

UCH-FC
Biotecnología
L 337
C-1

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

**“NANOPARICULAS DE ORO CONJUGADAS A PEPTIDOS PARA EL
DESARROLLO DE UNA NUEVA ESTRATEGIA TERAPEUTICA PARA LA
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER”**

Memoria de Titulo
Entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al titulo de
Ingeniero en Biotecnología Molecular

por

Cristián Alberto Lasagna Reeves

Septiembre, 2007
Santiago, Chile



Director de memoria de titulo: Dr Claudio Soto
Co-Director de memoria de titulo: Dr Marcelo Kogan



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

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

CRISTIÁN ALBERTO LASAGNA REEVES

Dr. Claudio Soto Jara
Director Seminario de Título

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'C. Soto Jara', written over a horizontal line.

Dr. Marcelo Kogan
Co-Director Seminario de Título

Comisión de Evaluación Seminario de Título

Dra. María Rosa Bono Merino
Presidente Comisión

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'M. Bono Merino', written over a horizontal line.

Dr. Christian González Billault
Corrector



Santiago de Chile, Septiembre de 2007



Biografía

Cristián Lasagna Reeves

Cristián nació el 18 de enero de 1983, siendo el tercer hijo de un matrimonio constituido por Raúl Lasagna González y Norma Reeves Becker.

Asistió al jardín infantil sin problemas, ingresando posteriormente al Colegio Andree English School en marzo de 1988, donde cursó la totalidad de sus estudios escolares, destacándose siempre por su buen rendimiento académico y sus capacidades de liderazgo, las que lo llevaron a ser presidente de curso en reiteradas ocasiones. En su graduación en diciembre de 2001, recibe los premios al mejor alumno en biología y en la asignatura de historia universal, llamando la atención de sus profesores por tener logros en tan disímiles áreas.

En el 2002 ingresa a la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile para cursar la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular, lo que logra sin mayores sobresaltos. En las vacaciones de verano, previas al inicio del noveno semestre, se va a Baltimore en EEUU, para participar del laboratorio de Neuropatología de la Universidad John Hopkins, invitado por el Dr. Juan Troncoso. En esa oportunidad aprovecha de crear nexos con otro científico chileno, el Dr. Claudio Soto, con quien se iría en septiembre de 2006 a realizar su tesis de pregrado en el área de neurociencias, en Galveston, Texas, EEUU. y luego dar inicio a su Magíster en Ciencias Biológicas, patrocinado por la Universidad de Chile en el mismo laboratorio..

Actualmente, a los 24 años está postulando a proseguir sus estudios realizando el Doctorado en Biotecnología, en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.



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 Cristian Zambrano, Daniel Orellana y a Claudio Pérez por todo lo que me enseñaron mientras estuve junto a ellos en el instituto milenio, en la facultad de Ciencias.

A mis compañeros y amigos Francisco Cubillos y Francisco Salinas, quienes fueron un gran apoyo durante la universidad.

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 muy especialmente a Marcelo Barria, por todo.

A Diego Vargas por su ayuda y amistad durante todo este tiempo.

A dos grandes mujeres como son Verónica y Vanessa García, quienes han estado en todo momento conmigo, siendo fundamentales en mi vida durante estos últimos meses.

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	19
1.3 Objetivos	19
1.3.1 Objetivo General	19
1.3.2 Objetivos específicos	19
2. Materiales	20
3. Métodos	21
3.1 Síntesis de AuNP	21
3.2 Síntesis de péptidos	22
3.3 Conjugación de AuNP a los péptidos	23
3.3.1 Conjugación de AuNP a CY	24
3.3.2 Centrifugación para eliminación del péptido libre	25
3.4 Caracterización de AuNP y sus conjugados	25
3.5 Interacción de los conjugados con $A\beta_{1-42}$	27
3.6 Inyección vía intraperitoneal del conjugado AuNP-Inh-Rod en ratas... ..	28
3.6.1 Determinación de la biodistribución del conjugado AuNP-Inh-Rod. ..	29
3.7 Marcaje con I^{125} del conjugado AuNP-CY	30
3.8. Inyección vía intravenosa del conjugado AuNP-CY I^{125} en ratones.....	30
4. Resultados	32
4.1. Síntesis y caracterización de las AuNP	32
4.2. Síntesis de péptidos y caracterización de los conjugados	37
4.3 Interacción de AuNP-Péptido con $A\beta_{1-42}$	49
4.4 Biodistribución del conjugado AuNP-Inh-Rod en Ratas	52
4.5 Biodistribución y paso a través de la BHE de AuNP- CY I^{125}	55
5. Discusión	60
6. Conclusión	68
7. Bibliografía	69



Índice de tablas.

	Página
Tabla 1	4

Índice de figuras.

	Página
Figura 1	6
Figura 2	15
Figura 3	17
Figura 4	33
Figura 5	35
Figura 6	36
Figura 7	36
Figura 8	39
Figura 9	39
Figura 10	41
Figura 11	43
Figura 12	43
Figura 13	44
Figura 14	45
Figura 15	45
Figura 16	46
Figura 17	46
Figura 18	47
Figura 19	48
Figura 20	51
Figura 21	51
Figura 22	54
Figura 23	55
Figura 24	56
Figura 25	57
Figura 26	58
Figura 27	59



Abreviaturas.

EA:	Enfermedad de Alzheimer
Aβ:	Proteína beta amiloide
Aβ₁₋₄₂:	Proteína beta amiloide de 42 residuos de aminoácidos
APP:	Proteína precursora del amiloide
PS1:	Presenilina 1
PS2:	Presenilina 2
NFT:	Ovillo 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 β ligando difusible
CMO:	Campo magnético oscilante
NPM:	Nanopartícula metálica
AuNP:	Nanopartícula de oro
Inh:	Péptido inhibidor CLPFFDNH ₂
i1:	Isomero 1 CDLPFFNH ₂
i2:	Isomero 2 CLPDDFNH ₂
ROD:	Rodamina B
CF:	Carboxifluoresceína
CY:	Cisteína-Tirosina
TEM:	Microscopio electrónico de transmisión
AFM:	Microscopía de Fuerza atómica
ICP-MS:	Plasma Acoplado por Inducción con Espectrómetro de Masas
RMI:	Imagen por resonancia magnética
SPECT:	Tomografía por emisión de fotón único
PET:	Tomografía por emisión de positrones
MRM:	Microscopía de resonancia magnética
PEG:	Polietilenglicol
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 memoria de título, ésta se enfoca en una etapa inicial del proyecto, donde se pretende determinar la estabilidad de distintos conjugados AuNP-péptido marcados fluorescentemente y la capacidad que presentan para unirse selectivamente a los agregados tóxicos de la proteína β -amiloide ($A\beta$) involucrada en la enfermedad de Alzheimer. El uso de estos conjugados marcados fluorescentemente facilitan los estudios *in vivo* de biodistribución y paso a través de la barrera hematoencefálica (BHE), los cuales fueron realizados de forma preliminar en este trabajo.

Por lo tanto, se sintetizaron AuNP de 10 nm de diámetro mediante la reducción de ácido tetracloroáurico ($HAuCl_4$) con citrato de sodio dihidratado y se conjugaron al péptido CLPFFDNH₂ (Inh), el cual es una modificación del péptido disruptor de laminas β LPFFDNH₂ que posee afinidad por los agregados de $A\beta$. También fueron utilizados 2 isómeros de este Inh, para evaluar si esta interacción es secuencia dependiente. Estos conjugados fueron marcados con Rodamina B o con Carboxifluoresceína, por lo que se estudiaron un total de seis conjugados.

La totalidad de los conjugados presentaron especificidad por las fibras $A\beta$, lo cual nos da pie para utilizar estos conjugados en futuros estudios *ex vivo* e *in vivo*.

En relación a los estudios de biodistribución y paso a través de la BHE, estos se realizaron a partir de la inyección tanto del conjugado AuNP-Inh, marcado con Rodamina B, en ratas como del AuNP-CY, marcado con I^{125} a nivel de la Tirosina, en ratones. En ambos casos se observó una gran acumulación de nanopartículas en el hígado y en menor medida en el cerebro, sin embargo lo suficiente para concluir que estas nanopartículas son capaces de cruzar la BHE. Sin lugar a duda se deben seguir realizando estudios de biodistribución, sin embargo los resultados obtenidos en este aspecto son muy prometedores para el desarrollo de este proyecto.



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 pursue to obtain stable AuNP-Peptide conjugates labeled with a fluorophore able to selectively attach to the toxic deposits of the amyloid β protein ($A\beta$) involved in Alzheimer's disease. The use of these conjugates labeled with a fluorophoro, makes the *in vivo* studies easier for biodistribution and permeability of the Blood Brain Barrier (BBB).

Therefore, AuNPs of 10 nm of diameter were synthesized by means of the reduction of acid tetrachloroauric ($HAuCl_4$) with citrate of sodium dehydrated. They were conjugated to the peptide CLPFFDNH2 (Inh), which is a modification of the β -sheet breaker LPFFDNH2 that possesses affinity for the $A\beta$ aggregates. Also we used 2 isomeric of this Inh. To evaluate if this interaction is a sequence dependent these conjugates were labeled with Rodhamine B and Carboxifluoresceine, and six conjugates were studied.

All the conjugates presented affinity for the $A\beta$ fibrils, which allows us to use these conjugate in future *ex vivo* and *in vivo* studies. In relation to the studies of biodistribution and permeability of the BBB, these were carried out by means of the injection of the conjugate AuNP-Inh-Rod in rats and by injection of AuNP-CY1125 in mice. In both cases a great accumulation of nanoparticles in the liver and some in the brain have been observed. 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 heredado 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 β -amiloide (P β A), el cual es un péptido de entre 39 y 42 amino ácidos, que se encuentra en una proteína de membrana 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 β , esto último produciría un desequilibrio entre la producción de A β y su eliminación. El péptido A β 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 β 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 β requiere del corte proteolítico de APP en la región N- y C-terminal de A β , realizado por la β y γ secretasa respectivamente (Selkoe, 2000). De forma alternativa, la APP puede ser cortada en al mitad del dominio A β por una tercera

proteasa llamada α -secretasa formando un producto no amiloidogénico (Simons y Eehalt, 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 β (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 ϵ 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 β juega un rol esencial en la patogénesis del Alzheimer.

TABLA 1. Genes asociados con la EAF y sus efectos en la formación de A β

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

NOTA: En esta tabla se encuentran los 4 genes que mayor efecto tienen en la EAF. Mutaciones en la proteína precursora del amiloide (β APP), en presenilina-1 (PS1), y presenilina-2 (PS2) son autosómicas dominantes en EAF y aumentan la producción total de A β . 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 ϵ 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 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 β y γ 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 β como la γ 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 β 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.

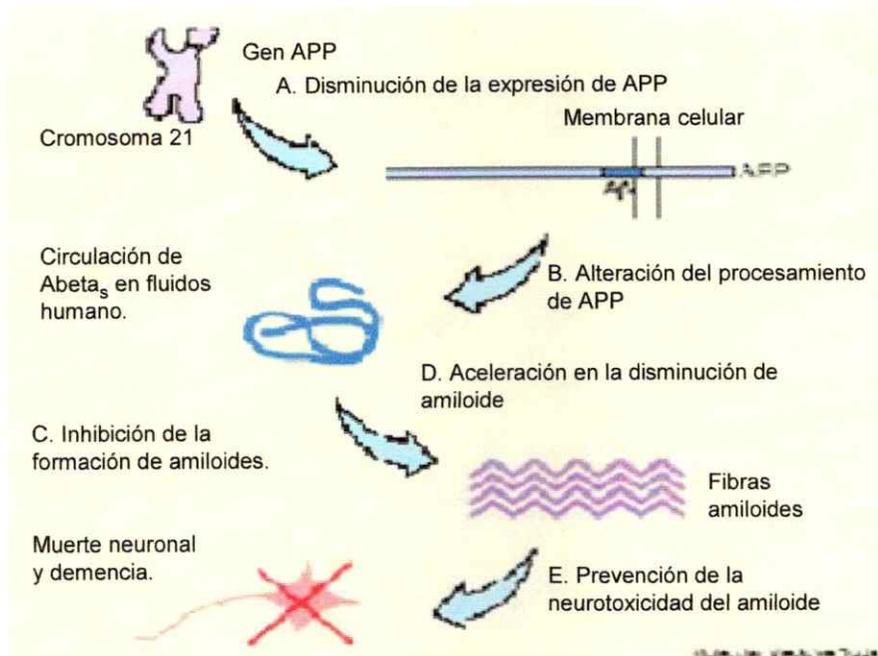


Figura 1: Blancos para el tratamiento de la EA. La cantidad de amiloide cerebral puede ser disminuida influenciando procesos diferentes pero relacionados. El efecto negativo del amiloide en el cerebro puede ser disminuido por: (A) Reducción de la expresión de APP; (B) alterar el procesamiento de APP (C) inhibición de la formación de las fibras amiloides; (D) aceleración en la disminución de fibras amiloides o péptidos amiloides soluble (sA β); 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 diagnóstico 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 diagnóstico del Alzheimer. Estos biomarcadores en estudio van desde marcadores genéticos, a mediciones de concentración de péptido A β y/o TAU en el líquido cefalorraquídeo (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 cefalorraquídeo y sangre (Sunderland y col, 2003; Francis y col, 1985). Específicamente la cuantificación del péptido β -amiloide₁₋₄₂, β -amiloide₁₋₄₀, tau total e hiperfosforilada en el líquido cefalorraquídeo 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 β ₁₋₄₂ en el líquido cefalorraquídeo en un estado temprano de la enfermedad en comparación a controles (Andreasen y Blennow, 2005). Sin embargo los métodos de diagnóstico utilizando el líquido cefalorraquídeo 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 β 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 β marcada con I¹²⁵, 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 Tc⁹⁹ del anticuerpo contra el fragmento 1-28 de la proteína A β , 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 magnética 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 β ₁₋₄₀ con el compuesto magnético derivado del ácido acético Gd-DTPA para detectar mediante μ MRI placas amiloides en ratones transgénicos APP/PS *in vivo*. El problema de este estudio es que el A β ₁₋₄₀ 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 de 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 más lipofílico que el anterior se une con mayor afinidad a las fibras de A β (Klunk y col, 2002). Ratones fueron inyectados por vía intravenosa con ¹¹C-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 μ m) (Bacskaï y col, 2001).

Algunos derivados de Tioflavina como ¹²⁵I-6 (68-3), ³H-BTA-1 (69-3) y el ¹¹C-6-OH-BTA-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 ^{11}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 β calculada en la corteza frontal de humano medida por medio de técnicas bioquímicas (Naslund y col, 2000). Mediante microscopia de multifoton se observó en ratones transgénicos el cruce de PIB fluorescente a través de la BHE, marcando los depósitos amiloides (Bacskai 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 mas 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 céfalo 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 atomolar 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).

