

UCH-FC  
MAG-BMCN  
L337  
C-1

**"NANOPARTICULAS DE ORO CONJUGADAS A PEPTIDOS  
PARA EL DESARROLLO DE UNA NUEVA ESTRATEGIA  
TERAPEUTICA PARA LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER"**

**Tesis**

Entregada A La  
Universidad De Chile  
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos  
Para Optar Al Grado De

Magíster en Ciencias Biológicas con Mención en  
Biología Molecular, Celular y Neurociencias.

Facultad De Ciencias  
Por

Cristián Alberto Lasagna Reeves  
Octubre, 2008



Director de tesis: Dr Claudio Soto  
Co-Director de tesis: Dr Marcelo Kogan

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por el candidato.

CRISTIAN A. LASAGNA REEVES

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas, con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 15 de Octubre de 2008.

Director de Tesis:

Dr. Claudio Soto

*CAS*  
.....

Co-Director de Tesis

Dr. Marcelo Kogan

.....

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Christian González

.....

Dr. Jorge Mpodozis

.....



Este trabajo esta dedicado exclusivamente a mi familia que es lo que mas amo en el mundo. Sin su apoyo jamás hubiese podido llegar a donde estoy. Solo me basta recordar el cariño que nos tenemos, para seguir adelante y no dejarme vencer. Gracias Papá, Mamá, Normi, Raúl y Raulito Santino por ser parte de mi vida, los quiero mucho.

Cristián.



## **Agradecimientos.**

Al Doctor Marcelo Kogan co-director de esta tesis y a Ivonne Olmedo, quienes sin lugar a dudas han sido fundamentales para mi desarrollo como científico y como persona. Espero contar tanto con su apoyo profesional como con su amistad por mucho tiempo más.

Al proyecto Fondecyt: 1061142 y al Fondap: 11980002

Al Doctor Juan Troncoso por haber confiado en mi y darme la posibilidad de vivir la extraordinaria experiencia de trabajar en la Universidad John Hopkins.

Al Doctor Claudio Soto quien me dio la posibilidad de realizar el seminario de título en su laboratorio y que me ha enseñado a ver la ciencia de una forma distinta.

Al Doctor Leoncio Vergara, por toda la ayuda me a dado para desarrollar de buena forma mis estudios durante mi estadía en la UTMB.

A Zane y al doctor Rakez Kayes por toda la ayuda brindada desde que llegue al laboratorio.

Muy especialmente a mis compañeros de trabajo, compatriotas y amigos que sin su ayuda jamás podría haber logrado lo hecho hasta ahora, muchas gracias, Rodrigo Morales,

Rodrigo Díaz, Dennise González y a Marcelo Barria, por todo.

Por sobre a todo a mi mamá Norma, a mi papá Raúl, a mi hermana Norma, a mi hermano Raúl y a mi sobrino Raulito Santino, quienes siempre han confiado en mi.

Also I would like to thank Audra Clos, who supported me during all this year, and gave me the force to continue my work at UTMB.





## Índice de contenidos.

Página	
Dedicatoria .....	ii
Agradecimientos .....	iii
Índice de contenido .....	iv
Índice de tablas .....	v
Índice de figuras .....	v
Lista de abreviaturas .....	vi
Resumen .....	vii
Summary .....	viii
1. Introducción .....	1
1.2 Hipótesis .....	16
1.3 Objetivos .....	16
1.3.1 Objetivo General .....	16
1.3.2 Objetivos específicos .....	16
2. Métodos .....	17
2.1 Síntesis de AuNP .....	17
2.2 Síntesis de péptidos .....	18
2.3 Conjugación de AuNP a los péptidos .....	19
2.3.1 Conjugación de AuNP a Tioflavina T.....	19
2.3.2 Conjugación de AuNP a región F(ab) <sub>2</sub> de anticuerpo anti A $\beta$ (6E10).....	20
2.4 Caracterización de AuNP y sus conjugados .....	20
2.5 Interacción <i>in vitro</i> de los conjugados con A $\beta$ <sub>1-42</sub> .....	21
2.6. Interacción <i>ex vivo</i> de los conjugados con agregados de A $\beta$ .....	23
2.7. Determinación de la toxicidad y biodistribución de las nanopartículas de oro en ratones silvestre C57/BL6.....	24
2.7.1. Tratamiento con nanopartículas de oro.....	24
2.7.2. Examinación morfológica.....	25
2.7.3. Análisis bioquímicos del suero.....	25
2.7.4. Examinación histopatológica.....	26
2.7.5. Cuantificación de oro.....	26
2.8. Inyección vía intravenosa del conjugado AuNP-Inh-Rod en ratones C57/BL6.....	26
2.8.1 Determinación del paso a través de la BHE del conjugado AuNP-Inh-Rod.....	27
3. Resultados .....	28
3.1. Síntesis y caracterización de las AuNP.....	28
3.2. Síntesis de péptidos y caracterización de los conjugados.....	29
3.3. Caracterización de los conjugados AuNP-Tioflavina y AuNP-F(ab) <sub>2</sub> 6E10.....	35
3.4 Interacción <i>in vitro</i> de AuNP-Péptido con A $\beta$ <sub>1-42</sub> .....	38
3.5. Interacción <i>ex vivo</i> de los conjugados con agregados de A $\beta$ .....	41
3.6. Determinación de la toxicidad y biodistribución de las nanopartículas de oro en ratones silvestre C57/BL6.....	46
3.6.1. Examinación morfológica.....	46
3.6.2. Ensayos bioquímicos en la sangre.....	49
3.6.3. Examinación histopatológica.....	50
3.6.4 Cuantificación de oro.....	52

**3.7. Determinación del paso a través de la BHE del conjugado AuNP-INH-Rod.....55**  
**4. Discusión..... 59**  
**5. Conclusión..... 67**  
**6. Bibliografía..... 68**





## Índice de tablas.

Página	
Tabla 1 .....	4
Tabla 2 .....	49
Tabla 3 .....	49

## Índice de figuras.

Página	
Figura 1 .....	6
Figura 2 .....	13
Figura 3 .....	15
Figura 4 .....	29
Figura 5 .....	31
Figura 6 .....	33
Figura 7 .....	33
Figura 8 .....	34
Figura 9 .....	36
Figura 10 .....	37
Figura 11 .....	38
Figura 12 .....	40
Figura 13 .....	43
Figura 14 .....	44
Figura 15 .....	45
Figura 16 .....	47
Figura 17 .....	48
Figura 18 .....	51
Figura 19 .....	53
Figura 20 .....	54
Figura 21 .....	56
Figura 22 .....	57
Figura 23 .....	58

## Abreviaturas.

**EA:** Enfermedad de Alzheimer  
**A $\beta$ :** Proteína beta amiloide  
**A $\beta$ 1-42:** Proteína beta amiloide de 42 residuos de aminoácidos  
**APP:** Proteína precursora del amiloide  
**PS1:** Presenilina 1  
**PS2:** Presenilina 2  
**NFT:** Ovillos neurofibrilares  
**LER:** Líquido encéfalo raquídeo  
**BHE:** Barrera hemato encefálica  
**SNC:** Sistema nervioso central  
**APP/PS1:** Ratón doble transgénico que sobre expresa el gen de APP y PS1  
**ADDLs:** A $\beta$  ligando difusible  
**CMO:** Campo magnético oscilante  
**NPM:** Nanopartícula metálica  
**AuNP:** Nanopartícula de oro  
**Inh:** Péptido inhibidor CLPFFDNH2  
**CN:** Control negativo CARTG  
**CP:** Control positivo CKLVFFAEDVGSNKGAIIGL  
**ROD:** Rodamina B  
**TEM:** Microscopio electrónico de transmisión  
**ICP-MS:** Plasma Acoplado por Inducción con Espectrómetro de Masas  
**GF-AAS:** Espectrometría de absorción atómica con horno de grafito.  
**RMI:** Imagen por resonancia magnética  
**SPECT:** Tomografía por emisión de fotón único  
**PET:** Tomografía por emisión de positrones  
**MRM:** Microscopía de resonancia magnética  
**ApoE:** Apolipoproteína E  
**SMB:** Metabisulfito de Sodio

## Resumen.

Varias son las patologías producidas por el mal plegamiento y la posterior agregación de proteínas, produciendo especies tóxicas. En la actualidad no existe un tratamiento efectivo para combatir este tipo de enfermedades, por lo que en nuestro laboratorio se está desarrollando una novedosa estrategia terapéutica que se basa en el uso de nanotecnología. Es posible conjugar nanopartículas de oro (AuNP) a diversos péptidos que poseen afinidad por estos agregados tóxicos y dirigirlos específicamente donde estos se encuentren, así se podría realizar una especie de “Cirugía molecular”, basada en la excitación de estas AuNP por parte de un Campo magnético oscilante, lo cual produce la liberación de energía por parte de estas nanopartículas permitiendo la desagregación de estos complejos proteicos, convirtiéndolos en especies menos tóxicas.

En el caso específico de la presente tesis, ésta se enfoca en una etapa inicial del proyecto, donde se pretende determinar la estabilidad de distintos conjugados AuNP-*compuestos* y la capacidad que presentan para unirse selectivamente a los agregados tóxicos de la proteína  $\beta$ -amiloide (A $\beta$ ) involucrada en la enfermedad de Alzheimer tanto *in vitro* como *ex vivo*. Como primer aporte a los estudios *in vivo* se determinó la toxicidad y biodistribución de distintas dosis de nanopartículas de oro en ratones silvestres. Además se determinó el paso de uno de estos conjugados a través de la BHE.

Por lo tanto, se sintetizaron AuNP de 10 nm de diámetro mediante la reducción de ácido tetracloroáurico (HAuCl<sub>4</sub>) con citrato de sodio dihidratado y se conjugaron al péptido CLPFFDNH<sub>2</sub>(Inh), el cual es una modificación del péptido disruptor de laminas  $\beta$  LPFFDNH<sub>2</sub> que posee afinidad por los agregados de A $\beta$ . También fueron utilizados 2 péptidos, para evaluar si esta interacción es secuencia dependiente. Uno de estos presenta una secuencia elegida al azar (CARTG), la cual no presenta ningún tipo de relación con el péptido A $\beta$ . El otro péptido es un fragmento de 20 aminoácidos del péptido A $\beta$ , por lo que presenta una gran afinidad por las fibras amiloides. Otros dos conjugados fueron sintetizados, uno está compuesto por la nanopartícula más moléculas de tioflavina T, la cual tiene la habilidad de interactuar con gran variedad de agregados. El otro conjugado está compuesto por la nanopartícula y la región Fab del anticuerpo 6E10 que reconoce al péptido A $\beta$ . De los cinco conjugados en estudio, solo cuatro mostraron afinidad por las fibras amiloides tanto *in vitro* como *ex vivo*, y solo el conjugado con el péptido CARTG no presentó ningún tipo de interacción, con cual demuestra que esta interacción debe ser específica.

En relación a los estudios de toxicidad, biodistribución y paso a través de la BHE, estos se realizaron a partir de la inyección intraperitoneales de tres dosis distintas de nanopartículas durante 8 días en ratones. En todos los casos no se observó ningún grado de toxicidad. En relación a la biodistribución se observó una mayor acumulación de nanopartículas en el hígado, riñón, bazo y en menor medida en el cerebro, sin embargo lo suficiente para concluir que estas nanopartículas son capaces de cruzar la BHE.

## Summary.

Several pathologies produced by the misfolding and later aggregation of proteins, producing toxic species. Presently an effective treatment does not exist to treat these diseases. In our laboratory we are developing a novel therapeutic strategy, based on the use of nanotechnology. Gold nanoparticles (AuNP) coated with peptides with high affinity for toxic protein deposits that triggers these diseases, and could be targeted specifically to these aggregates and give rise to a local “molecular surgery”, based on the excitation of these AuNPs produced by a magnetic oscillating field. When these nanoparticles are excited, they release enough energy that allows the disaggregation of these protein complexes, turning them into less toxic species. Thus, this thesis is framed as the first stage and is being pursued to obtain stable AuNP-*compound* conjugates able to selectively attach to the toxic deposits of the amyloid  $\beta$  protein ( $A\beta$ ) involved in Alzheimer’s disease. As a first approach to the *in vivo* studies we determinate the toxicity, biodistribution of these nanoparticles. Also we determinate the ability of one of the conjugates to cross the Blood Brain Barrier (BBB). Therefore, AuNPs of 10 nm of diameter were synthesized by means of the reduction of acid tetrafluoroauric ( $HAuCl_4$ ) with citrate of sodium dehydrated. They were conjugated to the peptide CLPFFDNH2 (Inh), which is a modification of the  $\beta$ -sheet breaker LPFFDNH2 that possesses affinity for the  $A\beta$  aggregates. Also we used 2 peptides to evaluate if this interaction is a sequence dependent. One of these peptides has random sequences (CARTG) that does not have any affinity for  $A\beta$ . The other peptide is a fragment of 20 amino acids that corresponded to the region 15-34 of  $A\beta$ , so it has a great affinity for the amyloid fibrils. Also we synthesized to other conjugates. One is based on the interaction between the gold nanoparticle and thioflavine T, which is a molecule that has great affinity for all kind of aggregates. The other conjugate is based on the interaction between the gold nanoparticle and the Fab region of the 6E10 antibody that recognize the  $A\beta$  peptide. From the five conjugated in study only four presented affinity for the  $A\beta$  fibrils *in vitro* and *ex vivo*. Only the conjugated with the CARTG peptide didn’t show any affinity for the fibrils. This result demonstrated that this interaction must be specific. In relation to the studies of toxicity, biodistribution and permeability of the BBB, these were carried out by means of the injection of three different doses of nanoparticles in mice during eight days. In all cases we did not see any toxicity. In relation with the biodistribution analysis it was possible to see a higher accumulation of nanoparticles in the liver, kidney, spleen and in a lower amount in the brain. Nevertheless, it is sufficient to conclude that these nanoparticles are capable of crossing the BBB.

## **1. Introducción.**

La enfermedad de Alzheimer (EA), la cual afecta a más de 16 millones de personas en el mundo (Refolo & Fillit 2004), es la causa más común de demencia en la vejez y está marcada por la degeneración de la estructura límbica y cortical del cerebro, mayormente en el lóbulo temporal. Para el año 2050 se espera que el número de personas con Alzheimer se triplique (Herbet y col, 2001), lo cual produciría un enorme colapso de los sistemas sociales y de salud a nivel mundial. La EA corresponde a un desorden neurodegenerativo clínicamente caracterizado por pérdida de memoria, problemas del lenguaje, incapacidad de relacionarse con el entorno, deterioro de funciones ejecutoras y eventualmente culmina con la muerte del paciente (Citron, 2003).

La mayoría de los casos de EA son esporádicos, con múltiples factores de riesgo, como el envejecimiento, estrés ambiental y la dieta. El resto de los casos que equivaldrían a un 5-10% del total son heredados por lo que reciben el nombre de Enfermedad de Alzheimer Familiar (EAF). Las principales características neuropatológicas del Alzheimer son la degeneración sináptica y neuronal, la presencia de placas amiloides y de ovillos neurofibrilares (NFTs). El mayor componente proteico de las placas es el péptido  $\beta$ -amiloide (P $\beta$ A), el cual es un péptido de entre 39 y 42 amino ácidos, que se encuentra en una proteína de transmembrana más larga denominada Proteína Precursora del Amiloide (APP) (Selkoe, 1994). En el caso de los ovillos neurofibrilares, estos están compuestos por formas hiperfosforiladas de la proteína de unión a microtubulos TAU. Se cree que estos dos agregados proteicos insolubles juegan un rol crítico en el proceso neurodegenerativo, sin embargo el mecanismo molecular por el cual estos agregados causan neurodegeneración aun no se ha establecido. Es ampliamente aceptada la idea de que la EA comienza con

varios “defectos” genéticos que conducirían a la alteración en la producción de APP o su procesamiento proteolítico o en la estabilidad y agregación del péptido A $\beta$ , esto último produciría un desequilibrio entre la producción de A $\beta$  y su eliminación. El péptido A $\beta$  es liberado tanto al espacio intra como extracelular, acumulándose continuamente (Dickson, 2004). Varias estrategias terapéuticas se han propuesto para reducir las placas amiloides en pacientes con Alzheimer. Evidencias que apoyan esta “hipótesis del amiloide” se basan en los estudios que muestran que una disminución crónica de A $\beta$  se traduce en una reducción en la patología de la enfermedad y en una mejora del funcionamiento cognitivo en modelos animales de Alzheimer y potencialmente en pacientes con EA (Hock, y col, 2003). Ha sido tema de debate si son las placas amiloides o los ovillos neurofibrilares el factor que gatilla la patogénesis del Alzheimer. La mayoría de las pruebas genéticas, bioquímicas y neuropatológicas, acumuladas en los últimos años sugieren que las placas amiloides iniciarían la cascada de eventos que producirían finalmente la muerte neuronal y la demencia del paciente (Selkoe, 1997). La producción de A $\beta$  requiere del corte proteolítico de APP en la región N- y Cterminal de A $\beta$ , realizado por la  $\beta$  y  $\gamma$  secretasa respectivamente (Selkoe, 2000). De forma alternativa, la APP puede ser cortada en la mitad del dominio A $\beta$  por una tercera proteasa llamada  $\alpha$ -secretasa formando un producto no amiloidogénico (Simons y Echehalt, 2002). Las evidencias de que las placas amiloides juegan un rol importante en la patogénesis temprana del Alzheimer provienen principalmente de estudios en individuos afectados por la EA de forma hereditaria. Análisis genéticos de varias familias con la forma autosómica dominante de la enfermedad mostraron mutaciones en el cromosoma 21 (donde se encuentra el gen de APP), y estas mutaciones se encontraban siempre en regiones cercanas o en la secuencia de A $\beta$  (Hardy y Allsop, 1991). Más aún, pacientes con Síndrome de Down, los cuales presentan trisomía del cromosoma 21 por lo

que poseen 3 copias de APP, desarrollan neuropatologías propias del Alzheimer a edades tempranas (Kang y col, 1987; Goldgaber y col, 1987). Aparte de APP tres otros genes se han visto relacionados con el Alzheimer: la apolipoproteína E (Apo E, en el cromosoma 19), Presenilina 1 (PS1, cromosoma 14) y presenilina 2 (PS2 en el cromosoma 1). Los productos de estos genes están relacionados en el tráfico y el procesamiento proteolítico de la APP (Hardy y Selkoe, 2002). Mutaciones en los genes de presenilina 1 y presenilina 2 causan Alzheimer del tipo familiar autosómico dominante (Selkoe y Podlesny, 2002). Estas mutaciones están relacionadas con el aumento en la formación total de placas amiloides (Tabla 1) (Scheuner y col, 1996). Junto a esto, los individuos que poseen el alelo  $\epsilon 4$  de la apolipoproteína E (Apo E) tienen un riesgo entre 20 -90% mayor de contraer Alzheimer (Corder y col, 1993).

Animales transgénicos que expresan altos niveles de APP mutante progresivamente desarrollan características neuropatológicas del Alzheimer como alteraciones en el comportamiento, pérdida neuronal, distrofia neurítica, astrogliosis y depósitos cerebrales de amiloides (Duff, 2001; Van Leuven, 2000; Price y col, 1998). Todas estas observaciones sugieren fuertemente que el  $A\beta$  juega un rol esencial en la patogénesis del Alzheimer.

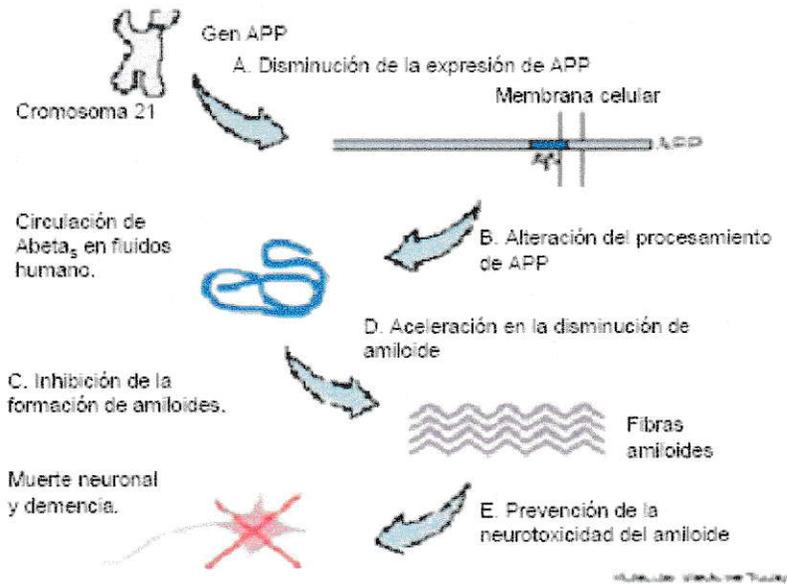
TABLA 1. Genes asociados con la EAF y sus efectos en la formación de A $\beta$

Gen	Locus	Número de mutaciones	EA (%)	EAF (%)	Edad de inicio	Efectos en A $\beta$
$\beta$ APP Autosomal dominante	21	11	<0.1	2-3	60s	$\uparrow$ A $\beta$
PS1 Autosomal dominante	14	76+	<2	$\approx$ 50	16-62	$\uparrow$ A $\beta$ 42
PS2 Autosomal dominante	1	6	<0.1	<1	60+	$\uparrow$ A $\beta$ 42
Alelo $\epsilon$ 4 ApoE 19 Factor de riesgo	19	-	$\approx$ 40%	-	60+	$\uparrow$ depósitos $\uparrow$ A $\beta$

NOTA: En esta tabla se encuentra los 4 genes que mayor efecto tienen en la EAF. Mutaciones en la proteína precursora del amiloide ( $\beta$ APP), en presenilina-1 (PS1), y presenilina-2 (PS2) son autosómicas dominantes en EAF y aumentan la producción total de A $\beta$ . Entre ellas, la mutación de presenilina es la que está más relacionada con el inicio temprano de la mayoría de los casos de EA y en la totalidad de los casos de EAF. Sin embargo, los casos de EAF son muy pocos dentro del total de casos de EA. Por otro lado, el alelo  $\epsilon$ 4 de ApoE es considerado un factor de riesgo para la EA. Sin embargo, individuos que presentan este alelo no necesariamente desarrollan la EA.

