración inicial del péptido A β 42 en el ensayo, se incrementa su velocidad de agregación y

el tiempo de vida medio ($t_{1/2}$) de cada cinética, que corresponde al tiempo en el cual se obtiene el 50% de fluorescencia entre la fase lag y *plateau* para cada cinética, disminuye^{74, 79, 98}. Sin embargo, este proceso llega a un punto de saturación en el cual se obtiene la misma velocidad independiente de la concentración inicial del péptido A β 42^{99, 100}. Ya que el proceso de agregación del péptido A β 42 posee un mecanismo de agregación principalmente comandado por la nucleación secundaria, en el cual la superficie de las fibras participa como catalizador del proceso de agregación^{99, 100}, cuando el sistema está saturado es porque todas las fibras de A β 42 presentes tienen ocupada toda su superficie y por ende no hay más espacios disponibles donde catalizar la formación de nuevos agregados. Esto se traduce en que el proceso de agregación se hace independiente de la concentración de monómero inicial. Es así como se requiere determinar cuáles son las concentraciones óptimas de A β 42 para evaluar el efecto de las NPO sobre el mecanismo de agregación y no sobre procesos extras como es el de saturación.

Para determinar el rango de concentraciones en el cual el monómero purificado presenta el comportamiento de agregación mediante nucleación secundaria, se procedió a realizar un ensayo de agregación utilizando concentraciones iniciales del monómero entre 1 μ M y 25 μ M (Fig. 4.3). Se observa que conforme se aumenta la concentración inicial de monómero aumenta la intensidad máxima de fluorescencia (Fig. 4.3a), y además, la velocidad de agregación es mucho mayor la cual está dada porque la aparición de las cinéticas ocurre cada vez a menores tiempos.

Al normalizar cada cinética con respecto al máximo de fluorescencia obtenida en el *plateau* (Fig. 4.3c), se observa que a mayor concentración inicial del monómero de A β 42 se produce una superposición de las cinéticas. Esto es más evidente al observar la figura 4.3b, el cual representa un gráfico del doble logaritmo de la vida media y la concentración inicial de monómero. Mediante este análisis se observa claramente que a concentraciones mayores de 8 μ M de A β 42 se obtiene el mismo valor de vida media, lo cual es un indicador de que el proceso de agregación se encuentra saturado y por ende hay una etapa adicional además de la nucleación secundaria. Por lo tanto, los análisis cinéticos posteriores se realizaron utilizando solamente hasta 8 μ M de A β 42 inicial.

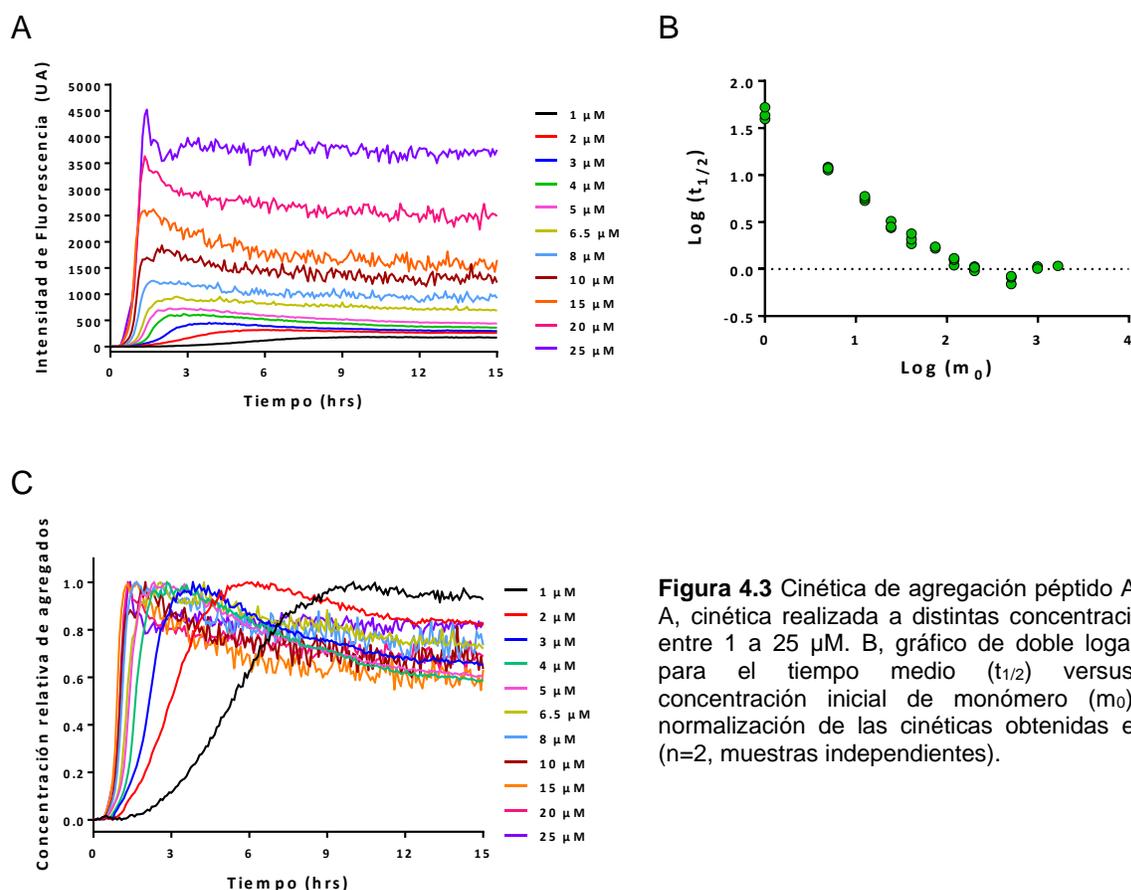


Figura 4.3 Cinética de agregación péptido A β 42. A, cinética realizada a distintas concentraciones entre 1 a 25 μ M. B, gráfico de doble logaritmo para el tiempo medio ($t_{1/2}$) versus la concentración inicial de monómero (m_0). C, normalización de las cinéticas obtenidas en A. (n=2, muestras independientes).

Para analizar el efecto de la curvatura de las NPO sobre el mecanismo de agregación de A β 42, las cinéticas de agregación fueron monitoreadas con ThT en presencia o ausencia de NPO. Los ensayos fueron realizados por triplicado para cada una de las siguientes concentraciones iniciales del monómero de A β 42: 2; 2,5; 3; 4; 6,5 y 8 μ M. Estas cinéticas fueron ajustadas globalmente con diversos modelos cinéticos propuestos en el *software* de libre acceso AmyloFit (como se detallan en la tabla 4.1). Del ajuste global de cada modelo a las cinéticas, se obtiene los residuales que son una medida de que tan distinto es el valor del ajuste con respecto al valor del dato experimental. Con estos datos, el *software* realiza el cálculo del error residual medio (MRE por sus siglas en inglés)⁷⁹, el cual corresponde a la sumatoria del cuadrado de los residuales dividido por el número de mediciones realizadas (en este caso cada 5 minutos se realizaba una medición). De esta forma, MRE es el principal parámetro usado por este *software* para discriminar entre los diferentes modelos matemáticos de agregación⁷⁹. Mientras más bajo sea este valor implica que el modelo analizado se ajusta de mejor forma a las cinéticas de agregación.

En ausencia de NPO, el modelo matemático que mejor describe las cinéticas de agregación es el modelo de nucleación secundaria multipasos, la cual se condice con lo descrito en literatura (Tabla 4.1). Además, al graficar el doble logaritmo del $t_{1/2}$ vs concentración inicial de A β 42 se obtiene una línea recta (Fig. 4.4). La pendiente de este gráfico se denomina “valor gamma” o “ γ value”, la cual en este caso fue de -0,933. Mientras este valor sea más cercano a -1 y alejado de -0,5, se ha descrito que el mecanismo de agregación es por nucleación

secundaria. Además, para el caso de A β 42 está descrito en la literatura un γ value de -1.3^{99-101} , el cual es similar al obtenido experimentalmente. De esta forma, los valores de MRE y de γ value en conjunto se correlacionan con el mecanismo de agregación de A β 42 reportado en literatura.

Tabla 4.1 Modelos matemáticos para el ajuste global de las cinéticas obtenidas con el péptido A β 42 con sus respectivos valores de MRE (en rojo se destaca el menor valor de MRE obtenido para cada ajuste en ausencia o presencia de NPO).

Modelo	Procesos dominantes del modelo	MRE		
		A β 42	A β 42 : NPrO	A β 42 : NeO
Nucleación elongación	Nucleación primaria (k_n) Elongación (k_+)	0,0136	0,0238	0,0120
Dominada por nucleación secundaria	Nucleación secundaria (k_2)	0,0104	0,0259	0,00641
Dominado por fragmentación	Fragmentación (k_-)	0,00293	0,00413	0,00399
Fragmentación y nucleación secundaria	Fragmentación (k_-) Nucleación secundaria (k_2)	0,00141	0,00409	0,00113
Nucleación secundaria multipasos	Nucleación secundaria (k_2)	0,00125	0,00382	0,00163
Elongación saturante	Elongación (k_+)	0,00505	0,00712	0,00541
Elongación saturante y nucleación secundaria	Elongación (k_+) Nucleación secundaria (k_2)	0,00508	0,0160	0,0056
Elongación saturante y fragmentación	Elongación (k_+) Fragmentación (k_-)	0,00293	0,00411	0,00399

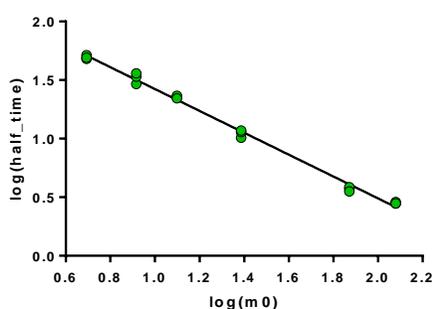


Figura 4.4 Gráfico que relaciona el logaritmo del tiempo medio de cada cinética (Half time) con el logaritmo de la concentración inicial de péptido A β sintético. La pendiente obtenida corresponde al valor gamma o " γ value" que en este caso es de -0.933 , lo que implica que el proceso de agregación corresponde a un mecanismo de nucleación secundaria ($n=3$, muestras independientes).

En la figura 4.5 se muestran las cinéticas de agregación de A β 42 en presencia y ausencia de NPO. El triplicado de cada concentración de A β 42 se muestra en círculos mientras la línea continua corresponde al ajuste global realizado (Fig. 4.5 panel inferior), junto al error residual obtenido del ajuste para cada concentración en el tiempo (Fig. 4.5 panel superior).

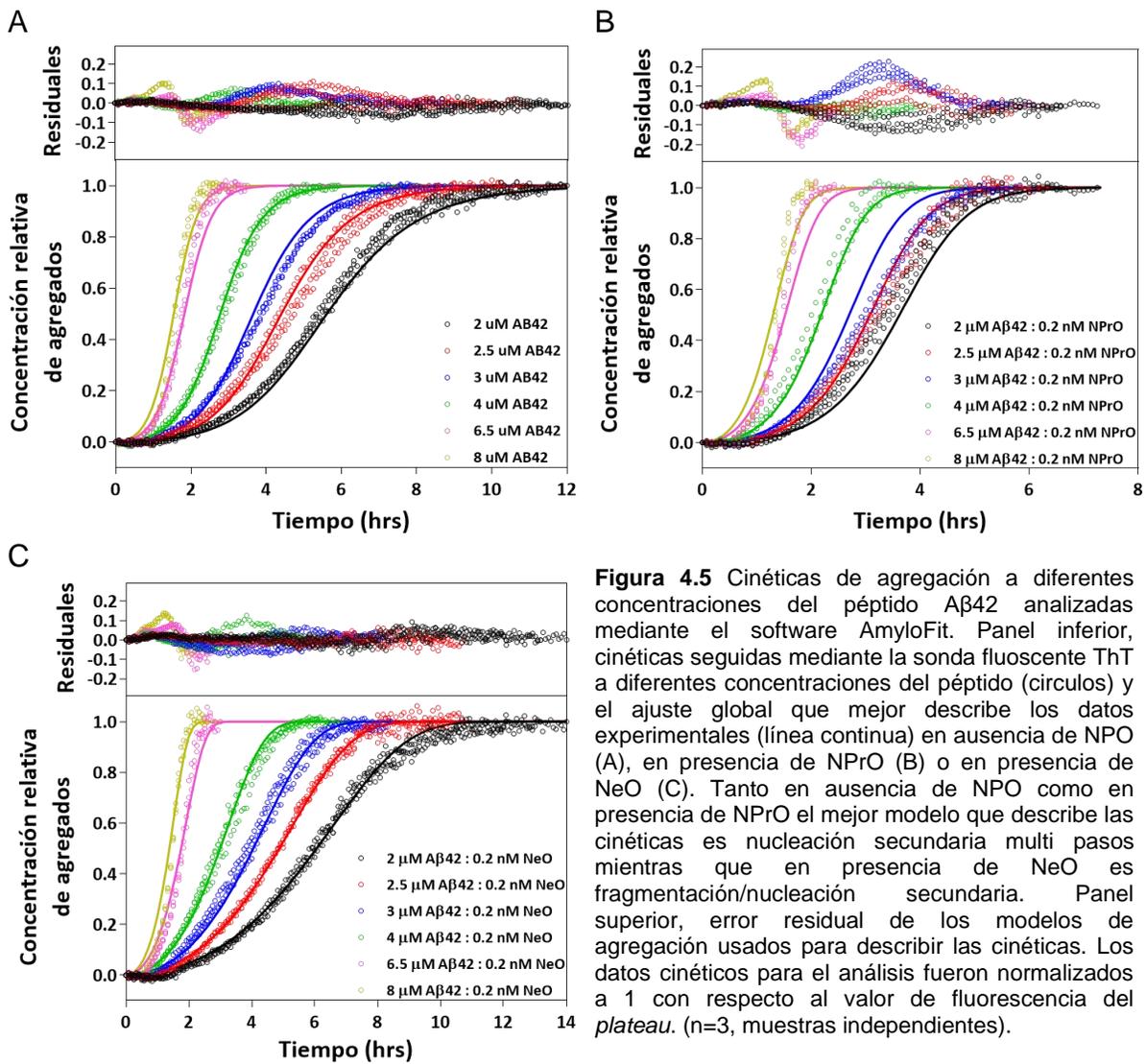


Figura 4.5 Cinéticas de agregación a diferentes concentraciones del péptido A β 42 analizadas mediante el software AmyloFit. Panel inferior, cinéticas seguidas mediante la sonda fluorescente ThT a diferentes concentraciones del péptido (círculos) y el ajuste global que mejor describe los datos experimentales (línea continua) en ausencia de NPO (A), en presencia de NPrO (B) o en presencia de NeO (C). Tanto en ausencia de NPO como en presencia de NPrO el mejor modelo que describe las cinéticas es nucleación secundaria multi pasos mientras que en presencia de NeO es fragmentación/nucleación secundaria. Panel superior, error residual de los modelos de agregación usados para describir las cinéticas. Los datos cinéticos para el análisis fueron normalizados a 1 con respecto al valor de fluorescencia del *plateau*. (n=3, muestras independientes).

Del ajuste realizado en ausencia de NPO, modelo de nucleación secundaria multipasos, se obtienen las constantes combinadas k_1+k_n y k_1+k_2 que caracterizan

las diferentes etapas que llevan a la formación de fibras (el valor de ambas constantes está detallado en la tabla 4.2). La constante combinada k_+k_n representa la ruta primaria de agregación definida por la formación de nuevos núcleos de agregación, la nucleación primaria (k_n), y la constante de elongación de las fibras ya formadas (k_+). Por otro lado, k_+k_2 representa la ruta de agregación secundaria que está definida por la constante de nucleación secundaria (k_2), mediante la cual la superficie de la fibra cataliza la formación de nuevos agregados, y la constante de elongación (k_+).

Tabla 4.2 Comparación constantes combinadas obtenidas del ajuste global para cada condición (n=3, muestras independientes).