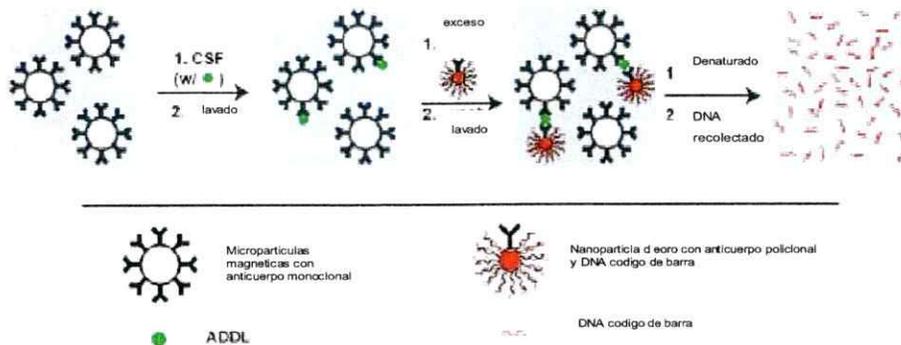


Figura 2: La presente figura representa la técnica desarrollada por Nam y col, basada en el uso de nanopartículas de oro y micropartículas magnéticas como forma de diagnóstico de la EA.

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 μ 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 β -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-peptido, 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.

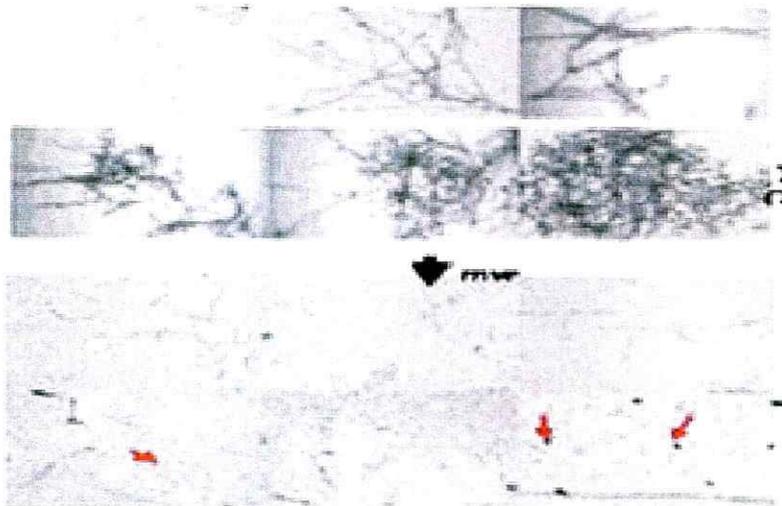


Figura 3: a) representación del complejo entre los conjugados de moléculas afines a A β unidos a NPM y los agregados de la proteína A β formando hoja A β) Luego de la aplicación de un CMO se produce la desagregación y/o cambios conformacionales de A β que llevarían a especies de menor toxicidad (interrogantes a resolver en este proyecto). En negro se representan las moléculas de A β , en rojo el transportador y en naranja las NPM (Kogan y col, 2006).

Debido a lo anteriormente expuesto, surge la idea de obtener conjugados AuNP-Péptido para el desarrollo de una nueva estrategia terapéutica para la EA y evaluar si estos conjugados presentan afinidad por los agregados de A β . Específicamente, en el presente seminario de título se evaluó la estabilidad y afinidad por los agregados A β de diversos conjugados marcados fluorescentemente para posteriores estudios *ex vivo* e *in vivo* y la penetración de los mismos a través de la BHE.

1.2. Hipótesis

Es posible producir AuNP estables con péptidos que presenten afinidad por los agregados tóxicos de A β y que atraviesan la BHE.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Obtener y caracterizar conjugados de AuNP con diversos péptidos que presenten afinidad por agregados A β .

1.3.2. Objetivos específicos

1. Sintetizar AuNP de 10 nm de diámetro de diámetro.
2. Diseñar péptidos de diferentes secuencias para formar conjugados que se unan selectivamente a los agregados tóxicos de A β .
3. Evaluar la interacción entre los conjugados AuNP-péptido marcado fluorescentemente y los agregados de A β .
4. Determinar la biodistribución y el paso a través de la BHE de las AuNP.
5. Determinar el paso a través de la BHE de un conjugado marcado fluorescentemente.

2. Materiales.

Los productos, Extran, Acido Nítrico 6M, Acido clorhídrico 1M, Rodamina B 99%, Dimetil Formamida 99%, Hidróxido de Sodio 0,5 M pureza >99%, Agarosa, TAE 50X, Glicerol, bolsa de diálisis (Spectra/ por MWCO 6-8,000), Reactivo de Bradford, Hexafluorisopropanol, y tabletas de PBS fueron compradas en Fisher Scientific, (Houston Texas USA).

El citrato de sodio Dihidratado 99,5% de pureza, H₂AuCl₄ Hidratado, Acido trifluoracético, amortiguador fosfato 200 mM, cloramina T, uretano y metabisulfito de Sodio, fueron de Sigma – Aldrich, (St. Louis, MO, USA).

Rejillas de cobre recubiertas con Formvar/carbon, papel Whatman numero 1 y acetato de uracilo fueron adquiridos en Electron Microscopy Sciences, (Hatfield Pennsylvania USA).

Tanto el ¹²⁵I-Na como la columna de Sephadex G-10 se obtuvieron de GE Health Care, (Piscataway New Jersey USA).

El péptido amiloide se compró en Keck Large Scale Peptide Laboratory (Yale University, New Haven CT USA).

3. Métodos.

3.1. 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 H₂AuCl₄ 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 H₂AuCl₄ 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 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. Las rejillas para TEM fueron preparadas en una placa de Petri con papel Whatman número 1 ubicando la rejilla con una pinza sobre el papel Whatman y colocando 10 μ L de la muestra sobre la rejilla. 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.

3.2. Síntesis de péptidos

Los péptidos marcados con rodamina B fueron sintetizados por la Doctora Fanny Guzman, en el instituto de Biología de la Universidad Católica de Valparaíso. Tanto el inhibidor como los otros dos isómeros marcados con rodamina B 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 acoplamientos 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%, EDT 2,5% y TIS 1%.

Los péptidos marcados con carboxifluoresceína fueron sintetizados por Ivonne Olmedo, memorista de pregrado de Química y Farmacia en el laboratorio de Síntesis, diseño, y estructura de péptidos y proteínas del Parque Científico de Barcelona (España), utilizando el mismo protocolo descrito para la síntesis de péptidos marcados con Rodamina B.

3.3. 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.

3.3.1 Conjugación de AuNP a CY

El método de conjugación de AuNP a CY es el mismo que para el resto de los péptidos, solo con la diferencia que este fue disuelto en agua mili Q, obteniendo una concentración de CY igual a 86,7 μ M. Luego se colocaron 11 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 12,7 μ L de la solución de péptido se añadieron rápidamente 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 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.

3.3.2. Centrifugación para la eliminación del péptido libre

Se centrifugaron alícuotas de 1,5 mL de AuNP-Péptido con el objeto de eliminar el péptido libre que pudiera haber quedado luego de la diálisis. Los coloides de AuNP fueron centrifugados a 13.200 rpm durante 15 minutos. Luego, se eliminó el sobrenadante y se reconstituyó con citrato 1,2 mM, sometiendo cada solución a centrifugación y reconstitución dos veces para finalmente medir su λ máximo en el espectro UV-Visible, este λ máximo debiera encontrarse desplazado a valores mayores que 520 nm, el cual es propio de las nanopartículas de 10 nm de diámetro, en el caso de existir conjugación.

3.4. Caracterización de AuNP y sus conjugados

Las AuNP obtenidas y sus conjugados fueron caracterizados a través de espectrofotometría UV-Visible, electroforesis en gel de agarosa, TEM y AFM en el caso de las AuNP. Las mediciones realizadas a través de espectrofotometría UV-Visible se realizaron empleando un espectrofotómetro Hitachi U-3010 y cubetas plásticas de 1 cm de longitud. La caracterización de AuNP y sus conjugados se realizó entre longitudes de onda de 350 nm y 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 electroforesis se realizó en geles de agarosa al 2% a 114 mV, para lo cual se llevó a ebullición en microondas una solución de 100 mL de amortiguador TAE 1X con 2g de agarosa y se depositó el gel obtenido en una placa de electroforesis (Bio-Rad). Luego, se colocó una peinetas de veinte dientes para formación de alvéolos de carga de muestra y se esperó hasta que el gel solidificara. Una vez solidificado el gel, se colocó en la cámara de electroforesis (Bio-Rad) y se cubrió con 450 mL de una solución de amortiguador TAE 1X. Separadamente, las muestras de AuNP y sus conjugados se llevaron a pH 8 con NaOH 0,5 M y se mezclaron con glicerol en una proporción 1:9, se ubicaron en los alvéolos y se dejó correr la electroforesis durante 12 minutos.

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 μ L de la muestra sobre la rejilla y esperando la sequedad, repitiendo esta última operación 3 veces.

La caracterización por AFM fue realizada por el Dr. Marcelo Kogan, colocándose una gota de muestra sobre una superficie de mica recién exfoliada y secando con nitrógeno gaseoso. Las muestras se observaron en aire empleando el modo de "*Tapping*"

3.5. Interacción de los conjugados con A β ₁₋₄₂

Esta tarea requirió de la obtención de la forma monomérica del péptido amiloide (A β 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 A β ₁₋₄₂ y sonicándolo en 200 μ L de agua Mili-Q durante un minuto a temperatura ambiente. Luego, por medio de una microcuantificación de proteínas con el reactivo de Bradford se hizo una curva de calibración con un patrón de albúmina a concentraciones de 0, 2, 4, 8, 14, y 20 μ g/mL, y se cuantificó el péptido A β ₁₋₄₂ evaluando la cantidad de éste en una alícuota de 10 μ L de la suspensión madre a 595 nm en UV-Visible. Hecho esto, se procedió a la obtención de la forma monomérica del péptido amiloide A β ₁₋₄₂ a través del tratamiento de Zagorsky (bitan y Templow, 2005) tomando una alícuota de la solución madre y preparando 600 μ L de A β ₁₋₄₂ 40 μ M. Se evaporó el agua, y se añadieron 20 μ L de ácido trifluoracético al secado volviendo a evaporar el solvente en corriente de nitrógeno. Se agregaron 20 μ 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 β ₁₋₄₂ añadiendo 107 μ L de NaOH 10 mM, 432 μ L de agua Mili-Q, y 60 μ L de amortiguador fosfato 200 mM, y los 600 μ L obtenidos (A β ₁₋₄₂ 40 μ 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. Inmediatamente, a partir de la solución preparada se obtuvieron 7 alícuotas de 100 μ L, a una de estas alícuotas se le agregaron 100 μ L de una solución de AuNP 0,1 μ M, a las otras 6 alícuotas se les agregaron cada uno de los seis conjugados con los que se trabajara (AuNP-Inh-Rod, AuNP-i1-Rod, AuNP-i2-Rod,

AuNP-Inh-CF, AuNP-i1-CF, AuNP-i2-CF) a una concentración 0,1 μM . DE esta forma se permite la obtención paulatina de fibras de $\text{A}\beta_{1-42}$ durante el proceso de incubación siguiente de siete días.

Este mismo procedimiento se realizo una vez mas, solo con la diferencia que tanto las AuNP como el resto de los conjugados fueron incubados una vez ya formadas las fibras, es decir, luego de transcurrido los 7 días de formación de fibras, se incubaron durante 48 horas 100 μL de estas fibras con 100 μL de solución de AuNP o conjugado 0,1 μM dependiendo el caso.

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 μL de ésta sobre un trozo de parafilm y, separadamente, dos gotas contiguas de agua Mili-Q y una de acetato de uranilo 2% (tinción para TEM) de 10 μL cada una. La cara correspondiente de la rejilla se puso en contacto con la muestra durante un minuto, se secó en papel Whatman número 1 y se puso en contacto con la gota contigua de agua Mili-Q durante un minuto más secándola nuevamente con un papel Whatman, repitiendo el proceder al hacer pasar la rejilla por el resto de las gotas. Una vez seca, la rejilla se llevó a TEM.

3.6. Inyección vía intraperitoneal del conjugado AuNP-Inh-Rod en ratas

Se inyecto intraperitonealmente a 4 ratas 1 mL de conjugado AuNP/Inh-Rod a una concentración 1 nm. Dos de las ratas fueron perfundidas 1 hora después de la inyección con Paraformaldehido al 4% PBS durante 7 minutos (1mL/min), las otras dos ratas fueron perfundidas a las 2 horas de haber sido inyectadas del mismo modo que el otro

grupo. Como control se inyectó intraperitonealmente a 2 ratas 1 mL de citrato 1,2 mM, una fue perfundida 1 hora luego de la inyección y la otra 2 horas luego de esta, en ambos casos se utilizó paraformaldehído al 4% PBS durante 7 minutos (1mL/min).

3.6.1. Determinación de la biodistribución del conjugado AuNP-Inh-Rod

Órganos representativos como el cerebro, el hígado y el riñón, fueron removidos y cada órgano 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. En el caso de las muestras utilizadas para análisis de fluorescencia, estas fueron fijadas en paraformaldehído al 4% durante 24 horas a temperatura ambiente, luego fueron deshidratadas con 30% sucrosa por 24 horas y posteriormente crioseccionadas con un grosor de 10 μm (Mullen y col, 1992). Las secciones fueron montadas en medio "ultramount" e incubadas a temperatura ambiente por tres horas. Después de la incubación las secciones fueron observadas en el microscopio de fluorescencia Zeiss. En cuanto a las mitades utilizadas para cuantificar oro, estas fueron liofilizadas en una solución 50% acetonitrilo durante 48 horas. Posterior por cada 0,1 g de tejido se agregaron 6 mL de ácido nítrico puro más 1 mL de agua oxigenada, luego se calienta al microondas a 250 watts durante 2 minutos, se deja 2 minutos a 0 watts, se vuelve a calentar a 250 watts por 5 minutos, una vez pasado estos 5 minutos se calienta a 400 watts por otros 5 minutos y por último se calienta a 600 watts durante 5 minutos. Finalmente los tejidos se disolvieron y fue cuantificado el oro mediante ICP-MS.

3.7. Marcaje con I¹²⁵ del conjugado AuNP-CY

En primer lugar se disuelve cloramina T en buffer fosfato a una concentración 1mg/mL. Luego se disuelve Metabisulfito de Sodio (SMB) en buffer fosfato a una concentración 10 mg/mL. Luego se agregan los reactivos en un tubo de vidrio 12 x 75 mm en el siguiente orden: 100 µL de la solución de AuNP-CY 5nm, 2 mCi de ¹²⁵I-Na, 10 µL de cloramina T, luego se vortexea y se espera 60 segundos para luego agregar 10 µL de SMB para terminar la reacción. Finalmente se purificó el conjugado marcado radioactivamente mediante una columna de Sephadex G-10, siguiendo las indicaciones del fabricante. Posteriormente se determinó la fracción que poseía el conjugado marcado radiactivamente mediante el uso de un contador Gamma.