Se han propuesto varias terapias para combatir la enfermedad de Alzheimer a nivel de las placas amiloides (Figura 1), pero ninguna ha sido totalmente exitosa. Una de estas tantas terapias es la reducción de la expresión del gen APP mediante terapia génica, oligonucleótidos antisense o ingeniería genética de ribozimas. Estas técnicas bloquean la formación del amiloide en una etapa muy temprana pero presentan la desventaja que al disminuir la expresión de APP podrían producirse varios efectos secundarios indeseables (Zheng, 1996). Otra estrategia utilizada comúnmente es alterar el procesamiento de APP mediante la inhibición de las enzimas  $\beta$  y  $\gamma$  secretasa lo que probablemente reduciría la concentración de A $\beta$  en el cerebro y disminuiría la formación de amiloides (Citron, 2000). La desventaja de este método es que tanto la  $\beta$  como la  $\gamma$  secretasa clivan a otras proteínas que pueden ser esenciales en el funcionamiento celular. Una tercera estrategia utilizada es la inhibición del proceso de agregación de las placas A $\beta$ . Varias evidencias

indican que el proceso de mal plegamiento de A $\beta$  es probablemente el primer proceso patológico en el Alzheimer (Soto, 1999). A pesar de que se tiene un vasto conocimiento sobre el mecanismo molecular de la formación del  $\beta$  amiloide (Soto, 1994; Soto, 1999; Tempow, 1998), tanto la inhibición de la interacción proteína – proteína como del proceso de mal plegamiento de la proteína no es un blanco terapéutico tradicional por lo que la industria farmacéutica no tiene gran experiencia. Aunque se sabe muy poco sobre el mecanismo por el cual las placas pueden ser removidas del cerebro, una de las estrategias que ha presentado uno de los mejores resultados experimentales es la inmunoterapia contra A $\beta$ , la cual tuvo un gran éxito en modelos animales de Alzheimer pero que en la fase clínica con pacientes produjo efectos secundarios en el 6% de los individuos por lo que el estudio se suspendió (Nicoll y col, 2003). Una última estrategia terapéutica a considerar es la prevención de la neurotoxicidad propia del amiloide. Esta estrategia presenta la ventaja de poder actuar en estados mas avanzados de la enfermedad cuando las placas amiloides ya estan formadas por lo que las restantes estrategias ya no serían útiles. Sin embargo este tipo de tratamiento presenta una gran desventaja debido a que el A $\beta$  puede producir toxicidad por varios mecanismos que actuarían simultáneamente. Por lo tanto según lo expuesto recientemente en relación a los tratamientos contra la enfermedad de Alzheimer, se hace indispensable la búsqueda de un nuevo tratamiento con una mayor efectividad en comparación a los anteriormente mencionados.



**Figura 1. Blancos para el tratamiento de la EA:** La cantidad de amiloide cerebral puede ser disminuida influenciando procesos diferentes pero relacionados. El efecto negativo del amiloide en el cerebro puede ser disminuido por: (A) Reducción de la expresión de APP; (B) alterar el procesamiento de APP (C) inhibición de la formación de las fibras amiloides; (D) aceleración en la disminución de fibras amiloides o péptidos amiloides soluble ( $sA\beta$ ); o (E) previniendo la neurotoxicidad producida por el amiloide. Cada uno de estos blancos tiene ventajas y desventajas que tiene que tomarse en consideración al momento de diseñar algún tipo de droga.

Por mas de un siglo la Enfermedad de Alzheimer a sido diagnosticada basándose en criterios clínicos y confirmada por criterios patológicos por medio de la autopsia (Mirra y col, 1991; Mendez y col, 1992.). Desgraciadamente no hay consenso sobre los conceptos clínicos que definen la enfermedad, que hace imposible un diagnostico definitivo en los estados tempranos del Alzheimer. Es por esto que en los últimos 10 años han emergido de la literatura varios candidatos como potenciales biomarcadores para el diagnostico del Alzheimer. Estos biomarcadores en estudio van desde marcadores genéticos, a mediciones de concentración de péptido  $A\beta$  y/o TAU en el líquido encéfalo raquídeo (CSF), mediciones de péptidos cerebrales en la orina y varios agentes para realizar técnicas de neuroimagen (Hardy y col, 1995). La gran mayoría de estos biomarcadores tarde o temprano han sido dejados de lado debido a la falta de reproducibilidad de los resultados.

La mayoría de los estudios de biomarcadores se han enfocado en la composición y concentración del péptido beta-amiloide y tau en varios tejidos humanos, incluyendo biopsia de material cerebral, líquido encéfalo raquídeo y sangre (Sunderland y col, 2003; Francis y col, 1985). Específicamente la cuantificación del péptido  $\beta$ -amiloide<sub>1-42</sub>,  $\beta$ -amiloide<sub>1-40</sub>, tau total e hiperfosforilada en el líquido encéfalo raquídeo a emergido como el método de diagnóstico de mayor interés en el último tiempo (Hardy y col, 1995; Andreasen y col, 1999). A modo de ejemplo varios estudios basados en la técnica de ELISA han mostrado un aumento en el nivel de tau normal e hiperfosforilada y una disminución de los niveles de  $A\beta_{1-42}$  en el líquido encéfalo raquídeo en un estado temprano de la enfermedad en comparación a controles (Andreasen y Blennow, 2005). Sin embargo los métodos de diagnóstico utilizando el líquido encéfalo raquídeo han sido poco utilizados debido a la dificultad de realizar una punción lumbar y a la poca ventaja que presenta sobre el diagnóstico clínico que se realiza actualmente.

El desarrollo de una herramienta no invasiva para obtener imágenes del cerebro humano ha sido de gran utilidad para entender la función del cerebro. Imágenes estructurales del cerebro como las obtenidas por RMI como también imágenes funcionales del cerebro obtenidas mediante SPECT y PET han sido fundamentales para entender el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer en una etapa temprana. La posibilidad de visualizar mediante técnicas de imaging las placas amiloides permitiría realizar una detección presintomática además de estudiar la progresión de la enfermedad. En los últimos años se han desarrollado compuestos con diversas estructuras químicas y propiedades que permiten visualizar las placas amiloides mediante técnicas de imaging. Algunos de estos compuestos se han probado con relativo éxito en ratones, monos y pacientes con Alzheimer.

Utilizando anticuerpos contra A $\beta$  o fragmentos de péptidos marcados radioactivamente ha sido posible visualizar las placas amiloides mediante la técnica de SPECT, ejemplo de esto es el uso de la proteína A $\beta$  marcada con I<sup>125</sup>, cuya acción fue estudiada en homogenizado de cerebro de ratón doble transgénico con la capacidad de desarrollar placas amiloides (Maggio y col, 1992). Otro ejemplo es el marcaje con Tc<sup>99</sup> del anticuerpo contra el fragmento 1-28 de la proteína A $\beta$ , el cual fue desarrollado por Friedland y col; (Friedland y col, 1994), a pesar de presentar buenos resultados *in vitro*, los resultados *in vivo* no fueron los esperados debido a la baja permeabilidad del anticuerpo marcado a través de la BHE. La microscopia de resonancia magnética (MRM) produce imágenes con una resolución mucho mayor que la resonancia magnetica convencional. Cuando La MRM fue aplicada *in vitro* en tejidos de cerebro de 5 pacientes con Alzheimer y 3 controles, las placas amiloides fueron observadas en el hipocampo de los 5 pacientes con Alzheimer (Benveniste y col, 1999). Debido a que esta técnica demora unas 20 horas, es muy difícil que tenga una aplicación *in vivo* en pacientes. Wadghiri y col, marcaron el péptido A $\beta$ <sub>1-40</sub> con el compuesto magnético derivado del ácido acético Gd-DTPA para detectar mediante  $\mu$ MRI placas amiloides en ratones transgénicos APP/PS *in vivo*. El problema de este estudio es que el A $\beta$ <sub>1-40</sub> marcado tuvo que ser inyectado con manitol para facilitar el paso del péptido a través de la barrera hematoencefálica (Wadghiri y col, 2003).

Varios grupos han utilizado pequeñas moléculas con la capacidad de unirse a las placas y así de ese modo visualizarlas mediante distintas técnicas de imaging. Algunos de los compuestos con mayor proyección son los derivados del rojo de congo y Tioflavina, los cuales difieren en la forma en que se unen a las placas y su ingreso al cerebro.

El derivado lipofílico fluorescente del rojo congo X-34, ha demostrado gran capacidad para unirse a las placas amiloides en tejidos de pacientes con Alzheimer (Link y col, 2001), y

puede ser detectado mediante la técnica de SPECT, sin embargo la penetración de este compuesto a través de la barrera hematoencefálica es diez veces menor comparado a los derivados de tioflavina. Otro derivado del rojo de congo el Metoxi- XO4, compuesto mas lipofílico que el anterior se une con mayor afinidad a las fibras de A $\beta$  (Klunk y col, 2002). Ratonos fueron inyectados por vía intravenosa con <sup>11</sup>C-metoxi- XO4 mostraron una gran permeabilidad a través de la barrera hematoencefálica, siendo posible visualizar las placas por medio de la técnica de imagen de multifotón, la cual permite analizar pequeñas estructuras en el cerebro (1  $\mu$ m) (Bacsikai y col, 2001). Algunos derivados de Tioflavina como <sup>125</sup>I-6 (68-3), <sup>3</sup>H-BTA-1 (69-3) y el <sup>11</sup>C-6-OHBTA- 1 (Wadghiri y col, 2003) han mostrado una gran capacidad para unirse a placas amiloides en tejidos de pacientes con Alzheimer, con una afinidad del rango nanomolar, siendo 10 a 100 veces mayor que los derivados de rojo de congo. Estudios de unión *in vitro* con <sup>11</sup>C-6-OH-BTA-1 (PIB), en tejido de la región córtico frontal de cerebro obtenidos a partir de la autopsia de pacientes con Alzheimer , muestran valores máximos de unión similares a la cantidad de A $\beta$  calculada en la corteza frontal de humano medida por medio de técnicas bioquímicas (Naslund y col, 2000). Mediante microcopia de multifoton se observó en ratones transgénicos el cruce de PIB fluorescente a través de la BHE, marcando los depósitos amiloides (Bacsikai y col, 2003), sin embargo el tiempo que permanece en el cerebro es muy corto. En síntesis, en la actualidad no existe un método de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer basado en técnicas de imágenes. Por lo tanto debido a lo expuesto hasta ahora, se hace necesario desarrollar nuevas técnicas que permitan tratar y diagnosticar de forma apropiada la Enfermedad de Alzheimer. En los últimos años se han utilizado con gran éxito varias técnicas nanotecnológicas para combatir diversas enfermedades como por ejemplo algunos tipos de cáncer, por lo que la presente memoria se

enmarca dentro de un gran proyecto que pretende tratar y diagnosticar la enfermedad de Alzheimer utilizando herramientas nanotecnológicas.

### **Las Nanotecnologías y sus aplicaciones en neurociencias**

Nanotecnología se define como la tecnología que utiliza materiales y dispositivos en la escala de los nanómetros (lo que equivale a  $10^{-9}$  metros) en al menos una de las dimensiones. Esto implica que algunos aspectos estos materiales o dispositivos pueden ser manipulados o controlados mediante técnicas físicas o químicas a una resolución nanométrica, siendo una propiedad funcional exclusiva de este tipo de tecnologías. Los nanodispositivos y los nanomateriales pueden interactuar con sistemas biológicos a nivel molecular con un alto grado de especificidad. Tomando ventaja de esta especificidad molecular, mediante la nanotecnología se puede estimular, responder e interactuar con alguna célula o tejido en forma controlada y así de esa forma inducir una respuesta fisiológica deseada y minimizar los efectos indeseados.

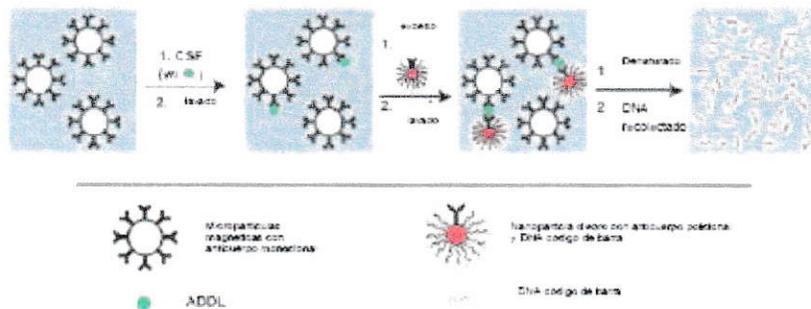
La aplicación de técnicas nanotecnológicas en neurociencia básica y clínica está en un estado muy temprano de desarrollo en comparación a otras áreas de la biomedicina, principalmente debido a la complejidad asociada a la interacción neuronal y al sistema nervioso. Existen dos tipos de aplicaciones nanotecnológicas en neurociencia. La “nanotecnología de plataforma” la cual puede ser adaptada para entender diversas áreas de la neurociencia; y la “nanotecnología de adaptación” la cual está directamente relacionada en solucionar algún problema neurobiológico.

Otra forma de clasificación puede ser según la aplicación de nanotecnología en neurociencia básica o en neurociencia clínica. En la mayoría de los casos la aplicación en neurociencia básica busca entender los mecanismos moleculares y celulares sin considerar

el uso o la potencial implicancia clínica, por el contrario en neurociencia clínica se busca atacar una determinada enfermedad sin necesariamente hacer uso de conocimientos neurobiológicos a nivel molecular y celular. Como se menciono anteriormente la aplicación de nanotecnología en el área clínica permite entender de mejor forma aspectos de la neurobiología molecular y celular. Específicamente esta tecnología es utilizada en neurociencia básica para “nano dirigir” materiales y realizar acercamientos que permitan promover la adhesión y crecimiento neuronal y de esta forma entender este proceso neurobiológico o también para apoyar otras técnicas diseñadas para interactuar con neuronas *in vivo* como por ejemplo estimulación con electrodos (Ai, H. y col, 2003; Moxon y col, 2004). Esto permite estudiar los procesos de comunicación y señalización celular y provee un sistema para investigar el efecto de drogas u otras moléculas Otra área emergente en neurociencia básica son los materiales y dispositivos diseñados para interactuar, y/o estimular neuronas a un nivel molecular (Shenai y col, 2004; Saifuddin y col, 2003). Otras investigaciones están enfocadas en realizar mediciones a nanoescala de la respuesta celular. La microscopia de fuerza atómica ha sido usada para medir respuestas morfológicas a nivel nanométrico (Shenai y col, 2004). Una última aplicación de la nanotecnología en neurociencia básica es su uso para realizar técnicas de imágenes, como por ejemplo los “quantum dots” y las nanopartículas, teniendo ambas partículas nanométricas con un centro compuesto por un metal pesado, lo cual les confiere propiedades ópticas interesantes. Un ejemplo de ello son los *quantum dots* que poseen fluorescencia muy alta y estable, la que puede ser cambiada alterando sus propiedades químicas y tamaño. En cuanto a las aplicaciones nanotecnológicas en neurociencia clínica, estas están principalmente enfocadas en limitar y revertir desórdenes neurológicos, promoviendo regeneración neuronal y neuroprotección (Silva y col, 2004).

Las aplicaciones nanotecnológicas con un objetivo neuroprotector se han enfocado en limitar los efectos dañinos de los radicales libres generados después de algún daño, el cual es un proceso neuropatológico clave que contribuye a la isquemia en el SNC y a promover desórdenes degenerativos (Tunggal y col, 2003; Gagliardi, 2000). Otra aplicación relevante en el área clínica que se ha estudiado de forma intensa, es el diseño de diversas nanopartículas funcionales que puedan ser administradas sistémicamente, que tengan la capacidad de liberar drogas en un sitio específico y que obviamente tengan la capacidad de atravesar la BHE (Lockman y col, 2002; Vinogradov y col, 2004), siendo este último punto el mayor objetivo clínico en el tratamiento de una amplia gama de desordenes neurológicos. Es muy importante comprender el fundamento molecular y el mecanismo celular involucrado en el proceso de cruce de nanopartículas a través de la BHE, lo cual sería uno de los impactos más importantes en la neurociencia clínica. A pesar de que en los últimos años la nanotecnología ha tenido un fuerte impacto en la ciencia en general, no existen muchos estudios que la relacionen con la EA. En estos estudios (Nam y col, 2003. Fortín y col, 2005) se utilizan técnicas nanotecnológicas para el tratamiento de esta enfermedad y su diagnóstico mediante imaging o mediante la detección de biomarcadores en el líquido cefalo raquídeo (LER) En relación a un posible método de diagnóstico de la EA, es sabido que ensayos basados en el uso de nanopartículas pueden detectar niveles de proteínas en el rango de concentración atómico siendo seis ordenes de magnitud menor que la concentración detectada por ELISA (Fortín y col, 2005). Por lo tanto este tipo de ensayos permite mejorar substancialmente la habilidad de detectar cambios metabólicos asociados a alguna enfermedad en particular en una etapa temprana. Este tipo de ensayo se basa en la captura de una determinada proteína mediante el uso de micropartículas magnéticas cubiertas con anticuerpo monoclonal específico para la proteína en cuestión. El complejo

micropartícula-proteína se hace reaccionar con nanopartículas de oro, las cuales a su vez están cubiertas por solo un anticuerpo policlonal contra la misma proteína y hebras de ADN con secuencia conocida denominada ADN “código de barra”. Este complejo ternario micropartícula-proteína-nanopartícula es capturado magnéticamente y luego el ADN “código de barra” es liberado y detectado mediante amplificación de plata, la cual es una técnica altamente sensible (figura 2) (Nam y col, 2003).



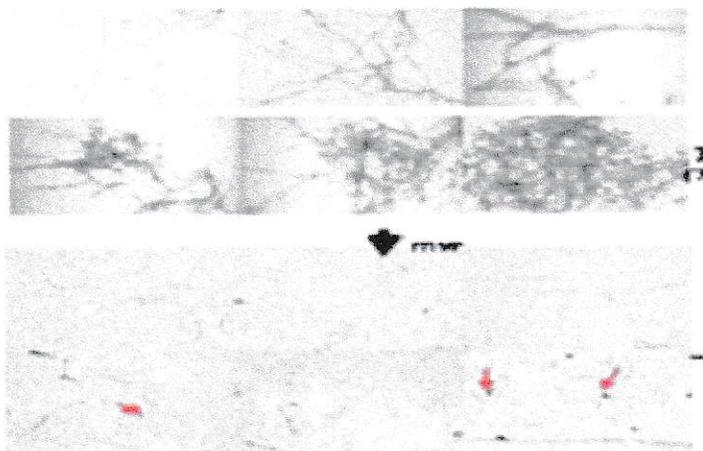
**Figura 2. Detección de ADDL en CFS mediante el uso de nanotecnología:** La presente figura representa la técnica desarrollada por Nam y col, basada en el uso de nanopartículas de oro y micropartículas magnéticas como forma de diagnóstico de la EA.

Este tipo de ensayo fue adaptado por Georganopoulou y col. para detectar la presencia del derivado de amiloide A $\beta$  ligando difusible (ADDLs), un potencial marcador patogénico soluble, en el líquido encéfalo raquídeo (LER) utilizando anticuerpos mono y policlonales específicos para este oligomero de A $\beta$  (Georganopoulou y col, 2005). La concentración de ADDLs determinada en los pacientes diagnosticado con Alzheimer fue 8 veces mayor en comparación a los controles. La ventaja de esta técnica en comparación a otras es la gran sensibilidad y además solo detecta un porcentaje del A $\beta$  total (solo ADDLs) en el LER y no todo como en otras técnicas, lo cual es un gran problema ya que no hay una gran diferencia en el A $\beta$  total en pacientes con Alzheimer en comparación a individuos sanos.

