



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA
LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA

“Nanopartículas plasmónicas para mejorar la detección de agregados β -Amiloide por fluorescencia”

PATROCINANTE

Dr. Marcelo J. Kogan
Laboratorio de Nanobiotecnología
Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas, Universidad de Chile.

DIRECTORES DE MEMORIA

Dr. Marcelo J. Kogan
Laboratorio de Nanobiotecnología
Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Dr. Francisco Morales Zavala.
Laboratorio de Nanobiotecnología
Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Proyecto de Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico

Pedro Esteban Jara Guajardo

SANTIAGO DE CHILE

2019

Agradecimiento

Financiamiento

Esta tesis fue desarrollada en el Laboratorio de Nanobiotecnología y Nanotoxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. El trabajo fue financiado por el proyecto FONDECYT 1170929 (Dr. Marcelo Kogan) y FONDAP 15130011.

Tabla de Contenidos

Agradecimiento.....	3
Financiamiento	4
Tabla de Contenidos.....	5
Índice de Figuras	8
Índice de Tablas	11
Abreviaturas	12
Resumen	13
Introducción	15
• Enfermedad de Alzheimer:.....	15
• Detección de agregados de β -amiloide utilizando sondas fluorescentes:.....	17
• Nanopartículas plasmónicas y sus aplicaciones en diagnóstico y terapia:	19
• Efecto de aumento de fluorescencia por superficie en nanopartículas plasmónicas:.....	20
• Funcionalización de nanopartículas plasmónicas para dirigirlas hacia los agregados tóxicos de β -amiloide:	22
Propuesta de Trabajo	24
Hipótesis.....	25
Objetivo general:.....	25
Objetivos específicos:	25
Metodología.....	26

1. Síntesis Nanopartículas plasmónicas y funcionalización con PEG y péptido D1.	26
• 1.1 Síntesis de Nanovarillas de oro (NVO) estabilizadas con CTAB.	26
• 1.2 Funcionalización de NVO con PEGs:	27
• 1.3 Funcionalización de NVO con el péptido D1:	27
• 1.4 Síntesis de Nanoprismas de oro:	28
• 1.5 Funcionalización de Nanoprismas con PEG:	28
• 1.6 Funcionalización de Nanoprismas con el péptido D1:	29
• 1.6 Caracterización de las nanopartículas:	29
2. Evaluación de la estabilidad coloidal de las nanopartículas sintetizadas.	29
3. Evaluar el efecto de las Nanopartículas sobre la intensidad de la fluorescencia de las sondas fluorescentes utilizadas en los agregados β -Amiloides.	30
Resultados y Discusión.....	31
1. Síntesis Nanopartículas plasmónicas y funcionalización con PEG y péptido D1.	31
• 1.1 Síntesis de Nanovarillas de oro (NVO) estabilizadas con CTAB.	31
• 1.2 Estabilización de NVO mediante funcionalización con PEG	33
• 1.3 Funcionalización de NVO-PEG con péptido D1.....	36
• 1.4 Síntesis de Nanoprismas de oro:	39
• 1.5 Funcionalización de Nanoprismas con PEG:	42
• 1.6 Funcionalización de Nanoprismas con el péptido D1:	45
2. Evaluación de la estabilidad coloidal de las nanopartículas sintetizadas.	48
• 2.1 Estabilidad NVO-PEG-D1 y NPrO-PEG-D1: Agua.....	48

- 2.2 Estabilidad NVO-PEG-D1 y NPrO-PEG-D1: PBS 49
- 2.3 Estabilidad NVO-PEG-D1 y NPrO-PEG-D1: Medio de Cultivo..... 51

3. Evaluar el efecto de las Nanopartículas sobre la intensidad de la fluorescencia de la sonda fluorescente utilizada para detectar los agregados de β -Amiloides..... 54

Conclusiones y Proyecciones: 60

Referencias: 61

Índice de Figuras

Figura 1: Esquema de la mutación autosómica dominante de APP que causan la aparición temprana de la enfermedad de Alzheimer familiar	17
Figura 2: Comparación entre estructura de Curcumina y CRANAD-2	17
Figura 3: Efecto “switch on” en la fluorescencia de CRANAD-2 al interactuar con agregados β -amiloide	18
Figura 4: Ventana biológica de absorción.	19
Figura 5: Efecto de RPS que se produce en una nanopartícula de oro	20
Figura 6: Aumento de la fluorescencia de octadecil rodamina B (R18), utilizando GNPs cubiertos con sílice	21
Figura 7: Espectro de absorción de nanopartículas de oro y esquema de funcionalización	23
Figura 8: Esquema del sistema nanopartículas y CRANAD-2 unido a fibra de A β para mejorar su detección.....	24
Figura 9: Espectro UV-Visible de NVO obtenidas de síntesis	31
Figura 10: Gráfico de distribución de tamaños de las NVO obtenidas de síntesis.....	32
Figura 11: Imagen STEM e histograma de NVO obtenidas de síntesis.....	33
Figura 12: Espectro UV-Visible de NVO funcionalizada con PEG	34
Figura 13: Gráfico de distribución de tamaños de las NVO obtenidas después de la funcionalización con PEG.	35
Figura 14: Imagen STEM e histograma de NVO obtenidas después de la funcionalización con PEG.	36
Figura 15: Espectro UV-Visible de NVO-PEG funcionalizadas con D1	37
Figura 16: Gráfico de distribución de tamaños de las NVO-PEG-D1.....	38
Figura 17: Imagen STEM e histograma de NVO-PEG-D1.....	39

Figura 18: Espectro UV-Visible de NPrO obtenidos de síntesis.	40
Figura 19: Gráfico de distribución de tamaños de los NPrO obtenidos de síntesis.....	41
Figura 20: Imagen TEM e histograma de los NPrO obtenidos de síntesis.....	41
Figura 21: Espectro UV-Visible de NPrO funcionalizados con PEG	42
Figura 22: Gráfico de distribución de tamaños de los NPrO-PEG.	43
Figura 23: Imagen TEM e histograma de NPrO-PEG.....	44
Figura 24: Espectro UV-Visible de NPrO-PEG funcionalizados con D1.	45
Figura 25: Gráfico de distribución de tamaños de las NVO-PEGs-D1.....	46
Figura 26: Imagen TEM e histograma de NVO-PEGs-D1	47
Figura 27: Estabilidad de NVO-PEG-D1 en Agua, mediante espectrofotometría UV-Visible.	48
Figura 28: Estabilidad de NPrO-PEG-D1 en Agua, mediante espectrofotometría UV-Visible	49
Figura 29: Estabilidad de NVO-PEG-D1 en PBS, mediante espectrofotometría UV-Visible.	50
Figura 30: Estabilidad de NPrO-PEG-D1 en PBS, mediante espectrofotometría UV-Visible	51
Figura 31: Estabilidad de NVO-PEG-D1 en medio de cultivo, mediante espectrofotometría UV-Visible.....	52
Figura 32: Estabilidad de NPrO-PEG-D1 en Medio de cultivo, mediante espectrofotometría UV-Visible.....	53
Figura 33: Espectro de Fluorescencia de A β , CRANAD-2 y A β +CRANAD2 a una longitud de onda de excitación de 640 nm y un rango de emisión de 670-830 nm.....	54
Figura 34: Controles realizados de A β con las nanopartículas de oro, en ausencia de la sonda fluorescente CRANAD-2.	55

Figura 35: Controles realizados de CRANAD-2 con las nanopartículas de oro, en ausencia de A β	55
Figura 36: Controles realizados de las nanopartículas de oro en ausencia de A β y CRANAD-2	55
Figura 37: Control realizados del péptido A β sin nanopartículas y CRANAD-2	56
Figura 38: Aumento de la intensidad de fluorescencia obtenidos al usar NVO a distintas concentraciones.....	57
Figura 39: Aumento de la intensidad de fluorescencia obtenidos al usar NPrO a distintas concentraciones.....	58

Índice de Tablas

Tabla 1: Diámetro hidrodinámico y Potencial Z de NVO obtenidas de la síntesis.....	32
Tabla 2: Diámetro hidrodinámico y Potencial Z de NVO luego de la funcionalización con PEG.	34
Tabla 3: Diámetro hidrodinámico y Potencial Z de NVO-PEG luego de la funcionalización con péptido D1.....	37
Tabla 4: Diámetro hidrodinámico y Potencial Z de NPrO obtenidos de síntesis..	40
Tabla 5: Diámetro hidrodinámico y Potencial Z de NPrO luego de la funcionalización con PEG D1.....	43
Tabla 6: Diámetro hidrodinámico y Potencial Z de NPrO-PEG luego de la funcionalización con péptido D1.....	46

Abreviaturas

A β : Péptido β -Amiloide

APP: Proteína Precursora de Amiloide

CTAB: Bromuro de Cetiltrimetilamonio

DLS: Dispersión Dinámica de la Luz

EA: Enfermedad de Alzheimer

EDC: 1-Etil-3-(3-Dimetilaminopropil) Carbodiimida

NHS: N-Hidroxisuccinimida

NPO: Nanopartícula de Oro

NPrO: Nanoprismas de Oro

NPs: Nanopartículas

NVO: Nanovarillas de Oro

PBS: Buffer Fosfato

PEG: Polietilenglicol

pZ: Potencial Z

RPS: Resonancia Plasmónica de Superficie.

TEM: Microscopia Electrónica de Trasmisión

Tio: Tiosulfato de Sodio

Resumen

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es la principal causa de demencia en el adulto mayor, provocando deterioro cognitivo progresivo. Hoy en día no existe cura para esta enfermedad, además los tratamientos disponibles solo permiten retrasar el avance de la EA por un periodo de tiempo. Debido a esto se hace necesario crear un sistema para la detección temprana de la EA.

En esta memoria de Titulo se busca crear un sistema de nanopartículas que permitan mejorar la detección de agregados tóxicos del péptido β -amiloide ($A\beta$), mediante la técnica de espectroscopia de fluorescencia, ya que estos agregados están relacionados con el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (EA).

Para lograr esto se sintetizaron Nanovarillas de oro (NVO) y Nanoprismas de oro (NPrO), los cuales fueron estabilizados con polietilenglicol y posteriormente modificados con el péptido D1, este péptido reconoce selectivamente agregados del péptido $A\beta$. Estas nanopartículas fueron caracterizadas mediante espectrofotometría UV-Visible, dispersión dinámica de la luz (DLS), potencial Zeta (pZ) y microscopia electrónica de transmisión y barrido (STEM). Se determinó que estas nanopartículas son capaces de aumentar la fluorescencia basal de la sonda fluorescente CRANAD-2 al estar unida a los agregados tóxicos del péptido $A\beta$, alcanzando un aumento de hasta 3 veces al utilizar NVO y de 2 veces al utilizar NPrO.

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is the main cause of dementia in the elderly, causing progressive cognitive deterioration. Nowadays there is no cure for this disease, in addition the available treatments only allow to delay the advance of the AD for a period of time. Due to this it is necessary to create a system for the early detection of AD.

In this title report, the aim is to create a system of nanoparticles that can improve the detection of toxic aggregates of the β -amyloid peptide ($A\beta$), by means of the fluorescence spectrometry technique, since these aggregates are related to the development of the Alzheimer's disease (AD).

To achieve this, gold nanorods (NRO) and gold nanoprisms (NPrO) were synthesized, which were stabilized with polyethylene glycol and subsequently modified with the D1 peptide, this peptide selectively recognizes aggregates of the $A\beta$ peptide. These nanoparticles were characterized by UV-Visible spectrophotometry, dynamic light scattering (DLS), Zeta potential (pZ) and electron microscopy of transmission and exploration (STEM). It was determined that these nanoparticles are able to increase the basal fluorescence of the fluorescent probe CRANAD-2 by being bound to the toxic aggregates of the $A\beta$ peptide, reaching an increase of up to 3 times when using NRO and 2 times when using NPrO.

Introducción

En los últimos años la población mundial ha envejecido a un ritmo mayor que en años anteriores, por lo que la atención en la salud se ha visto en la necesidad de mejorar los servicios entregados para las personas. Esta mejora en los servicios salud ha redundado en un aumento considerable en las expectativas de vida. Sin embargo, esto ha llevado consigo a un aumento considerable en el número de personas con enfermedades no trasmisibles, entre estas enfermedades se destaca un aumento en la incidencia de la demencia.

La demencia es un síndrome mayormente de naturaleza crónica o progresiva, entre estas la de mayor incidencia es la Enfermedad de Alzheimer. Esta enfermedad al igual que las demás demencias no tiene aún cura. El tratamiento disponible permite retrasar el avance de la enfermedad solo por un periodo de tiempo¹.

A partir de esto es que surge la necesidad de generar nuevas alternativas para detectar y tratar esta enfermedad en etapas más tempranas, y es aquí donde la nanotecnología entra en juego. En esta memoria se buscará demostrar que utilizando nanopartículas plasmónicas se podrá mejorar la detección de agregados de β -Amiloide por fluorescencia, los cuales según la hipótesis de la cascada amiloide son la principal causa que desencadena el desarrollo del Alzheimer.²

Enfermedad de Alzheimer:

La enfermedad de Alzheimer es la principal causa de demencia entre los adultos mayores. La Organización Mundial de la Salud (OMS) informó que en el mundo hay aproximadamente 47,5 millones de personas que padecen demencia, y cada año se registran 7,7 millones de nuevos casos. La enfermedad de Alzheimer, que es la causa de demencia más común, acapara entre un 60% y un 70% de los casos.³

En Chile el Alzheimer es la sexta causa de muerte, afectando a 3.57% de la población, lo que se traduce en 179.722 personas afectadas.⁴

Hoy en día no existe ningún tratamiento que pueda curar esta enfermedad o revertir su progresión. Solo existen numerosas intervenciones que buscan apoyar y mejorar la vida de las personas con esta enfermedad y la de sus cuidadores y familia.³

La enfermedad de Alzheimer es de origen multifactorial y está caracterizada por la pérdida de memoria en el individuo que la padece. Varias evidencias han vinculado la formación de agregados de β -Amiloide intraneuronal con la aparición de esta enfermedad. Esta formación de agregados β -Amiloide sería la causante de la pérdida de sinapsis entre las neuronas, lo que conllevaría a la pérdida de memoria.⁵ La hipótesis actualmente más aceptada y es denominada como "Hipótesis de la cascada amiloide".²

Dicha hipótesis postula que la deposición del péptido β -amiloide en el parénquima cerebral es un paso crucial que conduce al desarrollo del Alzheimer. Esta hipótesis ha sido modificada a lo largo de los años, ya que ha quedado claro que la correlación entre la demencia u otras alteraciones cognitivas y la acumulación de β -amiloide en el cerebro en forma de agregados no es lineal.²

La actual hipótesis de la cascada amiloide sugiere que la sinaptotoxicidad y la neurotoxicidad pueden estar mediadas tanto por las formas insolubles como por las solubles del péptido β -amiloide². En la *figura 1* se presentan las diferentes posibles causas que conllevarían a la aparición de la enfermedad de *Alzheimer familiar*. Tal como se menciona en dicha figura, estos factores serían los responsables de la agregación del péptido β -amiloide. Este péptido al estar agregado puede presentarse en dos estados: Soluble e Insoluble, los cuales al verse sometido a un "proceso de agregación" (término utilizado para describir los mecanismos potenciales que conducen a la agregación de β -amiloide), conllevaría a la formación de filamentos helicoidales apareados (PHF) de los agregados de la proteína intracelular TAU y por último a una disfunción neuronal o muerte neuronal dando origen a la Demencia tipo Alzheimer.²

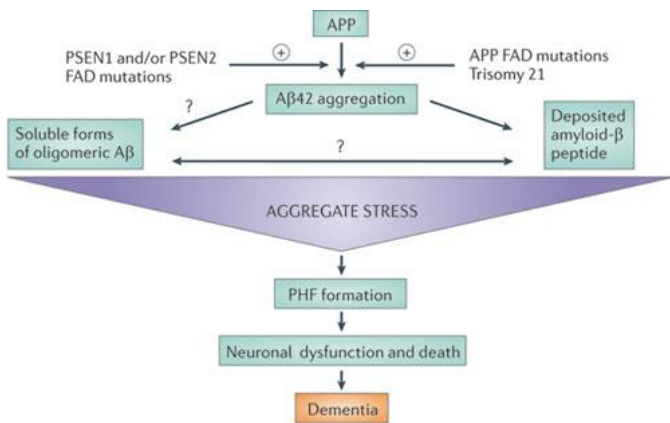


Figura 1: En esta imagen se muestra que la proteína precursora amiloide (APP), debido a la mutación autosómica dominante causan la aparición temprana de la enfermedad de Alzheimer familiar, los genes afectados son: presenilina 1 (PSEN1), PSEN2 y APP².