Finalmente se diluyó la muestra que contenía el conjugado marcado con PBS de tal forma de obtener una concentración de 12000 cpm/µL

3.8. Inyección vía intravenosa del conjugado AuNP-CYI¹²⁵ en ratones.

Los ratones fueron anestesiados mediante la inyección intraperitoneal de 100 µL de uretano al 40%, luego a cada raton se le inyectó 50 µL de conjugado a nivel de la vena yugular. A los 3, 5, 10 y 30 minutos después de la inyección los ratones fueron sacrificados y se les extrajo sangre, cerebro, corazón, pulmón, hígado, bazo y riñón. El suero de la sangre de los ratones se obtuvo a partir de la centrifugación de esta a 3000 rpm. Finalmente la radiactividad en cada órgano, la sangre y el suero se determinó mediante el uso de un contador gamma.

El método de análisis de regresión múltiple de tiempo (Blasberg y col, 1983; Urayama y col, 2003) fue utilizado para analizar el flujo unidireccional (K_{in}) del conjugado desde la

sangre al órgano. La relación órgano/suero versus el tiempo de exposición se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$A_m/C_p(t) = K_{in} * \int_0^t C_p(t) dt / C_p(t) + V_i \quad [1]$$

Donde A_m y $C_p(t)$ representan cpm/g de órgano y cpm/ μL de suero al tiempo t , respectivamente. K_{in} fue medido como la pendiente de la porción lineal de la relación entre órgano/suero y su respectivo tiempo de exposición. El tiempo de exposición fue calculado como el área bajo la curva de la relación concentración de suero v/s tiempo (la integral en la ecuación donde dt es la diferencial del tiempo) dividido por la concentración del suero a tiempo t . El intercepto de la línea en el eje y representa la distribución de volumen inicial (V_i) en el órgano a tiempo $t=0$.

El porcentaje de la dosis inyectada tomada por gramo de tejido al tiempo t (%Iny/g) fue calculado a partir de la siguiente ecuación:

$$\% \text{Iny/g de tejido} = (A_m/C_p(t) - V_i) * C_p(t)/\text{iny} * 100 \quad [2]$$

Donde iny se refiere a la dosis inyectada.

4. Resultados.

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

4.1. Síntesis y caracterización de las AuNP

Para la síntesis de AuNP existen diferentes métodos químicos y físicos (Daniel y col, 2004) entre los que podemos destacar métodos químicos como la reducción del HAuCl_4 con diferentes agentes reductores como citrato, NaBH_4 y estabilizantes de carácter tiólico, y métodos físicos como la ablación láser, radiolisis, etc. En este trabajo se escogió un método de carácter químico basado en la reducción de una sal de oro en medio acuoso debido a su simpleza, reproducibilidad, accesibilidad, limpieza en cuanto a sustancias de síntesis potencialmente tóxicas, homogeneidad en el tamaño alcanzado y en especial, por estar diseñados para medios acuosos, lo que es favorable para la conjugación subsiguiente a péptidos.

En términos de una ecuación química general, los métodos químicos de condensación de partículas que permiten la síntesis de AuNP a través del uso de un agente reductor (en este caso a través del empleo de citrato de sodio dihidratado) estarían definidos en función de la siguiente relación general (Figura 4):

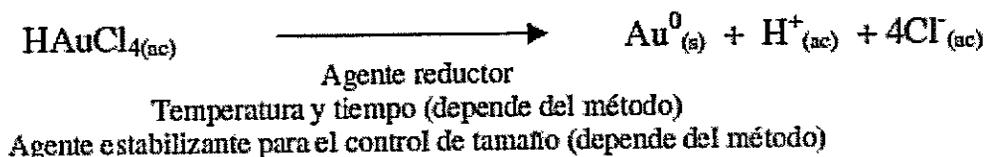


Figura 4: Relación que indica la formación de nanopartículas de oro, mediante la reducción de Au^{+3} a Au^0 , utilizando citrato de sodio dihidrato como agente reductor.

En sus experimentos Schmid y cols concluyeron que 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.

Debido al reducido tamaño de las AuNP, algunos de los electrones de sus átomos de superficie pasan al medio confiriéndole una carga superficial de partícula levemente positiva (potencial de Nernst) que provoca la adsorción de aniones provenientes del medio (en este caso dados por el citrato) formando una monocapa inmediatamente contigua a la superficie de la partícula que terminan por conferirle una carga final levemente negativa (potencial zeta negativo) (Martin y col, 1993; Shipway y col, 2000). En consecuencia, las AuNP presentan un potencial zeta negativo y muy cercano a cero lo que sugiere que las AuNP requieren de una carga muy pequeña para estabilizarse (Martin y col, 1993). Las fuerzas entre las partículas de una dispersión liofóbica estarían dadas por repulsiones electrostáticas y atracciones de van der Waals que resultarían en energías potenciales de repulsión y atracción, existiendo un gran potencial de atracción

cerca del origen de la partícula y una barrera de repulsión a distancias moderadas que, superada, daría lugar a la agregación de las partículas (Martin y col, 1993).

Por otra parte, cuando las AuNP alcanzan un tamaño del orden de la longitud de onda de "Broglie" correspondiente a los electrones de valencia de los átomos de su superficie, se produce una oscilación colectiva de estos electrones (efecto plasmón) que da lugar a un máximo de absorción al UV-Visible de aproximadamente 520 nm si los diámetros de partícula es alrededor de 10 nm (Daniel y col, 2004). Al ojo desnudo, las AuNP son de un color rojizo que se torna violeta si éstas se agregan, lo que además se traduce en el desplazamiento del λ máximo de absorción hacia valores mayores, fenómeno que se ha atribuido al acoplamiento del plasmón entre las partículas.

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

Caracterización por espectrofotometría UV-Visible: 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 5 se observa un pico estrecho, lo que indicaría la obtención de una distribución de tamaños relativamente uniforme.

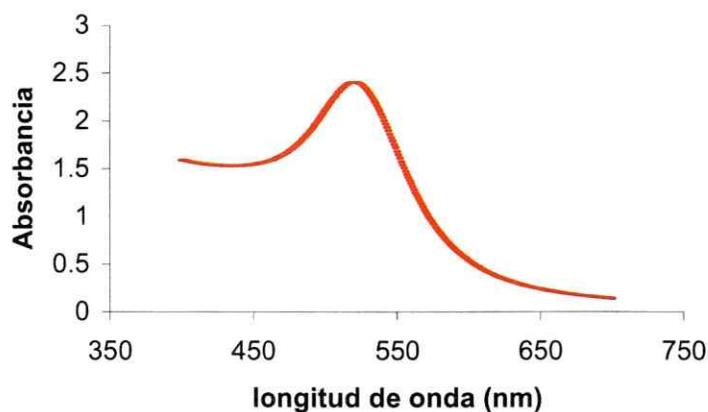


Figura 5: Curva de absorción en UV-Visible de AuNP, el máximo se observa a los 520 nm, lo cual indicaría que se tratan de AuNP de 10 nm de diámetro aproximadamente.

Caracterización por TEM y AFM: 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 6). Asimismo, AFM mostró nanopartículas con un diámetro de 11 nm (figura 7). Es importante mencionar que las muestras empleadas para la caracterización por AFM correspondieron a otros lotes de síntesis, pero siempre utilizando el mismo protocolo.

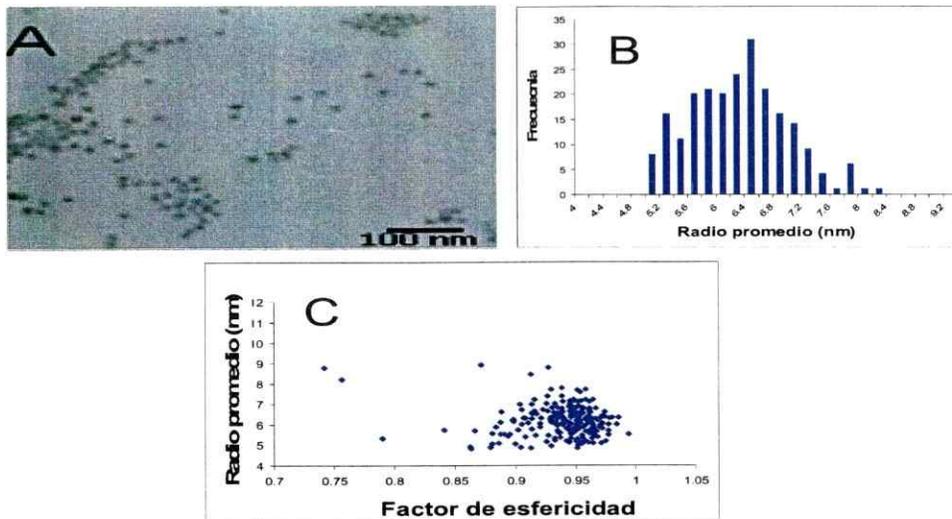


Figura 6: Caracterización de AuNP. A) Imagen de las nanopartículas tomada mediante TEM a 20000X. B) Histograma del radio promedio de las AuNP, obteniendo la frecuencia más alta a los 6,4 nm de radio. C) Grafico de factor de esfericidad versus radio promedio, el factor de esfericidad es igual a 1 cuando se trata de una circunferencia perfecta. En la mayoría de los caso los valores fluctúan entre 0,93 y 1 por lo que la mayoría de las AuNP sintetizadas poseen forma esférica.

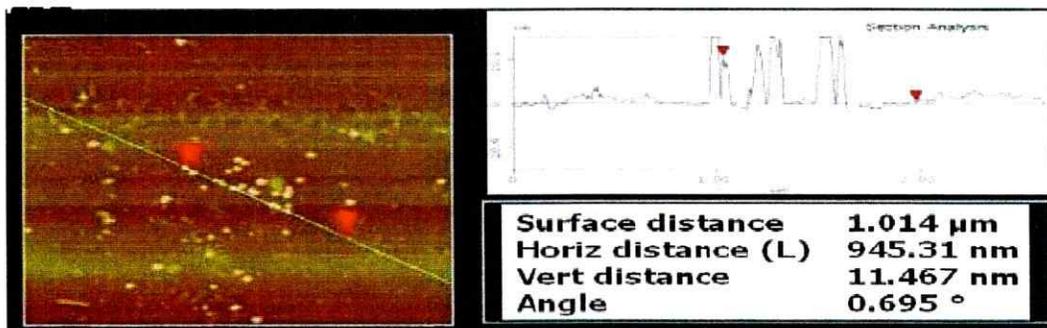


Figura 7: Imágenes topográficas de AFM de las AuNP, las cuales presentan un diámetro de 11 nm según los datos obtenidos.

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.

4.2. Síntesis de péptidos y caracterización de los conjugados

Los péptidos utilizados en este estudio se diseñaron a partir de los estudios realizados por Soto y colaboradores los cuales apuntan a la región 17-21 (17LVFFA21) de A β como el núcleo hidrofóbico a partir del cual se produce la autoagregación 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 β 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 β parecen jugar un papel importante en el reconocimiento e interacción A β -A β 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 β , la secuencia del péptido diseñado por Soto y col, contempló el reemplazo de este aminoácido por prolina, ya que su capacidad disruptora de configuraciones β por excelencia permite no sólo impedir la agregación de A β sin afectar el proceso de anclaje, sino también evitar la posible autoagregación del péptido diseñado o su participación como núcleo de agregación. Consecuentemente con lo anterior, estudios de estructura-actividad realizados con los péptidos desarrollados por Soto confirman que los aminoácidos prolina y fenilalanina ubicados en las posiciones 2 y 3 del péptido juegan un papel importante en la actividad de estos péptidos (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 β -A β 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 LPFFDNH₂, el cual fue denominado disruptor de laminas β .

Las características que presentan separadamente las AuNP y los péptidos disruptores de láminas β como LPFFDNH₂ podrían fusionarse a través de la conjugación de ambas sustancias permitiendo obtener un conjugado selectivo, estable, y con la capacidad de absorber y ceder la energía proveniente de un CMO a nivel local, donde la capacidad de absorber y ceder energía localmente estaría dada por las AuNP, la selectividad por A β estaría dada por el péptido LPFFDNH₂. 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

(Figura8).

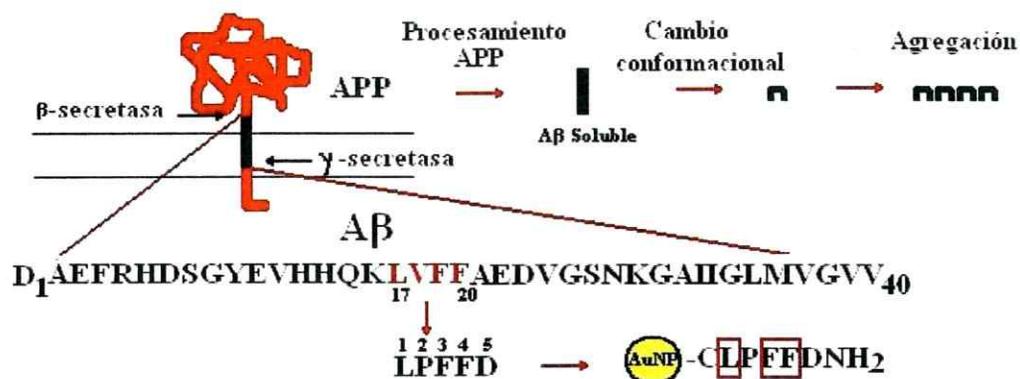


Figura 8: Representación esquemática del origen de los agregados de Ab. El reconocimiento entre el conjugado AuNP-INH y Aβ estaría dado por los aminoácidos encerrados en recuadros rojos.

Como se observa en la figura 9 la carga negativa del grupo carboxílico presente en el residuo aspártico a pHs cercanos al fisiológico puede conferir cargas negativas a las AuNP, y en consecuencia la estabilidad, al conjugar el péptido modificado CLPFFDNH2 (el cual denominaremos inhibidor) a éstas.

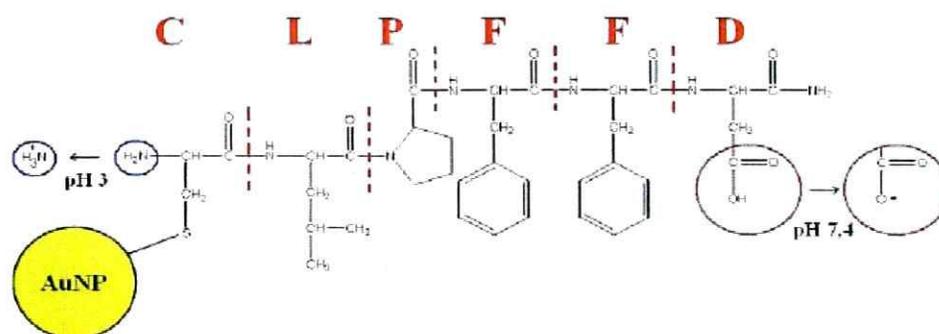


Figura 9: Representación de una AuNP conjugada a INH y las cargas esperadas a pH ácido y básico. Los círculos rojo y azul representan el lugar donde se espera la aparición de la carga negativa y positiva respectivamente.

