

UNIVERSIDAD DE SONORA

**DIVISIÓN DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE FÍSICA**

POSGRADO EN NANOTECNOLOGÍA

MATERIALES NANOESTRUCTURADOS: EFECTO CITOTÓXICO Y PROPIEDADES TERAPEÚTICAS

TESIS

Que para obtener el título de:

MAESTRÍA EN NANOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

EVA DANIELA RUIZ ORTEGA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JOSUÉ ELÍAS JUÁREZ ONOFRE

COORDIRECTOR DE TESIS:

DR. MIGUEL ÁNGEL VALDÉS COVARRUBIAS

HERMOSILLO, SONORA

OCTUBRE 2015

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMATO DE APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de la estudiante Eva Daniela Ruiz Ortega la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como

requisito para obtener el grado de Maestría en Nanotecnología

Dr. Josué Elías Juárez Onofre

Director de Tesis

Dr. Miguel Ángel Valdés Covarrubias

Co-Director de Tesis

Dra. Hisila Santacruz

Asesor

Dra. Viviana Reyes Márquez

Asesor

DEDICATORIA

A mis padres, Irma y Leonardo.

A mis hermanos, Ibor y Héctor.

A mi nana Fide † y tata Pancho.

A carolina Ortega, Dulce Ruiz, Gemma Moreno y Lisset Ferrer.

A Josué Juárez.

A Mario Almada.

AGRADECIMIENTOS

Al Departamento de Física de la Universidad de Sonora y al Posgrado en Nanotecnología.

Al Dr. Josué Elías Juárez Onofre del departamento de física de la Universidad de Sonora, a quién le agradezco su apoyo incondicional, enseñanzas y consejos.

Al Dr. Miguel Ángel Valdés del Departamento de Física de la Universidad de Sonora, por su apoyo, consejos y asesoramiento durante el desarrollo de mi trabajo y durante mis estudios en el Posgrado de Nanotecnología.

A la Dra. Hisila Santacruz del Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales de la Universidad de Sonora, por su atenta ayuda y colaboración durante el proceso de revisión de mi trabajo de tesis.

A la Dra. Viviana Reyes Márquez del Departamento de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad de Sonora, por su colaboración y correcciones durante el proceso de revisión del trabajo de tesis.

Al Dr. Antonio Topete del Centro Universitario de Ciencias de la Salud de la Universidad de Guadalajara por aceptar formar parte del comité de tesis y por su colaboración durante el proceso de revisión.

Al Dr. Reynaldo Gonzáles, por su asesoramiento y apoyo durante el desarrollo del presente trabajo de tesis.

A mis compañeros de laboratorio y del Posgrado en Nanotecnología, especialmente a Mario Almada, Jaime Ibarra, Julio Melendres, Baltazar Leal, Gloria Irma, David Encinas, Roberto Carrillo, Carlos Perez.

A CONACyT por el apoyo otorgado al proyecto # 236185.

UNISON-PTC-197 Convenio DSA/103.5/14/10945.

CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	IX
LISTA DE FIGURAS	X
RESUMEN	XIV
ABSTRACT	XVII
CAPÍTULO I	1
I. INTRODUCCIÓN	2
I. 1. La Nanotecnología en Biología y Medicina	2
I. 2. Métodos de Síntesis de Nanomateriales	3
I. 3. Aplicaciones Bionanotecnológicas y Biomédicas	4
I. 3. 1. Fibras amiloides	4
I. 3. 2. Aplicaciones biomédicas de nanopartículas de oro (Au NPs)	6
I. 4. Literatura Citada	8
CAPÍTULO II	10
II. METODOLOGÍA	10
II. 1. Formación de Fibras Amiloides	10
II. 1. 2. Cinética de Fibrilación de Lisozima Humana Recombinante (LHr)	10
II. 1. 2. 1. Descripción de la técnica de Fluorescencia de thioflavina T (ThT)	10
II. 1. 2. 1. 1. Desarrollo experimental Fluorescencia de thioflavina T (ThT)	11
II. 1. 2. 2. Descripción de la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS)	11
II. 1. 2. 2. 1. Desarrollo experimental dispersión dinámica de luz (DLS)	12
II. 1. 2. 3. Desarrollo experimental medidas de tensión superficial	14
II. 1. 4. Determinación de la Morfología de Estructuras de LHr	15
II. 1. 4. 1. Descripción de la técnica de Microscopía de fuerza atómica (AFM)	15
II. 1. 4. 1. 1. Desarrollo experimental microscopia de fuera atómica	16
II. 1. 5. Determinación de Transición en la Conformación Estructural de LHr	18
II. 1. 5. 1. Descripción de la técnica de espectroscopia infrarroja con transformadas de Fourier (FT-IR)	18
II. 1. 5. 1. 1. Desarrollo experimental espectroscopia infrarroja (FT-IR)	19
II. 1. 6. Viabilidad Celular	20

II. 1. 7. Nanovarillas de Oro	23
II. 1. 7. 1. Formación de nanovarillas de oro	23
II. 1. 7. 2. Métodos de crecimiento mediado por semillas	23
II. 1. 8. Conjugación de NV de oro con péptidos	24
II. 1. 9. Espectrofotometría UV-Vis	24
II. 1. 10. Balanza de Langmuir-Blodgett	25
II. 1. 11. Composición de modelo de membrana endotelial	29
II. 1. 12. Preparación y limpieza de la balanza de Langmuir	30
II. 1. 13. Formación de monocapas de mezcla de MMCE de la BHE	30
II. 1. 14. Isotermas de adsorción NV de oro en monocapas de mezcla de MMCE de la BHE	31
II. 1. 15. Películas de Langmuir- Blodgett	31
II. 1. 16. Caracterización de las monocapas por medio de AFM	31
II. 1. 17. Formación de monocapas de mezcla de MMCE de la BHE d	32
II. 1. 17. 1. Isotermas de adsorción de NV de oro conjugadas con péptidos en MMCE	32
II. 1. 17. 2. Isotermas de adsorción de LHR en MMCE	32
II. 1. 18. Películas de Langmuir- Blodgett	33
II. 1. 19. Películas de Langmuir- Blodgett bicapa lipídica con solución de LHR	34
II. 2. Literatura Citada	35
CAPÍTULO III	37
III. FIBRAS AMILOIDES	37
III. 1. Jerarquía de la Estructura de las Proteínas	37
III. 1. 1. Estructura primaria de proteínas	38
III. 1. 2. Estructura secundaria	38
III. 1. 3. Estructura secundaria: hélices- α y hojas- β	39
III. 1. 4. Estructura terciaria	40
III. 1. 5. Estructura cuaternaria	41
III. 2. Plegamiento Incorrecto y Disfunción Celular	42
III. 2. 1. Fibras de amiloide	43
III. 3. Lisozima humana	46
III. 4. Amiloidosis Sistémica por Lisozima	47
III. 5. Resultados	48
III. 5. 1. Estudio de la Cinética de Fibrilación de Lisozima Humana Recombinante (LHR)	48
III. 5. 1. 2. Fluorescencia de thioflavina T (ThT)	49

III. 5. 1. 3. Dispersión dinámica de luz (DLS)	49
III. 5. 1. 4. Tensión superficial	50
III. 5. 1. 5. Modelaje teórico de fibrilación de LHr	51
III. 5. 2. Microscopía de fuerza atómica	52
III. 5. 3. Determinación de transición en la conformación estructural de Lisozima Humana recombinante (LHr)	54
III. 5. 3. 1. Espectroscopía infrarroja con transformadas de fourier (FT-IR)	54
III. 6. Discusión	74
III. 7. Conclusión	78
III. 8. Literatura Citada	79
CAPÍTULO IV	87
VI. PROPIEDADES TERAPEÚTICAS DE SISTEMAS NANOESTRUCTURADOS	87
IV.1. Características de la enfermedad de Alzheimer	87
IV.1. 1. Origen molecular del péptido β - amiloide neurotóxico	89
IV.1 .2. Terapias que actualmente se utilizan	89
IV. 1. 3. Barrera Hematoencefálica	90
VI. 1. 4. Permeabilidad y efecto de fibras peptídicas β - amiloides sobre el endotelio cerebral	91
IV.1.5. Búsqueda de tratamiento a través de la barrera hematoencefálica	91
IV.1. 5.1. Aplicaciones médicas de nanopartículas anisotrópicas	92
IV.2. Resultados	94
IV.2.1. Síntesis de Nanovarillas de oro	94
IV. 2. 2. Isotermas de adsorción de NV de oro en MMCE de la BHE	96
IV. 2.2.1. Módulos de compresibilidad	99
IV. 2. 3. Imágenes de películas de Langmuir-Blodgett en AFM del MMCE	101
IV. 2. 2. Isotermas de adsorción de Au NV conjugadas con péptido Angiopep-2 y D1	
IV. 3. Discusiones	108
IV. 4. Conclusiones	113
V. ANEXO	121
V. 1. Artículo	121

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla I Composición de mezclas de fosfolípidos	30
Tabla II Los parámetros cinéticos del proceso de agregación de la solución de la lisozima humana recombinante (LHr).	53
Tabla III Fracciones de estructuras secundarias de lisozima LHr obtenidos por FTIR	55
Tabla IV Porcentaje de estructuras secundarias de lisozima nativa, obtenidas por cristalografía de rayos X y por FTIR (Kumosinski y Unrush, 1999)	56
Tabla V Análisis estadístico ANOVA de la viabilidad celular determinada por múltiples pruebas de comparación (Newman-Keuls)	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representación esquemática de un experimento de dispersión de la luz común	13
Figura 2	Fotografía de equipo de Dispersión Dinámica de Luz (DLS)	13
Figura 3	Esquema del Tensiómetro de gota	14
Figura 4	Representación de componentes de AFM	17
Figura 5	Fotografía de equipo de AFM	17
Figura 6	Esquema de funcionamiento de IR	20
Figura 7	Fotografía de lector de microplacas para la cuantificación de densidad óptica	23
Figura 8	La placa de Wilhelmy parcialmente sumergida en la subfase. La placa anchura w , la longitud l , el espesor t y se sumerge en agua a una profundidad h . El ángulo θ representa el ángulo de contacto líquido-placa	28
Figura 9	Esquema de formación de monocapa de Langmuir y obtención de Isoterma de compresión y películas de LB	29
Figura 10	Diagrama esquemático de una isoterma de presión-área. Las distintas regiones representan las fases que las exposiciones monocapa de surfactante durante la compresión	29
Figura 11	Representación esquemática de formación de una película de Langmuir-Blodgett.	34
Figura 12	Formación de enlaces peptídicos entre el grupo amino de un aminoácido y el grupo carboxilo de otro aminoácido que conforma la cadena polipeptídica	39
Figura 13	Estructura secundaria de proteínas	41
Figura 14	Esquema de niveles estructurales de las proteínas	43
Figura 15	Entrecruzamiento de hojas- β que conforma la estructura de los protofilamento	46
Figura 16	Estructura típica del entrecruzamiento de hoja- β	47

Figura 17	Estructura de lisozima humana (Koradi et al., 1996)	48
Figura 18	Evolución de la fibrilación de dispersión dinámica de luz (\square), fluorescencia de ThT (\circ), y la presión superficial (Δ) durante el tiempo de incubación de las soluciones de lisozima humana recombinante incubada a 55 ° C a pH 2,0 en presencia de NaCl 136,7 mM y 2,68 mM KCl	52
Figura 19	Imágenes de AFM de las diferentes etapas del proceso de fibrilación LHR a pH 2,0 y 55 ° C a) 0, b) 120, c) 360, d) 480 e) 600 f) 750, g) 1440, h) 3000 min, y i) al final del proceso de incubación.54	54
Figura 20	Banda de amida I de la solución de LHR a pH 2,0 sin tratamiento térmico, y la descomposición de la banda de amida I	56
Figura 21	Viabilidad celular de tratamiento en células ARPE-19	57
Figura 22	Isoterma de Langmuir de MMCE de BHE a 25°C en presencia de LHR	59
Figura 23	Isoterma de Langmuir de MMCE de BHE a 25°C en Presencia de LHR a 0, 600 y 750 minutos de incubación	61
Figura 24	Módulo de compresibilidad de MMCE de BHE a 25°C en Presencia de LHR Módulo de compresión calculado mediante la derivada de la isoterma correspondiente	63
Figura 25	Imágenes de AFM de las películas de Langmuir-Blodgett del MMCE de la BHE con DPPC, DPPS y SM a 30 mN/m y sus respectivos análisis de alturas del eje Z	65
Figura 26	AFM de monocapa de MMCE de BHE con DPPC, DPPS y SM en presencia de estadio de LHR de 0 minutos e Histograma topográfico y respectivos análisis de alturas del eje Z	67
Figura 27	AFM de monocapa de MMCE de BHE de DPC, DPPS y SM en presencia de estadio de LHR de 120 minutos e histograma topográfico	68
Figura 28	AFM de monocapa de MMCE de BHE de DPPC, DPPS y SM en presencia de estadio de LHR de 600 minutos e Histograma topográfico	69

Figura 29	AFM de monocapa de MMCE de BHE en presencia de estadio de LHr de 11400 minutos	70
Figura 30	Imagen de AFM de las películas de Langmuir-Blodgett (bicapa lipídica) del MMCE de la BHE	72
Figura 31	Imágenes de AFM de las películas de Langmuir-Blodgett (bicapa lipídica) del MMCE de la BHE en presencia de fibras amiloide	73
Figura 32	Imágenes de AFM de las películas de Langmuir-Blodgett (bicapa lipídica) del MMCE de la BHE en presencia de fibras amiloides	74
Figura 33	Espectros de UV-Vis-NIR de solución de nanovarillas de oro conforme se incrementa la cantidad de ácido ascórbico durante la síntesis. La segunda banda corresponde al plasmón longitudinal.	96
Figura 34	Micrografía de microscopio electrónico de transmisión de barrido en donde se muestra el efecto las variaciones de la concentración de ácido ascórbico en la relación de aspecto de la AuNv	97
Figura 35	Isoterma de Langmuir de MMCE de BHE a 25°C en presencia de Au NV con un PRL de 740, 790, 812 y 825 nm, respectivamente	99
Figura 36	Módulo de compresión calculado mediante la derivada de la isoterma correspondiente	101
Figura 37	Imagen de AFM de película de Langmuir-Blodgett del MMCE de la BHE con PC, PS, PE y SM e histograma correspondiente.	103
Figura 38	Imagen de AFM de las películas de Langmuir-Blodgett del MMCE de la BHE con PC, PS, PE y SM y análisis de alturas para el eje Z	103
Figura 39	Imagen de AFM de película de Langmuir-Blodgett del MMCE de la BHE con PC, PS, PE y SM en presencia de AuNV e histograma correspondiente	105
Figura 40	Imágenes de AFM de las películas de Langmuir-Blodgett del MMCE de la BHE con DPPC, DPPS, DPPE y SM en presencia	106

	de NV y análisis de altura del eje Z correspondiente	
Figura 41	Isoterma de Langmuir de MMCE de BHE a 25°C en presencia de Au NV sin conjugar y Au NV conjugadas con Angiopep2 y D1	108

RESUMEN

El estudio de materiales nanoestructurados es de gran interés para distintas áreas de la ciencia; en particular en el campo de la biomedicina. La importancia de los materiales nanoestructurados radica en sus posibles aplicaciones biomédicas y nanobiotecnológicas. Como se trata en el capítulo I del presente trabajo, la convergencia de la nanotecnología, la biología molecular y la medicina, representa nuevas posibilidades para la detección y la manipulación de átomos y moléculas utilizando nanodispositivos, con el potencial para una amplia variedad de aplicaciones médicas a nivel celular. Las herramientas de caracterización tales como las microscopías electrónicas, cristalografía, espectroscopia, entre otras que se han utilizado en este trabajo y se encuentran en el capítulo II, han permitido seguir y controlar el tamaño, la forma y la estructura de los nanomateriales. Las proteínas pueden ser consideradas como los arquitectos de la vida pues, son cruciales en todo proceso celular. La función biológica correcta de las proteínas depende de su auto-ensamblaje en estructuras bien definidas y altamente ordenadas. Por otro lado, el plegamiento incorrecto y el montaje anormal de estas, están relacionados en más de 30 trastornos humanos, incluyendo la enfermedad de Alzheimer, diabetes mellitus tipo II, entre otras. La patología de estos trastornos puede estar relacionada con el auto-ensamblaje de péptidos amiloidogénicos en diversas formas de agregados transitorios tales como oligómeros, protofibras, fibras de amiloide. La lisozima humana recombinante, una enzima bacteriolítica, está ampliamente distribuida en una variedad de tejidos y fluidos corporales y se ha relacionado en la formación de depósitos de amiloide en la amiloidosis sistémica hereditaria autosómica. En el capítulo III se presenta el estudio de cinética de formación y citotoxicidad de lisozima humana recombinante. En este trabajo se monitorizó la formación de fibras de amiloide de lisozima humana recombinante, *in vitro*, por aumento de fluorescencia de tioflavina T, dispersión dinámica de luz y tensión superficial; los aspectos de su morfología y transición de estructura secundaria fueron obtenidos mediante microscopía de fuerza atómica e infrarrojo respectivamente. La actividad citotóxica de las formas transitorias de fue probada en la línea celular ARPE-19 y por último se estudió la interacción no específica en un modelo de membrana de células endoteliales de la barrera hematoencefálica. Los resultados obtenidos muestran que Lisozima humana recombinante

en condiciones de desnaturalización parcial, solución de sales acidificada a pH 2, 136.7mM NaCl y 2.68 mM KCl ajustando pH con HCl, incubada a 55°C, sigue una fibrilación que incluye los estados transitorios oligoméricos, protofibrilares y de fibras maduras; Por otro lado, se corroboró la transición estructural de hélices- α a estructuras β mediante espectroscopía de infrarrojo con transformadas de Fourier. Las imágenes de microscopía de fuerza atómica apoyan los datos obtenidos mediante la cinética de fibrilación, para evidenciar los estados conformacionales transitorios de la lisozima humana recombinante durante los periodos de incubación. Los estudios de viabilidad de la línea celular Arpe-19, sugieren que la citotoxicidad está relacionada con la formación de estructuras con una ganancia de estructuras β característica y en la hidrofobicidad; Es decir, conformaciones prefibrilares y fibras de amiloide maduras. Por último se estudió el comportamiento en interfase aire/agua de un modelo de membrana endotelial y la influencia de fibras amiloides de lisozima en diferentes estadios de formación. Las condiciones de desnaturalización en la que la lisozima se incubó, alteran la estructura de la proteína e impulsa la formación de monómeros, oligómeros y agregados amiloides protofibrillas con distintas propiedades de adsorción en la interfase aire-agua. Estos resultados indicarían que existe una interacción no específica de la proteína con la membrana, cosa que podría facilitar el proceso de internalización en las células endoteliales y el pasaje a través de la barrera hematoencefálica.

En el capítulo IV se estudiaron algunas propiedades fisicoquímicas de materiales nanoestructurados, nanovarillas de oro (Au NV), con el objeto de estudiar sus características fisicoquímicas y posible uso como agentes terapéuticos en el tratamiento la enfermedad de Alzheimer (EA). La ventaja que proporcionan las Au NV es que estas tienen la propiedad de absorber energía en el infrarrojo cercano, la cual puede ser penetrada por el tejido hasta algunos centímetros. Además, a algunos estudios han demostrado que mediante la conjugación de Au NV con péptidos que puedan unirse selectivamente a agregados de A β (es decir, oligómeros, protofibrillas y fibras de amiloide) y mediante el calor disipado por estas nanoestructuras es posible destruir estos agregados. Este enfoque podría ser utilizado como un tipo de cirugía molecular para eliminar los agregados tóxicos presentes en los cerebros de pacientes y de ese modo detener o ralentizar la progresión de esta enfermedad. La efectividad de este tratamiento depende de la internalización a través de la barrera hematoencefálica (BHE) y una posible selectividad a las estructuras polipeptídicas de carácter amiloide, teniendo como fin evitar la agregación y formación de estas. En este trabajo se evaluó la internalización Au NV distintas relaciones

de tamaño longitudinal, y con una mezcla de MMCE de la BHE compuesto por Fosfatidilcolina (DPPC), fosfatidil etanolamina (DPPE), fosfatidilserina (DPPS) y esfingomielina (SM). Además, se seleccionó una síntesis dentro de la región de la ventana biológica para posteriormente conjugarlas con péptidos de reconocimiento a las fibras amiloides, y péptido D1 y un péptido que atraviese la barrera hematoencefálica, angiopep 2. La interacción con un modelo de membrana de células endoteliales se llevó a cabo mediante la técnica de Langmuir. Tras estudiar las isotermas de Langmuir en presencia de Au NV con diferentes plasmones de resonancia longitudinal, 740, 790, 800 y 825 nm, se encontró que el área por molécula de fosfolípido en presencia de las Au NV aumenta conforme aumenta el PRL, debido a la incorporación en la monocapa. El comportamiento de la monocapa en presencia de Au NV conjugadas con el péptido angiopep-2 y el péptido D1 mostró un corrimiento hacia áreas mayores, mostrando una evidente interacción entre las Au NV conjugadas y el MMCE indicando que existe una interacción primaria de las NV con la membrana, cosa que podría facilitar el proceso de internalización en las células endoteliales y el pasaje a través de la BHE.

ABSTRACT

The study of nanostructured materials is of great concern to different areas of science; particularly in the field of biomedicine. The importance of nanostructured materials is their potential in biomedical and nanobiotechnology applications.

As discussed in Chapter I of the present work, the convergence of nanotechnology, molecular biology and medicine, represents new possibilities for detection and manipulation of atoms and molecules using nanodevices, with the potential for a wide variety of medical applications at cellular level. Characterization tools such as electronic microscopies, crystallography, spectroscopy, and among others that have been used in this work, found in Chapter II, have enabled monitoring and controlling the size, shape and structure of nanomaterials. Proteins can be considered as the architects of life because they are crucial throughout cellular process. The correct biological function of the proteins depends on their self-assembly into well-defined and highly ordered structures. Moreover, the unfolding and assembly abnormal of proteins are related in more than 30 human disorders including Alzheimer disease, type II diabetes mellitus, among others. The pathology of these disorders may be related to the self assembly of amyloidogenic peptides in various forms of transient aggregates such as oligomers, protofibrils and amyloid aggregates. The recombinant human lysozyme, a bacteriolytic enzyme is widely distributed in a variety of tissues and body fluids and has been linked to the formation of amyloid deposits in the autosomal hereditary systemic amyloidosis. In chapter III the study of kinetics of formation and cytotoxicity of recombinant human lysozyme is presented. In this work the formation of amyloid fibers of recombinant human lysozyme was monitored in vitro by increasing thioflavin T fluorescence, dynamic light scattering and surface tension; aspects of their morphology and secondary structure transition were obtained by atomic force microscopy and infrared respectively. The cytotoxic activity of the transitional forms was tested in the cell line ARPE-19 and finally the non-specific interaction was studied in a model of endothelial cell membrane of the blood brain barrier. The results obtained show that recombinant human lysozyme partially denaturing conditions, solution of salts acidified to pH 2, 136.7mM 2.68 mM NaCl and KCl ajustando pH with HCl, incubated at 55 ° C, followed by a fibrillation including oligomeric transients, protofibrils and mature fibrils; Furthermore, the structural transition from α -helix to β structure was confirmed by

infrared spectroscopy with Fourier transforms. The images of atomic force microscopy support the kinetic data obtained by fibrillation, for evidence transient conformational states of recombinant human lysozyme for incubation periods. Feasibility studies of ARPE-19 cell line, suggesting that the cytotoxicity is related to the formation of structures with a characteristic gain β structures and hydrophobicity; That is, protofibrils conformations and mature amyloid fibrils. Finally behavior was studied in air / water interface of a model of endothelial membrane and influence of lysozyme amyloid fibers at different stages of formation. Feasibility studies of ARPE-19 cell line, suggesting that the cytotoxicity is related to the formation of structures with a characteristic gain β structures and hydrophobicity; That is, protofibrils conformations and mature amyloid fibrils. Finally behavior was studied in air / water interface of a model of endothelial membrane and influence of lysozyme amyloid fibers at different stages of formation. Denaturing conditions in which lysozyme incubated the altered protein structure and promoted the formation of monomers, oligomers and protofibrils amyloid aggregates with different adsorption properties at the air-water interface. These results indicate that there is a non-specific interaction of the protein with the membrane, which could facilitate the internalization process in endothelial cells and passage through the blood brain barrier.

In the chapter IV some physicochemical properties of nanostructured materials gold nanorods were studied, were studied in order to analyze their physicochemical properties and possible use as therapeutic agents in the treatment of Alzheimer's disease (AD). The advantage provided by gold nanorods is that these have the property of absorbing near-infrared energy, which can be penetrated by the tissue to a few centimeters. Furthermore, studies have shown that by conjugating gold nanorods with peptides that can bind selectively to A β aggregates (oligomers, protofibrils and fibrils amyloid) and with the heat dissipated by these nanostructures is possible to destroy these aggregates. This approach could be used as a kind of molecular surgery to remove toxic aggregates in the brains of patients and thereby stop or slow the progression of this disease. The effectiveness of this treatment depends on internalization of the gold nanorods through the blood brain barrier (BBB) and a possible selectivity to amyloid polypeptide structures, with the aim to avoid the aggregation and formation of these. In this work the internalization of gold nanorods was evaluated in a model of endothelial cell membrane of the BBB composed of phosphatidylcholine (DPPC), phosphatidylethanolamine (DPPE), phosphatidylserine (DPPS) and sphingomyelin (SM). Moreover, the interaction of gold nanorods conjugated peptides recognition amyloid fibers, D1 peptide, and a peptide that crosses the BBB,

angiopep 2 was evaluated. Interaction with a model endothelial cell membrane was performed by Langmuir-Blodgett isotherms technique. After studying the Langmuir isotherms in the presence of gold nanorods with different plasmon longitudinal resonance, 740, 790, 800 and 825 nm, it was found that the area per phospholipid molecule in the presence of gold nanorods increases with the plasmon resonance longitudinal, due to incorporansi3n in the monolayer. The behavior of the monolayer in the presence of Au NV conjugated with angiopep-2 D1 peptide and peptide showed a shift to higher areas, showing a clear interaction between conjugated and Au NV MMCE indicating that there is a primary interaction with the NV membrane, which could facilitate the process of internalization in endothelial cells and the passage across the BBB.

CAPÍTULO I

La nanotecnología es una disciplina que describe la convergencia entre la física, la química, la ciencia de los materiales y la biología para hacer frente a la manipulación y a la caracterización de la materia a una unidad de longitud a la que debe su nombre, el nanómetro. Los usos potenciales de la nanotecnología van desde la fabricación y mejora de cosméticos, tratamientos revolucionarios contra el cáncer y diversas enfermedades, hasta la fabricación de dispositivos electrónicos mil veces más pequeños que los de uso convencional. La integración de esta revolucionaria disciplina en el campo de estudio de la biología molecular y la medicina es de gran importancia, debido a que las nuevas herramientas de análisis podrían permitir estudiar y caracterizar el funcionamiento de las "nanomáquinas" moleculares que orquestan la química de la vida. Hoy en día, la cantidad de investigación en este campo está creciendo de manera exponencial debido a la disponibilidad de nuevos métodos de síntesis y herramientas analíticas, abriendo nuevas posibilidades para la detección y la manipulación de átomos y moléculas utilizando nanodispositivos con el potencial para una amplia variedad de aplicaciones médicas a nivel celular. El desarrollo de instrumentos que explotan la nanotecnología, dan lugar a mejoras de microscopía de fuerza atómica, microscopía de fluorescencia y las imágenes de rayos X entre otras, que permite la visualización de los sistemas biológicos con una resolución molecular. Por ejemplo, algunos mecanismos de reconocimiento y auto-ensamblaje biomolecular son explotados para crear nuevos nanomateriales, biosensores y sistemas de administración de fármacos.

I. INTRODUCCIÓN

La nanotecnología puede definirse como el estudio, diseño, creación, síntesis y manipulación de materiales a una unidad de longitud de la milmillonésima parte de un metro. La peculiaridad de este campo de estudio está presente en el hecho de que las propiedades físicas y químicas de los nanomateriales pueden diferir considerablemente de la de los átomos/moléculas simples o de los materiales macroscópicos de la misma composición. Cuando la materia es manipulada a una escala tan pequeña, esta presenta propiedades y fenómenos extraordinarios que nos conduce al desarrollo de nuevos dispositivos y a su aplicación en la mejora de tecnologías ya existentes.

La nanotecnología se encuentra dentro de la escala de longitud de los componentes básicos de la célula, por lo que representa una tecnología muy prometedora en campos científicos como la biología y la medicina.

El progreso global de esta rama, ha impulsado la investigación y la generación de nuevos sistemas de diagnóstico, administración de fármacos y tratamiento que revolucionarán la forma en que se diagnostica y se trata una gran variedad de enfermedades. Este desarrollo ha sido gracias a la creciente disponibilidad de nuevos métodos de síntesis de nanomateriales, así como de herramientas para su caracterización y manipulación.

I. 1. La Nanotecnología en Biología y Medicina: Métodos de Síntesis, Aplicaciones Biotecnológicas y Biomédicas

La investigación interdisciplinaria y los recientes avances en instrumentación y métodos para la aplicación de la nanotecnología para diversas áreas de la biología y la medicina muestra grandes avances, por ejemplo, en el diseño y uso de nanobiosensores con diversas técnicas analíticas para la detección y seguimiento de las biomoléculas específicas, incluyendo las células cancerosas y proteínas patógenas. La nanotecnología podría proporcionar las herramientas para estudiar los mecanismos en que las decenas de miles de proteínas en una célula trabajan juntas, en redes, haciendo posible estudiar genes y proteínas específicas que han sido relacionados con numerosas enfermedades y trastornos. Por ejemplo, los procesos de plegamiento incorrecto de proteínas que se relacionan con enfermedades, como la enfermedad de Alzheimer, la fibrosis quística, enfermedad de las "vacas locas".

La combinación de la nanotecnología, la ciencia de los materiales y la biología molecular abre la posibilidad de detectar y manipular los átomos y las moléculas utilizando nanodispositivos, con el potencial para una amplia variedad de temas de investigación biológica y aplicaciones médicas a nivel celular.

Dentro de los avances logrados por parte de la combinación de la biología y la nanotecnología ha dado lugar a una nueva generación de dispositivos (nanopartículas, dendrímeros, puntos cuánticos, etc.) para sondear la maquinaria celular y estudiar los procesos vitales a nivel molecular. Tales tecnologías pueden ayudar en la caracterización y predecir el comportamiento patológico de células enfermas, así como la capacidad de la respuesta de las células al tratamiento farmacológico mediante la combinación de nanomarcadores moleculares y técnicas ópticas que permiten identificar las alteraciones moleculares que distinguen a una célula enferma de una célula normal (Song *et al.*, 2004).

Estas nuevas herramientas de análisis son capaces de permitir el estudio del mundo nanométrico biológico y hacer posible caracterizar las propiedades de las células y entender el funcionamiento de las máquinas moleculares; Así como descubrir nuevos fenómenos y procesos, que a la larga, podrían conducir al desarrollo de nuevas modalidades para el diagnóstico precoz, el tratamiento médico y la prevención más allá del nivel celular al de orgánulos individuales.

Las aplicaciones médicas de los nanomateriales podrían revolucionar la biología y la atención de la salud, al proporcionar las herramientas para estudiar múltiples enfermedades, al tener el potencial de cambiar drásticamente el campo del diagnóstico, la terapia y el descubrimiento de fármacos.

I. 2. Métodos de Síntesis de Nanomateriales

En cuestiones de diseño, se han utilizado como bloques de construcción biomoléculas como ácidos nucleicos o proteínas, lípidos, vitaminas, etc., así como las estructuras y formas que asumen estas moléculas, proteínas plegadas, bicapa lipídica, núcleo, mitocondrias, endosoma, y otros para obtener materiales con estructuras complejas aprovechando sus capacidades de autoensamblaje (Doshi y Mitragotri, 2009). Estas sirven

como fuentes de inspiración para los científicos o ingenieros que están interesados en el desarrollo de materiales para las innovaciones en medicina y particularmente para aplicaciones de ingeniería de tejidos.

Usualmente, los materiales nanoestructurados se obtienen a través de dos estrategias: La primera estrategia es la denominada “top-down” y consiste en la reducción de tamaño de un material más grande; sin embargo, mediante esta estrategia se obtienen materiales en escala micrométrica debido a que la reducción del tamaño sólo se puede realizar hasta donde las propiedades del tamaño del material lo permita.

En la segunda estrategia, “bottom-up”, se utilizan moléculas pequeñas, como las proteínas, péptidos, fosfolípidos y ácidos nucleicos (ADN y RNA) como elementos constituyentes, que bajo condiciones controladas, permiten obtener estructuras bien ordenadas gracias a las propiedades de auto-ensamblaje que poseen este tipo de biomoléculas. Las propiedades de auto-asociación y ensamblaje que tienen estos biomateriales permiten, bajo condiciones controladas, obtener complejos nanoestructurados definidos. Por ejemplo, la célula viva es una construcción compleja propuesta por el de la naturaleza, y es el mejor ejemplo de la auto-asociación y ensamblaje en la que observamos la estrategia “bottom-up” (Schmid, 2004) (Tarn *et al.*, 2013) (Li y Zhao, 2013).

Las proteínas son una alternativa atractiva para la construcción de estas nanoestructuras, ya que además de tener un tamaño físico adecuado, una gran estabilidad (comparado con los estructuras basadas en ácidos nucleicos y fosfolípidos), poseen excelentes propiedades de adsorción a sustratos como vidrio, óxido de silicio, u oro; por otra parte las proteínas presentan una serie de funciones que pueden ser acopladas, por ejemplo, a circuitos electrónicos durante la construcción de nanodispositivos gracias a su alta flexibilidad, aun cuando estos materiales son no conductores, pueden recubrirse con metales conductores, por ejemplo las fibras amiloide.

I. 3. Aplicaciones Bionanotecnológicas y Biomédicas

I. 3. 1. Fibras amiloides

Como se mencionaba con anterioridad, en general, la importancia de los materiales biológicos nanoestructurados radica tanto en sus implicaciones como en sus aplicaciones biomédicas y biotecnológicas. La función biológica correcta de las proteínas depende de su propiedad de auto-ensamblaje en estructuras bien definidas y altamente ordenadas. Sin embargo, el plegamiento incorrecto de proteínas y el montaje anormal están relacionados en más de 30 trastornos humanos, como la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, diabetes tipo II etc. En estos, se produce el auto-ensamblaje de péptidos amiloidogénicos en diversas formas de agregados transitorios tales como oligómeros, protofibras y fibras de amiloide. Una cuestión clave en la comprensión de las condiciones de patógenos asociadas con esta agregación anormal de proteínas mal plegadas, es la identificación y la caracterización de estas especies transitorias que se forman durante el proceso de agregación y su citotoxicidad, estudio que se realiza en el presente trabajo, capítulo III.

Las herramientas nanotecnológicas son muy prometedoras en términos de avanzar en la comprensión de los mecanismos moleculares y celulares que regulan el procesamiento de proteínas precursoras causantes de la producción de estos agregados amiloidales. Además de generar conocimiento sobre los mecanismos de interacción y toxicidad celular. La información adquirida sobre estos procesos puede ayudarnos tanto a identificar nuevos objetivos que pueden ser explotadas terapéuticamente para modular la producción de estos agregados e incluso diseñar nanoestructuras con propiedades en sí mismas terapéuticas. Por otro lado, a pesar de la importancia de las fibras amiloides en el área clínica, actualmente existen otras áreas científicas que prestan especial interés en el estudio de las propiedades estructurales y de agregación fibrilar, en la búsqueda de nuevos materiales y posibles aplicaciones en campos de la nanobiotecnología, incluida la entrega de drogas y la ingeniería de tejidos (Ahn et al., 2010) (Peralta *et al.*, 2015).

Las fibras son excelentes candidatos para la construcción de nanocables, geles, andamios, plantillas entre otros y además pueden ser funcionalizadas mediante autoensamblaje (Baldwin et al. 2006) o utilizarse como una plantilla para la unión a metales (Scheibel *et al.*, 2003) (Reches y Gazit, 2003) como resultado de sus propiedades fisicoquímicas (rigidez, la estabilidad contra el calor y agentes desestabilizadores, de resistencia contra las proteasas, entre otros), compatibilidad estructural, dimensiones nanométricas y estructuras bien definidas (Juárez *et al.*, 2011) ; Son extremadamente

estables y resistente a la degradación, tanto que su resistencia ha sido descrita similar a la de acero, (Smith *et al.*, 2006) una propiedad que comparten con la seda.

I. 3. 2. Aplicaciones biomédicas de nanopartículas de oro (Au NPs)

Las propiedades de fisicoquímicas de materiales nanoestructurados metálicos pueden ser aprovechadas para aplicaciones terapéuticas en el tratamiento de una enfermedad dada, como por ejemplo, aquellas relacionadas con el montaje anormal de proteínas como la enfermedad de Alzheimer (EA). La ventaja que proporcionan es que las nanopartículas pueden ser acumuladas en la región del tejido de interés y ser iluminada con un láser NIR, de baja potencia y por el calentamiento ocasionado se podrían eliminar agregados proteicos tóxicos. Las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas de oro (Au NPs) dependen de su tamaño y forma, así como en el medio en que son dispersadas. Cuando un campo electromagnético oscilante, interacciona con los electrones libres, localizados en la superficie de una nanopartícula metálica, generan una polarización de los electrones los cuales oscilan coherentemente (misma frecuencia), fenómeno conocido como resonancia de plasmón superficial localizada (LSPR) (Jain *et al.*, 2008). El LSPR se manifiesta con una fuerte extinción cuya longitud de onda máxima se coloca exactamente en la frecuencia de resonancia. Algunos de los fotones absorbidos se dispersan en todas las direcciones a la misma frecuencia en un proceso conocido como dispersión. Otra parte de los fotones absorbidos se convertirá en fonones o vibraciones de la retícula de metal, este proceso se denomina absorción (Eustis y El Sayed 2006).

Otra propiedad única de estos nanomateriales es la posibilidad de ajustar la LSPR cambiando el tamaño, la forma, la composición y medio en el que están suspendidas las nanopartículas. Las nanovarillas NV, exhiben dos distintos modos de resonancia de plasmón: uno asociado con oscilaciones de electrones en paralelo al eje longitudinal (LSP) y el otro con oscilaciones de electrones en paralelo al eje transversal (TSP). El modo de plasmón longitudinal se puede activar mediante el ajuste de la relación de aspecto de la nanovarilla, por lo que esta estructura es particularmente útil para diferentes aplicaciones en los campos de la fotónica y la biotecnología. El plasmón superficial transversal y el longitudinal (LSP) de los NR aparecen en el visible y cerca de la región NIR en el espectro de absorción, respectivamente. Las longitudes de onda óptimas están en el rango de 800 - 1000 nm debido a la existencia de la llamada "ventana biológica", la región del espectro electromagnético donde la absorción del agua es mínima

La conjugación de biomoléculas a la superficie de las nanovarilla de oro, Au NV, ha abierto una amplia gama de aplicaciones. Uno de los métodos de funcionalización más comúnmente usados para la conjugación de Au NV es mediante la unión de polietilenglicol (PEG), estas se recubren con una capa de PEG o en combinación con otras moléculas tales como ligandos de receptores de superficie celular, o péptidos inhibidores del amiloide, ayudando así a la internalización de estos a las células diana. En el caso particular de este estudio, las Au NV fueron conjugadas con dos péptidos con afinidad, por un lado, a receptores de la BHE como Angiopep2 y D1, que reconoce los agregados tóxicos de la proteína β -amiloide (TAA β), que a su vez, puede conducir a la formación de fibrillas de amiloide que conforman las placas amiloides presentes en esta enfermedad.

