



UNIVERSIDAD NACIONAL ANDRÉS BELLO
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA

Proyecto Unidad de Investigación

**EFEECTO DE AGREGADOS OLIGOMÉRICOS DE α -SINUCLEÍNA SOBRE EL
CITOESQUELETO DE CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA SH-SY5Y**

Sede República Julio 2018

ÍNDICE

RESUMEN	7
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	8
CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO	10
2.1 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE α -SINUCLEÍNA	10
2.2 AGREGACIÓN Y FORMACIÓN DE OLIGÓMEROS DE α -SINUCLEÍNA	12
2.3 TIOFLAVINA T (ThT)	14
2.4 MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA DE REFLEXIÓN INTERNA TOTAL (TIRF)	15
2.5 ASOCIACIÓN ENTRE CITOESQUELETO NEURONAL Y α -SINUCLEÍNA	17
2.6 MICROTÚBULOS	17
2.7 α -TUBULINA	19
2.8 NEUROFILAMENTOS	20
2.9 CITOTOXICIDAD DE AGREGADOS OLIGOMÉRICOS	21
CAPÍTULO 3: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	23
3.1 HIPÓTESIS	23
3.2 OBJETIVOS	23
3.2.1 OBJETIVO GENERAL	23
3.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
CAPÍTULO 4: MATERIALES Y MÉTODOS	24
4.1 TIPO DE ESTUDIO Y LUGAR DE REALIZACIÓN	24
4.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y VARIABLES ANALIZADAS	24

4.3	OBTENCIÓN DE PROTEÍNA PURIFICADA	25
4.4	ELECTROFORESIS EN GELES SDS-PAGE	26
4.5	MARCAJE DE MONÓMEROS DE PROTEÍNA	26
4.6	ENSAYO DE AGREGACIÓN	27
4.7	MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA DE REFLEXIÓN INTERNA TOTAL (TIRF)	29
4.8	CULTIVO CELULAR	29
4.9	EVALUACIÓN DE INESTABILIDAD DEL CITOESQUELETO MEDIANTE INMUNOMARCACIÓN EN CULTIVO	30
4.10	DETERMINAR LA CITOTOXICIDAD MEDIANTE ENSAYOS CINÉTICOS POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE LDH	31
4.11	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS	31
CAPÍTULO 5: RESULTADOS		33
5.1	EVALUAR LA AGREGACIÓN DE α -SINUCLEÍNA MEDIANTE ENSAYOS DE FLUORESCENCIA.	33
5.2	ESTUDIAR LA DESESTABILIZACIÓN DEL CITOESQUELETO EN CULTIVO SH-SY5Y, EN PRESENCIA DE OLIGÓMEROS, MEDIANTE INMUNOMARCACIÓN DE α -TUBULINA, NEUROFILAMENTOS Y TUBULINA β III	37
5.3	DETERMINAR EL DAÑO CELULAR INDUCIDO POR LOS AGREGADOS OLIGOMÉRICOS DE α -SINUCLEÍNA, MEDIANTE ENSAYOS DE LDH	42
CAPÍTULO 6: DISCUSIÓN		43
6.1	EVALUAR LA AGREGACIÓN DE α -SINUCLEÍNA MEDIANTE ENSAYOS DE FLUORESCENCIA	43
6.1.1	PURIFICACIÓN Y MARCAJE DE MONÓMERO	43
6.1.2	AGREGACIÓN DE PROTEÍNA	45
6.2	ESTUDIAR LA DESESTABILIZACIÓN DEL CITOESQUELETO EN CULTIVO SH-SY5Y, EN PRESENCIA DE OLIGÓMEROS, MEDIANTE	

INMUNOMARCAJE DE α -TUBULINA, TUBULINA β -III Y NEUROFILAMENTO. 48

6.3 DETERMINACIÓN DEL EFECTO TÓXICO INDUCIDO POR LOS AGREGADOS OLIGOMÉRICOS DE α -SINUCLEÍNA SOBRE CÉLULAS SH-SY5Y MEDIANTE ENSAYOS DE LDH 51

CAPÍTULO 7: CONCLUSIONES 53

CAPÍTULO 8: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 54

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N°1: Representación esquemática de la estructura de α -sinucleína	11
FIGURA N°2: Interacciones de α -sinucleína con membranas lipídicas que son necesarias para la formación de dímeros, oligómeros y fibrillas amiloides, que posteriormente se depositan en cuerpos de Lewy	13
FIGURA N°3: Esquema representativo del funcionamiento de un microscopio TIRF	16
FIGURA N°4: Electroforesis SDS-PAGE para las distintas eluciones de Imidazol obtenidas durante la purificación proteica en columna manual	25
FIGURA N°5: Gel de electroforesis SDS-PAGE	33
FIGURA N°6: Gráfico que representa los resultados de la agregación de α -sinucleína medidos a las 0, 24 y 48 horas	34
FIGURA N°7: Gel de electroforesis SDS-PAGE teñido con solución de Coomassie	34
FIGURA N°8: Gráfico que representa la expresión de distintas bandas en gel de electroforesis SDS-PAGE teñido con solución de Coomassie a tiempo 0	35
FIGURA N°9: Gráfico que representa la expresión de distintas bandas en gel de electroforesis SDS-PAGE, teñido con solución de Coomassie, tras 48 horas de agregación	35
FIGURA N°10: Gráfico que representa los resultados de la agregación de α -sinucleína marcada con Alexa Flúor 488 NHS	36
FIGURA N°11: (A) Imagen obtenida mediante microscopía TIRF. (B) Histograma realizado en Matlab ®	37
FIGURA N°12: Inmunomarcaje utilizando el anticuerpo primario α tubulina (TU-01) y anticuerpo secundario Alexa Flúor 488 en células control SH-SY5Y	38
FIGURA N°13: Inmunomarcaje utilizando el anticuerpo primario α tubulina (TU-01) y anticuerpo secundario Alexa Flúor 488 en células SH-SY5Y incubadas con oligómeros (48 horas de agregación)	38
FIGURA N°14: Histograma realizado mediante el análisis del marcate con Alexa 488 en células control	39
FIGURA N°15: Histograma realizado mediante el análisis del marcate con Alexa 488 en células incubadas con oligómeros	39
FIGURA N°16: Gráfico que representa los resultados obtenidos luego del análisis de	

