



UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA

**EVALUACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO DE EXTRACTOS
METANÓLICOS DE LÍQUENES SOBRE EL PROCESO DE
AGREGACIÓN DE LA PROTEÍNA TAU**

Unidad de investigación

Autores:

Esteban Nicolás Díaz Castañeda, Juan Ignacio Díaz Toro

Profesor guía: Dr. Alberto Cornejo Mora

Santiago de Chile, 2017

ÍNDICE

RESUMEN	5
CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN.....	6
CAPÍTULO 2 MARCO TEÓRICO	9
2.1 Proteína tau	9
2.2 Agregación	11
2.3 <i>Escherichia coli</i> BL21 DE23.....	12
2.4 Líquenes antárticos y polifenoles	13
2.5 Ensayos de agregación y monitorización mediante fluorescencia	15
CAPÍTULO 3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	17
3.1 Hipótesis	17
3.2 Objetivos	17
3.2.1 <i>Objetivo general</i>	17
3.2.2 <i>Objetivos específicos</i>	17
CAPÍTULO 4 METODOLOGÍA	18
4.1 Materiales	18
4.1.1 <i>Biológico</i>	18
4.1.2. <i>Reactivos y soluciones</i>	18
4.1.2.1 <i>Transformación y Cultivo bacteriano</i>	18
4.1.2.2 <i>Purificación mediante HPLC de 4RMBD recombinante</i>	18
4.1.2.3 <i>Diálisis de 4RMBD recombinante</i>	19
4.1.2.4 <i>Concentración de 4RMBD recombinante</i>	19
4.1.2.5 <i>SDS-PAGE</i>	19
4.1.2.6 <i>Ensayo de agregación e inhibición de 4RMBD</i>	20
4.2 Equipos	20

4.3 Método	21
4.3.1 <i>Tipo de estudio y lugar de realización</i>	21
4.3.2 <i>Transformación y obtención de proteína</i>	22
4.3.3 <i>Cultivo piloto e inducción bacteriana</i>	22
4.3.4 <i>Electroforesis (SDS – PAGE)</i>	23
4.3.4.1 <i>Preparación de los geles</i>	23
4.3.4.2 <i>Desnaturalización y corrida electroforética</i>	24
4.3.4.3 <i>Fijación del gel</i>	25
4.3.4.4 <i>Tinción y lavado del gel</i>	25
4.3.5 <i>Cultivo grande</i>	26
4.3.6 <i>Separación de proteína</i>	26
4.3.7 <i>Purificación de 4RMBD</i>	27
4.3.8 <i>Recolección de 4RMBD</i>	27
4.3.9 <i>Diálisis y concentración de la proteína</i>	28
4.3.10 <i>Medición de la concentración de 4RMBD</i>	28
4.3.11 <i>Ensayo de agregación</i>	29
4.3.12 <i>Marcaje con Tioflavina T</i>	29
4.3.13 <i>Eliminación del material</i>	30
4.3.14 <i>Estadísticas</i>	30
CAPÍTULO 5 RESULTADOS	31
5.1 <i>Cultivo piloto</i>	31
5.2 <i>Purificación de proteína 4RMBD mediante IMAC</i>	34
5.3 <i>Ensayos de agregación con tioflavina T</i>	36

CAPÍTULO 6 DISCUSIÓN	39
5.1 <i>Purificación y concentración de 4RMBD</i>	40
5.2 <i>Ensayos de agregación in vitro y líquenes</i>	
CAPÍTULO 7 CONCLUSIÓN	46
BIBLIOGRAFÍA	47

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) corresponde a una enfermedad neurodegenerativa y progresiva, responsable de demencia en la población adulta mayor. En etapas tempranas se presenta con alteraciones de la memoria, afasia, apraxias y finalmente en deterioro de masa muscular, llevando al individuo a la incapacidad y dependencia completa. La EA en el 90% de los casos se desarrolla sobre los 60, alcanzando del 10% al 20% entre los 70 - 80 años, siendo más frecuente en mujeres. Si bien no existe un consenso respecto a la etiología de esta enfermedad, se pueden reconocer dos marcadores patológicos fundamentales para el desarrollo de esta, primero, la formación de placas seniles alrededor de neuronas, y en segundo lugar, los agregados de proteína tau, siendo estas últimas de interés para la búsqueda de moléculas con capacidad antiagregante en la presente unidad de investigación.

La terapia farmacológica de la EA actualmente es de carácter paliativo y solo es efectiva en el 50% de los pacientes. En consecuencia, diferentes investigaciones se han enfocado en la generación de farmacóforos que traten el avance neurodegenerativo de la enfermedad. Bajo esta premisa, el objetivo de la unidad de investigación fue estudiar el efecto inhibitorio de una batería de 12 moléculas de extractos de líquenes antárticos sobre el proceso de agregación de la proteína tau *in vitro*, la cual se obtuvo mediante recombinación y expresión en cepas de *Escherichia coli* y posterior purificación mediante cromatografía líquida de alta precisión (HPLC). Por otro lado, se realizaron ensayos de agregación *in vitro* donde se expusieron los extractos a proteína tau, siendo estos monitorizados por tioflavina T, una técnica de fluorescencia. Finalmente, se observó que, de esta batería, solo una molécula tuvo un efecto inhibitorio significativo.

CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una patología neurodegenerativa causante de demencia en la población mundial, principalmente en el adulto mayor. Fue descrito por primera vez por Alois Alzheimer en 1906¹. Una serie de factores se asocian al riesgo de padecer EA, como, por ejemplo, obesidad, dislipidemias, historial de diabetes e hipertensión².

La enfermedad en general es progresiva, siendo de evolución más tardía en las personas de mayor edad, extendiéndose hasta 10 años o más. Los síntomas con los cuales se presenta la EA son la pérdida de la memoria y atención, cambios de personalidad además de pérdida del habla, ya en etapas más avanzadas radica en la pérdida de masa muscular y con ello, a la incapacidad de movilizarse³.

En cuanto a su patología, la enfermedad se desarrolla por la acumulación anormal de placas β -amiloides y agregados intracelulares de proteína tau en las mallas neurofibrilares, por lo cual, se clasifica como una tauopatía⁴; esta se caracteriza por la acumulación de proteína tau en su forma hiperfosforilada. A medida que ocurre la hiperfosforilación se va agregando en los compartimientos somatodendríticos formando los ovillos neurofibrilares, los cuales causarían la disfunción neuronal⁵.

Epidemiológicamente, la EA se desarrolla principalmente sobre los 60 años afectando aproximadamente al 15% de dicha población, aumentando al 50% sobre los 85 años. Además, otros estudios indican que EA aumenta al doble cada 5 años a partir de los 65 años. Existen dos tipos de EA según la edad en la cual se manifiesten los síntomas: inicio temprano, cuando se presenta antes de los 65 años (menos del 5%), e inicio tardío, después de los 65 años. En Chile más del 10 % de la población sobre 65 años padece esta enfermedad y existirían 170.000 personas afectadas^{2,6}. Como consecuencia de padecer la enfermedad, debido a la destrucción de las células cerebrales, esta conlleva a la pérdida de la memoria en forma gradual, presentar signos de afasia, apraxia y desorientación¹.

Actualmente, existen terapias no farmacológicas y terapias farmacológicas. Las terapias no farmacológicas van dirigidas al mejoramiento en la calidad de vida de la persona, ejercicios de estimulación cognitiva, la cual se asocia a un aumento en la densidad neuronal, para poder lograr una mejoría en el aprendizaje verbal, en la capacidad de memoria y atención. Las personas con EA pueden padecer ansiedad y depresión, como consecuencia de la misma enfermedad, por lo tanto, la terapia de aceptación, aumentar la actividad física y mental, poseen un rol fundamental, ya que se ha estudiado que los ejercicios psicoeducativos han tenido un efecto beneficioso ⁴.

A su vez la terapia farmacológica es de carácter paliativo y va dirigida contra los efectos degenerativos de EA. Gracias al rol importante de la acetilcolina en el aprendizaje y memoria, los fármacos desarrollados consisten en inhibidores de la acetilcolinesterasa, esto debido por los daños derivados de la patogenia de la EA, los cuales reducen la efectividad de la transmisión colinérgica. Los principales fármacos son la galantamina, donepezilo, rivastigmina, cuyos efectos secundarios son dependientes de la dosis ⁷. Por otro lado, también se han desarrollado fármacos dirigidos hacia enzimas involucradas en la formación de placas β -amiloides, no obstante, sus intentos han sido furtivos, ya que las drogas desarrolladas se han adherido a otros sustratos o subunidades de canales de sodio ⁸, y en ensayos clínicos, estas han radicado en el empeoramiento de la degeneración cognitiva ⁹. Es por esto que diversos investigadores han basado sus estudios terapéuticos en farmacóforos que disminuyan la degeneración neuronal de la proteína tau ⁴, cuya función principal es polimerizar y estabilizar los microtúbulos a nivel axonal en neuronas ², y que en condiciones patológicas generan agregados en ovillos neurofibrilares.

En consideración del envejecimiento de la población chilena y la mayor prevalencia de la EA en etapas adultas, es importante buscar tratamientos alternativos que puedan intervenir la patogenia de esta. Bajo esta necesidad, es que se han descrito moléculas con capacidad antiagregante, específicamente polifenoles ¹⁰ que podrían resultar ser nuevas terapias dirigidas a los agentes etiológicos de esta enfermedad. Además, también se ha expuesto al azul de metileno, una fenotiazina que es capaz de cruzar la barrera

hematoencefálica y descrita como agente neuroprotector en ratas experimentales, ya que promueve la activación de genes involucrados en las defensas antioxidantes, específicamente Nrf2/ARE, lo cual deriva en evitar el daño oxidativo, la agregación de tau e inflamación del tejido ¹¹.

La presente unidad de investigación se realizó en el laboratorio de ciencias aplicadas a Tecnología Médica (CATEM 5), Echaurren #183, Universidad Nacional Andrés Bello, donde se efectuaron ensayos de agregación de la proteína tau *in vitro* monitorizados por técnicas de fluorescencia. Además, a estos ensayos se agregaron moléculas polifenólicas con el fin de medir su efecto antiagregante, es decir, si son capaces de detener la formación de hojas β .

CAPÍTULO 2 MARCO TEÓRICO

2.1 Proteína tau

Corresponde a un grupo de proteínas asociada a microtúbulos descrita en 1977 en los ovillos neurofibrilares. Se encuentra en neuronas, específicamente en sus axones, en menor cantidad en líquido cefalorraquídeo, y en otras células ¹².

La proteína tau es una molécula soluble de peso molecular de 45 a 65 kDa, la cual no adopta una estructura secundaria definida. Posee una familia de 6 isoformas de aproximadamente 351 a 441 aminoácidos. Se han establecido 2 tipos de regiones funcionales en ella, una ácida o amino terminal, la cual se considera como la zona de proyección al citoplasma y que está encargada de interactuar con otras proteínas del citoesqueleto y la membrana plasmática ¹³, seguida de la región de unión a microtúbulos, compuesta por una secuencia rica en prolinas, la cual posee residuos de treonina y serina, aminoácidos que al ser fosforilados determinan la unión a microtúbulos, otra de secuencias de repetición, conformadas por 31 a 32 aminoácidos y la zona carboxiterminal ¹⁴.

Esta se codifica en el cromosoma 17q21, con 16 exones que abarcan alrededor de 100 kb, de estos se omiten 3 que no se expresan en mRNA del sistema nervioso central, los exones 1, 5, 7, 9, 11, 12 y 13 son constitutivos, y los exones 2, 3 y 10 generan 6 mRNA diferentes. Por otro lado, cabe destacar que el exón 10 codifica secuencias de repetición involucradas en la región de unión a microtúbulos, y la modificación de este, produce isoformas con 3 secuencias de repetición, entre ellas 3R y 4R ¹⁵.

La principal función descrita radica en su unión y estabilización en los microtúbulos, polímeros del citoesqueleto que son vitales para la generación y mantención de axones, además de servir como vías de transporte para moléculas neuronales. La polimerización está determinada principalmente por la región de unión a microtúbulos o carboxiterminal a través de sus secuencias repetidas R1-R4 en adultos Fig. 1. ¹⁵.