La estabilidad de los conjugados presentes en condiciones fisiológicas determinará en gran medida el avance o retroceso que se logre en el desarrollo de esta nueva estrategia terapéutica. Por este motivo, en nuestro laboratorio se sintetizaron junto con el inhibidor (INH), otros 2 isómeros de este, los cuales solo difieren en la posición del aspartico. Las secuencias de los isómeros 1 (i1) y 2 (i2) son CDLPFFNH2 y CLPDDFFNH2 respectivamente. El estudio de la estabilidad y afinidad por A β de los conjugados con estos tres péptido ya fue comprobado, siendo parte de la Tesis de pregrado para la obtención del título de Químico Farmacéutico de Elías Medina (Medina, 2006.) Como ya se menciono anteriormente, este seminario de título tiene como objetivo realizar estudios de estabilidad y afinidad por A β de los mismos conjugados solo que en este caso, estos 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 acoplo un fluoroforo a nivel de la cisterna mediante un enlace peptídico entre el grupo amino del amino ácido y el carboxilo del fluoroforo, es por este motivo que se eligieron para el marcaje del péptido la Rodamina B, la cual emite fluorescencia roja y Carboxifluoresceína que emite fluorescencia verde (Figura 10).

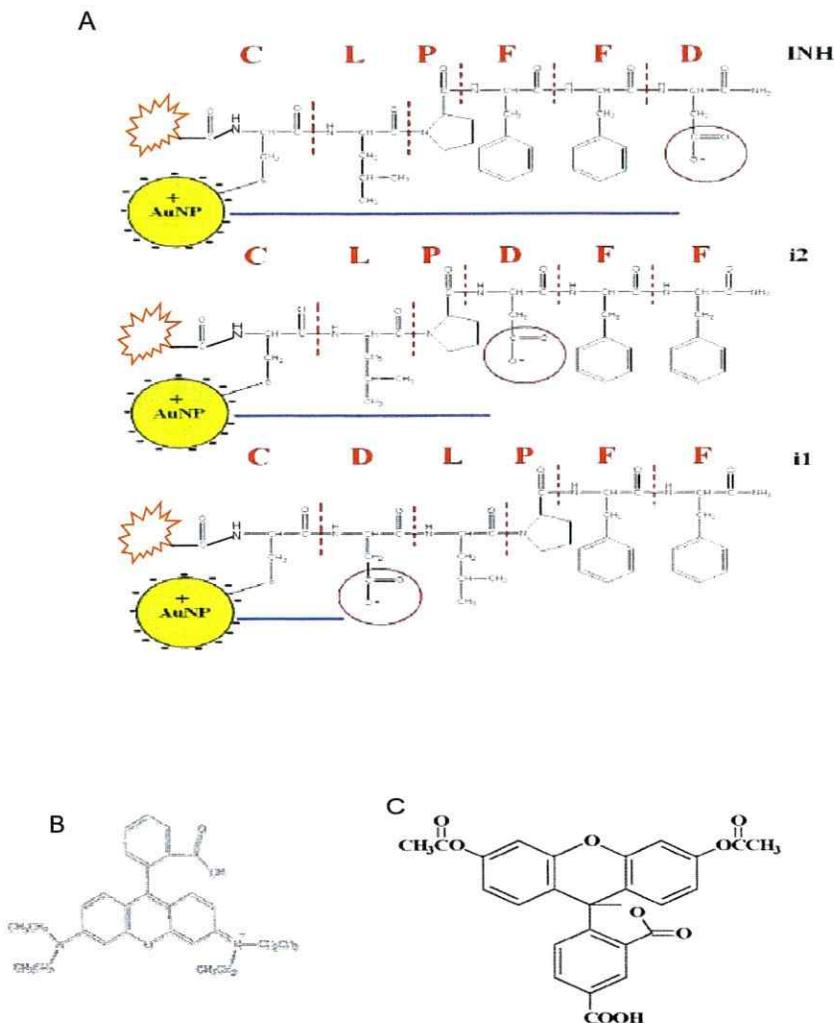


Figura 10: A) Representación teórica de las distancias (líneas azules) entre las cargas negativas de los distintos péptidos (INH, i2, i1) marcados con el fluoróforo y las cargas negativas de la superficie de las AuNP. A menor tamaño de las bandas azules mayor repulsión AuNP-Péptido y por tanto, mayor dificultad de interacción. B) Estructura molecular de la Rodamina B. C) Estructura molecular de la carboxifluoresceína. Ambos fluoróforos presentan un grupo COOH que permite su unión con el grupo NH₂ de la cisterna mediante un enlace peptídico.

La caracterización de conjugados AuNP-péptido representa un desafío por no existir protocolos bien establecidos, motivo por el cual se pusieron a punto protocolos utilizados en las áreas de bioquímica, síntesis de péptidos, y síntesis de AuNP.

Caracterización por espectrofotometría UV-Visible: 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 11), en el caso del conjugado AuNP-Inh-Rod se apreciaron máximos a 537 y a los 565,5 nm, el conjugado AuNP-i1-Rod presento sus máximos a 538,5 y 567 nm, y en cuanto al conjugado AuNP-i2-Rod, este presento sus máximos de absorbancia a los 535,5 y 565,5 nm.

En relación a los conjugados de AuNP con péptidos marcados con Carboxifluoresceina, estos también mostraron dos máximos de absorbancia (Figura 12), en el caso del conjugado AuNP-Inh-CF se observaron máximos a 467 y a 497 nm, el conjugado AuNP-i1-CF presento máximos a los 469 y 496,5 nm, y en cuanto al conjugado AuNP-i2-CF, este presento máximos a los 467 y 496 nm.

Este cambio en el máximo de absorción en los seis 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).

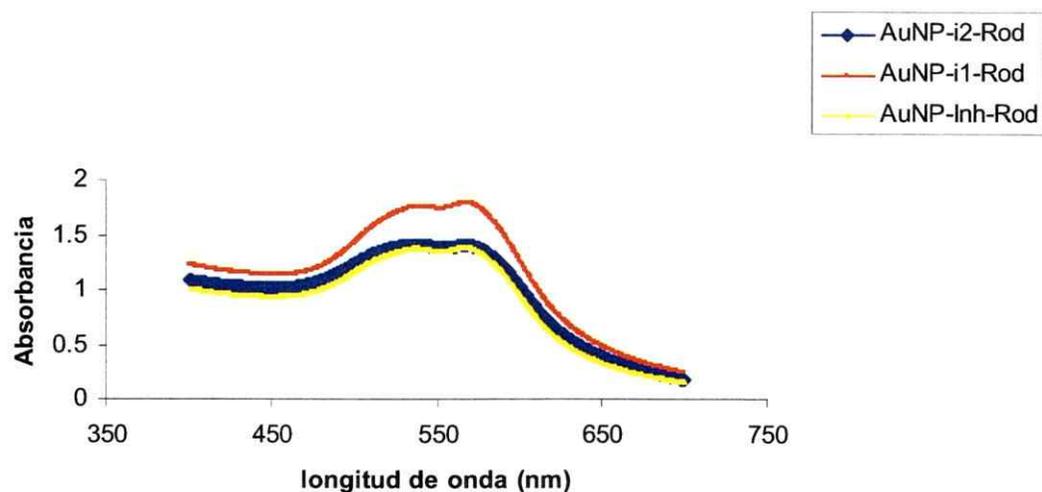


Figura 11: Curva de absorbancia UV-Visible de los conjugados marcados con Rodamina B. En los 3 espectros se observan máximos a los 536 y 567 nm aproximadamente, lo cual indicaría un cambio en la superficie de la partícula debido a la unión del péptido.

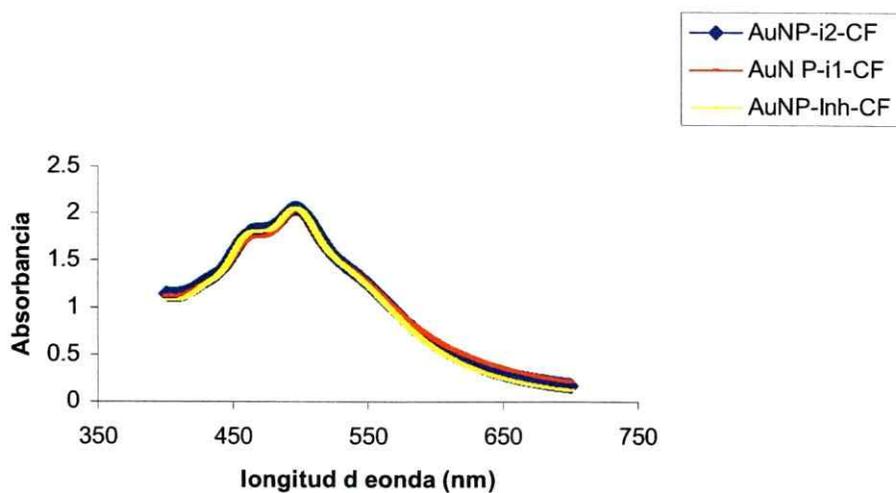


Figura 12: Curva de absorbancia UV-Visible de los conjugados marcados con carboxifluoresceína. En los 3 espectros se observan máximos a los 467 y 497 nm aproximadamente, lo cual indicaría un cambio en la superficie de la partícula debido a la unión del péptido.

Caracterización por TEM: Al analizar las imágenes de los 6 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 nm \pm 2 nm (Figura 13), en el caso de AuNP-i1-Rod fue de 13.2 nm \pm 1.8 nm (Figura 14) y en el caso de AuNP-i2-Rod fue de 10.2 nm \pm 2.1 nm (Figura 15). En cuanto a los conjugados marcados con CF se obtuvieron los siguientes diámetros: El de AuNP-Inh-CF fue de 13.2 nm \pm 1.2 nm (Figura 16), el de AuNP-i1-CF fue de 13.6 nm \pm 2.1 nm (Figura 17) y en el caso de AuNP-i2-CF fue de 13.6 nm \pm 1.6 nm (Figura 18).

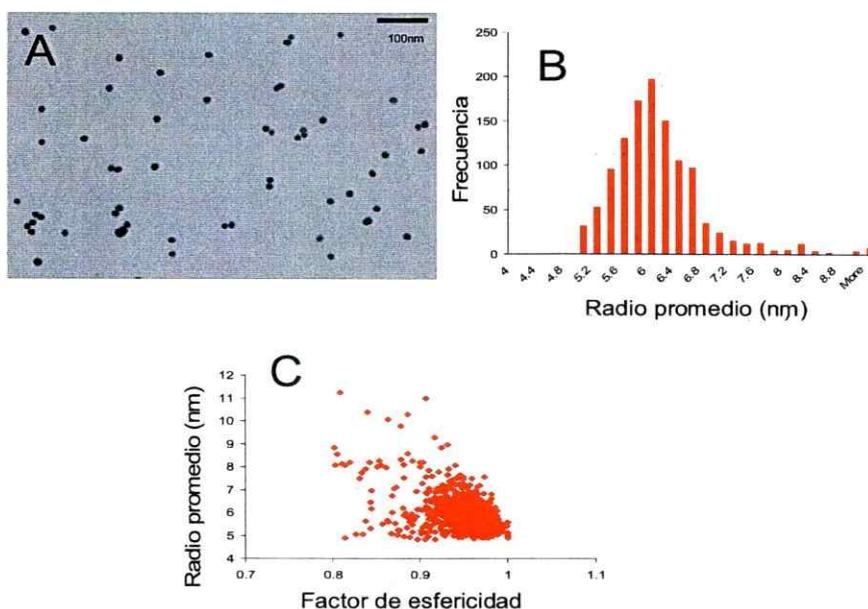


Figura 13: Caracterización conjugado AuNP-Inh-Rod. A) Imagen del conjugado tomada mediante TEM a 20000X. B) Histograma del radio promedio del conjugado, obteniendo la frecuencia más alta a los 6,2 nm de radio. C) Grafico de factor de esfericidad versus radio promedio, el factor de esfericidad es igual a 1 cuando se trata de una circunferencia perfecta. En la mayoría de los caso los valores fluctúan entre 0,9 y 1 por lo que las AuNP mantienen su esfericidad luego de ser conjugadas con Ihn-Rod.

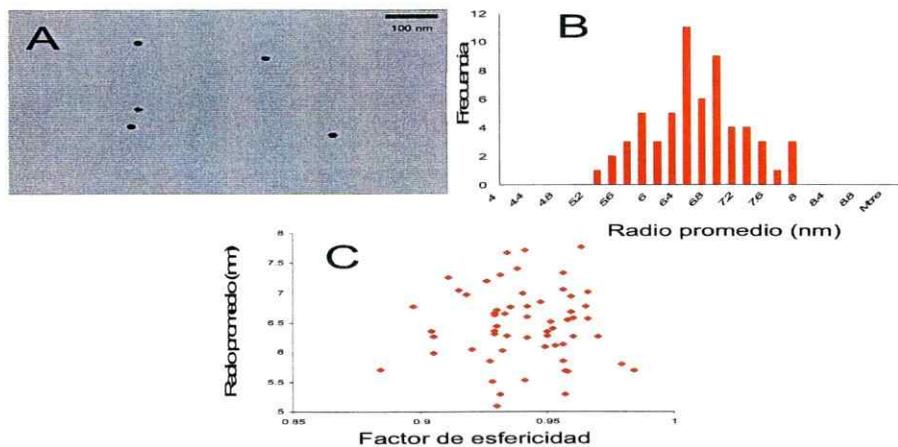


Figura 14: Caracterización conjugado AuNP-i1-Rod. A) Imagen del conjugado tomada mediante TEM a 20000X. B) Histograma del radio promedio del conjugado, obteniendo la frecuencia más alta a los 6,6 nm de radio. C) Grafico de factor de esfericidad versus radio promedio, el factor de esfericidad es igual a 1 cuando se trata de una circunferencia perfecta. En la mayoría de los caso los valores fluctúan entre 0,9 y 1 por lo que las AuNP mantienen su esfericidad luego de ser conjugadas con i1-Rod.