Nature Reviews | Drug Discovery

Detección de agregados de β-amiloide utilizando sondas fluorescentes:

Tal como se ha mencionado anteriormente, una posible causa de la enfermedad de Alzheimer es la formación de agregados del péptido β-amiloide en el cerebro, los cuales al acumularse en el tiempo y al agregarse (figura 1), conducen a la aparición de los síntomas clínicos de esta enfermedad. Es así como, actualmente esta enfermedad se detecta tardíamente ya que su diagnóstico se realiza 25 a 30 años después del comienzo de la enfermedad cuando ya están presentes los síntomas clínicos como la muerte neuronal. Debido a esto buscar una alternativa para aumentar la sensibilidad en la detección de la formación de estos agregados, facilitaría el diagnóstico de esta enfermedad antes de la aparición de sus síntomas.⁶

En la actualidad la sonda tioflavina es la más utilizada en para detección de agregados β-amiloides *in vitro* y *ex vivo*⁷, pese a la baja afinidad que tiene por los agregados β-amiloides (Kd= 580 nM). Debido a esto se ha puesto atención en la búsqueda de nuevas sondas selectivas para la detección de estos tipos de agregados.⁸ Se ha demostrado que los derivados de la curcumina poseen una gran selectividad por los agregados de β-amiloide, entre estos derivados se destaca la sonda fluorescente CRANAD-2 (figura 2), el cual posee una alta afinidad por estos agregados (Kd=38.0 nM).⁸

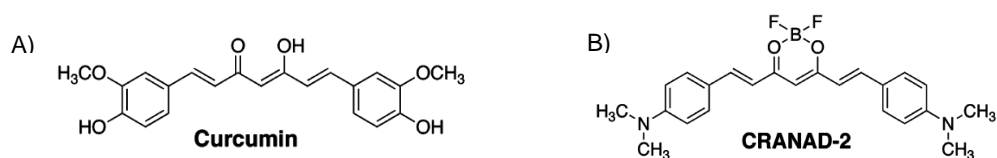


Figura 2: Comparación entre estructura de Curcumina y CRANAD-2
 A) Estructura de la Curcumina B) Estructura del CRANAD-2⁸

Además de estas características el CRANAD-2 al interactuar con los agregados de β -amiloide se produce un aumento de 70 veces en su fluorescencia normal, el cual se puede ver en la *figura 3*, este efecto es conocido como "switches on". Este compuesto posee espectros de absorción y emisión de la fluorescencia centrados en la región infrarroja del espectro en la que existe poca absorción de los tejidos (*figura 4*). Es así que se ve facilitada la detección de fluorescencia en dicha región ya que los tejidos tienen muy baja absorción de la radiación infrarroja.⁹ En el caso de la tioflavina, también se produce el efecto "switches on" al interactuar con el péptido A β . A diferencia de la sonda CRANAD-2, la tioflavina tiene espectros de emisión de fluorescencia con máximos centrados en alrededor de los 480 nm. No obstante, considerando su potencial uso para detección *in vivo*, el principal problema de utilizar sondas que producen emisión en esta zona es que los tejidos presentan una alta absorción en esta zona del espectro (*figura 4*), viéndose dificultada la detección de la fluorescencia en esta región.

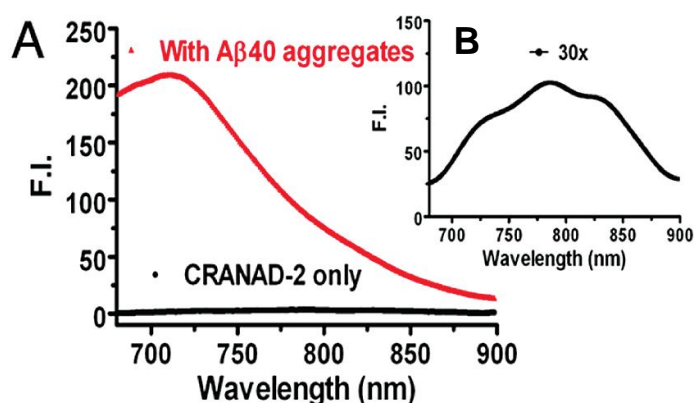


Figura 3: Efecto "switch on" en la fluorescencia de CRANAD-2 (100 nM) al interactuar con agregados β -amiloide (línea roja) (A); CRANAD-2 solo en PBS (línea negra). B) CRANAD-2 solo (intensidad de emisión es amplificada 30 veces).⁸

En este proyecto se plantea utilizar la sonda fluorescente CRANAD-2 para detectar agregados β -amiloide *in vitro* por su espectro de emisión en el infrarrojo y por su mayor afinidad por los agregados β -amiloide ($K_d=38.0$ nM)⁸ en comparación a la sonda tioflavina ($K_d=580$ nM)⁷. Pese a estas propiedades mejoradas, en la Enfermedad de Alzheimer la detección precoz es indispensable para atenuar la progresión de la enfermedad, por lo cual también sería deseable poder aumentar la intensidad de emisión de la sonda fluorescente. Para esto, la nanotecnología podría ser una herramienta interesante.

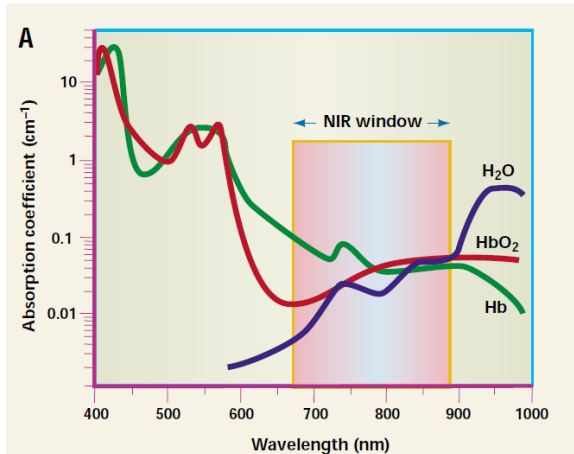


Figura 4: Ventana biológica de absorción. Se da entre las longitudes de onda 700 y 900 nm correspondiente al infrarrojo cercano (NIR), en la cual se genera la mínima absorción de energía por parte de moléculas biológicas como la hemoglobina, oxihemoglobina y agua.¹⁰

Nanopartículas plasmónicas y sus aplicaciones en diagnóstico y terapia:

Las nanopartículas metálicas son nano estructuras que poseen interesantes propiedades; tales como una gran área superficial, alta reactividad química, pequeño tamaño y propiedades ópticas, por lo cual pueden ser usados en aplicaciones médicas como: agentes de diagnóstico, entrega de fármaco y para terapias fototérmicas.¹¹ En el caso de las nanopartículas constituidas de oro, conocidas como nanopartículas de oro (NPO), poseen tamaños que oscilan desde los 1 a los 150 nm, se han convertido en las de mayor interés debido a que son muy estables, biocompatibles, fáciles de sintetizar y de ser visualizadas mediante microscopía electrónica.¹²

Tal como se mencionaba anteriormente entre las propiedades que poseen las nanopartículas, se encuentra su gran área superficial, la cual nos permite funcionalizarla, es decir, que podemos unir diversas moléculas a la superficie de estas NPO, logrando así dirigir a estas NPO a sitios de interés.^{13;14} Esta funcionalización es gracias a que el oro (Au) puede reaccionar con grupos sulfidrilos generándose un enlace covalente dativo.¹⁵ Debido a este enlace Au-tiol, las NPO pueden ser funcionalizadas con diversas moléculas tales como fármacos, moléculas de DNA/RNA, péptidos, anticuerpos, polímeros, etc. Dada esta gran versatilidad, la funcionalización de la superficie de las NPO les confiere una gran ventaja en su uso en diagnóstico y detección de enfermedades, y por ende han sido utilizadas en diversas aplicaciones biomédicas entre las que podemos mencionar su uso como agentes de contraste en imagenología¹⁶, como biosensores¹⁷ y a la capacidad de transportar fármacos (*Drug delivery*) y diversas moléculas.^{18;19;20}

Otra de las propiedades a destacar de las nanopartículas de oro, hierro y de plata es la resonancia plasmónica de superficie (RPS) o también conocida como efecto plasmón, esta característica depende de la forma, tamaño y composición de la nanopartícula y de las propiedades del medio que las rodea.²¹

La resonancia plasmónica de superficie (RPS) puede considerarse como el movimiento colectivo de los electrones en la superficie del metal causados por la interacción con un campo electromagnético (figura 5).²¹ Debido a esta característica que tienen las nanopartículas, es que se observan ciertas propiedades ópticas particulares, por ejemplo, en el caso de nanopartículas de oro, al absorber luz, causa que sus disoluciones adquieran coloraciones llamativas como tonalidades rojizas, al contrario del tono dorado que presenta este elemento cuando se encuentra a granel.¹¹

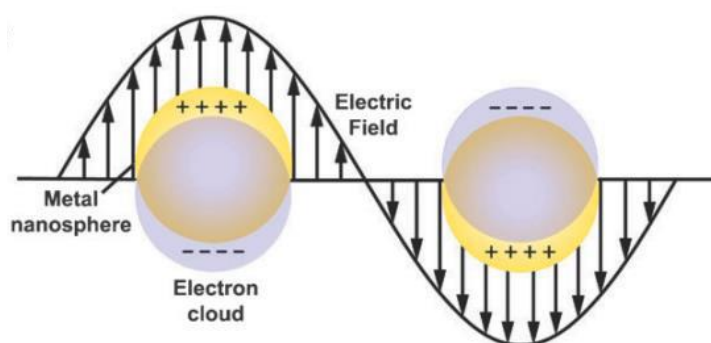


Figura 5: Efecto de RPS que se produce en una nanopartícula de oro, en la cual los electrones de la superficie oscilan colectivamente cuando son excitados a una determinada longitud de onda mayor que el tamaño de la nanopartícula.¹⁴

Otra característica que les confiere la resonancia plasmónica de superficie, es el efecto fototérmico, es decir que, al interaccionar la nanopartícula con una radiación electromagnética, estas pueden absorber la energía y luego liberarla en forma de calor local. Gracias a estas características, las nanopartículas de oro se han utilizado para la destrucción de agregados proteicos tóxicos²² y en terapia antineoplásica.²³

Efecto de aumento de fluorescencia por superficie en nanopartículas plasmónicas:

La sensibilidad para la detección espectroscópica puede ser amplificada con el uso de nanopartículas plasmónicas. Esta propiedad podría ser relevante para mejorar la detección de

biomarcadores y lograr un diagnóstico precoz de diferentes enfermedades. Una de las técnicas espectroscópicas en la cual su señal se ve aumentada por el plasmon de las nanopartículas de metales como oro, plata o cobre es la técnica SEF (Surface-Enhanced Fluorescence), tal como se detalla en la *figura 6*.

En caso de NPs encapsuladas (ej. nanopartículas con PEG o con sílica), el efecto es llamado SHINEF (shell-isolated nanoparticle-enhanced fluorescence).²⁴ Este efecto de aumento en la fluorescencia se debe a la interacción entre la nanopartícula metálica y la molécula excitada, mejorando la tasa de decaimiento radioactivo y con ello incrementando el rendimiento cuántico de la sonda.²⁵ La mejora máxima que se puede obtener en la fluorescencia es cuando la absorción electrónica del color está en resonancia tanto con: la resonancia plasmónica de la nanopartícula, como con la longitud de onda de emisión de la sonda y la distancia entre esta y la nanopartícula es alrededor de 10 nm.²⁶

Es así que, en el presente proyecto se emplearán nanopartículas de oro para aumentar la fluorescencia del CRANAD-2 unido a agregados tóxicos de la proteína A β .

Para ello se emplearán nanoprimas de oro (NPrO) y nanovarillas de oro (NVO) que poseen la banda plasmónica en la región del infrarrojo.

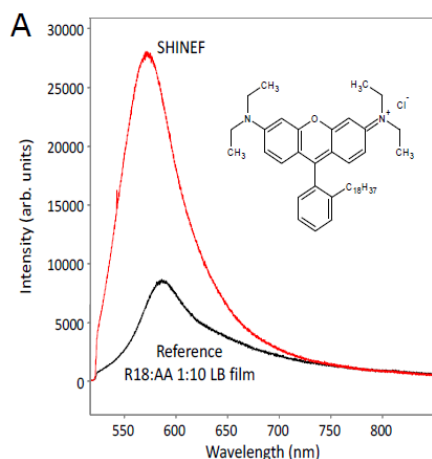


Figura 6: Aumento de la fluorescencia de octadecil rodamina B (R18), utilizando GNPs cubiertos con sílice. (Espectro de emisión con NPs está en rojo y en ausencia de NPs está en negro).²⁶

Funcionalización de nanopartículas plasmónicas para dirigir las hacia los agregados tóxicos de β -amiloides:

Para lograr un direccionamiento selectivo de la nanopartícula hacia los agregados de $A\beta$, estas se funcionalizarán con un péptido, el cual le conferirá una alta selectividad por los agregados $A\beta$. En este caso utilizaremos el péptido D1, el cual pertenece a una familia de péptidos que poseen una alta selectividad por este tipo de agregados β -amiloides y tienen la capacidad de desagregarlos. En nuestro grupo de investigación se ha evaluado nanosistemas de oro funcionalizados con este péptido y se ha observado que mantiene la capacidad de reconocimiento y prevención de la agregación del péptido β -amiloides una vez que ha sido utilizado para funcionalizar nanopartículas.²⁷ Este péptido D1, posee aminoácidos de la serie D, los cuales presentan ventajas con respecto a los aminoácidos de la serie L, como: menor sensibilidad a proteasas, resistencia a la degradación, vida media superior, absorción vía oral y son menos inmunogénicos.²⁸ Antes de la funcionalización de la nanopartícula con el péptido D1, utilizaremos la alta reactividad que tiene la superficie de la nanopartícula, para funcionalizarla con HS-PEG, el cual, al tener un extremo tiol, será posible formar un enlace estable S-Au por medio de quimisorción.²⁹ De esta manera se aumentará la estabilidad coloidal de las nanopartículas. Asimismo, permitirá separar al péptido D1 de la superficie de la nanopartícula lo que permitirá una mayor interacción con agregados de $A\beta$. El HS-PEG contiene además del grupo tiol un grupo carboxílico, que permitirá la formación de un enlace amida entre el péptido D1 y el PEG tal como se representa en la *figura 7*. En nuestro laboratorio se han sintetizado distintas formas de nanopartículas de oro entre ellas se encuentran las nanoesferas (NeO), nanovarillas (NVO) y nanoprismas de oro (NPrO), los cuales presentan plasmones característicos a lo largo del espectro UV-Visible-NIR, tal como se muestra en la *figura 7*. Para este caso utilizaremos nanopartículas de oro que presentan un plasmon superficial en la longitud de onda en el rango del infrarrojo, dentro de la ventana biológica, como lo son las nanovarillas (NVO) y los nanoprismas (NPrO).^{29,31}

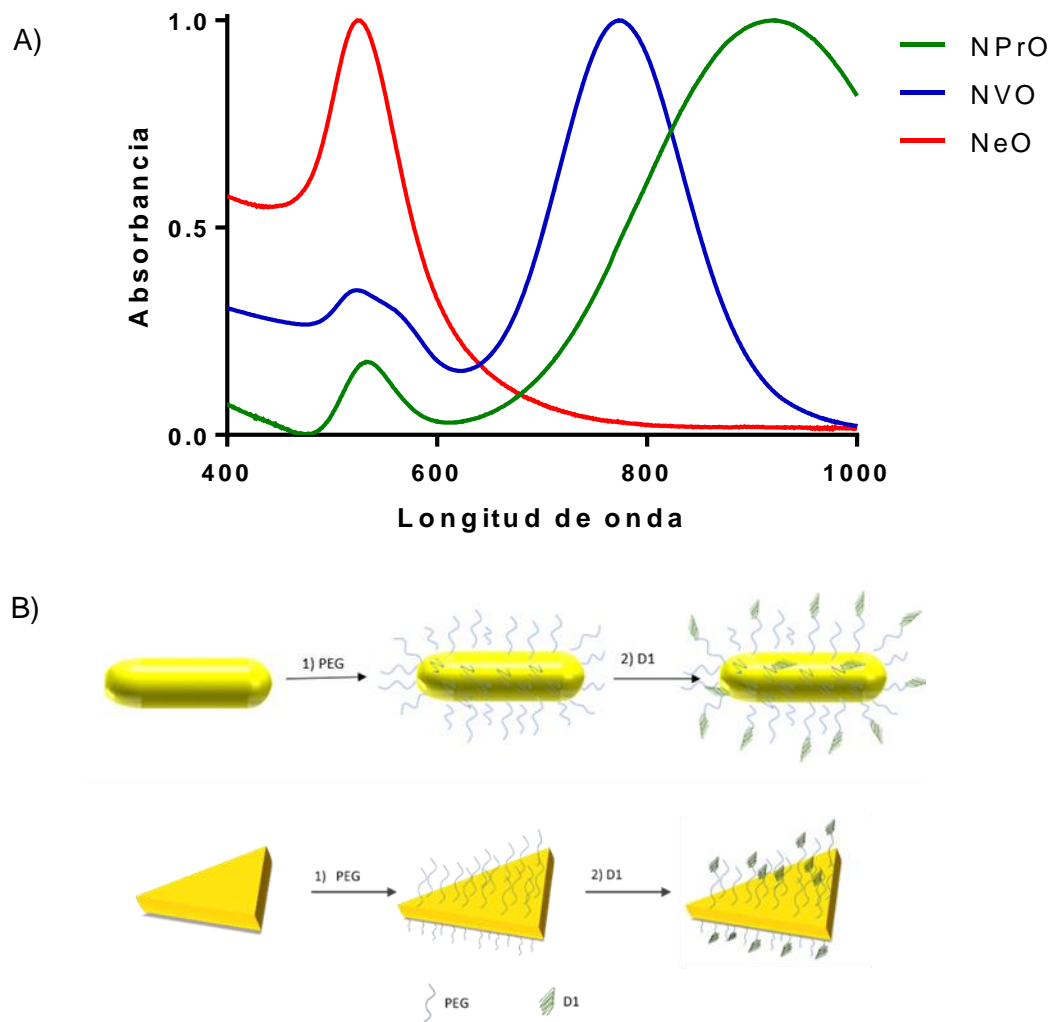


Figura 7: Espectro de absorción de nanopartículas de oro y esquema de funcionalización. A) Espectro de absorción para NPrO, NVO y NeO, B) Esquema de funcionalización de NVO y NPrO. Funcionalización con PEG y posteriormente con D1.