En otro estudio se conjugó el péptido  $A\beta_{1-40}$ , a una nanopartícula de óxido de hierro monocristalina (MION), la cual se inyectó intravascularmente, y se detectaron placas mediante  $\mu$ MRI en el cerebro de ratones transgénicos, existiendo una gran correlación entre estos resultados y los resultados inmunohistoquímicos (Wadghiri y col, 2003). Sin embargo este estudio no es una real alternativa de diagnóstico humano debido a que fue necesario coinyectarlo con manitol para facilitar el paso a través de la BHE, lo cual no está permitido en humanos.

Recientemente el Dr. Marcelo Kogan, desarrolló una novedosa técnica basada en el uso de nanopartículas de oro (AuNP), que permite manipular a nivel local (nanométrico) la autoagregación de la proteína  $\beta$ -amiloide mediante la aplicación de un campo magnético oscilante. En base a este concepto se está desarrollando una nueva estrategia para el tratamiento y diagnóstico de la EA, basada en el uso de AuNP. Las nanopartículas de oro (AuNP) son especies que ante la aplicación de campos magnéticos oscilantes (CMO) absorben energía pudiendo disiparla localmente en forma de calor por lo que se han utilizado para el tratamiento regional de ciertos tumores (Alexiou y col, 2000; Pankhurst y col, 2003). Recientemente en nuestro laboratorio, se observó que es posible desagregar especies tóxicas de  $A\beta$  y transformarlas en especies de bajo peso molecular mediante el uso de nanopartículas de oro y CMO (Fig 3) (Kogan y col, 2006). Para dirigir las AuNP hacia los agregados de  $A\beta$ , que representarían la diana terapéutica, las mismas pueden ser conjugadas a moléculas que posean una alta afinidad por los agregados amiloides, como son los inhibidores peptídicos de agregación, peptidomiméticos o anticuerpos específicos para oligómeros o fibras para obtener los conjugados AuNP-péptido, peptidomimético o proteína. Por otra parte, a pesar de que las AuNP requieren mayores frecuencias (GHz) que nanopartículas magnéticas de Co o Fe (KHz) para ser calentadas, las ventajas que atañen a

la simpleza de su síntesis, su baja toxicidad, su elevada estabilidad en medios acuosos, su tamaño, y la facilidad para conjugarse a través de enlaces tiólicos a péptidos que pudieran servirles como lanzaderas hacia dianas específicas, hacen de estos coloides herramientas sumamente atractivas para su aplicación en biomedicina.



**Figura 3. Desagregación de placas amiloides mediante el uso de AuNP:** a) La figura superior representa el complejo entre los conjugados de moléculas afines a  $A\beta$  unidos a AuNP y los agregados de la proteína  $A\beta$ . En la figura inferior se observa que luego de la aplicación de un Campo magnetico se produce la desagregación y/o cambios conformacionales de  $A\beta$  que llevarian a especies de menor toxicidad. Las flechas rojas muestran las AuNP luego de la irradiación.(Kogan y col, 2006).

Debido a lo anteriormente expuesto, surge la idea de obtener conjugados de nanoparticulas de oro para el desarrollo de una nueva estrategia terapéutica para la EA y evaluar si estos conjugados presentan afinidad por los agregados de  $A\beta$ . Específicamente, en el presente proyecto de magister se evaluó la estabilidad y afinidad de diversos conjugados por los agregados  $A\beta$  *in vitro* y *ex vivo*. Se evaluó la toxicidad, biodistribución y capacidad de atravesar la BHE de estas nanoparticulas *in vivo*. Por ultimo se determino la capacidad de uno de estos conjugado de cruzar la BHE *in vivo*.

## **1.2. Hipótesis**

Nanopartículas de oro (AuNP) de 10 nm de diámetro no presentan toxicidad *in vivo* y son capaces de atravesar la BHE. Por lo que es posible utilizar estas nanopartículas unidas a péptidos o macromoléculas que presenten afinidad por los agregados tóxicos de A $\beta$  para el desarrollo de una estrategia terapéutica para la Enfermedad de Alzheimer.

## **1.3. Objetivos**

### **1.3.1. Objetivo General**

Determinar el grado de toxicidad y biodistribución de nanopartículas de oro *in vivo*.  
Obtener y caracterizar conjugados de AuNP con diversos *compuestos* que presenten afinidad por agregados A $\beta$ .

### **1.3.2. Objetivos Específicos**

1. Sintetizar AuNP de 10 nm de diámetro de diámetro.
2. Determinar el grado de toxicidad de las AuNP *in vivo*.
3. Evaluar la biodistribución de las AuNP *in vivo*.
4. Evaluar la interacción entre los conjugados AuNP-*compuestos* (AuNP-Inh-Rod, AuNP-CP-Rod, AuNP-CN-Rod, AuNP-Tioflavina T, AuNP-F(ab)<sub>2</sub>6E10) y los agregados de A $\beta$  *in vitro* y *ex vivo*.
5. Determinar el paso a través de la BHE del conjugado AuNP-CLPFFD marcado fluorescentemente con rodamina.

## 2. Métodos.

### 2.1. Síntesis de AuNP

La síntesis de AuNP de aproximadamente 10 nm de diámetro fue realizada a través del método descrito por Turkevich y cols. Todo el material se lavó con Extran al 2 % en agua Mili-Q, se enjuagó con agua Mili-Q, se secó en estufa a 37 °C, y posteriormente se lavó con agua regia (Ácido nítrico/ácido clorhídrico 1:3). Todas las soluciones se prepararon empleando agua Mili-Q (18 MΩcm). **Método de Turkevich:** Se prepararon 106 mL de una solución 2,2 mM de citrato de sodio dihidratado. La reacción se realizó en un matraz de fondo redondo de tres cuellos de 250 mL, se conectó el cuello central del matraz a un condensador de reflujo, y se colocó todo el sistema en un manto de calefacción de aluminio con un agitador magnético para la agitación y mezcla continua. Se preparó 1 mL de una solución 24,3 mM de H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> (Sigma – Aldrich ) pesando 8,0 mg de esta sal. La solución 2,2 mM de citrato fue llevada a ebullición para añadir rápidamente, pero gota a gota, 1 mL de la solución 24,3 mM de H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> una vez alcanzado el reflujo. Después de aproximadamente 7 minutos (o hasta alcanzar color rojo característico) se retiró el matraz del calor y se esperó hasta que la solución alcanzara la temperatura ambiente para luego almacenarla a 4 °C. Las AuNP crecen a partir de un solo átomo de oro que comienza a revestirse a partir de otros átomos de acuerdo a la relación  $10n^2 + 2$  (Daniel y col, 2004), en que n representa el número de revestimientos. Por lo que el conjunto áurico más pequeño presentaría 13 átomos, el segundo 55 átomos y así sucesivamente.

Las AuNP obtenidas fueron caracterizadas por espectrofotometría UV-Visible en un espectrofotómetro Hitachi U-3010 para determinar el máximo de absorbancia del coloide. La caracterización por TEM fue realizada en un microscopio electrónico de transmisión

Philips con rejillas de cobre recubiertas con Formvar/carbon (Electron Microscopy Sciences). Las rejillas para TEM fueron preparadas en una placa de Petri con papel Whatman número 1 ubicando la rejilla con una pinza sobre el papel Whatman y colocando 10  $\mu$ L de la muestra sobre la rejilla. Se seca y se repite esta última operación 3 veces para posteriormente obtener las micrografías por TEM y medir sus tamaños empleando el programa Meta Morph Versión 6.1 Molecular Devices.

## **2.2. Síntesis de péptidos**

Tres péptidos marcados con rodamina B fueron sintetizados en el centro de Bioquímica de la Universidad de Texas en Galveston. Los péptidos fueron sintetizados mediante la técnica de síntesis de péptido en fase sólida a través del método de protección Fmoc/tBu, que emplea el grupo lábil en medio básico 9- fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) para proteger a los grupos aminoterminales y el grupo lábil en medio ácido terc-butilo (tBut) utilizado como protector de las cadenas laterales. La elongación del péptido en fase sólida fue llevada a cabo en jeringas de polipropileno equipadas con discos porosos de polietileno. Los solventes y reactivos solubles fueron removidos por succión. La remoción del Fmoc (tanto de la resina como la de los aminoácidos) se realizó con Piperidina 25%, Triton x100 1% / DMF (2 x 10 min). Los lavados entre desprotección, acoplamiento de aminoácidos y los subsecuentes pasos de desprotección se llevaron a cabo con dimetilformamida (DMF) (5 X 1 min), diclorometano (DCM ) usando 5 ml de solvente cada vez. Luego se realizó el ensayo de ninhidrina (Sarin y col, 1981), para determinar cualitativamente el porcentaje de acople de cada aminoácido. Los acoplamiento se llevaron a cabo con fmoc-aminoácidos (4 equivalentes), HOAt (4 equivalentes) y DIPCDI (4 equivalentes) los cuales fueron secuencialmente agregados a la resina, dejando la mezcla reaccionar por 90 minutos. La

rodamina fue la última en ser acoplada por lo tanto no presentaba el grupo protector fmoc. Por último el clivaje del péptido de la resina y la desprotección de las cadenas laterales se realizó con TFA 94%, agua 2,5%, EDT2,5% y TIS 1%.

### **2.3. Conjugación de AuNP a los péptidos**

Los conjugados AuNP-Péptido se obtuvieron empleando protocolos descritos por Levy y col, (Levy y col, 2004). Se tomaron 20 mL de AuNP y se procedió del siguiente modo: Se pesó 1 mg del péptido a conjugar y se disolvió en 1 mL de Dimetil Formamida. Se colocaron 20 mL de las AuNP a conjugar en un matraz de boca ancha de 50 mL con un agitador magnético para la agitación continua y se llevó el coloide a pH 8 con NaOH 0,5 M con el fin de estabilizar las AuNP y prevenir la precipitación durante el proceso de conjugación. Una vez preparados el coloide y el péptido, se añadió rápidamente 1 mL de péptido al matraz manteniendo el coloide bajo agitación continua durante 15 minutos. El coloide resultante fue sometido a diálisis por tres días empleando una bolsa de diálisis y 2 litros de solución 1,2 mM de citrato de sodio dihidratado para sumergir la bolsa. La diálisis se realizó manteniendo la bolsa sumergida bajo agitación continua en oscuridad a temperatura ambiente y cambiando la solución cada 24 horas.

#### **2.3.1 Conjugación de AuNP a Tioflavina T.**

El método de conjugación de AuNP a Tioflavina T (Sigma-Aldrich) es en general el mismo que para el resto de los péptidos, solo con la diferencia que la Tioflavina fue disuelta en agua mili Q a modo de preparar una solución al 0.2%. Luego se agregaron 18  $\mu$ L de la solución Tioflavina 2% a 30 mL de solución de AuNP en un matraz de boca ancha de 50

mL con un agitador magnético para producir agitación continua durante 25 minutos. El coloide resultante fue sometido a diálisis por tres días empleando una bolsa de diálisis y 2 litros de solución 1,2 mM de citrato de sodio dihidratado para sumergir la bolsa. La diálisis se realizó manteniendo la bolsa sumergida bajo agitación continua en oscuridad a temperatura ambiente y cambiando la solución cada 24 horas.

### **2.3.2 Conjugación de AuNP a región F(ab)<sub>2</sub> de anticuerpo anti A $\beta$ (6E10).**

En primer lugar 20 mL de solución de AuNP fueron centrifugadas a 13200 rpm por 15 minutos a modo de precipitar las nanoparticulas. Posteriormente se descarto en sobrenadante y el pellet (correspondiente a las AuNPs) fue reconstituido en 20 mL de HEPES 10 mM. En paralelo 10  $\mu$ L del anticuerpo 6E10 (Covance) fue diluido en 990  $\mu$ L de HEPES. Posteriormente se adiciono la solución de anticuerpo en HEPES a los 20 mL de AuNP y se dejo 20 minutos a temperatura ambiente. Luego de transcurrido los 20 minutos, se adiciono a la solución 0.5 mL de Polietilenglicol al 1% (PM = 8000) a modo de prevenir la agregación y se centrifugo a 6000 rpm por 30 minutos. Luego el pellet F(ab)<sub>2</sub>/AuNP se resuspendio en 10 mL de PBS 1X.

### **2.4. Caracterización de AuNP y sus conjugados**

Las AuNP obtenidas y sus conjugados fueron caracterizados a través de espectrofotometría UV-Visible y TEM. Las mediciones realizadas a través de espectrofotometría UV-Visible se realizaron empleando un espectrofotómetro Hitachi U-3010 y cubetas plásticas de 1cm de longitud. La caracterización de AuNP y sus conjugados se realizó entre longitudes de onda de 350 nm y 650 nm empleando como blanco citrato de sodio dihidratado 1,2 mM.

Todas las mediciones que requirieron del uso de espectrofotometría UV-Visible emplearon los mismos equipos e instrumentos.

La caracterización por TEM fue realizada en un microscopio electrónico de transmisión Philips modelo 201, con rejillas de cobre recubiertas con Formvar. Las rejillas para TEM fueron preparadas en una placa de Petri con papel Whatman número 1 ubicando la rejilla con una pinza sobre el papel Whatman y colocando 10  $\mu\text{L}$  de la muestra sobre la rejilla y esperando la sequedad, repitiendo esta última operación 3 veces.

## **2.5. Interacción *in vitro* de los conjugados con $\text{A}\beta_{1-42}$**

Esta tarea requirió de la obtención de la forma monomérica del péptido amiloide ( $\text{A}\beta_{1-42}$ ) y su incubación, con la consecuente formación de fibras, durante 7 días. Así, se preparó una suspensión madre pesando aproximadamente 1 mg de  $\text{A}\beta_{1-42}$  y sonicándolo en 200  $\mu\text{L}$  de agua Mili-Q durante un minuto a temperatura ambiente. Luego, por medio de una microcuantificación de proteínas con el reactivo de Bradford se hizo una curva de calibración con un patrón de albúmina a concentraciones de 0, 2, 4, 8, 14, y 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , y se cuantificó el péptido  $\text{A}\beta_{1-42}$  evaluando la cantidad de éste en una alícuota de 10  $\mu\text{L}$  de la suspensión madre a 595 nm en UV-Visible. Hecho esto, se procedió a la obtención de la forma monomérica del péptido amiloide  $\text{A}\beta_{1-42}$  a través del tratamiento de Zagorsky (Bitan y Temprow, 2005) tomando una alícuota de la solución madre y preparando 600  $\mu\text{L}$  de  $\text{A}\beta_{1-42}$  40  $\mu\text{M}$ . Se evaporó el agua, y se añadieron 20  $\mu\text{L}$  de ácido trifluoracético al secado volviendo a evaporar el solvente en corriente de nitrógeno. Se agregaron 20  $\mu\text{L}$  de hexafluorisopropanol y se secó la muestra una vez más, repitiendo esta última acción tres

veces para luego dejar la muestra durante toda la noche en un desecador al vacío con hidróxido de sodio y parafina. Al día siguiente, se disolvió A $\beta$ <sub>1-42</sub> añadiendo 107  $\mu$ L de NaOH 10 mM, 432  $\mu$ L de agua Mili-Q, y 60  $\mu$ L de amortiguador fosfato 200 mM, y los 600  $\mu$ L obtenidos (A $\beta$ <sub>1-42</sub> 40  $\mu$ M y amortiguador fosfato 20 mM) fueron vortexeados por el espacio de un minuto e incubados durante 4 horas a 37 °C para dar lugar a la formación de centros de nucleación. De esta forma se permite la obtención paulatina de fibras de A $\beta$ <sub>1-42</sub> durante el proceso de incubación siguiente de siete días. Una vez ya formadas las fibras, es decir, luego de transcurrido los 7 días. Inmediatamente, a partir de la solución preparada se obtuvieron 6 alícuotas de 100  $\mu$ L, a una de estas alícuotas se le agregaron 100  $\mu$ L de una solución de AuNP 0,1  $\mu$ M, a las otras 5 alícuotas se les agregaron cada uno de los cinco conjugados con los que se trabajó a una concentración 0,1  $\mu$ M. Estas soluciones fueron incubadas en agitación por 48 horas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación para cada experimento, las muestras fueron analizadas por TEM. Las rejillas para TEM fueron preparadas homogeneizando la muestra y depositando 10  $\mu$ L de ésta sobre un trozo de parafilm y, separadamente, dos gotas contiguas de agua Mili-Q y una de acetato de uranilo 2% (tinción para TEM) de 10  $\mu$ L cada una. La cara correspondiente de la rejilla se puso en contacto con la muestra durante un minuto, se secó en papel Whatman número 1 y se puso en contacto con la gota contigua de agua Mili-Q durante un minuto más secándola nuevamente con un papel Whatman, repitiendo el proceder al hacer pasar la rejilla por el resto de las gotas. Una vez seca, la rejilla se llevó a TEM.

## **2.6. Interacción *ex vivo* de los conjugados con agregados de A $\beta$ .**

Este experimento fue realizado en ratones doble transgenico APP/PS1 (Jackson laboratorios), los cuales desarrollan placas amiloides a los 6 meses de edad. Tres de estos animales fueron sacrificados a los 500 días de edad por lo que presentaban una gran cantidad de placas en el cerebro. Una vez sacrificados los animales, se les extrajo el cerebro, éste fue fijado en paraformaldehído al 4% por 24 horas y posteriormente cada cerebro fue embebido en parafina y se realizaron secciones de 10  $\mu$ m de grosor. Una vez obtenidas las secciones de cerebro, estas fueron desparafinadas mediante protocolo plenamente establecidos (Radde R, y col, 2006). Luego los tejidos fueron bloqueados por 1 hora con BSA 2% PBS para eliminar interacciones inespecíficas. En el caso específico de los tres conjugados AuNP-péptido marcados con Rodamina B, las secciones de cerebro fueron incubadas con uno u otro de estos conjugados durante toda la noche, al día siguiente las secciones fueron lavadas 3 veces con PBS 1X, 10 minutos cada vez, para luego ser incubadas por tres horas con el anticuerpo 6E10 (1:5000) el cual reconoce el epitope 6-10 del péptido A $\beta$ . Posteriormente las secciones se lavaron nuevamente 3 veces con PBS 1X, 10 minutos cada vez y las secciones se incubaron por 1 hora con el anticuerpo secundario anti-ratón IgG alexa488, 1:700 (Sigma-Aldrich). En el caso del conjugado AuNP-Tioflavina, el protocolo utilizado fue el mismo, solo con la diferencia que en este caso se utilizó un anticuerpo secundario anti-ratón IgG alexa568 (Sigma-aldrich). Finalmente en el caso del conjugado AuNP-F(ab)<sub>2</sub>6E10, este al igual que en los casos anteriores se incubó durante toda la noche, con la diferencia que en este caso luego de los 3 lavados con PBS 1X, las secciones fueron incubadas con anticuerpo secundario anti-ratón IgG alexa 488, 1:700 (Sigma-aldrich).

Todas las secciones fueron analizadas mediante microscopia de fluorescencia utilizando un microscopio Nikon Eclipse 800.

## **2.7. Determinación de la toxicidad y biodistribución de las nanopartículas de oro en ratones silvestre C57/BL6.**

### **2.7.1. Tratamiento con nanopartículas de oro.**

Ratones machos silvestre C57/BL6 (Jackson laboratorios) de 12 semanas de edad y de un peso promedio de  $28 \pm 2$  fueron usados en este experimento. La temperatura de la pieza se mantuvo a  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , la humedad relativa a  $60 \pm 10\%$  y se mantuvo un ciclo de 12 horas luz/oscuridad. Agua destilada y comida esterilizada estuvo disponible *ad limitum* para los animales.

Treinta y dos animales fueron divididos de forma aleatoria en cuatro grupos: un grupo control y tres experimentales. Cada grupo experimental fue inyectado con dosis distintas de oro ( $40 \mu\text{g/Kg}$ ,  $200 \mu\text{g/Kg}$  y  $400 \mu\text{g/Kg}$ ) en un volumen de  $100 \mu\text{L}$ . Estas dosis fueron administradas intraperitonealmente diariamente durante 8 días. El grupo control fue inyectado con Citrato de Sodio  $1,2 \text{ mM}$ . Mortalidad y cualquier alteración en el comportamiento de los animales fue monitoreada durante el estudio. Un día después de la última inyección (día 9), los animales fueron sacrificados utilizando  $\text{CO}_2$ . Muestras de sangre fue obtenida directamente del corazón, a partir de la centrifugación de la sangre a  $3000 \text{ rpm}$  por 10 minutos 2 veces se obtuvo el suero. Los siguientes órganos, hígado, pulmones, riñones cerebro y bazo fueron extraídos y pesados. Uno de los riñones, uno de los pulmones y un hemisferio del cerebro fueron fijados inmediatamente en una solución de formalina al 10% para realizar los estudios histopatológicos. En cuanto al otro riñón,

pulmón y hemisferio del cerebro restante, estos fueron inmediatamente colocados a  $-80^{\circ}\text{C}$  para los estudios de cuantificación de oro. En relación al hígado y bazo estos órganos fueron divididos mediante cortes longitudinales, de esa forma se obtuvieron trozos representativos tanto para los estudios histopatológicos como para los estudios de biodistribución.