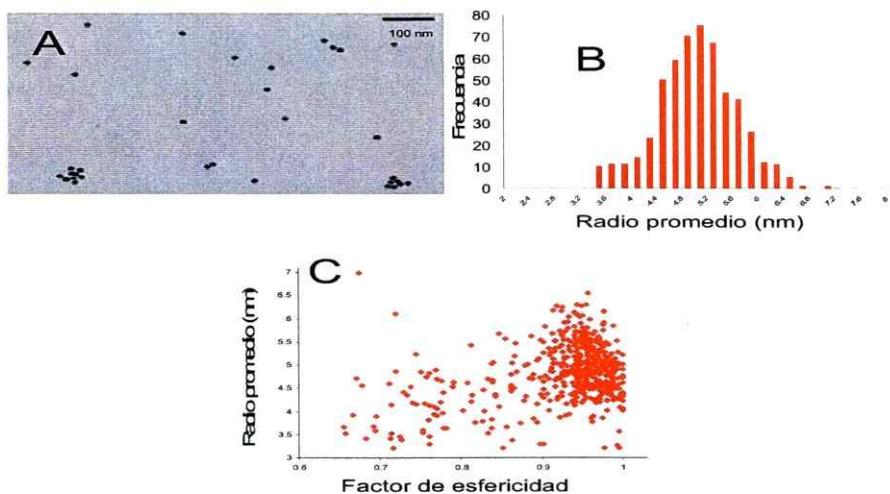


Figura 15: Caracterización conjugado AuNP-i2-Rod. A) Imagen del conjugado tomada mediante TEM a 20000X. B) Histograma del radio promedio del conjugado, obteniendo la frecuencia más alta a los 5,2 nm de radio. C) Grafico de factor de esfericidad versus radio promedio, el factor de esfericidad es igual a 1 cuando se trata de una circunferencia perfecta. En la mayoría de los caso los valores fluctúan entre 0,9 y 1 por lo que la mayoría de las AuNP mantienen su esfericidad luego de ser conjugadas con i2-Rod, sin embargo hay un numero importante de nanopartículas que presentan un factor d esfericidad cercanos a 0,7, lo que indica que han perdido sus características esféricas.

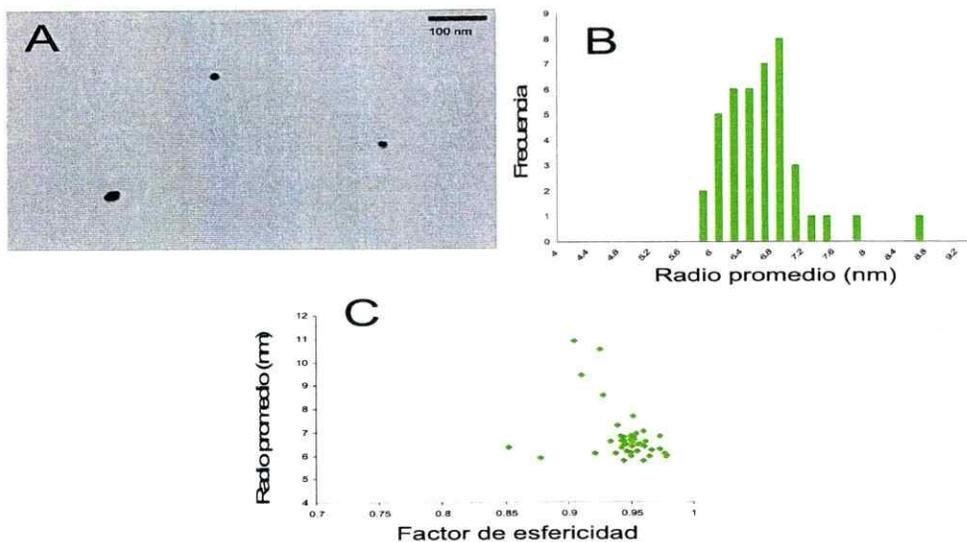


Figura 16: Caracterización conjugado AuNP-Inh-CF. A) Imagen del conjugado tomada mediante TEM a 20000X. B) Histograma del radio promedio del conjugado, obteniendo la frecuencia más alta a los 7,0 nm de radio. C) Grafico de factor de esfericidad versus radio promedio, el factor de esfericidad es igual a 1 cuando se trata de una circunferencia perfecta. En la mayoría de los caso los valores fluctúan entre 0,95 y 1 por lo que las AuNP mantienen su esfericidad luego de ser conjugadas con Ihn-CF.

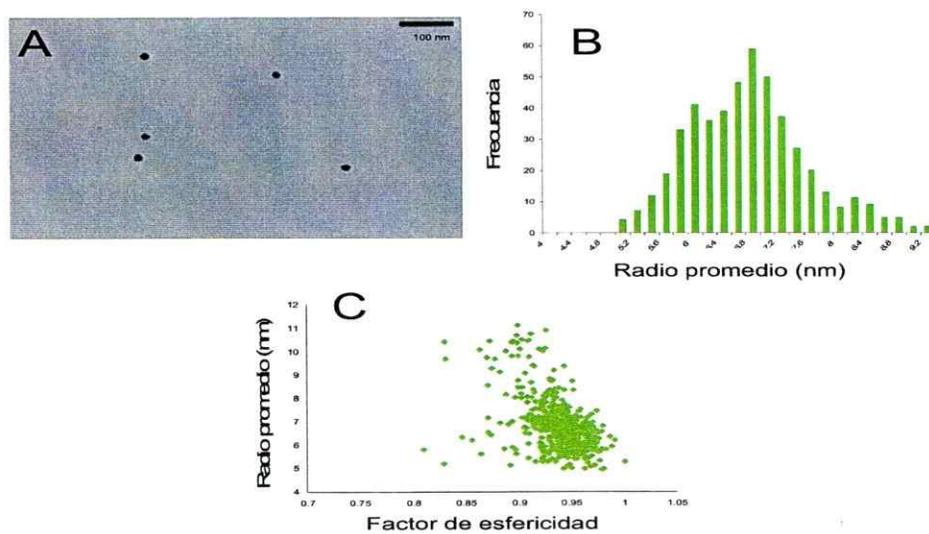


Figura 17: Caracterización conjugado AuNP-i1-CF. A) Imagen del conjugado tomada mediante TEM a 20000X. B) Histograma del radio promedio del conjugado, obteniendo la frecuencia más alta a los 7,0 nm de radio. C) Grafico de factor de esfericidad versus radio promedio, el factor de esfericidad es igual a 1 cuando se trata de una circunferencia perfecta. En la mayoría de los caso los valores fluctúan entre 0,93 y 1 por lo que las AuNP mantienen su esfericidad luego de ser conjugadas con i1-CF.

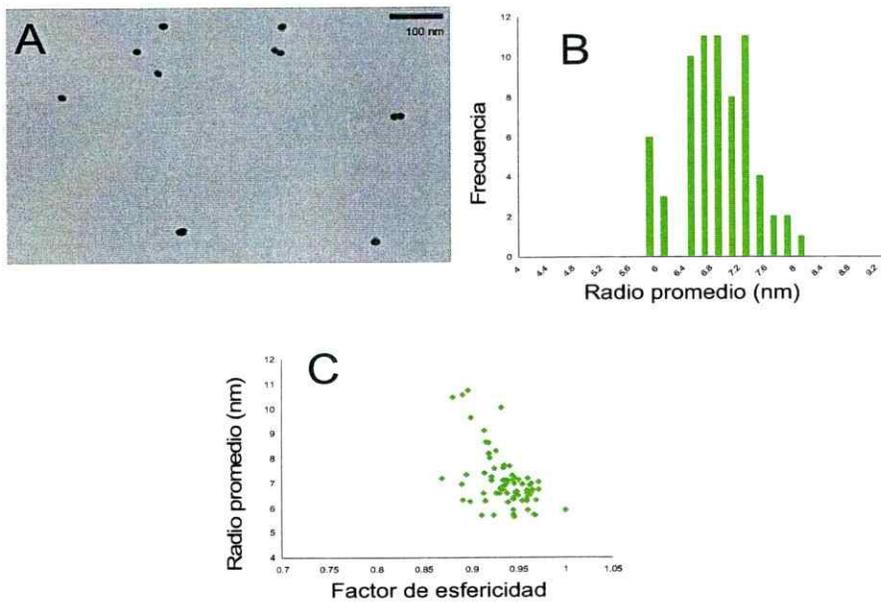


Figura 18: Caracterización conjugado AuNP-i2-CF. A) Imagen del conjugado tomada mediante TEM a 20000X. B) Histograma del radio promedio del conjugado, obteniendo la frecuencia más alta entre los 6,8 y 7,2 nm de radio. C) Grafico de factor de esfericidad versus radio promedio, el factor de esfericidad es igual a 1 cuando se trata de una circunferencia perfecta. En la mayoría de los caso los valores fluctúan entre 0,95 y 1 por lo que las AuNP mantienen su esfericidad luego de ser conjugadas con i2-CF.

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.

Electroforesis: Como se aprecia en la figura 19, los 6 conjugados migran hacia el polo positivo al ser sometidos a campos eléctricos. Esta movilidad electroforetica que se observa en los conjugados se debe a que los péptidos Inh, i1 e i2 poseen una carga

negativa producto de la pérdida del protón del grupo carboxilo (COO-) presente en el aspartico a ph 8 (condiciones de la corrida electroforética). En cambio las muestras de AuNP sin conjugar no migran debido que se agregan en las condiciones de corrida ya que dichos agregados quedan en la posición de siembra sin poder difundir a través de los poros del gel por sus grandes tamaños.

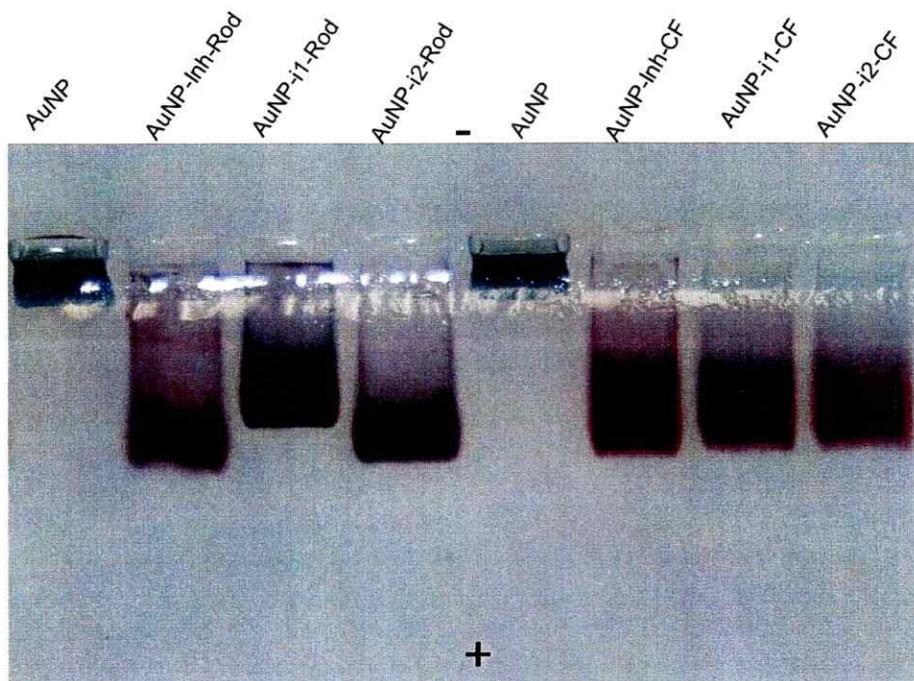


Figura 19: Electroforesis en gel de agarosa de AuNP y los respectivos conjugados marcados fluorescentemente con Rodamina B o Carboxifluorocina. Notese que los conjugados migran al polo positivo debido a la carga negativa presente en el COO- del aspartico.

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede concluir en forma general que la adición del fluoroforo al conjugado a nivel de la cisterna, no afecta la estabilidad de complejo ya que no se observa agregación ni precipitación con el tiempo, lo cual permitiría la utilización de estos conjugados para futuros estudios *ex vivo* e *in vivo*.

4.3 Interacción de AuNP-Péptido con A β ₁₋₄₂: La evaluación de esta interacción requiere de la elaboración de fibras de A β a partir de especies monoméricas solubles de este péptido, ya que de lo contrario, el ensayo es poco reproducible debido a que el A β adquirido en el comercio tiende a formar especies oligoméricas de bajo peso molecular durante su almacenamiento, que no necesariamente terminan formando fibras amiloides. Así, A β fue preparado de acuerdo a protocolos bien establecidos como el descrito por Zagorsky (Bitan y Temprow, 2005) en donde A β es tratado con sustancias que no afectan su estructura primaria, tales como el ácido trifluoracético y agentes desestructurantes como el hexafluorisopropanol, dando así lugar a la formación de la especie monomérica de A β .

Como antecedente del presente experimento solo se cuenta con la tesis de pregrado para obtener el título de Químico Farmacéutico de Elías Medina, en la cual él demostró la unión específica de los conjugados AuNP-Inh, AuNO-i1 e AuNP-i2 a fibras A β ₁₋₄₂, por lo que en este apartado se busca determinar si es que el fluoroforo afecta de alguna forma la unión entre los distintos conjugados y la fibras A β ₁₋₄₂. A diferencia del trabajo anterior en que solo se evaluó la interacción de los conjugados (sin fluoroforo) a fibras A β ₁₋₄₂, mediante la incubación del conjugado con el A β ₁₋₄₂ durante todo el proceso de formación de fibras (7 días), en este trabajo aparte de realizar ese mismo experimento con los conjugados de los péptidos marcados, también se estudio la interacción de los

conjugados con fibras maduras que luego de 7 días de crecimiento fueron incubadas por 48 horas con los mencionados conjugados.

En la figura 20 obtenida mediante TEM se puede apreciar que los seis conjugados en estudio presentan afinidad por las fibras $A\beta_{1-42}$ cuando son incubados durante todo el proceso de formación de fibras, en cambio no se aprecia esta interacción cuando las AuNP solas son incubadas durante todo el proceso de formación de fibras, lo cual indica que la interacción se debe a la presencia del péptido y no es debida a una interacción entre cargas opuestas entre las AuNP y las fibras, sin embargo como se expuso anteriormente es posible que esta interacción se vea facilitada por el proceso de formación de fibras en sí, lo cual podría producir un atrampamiento del conjugado entre las fibras que se están formando. Por lo tanto se realizó el mismo experimento solo con la diferencia que los conjugados fueron incubados durante 48 horas con fibras ya formadas, así de esta forma se elimina la posibilidad de que la interacción se vea facilitada por el proceso de formación de fibras. Al analizar los resultados arrojados por TEM (Figura 21) se aprecia de todas formas que los seis conjugados interaccionan con las fibras $A\beta_{1-42}$ ya formadas, a diferencia de las AuNP solas que no interaccionan con las fibras (Figura 21, imagen G), esto demuestra que la interacción conjugado fibra esta dada únicamente por la unión del péptido a la fibra.