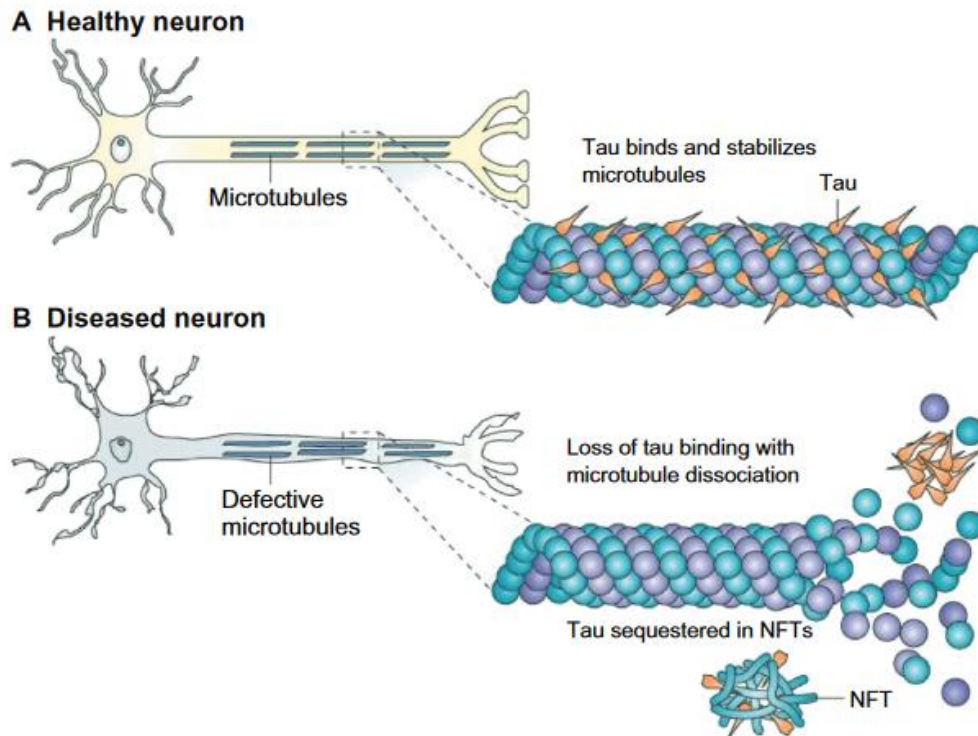


Figura 1. En la primera parte de la figura se demuestran los microtúbulos estabilizados en unión a tau, su función fisiológica. Seguido de esto, se observan la incapacidad de tau para cumplir su función, generando paralelamente agregados ¹⁶.

2.2 Agregación

El proceso de agregación se describe con el inicio de la estructura randómica de la proteína tau hacia la conformación de hojas beta cruzadas mediante sus secuencias de repetición, para luego formar unidades oligoméricas que serán intermediarias para la generación de fibras de pares helicoidales, y finalmente ovillos neurofibrilares, signos patognomónicos dentro de EA. Se han descrito dos secuencias hexapeptídicas hidrófobas en la región de repetición que propician la agregación, ²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ y ³⁰⁶VQIVYK³¹¹, las cuales son cruciales para la interacción de proteína tau y su agregación en los núcleos de las fibras de pares helicoidales ¹⁷. Por lo demás, en la literatura se ha expuesto que tau puede agregarse en compartimentos intracelulares debido al bajo pH en estos, para después ser liberados al medio, diseminando estos agregados citotóxicos al medio extracelular ¹⁸.

La hiperfosforilación se comprende como uno de los factores principales en desencadenar la agregación. Las enzimas de actividad quinasas involucradas en este proceso se pueden clasificar en 3 grupos ¹⁹:

- Quinasas dirigidas a prolina (PDPK): Dirigidas a serinas y treoninas presentes en la región rica en prolina, en este grupo se puede identificar la glicógeno sintasa quinasa (GSK3) y ciclodependiente quinasa (CDK-5), ambas enzimas que en condiciones de sobreexpresión hiperfosforilan la proteína tau, y, por tanto, la agregación de esta ¹⁹.

- Proteína quinasa no PDPK: Se identifican enzimas como tau-tubulina quinasa (TTBK 1/2), Caseína quinasa (CK 1/2), Quinasas reguladoras de afinidad a microtúbulos (MARK), entre otras ¹⁹.

- Tirosina quinasas: Existen 5 tirosinas que pueden ser fosforiladas por enzimas de este grupo, tales como las quinasas de la familia Src (SFK), entre estas, tirosina quinasa específica de leucocitos ¹⁹.

Según la literatura, podría mencionarse que, de las enzimas descritas, existen algunas con posible mayor importancia, esto por los sitios disponibles que disponen para fosforilar, entre estas la CK 1/2, GSK3, CDK-5^{19, 20, 21}.

También se han descrito otros mecanismos involucrados en la agregación de tau, entre estos, la oxidación de cisteínas en las secuencias de repetición, lo cual propiciaría agregación a través de puentes disulfuro²². Por otro lado, los metales pesados también han sido reportados como factores de agregación, además de producir radicales libres e inflamación y, por tanto, un daño tisular²³.

2.3 *Escherichia coli* BL21 DE23

La *Escherichia coli*, un bacilo Gram negativo, es el organismo procarionte de elección para la producción de proteínas recombinantes en la industria de la biotecnología. Esto debido a diversos factores, como, por ejemplo, eficiencia transcripcional y traduccional; fácil manipulación del DNA; estabilidad y variado número de vectores de expresión que dispone y el amplio conocimiento fisiológico de la bacteria²⁴.

La cepa más utilizada de *Escherichia coli* es la BL21, ya que carece de proteasas OmpT y Lon, las cuales participan en la degradación de proteínas, presenta una mutación que aumenta los niveles de expresión de proteínas de membrana y además posee la delección del gen fhuA2, el cual confiere resistencia al fago T1, un fago muy virulento que necesita el receptor de hidroxamato férrico de *Escherichia coli* para infectar a la bacteria²⁵.

2.4 Líquenes antárticos

Los líquenes son organismos producidos por asociación simbiótica entre un hongo (micobionte), que conforma una estructura resistente y estable, y un alga (ficobionte), la cual suministra de nutrientes como el azúcar para el metabolismo de ambos mediante la fotosíntesis. Se ha estimado la existencia de 18.500 especies con una amplia variación de coloración, formas, tamaños, cuya distribución se enmarca desde la Antártida, ambientes tropicales y altas montañas ²⁶. Estos organismos poseen alta resistencia a entornos extremos, en este caso, la Antártida, lugar que posee como características típicas la alta radiación UV, sequedad, bajas temperaturas y oscuridad prolongada, entre otros ²⁷. Estas condiciones son propicias para la generación de especies reactivas de oxígeno, las cuales están implicadas en el estrés oxidativo, por lo tanto, se plantea que los líquenes producen moléculas de alta capacidad antioxidante ²⁸ a modo de contrarrestar lo anteriormente expuesto. Estas moléculas se denominan sustancias liquénicas y en ellas hallamos los metabolitos secundarios ²⁷. Se han aislado alrededor de 700 de estos, se componen de ácidos grasos alifáticos, ácidos débiles con anillos fenolicos, derivados de las series del orcinol y β -orcinol: paradépsidos, metadépsidos, depsidonas, depsonas; ésteres bencílicos, dibenzofuranos, ácidos úsnicos, xantonas, antraquinonas, terpenoides y derivados del ácido pulvínico ²⁹. Para la síntesis de estos compuestos, se reconocen tres vías metabólicas:

1. Acetato poliamato: La más común, produce sustancias ácidas esterés de tipo alifáticos, fenoles, depsidonas, antraquinonas, entre otros ³⁰.
2. Ácido mavalónico: Síntesis de diferentes terpenos, esteroides y caretoides ³⁰.
3. Ácido shikímico: Producción de derivados del ácido pulvínico, ácido gálico y derivados polifenolicos ³¹. Suele ocurrir por la unión de dos moléculas de fenilpiruvato ³⁰.

Estas moléculas descritas se han vuelto un blanco de interés para investigaciones en ciencias médicas, ya que se han descrito en estas potenciales antibióticos, antifúngicos, antivirales, antitumorales, analgésicos, antipiréticos y antioxidantes ²⁶, desde esta

perspectiva, resulta como un objeto de interés de estudio para efectos antiagregantes, en ese caso, tau, como ya fue descrito anteriormente por Cornejo et al., donde se pudo aislar desde la *Ramalina tebrata* la parietina, molécula con alta capacidad antiagregante sobre la proteína tau ³².

Por otro lado, en estos compuestos se reconocen estructuras fenólicas y polifenoles que se caracterizan por poseer dos o más anillos fenólicos en su estructura (Fig.2), otorgando a estas propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y neuroprotectoras ya mencionadas, y más importante aún, poder intervenir el proceso de agregación de la proteína tau *in vitro* ³³. Las moléculas más características entre estos son los ácidos fenólicos, estilbenos, lignanos, flavonoides y diterpenos, donde, por lo general, se le atribuyen capacidades de modulación enzimática, señalización celular, debido a su estructura que le permite interactuar en reacciones de óxido-reducción ³⁴. Se han descrito diversas moléculas de este tipo, obtenidas de epigallocatequina-3-galato, obtenida del té ³⁵, ácido fúlvico, componente del humus ³⁶, polifenoles del vino como la miricetina ³⁴, entre otros.

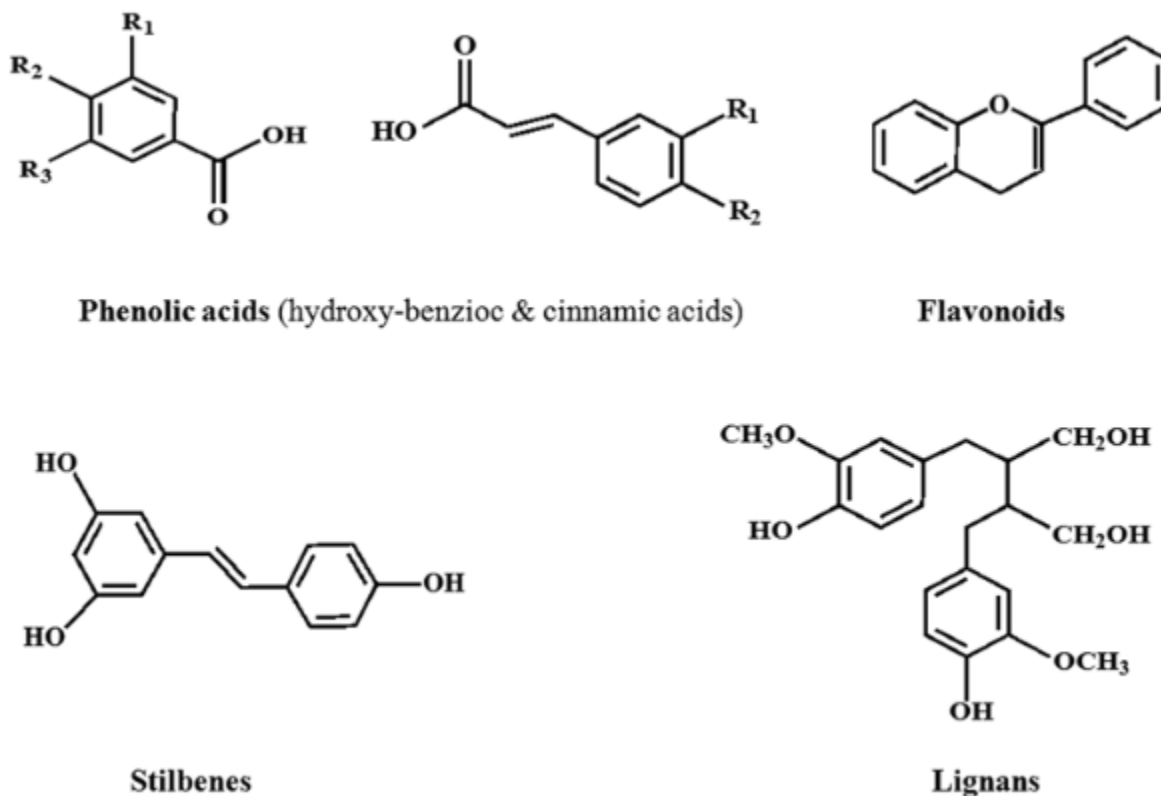


Figura 2. Diferentes moléculas polifenólicas, todas comparten más de un anillo fenólico en su estructura ³⁷

2.5 Ensayos de agregación y monitorización mediante fluorescencia

Para la agregación de la proteína tau, se han realizado ensayos *in vitro* que utilizan el método de Friedhoff et al. (1998), el cual expone que diferentes moléculas o polianiones propician la agregación y formación de filamentos de pares helicoidales, entre estos, heparina, RNA y poliglutamatos, siendo la primera la más eficiente, y según este método, es ocupada en proporción de 4:1 proteína – inductor ³⁸. Para el monitorio de la agregación, se ha descrito el uso de la tioflavina T como marcador fluorescente, una tinción benzotiazol catiónica, la cual ha sido definida como una de las moléculas más sensibles para el marcaje de estructuras β -amiloides ³⁹. Por procesos experimentales, se ha observado que, por su característica anfipática otorgada por sus dos extremos, benzatiol en el polar, dimetilamino en el apolar, esta es capaz de formar micelas en solventes acuosos, y de esta manera, su grupo polar expuesto es capaz de generar enlaces de

hidrógeno con hojas β ⁴⁰. Respecto a la fluorescencia de la tioflavina T, se ha mencionado que esta posee su anillo benziatol y otro benzialamina, los cuales se encuentran rotados cuando la molécula está libre, es decir, se encuentran en planos diferentes, presentando así un estado de baja fluorescencia, sin embargo, al unirse a estructuras de hojas beta rígidas, se produce una inmovilización de los últimos, generando un estado de excitación y por tanto de emisión³⁹. En consecuencia, aquellas soluciones que poseen mayores agregados de tau, y por lo tanto, hojas beta, unirán más moléculas de tioflavina T, así produciendo fluorescencia directamente proporcional a la concentración de agregados presentes. La longitud de onda descrita para la excitación corresponde a 440 nm, mientras que su emisión es 480 nm. Aparte de este proceso, se ha mencionado dentro de las técnicas de fluorescencia el uso de Iodocetamida para el marcaje de la proteína tau¹⁰. Esta molécula se une selectivamente a las cisteínas de la secuencia aminoácidica de tau mediante enlaces tiol, donde estas podrían estar involucradas en la estabilización de estructuras terciarias. El uso de esta técnica tendría por finalidad el monitoreo de la agregación¹⁰.