### **2.7.2. Examinación morfológica.**

Durante este estudio, los ratones fueron pesados y se analizó su comportamiento diariamente. Para examinar los cambios morfológicos, se extrajeron los órganos ya mencionados, los cuales fueron pesados, al igual que el cuerpo del animal. De esta forma se obtuvo el coeficiente de cada órgano en relación al peso total del ratón (órgano mg/peso del cuerpo g).

### **2.7.3. Análisis bioquímicos del suero.**

Luego de sacrificar a los animales, se le extrajo sangre, la cual fue centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos 2 veces para poder separar el suero. Mediante el uso de un Auto-analizador bioquímico se determinó los niveles en el suero de Bilirrubina total (TBIL) y Fosfatasa alcalina para evaluar daño en el hígado. Para determinar daño a nivel renal se midieron los niveles de ácido urico (URIC), urea nitrogenada (UREA) y creatinina (CREA).

#### **2.7.4. Examinación histopatológica.**

Para realizar los estudios patológicos, los órganos fueron inmediatamente fijados en formalina al 10%. Cada muestra fue embebida en bloques de parafina, para luego ser seccionados en secciones de 5  $\mu\text{m}$  de grosos y colocados en porta objetos de vidrio. Posteriormente las secciones de cada órgano fueron teñidas con Hematoxicilina y Eosina (H&E). Finalmente estas secciones fueron analizadas para determinar algún grado de toxicidad utilizando un microscopio óptico modelo Nikon Eclipse 800.

#### **2.7.5. Cuantificación de oro.**

Para la cuantificación de oro una vez extraído los órganos, estos fueron almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente los órganos fueron secados durante 24 horas en un horno a  $70^{\circ}\text{C}$ . Luego cada órgano seco fue digerido usando peróxido de hidrógeno al 30% a una temperatura de  $50^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente los tejidos digeridos fueron disueltos con ácido nítrico ultra puro 0.25 N (1-4 mL dependiendo la cantidad de tejido digerido). En orden de aumentar la fiabilidad de la cantidad de oro en cada órgano, se usaron dos técnicas distintas, Espectrometría de absorción atómica con horno de grafito (GF-AAS) y espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS).

#### **2.8. Inyección vía intravenosa del conjugado AuNP-Inh-Rod en ratones C57/BL6**

Se inyectó directamente a la vena yugular a 3 ratones 100  $\mu\text{L}$  de conjugado AuNP/Inh-Rod a una concentración 5 nM de nanopartículas equivalente a 200  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de oro. Luego de 1

hora, los ratones fueron perfundidos con PBS 1X. A modo de control 3 ratones fueron inyectados con 100  $\mu$ L de Citrato de Sodio 1,2 mM. Posteriormente a los ratones se les extrajo el cerebro, un hemisferio se utilizo para estudios de inmunihistoquímica mientras que el otro hemisferio fue utilizado para cuantificar la cantidad de oro que penetra al cerebro mediante ICP- MS y GF-AAS.

### **2.8.1 Determinación del paso a través de la BHE del conjugado AuNP-Inh-Rod.**

Como ya se menciona, luego de perfundir a cada animal, se le extrajo el cerebro el cual fue dividido en dos, una mitad para estimar cualitativamente la fluorescencia dada por la rodamina B y la otra para cuantificar la cantidad de oro mediante ICP-MS y GF-AAS. En el caso de los hemisferios utilizados para inmunofluorescencia, estos fueron guardados a -80°C, para luego realizar crio-secciones de 5  $\mu$ m de grosor. Estas secciones fueron analizadas directamente en el microscopio de fluorescencia para determinar la presencia de rodamina del conjugado en el cerebro. Además en estas secciones se tiñeron células neuronales mediante inmunohistoquímica utilizando NeuN (1:1000) el cual reconoce núcleos neuronales y un anticuerpo secundario anti-ratón IgG alexa 488 (1:700). De esta forma se determino el paso del conjugado a través de la BHE.

En cuanto a los análisis cuantitativos de la cantidad de oro en el cerebro, estos se realizo mediante la técnica de ICP-MS utilizando el mismo protocolo descrito en el punto 2.7.5.

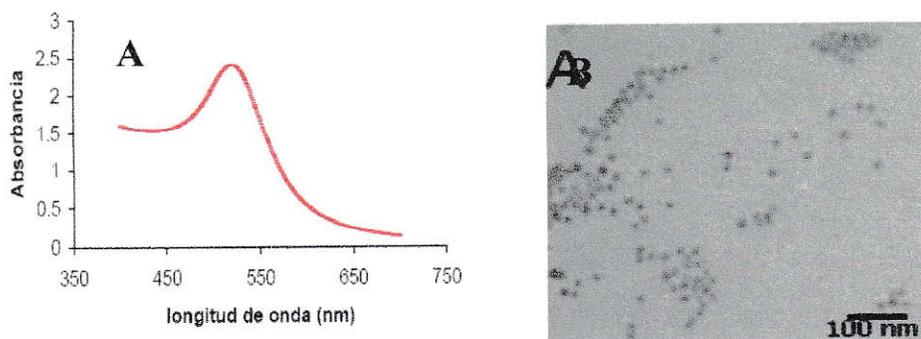
### **3. Resultados.**

Este trabajo corresponde solo a una etapa del proyecto que persigue el desarrollo de una nueva estrategia terapéutica para la enfermedad de Alzheimer, por lo que viene a ser evidente que algunas interrogantes hallarán respuesta sólo en trabajos posteriores, llegando a ser en este sentido, la base para futuros estudios.

#### **3.1. Caracterización de nanopartículas mediante espectrofotometría UV-Visible y Microscopía electrónica de transmisión (TEM):**

Las AuNP mostraron un  $\lambda$  de absorción máximo entre rangos de 520-522 nm lo cual se relaciona con tamaños de entre 10 y 15 nm, lo que es un indicativo de nanopartículas de diámetro cercano al esperado según el método usado. En la figura 4a se observa un pico estrecho, lo que indicaría la obtención de una distribución de tamaños relativamente uniforme.

Mediante el uso del TEM se determinó la esfericidad de las partículas, las cuales revelaron un tamaño de  $12,8 \text{ nm} \pm 1,8 \text{ nm}$  de diámetro (figura 4b).



**Figura 4. Caracterización de AuNPs:** A) Curva de absorbancia en UV-Visible de AuNP, el máximo se observa a los 520 nm, lo cual indicaría que se tratan de AuNP de 10 nm de diámetro aproximadamente. B) Imagen de las nanopartículas tomada mediante TEM a 20000X. Las AuNP presentaron un diámetro promedio de 12.8 nm.

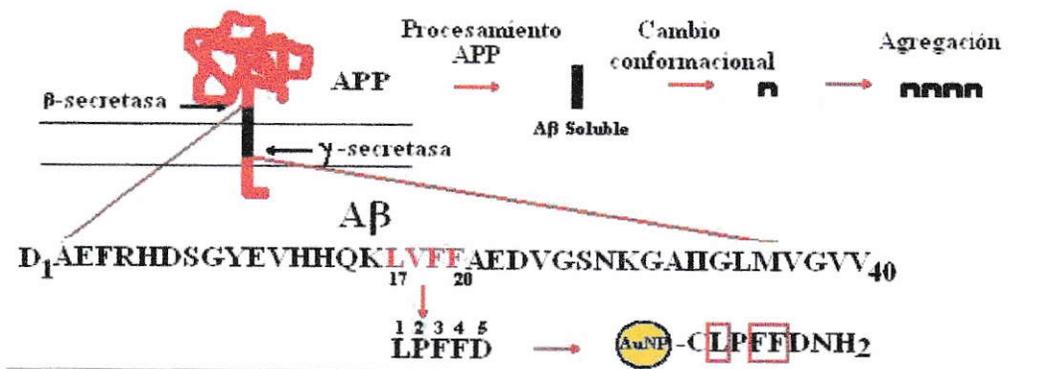
De acuerdo a los resultados obtenidos en relación a la síntesis de nanopartículas de oro, podemos concluir que el protocolo utilizado fue exitoso ya que se obtuvieron AuNP homogéneas y del diámetro esperado.

### 3.2. Síntesis de péptidos y caracterización de los conjugados AuNP-péptido.

El péptido utilizado en este estudio se diseñó a partir de los estudios realizados por Soto y colaboradores los cuales apuntan a la región 17-21 (17LVFFA21) de A $\beta$  como el núcleo hidrofóbico a partir del cual se produce la auto agregación por lo que, empleando como base esta secuencia de autoreconocimiento, se desarrollaron péptidos de elevada selectividad y afinidad capaces de inhibir la formación de depósitos tóxicos de A $\beta$  y desagregar los depósitos ya formados (Bieler y Soto, 2004), basando el diseño en el hecho de que los aminoácidos hidrofóbicos leucina y fenilalanina ubicados en las posiciones 17, 19, y 20 de A $\beta$  parecen jugar un papel importante en el reconocimiento e interacción A $\beta$ -

A $\beta$  y no así la valina en posición 18, que solo estabilizaría los agregados formados. Así, debido a la poca importancia que la valina (de la región 17-21) tiene respecto al reconocimiento y anclaje de A $\beta$ , la secuencia del péptido diseñado por Soto y col, contempló el reemplazo de este aminoácido por prolina, ya que su capacidad disruptora de configuraciones  $\beta$  por excelencia permite no sólo impedir la agregación de A $\beta$  sin afectar el proceso de anclaje, sino también evitar la posible autoagregación del péptido diseñado o su participación como núcleo de agregación. Consecuentemente con lo anterior, estudios de estructura-actividad realizados con los péptidos desarrollados por Soto confirman que los aminoácidos prolina y fenilalanina ubicados en las posiciones 2 y 3 del péptido juegan un papel importante en la actividad de estos péptidos (Bieler y Soto, 2004), información que se suma a estudios previos que señalan al aminoácido fenilalanina en la posición 19 (equivalente a la posición 3 del péptido inhibidor), como un aminoácido crítico en la interacción A $\beta$ -A $\beta$  y formación de amiloide. Finalmente, el diseño de los péptidos consideró el aumento de la solubilidad adicionando aspártico al extremo C-terminal debido a su carácter polar y considerando mejorar las propiedades farmacocinética del péptido, se disminuyó levemente la proteólisis fisiológica a través de la amidación C-terminal de estos péptidos dando lugar al péptido de síntesis LPFFDNH<sub>2</sub>, el cual fue denominado disruptor de laminas  $\beta$ . Las características que presentan separadamente las AuNP y los péptidos disruptores de láminas  $\beta$  como LPFFDNH<sub>2</sub> podrían fusionarse a través de la conjugación de ambas sustancias permitiendo obtener un conjugado selectivo, estable, y con la capacidad de absorber y ceder la energía proveniente de un CMO a nivel local, donde la capacidad de absorber y ceder energía localmente estaría dada por las AuNP, la selectividad por A $\beta$  estaría dada por el péptido LPFFDNH<sub>2</sub>. La estrategia utilizada para la conjugación de los péptidos a las AuNP se basa en la interacción que presenta el grupo tiol, presente en la

cisteína de la posición N terminal, con el oro. Es sabido que los grupos tiólicos y el oro reaccionan espontáneamente para formar un enlace de carácter covalente (Levy y col, 2004; Zhu y col, 2003), por lo que basados en este conocimiento, el proceso de conjugación AuNP-péptidos se llevó a cabo modificando el péptido LPFFDNH2 mediante la adición de una cisteína en la posición N-terminal (CLPFFDNH2), debido a que la presencia del grupo tiólico en la cadena lateral de este aminoácido (Levy y col, 2004) permite la interacción entre este grupo y las AuNP (Figura 5).



**Figura 5. Representación esquemática del origen de los agregados de Aβ:** La región LVFF del péptido Aβ, presenta naturaleza hidrofóbica donde se produce la interacción entre péptidos estimulando la formación de agregados. El péptido inhibidor fue sintetizado basándose en esta región. El reconocimiento entre el conjugado AuNP-INH y Aβ estaría dado por los aminoácidos encerrados en recuadros rojos.

El grado de interacción de los conjugados con las placas amiloides determinará en gran medida el avance que se logre en el desarrollo de esta nueva estrategia terapéutica. Por este motivo, en nuestro laboratorio se sintetizaron junto con el inhibidor (INH), otros dos péptidos. Uno de los péptidos es considerado nuestro control negativo (CN) ya que posee la secuencia CARTG elegida al azar, la cual no tiene relación con la región hidrofóbica de Aβ por lo que no debería interactuar de ninguna forma con las placas amiloides. El tercer péptido en

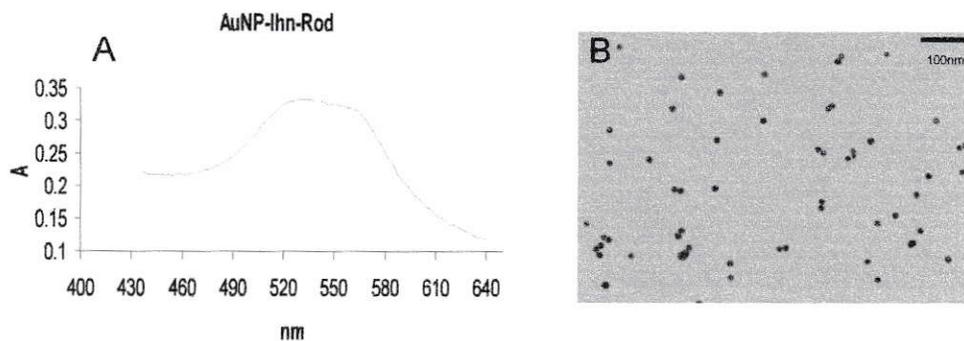
estudio es considerado nuestro control positivo (CP) ya que posee la secuencia de 20 aminoácidos CKLVFFAEDVGSNKGAIIGL que corresponde a la región 15-34 del péptido A $\beta$ , por lo que debiera unirse con gran afinidad a las placas amiloides (Tjernberg L y col, 1996).

Estos conjugados se encuentran marcados fluorescentemente para posteriores aplicaciones *ex vivo* e *in vivo*. Por lo tanto en este caso específico durante el proceso de síntesis de los 3 péptidos, se acopló un fluoróforo a nivel de las cisteína mediante un enlace peptídico entre el grupo amino del aminoácido y el carboxilo del fluoróforo, es por este motivo que se eligió para el marcaje de los péptidos la Rodamina B, la cual emite fluorescencia roja.

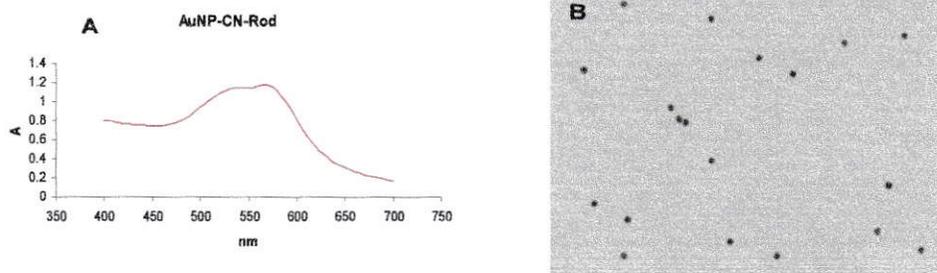
#### **Caracterización por espectrofotometría UV-Visible Visible y Microscopía electrónica de transmisión (TEM):**

Una vez sintetizadas, las AuNP fueron conjugadas y caracterizadas. Los conjugados de AuNP con péptidos marcados con Rodamina B, mostraron 2 picos máximos de absorbancia (Figura 6-8), en el caso del conjugado AuNP-INH-Rod (Figura 6A) se apreciaron máximos a 537 y a los 565,5 nm, el conjugado AuNP-CN-Rod presento sus máximos a 537 y 566 nm (Figura7A), y en cuanto al conjugado AuNP-CP-Rod, este presento sus máximos de absorbancia a los 536 y 568 nm (Figura 8A).

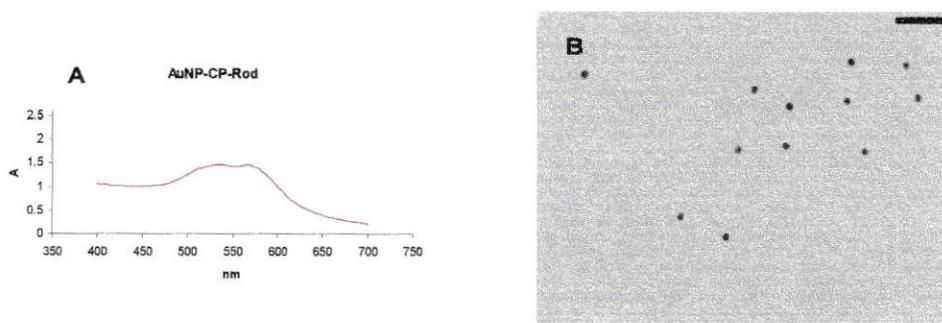
Este cambio en el máximo de absorción en los 3 conjugados respecto al observado en las AuNP sin recubrir se debería al cambio ocurrido en la superficie de la partícula producto de la conjugación, que genera un cambio en el índice de refracción (Daniel y col, 2004).



**Figura 6. Caracterización AuNP-Inh-Rod:** A) Curva de absorbancia UV-Visible del conjugado AuNP-INH-ROD. En el espectro se observan máximos a los 536 y 567 nm aproximadamente, lo cual indicaría un cambio en la superficie de la partícula debido a la unión del péptido. B) Imagen del conjugado tomada mediante TEM a 20000X. Los conjugados presentaron un diámetro promedio de 12.4 nm.



**Figura 7. Caracterización AuNP-CN-Rod:** Curva de absorbancia UV-Visible del conjugado AuNP-CN-ROD. En el espectro se observan máximos a los 537 y 566 nm aproximadamente, lo cual indicaría un cambio en la superficie de la partícula debido a la unión del péptido. B) Imagen del conjugado tomada mediante TEM a 20000X. Estos conjugados en promedio presentaron un diámetro de 11.2nm.



**Figura 8. Caracterización AuNP-CP-Rod:** Curva de absorbancia UV-Visible del conjugado AuNP-CP-ROD. En el espectro se observan máximos a los 536 y 568 nm aproximadamente, lo cual indicaría un cambio en la superficie de la partícula debido a la unión del péptido. B) Imagen del conjugado tomada mediante TEM a 20000X. El diámetro obtenido fue de 12.5 nm.

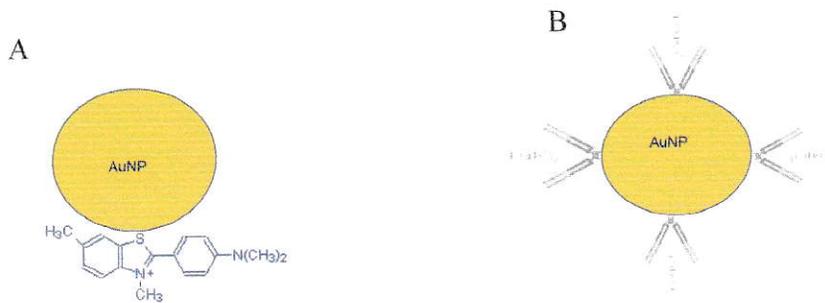
Al analizar las imágenes de TEM de los 3 conjugados, se observó que en todos los casos las AuNP conservaban su esfericidad, no se agregaban posiblemente debido a la repulsión de carga y presentaban un diámetro aproximado de 12 nm. Específicamente el diámetro calculado del conjugado AuNP-INH-Rod fue de  $12.4 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$  (Figura 6B), en el caso de AuNP-CN-Rod fue de  $11.2 \text{ nm} \pm 1.4 \text{ nm}$  (Figura 7B) y en el caso de AuNP-CP-Rod fue de  $12.5 \text{ nm} \pm 2.6 \text{ nm}$  (Figura 8B).

La importancia del tamaño de los conjugados radica en el uso terapéutico que se les pretende dar, siendo evidente el impacto que éste tendrá en los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción que, supeditados a la vía de administración, permitirán a los conjugados alcanzar la diana terapéutica.

### **3.3. Caracterización de los conjugados AuNP-Tioflavina y AuNP-F(ab)<sub>2</sub>6E10.**

Para este estudio se eligió trabajar con Tioflavina T, ya que esta molécula tiene la capacidad de unirse a cualquier tipo de amiloide (independiente de la proteína que lo forme) emitiendo fluorescencia verde. La tioflavina a sido usada como farmacoforo para el desarrollo de varios compuesto con capacidad para unirse a diversos amiloides (Mathis y col., 2003). Es por esto que el conjugado AuNP-tioflavina seria útil para el tratamiento de cualquier tipo de enfermedad en que se desarrollen agregados. Es importante mencionar que somos el primer grupo que conjuga este tipo de molécula a nanopartículas de oro, por lo que no sabemos con certeza como es la interacción entre la tioflavina y la superficie de la nanopartícula (Figura 9A).