La efectividad de este posible tratamiento depende de la internalización a través de la barrera hematoencefálica (BHE), la cual es una barrera eficiente y altamente regulada que limita el acceso de las moléculas grandes a la sistema nervioso central (SNC) (Bickel *et al.*, 2001). Debido a que la mayoría de los fármacos no atraviesan dicha barrera, hay pocos tratamientos disponibles contra la mayoría de los trastornos del SNC, incluyendo las enfermedad mencionadas con anterioridad, así como varios tipos de cáncer de cerebro (Pardridge, 2005). Además es necesaria la selectividad a las estructuras polipeptídicas de carácter amiloide, teniendo como fin evitar la agregación y formación de estas.

Recientemente, nanovarillas de oro multifuncionales han sido desarrollados para facilitar la administración de agentes terapéuticos a través de la BHE. Esto se ha logrado mediante la modificación del material acarreador con la unión de ligandos para receptores que se encuentran en las neuronas y las células endoteliales capilares de la BHE.

En el presente trabajo se estudió la relación entre las variaciones del plasmón de resonancia longitudinal de las nanovarillas de oro y el efecto de la conjugación de estas con péptidos angiopep-2 y D1 como potenciadores de la interacción de las nanovarillas con un modelo de membrana de células endoteliales de la BHE y su posterior internalización. Capítulo IV. Por lo tanto, un aspecto fundamental de la generación de nuevas terapias para las enfermedades de los sistemas nerviosos central es que las Au NV pueden atravesar la BHE, siendo necesario estudiar las interacciones primarias no específicas de las Au NV conjugadas con un modelo de las barreras biológicas o membranas de las células endoteliales.

I. 4. Literatura Citada

- Ahn M., Kang S., Koo H.J., Lee J.H., Lee Y.S. y Paik S.R. 2010. Nanoporous Protein Matrix Made of Amyloid Fibrils of β 2-Microglobulin. *Biotechnology Progress*; 26(6):1759-64.
- Baldwin A.J, Bader R., Christodoulou J., MacPhee C.E., Dobson C.M y Barker P.D. 2006. Cytochrome Display on Amyloid Fibrils. *Journal of the American Chemical Society* ;128:2162–2163.
- Bickel U., Yoshikawa T. y Pardridge W.M. 2001. Delivery of Peptides and Proteins Through the Blood-Brain Barrier. *Advanced Drug Delivery Reviews*; 1:46247-79.
- Doshi N, Mitragotri S. 2009. Designer Biomaterials for Nanomedicine. *Advanced Functional Materials*; 19:3843-54.
- Eustis S. y El-Sayed M. A. 2006. Why Gold Nanoparticles are More Precious than Pretty Gold: Noble Metal Surface Plasmon Resonance and its Enhancement of the Radiative and Nonradiative Properties of Nanocrystals of Different Shapes. *Chemical Society Reviews*; 35:209-17.
- Jain P.K., Huang X., El-Sayed I.H y El-Sayed M.A. 2008. Noble Metals on the Nanoscale: Optical and Photothermal Properties and Some Applications in Imaging, Sensing, Biology, and Medicine. *Accounts of Chemical Research*; 41:1578-86.
- Juárez J., Cambón A., Topete A., Taboada P., y Mosquera V. 20011. One-Dimensional Magnetic Nanowires Obtained by Protein Fibril Biotemplating. *Chemistry – A European Journal*; 17:7366-73.
- Li W. y Zhao D. 2013. An Overview of the Synthesis of Ordered Mesoporous Materials. *Chemical Communications*;49:943-6.
- Pardridge W. M. 2005. The Blood-Brain Barrier: Bottleneck in Brain Drug Development. *Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*; 2(1):3-14.
- Peralta M. D.R., Karsai A., Ngo A., Sierra C., Fong K.T., Hayre N.R., Mirzaee N., Ravikumar, K. M ., Kluber A. J., Chen X., Liu G., Toney M.D., Singh R. R. y Cox D. L. 2015. Engineering Amyloid Fibrils from β -Solenoid Proteins for Biomaterials Applications. *ACS Nano*; 150108143205001.
- Reches M y Gazit E. 2003. Casting Metal Nanowires Within Discrete Self-assembled Peptide Nanotubes. *Science*; 300:625–627.
- Scheibel T., Parthasarathy R., Sawicki G., Lin X.M., Jaeger H y Lindquist S.L 2003. Conducting Nanowires Built by Controlled Self-assembly of Amyloid Fibers and Selective Metal

Deposition. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America; 100:4527–4532.

Schmid G. 2004. Nanoparticles: From Theory to Application. Weinheim: Wiley-VCH.

Smith J.F, Knowles T.P., Dobson C.M., Macphee C.E y Welland M.E. 2006. Characterization of the Nanoscale Properties of Individual Amyloid Fibrils Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 103:15806–15811.

Song J. M., Kasili P. M., Griffin G. D., y Vo-Dinh, T. 2004. Detection of Cytochrome c in a Single Cell Using an Optical Nanobiosensor. Analytical chemistry; 76:2591-2594.

Tarn D., Ashley C.E., Xue M., Carnes E.C., Zink J.I y Brinker C.J. 2013. Mesoporous Silica Nanoparticle Nanocarriers: Biofunctionality and Biocompatibility. Accounts of Chemical Research; 46:792-801.

CAPÍTULO II

II. METODOLOGÍA

En este capítulo se describen la descripción de las técnicas utilizadas y el desarrollo experimental del presente trabajo.

II. 1. Formación de Fibras Amiloides

La técnica de Hirano *et al.*, (2012) se adaptó para la formación de fibras amiloides de la lisozima humana recombinante (LHr) en la cual se utilizó una solución madre de lisozima a una concentración de 2 mg/mL (pH 2, en una solución de 136.7 mM NaCl y 2.68 mM KCl ajustando pH con HCl), incubada a 55°C en agitación constante. Se tomaron alícuotas a distintos tiempos (0, 15, 30, 60, 120, 240, 360, 480, 600, 750, 1140, 1620, 1800, 2880, 3000, 4320 minutos).

II. 1. 2. Cinética de Fibrilación de Lisozima Humana Recombinante (LHr)

II. 1. 2. 1. Descripción de la técnica de Fluorescencia de thioflavina T (ThT)

La fluorescencia puede utilizarse para realizar estudios de dinámica molecular, análisis estructural de proteínas, cuantificación de iones en compartimentos celulares, microscopía, análisis de potencial de membrana, interacciones entre macromoléculas, etc. En espectroscopía de fluorescencia se registran espectros de excitación y de emisión. La Thioflavina T (ThT), es un fluoróforo que cuando se encuentra libre se caracteriza por presentar una longitud de onda máxima de excitación (λ_{exc}) de 415 nm y una longitud de onda máxima de emisión (λ_{em}) de 482 nm. Sin embargo, al unirse a las fibras amiloides, su espectro de excitación se incrementa apareciendo un pico a λ_{exc} 450 nm, sin modificar la longitud de onda de emisión.

II. 1. 2. 1. 1. Desarrollo experimental de seguimiento de la cinética mediante intensidad de Fluorescencia de thioflavina T (ThT)

Para la lectura de fluorescencia se diluyó 50:1 la solución de proteína a una concentración final de 0.05 mg/ml, agregando 0.4 mL de ThT disuelta en 3.6 mL de solución salina acidificada. Posteriormente la medición se realizó en un espectrofotómetro de fluorescencia. Los espectros de fluorescencia fueron obtenidos usando una longitud de onda máxima de excitación y emisión de 440 a 480 nm, respectivamente. Cada medida de fluorescencia ThT se realizó por triplicado.

II. 1. 2. 2. Descripción de la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS)

La dispersión Dinámica de Luz, DLS, también conocida como espectroscopía de correlación de fotones (PCS) o dispersión de luz cuasi-estática (QELS) es una técnica óptica ampliamente utilizada para la medición de diámetros medios de coloides poliméricos o partículas de tamaño submicrométrico (Chu, 1991). Básicamente, el instrumental empleado consiste en: a) una fuente de luz láser monocromática que incide sobre una solución muy diluida de la sustancia a analizar; b) un fotómetro posicionado a un ángulo de detección dado, θ_r , medido con respecto a la dirección de incidencia del láser sobre la muestra, y que colecta la luz dispersada por las partícula; c) un correlador digital que conjuntamente con un software, permiten obtener la función de autocorrelación de primer orden de la intensidad de luz dispersada a cada ángulo, $g^{(2)}(\tau)$ para diferentes valores del retardo de tiempo τ (McClements, 1999).

Las aplicaciones más usuales del DLS son para determinar el tamaño y distribución de tamaños de moléculas dispersas o disueltas en un líquido como proteínas, polímeros, micelas, carbohidratos, nanopartículas y dispersiones coloidales (McClements, 1999).

En una dispersión coloidal, la intensidad dispersada a un determinado ángulo fluctúa en el tiempo debido al movimiento Browniano de las partículas. Puesto que la intensidad dispersada en un tiempo t depende de la configuración espacial de las partículas en ese mismo instante, el movimiento de las partículas coloidales en el seno del fluido ocasiona fluctuaciones de la intensidad. La función que describe las fluctuaciones de la intensidad dispersada $I(q, t)$ es una función del tiempo, es decir, los movimientos difusivos de

partículas en solución dan lugar a fluctuaciones en la intensidad de la luz dispersada en la escala de tiempo de microsegundos. Esta fluctuación provoca un “ruido” en la señal de luz dispersada. Las fluctuaciones de ese “ruido” son una medida de la velocidad de desplazamiento. La velocidad del movimiento Browniano se define por una propiedad conocida como coeficiente de difusión de translación (D) y se relaciona con el tamaño de la partícula por medio de la ecuación de Stokes-Einstein: $R_{(H)} = kT / (6\pi\eta D)$ donde $R_{(H)}$ es el radio hidrodinámico, D es el coeficiente de difusión traslacional (m^2s^{-1}), k la constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23} NmK^{-1}$), T la temperatura absoluta (K) y η la viscosidad del medio dispersante (Nsm^{-2}). Así, mediante esta ecuación, el radio de partícula determinado representa el radio del volumen esférico, que cualquier partícula, no necesariamente esférica, ocupa en su desplazamiento acompañado de su libre rotación; este es el denominado radio hidrodinámico y corresponde aproximadamente a la mitad de la dimensión más larga de la partícula. El radio calculado es indicativo del tamaño aparente tomando en cuenta los procesos de atracción y asociación con moléculas del solvente.

II. 1. 2. 2. 1. Desarrollo experimental seguimiento de la cinética mediante dispersión dinámica de luz (DLS)

En la figura 1 puede observarse una representación esquemática de un experimento de dispersión de la luz común (Teraoka, 2002). Debido a la dependencia del tamaño de partícula con la intensidad de dispersión de luz, en este trabajo se seleccionó esta técnica con el objetivo de evaluar la cinética de asociación, la agregación o el autoensamblaje de LHR. Para realizar la medición de Dispersión Dinámica de Luz se tomó una alícuota de 0.1 mL de solución de proteína stock y se diluyó en 1 mL de solución salina para posteriormente realizar la medición en un instrumento ALV-5000 a un ángulo de dispersión de 90°. En la figura 2 se muestra una fotografía del equipo.

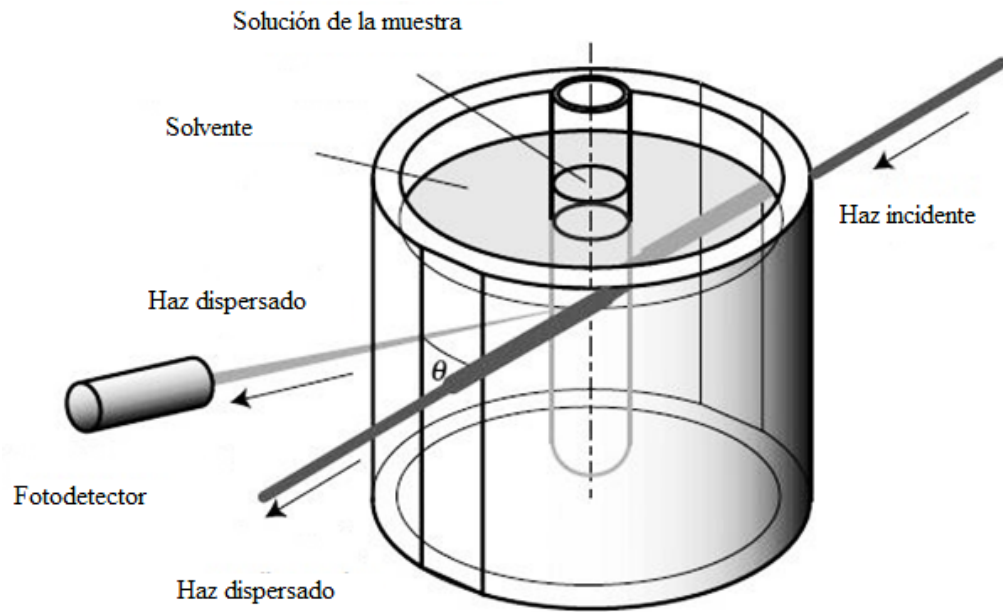


Figura 1. Representación esquemática de un experimento de dispersión de la luz común.

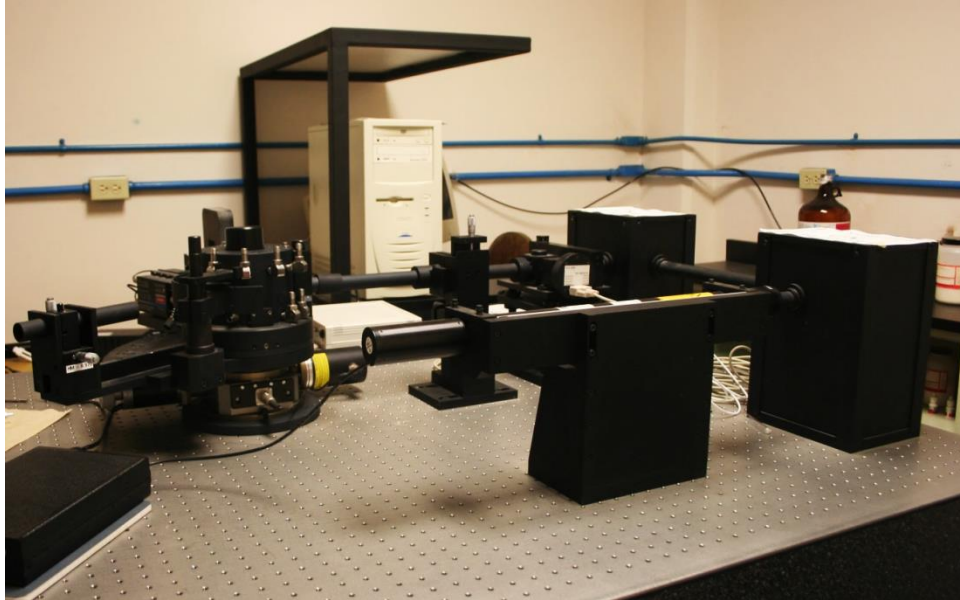


Figura 2. Fotografía de equipo de Dispersión Dinámica de Luz (DLS).

II. 1. 2. 3. Desarrollo experimental de seguimiento de la cinética mediante medidas de tensión superficial

Para realizar las mediciones de tensión superficial, se procedió a tomar 100 μl de solución stock en incubación a los distintos tiempos (min) determinados: 0, 15, 30, 60, 120, 240, 360, 480, 600, 750, 1140, 1620, 1800, 2880, 3000, 4320; Agregando 7 mL de solución salina y transfiriendo, posteriormente, las diluciones a una celda de cuarzo para su medición en Tensiómetro de gota (Drop tensiometer ITC tracker), el cual consta de una microjeringa unida a un capilar cilíndrico sobre la que se forma la gota. Para monitorear la tensión interfacial, del sistema líquido-aire, respecto al tiempo, la celda se colocó en una cámara conectada a un controlador de temperatura y el equipo tomó las imágenes de la gota, mediante una videocámara CCD de alta velocidad, para así realizar el análisis digital. (Möbius y Millar, 1998). En la Figura 3 se muestra un esquema del tensiómetro de gota.

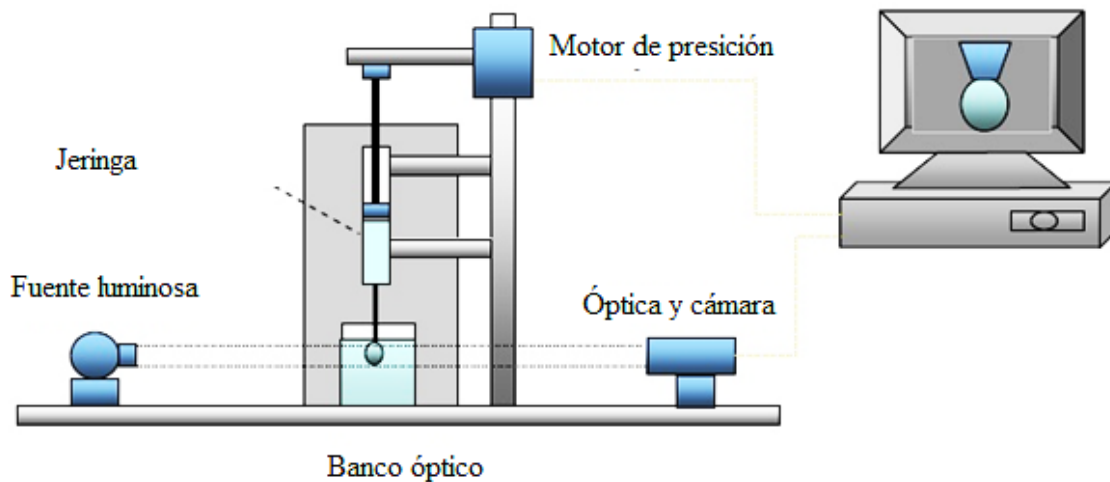


Figura 3. Esquema del Tensiómetro de gota.

II. 1. 4. Determinación de la Morfología de Estructuras de LHr

II. 1. 4. 1. Descripción de la técnica de Microscopía de fuerza atómica (AFM)

El AFM fue inventado en 1986 por Binnig, Quate y Gerber (1986) (Colton *et al.*, 1997). En el documento original, Binnig *et al.*, (1986) presentó al AFM como una combinación de microscopio de efecto túnel (STM) y un lápiz óptico que puede ser utilizado para estudiar conductores y aislantes en una escala atómica. El principio de funcionamiento del AFM, según ha explicado Binnig *et al.*, (1986), consiste en un cantilever con una punta afilada en el extremo se mueve sobre la superficie de la muestra línea por línea midiendo el patrón de lectura y curvas de respuesta a la fuerza de la interacción entre la punta y la superficie. Esta flexión vertical del cantiléver se traduce en información sobre la topografía de la muestra (Hinterdorfer y Dufre, 2006). Desde 1986 el AFM se ha convertido en una herramienta muy versátil y muy popular. Algunas de las características de AFM modernas incluyen alta sensibilidad de fuerza (capacidad de medir fuerzas en el rango pico-Newton), alta precisión de posicionamiento (del orden de 0,01 nm) y la capacidad de proporcionar imágenes en 3D (Hinterdorfer y Dufre, 2006).

Las fuerzas de atracción y repulsión entre la superficie de la punta y la muestra causan que el cantilever se doble (se desvíe lejos o hacia la superficie), la deflexión es observada por un detector como una función de la posición lateral (x, y) es entonces digitalizada para producir la imagen (Meyer, 1992).

La posición de la muestra en un AFM es controlado por el escáner piezoeléctrico que se mueve a través de la muestra en tres dimensiones (x, y, z) con respecto al cantilever. Alternativamente, en algunos AFM es el voladizo, en lugar de la muestra, que se monta en el escáner (Colton *et al.*, 1997). En ambos casos, el escáner está hecho de material piezoeléctrico. Como el nombre sugiere, este material se basa en el efecto piezoeléctrico, generación de una diferencia de potencial a través de las caras opuestas de ciertas cerámicas o cristales, como resultado de la tensión mecánica aplicada. En un AFM, una diferencia de potencial se aplica al material de escáner que da lugar a su alargamiento o contracción (dependiendo de la polaridad de la tensión) (Veeco, 2000). AFM modernos utilizan los llamados tubos piezoeléctricos que se construyen mediante la combinación de

electrodos piezoeléctricos operados independientemente para cada una de las 3 dimensiones.

El tubo se mueve en la dirección z mediante la aplicación de un voltaje entre el interior y todos los electrodos exteriores para inducir la contracción o elongación. La aplicación de un voltaje a sólo uno de los electrodos exteriores induce la flexión del tubo, es decir, el movimiento en las direcciones x y y-dirección.

II. 1. 4. 1. 1. Desarrollo experimental de morfología mediante microscopia de fuera atómica

Para realizar dicha observación se procedió a tomar 100 μ L de solución stock en incubación a los distintos tiempos (min) determinados: 0, 15, 30, 60, 120, 240, 360, 480, 600, 750, 1140, 1620, 1800, 2880, 3000, 4320. Posteriormente se vertió la alícuota en un sustrato sólido (mica), la muestra se dejó secar y posteriormente se procedió a observar en el microscopio de fuerza atómica (AFM) marca JOEL modelo JSPM 4210, utilizando el modo de no contacto. En la figura 4 podemos observar un esquema de representación del AFM y en la figura 5 una fotografía del equipo.

Para la obtención de las monocapas sobre mica, se realizó el procedimiento mencionado anteriormente para las monocapas comprimiendo hasta alcanzar una presión de 30 mN/m transfiriendo a la mica a una velocidad de 1 mm/min. La observación por microscopía de fuerza atómica se realizó sistemáticamente dentro de un intervalo de entre 10 y 15 minutos después de finalizar la transferencia. Se procedió a observar en el microscopio.

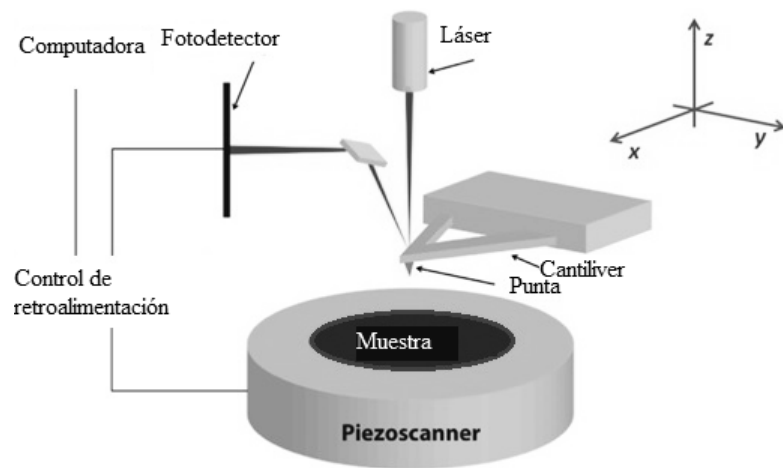


Figura 4. Representación de componentes de AFM.



Figura 5 Fotografía de equipo de AFM.

II. 1. 5. Determinación de Transición en la Conformación Estructural de LHR

II. 1. 5. 1. Descripción de la técnica de espectroscopia infrarroja con transformadas de Fourier (FT-IR)

Los espectros en la región infrarroja están asociados a las transiciones entre niveles de energía vibracional; estos niveles corresponden a vibraciones (tensión-contracción) y flexiones y otros movimientos complejos de las moléculas. Los modos de vibración de cada grupo son sensibles a cambios en la estructura química, cambios en las conformaciones y a interacciones con el medio. La espectroscopía infrarroja (IR) se ha utilizado para obtener información acerca de la composición química, la configuración, y la cristalinidad de los materiales poliméricos y biológicos (Ostrov y Gazit, 2010). El intervalo que abarca la espectroscopía infrarroja puede dividirse en tres regiones: infrarrojo lejano, medio y cercano. En general todas las aplicaciones analíticas caen entre el rango de 4000 y 670 cm^{-1} .

La región útil que nos interesa para macromoléculas biológicas se encuentra en el intervalo entre 4000 y 1400 cm^{-1} . Las bandas de estos espectros son anchas y centradas en frecuencias de grupos característicos tales como -C=O , -C=N , -N-H , amidas en proteínas, éster fosfato en ácidos nucleicos, etc. La mayoría de estudios de IR se centran en la caracterización de las estructuras secundarias de proteínas mediante el uso de bandas de absorción que reflejan los movimientos del enlace peptídico. El enlace peptídico produce hasta 9 bandas características, sin embargo, las bandas Amida I y Amida II son las dos principales bandas de los espectros IR de proteínas; La banda Amida I es la más intensa de las bandas de absorción en proteínas, entre el intervalo de 1600 y 1700 cm^{-1} , estando asociada principalmente a la vibración de tensión del grupo C=O (70-85%) y está directamente relacionada con la conformación del esqueleto polipeptídico y el patrón de enlaces de H.

De los 20 aminoácidos proteicos solo, Asp, Asn, Glu, Gln, Lys, Arg, Tyr, Phe, His, muestran una absorbancia significativa en la región de 1800 y 1400 cm^{-1} (región Amida I y Amida II) (Bai *et al.*, 2007; Slocik *et al.*, 2009). Estas bandas son conformacionalmente sensibles, y su posición se pueden atribuir a una conformación dominante de proteína, es decir, hélice- α , hoja- β paralela y antiparalela, giros β o estructuras al azar (Bai *et al.*, 2007; Slocik *et al.*, 2009).

La forma de la banda Amida I de las proteínas es característica de su estructura secundaria. Byler y Susi (1986) publicaron en *Biopolymers* la primera determinación de estructuras secundarias en proteínas a partir de espectros FT-IR. Esta determinación fue posible por la disponibilidad de espectros digitalizados con una elevada relación Señal/ruido y por la disponibilidad de ordenadores y de software capaz de realizar las operaciones de análisis de estos espectros en un tiempo aceptable. La información sobre la estructura secundaria en los espectros IR está mezclada por el solapamiento de las bandas de diferentes estructuras. Así, para obtener información estructural hemos de separar las diferentes contribuciones que se dan en la zona de la banda Amida I, en este caso en particular.

El método utilizado es el método de ajuste de bandas el cual está basado en la suposición de que los espectros de bandas simples (cada banda estrecha característica de un elemento de estructura secundaria) experimentan un ensanchamiento en disolución o en estado sólido dando como consecuencia un solapamiento de las bandas y no pueden distinguirse en la envoltura. En este método se realiza una operación de corrección del efecto de ensanchamiento de las bandas, operación llamada desconvolución, normalmente mediante la desconvolución de Fourier (con frecuencia referida erróneamente como autodesconvolución por razones históricas). La finalidad es identificar el número y posición aproximada de las bandas que componen la Amida I. Con el espectro así corregido se realiza un ajuste de bandas en la Amida I por un algoritmo iterativo que minimiza la desviación cuadrática media de la envoltura resultante del ajuste y la experimental. El área de una banda se asigna a una estructura de acuerdo con su posición (Byler y Susi, 1986; Goormaghtigh, *et al.*, 1994). Esta asignación descansa en los intervalos de aparición aceptados para las diferentes estructuras secundarias. Este método ha sido validado por comparación con los datos de difracción de rayos X, siendo los errores absolutos en la estimación de porcentajes de estructura secundaria del 2-9% (Byler y Susi, 1986; Goormaghtigh, *et al.*, 1994; Kumosinski y Unruth).

II. 1. 5. 1. 1. Desarrollo experimental mediante la técnica de espectroscopia infrarroja con transformadas de Fourier (FT-IR)

Las mediciones se hicieron tras liofilizar la solución madre de LHr correspondiente a los 0, 30, 120, 300, 600, 750, 1440 y 3000 minutos de incubación. Las siguientes frecuencias vibratorias se han asignado a: 1654 cm^{-1} para la hélice- α ; 1624, 1631, 1637, y

1675 cm^{-1} para hojas- β ; 1663, 1670, 1683, 1688, y 1694 cm^{-1} para giros; y 1645 cm^{-1} para otras estructuras (Dobson, 2003; Gorzny *et al.*, 2010; Ostrov y Gazit, 2010). Las cantidades relativas de las cuatro estructuras secundarias están determinadas por las áreas relativas bajo los picos de la banda.

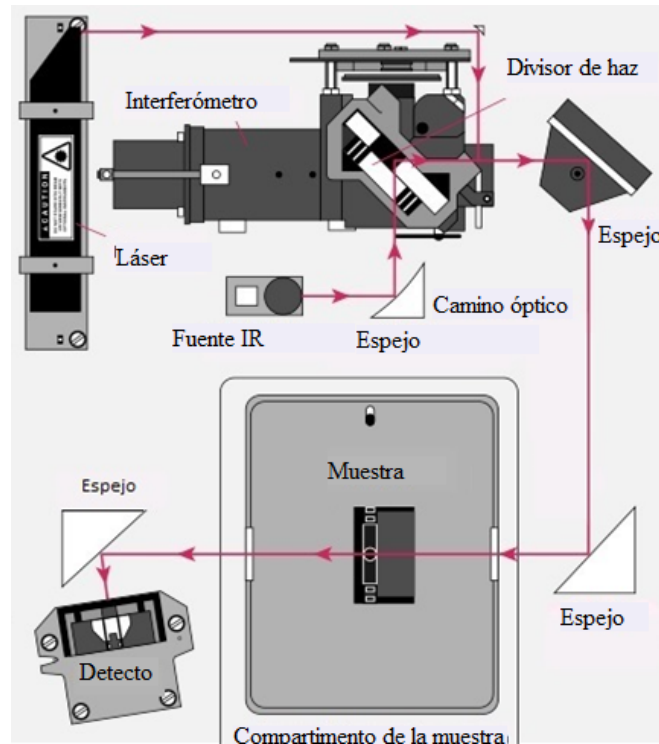


Figura 6. Esquema de funcionamiento de IR.

II. 1. 6. Viabilidad Celular

Cada organismo es una única célula o bien, está constituido por un número variable de células. Por lo tanto, para apreciar las capacidades y limitaciones de los organismos vivos es fundamental comprender algunas de sus propiedades. La naturaleza dinámica de la célula es particularmente significativa, como se pone de manifiesto por su capacidad de crecer, reproducirse y especializarse, y por su habilidad para responder a estímulos y adaptarse a cambios en el medio ambiente; En particular, esta naturaleza dinámica requiere que cada célula u orgánulo contenga algún tipo de barrera física para controlar el intercambio entre su medio interno y externo.

La citotoxicidad celular se define como una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a que se produzca un daño que pueda ser detectado. A partir de aquí, diferentes grupos de investigación han desarrollado pruebas *in vitro* para predecir los efectos tóxicos de las drogas y los compuestos químicos, utilizando como modelos experimentales cultivos primarios y órganos aislados como líneas celulares establecidas. Estos son capaces de detectar mediante, diferentes mecanismos celulares conocidos, los efectos adversos de interferencia con la estructura y propiedades esenciales para la supervivencia celular, proliferación y / mantenimiento de sus funciones vitales. Dentro de estos se encuentran mecanismos para evaluar la integridad de la membrana y del citoesqueleto, el metabolismo, la síntesis y degradación, liberación de constituyentes celulares o productos, regulación iónica y división celular (Fentem, 1994).

Uno de los ensayos más conocidos y ya validados es el ensayo de reducción del Bromuro de 3(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5- difeniltetrazolio (MTT) (Fentem, 1994). Este método es simple y se usa para determinar la viabilidad celular, dada por el número de células presentes en el cultivo lo cual es capaz de medirse mediante la formación de un compuesto coloreado, debido a una reacción que tiene lugar en las mitocondrias de las células viables (Shayne, 1999).

El MTT es captado por las células y reducido por la enzima succínico deshidrogenasa mitocondrial a su forma insoluble formazan; este queda retenido en las células y puede ser liberado mediante la solubilización de las mismas. De esta forma es cuantificada la cantidad de MTT reducido mediante un método colorimétrico, ya que se produce como consecuencia de la reacción un cambio de coloración del amarillo al morado.

La capacidad de las células para reducir al MTT constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional es interpretada como una medida de la viabilidad celular, permitiendo obtener información acerca de la toxicidad del compuesto que se evalúa. El período de exposición de la sustancia de ensayo varia, puede medirse durante períodos cortos (1-2 h de tratamiento), o en periodos largos de 24 ó 72 h. La D.O debe medirse al concluir el tiempo de incubación 550 nm utilizando un filtro de 620 nm como referencia.

Los resultados se expresarán como porcentaje (%) de células vivas, según la siguiente relación:

$$\% = D.O \text{ de células tratadas} \times \frac{100}{D.O \text{ de células controles}} \quad (1)$$

Las células del epitelio pigmentario retinal humano (células ARPE-19) se mantuvieron en medio mínimo esencial (MEM) (Sigma), suplementado con 10% de suero fetal bovino, penicilina 100 uμ/mL y estreptomicina 100 μg/mL, en frascos de cultivo estériles de 75 cm² e incubadas en condiciones estándar (5% CO₂ en el aire, 37 °C y 100% de humedad relativa) hasta lograr la confluencia. El medio suplementado aporta los factores de crecimiento, hormonas, minerales, lípidos y otros micronutrientes, que suplen satisfactoriamente los requerimientos metabólicos que garantizan la proliferación y adhesión celular.

Las células fueron sometidas a tripsinación por 7 minutos con tripsina-EDTA 0.2%, luego de lavar las mismas con PBS-EDTA. Posteriormente fueron centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos y resuspendidas en 1 ml de medio de cultivo. Inmediatamente después se realizó el conteo preparando una solución de 10 μl de células en medio y 90 μl colorante azul Tripán. Mediante la tinción con azul Tripán, las células muertas captan el colorante, mientras que las células vivas no lo hacen, ya que el colorante se une a las proteínas intracelulares de las células muertas por presentar una membrana celular permeable, de esta forma se descartan del conteo las células teñidas.

El tratamiento se llevó a cabo en placas de 96 pozos con ~10,000 células por pozo en 100 μL de medio. Se prepararon las tres diluciones de las fibras amiloides correspondientes a 5mM, 10 mM y 20 mM para los tiempos de incubación correspondientes a 0, 30, 120, 300, 600, 720 y 3000 minutos, en medio y se le añadieron alícuotas de 50 μL a cada pozo. La viabilidad celular se evaluó después de 48 h de incubación con las estructuras de cada tiempo de incubación. Después del periodo de incubación se agregaron 10μl de 3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio (MTT), a cada pozo, y las muestras se incubaron durante 4 h. Por último se realizó la medición mediante el lector de microplacas para la cuantificación de densidad óptica en el lector de microplacas como se observa en la figura 7.

Los datos fueron sujetos a análisis estadístico mediante ANOVA usando el programa estadístico GraphPad Prism versión 6.0. La prueba de Comparación Múltiple de Newman-Keuls fue usada para comparar los datos dentro de cada experimento. Los experimentos fueron realizados por triplicado. Los valores $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.



Figura 7. Fotografía de lector de microplacas para la cuantificación de densidad óptica.

II. 1. 7. Nanovarillas de Oro

II. 1. 7. 1. Formación de nanovarillas de oro

Las nanovarillas (NV) de oro se prepararon a través de un proceso de crecimiento de semillas usando ácido ascórbico como reductor. Para realizar este método se añadieron nanopartículas esféricas de oro con diámetros de entre 3 y 5nm a una solución de crecimiento que contiene HAuCl_4 , nitrato de plata, ácido ascórbico y bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB). La síntesis se llevó a cabo variando la concentración de ácido ascórbico a 0.75 mM, 1.00 mM, 1.25 mM, 1.75 mM.

II. 1. 7. 2. Métodos de crecimiento mediado por semillas

Se utilizó el método de crecimiento mediado por semillas, el cual es una forma de síntesis utilizada para obtener NPs de tamaño y forma bien definidos. La síntesis consistió en preparar una solución con partículas precursoras, denominadas semillas, que actúan

como sitios de nucleación para generar nanopartículas más grandes en el seno de una solución de crecimiento preparada, previamente, con sal de oro y un agente estabilizador (CTAB) y ácido ascórbico como agente reductor; éste se utiliza para reducir Au^{+3} a Au^{+1} ; y solo en la presencia de semillas del Au^{+1} se reducen a Au^0 ; por lo tanto, el Au^0 reducido puede depositarse sobre la superficie de las semillas.

II. 1. 8. Conjugación de NV de oro con péptidos

Las NV de oro se conjugaron primeramente agrando PEG-OMe (1 mM) en solución de NV de oro con valores de absorbancia de 1 y se mantuvo en agitación durante 10 minutos; posteriormente se procedió a agregar PEG-COOH (1 mM) a la solución de NV-PEG-OMe, previamente centrifugada por 5 minutos a 1400 rpm y resuspendida en agua, y se mantuvo en agitación durante 1 hora. Luego de esto la solución se centrifugó durante 10 minutos a 1400 rpm. Al pellet obtenido se le agregó NHS (0.5 mg/ mL) y EDC (0.2 mg/ mL) para la activación de $-\text{COOH}$ en buffer MES. Luego de la activación de $-\text{COOH}$ se agregó péptido D1 y péptido Angiopep-2 en relación 1:9 respectivamente.

II. 1. 9. Espectrofotometría UV-Vis

Cuando una molécula determinada absorbe radiación UV-visible, la energía absorbida excita electrones de orbitales de más baja energía a orbitales de más alta energía en la molécula. La máxima absorción UV-visible ocurre a una longitud de onda característica de la estructura molecular y se puede determinar a partir de una gráfica de intensidad de absorción (absorbancia) contra longitud de onda de la radiación absorbida (Moore et al., 2000). Cuando la radiación interacciona con la materia, pueden ocurrir varios procesos como reflexión, dispersión, absorbancia, fluorescencia/fosforescencia (absorción y reemisión) y una reacción fotoquímica (absorbancia y rotura de enlaces). En general, cuando se miden espectros UV-visible, sólo es deseable que ocurra absorbancia. Como la luz es una forma de energía, la absorción de la luz por la materia causa que aumente el contenido de energía de las moléculas (o átomos).

La energía potencial total de una molécula, generalmente se representa como la suma de sus energías electrónica, vibracional y rotacional:

$$E_{\text{total}} = E_{\text{electrónica}} + E_{\text{vibracional}} + E_{\text{rotacional}}$$

La cantidad de energía que una molécula posee en cada forma no es un continuo, sino una serie de niveles o estados discretos. Las diferencias de energía entre los diferentes estados siguen el orden: $E_{\text{electrónica}} > E_{\text{vibracional}} > E_{\text{rotacional}}$

En algunas moléculas y átomos, los fotones de luz UV y visible tienen suficiente energía para causar transiciones entre los diferentes niveles. La longitud de onda de la luz absorbida es aquella que tiene la energía requerida para mover un electrón desde un nivel de energía inferior a uno superior. Estas transiciones deben resultar en bandas de absorbancia muy estrechas, a longitudes de onda características de la diferencia entre los niveles de energía de las especies absorbentes. Sin embargo en las moléculas, los niveles de energía vibracional y rotacional están superpuestos sobre los niveles de energía electrónica. Como pueden ocurrir muchas transiciones con diferentes energías, las bandas se ensanchan. El ensanchamiento es incluso mayor en las disoluciones, debido a las interacciones disolvente-soluto.

Un instrumento para medir la absorción de radiación UV y visible está construido de una o más fuentes de luz, un selector de longitud de onda, un recipiente de muestra, transductores de radiación, un procesador de señal y dispositivos de lectura. Instrumentos de haces individuales varían ampliamente en sus características de complejidad y rendimiento. Los más simples consisten de una bombilla de tungsteno como la fuente, un filtro de vidrio conjunto para la selección de longitud de onda, un tubo de ensayo para los titulares de la muestra, una célula fotovoltaica como el transductor, y un analogmeter como el dispositivo de lectura. Otros instrumentos sofisticados tienen fuentes de tungsteno y lámpara de deuterio intercambiables, utilizan una célula de sílice rectangular, y están equipadas con una alta resolución de rejilla monocromador con hendidura variable. Tubos fotomultiplicadores se usan como transductores, y la salida es a menudo digitalizada, tratados y almacenados en un ordenador de manera que puede ser la impresora o representan en varias formas (Clarke *et al.*, 2004).