Propuesta de Trabajo

En este proyecto las nanopartículas NVO y NPrO, serán funcionalizadas con PEG y péptido D1 con la finalidad de generar un sistema estable y selectivo para las fibras de A β . Con este sistema buscamos aumentar la intensidad de la fluorescencia de la sonda fluorescente CRANAD-2 unida a los agregados β -amiloide, utilizando para esto el efecto SEF producido por las nanopartículas.

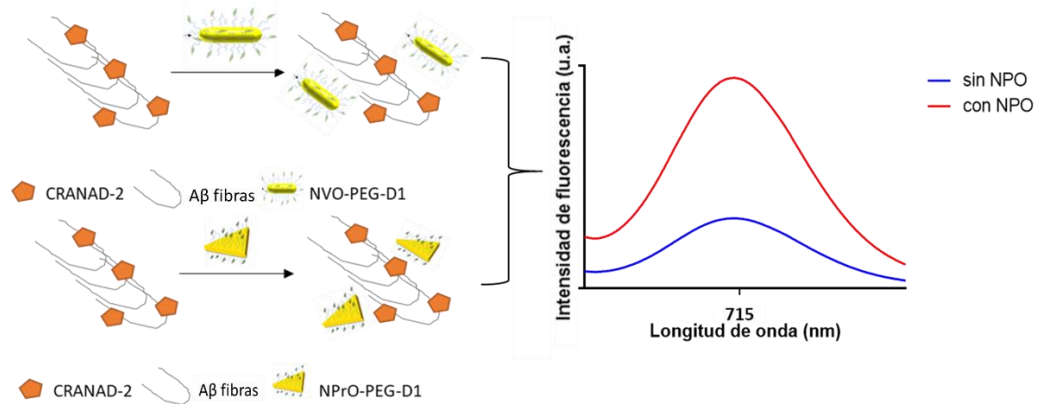


Figura 8: Esquema del sistema nanopartículas y CRANAD-2 unido a fibra de A β para mejorar su detección.

Hipótesis

Debido a lo expuesto anteriormente se postula que:

“Nanopartículas plasmónicas funcionalizadas con el péptido D1 producen un aumento en la intensidad de fluorescencia de CRANAD-2 unidos a agregados β -Amiloide *in vitro*”.

Objetivo general:

Sintetizar Nanopartículas plasmónicas funcionalizadas con el péptido D1 y evaluar su efecto *in vitro* sobre la intensidad de la fluorescencia de la sonda CRANAD-2 unidos a los agregados β -Amiloide.

Objetivos específicos:

1. Sintetizar Nanopartículas plasmónicas (NVO y NPrO) y funcionalizarlas con PEG y péptido D1.
2. Evaluar la estabilidad coloidal de las nanopartículas sintetizadas.
3. Evaluar el efecto de las Nanopartículas sobre la intensidad de emisión de la sonda fluorescente CRANAD-2 para detectar los agregados $A\beta$.

Metodología

1 Síntesis Nanopartículas plasmónicas y funcionalización con PEG y péptido D1.

1.1 Síntesis de Nanovarillas de oro (NVO) estabilizadas con CTAB.

Las NVO fueron sintetizadas usando el método mediado por semillas, en el cual se forman en una primera etapa pequeñas esferas y a partir de ellas se produce el crecimiento de la NVO.³⁰

En un primer paso, se preparo una solución de semillas a partir de una mezcla de 42.5 μL de HAuCl_4 (29.4 mM) y 4.7 mL de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) 0.1 M, la cual se agitó durante 5 minutos a 100 rpm. Posterior a esto se añadió 300 μL del agente reductor borohidruro de sodio 10 mM preparado en frío, para producir la reducción de la sal de oro y con ello la formación de las semillas. Esta mezcla se mantuvo en agitación durante 20 segundos a 1400 rpm y luego se dejó durante 15 minutos en agitación suave. Las semillas obtenidas se mantuvieron a 27°C hasta el momento de uso.

A continuación, se preparó una solución de crecimiento a partir de una mezcla de 170 μL de HAuCl_4 (29.4 mM) y 10 mL de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) 0.1 M, se mantuvo la mezcla en agitación vigorosa a 27°C hasta el término de la síntesis. Transcurridos 10 segundos se añadieron 75 μL de ácido ascórbico 0.1 M y 80 μL AgNO_3 5 mM se esperaron 30 segundos y se añadieron 120 μL de las semillas preparadas anteriormente, 20 segundos después se retiró el agitador magnético y se dejó reposar la solución durante 30 minutos a 27°C. Una vez terminado el tiempo de espera, el producto obtenido se centrifugo a 5900 g durante 30 minutos, el *pellet* obtenido se resuspendió en agua milli-Q³¹ y se almaceno a 27°C. Una vez terminada la síntesis las nanopartículas fueron caracterizadas por: UV-Visible, DLS, Potencial Z y STEM.²⁷

1.2 Funcionalización de NVO con PEGs:

Las NVO obtenidas fueron conjugadas con una mezcla de polietilenglicol (HS-PEG-OMe y HS-PEG-COOH) para dar estabilidad y permitir la posterior funcionalización de la NVO. Estos PEG poseen un grupo tiol que permiten la quimisorción de estas moléculas sobre la superficie de la nanopartícula. La funcionalización se realizó en dos etapas, primero 50 µL de una solución de SH-PEG-OMe 1 mM se agregó a 10 mL de una suspensión de NVO-CTAB 1 nM, la mezcla obtenida se dejó reaccionar bajo agitación magnética durante 10 min. Las NVO-PEG-OMe fueron centrifugadas a 16100 g por 10 min y luego el sobrenadante fue descartado. El *pellet* fue resuspendido en 10 mL de agua milli-Q. en la segunda etapa, se agregó a la suspensión de NVO-PEG-OMe 300 µL de una solución de HS-PEG-COOH 1 mM y se dejó reaccionar durante una hora en agitación mecánica, obteniéndose como resultado una capa mixta de PEG-OMe y PEG-COOH sobre la superficie de la NVO (NVO-PEGs). Una vez terminada la conjugación de los NVO fueron caracterizados por: UV-Visible, DLS y Potencial Z.²⁷

1.3 Funcionalización de NVO con el péptido D1:

La funcionalización de las NVO con el péptido D1, se realizó mediante la formación de un enlace amida entre el PEG-COOH y el péptido D1. Para llevar a cabo esto, se utilizaron los reactivos 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimida/N-hydroxysulfosuccinimida (EDC/NHS) con los cuales se formó un enlace amida, permitiendo unir el extremo carboxilo del HS-PEG-COOH con el extremo amino del péptido D1. La solución de NVO-PEGs se centrifugaron a 16100 g por 10 min y el sobrenadante fue descartado. El *pellet* obtenido se resuspendió en 100 µL de la solución amortiguadora MES 0.1M pH 5.5. Posteriormente, se agregaron 0.2 mg de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) y 0.5 mg de sulfo N-hidroxisuccinimida (Sulfo-NHS) en 100 µL de MES y se incubaron con la suspensión de NVO-PEGs por 15 min para activar los grupos carboxilos en la superficie de la NVO. El exceso de EDC/Sulfo-NHS se removió posteriormente por centrifugación a 16100 g por 10 min. Las NVO-PEGs activadas fueron mezcladas con 0.3 mg del péptido D1, en la solución

amortiguadora de PBS pH 7.4. La solución se mantuvo bajo agitación suave durante 24 hrs a temperatura ambiente y fueron guardadas a 4°C.

Previo a su uso, las NVO-péptidos se centrifugaron a 16100 g por 10 min para eliminar los péptidos no unidos.²⁰ Una vez terminado el proceso de conjugación de las nanopartículas con el péptido, serán caracterizadas por UV-Visible, DLS y Potencial Z.²⁷

1.4 Síntesis de Nanoprismas de oro:

Para la síntesis de NPrO se modificó el protocolo de Pelaz *et al.*, 2012. Se prepararon 10 mL de una solución acuosa de HAuCl₄ de concentración 2 mM, la cual se mezclaron con 12 mL de una solución 0.625 mM de tiosulfato de sodio (Na₂S₂O₃) con agitación suave durante 9 minutos a temperatura ambiente. Para terminar la reacción se adicionaron 2 mL de una solución 0.625 mM de Na₂S₂O₃. Los NPrO obtenidos se dejaron reposar durante 30 minutos y a continuación fueron filtrados y almacenados a 4 °C³². Una vez terminada la síntesis las nanopartículas fueron caracterizadas por: UV-Visible, DLS, Potencial Z y STEM.²⁷

1.5 Funcionalización de Nanoprismas con PEG:

Los NPrO obtenidos fueron conjugados con PEG (HS-PEG-COOH). El protocolo utilizado es a una solución de 5 mL de NPrO con una absorbancia de 1, se le ajustó el pH a 12 y se mantuvo bajo agitación suave y se añadieron 0.5 mg de PEG disueltos en 15 µL de agua milli-Q ajustada a pH 10 y por último se dejó agitando por 3 horas a velocidad suave. Terminado el tiempo se centrifugó a 5900 g por 20 min para eliminar el exceso de PEG-COOH, el *pellet* se resuspendió en agua milli-Q y se inició el protocolo de purificación, el cual consta de centrifugaciones seriadas de 3300, 1500 y 400 g por 20 min. El *pellet* final obtenido se resuspendido en agua milli-Q. Una vez obtenidas la muestra de NPrO purificados se procedió a realizar una segunda funcionalización con HSPEG-COOH. A 5 mL de NPrO purificados se les ajusto el pH a 12 y se mantuvo en agitación suave. Posteriormente, se añadieron 0.75 mg de HS-PEG-COOH disueltos en 150 µL de agua milli-Q ajustada a pH 10 y por último se dejó agitar por toda una noche. Terminada la funcionalización la solución obtenida se centrifugo a 3300 g por 20 min, el *pellet* obtenido se

resuspendió en agua milli-Q y se almacenó a 4°C. Una vez terminada la conjugación de los NPrO fueron caracterizados por: UV-Visible, DLS y Potencial Z.²⁷

1.6 Funcionalización de Nanoprismas con el péptido D1:

La solución de NPrO-PEG obtenida se centrifugó a 3300 g por 15 min y se resuspendió el *pellet* en 400 µL de agua milli-Q y se sonó la solución obtenida por 5 min. A continuación 0.9 mg de EDC y 1.35 mg de Sulfo-NHS se agregaron a la solución de NPrO-PEG durante 15 min para activar los grupos carboxilo. El exceso de EDC/sulfo-NHS fue removido mediante una centrifugación a 3300 g por 15 min, el *pellet* se resuspendió en una solución que contiene 0.3 mg del péptido D1 disuelto en PBS pH 7.4. Finalmente, la solución se dejó en agitación durante toda la noche y al día siguiente se centrifugó a 3300 g por 15 min a temperatura ambiente para separar el péptido remanente, el *pellet* obtenido se resuspendió en agua milli-Q. Los NPrO-PEG-D1 fueron almacenados a 4°C. Una vez terminada la funcionalización de los NPrO con el péptido fueron caracterizados por: UV-Visible, DLS y Potencial Z.²⁷

1.6 Caracterización de las nanopartículas:

Las nanopartículas sintetizadas fueron caracterizadas en cada etapa de funcionalización, mediante UV-Visible, DLS, Potencial Z y STEM.²⁷ Para la caracterización mediante UV-Visible, se utilizó el equipo PerkinElmer® modelo Lambda 25, con el cual se realizó un barrido de 400-1100 nm de longitud de onda. Para la caracterización mediante DLS y Potencial Z se utilizó el equipo DLS de Malvern modelo ZS, donde se realizó primero la medición de DLS la cual constó de tres repeticiones y se calculó el promedio de los valores obtenidos y posteriormente a la misma muestra se le evaluó Potencial Z, el cual constó de cinco mediciones para obtener el valor promedio. Para la caracterización mediante STEM, se utilizaron grillas FCF300-CU que fueron preparadas 24 hrs antes de ser analizadas.

2 Evaluación de la estabilidad coloidal de las nanopartículas sintetizadas.

La estabilidad de las nanopartículas fue evaluada mediante el uso de espectrofotometría UV-Visible. Para ello se incubaron las muestras y se obtuvieron los espectros de las diversas

soluciones.³³ En este caso se utilizaron 3 soluciones: Agua, PBS y Medio de cultivo con suero al 10%. Una vez preparadas las muestras de NVO-PEG-D1 0,5 nM y NPrO-PEG-D1 0,2 nM serán almacenadas a 37°C y se midieron a las 1; 2; 4; 6 horas de haber iniciado el experimento.

3 Evaluar el efecto de las Nanopartículas sobre la intensidad de la fluorescencia de las sondas fluorescentes utilizadas en los agregados β -Amiloides.

0.05 mg β -amiloide (1-42) se resuspendieron en 100 μ L de hexafluoroisopropanol (HFIP) y luego de 30 min se liofilizó durante toda la noche. Al día siguiente se agregaron 16 μ L de DMSO a la muestra liofilizada y se tomaron 5 μ L de la solución obtenida llevándola a un volumen final de 310 μ L con PBS, obteniéndose una solución de β -amiloide a 10 μ M. Una vez preparada la solución se procedió a preparar la placa de lectura Corning 3573. Se realizó la medición en el fluorímetro Biotek synergy mx en triplicado. Cada pocillo de la placa contenía 20 μ L de PBS, 25 μ L de la solución preparada de β -amiloide (obteniendo una concentración final de 5 μ M), 2.5 μ L de nanopartículas a utilizar (NVO-PEG-D1 o NPrO-PEG-D1) y 2.5 μ L de la Sonda Fluorescente (concentración final en el pocillo de 1 μ M). Una vez realizada la mezcla en la placa se procedió a medir inmediatamente en el fluorímetro a una longitud de onda de excitación de 640 nm y emisión de 715 nm. Los resultados obtenidos serán comparados con la fluorescencia basal de A β +CRANAD-2 y se analizarán mediante la prueba *t Student*, para conocer si los valores obtenidos son estadísticamente significativos.

Resultados y Discusión

1 Síntesis Nanopartículas plasmónicas y funcionalización con PEG y péptido D1.

1.1 Síntesis de Nanovarillas de oro (NVO) estabilizadas con CTAB.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos por espectrofotometría UV-Visible, DLS, Potencial Z, y STEM para la síntesis de NVO, según la metodología mencionada anteriormente.