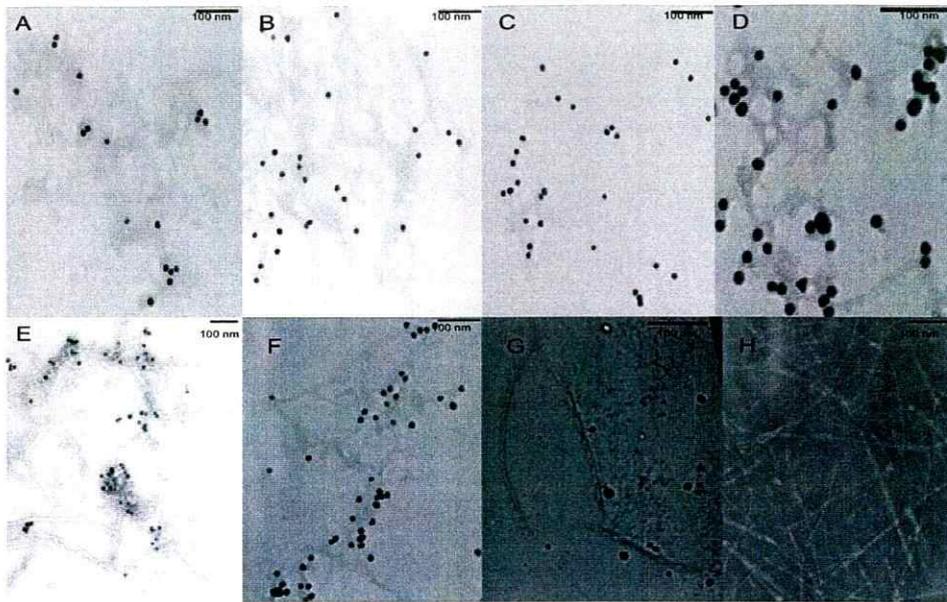


Figura 20: Interacción fibras $A\beta_{1-42}$ – conjugados incubados durante todo el proceso de formación de fibras (7 días). Cada imagen esta tomada con una magnificación de 20000X y dependiendo de la foto las fibras están interaccionando o no con: A) AuNP-Inh-ROD, B) AuNP-i1-ROD, C) AuNP-i2-ROD, D) AuNP-Inh-CF, E) AuNP-i1-CF, F) AuNP-i2-CF, G) AuNP y H) Fibras solas. Como se aprecia en la figura, todos los conjugados interaccionan con las fibras, en cambio las AuNP no, lo que indica que la interacción fibra-conjugado es a través de los péptidos.

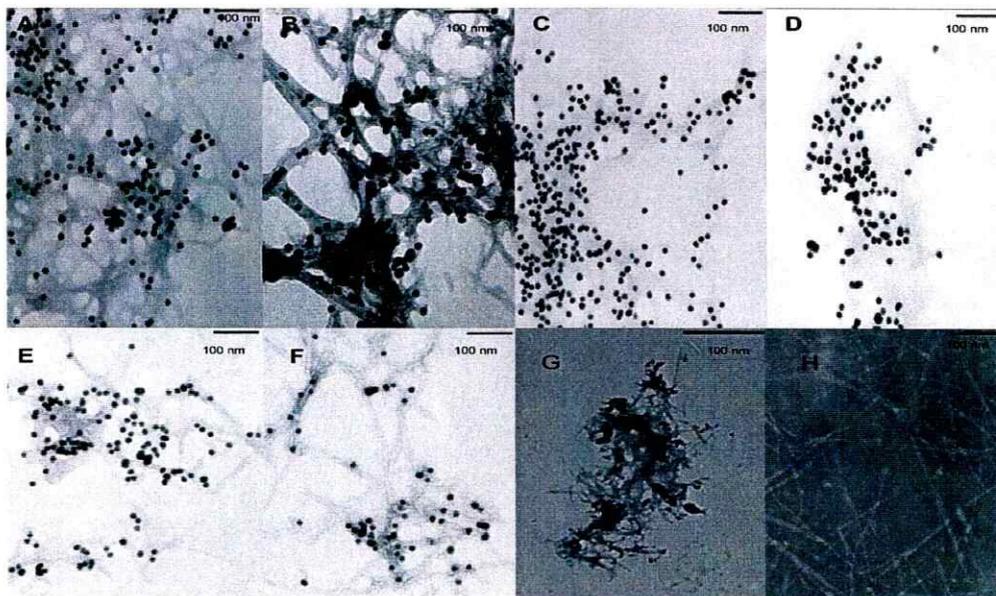


Figura 21: Interacción fibras $A\beta_{1-42}$ – conjugados incubados durante 48 horas una vez que las fibras ya estaban formadas. Cada imagen esta tomada con una magnificación de 20000X y dependiendo de la foto las fibras están interaccionando o no con: A) AuNP-Inh-ROD, B) AuNP-i1-ROD, C) AuNP-i2-ROD, D) AuNP-Inh-CF, E) AuNP-i1-CF, F) AuNP-i2-CF, G) AuNP y H) Fibras solas. Como se aprecia en la figura, todos los conjugados interaccionan con las fibras, en cambio las AuNP no, lo que indica que la interacción fibra-conjugado es a través de los péptidos.

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que el fluoroforo unido al péptido no afecta su interacción por las fibras $A\beta_{1-42}$, por lo que es posible utilizar estos conjugados en futuros estudios *ex vivo* e *in vivo*. Por otra parte, las AuNP conjugadas con los isómeros i1 e i2, tanto los marcados con rodamina como con CF, muestran también afinidad por las fibras de $A\beta_{1-42}$, sugiriendo que la afinidad de los isómeros de Inh no depende de la secuencia, sin embargo, habría que determinar el grado de unión de estos conjugados con las fibras amiloides, siendo este un tópico aún por explorar. Posiblemente la interacción de i1 e i2 (CDLPFFNH₂, CLPDDFFNH₂ respectivamente) se deba a la presencia de los residuos de leucina y fenilalanina que permiten la adhesión del péptido a las moléculas de $A\beta_{1-42}$ pertenecientes a las fibras amiloides, en especial en i1 que conserva la secuencia LPFF.

4.4 Biodistribución del conjugado AuNP-Inh-Rod en Ratas: Como ya se mencionó en los métodos, un primer paso para determinar la biodistribución de los conjugados fue inyectar vía intraperitoneal en ratas el conjugado AuNP-Inh-Rod, para posteriormente realizar un análisis cualitativo de la distribución mediante la observación de presencia de fluorescencia dada por la Rodamina B, y un análisis cuantitativo mediante la medición de la cantidad de oro presente en cada órgano.

En cuanto a los resultados cualitativos podemos observar en la figura 22 que en tanto en el cerebro como en el hígado y riñón se observa fluorescencia, lo cual indicaría que el conjugado es capaz de ingresar a estos tres órganos y permanece ahí por lo menos hasta 2 horas luego de la inyección. Como era de esperar y confirmando los antecedentes expuestos anteriormente (Moghimi y col., 1993), el conjugado tiende a concentrarse mayormente en el hígado ya que se observa una gran fluorescencia en el tejido hepático 1 y 2 horas luego de la inyección. En relación a los resultados observados en el riñón, se puede apreciar que tanto a la hora como a las 2 horas existe fluorescencia, siendo es mayor a la hora lo que indicaría que existe una disminución progresiva de la cantidad de conjugado en el órgano a las 2 horas. En el caso del cerebro, se aprecia fluorescencia tanto a la hora como a las 2 horas de haber inyectado el conjugado, sin embargo es mucho menor que en el resto de los tejidos, lo cual era lo esperado según los antecedentes, sin embargo lo importante es que un porcentaje no despreciable del conjugado es capaz de cruzar la BHE e ingresar al cerebro.

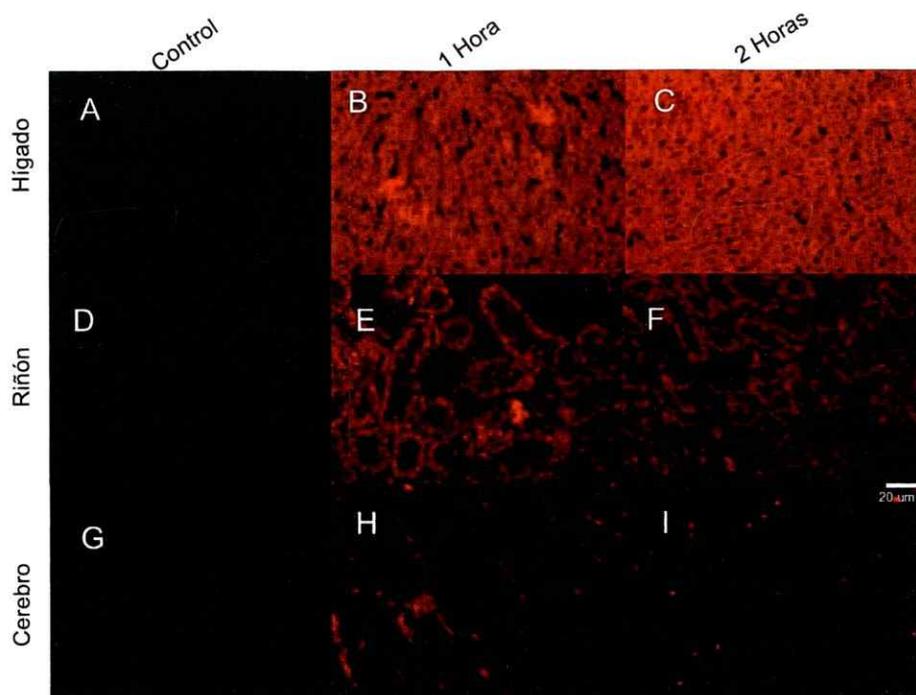


Figura 22: Análisis cualitativo de biodistribución y cruce de la BHE. En los tres órganos se aprecia fluorescencia tanto a la hora como a las 2 horas luego de la inyección, la cual es debida a la rodamina unida a la cisteína del péptido, lo que indica la presencia del conjugado en los tejidos. Las imágenes fueron tomadas a una magnitud de 40X.

La figura 23, muestra la relación masa de oro/ Kg de tejido en función del tiempo luego de la inyección. Se aprecia que en los tres órganos existe un incremento de la cantidad de oro en relación al tiempo luego de la inyección, confirmando los resultados cualitativos mencionados anteriormente. Al igual que el experimento anterior y confirmando antecedentes previos, el hígado es el órgano que presenta mayor concentración de conjugados. Los resultados obtenidos en riñón muestran una mayor cantidad de conjugado comparado al cerebro, sin embargo esta diferencia no parece significativa como hubiésemos esperado en base a los estudios cualitativos. Posiblemente esto es debido a que la concentración de conjugado inyectada es muy baja (Inanomolar) por lo que la cantidad de oro en los órganos es muy cercana al límite de

detección. A pesar de esto es posible demostrar la presencia de conjugados de oro en el cerebro de las ratas, por lo tanto este complejo debiera tener la capacidad de atravesar al BHE.

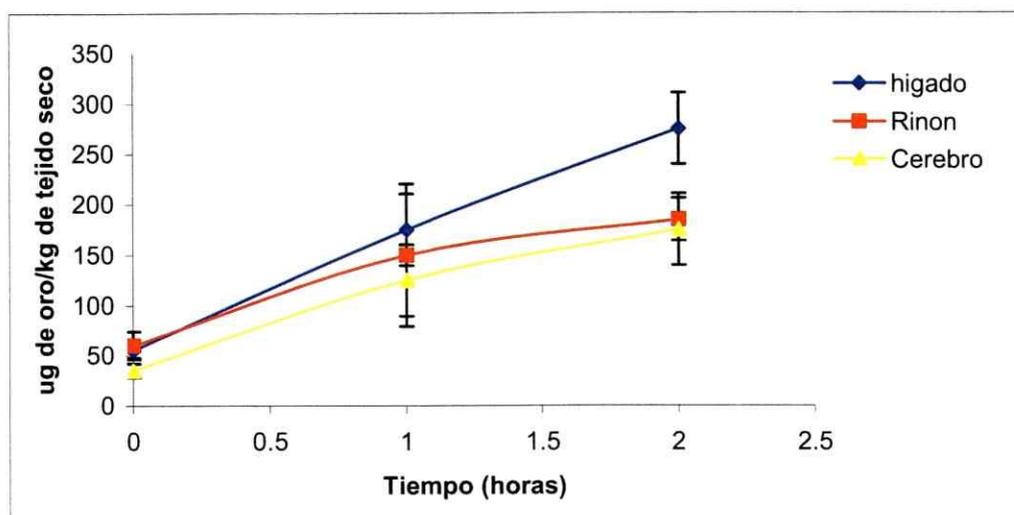


Figura 23: Grafico μg de oro/ Kg de tejido versus el tiempo luego de la inyección. En los tres órganos se aprecia un aumento de oro luego de la inyección del conjugado, como es de esperar la concentración es mayor en el hígado. La cantidad de oro es muy similar en el riñón y el cerebro.

4.5 Biodistribución y paso a través de la BHE de AuNP- CYI¹²⁵:

Este experimento al igual que el anteriormente descrito, busca determinar la biodistribución de las nanopartículas en diversos órganos y su paso a través de la BHE. En este caso específico aparte de de las mediciones de biodistribución y paso de las AuNP a través de la BHE, se analizó los niveles de radioactividad en el suero y la sangre utilizando nanopartículas asociadas a un pequeño peptido radioactivo. Esto último nos

permite determinar si las células sanguíneas fagocíticas incorporan las nanopartículas lo cual constituye un gran problema para este proyecto. Según los antecedentes disponibles, la cantidad de nanopartículas que interacciona con las células sanguíneas es muy baja, y solo un porcentaje pequeño penetra a estas células mediante un mecanismo que no se a determinado aun, distinto a la fagocitosis y endocitosis (Rothenruthshauser y col, 2006; Huang y col, 2005).

Para realizar el marcaje con radioactividad de la AuNP-CY se utilizo el método de Cloramina T descrito por Greenwood y colaboradores en 1963, el cual se basa en el uso de la cloramina T como agente oxidante del [I125] Ioduro de Sodio, lo que produce un desplazamiento del grupo OH- de la tirosina por parte del I^{125} (Figura 24).

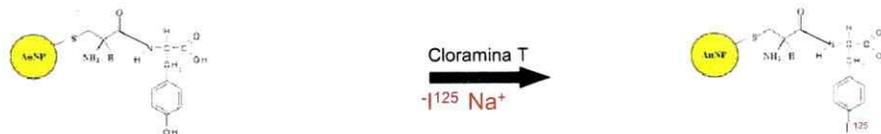


Figura 24: La presente figura esquematiza el método de Cloramina T, la cual oxida el Ioduro de Sodio desplazando el OH⁻ de la tirosina mediante la formación de NaOH permitiendo al I¹²⁵ ocupar su lugar.