los puntos iluminados con Alexa 488 en 5 células distintas	39
FIGURA N°17: Inmunomarcaje utilizando el anticuerpo primario tubulina β III (TU-20) y anticuerpo secundario Alexa Flúor 488 en células control SH-SY5Y	40
FIGURA N°18: Inmunomarcaje utilizando el anticuerpo primario tubulina β III (TU-20) y anticuerpo secundario Alexa Flúor 488 en células SH-SY5Y incubadas con oligómeros (48 horas de agregación)	40
FIGURA N°19: Histograma realizado mediante el análisis del marcaje con Alexa 488 en células control	41
FIGURA N°20: Histograma realizado mediante el análisis del marcaje con Alexa 488 en células incubadas con oligómeros	41
FIGURA N°21: Gráfico que representa los resultados obtenidos luego del análisis de los puntos iluminados con Alexa 488 en 5 células distintas, ya sea control como aquellas incubadas con oligómeros	41
FIGURA N°22: Gráfico que representa la concentración de la enzima lactato deshidrogenasa en células control y aquellas incubadas con oligómeros	42
FIGURA N°23: Esquema de la interacción entre grupos NHS y aminas primarias presente en las proteínas	44

RESUMEN

Los trastornos neurodegenerativos se definen como proteinopatías, donde se transforma una proteína funcional, en una con plegamiento anómalo, y la acumulación de ésta, conlleva a una pérdida neuronal progresiva. La enfermedad de Parkinson se caracteriza por la acumulación de la proteína sináptica α -sinucleína en neuronas dopaminérgicas; es el componente principal de los cuerpos de Lewy, marcador anatomopatológico de la enfermedad de Parkinson, su presencia se relaciona con la alteración de los procesos de transporte neuronal y axonal, agregados tóxicos, disfunción mitocondrial y muerte neuronal.

α -sinucleína puede alterar su conformación y adquirir capacidad autoagregante, formando oligómeros que contienen hoja β . La importancia patogénica de esta proteína se basa en su capacidad de formar oligómeros que deterioran la transmisión sináptica y el funcionamiento neuronal, formando poros en la membrana, que aumentan la permeabilidad y alteran la homeostasis iónica celular, generando un efecto de degeneración y muerte neuronal. Es por esto, que esta unidad de investigación surge por la necesidad de establecer el efecto que ejercen los agregados proteicos sobre el citoesqueleto neuronal y el nivel de citotoxicidad que producen sobre las mismas células. Para esto, se utilizó una línea celular inmortalizada proveniente de neuroblastoma SH-SY5Y, sobre la cual se realizó marcaje inmunofluorescente con anticuerpos tubulina β -III, α -tubulina, y neurofilamentos. Esto no entregó evidencias observables morfológicamente sobre disrupción del citoesqueleto, sin embargo, estadísticamente se obtuvieron diferencias significativas, que indicaron cambios a nivel del citoesqueleto. En paralelo, se realizó la medición de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en el sobrenadante del cultivo celular, dicha medición concuerda con el análisis fluorescente del citoesqueleto, ya que se obtuvieron niveles elevados de LDH, indicando que los oligómeros inducen citotoxicidad.

Palabras clave: Enfermedad de Parkinson, α -sinucleína, oligómeros, LDH.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

Los trastornos neurodegenerativos se producen debido a la muerte progresiva de neuronas en el sistema nervioso, lo que ocasiona los diferentes síntomas y signos asociados a cada una de estas patologías. Dichos trastornos son un tema de controversia a nivel mundial y por ende constituyen un objetivo de estudio constante para el mundo científico.

Dentro de los trastornos neurodegenerativos se encuentran dos grandes grupos, por un lado, están las denominadas Tauopatías, las cuales ocupan el primer lugar en cuanto a prevalencia en la población, y en segundo lugar, se encuentran las Sinucleinopatías, las cuales se presentan frecuentemente en personas mayores de 60 años, y se manifiestan con temblores en las extremidades, rigidez muscular, bradicinesia e inestabilidad postural, todos estos corresponden a síntomas que dificultan el desarrollo de actividades cotidianas.¹

El término sinucleinopatía se emplea para agrupar a tres patologías, las cuales tienen como denominador común la presencia de depósitos anómalos de la proteína α -sinucleína. Estas son la Demencia con cuerpos de Lewy, la Atrofia Multisistémica y la enfermedad de Parkinson.² En esta última, estos depósitos anormales se conocen con el nombre de cuerpos de Lewy, están localizados en las neuronas dopaminérgicas de la pars compacta, en la región cerebral denominada sustancia nigra y corresponden al marcador anatomopatológico de esta enfermedad. Por otro lado, en la Demencia con Cuerpos de Lewy se encuentran también estos depósitos anómalos de α -sinucleína, pero ubicados en la amígdala. Por último, en cuanto a la Atrofia Multisistémica, su principal sello histológico corresponde a los cuerpos de Papp-Lantos o inclusiones citoplasmáticas oligodendroglicales proteicas que se encuentran principalmente en la zona del putamen.² Dichas patologías, han ido en aumento en concordancia con el envejecimiento de la población, es por eso que existe una búsqueda constante en el

entendimiento de su etiología, para de esta forma, avanzar en el desarrollo de nuevas terapias.