II. 1. 10. Balanza de Langmuir-Blodgett

La bicapa lipídica es una estructura muy difícil de estudiar pues presenta ciertas limitaciones como ser muy delgada y frágil. Sin embargo, durante los últimos años algunas técnicas se han desarrollado para permitir la investigación de su estructura y función.

Mediante la técnica de Langmuir-Blodgett es posible organizar moléculas individuales en estructuras ordenadas en dos dimensiones, por lo que el interés en esta

técnica, radica en la posibilidad de construir sistemas modelo de superficies biológicas, así como preparar películas orgánicas de interés en electrónica molecular.

La mayoría de las bicapas naturales están compuestas principalmente por fosfolípidos, esfingolípidos, la esfingomiélin y los esteroides como el colesterol. de los fosfolípidos, el grupo más común es la fosfatidilcolina (DPPC), que representan aproximadamente la mitad de los fosfolípidos en la mayoría de células de mamíferos (Yeagle *et al.*, 1993). La PC tiene una cabeza polar anfipática, ya que tiene una carga negativa (grupo fosfato) y una carga positiva (grupo amina), debido a que estos en ciertas condiciones están ionizados.

Otros grupos también están presentes en diversos grados y pueden incluir la fosfatidilserina (DPPS) fosfatidiletanolamina (DPPE) y fosfatidilglicerol (DPPG). Estos grupos a menudo confieren funcionalidad biológica específica, por ejemplo, la presencia de la fosfatidilserina (DPPS) en la cara de la membrana extracelular de los eritrocitos es un marcador de la apoptosis celular (Fadok, *et al.*, 1998) mientras que la presencia de PS en vesículas de la placa de crecimiento ósea, es necesaria para la nucleación de cristales de hidroxiapatita y la mineralización ósea (Anderson *et al.*, 2005).

La balanza de Langmuir consiste en una tina rectangular de teflón la cual se llena con agua como subfase, con barreras móviles para delimitar con ellas el área de superficie. Las isoterma Langmuir nos permite obtener información sobre el estado termodinámico que presenta una monocapa a una temperatura determinada, ya que a través de ella se pueden identificar transiciones de fase que nos indican cambios termodinámicos que ocurren en la monocapa de Langmuir y a la vez obtener información sobre el área aproximada que ocupan las moléculas. Estos cambios son casi análogos a los estados más comunes que son el gas, líquido y sólido. Los cambios de fase mencionados anteriormente, se pueden identificar fácilmente mediante el control de la presión superficial (Π). La presión superficial Π (N/m) es una variable termodinámica que refleja el cambio en la energía libre de la superficie cuando se aumenta el área.

Cuando una sustancia anfifílica se deposita sobre la superficie del agua, este se extiende para cubrir toda el área disponible. Cuando una sustancia anfifílica se deposita sobre la superficie del agua, este se extiende para cubrir toda el área disponible. El indicador más importante de las propiedades de la monocapa se obtiene midiendo la presión de superficie en función del área de superficie que es correspondiente a cada

molécula, esto a una temperatura constante. Si esta área es grande, la distancia entre moléculas adyacentes también es grande, lo que significa que sus interacciones entre ellos mismos son débiles. En este caso, la monocapa se comporta como un gas de dos dimensiones y tiene poco efecto sobre la tensión superficial del agua. Sin embargo, cuando el área disponible se reduce utilizando las barreras, las moléculas anfifílicas comienzan a tener un efecto repulsivo entre ellas. Este efecto es un análogo en dos dimensiones de la presión superficial, Π (N/m) y se define:

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \quad (2)$$

donde, γ_0 es la tensión superficial sin el surfactante y γ es la tensión superficial con el tensioactivo presente formando una monocapa a un área determinada.

Para medir la presión de una monocapa en la interfase agua- aire se utiliza siempre como referencia la energía superficial del agua: $\gamma_0 = 73 \text{ mJ m}^{-2}$ y γ la tensión superficial en presencia de la monocapa a un área determinada.

Esta medición de la presión se obtiene mediante la determinación de la fuerza debida a la tensión superficial en una placa suspendida por encima y parcialmente sumergida en la subfase, denominada Placa de Wilhelmy. La fuerza se convierte entonces en la tensión superficial usando las dimensiones de la placa. Esta placa está hecha de papel de cromatografía, pero puede ser de una variedad de materiales. La Figura 8 muestra las dimensiones (anchura w , la longitud l , el espesor t) de una placa parcialmente sumergida a una profundidad h .

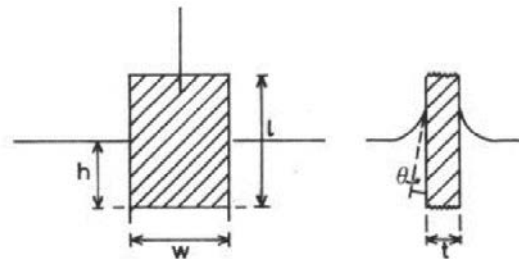


Figura 8. La placa de Wilhelmy parcialmente sumergida en la subfase.

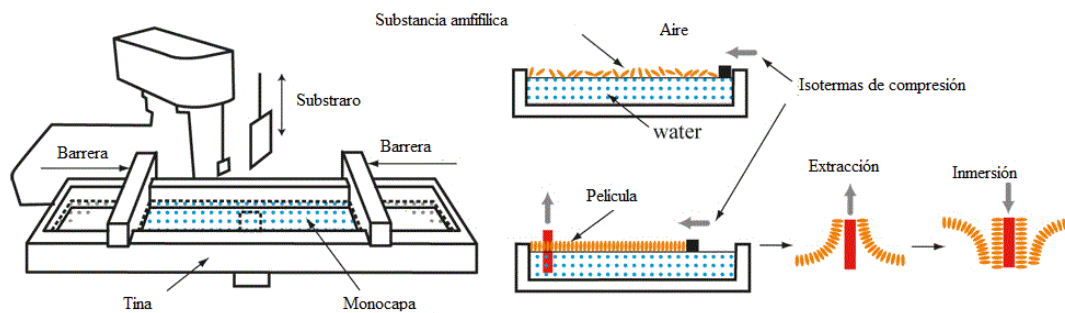


Figura 9. Esquema de formación de monocapa de Langmuir y obtención de Isoterma de compresión y películas de LB.

En la figura 9 se muestra la deposición de moléculas anfifílicas sobre la superficie del agua y la formación de una monocapa de Langmuir, así como la obtención de la isoterma correspondiente. Las moléculas son esparcidas por toda la superficie hasta alcanzar los bordes exteriores de la Balanza de Langmuir, la cual contiene agua. Posteriormente, las barreras "barren" la superficie, comprimiendo así la monocapa. Las moléculas se compactan hasta ordenarse de tal forma que los grupos hidrofílicos queden en contacto con el agua y los grupos hidrófobos queden orientados hacia el aire, incrementando de esta manera la presión superficial dando como resultado estas transformaciones mencionadas anteriormente.

La forma de la isoterma depende de las interacciones laterales entre moléculas. Esta, a su vez, depende del empaquetamiento molecular, que está influenciado por factores tales como el tamaño del grupo hidrofílico, la presencia de grupos polares, la longitud y el número de cadenas de hidrocarburos, y su conformación.

Típicamente en el estado gaseoso (G) las moléculas están lo suficientemente separadas en la superficie del agua y no hay interacción de las moléculas fosfolipídicas en la interface. Conforme se reduce el área de superficie de la monocapa, las cadenas hidrófobas de las moléculas comienzan a interactuar, observándose la fase de líquido expandido (E). En esta etapa, las moléculas en la superficie del agua están en una conformación aleatoria con sus grupos polares en contacto con la subfase. Si se continúa reduciendo el área molecular progresivamente, puede aparecer una fase condensada (C) En

fase condensada las moléculas están estrechamente empaquetadas y orientadas con los grupos hidrófobos hacia fuera de la superficie del agua, esta representación puede observarse en el esquema de la figura 10.

II. 1. 11. Composición de modelo de membrana endotelial

Se prepararon dos tipos de mezclas de fosfolípidos a esparcir sobre la subfase compuesta por buffer de fosfato a pH 7.4 para modelar la composición de una membrana endotelial. Se preparó una solución madre de cada uno de los fosfolípidos a una concentración de 1mg/mL en el caso de la fosfatidilcolina (DPPC), fosfatidilserina (DPPS), esfingomiolina (SM) y a una concentración de 1.2 mg/mL de fosfatidiletanolamina (DPPE) en el caso de la mezcla que contenía este último fosfolípido, todos ellos en una solución de cloroformo como disolvente por su alta volatilidad.

La solución de mezcla para el modelo de membrana se preparó variando los porcentajes como puede observarse en la tabla I:

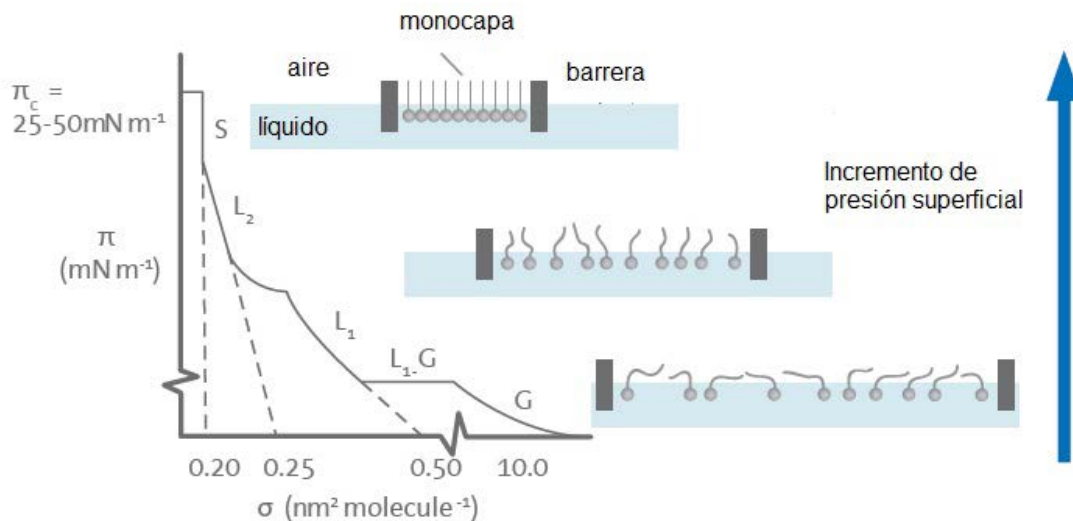


Figura 10. Diagrama esquemático de una isoterma de presión-área. Las distintas regiones representan las fases que las exposiciones monocapa de surfactante durante la compresión

Tabla I. Composición de mezclas de fosfolípidos

MMCE DPPC/PS/PE y SM		MMCE DPPC/PS y SM	
Fosfolípido	Porcentaje (%)	Fosfolípido	Porcentaje (%)
Etanolamina (DPPE)	19.78	Fosfatidilcolina	55.6
Fosfatidilcolina (DPPC)	38.6	Fosfatidilserina	17.1
Esfingomielina (SM)	29.2	Esfingomielina	27.3
Fosfatidilserina (DPPS)	12.4		

II. 1. 12. Preparación y limpieza de la balanza de Langmuir

Previo a comenzar cada uno de los experimentos se procedió a la calibración (nivel, área y presión) de la balanza. La superficie interna de la balanza fue limpiada con etanol y cloroformo aplicándolos con ayuda de un algodón hasta remover el polvo y grasas que puedan encontrarse en la superficie. Al colocar un volumen de 480 mL de agua ultra pura (18 M Ω -cm) en la balanza se procedió a cerrar las barreras procurando que la presión no aumentara de 0.2 mN/m, valor indicado como apropiado para trabajar.

II. 1. 13. Formación de monocapas de mezcla de MMCE de la BHE de DPPC/DPPS/DPPE y SM a 25°C en interfase aire- agua

Se preparó un buffer de fosfatos pH 7.4 (NaH₂PO₄ y Na₂HPO₄), agua ultra pura 18 M Ω -cm de resistividad, para utilizarlo como subfase. Se depositó sobre la balanza un volumen de 480 mL de buffer; posteriormente un volumen de 50 μ L de la mezcla de fosfolípidos fue esparcida sobre la subfase con una microjeringa y se esperó 15 minutos para la evaporación del solvente intentando tener únicamente fosfolípidos sobre la subfase. Hecho esto, se realizó la obtención de las isotermas correspondientes a una velocidad de 20cm²/min controlando la temperatura con un circulador de agua.

II. 1. 14. Isotermas de adsorción NV de oro en monocapas de mezcla de MMCE de la BHE

Un volumen de 200 μL de nanovarillas de oro fueron depositados en 480 mL de buffer con la finalidad de que las nanovarillas (NV) se homogenizaran en la subfase; posteriormente la subfase con las NV fue depositada sobre la balanza. Teniendo la subfase, un volumen de 50 μL de la mezcla de fosfolípidos fue esparcida cuidadosamente sobre la subfase con una microjeringa y se esperó 1 hora para estabilizar. Se realizó la obtención de las isotermas correspondientes a una velocidad de 1 cm^2/min y manteniendo la temperaturas a 25°C controlada por un circulador de agua. Los experimentos se realizaron para Au NV sintetizadas variando las concentraciones de ácido ascórbico: .075 mM, 1mM, 1.25 mM y 1.75 mM.

II. 1. 15. Películas de Langmuir- Blodgett

La transferencia de las películas se realizó a una presión de 30 mN/m y una velocidad de 1 mm/min, esto con la finalidad de regular el proceso de transferencia en el sentido de que al mantener una velocidad baja, la estructura o arreglo molecular de la fase no se viera afectada al momento de la transferencia de la monocapa al sustrato sólido de la mica.

II. 1. 16. Caracterización de las monocapas por medio de AFM

Para la obtención de las monocapas sobre mica, se realizó el procedimiento mencionado anteriormente para las monocapas comprimiendo hasta alcanzar una presión de 30 mN/m transfiriendo a la mica a una velocidad de 1 mm/min. Sistemáticamente la observación por microscopía de fuerza atómica se realizó dentro de un intervalo de entre 10 y 15 minutos después de finalizar la transferencia. Se procedió a observar en el microscopio de fuerza atómica (AFM) marca JEOL modelo JSPM 4210, utilizando el modo de no contacto.

II. 1. 17. Formación de monocapas de mezcla de MMCE de la BHE

Se depositó sobre la balanza un volumen de 50 mL de buffer; posteriormente un volumen de 10 μ L de la mezcla de fosfolípidos fue esparcida sobre la subfase con una microjeringa y se esperó 15 minutos para la evaporación del solvente intentando tener únicamente fosfolípidos sobre la subfase. Hecho esto, se realizó la obtención de las isotermas correspondientes a una velocidad de 1 cm^2/min controlando la temperatura con un circulador de agua.

II. 1. 17. 1. Isotermas de adsorción de NV de oro conjugadas con péptidos en MMCE de la BHE

Un volumen de 50 μ L de nanovarillas de oro fueron depositados en 50 mL de buffer con la finalidad de que las Au NV de oro se homogenizaran en la subfase; posteriormente la subfase con las Au NV fue depositada sobre la balanza. Teniendo la subfase, un volumen de 10 μ L de la mezcla de fosfolípidos fue esparcida cuidadosamente sobre la subfase con una microjeringa y se esperó 1 hora para estabilizar. Se realizó la obtención de las isotermas correspondientes a una velocidad de 1 cm^2/min y manteniendo la temperaturas a 25°C controlada por un circulador de agua. Los experimentos se realizaron para Au NV sintetizadas con 1 mM de ácido ascórbico, Au NV conjugadas con péptido Angiopep-2/D1, y blancos de CTAB, péptido D1, péptido Angiopep-2.

II. 1. 17. 2. Isotermas de adsorción de LHr en MMCE de la BHE

Para estudiar el comportamiento de la barrera hematoencefálica, se requiere imitar el entorno interfacial en el que se podría llevar a cabo la interacción entre las determinadas moléculas, en este caso soluciones de proteína de LHr y una membrana modelo. El estudio de la interacción entre BHE y las fibras tipo amiloides puede ser analizado mediante interacciones no específicas, simplificándolo, dado la complejidad de las membranas biológicas naturales, a un modelo por medio de la técnica de Lagmuir-Blodgett. Las interacciones fisicoquímicas de la superficie, se pueden utilizar como un modelo que pueda imitar las membranas biológicas, lo que tiene una inmensa importancia en el estudio de las

enfermedades relacionadas con las fibras tipo amiloide con respecto a un entorno de lípidos de membrana.

Un volumen de 1 mL de los tiempos de incubación correspondientes a 0, 30, 120, 300, 600, 750 y 3000 minutos de LHr, fueron depositados en 480 mL de buffer con la finalidad de que las nanovarillas se homogenizaran en la subfase; posteriormente la subfase con las nanovarillas fue depositada sobre la balanza. Teniendo la subfase, un volumen de 50 μ L de la mezcla de fosfolípidos fue esparcida cuidadosamente sobre la subfase con una microjeringa y se esperó 1 hora. Se realizó la obtención de las isothermas correspondientes a una velocidad de 1cm²/min y manteniendo la temperaturas a 25°C controlada por un circulador de agua.

II. 1. 18. Películas de Langmuir- Blodgett

Mediante la técnica de Langmuir-Blodgett, es posible depositar una película de una monocapa sobre un sustrato sólido, o construir multicapas por deposiciones sucesivas de monocapas. En este caso, esta técnica se llama Langmuir-Blodgett y las películas se denominan películas de Langmuir-Blodgett (LB). Una monocapa se adsorbe homogéneamente con cada inmersión. Estas películas LB son de gran interés ya que permiten la construcción de apilamientos capas funcionales que se pueden utilizar en dispositivos electrónicos moleculares, tales como sensores de gas, diodos o en dispositivos semiconductores como aislantes en transistores.

La transferencia de las películas, figura 11, se realizó a una velocidad de 1 mm/min, esto con la finalidad de regular el proceso de transferencia en el sentido de que al mantener una velocidad baja, la estructura o arreglo molecular de la fase no se vea afectada al momento de la transferencia de la monocapa al sustrato sólido de la mica.

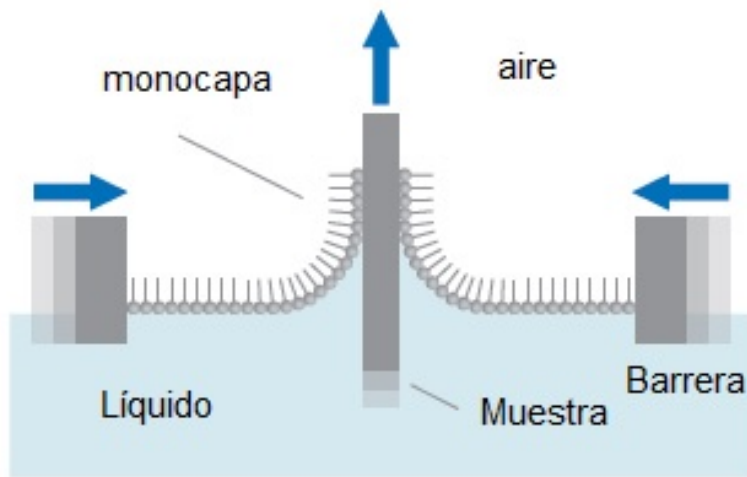


Figura 11. Representación esquemática de formación de una película de Langmuir-Blodgett.

II. 1. 19. Películas de Langmuir- Blodgett bicapa lipídica con solución de LHr

Mediante Langmuir-Blodgett, se realizó una transferencia a un sustrato sólido de una multicapa, específicamente, una bicapa lipídica por deposición sucesiva. Posteriormente, se procedió a depositar la mica con la bicapa del MMCE de la BHE transferida en ella, a un vaso de precipitado con PBS y solución de LHr de un estadio correspondiente a 750 minutos de incubación. El sustrato con la bicapa se dejó reposando en la solución 5 minutos y posteriormente la mica fue observada en el microscopio de fuerza atómica AFM.

II. 2. Literatura Citada

- Andersson, K., Olofsson, A., Nielsen, E., Svehag, S., y Lundgren, E. 2002. Only Amyloidogenic Intermediates of Transthyretin Induce Apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 294(2):309-314.
- Bai, H.; Xu, K.; Xu, Y. y Matsui, H. 2007. Fabrication of Au Nanowires of Uniform Length and Diameter Using a Monodisperse and Rigid Biomolecular Template: Collagen-like Triple Helix. *Angewandte Chemie International Edition*. 46:3319–3322.
- Binnig, G., Quate, C.F., y Gerber Ch. 1986. Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters*, 56(9):930933
- Byler D. M. y Susi H. 1986. Examination of the Secondary Structure of Proteins by Deconvolved FTIR Spectra. *Biopolymers* 25(3):469-87.
- Colton R.J., Baselt D.R, Dufrene Y.F y Lee G. 1997. Scanning Probe Microscopy. *Current Opinion in Chemical Biology*. 1 :370-377.
- Dobson, C. 2003. Protein Folding and Misfolding. *Nature* 426:884–890.
- Fentem J.H. 1994. The Use of Human Tissues *In vitro* Toxicology, Summary of General Discussions. *Human Experimental Toxicology* 13(2):445-449.
- Goormaghtigh, E., Cabiaux, V. y Ruyschaert, J. 1994. Determination of Soluble and Membrane Protein Structure by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. III. Secondary Structures. *Subcellular Biochemistry* 23: 405-450.
- Hilal N., Bowen W.R., Alkhatib L. y Ogunbiyi O. 2006. A Review of Atomic Force Microscopy Applied to Cell Interactions with Membranes. *Chemical Engineering Research and Design*, 84(A4):282-292.
- Hinterdorfer, P y Dufrene, Y. F. 2006. Detection and Localization of Single Molecular Recognition Events Using Atomic Force Microscopy. *Nature Methods*, 3(5):347-355.
- Hirano, A., Yoshikawa, H., Matsushita, S., Yamada, Y. y Shiraki, K. 2012. Adsorption and Disruption of Lipid Bilayers by Nanoscale Protein Aggregates. *Langmuir* 28: 3887-3895
- Kumosinski, T., y Unrush, J. 1996. Quantitation of the Global Secondary Structure of Globular Proteins by FTIR Spectroscopy; Comparison with X-ray Crystallographic Structure. *Talanta* 43: 199-219.

- Meyer E. Atomic force microscopy. *Progress in Surface Science*, 41:3-49, 1992.
- Möbius, D. y Millar, R. 1998. Proteins at liquid Interfaces, *ELSERVIER* 303-339.
- Ostrov, N., y Gazit, E. 2010 Genetic Engineering of Biomolecular Scaffolds for the Fabrication of Organic and Metallic Nanowires. *Angewandte Chemie International Edition* 49: 3018–3021
- Shayne G.1999. Alternatives to in vivo Studies in Toxicology.178-182,p. En: Balantyne B, Marrs T, Syversen T. *General and applied toxicology*. Estados Unidos de América.
- Slocik, J., Kim, S., Whitehead, T., Clark, D., y Naik, R., Biotemplated Metal Nanowires Using Hyperthermophilic Protein Filaments. *Small* 2009, 5: 2038–2042.
- Veeco Metrology Group Digital Instruments. *Scanning Probe Microscopy Training Notebook*, Version 3.0, 2000.

CAPÍTULO III

III. FIBRAS AMILOIDES

Las proteínas pueden ser consideradas como los arquitectos de la vida pues, son cruciales en todo proceso celular. La función biológica correcta de las proteínas depende de su auto-ensamblaje en estructuras bien definidas y altamente ordenadas. Por otro lado, el plegamiento incorrecto de proteínas y el montaje anormal están relacionados en más de 30 trastornos humanos, incluyendo la enfermedad de Alzheimer, diabetes mellitus tipo II, entre otras. La patología de estos trastornos puede estar relacionada con el auto-ensamblaje de péptidos amiloidogénicos en diversas formas de agregados transitorios tales como oligómeros, protofibras, fibras de amiloide. La lisozima humana recombinante (LHr) es una enzima bacteriolítica, ampliamente distribuida en una variedad de tejidos y fluidos corporales y se ha relacionado en la formación de depósitos de amiloide en la amiloidosis sistémica hereditaria autosómica. En este trabajo se monitorizó la formación de fibras de amiloide de LHr, *in vitro*, por aumento de fluorescencia de ThT, DLS, tensión superficial; aspectos de su morfología y transición de estructura secundaria obtenidos mediante AFM e IR respectivamente. La actividad citotóxica de las formas transitorias de LHr, fue probada en la línea celular ARPE-19, además del estudio en un modelo de membrana de células endoteliales.

III. 1. Jerarquía de la Estructura de las Proteínas

Una molécula de proteína está formada por una larga cadena de aminoácidos, cada uno de los cuales está unido a su vecino mediante un enlace covalente peptídico, como puede observarse en la figura 12. Por ello, a las proteínas también se les conoce como polipéptidos. Cada tipo de proteína tiene una secuencia única de aminoácidos y se conocen muchos miles de diferentes proteínas, cada una de ellas con su particular secuencia de aminoácidos. La secuencia repetida de átomos a lo largo de la cadena se conoce como el esqueleto peptídico. Las cadenas polipeptídicas tienen dos grupos terminales: por un lado, poseen un grupo amino con polaridad positiva y, por el otro, un grupo carboxílico con polaridad negativa. Por convención, el grupo amino se ha considerado el principio de la cadena de polipéptido. Unidas a esta cadena repetitiva están aquellas partes de los aminoácidos, cadenas laterales, que le confieren a cada uno de los aminoácidos sus

propiedades características. Algunas de las 20 cadenas laterales son apolares e hidrofóbicas, otras están cargadas positiva o negativamente, algunas forman enlaces covalentes, etc. (Fersht, 1999).

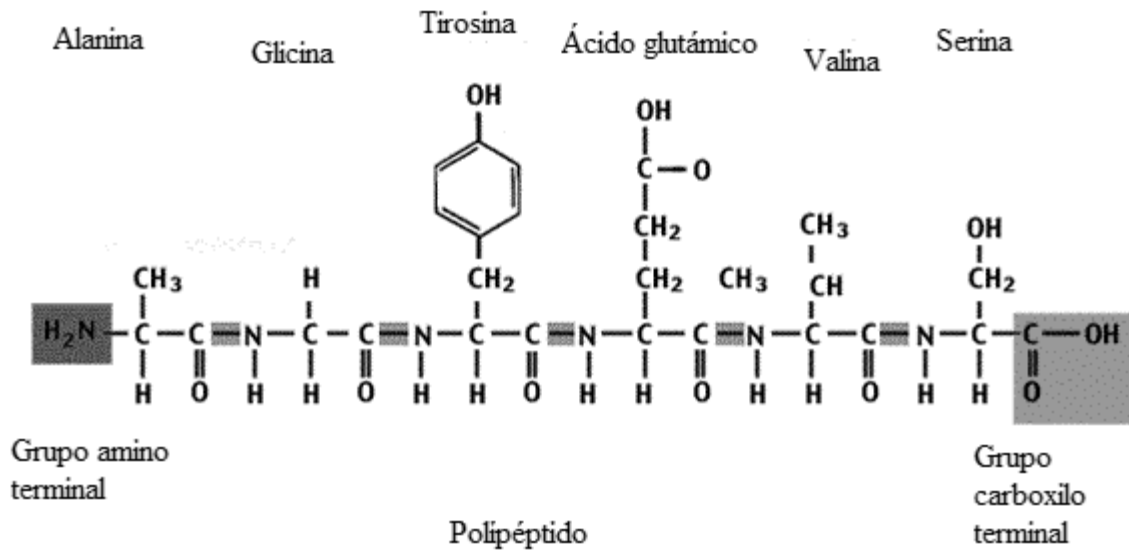


Figura 22. Formación de enlaces peptídicos entre el grupo amino de un aminoácido y el grupo carboxilo de otro aminoácido que conforma la cadena polipeptídica.

III. 1. 1. Estructura primaria de proteínas

A la secuencia de aminoácidos en la cadena, se le denomina estructura primaria y esta información se encuentra codificada en los genes presentes en el ácido desoxirribonucleico. La estructura primaria (información secuencial) de la proteína, determina la estructura tridimensional (información conformacional) y, a su vez, determina la función biológica, que ejerce mediante el reconocimiento molecular (Fersht, 1999).

III. 1. 2. Estructura secundaria

La estructura secundaria de la proteína se construye alrededor de las unidades unidimensionales del enlace peptídico. La estructura secundaria de un segmento de la cadena de polipéptido se define como las disposiciones espaciales de sus átomos de la cadena principal, sin tener en cuenta la conformación de sus cadenas laterales o de su relación con otros segmentos. La estructura secundaria se organiza en elementos

repetitivos regulares, tales como hélices α y hojas β que están unidas por bucles. El examen de un gran número de proteínas revela otras características, tales como la organización hélices- α u hojas- β en motivos recurrentes conocidas como estructuras súper secundarias (Fersht, 1999).

La estructura secundaria de las proteínas depende de 4 factores: i) la longitud de los enlaces y ángulos de los enlaces peptídicos; ii) la disposición coplanar de los átomos sustituidos en los grupos amida, iii) los enlaces de hidrógeno formados por los grupos funcionales $-C=O$ y $-NH$, con el fin de mantener estabilidad estructural: iv) la distancia de los enlaces de hidrógeno que se forman (Sun, 2004).

III. 1. 3. Estructura secundaria: hélices- α y hojas- β

Tras el análisis de la estructura de la molécula de mioglobina, realizado por Kendrew en 1958, tomó fuerza la interrogante sobre los mecanismos que utiliza la proteína para generar estructuras termodinámicamente estables. Planteándose que el mecanismo principal en el plegamiento de las proteínas es de carácter físico y se debe a la interacción entre los aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos con las moléculas de agua (H_2O), aquellos aminoácidos hidrofóbicos tienden a agruparse en el interior de la macromolécula, evitando el contacto con el medio acuoso. Mientras que los grupos hidrofílicos tienden a ocupar la superficie exterior, quedando expuestos a la interacción atractiva con las moléculas del disolvente (Fersht, 1999). Para aglutinar a los aminoácidos hidrofóbicos en el interior de la molécula, los átomos del $C\alpha$ correspondientes deben también agruparse en el interior. Sin embargo, se sabe que la cadena principal de átomos de carbono $C\alpha$ es básicamente de carácter polar. Para anular la interacción polar de la cadena $C\alpha$ con las moléculas de H_2O , se requiere la presencia de puentes de hidrógeno que balanceen esta interacción. La formación de los puentes de hidrógeno conduce a la formación de dos tipos de estructuras en el interior de la macromolécula: las hélices- α y las hojas- β , como se observa en la figura 13. Ambas estructuras, conocidas como estructuras secundarias, se caracterizan por la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos amino ($-NH_2$) y los grupos carboxílicos ($-COOH$) de la cadena principal. La mayoría de las proteínas están constituidas por combinaciones de estas dos estructuras secundarias, conectadas entre sí mediante cadenas de aminoácidos con forma irregular, hebras de enlace (loop regions).

En el siguiente nivel de organización de los aminoácidos, distintas estructuras secundarias se agrupan entre sí para formar lo que se conoce como un dominio. Por

convención, se llama dominio a un conjunto de hélices- α , hojas- β y hebras de enlace que pueden plegarse en forma simultánea e independiente de las partes restantes de la proteína y que además realiza una función específica (Fersht, 1999) como puede observarse en la figura 13.

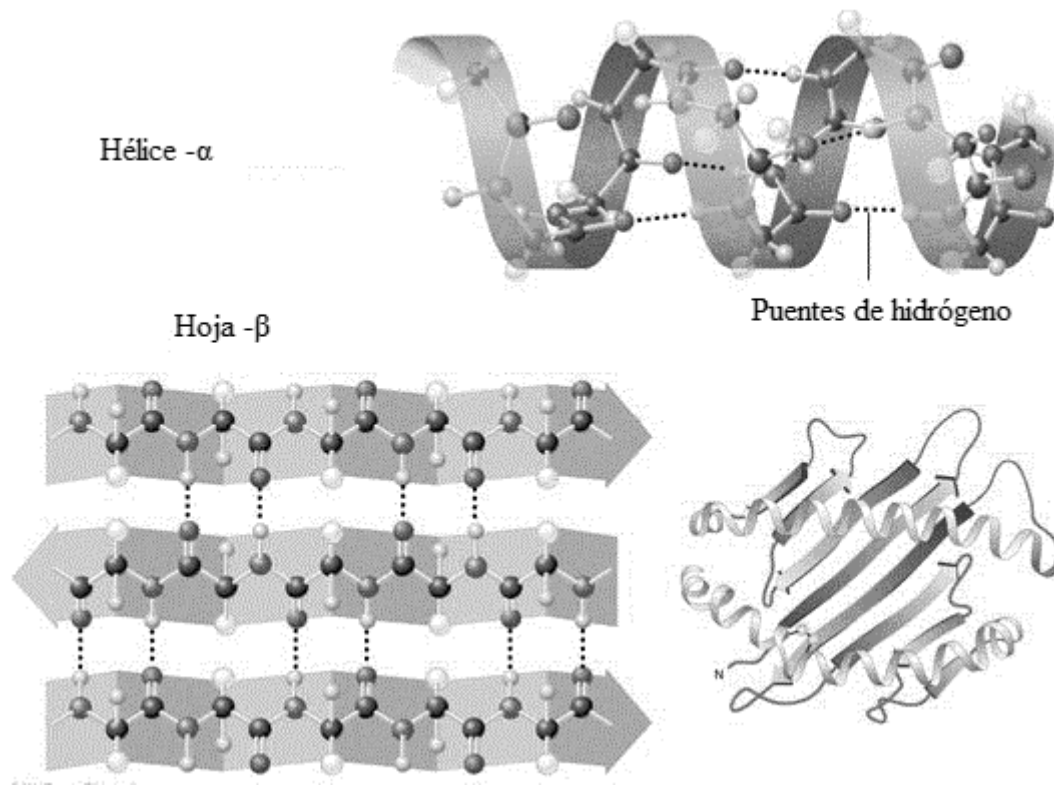


Figura13. Estructura secundaria de proteínas

III. 1. 4. Estructura terciaria

La disposición en el espacio de todos los átomos en una única cadena polipeptídica, o en las cadenas unidas covalentemente, se denomina estructura terciaria. Se han identificado cuatro clases de moléculas de proteína, sobre la base de diferentes combinaciones de estas estructuras: α/α , β/β , α/β (Fersht, 1999). La fuerza motriz para el plegamiento de proteínas parece ser la agrupación de las cadenas laterales hidrófobas para minimizar la superficie de contacto con el agua. Los requisitos básicos para plegado son, por lo tanto: a) que las estructuras sean compactas y así minimizar el área de superficie hidrófoba que están expuestos a disolvente, b) que los grupos de puentes de hidrógeno estén emparejados.

La forma general de la estructura secundaria determina su modo de ensamblaje (Fersht, 1999). Considerando que la estructura secundaria se refiere a la disposición espacial de los residuos de aminoácidos que son adyacentes en un segmento de una estructura de polipéptido, la estructura terciaria incluye aspectos de largo alcance de la secuencia de aminoácidos. Los aminoácidos que están muy separados en la secuencia de polipéptido y están en diferentes tipos de estructura secundaria pueden interactuar dentro de la estructura completamente plegada de una proteína. Es decir, la estructura terciaria emerge de la distribución de las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos. En su lugar, las partes más profundas de las proteínas consisten casi por completo de los residuos no polares. Por otra parte, los residuos cargados por lo general están ausentes en el interior de las proteínas. Sin embargo, tanto los residuos polares y no polares se pueden encontrar en la superficie de la proteína.

En medio acuoso, el plegamiento de proteínas es impulsado por la fuerte tendencia de los residuos hidrofóbicos a ser excluidos del agua (el sistema es termodinámicamente estable cuando los grupos hidrófobos se agrupan en lugar de extenderse en los alrededores acuosos). Por consiguiente, la cadena polipeptídica se pliega de manera que sus cadenas laterales hidrofóbicas están enterradas y las cadenas polares son cargadas en la superficie. Muchas hélices- α y hoja- β son anfipáticas, ya que ambas estructuras secundarias tienen una cara hidrofóbica que apunta hacia el interior de las proteínas, y un rostro más polar que apunta a la solución. Los dominios enterrados en un entorno hidrófobo se estabilizan por enlaces de hidrógeno mediante el emparejamiento de todos los grupos amino y ácido carboxílico. Este emparejamiento se realiza de forma ordenada en una estructura de hélice- α y hoja- β . Las interacciones de Van der Waals entre las cadenas laterales cercanas de hidrocarburos también contribuyen a la estabilidad de la estructura terciaria de proteínas (Berg *et al.*, 2003).

III. 1. 5. Estructura cuaternaria

La estructura cuaternaria se refiere a la asociación de varias cadenas polipeptídicas (con estructura terciaria) unidas por fuerzas débiles como enlaces de hidrógeno, interacciones hidrófobas e interacciones como puentes disulfuro y la ligadura de iones metálicos. En este nivel estructural, los conjuntos de proteínas compuestas de más de una

cadena polipeptídica se denominan oligómeros, y cada cadena individual se denomina subunidad, figura 14.

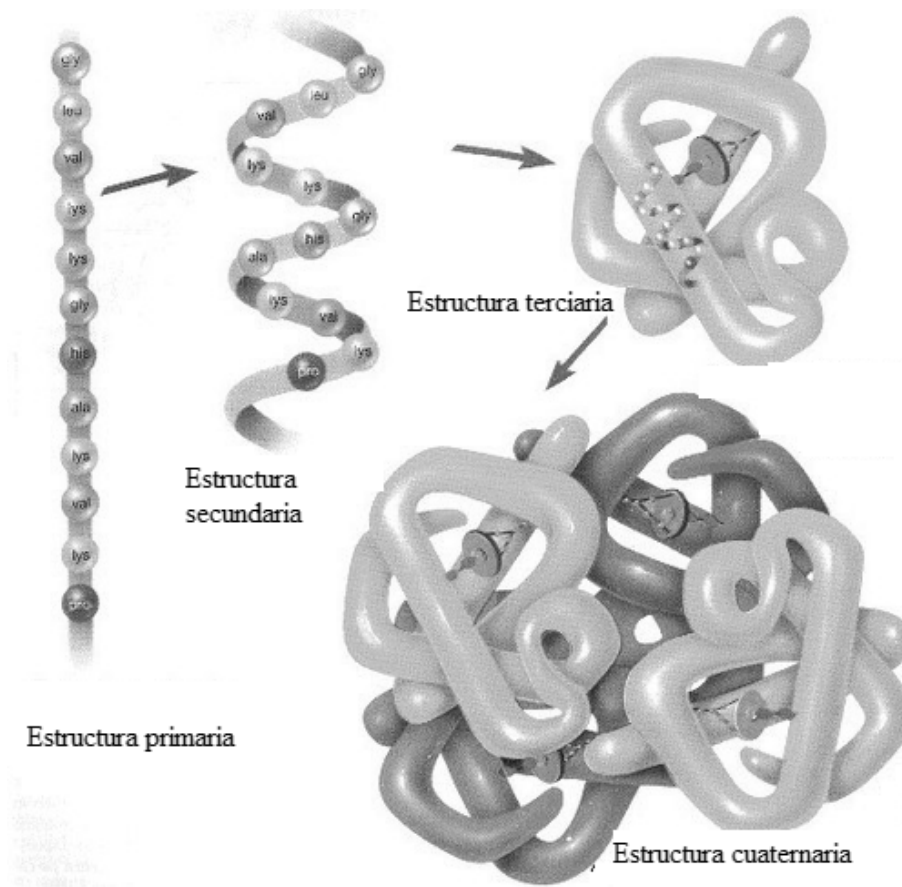


Figura 14. Esquema de niveles estructurales de las proteínas.