Muestra	k_+k_n ($\mu\text{M}^{-2}\text{h}^{-2}$)	k_+k_2 ($\mu\text{M}^{-3}\text{h}^{-2}$)	k_+k_- ($\mu\text{M}^{-1}\text{h}^{-1}$)
A β 42	$1,33 \times 10^{+9} \pm 3,8 \times 10^{+7}$	$8,9 \times 10^{+16} \pm 8,7 \times 10^{+15}$	-
A β 42 : NPrO	$2,84 \times 10^{+9} \pm 1,7 \times 10^{+8}$	$6,8 \times 10^{+18} \pm 4,7 \times 10^{+18}$	-
A β 42 : NeO	$2,84 \times 10^{+9} \pm 6 \times 10^{+7}$	$4,1 \times 10^{+15} \pm 3,6 \times 10^{+14}$	$2,64 \times 10^{+4} \pm 1,4 \times 10^{+3}$

La presencia de 0,2 nM **NPrO** sobre las cinéticas de A β 42 **incrementó la velocidad aparente de las cinéticas de agregación** (Fig. 4.5b) lo cual también se observa en la disminución del tiempo medio para cada una de las cinéticas a las distintas concentraciones analizadas comparado con el control (Fig. 4.6). El mecanismo de formación de fibras en presencia de los NPrO no se vio modificado ya que el modelo que mejor se ajustó a las cinéticas fue nuevamente la **nucleación secundaria multipasos** (Tabla 4.1). Sin embargo, la presencia de los NPrO incrementó la constante combinada k_+k_2 en dos órdenes de magnitud sin modificar la constante k_+k_n comparado a las mediciones en ausencia de NPO

(Tabla 4.2). En contraste, la presencia de **las NeO sí modificó el modelo de agregación del péptido A β 42**. En este caso el ajuste global predijo un mecanismo de **agregación de nucleación secundaria/fragmentación** (Tabla 4.1), en el cual la fragmentación de las fibras largas ya formadas también contribuye a la formación de nuevos agregados a través de la constante de fragmentación (k_-) junto con la nucleación secundaria. Con respecto a las cinéticas, la presencia de NeO desaceleró ligeramente las cinéticas de formación de fibras (Fig. 4.5c) e incrementó el tiempo medio para cada una de las cinéticas a las distintas concentraciones analizadas comparado con el control (Fig. 4.6). Este incremento fue coherente con la disminución de la constante combinada k_+k_2 en un orden de magnitud mientras k_+k_n se mantuvo constante con respecto a la misma constante en ausencia de NeO (Tabla 4.2). Además, basado en este modelo se obtuvo una tercera constante combinada representada por k_+k_- la cual contribuye al proceso de agregación mediante la fragmentación de las fibras más largas. *Por lo tanto, de los resultados obtenidos hasta ahora se propone que los NPrO promueven la agregación mediante k_+k_2 mientras las NeO desaceleran la agregación afectando el mecanismo de agregación mediante la nucleación secundaria/fragmentación.*

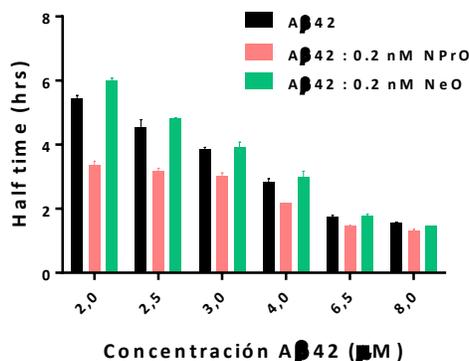


Figura 4.6 Comparación de los tiempos medios de las cinéticas de agregación para cada concentración de Aβ42 en ausencia de NPO (columnas negras), en presencia de NPrO (columnas rojas) y en presencia de NeO (columnas verdes) utilizando el software AmyloFit (n=3, muestras independientes).

Con el fin de determinar sobre cuál constante microscópica individual relacionadas a la vías primaria o secundaria de agregación, es decir, sobre cuál etapa del mecanismo de agregación las NPO ejercen su efecto, es que se procedió a analizar las cinéticas de agregación en función de la concentración de NPO. En la figura 4.7 se muestra el desglose del efecto de diferentes concentraciones de NPrO sobre cada una de las concentraciones del péptido Aβ42. Como se puede observar, la concentración de los NPrO posee un efecto concentración dependiente sobre las cinéticas de agregación en las cuales al aumentar la concentración de **NPrO la velocidad aparente de las cinéticas también se ve incrementada**. Al realizar el ajuste global de las cinéticas de agregación para cada concentración de NPrO se obtiene un aumento del valor de la constante combinada $k+k_2$ sin alterar la constante combinada $k+k_n$ (Fig. 4.9a). Este resultado explica el aumento de la velocidad aparente de las cinéticas conforme se aumenta la concentración de NPrO presente en el ensayo. Además, ya que la constante individual k_2 es compartida por ambas constantes

combinadas, k_+k_2 y k_+k_n , y esta última no se vio modificada por la presencia de las distintas concentraciones de NPrO, es que se puede asumir que solamente la constante de nucleación secundaria k_2 es la que está siendo acelerada por la presencia de los NPrO. Por otro lado, la figura 4.8 compara las cinéticas de agregación a distintas concentraciones de NeO. Para ambas concentraciones de NeO analizadas se obtiene el mismo patrón de cinética y del ajuste global de cada una de estas se obtiene el mismo valor para las tres constantes combinadas: k_+k_2 y k_+k_n (Fig. 4.9b eje izquierdo) y k_+k_- (Fig 4.9b eje derecho). *Por lo tanto, con este análisis no se puede discriminar sobre cuál etapa del proceso de agregación las NeO tiene un efecto mayoritario, y solamente se determinó que afectan la nucleación secundaria y la fragmentación en el mecanismo de agregación del péptido A β 42.*

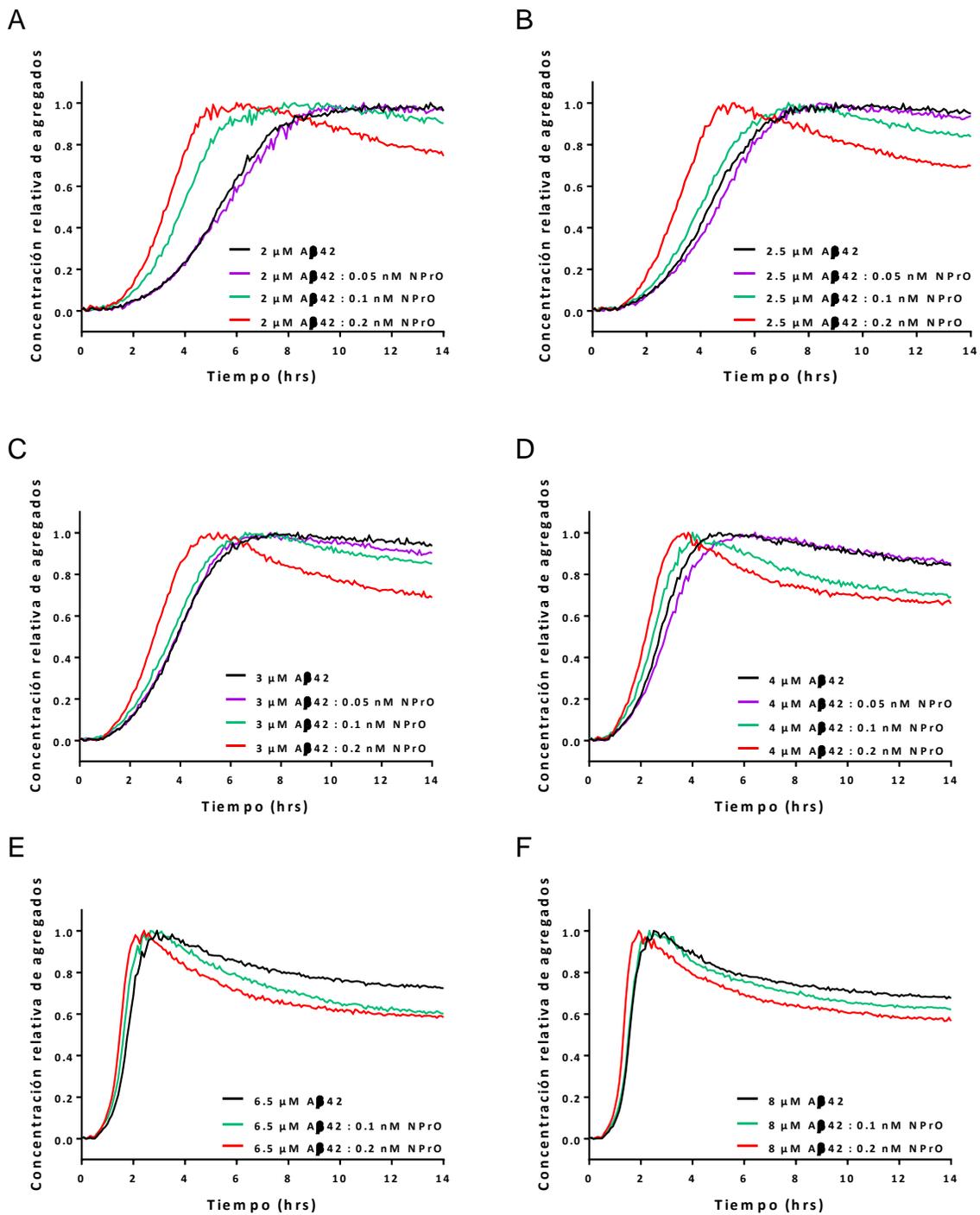


Figura 4.7 Cinéticas de agregación a diferentes concentraciones del péptido Aβ42 analizadas a diferentes concentraciones de NPrO. Se realizó el desglose para cada concentración de Aβ42. La línea negra corresponde al control de Aβ42 en ausencia de NPrO (n=3, muestras independientes).

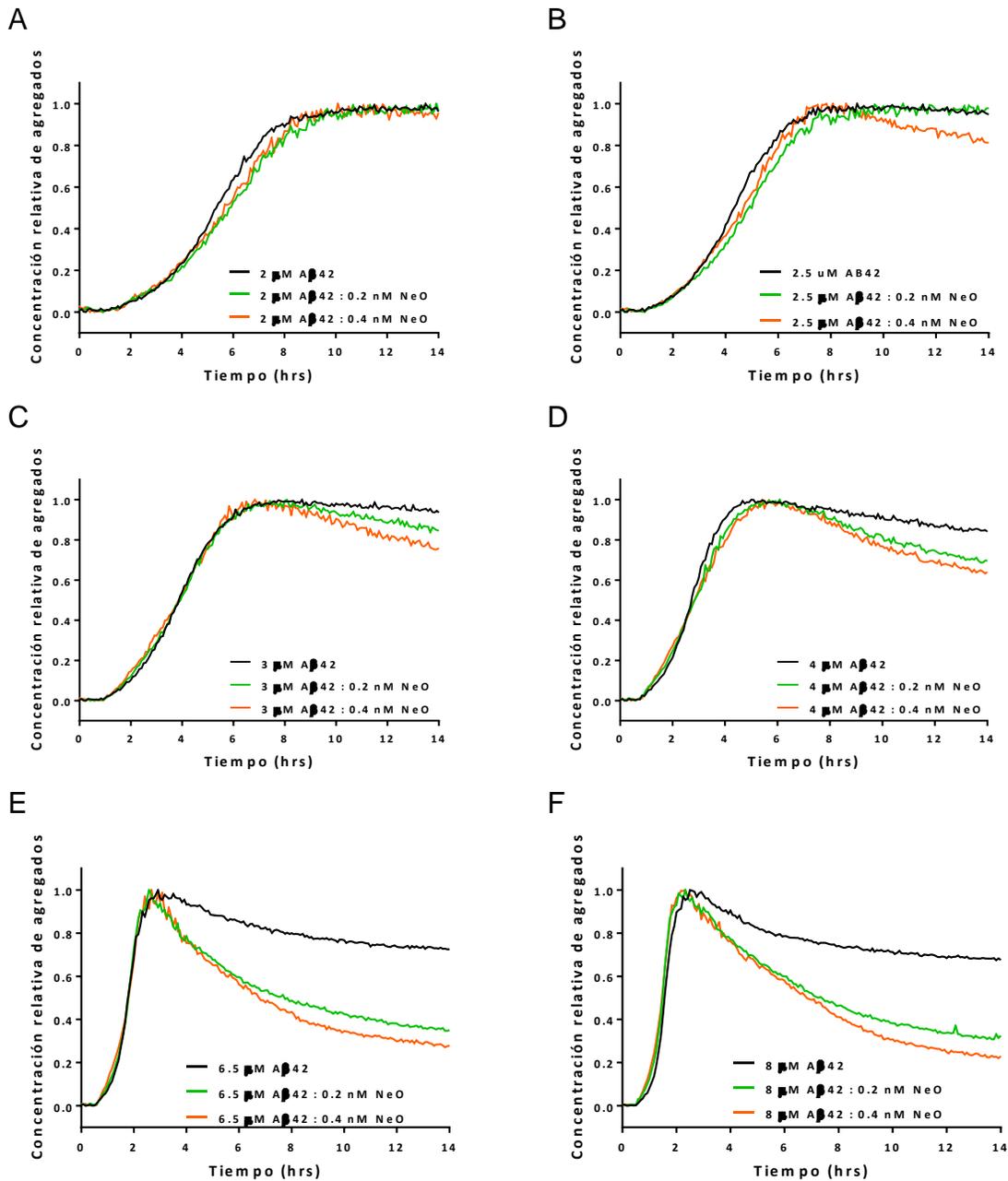


Figura 4.8 Cinéticas de agregación a diferentes concentraciones del péptido Aβ42 analizadas a diferentes concentraciones de NeO. Se realizó el desglose para cada concentración de Aβ42. La línea negra corresponde al control de Aβ42 en ausencia de NPO (n=3, muestras independientes).

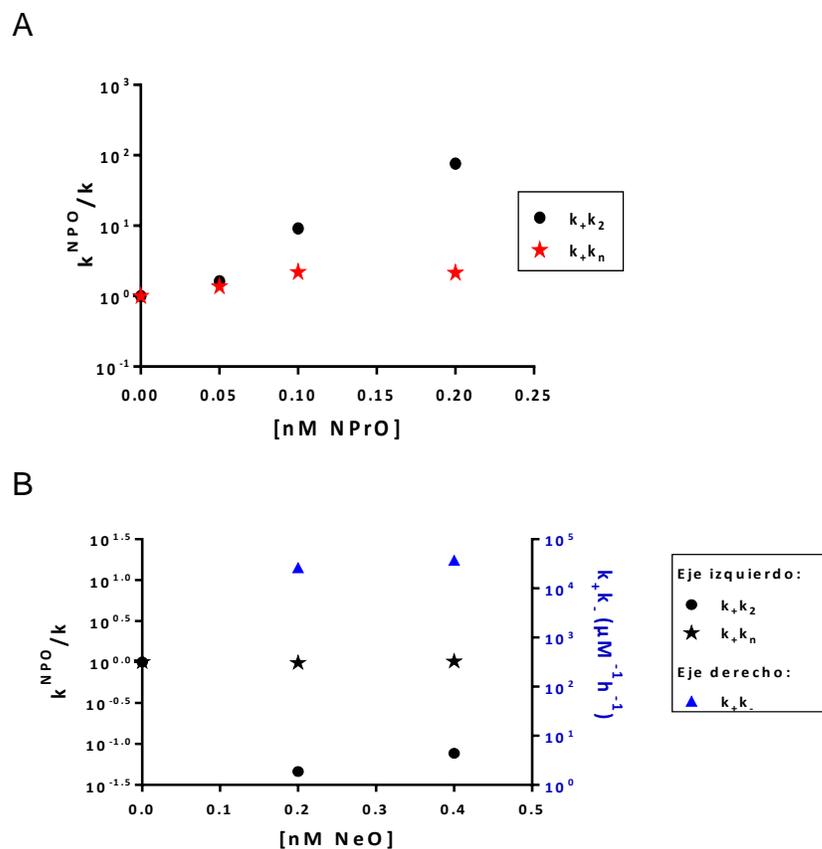


Figura 4.9 Dependencia de las constantes combinadas como función de la concentración de NPrO (A) y de NeO (B). La razón de cada constante combinada obtenida en presencia de NPO está representada por k^{NPO} (que corresponde ya sea a $k_{+}k_{2}$ y $k_{+}k_{n}$) en relación a las misma contante combinada en ausencia de NPO representada por k (que corresponde ya sea a $k_{+}k_{2}$ y $k_{+}k_{n}$) ($n=3$, muestras independientes).

Capítulo 5: Determinación de la interacción entre curvatura de NPO con A β 42.

4.1 Efecto de NPO sobre la estructura final de las fibras de A β 42

A continuación, para comprender si el efecto observado de NPrO o NeO sobre el proceso de agregación del péptido A β 42 no es tan sólo a nivel cinético sino también a nivel estructural, se analizó mediante dicroísmo circular las fibras de A β 42 en ausencia o presencia de las NPO al tiempo final de la cinética de agregación. Como control inicial se analizó el péptido A β 42 en su forma monomérica antes de realizar el ensayo, en el cual se observa la señal característica para un *random coil* (Fig. 5.1) ya que A β 42 en este estado no presenta estructura.

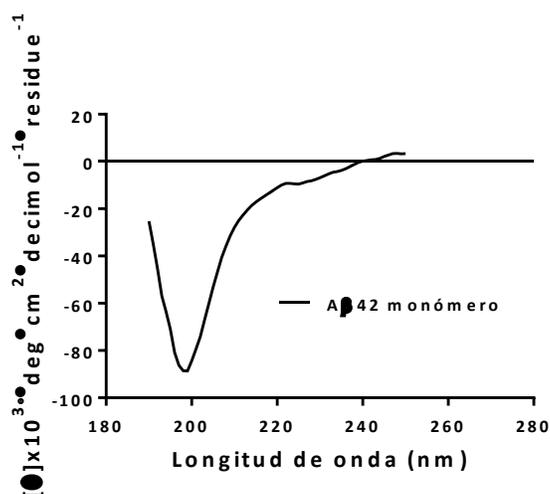


Figura 5.1 Espectro DC representativo para el péptido A β 42 monomérico después de la purificación mediante SEC-FPLC y antes de ser usado en el ensayo de cinética de agregación.