Es sabido que la región Fab de un anticuerpo es la encargada de unirse al antígeno, por lo se decidió conjugar a la nanoparticulas solo la región Fab del anticuerpo 6E10, así de este modo se reduce considerablemente el tamaño del conjugado lo que es esencial para que éste pueda cruzar la BHE. Este conjugado no fue marcado con ningún fluoróforo ya que puede ser fácilmente detectado mediante un anticuerpo secundario anti-ratón que reconoce la región Fab del anticuerpo 6E10 (Figura 9B).



**Figura 9:** A) Representación grafica del conjugado AuNP-Tioflavina T. Este conjugado podría ser utilizado en otras enfermedades relacionadas a la agregación de proteínas, ya que esta molécula tiene la capacidad de unirse a cualquier tipo de agregado. B) Representación del conjugado AuNP-F(ab)<sub>2</sub>6E10. Este es un anticuerpo disponible comercialmente que se une al péptido A $\beta$  independiente de su conformación.

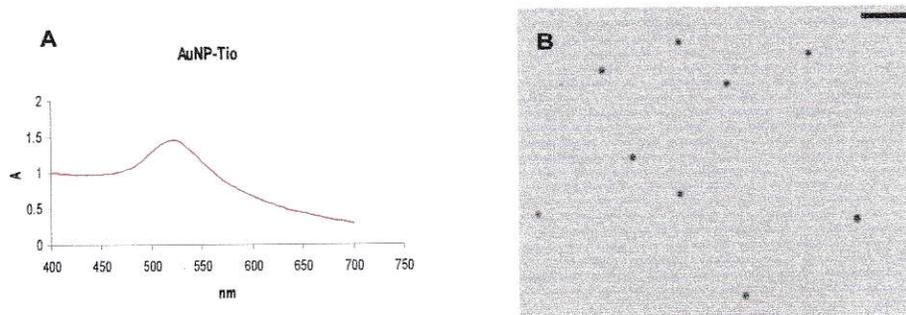
### **Caracterización por espectrofotometría UV-Visible Visible y Microscopía electrónica de transmisión (TEM):**

En el análisis de UV-Visible el conjugado de AuNP-Tioflavina T mostró 1 pico máximo de absorbancia, este máximo de aprecio a los 522 nm (Figura 10A). En el caso del conjugado AuNP-F(ab)<sub>2</sub>6E10, se observo el pico de absorbancia a los 530 nm (Figura 11A).

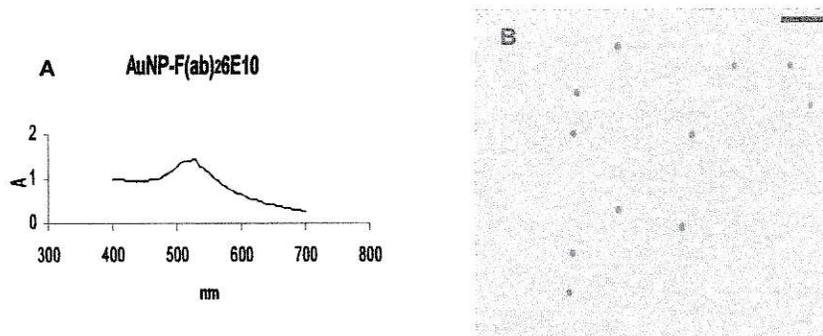
Al igual que en los conjugados peptídicos, el cambio en el máximo de absorción en los conjugados respecto al observado en las AuNP sin recubrir se debería al cambio ocurrido en la superficie de la partícula producto de la conjugación, que genera un cambio en el índice de refracción (Daniel y col, 2004).

En las imágenes de TEM se puede ver que en ambos conjugados las AuNP mantienen su esfericidad, no se agregaban posiblemente debido a la repulsión de carga y presentaban un diámetro aproximado de 12 nm. En el caso específico del conjugado AuNP-tioflavina T, el diámetro calculado fue de 12.8 nm  $\pm$  1 nm (Figura 10B). En el caso del conjugado AuNP-F(ab)<sub>2</sub>6E10, el diámetro promedio calculado fue de 12.6 nm  $\pm$  3 nm (Figura 11B).

Como se menciono previamente es de gran importancia mantener el tamaño del conjugado en valores lo mas bajo posible, debido al uso terapéutico que se les pretende dar, lo cual esta estrechamente relacionado con el cruce de estas partículas a través de la BHE.



**Figura 10. Caracterización Aunp-Tio:** Curva de absorbancia UV-Visible del conjugado AuNP-Tioflavina T. En el espectro se observa el máximo a los 522 nm aproximadamente, lo cual indicaría un cambio en la superficie de la partícula debido a la unión del péptido. B) Imagen del conjugado tomada mediante TEM a 20000X. El diámetro de estos conjugados es de 12.8 nm.



**Figura 11. Caracterización AuNP-F(ab)<sub>2</sub>6E10:** Curva de absorbancia UV-Visible del conjugado AuNP-F(ab)<sub>2</sub>6E10. En el espectro se observa el máximo a los 530 nm aproximadamente, lo cual indicaría un cambio en la superficie de la partícula debido a la unión del péptido. B) Imagen del conjugado tomada mediante TEM a 20000X. El diámetro obtenido en promedio fue de 12.6 nm.

### 3.4. Interacción *in vitro* de los conjugados con A $\beta$ <sub>1-42</sub>.

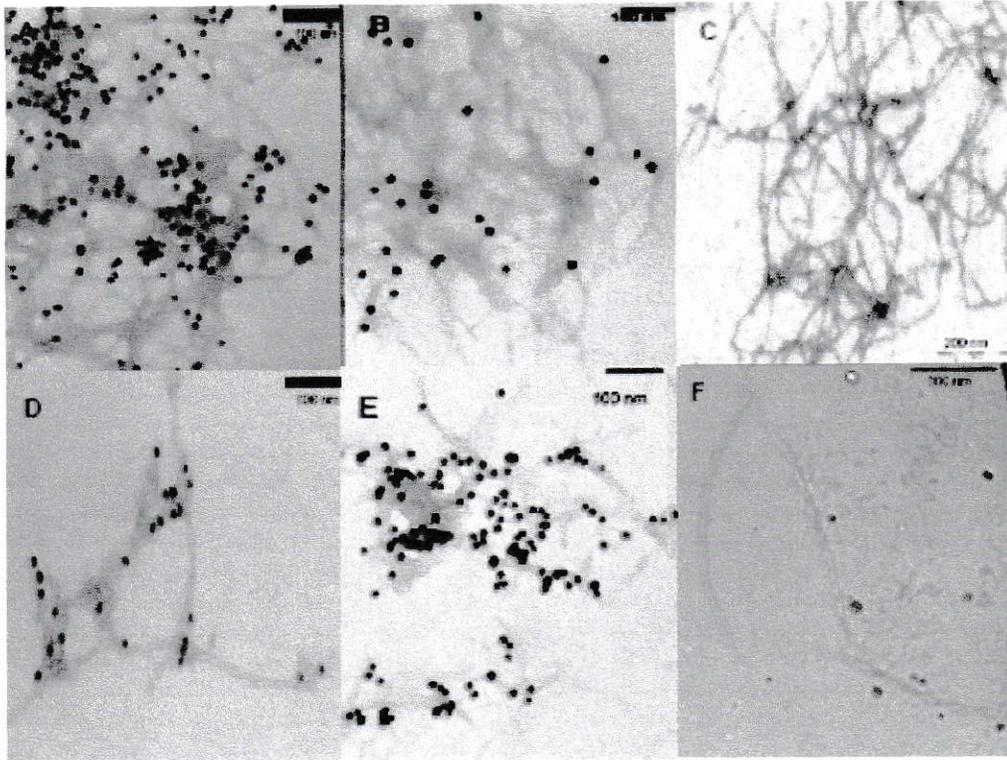
La evaluación de esta interacción requiere de la elaboración de fibras de A $\beta$  a partir de especies monoméricas solubles de este péptido, ya que de lo contrario, el ensayo es poco reproducible debido a que el A $\beta$  adquirido en el comercio tiende a formar especies oligoméricas de bajo peso molecular durante su almacenamiento, que no necesariamente terminan formando fibras amiloides. Así, A $\beta$  fue preparado de acuerdo a protocolos bien establecidos como el descrito por Zagorsky (Bitan y Temprow, 2005) en donde A $\beta$  es tratado con sustancias que no afectan su estructura primaria, tales como el ácido

trifluoracético y agentes desestructurantes como el hexafluorisopropanol, dando así lugar a la formación de la especie monomérica de A $\beta$ .

Previamente en estudios anteriores ya se ha demostrado que el marcaje del conjugado AuNP-INH con rodamina, no afecta su interacción con fibras de A $\beta$  *in vitro* (C. Lasagna, 2008) por lo que este fluoróforo no debiera influir en gran medida la interacción de los conjugados peptídicos con las fibras.

En la figura 12 obtenida mediante TEM se puede apreciar que solo cuatro de los cinco conjugados en estudio presentan afinidad por las fibras A $\beta$ <sub>1-42</sub>. Como era de esperar el conjugado AuNP-Inh-Rod, que presenta el péptido disruptor de A $\beta$  y el conjugado AuNP-CP-Rod, que posee el péptido de 20 aminoácido correspondiente a la región de interacción del péptido A $\beta$ , poseen una gran afinidad por las fibras de A $\beta$ <sub>1-42</sub> (Figura 12A y 12B, respectivamente). Por el contrario el conjugado AuNP-CN-Rod, que presenta el péptido CARTG, el cual no posee ninguna relación con el péptido A $\beta$ , no interacciona en lo más mínimo con las fibras de A $\beta$ <sub>1-42</sub> (figura 12C).

En relación al conjugado AuNP-tioflavina T, como era de esperarse presenta gran afinidad por las fibras de A $\beta$ <sub>1-42</sub> (figura 12D), al igual que el conjugado AuNP-F(ab)<sub>2</sub>E10 (Figura 12E). A modo de control se incubaron durante 48 horas fibras con AuNP descubiertas, para así de esta forma demostrar que la interacción no es debida a una interacción entre cargas opuestas entre las AuNP y las fibras. Como era de esperar de acuerdo a resultados previos, la interacción entre las AuNP y las fibras es nula (figura 12F).



**Figura 12. Interacción fibras A $\beta$ <sub>1-42</sub> – conjugados:** Los conjugados fueron incubados durante 48 horas con fibras A $\beta$  ya formadas. Cada imagen esta tomada con una magnificación de 20000X y dependiendo de la foto las fibras están interaccionando o no con: A) AuNP-Inh-Rod, B) AuNP-CP-Rod, C) AuNP-CN-Rod, D) AuNP-Tioflavina T, E) AuNP-F(ab)26E10, F) AuNP. Como se aprecia en la figura, solo los conjugados que poseen moléculas con afinidad por A $\beta$  interaccionan con las fibras, en cambio las AuNP y el conjugado AuNP-CN-Rod no, lo que indica que la interacción fibra-conjugado es una interacción específica.

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir en forma general que la interacción entre las fibras A $\beta$  y los conjugados AuNP-péptido, depende en la especificidad que presente el péptido por las fibras y no cualquier péptido posee la capacidad de interactuar con estas fibras. En cuanto a los resultados obtenidos con el conjugado AuNP-tioflavina T, estos resultan muy interesantes ya que este conjugado diseñado exclusivamente en nuestro laboratorio se convierte en una herramienta muy importante para extrapolar esta terapia a otras enfermedades involucradas en la agregación de proteínas. En relación al conjugado

AuNP-F(ab)<sub>2</sub>6E10, los resultados obtenidos son muy auspiciosos, ya que éste debiera ser el conjugado que presente una mayor especificidad por las placas amiloides de A $\beta$  en futuros experimentos *in vivo*.

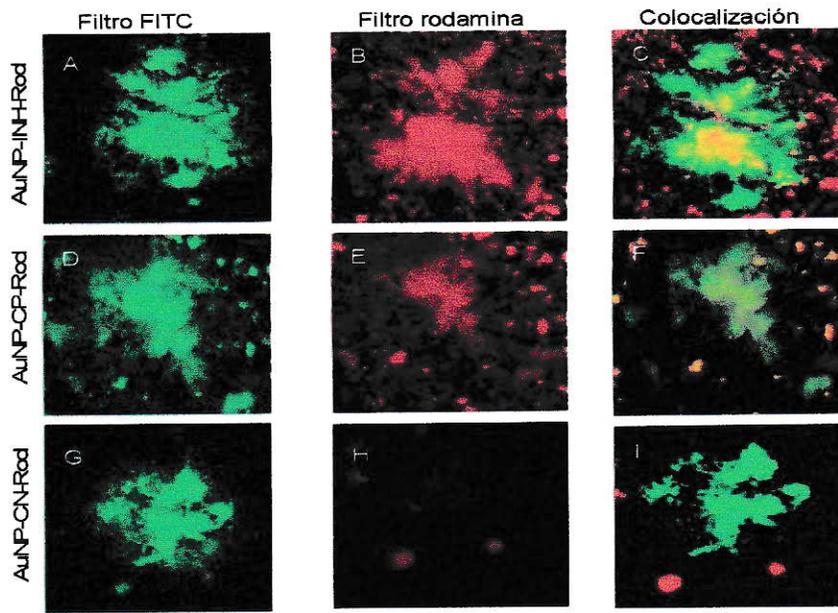
### **3.5. Interacción *ex vivo* de los conjugados con agregados de A $\beta$ .**

Un paso previo a los experimentos *in vivo*, fue determinar si los conjugados son capaces de interactuar en forma específica con placas amiloides formadas de forma natural. Para comprobar esto se incubaron los conjugados en secciones de cerebro de ratón doble transgénico APP/PS1 (Price y col, 1998). Este es un modelo de ratón muy utilizado en el estudio de la enfermedad de Alzheimer. Este modelo posee los genes humanos de APP el cual posee una mutación identificada en un tipo de Alzheimer familiar (EAF) originado en Suecia y PS1 que codifica para la enzima  $\gamma$  secretasa que corta APP. Es importante mencionar que este experimento se denominó *ex vivo* a modo de diferenciarlo con los análisis de interacción entre los conjugados y las fibras de A $\beta$  en el punto 3.4.

En la figura 13, se puede apreciar que los resultados *ex vivo* confirman los resultados *in vitro* obtenidos en el punto 3.4 en relación a los conjugados péptidicos. Como se menciona en los métodos este experimento busca determinar si los conjugados se unen a las placas amiloides mediante la colocalización de fluorescencia roja dada por la rodamina del conjugado y fluorescencia verde producida por una inmunohistoquímica estándar en que se utilizó el anticuerpo primario 6E10 que reconoce el epítipo 6-10 del péptido A $\beta$  y un anticuerpo secundario anti-ratón IgG que está unido al fluoróforo alexa488 que emite fluorescencia verde. De esta forma en el caso de los tres conjugados péptidicos, primero se identificaron las placas amiloides en el microscopio utilizando un filtro FITC que ve

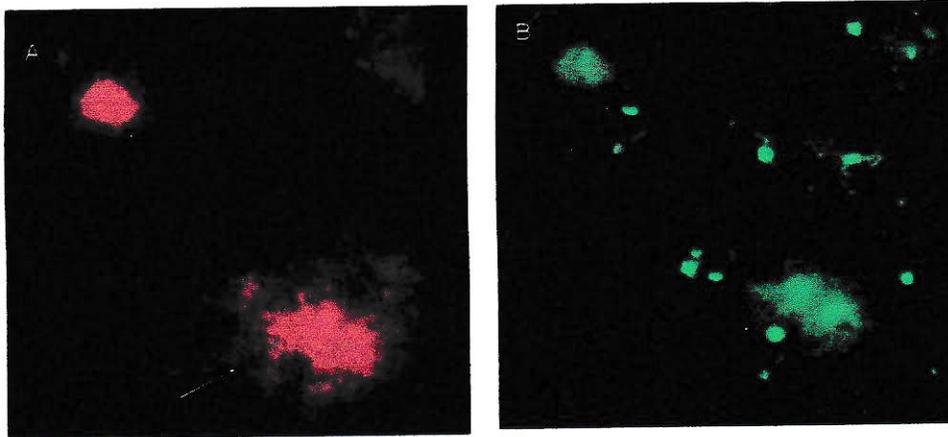
fluorescencia verde y posteriormente se uso un filtro de rodamina que ve fluorescencia en el rojo.

En el caso específico del conjugado AuNP-INH-Rod, la fluorescencia verde, dada por el anticuerpo anti-ratón IgGalexa488 que reconoce a 6E10 (figura 13A), colocaliza perfectamente con la fluorescencia roja detectada (Figura 13C), lo que indicaría que la fluorescencia roja dada por la rodamina del conjugado se encuentra específicamente en las placas amiloides (Figura 13B). En cuanto a los resultados obtenidos en relación al conjugado AuNP-CP-Rod, estos son muy similares al caso anterior, es decir, la fluorescencia verde, dada por el anticuerpo anti-ratón IgGalexa488 que reconoce a 6E10 (figura 13D), también colocaliza perfectamente con la fluorescencia roja detectada (Figura 13F), lo que indicaría que la fluorescencia roja dada por la rodamina del conjugado se encuentra específicamente en las placas amiloides (Figura 13E). Por el contrario en el caso del conjugado AuNP-CN-Rod, la fluorescencia verde, dada por el anticuerpo anti-ratón IgGalexa488 que reconoce a 6E10 (figura 13G), no colocaliza con ningún tipo de señal roja (Figura 13I), es mas, en este caso no fue posible detectar fluorescencia en el rojo de forma considerable (Figura 13H).



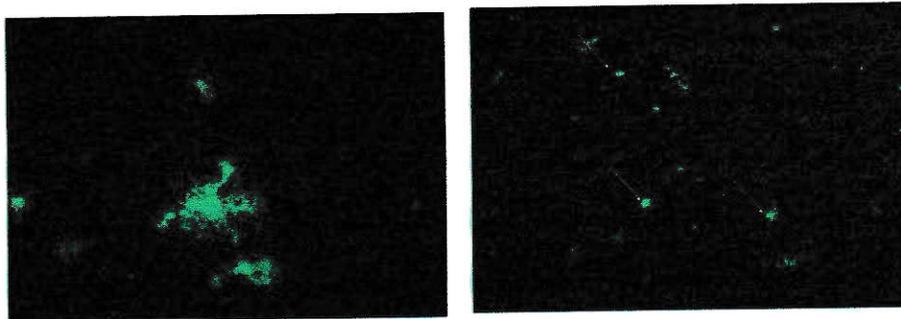
**Figura 13. Interacción ex vivo de los conjugados con las placas amiloides en secciones de cerebro de ratón doble transgenico APP/PS1:** A) Placa amiloide identificada mediante anticuerpo 6E10. B) Fluorescencia roja producida por la interacción del conjugado AuNP-Inh-rod con la placa amiloide. C) Colocalización entre A y B. D) Placa amiloide identificada por IHQ. E) Fluorescencia roja producida por la interacción del conjugado AuNP-CP-Rod con la placa amiloide. F) Colocalización entre D yE. G) Placa amiloide identificada por IHQ. H) No es posible detectar fluorescencia roja en la placa amiloide. I) Colocalización entre G y H. Esta figura demuestra la importancia del péptido en la interacción del conjugado con las placas amiloides. Todas las imágenes tienen una magnificación de 40X.

En cuanto al conjugado AuNP-tioflavina T, para determinar si éste se unía específicamente a las placas amiloides, luego de su incubación en el tejido, se realizó una IHQ utilizando nuevamente el anticuerpo 6E10, pero en este caso se usó un anticuerpo secundario anti-ratón IgG marcado con alexa 568, el cual es un fluoróforo que emite en el rojo. Por lo tanto primero se ubicó la placa amiloide utilizando el filtro de rodamina para ver en rojo y luego mediante el filtro FITC se determinó si el conjugado se unía o no específicamente a las placas. Como se puede ver en la figura 14 la fluorescencia verde dada por el conjugado, colocaliza perfectamente con la fluorescencia roja dada por el anticuerpo.



**Figura 14. Interacción *ex vivo* del conjugado AuNP-Tio con las placas amiloides en sección de cerebro de ratón doble transgenico APP/PS1:** A) Placas amiloides detectadas mediante IHQ utilizando el anticuerpo 6E10. B) Fluorescencia dada por la interacción del conjugado AuNP-tioflavina t con las placas amiloides. Las flechas indican la presencia de placas. Magnificación 40X.

Finalmente en el caso del conjugado AuNP-F(ab)<sub>2</sub>6E10, para determinar su capacidad de interacción con placas amiloides *ex vivo*, solamente se incubo el tejido con el conjugado y posteriormente el tejido se expuso al anticuerpo secundario anti-ratón IgG alexa488, el cual reconoce la región Fab del anticuerpo primario. Por lo tanto este anticuerpo secundario reconoce a la región F(ab)<sub>2</sub>6E10 que esta conjugada a la nanoparticula. En la figura 15 se puede ver como el conjugado interacciona de forma especifica a las placas amiloides. La fluoescencia verde es producida por el anticuerpo secundario que reconoce a la fragmento F(ab)<sub>2</sub> unido a la nanoparticula.