CAPÍTULO 3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

“Los compuestos de líquenes poseen la capacidad de inhibir *in vitro* el efecto agregante de la proteína tau recombinante”.

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo general

Evaluar el efecto antiagregante de líquenes sobre el proceso de agregación de la proteína tau.

3.2.2 Objetivos específicos

- Purificar mediante columna IMAC de la proteína tau recombinante.
- Comparar el efecto antiagregante de diversas moléculas de líquenes frente a la proteína tau recombinante.
- Medir el efecto antiagregante del compuesto natural mediante fluorescencia.

CAPÍTULO 4 METODOLOGÍA

4.1 Materiales

4.1.1 Biológico

- Cepas de *Escherichia coli* BL21 (DE3)

4.1.2 Reactivos y soluciones

4.1.2.1 Transformación y cultivo bacteriano

Reactivos:

- Stock de kanamicina 10 mg/mL
- Stock de IPTG 1 M
- Stock de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 100 mM
- Stock de glicerol 85%

Soluciones:

- Medio de cultivo Luria-Bertani (LB) (Sigma®) para matraz
- Medio LB más base Agar Nutritivo (AN) para cultivo en placas

4.1.2.2 Purificación mediante HPLC de 4RMBD recombinante

Materiales:

- Filtro MS ® PP Syringe 25 mm con poros 0,22 µm
- Columna ProPac™ IMAC-10 Thermo Scientific®
- Jeringa Microliter™ #710 de 100 µL Hamilton®

Soluciones:

- 20 mM de HEPES, 20 mM de imidazol, 500 mM de NaCl, (buffer A)
- 20 mM de HEPES, 500 mM de imidazol, 500 mM de NaCl, (buffer B)

* Ambas soluciones a pH 7,5

*4.1.2.3 Diálisis de 4RMBD recombinante**Materiales:*

- SnakeSkin® Dialysis Tubing 10 K MWCO, 16 mm dry I.D. 10,6 metros Thermo Scientific
- SnakeSkin® Dialysis Tubing Clips Thermo Scientific

*4.1.2.4 Concentración de 4RMBD recombinante**Materiales:*

- Filtro concentrador Millipore® Amicon® Ultra - 4 de 15 mL

Solución:

- Buffer acetato de sodio 100 mM

*4.1.2.5 SDS-PAGE**Reactivos:*

- 4x Tris·HCl/SDS pH 8,8
- 4x Tris·HCl/SDS pH 6,8
- Laemmli Sample buffer (Bio-Rad®)
- TEMED (Bio-Rad®)
- Marcador de proteínas PageRuler Plus (Thermo Scientific®)

- Alcohol isopropílico
- Persulfato de amonio 10% p/v

Soluciones:

- Solución 30% acrilamida, 0,8% bis-acrilamida
- Solución de trabajo: 80% v/v solución stock de azul de Coomassie (0,1% p/v azul de Coomassie G250, 2% p/v ácido orto-fosfórico, 10% p/v sulfato de amonio), 20% v/v metanol
- Solución de fijación: 40% v/v etanol, 10% v/v ácido acético
- Solución de lavado: 20% v/v metanol, 15% v/v ácido acético

4.1.2.6 *Ensayo de agregación e inhibición de 4RMBD*

Reactivos:

- Stock de tioflavina T 50 μ M
- Heparina 10 μ M
- Dimetilsulfóxido

4.2 Equipos

- Sonicador Ultrasonic Cleaner SB-100DT
- Espectrofotómetro Mindray® BA-88^a
- Fluorímetro Synergy H1 BioTek®
- HPLC Youngling YL9100 System
- Termoagitador en seco BOECO® MSH 130
- Incubador Shaker Zhicheng® ZHWY 100 B
- Freezer Panasonic® MDF-U33U-PB

- Refrigerador/congelador: Daewoo® RF-42151
- Centrífuga Hettich® Universal 320R
- Baño termorregulado: Digisystem® DSB-500D
- Estufa de incubación Incucell MMM Group
- Recolector Fraction Collector Gilson FC203B
- Cámara electroforética Mini-Protean® tetracell, 4-gel system (Bio-Rad®)
- pHmetro digital Ohaus ® Starter 2100
- Balanza analítica Adam ® AFA-120LC
- Mini-spin Hitachi IMAC CT15E

4.3 Método

4.3.1 Tipo de estudio y lugar de realización

El estudio corresponde a uno de tipo experimental, se llevó a cabo en los laboratorios de Ciencias Aplicadas a Tecnología Médica (CATEM), de la Universidad Andrés Bello sede República.

4.3.2. Transformación y obtención de la proteína

Para la obtención de la proteína recombinante se utilizó 300 μL de una cepa de *Escherichia coli* BL21 (DE3+) almacenada a -80°C y se le agregó 3 μL del vector pET28a+, ambos provistos gentilmente por el Dr. Alberto Cornejo Mora de la escuela de Tecnología Médica, Universidad Nacional Andrés Bello. Posteriormente la mezcla se incubó por 30 minutos en hielo, luego se dejó en el baño termostático seco por 30 segundos a 42°C y se finalizó con una última incubación en hielo por 30 minutos más. Tras esto, se centrifugó el pellet y se sembró en placas de LB con AN y kanamicina 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, lo cual se dejó incubando por 18 horas a 37°C . Transcurrido este tiempo, se seleccionaron las colonias aisladas, teniendo en consideración de que el plásmido había sido asociado gracias a la resistencia presentado al medio. Para el almacenamiento en -80°C de las células competentes, se añadió glicerol al 85% en una relación 1:4. De estas últimas, se realizaron cultivos pilotos.

4.3.3 Cultivo piloto e inducción bacteriana

Para comenzar el cultivo piloto se descongelaron las bacterias y se adicionó un raspado (200 μL aprox.) de bacterias a 1,8 mL de medio LB en una relación 1:10 con 6 μL de kanamicina a partir de un stock 10 mg/mL para dejar a una concentración de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de kanamicina, y se dejó por 24 horas a 37°C . El resto de bacterias se congelaron a -80°C .

Al siguiente día las bacterias se sembraron por agotamiento de estrías, las que fueron incubadas por 24 hrs a 37°C en una placa que contenía medio LB, nutriente agar y kanamicina 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sembrada en césped.

Luego de cumplidas las 24 horas, se seleccionaron 5 colonias y se traspasaron por separado a 5 tubos Falcon de 50 mL, el cual contenía 2 mL de medio LB con kanamicina 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ quedando con un volumen final de 2 mL; luego se incubaron a 200 rpm a 37°C

hasta alcanzar una densidad óptica (DO) entre 0,4 – 0,6; para realizar esta medición se tomó cada 20 minutos pequeñas alícuotas que fueron leídas a 600 nm en el fluorímetro.

Alcanzado la DO óptima se guardó una alícuota de 1 mL aprox. de cada colonia al -80°C, los que sirvieron como control negativo de la inducción en la electroforesis. Para la inducción se agregó 2 µL a cada tubo Falcon de IPTG 1 M dejando a 1 mM de IPTG y se incubó a 200 rpm a 37°C por 4 horas. Una vez terminada la última etapa de incubación, se realizó una electroforesis con 20 µL de cada colonia para evidenciar que colonias produjeron más proteínas. Las muestras restantes se guardaron a -80°C.

4.3.4 Electroforesis (SDS – PAGE)

La comprobación de la inducción con IPTG en el cultivo bacteriano y la presencia de 4RMBD en el concentrado se hizo mediante la realización de una electroforesis según el método de Laemmli U.K.⁴¹ en donde se utilizaron 4 alícuotas: una para el control negativo (alícuota no inducida), 3 para control positivo (pellet inducido con IPTG).

4.3.4.1 Preparación de los geles

Consisten en dos geles, uno corresponde al gel de separación y otro al de concentración. Ambos geles se prepararon a partir de los reactivos acrilamida / bis-acrilamida 30%, Tris HCl/SDS, agua destilada, persulfato de amonio y TEMED, en las siguientes proporciones:

TABLA 1

REACTIVOS	GEL SEPARADOR (ML)	GEL DE CONCENTRACIÓN (ML)
30% ACRILAMIDA/ 0,8% BISACRILAMIDA	7,5	0,65
4X TRIS HCL/SDS, PH 8,8	3,75	-
4X TRIS HCL/SDS, PH 6,8	-	1,25
AGUA DESTILADA	3,75	3,05
PERSULFATO DE AMONIO 10%	0,05	0,025
TEMED	0,01	0,005

Finalizado los geles, el gel separador fue cargado en el molde especial de la electroforesis, asegurándose de dejar un espacio en la zona superior en donde se agregó alcohol isopropílico para aislar el O₂. Luego de gelificarse, se eliminó el alcohol y se añadió el gel concentrador junto al peine de separación de la electroforesis, dando lugar a las ranuras en que se cargaron las muestras en estudio. Una vez finalizado el proceso de gelificación, se retiró el peine y se cargaron las muestras en los ovillos para realizar la corrida electroforética.

4.3.4.2 Desnaturalización y corrida electroforética

Para preparar las muestras se utilizaron 4 tubos de microcentrifuga Eppendorf ®; el primer tubo tenía 20 µL de control negativo, del segundo al cuarto tubo 20 µL de control positivo; posterior a eso, se le agregó 5 µL de β-mercaptoetanol, y estos fueron llevados a calentar en un agitador termorregulado por 5 minutos a 90°C. Posteriormente, se cargó

la electroforesis de la siguiente manera: primer carril con 3 μL del marcador de peso molecular, desde el segundo hasta el décimo carril, dependiendo de las muestras obtenidas, se cargaron con 15 μL de las muestras incubadas, y se dejó corriendo a 100 mV por aproximadamente 80 minutos.

4.3.4.3 *Fijación del gel*

Tras los 80 minutos de corrida, se retiró el gel de la electroforesis, se añadió 40% v/v de etanol y 10% v/v de ácido acético, el cual fue llevado a agitación por 50 rpm a 20°C por 30 minutos.

4.3.4.4 *Tinción y lavado del gel*

Para visualización de las bandas, terminado el proceso de agitación, se retiró la solución dispuesta, y se añadió, procurando dejar cubierto el gel, la solución de trabajo azul de Coomassie 80% v/v y metanol 20% v/v, para dejar por 24 horas a 50 rpm a 20 °C.

Terminada las 24 horas se procedió a retirar la solución de trabajo utilizando la solución de lavado 20% v/v metanol y 15% v/v ácido acético, para finalmente visualizar las bandas.

4.3.5 Cultivo grande

Del cultivo piloto se seleccionó el Eppendorf® guardado a -80°C con 1 mL correspondiente a la colonia que más proteína expresó según el resultado de la electroforesis, el cual se resuspendió en 80 mL de LB y 240 μL del stock de kanamicina en un matraz Erlenmeyer, dejando incubar a 200 rpm por 24 horas a 37°C .

Posterior a las 24 horas, el contenido total del matraz se vertió a un segundo matraz Erlenmeyer de 500 mL, el cual contenía 320 mL de medio LB quedando con un volumen final de 400 mL; luego se dejó incubar a 200 rpm a 37°C y ; cada 20 minutos fueron leídas pequeñas alícuotas a 600 nm en el fluorímetro hasta obtener una densidad óptica (DO) entre 0,4 – 0,6.

Luego de alcanzar la DO óptima, se homogeneizó una pequeña alícuota de 800 μL del cultivo con 200 μL de glicerol y se almacenó a -20°C en un tubo Eppendorf®, que fue el control negativo de la inducción en posterior electroforesis. Para la inducción se agregó 400 μL de IPTG 1 M y se dejó incubar a 200 rpm a 37°C por 4 horas. Una vez terminada esta etapa, se dispuso el cultivo en tubos Falcon de 50 mL con igual volumen final, y se centrifugó a 4.000 rpm por 15 minutos a 4°C . Finalmente, al terminar la centrifugación, se desechó el sobrenadante y el pellet se almacenó a -20°C .

4.3.6 Separación de la proteína

Los pellets almacenados se resuspendieron con 5 mL de buffer A y 100 μL de PMSF 100 mM. Posteriormente se realizó un sonicado de 5 minutos y después un proceso de congelación por 5 minutos más; proceso que se hizo 3 veces. Una vez terminado los ciclos se le dio un golpe de calor de 5 minutos a 90°C . Luego, se centrifugó a 5.000 rpm por 15 minutos a 4°C , para finalmente, el sobrenadante obtenido se filtró a través de los filtros MS ® PP Syringe de 0,22 μM , y congelarlo a -80°C .

4.3.7 Purificación de 4RMBD

Para purificar la proteína se utilizó la técnica de retención y elución, a través de la cromatografía líquida de alta precisión (HPLC) mediante la columna ProPac™ IMAC-10 Thermo Scientific®; la columna posee en su fase estacionaria moléculas inmovilizadas de cobalto, las cuales generan enlaces de coordinación con la porción *hys – tag* del extremo amino terminal de la proteína 4RMBD recombinante ⁴². Para continuar se utilizó los buffers A y B, mediante un flujo de 0,5 mL/min en un periodo de 0 a 40 minutos.