Luego, se evaluó mediante DC las muestras de fibras de A β 42 en ausencia o presencia de NPO. Como se observa en la figura 5.2a, los agregados de A β 42 en ausencia de NPO presentan la señal característica para una estructura hoja β , lo cual también da cuenta del proceso de agregación del péptido A β 42, que está definido como la ganancia de estructura β desde un *random coil*. A continuación, al comparar esta señal con la de las fibras en presencia de ambas NPO se observa que la forma del espectro de

DC no se ve alterada independiente de la NPO usada (Fig. 5.6a). Mediante el *software* de acceso libre BeStSel, se ajustaron estos espectros de DC para predecir el contenido de estructura secundaria de las fibras bajo estas tres condiciones (Fig. 5.6b), donde los porcentajes del análisis para cada una de las estructuras fue el mismo para todas las condiciones. *De esta forma, se descartó que el efecto diferencial obtenido para cada una de las NPO sobre el proceso de agregación de Aβ42 sea debido a una alteración en la estructura secundaria de las fibras de Aβ42.*

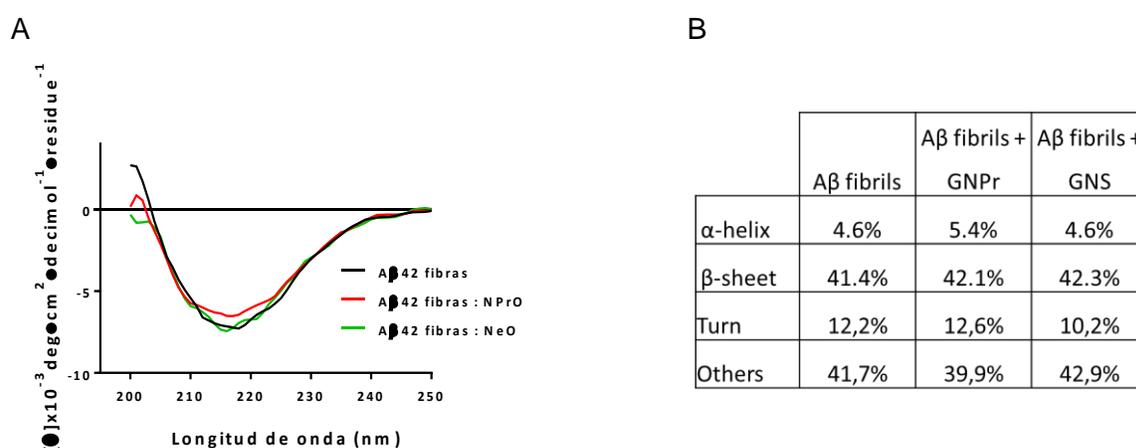


Figura 5.2 Evaluación mediante DC de las fibras de Aβ42 en ausencia o presencia de NPO al tiempo final de 18 hrs del ensayo de agregación. A, comparación de los espectros de las fibras de Aβ42 en ausencia de NPO (línea negra), en presencia de NPrO (línea roja) y en presencia de NeO (línea verde). B, deconvolución de los espectros de DC mediante el *software* BeStSel para predecir y calcular el contenido de estructura secundaria de las fibras de Aβ42 para cada una de las condiciones previamente analizadas (n=3, muestras independientes).

5.2 Evaluación de la morfología de fibras de Aβ42 mediante TEM

A continuación, ya que la presencia de las NPO modificó las cinéticas de formación de fibras, es que se analizó la morfología de estas para corroborar los resultados obtenidos en las cinéticas de Aβ42. Las muestras para ambas NPO fueron analizadas mediante microscopía electrónica de transmisión TEM a tiempo final de las cinéticas y utilizando las muestras 8μM de Aβ42. En la figura 5.3 se

puede observar la colocalización de tanto los NPrO (Fig. 5.3a) como las NeO (Fig. 5.3b) con las fibras de A β 42.

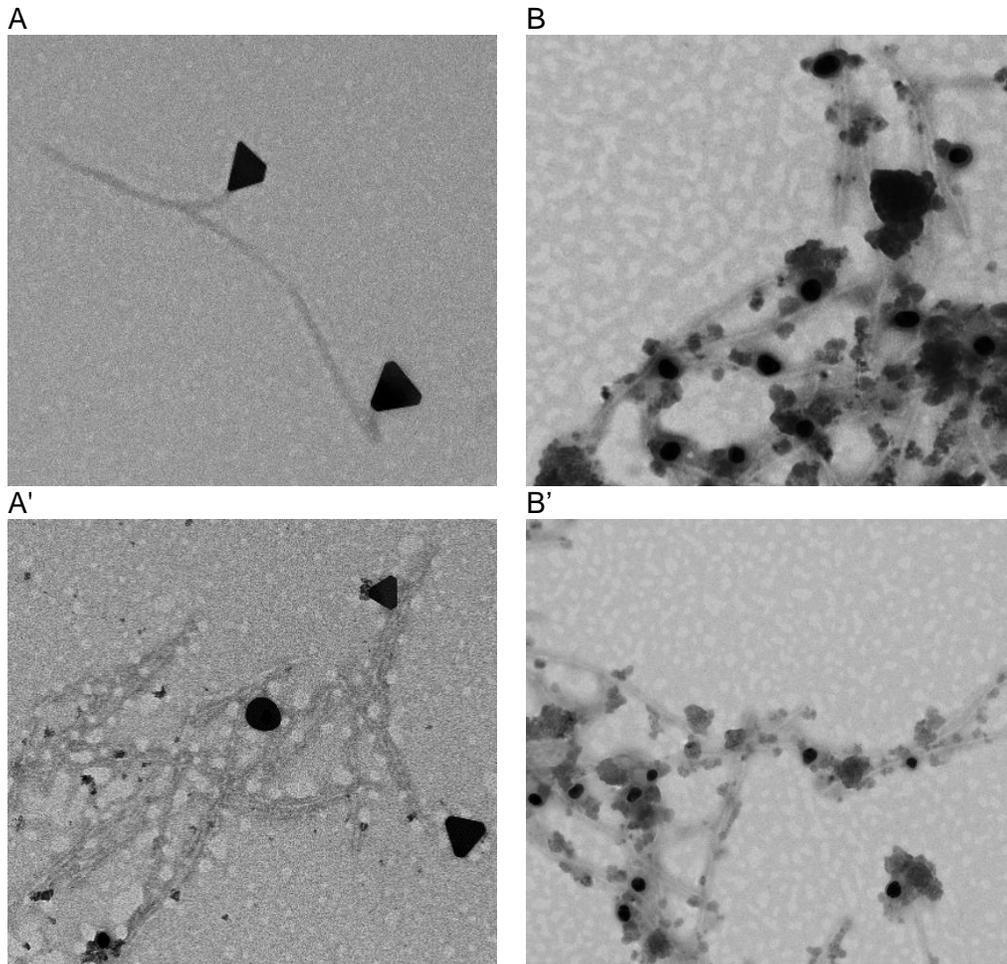


Figura 5.3 Imágenes TEM representativas de la interacción y colocalización entre A β 42 ya sea con NPrO (A,A') o con NeO (B, B'). Las imágenes TEM fueron adquiridas a las 18 hrs de incubación y corresponden a las muestras de 8 μ M de A β 42.

Para determinar el efecto de la presencia de las NPO sobre la morfología de las fibras de A β 42, se realizó un análisis del largo de las fibras de A β 42 tanto en ausencia como en presencia de NPO (Fig. 5.4a-c). Se analizaron aproximadamente 100 fibras por condición las cuales se muestran en los histogramas de distribución de tamaño del largo de las fibras (Fig. 5.4d-f), en el

cual no se observó diferencia en el promedio del largo de las fibras entre las distintas condiciones. Sin embargo, se observa que la forma de los histogramas es distinto para cada una de las condiciones analizadas, lo cual es más evidente al realizar un análisis de las medianas, que corresponde al valor central de un conjunto de datos (Fig. 5.5). De esta forma, el análisis de la mediana para cada muestra permite determinar el comportamiento y largo de la población de fibras. En presencia de los NPrO se observa un aumento de la mediana con respecto al control, lo cual implica que la población de fibras es mucho más larga lo que se correlaciona con los resultados obtenidos de las cinéticas de agregación, ya que al aumentar la velocidad de agregación de A β 42 es más probable encontrar fibras de mayor longitud. Por otro lado, en presencia de NeO la mediana obtenida del histograma es menor con respecto a la del control sin NPO. Esto quiere decir que la población de fibras esta desplazada hacia un tamaño menor, lo cual también se correlaciona con lo obtenido en las cinéticas de agregación en presencia de NeO donde la fragmentación de las fibras ya formadas puede contribuir al aumento de la población de fibras más cortas. *Cabe destacar, que aun cuando ambas NPO presentan cinéticas a concentración de 8 μ M de A β 42 similares (Fig. 4.5), las medianas obtenidas del análisis estadístico son diferentes lo que refuerza que ambas NPO participan por mecanismos distintos en el proceso de agregación de A β 42.*

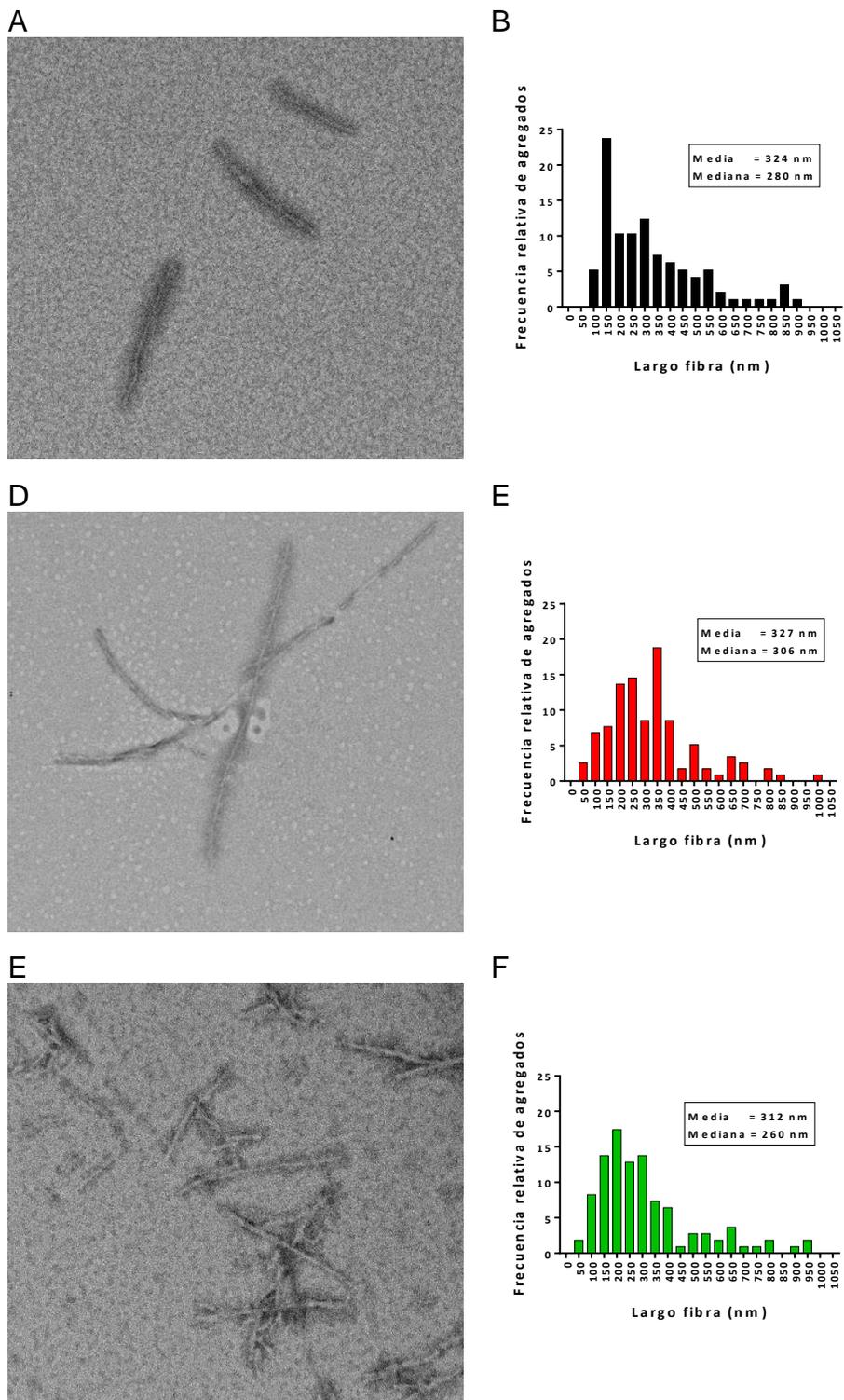


Figura 5.4 Imágenes TEM en ausencia y presencia de NPO representativas para cada condición. Histogramas de distribución del largo de las fibras utilizando la muestra a $8\mu\text{M}$ de $\text{A}\beta_{42}$ después de 18 hrs de incubación en ausencia de NPO (A y B), en presencia de NPrO (C y D) y en presencia de NeO (E y F). Las imágenes TEM son representativas de cada etapa y los histogramas corresponden a un análisis de 100 fibras por condición.

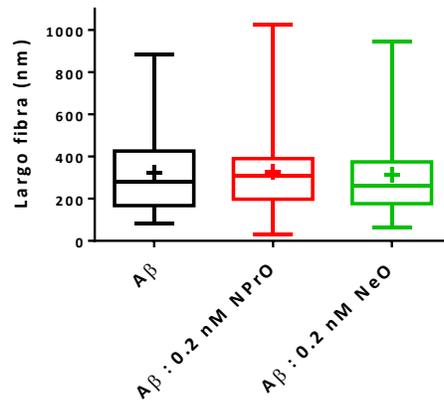


Figura 5.5 Análisis estadístico mediante un diagrama de caja y bigotes para el largo de las fibras de Aβ42 en ausencia de NPO (negro), en presencia de NPrO (rojo) y en presencia de NeO (verde). La cruz representa la media de los valores y la línea del medio de cada caja corresponde a la mediana de cada población de fibras.

Adicionalmente, para corroborar la interacción y colocalización entre las NPO con las fibras de Aβ42 vistas por TEM y eliminar la posibilidad de que sea un artefacto de la metodología, se realizó el experimento nuevamente pero adicionando las NPO a una suspensión de fibras Aβ42 ya crecidas después de 18 hrs. Esta mezcla se dejó durante 30 minutos a temperatura ambiente, se recuperó una alícuota de 10 μL y se analizó mediante STEM, donde nuevamente se observa la colocalización de ya sea los NPrO (Fig. 5.6a) o NeO (Fig. 5.6b) con las fibras de Aβ42.

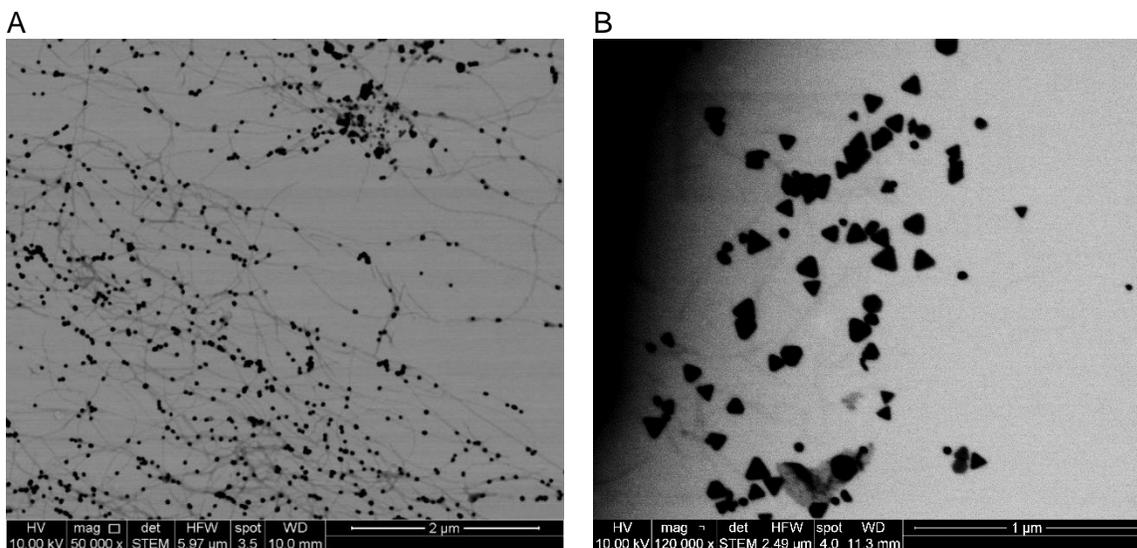


Figura 5.6 Imagen STEM representativas de NPrO (A) o NeO (B) incubadas con fibras de A β 42 posterior a su proceso de formación.

5.3 Evaluación de la interacción de NPO con fibras de A β 42

La interacción observada por cada NPO con A β 42 también se evaluó desde el punto de vista de la formación de la corona de proteínas de A β 42, la cual corresponde a la capacidad que tienen las NPO de adsorber proteínas/péptidos sobre su superficie. Para llevar a cabo esto, una vez terminado el ensayo cinético se recuperó parte de la muestra y mediante centrifugación se separaron las NPO de las fibras de A β 42 y se analizaron mediante espectrofotometría Vis-IR, potencial ζ y DLS (Tabla 5.1). Nuevamente, estos análisis se realizaron sobre las muestra de 8 μ M de A β 42 a tiempo final de la cinética de agregación, es decir, luego de 18 hrs de coincubación. Por espectrofotometría se observa un desplazamiento batocrómico del plasmón de 2 y 3 nm para las NeO y para el plasmón en el infrarrojo cercano de los NPrO, respectivamente. Este desplazamiento es característico cuando hay formación de la corona de proteínas

que rodea las NPO^{102, 103}. Con respecto al valor del potencial ζ este también se vio modificado hacia valores menos negativos comparados a las muestras de NPO sin incubación con el péptido A β 42. Esta modificación también permite determinar la presencia de pequeños agregados de A β 42 adsorbidos sobre la superficie del PEG para ambas NPO. Sin embargo, al analizar las muestras mediante DLS aun cuando se observa una tendencia a aumentar su diámetro hidrodinámico para ambas NPO, estos cambios no fueron estadísticamente significativos lo cual se puede deber a la sensibilidad de la técnica y a que los agregados adsorbidos sobre la superficie de ambas NPO son muy pequeños. *Por lo tanto, tomando en conjunto los resultados de estas tres metodologías se puede sugerir que el péptido A β 42 efectivamente interacciona con las NPO.*

Tabla 5.1 Comparación fisicoquímica de NPrO y NeO recuperadas a tiempo final de la cinética de agregación en ausencia y presencia de A β 42 (n=3, muestras independientes).