III. 2. Plegamiento Incorrecto y Disfunción Celular

Todos los organismos vivos poseen complejos sistemas multiproteicos presentes en los diferentes compartimentos celulares donde ocurre la síntesis de proteína, los cuales controlan y asisten el correcto plegamiento de estas nuevas moléculas proteicas y eliminan a las que no consiguen plegarse correctamente, así como a las que, habiendo alcanzado previamente su estado nativo, lo han perdido por el efecto de condiciones ambientales adversas. Uno de los componentes fundamentales de los sistemas de control del plegamiento, entre las más importantes son las chaperonas moleculares (Lee *et al.*, 2005). Un gran número de enfermedades graves como el mal de Parkinson, la enfermedad de

Alzheimer, enfermedad de Huntington, diabetes tipo II, la amiloidosis sistémica, por mencionar algunas, están asociados con la deposición de agregados proteicos insolubles en varios órganos y tejidos humanos (Glabe, 2006; Stefani, 2004). El descubrimiento de esta correlación ha centrado el interés en el plegamiento de proteínas y la agregación. Las proteínas que en general cumplen roles funcionales específicos, se vuelven inactivas cuando forman especies de agregados prefibrilares y formas insolubles de amiloides (Bergstrom *et al.*, 2005; Morozova-Roche *et al.*, 2000; Pepys *et al.*, 1993).

En la actualidad se tiene conocimiento sobre más de 30 proteínas que pueden llegar a formar agregados tóxicos, cada una de las cuales está asociada con una enfermedad particular (Kastorna *et al.*, 2012). La evidencia creciente apoya la idea de que la formación de amiloide es una característica genérica de la cadena polipeptídica, independientemente de la secuencia específica de aminoácidos (Chiti *et al.*, 1999; Stefani, 2008). Por ejemplo, según Dobson (1999), padecimientos como la fibrosis quística y el enfisema pulmonar familiar, comparten una conexión clara entre el plegamiento anormal de una proteína y una disfunción celular específica. Los factores, tales como pH ácido, alta temperatura, la falta de ligando o concentraciones moderadas de sales, pueden reducir la estabilidad conformacional de una proteína y provocar con ello la agregación.

El plegamiento *in vitro* de las proteínas ha sido extensamente estudiado mediante el empleo de una amplia variedad de métodos espectroscópicos y bioquímicos, así como mediante simulaciones computacionales (Oliveberg *et al.*, 2005). En muchas de las proteínas afectadas, se alteran los mecanismos moleculares que normalmente aseguran la permanencia de las proteínas en sus estados funcionales correctamente plegados.

Las mutaciones puntuales en algunas proteínas, como lisozima, pueden reducir su estabilidad respecto de la forma nativa permitiendo un plegamiento cooperativo transitorio.

III. 2. 1. Fibras de amiloide

Las fibras de amiloide están conformadas por dos filamentos helicoidales que tienen de entre 7 a 10 nm de diámetro. Los filamentos que componen las fibras miden entre 1.5-2.0 nm de diámetro, y están trenzados una alrededor de la otra (Stefani, 2004). Una característica que define a estas fibras es la presencia de estructura de hoja- β cruzada,

revelada por estudios de difracción de rayos X, dicroísmo circular, RMN y RPE (Chiti *et al.*, 1999; Kaye *et al.*, 2003; Tycko, 2004). Las hebras de filamentos, o los protofilamentos, son estabilizados tanto por enlaces de hidrógeno inter e intramoleculares, interacciones hidrófobas e interacciones de pares iónicos y por el entrecruzamiento de hojas- β orientadas en paralelo, y hebras- β perpendicular al eje de las fibras. En la figura 15 puede apreciarse la estructura típica del entrecruzamiento de hoja- β , en una columna formada por diferente número de hebras beta, protofilamentos, trenzados entre sí, ya sea en arreglos compactos o empaquetamiento de en forma de cinta, o cremallera. Por otro lado en la figura 16 puede apreciarse una imagen de difracción de rayos X; en esta, las flechas indican las posiciones de la reflexión β -cruzada en el meridiano situado a 4,7 Å y en el ecuador a 10 Å. (Makin *et al.*, 2006).

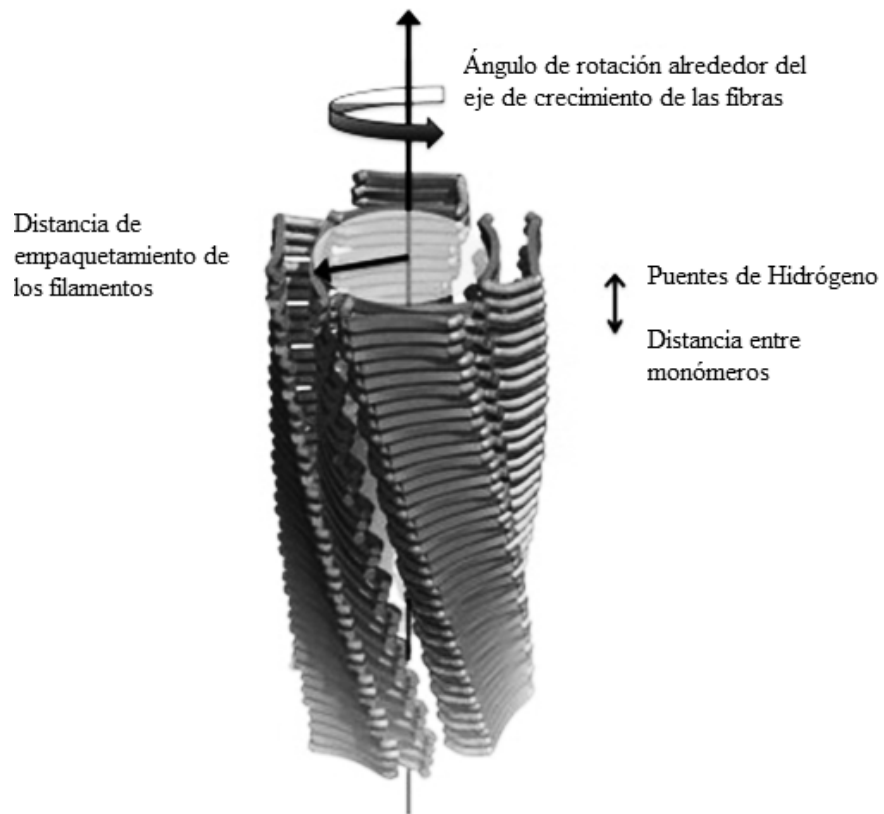


Figura 15. Entrecruzamiento de hojas- β que conforma la estructura de los protofilamento.

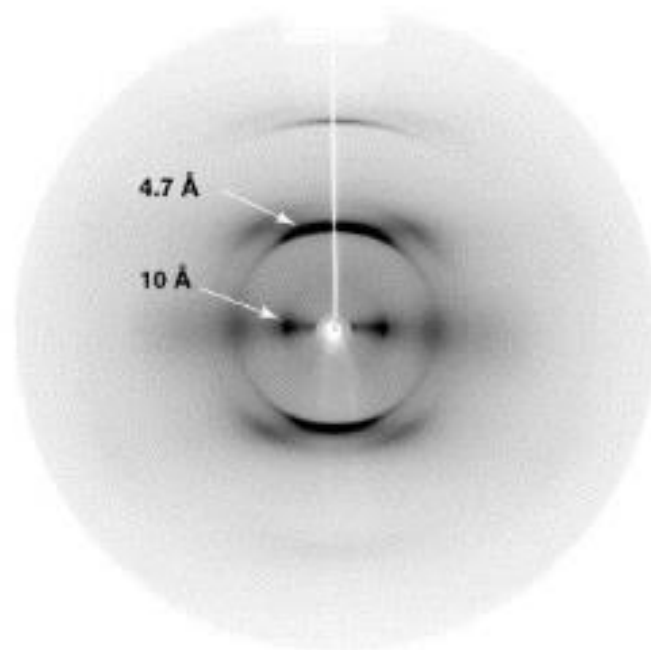


Figura 16. Estructura típica del entrecruzamiento de hoja- β .

III. 3. Lisozima humana

Lisozima humana es una proteína de 130 residuos y pertenece a la clase de tipo C de lisozimas. La estructura de la proteína se ha estudiado en detalle por cristalografía de rayos X y espectroscopia de resonancia magnética nuclear de alta resolución. Se divide en dos dominios: un dominio- α (Residuos 1-40 y 83-100) y un dominio- β (residuos 41-82). El dominio- α comprende cuatro hélices (denominados A, B, C, y D) y dos hélices 3_{10} . El dominio- β comprende un triple trenzado de hojas β , una hélice 3_{10} , y un bucle largo. En la figura 17 puede observarse la estructura de lisozima humana (Koradi et al. 1996).

La proteína tiene cuatro puentes disulfuro de los cuales dos se encuentran en el dominio- α (C6-C128, C30-C116), y uno en el bucle largo del dominio- β (C65-C81), el enlace disulfuro restante une los dos dominios (C77-C95), figura 17. El sitio activo de la enzima se forma en la hendidura entre los dos dominios de las cadenas laterales de E35 y D53 jugando un importante papel en la función catalítica de la lisozima. (Muraki et al., 1987).

La lisozima humana (LH) está ligada a la forma de amiloidosis como resultado de una mutación en uno o más de los siguientes genes: gen de la lisozima (LYZ el gen LYZ, situado en el brazo largo del cromosoma 12 (12q15), que codifica a la lisozima humana. En este tipo de amiloidosis se afectan los órganos internos, pero no se afecta el sistema nervioso.

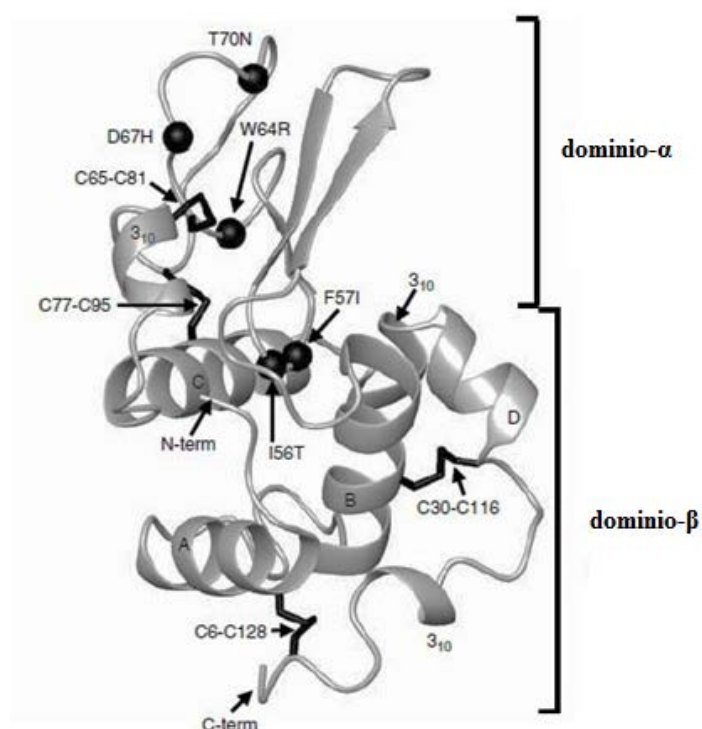


Figura 17. Estructura de lisozima humana (Koradi *et al.*, 1996).

III. 4. Amiloidosis Sistémica por Lisozima

La amiloidosis sistémica por lisozima es una enfermedad hereditaria, asociada con la deposición de fibras amiloide en bazo, hígado y riñón (Pepys *et al.*, 1993). Estas fibras se componen de variantes mutantes de la proteína lisozima (Mossuto *et al.*, 2010; Takano *et al.*, 2001). La relación general entre las mutaciones, despliegues parciales, y la formación de amiloide ha sido bien documentada para una variedad de sistemas. (Chiti *et al.*, 2000; Gerum *et al.*, 2010).

Se han reportado cinco familias propensas a ser afectados por esta enfermedad. En todos los casos, los pacientes son heterocigotos, la enfermedad se transmite a través de un mecanismo dominante autosómico. La edad en que los depósitos de amiloide aparecen, su distribución en el tejido, y sus efectos clínicos son muy variables tanto dentro como entre las familias (Gillmore *et al.*, 1999; Pepys *et al.*, 1993; Valleix *et al.*, 2002; Yazaki *et al.*, 2003). Tal variabilidad se ha informado de otras amiloidosis sistémicas, incluyendo el trastorno más común de tales que está asociado con transtiretina, pero sus causas siguen siendo en gran parte desconocida (Gillmore *et al.*, 1999).

III. 5. Resultados

Mediante las técnicas de dispersión dinámica de luz (DLS), fluorescencia de tioflavina T (ThT), y medidas de tensión superficial (TS) en interface aire-agua e isothermas de compresión mediante Langmuir Blodgett, se analizaron las propiedades hidrofóbicas de agregados pre-amiloidales que intervienen en el proceso de fibrilación de LHr, con la finalidad de encontrar correlación entre el carácter hidrofóbico de oligómeros, protofibras y agregados amiloidales con el cambio conformacional a estructura de hoja β cruzada, como resultado del aumento del tiempo de incubación en solución desnaturalizante. La capacidad que presentan los diferentes agregados de LHr, aislados durante el proceso de fibrilación, para ser adsorbido en la interfase aire-agua puede proporcionar información importante acerca de las propiedades hidrofóbicas de la proteína, que pueden estar relacionados con cambios en la estructura secundaria de la LHr, además, la hidrofobicidad podría resultar en especies citotóxicas en la línea celular, ARPE-19.

III. 5. 1. Estudio de la Cinética de Fibrilación de Lisozima Humana Recombinante (LHr)

La cinética de fibrilación de LHr evaluada por el aumento de la emisión de fluorescencia de tioflavina T (ThT) y dispersión dinámica de luz (DLS), muestran una tendencia muy similar en cuanto a la forma comúnmente reportada para la fibrilación de otras proteínas amiloides. Los procesos de fibrilación han sido modelados como una serie de reacciones en serie que cubren el conjunto de los oligómeros, la formación de núcleos, así como el crecimiento y la rotura de las fibras.

En la medición de las intensidades mediante fluorescencia de ThT y DLS, observamos un mecanismo clásico de polimerización nucleada, la cual consta de tres etapas (Lee, *et al.*, 2007) (Shreck *et al.*, 2013) y (Uversy *et al.*, 2010): (a) un tiempo de retardo o fase lag, durante la cual se forman núcleos de proteínas solubles; (b) una fase de elongación, durante la cual los oligómeros se hacen insolubles y crecen por la asociación de oligómeros adyacentes; y (c) una fase de equilibrio, durante el cual la mayoría de las proteínas solubles se convierten en a fibras.

La longitud de la fase de latencia y la elongación, o crecimiento de las fibras, es dependiente, principalmente, de los factores de concentración inicial de proteína y el pH, pues estos afectan el grado de supersaturación en la solución.

III. 5 .1. 2. Fluorescencia de thioflavina T (ThT)

La intensidad de fluorescencia mostró una curva observada comúnmente en el proceso de fibrilación dependiente de nucleación. El tiempo de latencia antes del crecimiento de las fibras se ha observado en numerosas publicaciones y se asemeja a un período de incubación. En la cinética de LHR esta fase de retardo se aprecia hasta aproximadamente los 600 minutos de incubación (figura 18) la cual corresponde al proceso de nucleación de LHR hasta alcanzar la formación de las fibras de amiloide. Entre los 600 y 750 minutos de incubación, la intensidad de la fluorescencia aumentó de forma pronunciada debida a un crecimiento de las fibras. El proceso de fibrilación se considera terminado a los 3000 minutos de incubación, cuando la intensidad de fluorescencia de ThT alcanzó el equilibrio.

Aunque la medición de fluorescencia utilizando ThT es útil para evaluar la cinética de fibrilogénesis, la información sobre su morfología no se puede obtener. Para examinar la morfología de las fibras de amiloide, fueron tomadas imágenes de AFM durante el proceso de fibrilación.

III. 5. 1. 3. Dispersión dinámica de luz (DLS)

La cinética de crecimiento también se siguió usando la intensidad de luz dispersada de proteína por dispersión dinámica de luz. Los resultados obtenidos mostraron una curva aparentemente sigmoideal de manera similar a la obtenida por fluorescencia de ThT (figura 18), sin embargo, se obtuvo una intensidad mayor en la fase de latencia mediante DLS y una intensidad menor en la fase de elongación. Siendo la intensidad obtenida para DLS en la fase de latencia, alrededor de los 600 minutos de incubación, igual a 0.129 unidades arbitrarias (a. u) contra 0.066 (a. u) en emisión de fluorescencia de ThT. Por otro lado el intervalo para la fase de elongación de DLS se obtuvo a 0.22 a 0.62 (a. u); mientras que en fluorescencia este intervalo de intensidad corresponde a 0.076 a 0.86 (a. u).

Es importante tener en cuenta que las medidas de la intensidad por dispersión de luz nos arrojan datos relacionados con la agregación, y los tamaños de los mismos agregados,

que se encuentran en la solución de nuestra muestra. Mientras que la emisión de fluorescencia de ThT mide la interacción de tioflavina y las fibras amiloides, uniéndose las fibras ricas en hojas- β , es decir, arroja información sobre la conformación de los agregados.

III. 5. 1. 4. Tensión superficial

La cinética de agregación y el carácter hidrófobo de los agregados de LHr se correlacionaron en términos de la presión superficial (π). A través de las medidas de presión superficial se observó una disminución dependiente del tiempo, las cuales presentaron una disminución continua a partir de los períodos tempranos de incubación, por lo que no se observó una fase de retardo perceptible en esta técnica hasta que se alcanzó la región estabilizada, como puede observarse en la figura 18 (línea con rectángulos). La proteína LHr, presentó una hidrofobicidad relativa al acercarse a los 600 y 1600 minutos, región estabilizada donde se observa la aparente fase de retardo, estabilizándose casi por completo después de los 3000 minutos. Esta disminución continua es resultado de la manifestación de conformaciones estructurales que tienden a adsorberse en la interfase en un periodo de tiempo cada vez más largo a consecuencia del efecto hidrofóbico. La forma en la que las propiedades de adsorción de los estadios se relacionan con el carácter hidrofóbico que adquiere LHr durante la cinética de fibrilación, se puede establecer con base a los resultados obtenidos mediante fluorescencia de ThT, DLS e IR; los cuales corroboran los cambios conformacionales que modifican el carácter hidrofóbico y de agregación de cada especie prefibrilar, la cual da como resultado un aumento la actividad superficial reflejada en las propiedades de adsorción.

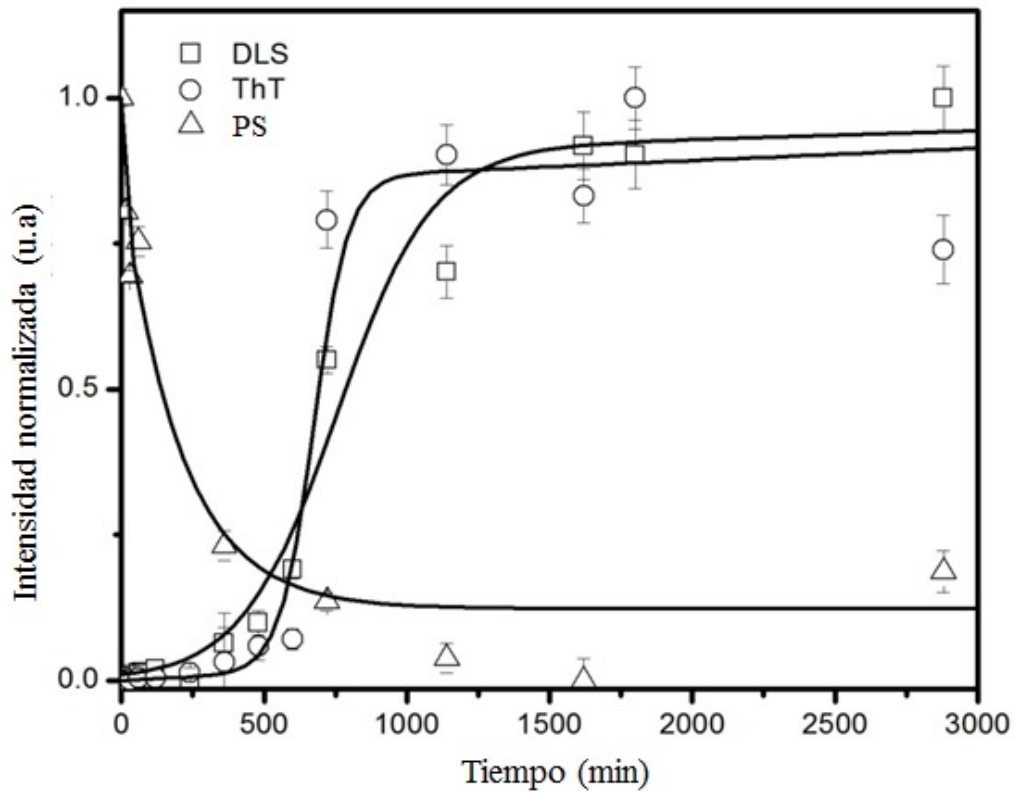


Figura 18. Evolución de la fibrilación de dispersión dinámica de luz (\square), fluorescencia de ThT (\circ), y la presión superficial (Δ) durante el tiempo de incubación de las soluciones de lisozima humana recombinante incubada a 55°C a pH 2,0 en presencia de NaCl 136,7 mM y 2,68 mM KCl.

III. 5. 1. 5. Modelaje teórico de fibrilación de LHR

Funciones exponenciales empíricas o semi-empíricas han sido una opción popular para ajustar los datos experimentales de fibrilogénesis, ya que son computacionalmente simples (Nielsen *et al.*, 2001; Pasternack *et al.*, 2006). A lo largo de investigaciones relacionadas con la cinética de fibrilogénesis, se ha utilizado la función empírica siguiente, para adaptarse a los datos de emisión por fluorescencia de ThT (Nielsen *et al.*, 2001; Uversky, 2001).

$$Y = y_i + \frac{y_f}{1 + e^{-(t-t_0)/\tau}} \quad (3)$$

Los parámetros de este modelo incluyen la constante de velocidad aparente para el crecimiento de fibras (k_{app}) igual a $1/\tau$, τ es la constante de tiempo de crecimiento de las fibras y es igual a $1/k_{app}$, y el tiempo de retraso iguales a $t_0-2\tau$, t_0 es el tiempo para el 50% de la señal máxima o el tiempo de punto de inflexión. Los valores obtenidos para la constante de crecimiento de fibras (k_{app}) y la fase de retardo (lag) se muestran en la tabla II.

Tabla II. Los parámetros cinéticos del proceso de agregación de la solución de la lisozima humana recombinante (LHr).

	k_{app} (min ⁻¹)	<i>Fase lag</i> (min)	t_0 (min)
DLS	$0.0060 \pm 5 \times 10^{-4}$	418 ± 16	752 ± 39
THT fluorescencia	$0.0064 \pm 7 \times 10^{-4}$	384 ± 12	697 ± 36
Presión superficial	$0.0048 \pm 6 \times 10^{-4}$	--	--

III. 5. 2. Microscopía de fuerza atómica

Mediante imágenes de microscopía de fuerza atómica (AFM) fue posible observar en la figura 19, la morfología de lisozima humana recombinante a diferentes tiempos de incubación mientras se seguía la cinética de fibrilación con el objeto de identificar los estadios transitorios y las fibras de amiloide.

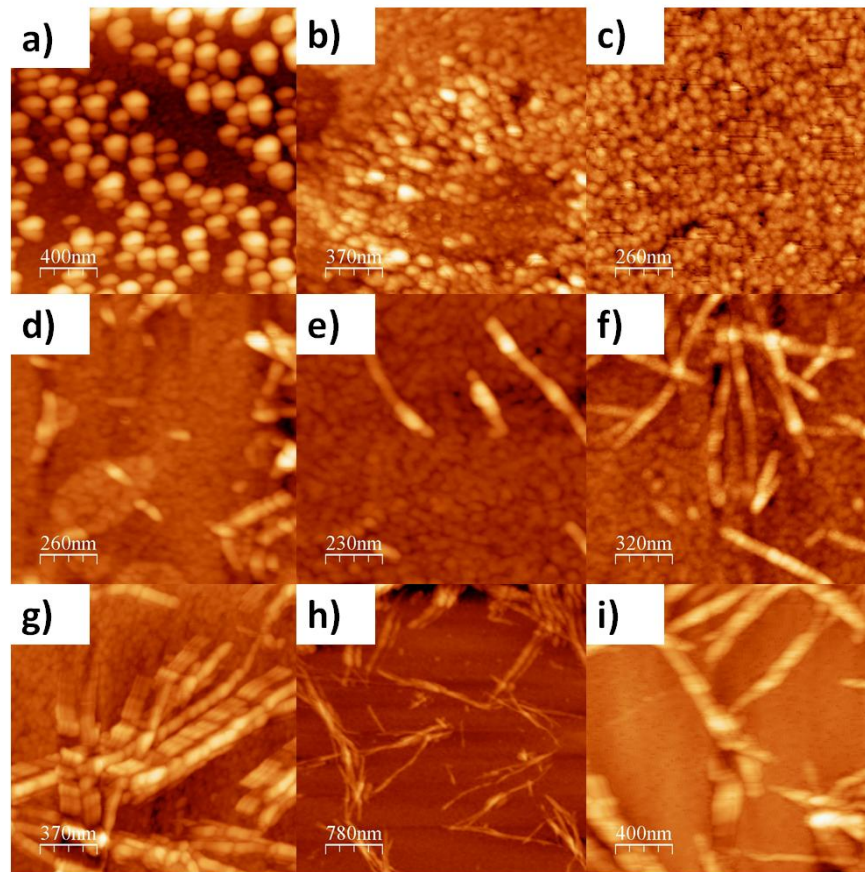


Figura 19. Imágenes de AFM de las diferentes etapas del proceso de fibrilación LHR a pH 2,0 y 55 ° C a) 0, b) 120, c) 360, d) 480 e) 600 f) 750, g) 1440, h) 3000 min, y i) al final del proceso de incubación.

La agregación de la proteína puede explicarse por la exposición de lisozima a un medio parcialmente desnaturizante, acidificado a pH 2. Por otro lado, a los 120 minutos de incubación a 55°C en la solución acidificada, fue posible observar una disminución de los tamaños, disociación y formación de dímeros, trímeros, figura 19 b); así como la interacción o lo que se asemeja a una alineación de los oligómeros. Entre los 600 y 750 minutos fue posible observar imágenes de estructuras protofibrilares y el crecimiento de las mismas, como se observa en las figuras e) y f). La morfología fibrilar de los estadios de LHR tomados a estos tiempos de incubación, 600 y 750, presentó la mayor citotoxicidad en las células ARPE-19 en los ensayos realizados.

III. 5. 3. Determinación de transición en la conformación estructural de Lisozima Humana recombinante (LHr)

III. 5. 3. 1. Espectroscopía infrarroja con transformadas de fourier (FT-IR)

El proceso de agregación y la transición de la composición de estructura secundaria de hélices- α a hoja- β fueron monitoreados por la técnica de FT-IR. Tras la obtención de datos y al realizar en análisis de deconvoluciones, figura 20, se obtuvieron las fracciones de estructuras secundarias que se muestran en la tabla III.

Tabla III. Fracciones de estructuras secundarias de lisozima LHr obtenidos por FTIR

Tiempo (min)	Hélice-α 1655 cm⁻¹	Hoja-β 1621,1635, 1680 cm⁻¹	Giros-β 1670 cm⁻¹	Desordenadas 1645 cm⁻¹
0	0.357	0.322	0.138	0.183
30	0.314	0.344	0.153	0.189
120	0.195	0.375	0.192	0.238
360	0.173	0.364	0.195	0.268
600	0.139	0.429	0.199	0.233
750	0.146	0.490	0.230	0.134
1400	0.126	0.529	0.220	0.125
2200	0.080	0.610	0.260	0.05

La tabla III, representa los porcentajes de la composición de LHr con forme se sigue la formación de fibras. Los porcentajes obtenidos a tiempo 0 son de 0.35 de

estructuras hélices- α y 0.32 de hojas- β . Puede apreciarse la transición de estructuras conforme aumenta el tiempo de incubación. A partir de los 600 minutos de incubación, se puede apreciar que ocurre una transición estructuras correspondientes a hojas- β y otras ordenadas al azar. Por otro lado, en la tabla IV se muestran los porcentajes asignados en la literatura para la proteína nativa de lisozima mediante la técnica de rayos x y FT-IR.

Tabla IV. Porcentaje de estructuras secundarias de lisozima nativa, obtenidas por cristalografía de Rayos X y por FTIR. (Kumosinski y Unrush, 1999).

Estructura	Rayos x	FT-IR
Hélice	45%	42%
Hoja	19%	16%
Giros	23%	36%
Al azar	13%	6%

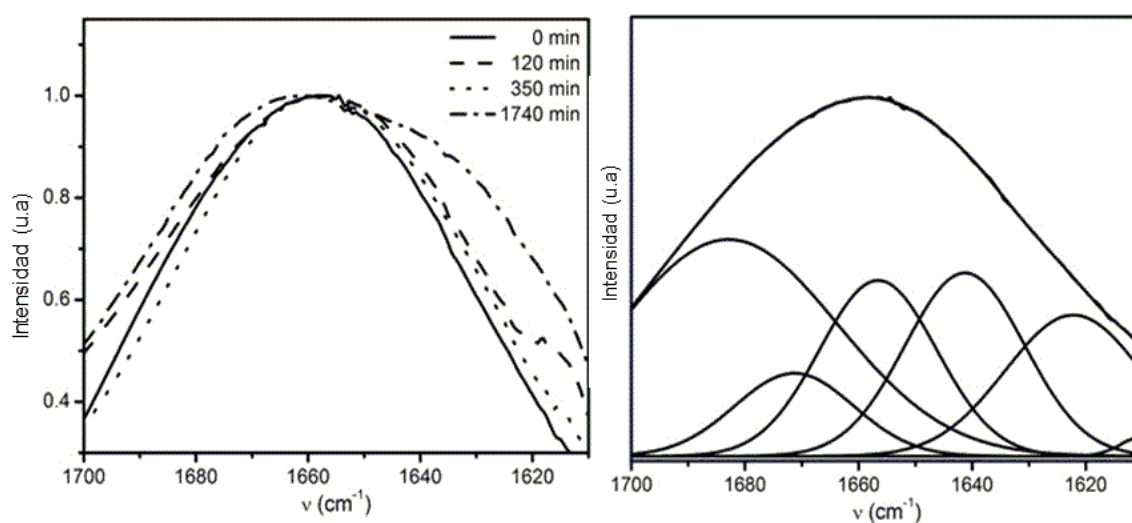


Figura 20. Banda de amida I de la solución de LHR a pH 2,0 sin tratamiento térmico, y la descomposición de la banda de amida I.

III. 5. 4. Viabilidad Celular

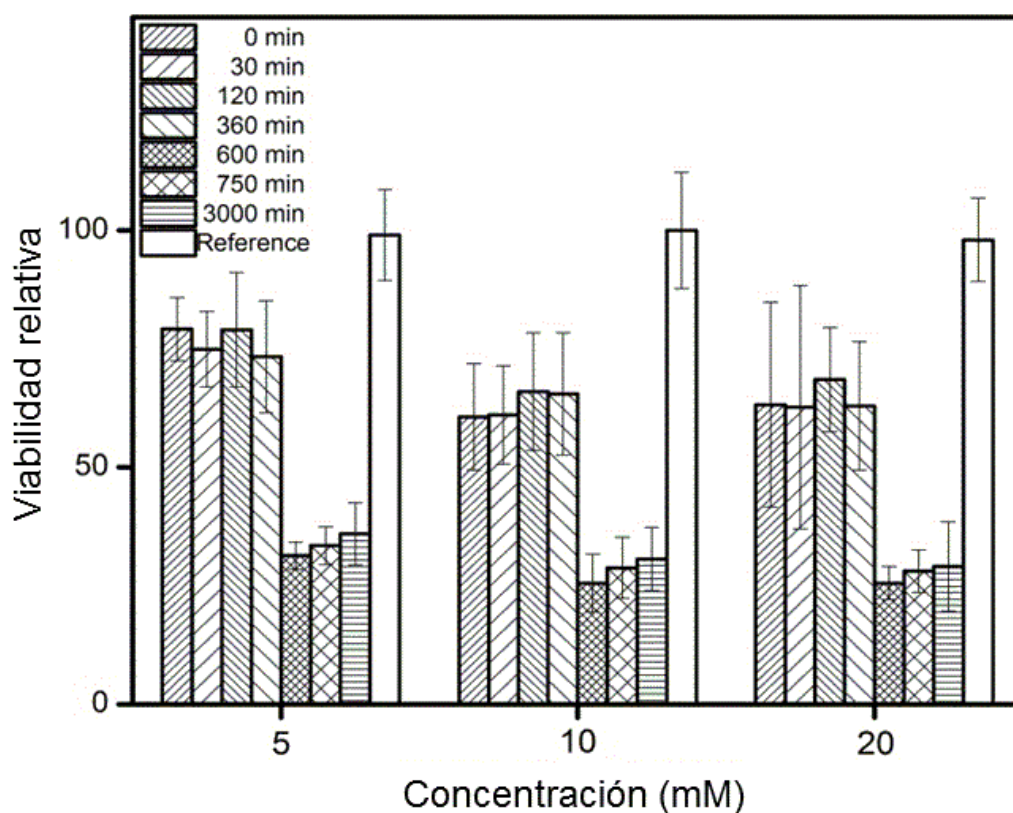


Figura 21. Viabilidad celular de tratamiento en células ARPE-19.

Los ensayos de viabilidad en la línea celular Arpe-19 mediante el tratamiento con MTT de diferentes estadios de oligómeros, protofibras y fibras de amiloide se muestran en la figura 21, estos sugieren, en primer lugar, que los agregados iniciales de proteína Lisozima disuelta en el medio de solución de sales a pH 2 afectó la viabilidad celular, obteniéndose valores del $79.2 \pm 6.6\%$ en la concentración más baja, $60.6 \pm 11.2\%$ a concentración de 10mM y $63.2 \pm 12.6\%$ a 20 mM como se puede apreciar en la tabla V. Los mayores efectos de toxicidad pueden apreciarse a partir de los 600 minutos de incubación, en los que la viabilidad disminuye a $31.3 \pm 3.0\%$ a 5mM, $25.5 \pm 6.1\%$ a 10mM y $25.6 \pm 3.5\%$ a 20 mM. Esta tendencia podría indicar que la toxicidad está relacionada en mayor medida con la formación de las fibras al término de la fase de nucleación.

Tabla V. Análisis estadístico ANOVA de la viabilidad celular determinada por múltiples pruebas de comparación (Newman-Keuls).

	0 min	30 min	120 min	360 min	600 min	750 min	3000 min
5 mM	79.2±6.6	74.9±8.0	79.0±12.0	73.4±11.8	31.3±3.0	33.5±4.0	36.0±6.5
10 mM	60.6±11.2	61.1±10.4	65.9±12.3	65.4±13.0	25.5±6.1	28.8±6.4	30.7±6.6
20 mM	63.2±12.6	62.7±13.6	68.5±11.0	63.0±13.5	25.6±3.5	28.1±4.5	29.1±9.4

III. 5. 5. Interacción de Soluciones de Lisozima Humana Recombinante (LHr) en un modelo de membrana de células endoteliales (MMCE) de la barrera hematoencefálica BHE

La interacción de los diferentes agregados pre-amiloidales de la LHr se evaluó mediante el análisis de las isothermas de adsorción obtenidas en la balanza de Langmuir-Blodgett (figura 22).

Las isothermas del MMCE de la BHE compuesta por DPPC/DPPS y SM a 25°C, figura 22, en color negro, la fase gaseosa, las moléculas se encuentran lo suficientemente separadas en la superficie del agua de manera que ejercen poca fuerza una sobre otra. Al reducir el área de superficie de la monocapa, las cadenas hidrófobas de las moléculas comienzan a interactuar. En donde las moléculas ocupan en promedio, toda el área de trabajo disponible, considerado un gas en dos dimensiones se encuentra en un área promedio por molécula en valores mayores a 100 Å². La fase líquido expandida (LE), las moléculas en la superficie del agua están en un lugar aleatorio en lugar de en una orientación regular, con sus grupos polares en contacto con la subfase y se encuentra en valores promedio por molécula entre entre ~70 y 100 Å². Posteriormente puede observarse un cambio de fase en una región próxima en la isoterma correspondiente a la fase de transición LE-LC (líquido expandido-Líquido comprimido o condensado) entre ~55 y 75, seguido por un incremento de presión LC en áreas más pequeñas, en esta las moléculas están estrechamente empaquetadas y están orientados con los grupos hidrófobos hacia afuera de la superficie del agua.

En estadios pre-amiloidales y amiloidales de la HLr contenidos en la subfase, las isothermas se desplazan áreas mayores y la presión superficial es mayor a cero si las

comparamos con la isoterma del MMCE, lo que puede indicar una intercalación de las moléculas de proteína entre los fosfolípidos que forman la membrana modelo, haciendo que se modifique la fase líquido expandido-líquido comprimido. Las isotermas que aparecen desplazadas hacia áreas mayores, son las correspondientes a un tiempo de incubación de 600, 750 y 1400 minutos, donde según la cinética de fibrilación estudiada anteriormente, encontramos estructuras prefibrilares que se encuentran en la etapa de elongación y, por último, estructuras de fibras maduras.

En la isoterma correspondiente a la solución de lisozima humana recombinante LHr, la fase gaseosa-LE no aparece en comparación a la fase gaseosa-LE que corresponde a la isoterma del MMCE de la BHE, esta isoterma presenta la transición de fase de LE a un área mayor entre ~ 80 y 120 \AA^2 .

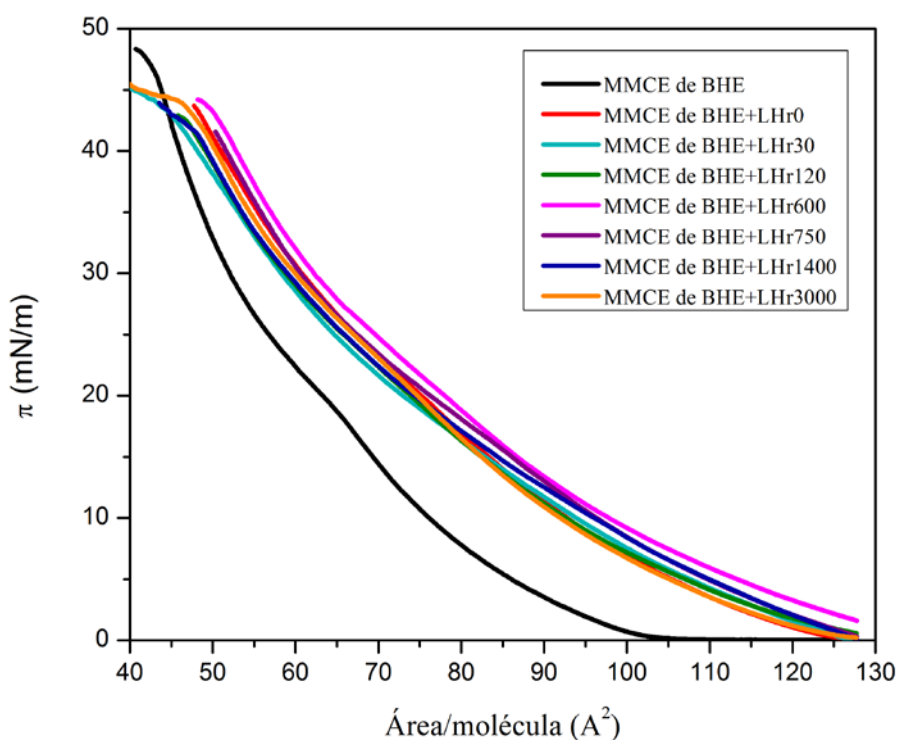


Figura 22. Isotherma de Langmuir de MMCE de BHE a 25°C en presencia de LHr

Mediante la incorporación de solución de LHr a tiempo 0 no se observa una fase gas en la isoterma, la fase LE aparece muy cercana a una presión de 0, como en el caso de

el MMCE sin solución de proteína, y a un área mayor de $\sim 120 \text{ \AA}^2$ hasta aproximadamente un área por molécula de $\sim 80 \text{ \AA}^2$; una transición de LE-LC aparece entre ~ 64 y $\sim 80 \text{ \AA}^2$, seguido por una fase condensada un poco más inclinada que la del MMCE sin proteína y a un área correspondiente de entre ~ 47 y 64 \AA^2 y a una presión de 43 mN/m . Los agregados iniciales de Lisozima disuelta en la solución de sales a pH 2 afectó la viabilidad celular, obteniéndose valores del $79.2 \pm 6.6\%$ en la concentración más baja, $60.6 \pm 11.2\%$ a concentración de 10 mM y $63.2 \pm 12.6\%$ a 20 mM .