**Figura 15. Interacción ex vivo del conjugado AuNP-F(ab)<sub>2</sub>6E10 con las placas amiloides en secciones de cerebro de ratón doble transgenico APP/PS1:** A) Luego de incubar las secciones con el conjugado, estas fueron tratadas con el anticuerpo secundario anti ratón alexa 488 que produce fluorescencia verde, lo cual demuestra la interacción específica entre el conjugado y las placas amiloides. B) Magnificación 10X en que se demuestra la gran especificidad de este conjugado por las placas amiloides.

A partir de estos resultados se puede concluir, al igual que el punto 3.4, que la interacción de los conjugados peptídicos con las placas amiloides está estrechamente relacionado con la naturaleza del péptido y su capacidad de interactuar con el péptido A $\beta$ . Y que el conjugado AuNP-Tioflavina T se ha convertido en una herramienta fundamental para el tratamiento de diversas enfermedades relacionadas con la agregación de proteínas. En relación al conjugado AuNP-F(ab)<sub>2</sub>6E10, como era de esperar presenta una gran afinidad por las placas amiloides, siendo casi nula la unión inespecífica con otras estructuras del tejido lo cual es muy importante para futuras aplicaciones *in vivo*.

### **3.6. Determinación de la toxicidad y biodistribución de las nanopartículas de oro en ratones silvestre C57/BL6.**

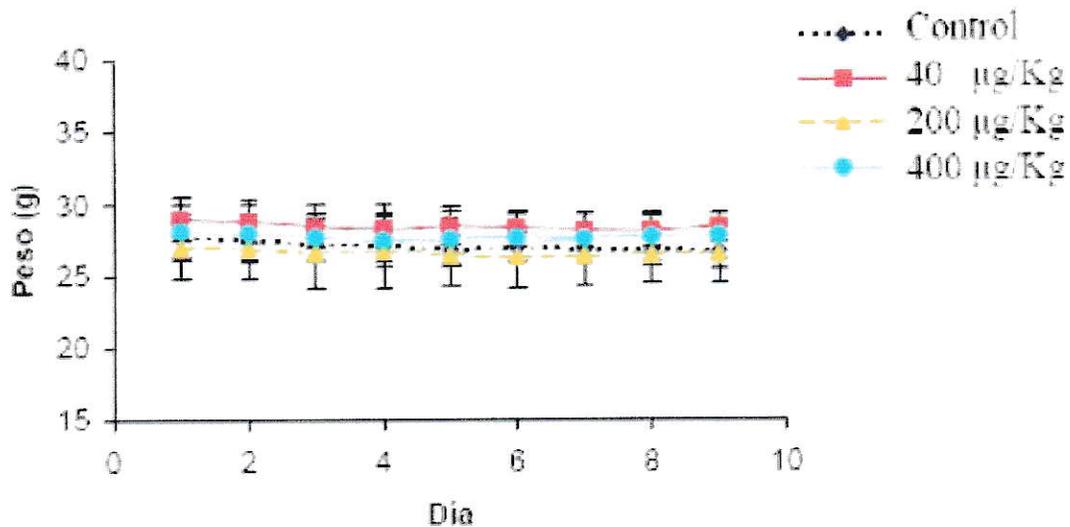
Como ya se ha demostrado *in vitro* y *ex vivo*, el potencial uso que presentan los diversos conjugados para desarrollar un tratamiento contra la Enfermedad de Alzheimer, es necesario comenzar los estudios *in vivo*. Sorprendentemente en la literatura no hay estudios relacionados con la toxicidad y biodistribución de este tipo de nanomateriales, solamente existe información sobre citotoxicidad (Lewinski N y col, 2008). Obviamente esto no es suficiente ya que se ha demostrado la falta de correlación entre los efectos *in vivo* e *in vitro* de diversos nanomateriales. (Sayes CM, y col, 2007). Los sistemas *in vivo* son extremadamente complicados y la interacción de las nanopartículas con componentes biológicos, como proteínas y células, pueden producir rangos de biodistribución, eliminación, respuesta inmune y metabolismos exclusivos. Uno no puede predecir el movimiento y localización de las nanopartículas luego de la exposición *in vivo* de éstas. Por lo tanto resultan urgentes estudiar la toxicidad, biodistribución y bioacumulación de estas nanopartículas *in vivo* previo a cualquier otro experimento.

Como ya se menciona en el apartado Métodos 2.7.1., tres grupos de ratones fueron inyectados diariamente durante 8 días con distintas dosis de nanopartículas de oro (40 µg/Kg, 200 µg/Kg y 400 µg/Kg).

#### **3.6.1. Examinación morfológica.**

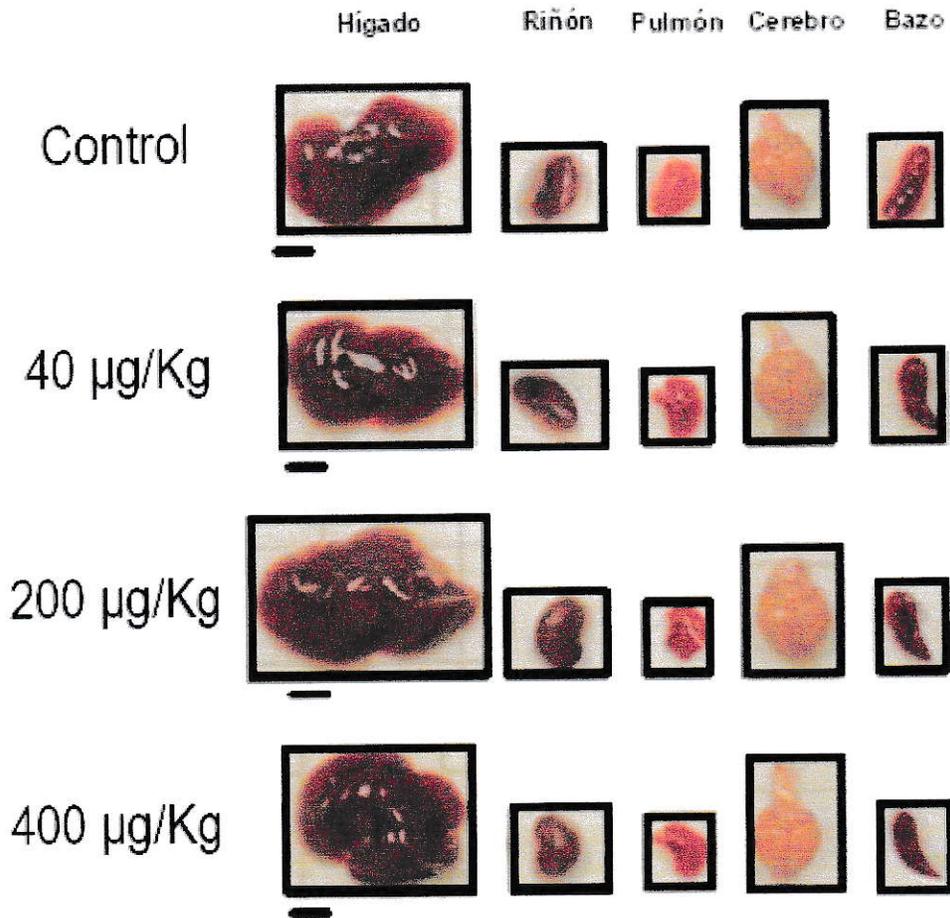
Durante el periodo de estudio, el tratamiento con diferentes concentraciones de nanopartículas de oro no causó ningún efecto adverso en el crecimiento de los animales,

esto se puede observar en la figura 16 donde no se aprecian diferencias significativas en el peso de los animales de cada grupo experimental en relación al control. Más aun, no se observaron signos clínicos anormales o cambios groseros en el comportamiento de los animales durante el estudio.



**Figura 16. Determinación del peso de los ratones durante el tratamiento:** El peso de los ratones no cambia durante el tratamiento. El peso de cada ratón fue medido diariamente. Cada punto representa el peso promedio  $\pm$  DS. No se observaron cambios significativos.

Los órganos extraídos luego del tratamiento no mostraron normalidades morfológicas. En ninguno de los grupos experimentales fue posible observar atrofia severa o cambios en el color del cerebro, bazo, hígado, pulmón y riñón en comparación al grupo control (figura 17).



**Figura 17. Determinación de cambios morfológicos de los órganos:** A cada uno de los ratones se les extrajo el hígado, riñón, bazo, cerebro y pulmón. Estos órganos fueron analizados a simple vista para determinar la existencia de daños a nivel morfológico. El tratamiento con distintas dosis de nanopartículas, no genera cambios en la morfología de ninguno de los órganos analizados. La barra equivale a 50 mm.

Para determinar de forma más específicas si es que algunos de los tratamientos produjeron algún cambio, se determino el coeficiente de cada órgano con respecto al peso del animal. El coeficiente del cerebro, hígado, bazo, pulmón y riñón fue expresado en miligramos de

tejido dividido en gramos de peso total. No se observaron diferencias significativas en ninguno de los coeficientes en comparación a los controles (Tabla 2). Estas observaciones indican que las nanopartículas no produjeron inflamación en los animales.

Tabla 2.  
Coeficiente del hígado, bazo, riñón, pulmón y cerebro luego del tratamiento con nanopartículas.

Grupos	Peso del cuerpo (g) luego del tratamiento	Hígado (mg/g)	Bazo (mg/g)	Riñón (mg/g)	Pulmón (mg/g)	Cerebro (mg/g)
Control	26.7 ± 1.1	53.3 ± 3.7	2.6 ± 0.2	7.9 ± 0.6	1.7 ± 0.2	16.9 ± 0.7
40 µg/Kg	28.3 ± 1.0	54.8 ± 3.8	2.4 ± 0.3	7.4 ± 0.4	1.7 ± 0.3	16.9 ± 0.8
200 µg/Kg	26.4 ± 1.9	54.1 ± 6.9	2.6 ± 0.7	7.8 ± 0.8	1.7 ± 0.3	17.2 ± 0.7
400 µg/Kg	27.7 ± 1.6	56.4 ± 3.9	2.9 ± 0.3	7.5 ± 0.6	1.8 ± 0.5	16.7 ± 0.8

Nota: En esta tabla se puede observar que no hay ningún cambio en el peso de los órganos de cada animal con respecto al peso total de éste.

### 3.6.2. Ensayos bioquímicos en la sangre.

De acuerdo a los análisis bioquímicos del suero, los niveles de ácido úrico (URIC), urea nitrogenada (UREA) y de creatinina (CREA) no presentan diferencias significativas entre el grupo control y los grupos experimentales (tabla 3). Este resultado demuestra que las nanopartículas de oro no producen toxicidad a nivel renal. Los niveles de bilirrubina total (TBIL) y de fosfatasa alcalina (ALKP) son constante en todos los grupos (tabla 3), lo que refleja que las funciones hepáticas no han sido alteradas.

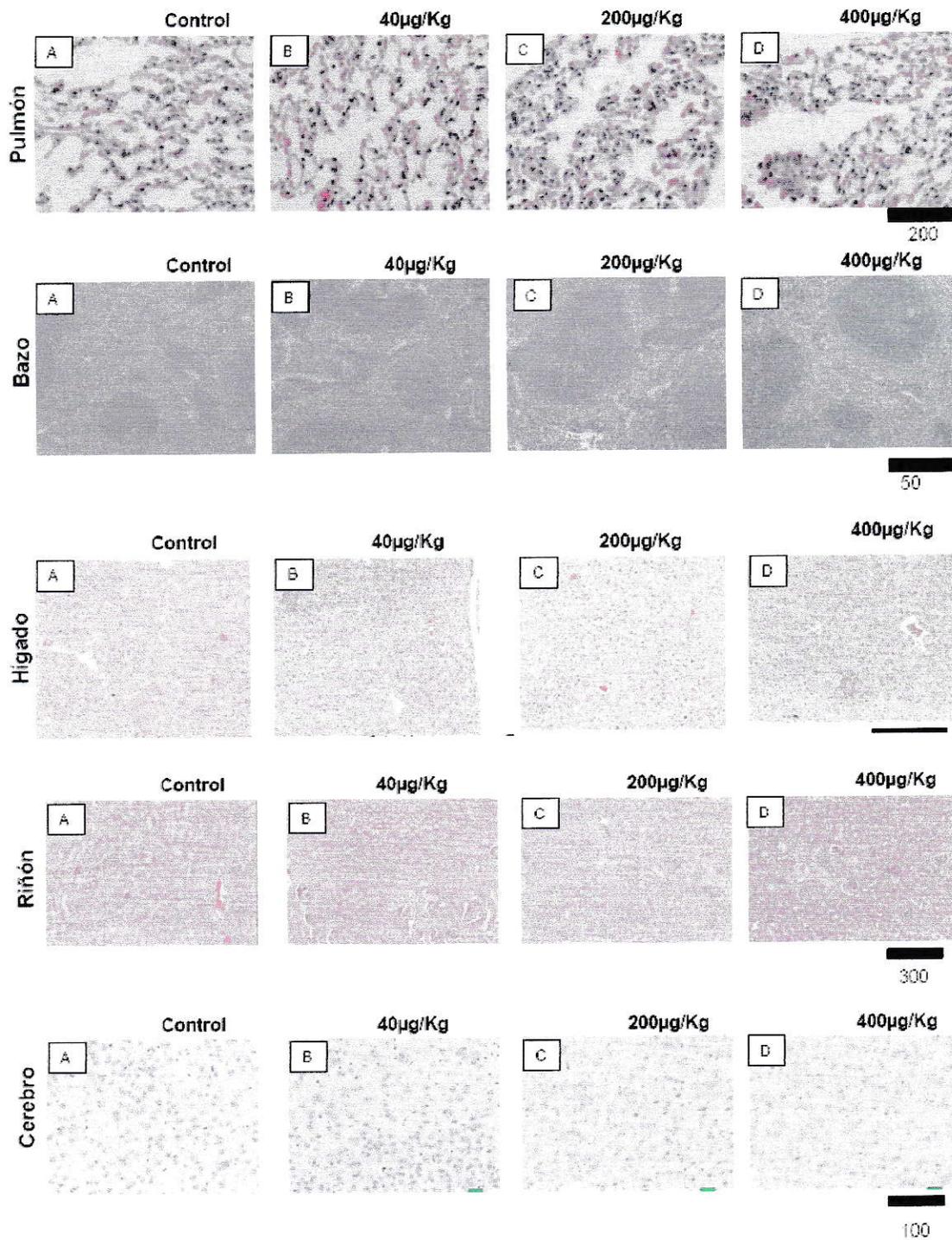
Tabla 3  
Parámetros bioquímicos en suero de ratones luego del tratamiento.

Grupos	URIC mg/dL	CREA mg/dL	UREA mg/dL	TBIL mg/dL	ALKP U/L
Control	3.45 ± 0.8	0.24 ± 0.08	26.25 ± 2.06	1.25 ± 0.53	89.25 ± 9.8
40 µg/Kg	3.93 ± 0.68	0.27 ± 0.02	24.0 ± 2.44	0.90 ± 0.28	86.60 ± 10.9
200 µg/Kg	4.02 ± 1.15	0.26 ± 0.06	24.0 ± 3.65	0.75 ± 0.31	91.0 ± 16.46
400 µg/Kg	4.17 ± 0.86	0.24 ± 0.05	26.2 ± 2.58	0.52 ± 0.26	76.66 ± 3.78

Nota: Como se observa en la presente tabla, no existen diferencias significativas en el nivel de ninguna de las proteínas medidas, lo que indica que no existe toxicidad a nivel renal y hepático.

### **3.6.3. Examinación histopatológica.**

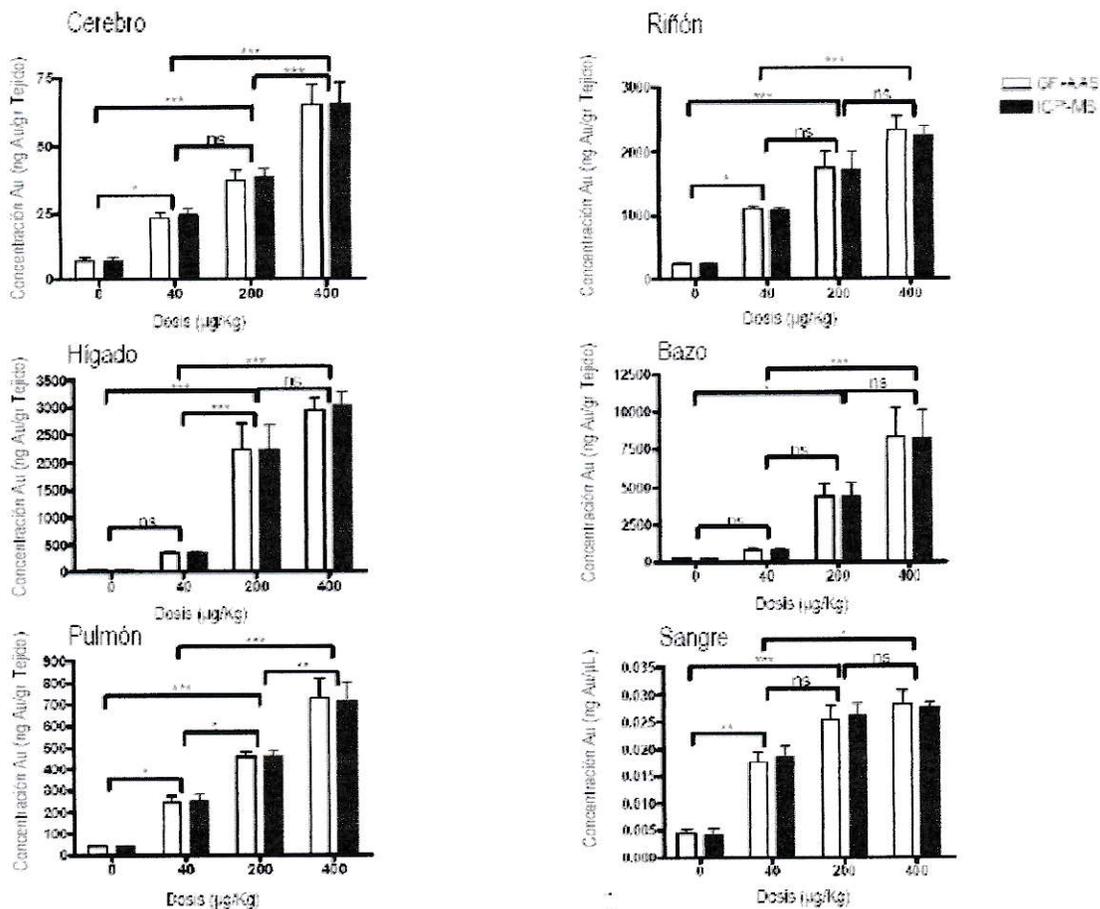
En todos los animales expuestos a las nanopartículas de oro, no hay evidencias de daño de tejido agudo en ninguna de las secciones obtenidas desde el riñón, hígado, bazo, cerebro o pulmón (Figura 18). En la examinación histológica de las secciones de riñón no se observó en ninguno de los grupos daños en el glomérulo renal, como por ejemplo glomerulonefritis. El tubulo próximo renal mantiene la integridad de su estructura en todos los grupos, lo que descarta una necrosis aguda tubular. En las secciones de hígado tanto del grupo control como los grupos experimentales no se aprecia cambios patológicos agudos que comúnmente ocurren en el hígado cuando éste está expuesto a sustancias tóxicas, como por ejemplo la acumulación de ácidos grasos intracelulares. En cuanto a las secciones de bazo, no se observó bazo megalia o congestión aguda de la pulpa roja, las cuales son características principales en la inflamación del bazo. Las secciones de cerebro obtenidas de los cuatro grupos en estudio, claramente no mostraron signos de necrosis licuefactiva, la cual es la característica principal en cerebros con desórdenes toxicológicos. Las secciones de pulmón de ningún grupo presentaron evidencias de alguna reacción aguda pulmonar como la presencia de infiltrados intersticiales o fibrosis.



**Figura 18. Determinación de toxicidad a nivel histopatológico:** No se observó daño a nivel histológico en ninguno de los órganos de grupos experimentales. Tanto en el pulmón como en el bazo, hígado, riñón y cerebro no se observó inflamación o sobre activación de macrófagos.