	NPrO	NPrO : Aβ42	NeO	NeO : Aβ42
Plasmón (nm)	916	919	531	533
DLS (nm)	83.3 \pm 1.1	89.5 \pm 3.8	75.2 \pm 1.9	79.2 \pm 0.6
Potencial ζ (mV)	-43.3 \pm 1.6	-29.5 \pm 0.3	-48.3 \pm 1.2	-29.8 \pm 0.9

5.4 Análisis Raman de la interacción de A β 42 sobre cada NPO

A continuación, se evaluó como la curvatura de cada NPO afecta la interacción y comportamiento del péptido A β 42 sobre la superficie de cada NPO y

así determinar la naturaleza de la interacción entre estas. Este análisis se realizó mediante espectroscopía Raman, la cual permite analizar la proximidad de los aminoácidos que componen las fibras de A β 42 sobre la superficie de NPrO y de NeO, y por tanto dan cuenta del comportamiento de A β 42 en presencia de cada NPO. Primero, se registró el espectro Raman de las fibras de A β 42 en ausencia de NPO (Fig. 5.7 línea negra) para obtener el patrón de señales de la situación control. De este espectro se seleccionaron las señales Raman de tres aminoácidos que fueron los que mostraron una señal más definida y que permiten un mejor seguimiento de lo que ocurre con el péptido A β 42 sobre la superficie de ambas NPO: Tirosina (Tyr, Y), Fenilalanina (Phe, F) y Metionina (Met, M) como se puede observar en la siguiente secuencia para A β 42 “DAEFRHDSG**Y**EVHHQKLV**FF**AEDVGSNKGAIIGLM**M**VGGVVIA”. Además estos tres aminoácidos están localizados en diferentes porciones de la estructura del péptido A β 42 en su estado agregado el cual es de una hoja β con un *loop* en la mitad de la secuencia. Tyr está localizado en el primer segmento del N-terminal de A β 42 mientras que las Phe's están localizadas al final de este, justo antes de comenzar el *loop*. Por otro lado, Met está localizado en la mitad del segmento C-terminal, el cual es parte de una región apolar y que por ende no está expuesto al solvente. De esta forma, el seguimiento de las señales de estos tres aminoácidos permite determinar proximidad de estas tres regiones de A β 42 con la superficie de cada NPO. En la tabla 5.2 se resumen las señales de Raman y sus asignaciones.

Tabla 5.2 Asignaciones específicas de las señales Raman para las muestras de fibras de A β en ausencia o presencia de NPO.

Raman A β fibras	Raman A β fibras : NPrO	Raman A β fibras : NeO	Asignación
532	530	532	ThT
-	631	633	PEG
699	700	701	M
830	-	-	(Y)/(G)
867	850	853	(Y)
1002	1004	1008	(F)
1174	1167	1182	(Y)
1405	1401	1409	(Y)
1598	-	-	(F)
-	1611	-	Amide I

Las señales Raman de ThT y PEG, muestran la misma relación de intensidades relativas entre ambas en cada uno de los tres espectros de la figura, lo que indica que son especies que no sufren cambios geométricos como consecuencia de alguna interacción química con respecto a A β en presencia o ausencia de NPO. Sobre la sonda de fluorescencia ThT, es posible indicar que no influye sobre la estructura de A β dado que la banda vibracional a 530 cm⁻¹, inherente de ThT, no sufre grandes modificaciones en términos de corrimiento, considerando que esta señal está asignada a una deformación CSC del fragmento tiazol. Por otro lado, la señal más intensa del PEG unido a una superficie de las NPO, es observada en torno a los 640 cm⁻¹, señal asignada al modo estiramiento C-S. La relación de intensidad de ThT y PEG con respecto a los tres aminoácidos

ya antes mencionados será utilizada como guía para determinar la proximidad de estos a la superficie metálica. Con respecto a $A\beta$, del espectro Raman se observa que Tyr muestra la tendencia a acercarse a la superficie metálica de las NeO más que a la de los NPrO, dado que sus señales son más intensas en el sistema conformado por NeO. La señal ubicada a los 1182 cm^{-1} asociada a la deformación en el plano de los -CH aromáticos da indicios de lo que ocurre en esta fracción. Con respecto a las dos Phe's unidas entre sí, se observa que esta región está distanciada de la superficie de ambas NPO aunque ligeramente más cerca de las NeO que de los NPrO. Este análisis deriva luego de observar que decrece la intensidad relativa de la señal principal de Phe ubicada a 1002 cm^{-1} . Las reglas de selección SERS (del inglés *Surface Enhanced Raman Spectroscopy*) permiten inferir sobre este hecho. Finalmente, la intensidad relativa de la señal asociada al aminoácido Met, con respecto a las señales de PEG y THT, indica que aun cuando la proximidad de este aminoácido está alejada de la superficie de ambas NPO existe una mayor cercanía con los NPrO más que con las NeO. Además, se observa que Met no sufre cambios estructurales al analizar el corrimiento nulo de esta señal que en los tres casos se posiciona en entorno a los 700 cm^{-1} .

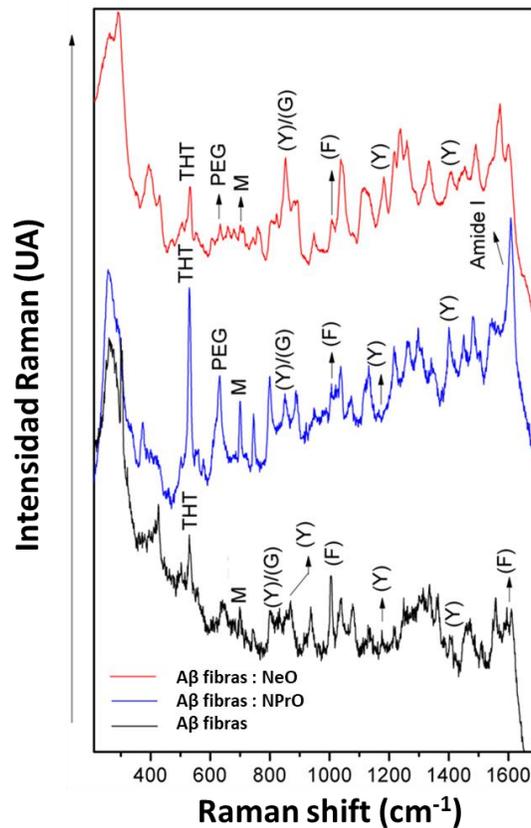


Figura 5.7 Espectro Raman representativo de fibras de A β en ausencia o presencia de NPO. Espectro de fibras de A β usadas como control en ausencia de NPO (línea negra), en presencia de NPrO (línea azul) y en presencia de NeO (línea roja).

Adicionalmente, una evidencia interesante respecto de la presencia de los agregados con estructura hoja β , es aquella observada a partir de su señal característica entorno a los 1620 cm^{-1} , asignada a la deformación compuesta mayoritariamente por un estiramiento C=O acoplada a una menor componente del estiramiento fuera de fase del enlace C-N. La señal indicada es visible con una mayor intensidad relativa en el espectro de Raman de las fibras de A β cuando están en presencia de los NPrO. No ocurre lo mismo cuando están en presencia de las NeO, dado que no se observa señal alguna en torno a los 1620 cm^{-1} . *Estos resultados sugieren que hay una mayor cercanía de las estructuras de hoja β*

sobre la superficie de los NPrO con respecto a las NeO, y que por ende poseen una estructura mucho más compacta sobre estos.

Finalmente, se evaluaron los espectros de los controles correspondientes a perfiles Raman de NeO y NPrO en ausencia y en presencia de ThT. La preparación de estas NPO considera inicialmente su suspensión en buffer fosfato y funcionalización con PEG (Fig. 5.8), donde las señales de ambos no son visibles. Por otro lado, las señales de ThT sobre NPrO y NeO son visibles en cada caso a 530 y 850 cm^{-1} las que están asignadas a modos de deformación del fragmento tiazol y deformación en el plano de $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$, respectivamente. Basado en las reglas de selección SERS, la asignación propuesta para estas señales e intensidad de ambas, se establece una orientación distinta en cada superficie. Este es el motivo por el que se visualizan dos espectros SERS en presencia de ThT diferentes.

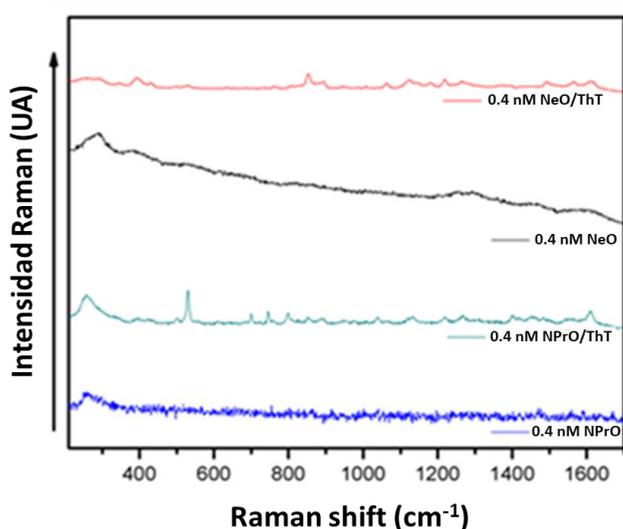


Figura 5.8 Espectro Raman representativo de NPO funcionalizadas con PEG, solubilizadas en el buffer fosfato de las cinéticas de agregación en presencia o ausencia de ThT. 0,4 nM de NeO en presencia de ThT (línea roja) o en ausencia (línea negra), 0,4 nM de NPrO en presencia de ThT (línea cian) o en ausencia (línea azul).

Capítulo 6: Discusión de resultados, conclusiones y proyecciones

6.1 Discusión de Resultados

6.1.1 Síntesis y caracterización de NPO

En la presente tesis de doctorado, el objetivo principal fue determinar como la forma de las NPO puede alterar las cinéticas de agregación del péptido A β 42, por lo cual se planteó la obtención de dos NPO con características fisicoquímicas similares y que solamente variaran en la forma que poseen estas: una forma plana exhibida por nanoprismas de oro (NPrO) y otra forma curva correspondiente a las nanoesferas de oro (NeO).

Ya que los NPrO poseen una forma anisotrópica, su síntesis es mucho más compleja y por lo cual aun cuando ésta estaba descrita en literatura¹⁰⁴, se tuvo que caracterizar completamente esta síntesis debido a la falta de reproducibilidad de los datos obtenidos desde la literatura. La síntesis de NPrO es un procedimiento relativamente sencillo que consta de una solución de oro a la cual se le adiciona un primer volumen de tiosulfato de sodio el cual permite la generación de semillas y que bloqueará las caras {1,1,1} permitiendo dar la forma de prisma a la NPO⁹²,⁹³. Luego un segundo volumen de tiosulfato de sodio es usado para dar término a la reacción. Sin embargo, además de no lograr la reproducibilidad reportada en la literatura se observó que esta síntesis es muy sensible a pequeñas variaciones en concentraciones de los reactantes o a la temperatura de reacción. Es así como se determinó que la relación de reactantes (solución áurica/tiosulfato de sodio) es un paso fundamental en esta síntesis. Mientras más átomos de oro estén presentes en la solución más grandes serán los prismas a una concentración constante de tiosulfato. Por otro lado, al variar la concentración de tiosulfato de sodio se obtuvo

que el tamaño del prisma es inversamente proporcional a la concentración de tiosulfato de sodio utilizado. Mientras más concentrado sea la solución de tiosulfato de sodio el tamaño del prisma será más pequeño y mientras más diluida el tamaño del prisma será más grande. Este paso es clave ya que pequeñas variaciones en la concentración de este agente reductor provocan variaciones muy grandes en el tamaño del prisma. De esta forma, se obtuvo la razón de volúmenes para los reactantes de 1,0:1,2;0,2 que corresponden a solución de oro, primer volumen de tiosulfato y segundo volumen de tiosulfato, respectivamente.

Otro de los inconvenientes que presentó esta síntesis es la presencia de nanoesferas de oro (NeO) de pequeño tamaño, 20 nm aprox., como subproducto de la síntesis de NPrO. En literatura está descrito que se puede controlar el tamaño de las NPO mediante la modificación de la temperatura de reacción¹⁰⁵. Al analizar este parámetro se determinó que al disminuir la temperatura de reacción, la formación de NPrO es mucho más lenta y los NPrO finales son de gran tamaño, mientras que al aumentar la temperatura del ensayo se observa que la velocidad de síntesis aumenta y el tamaño de los prismas se hace cada vez menor. Este resultado se pueden deber a que en el proceso de formación de los NPrO, primero se tienen que formar semillas o núcleos de oro Au^0 sobre los cuales se va depositando más oro Au^{3+} el cual se reduce mediante el tiosulfato presente en la solución⁹¹. Al aumentar la temperatura de reacción se aumenta la velocidad de reacción del tiosulfato y por ende hay mayor formación de núcleos o semillas donde se puede depositar el oro reducido. Sin embargo, al haber tantos sitios donde nuclear no se logra en todos llevar a cabo con éxito la generación de la

forma del prisma y muchos quedan con una forma más bien esférica, lo cual se traduce en un aumento de la población de NeO como subproducto, y que los prismas sean de menor tamaño. Por el contrario, al disminuir la temperatura de reacción, se disminuye la velocidad de reacción y por lo tanto se generan menos núcleos o semillas⁹⁴. Esto permite que al reducir el oro en solución éste se deposite en los pocos núcleos disponibles y por ende se generan prismas de mayor tamaño y además menos esferas. De esta forma, se escogió la temperatura de 20°C para realizar las síntesis de NPrO ya que permite generar prismas de un adecuado tamaño para futuras aplicaciones biomédicas.

La caracterización final de los NPrO se realizó mediante TEM, SEM, espectroscopía Visible-IR, potencial ζ y DLS, siendo esta última la más llamativa por la presencia de dos picos en las mediciones. El primero a 58 ± 3 nm se atribuye al largo de los NPrO y es un valor levemente mayor al obtenido por TEM ya que mediante DLS se mide el diámetro hidrodinámico, el cual incluye los contraiones que están rodeando al prisma. Sin embargo, la presencia de un segundo pico a 4 ± 1 nm es controversial. En literatura, este pico se ha descrito para otras NPO anisotrópicas y se ha asociado con la difusión rotacional de estas¹⁰⁶, pero también mediante análisis matemáticos se ha determinado que podría ser un artefacto de la técnica asociado a la medición de nanopartículas de un diámetro superior a 40 nm⁹⁶. Debido a esto, sólo se utilizará el primer pico para hacer un seguimiento de las muestras.

A continuación, se procedió al enriquecimiento de la muestra en NPrO^{90, 91}, ya que la síntesis genera como subproducto pequeñas NeO, mediante

centrifugación diferencial logrando un aumento de la población de NPrO desde un 30% a un 79%, con un potencial ζ relativamente constante, de -40 a -37 mV, indicando que la carga negativa en esta muestra es aportada por el grupo carboxílico que se encuentra en el extremo del PEG (se encuentra desprotonado al pH 5,5 al que se obtuvieron las mediciones). Mediante DLS, el primer pico se desplazó hacia un mayor valor (de 58 a 69 nm), lo que indica que las moléculas de PEG se encuentran unidas a la superficie de los NPrO. El PEG utilizado tiene un peso estimado de 5000 g/mol y se ha descrito que NPO con este tipo de modificación aumentan en promedio 11 nm, medido por HRTEM¹⁰⁷. Sin embargo, al calcular el tamaño teórico de un prisma rodeado de PEG este es mayor que el obtenido por DLS: 82 nm (60 nm +11x2nm, por cada extremo del prisma) comparado con 69 nm, respectivamente. Esto sugiere que aun cuando la superficie de los NPrO está funcionalizada con moléculas de PEG, estas estarían acostadas sobre la superficie y por ende quedarían espacios donde aún funcionalizar. Esto es coherente con el hecho de que al funcionalizar la muestra inicial, parte del PEG se unió a la superficie de las pequeñas NeO y por ende no estaría completamente disponible para los NPrO.

Debido a esto se procedió a funcionalizar por segunda vez los prismas con PEG. Mediante potencial ζ y DLS se obtuvieron los cambios más relevantes. La carga superficial se desplazó hacia valores más negativos, de -37 a -51 mV, lo cual sugiere que hay una mayor presencia de grupos carboxílicos y, por ende, de moléculas de PEG sobre la superficie del prisma. Por DLS se obtuvo un aumento del diámetro hidrodinámico de 69 a 77 nm. Para correlacionar este dato con los

valores obtenidos por TEM, se determinó el ancho del PEG mediante SEM, el cual fue de 11 ± 1 nm. Al calcular el tamaño promedio del NPrO este fue de 85 nm ($63 \text{ nm} + 11 \times 2 \text{ nm}$), un valor que es bastante cercano al obtenido por DLS. De las imágenes TEM también se calculó el área superficial de los NPrO desnudos y considerando el PEG, el que fue de 5400 y 13900 nm², respectivamente.

Con respecto a las NeO funcionalizadas, también se caracterizaron mediante espectrofotometría Visible-IR, TEM, SEM, potencial ζ y DLS, siendo estos dos últimos los que mostraron cambios más relevantes. La carga superficial disminuyó de -39 a -55 mV dando cuenta de una mayor presencia de carga negativa aportada por el PEG. Por otro lado, el diámetro hidrodinámico se incrementó siendo similar al obtenido de forma teórica de las imágenes TEM y SEM: 65 nm ($43 \text{ nm} + 11 \times 2 \text{ nm}$) comparado con los 75 nm obtenidos mediante DLS. El área superficial de las NeO desnudas y funcionalizadas con PEG fue 5800 y 13300 nm², respectivamente, valores muy similares a los obtenidos con NPrO.

En resumen, se lograron sintetizar dos NPO de distinta forma, NPrO planos y NeO curvas, pero con el resto de sus propiedades fisicoquímicas similares: carga superficial, diámetro hidrodinámico, y área superficial.