Al caracterizar las NVO se observó mediante UV-Visible dos máximos de absorbancia a 512 y 748 nm, característicos de este tipo de nanopartículas (figura 9). El primer máximo se relaciona con la interacción de la luz con el eje transversal de las NVO y el otro al de la luz con el eje longitudinal de la NVO.^{26,30}

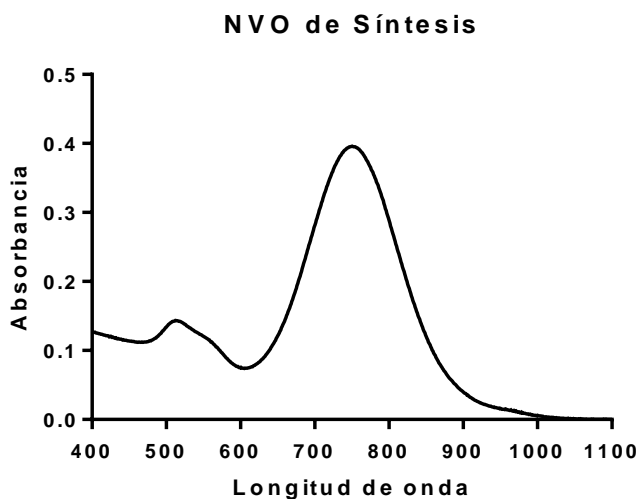


Figura 9: Espectro UV-Visible de NVO obtenidas de síntesis. Presenta dos máximos a 512 nm y 745 nm (Imagen representativa)

Al caracterizar las NVO obtenidas de síntesis, mediante DLS, se obtuvieron los datos que se presentan en la *Tabla 1*. Se observó que estas nanopartículas debido a su asimetría presentan dos picos máximos (*Tabla 1*, figura 10), uno relacionado con el tamaño del eje transversal de la partícula (máximo 1) y el otro con el eje longitudinal (máximo 2).³⁰

Diámetro Hidrodinámico			Potencial Z	
Promedio Tamaño (nm)	Desviación estándar (nm)	Pdi	Promedio Potencial Z (mV)	Desviación estándar (mV)
Máximo 1	1.50	0.412	+27	3.2
Máximo 2	46.0			

Tabla 1: Diámetro hidrodinámico y Potencial Z de NVO obtenidas de la síntesis. En A se presentan los datos del diámetro hidrodinámico (n=3) y en B se presentan los valores obtenidos de potencial Z para las NVO obtenidas de síntesis (n=3).

Los datos obtenidos de potencial Z (Tabla 2) dan cuenta de que, las NVO obtenidas de síntesis presentaron una carga superficial de +27 mV. Este valor de signo positivo se debe a la presencia de CTAB en la superficie de la NVO. El CTAB es un tensoactivo que es utilizado como agente estabilizante de la NVO durante la síntesis y posee una carga positiva.³⁰

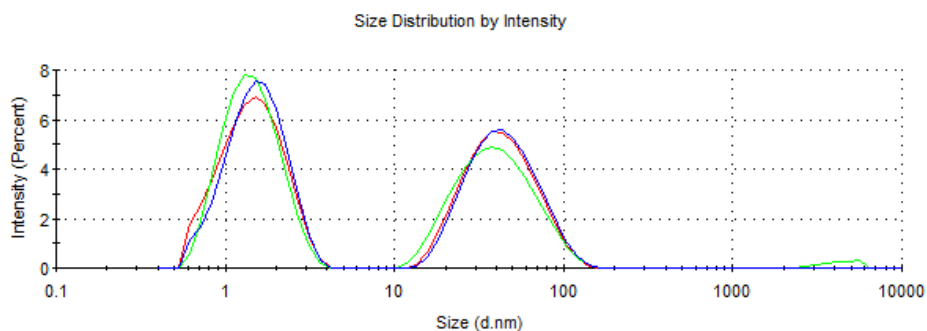


Figura 10: Gráfico de distribución de tamaños de las NVO obtenidas de síntesis (Imagen representativa).

Mediante las imágenes obtenidas de la microscopia electrónica (figura 11), se comprobó la existencia de distintas poblaciones de tamaño de NVO, donde la relación de aspecto (largo/ancho) de las NVO determino que la población mayoritaria tiene una relación de aspecto de 3:1, teniendo un largo promedio de 34 ± 5 nm y un ancho de 10 ± 2 nm. A diferencia de lo obtenido por DLS, donde el largo de las NVO tiene un valor aproximado de 40 nm, esta diferencia entre las dos técnicas se debe a que en la técnica DLS existe la formación de una capa superficial de agua sobre la nanopartícula, lo cual genera un aumento en el tamaño de la NVO que no está presente al realizar STEM. Es así que con DLS se determina el diámetro hidrodinámico a diferencia de lo que se hace con el STEM, en donde se mide el tamaño de la nanopartícula metálica observada en la imagen de microscopia y que

está dado por la interacción del haz de electrones con los átomos de oro que conforman la nanopartícula.

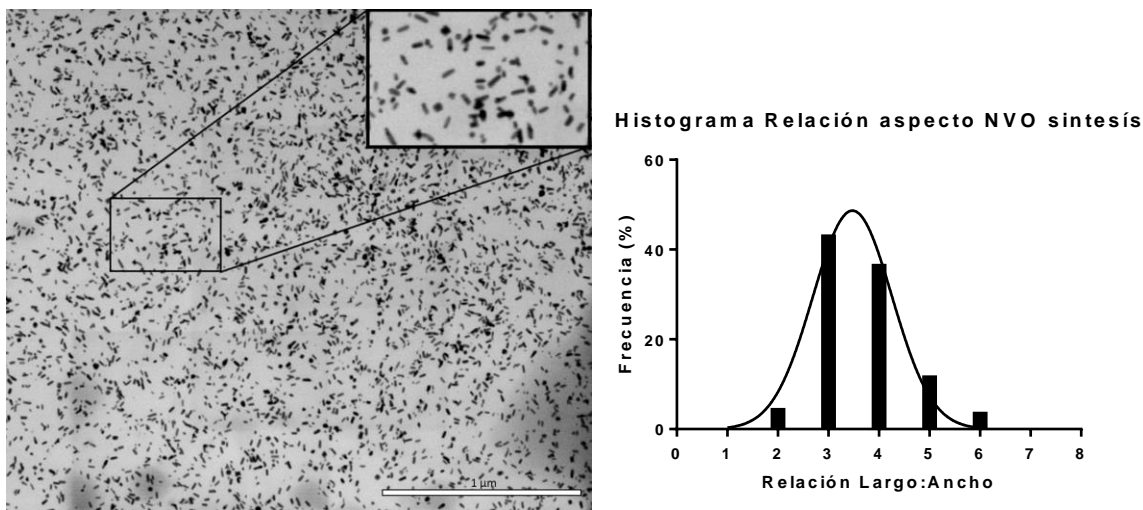


Figura 11: Imagen STEM e histograma de NVO obtenidas de síntesis, estas nanopartículas tienen una distribución de tamaño de 34 nm aproximadamente con una relación de aspecto de 3 (STEM Imagen representativa; Histograma realizado con un $n=3$ de las imágenes obtenidas).

Los resultados obtenidos demuestran que el protocolo de síntesis utilizado permitió obtener NVO con una distribución de tamaño de 34 nm aproximadamente. Lo cual fue confirmado mediante el uso de DLS e imágenes STEM de la muestra.

La obtención del espectro característico mediante UV-Visible tuvo un máximo de 748 nm, siendo este el valor característico para la obtención de NVO mediante este protocolo.³⁰ Por otra parte, en esta síntesis se utilizó CTAB como agente estabilizante, el cual al ser un agente catiónico se esperaba que la carga superficial de las NVO fuera positiva, lo cual fue confirmado mediante la información obtenida del potencial Z, dando un valor promedio de +27.2 mV.^{26,30}

1.2 Estabilización de NVO mediante funcionalización con PEG

A continuación, se presentan los resultados obtenidos por espectrofotometría UV-Visible, DLS, Potencial Z, y STEM para la funcionalización de NVO con PEG, según la metodología mencionada anteriormente.

Al caracterizar las NVO-PEG, mediante UV-Visible (figura 12) se obtuvo la presencia de dos máximos de absorción 512 y 750 nm. Comparando con los datos obtenidos en las NVO de síntesis, se observa un desplazamiento de 2 nm luego de haberse realizado la funcionalización con PEG.

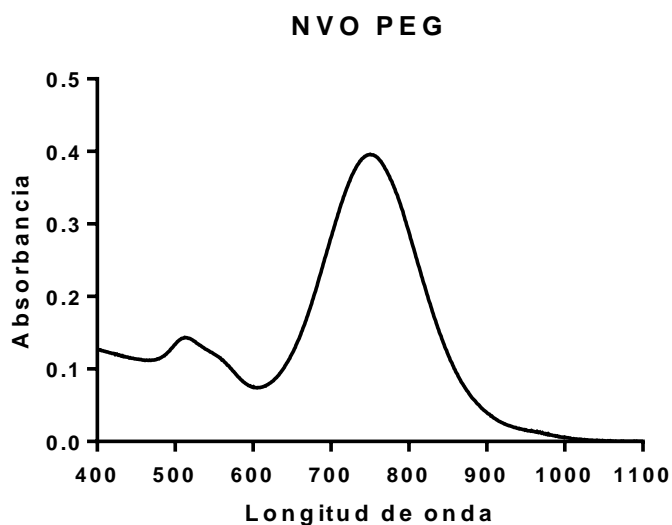


Figura 12: Espectro UV-Visible de NVO funcionalizada con PEG. Presenta dos máximos a 512 nm y 750 nm (imagen representativa).

Al caracterizar las NVO-PEG mediante DLS, se obtuvieron los datos que se presentan en la Tabla 2. Se observó que estas nanopartículas al igual que las NVO de síntesis presentan dos picos máximos de diámetro hidrodinámico (Tabla 2, figura 13), en este caso se ve un aumento de los diámetros hidrodinámicos de las NVO-PEG, con respecto a las NVO de síntesis, por lo cual podemos confirmar que hubo un recubrimiento con PEG que generó un aumento en el tamaño de la nanopartícula.

Diámetro Hidrodinámico			Potencial Z	
Promedio Tamaño (nm)	Desviación estándar (nm)	Pdi	Promedio Potencial Z (mV)	Desviación estándar (mV)
Máximo 1	5.4		0.420	-23
Máximo 2	67			

Tabla 2: Diámetro hidrodinámico y Potencial Z de NVO luego de la funcionalización con PEG. En A se presentan los datos del diámetro hidrodinámico de las NVO (n=3) luego de la funcionalización con PEG, y en B se presentan los valores obtenidos de potencial Z (n=3) para la misma muestra.

Los datos obtenidos de potencial Z (Tabla 2) nos dan cuenta de que las NVO funcionalizadas con PEG presentaron una carga superficial de -23 mV, este valor junto al diámetro hidrodinámico nos permite confirmar que la funcionalización con PEG se realizó correctamente. Este valor obtenido se debe a que el PEG utilizado presenta un extremo carboxílico, el cual al estar en solución adquiere carga negativa, además al unirse a la superficie causa el desplazamiento del CTAB presente en la NVO, perdiendo de esta forma la molécula que confería carga positiva al sistema.

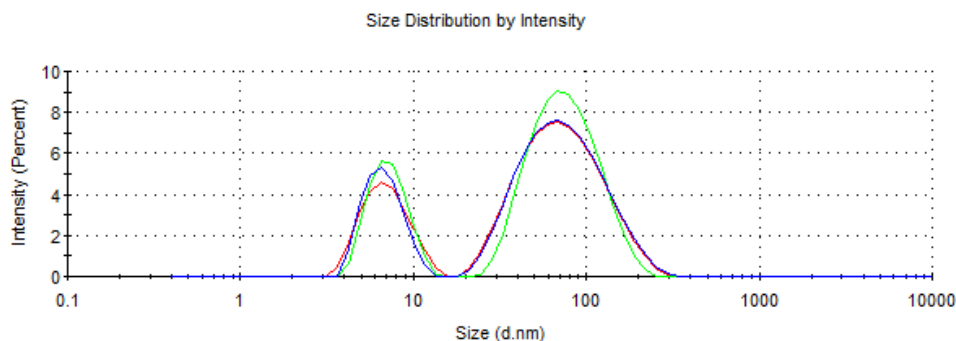


Figura 13: Gráfico de distribución de tamaños de las NVO obtenidas después de la funcionalización con PEG (imagen representativa).

Mediante las imágenes obtenidas de la microscopia electrónica (figura 14), se observó que la relación de aspecto en comparación con las NVO obtenidas de síntesis aumento de 3:1 a 4:1 luego de la funcionalización con PEG, pero manteniendo el tamaño observado anteriormente 33 ± 5 nm y 8 ± 1 nm. Mediante DLS se obtiene un largo de 66 nm aprox., esto es debido tanto a la capa superficial de agua que rodea a la nanopartícula y al PEG, el cual no puede ser visualizado mediante STEM sin el previo tratamiento de tinción. Por lo tanto, la imagen STEM solo nos estará dando el tamaño de la nanopartícula sin tomar en cuenta al PEG.

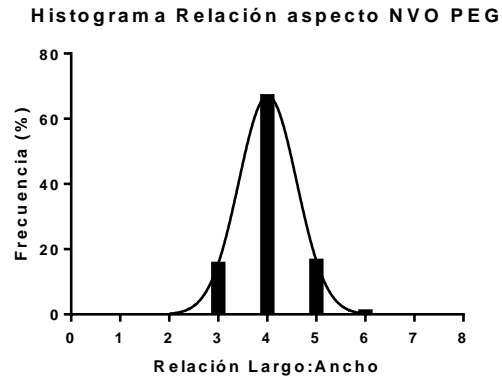
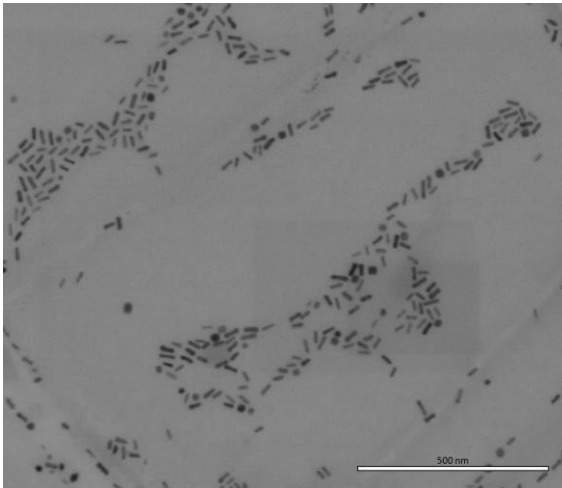


Figura 14: Imagen STEM e histograma de NVO obtenidas después de la funcionalización con PEG, estas nanopartículas tienen una distribución de tamaño de 33 nm aproximadamente y una relación de aspecto de 4 (STEM Imagen representativa; Histograma realizado con un $n=3$ de las imágenes obtenidas).

Los resultados obtenidos demuestran que el protocolo de funcionalización utilizado nos permite obtener NVO funcionalizadas con PEG, obteniéndose un leve desplazamiento en los espectros UV-Visible, pudiéndose confirmar que esta funcionalización ocurrió mediante la variación en el tamaño del diámetro hidrodinámico, el cual era de 45 nm para las NVO de síntesis y posterior a la funcionalización dieron un valor de 66 nm. Por otra parte, el potencial Z también nos confirma que existe un cambio en la superficie de las NVO, ya que el potencial Z de esta varía desde +27 mV a -23 mV, lo que implica que el CTAB fue removido de la superficie de la nanopartícula y el PEG sea unido a esta, debido a que este posee un grupo carboxilo terminal, confiriéndole así una carga superficial negativa a la NVO.²⁶

1.3 Funcionalización de NVO-PEG con péptido D1

A continuación, se presentan los resultados obtenidos por espectrofotometría UV-Visible, DLS, Potencial Z, y STEM funcionalización de NVO-PEG con péptido D1, según la metodología mencionada anteriormente.

Al caracterizar las NVO-PEG-D1, mediante UV-Visible (figura 15) se obtiene la presencia de dos máximos de absorbancia 512 y de 754 nm. Comparando con los datos obtenidos en las NVO-PEG, el máximo obtenido a 750 nm se desplazó a 754 nm, este cambio al igual que en la etapa de

funcionalización anterior corresponde a un leve desplazamiento del plasmon de las NVO al ser funcionalizadas.

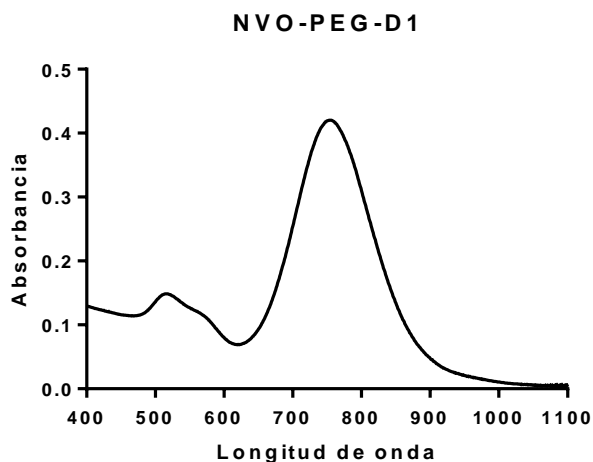


Figura 15: Espectro UV-Visible de NVO-PEG funcionalizadas con D1. Presenta dos máximos a 512 nm y 754 nm (Imagen representativa).