La isoterma correspondiente a la MMCE en presencia de solución de LHR de un tiempo de incubación de 600 minutos, presenta un aumento de presión de aproximadamente 1.69 mN/m a un área de entre ~ 100 y 127 \AA^2 correspondiente a una fase LE; seguido de un ligero cambio en la forma de la isoterma en una región entre ~ 85 a 63 \AA^2 . Posteriormente una fase más condensada aparece entre ~ 50 y 64 \AA^2 . Los mayores efectos de toxicidad pueden apreciarse a partir de los 600 minutos de incubación, en los que la viabilidad disminuye a $31.3 \pm 3.0\%$ a 5 mM , $25.5 \pm 6.1\%$ a 10 mM y $25.6 \pm 3.5\%$ a 20 mM . Esta tendencia podría indicar que la toxicidad está relacionada en mayor medida con la formación de las fibras al término de la fase de nucleación.

La isoterma correspondiente a la MMCE en presencia de solución de LHR de un tiempo de incubación de 750 minutos, presenta una fase LE en una región de área de entre ~ 90 a 127 \AA^2 ; seguida de una fase de transición LE-LC entre ~ 72 y 94 \AA^2 seguida de una fase condensada LC en una región próxima entre ~ 70 y 50 \AA^2 , que se traslapa con la fase condensada de la solución de 0 minutos de incubación.

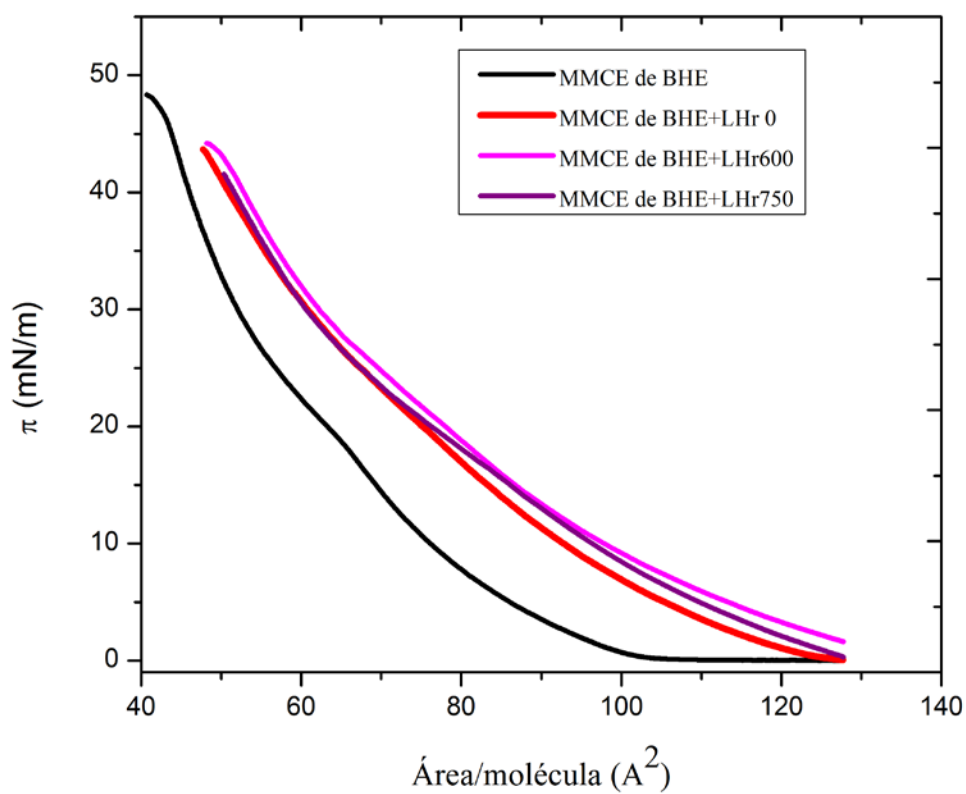


Figura 23. Isoterma de Langmuir de MMCE de BHE a 25°C en Presencia de LHr a 0, 600 y 750 minutos de incubación

III. 5. 6. 2. Módulo de compresión

Desde los primeros periodos de la investigación sobre monocapas de Langmuir, Gibbs ya había señalado que un cambio de la tensión superficial con el área de la superficie asociada con una película líquida se puede atribuir a una elasticidad interfacial. Para una monocapa de Langmuir la elasticidad de equilibrio está relacionada con la compresibilidad de la fase condensada de la monocapa.

$$C = - \frac{1}{A} = \frac{dA}{d\pi}(T) \quad (4)$$

donde A es el área molecular. En el caso de una superficie pura, la compresibilidad C es infinita porque la tensión superficial no se cambia con el área. La cantidad recíproca de C, denotado como módulo de compresión de superficie κ , se utiliza a menudo para caracterizar las propiedades de la monocapa.

$$\kappa = \frac{1}{C} = -A\left(\frac{d\pi}{dA}\right)_T \quad (5)$$

En la figura 24 se analizan el efecto de los estadios de LHR en el empaquetamiento y orden de la monocapa de fosfolípidos, mediante los valores del módulo de compresión.

En principio, los estadios de LHR muestran una elasticidad similar y a medida que la presión es incrementada, el comportamiento de la monocapa va cambiando, hasta llegar a una fase de coexistencia LE-LC hasta llegar a un máximo de compresibilidad.

El máximo del módulo de compresibilidad del MMCE aparece a una presión de 42 mN/m que corresponde la fase líquido condensado (LC), donde las moléculas de fosfolípidos están densamente empaquetadas. Por otro lado aparece un mínimo a una presión de 16 mN/m que corresponde a la fase de transición a Líquido expandido- líquido condensado. En valores menores correspondientes a la fase líquido expandido, las moléculas hidrofóbicas pueden estar en orientaciones azarosas con sus grupos polares en contacto con la fase acuosas, mientras aumenta la compresión, las cadenas hidrofóbicas comienzan a empaquetarse y tomar una configuración estructural más ordenada. La disminución de los valores κ en comparación al MMCE, puede indicar que la adición de los estadios de LHR a las monocapas modifica su empaquetamiento, de tal forma que son

menos condensadas y menos ordenada (más fluida) especialmente en estadios como 600 y 750 minutos de incubación.

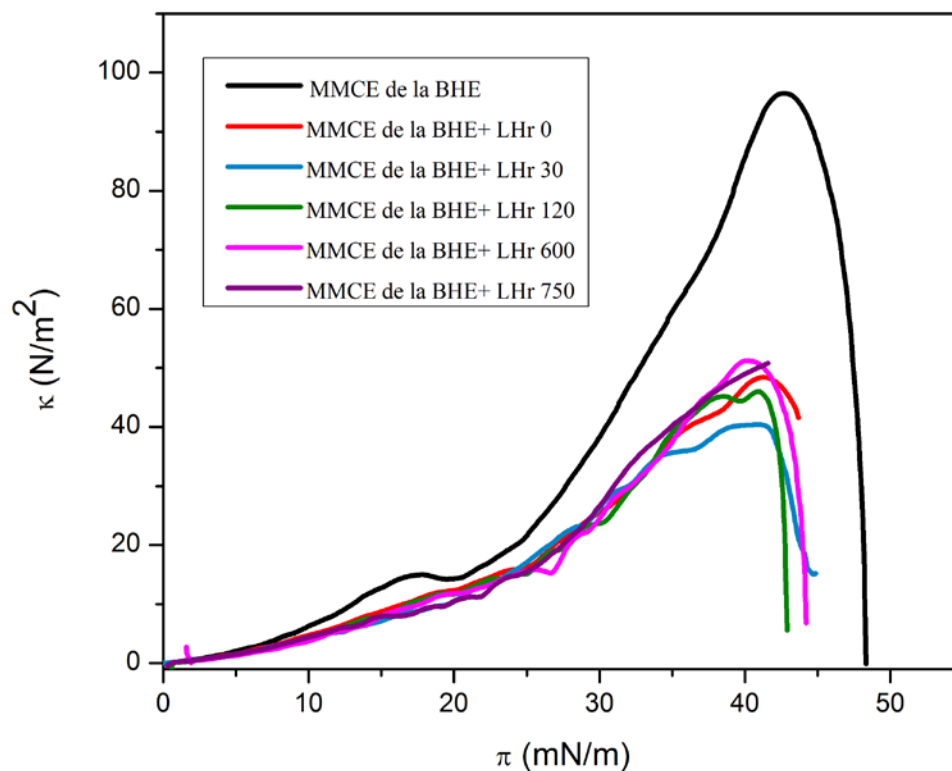


Figura 24. Módulo de compresibilidad de MMCE de BHE a 25°C en Presencia de LHr Módulo de compresión calculado mediante la derivada de la isoterma correspondiente.

III. 5. 7. Películas de Langmuir-Blodgett del MMCE de la BHE en presencia de fibras amiloides

La morfología, estructura y texturas que presentan las monocapas de Langmuir pueden ser estudiadas a través de diferentes técnicas experimentales, una de ellas es la obtención de películas de Langmuir-Blodgett y posterior análisis con microscopía de fuerza atómica (AFM). La mica es un material con superficie atómica plana y limpia en la que las moléculas se adhieren fácilmente a la superficie; esta, además, mantiene una carga negativa en soluciones por lo que la hace un sustrato muy hidrofílico. En esta, las cabezas polares de las moléculas anfifílicas que forman la monocapa interacciona con la mica de naturaleza hidrofílica.

El sustrato es sumergido a la subfase antes de la formación de la monocapa, conforme es extraído el sustrato las moléculas serán transferidas a la mica, al repetir este paso se forma un sistema de multicapas, que seguirá si el sustrato entra y sale de la subfase. Como la densidad de empaquetamiento de los lípidos a continuación, corresponden a una presión lateral de equilibrio, un valor de 30-35 mN/m para las membranas biológicas (Yuan *et al.*, 2002) (Green *et al.*, 2004), (Coban *et al.*, 2007), (Kinnunen, 2009), la monocapa fue extraída a una presión fija de 30 mN/m en el que tenemos la fase de transición de LE-LC.

En la figura 25 se muestra la imagen de microscopía de fuerza atómica de una monocapa de MMCE de la BHE obtenida directamente sobre una mica a 25°C y una presión de 30 mN/m. Como puede observarse, la MMCE de la BHE forma una estructura con empaquetamientos de lípidos como en pequeñas islas o dominios en una coexistencia de fase LC-LE, formando dominios con formas irregulares. En el histograma de alturas para este caso, se muestra un pico de tamaño promedio de 4.8 nm y otra población más pequeña a 7.10 nm y mostrándose en el análisis de alturas del eje Z, alturas uniformes de entre 3.5 y 4 nm.

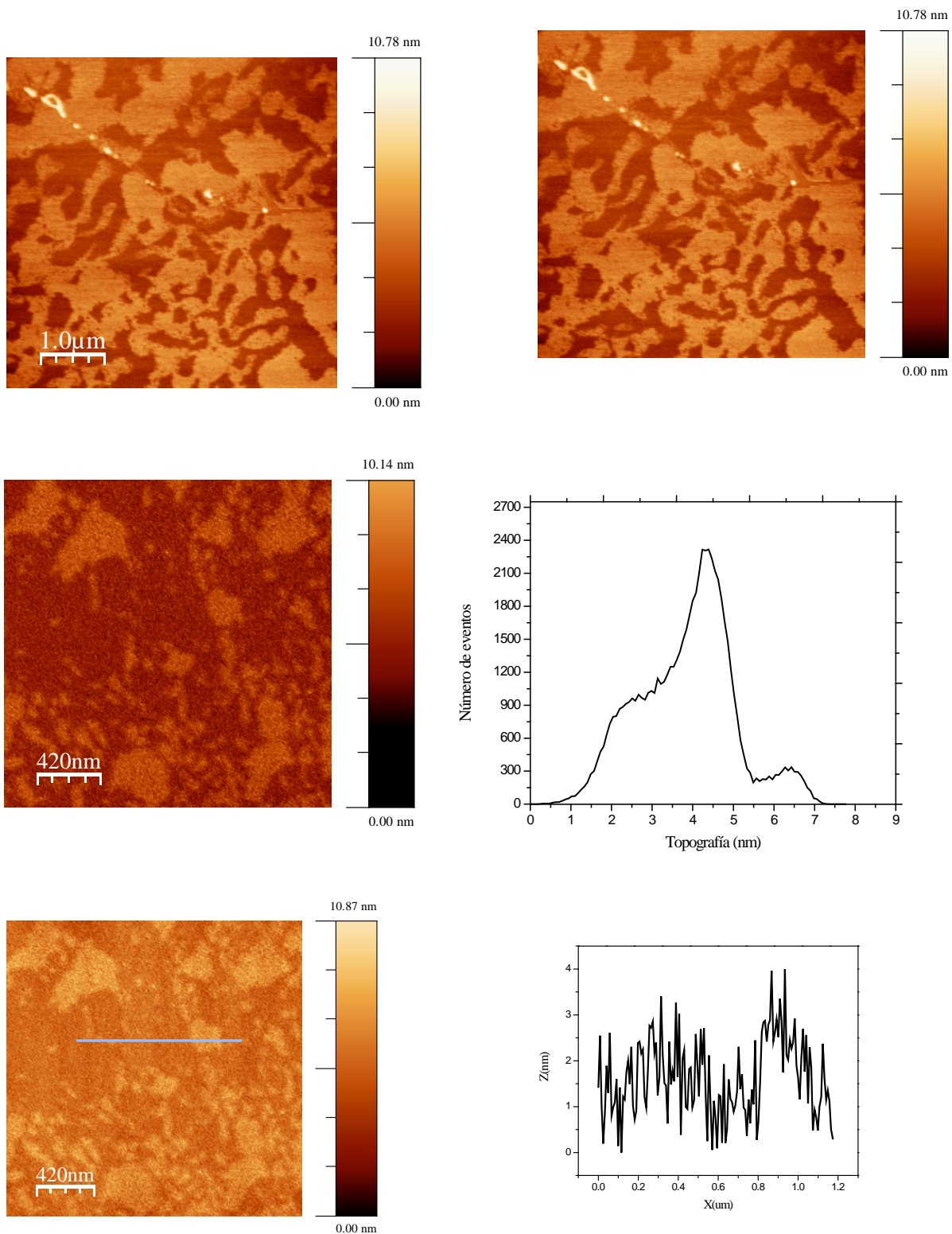


Figura 25. Imágenes de AFM de las películas de Langmuir-Blodgett del MMCE de la BHE con DPPC, DPPS y SM a 30 mN/m y sus respectivos análisis de alturas del eje Z.

En la figura 26 observamos las imágenes de AFM de la monocapa de MMCE de BHE con DPPC, DPPS y SM en presencia de estadio de LHr de 0 minutos; en esta, básicamente encontramos una conformación relativamente uniforme de fosfolípidos en algunas zonas, como podemos observar en el histograma de alturas, en el que las poblaciones predominantes van desde 0.5 a 2.0 nm. Sin embargo, en otras zonas encontramos agregados de proteína que presentan alturas de alrededor de 60 y 70 nm.

En la figura 27 podemos observar la monocapa que corresponde al MMCE en presencia del estadio de 120 minutos de incubación. En esta, que corresponde a la disociación de la proteína a estructuras esféricas y compactas, las monocapas presentan un máximo de 2 nm correspondiente al empaquetamiento en fase LC, según los análisis de altura, sin embargo, encontramos un cambio de morfología del empaquetamiento de los fosfolípidos. Aparecen espacios vacíos entre las fases, donde encontramos alturas menores o muy cercanas a 1nm alrededor de la fase LE.

Una conformación del empaquetamiento similar a este estadio es el que se observa en la imagen 28 y corresponde al estadio de 600 minutos, uniforme y compacto, presentando alturas mayores a 2 nm, sin embargo los espacios vacíos son considerablemente más grandes.

Para los estadios más largos, el análisis de alturas de las monocapas correspondientes la agregación de las fibras y agregados amiloidales, como puede observarse en las figuras 29 y 30, es mucho más evidente en las monocapas.

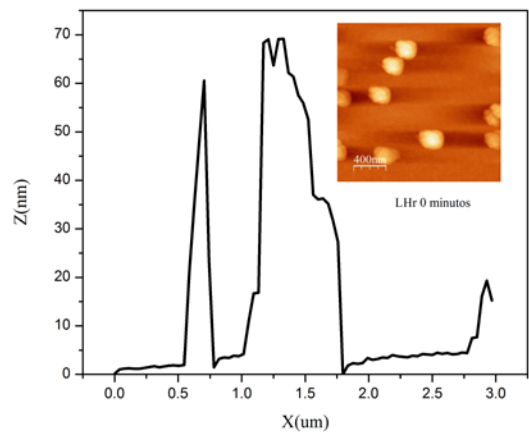
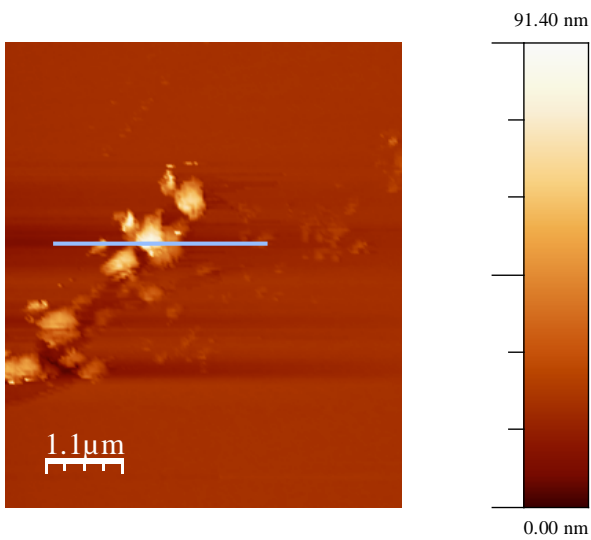
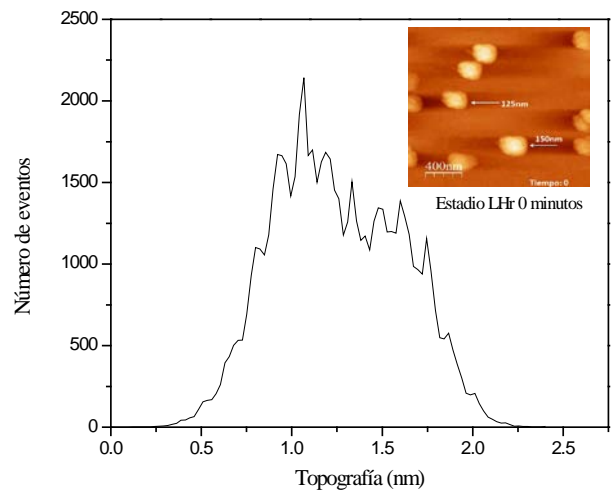
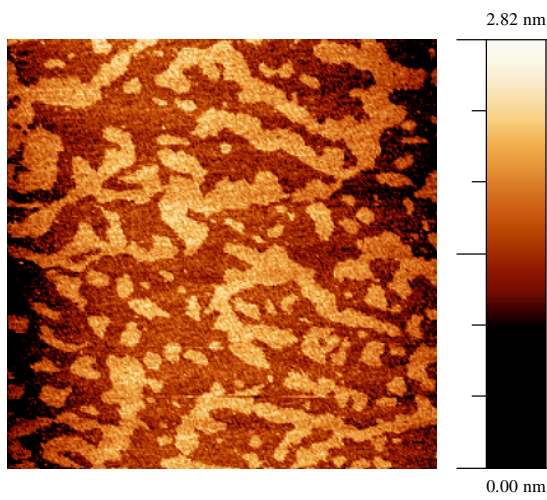


Figura 26. AFM de monocapa de MMCE de BHE con DPPC, DPPS y SM en presencia de estadio de LHR de 0 minutos e Histograma topográfico y respectivos análisis de alturas del eje Z

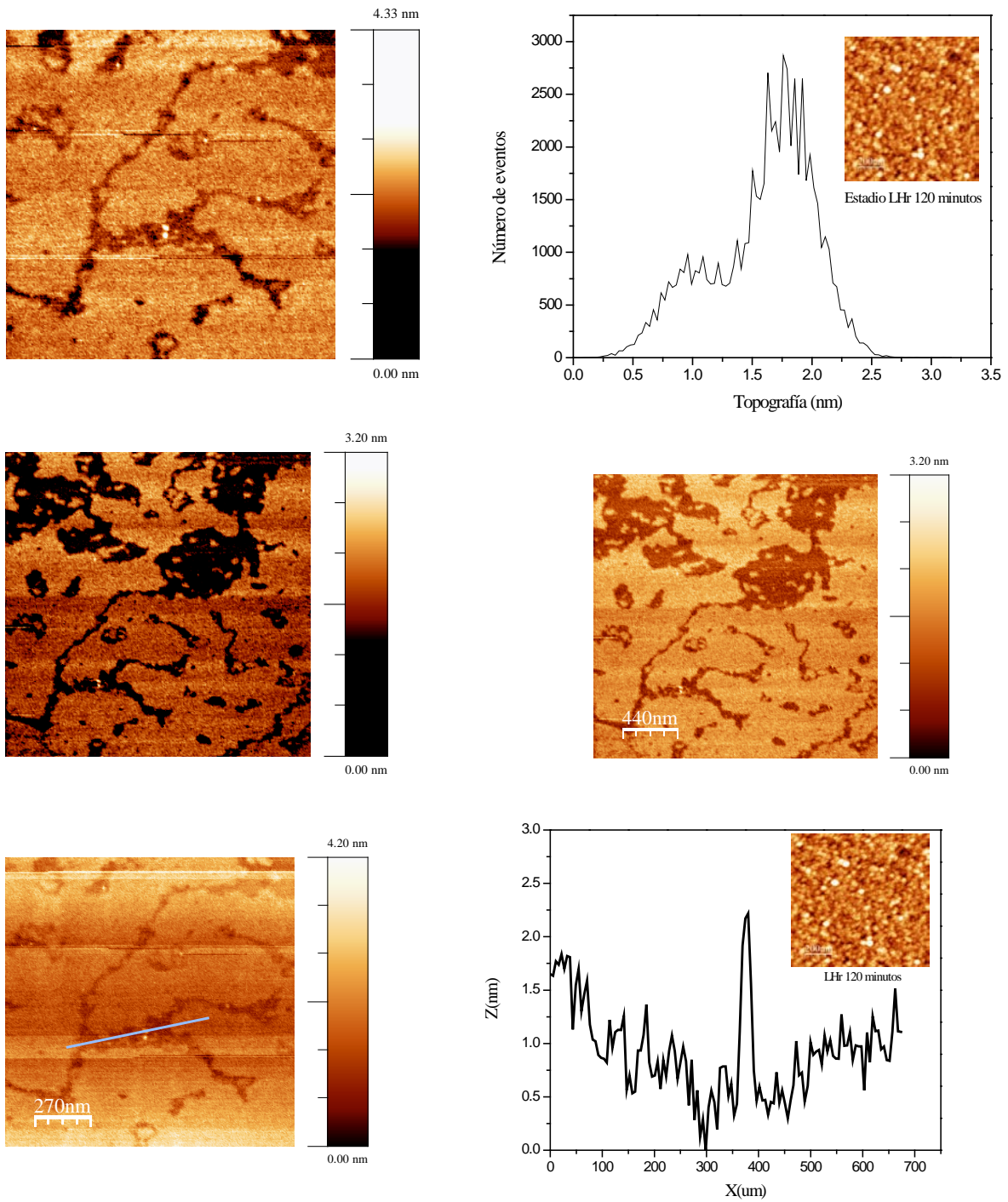


Figura 27. AFM de monocapa de MMCE de BHE de DPC, DPPS y SM en presencia de estadio de LHR de 120 minutos e histograma topográfico

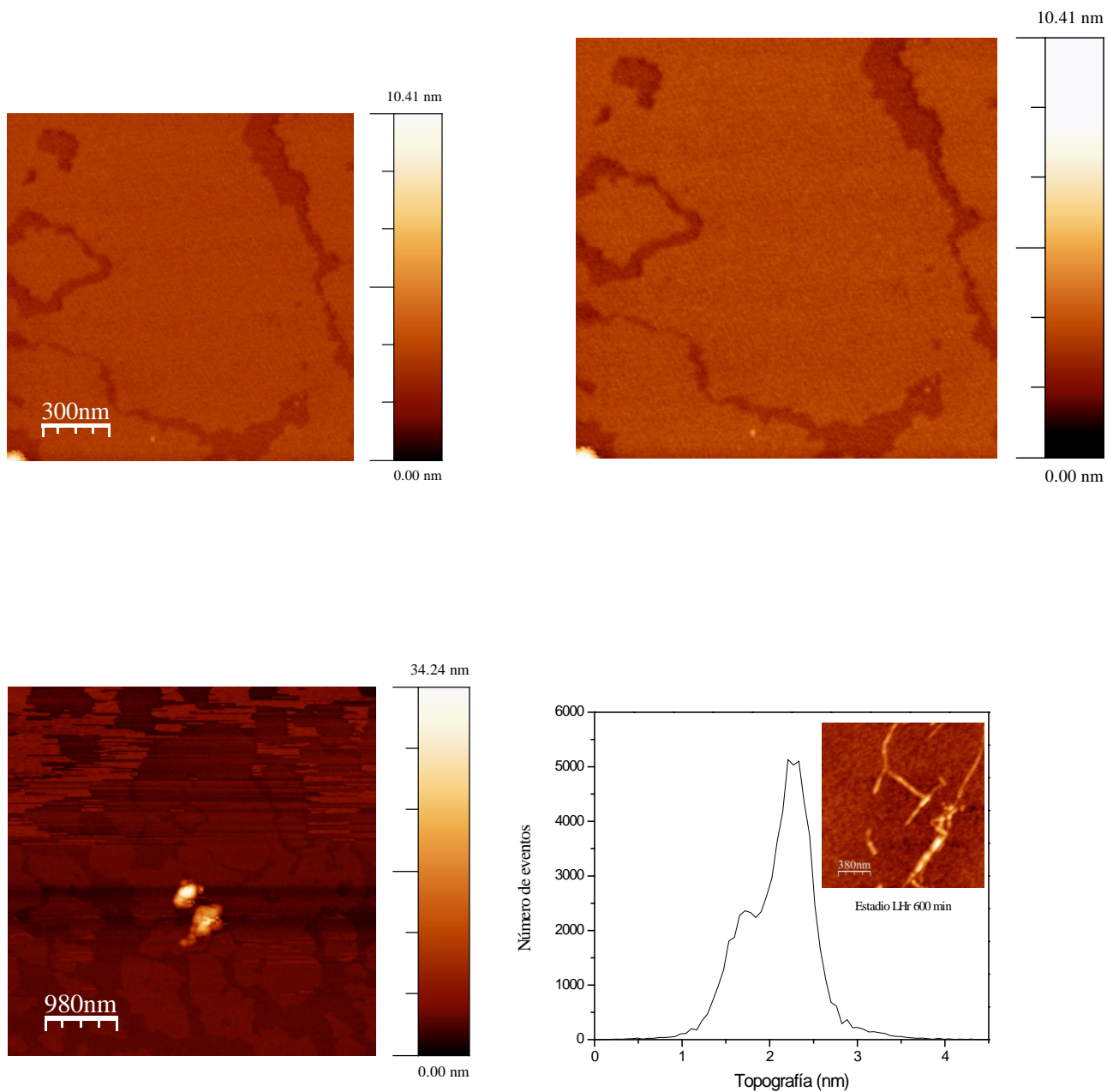


Figura 28. AFM de monocapa de MMCE de BHE de DPPC, DPPS y SM en presencia de estadio de LHR de 600 minutos e Histograma topográfico

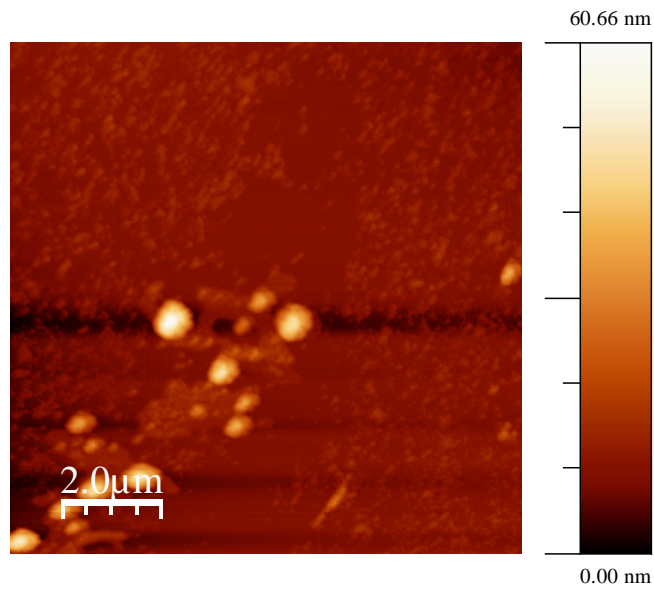


Figura 29. AFM de bicapa lipídica de Langmuir-Blodgett de MMCE de BHE en presencia de estadio de LHR de 750 minutos.

En la figura 30, se muestra la imagen de AFM de las películas de Langmuir-Blodgett, bicapa lipídica, del MMCE de la BHE. En esa imagen podemos observar dominios de fosfolípidos en una coexistencia de fases; el empaquetamiento se da en pequeños dominios separados entre sí; y otras conformaciones más grandes con estructuras micelares. El análisis de alturas muestra un mínimo de 2 nm y un máximo de 14 nm para el eje Z.

En el caso de las bicapas lipídicas podemos observar un cambio en el empaquetamiento de los fosfolípidos en presencia de fibras amiloides correspondientes al estadio de 750 minutos de incubación. En las imágenes 34 y 35, son visibles, lo que suponemos son, filamentos y estructuras fibrilares que aparentemente van tornándose en conformaciones ovaladas o de ovillos y formas micelares, lo que podría sugerir no solo la unión de las fibras y los lípidos sino la adsorción de las mismas. La ganancia de composición mayoritariamente hidrofóbica de los estadios de LHr parece tener una gran influencia en su actividad de la superficie de la membrana modelo. Estos fenómenos observados mediante la obtención en mica de la bicapa lipídica y la imagen de AFM, pudiera ayudar a explicar la hipótesis de intercalación lipídica de proteínas y así estudiar formación de poros, la asociación del péptido sobre el lípido, en el modelo de carpeta, y la aparición de micelas invertidas. Por otro lado, el efecto podría ser muy parecido al observado con péptidos antimicrobianos, los cuales tienen una fuerte afinidad para membranas de lípidos neutros y aniónicos.

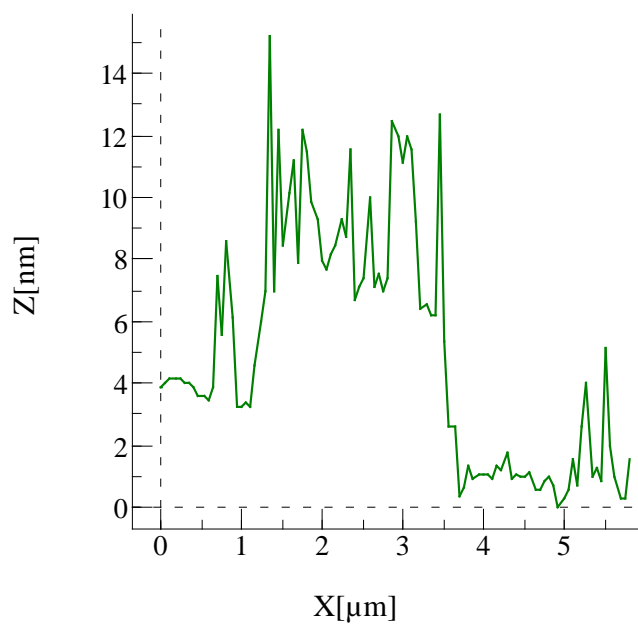
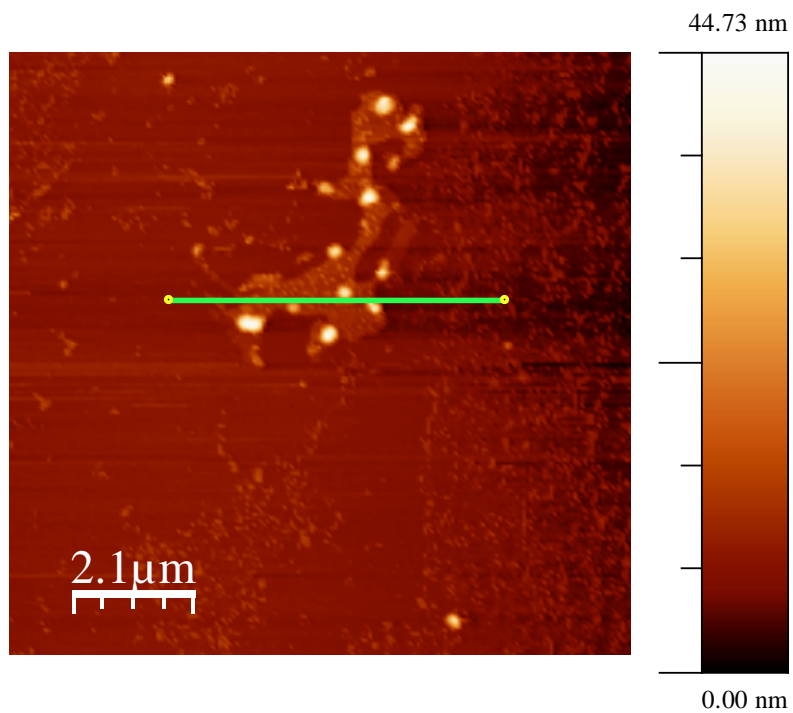


Figura 30. Imagen de AFM de las películas de Langmuir-Blodgett (bicapa lipídica) del MMCE de la BHE

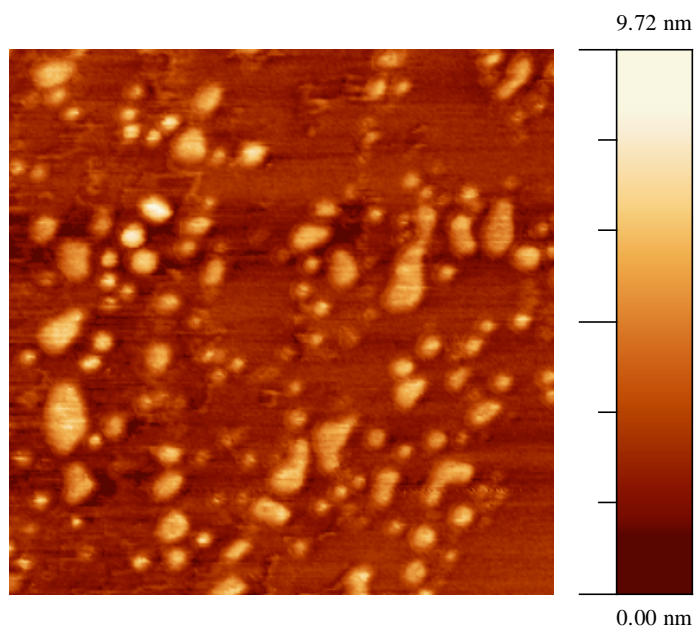
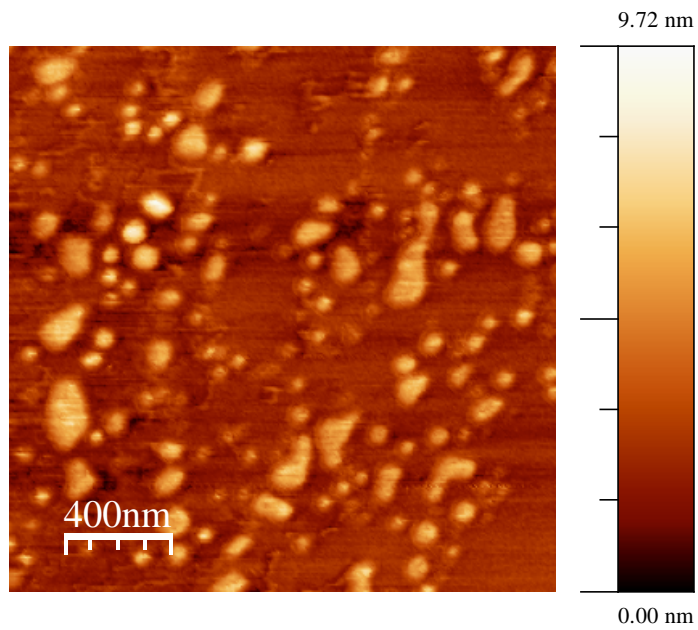


Figura 31 Imágenes de AFM de las películas de Langmuir-Blodgett (bicapa lipídica) del MMCE de la BHE en presencia de fibras amiloides

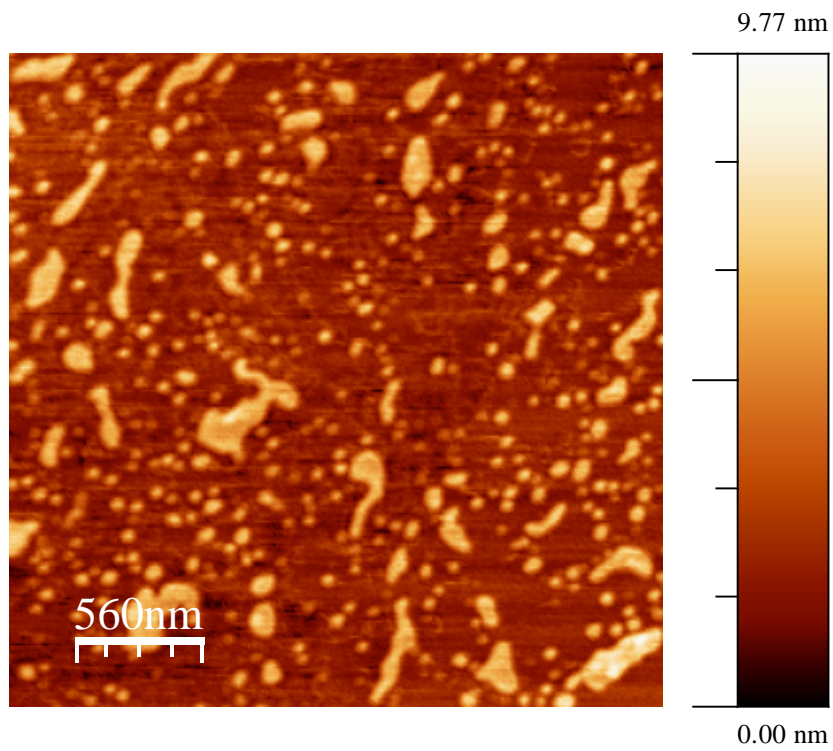


Figura 32. Imágenes de AFM de las películas de Langmuir-Blodgett (bicapa lipídica) del MMCE de la BHE en presencia de fibras amiloides.