6.1.2 Efecto de la curvatura de NPO sobre las cinéticas de A β 42

Con respecto a las cinéticas de agregación del péptido A β 42, lo primero que se descartó fue que la concentración de ThT (empleada para monitorear el proceso de formación de agregados amiloides) alterará las cinéticas de

agregación. El rango de concentraciones de ThT (0,25 a 20 μM) analizado en este estudio no mostró una modificación de las cinéticas, lo que se condice con estudios previos que describen que hasta 50 μM de ThT no se alteran las cinéticas de A β 42⁹⁷. A continuación, se analizó un amplio rango de concentraciones de A β 42 (2 a 25 μM) ya que está descrito en literatura que a altas concentraciones del monómero inicial se produce una saturación del sistema, es decir, aun cuando se incrementa la concentración del monómero inicial se obtiene la misma velocidad de agregación⁹⁹. Ya que para los estudios cinéticos se necesita observar sólo el efecto de las NPO y descartar cualquier otra influencia que afecte las cinéticas, es que se utilizó el rango de 2 a 8 μM de A β 42, ya que sobre 8 μM se observó la saturación del sistema. Junto con esto, debido a que la concentración de 8 μM A β 42 fue la más alta usada es que utilizó la concentración de 10 μM ThT como adecuada para monitorear las cinéticas de agregación.

Para determinar el efecto de la forma de NPO sobre el mecanismo de agregación de A β 42, y cuáles serían las etapas microscópicas que se verían alteradas (Fig. 1.8), se analizó globalmente las cinéticas a distintas concentraciones del péptido A β 42 mediante el software AmyloFit⁷⁹. Este aspecto es importante debido a que los procesos microscópicos se han correlacionado con la acumulación de oligómeros tóxicos de A β 42¹⁰⁸, siendo la nucleación secundaria uno de los pasos claves que produce estos oligómeros^{100, 101}. En una primera etapa, se evaluó la situación control, es decir, las cinéticas de A β 42 en ausencia de NPO. Del ajuste global, el mejor modelo matemático que se ajustó a las cinéticas fue el de nucleación secundaria multipasos, como está reportado en

literatura, y corroborado mediante el “ γ value” que fue de -0,933. Este valor mientras más cercano a -1, indica que estamos en presencia de un mecanismo de nucleación secundaria⁹⁹⁻¹⁰¹. Por lo tanto, las cinéticas en ausencia de NPrO se correlacionan con lo reportado en la literatura para A β 42.

A continuación, en presencia de NPrO no se alteró el mecanismo de agregación de A β 42. Sin embargo, la presencia de los NPrO si aceleró las cinéticas de agregación y modificó solamente la constante combinada $k+k_2$, mostrando un efecto dosis dependiente al variar la concentración de NPrO. Ya que la constante combinada $k+k_n$ se mantuvo sin alteración con respecto a las distintas concentraciones de NPrO utilizadas, y a que ambas constantes combinadas comparten la constante k_+ , es que se puede conjeturar que el efecto de los NPrO es principalmente sobre la constante de la nucleación secundaria (k_2). Este efecto es similar al observado con la droga trodusquemina⁸³, la cual incrementa la constante de nucleación secundaria disminuyendo la generación de especies oligoméricas debido al aumento de la polimerización hacia fibras. Estos resultados se pueden explicar tanto por la forma plana de los NPrO como por la funcionalización de éstos. PEG es una molécula anfipática que posee una cola hidrofóbica y un extremo con carga negativa aportado por el grupo carboxílico, lo cual está descrito que la carga negativa mediante interacciones electrostáticas puede inducir el proceso de agregación de A β 42¹⁰⁹⁻¹¹⁵. Por otro lado, el proceso de agregación involucra una interacción entre monómeros donde la forma plana de los NPrO permitiría acomodar los monómeros de A β 42 promoviendo la formación de interacciones laterales péptido-péptido⁶¹. Este efecto ha sido descrito con otras

proteínas tales como fibrinógeno⁶⁶, donde superficies planas inducen la agregación de fibrinógeno más que superficies con algún grado de curvatura. Así, la forma plana de los NPrO podría actuar como una plataforma incrementando la concentración local de A β 42, mediante interacciones electrostática con la carga negativa del PEG, y promoviendo las interacciones entre monómeros acelerando el proceso de agregación mediante la nucleación secundaria.

Por otro lado, en presencia de NeO el modelo matemático que mejor se ajustó a estas cinéticas fue el de nucleación secundaria/fragmentación, modificando el mecanismo molecular de agregación de A β 42. Además, las NeO desaceleraron el proceso de agregación disminuyendo solamente la constante combinada k_+k_2 , mientras que las constantes combinadas k_+k_n y k_+k_- no se modificaron a las distintas concentraciones de NeO analizadas. Este efecto es similar al de la chaperona brichos¹⁰⁸, la cual específicamente suprime la etapa de nucleación secundaria, disminuyendo la formación de oligómeros. Sin embargo, debido a que no se observó un efecto dependiente de la concentración de NeO sobre las constantes combinadas, es que no se puede hacer un desglose sobre cual constante sería la más afectada por la presencia de las NeO. Para explicar el efecto de las NeO se propone que la curvatura puede impedir o molestar el correcto posicionamiento de los monómeros de A β 42 sobre la superficie de las NeO previniendo o disminuyendo las interacciones laterales péptido-péptido, haciendo más difícil que los monómeros interaccionen entre sí^{61, 67, 116}. Este fenómeno ha sido descrito en otros estudios con nanopartículas de un tamaño y carga negativa superficial similar a las NeO de esta tesis, donde proteínas son

espacialmente interrumpidas y por lo tanto los contactos entre proteínas vecinas se ven disminuidos^{66, 67}, lo que se observa como un efecto inhibitorio sobre las cinéticas. Además, ya que las NeO modificaron el mecanismo de agregación implica que tanto la etapa de nucleación secundaria como la etapa de fragmentación poseen una contribución en la formación de nuevos agregados. Se ha descrito que al enlentecer las cinéticas y por ende disminuir la constante de nucleación secundaria, la constante asociada a la fragmentación se hace visible cinéticamente¹¹⁷. Este fenómeno también ha sido descrito con la proteína Prión o el péptido A β 40, donde la desaceleración del proceso de agregación permite observar la fragmentación de las fibras^{57, 86}. De esta forma, estos estudios respaldan la hipótesis que la curvatura de las NeO puede inhibir las cinéticas de agregación de A β 42.

6.1.3 Morfología de las fibras de A β 42 en presencia de NPO

Debido a los resultados obtenidos de los ajustes matemáticos, se procedió a analizar si el efecto observado en las cinéticas también modificaba la estructura de las fibras. Para este análisis se evaluó las fibras de A β 42 a tiempo final de las cinéticas mediante dicroísmo circular. Tanto en ausencia como en presencia de las NPO se observa la señal característica para una estructura hoja β , lo cual da cuenta del proceso de agregación del péptido A β 42. Sin embargo, no se observa en ninguno de las muestras un cambio en la forma de los espectros y al analizar el contenido de estructura secundaria mediante el software BeStSel tampoco se observa una modificación tanto en ausencia como en presencia de NPO. Esto

sugiere que el efecto de ambas NPO es cinético y no estructural sobre el proceso de agregación de A β 42.

A continuación, se analizó la morfología de las fibras de A β 42 mediante TEM para corroborar los resultados obtenidos de las cinéticas. De este análisis se obtuvo que el largo promedio de las fibras es similar tanto en ausencia como en presencia de NPrO o NeO. Este resultado se condice con que en presencia de los NPrO hay una aceleración del proceso de agregación por lo cual se pueden encontrar fibras más largas pero también más núcleos de agregación o fibras cortas. Por otro lado, en presencia de NeO al haber una mayor contribución de la etapa de fragmentación se espera la presencia de fibras largas y fibras de pequeño tamaño. Debido a esto, es que se procedió a analizar las medianas como una medida del comportamiento de la población del largo de fibras. En este sentido, sí se observa un aumento del largo de la población en presencia de NPrO mientras éste disminuye en presencia de NeO con respecto al control. Estos resultados se condicen con lo reportado en literatura donde la aceleración del proceso de agregación de A β 42 promueve la presencia de fibras más largas⁸⁷, como con los NPrO, mientras la desaceleración del proceso de agregación promueve la presencia de fibras más cortas, como se obtuvo con las NeO^{57, 86}.

6.1.4 Determinación de la interacción de NPO con A β 42

En primera instancia, se observó de las imágenes TEM que tanto NPrO como NeO colocalizan con las fibras de A β 42^{56, 108}. Para corroborar este resultado

se realizó un ensayo cinético aparte del cual se recuperaron las fibras de A β 42 y se incubaron con ya sea NPrO o NeO durante 30 minutos. Estas muestras fueron analizadas por TEM donde nuevamente fue posible observar que las fibras de A β 42 se encuentran decoradas con NPrO o NeO, lo cual permite aseverar que bajo estas condiciones ambas NPO interaccionan con las fibras de A β 42.

Habiendo realizado los análisis desde el punto de vista de A β 42, a continuación se caracterizó fisicoquímicamente tanto NPrO como NeO recuperadas de las cinéticas de agregación de A β 42. Este estudio se realizó para confirmar la presencia de la llamada “corona de proteínas” y por ende corroborar la interacción de A β 42 con NPrO y NeO. Para ambas NPO se observó un desplazamiento del plasmón hacia el rojo con respecto al control, lo cual está descrito en literatura que corresponde a la formación de la corona de proteínas que rodean las NPO cuando aumenta entre 2 a 3 nm^{102, 103}. Este desplazamiento hacia el rojo ocurre cuando la NPO aumenta de tamaño, lo cual sugeriría la presencia de pequeños agregados de A β 42 sobre la superficie de ambas NPO. Además, el potencial ζ de ambas NPO aumentó hacia un valor menos negativo lo cual permite inferir que A β 42 se encuentra adsorbido en la superficie de ambas NPO. Este cambio en la carga superficial viene dado ya que A β 42 posee punto isoeléctrico cercano al pH de análisis de la muestra (entre 5 a 5,5) y de esta forma contribuye a restar la carga negativa de la superficie de las NPO. No obstante, al analizar las muestras por DLS se observa una ligera tendencia a aumentar el diámetro hidrodinámico de ambas NPO, la cual no fue estadísticamente significativa. Esto se puede deber a la sensibilidad del equipo y por ende los

agregados de A β 42 adsorbidos en la superficie de ambas NPO podrían ser muy pequeños para ser detectados por éste. Otra posible explicación es que se forme la denominada “*soft corona*”^{118, 119}, la cual implica la formación de interacciones más débiles entre el péptido A β 42 y la superficie de ambas NPO, y por ende es más fácil que se desprendan los agregados de A β 42 con la manipulación de la muestra. Por lo tanto, tomando estos resultados en conjunto se puede sustentar el hecho de que efectivamente A β 42 interacciona con la superficie de NPrO y de NeO. Además, esta información se condice con estudios previos que han mostrado que las moléculas de PEG no son moléculas completamente inertes¹⁰², y que al poseer una carga negativa en su extremo (debido a la presencia de un grupo carboxílico) pueden promover la adsorción de A β 42 sobre la superficie de nanopartículas mediante una interacción electrostática.

6.1.5 Efecto de la curvatura de NPO en la interacción con A β 42

A continuación, se analizó el comportamiento de A β 42 sobre la superficie de ambas NPO con el fin de obtener indicios acerca de las interacciones locales entre estas mediante espectroscopia Raman^{73, 88, 89}. Para este análisis, se utilizaron las señales de tres aminoácidos: Tyr10, Phe19,20 y Met35, los cuales están localizados en diferentes regiones de la estructura del péptido A β 42 en su estado agregado. Tyr y Phe representan el extremo N-terminal de A β 42 en el estado agregado (Tyr se encuentra en la parte inicial mientras que las Phe están en la parte final del extremo N-terminal (justo antes del loop) mientras que Met está localizada en la porción media del extremo C-terminal^{12, 120, 121}). Por lo tanto,

las señales de estos tres residuos permiten determinar modos de interacción diferencial considerando la proximidad de estas regiones entre el péptido A β 42 con la superficie de curva de las NeO o plana de los NPrO. De forma interesante, nuestro estudio mostró una intensidad diferente para cada uno de estos residuos con la presencia de cada NPO. Este resultado sugiere que la interacción entre estas regiones con la superficie de cada NPO es diferente y depende de la forma que posee la NPO, ya que es la única característica en que difieren éstas. En la presencia de NPrO, Tyr y Met muestran un aumento de intensidad de su señal lo que da cuenta de una mayor proximidad con la superficie de los NPrO mientras que la intensidad de señal para Phe es menor y por lo tanto esta se encuentra más alejada de la superficie del NPrO (Fig. 6.1a). La localización espacial de este último aminoácido es muy importante ya que la Phe participa directamente en el proceso de agregación permitiendo el alargamiento de las fibras mediante interacciones de tipo “ π stacking” con otros monómeros¹²²⁻¹²⁴. Así, la superficie plana de los NPrO puede estar actuando de un modo dual: por un lado incrementado la concentración local de A β 42 a través de interacciones con Tyr y Met, como si fuesen puntos de anclaje, y por otro lado promoviendo las interacciones monómero-monómero gracias a la Phe libre y de esta forma, aumentando el proceso de agregación a lo largo de la superficie plana del NPrO. Adicionalmente, de los espectros Raman se observa un aumento de la intensidad de la señal que corresponde a estructuras β , lo cual puede indicar la presencia de un alto contenido de estructura secundaria β sobre la superficie del NPrO. Estos resultados proveen mayor evidencia para sustentar la hipótesis de que la forma plana del NPrO actúa como una especie de plataforma sobre la cual los

monómeros de A β 42 adoptan una posición que promueve las interacciones intermoleculares, lo que se traduce finalmente en una aceleración de las cinéticas de agregación.

Con respecto a las NeO, del espectro Raman se observa una alta proximidad de Tyr sobre la superficie curva de las NeO, mientras que las Phe se encuentran menos cerca y la Met es el más alejado de la superficie de las NeO (Fig. 6.1b). En este caso, los monómeros de A β 42 solo tendrían un aminoácido como punto de anclaje a la superficie curva de las NeO y ya que la Phe también estaría más cerca de la superficie de éstas, podría significar que el extremo N-terminal de A β 42 estaría adsorbido sobre la superficie del PEG. Como se mencionó antes, Phe genera contactos importantes entre monómeros que promueven la agregación, por lo cual al encontrarse ligeramente adsorbido en el PEG el proceso de agregación se vería entorpecido o desacelerado. Esto se puede explicar debido a que la curvatura de las NeO puede provocar que queden espacios entre las moléculas de PEG, por los cuales se podrían adsorber y ocultar ciertas zonas del péptido A β 42. Por otro lado, el PEG sobre una superficie plana, como la de los NPrO, no tiene tanta libertad y por ende se encuentran apilados entre sí sin dejar espacios entre ellos. Esto se ha observado en esferas funcionalizadas con oligonucleótidos los cuales dejan espacios entre si debido a la curvatura de las esferas¹²⁵. De esta forma, estos espacios podrían facilitar la interacción del residuo Phe con la parte hidrofóbica del PEG y por ende del extremo N-terminal del péptido A β 42. Esto se correlaciona con lo observado por Raman donde el extremo N-terminal (que posee residuos hidrofóbicos) posee una

mayor cercanía con la estructura metálica de las NeO, y en estudios previos de dinámica molecular en los cuales se determinó que el PEG tiene una tendencia a interactuar con el extremo N-terminal de A β 42 debido a sus características anfifílicas¹²⁶. Por lo tanto, estos resultados corroboran lo observado en las cinéticas donde el proceso de agregación se desacelera por la presencia de las NeO modificando el mecanismo de agregación hacia un mecanismo de nucleación secundaria/fragmentación.

Los resultados obtenidos se condicen con lo descrito para el proceso de agregación que ocurre sobre superficies con carga negativa, tales como las membranas biológicas de las neuronas. En este sentido, aun cuando el péptido A β 42 posee un punto isoeléctrico cercano a 5.5¹²⁷, el extremo N-terminal de A β 42 presenta una elevada densidad de cargas positivas¹¹⁴, lo cual predomina y le confiere la capacidad de interactuar tanto con cargas negativas como las de gangliósidos (GM1)¹²⁸ y fosfolípidos¹²⁹, así como también con otro tipo de moléculas como colesterol¹³⁰ que están presentes en la membrana neuronal. Estudios de agregación de A β 42 en presencia de líquido cefalorraquídeo o de membranas fosfolipídicas han demostrado que una de las etapas primordiales que domina el proceso de agregación es la nucleación secundaria^{129, 131}, en la cual la superficie de las fibras ya formadas cataliza la generación de nuevas especies intermediarias oligoméricas que son tóxicas. De hecho, estudios realizados en modelos murinos a los cuales se les inyectó pequeñas fibras de A β mostraron una aceleración del proceso de agregación¹³², soportando que *in vivo* las fibras inyectadas actúan como una plantilla o superficie que promueve la agregación

mediante la nucleación secundaria. Estos resultados también fueron observados en estudios de dinámica molecular¹³³. Así, la nucleación secundaria es una de las etapas clave en la generación de nuevos oligómeros¹⁰¹, a los cuales se les han atribuido un sin número de efectos tóxicos debido a su alta reactividad. Dentro de estos efectos, se encuentra la capacidad de interactuar con membranas biológicas generando poros lo cual conlleva a un desbalance quimiosmótico con la consiguiente muerte neuronal^{26, 134, 135}. En este sentido actualmente existen dos estrategias para disminuir la concentración de oligómeros tóxicos en estado estacionario: utilizar inhibidores para enlentecer la cinética de formación de oligómeros o catalizadores para acelerar el proceso de agregación y convertir los oligómeros en fibras¹³⁶. Con respecto al uso de inhibidores, una de las principales desventajas de esta estrategia es la concentración del inhibidor¹⁰⁸, ya que para interactuar con la mayor cantidad de especies oligoméricas se requiere mantener altas concentraciones del agente inhibitorio, que es más complejo de lograr en sistemas *in vivo*. Junto con esto, enlentecer este proceso no detiene la formación de oligómeros, sólo lo retrasa. Además, en este sentido aun cuando las NeO desaceleran el proceso de agregación, promueven la fragmentación de las fibras lo que puede producir especies de menor tamaño similares a los oligómeros, lo cual contribuiría constantemente a generar especies oligoméricas, aumentando su concentración y por ende la toxicidad de la muestra. Por otro lado, el uso de agentes catalizadores como los NPrO aceleran el proceso de agregación, específicamente la nucleación secundaria, y podrían aumentar la tasa de formación de oligómeros⁸³. Sin embargo, aun cuando la concentración de oligómeros se puede incrementar, cabe destacar que estos quedan disponibles

para el proceso de elongación mediante el cual se convertirían en especies de mayor peso molecular, fibras por ejemplo, que son mucho más estables y menos tóxicas que los oligómeros¹³⁶. De esta forma, el uso de agentes catalizadores en el proceso de agregación disminuye la concentración de los oligómeros tóxicos en el tiempo y por ende la toxicidad de la muestra. Por lo tanto, los resultados obtenidos con ambas NPO se correlacionan con lo descrito en literatura, donde el uso de moléculas que aceleren el proceso de agregación ha emergido como una estrategia interesante mediante la cual disminuir la presencia de intermediarios oligoméricos tóxicos^{83, 87, 136, 137}.