Una vez listas las condiciones necesarias, se procedió a inyectar 100 µL de sobrenadante, utilizando la jeringa Microliter™ en el HPLC, el cual fue monitorizado a través de un cromatograma entregado por el software que realiza una detección de anillos aromáticos, entregando así un peak de lectura, a 276 nm.

4.3.8 Recolección de 4RMBD

La recolección de la proteína empezó al inicio de los peaks en el cromatograma, los cuales corresponden a las primeras fracciones de proteína al comenzar a eluir con el buffer B. Para recolectar la proteína se utilizó el recolector Fraction Collector Gilson FC203B, cargado con un stock de tubos de ensayos para el proceso. Posterior a esto, se montó una corrida electroforética (SDS – PAGE) con el fin de comprobar la inducción en el proceso de cultivo y la presencia de proteína en los eluados.

4.3.9 Diálisis y concentración de proteína

Terminada la etapa de recolección, se dializó la proteína utilizando la membrana SnakeSkin® Dialysis con poros de 10 kDa, para retener la proteína y filtrar todas las moléculas de menor peso molecular. Para el proceso se preparó acetato de sodio 10 mM 1 L y se vertió en un vaso precipitado de 1 L, a continuación, se añadió el volumen de proteína recolectada en la membrana (previamente ambientada con acetato de sodio) y se cerraron ambos extremos de la membrana con los clips de SnakeSkin® Dialysis. A continuación, se dejó agitando por 1 hora a 200 rpm; terminado el tiempo se cambió el buffer acetato de sodio utilizado, por uno preparado nuevamente, con el fin de evitar la saturación del medio y se terminó el proceso dejando en agitación por 18 horas a 200 rpm.

Finalizada la última etapa de diálisis, se dispuso la proteína dializada en un tubo Falcon con el filtro concentrador Millipore® Amicon® y se centrifugó a 3.500 rpm por 10 minutos a 4°C, con el fin de concentrar la proteína.

4.3.10 Medición de la concentración de 4RMBD

Al concentrado de proteína se le determinó su concentración a través del fluorímetro Synergy, por medio de una longitud de onda de 276 nm, correspondiente a los residuos de tirosina en la proteína⁴³. El cálculo de la concentración se realizó mediante la siguiente fórmula: $C = A / l \times \epsilon$; donde C es igual a la concentración de la proteína, A es la absorbancia obtenida en la medición, l es el diámetro de la cubeta del fluorímetro y ϵ es el coeficiente de extinción molar de 4RMBD con un valor de $1.520 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

4.3.11 Ensayo agregación

El ensayo se realizó para determinar la capacidad inhibitoria en la agregación de 4RMBD de los extractos de líquenicos, actualmente confidenciales, donados gentilmente por el profesor Carlos Areche del Laboratorio Químico de la Universidad de Chile.

Previo a montar el ensayo se prepararon 5 diluciones correspondientes a las moléculas de líquenes con el reactivo DMSO como solvente, dejando a una concentración de 5 mM; 2,5 mM; 1,075 mM; 0,5 mM.

Para montar el ensayo se utilizó una placa que contiene 96 pocillos, el cual fue cargado utilizando una pipeta múltiple de la siguiente manera: 3 pocillos para el blanco, que para el caso de 4RMBD son 50 μ L de acetato 100 μ M; 3 pocillos para cargar la proteína, que tenía 50 μ L de control positivo 4RMBD 40 μ M más 50 μ L de heparina 10 μ M, el cual cumple la función de agente inductor, esta primera parte fue el control de agregación.

Luego se montó el ensayo de dosis – respuesta, para el cual, se añadió en 5 pocillos nuevamente el blanco de acetato, seguido de 5 pocillos más, que tenían 50 μ L de proteína (4RMBD) 49 μ M con 50 μ L de heparina 12,5 μ M; esta parte se preparó en duplicado. Para finalizar, se le agregó 1 μ L de las diferentes diluciones de la molécula a cada uno de los 5 pocillos preparados tanto del blanco, como de la proteína en duplicado. El ensayo se dejó agitando a 120 rpm por 24 horas a 37°C.

4.3.12 Marcaje con tioflavina T

Pasadas las 24 horas, se adicionó 100 μ L de tioflavina T 50 μ M a todos los pocillos y se dejó en agitación a 37°C por 1 hora a 120 rpm. Finalizado este paso, se procedió a medir la concentración utilizando el fluorímetro Synergy a una longitud de onda de excitación de 440 nm y emisión a 480 nm.

4.3.13 Eliminación del material

Para la eliminación de residuos biológicos se debieron usar los elementos de protección personal (guantes, delantal y gafas) en todo momento mientras se manipulaba el material. Se debió disponer de bolsas y contenedores especiales, los que permitían un cierre hermético, además de ser resistentes a la manipulación y a los mismos residuos. Dichos contenedores poseen una etiqueta con el símbolo internacional de riesgo biológico.

En cuanto a los cultivos bacterianos, estos fueron autoclavados a 121 °C para su esterilización y posterior eliminación.

Una vez que los contenedores estuviesen llenos hasta $\frac{3}{4}$ de su capacidad, se procedió a cerrarlo herméticamente y trasladados a la bodega de acopio de la universidad para su disposición final donde una empresa externa realizó el retiro programado de los contenedores ⁴⁴.

4.3.14 Estadísticas

El análisis de los resultados y posterior realización de gráficos se hizo mediante el programa *SigmaPlot 12,0* y *GraphPad Prism 6*, la significancia de estos fue medida a través del método “t-student” con un nivel de confianza de 95% .

CAPÍTULO 5 RESULTADOS

5.1 Cultivo piloto

Luego de la inducción y posterior selección de las colonias aisladas tras la siembra en placa, estas fueron incubadas en 5 cultivos diferentes con medio LB y kanamicina por 24 h; tal como se explicó en la metodología de cultivo piloto e inducción bacteriana; se logró evidenciar el crecimiento bacteriano y la correcta realización del proceso de inducción. En la Figura 3 se observan los resultados de la electroforesis realizada a las 5 colonias aisladas del cultivo expuesto.

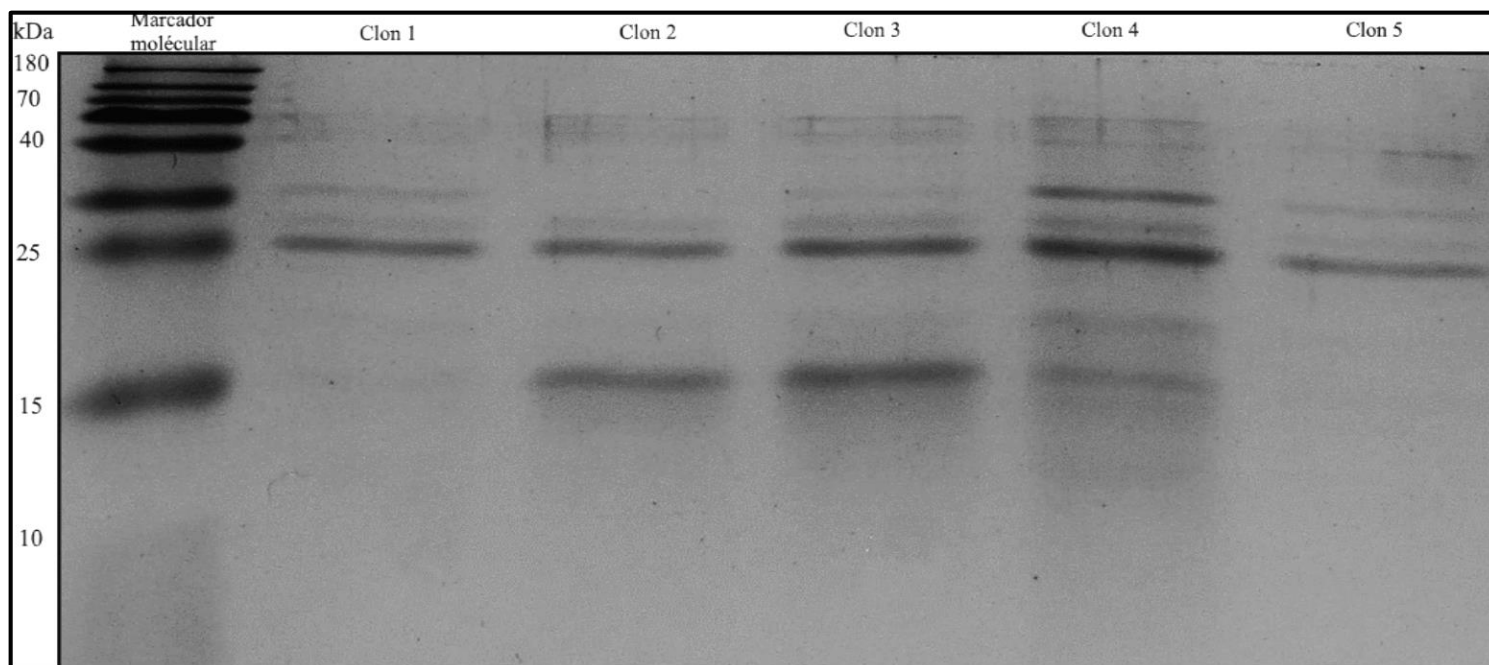


Figura 3 - Análisis del SDS-PAGE acrilamida/bisacrilamida 15%. Gel electroforético utilizado para evidenciar la colonia de mayor producción de proteína. Carril 1: Marcador de proteínas PageRuler Plus (Thermo Scientific®). Carril 2: colonia 1, se observa una leve banda marcada a nivel de los 15 kDa, correspondientes a la proteína 4RMBD. Carril 3 al 5 : colonias 2,3,4 respectivamente, donde se puede distinguir claramente una banda marcada a la altura de los 15 kDa, lo que nos indica buena producción de proteína 4RMBD. Carril 6: colonia 5, no se observa banda en los 15 kDa.

Según la Figura 3, la colonia con mayor producción de proteína fue la 3, en donde la banda a la altura de los 15 kDa fue mucho más acentuada en comparación a las colonias restantes. Seleccionada esta colonia, se procedió a realizar nuevamente el proceso de cultivo e inducción, explicado en la metodología de cultivo grande. La Figura 4 corresponde a la DO medida a 600 nm cada 20 minutos a medida que el bacteriano se reproducía. Se puede distinguir que desde los 40 a 160 minutos existe una fase de crecimiento que se traduce en un aumento de la densidad de este. Luego este comienza a enlentecer desde los 180 minutos, demostrando la fase estacionaria del cultivo.

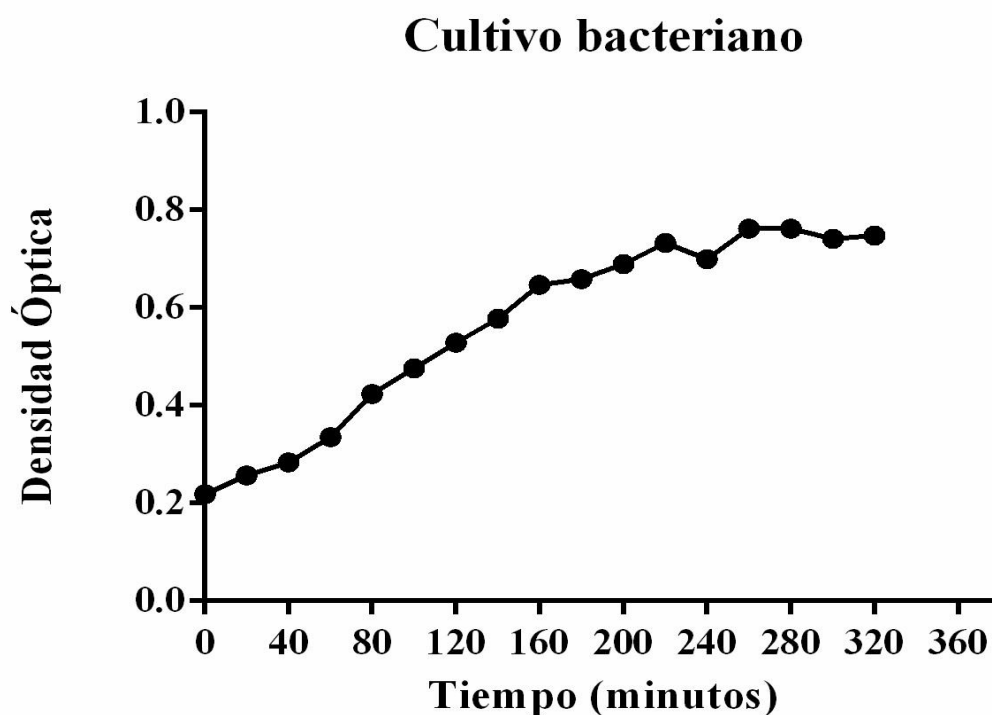


Figura 4 - Gráfico del cultivo bacteriano, correspondiente al crecimiento.

Tras alcanzar una DO de 0,4, se obtuvo una alícuota de 100 μ L desde el cultivo sin inducir, la cual fue utilizada como control negativo. Luego comenzó la inducción tras agregar IPTG al cultivo y el resultado final fue contrastado mediante una electroforesis SDS-PAGE con un gel de bis-acrilamida al 15%, presentado en la Figura 6.