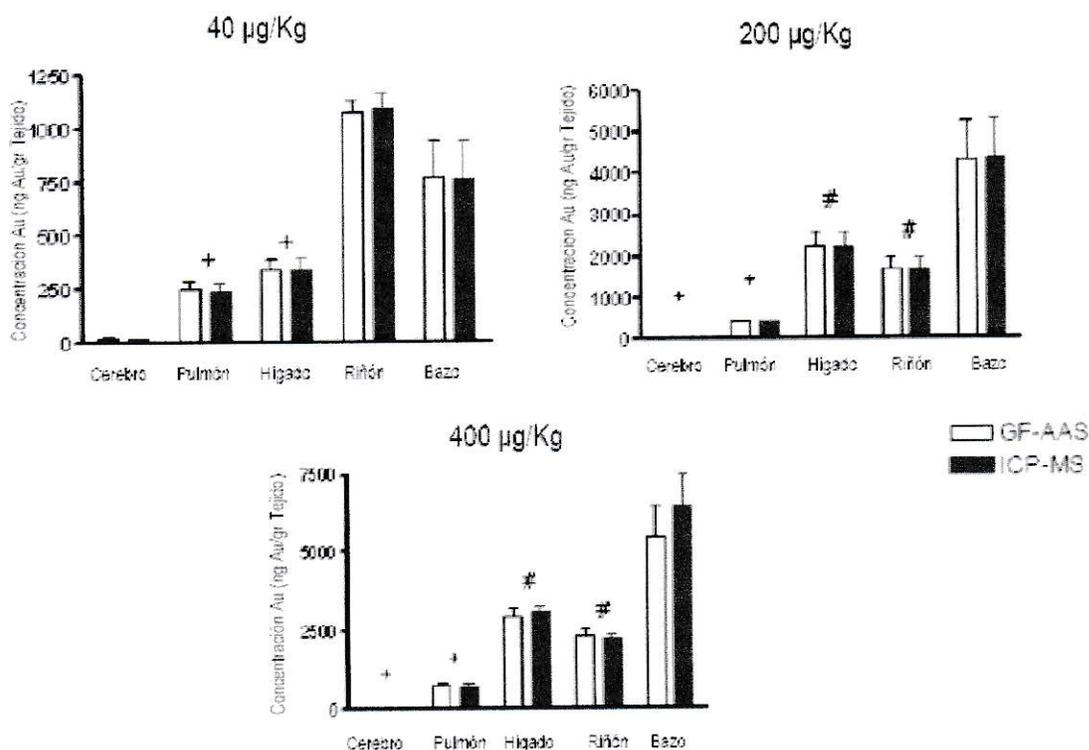
#### **3.6.4 Cuantificación de oro.**

Como se menciona en el punto 2.7.5 para determinar la biodistribución y acumulación de oro en diversos órganos, se utilizaron dos técnicas como Espectrometría de absorción atómica con horno de grafito (GF-AAS) y espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS). Ambas técnicas ya han sido utilizadas para la cuantificación de oro en otros estudios (Hillyer y col, 2001). Como se puede observar en la figura 19, en que se muestran las mediciones realizadas mediante ICP-MS y GF-AAS, en todos los órganos se ve un aumento significativo de oro de las tres dosis administradas en comparación al control. En el caso específico del cerebro, se puede observar que hay una diferencia significativa de oro entre los grupos 40  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ , 200  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  y 400  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ . En el caso del riñón solo se observa una diferencia significativa entre los grupos 40  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  y 400  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ , es decir, no existen diferencias entre los grupos 40  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  y 200  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ , y los grupos 200  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  y 400  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ . En cuanto al hígado hay diferencias significativas en relación a la concentración de oro, entre los grupos 40  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  y 200  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  y entre los grupos 40  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  y 400  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ , pero no hay diferencia entre los grupos 200  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  y 400  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ . Las mediciones obtenidas en el bazo demuestran que existe una diferencia significativa entre los grupos 40  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  y 200  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ . Esta diferencia se acentúa entre el grupo 40  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  y 400  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ . En cuanto al pulmón, en este órgano al igual que en el cerebro se puede observar diferencias significativas en la cantidad de oro entre todos los grupos.



**Figura 19. Determinación de la bioacumulación de oro en distintos órganos:** Mediante ICP-MSGF-AAS, se puede observar que en todos los órganos y en la sangre existen diferencias significativas entre las tres dosis y el control. También en todos los casos existe una diferencia significativa entre los grupos 40 µg/Kg y 400 µg/Kg. Pero solo en el caso del cerebro, bazo, hígado y pulmón se pudo observar diferencias significativas entre el grupo 40 µg/Kg y 200 µg/Kg. Finalmente solo en el caso del cerebro y pulmón se observó una diferencia significativa entre el grupo 200 µg/Kg y 400 µg/Kg. Los datos fue analizados por ANOVA con test de Bonferroni's. ns: no diferencias significativas. \*: (p<0.05). \*\*: (p<0.01) y \*\*\*: (p<0.001)

Al observar la figura 20, se puede apreciar que en el grupo que se inyectó las dosis más bajas de nanopartículas, el oro tiende a concentrarse a nivel del riñón y en menor medida en el hígado y bazo. Pero en el caso del grupo inyectado con 200  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de oro, éste se concentra principalmente en el bazo e hígado siendo menor su cantidad en el riñón y casi inexistente en el pulmón y cerebro. Esta diferencia se acrecienta en el último grupo donde la concentración de oro en el bazo es más que el doble que en el hígado y triplica al riñón.



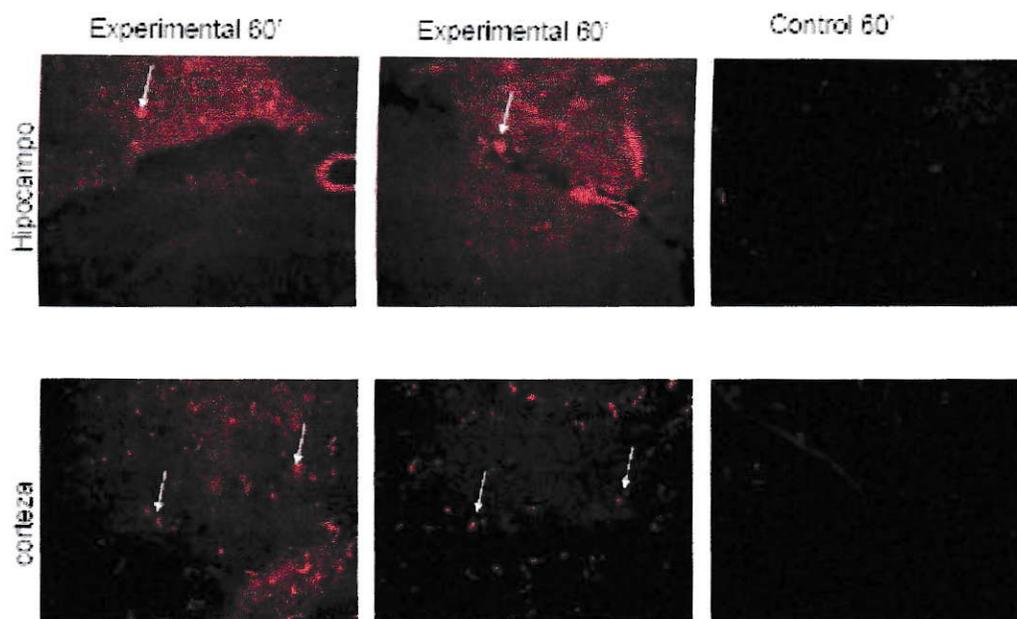
**Figura 20. Determinación de la bioacumulación de oro en relación a la dosis inyectada:** En la figura se puede apreciar como a el oro se concentra principalmente en el riñón en la dosis más baja (40  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ). Pero a medida que la dosis aumenta el oro tiende a concentrarse en el hígado y bazo. Esto se debe posiblemente a que el riñón tiene a saturarse más rápidamente por lo que a concentraciones mayores, las AuNP son captadas por el hígado y bazo que son partes del Sistema retículo endotelial.

En forma general se puede concluir que las nanopartículas llegan a todos los órganos, preferentemente en el riñón a dosis bajas y a medida que están suben, las nanopartículas se

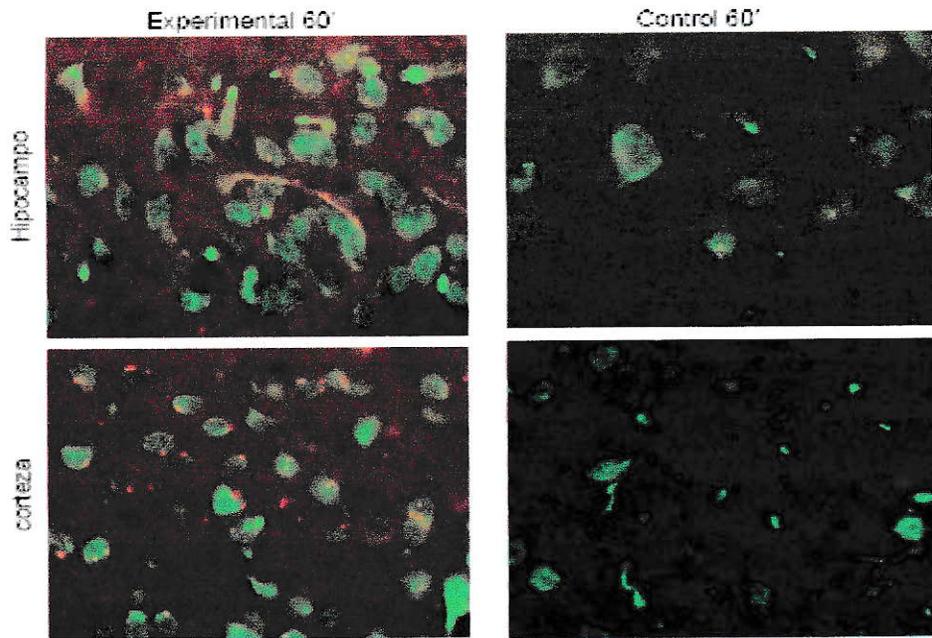
acumulan mayormente en el hígado y bazo. También es posible determinar que en relación al hígado, riñón y bazo, se llegó a un plato de concentración de nanopartículas, es decir, no existe una diferencia significativa entre las dosis 200  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  y 400  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ . En cambio en el caso del cerebro y pulmón no se llegó a este plato por lo que sería posible para estos órganos acumular dosis mayores de nanopartículas. Por último es posible ver en el caso de la sangre que la cantidad de oro en los distintos grupos no presenta gran variación lo que demostraría que el oro tiende a acumularse en los órganos y no se mantiene en el torrente sanguíneo.

### **3.7. Determinación del paso a través de la BHE del conjugado AuNP-INH-Rod.**

Como ya se mencionó este estudio busca determinar el paso del conjugado AuNP-INH-Rod a través de la BHE mediante técnicas cualitativas y cuantitativas. En el caso de los análisis cualitativos, estos se realizaron en base a la presencia de fluorescencia roja dada por la rodamina del conjugado. Como se puede apreciar en la figura 21, tanto en el hipocampo como en la corteza hay presencia de fluorescencia roja en los grupos experimentales, a diferencia del grupo control en que la fluorescencia es nula. Para determinar de mejor forma si esta fluorescencia se encuentra en el parénquima y no en los vasos sanguíneos que irrigan el cerebro, se realizó una IHQ utilizando el anticuerpo NeuN, específico para proteína nuclear de neuronas. De ese modo se determinó que el conjugado atravesó la BHE, ya que se puede apreciar fluorescencia roja posiblemente dada por el conjugado alrededor de las neuronas e incluso en algunos casos al interior de las neuronas (Figura 22).

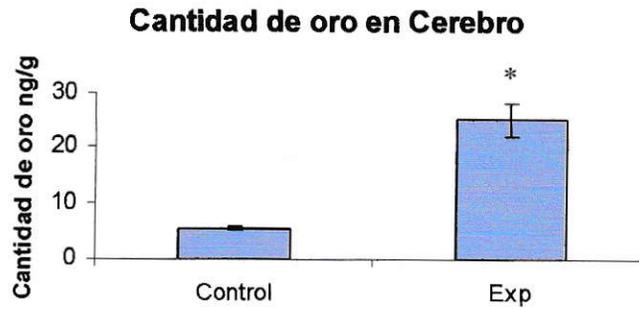


**Figura 21. Determinación del cruce del conjugado AuNP-Inh-Rod a través de la BHE:** Sesenta minutos luego de inyectar el conjugado AuNP-inh-Rod, los animales fueron sacrificados. Las secciones de cerebro fueron analizadas directamente por microscopia de fluorescencia. Las flechas blancas indican la presencia de fluorescencia roja, la cual posiblemente es producida por la rodamina del conjugado.



**Figura 22. Colocalización del conjugado AuNP-Inh-Rod con marcador de neurona:** Para determinar si el conjugado cruza la BHE, se marcaron las neuronas con el anticuerpo NeuN. En la figura se puede observar la colocalización entre neuronas (verde) y el conjugado (rojo), tanto en hipocampo como en corteza, lo que demuestra que el conjugado cruza la BHE (40X).

En cuanto a los estudios cuantitativos, la cantidad de oro en cada hemisferio se midió mediante ICP-MS. Como se puede ver en la figura 23, la cantidad de oro cuantificada en los cerebros de ratones inyectados con el conjugado presenta una concentración de oro igual a  $25.18 \pm 3$  ng/g la cual es significativamente mayor en relación a los controles ( $5.3 \pm 0.4$ ).



**Figura 23. Determinación de la cantidad de oro en cerebro:** Como se observa en la figura la cantidad de nanogramos de oro por gramos de tejido es 5 veces mayor en los ratones inyectados con el conjugado en relación al grupo control. El grupo experimental presenta diferencias significativas en comparación al grupo control.t-student test. ( $p < 0.05$ ).

En forma general se puede concluir que el conjugado AuNP-INH-Rod es capaz de cruzar la BHE. Lo cual lo convierte en una herramienta de gran potencial para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

#### **4. DISCUSION.**

El análisis de los resultados muestra que los 4 de los cinco conjugados en estudio tienen la capacidad de unirse a las fibras A $\beta$ , a través de una interacción específica. En el caso de los conjugados peptídicos, quedó demostrado que la habilidad del conjugado para unirse a las fibras amiloides depende exclusivamente de la secuencia del péptido y de la capacidad natural de éste para interactuar con la proteína A $\beta$ . Específicamente la interacción tanto del péptido inhibidor como del fragmento de A $\beta$  que denominamos control positivo con las fibras amiloides se produce principalmente en la región hidrofóbica del dominio N-terminal de la proteína A $\beta$  (aminoácidos 17-21: LVFFA), la cual es clave en la formación de la estructura  $\beta$  de la proteína. De acuerdo a los antecedentes obtenidos de la literatura la interacción péptido inhibidor-fibras es del tipo hidrofóbica, lo cual fue demostrado reemplazando los residuos hidrofóbicos por hidrofílicos en la región interna del A $\beta$  dificultando la formación de fibras (Hilbich y col, 1992).

Respaldando lo anteriormente mencionado, estudios de modelamiento molecular de la interacción entre la estructura tri-dimensional del A $\beta$ <sub>1-40</sub> y el péptido inhibidor (sin la cisteína), sugieren que este péptido interacciona de forma antiparalela con un bolsillo hidrofóbico en el dominio central del A $\beta$ . De modo similar debiera ser la interacción entre el péptido de 20 aminoácidos denominado control positivo. En el caso del péptido CARTG que utilizamos a modo de control negativo, no interacciona con las fibras amiloides ratificando que esta interacción es específica dependiente de la secuencia.

En cuanto al conjugado AuNP-Tioflavina T, este mostró una extraordinaria habilidad de interacción con las fibras de A $\beta$ , tanto *in vitro* como *ex vivo* lo cual es muy prometedor para futuros estudios *in vivo*. La gran ventaja de este conjugado es que puede ser utilizado para

el tratamiento de diversas enfermedades caracterizadas por la agregación de proteínas, ya que la tioflavina T presenta la capacidad de unirse a agregados proteicos independiente de la secuencia peptídica de estos. Como ya se menciono el conjugado AuNP-Tioflavina fue diseñado y sintetizado exclusivamente en nuestro laboratorio, por lo que es una herramienta nueva, como mucho potencial, pero es necesario hacer diversos estudios de caracterización previo al inicio de estudios *in vivo*. Pero sin lugar a duda este conjugado nos dará un gran abanico de posibilidad para seguir desarrollando este proyecto a un nivel mayor.

Otro gran logro de este proyecto fue la obtención del conjugado AuNP-F(ab)<sub>2</sub> del anticuerpo 6E10 que reconoce al epitope 6-10 de la proteína precursora del amiloide APP, por lo tanto reconoce al péptido A $\beta$ . El procedimiento de conjugar anticuerpos a nanoparticulas de oro, esta bien establecido principalmente en el are del cáncer, donde diversos grupos han realizado esta técnica para el tratamiento de esta enfermedad. Sin embargo no existen antecedentes en la literatura, donde se mencione este tipo de técnicas con un fin terapéutico en el área de la neurociencia. Al ver los resultados *ex vivo*, se puede determinar que este es el conjugado que presenta mayor afinidad específica por las placas amiloides, siendo casi nula la unión inespecífica en el tejido. Estos resultados convertirían a este conjugado en el primer candidato para estudios *in vivo*. Sin embargo hay que tomar en cuenta que el tipo de enlace entre el anticuerpo con la superficie de la nanopartícula no es tan estable en comparación al enlace entre el la cisteína de los péptidos y la nanopartícula, el cual es un enlace de tipo covalente entre el S de la cisteína y la superficie de la nanopartículas, siendo muy difícil de romper, lo cual nos asegura que este tipo de conjugados llegaría al sitio de acción sin sufrir modificaciones. Siendo esta una característica muy importante a tomar en cuenta al momento o de iniciar los estudios *in vivo*.

Como se a mencionado reiteradas veces a lo largo de este proyecto, previo a cualquier estudio in vivo, fue necesario determinar la toxicidad de las nanoparticulas de oro. Sorpresivamente a pesar de que las nanoparticulas están siendo utilizadas en varios ámbitos de la ciencia, no se ha realizado ningún estudio de toxicidad in vivo. Solo se han hecho estudios de citotoxicidad (Lewinski N, y col, 2008) en los cuales se determino que este tipos de nanomateriales no producen toxicidad. Otro punto que se debe resaltar es que este es el primer estudio en que se evalúa toxicidad de algún nanomaterial luego de múltiples dosis, lo cual es muy importante ya que en futuro uso terapéutico, se requeriría dar múltiples dosis del conjugado.

Al analizar los resultados, estos resultan ser muy positivos, ya que en ninguna de las tres dosis se observo toxicidad en el suero o en los tejidos a nivel micro o macroscópico. Estos es muy alentador ya que como se puede observar en los estudios de biodistribución, los cuales se discutirán mas adelante, la cantidad de oro en el hígado bazo es relativamente alta, por lo que no sería sorpresivo ver algún tipo de toxicidad en estos órganos en la dosis mas alta, pero incluso en estos casos no se observo ningún daño. Otro punto a recalcar es la inexistencia de toxicidad a nivel renal, ya que el diámetro de estas nanoparticulas es mucho mayor al de los glomerulos (5.5 nm), lo cual indicaría que estas nanoparticulas no bloquean el riñón a nivel del glomérulo y pueden circular sin ningún problema. Pero sin lugar a duda un resultado muy positivo para este proyecto en la inexistencia de toxicidad a nivel del cerebro ya que éste es el órgano blanco para una futura terapia contra la enfermedad de Alzheimer. Por último en relación a este estudio, vale la pena mencionar que se trabajo con la mayor dosis posible a administrar (400 µg/Kg). ya que a

concentraciones mayores, las nanopartículas tienden a agregarse perdiendo su naturaleza de coloide.

En cuanto a los experimentos de biodistribución realizados en el presente proyecto, se observó acumulación de nanopartículas a distintas dosis en todos los órganos en comparación al grupo control, el cual de todos modos presenta un pequeño nivel de oro en todos los órganos analizados. Esto no es sorprendente ya que a sido ha sido descrito la presencia de oro en diversos tejidos de mamíferos incluyendo a humanos (Mertz W, 1986).

En el caso de la dosis mas baja, se observo una mayor acumulación en el riñón en comparación al resto de los órganos, esto posiblemente se debe a que en el caso de estas nanopartículas tienden a irse a los riñones pero al ser de un tamaño mayor al diámetro de los glomérulos, no pueden ser eliminadas por esta vía, por lo que el oro tiende a acumularse principalmente en los órganos pertenecientes al sistema retículoendotelial como son el hígado y el bazo, lo cual era esperable según los antecedentes descritos en la literatura (Illum y col, 1987; Gref y col, 1995; Panagi y col, 2001). Es importante mencionar que el sistema retículoendotelial, es parte del sistema inmune, y consiste en células fagocíticas localizadas en tejido conectivo reticular. Estas células se acumulan en nodos linfáticos y el bazo. Las células de Kupffer del hígado también forman parte de este sistema. Esta acumulación de las nanopartículas en los órganos pertenecientes al sistema retículoendotelial, esta relacionado de cierta forma al proceso de opsonización que ocurre en la sangre, donde las nanopartículas son recubiertas con proteínas opsoninas, haciéndolas mas detectables para las células fagocíticas. Luego de la opsonización, ocurre la fagocitosis, produciendo la remoción de las nanopartículas del torrente sanguíneo. La célula fagocítica se une a la nanopartícula por medio de las opsoninas pegadas a la superficie de

esta. Por lo tanto si se evitara la unión de las opsoninas a la superficie de la nanopartícula, las células fagocitas no podrían reconocer a estas partículas como un agente extraño.