III. 6. Discusión

Mediante la realización de este trabajo se determinó que el proceso de fibrilación de la Lisozima Humana recombinante (LHr) muestra el mecanismo clásico de nucleación, mismo que se caracteriza por la presencia de una fase de latencia o de retardo, una fase de elongación o crecimiento y por último una fase de estabilización, la cual se interpreta como el proceso final de la fibrilación. Estos resultados son corroborados por las técnicas de dispersión dinámica de luz (DLS) y de fluorescencia de ThT, los cuales muestran una curva sigmoideal típica. En contraste, los datos de las mediciones de presión de superficie ponen en evidencia un comportamiento dependiente del tiempo, en el que aparentemente la agregación de LHr tiende a ser más hidrófoba cuando aumenta el tiempo de incubación, resultado de la evolución conformacional de la proteína durante todo el proceso de fibrilación.

La observación mediante microscopía de AFM reveló la interacción de oligómeros de diversos tamaños y conformación estructural de LHr en los primeros periodos; Seguidos de estructuras filamentosas similares a las ya reportadas en la literatura como protofibras y fibras maduras. Asimismo los datos obtenidos mediante FTIR confirmaron las alteraciones conformacionales y cambios de arquitectura de la LHr hacia una composición mayoritaria de estructura secundaria β , sin rastro aparente de estructuras de hélice- α a partir de periodos más o menos tempranos de incubación. Los cambios conformacionales observados predisponen a la LHr a la agregación. La actividad y aumento de la hidrofobicidad fue confirmada mediante las medidas de tensión superficial. Por último, tras los ensayos de viabilidad de células ARPE-19, se sugiere que la estructura y el carácter hidrófobo de los diferentes agregados prefibrilares de la LHr pueden estar relacionados directamente con el efecto citotóxico.

En medio acuoso, el plegamiento de proteínas es impulsado por la fuerte tendencia de los residuos hidrofóbicos a ser excluidos del agua y el sistema es termodinámicamente estable cuando los grupos hidrófobos se agrupan en lugar de extenderse en los alrededores acuosos, por consiguiente, la cadena polipeptídica se pliega de manera que sus cadenas laterales hidrofóbicas están enterradas y las cadenas polares son cargadas en la superficie.

LHr, como otras proteínas y moléculas con actividad interfacial, tiende a acumularse en la interfase gracias a esta presencia en su estructura de grupos polares y no polares, como se mencionaba anteriormente; sin embargo, también tiende a agregarse al aumentar la hidrofobicidad. Esta actividad superficial es vital, ya que las fuerzas

impulsoras que gobiernan la adsorción de las moléculas anfifílicas, como las proteínas, favorecen o dificultan la adsorción. Este comportamiento sugiere que los agregados hidrofóbicos se insertan en la membrana celular, interfiriendo así con la permeabilidad de esta, como sugieren Chaudhary (2009) y Gharibyan(2007) disminuyendo, en este caso, la viabilidad de la línea celular ARPE 19.

Las propiedades anfipáticas de las fibras amiloides extracelulares, oligómeros y protofibras, les confiere la habilidad de perturbar múltiples receptores de superficie celular y/o canales inespecíficamente (Selkoe, 2003). Sin embargo, algunos han reportado que las interacciones hidrofóbicas solo juegan un papel auxiliar en la ruptura de las membranas lipídicas, mientras que las interacciones electrostáticas sí son cruciales (Chaudhary y Nagara 2009; Gharibyan, 2007; Huang *et al.*, 2009).

Normalmente las moléculas complejas como las proteínas, al combinarse con los iones hidrógeno y con otros iones presentes en una disolución dan lugar a la carga neta de la molécula. Una proteína dada presenta a pH menor de su pI, una carga positiva, y a pH mayor de su pI presentar carga negativa. En el caso de lisozima a pH biológico presenta un pI de 11 por lo que en un medio de disolución a pH 2 la carga de la proteína es positiva.

En cuanto a la relación observada entre la carga de lisozima y la interacción con la membrana, se pueden mencionar un par de casos muy interesantes, por ejemplo, mediante un estudio de interacción entre liposomas y lisozima de clara de huevo, se encontró que las fibras de amiloide de la lisozima eran capaces de perturbar la carga negativa de los liposomas conformados por DOPG/DOPC con calceína dentro (Hirano *et al.*, 2012). En este estudio la fuga de calceína, después de mezclar los liposoma con las fibras de amiloide, aumentó conforme aumentaba el tiempo de incubación.

La disrupción de los liposomas fue atribuida a la atracción electrostática entre las fibras de la lisozima y los liposomas pues la fuga de la calceína hacia el medio disminuyó conforme el pH se reducía cerca del punto isoeléctrico de la lisozima, donde la carga neta de la lisozima es cero. Además, este resultado indicó que las moléculas de lisozima monoméricas no interrumpieron la conformación de los liposomas, mientras que las fibras de amiloide sí, lo que implica la importancia de la morfología agregada de lisozima en la interrupción.

A la hora de interpretar los resultados de citotoxicidad, en este estudio, es necesario tener en cuenta que el mismo medio ácido (pH 2) en el que se realizó la fibrilación de LHR,

también tuvo un efecto perjudicial, repercutiendo en disminución de la viabilidad celular desde los primeros estadios a los que no se les atribuye la presencia de estructuras oligoméricas, prefibrilares o de fibras de amiloides. Es decir, el medio ácido ocasiona una desnaturalización parcial en lisozima y esta afecta en mayor o menor grado a las células. Sin embargo, la disminución de la viabilidad en los estadios monoméricos de lisozima comparados a la viabilidad de los estadios prefibrilares y fibrilares, es considerablemente mayor en estos últimos. Por lo que podemos decir que la morfología de los agregados de la LHr y su actividad citotóxica están relacionadas en la interrupción de viabilidad.

En cuanto a las especies citotóxicas implicadas, según la opinión predominante, la formación de fibras maduras y su co-agregación en depósitos y placas se consideran un mecanismo de protección que se desarrolló en la naturaleza para evitar la alta toxicidad intrínseca de los oligómeros solubles (Bucciantini *et al.*, 2002; Caughey y Lansbury, 2003; Kirkitadze *et al.*, 2002). Pues el deterioro de las funciones celulares y alta toxicidad de oligómeros solubles se ha reportado para una serie de polipéptidos incluyendo la α -Sinucleína (Conway *et al.*, 2000; Volles y Lansbury, 2003) péptidos A β (Hartley *et al.*, 1999; Walsh *et al.*, 2002), transtiretina (Sousa *et al.*, 2000), y la lisozima (Malisauskas *et al.*, 2005), así como para proteínas que no están asociadas con cualquier trastorno conformacional.

Novitskaya *et al.*, (2006) reportaron por primera vez que tanto las especies oligoméricas solubles y las fibras maduras de amiloides, producidos a partir de la proteína prión, indujeron muerte celular hasta del 90 y 80% de la población de células neuronales. Ellos probaron el efecto de tres estadios conformacionales (monómeros de hélice- α , β -oligómeros y fibras maduras) de proteínas priones de mamíferos (rPrP) en células cultivadas y neuronas primarias, reportando además que la muerte celular se producía a través de un mecanismo apoptótico. Una explicación es que estas especies eran capaces de inducir un aumento en la conductancia y permeabilidad de la membrana, seguido por una rápida elevación intracelular de Ca²⁺, la cual era capaz de reducir el potencial de membrana y la síntesis de ATP por acumulación de este ion en la mitocondria, ocasionando la apoptosis o necrosis celular.

Al estudiar la actividad en un modelo de membrana de células endoteliales, se encontró que los fosfolípidos que componen esta membrana modelo fueron capaces de intervenir en la migración hacia la interfase aire- agua, a medida que la estructura de la proteína en solución era modificada por condiciones desnaturalizantes.

La forma en la que las propiedades de adsorción de los estadios que se ve reflejada tanto por la migración a la interfase en los experimentos realizados en tensiómetro de gota y el aumento de presión y área en los estudios de modelo de membrana, se pueden relacionar con el carácter hidrofóbico que adquiere las soluciones de la lisozima humana recombinante, LHr, este carácter lo adjudicamos en base a los resultados obtenidos mediante fluorescencia de ThT, DLS e FTIR; los cuales corroboran los cambios conformacionales que modifican el carácter hidrofóbico y de agregación de cada especie prefibrilar, la cual da como resultado un aumento la actividad superficial reflejada en las propiedades de adsorción.

Además, tomando en consideración la carga positiva de las estructuras de LHr, a pesar de la propiedad isoeléctrica de los fosfolípidos DPPC, SM a pH 7.4, es importante considerar que la PS le da el carácter predominantemente negativo al modelo de membrana celular. Por lo que no solo el carácter hidrofóbico de LHr pudiera estar potenciando la interacción en el modelo así como la intercalación o adsorción observada en la formación de la bicapa, sino también la interacción electrostática entre estructuras de LHr y la PS.

III. 7. Conclusión

LHr en condiciones de desnaturalización parcial, solución de sales acidificada a pH 2, 136.7mM NaCl y 2.68 mM KCl ajustando pH con HCl, incubada a 55°C, sigue una fibrilación que incluye los estados transitorios oligoméricos, protofibrilares y de fibras maduras; corroborándose, además, que estos estados transitorios comparten la semejanza conformacional en distintas proteínas asociadas con la enfermedad, lo que igualmente fortalece la suposición de que los mecanismos de formación subyacentes pueden ser común en el resto de proteínas amiloides.

La adsorción de proteínas en la interfase aire-agua fue gobernada por un mecanismo de difusión, y no se observó ninguna perturbación apreciable del sistema. Por lo tanto, la agregación cinética y carácter hidrófobo de los agregados de la LHr se correlacionó en términos de la presión superficial (π).

Se corroboró la transición estructural de hélices- α a estructuras β mediante FTIR.

Las imágenes de AFM apoyan los datos obtenidos mediante la cinética de fibrilación, para evidenciar los estados conformacionales transitorios de la LHr durante los periodos de incubación.

Los datos de viabilidad de la línea celular Arpe-19, sugieren que la citotoxicidad está relacionada con la formación de filamentos; Es decir, conformaciones prefibrilares y fibras de amiloide maduras.

Además, en este trabajo se estudió el comportamiento en interfase aire/agua de un modelo de membrana endotelial y la influencia de fibras amiloides de de LHr en diferentes estadios de formación. El área por molécula de fosfolípido en presencia de la LHr aumenta considerablemente, lo que se correlaciona con una penetración de la monocapa.

Las condiciones de desnaturalización en la que la LHr se incubó, alteran la estructura de la proteína e impulsa la formación de monómeros, oligómeros y agregados amiloides protofibrillas con distintas propiedades de adsorción en la interfase aire-agua.

III. 8. Literatura Citada

- Andersson, K., Olofsson, A., Nielsen, E., Svehag, S., y Lundgren, E. 2002. Only Amyloidogenic Intermediates of Transthyretin Induce Apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 294(2):309-314.
- Anfinsen, C., Haber, E., Sela, M. y White, F. 1961. The Kinetics of Formation of Native Ribonuclease During Oxidation of the Reduced Polypeptide Chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 47:1309-1314 3.
- Arthur W. Adamson. 1990. *Physical Chemistry of Surfaces*, 5ta Edition, Wiley, A. Interscience Publication. Estados Unidos de América.
- Bai H., Xu K., Xu Y., y Matsui H. 2007. Fabrication of Au Nanowires of Uniform Length and Diameter Using a Monodisperse and Rigid Biomolecular Template: Collagen-like Triple Helix. *Angewandte Chemie International Edición*, 46:3319–3322.
- Bernales, S., Papa, F., y Walter, P. 2006. Intracellular Signaling by the Unfolded Protein Response. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 22:487-508.
- Berg J., Tymoczko J., Stryer L., y Clarke N. 2003. *Bioquímica*. Barcelona: Editorial Reverté, S. A.
- Bösl B., Grimminger V., y Walte S. 2006. The Molecular Chaperone Hsp104-a Molecular Machine for Protein Disaggregation. *Journal of Structural Biology* 156:139-148.
- Branden, C., y Tooze, J. 1999. *Introduction to Protein Structure*, Second Edition, Garland. Publishing, New York.
- Brockwell, D.J., y Radford, S.E. 2007. Intermediates: Ubiquitous Species on Folding Energy Landscapes *Current Opinion in Structural Biology* 17:30-37.
- Bucciantini, M., Giannoni, E., Chiti, F., Baroni, F., Formigli, L., Zurdo, J., Taddei, N., Ramponi, G., Dobson, C. M., y Stefani, M. 2002. Inherent Toxicity of Aggregates Implies a Common Mechanism for Protein Misfolding Diseases. *Nature* 416: 507–511.
- Buell, A., Dhulesia A., Mossuto, F., Cremades, N., Kumita, J., Dumoulin, M., Welland, M. E., Knowles, T.P.J., Salvatella, X., y Dobson, C. 2011. Population of Nonnative States of Lysozyme Variants Drives Amyloid Fibril Formation. *Journal of the American Chemical Society* 133(20):7737-43.
- Byler D. M. y Susi H. 1986. Examination of the Secondary Structure of Proteins by Deconvolved FTIR Spectra. *Biopolymers* 25(3):469-87.

- Caughey, B., y Lansbury, P. T. 2003. Protofibrils, Pores, Fibrils, and Neurodegeneration: Separating the Responsible Protein Aggregates from the Innocent Bystanders. *Annual Review of Neuroscience* 26: 267–298.
- Clarke, A.R. Cytosolic Chaperonins: A Question of Promiscuity. 2006. *Molecular Cell* 24:165-167.
- Chanez-Cárdenas, M.E., Cisneros-Armas, D., Del Pozo-Yauner, L., Becerril, B., y Fernandez-Velasco. 2002. Enfermedades Relacionadas al Plegamiento Anómalo de las Proteínas. En: Cea Bonilla A, del Arenal Mena IP, Riveros Rosas H, Vázquez Contreras E (eds). *Mensaje Bioquímico* 26: 73-97.
- Chaudhary, N. y Nagaraj, R. 2009. Hen Lysozyme Amyloid Fibrils Induce Aggregation of Erythrocytes and Lipid Vesicles. *Molecular and Cellular Biochemistry* 328: 209–215.
- Chiti, F., Taddei, N., Bucciantini, M., White, P., Ramponi, G., y Dobson, C. M. 2000. Mutational Analysis of the Propensity for Amyloid Formation by a Globular Protein. *EMBO Journal* 19:1441–1449.
- Chiti, F., Webster, P., Taddei, N., Clark, A., Stefani, M., Ramoni, G., y Dobson, C. 1999. Designing Conditions for In Vitro Formation of Amyloid Protofilaments and Fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90:3590–3594.
- Chow, M.K.M., Lomas, D.A., y Bottomley, S.P. 2004. Promiscuous Beta-Strand Interactions and the Conformational Diseases. *Current Medicinal Chemistry* 11(4):491-499.
- Chu, B. 1991. *Laser Light Scattering*. 2nd Edition, Academic Press, Boston. Estados Unidos de América.
- Coban O., Popov J., Burger M., Vobornik D y Johnston L.J. 2007. Transition from Nanodomains to Microdomains Induced by Exposure of Lipid Monolayers to Air. *Biophysical Journal*, 92:2842-2853.
- Conway, K. A., Lee, S. J., Rochet, J. C., Ding, T., Williamson, R., y Lansbury, P. 2000. Acceleration of Oligomerization, Not Fibrillization, is a Shared Property of Both α -Synuclein Mutations Linked to Early-onset Parkinson's Disease: Implications for Pathogenesis and Therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97:571–576.
- De Felice, F. G., Vieira, M. N. N., Meirelles, M. N. L., Morozova-Roche L. A., Dobson C. M., y Ferreira S. T. 2004. Formation of Amyloid Aggregates From Human Lysozyme and Disease-Associated Variants Using Hydrostatic Pressure. *The FASEB Journal* 18:10 1099-110.

- Dobson, C. 2003. Protein Folding and Misfolding. *Nature* 426:884–890.
- Dobson, C. 1999. Protein Misfolding, Evolution and Disease. *Trends in Biochemical Sciences* 24:329-332.
- Dobson, C. 2004. Navigating the Pathway from Embryonic Stem Cells to Beta Cells. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 15:3-16.
- Dobson, C. 2001. The Structural Basis of Protein Folding and its Links with Human Disease. *Philosophical Transactions of the Royal Society Biological Sciences* 356:133-145.
- Esser, C., y Alberti, S., Höhfeld, J. 2004. Cooperation of Molecular Chaperones with the Ubiquitin/proteasome System. *Biochim Biophys Acta* 1695(1-3):171-88.
- Fentem J.H. 1994. The Use of Human Tissues in In Vitro Toxicology, Summary of General Discussions. *Human Experimental Toxicology* 13(2):445-449.
- Fersht A. 1999. *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*. Freeman, New York. Estados Unidos de América.
- Gerum, C., Schlepckow, K., y Schwalbe, H.2010. The Unfolded State of the Murine Prion Protein and Properties of Single-point Mutants Related to Human Prion Diseases. *Journal of Molecular Biology* 401:7–12.
- Gharibyan, A.L., Zamotin, V., Yanamandra, K., Moskaleva, O.S., Margulis, B.A., Kostanyan, I.A., y Morozova-Roche, L. 2007. Lysozyme Amyloid Oligomers and Fibrils Induce Cellular Death Via Different Apoptotic/Necrotic Pathways. *Journal of Molecular Biology* 365:1337–1349.
- Glabe, C., 2006. Common Mechanisms of Amyloid Oligomer Pathogenesis in Degenerative Disease. *Neurobiology of Aging* 27:570–575.
- Gong, Y., Chang, L., Viola, K. L., Lacor, N., Lambert, M., Finch, C., Krafft, G., y Klein, W. 2003. Alzheimer's Disease-Affected Brain: Presence of Oligomeric A β Ligands (ADDLs) Suggests a Molecular Basis for Reversible Memory Loss. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (18): 10417–10422.
- Goormaghtigh, E., Cabiaux, V. y Ruyschaert, J. 1994. Determination of Soluble and Membrane Protein Structure By Fourier Transform Infrared Spectroscopy. III. Secondary structures. *Subcellular Biochemistry* 23: 405-450.
- Górzny, M., Walton, A., y Evans, S.2010.Synthesis of High-Surface-Area Platinum Nanotubes Using a Viral Template. *Advanced Functional Materials*. 20: 1295–1300.
- Green, J.D. et al.2004. Atomic Force Microscopy Reveals Defects Within Mica Supported Lipid Bilayers Induced by the Amyloidogenic Human Amylin Peptide. *The Journal of*

Molecular Biology, 342:877-887.

Haataja L., Gurlo T., Huang C., y Butler P. 2008. Islet Amyloid in Type 2 Diabetes, and the Toxic Oligomer Hypothesis. *Endocrine Reviews* 29 (3): 303–16.

Harrison R. F., Hawkins P. N., Roche W. R., MacMahon, R. F., Hubscher, S. G., y Buckels, J. A. 1996. Fragile Liver and Massive Hepatic Haemorrhage Due to Hereditary Amyloidosis. *Journal in Gastroenterology* 38: 151–152.

Hartl F. y Hayert-Hartl M. 2002. Molecular Chaperones in the Cytosol: from Nascent Chain to Folded Protein. *Science* 295: 1852-1858.

Hartley D., Walsh D., Ye C., Diehl T., Vasquez, S., Vassilev P., Teplow D., y Selkoe D. 1999. Protofibrillar Intermediates of Amyloid-B-Protein Induce Acute Electrophysiological Changes and Progressive Neurotoxicity in Cortical Neurons. *The Journal of Neuroscience* 19: 8876–8884.

Hirano A.; Uda K.; Maeda, Y.; Akasaka T. y Shiraki K. 2010. One Dimensional Protein-Based Nanoparticles Induce Lipid Bilayer Disruption: Carbon Nanotube Conjugates and Amyloid Fibrils. *Langmuir* 26: 17256–17259.

Hirano A., Yoshikawa H., Matsushita S., Yamada, Y. y Shiraki K. 2012. Adsorption and Disruption of Lipid Bilayers by Nanoscale Protein Aggregates. *Langmuir* 28: 3887-3895.

Huang B., He J., Ren J., Yan X., y Zeng, C. 2009. Cellular Membrane Disruption by Amyloid Fibrils Involved Intermolecular Disulfide Cross-Linking. *Biochemistry* 48: 5794–5800.

Jahn T. y Radford S. 2005. The Yin and Yang of Protein Folding. *Federation of European Biochemical Societies* 272: 5962-5970.

Jarrett J., Berger E., y Lansbury P. 1993. The Carboxy Terminus of the Beta Amyloid Protein is Critical for the Seeding of Amyloid Formation: Implications for the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Biochemistry* 32: 4693-4697.

Kastornaa A., Trusovaa V., Gorbenkoa G., y Kinnunenb P. 2012. Membrane Effects of Lysozyme Amyloid Fibrils. *Chemistry and Physics of Lipids. Chemistry and Physics of Lipids* 165: 331–33.

Kayed R., Head E., Thompson J., McIntire M., Milton C., Cotman C., y Glabe C. 2003. Common Structure of Soluble Amyloid Oligomers Implies Common Mechanism of Pathogenesis. *Science* 300:486–489.

Kayed R., Sokolov Y., Edmonds B., McIntire T.M., Milton S.C., Hall J.E., y Glabe C. G. 2004. Permeabilization of Lipid Bilayers is a Common Conformation-Dependent

- Activity of Soluble Amyloid Oligomers in Protein Misfolding Diseases. *Journal of Biological Chemistry* 279(45):46363-6.
- Kerr J., Wyllie A. y Currie A. 1972. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. *British Journal of Cancer* 26: 239-257.
- Kinnunen P.K.J. 2009. Amyloid Formation on Lipid Membrane Surfaces. *The Open Biology Journal*; 2:163-175,
- Kirkitadze M. D., Bitan G., y Teplow D. B. 2002. *Journal of Neuroscience Research* 69:567–577.
- Koradi R., Billeter M., y Wuthrich K.1996. MOLMOL: Programa Para la Visualización y el Análisis de Estructuras Macromoleculares. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 14:51–55.
- Kumosinski T., y Unrush, J. 1996. Quantitation of the Global Secondary Structure of Globular Proteins by FTIR Spectroscopy; Comparison With X-ray Crystallographic Structure. *Talanta* 43: 199-219.
- Lashuel H. y Butterfield. S. 2010. Amyloidogenic Protein–Membrane Interactions: Mechanistic Insight from Model Systems. *Angewandte Chemie International Edition* 49(33):5628-54.
- Lashuel H., y Lansbury P. 2006. Are Amyloid Diseases Caused by Protein Aggregates that Mimic Bacterial Pore-forming Toxins? *Q. Review of Biophysics* 39 (2): 167.
- Lee D., Haris, P. Chapman D. y Mitchell, R. C.1990. Determination of Protein Secondary Structure Using Factor Analysis of Infrared Spectra. *Biochemistry* 29: 9185-9193
- Lee K., Lee S., Kim H., Song J., Yang S., Paik S., y Han P. 2004. Progressive Cognitive Impairment and Anxiety Induction in the Absence of Plaque Deposition in C57Bl/6 Inbred Mice Expressing Transgenic Amyloid Precursor Protein. *Journal of Neuroscience Research* 76: 572–580.
- Lee S., y Tsai F.T.F. 2005. Molecular Chaperones in Protein Quality Control. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 38: 259-265.
- Lesné S., Koh M., Kotilinek L., Kaye R., Glabe C., Yang, A., Gallagher, M., y Ashe, K. 2006. A Specific Amyloid-beta Protein Assembly in the Brain Impairs Memory. *Nature* 440:352–357.
- Lin H., Bhatia R., y Lal R. 2001. Amyloid Beta Protein Forms Ion Channels: Implications for Alzheimer's Disease Pathophysiology. *The Journal of Federation of American Societies for Experimental Biology* 15(13):2433-44.

- Lin M., Chiu H., Fan F., Tsai H., Wang S., Chan Y., y Chen W. 2007. Kinetics and Enthalpy Measurements of Interaction Between Beta-amyloid and Liposomes by Surface Plasmon Resonance and Isothermal Titration Microcalorimetry. *Colloids and Surfaces Biointerfaces* 58 (2): 231–236.
- Makin S., Sikorski P. y Serpell C. 2006. Diffraction to Study Protein and Peptide Assemblies. *Current Opinion in Chemical Biology* 10 (5): 417-422.
- Malisauskas M., Johan O., Darinskas A., Zamotin V., Liutkevicius E., Lundgren E., y Morozova-Roche A. 2005. Does the Cytotoxic Effect of Transient Amyloid Oligomers from Common Equine Lysozyme *In Vitro* Imply Innate Amyloid Toxicity? *The Journal of Biological Chemistry* 280 (8): 6269-6275.
- Matagne A. y Dobson C. 1998. The Folding Process of Hen Lysozyme: A Perspective From the ‘New View’. *Cellular and Molecular Life Sciences* 54 (4): 363–371.
- Möbius D. y Millar R. 1998. *Proteins at Liquid Interfaces*, ELSERVIER 303-339.
- Mossuto M., Dhulesia A., Devlin G., Frare E., Kumita J. R., de Laureto P., Dumoulin M., Fontana A., Dobson C., y Salvatella X. 2010. The Non-Core Regions of Human Lysozyme Amyloid Fibrils Influence Cytotoxicity. *Journal of Molecular Biology* 402: 783–796.
- Neet K. E., y Timm D. E. 1994. Conformational Stability of Dimeric Proteins: Quantitative Studies by Equilibrium Denaturation. *Protein Science* 3: 2167-2174.
- Nelson, D., y Cox, M. 2000. *Lehninger Principles of Biochemistry*, Worth Publisher, Nueva York. Estados Unidos de América.
- Nielsen L, Khurana R, Coats A, Frokjaer S, Brange J, Vyas S, Uversky VN, Fink A. 2001. Effect of Environmental Factors on the Kinetics of Insulin Fibril Formation: Elucidation of the Molecular Mechanism. *Biochemistry* 40:6036-6046.
- Nilsson, M. R. 2004. Techniques to Study Amyloid Fibril Formation *In vitro*. *Methods* 34: 151–160.
- Novitskaya V., Bocharova O., Bronstein I., y Baskakov I., 2006. Amyloid Fibrils of Mammalian Prion Protein are Highly Toxic to Cultured Cells and Primary Neurons. *Journal of Biological Chemistry* 281: 13828–13836.
- Oliveberg M., y Wolynes P. 2005. The Experimental Survey of Protein-folding Energy Landscapes. *Quarterly Reviews of Biophysics* 38: 245-288.
- Ostrov N., y Gazit E. 2010 Genetic Engineering of Biomolecular Scaffolds for the Fabrication of Organic and Metallic Nanowires. *Angewandte Chemie International Edition* 49: 3018–3021

- Pandit A., Jha A., Freed K., y Sosnick T. 2006. Small Proteins Fold Through Transition States with Native-like Topologies. *Journal of Molecular Biology* 361: 755-770.
- Pasternack R., Gibbs E., Sibley S., Woodard L., Hutchinson P., Genereux J., y Kristian K., 2006. Formation Kinetics of Insulin-Based Amyloid Gels and the Effect of Added Metalloporphyrins. *Biophys Journal* 90:1033-1042.
- Pauling, L., Corey, R.B., y Branson, H.R. 1951. Atomic Coordinates and Structure Factors for Two Helical Configurations of Polypeptide Chains. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 37 (4): 205-211.
- Pepys, M., Hawkins, P., Booth, D., Vigushin, D., Tennent, G., Soutar, A., Totty, N., Nguyen, O., Blake, C., Terry, C., Feest, G., Zalin, A., y Hsuan J.1993. Human Lysozyme Gene Mutations Cause Hereditary Systemic Amyloidosis. *Nature* 362: 553–557.
- Pollard, H. B., Arispe, N., y Rojas, E. 1995. Ion Channel Hypothesis for Alzheimer Amyloid Peptide Neurotoxicity. *Cellular and Molecular Neurobiology*15: 513-26.
- Pountney, D., Voelcker, N., y Gai, W. 2005. Annular Alpha-Synuclein Oligomers are Potentially Toxic Agents in Alpha-Synucleinopathy. *Neurotoxicity Research* 7:59-67.
- Richardson, J.S., y Richardson D. 2002. Natural β -sheet Proteins Use Negative Design to Avoid Edge-to-Edge Aggregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99 (5): 2754-2759.
- Sato T., Kwon C., Miyake H., Taniguchi T. y Maeda E. 2001. *Plant Production Science* 4:145-150.
- Slocik, J., Kim, S., Whitehead, T., Clark, D., y Naik, R., Biotemplated Metal Nanowires Using Hyperthermophilic Protein Filaments. *Small* 2009, 5: 2038–2042.
- Sokolov, Y., Kozak, J., Kaye, R., Chanturiya, A., Glabe, C., Hall, J., Gen, J., Chanturiya, A., Glabe, C., y Hall, J., 2006. Soluble Amyloid Oligomers Increase Bilayer Conductance by Altering Dielectric Structure. *Physiology* 128 (6): 637–647.
- Sousa, M. M., Cardoso, I., Fernandes, R., Guimaraes, A., y Saraiva, M. J. 2001. *American Journal of Pathology* 159: 1993–2000.
- Stefani, M., y Dobson, C. 2003. Protein Aggregation and Aggregate Toxicity: New Insights into Protein Folding, Misfolding Diseases and Biological Evolution. *Journal of Molecular Medicine* 81 (11): 678–699.
- Stefani M., 2004. Protein misfolding and aggregation: New Examples in Medicine and Biology of the Dark Side of the Protein World. *Biochimica et Biophysica Acta* 1739 (1): 5–25.

- Stefani M., 2008. Protein Folding and Misfolding on Surfaces. *International Journal of Molecular Sciences* 9: 2515–2542.
- Sun S. 2004. *Physical Chemistry of Macromolecules: Basic principles and issues*. New York. Estados Unidos de América.
- Susi H. y Byler D. 1986. Resolution-Enhanced Fourier Transform Infrared Spectroscopy of Enzymes. *Methods Enzymol* 130:290-311
- Susi H. y Byler D. 1987. Fourier Transform Infrared Study of proteins With parallel β - chains. *Biochimica et Biophysica Acta Biophys* 258:465-469.
- Takano K., Funahashi J., y Yutani, K. 2001. The Stability and Folding Process of Amyloidogenic Mutant Human Lysozymes. *European Journal of Biochemistry* 268 (1): 155–159.
- Thirumalai D., Klimov, D., y Dima, R. 2003. Emerging Ideas on the Molecular Basis and Peptide Aggregation. *Current Opinion in Structural Biology* 13(2): 146-159.
- Tycko R., 2004. Progress Towards a Molecular-level Structural Understanding of Amyloid Fibrils. *Current Opinion in Structural Biology* 14 (1): 96–103.
- Volles M. J., y Lansbury P. T., y Jr. 2003. Zeroing in on the Pathogenic form of Alpha-Synuclein and its Mechanism of Neurotoxicity in Parkinson's Disease. *Biochemistry* 42:7871–7878.
- Walsh D., Klyubin I., Fadeeva J., Cullen, W., Anwyl R., Wolfe M., Rowan M., y Selkoe D. 2002. Naturally Secreted Oligomers of Amyloid Beta Protein Potently Inhibit Hippocampal Long-term Potentiation in vivo. *Nature* 416(6880):535-9.
- Watanabe K., Segawa T., Nakamura K., Kodaka M., Konakahara y Okuno, H. 2001. Identification of the Molecular Interaction Site of Screening of Amyloid Beta Peptide by Using Fluorescence Assay. *Journal of Peptide Research* 2001, 58(4): 342–346.
- Uversky V., Li J., y Fink A. 2001. Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human α -synuclein. A possible molecular link between Parkinson's disease and heavy metal exposure. *Journal of Biological Chemistry* 276:44284-44296.
- Zhang K., y Kaufman R.J. 2006. The Unfolded Protein Response: an ER Stress Signaling Critical for Health and Diseases. *Neurology*. 66: S102-109.

CAPÍTULO IV

VI. PROPIEDADES TERAPEÚTICAS DE SISTEMAS NANOESTRUCTURADOS

El estudio de materiales nanoestructurados es de gran interés para distintas áreas de la ciencia; en particular en el campo de la biomédica. Las propiedades fisicoquímicas de materiales nanoestructurados metálicos pueden ser aprovechadas para aplicaciones terapéuticas en el tratamiento de una enfermedad dada, como por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer (EA). Se estima que actualmente existen 44 millones de víctimas de EA en el mundo y que esta crecerá a más de 100 millones de casos en 2050 (Alzheimer's Association, 2012) y (Thies, 2013). Por el impacto de la cifra estadística mencionada anteriormente, resulta urgente implementar nuevas terapias que eviten o retarden la progresión, de la EA. Las propiedades fisicoquímicas de las nanovarillas de oro podrían ser aprovechadas como agentes terapéuticos, pues presentan la capacidad para absorber la radiación electromagnética en la región del infrarrojo cercano y dispersar energía en forma de calor. La radiación región del infrarrojo cercano es transparente para la mayoría de los tejidos del cuerpo, lo que significa que esta radiación puede penetrar el tejido hasta varios centímetros. Esta terapia podría ser utilizada para eliminar agregados proteicos amiloidales tóxicos; sin embargo, la efectividad de este posible tratamiento depende de la internalización de las nanovarillas a través de la barrera hematoencefálica y del reconocimiento selectivo a las estructuras polipeptídicas de carácter amiloide. Por tal motivo, en este capítulo se estudió la interacción de nanovarillas de oro conjugadas con péptidos angioprep-2 (péptido diseñado para atravesar la barrera hematoencefálica) y péptido D1 (como péptido de reconocimiento a estructuras amiloides) como potenciadores de la interacción de las nanovarillas con un modelo de membrana de células endoteliales de la barrera hematoencefálica.

IV.1. Características de la enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) se caracteriza por dos signos típicos en los cerebros afectados. Uno de ellos son las placas amiloides, que a su vez están conformadas por fibras de amiloide. El segundo marcador clásico de esta enfermedad es la proteína Tau, la cual es de alta expresión en axones corticales no mielinados, especialmente en las regiones del

cerebro que consolidan la memoria como la corteza límbica incluyendo el hipocampo (Trojanowski *et al.*, 1989).

En muchas de las proteínas afectadas se alteran los mecanismos moleculares que normalmente aseguran la permanencia de las proteínas en sus estados funcionales, correctamente plegados. Las mutaciones puntuales en algunas proteínas pueden reducir su estabilidad respecto de la forma nativa permitiendo un plegamiento transitorio entre estas formas menos estables. Este proceso parece ser el evento crítico que dispara el proceso de agregación de la proteína que lleva a la formación de fibras de amiloide. Algunas de estas mutaciones puntuales, conducen a sustituciones de aminoácidos dentro de o cerca del dominio del péptido A β , promoviendo la formación de conjuntos de péptidos neurotóxicos que pueden generar la Enfermedad de Alzheimer (EA) de comienzo temprano. Las mutaciones se han identificado en el gen APP y en la presenilina 1 y 2, siendo importante destacar que todas las mutaciones identificadas en los diferentes genes, comúnmente conducen a la deposición temprana de placas extracelulares aumentando con ello la probabilidad de la generación y / o agregación de los péptidos A β (Nilsberth *et al.*, 2001; Kennedy *et al.*, 2003; Tanzi y Bertram, 2005; Hori *et al.*, 2007; Di *et al.*, 2009). Sin embargo, los mecanismos que incrementan la agregación del péptido A β y causan las formas mucho más comunes de la EA, esporádicos, son en gran parte desconocidos.

Anteriormente, se pensaba que las formas fibrilares depositadas en las placas eran las responsables de la disfunción neuronal (Haass y Selkoe, 1993) sin embargo, desde 1998 se ha introducido la hipótesis la cascada amiloide, basada en que la exposición neuronal a oligómeros, formas tempranas o precursoras de estructuras prefibrilares y fibras maduras, explicadas en el capítulo III, de β Amiloides constituye el mecanismo de neurotoxicidad que desencadena la enfermedad de Alzheimer (Klein *et al.*, 2013). Esta hipótesis ha sido ampliamente sustentada en los últimos años por diversos estudios en donde se ha visto que especies de oligómeros, protofibras y agregados prefibrilares del péptido A β , formas solubles denominadas (ADDLs) (Catalano *et al.*, 2006) producen aberraciones en la composición de la sinapsis, morfología neuronal y densidad, siendo las principales especies tóxicas durante el desarrollo y la progresión de la enfermedad (Shankar *et al.*, 2008). Además pequeñas cantidades de daño neuronal ocasionadas por oligómeros individuales pueden acumularse con el tiempo y conducir a la disfunción generalizada a nivel de tejidos (Narayan *et al.*, 2014).

IV.1. 1. Origen molecular del péptido β - amiloide neurotóxico

El péptido A β se compone de 39 a 43 residuos de aminoácidos, es el principal componente de las placas amiloide y se deriva de la proteína precursora amiloide (APP) por las actividades secuenciales del β - y γ -secretasas (Selkoe, 2001; Mattson, 2004). La APP es una proteína transmembrana y es expresada en muchos tipos de tejidos concentrados en la sinapsis entre neuronas. Su función aún no ha sido elucidada, aunque algunos estudios han revelado que podría participar como regulador de crecimiento neuronal y estar relacionada con procesos de adhesión celular (Kang *et al.*, 1987).

Investigaciones genéticas, bioquímicas y de comportamiento, sugieren que la generación fisiológica del péptido A β neurotóxico surge tras la proteólisis errónea de APP (Kang *et al.*, 1987; Selkoe, 1993) produciendo el péptido A β el cual es propenso a la agregación, produciendo la formación de oligómeros, formas intermedias más grandes como protofibras, fibras amiloides y posteriormente la deposición de placas insolubles (Buscador y Glockshuber., 2007).

IV.1 .2. Terapias que actualmente se utilizan

A la fecha, los tratamientos dirigidos contra las fibras amiloide han tenido resultados positivos *in vitro*, pero no beneficios clínicos (Gandy *et al.*, 2013), habiéndose probado anticuerpos monoclonales dirigidos contra el A β (Rinne *et al.*, 2010), vacunas (Schenk *et al.*, 1999), moduladores/inhibidores de γ Secretasa (He *et al.*, 2010), Reserveratrol y otros fenoles (Mouchiroud *et al.*, 2010). Algunas drogas son el principal tratamiento de elección en la aparición temprana de la enfermedad de Alzheimer e incluyen Aricept o donepezilo clorhidrato, E2020 (Kakinuma, *et al.*, 2010.) por Pfizer Pharmaceuticals; Exelon o tartrato de rivastigmina, que sin embargo carecen de buenos resultados de eficacia (Winblad, *et al.*, 2007; Kumar, *et al.*, 2008) y tienen muchos efectos secundarios.

El desarrollo de fármacos para la EA ha resultado una tarea muy complicada, siendo aprobados, hasta la fecha, cinco medicamentos para el tratamiento de la EA: tacrina, donepezil, rivastigmina, galantamina (cuatro inhibidores de la colinesterasa) y un N-metil-D-aspartato (NMDA) antagonista del receptor de AD (memantina) (Hyde *et al.*, 2013)

(Howard et al., 2012). Sin embargo, no ha habido nuevos tratamientos aprobados para el tratamiento de la EA desde 2003; tacrina fue aprobada por la Food and Drug Administration (FDA) en 1993, en 1996 el donepezil, rivastigmina en 1998, la galantamina en 2001, y la memantina en 2003 (Cummings *et al.*, 2014).

Debido a que la patología de Alzheimer es desencadenada tras el proceso en cascada de agregación del péptido A β , formando oligómeros, protofilamentos y fibras amiloides, la mayoría de la investigación relacionada con terapias contra la EA se han enfocado en el evitar la progresión de la agregación del péptido de A β (Funke y Willbold, 2012). Por ejemplo, el péptido D1 (Gln, Ser, His, Try, Arg, His, Ile, Ser, Pro, Ala, Gln, Val) derivado de ACI-80, fue desarrollado para unirse específicamente a formas oligoméricas y fibras de A β (Wiesehan et al., 2003; Bartnik *et al.*, 2010; Van Groen *et al.*, 2009).