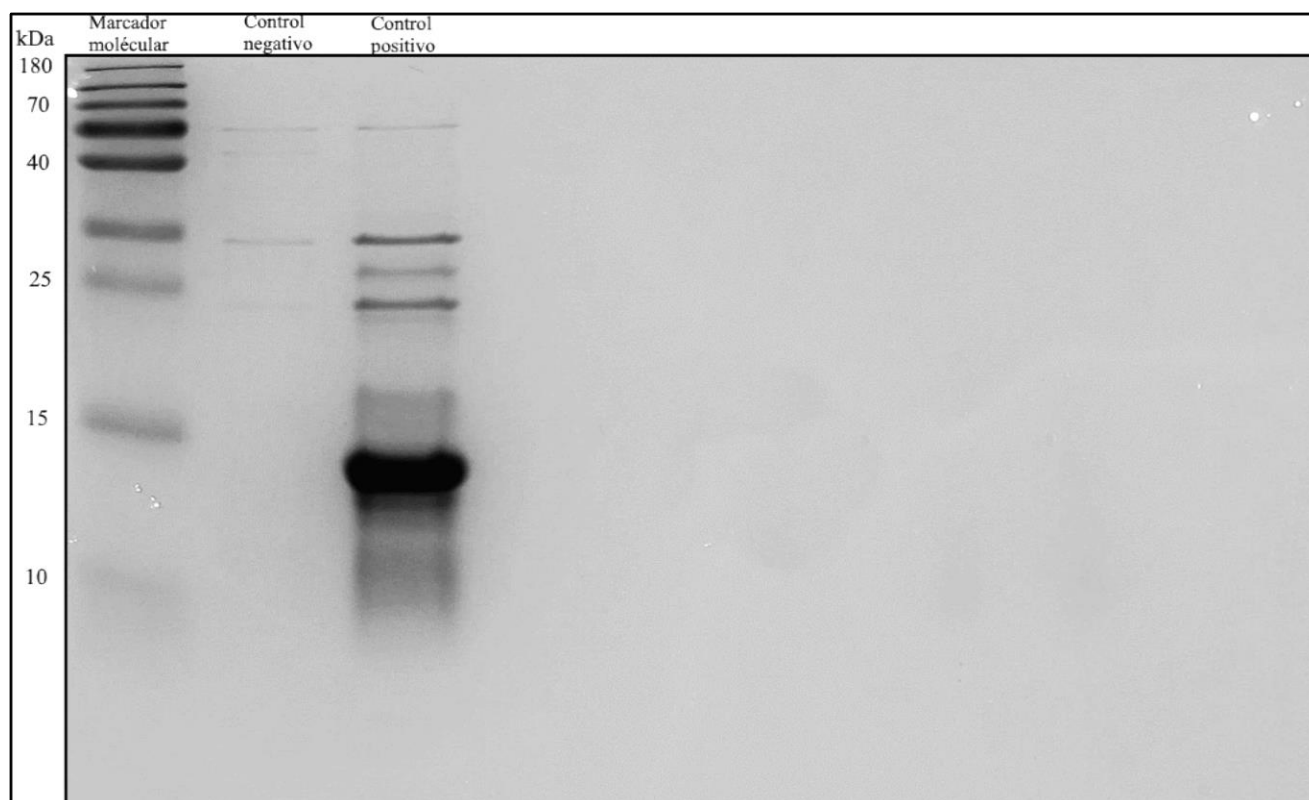


Figura 6. Análisis del SDS-PAGE acrilamida/bisacrilamida 15%. Gel electroforético utilizado para evidenciar la producción proteica tras la inducción del cultivo. Carril 1: Marcador de proteínas PageRuler Plus (Thermo Scientific®). Carril 2: Control negativo. Carril 3: Control positivo. Se observa banda acentuada a la altura de 15 kDa.

5.2 Purificación de proteína 4RMBD mediante IMAC

Luego de la inducción con IPTG, el cultivo se trasvasijo a tubos Falcon de 50 mL, siendo estos sometidos a la fase de separación que consta de ciclos de sonicado y congelado a -80°C , a fin de obtener los sobrenadantes para la purificación mediante la columna ProPac-IMAC. Se utilizó un método de gradiente no isocrático de 30 minutos, con una longitud de 276 nm para la detección de la proteína. Tras inyectar $300\ \mu\text{L}$ de este sobrenadante, aproximadamente en los 3 minutos se manifestó el inicio del peak correspondiente a la lectura de la proteína monomérica, siendo este colectado en el fraction collector hasta los 10 minutos, esto se evidencia en el cromatograma expuesto en la Figura 7. Se presenta el cromatograma con el peak mencionado en la Figura 7.

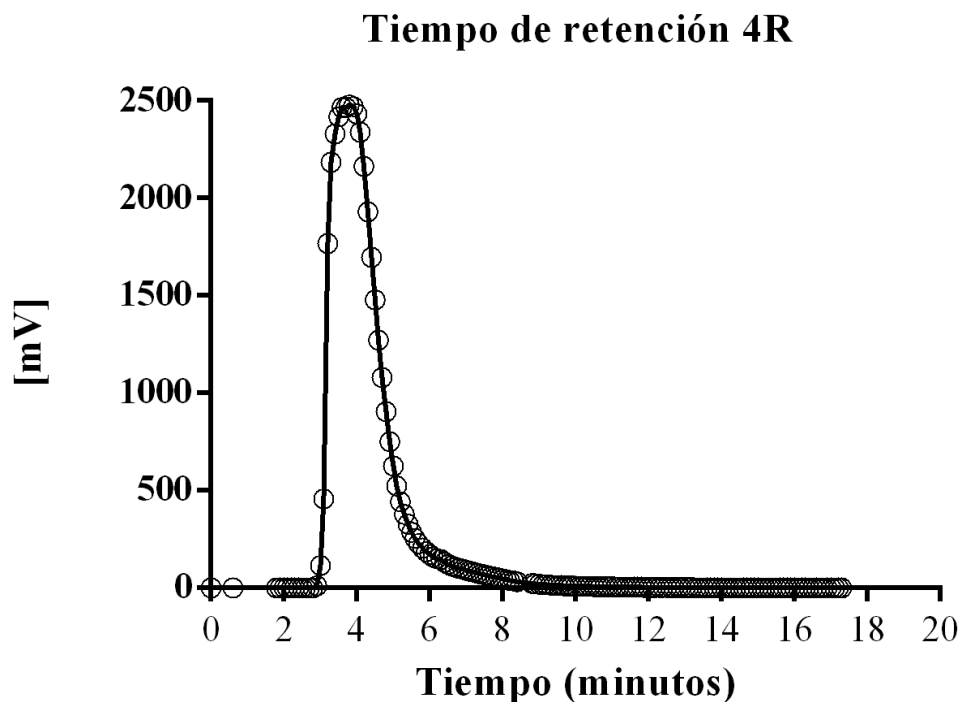


Figura 7. Cromatograma correspondiente a la purificación de 4RMBD. Se observa peak a los 3 minutos con una altura de 2.500 mV, el cual se detuvo a los 10 minutos aproximados.

Finalmente, la fracción purificada fue dializada mediante SnakeSkin® Dialysis por 18 horas con buffer de acetato de sodio 100 mM y concentradas en filtros concentradores Millipore® Amicon®. Para comprobar la presencia de la proteína tras estos procesos, se realizó una electroforesis SDS-PAGE con un gel bis-acrilamida al 15%, donde se cargó una fracción purificada y concentrada, y una fracción concentrada posterior a la diálisis. Interesantemente, se evidenció la presencia de dos bandas más sobre la esperada. Esto se demuestra en la Figura 8.

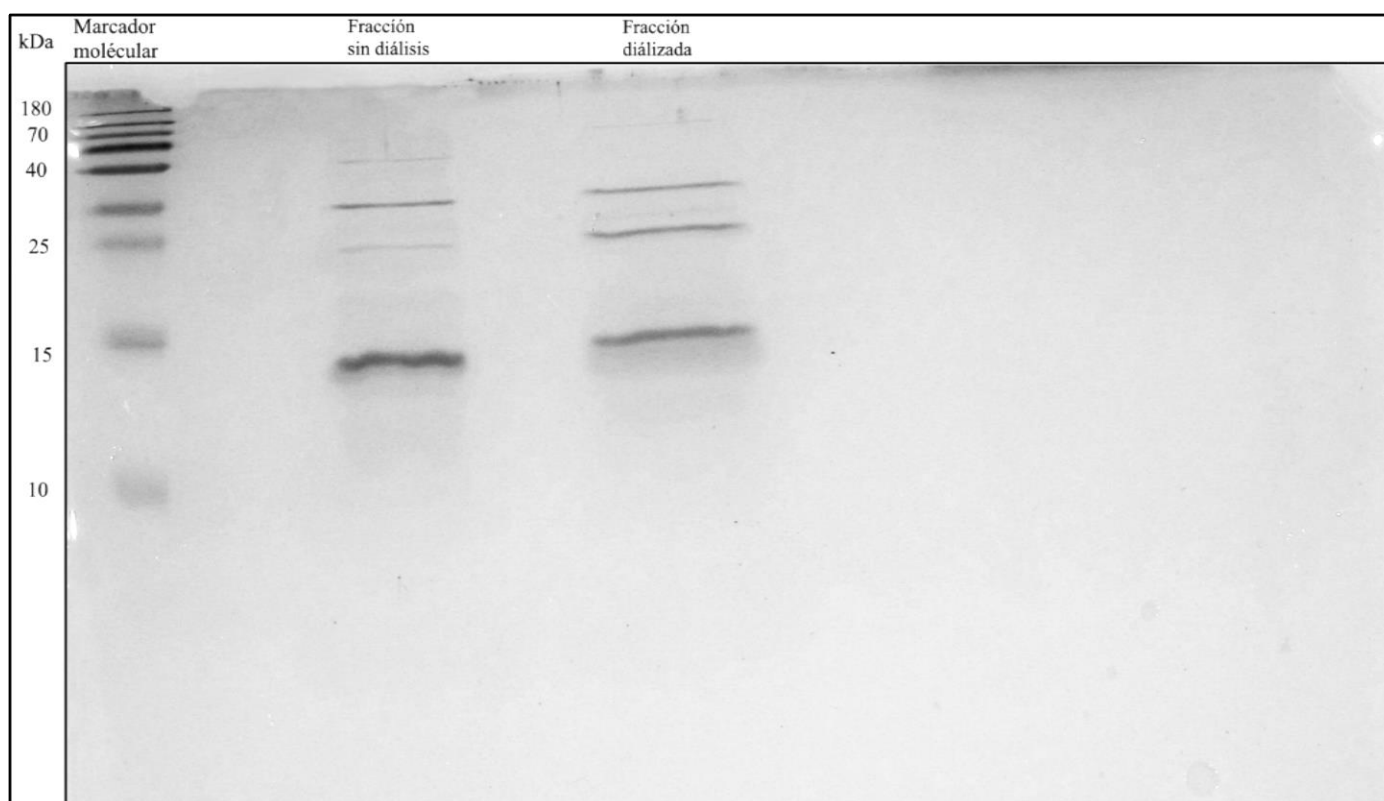


Figura 8. Análisis del SDS-PAGE acrilamida/bisacrilamida 15%. Gel electroforético utilizado para observar la presencia de 4RMBD tras la purificación y concentración por ProPac-IMAC. Carril 1: Marcador de proteínas PageRuler Plus (Thermo Scientific®). Carril 2: Fracción sin concentrar. Carril 3: Fracción concentrada, se observa cómo se acentúan.

5.3 Ensayos *in vitro* de agregación con tioflavina T

Se realizaron dos test de screening iniciales con los líquenes en estudio, en primer lugar, con los extractos metanólicos disueltos en DMSO, y en segunda instancia, con agua, ambos a una concentración de 5 mg/mL y con una muestra de 4RMBD a 45 μ M más heparina a 11,3 μ M. Posterior a la lectura con tioflavina T, tal como se demuestra en la Figura 9, se graficaron los porcentajes de actividad de agregación de cada muestra con su respectivo liquen.