La presente unidad de investigación se centra en el estudio de la proteína α -sinucleína, específicamente de su forma agregada u oligomérica, con el fin de evidenciar que los oligómeros ejercen un efecto tóxico sobre las células neuronales y causan disrupción del citoesqueleto. La evaluación de los efectos de los agregados oligoméricos de α -sinucleína se realizó de dos formas, en primer lugar, se utilizaron técnicas de marcaje inmunofluorescente en cultivos de células de tipo SH-SY5Y, las cuales fueron tratadas con ácido retinoico para inducir su diferenciación a neuronas dopaminérgicas. Sobre estas células diferenciadas, se utilizaron tres anticuerpos, tubulina β -III, α -tubulina y neurofilamentos, los que permitieron visualizar el citoesqueleto neuronal sin oligómero, a modo de control, y con oligómero, para establecer una comparación entre ambas señales, lo mismo para los tres marcadores. En segundo lugar, se utilizó un kit que permitió medir la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en el sobrenadante del cultivo celular, con el fin de determinar si los oligómeros de α -sinucleína incrementan los niveles de la enzima y generan citotoxicidad.

CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO

2.1 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE α -SINUCLEÍNA

La proteína α -sinucleína se vuelve de principal interés, debido a su estrecha relación con la Enfermedad de Parkinson y otros trastornos neurodegenerativos asociados. Esta es una proteína neuronal, localizada en los terminales presinápticos, que se encuentra altamente expresada en neuronas centrales³, está constituida por 140 aminoácidos y su masa molecular es de aproximadamente 14.460 kDa en geles denaturantes, según se demuestra en diversos estudios previos.⁴ Intrínsecamente, su estructura es desordenada y es codificada por el gen PARK-1 (SNCA) que se localiza en el brazo largo del cromosoma 4 (4q22.1).⁵

Dicha proteína pertenece a la familia de las sinucleínas cerebrales humanas junto a β y γ sinucleína, estas se agrupan de acuerdo a la similitud que existe entre sus secuencias, ya que poseen una región de repetición amino-terminal altamente conservada, sin embargo, a pesar de estas similitudes sólo α está involucrada con trastornos neurodegenerativos, debido a que forma depósitos de proteína en las tres patologías previamente mencionadas.²⁻⁶

La estructura de α -sinucleína se compone de tres regiones principales, las cuales se ilustran en la Figura 1, estas son:

- a) **Región Amino (N)-terminal:** comprende desde el extremo amino terminal o residuo 1 hasta el 60, tiene carga positiva, es anfipático, presenta un motivo hexamérico altamente conservado, que está constituido por la secuencia aminoacídica “KTKEGV”, la cual se relaciona con la función fisiológica de este dominio, que consiste en unión a fosfolípidos de membrana plasmática, lo

que le permite interferir en procesos de estabilización de membrana frente a alguna alteración y regular el transporte de vesículas.⁴⁻⁶⁻⁷

- b) **Región Central no Amiloidea (NAC):** abarca desde el aminoácido 61 hasta el 95, se caracteriza por ser altamente hidrofóbica, se considera el dominio clave para la agregación de proteínas, ya que confiere a α -sinucleína la capacidad autoagregante, y por consiguiente genera un aumento en la estructura de hoja β , para formar finalmente estructuras β cruzadas.⁶⁻⁷
- c) **Región Carboxilo (C)-terminal:** corresponde a la región ácida cargada negativamente, comprende desde el aminoácido 96 hasta el 140 y presenta baja hidrofobicidad. La región N-terminal y NAC forman el dominio de unión a membranas lipídicas, mientras que la región C-terminal contiene sitios de interacción para otras proteínas y algunas moléculas pequeñas.⁴

Existen estudios que proponen que una interacción entre la región NAC y la C-terminal es la responsable de inhibir la agregación de α -sinucleína, sin embargo, dada la carga negativa de este dominio es que tiene la capacidad de interactuar con algunos metales, tal como Al^{+3} , dicha unión podría ser la responsable de promover la agregación y contrarrestar el efecto inhibitorio dado por la interacción de ambas regiones.⁷

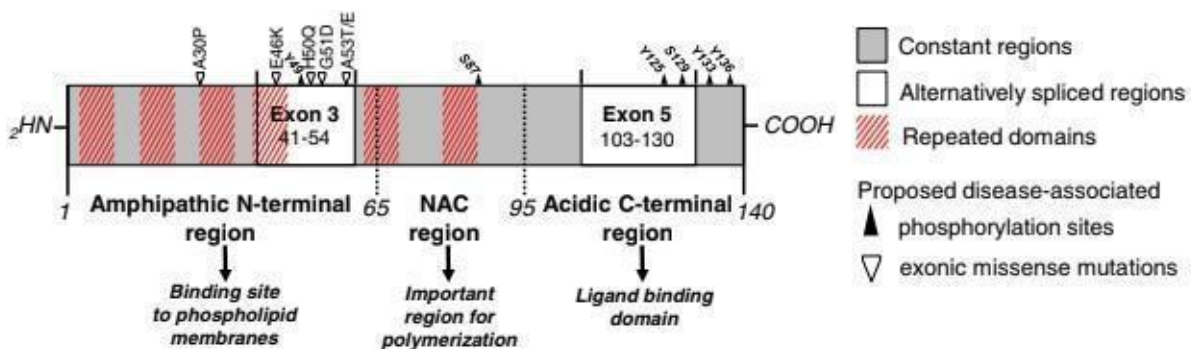


Figura N°1: Representación esquemática de la estructura de α -sinucleína.¹

2.2 AGREGACIÓN Y FORMACIÓN DE OLIGÓMEROS DE α -SINUCLÉINA

Estudios previos demostraron que α -sinucleína interactúa directamente con las membranas de fosfolípidos, particularmente con vesículas sinápticas, por lo que se cree que esta proteína es un regulador fundamental en la dinámica de vesículas en el proceso de sinapsis.⁶ Es por esta estrecha relación que presenta α -sinucleína con componentes esenciales para las células neuronales, que se hace fundamental comprender la disfunción celular debido al plegamiento incorrecto de la proteína.⁶