Al analizar los resultados de la figura 25 la cual muestra la relación tejido/suero, obtenido a partir de la división de los valores de cpm por gramos cuantificados en cada órgano y los valores de cpm por μ L de suero, versus el tiempo de exposición luego de la inyección, se puede observar que en los 6 órganos hay presencia de radioactividad. La relación tejido/suero nos permite asegurar que la radioactividad medida se encuentra en el órgano y no en los vasos sanguíneos que lo rodean.

Los órganos en los cuales se cuantificó mayores niveles de radioactividad fueron el hígado y el bazo, con la diferencia que en el hígado la radioactividad medida se mantuvo constante en los últimos puntos mientras que en el bazo, éste mantuvo un aumento progresivo de la radioactividad en el tiempo. En cuanto al riñón y el pulmón, estos órganos presentan de igual forma altos niveles de radioactividad, la cual en ambos casos alcanza su máximo aproximadamente a los 13 minutos de exposición, para luego comenzar a decaer. Por último en el caso del corazón y del cerebro, en ambos órganos los niveles de radioactividad medidos fueron menores en comparación al resto pero de todas formas presentan niveles mayores. La radioactividad medida en el corazón alcanzó un máximo a los 5 minutos para luego disminuir manteniéndose constante en los últimos puntos. En el caso específico de cerebro, éste al ser el órgano blanco en una futura terapia por lo tanto el más importante en nuestro estudio será analizado por separado utilizando la figura 26.

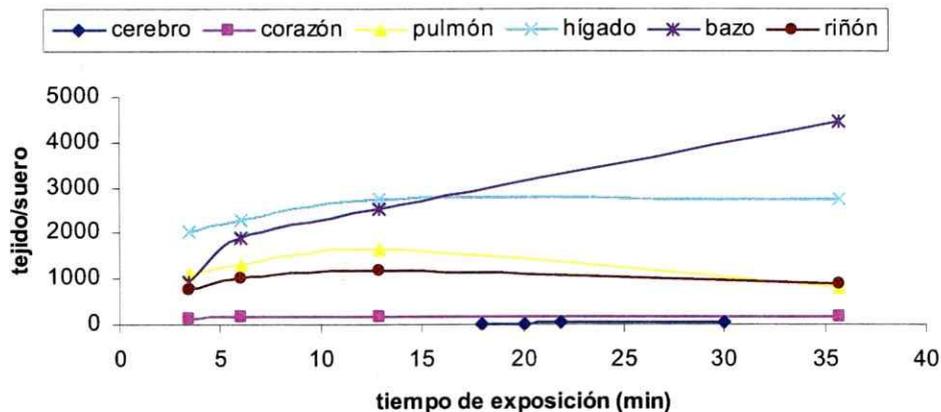


Figura 25: Este grafico indica la radiación presente en cada órgano, luego de distintos tiempos de exposición después de haber inyectado las nanopartículas radioactivas. La radioactividad final fue calculada empleando la relación tejido/suero para así asegurar que la medición correspondiera solo a las nanopartículas que ingresaron al órgano y no aquellas que se encuentran en los vasos sanguíneos alrededor de éste.

Como se aprecia en la figura 26 hay un aumento progresivo de la radioactividad en el cerebro, lo cual indica que las AuNP son capaces de atravesar la BHE y permanecen en el cerebro por un tiempo considerable.

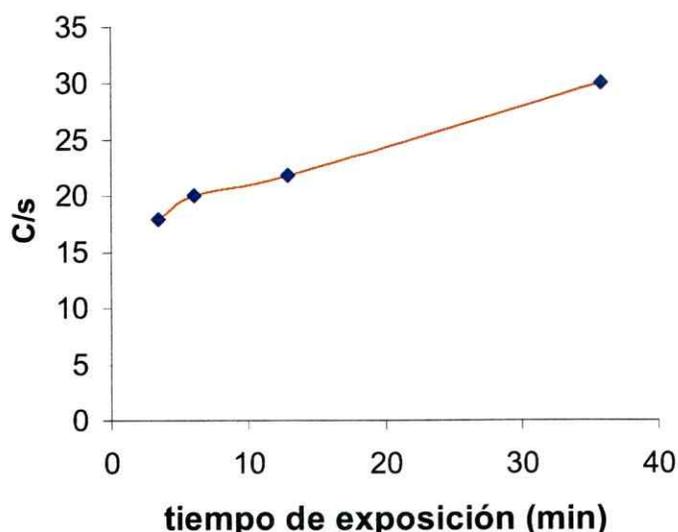


Figura 26: Valores de radioactividad de la relación cerebro/suero versus el tiempo de exposición luego de la inyección. En el gráfico se observa un aumento de los valores de C/s a mayores tiempos de exposición lo que indica que existe acumulación de nanopartículas en el cerebro, por lo tanto éstas debieran ser capaces de atravesar la BHE.

Como se mencionó en los anteriormente es muy importante determinar si las AuNP se unen o no de alguna u otra forma a las células sanguíneas o permanecen libres en el suero sanguíneo, para responder a esta pregunta se determinó el porcentaje de radioactividad según la dosis inyectada por mL de suero y de sangre total. Al analizar la figura 27 se puede apreciar que en todos los puntos medidos el porcentaje de radioactividad en el suero es mayor que en la sangre por lo que las AuNP permanecen en

su mayoría libres en el suero, si embargo, el aumento de la radioactividad en el suero en comparación a la sangre no es considerablemente mayor lo cual se debe posiblemente a que un porcentaje de las AuNP se une de alguna u otra forma a las células sanguíneas, pero estos valores están dentro de los márgenes esperados ya que es muy difícil que alguna droga o molécula no interaccionen con las células sanguíneas.

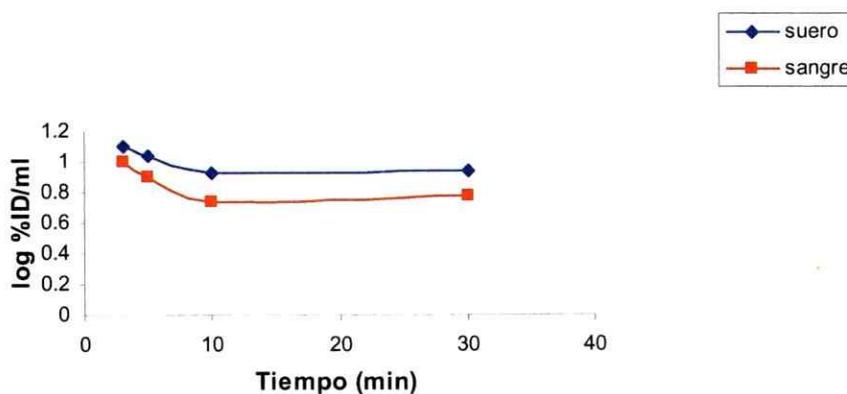


Figura 27: Logaritmo del porcentaje de la dosis inyectada por mL de sangre o suero versus el tiempo experimental luego de la inyección. Al analizar el grafico se puede apreciar que el porcentaje en el suero siempre es mayor en comparación a la sangre lo cual indica que las AuNP permanecen libres en su mayoría y no se unen de algún modo u otro a las células sanguíneas.

En resumen, la biodistribución tanto de las nanopartículas como de todo el conjugado, muestra que estas tienden a acumularse mayormente en el hígado y el bazo tal como está descrito en la literatura, y en menor medida en el resto de los órganos, especialmente en el cerebro donde la acumulación de estas partículas metálicas es muy baja. Por lo tanto será necesario en un futuro buscar una estrategia para disminuir la acumulación de estas partículas en órganos no deseados y aumentarla en el órgano blanco siendo este caso el cerebro.

5. DISCUSION.

El análisis de los resultados muestra que los 6 conjugados en estudio tienen la capacidad de unirse a las fibras A β , a través de una interacción específica tanto con el péptido inhibidor como con los isómeros. Esta interacción se produce en la región hidrofóbica del dominio N-terminal de la proteína A β (aminoácidos 17-21: LVFFA), la cual es clave en la formación de la estructura β 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 β dificultando la formación de fibras (Hilbich y col, 1992). Respaldo lo anteriormente mencionado, estudios de modelamiento molecular de la interacción entre la estructura tri-dimensional del A β_{1-40} y el péptido inhibidor (sin la cisteína), sugieren que este péptido interactúa de forma antiparalela con un bolsillo hidrofóbico en el dominio central del A β .

Tomando en cuenta que los tres péptidos utilizados son capaces de interactuar con las fibras, sin importar la posición del Aspartato en el péptido, por lo que es posible señalar, que esta interacción hidrofóbica no está mayormente condicionada a la secuencia del péptido sino más bien a la naturaleza de los aminoácidos que lo componen. Existen varios resultados que sugieren que la Prolina y la fenilalanina, juegan un rol fundamental en la actividad disruptora de lamina β del péptido inhibidor. Anteriormente ya se había demostrado que la secuencia 17-21 del A β y en particular la fenilalanina en la posición

19 (equivalente a la Phe³ del inhibidor, sin considerar a la cisterna), son indispensables para la interacción A β -A β y la formación del amiloide. (Soto y col, 1995; Hilbich y col, 1992; Tjemberg y col 1996; Wood y col, 1995). Es sabido que tanto las dos fenilalaninas como la leucina son responsables de la de la afinidad del péptido por el A β , y como ya se mencionó la prolina no juega un rol fundamental en la unión del péptido al A β , pero es muy importante en la actividad inhibidora de la formación de fibras que posee el péptido inhibidor. Por lo tanto, debido a que la unión del petido a la fibra esta dada preferentemente por la presencia de los aminoácidos fenilalanina y leucina en los péptidos, la adición de la cisteina en el extremo amino no afecta la interacción péptido-fibra.

En el caso específico de este seminario de titulo uno de los objetivos fue determinar si la adición de un determinado fluoroforo al conjugado impediría de alguna forma la unión de todo el complejo a las fibras A β . En relación a esto, uno de los posibles problemas a los cuales nos podíamos enfrentar era la posibilidad de que tanto la Rodamina B como la Carboxifluorosceina inhibieran la interacción mediante impedimento estérico, es decir, debido al tamaño de estos fluoroforos, 443 y 520 gr/mol respectivamente, podrían interponerse entre el péptido (740,89 gr/mol) y las fibras de A β , lo cual no es así según los resultados obtenidos, posiblemente debido a que los fluoroforos unidos al grupo amino de la cisteina a través de un enlace peptídico no son lo suficientemente grandes para "bloquear" a las dos fenilalaninas que se encuentran en el otro extremo del péptido y como ya se dijo son los aminoácidos que otorgan la afinidad del péptido por las fibras A β .

En relación a la estabilidad del conjugado, esta no se vio afectada por la presencia del fluoróforo, ya que como se puede ver en las imágenes obtenidas mediante TEM, las nanopartículas se mantienen sin agregarse (Figura 20 y 21) presentando una carga neta negativa dada por el aspartato desprotonado, lo cual se puede apreciar en la figura 20. Por lo tanto, de acuerdo a lo discutido hasta ahora, los conjugados marcados tanto con Rodamina B como con Carboxifluoresceína podrán ser utilizados para futuros estudios *ex vivo* e *in vivo*.

Desde luego el uso de estos fluoroforos es solo para facilitar posteriores estudios *ex vivo* e *in vivo* que nos permitan determinar la biodistribución del conjugado, su paso a través de la BHE y por supuesto su afinidad por placas amiloides. Específicamente, es este último punto el que le otorga la importancia a este estudio, ya que en futuros estudios *in vivo* de especificidad del conjugado por las placas amiloides, hay que descartar de antemano que el fluoroforo afecte dicha interacción.

En cuanto a los experimentos de biodistribución realizados en la presente memoria, se observó acumulación de nanopartículas, tanto de las marcadas con Rodamina como con I125, 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, está relacionado de cierta forma al proceso de opsonización

que ocurre en la sangre, donde las nanopartículas son recubiertas con proteínas opsoninas, haciéndolas más 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 fagocíticas no podrían reconocer a estas partículas como un agente extraño.

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, siendo este último punto parte de futuros estudios.

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; Hunter y Moghimi, 2002). Por lo tanto, no es posible predecir la biodistribución que presentaran las AuNP de 10 nm y menos del conjugado debido a los antecedentes ya mencionados, además no existen estudios concluyentes que indiquen una tendencia de biodistribución y cruce de la BHE por parte de las partículas utilizadas en este proyecto.

Como se vio en los resultados del apartado 4.4 y 4.5, la cantidad de conjugado marcado con rodamina B como la de nanopartícula marcada con I125 respectivamente, que llego finalmente al cerebro es muy baja, lo cual se debe principalmente a que las AuNP son captadas por el sistema reticuloendotelial u opsonizadas , por lo que se hace necesario para la mejora de este proyecto buscar una forma de evitar la acción fagocítica del sistema reticuloendotelial y del proceso de opsonización. Desgraciadamente no existen métodos que sean capaces de evitar el proceso de opsonización y a la acción del sistema reticuloendotelial por completo, pero en los últimos 30 años se han desarrollado técnicas que permiten enlentecer estos procesos (Roser y col, 1998).

Estudios han demostrado que partículas neutras están menos expuestas al proceso de opsonización y a la acción del sistema retículoendotelial, en comparación a las partículas cargadas (Roser y col, 1998), por lo que un método muy usado para disminuir la acción de estos procesos, se basa en la fijación por absorción de grupos que bloqueen las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas a la superficie de la partícula. Dentro de todos los grupos testeados, el que presenta mayor efectividad es el polietilenglicol, PEG, el cual es un polímero muy flexible y altamente hidrofílico, que es capaz de proteger a partículas hidrofóbicas o cargadas de la acción de las proteínas presentes en la sangre. El PEG hidrata a la partícula mediante la atracción de agua, formando una capa que evita la adhesión de opsoninas y que protege a la partícula de la acción del sistema retículoendotelial. Tomando en cuenta estudios que indican que a 24 horas de haber inyectado partículas con PEG, solo el 40% de éstas se encontraron en el hígado y que en el caso de las partículas sin PEG un 90% del total se encontraba en el hígado solo 3 minutos después de haberlas inyectados (Peracchia y col, 1999), es altamente necesario que en una próxima etapa del proyecto se realicen estudios *in vivo* utilizando conjugados que también posean el polímero PEG.

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 de fluorescencia dada por la Rodamina B o la cuantificación de radiactividad del I^{125} unido a la tirosina o directamente mediante la cuantificación de oro por ICP-MS, demuestra que este tipo de nanopartículas es capaz de atravesar la BHE.

La base principal de la BHE son las células endoteliales especializadas en la microvasculatura cerebral, las cuales interactúan con la glía. 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 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 cincunventriculares, 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.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la presente memoria, los objetivos propuestos se cumplieron totalmente, ya que se determinó *in vitro*, que los conjugados AuNP-peptido, luego de ser marcados con un fluoroforo como la Rodamina B o la Carboxifluoresceína, mantienen su estabilidad y afinidad por fibras A β . En relación a los conjugados utilizados en este estudio, será necesario realizar experimentos *in vitro* que permitan determinar cuantitativamente cual de estos es el que se une mejor a las fibras A β obtenidas comercialmente y experimentos en cortes de cerebro de ratón doble

transgenico con la capacidad e formar placas amiloides que nos permitan también determinar cual es el mejor conjugado mediante medición de la fluorescencia dada por el fluoroforo.