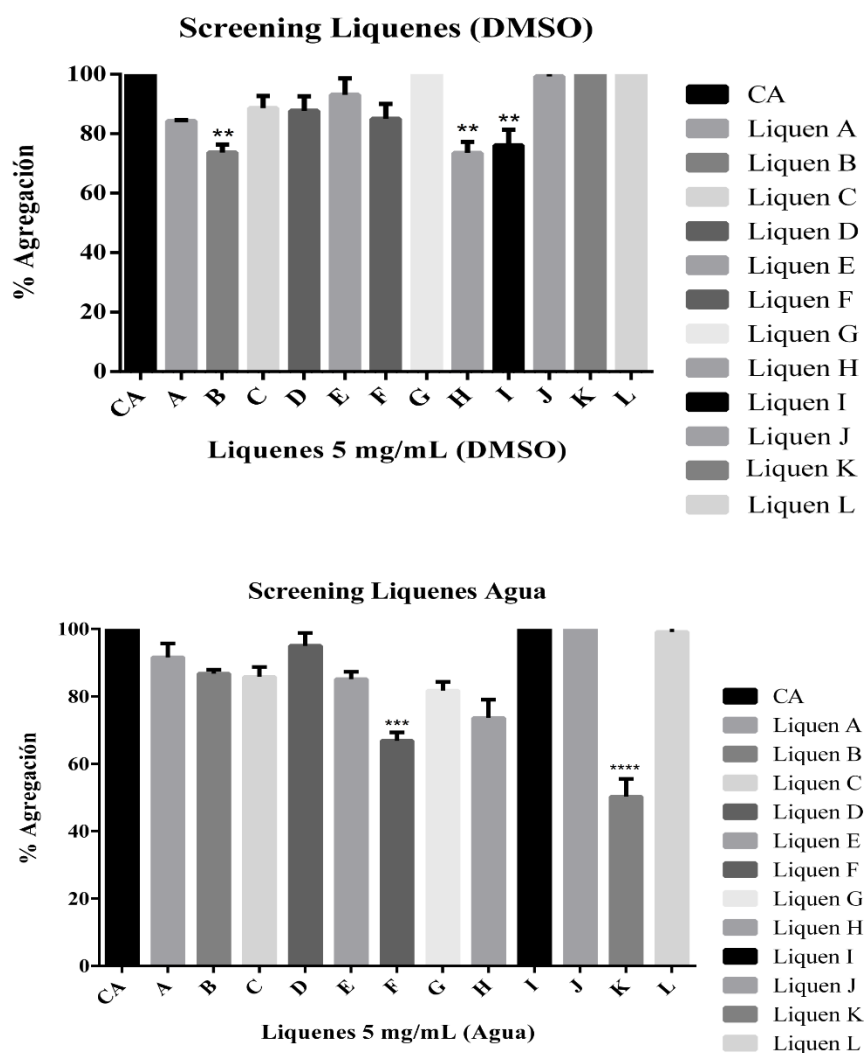


Figura 9. Gráficos del screening de líquenes. Extractos disueltos en DMSO en superior, extractos disueltos en agua en inferior.

Se observó que dentro de los líquenes disueltos en DMSO, B y H mostraban un porcentaje de agregación menor respecto a las demás muestras, por otro lado, en aquellos disueltos en agua, K demostró tener una actividad de agregación mucho menor a sus pares, inclusive a aquellos en DMSO.

En la Tabla 2 se describe el porcentaje de inhibición de estos 3 últimos, es decir, el porcentaje de actividad agregación restado al control del ensayo respectivo que corresponde a un 100%, más los valores p obtenidos del análisis t-student.

TABLA 2. *Porcentaje de inhibición. Valor p*
Líquenes B, H y K

Liquen B (DMSO)	26,3	0,0044
Liquen H (DMSO)	26,5	0,005
Liquen K (Agua)	50	0,001

Según lo expuesto, dentro de los 3 líquenes, K presentó una mejor inhibición, por lo cual se procedió a hacer un ensayo de dosis-respuesta con este último. Se probaron diluciones de este último en 5; 2,5; 1; 0,75 y 0,5 mg/mL. En la Figura 10 se expone el ensayo dosis respuesta, el cual fue hecho con 4RMBD a 48 μ M y heparina 12 μ M, y en la Tabla 3 sus respectivos porcentajes de inhibición y valores p.

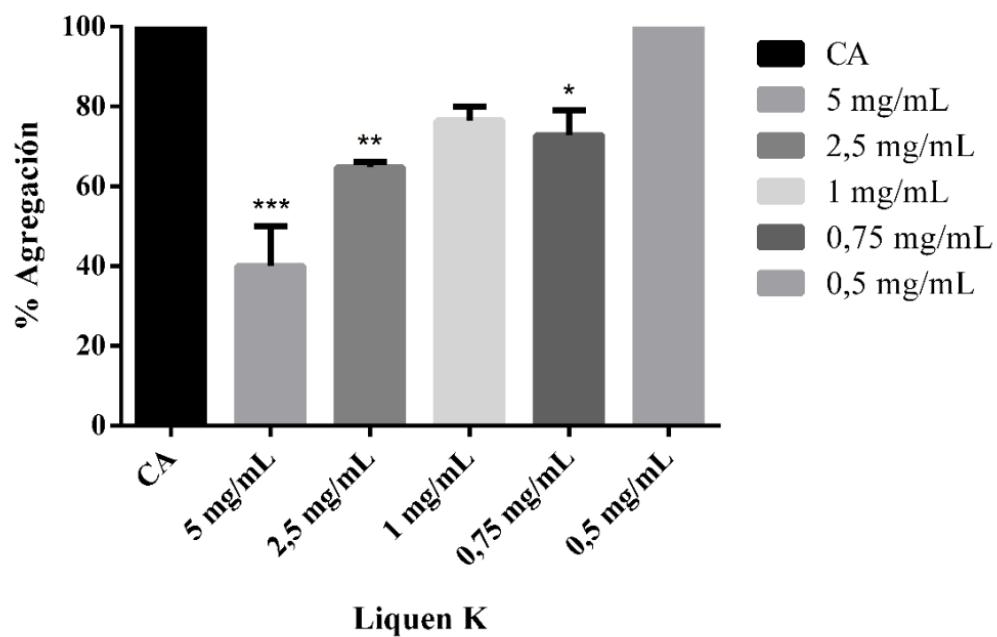


Figura 10. Gráfico de ensayo dosis respuesta del liquen K en agua

TABLA 3.

Liquen K (mg/mL) Porcentaje de inhibición. Valor p

5	60	0,004
2,5	35,2	0,0001
1	23,8	0,0029
0,75	27,1	0,0094
0,5	0	0,7143

CAPÍTULO 6 DISCUSIÓN

La EA ha sido ampliamente estudiada en los últimos 30 años con mucha dedicación en la investigación clínica y experimental tanto *in vitro* como en ratones transgénicos, lo que ha conllevado a la realización de múltiples ensayos terapéuticos con una gran cantidad de fármacos, los cuales han tenido diversos resultados en los síntomas conductuales y cognitivos, con diversos grados de intensidad y duración ⁴⁵. Para el tratamiento de la EA se buscan principalmente moléculas terapéuticas provenientes de plantas que eviten la pérdida neuronal producido por el estrés oxidativo y con ello, prevenir la degeneración neuronal. Estas moléculas se caracterizan por ser estructuras polifenólicas compuestas por dos o más anillos fenólicos, y actualmente se ha descrito su capacidad antioxidante determinado directamente por la capacidad de neutralizar y atrapar los radicales libres asociados en la formación de placas neuronales ⁴⁶. Por ello, el estudio de esta investigación se basó en la evaluación *in vitro* del efecto inhibitorio de extractos de 7 líquenes antárticos, debido a que estos metabolitos secundarios se componen de estructuras polifenólicas, importantes actualmente en el avance medicinal de la terapia de EA.

Para realizar los ensayos *in vitro*, se utilizó el fragmento 4RMBD de la proteína tau, el cual comprende una serie de dominios de repetición compuestas por dos secuencias hexapeptídicas hidrófobas, ²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ y ³⁰⁶VQIVYK³¹¹, que se unen a los microtúbulos neuronales y genera la agregación de la proteína ¹⁷. La obtención de esta se realizó mediante la preparación de un cultivo bacteriano de *Escherichia coli* BL21 (DE+), previamente transformadas utilizando el vector de expresión bacteriano pET-28a(+). Dicho vector posee 4 regiones importantes, una región T7 para el reconocimiento de la T7 RNA polimerasa; la región lac, que participa en la inducción y activación de la transcripción; otra región que codifica la resistencia a kanamicina; y por último la región que codifica para la secuencia de poli histidina o Hys-tag . Durante el proceso de obtención de la fracción 4RMBD, se prepararon dos cultivos, un cultivo piloto o pequeño, utilizado para averiguar el clon bacteriano de mayor producción de proteína, y un cultivo grande, preparado a partir del clon seleccionado, para la obtención de un stock de sobrenadantes

que diera abasto para la realización de los experimentos durante la investigación. La implementación del antibiótico kanamicina durante el proceso de cultivo permite la producción de clones bacterianos que sí hayan incorporado el vector pET-28a(+), ya que el vector posee la región que codifica la resistencia al antibiótico ⁴⁷. Para alcanzar un desarrollo bacteriano óptimo, se debió alcanzar una DO entre 0,4 – 0,6, dicho rango se comprende en la fase exponencial de la curva de crecimiento bacteriano, en donde existe un desarrollo balanceado y existen suficientes nutrientes; las bacterias recuperan el ciclo celular e incrementan su número de manera exponencial ⁴⁷. Posteriormente se procedió a realizar la inducción con IPTG, un carbohidrato ampliamente utilizado para inducir el operón lac de la *Eschechiria coli*, para finalizar con el proceso de sonicado y aplicación de diferentes temperaturas –como se explicó en la metodología de separación de proteína 4RMBD. La aplicación de frío a -80°C y posterior golpe de calor a 90°C asegura la desnaturalización de las proteínas excepto del fragmento de la proteína tau, esto debido a que es termoestable lo que asegura su resistencia a los cambios de temperatura ⁴⁸. La visualización del fragmento 4RMBD se hizo mediante un SDS–PAGE acrilamida/bis-acrilamida al 15% para la comparación de los sobrenadantes obtenidos en la centrifugación final del proceso de separación, en el cual se observa que el control positivo presenta una banda marcada a nivel de los 15 kDa, coincidiendo con el peso molecular del fragmento de 4RMBD que es de 15 kDa.

5.1 Purificación y concentración de 4RMBD

Para la purificación del fragmento 4RMBD de la proteína tau se utilizó la columna ProPrac–IMAC, que en la estructura de su matriz posee moléculas de Co^{+2} que interaccionan con la cola de polihistidinas presentes en la proteína ⁴⁹. Junto con la anterior, se utilizaron dos buffers de corrida que fueron necesarios para la generación de la fase móvil, el que permite la retención y elusión de la proteína 4RMBD por la columna. La retención de la proteína se logra con bajas concentración de imidazol, reactivo análogo de la histidina ⁵⁰ el cual disminuye las uniones inespecíficas a la matriz de otras proteínas existentes. Por otro lado, la elusión de la proteína se consigue aumentando la concentración de imidazol, el cual mediante la unión competitiva con las moléculas de histidinas sobre la matriz propicia la elusión de esta ⁴⁹.

La visualización del fragmento purificado de 4RMBD de la proteína tau se obtuvo mediante la realización de un SDS-PAGE al 15% de acrilamida/bis-acrilamida, en el cual se cargaron dos muestras de la proteína purificada. Las condiciones de las muestras fueron diferentes, a una muestra no se le realizó el proceso de diálisis y solo se concentró a través de los filtros Amicon® por medio de la centrifugación, mientras que la segunda muestra se dializó mediante la membrana SnakeSkin® Dialysis con poros de 10 kDa para poder filtrar todas las moléculas de menor peso molecular y así retener el fragmento de la proteína tau, para finalizar con la centrifugación, y con ello, concentrar la proteína.

Como se puede apreciar en la Figura 8, en el carril 2 se ve claramente la existencia de una banda marcada a nivel de los 15 kDa correspondiente a la fracción 4RMBD de la proteína tau, además de la presencia de otras bandas a nivel de los 25 kDa y una banda muy tenue a los 40 kDa; en el carril 3, dializada la proteína y concentrada, se logró apreciar la banda a los 15 kDa, un poco más tenue que la anterior, debido a que existe una relación directamente proporcional a la concentración utilizada, para este caso fue de 60 μ M de proteína.

Para conocer la concentración del fragmento 4RMBD se utilizó el método de fluorescencia, el cual es un método ampliamente utilizado para el estudio de interacciones entre moléculas. Dicha técnica provee de un análisis rápido y sensible para la determinación de compuestos químicos que se hayan unido a la proteína. Para efectos de la investigación se utilizó la fluorescencia intrínseca de un aminoácido que forma parte de la estructura química de la proteína tau, la tirosina (Tyr). El fragmento 4RMBD emite fluorescencia en un rango de los 307 nm, que corresponde al espectro de emisión de Tyr, el cual a su vez posee un espectro de excitación a los 276 nm ⁵¹.

En cuanto a las bandas apreciadas a nivel de los 25 kDa tanto en el carril 2 como el 3, esto puede deberse a la existencia de impurezas proteicas capaces de resistir el proceso de separación de la proteína cuando es sometido a cambios de temperatura, lo que explica que dichos restos bacterianos sean termoestables al igual que el fragmento 4RMBD de la proteína tau, a su vez, existen impurezas proteicas que pueden presentar una afinidad similar o incluso superior al fragmento 4RMBD que no pueden excluirse mediante este

método de purificación. Otra de las posibles causas de la aparición de estas bandas es la existencia de agregados de proteína tau, como se sabe, la proteína tau tiende a agregarse y en las condiciones en que se realizó la diálisis, la concentración y purificación son condiciones no desnaturalizantes lo que puede llevar a la formación de estructuras proteicas de mayor tamaño, como los los dímeros, trímeros y tetrameros ⁵².