En conclusión, en este trabajo se logró describir y determinar el mecanismo molecular de tanto NPrO como NeO sobre el proceso de agregación de A β 42 y cómo, sólo modificando la forma de la NPO, estas pueden alterar el comportamiento de A β 42 y su agregación sobre la superficie de las NPO. Esta información es valiosa debido a que solo modulando la forma de la NPO se puede inducir un comportamiento de A β 42 completamente diferente y desplazar el equilibrio del proceso de agregación hacia la formación de fibras, disminuyendo la concentración de especies intermediarias tóxicas con una superficie plana o por una superficie curva enlenteciendo el proceso de agregación. Así, esta investigación tendría un alto impacto a la hora de seleccionar la forma de la NPO a utilizar y en un potencial uso en el futuro diseño de estrategias que permitan el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

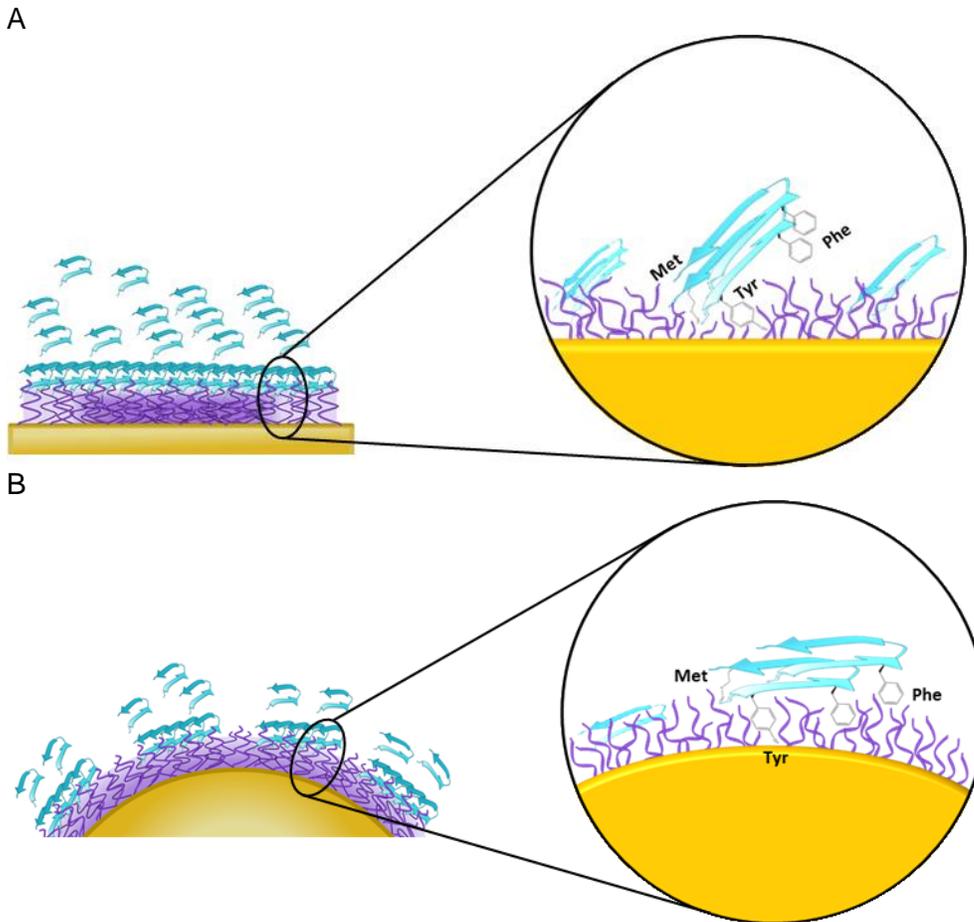


Figura 6.1 Modelo propuesto para el mecanismo molecular de las NPO sobre el proceso de agregación de A β 42. Los residuos Tyr, Phe y Met están localizados en posiciones clave de la conformación canónica de A β 42 en el estado agregado. A, la superficie plana de los NPrO acelera el procesos de agregación mediante el incremento de la concentración local y promoviendo las interacciones péptido-péptido entre los monómeros de A β 42. B, la superficie curva de las NeO impide la correcta acomodación o posicionamiento de los monómeros de A β 42 sobre la superficie de las NeO, y de esta forma, desacelera el proceso de agregación dificultando la interacción péptido-péptido.

6.2 Conclusiones

- Se obtuvieron dos nanosistemas NPrO y NeO, funcionalizados y estabilizados con PEG, con propiedades fisicoquímicas similares donde solamente varía la curvatura que poseen ambas NPO.
- NPrO aceleraron las cinéticas de agregación de A β 42 sin modificar el mecanismo de agregación de nucleación secundaria multipasos. El efecto estaría dado mayoritariamente sobre la etapa de nucleación secundaria.
- NeO desaceleraron las cinéticas de agregación de A β 42 y además si modificaron el mecanismo de agregación de una nucleación secundaria multipasos a una nucleación secundaria/fragmentación.
- La presencia de NPrO o de NeO afecto al proceso de agregación de A β 42 desde el punto de vista cinético y no alteró la estructura secundaria de los agregados de A β 42.
- Ambas NPO modificaron el largo de la población de fibras de A β 42. En presencia de NPrO fueron más largas que el control mientras que en presencia de NeO fueron más cortas.
- Para ambas NPO se observó la interacción con el péptido A β 42, tanto por la formación de la corona de proteínas compuesta por pequeños agregados del péptido A β 42, que rodean a ambas NPO, como por la colocalización observada entre las fibras de A β 42 con cada NPO.
- Se determinó que en la interacción entre A β 42 y cada NPO participan distintos aminoácidos. En el caso de NPrO, se observa que Tyr y Met están más cerca de la superficie plana del prisma. Para el caso de NeO, Tyr y

Phe están más cerca de la superficie, por lo cual el extremo N-terminal completo de A β 42 estaría más cerca de la superficie curva de la esfera.

De esta forma, los resultados obtenidos en la presente tesis sustentan y validan la hipótesis propuesta de que la curvatura de las NPO funcionalizadas con PEG modifican el proceso de agregación de A β 42.

6.3 Proyecciones

A futuro, se espera poder evaluar el efecto citotóxico de las especies formadas a tiempo final de las cinéticas de agregación del péptido A β 42 en presencia de NPrO o de NeO en líneas celulares de neuronas así como también en cultivo primario de neuronas hipocampales. Este tipo de estudio permite determinar si las especies formadas por la presencia de un tipo particular de NPO serán tóxicas o no, por lo cual vendría a validar lo observado en las cinéticas desde un punto de vista biológico así como también a demostrar la bioseguridad del uso de una determinada NPO.

Por otro lado, en nuestro laboratorio se cuentan con otro tipo de formas de NPO, entre estas nanovarillas y nanoestrellas de oro, las cuales se pretenden analizar y evaluar su efecto sobre las cinéticas de agregación del péptido A β 42 así como también del comportamiento que presente éste sobre la superficie de estas NPO. El uso de este tipo de nanoestructuras es bastante interesante ya que ambas combinan superficies planas y curvas, es decir son superficies mixtas, por

lo cual amplía el espectro del entendimiento de cómo se comporta A β 42 sobre otro tipo de superficies.

Finalmente, otro tipo de estudios que se proponen a futuro son los relacionados con microfluidica. Este tipo de metodología permite el análisis del comportamiento del proceso de agregación en un sistema confinado debido a las dimensiones en las cuales se realizan los ensayos, que son a escala micro. Este tipo de aproximaciones permitiría emular de forma más adecuada un sistema biológico y las interacciones que se darían entre las NPO con el péptido A β 42 bajo un confinamiento espacial.

Publicaciones

[1] **Tapia-Arellano, A.**, Gallardo-Toledo, E., Celis, F., Rivera, R., Campos, M., Carulla, N., Baez, M., Kogan, M.J. (2020). A low curvature degree of gold nanoparticles exposes amyloid- β hydrophobic residues promoting its aggregation by a surface catalysed nucleation mechanism. *Journal of Materials Science and Engineering C*. (**en revision R3**).

[2] **Tapia-Arellano, A***, Gallardo-Toledo, E*, Ortiz, C., Henríquez, J., Feijóo, C.G., Araya, E., Sierpe, R., Kogan, M.J. (2020). Functionalization with PEG/Angiopep-2 peptide to improve the delivery of gold nanoprisms to central nervous system: in vitro and in vivo studies. *Journal of Materials Science and Engineering C* (DOI: 10.1016/j.msec.2020.111785) (**Publicado**).

[3] Gallardo-Toledo, E., **Tapia-Arellano, A.**, Celis, F., Sinai, T., Campos, M., Kogan, M.J., Sintov, A.C. (2020). Intranasal administration of gold nanoparticles designed to target the central nervous system: fabrication and comparison between nanospheres and nanoprisms. *International Journal of Pharmaceutics*. (DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.119957) (**Publicado**).

[4] Oyarzún, M.P., **Tapia-Arellano, A.**, Jara-Guajardo P., Cabrera, P., Kogan, M.J. (2021) Review about Alzheimer and plasmonic sensing techniques with Nanomaterials. *Sensors* (DOI: [10.3390/s21062067](https://doi.org/10.3390/s21062067)) (**Publicado**).

Congresos

Presentaciones formato Oral Internacional

[1] **Tapia-Arellano, A.**, Gallardo-Toledo, E., Celis, F., Campos, M., Carulla, M., Baez, M., Kogan, M. (2020) "Efecto de la forma de la nanopartículas de oro sobre la cinética de agregación del péptido A β ". *Nanoandes Perú 2020*, November 20- December 10, Perú.

Presentaciones formato Oral Nacional

[2] **Tapia-Arellano, A.**, Gallardo-Toledo, E., Celis, F., Rivera, R., Campos, M., Carulla, M., Baez, M., Kogan, M. (2020) "Efecto de la forma de la nanopartículas de oro sobre la cinética de agregación del péptido A β ". XXXIII Jornada Chilena de Química, January 7-10, Puerto Varas, Chile.

[3] **Tapia-Arellano, A.**, Gallardo-Toledo, E., Rivera, R., Carulla, M., Baez, M., Kogan, M. (2019) "The shape of GNP alters the aggregation kinetic of amyloid- β ". XLII Annual Meeting of the Chilean Biochemistry and Molecular Biology Society, October 8-11, Iquique, Chile.

Presentaciones formato Panel Internacional

[4] **Tapia, A.**, Gallardo-Toledo, E., Jara-Guajardo, P., Kogan, M.J. (2018) "Characterization of gold nanoprisms functionalized with a beta sheet breaker as a potential inhibitor in the Alzheimer's disease.". XI Young Scientist Symposium, May 24-25, Pessac, France.

[5] Gallardo-Toledo, E., **Tapia, A.**, Jara-Guajardo, P., Corrales, C., Sintov, A., Kogan, M.J. (2018) "Gold nanoprisms functionalized by organic polymers as a putative intranasal delivery platform for treatment of Alzheimer's disease". 11th World Meeting on Pharmaceuticals, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, March 19-22, Granada, Spain.

Presentaciones formato Panel Nacional

[6] Gallardo-Toledo, E., **Tapia, A.**, Jara-Guajardo, P., Corrales, C., Sintov, A., Kogan, M.J. (2020) "Administración intranasal de nanopartículas de oro funcionalizadas con polietilenglicol y péptido D1". XXXIII Jornada Chilena de Química, January 7-10, Puerto Varas, Chile.

[7] Jara-Guajardo, P., Gallardo-Toledo E., **Tapia, A.**, Morales-Zavala, F., Kogan, M.J. (2018) "Nanopartículas plasmónicas para mejorar la detección de agregados β -Amiloides por fluorescencia". V Congreso Nacional de Nanotecnología, November 25-29, Pucón, Chile.

[8] Rivera, R., **Tapia, A.**, Kogan, M.J., Baez, M. (2018) "Effect of gold nanoparticles in A β 42 amyloid formation". XLI Annual Meeting of the Chilean Biochemistry and Molecular Biology Society, September 25-28, Iquique, Chile.

[9] **Tapia, A.**, Gallardo-Toledo, E., Jara-Guajardo, P., Corrales, C., Sierpe, R., Kogan, M.J. (2018) "Influencia de la temperatura sobre la cinética de formación de nanoprismas de oro". XXXIII Jornada Chilena de Química, January 9-11, Puerto Varas, Chile.

[10] Gallardo-Toledo, E., **Tapia, A.**, Jara-Guajardo, P., Corrales, C., Sintov, A., Kogan, M.J. (2018) "Purificación y caracterización de Nanoprismas de Oro". XXXIII Jornada Chilena de Química, January 9-11, Puerto Varas, Chile.

[11] Corrales, C., Gallardo-Toledo, E., **Tapia, A.**, Jara-Guajardo, P., Kogan, M.J., Celis, F. (2018) "Caracterización del sistema Nanoprismo-Polietilenglicol-D1, mediante Espectrometría Raman". XXXIII Jornada Chilena de Química, January 9-11, Puerto Varas, Chile.

[12] Jara-Guajardo, P., Gallardo-Toledo E., **Tapia, A.**, Sierpe, R., Corrales, C., Kogan, M.J. (2018) "Determinación del coeficiente de extinción molar de Nanoprismas de oro para establecer la concentración de nanopartículas". XXXIII Jornada Chilena de Química, January 9-11, Puerto Varas, Chile.

[13] **Tapia, A.**, Rivera, R., Gallardo-Toledo, E., Baez, M., Kogan, M.J. (2017) "Effect of gold nanoparticles on β -amyloid peptide aggregation". XL Annual Meeting of the Chilean Biochemistry and Molecular Biology Society, September 26-29, Puerto Varas, Chile.

- [14] Rivera, R., **Tapia, A.**, Kogan, M.J., Baez, M. (2017) "Purification of recombinant A β 42 peptide and aggregation kinetic analysis by global fitting". XL Annual Meeting of the Chilean Biochemistry and Molecular Biology Society, September 26-29, Puerto Varas, Chile.
- [15] **Tapia, A.**, Rivera, R., Gallardo-Toledo, E., Jara-Guajardo, P., Baez, M., Kogan, M.J. (2017) "Effect of gold nanoprisms on β -amyloid peptide aggregation". Workshop Novel Insights Into Chronic Diseases. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, September 25, Santiago, Chile.
- [16] Rivera, R., **Tapia, A.**, Jara-Guajardo, P., Baez, M., Kogan, M.J. (2017) "Purification of recombinant A β 42 peptide and aggregation kinetic analysis by global fitting". Workshop Novel Insights Into Chronic Diseases. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, September 25, Santiago, Chile.
- [17] Gallardo-Toledo, E., **Tapia, A.**, Jara-Guajardo, P., Corrales, C., Kogan, M.J. (2017) "Síntesis y caracterización de nanoprismas de oro conjugados con polietilenglicol para aplicaciones en nanomedicina". XIV Jornadas de Investigación en Ciencia y Tecnología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, September 14, Santiago, Chile.
- [18] **Tapia, A.**, Ortiz, C. A., Gallardo-Toledo, E., Sierpe, R., Kogan, M.J. (2016) "Nanoprismas de oro funcionalizados con el péptido angiopep-2". IV Congreso Nacional de Nanotecnología, September 5-7, Olmué, Chile.