Según estudios previos⁸, se piensa que los oligómeros solubles⁹ de α -sinucleína son las estructuras que presentan mayor grado de citotoxicidad dentro de las distintas conformaciones que se generan. Incluso, existe la hipótesis de que las fibras o fibrillas de amiloide, que corresponde al mayor estado de agregación de α -sinucleína, ejercería un rol protector en la célula.⁴

En solución acuosa, α -sinucleína presenta una estructura dinámica desordenada, o dicho de otra forma, adopta una conformación random coil, sin embargo, se ha observado una leve tendencia a estabilizarse en α hélice en varios sectores de su estructura central. Ante la presencia de membranas vesiculares que contienen fosfolípidos de carácter aniónico, la región amino terminal de la proteína forma dos hélices α , las cuales le permiten unirse a la superficie de la membrana y, gracias a la capacidad autoagregante que le confiere la región NAC, dicha proteína puede continuar con el proceso de agregación.¹⁰⁻¹¹ Existen ciertas modificaciones covalentes que actúan como eventos iniciadores de la agregación, tales como la fosforilación o la escisión, ya que participan en la transformación de una proteína funcional normal, por una con conformación anómala.

La formación de oligómeros pasa por diferentes etapas, que involucran la formación de dímeros, intermediarios globulares u oligoméricos solubles, fibrillas en cadena, protofibrillas, protofilamentos y fibras maduras; todo este proceso es dependiente de un

mecanismo de nucleación y polimerización.¹² Respecto a la nucleación, esta se divide en tipo primaria y secundaria; la nucleación primaria consiste en la asociación de monómeros en forma de oligómeros no tóxicos, ya que se presume que estos carecen de contenido de hoja β en su estructura. Por otro lado, la nucleación de tipo secundaria, es la formación de oligómeros a partir de agregados preexistentes, proceso dependiente de la concentración de la proteína fibrilar y soluble.⁹

La estabilización de las interacciones de la proteína con la membrana o el aumento de su concentración, ya sea mediante mecanismos de multiplicación genética o mutaciones puntuales como A53T o E46K⁶, facilita la formación de dímeros de α -sinucleína en la superficie de la membrana o en el citoplasma celular; como se esquematiza en la figura N°2. A través del proceso de dimerización, α -sinucleína adopta una estructura secundaria con alto contenido de hoja β , que, a su vez, a través de la asociación con monómeros u otros dímeros de α -sinucleína presentes en la célula, conduce a la formación de estructuras oligoméricas.⁶

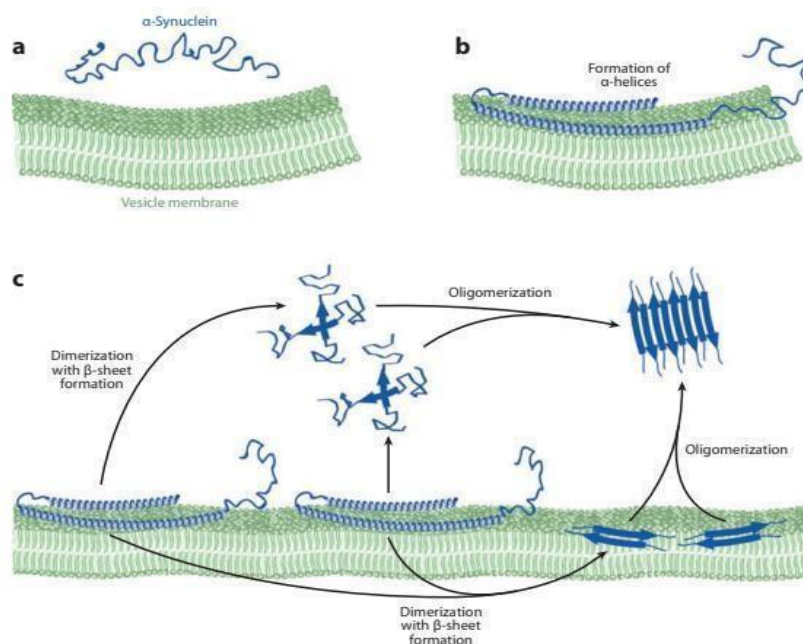


Figura N°2: Interacciones de α -sinucleína con membranas lipídicas que son necesarias para la formación de dímeros, oligómeros y fibrillas amiloides, que posteriormente se depositan en cuerpos de Lewy.⁶

α -sinucleína presenta en su estructura, a nivel de la región central no amiloidea, un dominio altamente hidrófobo de 12 aminoácidos (71-VTGVTAQAQKTV-82), el cual

es indispensable para la oligomerización y fibrilización de la proteína.¹³ Las mutaciones asociadas a α -sinucleína alteran su estructura de diferentes maneras, en primera instancia existe la mutación A53T, la cual expande el dominio hidrofóbico dentro de la estructura de la proteína, de 11 aminoácidos iniciales a 30, con lo cual logra desestabilizar el dominio α helicoidal entre los residuos 51 a 66.¹⁴ Este dominio hidrófobo extendido le confiere la capacidad de adoptar la estructura de hoja β , la cual es requerida para la formación de estructuras oligoméricas citotóxicas.¹⁵⁻¹⁶