IV. 1. 3. Barrera Hematoencefálica

Una de las cosas que se debe tener en mente al momento de pensar en un tratamiento contra la enfermedad de Alzheimer es la dificultad que existe en lograr acumular ciertos fármacos en el cerebro debido a la presencia de la barrera hematoencefálica. Esta barrera está conformada por células endoteliales en una extensa superficie de intercambio entre el torrente sanguíneo y el cerebro (Abbott *et al.*, 2010).

Debido a la presencia de estas uniones estrechas (Tjs) la barrera actúa como una barrera física y es con frecuencia el factor limitante de la velocidad para la penetración de proteínas, agentes farmacológicos o péptidos en el sistema nervioso central (SNC) (Begley 2004; Abbott *et al.*, 2006). Por tanto, muchos fármacos potenciales, que podrían ser eficaces en su sitio de acción, han fallado durante el desarrollo debido a que no llegan a concentraciones terapéuticas dentro del SNC (Boer y Gaillard 2007).

El transporte de macromoléculas a través de la barrera hematoencefálica ocurre a través de la vía cenocítica, por mecanismos de transcitosis mediada por receptor. Mediante el control de acceso al cerebro, la barrera hematoencefálica (BHE) restringe la entrada de proteínas y fármacos potenciales a los tejidos cerebrales.

VI. 1. 4. Permeabilidad y efecto de fibras peptídicas β -amiloides sobre el endotelio cerebral

Se tiene cierto conocimiento de que la barrera hematoencefálica (BHE) controla la entrada de derivados $A\beta$ libres en el plasma al sistema nervioso central (SNC) por un complejo conocido como RAGE (los productos finales de glicación avanzada) (Yan *et al.*, 1996; Deane *et al.*, 2003) por lo que sugiere que el péptido $A\beta$ puede perturbar las uniones estrechas (TJ) de la barrera BHE a través de la interacción con el RAGE como un mediador específico.

El péptido beta amiloide interactúa con la vasculatura y el flujo sanguíneo cerebral proporcionando un medio por el cual amplifica el riesgo de accidente cerebrovascular hemorrágico y demencia. Las fibras peptídicas β -amiloides se acumulan en las paredes de las arterias cerebrales del SNC y del cerebro y conducen a la angiopatía amiloide cerebral (CAA) denominada también angiopatía congofílica (Ellis *et al.*, 1996). La angiopatía amiloide cerebral puede causar sangrado intracerebral, normalmente en las partes exteriores del cerebro, llamadas los lóbulos, y no en las áreas profundas.

Algunos autores han coincidido en que el péptido $A\beta$ induce la entrada de calcio en las células, ya sea directa o indirectamente (Kawahara *et al.*, 2000;.. Kagan *et al.*, 2002) provocando o conduciendo a un cambio en las TJs (Stuart *et al.*, 1996), así como induce la expresión de metaloproteasas de la matriz (MMPs) (Bond *et al.*, 1998).

IV.1.5. Búsqueda de tratamiento a través de la barrera hematoencefálica

Recientemente, nanopartículas (NPs) multifuncionales han sido desarrollados para facilitar la administración de agentes terapéuticos a través de la BHE. Esto se ha logrado mediante la modificación del material acarreador con la unión de ligandos para receptores que se encuentran en las neuronas y las células endoteliales capilares de la BHE, tales como el receptor de transferrina, receptor de lactoferrina, receptor de la insulina y del receptor de acetilcolina. Esta terapia se basa en generar daño local a las células cancerosas o desagregación de agregados de proteínas tóxicas involucran en la enfermedad neurodegenerativa, tales como la enfermedad de Alzheimer (AD).

Demeule y colaboradores (2008) han informado que una familia de péptidos, del dominio derivado de Kunitz de aprotinina, llamados Angiopeps, se pueden utilizar como un sistema coadyuvante en la administración de fármacos para el cerebro. Estos autores han caracterizado la capacidad de transcitosis de estos péptidos usando un modelo *in vitro* de la BHE, y en la perfusión cerebral *in situ*. Entre los sistemas de transcitosis mediada por receptores mejor caracterizados, se encuentran aquellos constituidos por los receptores de transferrina, de insulina y la proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP 1 y 2).

Xihui y colaboradores (2013) han reportado que la asociación entre péptido angiopep-2 (conformado por 19 amino ácidos (a.a) (Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Ser-Arg-Gly-Lys-Arg-Asn-Asn-Phe-Lys-Thr-Glu-Glu-Tyr) con nanopartículas y receptores de proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP) en las células endoteliales de los capilares del cerebro, aumenta significativamente la absorción intracerebral de las nanopartículas. Siendo sistemas como estos una promesa para el diagnóstico o tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central, tales como tumores cerebrales y la enfermedad de Alzheimer sin comprometer o dañar la BHE. (Xihui *et al.*, 2013).

IV.1. 5.1. Aplicaciones médicas de nanopartículas anisotrópicas

Las nanovarillas NV, exhiben dos distintos modos de resonancia de plasmón. El plasmón superficial transversal y el longitudinal (LPSR) de las nanopartículas anisotrópicas aparecen en el visible y cerca de la región NIR en el espectro de absorción, respectivamente (Panikkanvalappil R. *et al.*, 2011). La banda del LPSR longitudinal puede ser sintonizada en la región NIR y aprovechada como agente en terapia fototérmica, en este caso contra la enfermedad de Alzheimer. Esta terapia se basa en generar daño local a las células cancerosas o desagregación de agregados de proteínas tóxicas involucran en la enfermedad neurodegenerativa, tales como la enfermedad de Alzheimer (AD).

Algunos estudios han demostrado que mediante la conjugación de nanoestructuras de oro conjugadas con péptidos que puedan unirse selectivamente a agregados de A β (es decir, oligómeros, protofibrillas y fibrillas) y mediante el calor disipado por estas nanoestructuras es posible destruir estos agregados. Este enfoque podría ser utilizado como un tipo de cirugía molecular para eliminar los agregados tóxicos presentes en los cerebros

de pacientes y de ese modo detener o ralentizar la progresión de esta enfermedad (Kogan *et al.*, 2006 y Araya *et al.*, 2008)

La efectividad de este posible tratamiento depende de la internalización a través de la BHE y una posible selectividad a las estructuras polipeptídicas de carácter amiloide, teniendo como fin evitar la agregación y formación de estas. Por tal motivo, en este capítulo se estudió la relación entre las variaciones del plasmón de resonancia longitudinal, asociado al tamaño, de las nanovarillas de oro Au NV y el efecto de la conjugación de estas con péptidos angiopep-2 y D1 como potenciadores de la interacción de las nanovarillas con un modelo de membrana de células endoteliales de la BHE y su posterior internalización.

IV.2. Resultados

IV.2.1. Síntesis de Nanovarillas de oro

Las nanoestructuras de oro son altamente reactivas, permitiendo su conjugación con moléculas sintéticas o biomoléculas (anticuerpos, polímeros, fármacos, ADN, ARN, péptidos, etc.), además, su tamaño reducido les permite penetrar a través de barreras biológicas, alcanzando diferentes sitios de interés, además de la capacidad para absorber la radiación electromagnética y dispersar en forma de calor local. La región del infrarrojo cercano es transparente para la mayoría de los tejidos del cuerpo, lo que significa que esta radiación puede penetrar el tejido hasta varios centímetros. Las nanovarillas de oro (Au NV) pueden ser utilizadas en la terapia fototérmica o detección de especies tóxicas de agregados proteicos.

Las nanovarillas de oro (Au NV) exhiben dos plasmones de superficie en el espectro de absorción cuando la radiación electromagnética interactúa con la longitud y la anchura siendo posible ajustar el LSPR cambiando el tamaño, la forma, la composición y los alrededores de la nanopartícula. En el caso de las nanovarillas sintetizadas en este trabajo podemos observar un corrimiento de plasmón longitudinal hacia la derecha con respecto a la variación del ácido ascórbico durante la síntesis, como puede observarse en la figura 33. El primer pico de absorción en el caso de las Au NV con 0.75 mM de ácido ascórbico aparece con un máximo próximo a ~ 520 nm y el pico correspondiente al plasmón longitudinal aparece ~a 740 nm. Para el caso de las Au NV de 1 mM, encontramos el pico de plasmón transversal aparece a ~520 nm y el pico longitudinal aparece ~790 nm. Para el caso de las Au NV sintetizadas con 1.25 mM de ácido ascórbico aparece a ~525 con la aparición de un ensanchamiento de la banda con un "hombro" que aparece a ~550nm y el plasmón longitudinal aparece en 812 nm. Por último, las NV con 1.75 mM de ácido ascórbico el pico transversal aparece a ~520 con un "hombro" a 550 nm y el plasmón longitudinal aparece a 825nm. La relación de aspecto puede observarse en las micrografías de la figura 34.

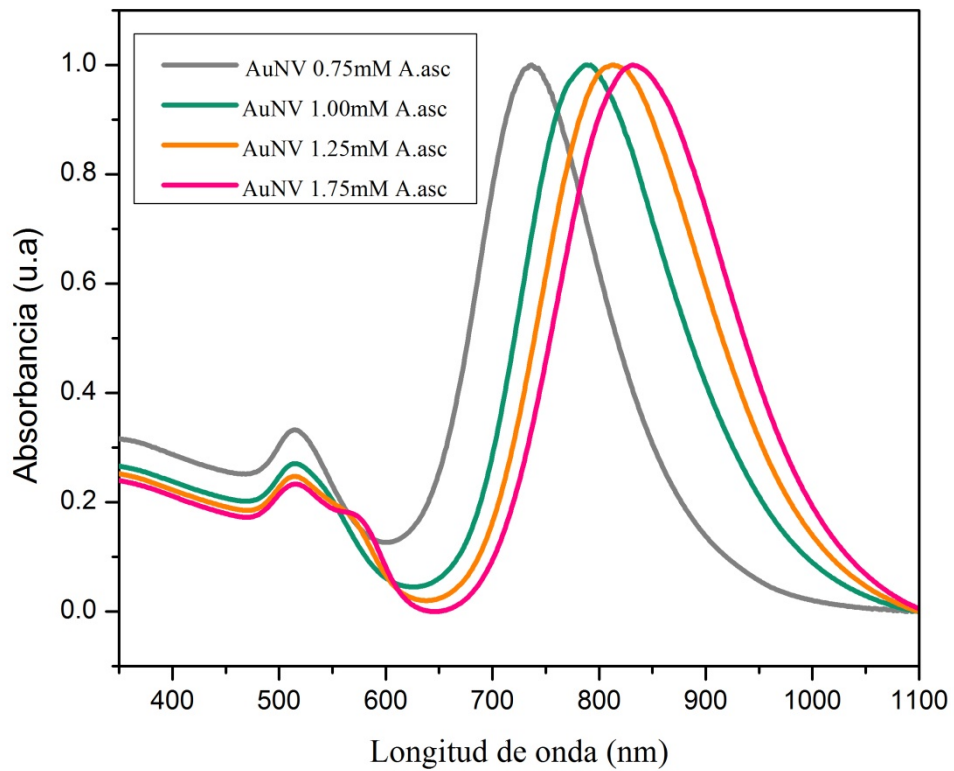


Figura 33. Espectros de UV-Vis-NIR de solución de nanovarillas de oro conforme se incrementa la cantidad de ácido ascórbico durante la síntesis. La segunda banda corresponde al plasmón longitudinal.

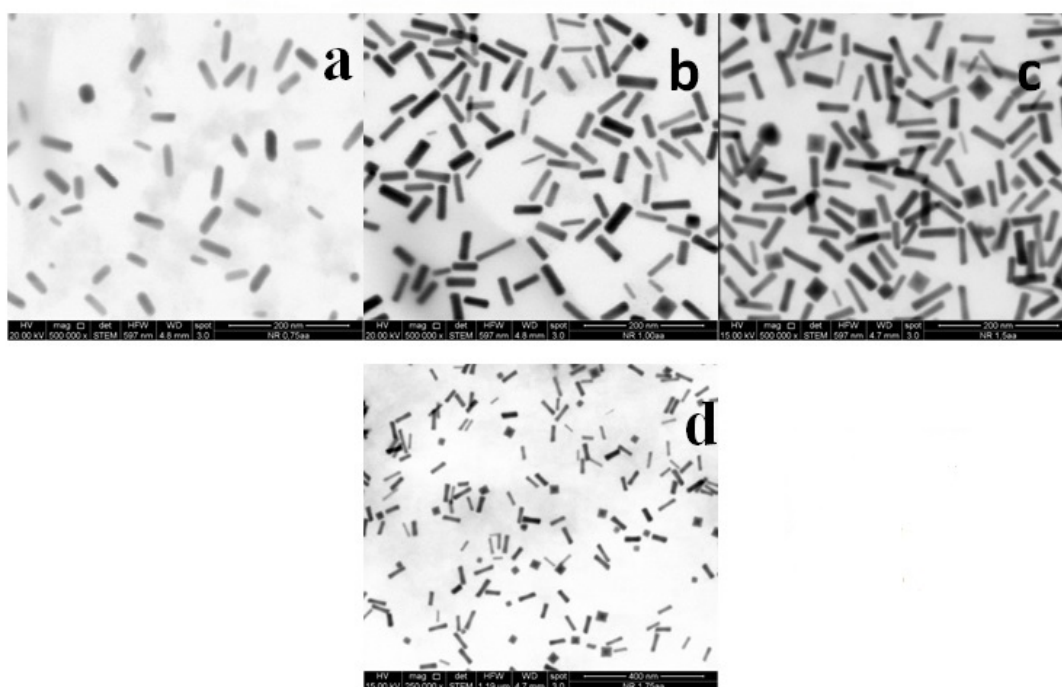


Figura 34. Micrografía de microscopio electrónico de transmisión de barrido en donde se muestra el efecto las variaciones de la concentración de ácido ascórbico en la relación de aspecto de la AuNv

IV. 2. 2. Isotermas de adsorción de NV de oro en MMCE de la BHE

Las membranas biológicas y las membranas celulares son estructuras fluidas y dinámicas conformadas por fosfolípidos anfipáticos, que les permiten generar espontáneamente una membrana en un entorno acuoso, creando una doble capa de alrededor de 4 y 5 nm de espesor. Los componentes básicos de una membrana celular son los fosfolípidos, que pueden ser saturados o insaturados. Las proporciones saturadas determinan el grado de fluidez de la membrana. Las nanoestructuras pueden interactuar o entrar a la célula por dos posibles caminos, endocitosis o adsorción por interacciones no específicas con la membrana. En este caso, se estudiaron las interacciones a nivel fisicoquímico usando un modelo de membrana de células endoteliales (MMCE).

La construcción y caracterización fisicoquímica del MMCE se realizó en la interfase aire-agua usando una Balanza de Langmuir-Blodgett; así como la modificación

de la MMC debido a la adsorción de nanovarillas de oro (Au NV), los materiales y métodos se encuentran explicados con mayor detenimiento en el capítulo II.

La isoterma de adsorción que corresponde al MMCE correspondiente a la síntesis de Au NV con un plasmón de resonancia longitudinal (PRL) de 740 nm encontramos que para áreas moleculares por encima de $\sim 120 \text{ \AA}^2$, las presiones superficiales se encuentran cercanas a cero, comparables con el estado gaseoso. Como podemos observar en la figura 35, la fase líquido expandido (LE), se encuentra en un área promedio por molécula en valores próximos entre 74 y 113 \AA^2 teniendo la coexistencia entre la fase gas y fase líquida expandida; Seguida de esta se encuentra una fase más condensada donde podrían estar coexistiendo una fase líquido expandido- líquido condensado, LE-LC; alrededor 66 y 75 \AA^2 , aproximadamente, aparece una fase de transición seguido de una fase LC que se traslapa con la fase LC del MMCE sin presencia de Au NV.

La siguiente isoterma que corresponde al MMCE en presencia de NV de oro con plasmón de resonancia longitudinal de 790 nm, presenta una fase de coexistencia gas-LE similar a la isoterma de la Au NV con PRL de 740 nm; sin embargo, la fase LE se extiende desde un valor próximo entre 78 y 115 \AA^2 y una coexistencia de LE-LC aparece entre 70 y 80 \AA^2 . La fase LC aparece a un área $\sim 63 - 70 \text{ \AA}^2$. Esta última se traslapa con la siguiente isoterma que presenta un PRL de 812 nm.

La isoterma con Au NV sintetizadas con una concentración de ácido ascórbico de 1.25 mM, PRL de 812 nm, presenta una presión cercana a 0 a un valor próximo a 125 \AA^2 , al comprimir las barreras, inmediatamente se observa un aumento en la presión correspondiente a la fase LE entre ~ 90 a 123 \AA^2 . La coexistencia de las fases LE-LC aparece entre 72 a 90 \AA^2 . Seguido de esto ocurre un cambio en la pendiente hacia una fase más condensada LC entre 63 a 70 \AA^2 .

Por último, la isoterma correspondiente a una concentración de plasmón de resonancia de 825 nm, presenta una similitud con la isoterma de adsorción anterior puesto que al comenzar los valores permanecen muy cercanos a 0 seguido de un súbito aumento de presión al comenzar la compresión. La fase característica de LE aparece entre 98 a 100 \AA^2 . La coexistencia de las fases LE-LC aparecen entre 80 y 100 \AA^2 . Seguidos de un aumento de presión a un área entre 72 y 80 \AA^2 .

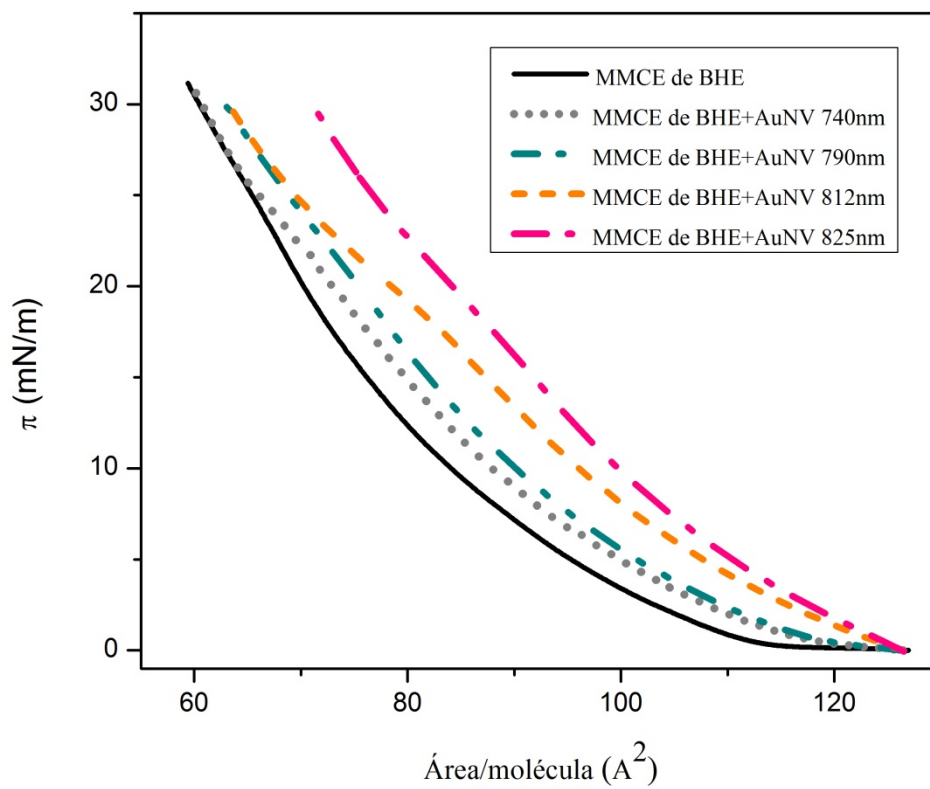


Figura 35. Isotherma de Langmuir de MMCE de BHE a 25°C en presencia de Au NV con un PRL de 740, 790, 812 y 825 nm, respectivamente.

III. 2.2.1. Módulos de compresibilidad

El módulo de compresibilidad para cada isoterma, ha sido utilizado para caracterizar las propiedades mecánicas de las monocapas en interfase agua/aire.

$$\kappa = \frac{1}{C} = -A \left(\frac{d\pi}{dA} \right)_T$$

El módulo de compresibilidad para cada presión (π) y área (A) de una isoterma permitió caracterizar las propiedades mecánicas de las monocapas. Pudiendo encontrarse cierta relación de la interacción de algunas moléculas capaces de producir mayor o menor flexibilidad dependiendo de algunos factores como morfología de la nanovarilla.

En la figura 36 se muestra el comportamiento de los módulos de compresión de las monocapas del MMCE como mezcla pura y en presencia de las Au NV con diferente PRL. Durante la fase LE, las Au NV con diferentes PRL muestran una elasticidad similar, y a medida que incrementa la presión de superficie, esta va cambiando hasta llegar a una fase de coexistencia LE-LC.

Un primer pico del módulo de compresibilidad de la monocapa del MMCE de la BHE a 25°C inicia aproximadamente a una π de 14.51 mN/m y una κ de 10.38 N/m², la cual corresponde a la región donde se encuentra la fase LE-LC a ~80 Å²; posteriormente aparece un segundo pico a una π de 21.65 mN/m y una κ de 22.88 mN/m², encontrándose un máximo del módulo en 35 mN/m correspondiente al colapso.

Para el módulo de compresibilidad del MMCE en presencia de NV de oro que presenta el PRL a 740 nm, presentan un pico alrededor de 15.83 mN/m y κ de 11.19 en un área próximo a 78 Å² en la isoterma. El siguiente pico aparece a 21.45 mN/m con una κ de 17.51 N/m²; transiciones de fase que no son muy claras en la isoterma de compresión.

El primer pico en el módulo correspondiente a un PRL de 790 nm aparece a una presión de superficie de 14.84 mN/m y una κ de 10.20 que corresponde a una fase de LE; el segundo pico aparece a 18.94 mN/m y una κ de 15.20 donde coexisten la fase LE-LC.

En cuanto al módulo κ que corresponde a un PRL de 812 nm, aparece a π de 12.58 con una k de 7.58 en una región cercana a 90 \AA^2 donde encontramos la fase LE; un máximo en π de 16.56 y una k de 10.29 N/m^2 en la región en donde coexisten las fases LC-LE, misma que puede observarse claramente en la isoterma de compresión y un último máximo correspondiente al colapso.

Por último, en el módulo para el PRL de 825 nm, un primer pico correspondiente a π de 15.51 mN/m y una κ de 10.38 N/m^2 . Un segundo pico aparece muy próximo a una π de 30 mN/m. La disminución de los valores de κ indica que los cambios de PRL de las AuNV, que podemos adjudicarles a un cambio en la longitud de las Au NV, modifican el empaquetamiento de la monocapa del MMCE haciéndola menos rígida.

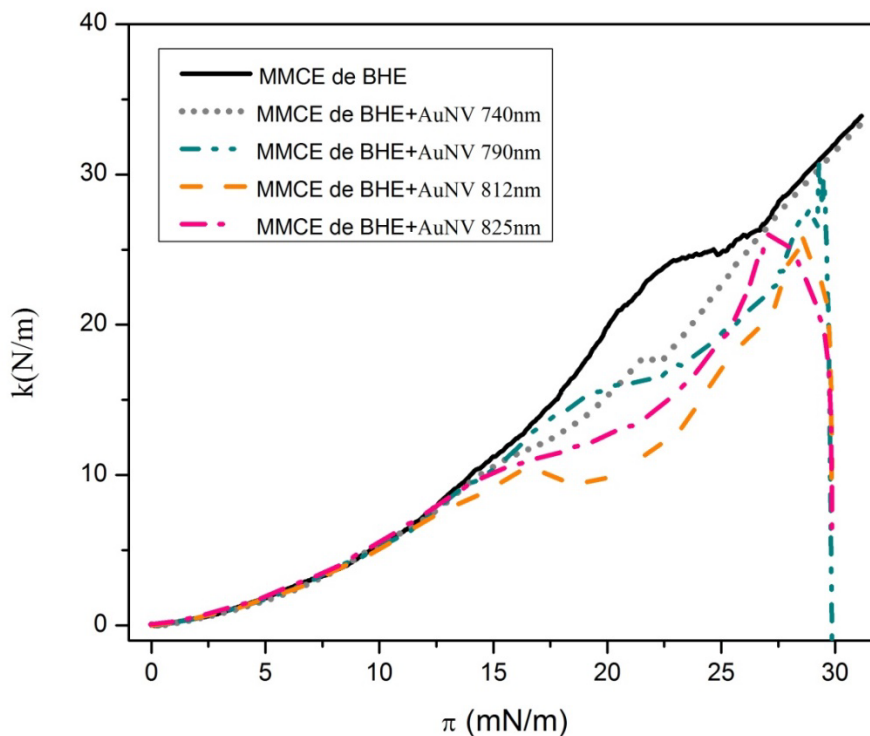


Figura 36. Módulo de compresión calculado mediante la derivada de la isoterma correspondiente.

IV. 2. 3. Imágenes de películas de Langmuir-Blodgett en AFM del MMCE (DPPC/DPPS/DPPE y SM) de la BHE

Las monocapas fueron extraída a una presión fija de 30 mN/m en el que el equilibrio de la fase de transición de LE-LC, después de haber sido depositada la muestra en la subfase de PBS.

En la figura 37, se muestra la imagen de una monocapa de MMCE de la BHE transferida a una mica a 25°C y a una presión de superficie de 30 mN/m. Como puede observarse en la monocapa de MMCE de la BHE se formó un empaquetamiento de los fosfolípidos en dominios con formas irregulares. La morfología más evidente es la formación de bandas o racimos de fosfolípido.

Estas conformaciones en la monocapa presentan dos poblaciones de alturas, la población, en promedio mayoritaria, presenta una altura de 2.5 nm; la siguiente población presenta alrededor de 4.8 nm de alturas.

En la figura 38 podemos observar el análisis de altura donde encontramos que el valor del eje Z de las bandas presentan en promedio una altura de entre 2.5 y 3.5 nm; mientras que las zonas donde encontramos dominios irregulares dispersos, presentan una altura de entre 1 y 1.5 de altura; la dimensión del ancho de esta banda es de alrededor de 230 nm.

Los fosfolípidos con ácidos grasos saturados permiten el empaquetamiento compacto de los lípidos dentro de las denominadas balsas lipídicas; los esfingolípidos también contienen cadenas laterales de ácidos grasos saturados, como el colesterol, y estos ácidos grasos saturados son capaces de empacarse de manera muy estrecha, por lo que la formación de estas balsas de lípidos son muy ordenados y menos fluidas que el resto de los lípidos que los rodea en la monocapa.

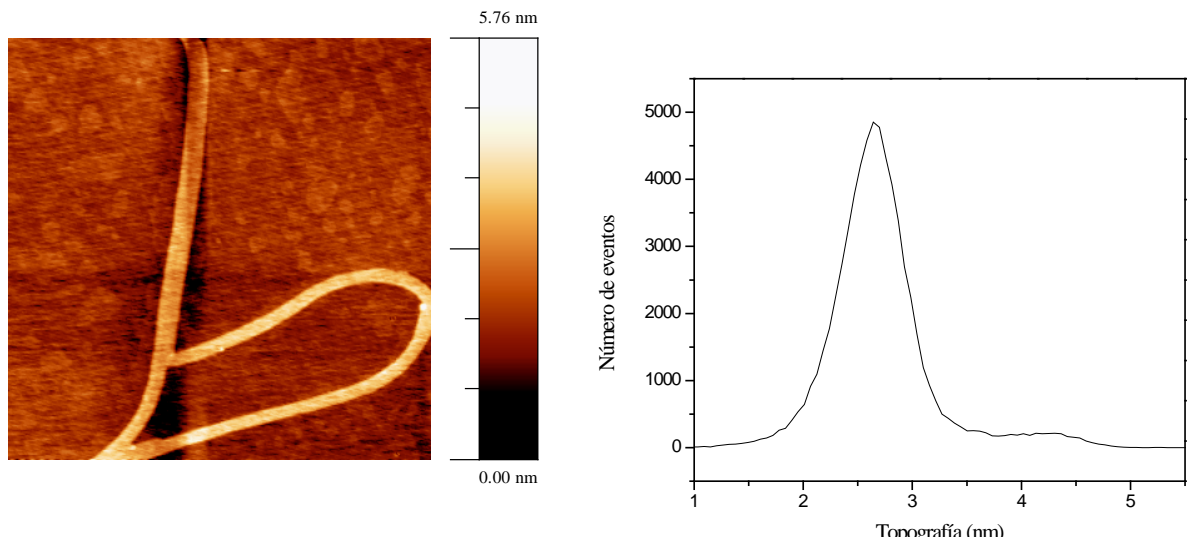


Figura 37. Imagen de AFM de película de Langmuir-Blodgett del MMCE de la BHE con PC, PS, PE y SM e histograma correspondiente.

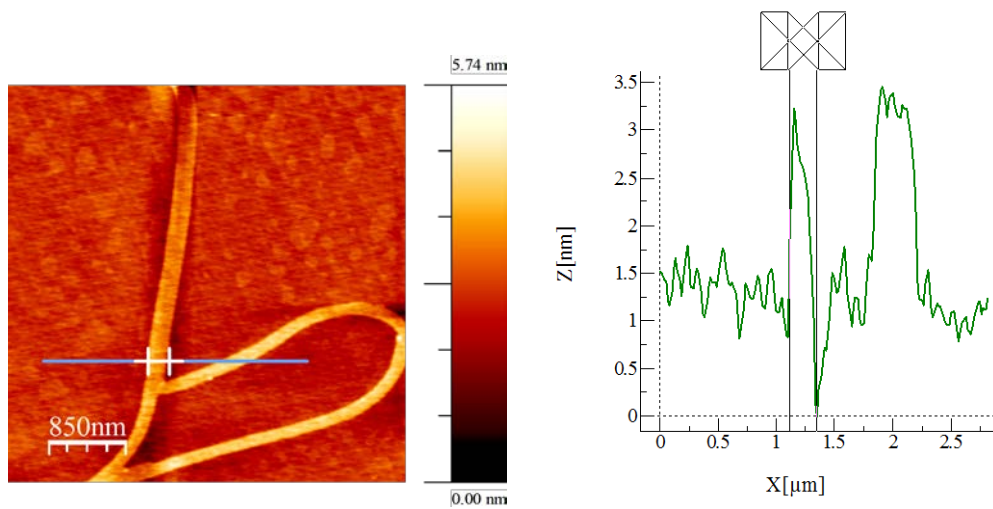


Figura 38. Imagen de AFM de las películas de Langmuir-Blodgett del MMCE de la BHE con PC, PS, PE y SM y análisis de alturas para el eje Z.

En la figura 39 se muestra la imagen de una monocapa de MMCE de la BHE en presencia de Au NV transferida a una mica a 30 mN/m. En esta, es posible observar similitudes a las monocapas del MMCE de la BHE sin Au NV; sin embargo, una

formación que destaca, es una estructura de ovillo o micelar que mediante el análisis del eje Z, en la figura 40, indica un aumento en la altura de hasta 12 nm y un ancho de la banda de alrededor de 306 nm.

En las figuras 37 y 38 podemos observar el análisis de altura donde encontramos que el valor del eje Z de las bandas presentan en promedio una altura de entre 2.5 y 3.5 nm; mientras que las zonas donde encontramos dominios irregulares dispersos, presentan una altura de entre 1 y 1.5 de altura.

En la imagen 41 vemos otro tipo de morfología de las bandas encontradas en las monocapas del MMCE en presencia de las Au NV; como en las imágenes anteriores también se presentaron estos agregados micelares o de ovillos con alturas de entre 10 nm cuando se encontraban dispersos en los dominios irregulares, y entre 25 nm en el caso de los que se encontraban dispersos en las bandas o racimos de fosfolípidos.

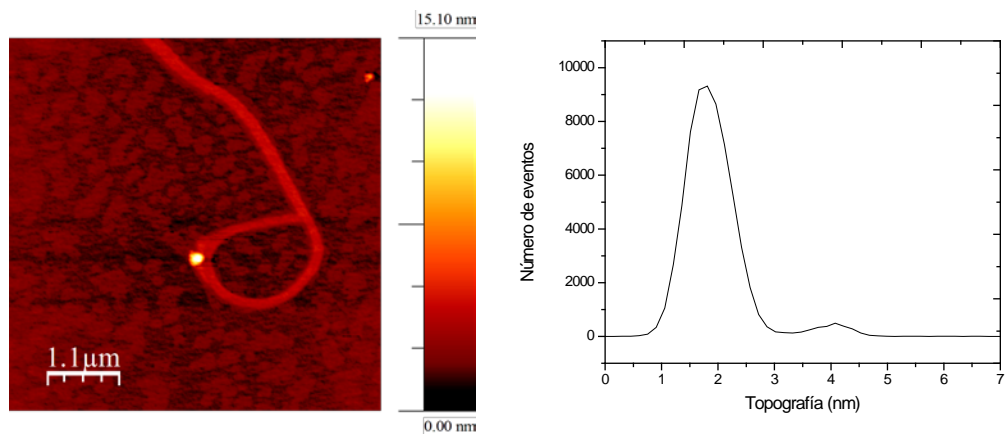


Figura 39. Imagen de AFM de película de Langmuir-Blodgett del MMCE de la BHE con PC, PS, PE y SM en presencia de AuNV e histograma correspondiente.

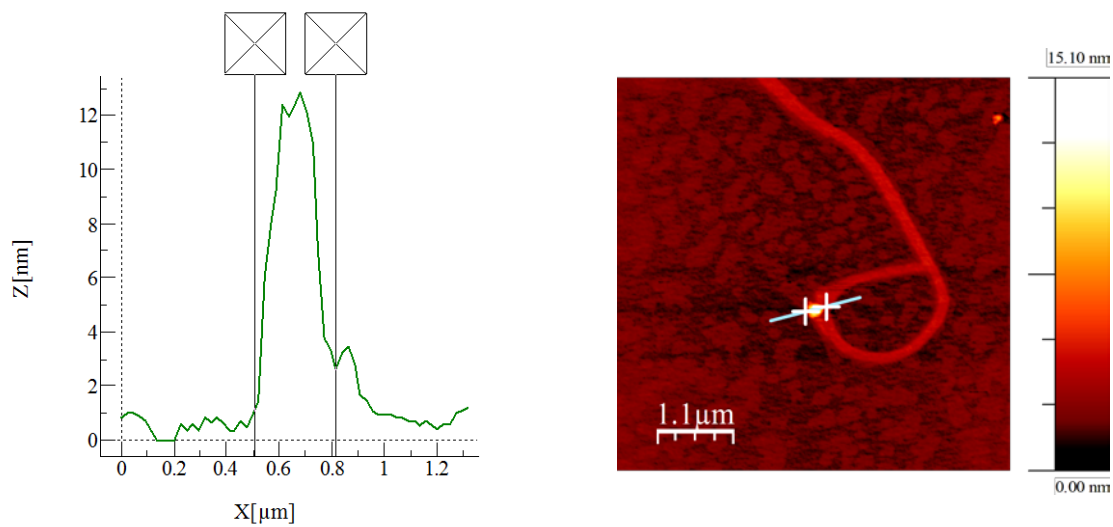


Figura 40. Imágenes de AFM de las películas de Langmuir-Blodgett del MMCE de la BHE con DPPC, DPPS, DPPE y SM y un análisis de altura del eje Z correspondiente,

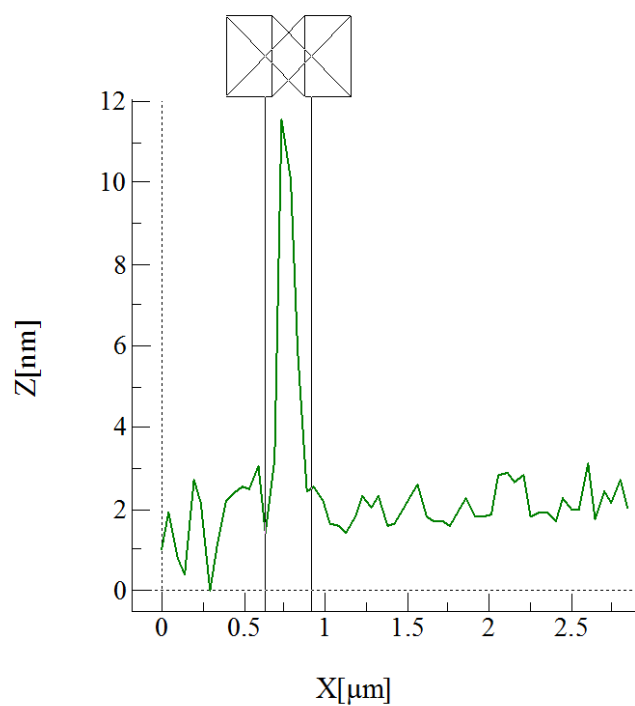
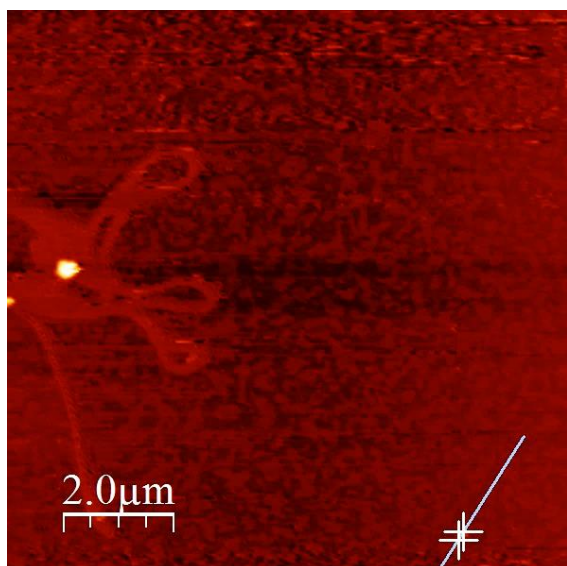
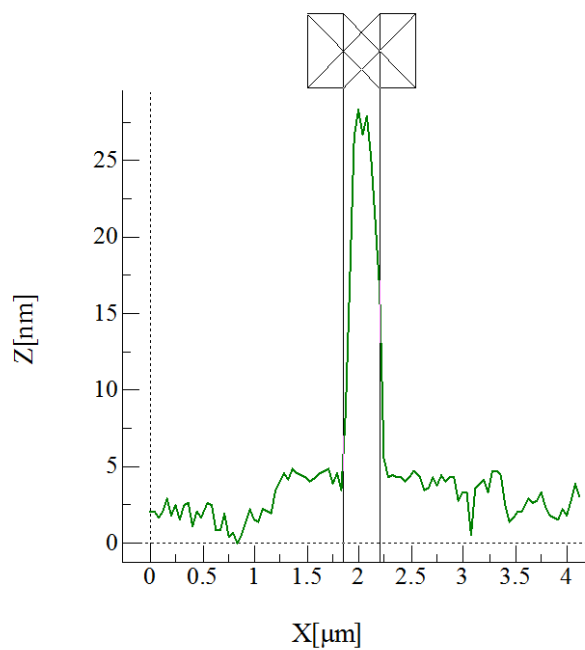
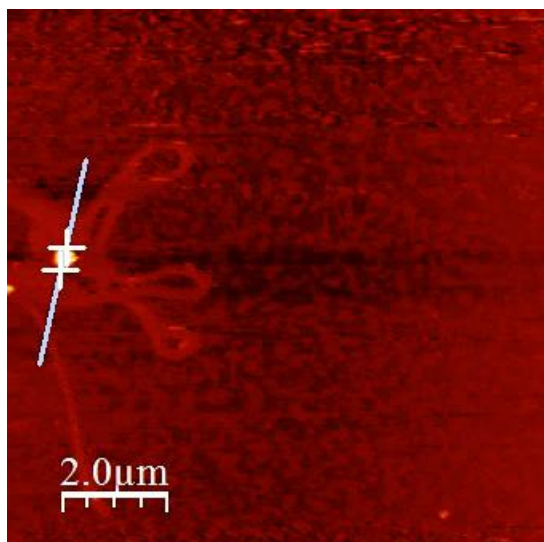


Figura 41. Imágenes de AFM de las películas de Langmuir-Blodgett del MMCE de la BHE con DPPC, DPPS, DPPE y SM en presencia de NV y análisis de altura del eje Z correspondiente

IV. 2. 2. Isotermas de adsorción de Au NV conjugadas con péptido Angiopep-2 y D1 en MMCE (DPPC/PS/ y SM) de la BHE

Tras los resultados obtenidos con dichas variaciones en la síntesis se optó por utilizar la síntesis con las Au NV que presentaba un plasmón de resonancia de 790 nm, dado a que en esta síntesis no observamos la aparición de "hombro" que está asociado a la aparición de otras estructuras, para conjugarlos con los péptidos anfipáticos D1, que reconoce agregados tóxicos de la proteína β -amiloide, y angiopep-2 que tiene la propiedad de atravesar la barrera hematoencefálica.