Referencias

1. Wimo, A.; Prince, M., World Alzheimer Report 2010: the global economic impact of dementia (London: Alzheimer's Disease International). *Alzheimers Dis Int* **2010**, 1-56.
2. Blennow, K.; de Leon, M. J.; Zetterberg, H., Alzheimer's disease. *Lancet* **2006**, 368 (9533), 387-403.
3. Inestrosa, N., *Las Incomunicaciones del Alzheimer*. Vicerrectoría de Comunicaciones y Asuntos Públicos ed.; Atenea Impresores Ltda.: 2007; Vol. Cuarta edición.
4. Wenk, G. L., Neuropathologic changes in Alzheimer's disease. *J Clin Psychiatry* **2003**, 64 Suppl 9, 7-10.
5. Tiraboschi, P.; Hansen, L. A.; Thal, L. J.; Corey-Bloom, J., The importance of neuritic plaques and tangles to the development and evolution of AD. *Neurology* **2004**, 62 (11), 1984-9.
6. Sorrentino, P.; Iuliano, A.; Polverino, A.; Jacini, F.; Sorrentino, G., The dark sides of amyloid in Alzheimer's disease pathogenesis. *FEBS Lett* **2014**, 588 (5), 641-52.
7. Mi, K.; Johnson, G. V., The role of tau phosphorylation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* **2006**, 3 (5), 449-63.
8. Bouras, C.; Hof, P. R.; Giannakopoulos, P.; Michel, J. P.; Morrison, J. H., Regional distribution of neurofibrillary tangles and senile plaques in the cerebral cortex of elderly patients: a quantitative evaluation of a one-year autopsy population from a geriatric hospital. *Cereb Cortex* **1994**, 4 (2), 138-50.
9. Karran, E.; Mercken, M.; De Strooper, B., The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* **2011**, 10 (9), 698-712.
10. Reinhard, C.; Hébert, S. S.; De Strooper, B., The amyloid-beta precursor protein: integrating structure with biological function. *EMBO J* **2005**, 24 (23), 3996-4006.
11. Selkoe, D. J., Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behav Brain Res* **2008**, 192 (1), 106-13.

12. Ahmed, M.; Davis, J.; Aucoin, D.; Sato, T.; Ahuja, S.; Aimoto, S.; Elliott, J. I.; Van Nostrand, W. E.; Smith, S. O., Structural conversion of neurotoxic amyloid-beta(1-42) oligomers to fibrils. *Nat Struct Mol Biol* **2010**, *17* (5), 561-7.
13. Zheng, H.; Koo, E. H., The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Mol Neurodegener* **2006**, *1*, 5.
14. LaFerla, F. M.; Green, K. N.; Oddo, S., Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* **2007**, *8* (7), 499-509.
15. Cummings, J. L., Alzheimer's disease. *N Engl J Med* **2004**, *351* (1), 56-67.
16. Stefani, M.; Dobson, C. M., Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *J Mol Med (Berl)* **2003**, *81* (11), 678-99.
17. Dobson, C. M., The structural basis of protein folding and its links with human disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **2001**, *356* (1406), 133-45.
18. Ross, C. A.; Poirier, M. A., Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med* **2004**, *10 Suppl*, S10-7.
19. Chiti, F.; Dobson, C. M., Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem* **2006**, *75*, 333-66.
20. Chapman, M. R.; Robinson, L. S.; Pinkner, J. S.; Roth, R.; Heuser, J.; Hammar, M.; Normark, S.; Hultgren, S. J., Role of Escherichia coli curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science* **2002**, *295* (5556), 851-5.
21. Frederikse, P. H., Amyloid-like protein structure in mammalian ocular lenses. *Curr Eye Res* **2000**, *20* (6), 462-8.
22. Fändrich, M.; Schmidt, M.; Grigorieff, N., Recent progress in understanding Alzheimer's β -amyloid structures. *Trends Biochem Sci* **2011**, *36* (6), 338-45.
23. Kirschner, D. A.; Abraham, C.; Selkoe, D. J., X-ray diffraction from intraneuronal paired helical filaments and extraneuronal amyloid fibers in Alzheimer disease indicates cross-beta conformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1986**, *83* (2), 503-7.
24. Cleary, J. P.; Walsh, D. M.; Hofmeister, J. J.; Shankar, G. M.; Kuskowski, M. A.; Selkoe, D. J.; Ashe, K. H., Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci* **2005**, *8* (1), 79-84.
25. Sengupta, U.; Nilson, A. N.; Kaye, R., The Role of Amyloid- β Oligomers in Toxicity, Propagation, and Immunotherapy. *EBioMedicine* **2016**, *6*, 42-49.
26. Ciudad, S.; Puig, E.; Botzanowski, T.; Meigooni, M.; Arango, A. S.; Do, J.; Mayzel, M.; Bayoumi, M.; Chaignepain, S.; Maglia, G.; Cianferani, S.; Orekhov, V.; Tajkhorshid, E.; Bardiaux, B.; Carulla, N., A β (1-42) tetramer and octamer structures reveal edge conductivity pores as a mechanism for membrane damage. *Nat Commun* **2020**, *11* (1), 3014.
27. Takahashi, T.; Mihara, H., Peptide and Protein Mimetics Inhibiting Amyloid β -Peptide Aggregation. *Accounts of Chemical Research* **2008**, *41* (10), 1309-1318.
28. Riehemann, K.; Schneider, S. W.; Luger, T. A.; Godin, B.; Ferrari, M.; Fuchs, H., Nanomedicine--challenge and perspectives. *Angew Chem Int Ed Engl* **2009**, *48* (5), 872-97.
29. Gregori, M.; Masserini, M.; Mancini, S., Nanomedicine for the treatment of Alzheimer's disease. *Nanomedicine (Lond)* **2015**, *10* (7), 1203-18.
30. Le Droumaguet, B.; Nicolas, J.; Brambilla, D.; Mura, S.; Maksimenko, A.; De Kimpe, L.; Salvati, E.; Zona, C.; Airoidi, C.; Canovi, M.; Gobbi, M.; Magali, N.; La Ferla, B.; Nicotra, F.; Scheper, W.; Flores, O.; Masserini, M.; Andrieux, K.; Couvreur, P., Versatile and efficient targeting using a single nanoparticulate platform: application to cancer and Alzheimer's disease. *ACS Nano* **2012**, *6* (7), 5866-79.

31. Sperling, R. A.; Rivera Gil, P.; Zhang, F.; Zanella, M.; Parak, W. J., Biological applications of gold nanoparticles. *Chem Soc Rev* **2008**, *37* (9), 1896-908.
32. Velasco-Aguirre, C.; Morales, F.; Gallardo-Toledo, E.; Guerrero, S.; Giralto, E.; Araya, E.; Kogan, M. J., Peptides and proteins used to enhance gold nanoparticle delivery to the brain: preclinical approaches. *Int J Nanomedicine* **2015**, *10*, 4919-36.
33. Ghosh, P.; Han, G.; De, M.; Kim, C. K.; Rotello, V. M., Gold nanoparticles in delivery applications. *Adv Drug Deliv Rev* **2008**, *60* (11), 1307-15.
34. Copley, C. M.; Chen, J.; Cho, E. C.; Wang, L. V.; Xia, Y., Gold nanostructures: a class of multifunctional materials for biomedical applications. *Chem Soc Rev* **2011**, *40* (1), 44-56.
35. Häkkinen, H., The gold-sulfur interface at the nanoscale. *Nat Chem* **2012**, *4* (6), 443-55.
36. Manson, J.; Kumar, D.; Meenan, B. J.; Dixon, D., Polyethylene glycol functionalized gold nanoparticles: the influence of capping density on stability in various media. *Gold Bulletin* **2011**, *44* (2), 99-105.
37. Tosi, G.; Pederzoli, F.; Belletti, D.; Vandelli, M. A.; Forni, F.; Duskey, J. T.; Ruozi, B., Nanomedicine in Alzheimer's disease: Amyloid beta targeting strategy. *Prog Brain Res* **2019**, *245*, 57-88.
38. Hernando, S.; Gartzandia, O.; Herran, E.; Pedraz, J. L.; Igartua, M.; Hernandez, R. M., Advances in nanomedicine for the treatment of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nanomedicine (Lond)* **2016**, *11* (10), 1267-85.
39. El-Sayed, M. A., Some interesting properties of metals confined in time and nanometer space of different shapes. *Acc Chem Res* **2001**, *34* (4), 257-64.
40. Karhanek, M.; Kemp, J. T.; Pourmand, N.; Davis, R. W.; Webb, C. D., Single DNA molecule detection using nanopipettes and nanoparticles. *Nano Lett* **2005**, *5* (2), 403-7.
41. Kohler, N.; Sun, C.; Wang, J.; Zhang, M., Methotrexate-modified superparamagnetic nanoparticles and their intracellular uptake into human cancer cells. *Langmuir* **2005**, *21* (19), 8858-64.
42. Hirsch, L. R.; Stafford, R. J.; Bankson, J. A.; Sershen, S. R.; Rivera, B.; Price, R. E.; Hazle, J. D.; Halas, N. J.; West, J. L., Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, *100* (23), 13549-54.
43. Yang, P. H.; Sun, X.; Chiu, J. F.; Sun, H.; He, Q. Y., Transferrin-mediated gold nanoparticle cellular uptake. *Bioconjug Chem* **2005**, *16* (3), 494-6.
44. Kelly, K. L.; Coronado, E.; Zhao, L. L.; Schatz, G. C., The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. *The Journal of Physical Chemistry B* **2003**, *107* (3), 668-677.
45. Gobin, A. M.; Watkins, E. M.; Quevedo, E.; Colvin, V. L.; West, J. L., Near-infrared-resonant gold/gold sulfide nanoparticles as a photothermal cancer therapeutic agent. *Small* **2010**, *6* (6), 745-52.
46. Near, R. D.; Hayden, S. C.; Hunter, R. E.; Thackston, D.; El-Sayed, M. A., Rapid and Efficient Prediction of Optical Extinction Coefficients for Gold Nanospheres and Gold Nanorods. *The Journal of Physical Chemistry C* **2013**, *117* (45), 23950-23955.
47. Guerrero, A. R.; Hassan, N.; Escobar, C. A.; Albericio, F.; Kogan, M. J.; Araya, E., Gold nanoparticles for photothermally controlled drug release. *Nanomedicine (Lond)* **2014**, *9* (13), 2023-39.
48. Choi, W. I.; Kim, J. Y.; Kang, C.; Byeon, C. C.; Kim, Y. H.; Tae, G., Tumor regression in vivo by photothermal therapy based on gold-nanorod-loaded, functional nanocarriers. *ACS Nano* **2011**, *5* (3), 1995-2003.

49. Kogan, M. J.; Bastus, N. G.; Amigo, R.; Grillo-Bosch, D.; Araya, E.; Turiel, A.; Labarta, A.; Giralt, E.; Puentes, V. F., Nanoparticle-mediated local and remote manipulation of protein aggregation. *Nano Lett* **2006**, *6* (1), 110-5.
50. Araya, E.; Olmedo, I.; Bastus, N. G.; Guerrero, S.; Puentes, V. F.; Giralt, E.; Kogan, M. J., Gold Nanoparticles and Microwave Irradiation Inhibit Beta-Amyloid Amyloidogenesis. *Nanoscale Research Letters* **2008**, *3* (11), 435-443.
51. Weissleder, R., A clearer vision for in vivo imaging. In *Nat Biotechnol*, United States, 2001; Vol. 19, pp 316-7.
52. Bao, C., C., J., Pan, F., Li, C., Zhang, C., Tian, F., Liang, S., de la Fuente, J., Cui, D., Gold nanoprisms as a hybrid in vivo cancer theranostic platform for in situ photoacoustic imaging, angiography, and localized hyperthermia. 2016; Vol. 9, pp 1043-1056.
53. Cabaleiro-Lago, C.; Quinlan-Pluck, F.; Lynch, I.; Dawson, K. A.; Linse, S., Dual effect of amino modified polystyrene nanoparticles on amyloid β protein fibrillation. *ACS Chem Neurosci* **2010**, *1* (4), 279-87.
54. Cabaleiro-Lago, C.; Quinlan-Pluck, F.; Lynch, I.; Lindman, S.; Minogue, A. M.; Thulin, E.; Walsh, D. M.; Dawson, K. A.; Linse, S., Inhibition of amyloid beta protein fibrillation by polymeric nanoparticles. *J Am Chem Soc* **2008**, *130* (46), 15437-43.
55. Linse, S.; Cabaleiro-Lago, C.; Xue, W. F.; Lynch, I.; Lindman, S.; Thulin, E.; Radford, S. E.; Dawson, K. A., Nucleation of protein fibrillation by nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, *104* (21), 8691-6.
56. 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., Peptide multifunctionalized gold nanorods decrease toxicity of β -amyloid peptide in a *Caenorhabditis elegans* model of Alzheimer's disease. *Nanomedicine* **2017**, *13* (7), 2341-2350.
57. Liao, Y. H.; Chang, Y. J.; Yoshiike, Y.; Chang, Y. C.; Chen, Y. R., Negatively charged gold nanoparticles inhibit Alzheimer's amyloid- β fibrillization, induce fibril dissociation, and mitigate neurotoxicity. *Small* **2012**, *8* (23), 3631-9.
58. Javed, I.; Sun, Y.; Adamcik, J.; Wang, B.; Kakinen, A.; Pilkington, E. H.; Ding, F.; Mezzenga, R.; Davis, T. P.; Ke, P. C., Cofibrillization of Pathogenic and Functional Amyloid Proteins with Gold Nanoparticles against Amyloidogenesis. *Biomacromolecules* **2017**, *18* (12), 4316-4322.
59. Cabaleiro-Lago, C.; Szczepankiewicz, O.; Linse, S., The effect of nanoparticles on amyloid aggregation depends on the protein stability and intrinsic aggregation rate. *Langmuir* **2012**, *28* (3), 1852-7.
60. Wang, Y.; Cai, R.; Chen, C., The Nano-Bio Interactions of Nanomedicines: Understanding the Biochemical Driving Forces and Redox Reactions. *Acc Chem Res* **2019**, *52* (6), 1507-1518.
61. Shemetov, A. A.; Nabiev, I.; Sukhanova, A., Molecular interaction of proteins and peptides with nanoparticles. *ACS Nano* **2012**, *6* (6), 4585-602.
62. Mahmoudi, M.; Kalhor, H. R.; Laurent, S.; Lynch, I., Protein fibrillation and nanoparticle interactions: opportunities and challenges. *Nanoscale* **2013**, *5* (7), 2570-88.
63. Vácha, R.; Linse, S.; Lund, M., Surface effects on aggregation kinetics of amyloidogenic peptides. *J Am Chem Soc* **2014**, *136* (33), 11776-82.
64. Colvin, V. L.; Kulinowski, K. M., Nanoparticles as catalysts for protein fibrillation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, *104* (21), 8679-80.
65. Gonzalez Solveyra, E.; Szleifer, I., What is the role of curvature on the properties of nanomaterials for biomedical applications? *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* **2016**, *8* (3), 334-54.

66. Roach, P.; Farrar, D.; Perry, C. C., Surface tailoring for controlled protein adsorption: effect of topography at the nanometer scale and chemistry. *J Am Chem Soc* **2006**, *128* (12), 3939-45.
67. Lindman, S.; Lynch, I.; Thulin, E.; Nilsson, H.; Dawson, K. A.; Linse, S., Systematic investigation of the thermodynamics of HSA adsorption to N-iso-propylacrylamide/N-tert-butylacrylamide copolymer nanoparticles. Effects of particle size and hydrophobicity. *Nano Lett* **2007**, *7* (4), 914-20.
68. Li, B.; Zhang, R.; Shi, X., Aggregation of amyloid peptides into fibrils driven by nanoparticles and their curvature effect. *Phys Chem Chem Phys* **2019**, *21* (4), 1784-1790.
69. John, T.; Gladysz, A.; Kubeil, C.; Martin, L. L.; Risselada, H. J.; Abel, B., Impact of nanoparticles on amyloid peptide and protein aggregation: a review with a focus on gold nanoparticles. *Nanoscale* **2018**, *10* (45), 20894-20913.
70. Saptarshi, S. R.; Duschl, A.; Lopata, A. L., Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle. *J Nanobiotechnology* **2013**, *11*, 26.
71. Nel, A. E.; Mädler, L.; Velegol, D.; Xia, T.; Hoek, E. M.; Somasundaran, P.; Klaessig, F.; Castranova, V.; Thompson, M., Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat Mater* **2009**, *8* (7), 543-57.
72. Kurylowicz, M.; Paulin, H.; Mogyoros, J.; Giuliani, M.; Dutcher, J. R., The effect of nanoscale surface curvature on the oligomerization of surface-bound proteins. *J R Soc Interface* **2014**, *11* (94), 20130818.
73. Kim, Y.; Park, J. H.; Lee, H.; Nam, J. M., How Do the Size, Charge and Shape of Nanoparticles Affect Amyloid β Aggregation on Brain Lipid Bilayer? *Sci Rep* **2016**, *6*, 19548.
74. Arosio, P.; Knowles, T. P.; Linse, S., On the lag phase in amyloid fibril formation. *Phys Chem Chem Phys* **2015**, *17* (12), 7606-18.
75. Oosawa, F.; Kasai, M., A theory of linear and helical aggregations of macromolecules. *J Mol Biol* **1962**, *4*, 10-21.
76. Knowles, T. P.; Waudby, C. A.; Devlin, G. L.; Cohen, S. I.; Aguzzi, A.; Vendruscolo, M.; Terentjev, E. M.; Welland, M. E.; Dobson, C. M., An analytical solution to the kinetics of breakable filament assembly. *Science* **2009**, *326* (5959), 1533-7.
77. Cohen, S. I.; Vendruscolo, M.; Welland, M. E.; Dobson, C. M.; Terentjev, E. M.; Knowles, T. P., Nucleated polymerization with secondary pathways. I. Time evolution of the principal moments. *J Chem Phys* **2011**, *135* (6), 065105.
78. Michaels, T. C.; Lazell, H. W.; Arosio, P.; Knowles, T. P., Dynamics of protein aggregation and oligomer formation governed by secondary nucleation. *J Chem Phys* **2015**, *143* (5), 054901.
79. Meisl, G.; Kirkegaard, J. B.; Arosio, P.; Michaels, T. C.; Vendruscolo, M.; Dobson, C. M.; Linse, S.; Knowles, T. P., Molecular mechanisms of protein aggregation from global fitting of kinetic models. *Nat Protoc* **2016**, *11* (2), 252-72.
80. Arosio, P.; Vendruscolo, M.; Dobson, C. M.; Knowles, T. P., Chemical kinetics for drug discovery to combat protein aggregation diseases. *Trends Pharmacol Sci* **2014**, *35* (3), 127-35.
81. Michaels, T. C. T.; Šarić, A.; Habchi, J.; Chia, S.; Meisl, G.; Vendruscolo, M.; Dobson, C. M.; Knowles, T. P. J., Chemical Kinetics for Bridging Molecular Mechanisms and Macroscopic Measurements of Amyloid Fibril Formation. *Annu Rev Phys Chem* **2018**, *69*, 273-298.
82. Arosio, P.; Michaels, T. C.; Linse, S.; Månsson, C.; Emanuelsson, C.; Presto, J.; Johansson, J.; Vendruscolo, M.; Dobson, C. M.; Knowles, T. P., Kinetic analysis reveals the diversity of microscopic mechanisms through which molecular chaperones suppress amyloid formation. *Nat Commun* **2016**, *7*, 10948.
83. Limbocker, R.; Chia, S.; Ruggeri, F. S.; Perni, M.; Cascella, R.; Heller, G. T.; Meisl, G.; Mannini, B.; Habchi, J.; Michaels, T. C. T.; Challa, P. K.; Ahn, M.; Casford, S. T.; Fernando, N.; Xu, C. K.; Kloss, N. D.; Cohen, S. I. A.; Kumita, J. R.; Cecchi, C.; Zasloff, M.; Linse, S.; Knowles, T. P. J.;