Al caracterizar las NVO-PEG funcionalizadas con el péptido D1, mediante DLS se obtuvieron los datos que se presentan en la *Tabla 3*. Se observó que estas nanopartículas al igual que los datos obtenidos anteriormente, presentan dos máximos de diámetro hidrodinámico (*Tabla 3*, figura 16), en este caso se ve un aumento mayor en el diámetro hidrodinámico de las NVO-PEG-D1, con respecto a las NVO-PEG obtenidas en la etapa anterior. Este aumento se debe a la funcionalización con el péptido D1, el cual al igual que el PEG causa un aumento en el tamaño de la nanopartícula.

Diámetro Hidrodinámico			Potencial Z	
Promedio Tamaño (nm)	Desviación estándar (nm)	Pdi	Promedio Potencial Z (mV)	Desviación estándar (mV)
Máximo 1	4.00	0.469	-6.6	5.7
Máximo 2	76.4			

Tabla 3: Diámetro hidrodinámico y Potencial Z de NVO-PEG luego de la funcionalización con péptido D1. En A se presentan los datos del diámetro hidrodinámico (n=3) de las NVO-PEG-D1, y en B se presentan los valores obtenidos de potencial Z (n=3) para la misma muestra.

Los datos obtenidos de potencial Z nos dan cuenta de que las NVO-PEG-D1 presentan una carga superficial de -6,6 mV, este valor nos da cuenta de que la funcionalización con el péptido D1 se realizó correctamente, ya que este péptido al unirse mediante la formación de un enlace amida

con el PEG de la NVO, disminuirá la carga superficial que este aporta, causando que el potencial Z sea más positivo respecto al valor obtenido de las NVO-PEG, además la medición de potencial Z se realizó a un pH 5, en el cual el péptido se encuentra en un valor inferior a su punto isoeléctrico de 9.95 por lo cual aportaría una carga neta positiva al sistema, lo que se ve reflejado en la obtención del potencial Z más positivo que la NVO-PEG.

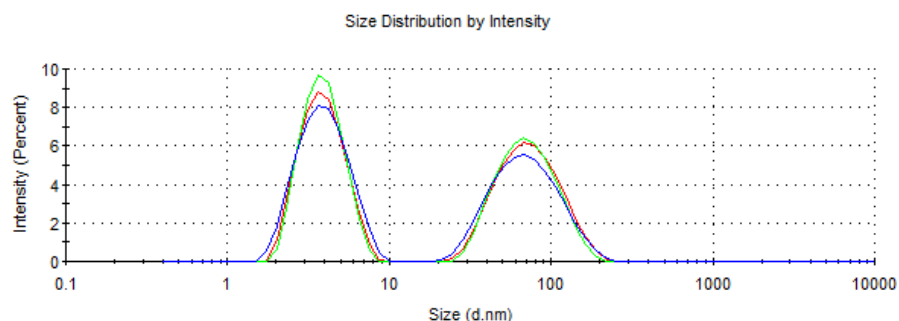


Figura 16: Gráfico de distribución de tamaños de las NVO-PEG-D1 (imagen representativa).

Mediante las imágenes obtenidas de la microscopía electrónica (figura 17), se observó que las poblaciones obtenidas en los casos anteriores se mantienen hasta la última etapa de funcionalización. En la relación aspecto mantiene un valor de 4:1 y en el tamaño tiene valores de 34 ± 6 nm y 9 ± 2 nm de largo y ancho respectivamente. Al igual que en el caso de NVO-PEG, el tamaño obtenido con DLS difiere del obtenido por las imágenes STEM, nuevamente esto se debe a que el péptido D1 al igual que el PEG, para ser visualizados mediante STEM deben ser teñidos previamente. Por lo tanto, el tamaño obtenido mediante estas imágenes da cuenta de las dimensiones de la nanopartícula solamente.

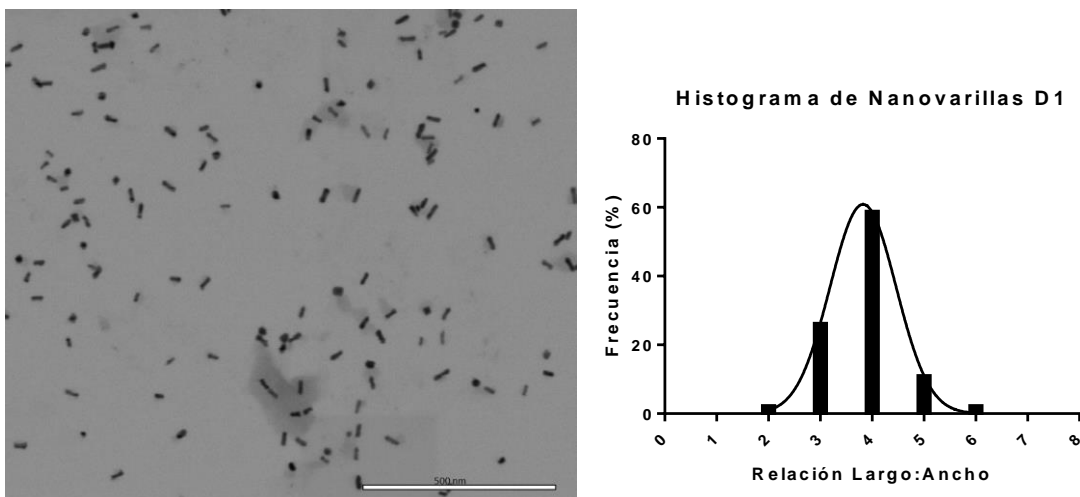


Figura 17: Imagen STEM e histograma de NVO-PEG-D1, estas nanopartículas tienen una distribución de tamaño de 30 nm aproximadamente (STEM Imagen representativa; Histograma realizado con un $n=3$ de las imágenes obtenidas).

Los resultados obtenidos demuestran que al funcionalizar las NVO-PEG con el péptido D1, el diámetro hidrodinámico aumenta alcanzando un valor de 76 nm respecto al diámetro de las NVO-PEG que tenía un valor de 66 nm. Además, se produce un leve desplazamiento en el plasmon alcanzando un valor de 754 nm. El potencial Z también es modificado al realizar esta funcionalización, debido a la carga neta positiva del péptido y a la utilización de los grupos carboxílicos para formar el enlace amida con el péptido D1, la carga superficial que aporta este grupo disminuirá produciendo un cambio del valor del potencial Z de -23 mV a un valor final de -6 mV.²⁶

1.4 Síntesis de Nanoprismas de oro:

A continuación, se presentan los resultados obtenidos por espectrofotometría UV-Visible, DLS, Potencial Z, y STEM para la síntesis de NPrO, según la metodología mencionada anteriormente.

Al caracterizar las NPrO mediante UV-Visible, se obtiene la presencia de dos máximos de absorbancia 530 y 840 nm (figura 18). Estos máximos son característicos de este tipo de nanopartículas donde el primer máximo se relaciona con la interacción de la luz con el eje transversal de los NPrO y el segundo al de la luz con el eje longitudinal o largo del NPrO.³¹

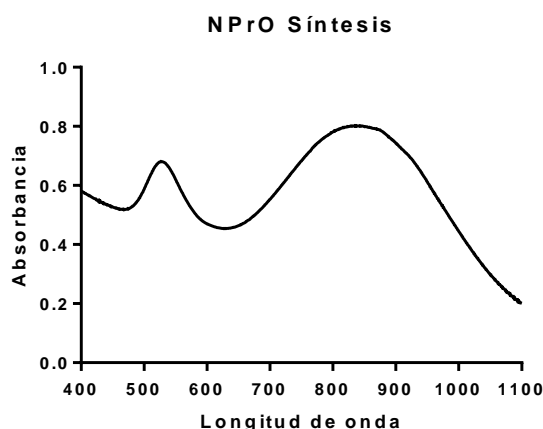


Figura 18: Espectro UV-Visible de NPrO obtenidos de síntesis. Presenta dos máximos a 530 nm y 840 nm, los que son característicos de la síntesis de NPrO por esta metodología (Imagen representativa).

Al caracterizar los NPrO obtenidos de síntesis mediante DLS, se obtuvieron los datos que se presentan en la *Tabla 4*. Se observó que estas nanopartículas al igual que las NVO presentan dos máximos de diámetro hidrodinámico (*Tabla 4*, figura 19), esto se debe a que el equipo mide a las nanopartículas tanto de forma transversal, como longitudinal, lo cual genera la aparición de dos picos en la población.

Diámetro Hidrodinámico			Potencial Z	
Promedio Tamaño (nm)	Desviación estándar (nm)	Pdi	Promedio Potencial Z (mV)	Desviación estándar (mV)
Máximo 1	4,1		0.529	-40
Máximo 2	58			

Tabla 4: Diámetro hidrodinámico y Potencial Z de NPrO obtenidos de síntesis. En A se presentan los datos del diámetro hidrodinámico de los NPrO (n=3) obtenidos de síntesis, y en B se presentan los valores obtenidos de potencial Z (n=3) para la misma muestra.

Los datos obtenidos de potencial Z (*tabla 4*) nos dan cuenta de que, los NPrO presentan una carga superficial de -40.2 mV, este valor negativo corresponde al agente estabilizante utilizado en la síntesis el cual rodea a la superficie de la nanopartícula, en este caso se utilizó tiosulfato el cual presenta carga negativa.³¹

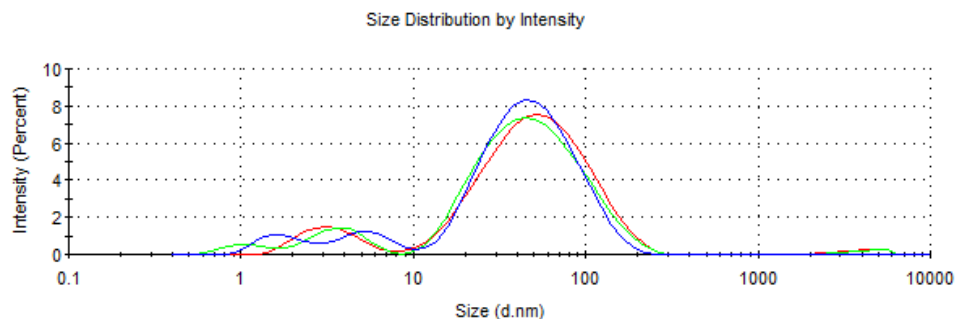


Figura 19: Gráfico de distribución de tamaños de los NPrO obtenidos de síntesis (Imagen representativa).

Mediante las imágenes obtenidas de la microscopía electrónica (figura 20), se obtuvo distintas poblaciones de tamaño de los NPrO, donde la proporción mayoritaria de partículas presento un tamaño aproximado de 40-50 nm de largo. A diferencia de lo obtenido por DLS, en el cual el largo de los NPrO es aproximado de 60 nm. Esta diferencia obtenida mediante estas dos técnicas se debe a que, por DLS existe la formación de una capa superficial de agua sobre la nanopartícula obteniéndose así los diámetros hidrodinámicos. Es así que se observa un mayor tamaño respecto al observado por STEM.

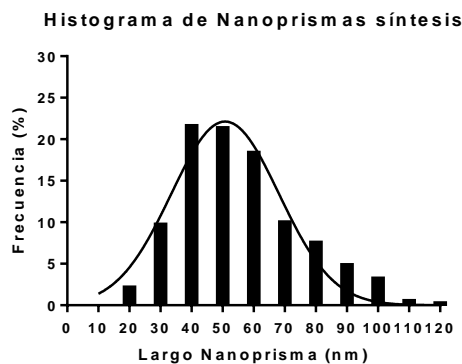
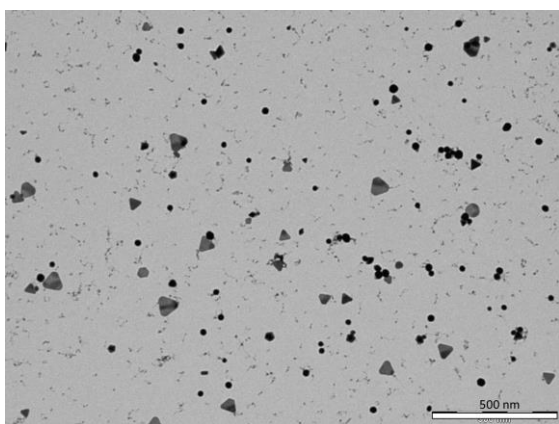


Figura 20: Imagen TEM e histograma de los NPrO obtenidos de síntesis, estas nanopartículas tienen una distribución de tamaño entre 40-60 nm aproximadamente (TEM Imagen representativa; Histograma realizado con un $n=3$ de las imágenes obtenidas).

Los resultados obtenidos demuestran que el protocolo utilizado para la síntesis de NPrO, nos permite obtener una población de tamaño de 50 nm aproximadamente. Esto se confirma tanto por el uso de DLS como por imágenes TEM de la muestra. Además, mediante UV-Visible se obtiene el plasmon característico de la síntesis de NPrO, el cual se compone de dos máximos de absorción a 530 y 840 nm aprox.. Por otra parte, en esta síntesis se emplea tiosulfato como agente reductor y estabilizante,

este al tener una carga negativa le confiere esta carga a la superficie de los NPrO, lo cual es confirmado con la información obtenida del potencial Z, dando un valor promedio de -40 mV.

1.5 Funcionalización de Nanoprismas con PEG:

A continuación, se presentan los resultados obtenidos por espectrofotometría UV-Visible, DLS, Potencial Z, y para la funcionalización de NVO con PEG., según la metodología mencionada anteriormente.

Al caracterizar los NPrO-PEG, mediante UV-Visible se obtiene la presencia de dos máximos de absorbancia a 530 y a 910nm (figura 21). Al comparar con los datos obtenidos en los NPrO de síntesis, se obtuvo un desplazamiento desde los 840 nm a los 910 nm, esto es consecuencia de la funcionalización de la nanopartícula y al proceso de purificación mediante centrifugaciones seriadas al que son sometida, causando el corrimiento del plasmon observado en 840 nm.

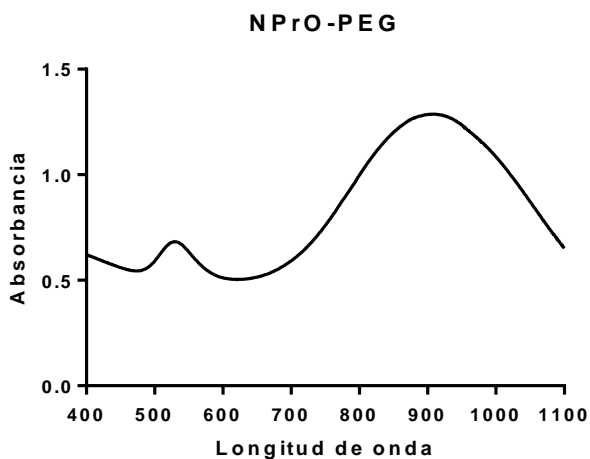


Figura 21: Espectro UV-Visible de NPrO funcionalizados con PEG. Presenta dos máximos a 530 nm y 910 nm (imagen representativa).

Al caracterizar los NPrO funcionalizados con PEG, mediante DLS, se obtienen los datos que se presentan en la *Tabla 5*. Se observa que estas nanopartículas al igual que los NPrO de síntesis presentan dos máximos de diámetro hidrodinámico (*Tabla 5*, *figura 22*), en este caso se ve un aumento en el diámetro hidrodinámico de las NPrO-PEG con respecto a las NPrO de síntesis, por lo cual podemos confirmar que la funcionalización de la nanopartícula se realizó correctamente, ya que se generó un aumento en el tamaño de la nanopartícula.

Diámetro Hidrodinámico			Potencial Z	
Promedio Tamaño (nm)	Desviación estándar (nm)	Pdi	Promedio Potencial Z (mV)	Desviación estándar (mV)
Máximo 1	7.9		0.542	-41
Máximo 2	126.0			

Tabla 5: Diámetro hidrodinámico y Potencial Z de NPrO luego de la funcionalización con PEG D1. En A se presentan los datos del diámetro hidrodinámico de los NPrO-PEG n=3) y en B se presentan los valores obtenidos de potencial Z (n=3) para la misma muestra.

Los datos obtenidos de potencial Z (*tabla 5*) nos dan cuenta de que los NPrO funcionalizados con PEG presentan una carga superficial de -41.3 mV. Este valor junto con el valor obtenido para DLS nos da cuenta de que la funcionalización con PEG se realizó correctamente, ya que este compuesto presenta un extremo carboxílico, el cual al estar en solución adquiere una carga negativa, además al unirse a la superficie de los NPrO desplazara al tiosulfato de esta dejándola con un potencial más negativo.