5.2 Ensayos de agregación *in vitro* y líquenes

La polimerización *in vitro* de la proteína tau se ha descrito como lenta, por lo cual, el uso de polianiones ha sido sugerido en más de una ocasión, tal como señala Ramachandran ⁵³, donde actúan como un soporte para nucleaciones heterogéneas de la proteína en estudio ⁵⁴. Ramachandran, nuevamente describe que, en primer lugar, se encuentra la proteína en agregados no fibrilares, a medida que transcurre la agregación, se forman monómeros conectados por giros β , luego estos son unidos por la heparina para formar dímeros con capacidad agregante que evolucionarán a agregados fibrilares tempranos, denominando esta etapa como “Conversión conformacional”, la cual ocurriría en la primera hora dentro de un ensayo de agregación. En paralelo, la maduración fibrilar ocurre, y posterior a los agregados fibrilares tempranos, se conforman las fibras maduras que actúan como el núcleo de agregación. Cabe destacar, eventualmente, que a medida que se conforman estas estructuras, el número de estructuras y hojas β se enriquece ⁵⁵. Este proceso es demostrado en la Figura 11.

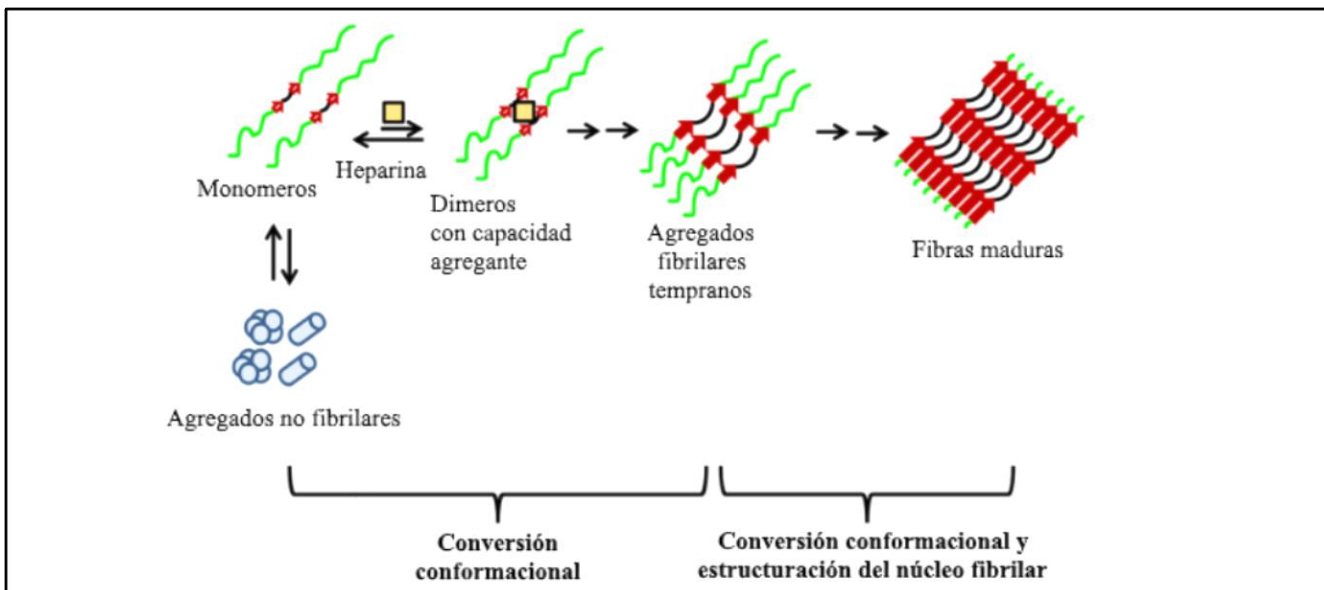


Figura 11. Formación de agregados fibrilares por medio de la Heparina. Flechas rojas representan hebras β , líneas negras giros β y líneas verdes estructuras indeterminadas.⁵⁵

Es necesario mencionar también, que se han descrito otros factores importantes que tienen influencia sobre los ensayos de agregación. En primer lugar, la temperatura. En distintas referencias se ha descrito el uso de 37°C e incubación de 24 horas, esto planteado en los procedimientos realizados por Crowe⁵⁶ y Pickhardt⁵⁷, y por su parte, Cornejo describe una diferencia en la incubación, donde éste la mantiene por 48 hrs³⁶. Además, Torres-Bugeau expone que la temperatura participa en la formación de las estructuras amiloides⁵⁸. Por otro lado, la concentración de 4RMBD, la heparina, y la estequiometría entre ambas, son enunciadas como factores importantes por Ramachandran, donde éste último establece que, a concentraciones bajas de heparina, la formación de fibras es más rápida, y en contraposición, determina concentración máxima de $25\ \mu\text{M}$ para esta. En cambio, la proteína tiene una concentración mínima para la formación de fibras, la cual corresponde a $2 - 3\ \mu\text{M}$, y por lo demás, también posee una máxima de $75 - 80\ \mu\text{M}$, esto debido a la estequiometría de la proteína y la heparina, donde 1 molécula de esta última, está asociada a 20 moléculas de proteína cuando las fibras están maduras y completas⁵³.

Dentro de los ensayos expuestos, se aplicó la prueba “*t-student*”, donde el valor p del liquen K fue 0,0011, por lo cual, esta entrega una diferencia significativa respecto al 100%

de agregación demostrado por el control del ensayo. Por otro lado, el ensayo de dosis respuesta obtuvo en sus valores p 0,004; 0,0001; 0,0029; 0,0094 y 0,71, para 5; 2,5; 1; 0,75 y 0,5 mg/mL respectivamente, donde los primeros 4 valores fueron significativos, deduciendo que el último puto, debido a su baja actividad, no tuvo un valor significativo.

El líquen K, dentro de los test screening, demostró tener un porcentaje de actividad de inhibición de un 50% mientras estuviese disuelto en agua, no obstante, resulta interesante al contrastar este con su par disuelto en DMSO, el cual tuvo una actividad de inhibición nula, por lo cual podría especularse que dentro de estos existe una porción soluble en agua o de alta polaridad que podría verse no disuelta en DMSO, solvente polar aprotico incapaz de donar un hidrógeno para establecer enlaces de hidrogeno⁵⁹, esto ya que el agua, solvente dipolar prótico que sí dona su hidrogeno para un enlace, posee una constante dieléctrica mayor al DMSO, y por tanto, mayor polaridad⁶⁰.

Por lo demás, cabe destacar que este líquen se encuentra sin caracterizar, por tanto, los compuestos o metabolitos de este se encuentran en desconocimiento. No obstante, en la literatura se ha descrito ya el funcionamiento e interacción de moléculas liquenicas sobre 4RMBD, específicamente del líquen *Ramalina terebrata* y su compuesto parietina, donde Cornejo describe, mediante docking, que esta última se une por 2 vías a la proteína. Primordialmente, esta se acopla a las lisinas ubicadas en la secuencia formadora de fibras³⁰⁶VQIVYK³¹¹ mediante enlaces de hidrogeno de sus grupos fenólicos y grupos metoxil, y, en segundo lugar, mediante la unión del grupo metil proviniendo del grupo metoxil a las valinas presentes en esta secuencia, lo cual evitaría a posterior la conformación de estructuras fibrilares mayores³², tal como se gráfica en la figura 12. Por lo demás, en consideración del desconocimiento respecto a la composición del líquen K, cabe resaltar que el efecto inhibitorio demostrado podría deberse a una molécula, o de lo contrario, al efecto en conjunto y sinérgico entre más de una. Y desde otra perspectiva, el epigallocatequin gallato³⁵, una molécula proveniente del té que se une a los monómeros mal plegados de la proteína y a estructuras mayores como los núcleos de fibrilación, los cuales son disgregados a monómeros desplegados.

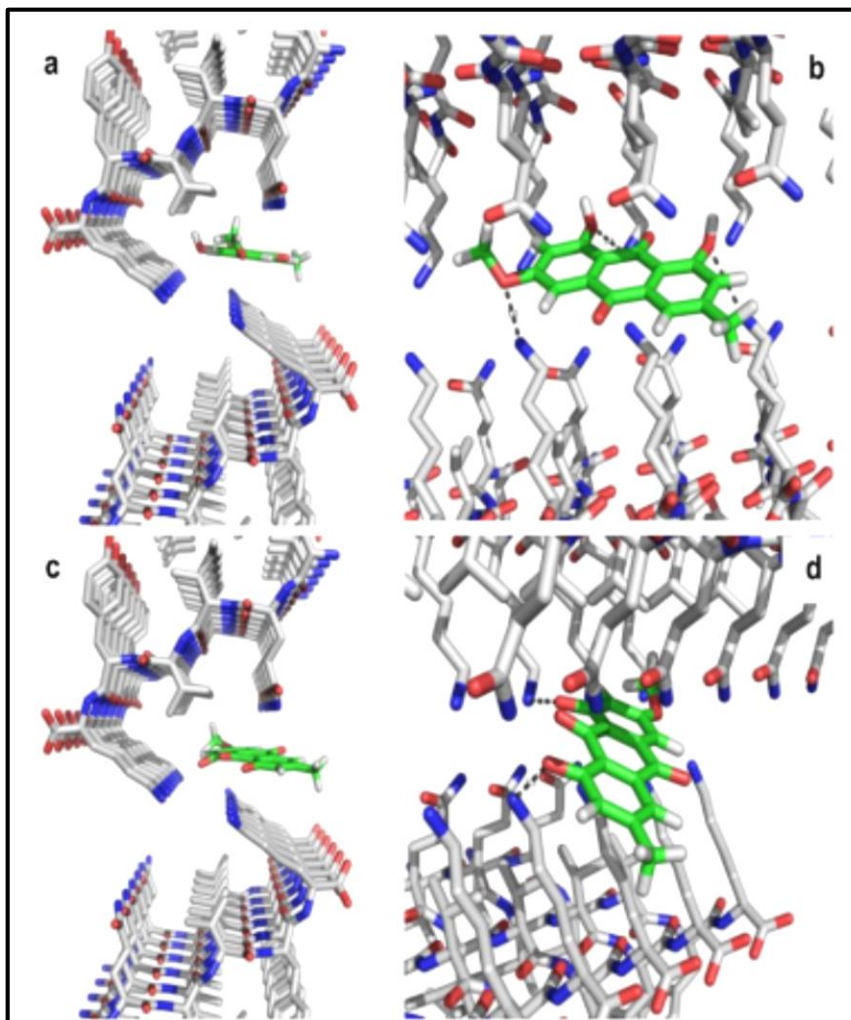


Figura 12. Docking de la interacción entre parietina y 2 secuencias formadoras de fibras ³⁰⁶VQIVYK³¹¹. Secuencias en planos a y c. Enlaces de hidrogeno entre parietina y residuos de lisina representados por línea punteada en planos b y c.³²

Finalmente, es necesario mencionar que a pesar de que el líquen K tuvo un porcentaje de inhibición mayor que el resto, es necesario estudiarlo y caracterizarlo. Además, este solo ha sido estudiado *in vitro*, desconociendo el comportamiento que tendría en pruebas *in vivo*, como efectos colaterales sobre el organismo en que es estudiado, metabolización temprana o incapacidad de cruzar la barrera hematoencefálica.

CAPITULO 7 CONCLUSIÓN

En la presente investigación se evaluó el efecto inhibitorio de extractos de líquenes sobre la agregación de la proteína tau, dado la importancia que dicha proteína presenta en la patogenia de la EA.