Por último, estudios previos postulan que la mutación E64K generaría cierto nivel de citotoxicidad al alterar la interacción entre α -sinucleína y fosfolípidos aniónicos, exponiendo porciones hidrofóbicas de la proteína, las cuales quedarían libres para realizar eventuales interacciones con otras moléculas. Estas interacciones al verse aumentadas acelerarán los procesos de formación de dímeros y la generación posterior de oligómeros al interior de las células neuronales.¹⁷

Además de todo lo mencionado previamente, existen factores externos que se ven involucrados en la formación de los agregados oligoméricos de α -sinucleína, especialmente al desarrollar ensayos de agregación in vitro, estos son la concentración de la proteína en su forma monomérica, temperatura, pH, agitación y tiempo.⁹

2.3 TIOFLAVINA T (ThT)

La Tioflavina T es una solución de benzatiol, de carácter catiónico, que desde 1959 se utiliza como el marcador fluorescente gold estándar para la identificación de fibras amiloides. Estas corresponden a material proteináceo amorfo e insoluble que se encuentra en ciertas patologías que involucran plegamiento anómalo de proteínas, tal como es el caso de la α -sinucleína en la enfermedad de parkinson.¹⁸⁻¹⁹

Los compuestos fluorescentes, tales como la ThT, se definen como técnicas sensibles en la detección de estructuras que no son identificables con otro tipo de coloraciones

directas, debido a que, sólo al unirse a moléculas específicas estos compuestos aumentan su fluorescencia.²⁰ Los espectros de fluorescencia en que funciona óptimamente la ThT cambian cuando esta se une a las fibrillas de amiloide, es decir, el máximo de excitación de la molécula por sí sola es de 385 nm y al unirse a la estructura este cambia a 452 nm; por otro lado, el máximo de emisión de ThT sólo, es de 445nm y al unirse a las fibrillas este cambia a 482 nm. Este aumento que se produce en la fluorescencia de la ThT se atribuye a la inmovilización selectiva de un subconjunto de conformeros del compuesto. Esto plantea la idea de que existe un sitio de unión para ThT en las fibrillas amiloides que genera un impedimento estérico sobre el colorante unido y da como resultado el aumento de la fluorescencia de ThT.²¹

La ThT se une a fibrillas que presentan diferentes secuencias aminoacídicas, es decir, que la composición de aminoácidos no es la clave para determinar el sitio de unión, en contraste, se postula que el compuesto de benzatiol reconoce la arquitectura en forma de β cruzada de las diferentes fibrillas y es la superficie de éstas la que se acepta como sitio de unión.²¹ Dada la selectividad y especificidad de la unión de ThT, este es el método que se utilizó para monitorear los ensayos de agregación de α -sinucleína.

2.4 MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA DE REFLEXIÓN INTERNA TOTAL (TIRF)

El TIRF es una técnica de obtención de imágenes que se utiliza actualmente para observar la asociación de membranas, adhesión celular, unión hormonal, transporte molecular y procesos de endo y exocitosis, debido a su alta resolución. Permite obtener imágenes selectivas de moléculas fluorescentes, en un ambiente acuoso con un alto índice de refracción, muy cercano a sustancias sólidas como un cubreobjeto. Dependiendo de la longitud de onda de excitación y la apertura numérica, se produce una onda evanescente que corresponde al espesor de la profundidad de excitación. Esto permite utilizar esta onda evanescente y no un haz de luz directa sobre la muestra a analizar.²²

Como se observa en la figura 3, la onda evanescente se produce cuando la totalidad de la onda incidente es reflejada dentro de una interfaz, compuesta por dos medios transparentes con distintos índices de refracción. La interfaz se compone frecuentemente de un cubreobjeto de vidrio y una capa de solución acuosa que se coloca entre éste y lo que se desea observar. La fuerza del campo evanescente decrece exponencialmente a medida que aumenta la distancia con la interfaz. Solo los fluoróforos que se encuentren a una distancia determinada pueden ser excitados, lo que genera imágenes con muy poca señal residual y con una resolución axial de 100 nm aproximadamente.²²⁻²³

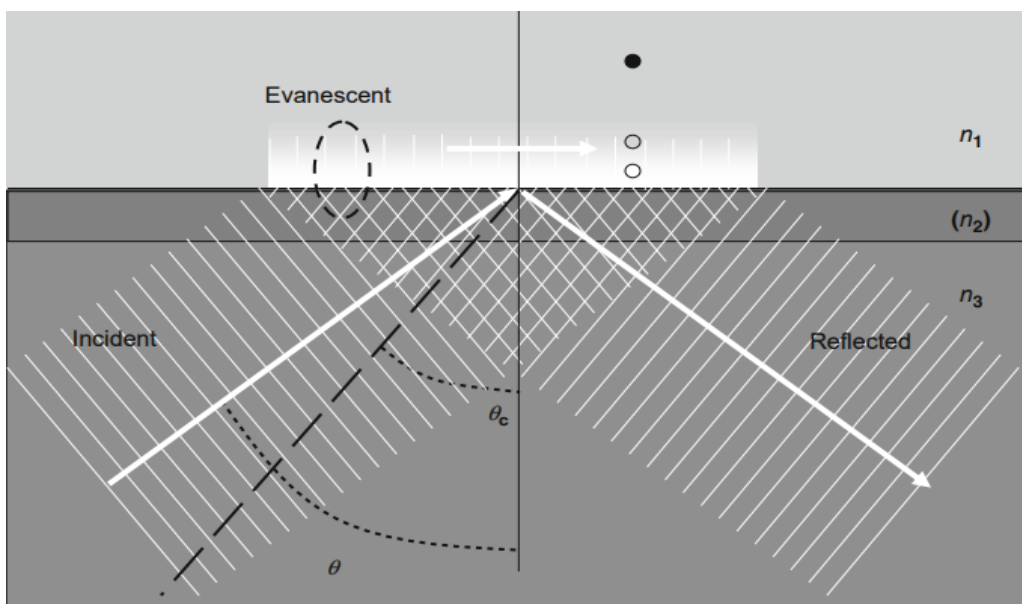


Figura N°3: Esquema representativo del funcionamiento de un microscopio TIRF.²³

A cierto ángulo de incidencia, que se conoce como ángulo crítico, la luz será completamente reflejada, dicho fenómeno se denomina reflexión interna total. Este efecto solo se produce si la luz incidente viaja de un medio con un índice de refracción mayor a uno menor, como la luz que pasa de un cubreobjeto a un medio acuoso. Cuando ocurre el fenómeno de reflexión interna total, una parte de la luz incidente se convierte en un campo electromagnético y pasa a través del interfaz para formar la onda