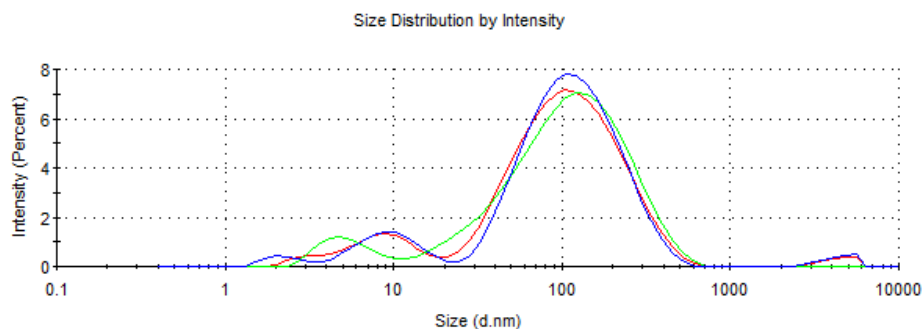


Figura 22: Gráfico de distribución de tamaños de los NPrO-PEG. (Imagen representativa).

Mediante las imágenes obtenidas de la microscopía electrónica (*figura 23*), se observa que las poblaciones en el caso de los NPrO obtenidos de síntesis se mantienen luego de la funcionalización con PEG. Debido a los procesos de purificación a los que son sometidos los NPrO-PEG tras su

funcionalización se obtiene una población con tamaños muchos mas grandes 60 a 70 nm en comparación a los NPrO obtenidos de síntesis. Al comparar estos valores con los datos obtenidos por DLS, donde se obtiene un largo de 126 nm aprox, esta gran diferencia se puede deber a la capa superficial de agua que rodea a la nanopartícula y al PEG, el cual no puede ser visualizado mediante STEM sin el previo tratamiento de tinción. Por lo tanto, la imagen STEM solo nos estará dando cuenta del largo de la nanopartícula.

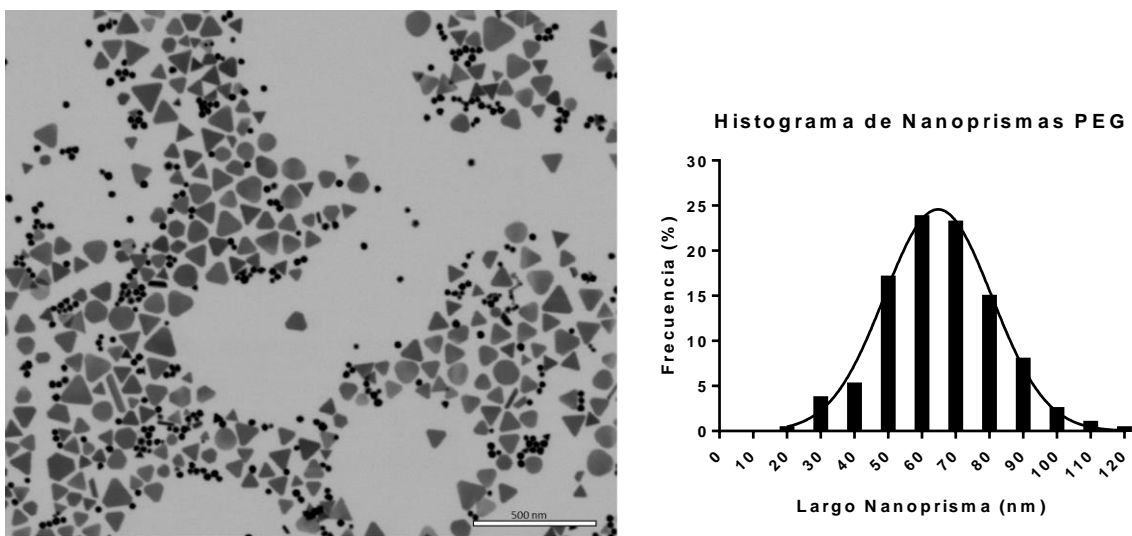


Figura 23: Imagen TEM e histograma de NPrO-PEG, estas nanopartículas tienen una distribución de tamaño de 60 -70 nm aproximadamente (TEM Imagen representativa; Histograma realizado con un n=3 de las imágenes obtenidas).

Los resultados obtenidos demuestran que el protocolo de funcionalización utilizado nos permite obtener NPrO funcionalizados con PEG, esto es confirmado mediante la variación en el tamaño del diámetro hidrodinámico el cual varía de 58 nm a 126 nm. Además, mediante espectrofotometría UV-Visible se observa un cambio en la longitud de onda del plasmon, cambiando de 840 nm a 910 nm. Este desplazamiento se debe principalmente al proceso de purificación al cual es sometido los NPrO una vez funcionalizados, el cual consiste en una serie de centrifugaciones seriadas a distintas velocidades, tal como se menciona en la metodología. Durante este proceso al ir disminuyendo las velocidades de centrifugación nos permite ir dejando en el sobrenadante las nanopartículas más pequeñas, las cuales corresponderían a las esferas contaminantes de la síntesis, pero también se produce la pérdida de NPrO pequeños, por lo cual al término del proceso de purificación se obtiene

una población con NPrO de mayor tamaño y con un plasmon mucho más desplazado. Por otra parte, el potencial Z nos confirma que existe un cambio en la superficie de los NPrO, ya que el potencial Z de esta varía desde -40.2 mV a -41.3 mV, lo que implica que el tiosulfato fue removido de la superficie de la nanopartícula y el PEG sea unido a esta, debido a que ambas moléculas confieren una carga superficial negativa a los NPrO, no se obtiene una variación en el valor obtenido del potencial Z.

1.6 Funcionalización de Nanoprismas con el péptido D1:

A continuación, se presentan los resultados obtenidos por espectrofotometría UV-Visible, DLS, Potencial Z, y para la funcionalización de NPrO-PEG con péptido D1, según la metodología mencionada anteriormente.

Al caracterizar las NPrO-PEG-D1, mediante UV-Visible (figura 24) se obtiene la presencia de dos máximos de absorbancia a 530 y a 930 nm. Comparando con los datos obtenidos en las NVO-PEG, el máximo obtenido a 910 nm se desplazó a 930 nm, este cambio en la superficie de la nanopartícula es mucho menor al obtenido en la etapa anterior, lo cual se debe a que en esta etapa no existe una etapa de purificación.

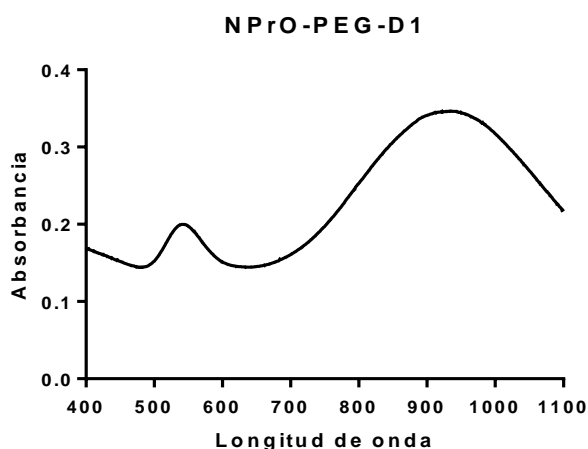


Figura 24: Espectro UV-Visible de NPrO-PEG funcionalizados con D1. Presenta dos máximos a 530 nm y 930 nm (Imagen representativa).

Al caracterizar las NPrO-PEG funcionalizadas con el péptido D1, mediante DLS, se obtienen los datos que se presentan en la *Tabla 6*. Se observa que estas nanopartículas al igual que los datos

obtenidos anteriormente, presentan dos máximos de diámetro hidrodinámico (Tabla 6, figura 25), en este caso el promedio obtenido del largo de los NPrO-PEG-D1, se encuentra dentro del rango obtenido para la funcionalización con PEG.

Diámetro Hidrodinámico			Potencial Z	
Promedio Tamaño (nm)	Desviación estándar (nm)	Pdi	Promedio Potencial Z (mV)	Desviación estándar (mV)
Máximo 1	13.0	0.545	-27	1.1
Máximo 2	136.0			

Tabla 6: Diámetro hidrodinámico y Potencial Z de NPrO-PEG luego de la funcionalización con péptido D1. En A se presentan los datos del diámetro hidrodinámico de las NVO-PEGs-D1 (n=3), y en B se presentan los valores obtenidos de potencial Z (n=3) para la misma muestra.

Los datos obtenidos de potencial Z nos dan cuenta de que las NPrO-PEG funcionalizadas con el péptido D1 presentan una carga superficial de -27.5 mV, este valor nos da cuenta de que la funcionalización con el péptido D1 se realizó correctamente, ya que este péptido al unirse mediante la formación de un enlace amida con el PEG de la NVO, disminuirá la carga superficial que este aporta, causando que el potencial Z sea más positivo respecto al valor obtenido de las NPrO-PEG, además la medición de potencial Z se realizó a un pH 5, en el cual el péptido se encuentra en un valor inferior a su punto isoeléctrico de 9.95 por lo cual aportaría una carga neta positiva al sistema, lo que se ve reflejado en la obtención del potencial Z más positivo que la NPrO-PEG.

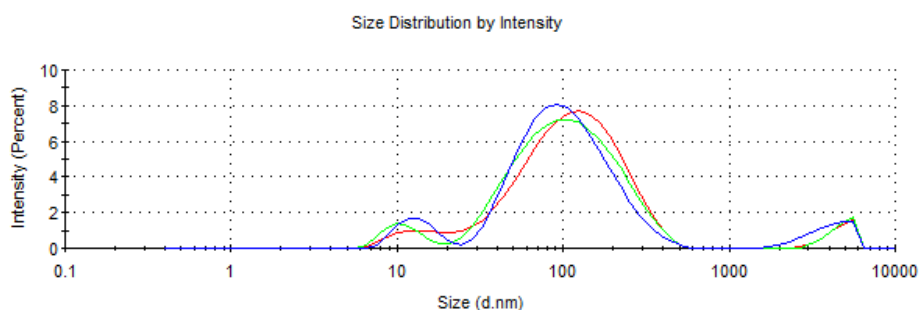


Figura 25: Gráfico de distribución de tamaños de las NVO-PEGs-D1 (Imagen representativa).

Mediante las imágenes obtenidas de la microscopía electrónica (figura 26), se observa que las poblaciones obtenidas en los casos anteriores se mantienen hasta la última etapa de

funcionalización. En este caso existe un predominio de las poblaciones de entre 60 a 70 nm. Al igual que en el caso de NPrO-PEG, el tamaño obtenido con DLS difiere del obtenido por las imágenes STEM, nuevamente esto se debe a que el péptido D1 al igual que el PEG, para ser visualizados mediante STEM deben ser teñidos previamente. Por lo tanto, la distancia obtenida mediante estas imágenes nos da cuenta del tamaño de la nanopartícula solamente.

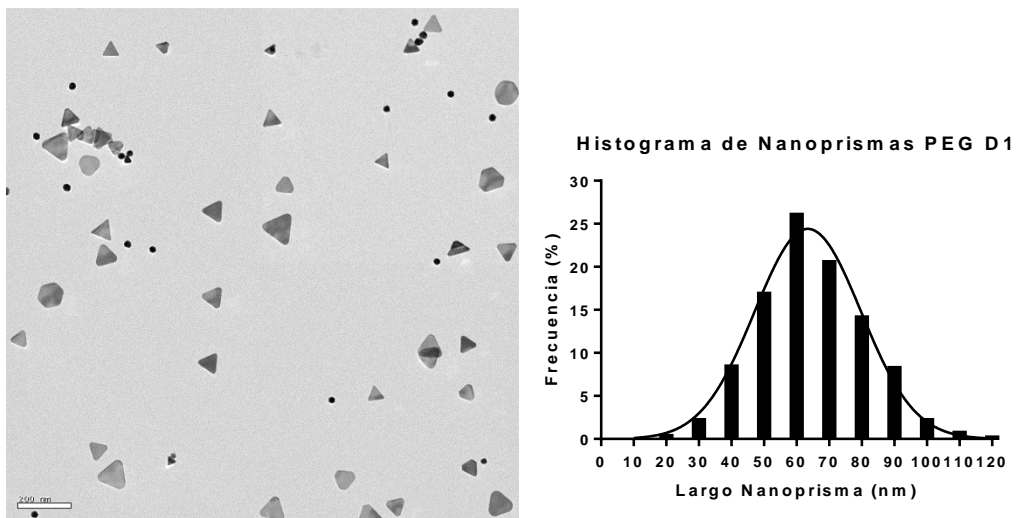


Figura 26: Imagen TEM e histograma de NVO-PEGs-D1, estas nanopartículas tienen una distribución de tamaño de 60 nm aproximadamente (TEM Imagen representativa; Histograma realizado con un $n=3$ de las imágenes obtenidas).

Los resultados obtenidos demuestran que al funcionalizar las NPrO-PEG con el péptido D1, el diámetro hidrodinámico alcanza valores de 136 nm. Además, el espectro UV-Visible de los NPrO-PEG-D1, presentan un desplazamiento del plasmon en comparación al espectro de los NPrO-PEG, esto debido a la modificación que sucedió en la superficie del NPrO. El potencial Z también es modificado al realizar esta funcionalización, debido a la utilización de los grupos carboxílicos para formar el enlace amida con el péptido D1, por lo cual la carga superficial que aporta este grupo disminuirá, obteniéndose valores de potencial Z para los NPrO-PEG-D1 de -27.5 mV, comparado con el potencial Z de NPrO-PEG de -41.3 mV.

2 Evaluación de la estabilidad coloidal de las nanopartículas sintetizadas.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos de la estabilidad coloidal de las nanopartículas funcionalizadas con el péptido D1, mediante espectrofotometría UV-Visible en distintas soluciones.

2.1 Estabilidad NVO-PEG-D1 y NPrO-PEG-D1: Agua

Conocer la estabilidad de la nanopartícula en este medio es importante, ya que es el medio más utilizado para solubilizar, almacenar y estudiar a las nanopartículas.

Mediante este estudio de estabilidad que en el caso de las NVO-PEG-D1 (figura 27) se pudo observar que los dos máximos de absorbancia característicos de este tipo de nanopartículas (512 y 750 nm) se mantienen sin una gran variación en el desplazamiento del plasmon, pero se observa una disminución en las absorbancias correspondiente a cada máximo. Esta disminución se puede deber a la agregación de una parte de las NVO-PEG-D1 presentes en la solución, alcanzando una disminución de aproximadamente de 40% al transcurrir una hora y de 50% al término del experimento. Por lo tanto, las NVO-PEG-D1 en las condiciones de este experimento no son completamente estables durante el tiempo de duración del experimento.

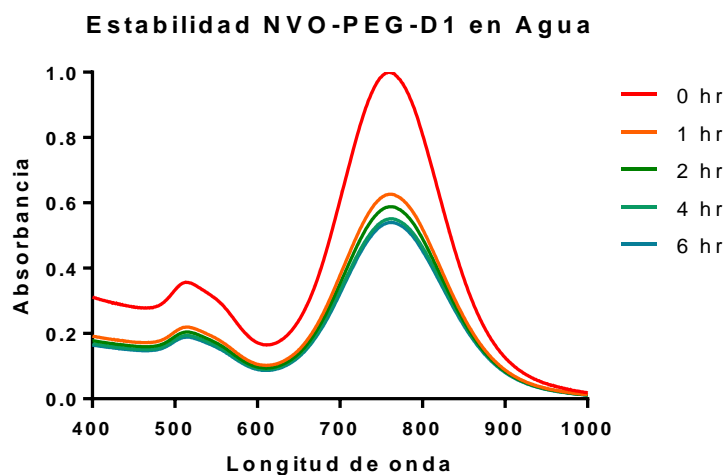


Figura 27: Estabilidad de NVO-PEG-D1 en Agua, mediante espectrofotometría UV-Visible.

Para el caso de los NPrO-PEG-D1 (figura 28) se pudo observar que los dos máximos de absorbancia (530 y 800 nm) se mantienen sin una gran variación en el desplazamiento del plasmon, pero se

observa una disminución en las absorbancias correspondiente a cada máximo. Esta disminución se ve a lo largo de todo el transcurso del experimento, obteniéndose una disminución de 10% durante el transcurso de la primera hora y un 20% al término del experimento, lo cual es un indicativo que estas nanopartículas pierden su estabilidad a lo largo del tiempo en este medio en las condiciones utilizadas para el experimento.