Una vez que se haya determinado cual de los conjugados presenta mayor afinidad por las fibras A β , se podrán realizar estudios más minuciosos de biodistribución los cuales se verán facilitados por la presencia del fluoroforo. De todos modos también será necesario realizar mas estudios de biodistribucion utilizando otro tipo de técnicas que nos permitan cuantificar solo las AuNP sin ser conjugadas, ya que en la actualidad no existe un estudio serio sobre la biodistribución de estas nanopartículas y su paso a través de la BHE.

Por ultimo es importante recalcar, que gracias a los resultados obtenidos en la primera parte de este seminario de titulo se pudo avanzar a una segunda etapa del proyecto, involucrando experimentos *in vivo* los cuales arrojaron resultados muy prometedores.

Los mencionados resultados establecen las bases para el desarrollo de nuevas estrategias que emplean herramientas nanotecnológicas en el potencial diagnostico y terapia de la EA

6. Conclusión.

- Los conjugados marcados con Rodamina B o Carboxifluoresceína mantienen su estabilidad en la fase coloide.
- Los conjugados con Rodamina B o carboxifluoresceína son capaces de unirse específicamente a las fibras A β .
- El conjugado AuNP-Inh-Rod es capaz de cruzar la BHE.
- AuNP marcada radiactivamente logra atravesar la BHE.

7) 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, Minthon L, Clarberg A, 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, Terajima M, Miura M, et al, 1995. Tau in cerebrospinal fluid: a potential diagnostic marker in Alzheimer’s disease. *Ann Neurol*; **38**:649-652.
- 6) Bacskai BJ, Kajdasz ST, Christie RH, 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, Hickey GA, Skoch J, 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 USA*; **100**: 12462–67.
- 8) Benveniste H, Einstein G, Kim KR, Hulette C, Johnson GA. Detection of neuritic plaques in Alzheimer’s disease by magnetic resonance microscopy. 1999. *Proc Natl Acad Sci USA*; **96**: 14079–84.
- 9) BIELER S., Soto C. 2004. Beta-Sheet breakers for Alzheimer’s disease therapy. *Curr. Drug Targets*, **5** (6): 553-558.
- 10) Bitan G., Templov D.B. 2005. Preparation of aggregate-free, low molecular weight amyloid-b for assembly and toxicity assays. En: SINGURDSSON E.M. *Amyloid Proteins: Methods and protocols*. U.S.A. Humana Press. pp. 3-9. Blasberg, R. G., Fenstermacher, J. D. & Patlak, C. S. 1983 *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., Astruc D. 2004. Gold Nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, quantum size-related properties, and

- applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chem. Rev.*, 104 (1): 293-346.
- 15) Dickson, D. W., 2004, Apoptotic mechanisms in Alzheimer neurofibrillary degeneration: 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., Chen S., Gao Y., 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, Palmer AM, Sims NR, et al, 1985.. Neurochemical studies of early-onset Alzheimer's disease. Possible influence on
 - 20) treatment. *N Engl J Med*; 313:7-11.
 - 21) Friedland RP, Majocha RE, Reno JM, Lyle LR, Marotta CA. 1994. Development of an anti-A beta monoclonal antibody for in vivo imaging of amyloid angiopathy in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*; 9: 107-13.
 - 22) Gagliardi, R. J. 2000. Neuroprotection, excitotoxicity and NMDA antagonists. *Arq. Neuropsiquiatr.* 58, 583-588
 - 23) 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. U. S. A.* 102, 2273-2276.
 - 24) Goldgaber, D., Lerman, M. I., Mc Bride, O. W., Sulfflotti, V. and Gajdurck, D. C., 1987, Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease, *Science.* 235 (4791), 877-80.
 - 25) Gref, R., Domb, A., Quellec, P., Blunk, T., Muller, R.H., Verbavatz, J.M., Langer, R., 1995. The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 16, 215-233.
 - 26) Hardy, J., Allsop, D., 1991, Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 12, 383-388.
 - 27) 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.
 - 28) 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.
 - 29) Hilbich, C., Kisters-Woike, B., Reed, J., Masters, C.L., and Beyreuther, K., 1992,

- 30) Substitutions of hydrophobic amino acids reduce the amyloidogenicity of Alzheimer's disease beta A4 peptides. *J. Mol. Biol.* **228**: 460-473.
- 31) Hock, C., Konietzko, U., Streffer, J. R., Tracy J., Signorell, A., Muller-Tillmanns, B., Lemke, U., Henke, K., Moritz, E., Garcia, E., et al., 2003, Antibodies against beta-amyloid slow cognitive decline in Alzheimer's disease. *Neuron*. **38**:547-554.
- 32) Huang, M. Wu, W. Qian, J. Wan, D. Zhu, J. 2005. Body distribution and in situ evading of phagocytic uptake by macrophages of long-circulating poly (ethylene glycol) cyanoacrylate-co-n-hexadecyl cyanoacrylate nanoparticles. *Acta Pharmacologica Sinica*, **26** (12): 1521-1518.
- 33) Illum, L., Davis, S.S., Muller, R.H., Mak, E., West, P., 1987. The organ distribution and circulation time of intravenously injected colloidal carriers sterically stabilized with a blockcopolymer—Poloxamine 908. *Life Sci.* **40**, 367-374.
- 34) Kang, J., Lemaire, H. G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K. H., Multhaup, G., Beyreuther, K., and Muller-Hill, B., 1987, The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*, **325**, 733-736.
- 35) Kniesel, U., and Wolburg, H. 2000. Tight junctions of the blood-brain barrier. *Cell. Mol. Neurobiol.* **20**, 57-76.
- 36) Klunk WE, Bacsikai BJ, Mathis CA, 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.
- 37) KOGAN MJ "et al". 2006. Nanoparticle-Mediated Local and Remote Manipulation of Protein Aggregation. *Nano Lett.*, **6** (1): 110-115.
- 38) Kreuter, J. 2001. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **47**; 65-81.
- 39) LEVY R. "et al". 2004. Rational and combinatorial design of peptide capping ligands for gold nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.*, **126** (32): 10076-10084.
- 40) Link CD, Johnson CJ, Fonte V, 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.
- 41) Lockman, P. R., Mumper, R. J., Khan, M. A. & Allen, D. D. 2004. Nanoparticle technology for drug delivery across the blood-brain barrier. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **28**, 1-13
- 42) Maggio JE, Stimson ER, Ghilardi JR, et al, 1992. Reversible in vitro growth of Alzheimer disease beta-amyloid plaques by deposition of labeled amyloid peptide. *Proc Natl Acad Sci USA*; **89**: 5462-66.

- 45) Martin A. Colloids. En su: Physical Pharmacy. 4th edition. U.S.A., Lippincott Williams & Wilkins. pp. 393-422.
- 46) Medina, E. 2006. Tesis para obtener el titulo de Quimico farmaceutico.
- 47) Mendez MF, Mastri AR, Sung JH, Frey WH II, 1992. Clinically diagnosed Alzheimer disease: neuropathologic findings in 650 cases. *Alzheimer Dis Assoc Disord*; 6:35-43.
- 48) Mirra SS, Heyman A, McKeel D, et al. 1991, The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). PartII. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology*; 41:479-486.
- 49) Moghimi, S.M., 2002. Chemical camouflage of nanospheres with a poorly reactive surface: towards development of stealth and target-specific nanocarriers. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.* **1590**, 131-139.
- 50) Moghimi, S.M., Hedeman, H., Christy, N.M., Illum, L., Davis, S.S., 1993. Enhanced hepatic-clearance of intravenously administered sterically stabilized microspheres in zymosan-stimulated rats. *J. Leukoc. Biol.* **54**, 513-517.
- 51) Moghimi, S.M., Patel, H.M., 1988. Tissue specific opsonins for phagocytic cells and their different affinity for cholesterol-rich liposomes. *FEBS Lett.* **233**, 143-147.
- 52) 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
- 53) Nam, J.M. *et al.* (2003) Nanoparticle-based bio-bar codes for the ultrasensitive detection of proteins. *Science* **301**, 1884-1886.
- 54) Näslund J, Haroutunian V, Mohs R, *et al*, 2000. Correlation between elevated levels of amyloid beta peptide in the brain and cognitive decline. *JAMA*; **283**: 1571-77.
- 55) Nicoll, J., Wilkinson, D., Holmes, C., Steart, P., Markham, H., Weller, R. 2003. Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid- β peptide: a case report. *Nature Medicine.* **9**: 448-452
- 56) Panagi, Z., Beletsi, A., Evangelatos, G., Livaniou, E., Ithakissios, D.S., Avgoustakis, K., 2001. Effect of dose on the biodistribution and pharmacokinetics of PLGA and PLGA-mPEG nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **221**, 143-152.
- 57) PANKHURST Q.A. "et al". 2003. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J Phys DAppl. Phys.*, **36** (13): R167-R181.
- 58) Peracchia, M.T., Fattal, E., Desmaele, D., Besnard, M., Noel, J.P., Gomis, J.M., Appel, M., d'Angelo, J., Couvreur, P., 1999. Stealth PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles for intravenous administration and splenic targeting. *J. Control. Release* **60**, 121-128.
- 59) Price, D.L., Tanzi, R.E., Borchelt, D.R., and Sisodia, S.S., 1998, Alzheimer's disease: genetic studies and transgenic models. *Annu. Rev. Genet.* **32**: 461-493.

- 60) Refolo, L. M. And Fillit, H. M., 2004, Drug discovery for Alzheimer's disease: the end of the beginning, *J. Mol. Neurosci.* **24**, 1-8.
- 61) Roser, M., Fischer, D., Kissel, T., 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.
- 62) Rothen-Rutishauser, B. Schurc, S. Haenni, B. Kapp, N and Gehr, P. 2006. Interaction of fine particles and nanoparticles with red blood cells visualized with advanced microscopic techniques. *Environ. Sci. Technol.* **40**, 4353-4359.
- 63) 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.
- 64) Sarin, V. Kent, S. Tam, J. and Merrifield, R. 1982. Quantitative Monitoring of Solid -phase peptide synthesis by the Ninhydrin Reaction. *Analytical Biochemistry*, **117**, 147-157.
- 65) 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.
- 66) Scinto LF, Daffner KR, Dressler D, *et al*, 1994. A potential noninvasive neurobiological test for Alzheimer's disease. *Science*; **266**:1051-1054.
- 67) Selkoe, D. J., 1994, Alzheimer's disease: a central role for amyloid. *J. Neuropathol. Experim. Neurol.* **53**, 438-447.
- 68) Selkoe, D.J., 1997, Alzheimer's disease: genotypes, phenotypes, and treatments. *Science* **275**: 630-631.
- 69) Selkoe, D.J., 2000, The origins of Alzheimer disease - A is for amyloid. *Jama: Journal of the American Medical Association* **283**: 1615-1617.
- 70) Simons, K. and Ehehalt, R., 2002, Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J Clin Invest.* **110**(5), 597-603.
- 71) Selkoe, D. J., and Podlesny, M. B., 2002, Deciphering the genetic basis of Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Genomics. Hum. Genet.* **3**, 67-99.
- 72) Shenai, M. B. *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.
- 73) SHIPWAY A.N. "et al". 2000. Investigations into the electrostatically induced aggregation of Au nanoparticles. *Langmuir*, **16** (23): 8789-8795.
- 74) Silva, G. A. *et al.* 2004. Selective differentiation of neural progenitor cells by high-epitope density nanofibers. *Science* **303**, 1352-1355.
- 75) Soto, C., Branes, M.C., Alvarez, J., and Inestrosa, N.C., 1994, Structural determinants of the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *J. Neurochem.* **63**: 1191-1198.
- 76) Soto, C., Castano, E.M., Frangione, B., and Inestrosa, N.C., 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.
- 77) Soto, C., 1999, Plaque busters: strategies to inhibit amyloid formation in Alzheimer's disease. *Mol. Med. Today* **5**: 343-350.
 - 78) Sunderland T, Linker G, Mirza N, et al. Decreased betaamyloid1- 42 and increased tau levels in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer disease. *JAMA* 2003; **289**:2094-2103.
 - 79) Spencer, P. S. 2000. Doxorubicin and related anthracyclines, In *Experimental and Clinical Neurotoxicology* (P. S. Spencer, and H. H. Svhaumburg, Eds.), pp. 529–533. Oxford University Press, New York
 - 80) Stewart, P. A. 2000. Endothelial vesicles in the blood–brain barrier: Are they related to permeability? *Cell. Mol. Neurobiol.* **20**, 149–163.
 - 81) Teplow DB., 1998, Structural and kinetic features of amyloid beta-protein fibrillogenesis. *Amyloid.* **5**(2), 121-42.
 - 82) Urayama, A., Yamada, S., Ohmori, Y., Deguchi, Y., Uchida, S. & Kimura, R. 2003 *Drug Metab. Pharmacokin.* **18**, 310–318.
 - 83) Tjernberg, L.O., Naslund, J., Lindqvist, F., Johansson, J., Karlstrom, A.R., Thyberg, J., Terenius, L., and Nordstedt, C., 1996, Arrest of beta-amyloid fibril formation by a pentapeptide ligand. *J. Biol. Chem.* **271**: 8545-8548.
 - 84) Van Leuven, F., 2000, Single and multiple transgenic mice as models for Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology* **61**: 305-312.
 - 85) Vinogradov, S. V., Batrakova, E. V. & Kabanov, A. V. 2004. Nanogels for oligonucleotide delivery to the brain. *Bioconjug. Chem.* **15**, 50–60
 - 86) Wadghiri YZ, Sigurdsson EM, Sadowski M, et al, 2003. Detection of Alzheimer's amyloid in transgenic mice using magnetic resonance microimaging. *Magn Reson Med*; **50**: 293–302.
 - 87) Wood, S.J., Wetzel, R., Martin, J.D., and Hurle, M.R., 1995, Prolines and amyloidogenicity in fragments of the Alzheimer's peptide beta/A4. *Biochemistry* **34**: 724-730.
 - 88) Zheng, H., Jiang, M., Trumbauer, M. E., Hopkins, R., Sereenathsinghi D. J. S., Stevens, K. A., Conner M. W., Glunt, H. H., Sisodia, S. S., Chen, H. Y., Van der Ploeg L. H. T., 1996, Mice deficient for the amyloid precursor protein gene. *Ann NY Acad. Sci.* **777**, 421-426.
 - 89) ZHU T. "et al". 2003. Surface modification of citrate-reduced colloidal gold nanoparticles with 2-mercaptosuccinic acid. *Langmuir*, **19** (22): 9518-9525.