Se tienen antecedentes que las nanopartículas son secuestradas rápidamente en cuestión de minutos por células fagocíticas mononucleares que se concentran en el hígado y el bazo (Illum y col., 1987; Grez y col., 1995; Panagi y col., 2001). Se ha demostrado que el tamaño de las partículas juega un rol clave en la biodistribución final y en el tiempo en que permanecen en la sangre. Por ejemplo moléculas que presentan un peso molecular menor que 5000 kDa, o incluso mayor pueden ser removidas por el cuerpo vía el sistema renal. En el caso de partículas más grandes que no pueden ser removidas mediante el sistema renal, se ha demostrado que si las mismas presentan un radio hidrodinámico mayor a 200 nm se excretan del organismo más rápidamente que las partículas con un radio menor a 200 nm (Moghimi y col., 1993).

Otra posible explicación que la dependencia del tamaño en la biodistribución tenga que ver con un simple efecto de filtración, donde las partículas más grandes son removidas por el bazo y el hígado rápidamente, mientras que las partículas más pequeñas van directamente a la médula ósea (Moghimi y col., 1993). Sin embargo la razón exacta de esta dependencia en el tamaño no ha sido aun claramente elucidada.

En cuanto a la biodistribución de nanopartículas, existen un gran número de datos conflictivos en la literatura, y debido a la falta de estudios de ayuden a comprender los factores involucrados a lo largo de diversos modelos animales o a la variabilidad observada en los materiales y polímeros utilizados para realizar estos estudios, muy poco se ha podido establecer con real certeza sobre cual de estos parámetros afectaría finalmente la biodistribución de las nanopartículas (Porter y col., 1992; Moghimi y col., 2002). Por lo tanto, como ya se menciono, no existían antecedentes en la literatura que nos diera una

idea de la biodistribución que presentarían las AuNP de 10 nm, por lo que este es el primer estudio concluyente que indica una tendencia de biodistribución de este tipo de nanopartículas.

A pesar de que no se observó de forma tan notoria como en el resto de los órganos, la presencia de AuNP en el cerebro, ya sea mediante la medición oro por GF-AAS o ICP-MS, demuestra que este tipo de nanopartículas es capaz de atravesar la BHE. Esta observación se puede afirmar al analizar los gráficos e que se ve que en el caso del cerebro existen diferencias significativas en la cantidad de oro entre todos los grupos, lo que indicaría que el oro sigue penetrando al cerebro, en cambio en la sangre no existe diferencias significativas en entre las dos dosis mas altas, lo que demostraría que las nanopartículas no se quedan circulando por la sangre, al contrario tienden a acumularse en los órganos, como es el caso del cerebro.

La base principal de la BHE son las células endoteliales especializadas en la microvasculatura cerebral, la cuales interactúan con la glia. Entre las propiedades exclusivas que poseen estas células endoteliales podemos mencionar la existencia de “ensamblajes” fuertes entre las células, donde los espacios entre estos “ensamblajes” son de aproximadamente de 4 nm (Kniesel y Wolburg, 2000). Por lo que las AuNP para poder ingresar al cerebro, probablemente pasan por la membrana de las células endoteliales y no entre ellas. La penetración de moléculas hacia el cerebro esta estrechamente relacionada a su solubilidad lipídica y a la capacidad que posean de para pasar a través de la membrana plasmática de las células que forman la BHE (Stewart, 2000). Sin embargo este no es el caso de las AuNP, debido a que estas partículas son altamente solubles en agua. Mas aún, las células del cerebro no realizan pinocitosis, por lo que las AuNP deben ingresar al cerebro por alguna otra vía. En el sistema nervioso central maduro, espinal y ganglios

autonómicos, como en otros sitios dentro del cerebro llamados órganos cincuventriculares, no hay presencia de la BHE (Spencer, 2000). La discontinuidad de la BHE permite la entrada al cerebro de la drogas anti-cancerígena doxorubicina. Probablemente, nanopartículas como las AuNP adoptan este mismo método para atravesar la BHE sin afectar su permeabilidad.

La importancia del estudio de la distribución de las AuNP en los distintos tejidos se debe a su esperado uso en biomedicina, ya que es primordial que las AuNP lleguen al órgano blanco y no produzcan toxicidad en los tejidos donde se acumulan.

Al igual que las nanopartículas solas, en el presente proyecto se demostró la capacidad del conjugado AuNP-INH-Rod de atravesar la BHE tanto se forma cuantitativa como cualitativa. La medición cuantitativa, es muy concluyente ya que los animales fueron perfundidos luego de ser sacrificados eliminando toda la sangre, lo que excluye la posibilidad de que el oro cuantificado se encontrara en los vasos sanguíneos y no en el parénquima. Por su parte los análisis cualitativos no demostraron que en el conjugado es capaz de atravesar la BHE y se deposita en regiones del cerebro como el hipocampo y la corteza, lo cual es de suma importancia, ya que es sabido que las placas amiloides en pacientes con Alzheimer se depositan mayormente en estas regiones. Un resultado que por un lado es muy positivo ya que confirma el cruce de estas partículas a través de la BHE, pero podría ser perjudicial en el caso de una futura aplicación del tratamiento in vivo, es la colocalización entre el conjugado y neuronas. Se podría pensar que estos no es un resultado positivo ya que en el caso de una futura irradiación, podríamos producir daño a nivel neuronal. Pero la verdad que esto no ocurriría ya que las nanopartículas por si solas liberan una energía muy baja, por lo que para producir un efecto, éstas debieran estar aglomeradas en algún punto. Así que en el caso de un futuro uso in vivo, se espera que estos conjugados

tiendan a aglomerarse alrededor de las placas amiloides produciendo su efecto terapéutico. Y si en el caso hubieran nanopartículas que no se unieran a las placas, estas estarían de forma dispersa en el cerebro, por lo que la irradiación por produciría efecto alguno.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente proyecto, los objetivos propuestos se cumplieron totalmente, ya que se determinó tanto *in vitro* como *ex vivo*, la afinidad de diversos conjugados por las placas amiloides y como esta es una interacción de tipo específica. También se inició con los primeros estudios *in vivo*, los cuales arrojaron resultados prometedores. Al haber demostrado el paso de las nanopartículas a través de la BHE y la baja o nula toxicidad que éstas presentan, ahora nos encontramos en muy buen pie para iniciar una nueva etapa de este proyecto que involucra los estudios *in vivo* de los diversos conjugados y la afinidad de estos para unirse a las placas amiloides.

Por lo que los mencionados resultados establecen las bases para el desarrollo de nuevas estrategias que emplean herramientas nanotecnológicas en el potencial diagnóstico y terapia de la EA.

## **5. Conclusión.**

- Los cinco conjugados que se estudiaron presentan estabilidad en la fase coloide.
- Los conjugados AuNP-Inh-Rod, AuNP-CP-Rod, AuNP-tioflavina T y AuNP-F(ab)<sub>2</sub>E10 presentan afinidad por los fibras amiloides tanto *in vitro* como *ex vivo*. Mientras que el conjugado AuNP-CN-Rod no presenta ningún tipo de afinidad por las fibras.
- Las nanopartículas de oro no presentan toxicidad *in vivo* y son capaces a cruzar la BHE.
- El conjugado AuNP-Inh-Rod es capaz de cruzar la BHE en ratones silvestres.

## **6. Bibliografia.**

- 1) Ai, H. *et al.* 2003. Biocompatibility of layer-by-layer selfassembled nanofilm on silicone rubber for neurons. *J. Neurosci. Methods.* **128**, 1–8
- 2) Alexiou C. *et al.*, 2000. Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting. *Cancer Res.* **60** (23): 6641-6648.
- 3) Andreasen N. *et al.*, 1999. Sensitivity, specificity and stability of CSF-tau in AD in a community-based patient sample. *Neurology.* **53**,1488-1494.
- 4) Andreasen, N. and Blennow, K. 2005. CSF biomarkers for mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *Clin. Neurol. Neurosurg.* **107**, 165–173.
- 5) Arai H. *et al.* 1995. Tau in cerebrospinal fluid: a potential diagnostic marker in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*; **38**:649-652.
- 6) Bacskai BJ. *et al.* 2001. Imaging of amyloid beta deposits in brains of living mice permits direct observation of clearance of plaques with immunotherapy. *Nat Med.* **7**, 369–72.
- 7) Bacskai BJ. *et al.* 2003. Fourdimensional multiphoton imaging of brain entry, amyloid binding, and clearance of an amyloid-beta ligand in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci.* **100**, 12462-67.
- 8) Benveniste H. *et al.* 1999. Detection of neuritic plaques in Alzheimer's disease by magnetic resonance microscopy. *Proc Natl Acad Sci.* **96**, 14079–84.
- 9) Bieler S, and Soto C. 2004. Beta-Sheet breakers for Alzheimer's disease therapy. *Curr. Drug Targets.* **5** (6), 553-558.
- 10) Bitan G, and Temprow D.B. 2005. Preparation of aggregate-free, low molecular weight amyloid-b for assembly and toxicity assays. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **3**, 8–32.
- 11) Blass, J. P. 2003. Cerebrometabolic abnormalities in Alzheimer's disease. *Neurol. Res.* **25**, 556–566
- 12) Citron, M. 2000. Secretase as targets for the treatments of Alzheimer's disease. *Mol. Med. Today.* **6**, 392-397.
- 13) Corder, E. H. *et al.* 1993, Gene close of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science.* 261, 921-923.
- 14) Daniel MC and Astruc D. 2004. Gold Nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry quantum size-related properties, and applications toward biology, catalysis, nanotechnology. *Chem. Rev.***104** (1): 293-346.
- 15) Dickson, D. W. 2004, Apoptotic mechanisms in Alzheimer neurofibrillarydegeneration: cause or effect? *J. Clin. Invest.* **114** (1), 23-27.
- 16) Duff, K. 2001, Transgenic mouse models of Alzheimer's disease: phenotype and mechanisms of pathogenesis. *Biochem Soc Symp.* **67**, 195-202.

- 17) Fan J. *et al.* 2003. Coating gold nanoparticles with peptide molecules via a peptide elongation approach. *Colloids surf. B Biointerfaces*, **28** (2-3): 199-207.
- 18) Fortina, P. *et al.* 2005 Nanobiotechnology: the promise and reality of new approaches to molecular recognition. *Trends Biotechnol.* **23**, 168–173.
- 19) Francis PT. *et a.* 1985.. Neurochemical studies of early-onset Alzheimer's disease. Possible influence on treatment. *N Engl J Med*; **313**, 214-218.
- 20) Friedland RP. *et al.* 1994. Development of an anti-A beta monoclonal antibody for in vivo imaging of amyloid angiopathy in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol.* **9**, 107-113
- 21) Gagliardi, R. J. 2000. Neuroprotection, excitotoxicity and NMDA antagonists. *Arq. Neuropsiquiatr.* **58**, 583–588
- 22) Georganopoulou, D.G. *et al.* 2005. Nanoparticle-based detection in cerebral spinal fluid of a soluble pathogenic biomarker for Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**. 2273-2276.
- 23) Goldgaber, D. *et al.* 1987. Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease, *Science.* **235** (4791), 877-80.
- 24) Gref, R. *et al.* 1995. The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **16**, 215–233.
- 25) Hardy, J and Allsop, D. 1991, Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol. Sci.* **12**, 383-388.
- 26) Hardy, J., and Selkoe, D. J. 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics, *Science*, **297**, 353-356.
- 27) Herbert, L. E. *et al.* 2001, Annual incidence of Alzheimer disease in the United State projected to the years 2000 to 2050. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* **15**, 169-173.
- 28) Hilbich, C.*et al.* 1992. Substitutions of hydrophobic amino acids reduce the amyloidogenicity of Alzheimer's disease beta A4 peptides. *J. Mol. Biol.* **228**: 460-473.
- 29) Hock, C. *et al.* 2003, Antibodies against beta-amyloid slow cognitive decline in Alzheimer disease. *Neuron.* **38**,547-554.
- 30) Illum, L. *et al.* 1987. The organ distribution and circulation time of intravenously injected colloidal carriers sterically stabilized with a blockcopolymer-Poloxamine 908. *Life Sci.* **40**, 367–374.
- 31) Kang, J. *et al.* 1987, The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature.* **325**, 733-736.
- 32) Kniesel, U and Wolburg, H. 2000. Tight junctions of the blood–brain barrier. *J. Clin. Invest.* **90**, 112-116.
- 33) Klunk WE. *et al.* 2001. Imaging Abeta plaques in living transgenic mice with multiphoton microscopy and methoxy-X04, a systemically administered Congo red derivative. *J Neuropathol Exp Neurol*; **61**, 797–805.
- 34) Kogan MJ. *et al.* 2006. Nanoparticle-Mediated Local and Remote Manipulation of Protein Aggregation. *Nano Lett*, **6** (1), 110-115.
- 35) Levy R. *et al.* 2004. Rational and combinatorial design of peptide capping ligands for gold nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **126** (32), 10076-10084.
- 36) Lewinski N. *et al.* 2008. Cytotoxicity of nanoparticles. *Small* **4** (1), 26-49.
- 37) Link CD. *et al.* 2001. Visualization of fibrillar amyloid deposits in living, transgenic *Caenorhabditis elegans* animals using the sensitive amyloid dye, X-34.

- Neurobiol Aging*. **22**, 217–26.
- 38) Lockman, PR *et al.* 2004. Nanoparticle technology for drug delivery across the blood–brain barrier. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **28**, 1–13
  - 39) Maggio JE. *et al.* 1992. Reversible in vitro growth of Alzheimer disease beta-amyloid plaques by deposition of labeled amyloid peptide. *Proc Natl Acad Sci.* **89**, 5462–66.
  - 40) Martin A. 1990. Colloids. *Physical Pharmacy. 4th edition.* 393–42.
  - 41) Mathis CA. *et al.* 2002. Synthesis and evaluation of <sup>11</sup>C labeled 6substituted 2-arylbenzothiazoles as amyloid imaging agents. *J. Med Chem*, **46**, 2740–54.
  - 42) Mendez MF. *et al.* 1992. Clinically diagnosed Alzheimer disease: neuropathologic findings in 650 cases. *Alzheimer Dis Assoc Disord*; **6**,35–43.
  - 43) Mertz W. 1986. Trace elements in Human and animal Nutrition-Fifth edition 450–463.
  - 44) Mirra SS. *et al.* 1991, The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer’s Disease Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer’s disease. *Neurology*; **41**,479–486.
  - 45) Moghimi, S.M., 2002. Chemical camouflage of nanospheres with a poorly reactive surface: poorly reactive surface: towards development of stealth and targetspecific nanocarriers. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.* **1590**, 131–139.
  - 46) Moghimi, SM. *et al.* 1993. Enhanced hepatic-clearance of intravenously administered sterically stabilized microspheres in zymosan-stimulated rats. *J. Leukoc. Biol.* **54**, 513–517.
  - 47) Moghimi, S.M and Patel, H.M., 1988. Tissue specific opsonins for phagocytic cells and their different affinity for cholesterol-rich liposomes. *FEBS Lett.* **233**, 143–147.
  - 48) Moxon, K. A. *et al.* 2004. Nanostructured surface modification of ceramic-based microelectrodes to enhance biocompatibility for a direct brain–machine interface. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **51**, 881–889
  - 49) Nam, J.M. *et al.* 2003 Nanoparticle-based bio-bar codes for the ultrasensitive detection of proteins. *Science* **301**, 1884–1886.
  - 50) Näslund J. *et al.* 2000. Correlation between elevated levels of amyloid beta peptide in the brain and cognitive decline. *JAMA*; **283**, 1571–77.
  - 51) Nicoll, J. *et al.* 2003. Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid- $\beta$  peptide: a case report. *Nature Medicine.* **9**, 448–452.
  - 52) Panagi, Z. *et al.* 2001. Effect of dose on the biodistribution and pharmacokinetics of PLGA and PLGA-mPEG nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **221**, 143–152.
  - 53) Pankhurst QA. *et al.* 2003. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J Phys DAppl. Phys*, **36** (13), R167–R181.
  - 54) Price, D.L. *et al.* 1998, Alzheimer's disease: genetic studies and transgenic models *Annu. Rev. Genet.* **32**, 461–493.
  - 55) Radde R. *et al.* 2006. A $\beta$ 1-42 driven cerebral amyloids in transgenic mice reveals early and robust pathology. *EMBO reports.* **7**(9); 940–946.
  - 56) Refolo, LM. and Fillit, HM. 2004. Drug discovery for Alzheimer's disease: the end of the beginning, *J. Mol. Neurosci.* **24**, 1–8.
  - 57) Roser, M. *et al.* 1998. Surface-modified biodegradable albumin nano- and microspheres. II. Effect of surface charges on in vitro phagocytosis and biodistribution in rats. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **46**, 255–263.
  - 58) Saifuddin, U. *et al.* 2003. Assembly and characterization of biofunctional neurotransmitter-immobilized surfaces for interaction with postsynaptic

- membrane receptors. *J. Biomed. Mater. Res. A* **66**, 184–191.
- 59) Sayes CM. *et al.* 2007. Assessing toxicity of fine nanoparticles: comparing in vitro measurements to in vivo pulmonary toxicity profiles. *Toxico Sci.* **97**(1): 163-80.
  - 60) Scheuner, D. *et al.* 1996, Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat. Med.* **2**, 864-780.
  - 61) Scinto LF. *et al.* 1994. A potential noninvasive neurobiological test for Alzheimer's disease. *Science*; **266**:1051-1054.
  - 62) Selkoe, D. J. 1994, Alzheimer's disease: a central role for amyloid. *J. Neuropathol. Experim. Neurol.* **53**, 438-447.
  - 63) Selkoe, D.J. 1997. Alzheimer's disease: genotypes, phenotypes, and treatments. *Science* **275**: 630-631.
  - 64) Selkoe, D.J. 2000, The origins of Alzheimer disease - A is for amyloid. *Jama: Journal of the American Medical Association* **283**, 1615-1617.
  - 65) Simons, K. and Ehehalt, R. 2002. Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J Clin Invest.* **110**(5): 597-603.
  - 66) Selkoe, DJ and Podlesny, MB. 2002. Deciphering the genetic basis of Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Genomics. Hum. Genet.* **3**, 67-99.
  - 67) Shenai, MB. *et al.* 2004. A novel MEA/AFM platform for measurement of real-time, nanometric morphological alterations of electrically stimulated neuroblastoma cells. *IEEE Trans. Nanobioscience* **3**, 111–117.
  - 68) Shipway AN. *et al.* 2000. Investigations into the electrostatically induced aggregation of Au nanoparticles. *Langmuir*, **16** (23): 8789-8795.
  - 69) Silva, GA. *et al.* 2004. Selective differentiation of neural progenitor cells by high-epitope density nanofibers. *Science* **303**, 1352–1355.
  - 70) Soto, C. *et al.* 1994, Structural determinants of the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *J. Neurochem.* **63**, 1191-1198.
  - 71) Soto, C. *et al.* 1995, The alpha-helical to betastrand transition in the amino-terminal fragment of the amyloid beta-peptide modulates amyloid formation. *J. Biol. Chem.* **270**, 3063-3067.
  - 72) Soto, C. 1999, Plaque busters: strategies to inhibit amyloid formation in Alzheimer's disease. *Mol. Med. Today* **5**, 343-350.
  - 73) Sunderland T. *et al.* 2003. Decreased betaamyloid1- 42 and increased tau levels in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer disease. *JAMA.* 289:2094-2103.
  - 74) Spencer, P. S. 2000. Doxorubicin and related anthrax cyclines, In *Experimental and Clinical Neurotoxicology. Oxford University Press.* 529–533
  - 75) Stewart, P. A. 2000. Endothelial vesicles in the blood–brain barrier: Are they related to permeability? *Cell. Mol. Neurobiol.* **20**, 149–163.
  - 76) Teplow DB., 1998, Structural and kinetic features of amyloid betaprotein fibrillogenesis. *Amyloid.* **5** (2), 121-42.
  - 77) Tjernberg, LO. *et al.* 1996, Arrest of betaamyloid fibril formation by a pentapeptide ligand. *J. Biol. Chem.* **271**: 8545-8548.
  - 78) Van Leuven, F. 2000. Single and multiple transgenic mice as models for Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology* **61**, 305-312.
  - 79) Vinogradov, SV. *et al.* 2004. Nanogels for oligonucleotide delivery to the brain. *Bioconjug. Chem.* **15**, 50–60

- 80) Wadghiri YZ. et al, 2003. Detection of Alzheimer's amyloid in transgenic mice using magnetic resonance microimaging. *Magn Reson Med*; **50**: 293–302.
- 81) Wood, SJ. et al. 1995, Prolines and amyloidogenicity in fragments of the Alzheimer's peptide beta/A4. *Biochemistry* **34**, 724-730.
- 82) Zheng, H. et al. 1996, Mice deficient for the amyloid precursor protein gene. *Ann NY Acad. Sci.* **777**, 421-426.
- 83) Zhu T. et al. 2003. Surface modification of citrate-reduced colloidal gold nanoparticles with 2-mercaptopropionic acid. *Langmuir*, **19** (22): 9518-9525.