evanescente. Esta tiene la misma frecuencia que la luz incidente y su amplitud decae a medida que aumenta la penetración.²³

Esta técnica permite observar moléculas fluorescentes individuales, entrega un fondo lo suficientemente oscuro e incluso permite entregar información sobre la orientación de la molécula en la superficie y su dinámica rotacional. Debido a estas características es que esta técnica microscópica permitió monitorear la agregación de monómeros marcados previamente con Alexa Fluor 488 succinimidyl éster (NHS).

2.5 ASOCIACIÓN ENTRE CITOESQUELETO NEURONAL Y α -SINUCLEÍNA

Las neuronas, por ser un tipo de células altamente especializadas, requieren para su óptimo funcionamiento un citoesqueleto bien organizado, el cual está compuesto por tres estructuras fibrilares, que corresponden a los microfilamentos, neurofilamentos y microtúbulos. El citoesqueleto en su rol fisiológico, se ve involucrado en proporcionar la forma y arquitectura neuronal, además de contribuir en procesos de transporte axonal.²⁴ Los filamentos también son denominados polímeros, ya que a su vez están compuestos por repeticiones de monómeros. En el caso de los microfilamentos, son monómeros de actina globular asociados a moléculas de ATP o ADP. Por otro lado, los neurofilamentos son monómeros de citoqueratina, son los filamentos más abundantes y están encargados de ejercer la función de soporte estructural; finalmente, los microtúbulos son monómeros de α y β tubulina, constituyen a las fibras de mayor diámetro entre los tres componentes principales del citoesqueleto.²

2.6 MICROTÚBULOS

Los microtúbulos en general están implicados en muchas funciones al interior de las células, incluyendo mitosis, transporte intracelular, determinación de la morfología y diferenciación celular, entre otras.²⁵ La tubulina corresponde a la proteína que conforma la subunidad de los microtúbulos, es un heterodímero α / β y existen múltiples isotipos,

tanto para α como para β -tubulina, que difieren entre sí en su secuencia aminoacídica y en la distribución tisular. En mamíferos, existen siete isotipos distintos de β -tubulina bien establecidos, estos son: β -I, β -II, β -III, β -IVa, β -IVb, β -V y β -VI.²⁶ Las diferencias entre cada uno de estos isotipos se han mantenido altamente conservadas a través de la evolución, lo que implica que cada diferencia es funcionalmente significativa.²⁷

Estudios previos han analizado las distribuciones intracelulares de los isotipos β -I, β -II y β -III en células de neuroblastoma tanto para células indiferenciadas como para células neuronales diferenciadas. Estos tres isotipos de tubulina tienen expresión común para ambos tipos celulares y se ha determinado que cada uno cumple un papel esencial en las células neuronales. Mediante análisis realizados previamente²⁷ sobre células de neuroblastoma del tipo SK-N-SH, que fueron inducidas para su diferenciación, utilizando ARN de interferencia específicos (siRNA) para disminuir la expresión de los diversos isotipos de β -tubulina en los diversos ensayos aplicados; se llegó a la conclusión de que cada isotipo de β -tubulina estudiado juega un rol distinto en la célula neuronal.²⁷ Por la evidencia obtenida en este estudio, se sugiere que el isotipo β -I es esencial para la supervivencia de la célula neuronal diferenciada, β -II no es crucial en este aspecto, pero sí desempeña una función muy importante en la diferenciación neuronal, ya que participa activamente del proceso de formación de neuritas. Por último, el isotipo β -III está estrechamente relacionado con mecanismos de protección celular.

Por otra parte, una investigación previa²⁸ demostró que un determinado fragmento peptídico del isotipo β -III de tubulina, compuesto entre los residuos 235 y 282 de esta proteína, es capaz de bloquear la acumulación de α -sinucleína en modelos de ratones transgénicos con atrofia multisistémica al unirse a esta última mediante la región descrita previamente.²⁸

2.7 α -TUBULINA

El otro dominio proteico del cual se componen los heterodímeros de los microtúbulos corresponde a la α -tubulina, que al igual que β -tubulina posee diversos isotipos los cuales están sujetos a una amplia gama de modificaciones post-traduccionales tales como acetilación, fosforilación, etc. Estos cambios pueden afectar diversas funcionalidades de los microtúbulos dependiendo de la localización de los sitios de modificación dentro de la estructura de la proteína. Dentro de este amplio espectro de alteraciones en la estructura de α -tubulina también se encuentran la eliminación o adición de determinados aminoácidos esenciales para la interacción de esta proteína con otras estructuras dentro de la célula.²⁹

Estas modificaciones mencionadas anteriormente ocurren en mayor parte en la región C-terminal de los microtúbulos, la cual consiste en aproximadamente 15 residuos aminoacídicos y constituye el principal dominio variable tanto para α como para β -tubulina, es así como estas secuencias variables en las regiones C-terminales de los microtúbulos pueden dar origen a modificaciones post-traduccionales específicos para cada isoforma de tubulina.³⁰