La purificación de la proteína tau mediante la columna IMAC fue totalmente satisfactoria tras su realización, es un método confiable y muy rápido, lo que permitió obtener grandes cantidades de proteína 4RMBD purificada, los cuales fueron visualizados mediante SDS-PAGE al 15%. Posteriormente, se logró medir la cantidad de agregación, es decir, formación de hojas y estructuras β por medio de los ensayos de agregación con tioflavina T, cuya fluorescencia era un indicador directamente proporcional a la cantidad de fibras agregadas. Al realizar la comparación de los ensayos de agregación con los diferentes extractos de líquenes, se pudo concluir que el liquen K tuvo un porcentaje de inhibición considerable y significativo estadísticamente, en cuanto a sus pares estudiados. Los líquenes B y H también presentaron un efecto inhibitorio, pero estos no fueron significativos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Batista, A., Maia De Moraes, S., Bezerra, A., Ribeiro, D., Moreira, A., Hunaldo, L., Silva, J. 2017. Medicinal plants from northeastern Brazil against Alzheimer's disease, pág. 1-2.
2. Carvajal, C. 2016. Biología molecular de la enfermedad de Alzheimer. pág. 3-5.
3. Sánchez, A., Dumitrache, G., Calet, N., de los Santos, A. 2016. Intervención en un paciente con Enfermedad de Alzheimer: anomia léxica. *Revista en Investigación en Logopedia*, pág. 1-2.
4. Mendiola-Precoma, J., Berumen, L., Padilla, K., Garcia-Alcocer, G. 2016. Therapies for prevention and treatment of Alzheimer's disease. *Biomed Research International*, 2016, pág. 1-6-7-8-9.
5. Kimura, T., Whitcomb, D., Jo, J., Regan, P., Piers, T., Heo, S., Brown, C., Hashikawa, T., Murayama, M., Seok, H., Sotiropoulos, I., Kim, E., Collingridge, G., Takashima, A., Cho, K. 2013. Microtubule-associated protein tau is essential for long-term depression in the hippocampus. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369, pág. 1-2.
6. La enfermedad de Alzheimer (EA) y otras demencias, de Corporación Alzheimer en Chile sitio web: <http://www.corporacionalzheimer.cl/alzheimer.html>
7. Tan, C., Yu, J., Wang, H., Tan, M., Meng, X., Wang C., Jiang T., Zhu, X., Tan L. 2014. Efficacy and safety of donepezil, galantamine, rivastigmine, and memantine for the treatment of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Alzheimer's Disease*, 41(2), pág. 615-631
8. Brunden, K., Trojanowski, J., Lee, V. 2009. Advances in tau-focused drug discovery for Alzheimer's disease and related tauopathies. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 8(10), pág. 783-793.
9. Schor, N. F. 2011, What the halted phase III γ -secretase inhibitor trial may (or may not) be telling us. *Annals of Neurology.*, 69, pág. 237-239.
10. Chua, S., Cornejo, A., Van Eersel, J., Stevens, Ch., Vaca, I., Cueto, M., Kassiou, M., Gladbach, A., Macmillan, A., Lewis, L., Whan, R., Ittner, L. 2017. The polyphenol altemusin inhibits in vitro fibrillization of tau and reduces induced tau

- pathology in primary neurons. Marzo 12, 2017, de *ACS Chemical Neuroscience*.
 Sitio web: <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acschemneuro.6b00433>
11. Stack, C., Jainuddin, S., Elipenahli, C., Gerges, M., Starkova, N., Starkov, A., Dumont, M. 2014. Methylene blue upregulates Nrf2/ARE genes and prevents tau-related neurotoxicity. *Human Molecular Genetics*, 23(14), pág. 3716–3732.
 12. Zetterberg, H. 2017, Review: Tau in biofluids - relation to pathology, imaging and clinical features. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 40(3). pág. 194–199.
 13. Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. 1995. *The Journal of Cell Biology*, 131(5), pág. 1327–1340.
 14. Šimić, G., Babić Leko, M., Wray, S., Harrington, C., Delalle, I., Jovanov-Milošević, N., Hof, P. R. 2016. Tau protein hyperphosphorylation and aggregation in Alzheimer's disease and other tauopathies, and possible neuroprotective strategies. *Biomolecules*, 6(1), pág.6.
 15. Santa María, P. 2008. Estudios sobre la fosforilación y agregación de la proteína Tau y su posible relación con la enfermedad de Alzheimer (Tesis doctoral). Departamento de Biología Molecular. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid.
 16. Chen, S., Ge, X., Chen, Y., Lv, N., Liu, Z., Yuan, W. 2013. Advances with RNA interference in Alzheimer's disease research. *Drug design, development and therapy*, 7, pág.117–125.
 17. Peterson, D., Zhou, H., Dhalquist, F. Lew, J. 2008. A soluble oligomer of tau associated with fiber formation analyzed by NMR. *Biochemistry*, 47, pág. 7393–7404. 2017. marzo 11, De ACS publications.
 18. Michel, C. H., Kumar, S., Pinotsi, D., Tunnacliffe, A., St. George-Hyslop, P., Mandelkow, E., Kaminski Schierle, G. S. 2014. Extracellular monomeric tau protein is sufficient to initiate the spread of tau protein pathology. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(2), pág. 956–967.
 19. Martin, L., Latypova, X., Wilson, C., Magnaudeix, A., Perrin, M., Yardin, C. Terro, F. 2013. Tau protein kinases: Involvement in Alzheimer's disease. *Ageing Research Reviews*, 12, pág. 289-309

20. Lopéz, A. 2015. Glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3) como diana de fármacos anti-Alzheimer (Tesis de grado). Facultad de farmacia. Universidad Complutense de Madrid. Madrid.
21. Pei J.J., Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Bogdanovic N., Winblad B., Cowburn R.F. 1998. Accumulation of cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) in neurons with early stages of Alzheimer's disease neurofibrillary degeneration. *Brain research*. 797(2), pág. 267-277.
22. Haque, M., Kim, D., Hyun., Ling, S., Kmn D., Chang, Y. 2014. Inhibition of tau aggregation by a rosamine derivative that blocks tau intermolecular disulfide cross-linking. *Amyloid. The Journal of Protein Folding Disorders*, 21, pág.185-190.
23. Savalief, Masha., Lee, S., Liu, Y., Lim, M. 2013. Untangling amyloid- β , tau, and metals in Alzheimer's disease. *ACS Chemical Biology*, 8 (5) pág. 356 -365.
24. Redacción. (2010). Sistemas de expresión de proteínas en Escherichia Coli para la producción de biofármacos. Alternativas y criterios de selección. junio 26, 2017, de Biotech sitio web: <http://www.biotechmagazine.es/reportajes-biotech/sistemas-de-expresion-de-proteinas-en-escherichia-coli-para-la-produccion-de-biofarmacos-alternativas-y-criterios-de-seleccion-3/>
25. New England biolabs. BL21 Competent E. coli. mayo 4, 2017, de New England biolabs sitio web: <https://www.neb.com/products/c2530-bl21-competent-e-coli>.
26. Mitrović, T., Stamenković, S., Cvetković, V., Nikolić, M., Tošić, S., Stojčić, D., 2011. Lichens as source of versatile bioactive compounds. *Biologica Nyssana*, 2, pág 1-6.
27. Sancho, L.G., Pintado, A. 2011. Ecología vegetal en la Antártida. *Ecosistemas* 20(1), pág. 42-53.
28. Luo, H., Yamamoto, Y., Kim, J.A., Jung, J.S., Koh, Y.J., Hur, J.S. 2009. *Lecanoric acid*, a secondary lichen substance with antioxidant properties from *Umbilicaria antartica* in maritime Antartica (King George Island). *Polar Biology* 32, pág.1033-1049.
29. Barreno, E., Pérez-Ortega, S. 2003. Líquenes de la Reserva Natural Integral de Muniellos, Asturias, España: Consejería del medio ambiente, ordenación del territorio e infraestructuras del principado de Asturias, KRK ediciones.

30. Perico, L. 2011. Antioxidantes de los líquenes *Stereocaulon strictum* (Stereocaulaceae) y *Loberiella pallida* (Lobariaceae) y determinación de su citotoxicidad (Tesis doctoral). Facultad de farmacia. Universidad Nacional de Colombia
31. Viteri, R. 2015. Estudio fotoquímico del extracto etanólico del líquen *Usnea antartica*, procedente de la Antártida (Tesis de grado). Insitute venezolano de investigaciones científicas.
32. Cornejo, A., Salgado, F., Caballero, J., Vargas, R., Simirgiotis, M., Areche, C. 2016. Secondary metabolites in *Ramalina terebrata* detected by UHPLC/ESI/MS/MS and identification of parietin as tau protein inhibitor. *International journal of molecular sciences*, 17(8), pág. 1303.
33. Ono, K., Yoshiike, Y., Takashima, A., Hasegawa, K., Naiki, H., Yamada, M. 2003. Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols *in vitro*: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, (87), pág: 172-181.
34. Garrancho, M. 2014. Análisis del papel protector de los polifenoles en enfermedades degenerativas (Tesis de grado). Jaén: Universidad de Jaén. Facultad de Ciencias Experimentales, pág. 9-24.
35. Wobst, H. J., Sharma, A., Diamond, M. I., Wanker, E. E., Bieschke, J. 2015. The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate prevents the aggregation of tau protein into toxic oligomers at substoichiometric ratios. *FEBS Letters*, 589(1), pág.77–83.
36. Cornejo, A., Jimenez, J.M., Caballero, L., Melo, F., MacCioni, R. B. 2011. Fulvic acid inhibits aggregation and promotes disassembly of tau fibrils associated with alzheimer's disease, *Journal of Alzheimer's Disease*, 27(1), pág. 143–153.
37. Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5), pág. 270–278.
38. Friedhoff, P., Schneider, A., Mandelkow, E. M., Mandelkow, E. 1998. Rapid assembly of Alzheimer-like paired helical filaments from microtubule-associated

- protein tau monitored by fluorescence in solution. *Biochemistry*, 37, pág.10223–10230.
39. Khurana, R., Coleman, C., Ionesco-Zanettu, C., Carter, S., Krishna, V., Grover, R., & Singh, S., 2005. Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils. *Journal of Structural Biology*, 151, pág. 229–238.
 40. Biancalana, M., Koide, S. 2010. Molecular mechanism of thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804(7), pág.1405–1412.
 41. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), pág. 680-685.
 42. Block, H., Maertens, B., Spriestersbach, A., Brinker, N., Kubicek, J., Fabis, R., Labahn, J., Schäfer, F. 2009. Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): A review. *Methods Enzymol*;463(27), pág. 439-473.
 43. Guru KrishnaKumar, V., Sharad Gupta. (2017). Simplified method to obtain enhanced expression of tau protein from E.coli and one - step purification by direct boiling. (pág: 52-Laemmli, U. K. (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. 227(5259), pág. 680-685.
 44. Gutierrez, F., Aschieri, F., Arriaza, N. 2014. Manual de bioseguridad para Laboratorios de Escuela de Tecnología Médica. Pág. 36 – 37.
 45. Bermejo, F., Llamas, S., Villarejo, A. 2016. Prevención de la enfermedad de Alzheimer: un camino a seguir. *Revista Clínica Española*, 2016, pág. 2.
 46. Sierra, L. 2016. Estrategias de investigación para el tratamiento de Alzheimer con antioxidantes polifenólicos. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 40, pág. 610-611.
 47. López, L. 2016. Curva de crecimiento bacteriano en la producción de proteínas recombinantes, Julio 5, 2017, de Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud Universidad Nacional de Asunción sitio web: http://www.conacyt.gov.py/sites/default/files/Transferencia de conocimientos_Liz_Lopez_2015.pdf
 48. Mena, R., Luna, J., García, F., Hernández, A. 2003, Histopatología molecular de la enfermedad de Alzheimer, julio 3,2017, de revista digital universitaria sitio web: <http://www.revista.unam.mx/vol.4/num7/art20/art20.htm>

49. Bornhorst, J., Falke, J. 2010. Proteins using polyhistidine affinity tags. Julio 1, 2017, de national institutes of health sitio web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2909483/pdf/nihms214279.pdf>
50. Hwang, H., Hu, J., Na, K., Bae, Y. 2014. Role of polymeric endosomolytic agents in gene transfection: a comparative study of poly(L-lysine) grafted with monomeric L-histidine analogue and poly(L-histidine). *Biomacromolecules*, 15, pág. 3577 – 3578.
51. Zeinabad, H., Zarrabian, A., Saboury, A., Alizadeh, A., Falahati, M. 2016. Interaction of single and multi wall carbon nanotubes with the biological systems: tau protein and PC12 cells as targets. *Scientific Reports*, 6, pág. 5.
52. Thermo Fisher. 2012. ProPac™ IMAC-10 product manual, pág. 19.
53. Ramachandran, G., Udgaonkar, J. B. 2011. Understanding the kinetic roles of the inducer heparin and of rod-like protofibrils during amyloidfibril formation by Tau protein. *Journal of Biological Chemistry*, 286, pág. 38948–38959.
54. Congdon, E.E., Kim, S., Bonchak, J., Songrug, T., Matzavinos, A., Kuret, J. 2008. Nucleation-dependent tau filament formation: the importance of dimerization and an estimation of elementary rate constants. *Journal of Biological Chemistry*, 283, pág. 13806-13816.
55. Ramachandran, G., Udgaonkar, J. B. 2013. Mechanistic Studies Unravel the Complexity Inherent in Tau Aggregation Leading to Alzheimer's Disease and the Tauopathies. *Biochemistry* 52, 4107–4126.
56. Crowe, A., Ballatore, C., Hyde, E., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M. 2007. High throughput screening for small molecule inhibitors of heparin-induced tau fibril formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 358, pág. 1-6.
57. Pickhardt, M., Gazova, Z., Von Bergen, M., Khlistunova, I., Wang, Y., Hascher, A., Mandelkow, E.M., Biernat, J., Mandelkow, E. 2005. Anthraquinones inhibit tau aggregation and dissolve Alzheimer's paired helical filaments in vitro and in cells. *Journal of Biological Chemistry*, 280, pág 3628-3635.

58. Torres-Bugeau C., Ávila, C., Raisman-Vozari, R., Papy-Garcia, D., Itri, R., Barbosa, L., Cortez, L., Sim, V., Chehín, R. 2012. Characterization of heparin-induced Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase early amyloid-like oligomers and their implication in α -synuclein aggregation. *Journal of Biological Chemistry*, 287(4), pág. 2398-2409.
59. Nic, M., Jirat, J., Kosata, B. (2006). Compendium of chemical terminology. Julio 1, 2017, de IUPAC sitio web: <http://goldbook.iupac.org/html/A/A00425.html>
60. Alastruey-Izquierdo, A., Gomez-Lopez, A., Arendrup, M., Lass-Flörl, C., Hope, W., Perlin, D., Rodriguez-Tudela, J., Cuenca-Estrella, M. 2012. Comparison of dimethyl sulfoxide and water as solvents for echinocandin susceptibility testing by the EUCAST methodology. *Journal of Clinical Microbiology*, 50, pág. 2509-2512.