En la figura 42 se muestra una isoterma (π -A) del MMCE conformada por DPPC/DPPS/ y SM, la cual experimentalmente presentó mayor estabilidad, de la barrera hematoencefálica (BHE) sobre una subfase de PBS obtenida a una temperatura de 25°C, esta aparece en línea continua en color negro. La fase gaseosa-LE en donde las moléculas ocupan, en promedio, todo el área de trabajo disponible, considerado un gas en dos dimensiones, se encuentra en un área promedio por molécula en valores mayores a 100 Å², la fase líquido expandida (LE) se encuentra en valores promedio por molécula entre 80 y 100 Å². Seguido de estas, encontramos un ligero cambio en la pendiente en una región próxima entre 50 y 75 Å² correspondiente a la fase LE-LC (líquido expandido-Líquido condensado) seguida por un incremento de presión en la fase LC donde ocurrió el colapso ~ a una π de 45 mN/m.

En la isoterma de compresión del MMCE en presencia de Au NV sin conjugar, la fase LE comienza a en una región correspondiente a 97 Å² a una presión de superficie que comienza desde 2.21 mN/m; una fase de coexistencia entre LE y LC que en el MMCE sin Au NV aparece en la región próxima entre 50 y 75 Å² aparece ahora entre las regiones aproximadas entre 50 y 67 Å² y a una presión de superficie de 35 mN/m. Por último la fase LC aparece entre 37 y 50 Å² lo que podría sugerir una expulsión de material antes del colapso. Un comportamiento similar es presentado por la isoterma de compresión del MMCE en presencia de Au NV conjugadas con el péptido angiopep-2 y el péptido D1. Sin embargo, no presenta una transición similar al MMCE puro y al MMCE con Au NV sin conjugar. Además de que la fase LC aparece entre la región de 47 y 67 Å², colapsando a una presión de 33 mN/m y un área por molécula de 46 Å².

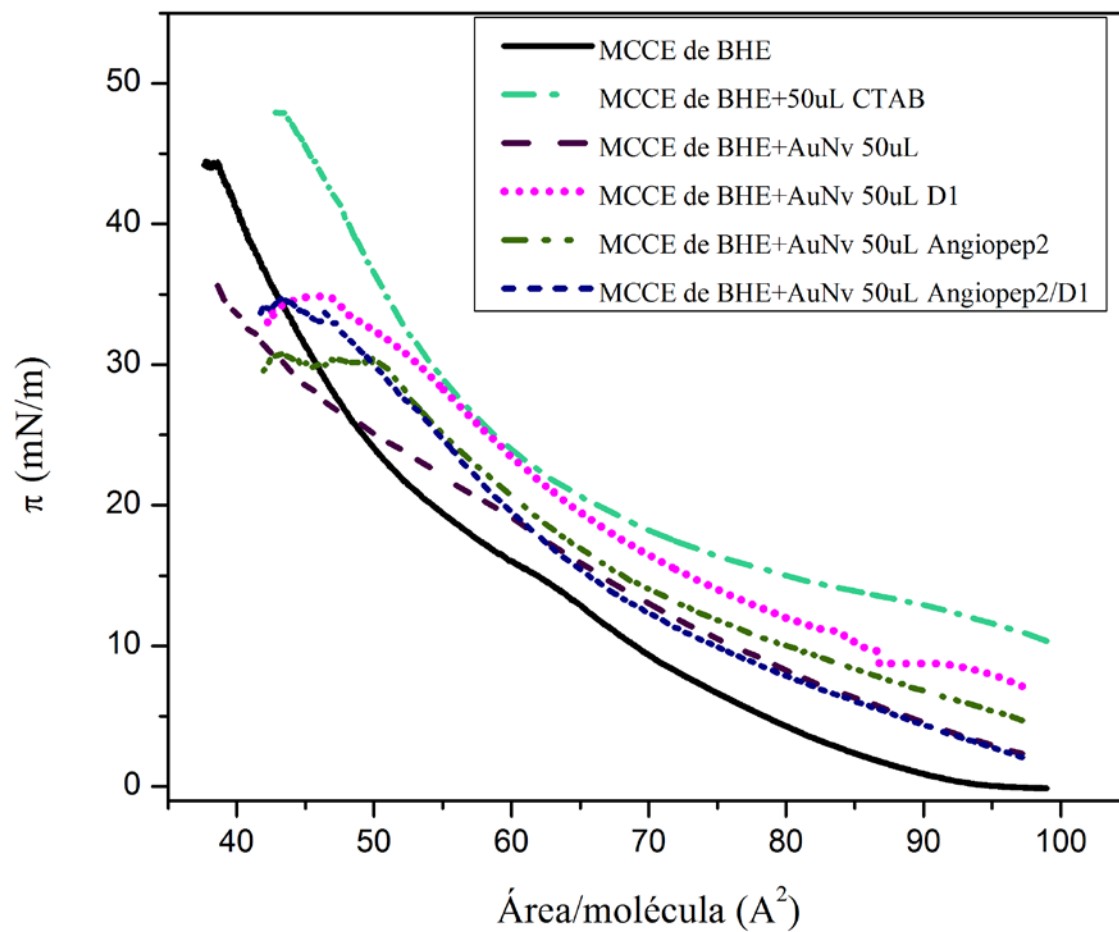


Figura 42. Isoterma de Langmuir de MMCE de BHE a 25°C en presencia de Au NV sin conjugar y Au NV conjugadas con Angiopep2 y D1

IV. 3. Discusiones

La nanotecnología ha tenido un gran impacto en abrir nuevas posibilidades para el desarrollo de la nanobiomedicina. Un número significativo de estudios han demostrado el impacto de la forma, el tamaño y la carga superficial (determinada por la funcionalización) de las nanopartículas sobre la viabilidad celular y la internalización en las células. Para lograr la penetración a nivel de la membrana plasmática es necesario disminuir los efectos adversos.

En el caso del uso de las Au NV, la citotoxicidad de las mismas depende en gran medida de la superficie de recubrimiento. El bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), un material importante durante la síntesis, ha demostrado ser citotóxico para muchas líneas celulares (Alkilany *et al.*, 2009) (Wang *et al.*, 2008), lo que hace necesario el recubrimiento adecuado para la biocompatibilidad antes de pensar en su posible aplicación.

Por otro lado, el camino a través de una barrera biológica depende de su interacción con las membranas, siendo parámetros importantes: la carga, la hidrofobicidad el grado de funcionalización, el tamaño de partícula, etc. Para asegurar su disponibilidad y viabilidad en el plasma y lograr penetrar a las células, es necesario que las especies presenten una carga positiva, de modo que exista una interacción primaria con la membrana, la cual está cargada negativamente, y por lo tanto se promueva la endocitosis o desplazamiento a través de la membrana. En la literatura podemos encontrar el uso de péptidos vectores dada su capacidad de penetrar las células; estos péptidos se caracterizan por tener una secuencia de aminoácidos con varios residuos de arginina y lisina, lo que les proporciona una carga neta positiva.

Algunos estudios sobre interacciones nanoestructuras-célula, basadas en la variación de carga superficial de los de las nanoestructuras cubiertas con diferentes moléculas, describen que la interacción con la membrana celular se ve favorecida por estructuras catiónicas en lugar de aniónicas e hidrofóbicos, sin embargo, las catiónicas también han demostrado que pueden tender a generar una irrupción en la membrana celular y por lo tanto conllevan a efectos citotóxicos agudos. Por ejemplo, Landgraf y

colaboradores en 2015, realizaron un estudio en el que comparaban el tamaño, la forma y la carga de diferentes nanoestructuras, encontrando que una superficie cargada positivamente condujo a la reducción más fuerte de la viabilidad celular, mientras que las nanopartículas neutras y cargadas negativamente fueron altamente biocompatibles a las células endoteliales. Estos resultados se atribuyen a una rápida internalización de las nanopartículas funcionalizadas con cargas mayormente positivas en combinación con el daño de las membranas intracelulares.

Durante las interacciones de péptidos con membrana, tanto el péptido y como la membrana pueden experimentar una serie de cambios estructurales. Por tal motivo, los estudios teóricos y experimentales de las interacciones entre péptido y membrana constituyen un tema muy difícil para la investigación y la comprensión completa de la relación entre la estructura del péptido y el mecanismo de interacción con lípidos, como hemos visto en el capítulo III, así como comprender los detalles moleculares de este proceso. Sin embargo, es de suma importancia para que puedan dar carácter de funcionalidad a nanoestructuras metálicas o en sí mismas para aplicaciones terapéuticas.

Por ejemplo, podemos mencionar a los péptidos antimicrobianos (AMP) que son capaces de reconocer y matar a muchos patógenos, y un número de estos péptidos han sido identificados como componentes clave del sistema de defensa inmune natural. La familia de péptidos anfipáticos están relacionados con la penetración celular y son denominados CPP; estos son capaces de difundir de manera eficiente a través de la membrana celular, ya sea por sí mismos o junto con una carga molecular, y en especial para este trabajo han sido importantes como posibles vectores para cruzar la BHE y tener afinidad por fibras amiloides.

El modelo de membrana celular para representar a la barrera hematoencefálica consistió en básicamente dos tipos de mezclas, la primera utilizada consistió en cuatro fosfolípidos (DPPC, DPPS, DPPE y SM), más detalle en el capítulo II, sin embargo, por la complejidad de la misma, únicamente se realizaron los experimentos de adsorción de Au NV en función del PRL, obteniendo resultados muy interesantes en cuanto a las diversas conformaciones de los microdominios provocadas por la interacción entre estos cuatro fosfolípidos y en papel que tienen estos dominios en la internalización de dichas nanoestructuras.

La segunda mezcla lipídica utilizada consistió en DPPC, DPPS y SM, para los experimentos con Au NV con plasmón de 790 nm conjugadas con péptido Angiopep2 y D1 en los cuales, la mezcla también mostró tener afinidad tanto con Au NV y Au NV conjugadas.

Las mezclas utilizadas presentan diferencias en las propiedades debido a las características de cada fosfolípido, la proporción de los mismos utilizados, la interacción entre ellos, etc. Por ejemplo, tanto el DPPC y la DPPE son conocidos por ser isoeléctricos sobre un amplio rango de pHs, así mismo, la SM muestra ser neutro a pH fisiológico. Mientras que el fosfolípido DPPS es un lípido negativo que naturalmente predomina en las membranas de muchas células de mamíferos, e igualmente en los experimentos realizados en este estudio.

Gracias al carácter aniónico del fosfolípido DPPS a pH fisiológico, es que desempeña un papel importante en los procesos que implican las interacciones entre la membrana y el medio extracelulares mediante la regulación de la concentración de protones, cationes, y cualquier metabolito cargado en la superficie de la membrana. Así, su carga contribuye a la creación de los potenciales transmembrana que participan en los procesos que regular la actividad de ciertas proteínas de la membrana. Para determinar la contribución a la carga de la membrana atribuida por la PS, uno debe conocer su pKa, es decir, el pH a la cual la mitad de las moléculas de PS está cargada; y en el caso de este estudio, el valor del pKa a pH fisiológico utilizado es de 2.21, por lo que el 100% de moléculas de PS están cargadas negativamente, y el resto de los fosfolípidos de la composición están en su forma neutra.

Analizando las isothermas típicas de los fosfolípidos individuales que componen la mezcla, es posible determinar el efecto de qué fosfolípido es el más predominante en la forma que adquiere la isoterma. En particular, para las monocapas de DPPC puro se tiene caracterizada la isoterma típica (π -A) a 25°C en la cual en áreas por molécula grandes, mayores a 100 Å², la presión superficial que en un inicio presenta un valor bajo, comienza a aumentar sin problemas con la compresión, lo que indica un empaquetamiento cada vez mayor de la fase de líquido-expandido (LE). Avanzando con la compresión, en el área por molécula de aproximadamente 66 Å², la isoterma de π -A presenta una meseta plana típica correspondiente a la coexistencia de una fase fluida LE y una fase altamente ordenada líquido condensado (LC), caracterizada por una baja fluidez (Kaganer et al., 1999). Cuando

la monocapa se comprime aún más, por debajo de un valor del área por molécula de aproximadamente 50 \AA^2 , la presión superficial aumenta con una pendiente más grande, lo que indica que solo la fase de LC está presente. La compresión conduce a un nuevo cambio en la pendiente de la isoterma correspondiente a la aparición del estado sólido seguido de un colapso de la monocapa, a una presión superficial de aproximadamente 70 mN/m .

Para explicar los cambios observados en el comportamiento de las monocapas que conforman el MMCE de la BHE, compuesto por DPPC/DPPE/DPPS y SM, en presencia de Au NV, se ha propuesto que las Au NV al interactuar con la superficie donde se han depositado los fosfolípidos, se forman complejos de Au NV y fosfolípidos y en consecuencia se incorporan en la monocapa, como suponemos se relaciona con el aumento del valor del eje Z en las películas observadas en las imágenes de microscopía de fuerza atómica, figuras 44-45.

La inserción de estas Au NV en las bandas o racimos que se han observado no puede ser asegurado, debido a que pudiera ser ocasionado por la formación de ovillos o micelas de fosfolípidos y no debida a la inserción de NV; sin embargo se propondría estudiar las monocapas con algunas otras técnicas de caracterización como: Modulación de Polarización- Espectroscopía de Infrarrojo de Reflexión-absorción (MP-IRRAS) el cual es un método espectroscópico para caracterizar la superficie de películas delgadas y monocapas flotantes. El método utiliza las diferencias en la reflectividad de interfaces para la luz polarizada perpendicular a la superficie y la luz polarizada plana a la superficie. Asimismo, podría utilizarse XPS (Espectroscopía Fotoelectrónica de rayos X), para obtener información sobre el estado químico y la concentración de los elementos de la capa de la superficie externa de un sólido.

Las imágenes de microscopía de fuerza atómica (AFM) de las películas de las monocapas del MMCE (DPPC, DPPE, DPPS y SM) obtenidas a 30 mN/m , puras y en presencia de Au NV con distintos PRL, mostraron la coexistencia de las fases LE-LC y un empaquetamiento de los fosfolípidos en dominios agrupados de manera regular y espaciados entre ellos. Otra morfología observada es la conformación de los dominios lipídicos en forma de bandas y racimos; este tipo de estructuras, similares a las balsas lipídicas o “rafts”, como microdominios, han sido muy reportadas para las membranas biológicas que contienen mezclas de esfingolípidos (SM) y colesterol, observado por primera vez por Thompson y colaboradores (Thompson y Tillack, 1985; Thompson *et al.*, 1986). Estas balsas lipídicas o “rafts” se forman cuando los lípidos sufren separaciones de

fases laterales que producen dominios laminares coexistentes que son estables. Se ha sugerido, también, que estas separaciones de fases pueden darse en presencia de PC y los SM; esto podría explicar la formación de las bandas y racimos observadas en las películas de Langmuir Blodgett de las imágenes de AFM, (figura 44); sin embargo, tales bandas solo aparecen con la mezcla compuesta por DPPC, DPPS, DPPE y SM, sugiriendo que la DPPE al interactuar con los otros tres fosfolípidos tiene la propiedad de formar dicho empaquetamiento de bandas.

Las Au NV conjugadas con péptido Agiopep-2 y péptido D1, demostraron ser capaces de potenciar la interacción entre las Au NV con el modelo de membrana biológica y su posterior internalización, adsorción o traslocación con la membrana, posiblemente adjudicado por el carácter anfipático de los péptidos o su carga positiva.

IV. 4. Conclusiones

Se evaluó la internalización Au NV distintas relaciones de tamaño longitudinal, y con una mezcla de MMCE de la BHE compuesto por DPPC/DPPS/ DPPE y SM. La selección del método de síntesis para las Au NV a conjugar, se basaron en la capacidad de internalización en el modelo de membrana por interacciones no específicas.

Tras estudiar las isotermas de Langmuir en presencia de Au NV con diferentes plasmones de resonancia longitudinal, 740, 790, 800 y 825 nm, se encontró que el área por molécula de fosfolípido en presencia de las Au NV aumenta conforme aumenta el PRL, debido a la incorporación en la monocapa.

El comportamiento de la monocapa en presencia de Au NV conjugadas con el péptido angiopep-2 y el péptido D1 mostró un corrimiento hacia áreas mayores, mostrando una evidente interacción entre las Au NV conjugadas y el MMCE indicando que existe una interacción primaria de las NV con la membrana, cosa que podría facilitar el proceso de internalización en las células endoteliales y el pasaje a través de la BHE.

IV. 5. Literatura Citada

- Ah C. S, Yun Y. J, Park H. J, Kim W-J, Ha D. H y Yun W. S. 2005. Size-Controlled Synthesis of Machinable Single Crystalline Gold Nanoplates. *Chemistry of Materials*; 17:5558–61.
- Alivisatos A. P. 1996. Perspectives on the Physical Chemistry of Semiconductor Nanocrystals. *The Journal of Physical Chemistry*; 100:13226–39.
- Anderson H. C, Garimella R y Tague S. E. 2005. The Role of Matrix Vesicles in Growth Plate Development and Biomineralization. *Frontiers in Bioscience*. 10: 822–37.
- Bartnik D., Funke S. A., Andrei-Selmer L. C., Bacher M., Dodel R. y Willbold D. 2010. Differently Selected D-enantiomeric Peptides Act on Different Abeta species. *Rejuvenation Research*; 13(2-3):202-5.
- Bramblett G. T, Goedert M., Jakes R., Merrick S. E., Trojanowski J. Q y Lee V. M. 1993. Abnormal Tau Phosphorylation at Ser396 in Alzheimer's Disease Recapitulates Development and Contributes to Reduced Microtubule Binding. *Neuron*, 10:1089-1099.
- Brus L. 2008. Noble Metal Nanocrystals: Plasmon Electron Transfer Photochemistry and Single-Molecule Raman Spectroscopy. *Accounts of Chemical Research*. 41:1742–9.
- Burda C., Chen X., Narayanan R. y El-Sayed M.A. 2005. Chemistry and Properties of Nanocrystals of Different Shapes. *Chemical Reviews*; 105:1025–102.
- Burgin J., Liu M. y Guyot-Sionnest P. 2008. Dielectric Sensing with Deposited Gold Bipyramids. *Journal of Physical Chemistry C*. 112:19279–82.
- Busbee B.D, Obare S.O. y Murphy C.J. 2003. An Improved Synthesis of High-Aspect-Ratio Gold Nanorods. *Advanced Materials*. 15:414–6.
- Caswell K. K., Bender C. M. y Murphy C .J. 2003. Seedless, Surfactantless Wet Chemical Synthesis of Silver Nanowires. *Nano Letter*; 3:667–9.
- Catalano S. M., Dodson E. C., Henze D. A., Joyce J. G., Krafft G. A. y Kinney G. G. 2006. The Role of Amyloid-beta Derived Diffusible Ligands (ADDLs) in Alzheimer's Disease. *Current Topics in Medicinal Chemistry*; 6(6):597-608.
- Chang S. S., Shih C.W., Chen C. D., Lai W. C. y Wang C. R. 1999. The Shape Transition of Gold Nanorods. *Langmuir*; 15:701–9.

- Chen H. M., Liu R. S., Asakura K., Jang L.Y. y Lee J. F. 2007. Controlling Length of Gold Nanowires With Large-Scale. X-ray Absorption Spectroscopy Approaches to the Growth Process. *The Journal of Physical Chemistry*.C.111:18550–7.
- Danho W., Swistok J., Khan W., Chu X. J., Cheung A., Fry D., Sun H., Kurylko G., Rumennik L., Cefalu J., Cefalu G. y Nunn P. 2009. Opportunities and Challenges of Developing Peptide Drugs in the Pharmaceutical Industry. *Adv Exp Med Biol.*; 611:467-9.
- Deane R., Du Yan S, Submamaryan R. K., LaRue B., Jovanovic S., Hogg E., Welch D., Manness L, Lin C., Yu J., Zhu H., Ghiso J., Frangione B., Stern A., Schmidt A.M., Armstrong D.L., Arnold B., Liliensiek B., Nawroth P., Hofman F., Kindy M., Stern D. y Zlokovic B. 2003. RAGE Mediates Amyloid-beta Peptide Transport Across the Blood-Brain Barrier and Accumulation in Brain. *Nature Medicine*; 9(7):907-13.
- Daniel M.C. y Astruc D. 2003. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications Toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. *Chemical Reviews*; 104:293–346.
- Demeule M., Currie, J. C., Bertrand Y., Che, C., Nguyen T., Regina A., Gabathuler R., Castaigne J. P. y Beliveau R. 2008. Involvement of the Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein in the Transcytosis of the Brain Delivery Vector Angiopep-2. *Journal of Neurochemistry*. 106(4):1534-1544.
- Demeule M., Regina A., Che C., Poirier J., Nguyen T., Gabathuler R., Castaigne J. P. y Beliveau R. 2008. Identification and Design of Peptides as a New Drug Delivery System for the Brain. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*; 324(3):1064-1072.
- De Felice F.G., Wu D., Lambert M.P., Fernandez S.J., Velasco P.T., Lacor P.N., Bigio E.H., Jerecic J., Acton P.J. y Shughrue P.J. 2008. Alzheimer's Disease-Type Neuronal Tau Hyperphosphorylation Induced by A β oligomers. *Neurobiology of Aging*; 29(9):1334-1347.
- De Felice F.G., Velasco P.T., Lambert M.P., Viola K., Fernandez S.J., Ferreira S.T. y Klein WL. 2007. A β Oligomers Induce Neuronal Oxidative Stress Through an N-methyl-D-aspartate Receptor-Dependent Mechanism that is Blocked by the Alzheimer Drug Memantine. *The Journal of Biological Chemistry*; 282(15):11590-11601.

- Fadok V. A., Bratton D. L., Frasch S. C., Warner M.L. y Henson P. M. 1998. The Role of Phosphatidylserine in Recognition of Apoptotic Cells by Phagocytes. *Cell Death & Differentiation*. 5 (7): 551–62.
- Gandy S. y DeKosky S. T. 2013. Toward the Treatment and Prevention of Alzheimer's Disease: Rational Strategies and Recent Progress. *Annual Review of Medicine*. 64:367-383.
- Hampel H., Blennow K., Shaw L. M., Hoessler Y. C., Zetterberg H. y Trojanowski J. Q. 2010. Total and Phosphorylated Tau Protein as Biological Markers of Alzheimer's Disease. *Experimental Gerontology* ;45(1):30-40.
- Haass C. y Selkoe D. J. 1993. Cellular Processing of Beta-amyloid Precursor Protein and the Genesis of Amyloid beta-peptide. *Cell* ; 75(6):1039-42.
- He G., Luo W., Li P., Remmers C., Netzer W. J., Hendrick J., Bettayeb K., Flajolet M., Gorelick F. y Wennogle L. P. 2010. Gamma-Secretase Activating Protein is a Therapeutic Target for Alzheimer's Disease. *Nature*, 467(7311):95-98.
- Hebert L. E., Weuve J., Scherr P. A. y Evans D. A. 2013. Alzheimer Disease in the United States (2010-2050) Estimated Using the 2010 Census. *Neurology*; 80(19): 1778–1783.
- Henzie J., Kwak E. S y Odom T. W. 2005. Mesoscale Metallic Pyramids with Nanoscale Tips. *Nano Letters*.; 5:1199–202.
- Huang X., Neretina S. y El-Sayed M. A. 2009. Gold nanorods: from Synthesis and Properties to Biological and Biomedical Applications. *Advanced Materials*; 21:4880–910.
- Hu J., Odom T. W. y Lieber C. M.1999. Chemistry and Physics in one Dimension: Synthesis and Properties of nanowires and Nanotubes. *Accounts of Chemical Research*; 32, 435-445.
- Jana N. R., Gearheart L. y Murphy C. J. 2001. Seeding Growth for Size Control of 5–40 nm Diameter Gold Nanoparticles. *Langmuir*; 17:6782–6.
- Jalbert J. J., Daiello L. A. y Lapane K. L. 2008. Dementia of the Alzheimer Type. *Epidemiologic Reviews*; 30:15-34.
- Jin R., Cao Y., Mirkin C. A., Kelly K. L., Schatz G. C. y Zheng J. G. 2001. Photoinduced Conversion of Silver Nanospheres to Nanoprisms. *Science*; 294:1901–3.
- Kan C., Zhu X. y Wang G. 2006. Single-Crystalline Gold Microplates: Synthesis, Characterization, and Thermal Stability. *The Journal of Physical Chemistry B*. 110:4651–6.

- Kaganer V. M, Mohwald H. y Dutta, P. 1999. Structure and Phase Transitions in Langmuir Monolayers. *Reviews of Modern Physics*; 71:779-819.
- Kim J., Mosior M., Chung L. A., Wu H. y McLaughlin S. 1991. Binding of Peptides with Basic Residues to Membranes Containing Acidic Phospholipids. *Biophysical Journal*; 60 (1): 135–48.
- Kim F., Sohn K., Wu J. y Huang J. 2008. Chemical Synthesis of Gold Nanowires in Acidic Solutions. *Journal of the American Chemical Society*; 130:14442–3.
- Klein W. L. 2013. Synaptotoxic Amyloid-beta Oligomers: a Molecular Basis for the Cause, Diagnosis, and Treatment of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*; 33 Suppl 1:S49-65.
- Krichevski O. y Markovich G. 2007. Growth of Colloidal Gold Nanostars and Nanowires Induced by Palladium Doping. *Langmuir*; 23:1496–9.
- Kreibig U., y Vollmer M. 1995. *Optical properties of metal clusters*. Berlin: Springer; 25: 101007
- Kumar P. S, Pastoriza-Santos I., Rodriguez-Gonzalez B., de Abajo F. J. G. y Liz-Marzan L. M. 2008. *Nanotechnology*; 19:015606.
- Lacor P. N, Buniel M. C, Chang L., Fernandez S. J, Gong Y., Viola K. L, Lambert M. P, Velasco P. T, Bigio E. H. y Finch C. E. 2004. Synaptic Targeting by Alzheimer's-Related Amyloid Beta Oligomers. *The Journal of Neuroscience*; 24(45):10191-10200.
- Lee J., Hasan W., Stender C.L. y Odom T. W. 2008. Pyramids: a Platform for Designing Multifunctional Plasmonic Particles. *Accounts of Chemical Research*; 41:1762–71.
- Link, S. y El-Sayed M. A. 2003. Optical Properties and Ultrafast Dynamics of Metallic Nanocrystals. *Annual Review of Physical Chemistry*. 54:331-366.
- Link, S. y El-Sayed, M. A. 1999. Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry B*. 103(21):4212-4217.
- Luna C., Strokaa K., Bermudez H. y Espinoza H. A. 2011. Thermodynamics of Monolayers Formed by Mixtures of Phosphatidylcholine/Phosphatidylserine Colloids and Surfaces. 85:293-300.
- Maccioni R. B., Farias G., Morales I. y Navarrete L. 2010. The Revitalized Tau Hypothesis on Alzheimer's Disease. *Archives of Medical Research*; 41(3):226-231.

- Millstone J. E., Park S., Shuford K. L., Qin L., Schatz G. C. y Mirkin C. A. 2005. Observation of a Quadrupole Plasmon Mode for a Colloidal Solution of Gold Nanoprisms. *Journal of the American Chemical Society*; 127:5312–3.
- Mouchiroud L, Molin L, Dalliere N, Solari F. 2010. Life span extension by resveratrol, rapamycin, and metformin: The promise of dietary restriction mimetics for an healthy aging. *Biofactors*, 36(5):377-382.
- Narayan P., Holmström K. M., Kim D. H., Whitcomb D. J., Wilson, M. R., St. George-Hyslop P., Wood N. W., Dobson C. M., Cho K., Abramov A. Y y Klenerman D. 2014. Rare Individual Amyloid- β Oligomers Act on Astrocytes to Initiate Neuronal Damage'. *Biochemistry*; 53: 2442-2453.
- Nehl C. L., Liao H. y Hafner J. H. 2006. Optical Properties of Star-shaped Gold Nanoparticles. *Nano Letters* ;6:683–8.
- Nelayah J., Kociak M., Stephan O., Garcia de Abajo F. J, Tence M., Henrard L. 2007. Mapping Surface Plasmons on a Single Metallic Nanoparticle. *Nature Physics*; 3:348–53.
- Noguez C. 2007. Surface Plasmons on Metal Nanoparticles: the Influence of Shape and Physical Environment. *Journal of Physical Chemistry C.*; 111:3806–19.
- Nowotarska S. W., Nowotarski K. J., Friedman M. y Situ C. 2014. Effect of Structure on the Interactions between Five Natural Antimicrobial Compounds and Phospholipids of Bacterial Cell Membrane on Model Monolayers. *Molecules*. 19, 7497-7515.
- Pileni M. P. 2007. Control of the Size and Shape of Inorganic Nanocrystals at Various Scales from Nano to Macrod domains. *The Journal of Physical Chemistry C.*; 111:9019–38.
- Pepys, M. B., Hawkins, P. N., Booth, D. R., Vigushin, D. M., Tennent, G. A. Soutar, A. K., Totty, N., Nguyen, O., Blake, C. C., Terry, C. J., Feest, G., Zalin, A. M., y Hsuan J. J. 1993. Human Lysozyme Gene Mutations Cause Hereditary Systemic Amyloidosis. *Nature* 362: 553–557.
- Perez-Juste J, Pastoriza-Santos I, Liz-Marzan L. M, Mulvaney P. 2005. Gold Nanorods: Synthesis, Characterization and Applications. *Coord Chem Rev.*;249:1870–901.
- Richter RP, Brisson A. 2003. Characterization of Lipid Bilayers and Protein Assemblies Supported on Rough Surfaces by Atomic Force Microscopy. *Langmuir* 19 (5): 1632–40.

- Rinne J. O., Brooks D. J., Rossor M. N., Fox N. C., Bullock R., Klunk W. E., Mathis C.A., Blennow K., Barakos J. y Okello A. A. 2010. 11C-PiB PET assessment of change in fibrillar amyloid-beta load in patients with Alzheimer's disease treated with bapineuzumab: a phase 2, double-blind, placebo-controlled, ascending-dose study. *Lancet Neurol*, 9(4):363-372.
- Roiter, Y., Ornatska, M., Rammohan, A. R., Balakrishnan, J., Heine, D. R., y Minko, S. 2008. Interaction of Nanoparticles with Lipid Membrane, *Nano Letters*, vol. 8, iss. 3, pp. 941–944.
- Sajanlal PR, Subramaniam C, Sasanpour P, Rashidian B, Pradeep T. 2010. Electric Field Enhancement and Concomitant Raman Spectral Effects at the Edges of a Nanometre-thin Gold Mesotriangle. *J Mater Chem.*;20:2108–13.
- Sajanlal P. R., Pradeep T. 2008. Growth of Anisotropic Gold Nanostructures on Conducting Glass Surfaces. *The Journal of Chemical Sciences*;120:79–85.
- Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K. 1999. Immunization with Amyloid-beta Attenuates Alzheimer-Disease-like Pathology in the PDAPP Mouse. *Nature*, 400(6740):173-177.
- Shankar G. M., Li S., Mehta T. H., Garcia-Munoz A., Shepardson N. E., Smith I., Brett F. M., Farrell M. A., Rowan M. J, Lemere C. A., Regan C. M., Walsh D. M., Sabatini B. L. y Selkoe D. J. 2008. Amyloid-beta Protein Dimers Isolated Directly from Alzheimer's Brains Impair Synaptic Plasticity and Memory. *Nature Medicine*; 14(8):837-42.
- Susanne Aileen Funke y Dieter Willbold. 2012. Peptides for Therapy and Diagnosis of Alzheimer's Disease. *Current Pharmaceutical Design*; 18(6): 755–767.
- Tao AR, Habas S, Yang P. 2008. Shape Control of Colloidal Metal Nanocrystals. *Small.*;4:310–25.
- Tokumasu F, Jin A. J. y Dvorak J. A. 2002. Lipid Membrane Phase Behavior Elucidated in Real Time by Controlled Environment Atomic Force Microscopy. *J. Electron Microsc.* 51 (1): 1–9.
- Thompson T. E, Barenholz Y, Brown R. E, Correa-Freire M, Young W. W, Tillack T. W. Molecular Organization of Glycosphingolipids in Phosphatidylcholine Bilayers and Biological Membranes. In: Freysz L, Dreyfus H, Massarelli R, Gatt S, editors. *Enzymes of Lipid Metabolism II*. Plenum Pub. Corp.; New York: 1986. pp. 387–396.

- Thompson, T.E., Tillack, T.W., 1985. Organization of Glycophingolipids in Bilayers and Plasma Membranes of Mammalian Cells. *Ann. Rev. Biophys. Chem.* 14, 361–386.
- Trojanowski JQ, Schuck T, Schmidt ML, Lee VM. 1989. Distribution of Tau Proteins in the Normal Human Central and Peripheral Nervous System. *J Histochem Cytochem*, 37(2):209-215.
- Valeur, B. *Molecular Fluorescence Principles and Application*. Weinheim: Wiley-VCH, 2002.
- Van Holde, K. E.; Johnson, W. C.; Ho, P. S. *Principles of Physical Biochemistry*. Upper Saddle River: Pearson Prentice-Hall, 2006.
- Wang H, Brandl D. W, Nordlander P y Halas N. J. 2007. Plasmonic Nanostructures: Artificial Molecules. *Accounts of Chemical Research*.40:53–62.
- Wang L, Chen X, Zhan J, Chai Y, Yang C, Xu L. 2005. Synthesis of Gold Nano- and Microplates in Hexagonal Liquid Crystals. *The Journal of Physical Chemistry B*.; 109:3189–94.
- Wiesehan K., Buder K., Linke R. P., Patt S., Stoldt M., Unger E., Schmitt B., Bucci E. y Willbold D. 2003. Selection of D-amino-acid Peptides that Bind to Alzheimer's Disease Amyloid Peptide Abeta1-42 by Mirror Image Phage Display. *Chembiochem*; 4(8):748-53.
- Xue D, Zhao M, Wang YJ, Wang L, Yang Y, Wang SW, Zhang R, Zhao Y, Liu RT. 2012. A Multifunctional Peptide Rescues Memory Deficits in Alzheimer's Disease Transgenic Mice by Inhibiting Abeta42-induced Cytotoxicity and Increasing Microglial Phagocytosis. *Neurobiol Dis*, 46(3):701-709.
- Yang Z, Lin ZH, Tang CY, Chang HT. 2007. Preparation and Characterization of Flower-like Gold Nanomaterials and Iron Oxide/gold Composite Nanomaterials. *Nanotechnology*.;18:255–606.
- Zhao W. Q., De Felice F. G., Fernandez S., Chen H., Lambert M. P., Quon M. J., Krafft G. A. y Klein W. L. 2008. Amyloid Beta Oligomers Induce Impairment of Neuronal Insulin Receptors. *FASEB J*, 22(1):246-260.



Oligomers, protofibrils and amyloid fibrils from recombinant human lysozyme (rHL): Fibrillation process and cytotoxicity evaluation for ARPE-19 cell line



Eva D. Ruiz^a, Mario Almada^a, María G. Burboa^b, Pablo Taboada^c, Víctor Mosquera^c, Miguel A. Valdez^a, Josué Juárez^{a,*}

^a Departamento de Física, Universidad de Sonora, Rosales y Transversal, 83000 Hermosillo, Sonora, Mexico

^b Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad de Sonora, Rosales y Transversal, 83000 Hermosillo, Sonora, Mexico

^c Departamento de Física de la Materia Condensada, Facultad de Física, Universidad de Santiago de Compostela, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 December 2013

Received in revised form 18 October 2014

Accepted 4 December 2014

Available online 12 December 2014

Keywords:

Recombinant human lysozyme

Oligomers

Protofibrils

Amyloid fibrils

ARPE-19

ABSTRACT

Amyloid-associated diseases, such as Alzheimer's, Huntington's, Parkinson's, and type II diabetes, are related to protein misfolding and aggregation. Herein, the time evolution of scattered light intensity, hydrophobic properties, and conformational changes during fibrillation processes of rHL solutions at 55 °C and pH 2.0 were used to monitor the aggregation process of recombinant human lysozyme (rHL). Dynamic light scattering (DLS), thioflavin T (ThT) fluorescence, and surface tension (ST) at the air–water interface were used to analyze the hydrophobic properties of pre-amyloid aggregates involved in the fibrillation process of rHL to find a correlation between the hydrophobic character of oligomers, protofibrils and amyloid aggregates with the gain in cross- β -sheet structure, depending on the increase in the incubation periods. The ability of the different aggregates of rHL isolated during the fibrillation process to be adsorbed at the air–water interface can provide important information about the hydrophobic properties of the protein, which can be related to changes in the secondary structure of rHL, resulting in cytotoxic or non-cytotoxic species. Thus, we evaluated the cytotoxic effect of oligomers, protofibrils and amyloid fibrils on the cell line ARPE-19 using the MTT reduction test. The more cytotoxic protein species arose after a 600-min incubation time, suggesting that the hydrophobic character of pre-amyloid fibrils, in addition to the high prevalence of the cross- β -sheet conformation, can become toxic for the cell line ARPE-19.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Amyloid fibrils have received extensive attention in medicine, biology and biophysics because of their implications in several human diseases [1–6]. Currently, it is known that more than 30 human diseases, including Alzheimer's, Parkinson's, Huntington's, and type II diabetes, are related to protein misfolding [5,7,8]. The progressive accumulation of proteinaceous amyloid aggregates in the extracellular space of affected tissues and organs can result in concomitant cell death, leading to abnormal function and failure of the organs involved [6,9–11]. For instance, neuronal cell death is associated with neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's, Parkinson's and Huntington's disease; hepatocyte death has been observed in systemic lysozyme amyloidosis; and the failure of pancreatic β -cells has been observed in type II diabetes [12]. Initially,

amyloid fibrils were considered responsible for tissue damage and organ dysfunction because amyloid plaques are usually observed in histological samples originating from affected tissues and organs [8]. However, it is well known that both mature fibrils and pre-fibrillar aggregates are cytotoxic, affecting cellular functionality throughout the progression of amyloid illness [13]. Recently, experimental evidence has suggested that prefibrillar aggregates such as oligomers and protofibrils may cause cell damage and lead to cellular death, whereas non-native hydrophobic motifs exposed on the protein surface can interact with essential components of cellular membranes, altering the integrity of cells [7,14–17]. In this manner, oligomeric and amyloid aggregates have the ability to bind to and disrupt cellular membranes and model membranes of the phospholipid bilayer. This action mode has been considered the primary toxic mechanism of amyloid pathogenesis [6,7,17]. For instance, many reports support the hypothesis that the hydrophobic properties of the various prefibrillar aggregates play an important role in the rupture of cell membrane models, such as liposomes, Langmuir monolayers, and cellular assays [18–20]. These studies indicate that

* Corresponding author.

E-mail address: josue.juarez@correo.fisica.uson.mx (J. Juárez).