- Chiti, F.; Vendruscolo, M.; Dobson, C. M., Trodusquemine enhances A β aggregation but suppresses its toxicity by displacing oligomers from cell membranes. *Nat Commun* **2019**, *10* (1), 225.
84. Bonito-Oliva, A.; Barbash, S.; Sakmar, T. P.; Graham, W. V., Nucleobindin 1 binds to multiple types of pre-fibrillar amyloid and inhibits fibrillization. *Sci Rep* **2017**, *7*, 42880.
85. Habchi, J.; Arosio, P.; Perni, M.; Costa, A. R.; Yagi-Utsumi, M.; Joshi, P.; Chia, S.; Cohen, S. I.; Müller, M. B.; Linse, S.; Nollen, E. A.; Dobson, C. M.; Knowles, T. P.; Vendruscolo, M., An anticancer drug suppresses the primary nucleation reaction that initiates the production of the toxic A β 42 aggregates linked with Alzheimer's disease. *Sci Adv* **2016**, *2* (2), e1501244.
86. Tanaka, M.; Collins, S. R.; Toyama, B. H.; Weissman, J. S., The physical basis of how prion conformations determine strain phenotypes. *Nature* **2006**, *442* (7102), 585-9.
87. Bieschke, J.; Herbst, M.; Wiglenda, T.; Friedrich, R. P.; Boeddrich, A.; Schiele, F.; Kleckers, D.; Lopez del Amo, J. M.; Grüning, B. A.; Wang, Q.; Schmidt, M. R.; Lurz, R.; Anwyll, R.; Schnoegl, S.; Fändrich, M.; Frank, R. F.; Reif, B.; Günther, S.; Walsh, D. M.; Wanker, E. E., Small-molecule conversion of toxic oligomers to nontoxic β -sheet-rich amyloid fibrils. *Nat Chem Biol* **2011**, *8* (1), 93-101.
88. Kurouski, D.; Van Duyne, R. P.; Lednev, I. K., Exploring the structure and formation mechanism of amyloid fibrils by Raman spectroscopy: a review. *Analyst* **2015**, *140* (15), 4967-80.
89. Voiciuk, V.; Valincius, G.; Budvytytė, R.; Matijoška, A.; Matulaitienė, I.; Niaura, G., Surface-enhanced Raman spectroscopy for detection of toxic amyloid β oligomers adsorbed on self-assembled monolayers. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **2012**, *95*, 526-32.
90. Pelaz, B.; Grazu, V.; Ibarra, A.; Magen, C.; del Pino, P.; de la Fuente, J. M., Tailoring the synthesis and heating ability of gold nanoprisms for bioapplications. *Langmuir* **2012**, *28* (24), 8965-70.
91. Pelaz Garcia, B., Tailoring the synthesis and the functionalization of nanoparticles for nanomedicine. In *Doctoral Thesis. Universidad de Zaragoza. ZAGUAN Universidad de Zaragoza Repository.*, <http://zaguan.unizar.es/record/7468/files/TESIS-2012-070.pdf>, 2012.
92. Millstone, J. E.; Hurst, S. J.; Métraux, G. S.; Cutler, J. I.; Mirkin, C. A., Colloidal gold and silver triangular nanoprisms. *Small* **2009**, *5* (6), 646-64.
93. Tao, A. R.; Habas, S.; Yang, P., Shape Control of Colloidal Metal Nanocrystals. *Small* **2008**, *4* (3), 310-325.
94. Saverot, S. E.; Reese, L. M.; Cimini, D.; Vikesland, P. J.; Bickford, L. R., Characterization of Conventional One-Step Sodium Thiosulfate Facilitated Gold Nanoparticle Synthesis. *Nanoscale Res Lett* **2015**, *10* (1), 940.
95. Turkevich J., S. P. C., Hillier J., A Study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society*, 1951; Vol. 11, pp 55-75.
96. Khlebtsov, B. N.; Khlebtsov, N. G., On the measurement of gold nanoparticle sizes by the dynamic light scattering method. *Colloid Journal* **2011**, *73* (1), 118-127.
97. Xue, C.; Lin, T. Y.; Chang, D.; Guo, Z., Thioflavin T as an amyloid dye: fibril quantification, optimal concentration and effect on aggregation. *R Soc Open Sci* **2017**, *4* (1), 160696.
98. Hellstrand, E.; Boland, B.; Walsh, D. M.; Linse, S., Amyloid β -protein aggregation produces highly reproducible kinetic data and occurs by a two-phase process. *ACS Chem Neurosci* **2010**, *1* (1), 13-8.
99. Linse, S., Monomer-dependent secondary nucleation in amyloid formation. *Biophys Rev* **2017**, *9* (4), 329-338.
100. Cohen, S. I.; Linse, S.; Luheshi, L. M.; Hellstrand, E.; White, D. A.; Rajah, L.; Otzen, D. E.; Vendruscolo, M.; Dobson, C. M.; Knowles, T. P., Proliferation of amyloid- β 42 aggregates occurs through a secondary nucleation mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2013**, *110* (24), 9758-63.

101. Törnquist, M.; Michaels, T. C. T.; Sanagavarapu, K.; Yang, X.; Meisl, G.; Cohen, S. I. A.; Knowles, T. P. J.; Linse, S., Secondary nucleation in amyloid formation. *Chem Commun (Camb)* **2018**, 54 (63), 8667-8684.
102. García-Álvarez, R.; Hadjidemetriou, M.; Sánchez-Iglesias, A.; Liz-Marzán, L. M.; Kostarelos, K., In vivo formation of protein corona on gold nanoparticles. The effect of their size and shape. *Nanoscale* **2018**, 10 (3), 1256-1264.
103. Mirsadeghi, S.; Dinarvand, R.; Ghahremani, M. H.; Hormozi-Nezhad, M. R.; Mahmoudi, Z.; Hajipour, M. J.; Atyabi, F.; Ghavami, M.; Mahmoudi, M., Protein corona composition of gold nanoparticles/nanorods affects amyloid beta fibrillation process. *Nanoscale* **2015**, 7 (11), 5004-13.
104. **!!! INVALID CITATION !!! 1, 2.**
105. Depciuch, J.; Stec, M.; Maximenko, A.; Baran, J.; Parlinska-Wojtan, M., Temperature-controlled synthesis of hollow, porous gold nanoparticles with wide range light absorption. *Journal of Materials Science* **2020**, 55 (12), 5257-5267.
106. Liu, H.; Pierre-Pierre, N.; Huo, Q., Dynamic light scattering for gold nanorod size characterization and study of nanorod-protein interactions. *Gold Bulletin* **2012**, 45 (4), 187-195.
107. Cauda, V.; Argyo, C.; Bein, T., Impact of different PEGylation patterns on the long-term bio-stability of colloidal mesoporous silica nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry* **2010**, 20 (39), 8693-8699.
108. Cohen, S. I. A.; Arosio, P.; Presto, J.; Kurudenkandy, F. R.; Biverstal, H.; Dolfe, L.; Dunning, C.; Yang, X.; Frohm, B.; Vendruscolo, M.; Johansson, J.; Dobson, C. M.; Fisahn, A.; Knowles, T. P. J.; Linse, S., A molecular chaperone breaks the catalytic cycle that generates toxic A β oligomers. *Nat Struct Mol Biol* **2015**, 22 (3), 207-213.
109. Matsuzaki, K., How do membranes initiate Alzheimer's Disease? Formation of toxic amyloid fibrils by the amyloid β -protein on ganglioside clusters. *Acc Chem Res* **2014**, 47 (8), 2397-404.
110. Matsuzaki, K., Physicochemical interactions of amyloid beta-peptide with lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta* **2007**, 1768 (8), 1935-42.
111. Sureshbabu, N.; Kirubakaran, R.; Thangarajah, H.; Malar, E. J.; Jayakumar, R., Lipid-induced conformational transition of amyloid beta peptide fragments. *J Mol Neurosci* **2010**, 41 (3), 368-82.
112. Mao, Y.; Shang, Z.; Imai, Y.; Hoshino, T.; Tero, R.; Tanaka, M.; Yamamoto, N.; Yanagisawa, K.; Urisu, T., Surface-induced phase separation of a sphingomyelin/cholesterol/ganglioside GM1-planar bilayer on mica surfaces and microdomain molecular conformation that accelerates Abeta oligomerization. *Biochim Biophys Acta* **2010**, 1798 (6), 1090-9.
113. Assarsson, A.; Hellstrand, E.; Cabaleiro-Lago, C.; Linse, S., Charge dependent retardation of amyloid β aggregation by hydrophilic proteins. *ACS Chem Neurosci* **2014**, 5 (4), 266-74.
114. Moores, B.; Drolle, E.; Attwood, S. J.; Simons, J.; Leonenko, Z., Effect of surfaces on amyloid fibril formation. *PLoS One* **2011**, 6 (10), e25954.
115. Giacomelli, C. E.; Norde, W., Conformational changes of the amyloid beta-peptide (1-40) adsorbed on solid surfaces. *Macromol Biosci* **2005**, 5 (5), 401-7.
116. Wang, Q.; Shah, N.; Zhao, J.; Wang, C.; Zhao, C.; Liu, L.; Li, L.; Zhou, F.; Zheng, J., Structural, morphological, and kinetic studies of β -amyloid peptide aggregation on self-assembled monolayers. *Phys Chem Chem Phys* **2011**, 13 (33), 15200-10.
117. Meisl, G.; Rajah, L.; Cohen, S. A. I.; Pfammatter, M.; Šarić, A.; Hellstrand, E.; Buell, A. K.; Aguzzi, A.; Linse, S.; Vendruscolo, M.; Dobson, C. M.; Knowles, T. P. J., Scaling behaviour and rate-determining steps in filamentous self-assembly. *Chemical Science* **2017**, 8 (10), 7087-7097.

118. Kharazian, B.; Hadipour, N. L.; Ejtehad, M. R., Understanding the nanoparticle–protein corona complexes using computational and experimental methods. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **2016**, *75*, 162-174.
119. Mohammad-Beigi, H.; Hayashi, Y.; Zeuthen, C. M.; Eskandari, H.; Scavenius, C.; Juul-Madsen, K.; Vorup-Jensen, T.; Enghild, J. J.; Sutherland, D. S., Mapping and identification of soft corona proteins at nanoparticles and their impact on cellular association. *Nature Communications* **2020**, *11* (1), 4535.
120. Bertini, I.; Gonnelli, L.; Luchinat, C.; Mao, J.; Nesi, A., A new structural model of A β 40 fibrils. *J Am Chem Soc* **2011**, *133* (40), 16013-22.
121. Petkova, A. T.; Yau, W. M.; Tycko, R., Experimental constraints on quaternary structure in Alzheimer's beta-amyloid fibrils. *Biochemistry* **2006**, *45* (2), 498-512.
122. Inouye, H.; Gleason, K. A.; Zhang, D.; Decatur, S. M.; Kirschner, D. A., Differential effects of Phe19 and Phe20 on fibril formation by amyloidogenic peptide A beta 16-22 (Ac-KLVFFAE-NH₂). *Proteins* **2010**, *78* (10), 2306-21.
123. Senguen, F. T.; Lee, N. R.; Gu, X.; Ryan, D. M.; Doran, T. M.; Anderson, E. A.; Nilsson, B. L., Probing aromatic, hydrophobic, and steric effects on the self-assembly of an amyloid- β fragment peptide. *Mol Biosyst* **2011**, *7* (2), 486-96.
124. Cukalevski, R.; Boland, B.; Frohm, B.; Thulin, E.; Walsh, D.; Linse, S., Role of aromatic side chains in amyloid β -protein aggregation. *ACS Chem Neurosci* **2012**, *3* (12), 1008-16.
125. Hill, H. D.; Millstone, J. E.; Banholzer, M. J.; Mirkin, C. A., The role radius of curvature plays in thiolated oligonucleotide loading on gold nanoparticles. *ACS nano* **2009**, *3* (2), 418-424.
126. Brambilla, D.; Verpillot, R.; Le Droumaguet, B.; Nicolas, J.; Taverna, M.; Kóňa, 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., PEGylated Nanoparticles Bind to and Alter Amyloid-Beta Peptide Conformation: Toward Engineering of Functional Nanomedicines for Alzheimer's Disease. *ACS Nano* **2012**, *6* (7), 5897-5908.
127. Jiang, D.; Rauda, I.; Han, S.; Chen, S.; Zhou, F., Aggregation pathways of the amyloid β (1-42) peptide depend on its colloidal stability and ordered β -sheet stacking. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2012**, *28* (35), 12711-12721.
128. Cebecauer, M.; Hof, M.; Amaro, M., Impact of GM(1) on Membrane-Mediated Aggregation/Oligomerization of β -Amyloid: Unifying View. *Biophysical journal* **2017**, *113* (6), 1194-1199.
129. Lindberg, D. J.; Wesén, E.; Björkeröth, J.; Rocha, S.; Esbjörner, E. K., Lipid membranes catalyse the fibril formation of the amyloid- β (1-42) peptide through lipid-fibril interactions that reinforce secondary pathways. *Biochim Biophys Acta Biomembr* **2017**, *1859* (10), 1921-1929.
130. Habchi, J.; Chia, S.; Galvagnion, C.; Michaels, T. C. T.; Bellaiche, M. M. J.; Ruggeri, F. S.; Sanguanini, M.; Idini, I.; Kumita, J. R.; Sparr, E.; Linse, S.; Dobson, C. M.; Knowles, T. P. J.; Vendruscolo, M., Cholesterol catalyses A β 42 aggregation through a heterogeneous nucleation pathway in the presence of lipid membranes. *Nat Chem* **2018**, *10* (6), 673-683.
131. Frankel, R.; Törnquist, M.; Meisl, G.; Hansson, O.; Andreasson, U.; Zetterberg, H.; Blennow, K.; Frohm, B.; Cedervall, T.; Knowles, T. P. J.; Leiding, T.; Linse, S., Autocatalytic amplification of Alzheimer-associated A β 42 peptide aggregation in human cerebrospinal fluid. *Communications biology* **2019**, *2*, 365-365.
132. Morales, R.; Bravo-Alegria, J.; Duran-Aniotz, C.; Soto, C., Titration of biologically active amyloid- β seeds in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Scientific Reports* **2015**, *5* (1), 9349.

133. Šarić, A.; Buell, A. K.; Meisl, G.; Michaels, T. C. T.; Dobson, C. M.; Linse, S.; Knowles, Tuomas P. J.; Frenkel, D., Physical determinants of the self-replication of protein fibrils. *Nature Physics* **2016**, *12* (9), 874-880.
134. Serra-Batiste, M.; Ninot-Pedrosa, M.; Bayoumi, M.; Gairí, M.; Maglia, G.; Carulla, N., A β 42 assembles into specific β -barrel pore-forming oligomers in membrane-mimicking environments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2016**, *113* (39), 10866-71.
135. Flagmeier, P.; De, S.; Michaels, T. C. T.; Yang, X.; Dear, A. J.; Emanuelsson, C.; Vendruscolo, M.; Linse, S.; Klenerman, D.; Knowles, T. P. J.; Dobson, C. M., Direct measurement of lipid membrane disruption connects kinetics and toxicity of A β 42 aggregation. *Nature Structural & Molecular Biology* **2020**, *27* (10), 886-891.
136. Yang, J.; Dear, A. J.; Yao, Q.-Q.; Liu, Z.; Dobson, C. M.; Knowles, T. P. J.; Wu, S.; Perrett, S., Amelioration of aggregate cytotoxicity by catalytic conversion of protein oligomers into amyloid fibrils. *Nanoscale* **2020**, *12* (36), 18663-18672.
137. Limbocker, R.; Mannini, B.; Ruggeri, F. S.; Cascella, R.; Xu, C. K.; Perni, M.; Chia, S.; Chen, S. W.; Habchi, J.; Bigi, A.; Kreiser, R. P.; Wright, A. K.; Albright, J. A.; Kartanas, T.; Kumita, J. R.; Cremades, N.; Zasloff, M.; Cecchi, C.; Knowles, T. P. J.; Chiti, F.; Vendruscolo, M.; Dobson, C. M., Trodusquemine displaces protein misfolded oligomers from cell membranes and abrogates their cytotoxicity through a generic mechanism. *Communications Biology* **2020**, *3* (1), 435.