Asimismo, muchos trastornos neurodegenerativos que se caracterizan por la acumulación de proteínas agregadas como ocurre en la Enfermedad de Parkinson se asocian a alteraciones tanto en la interacción con proteínas asociadas a los microtúbulos así como también defectos en la función de transporte neuronal, alteraciones que a su vez se encuentran determinadas por modificaciones post-traduccionales que afectan a la estructura de α -tubulina. Estudios previos han indicado que es probable que las modificaciones post-traduccionales de α -tubulina funcionen como un mecanismo regulador involucrado en el control de procesos tales como la diferenciación, transporte y crecimiento axonal, o la formación de sinapsis con otras neuronas.³¹

2.8 NEUROFILAMENTOS

Se encuentran en gran cantidad en los axones neuronales, donde están involucrados en procesos de crecimiento axonal, mantenimiento del calibre del axón y la transmisión de impulsos eléctricos. En ciertas patologías de tipo neurodegenerativas, los neurofilamentos suelen acumularse en los axones y cuerpos celulares, contribuyendo de esa forma a la muerte neuronal. Son heteropolímeros formados por cuatro subunidades, las cuales se diferencian por sus pesos moleculares, estos son neurofilamentos pesados (NF-H), medios (NF-M), ligeros (NF-L) y α -internexina. Se caracterizan por presentar vidas medias muy largas, y además por tener propiedad de fibras elásticas siendo responsables de dar y mantener la forma asimétrica en las neuronas.³²

Además de cumplir un rol muy importante en cuanto al soporte estructural de las células, estos se ven involucrados en el crecimiento radial del axón, principalmente las subunidades ligeras y medianas. Las subunidades de los neurofilamentos poseen tres dominios, uno de tipo α -helicoidal, una cabeza globular y dominios de cola variables en cuanto a composición aminoacídica y longitud.³³

Las interacciones de los neurofilamentos, ya sea entre sí mismos o con microtúbulos, son reguladas por el dominio de cola variable de neurofilamentos medios, lo cual también influye en la arquitectura y tamaño del citoesqueleto de los axones. Entonces, el dominio de cola altamente fosforilada de la subunidad de neurofilamentos medios es crítico para las funciones ya descritas, pero también se encarga de otorgar a los neurofilamentos la capacidad de resistir la proteólisis.³²

A pesar de que, durante el envejecimiento y la maduración la actividad de las enzimas kinasas disminuye, los dominios de cola variable se fosforilan cada vez más, ya que no sólo se ve afectada la actividad kinasa, sino que también se alteran las fosfatasas. Esto se relaciona directamente con la acumulación de neurofilamentos en los cuerpos celulares, debido a una fosforilación aberrante, donde va a predominar la actividad de las kinasas por sobre las fosfatasas.³⁴

2.9 CITOTOXICIDAD DE AGREGADOS OLIGOMÉRICOS

Existe una gran variedad de estructuras oligoméricas resultantes de la agregación de α -sinucleína, debido a esto, estudios previos proponen que algunas de estas especies están involucradas con la citotoxicidad neuronal. Además, dicha toxicidad podría deberse a efectos generados por fenómenos de estrés oxidativo, fosforilación, nitración o interacciones con lípidos; por lo que se asumen como responsables de inducir la formación de oligómeros con una concentración elevada de hoja β . Estos oligómeros se denominan pre-fibrilares y son los que poseen la capacidad de alterar la membrana para de esta manera modificar la permeabilidad celular, lo que se traduce en un aumento del Ca^{+2} intracelular, ocasionando un desequilibrio iónico que culmina en neurodegeneración y posterior muerte celular.³⁵

Por otro lado, hay evidencias de que al interior de las mitocondrias se localiza una porción de α -sinucleína, la cual al agregar induce dos efectos, la fragmentación mitocondrial y la mitofagia, ocasionando en primera instancia disfunción mitocondrial, para terminar con muerte neuronal. Esto se debe principalmente a que las estructuras oligoméricas inhiben el complejo I de la cadena transportadora de electrones, lo que conlleva a un aumento en las especies reactivas de oxígeno (ROS) y del estrés oxidativo.³⁶

Como se mencionó anteriormente, debido a la relevancia estructural que tiene el citoesqueleto para la estabilidad de células neuronales, en general, es necesario estudiar los efectos de agregados oligoméricos de α -sinucleína sobre este y como su alteración se puede traducir en citotoxicidad y finalmente muerte neuronal. Para esto, se estudió un cultivo de neuroblastoma SH-SY5Y; el cual se evaluó mediante técnica de inmunofluorescencia para 3 anticuerpos distintos: α -tubulina (TU-01), tubulina β -III (TU-20) y neurofilamentos (NF-09), tanto para células control, como para aquellas afectadas por los agregados de α -sinucleína. Además, estos resultados se correlacionaron con la medición de los niveles de LDH obtenidas del medio de cultivo, tanto para células control como para las inducidas con agregados de α -sinucleína.

Basándose en toda esta evidencia científica previamente descrita, específicamente del isotipo β -III de tubulina y las funciones en las que esta proteína podría estar implicada dentro del contexto de las enfermedades neurodegenerativas, es que se vuelve interesante incluir el estudio del comportamiento de esta proteína en la presente investigación, buscando evidenciar el grado de asociación que este dominio tiene con la proteína α -sinucleína y cómo ésta varía en la medida que comienza la formación de estructuras oligoméricas al interior de las células de neuroblastoma SH-SY5Y. Por otro lado, α -tubulina es un heterodímero que contiene subunidades de α y β -tubulina. Corresponden a estructuras y filamentos básicos presente en la mayoría de las células eucariotas. Forma parte de la estructura del citoesqueleto y representa el mayor componente de los microtúbulos. Debido a esto, parece esencial observar como se ve afectada su estructura y disposición en presencia de agregados de α -sinucleína.