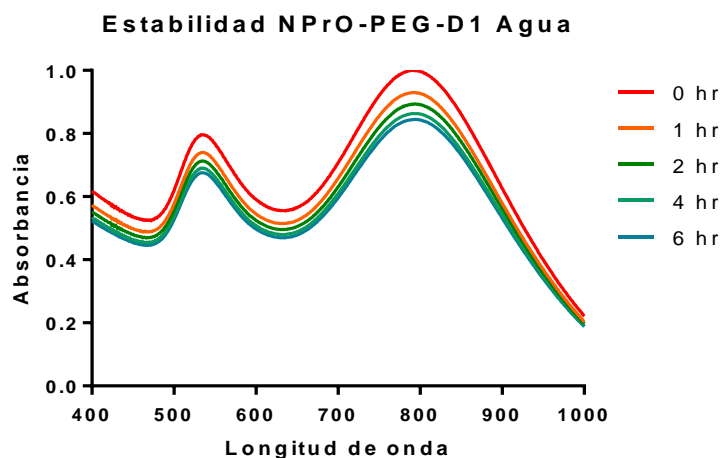


Figura 28: Estabilidad de NPrO-PEG-D1 en Agua, mediante espectrofotometría UV-Visible

2.2 Estabilidad NVO-PEG-D1 y NPrO-PEG-D1: PBS

Conocer la estabilidad de la nanopartícula en este buffer es importante, ya que es un buffer altamente utilizado para la disolución de compuestos, ya que tiene un pH 7.4, lo cual podría ayudarnos a predecir cómo sería el comportamiento de la nanopartícula en un medio fisiológico, además este buffer es utilizado para realizar los procesos de funcionalización, por lo tanto, es importante conocer el tiempo en el cual es estable nuestra nanopartícula.

Mediante este estudio de estabilidad que para el caso de las NVO-PEG-D1 (figura 29) se pudo observar que los dos máximos de absorbancia característicos de este tipo de nanopartículas (512 y 750 nm) se mantuvieron sin una gran variación en el desplazamiento del plasmon, pero se observó una disminución en las absorbancias correspondiente a cada máximo. Esta disminución es alrededor de un 50% de absorbancia durante el transcurso de la primera hora del experimento, para luego mantenerse fija en el tiempo restante del experimento. Esta disminución en la absorbancia observada

se puede deber a la agregación de las NVO-PEG-D1 causada por las altas concentraciones de sales en el medio o fuerza iónica del PBS, produciendo una aceleración en el proceso de agregación de las nanopartículas tal como se encuentra reportado por Du *et al*, 2012³⁴, lo que causaría una disminución de NVO-PEG-D1 disponibles en solución y con ello una disminución en la absorbancia. Por lo tanto, según lo observado en este experimento se puede concluir que, las NVO-PEG-D1 presentan una disminución en la absorbancia al principio, pero luego de este suceso se mantiene estable por el resto del tiempo transcurrido.

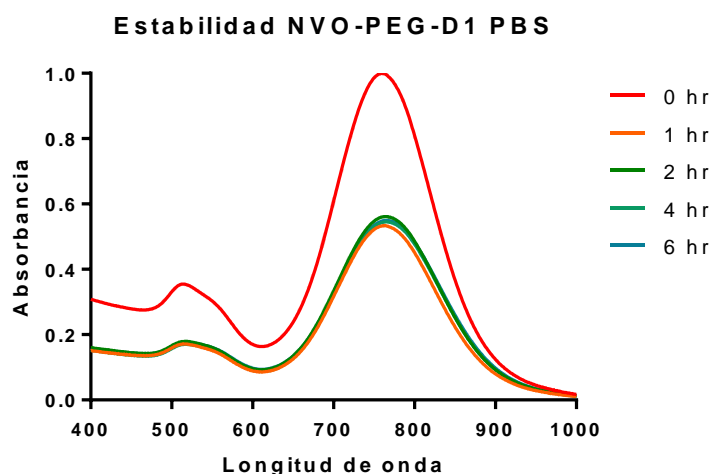


Figura 29: Estabilidad de NVO-PEG-D1 en PBS, mediante espectrofotometría UV-Visible.

Para el caso de los NPrO-PEG-D1 (figura 30) se pudo observar que los dos máximos de absorbancia (530 y 800 nm) se mantienen sin una gran variación en el desplazamiento del plasmon, pero se observó una disminución en las absorbancias correspondiente a cada máximo. Esta disminución en la absorbancia al igual que en el caso de las NVO-PEG-D1, se debe a la fuerza iónica del PBS lo que causaría la agregación de las nanopartículas, lo cual se ve a lo largo de todo el transcurso del experimento, siendo durante la primera hora la disminución más marcada alrededor de 85% y un valor de 90% al término del experimento. Por lo tanto, según lo observado en este experimento se puede concluir que, los NPrO-PEG-D1 presentan una disminución en la absorbancia durante todo el transcurso del experimento, lo cual indicaría que la estabilidad de estas nanopartículas no se encuentra favorecida en las condiciones del medio utilizado.

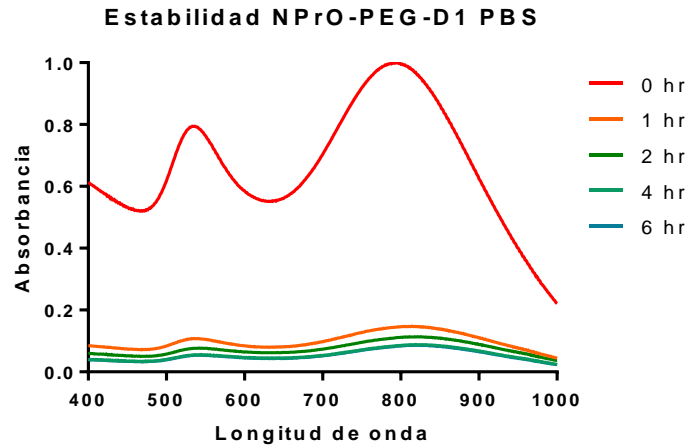


Figura 30: Estabilidad de NPrO-PEG-D1 en PBS, mediante espectrofotometría UV-Visible

2.3 Estabilidad NVO-PEG-D1 y NPrO-PEG-D1: Medio de Cultivo

Conocer el comportamiento que tiene nuestro sistema durante el tiempo en medio de cultivo, es importante para el desarrollo de futuros experimentos *in vitro*, donde este medio es utilizado para el crecimiento y mantención de cultivos celulares.

Mediante este estudio de estabilidad se pudo observar que para el caso de las NVO-PEG-D1 (figura 31) los dos máximos de absorbancia característicos de este tipo de nanopartículas (512 y 750 nm) se mantuvieron sin presentar una gran variación en la absorbancia durante todo el transcurso del experimento. Por lo tanto, al no existir una variación en la absorbancia de nuestra nanopartícula, se puede inferir que es estable en este medio durante el transcurso de tiempo estudiado. Lo cual nos permitiría utilizar este tipo de nanopartícula en estudios celulares *in vitro* y conocer como esta podría comportarse al interactuar con células.

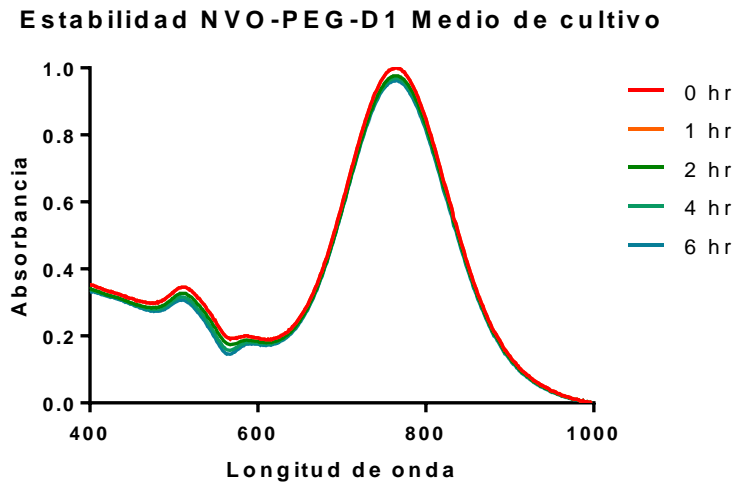


Figura 31: Estabilidad de NVO-PEG-D1 en medio de cultivo con 10% de FBS, mediante espectrofotometría UV-Visible.

Para el caso de los NPrO-PEG-D1 (figura 32) se pudo observar que los máximos de absorbancia (530 y 880 nm) se mantienen sin una gran variación dentro de las primeras horas del experimento, en el término del experimento se observa una disminución de aproximadamente 10% en la absorbancia. También se observa la aparición de un mínimo, el cual no se produce en ningún otro experimento de estabilidad, este mínimo se puede deber a la formación de alguna interacción entre las nanopartículas y los compuestos del medio de cultivo, la cual absorba a la longitud de onda del mínimo observado, al recuperar los NPrO-PEG-D1 del medio de cultivo mediante centrifugación y posterior resuspensión de estos en agua y al realizarle la medición de absorbancia se logra recuperar los dos máximos característicos de este tipo de nanopartículas y la desaparición del mínimo observado en el medio de cultivo. Por lo tanto, al no existir una variación en la absorbancia excepto al último tiempo medido, se puede decir que esta nanopartícula es estable en este medio durante parte del tiempo estudiado. Lo cual nos permitiría utilizar este tipo de nanopartícula en estudios celulares in vitro y conocer como esta podría comportarse al interactuar con células.

Estabilidad NPrO-PEG-D1 Medio de cultivo

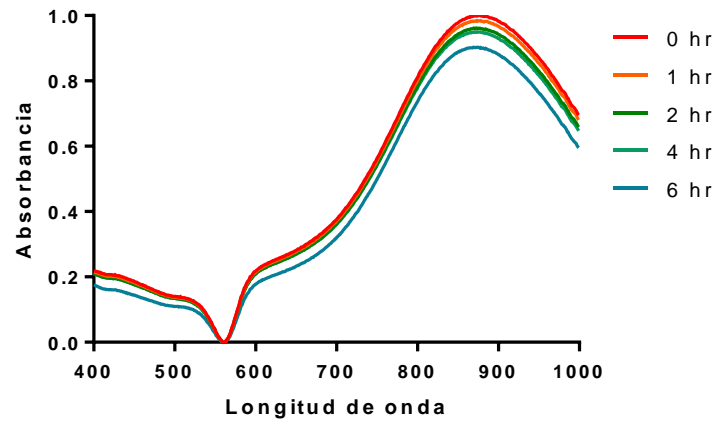


Figura 32: Estabilidad de NPrO-PEG-D1 en Medio de cultivo, mediante espectrofotometría UV-Visible

3 Evaluar el efecto de las Nanopartículas sobre la intensidad de la fluorescencia de la sonda fluorescente utilizada para detectar los agregados de β -Amiloides.

Conocer el aumento de la intensidad de la fluorescencia basal que tiene los agregados $A\beta$ con la sonda fluorescente CRANAD-2 al añadir las nanopartículas funcionalizadas, nos permitirá determinar qué tan efectivo es la detección de estos agregados proteicos, llevando de esta manera al desarrollo de un nuevo sistema de detección el sistema para mejorar de estos agregados.

En primer lugar, se realizaron experimentos control en los que se determinó la efectividad de la sonda CRANAD-2 para la detección de agregados de $A\beta$ mediante fluorescencia. Tal como se observa en la *figura 33* agregados de $A\beta$ en presencia de CRANAD-2 presentan un aumento en la fluorescencia respecto a los agregados de $A\beta$ en ausencia de la sonda, lo cual está de acuerdo a lo reportado por Ran *et al.*, 2009.

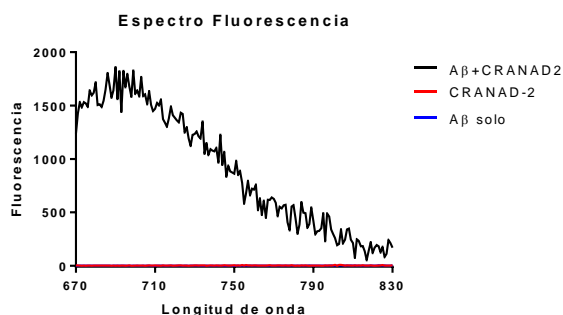


Figura 33: Espectro de Fluorescencia de $A\beta$ (azul), CRANAD-2 (rojo) y $A\beta$ +CRANAD2 (negro) a una longitud de onda de excitación de 640 nm y un rango de emisión de 670-830 nm.

Una vez comprobado que la sonda CRANAD-2 presenta fluorescencia al unirse a los agregados de $A\beta$ se determinó si las NVO (NVO-PEG-D1) y NPrO (NPrO-PEG-D1) producen un aumento de la fluorescencia al interactuar con agregados de $A\beta$ y CRANAD-2 por separado. De lo cual se obtuvo que ni las NVO ni los NPrO presentan fluorescencia en presencia de agregados de $A\beta$ (figura 34). Asimismo, se determinó que las nanopartículas no producen aumento de la fluorescencia del CRANAD-2 cuando no hay presencia del agregado de $A\beta$ (figura 35), además se comprobó que las nanopartículas por sí solas no presentan fluorescencia propia en el rango de longitud de onda estudiado (figura 36).

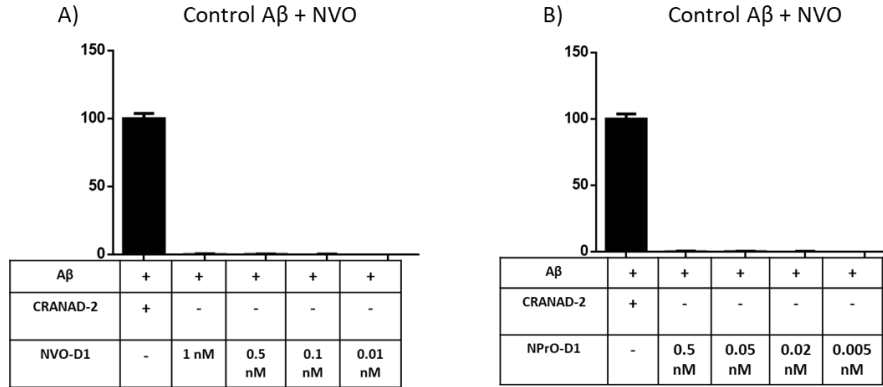


Figura 34: Controles realizados de A β con las nanopartículas de oro, NVO (A) y NPrO (B), ambas en ausencia de la sonda fluorescente CRANAD-2. Estos controles fueron comparados con un control positivo de A β +CRANAD-2(n=3) a una longitud de onda de excitación de 640 nm y emisión de 715 nm.

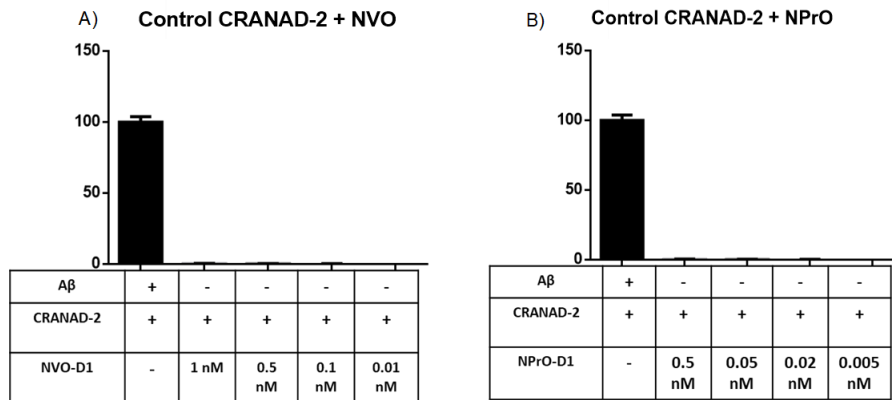


Figura 35: Controles realizados de CRANAD-2 con las nanopartículas de oro, NVO (A) y NPrO (B), ambas en ausencia de A β . Estos controles fueron comparados con un control positivo de A β +CRANAD-2(n=3) a una longitud de onda de excitación de 640 nm y emisión de 715 nm.

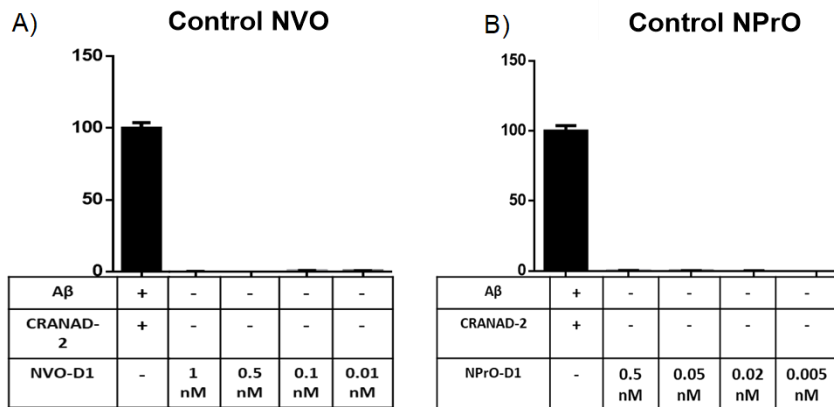


Figura 36: Controles realizados de las nanopartículas de oro en ausencia de A β y CRANAD-2, NVO (A) y NPrO (B), comparadas respecto al control positivo de A β +CRANAD-2 (n=3) a una longitud de onda de excitación de 640 nm y emisión de 715 nm.

Por último, para comprobar que la fluorescencia basal se debe a la asociación de A β con CRANAD-2, se evaluó si ambas por sí solas generan un aumento en la fluorescencia (figura 37). Se obtuvo que tanto A β como CRANAD-2 no presentan fluorescencia por sí solos con respecto a la fluorescencia basal que presenta la A β +CRANAD-2 a la longitud de onda estudiada.

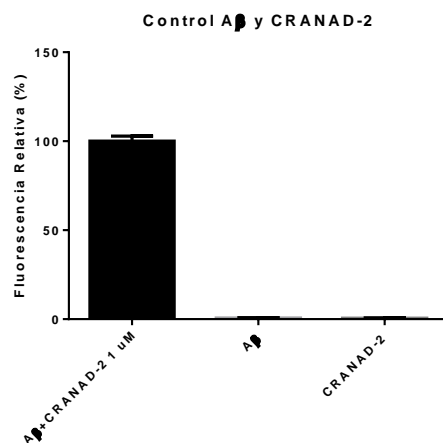


Figura 37: Control realizados del péptido A β sin nanopartículas y CRANAD-2 respecto al control positivo de A β +CRANAD-2, también se muestra el control para CRANAD-2 en ausencia de nanopartículas y A β comparado con el mismo control positivo a una longitud de onda de excitación de 640 nm y emisión de 715 nm.

Tal como está descrito en literatura, la sonda fluorescente CRANAD-2 solo presenta fluorescencia al interaccionar con los agregados A β esto debido al efecto "switches on". Por lo tanto, si se observa un aumento de fluorescencia con nuestro sistema A β +CRANAD-2+Nanopartícula, respecto a la fluorescencia que presenta A β +CRANAD-2, se deberá al efecto SEF que presentan las nanopartículas sobre la sonda fluorescente empleada.

En las figuras 38 y 39 se muestran los resultados obtenidos en los experimentos realizados con A β 5 μ M, CRANAD-2 1 μ M y nanopartículas 1; 0.5; 0.1; 0.01 nM para NVO-PEG-D1 y 0.5; 0.05; 0.025; 0.005 nM para NPrO-PEG-D1.

Tal como se muestra en la figura 38, al añadir las NVO a nuestro sistema A β +CRANAD-2 se logra obtener un aumento de la fluorescencia respecto a la fluorescencia basal dada por el sistema

A β +CRANAD-2. El máximo de fluorescencia alcanzado fue utilizando NVO 0,5 nM y 0,1 nM, permitiendo aumentar 3 y 2.5 veces la fluorescencia basal respectivamente. Estos resultados fueron analizados mediante la prueba de *t student*, para saber si los valores obtenidos son estadísticamente significativos, obteniéndose que la concentración 0.5 nM y 0.1 nM presentan un valor p de <0.0001 y 0.0006 respectivamente, por lo tanto, estos dos valores son estadísticamente significativos. En el caso de NVO 1 nM, se obtuvo un menor aumento de la intensidad de fluorescencia respecto a NVO 0.5 nM, esto se puede deber a un posible apagamiento en la fluorescencia debido a un exceso de nanopartículas, el cual se revierte al disminuir la cantidad de nanopartículas utilizadas mejorando así la intensidad de fluorescencia obtenida. En el caso de NVO a 0.01 nM se observa que existe una disminución en la fluorescencia respecto a NVO a 0.5 nM, esto se debe a que la cantidad de nanopartículas presentes en la solución no son suficientes para generar el efecto máximo de las NVO sobre la fluorescencia de la sonda.

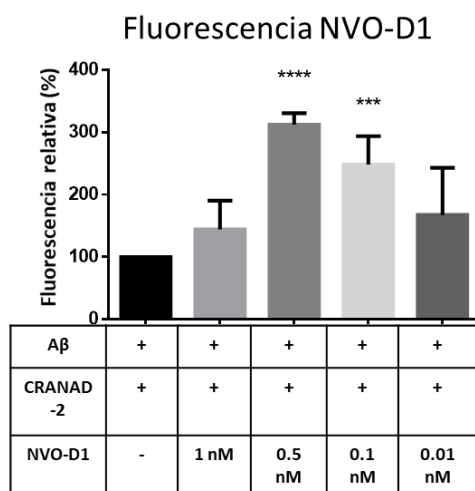


Figura 388: Aumento de la intensidad de fluorescencia obtenidos al usar NVO a distintas concentraciones. Siendo un valor $p < 0.0001$ para **** y un valor $p = 0.0006$ para *** ($n = 3$) a una longitud de onda de excitación de 640 nm y emisión de 715 nm.

Tal como se muestra en la figura 39, al añadir las NPrO a nuestro sistema A β +CRANAD-2 logramos obtener un aumento de la fluorescencia respecto a la fluorescencia basal dada por el sistema A β +CRANAD-2. El máximo de fluorescencia alcanzado fue utilizando NPrO 0.025 nM y 0.005 nM, permitiendo aumentar 1.9 y 2.2 veces la fluorescencia basal respectivamente. Estos resultados fueron analizados mediante la prueba de *t student*, para obtener si los valores obtenidos son estadísticamente significativos, obteniéndose que la concentración 0.025 nM y 0.005 nM presentan

un valor p de 0.0466 y 0.0014 respectivamente, por lo tanto, estos dos valores son estadísticamente significativos. Al igual que en el caso de las NVO a altas concentraciones de nanopartículas se produce un apagamiento en la fluorescencia, esto debido a un exceso de nanopartículas en el medio, pero al disminuir las cantidades de nanopartículas se observa un aumento de la fluorescencia.

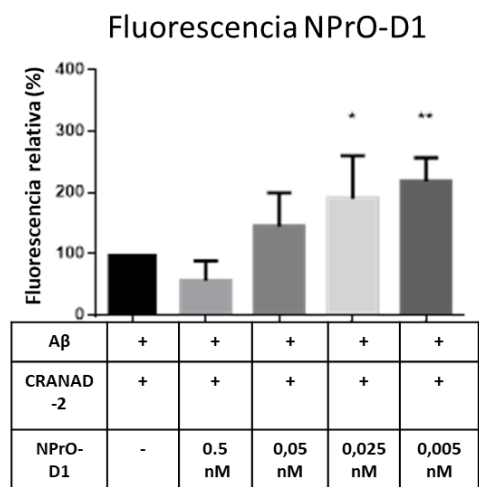


Figura 39: Aumento de la intensidad de fluorescencia obtenidos al usar NPrO a distintas concentraciones. Siendo un valor $p=0.0466$ para * y un valor $p=0.0014$ para **($n=3$) a una longitud de onda de excitación de 640 nm y emisión de 715 nm.

Por lo tanto, ambas nanopartículas empleadas (NVO y NPrO) producen un aumento en la fluorescencia basal del sistema Aβ+CRANAD-2, lo cual nos permite confirmar que este tipo de nanopartículas producen el efecto surface enhanced fluorescence (SEF) sobre la sonda utilizada. Cabe destacar que, entre las nanopartículas utilizadas, las NVO presentan un mejor aumento en la fluorescencia alcanzando un máximo de 3 veces la fluorescencia basal a la concentración de 0.5 nM. Por otra parte, los NPrO a pesar de producir un menor aumento en la intensidad de la fluorescencia respecto al obtenido por las NVO, este máximo lo alcanza a concentraciones 100 veces menor que las NVO. Esta diferencia obtenida en los aumentos de la intensidad de fluorescencia entre NVO y NPrO, se puede deber a los distintos plasmones que presenta cada nanopartícula, ya que para alcanzar el máximo de efecto de aumento en la fluorescencia mediante SEF, la longitud de onda de emisión de la sonda y el máximo del plasmon de las nanopartículas deben encontrarse a longitudes de onda lo más cercano posible.²⁶ Debido a esto las NVO al tener su plasmon alrededor de los 750 nm se encuentra mucho más cercano a la emisión del CRANAD-2 (715 nm), por lo cual presenta un mayor aumento en la intensidad que nos NPrO que presentan un plasmon más alejado (930 nm).

Ambas nanopartículas presentan beneficios en su utilización para la creación de un posible sistema de detección con una mayor sensibilidad de los agregados A β basados en el uso de la sonda CRANAD-2.

Conclusiones y Proyecciones:

Mediante el trabajo experimental realizado durante esta memoria de título, se logró obtener nanopartículas plasmónicas (NVO y NPrO) mediante la metodología planteada, las cuales fueron funcionalizadas y caracterizadas en cada etapa dando como resultado la obtención de nanopartículas funcionalizadas con PEG-D1. Se demostró que tanto las NVO como NPrO son estables en medio de cultivo durante el periodo de estudio, el cual es uno de los principales medios de interés biológico para ensayos celulares. Además, se comprobó que ambas nanopartículas son capaces de aumentar la intensidad de fluorescencia de la sonda CRANAD-2 unida a agregados de A β , permitiendo de esta forma comprobar la hipótesis propuesta, obteniendo un aumento en la intensidad de fluorescencia de tres veces con NVO-PEG-D1 y de dos veces con NPrO-PEG-D1 respecto al control sin nanopartículas, además se observó que NPrO-PEG-D1 alcanza el máximo de aumento de intensidad de fluorescencia a concentraciones 100 veces menor que las NVO-PEG-D1, este efecto de las nanopartículas puede ser mejorado si se controla la distancia entre la sonda y la nanopartícula²⁵, por lo cual, entre las proyecciones para continuar este trabajo se encuentra generar un sistema que permita controlar la distancia entre las nanopartículas y la sonda, también se espera evaluar si a concentraciones menores de NPrO-PEG-D1 se produce un mayor aumento de intensidad de la sonda fluorescente y también se espera comprobar si la sonda CRANAD-2 puede ser utilizada para detectar agregados *in vivo*. Por último, se espera evaluar si estos nanosistemas pueden ser utilizados para mejorar la detección de placas del péptido A β *in vivo* en un modelo murino de la enfermedad de Alzheimer.

Referencias:

- 1 OPS. Demencia: una prioridad de salud pública. Washington, DC 2013.
- 2 Karran, E.; Mercken, M.; Strooper, B. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat. Rev Drug Discov*, **2011**, *10*, 698-712.
- 3 Organización Mundial de la Salud. Demencia 2016.
- 4 SENAMA, Servicio Nacional del Adulto Mayor. Conmemoran día internacional del alzheimer 22 de septiembre de 2015.
- 5 Capetillo-Zarate, E.; Gracia, L.; Tampellini, D.; Gouras, G. K. Intraneuronal A β accumulation, amyloid plaques, and synapse pathology in Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis.*, **2012**, *10*, 56-59.
- 6 Harrison, J. R.; Owen, M. J. Alzheimer's disease: the amyloid hypothesis on trial. *Br J Psychiatry*, **2016**, *208*, 1-3.
- 7 Khurana, R.; Coleman, C.; Ionescu-Zanetti, C.; Carter, S. A.; Krishna, V.; Grover, R. K.; Roy, R.; Singh, S. Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils. *J. Struct. Biol.*, **2005**, *151*, 229-238.
- 8 Ran, C.; Xu, X.; Raymond, S. B.; Ferrara, B. J.; Neal, K.; Bacskai, B. J.; Medarova, Z.; Moore, A. Design, synthesis, and testing of difluoroboron-derivatized curcumins as near-infrared probes for in vivo detection of amyloid-beta deposits. *J. Am Chem Soc.*, **2009**, *131*, 15257-15261.
- 9 Guerrero, A. R.; Hassan, N.; Escobar, C. A.; Albericio, F.; Kogan, M. J.; Araya, E. Gold nanoparticles for photothermally controlled drug release. *Nanomedicine*, **2014**, *9*, 2023-2039.
- 10 Weissleder, R. A clearer vision for in vivo imaging. *Nat Biotechnol*, **2001**, *19*, 316-317.
- 11 Sharma, H.; Mishra, P. K.; Talegaonkar, S.; Vaidya, B. Metal nanoparticles: a theranostic nanotool against cancer. *Drug Discov Today*, **2015**, *20*, 1143-1151.
- 12 Sperling, R. A.; Rivera, Gil. P.; Zhang, F.; Zanella, M.; Parak, W. J. Biological applications of gold nanoparticles. *Chem Soc Rev*, **2008**, *37*, 1896-1908.
- 13 Ghosh, P.; Han, G.; De M.; Kim, C. K.; Rotello, V. M. Gold nanoparticles in delivery applications. *Adv. Drug Deliv Rev*, **2008**, *60*, 1307-1315.
- 14 Cogley, 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*, 44-56.
- 15 Häkkinen, H. The gold-sulfur interface at the nanoscale. *Nat Chem*, **2012**, *4*, 443-455.

- 16 Mostafa A. El-Sayed. Some interesting properties of metals confined in time and nanometer space of different shapes. *Acc. Chem. Res.*, **2001**, *34*, 257-264.
- 17 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*, 403-407.
- 18 , 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 USA*, **2003**, *100*, 13549-13554.
- 19 Kohler, N.; Sun, C.; Wang, J.; Zhang, M. Methotrexate-modified superparamagnetic nanoparticles and their intracellular uptake into human cancer cells. *Langmuir*, **2005**, *21*, 8858-8864.
- 20 Yang, P. H.; Sun, X.; Chiu, J. F.; Sun, H.; He, Q. Y. Transferrin-mediated gold nanoparticle cellular uptake. *Bioconjug Chem*, **2005**, *16*, 494-496.
- 21 Link, S.; El-Sayed, M. A. Optical properties and ultrafast dynamics of metallic nanocrystals. *Annu Rev Phys Chem*, **2003**, *54*, 331-366.
- 22 Kogan, M. J.; Bastus, N. G.; Amigo, R.; Grillo-Bosch, D.; Araya, E.; Turiel, A.; Labarta, A.; Giralt, E.; Puntès, V. F. Nanoparticle-mediated local and remote manipulation of protein aggregation. *Nano Lett*, **2006**, *6*, 110-115.
- 23 Berry, C. C.; Curtis, A. S. G. Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics*, **2003**, *36*, 198-206.
- 24 Guerrero, A. R.; Aroca, R. F. Surface-enhanced fluorescence with shell-isolated nanoparticles (SHINEF). *Angew Chem Int Ed Engl*, **2011**, *50*, 665-668.
- 25 Bauch, M.; Toma, K.; Toma, M.; Zhang, Q.; Dostalek, J. Plasmon-Enhanced Fluorescence Biosensors: a Review. *Plasmonics*, **2014**, *9*, 781-799.
- 26 Goulet, P. J. G.; Aroca, R. F. Surface-Enhancement of Fluorescence Near Noble Metal Nanostructures. *Radiative Decay Engineering*, **2005**, *8*, 223-247.
- 27 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.; et al. Peptide multifunctionalized gold nanorods decrease toxicity of β -amyloid peptide in a *Caenorhabditis elegans* model of Alzheimer's disease. *Nanomedicine*, **2017**, *13*, 2341-2350.
- 28 Kumar, J.; Sim, V. D-amino acid-based peptide inhibitors as early or preventative therapy in Alzheimer disease. *Prion*, **2014**, *8*, 119-124.
- 29 Boisselier, E.; Astruc, D. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chem Soc Rev*, **2009**, *38*, 1759-1782.

- 30 MacQueen, A. Factors that Affect the Synthesis of Gold Nanorods. *REU Research Accomplishments*, **2007**, 32-33.
- 31 Scarabelli, L.; Sánchez-Iglesias, A.; Pérez-Juste, J.; Liz-Marzán, L. M. A “Tips and Tricks” Practical Guide to the Synthesis of Gold Nanorods. *J. Phys. Chem. Lett*, **2015**, *6*, 4270-4279.
- 32 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*, 8965-8970.
- 33 Adua, C.; Guerrero, S.; Salas, E.; Medel, L.; Riveros, A.; Mena, J.; Arbiol, J.; Albericio, F.; Giralt, E.; Kogan, M. J. Stable conjugates of peptides with gold nanorods for biomedical applications with reduced effects on cell viability. *ACS Appl Mater Interfaces*, **2013**, *5*, 4076-4085.
- 34 Du, S.; Kendall, K.; Toloueinia, P.; Mehrabadi, Y.; Gupta, G.; Newton, J. Aggregation and adhesion of gold nanoparticles in phosphate buffered saline. *J. Nanoparticle Research*, **2012**, *14*, 758-771.