Existen estudios recientes que discuten respecto a los neurofilamentos y su posible implicancia en la enfermedad de Parkinson. Los cuerpos de Lewy son depósitos anómalos de proteína α -sinucleína, sin embargo, también se han hallado cantidades no despreciables de neurofilamentos y ubiquitina.³⁷ Estas cantidades aberrantes de neurofilamentos favorecen el proceso de agregación y formación de estructuras oligoméricas de tipo patológicas, las que serán responsables de inducir autofagia y apoptosis en las neuronas dopaminérgicas y con esto conducir a la muerte celular.⁶

CAPÍTULO 3: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESIS

Los agregados oligoméricos de α -sinucleína producen disrupción del citoesqueleto y toxicidad en células de neuroblastoma SH-SY5Y.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar si la acumulación de agregados oligoméricos de α -sinucleína induce disrupción del citoesqueleto y toxicidad en células de neuroblastoma.

3.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar la agregación de α -sinucleína mediante ensayos de fluorescencia.

Estudiar la desestabilización del citoesqueleto en cultivo SH-SY5Y, en presencia de oligómeros, mediante inmunomarcación de α -tubulina, neurofilamentos y tubulina β -III.

Determinar el daño celular inducido por los agregados oligoméricos de α -sinucleína, mediante ensayos de LDH

CAPÍTULO 4: MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 TIPO DE ESTUDIO Y LUGAR DE REALIZACIÓN

La investigación a realizar corresponde a un estudio de tipo experimental, el cual se desarrolló en el laboratorio de Ciencias Aplicada a la Tecnología Médica V (CATEM), sede República, Echaurren 183.

Algunos de los experimentos están basados en protocolos realizados en trabajos previos,³⁸ y fueron adaptados para el desarrollo de esta investigación.³⁸⁻³⁹

4.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y VARIABLES ANALIZADAS

Para el desarrollo de esta investigación, se utilizaron cultivos celulares de neuroblastoma SH-SY5Y, pertenecientes a una línea celular inmortalizada. Se escogió este tipo celular por la posibilidad de obtener células representativas de neuronas dopaminérgicas, luego de un proceso de diferenciación al incubarlas con ácido retinoico y una disminución en los niveles de suero fetal bovino. Se realizó el inmunomarcaje en dos grupos celulares, un grupo control y otro incubado con agregados oligoméricos. Para el análisis de los resultados se consideraron células que presentaban signos de diferenciación, considerando la presencia de prolongaciones o neuritas.

4.3 OBTENCIÓN DE α -SINUCLEÍNA PURIFICADA

La proteína purificada con la cual se trabajó durante todo el proyecto, se obtuvo a partir de procedimientos realizados en proyectos previos, según protocolos estandarizados, los cuales fueron utilizados para obtener el monómero de α -sinucleína y posteriormente evidenciar la obtención de la proteína en un gel de electroforesis.³⁸ Para llevar a cabo dichos protocolos, se utilizaron los siguientes equipos y reactivos, sonicador: Ultrasonic Cleaner SB-100DT; Refrigerador/congelador: Daewoo ® RF-42151; Baño termostático Farmalatina ® DSB-500D; Centrífuga Hettich ® Universal 320R; Filtros Minisart Syringe ® SARTORIUS; Columna ProImac ®; Soluciones de Imidazol en un gradiente de concentración de 10mM a 120mM; Classic Rocking Shaker Sk-R1807-E; Filtros de centrifugación Amicon ® Merck Millipore; Freezer:Panasonic ® MDF-U33U-PB.

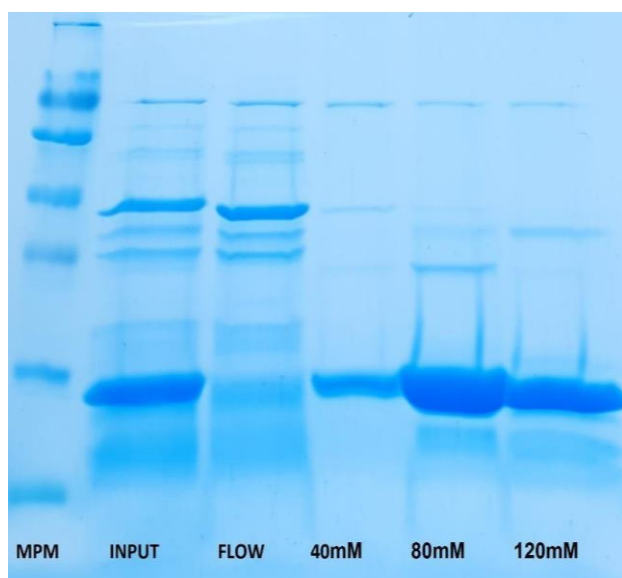


Figura N°4: Electroforesis SDS-PAGE para las distintas eluciones de Imidazol obtenidas durante la purificación proteica en columna manual. De Izquierda a derecha, se observa el marcador de peso molecular (MPM), control positivo de α -sinucleína (INPUT), solución de unión de 10 mM de imidazol (FLOW), y las eluciones de distintas concentraciones de imidazol (40, 80 y

120 mM).

4.4 ELECTROFORESIS EN GELES SDS-PAGE

Para verificar que ciertos procedimientos, tales como la obtención de proteína purificada y ensayos de agregación, fueron realizados correctamente, se utilizó la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida al 15%. En la preparación de los geles se utilizaron los siguientes reactivos: 30% acrilamida / 0.8% Bis-acrilamida, 4x Tris-HCl / SDS pH 8.8, 4x Tris-HCl / SDS pH 6.8, 10% Persulfato de amonio y TEMED. En la ejecución de la electroforesis se empleó el Baño termorregulado Termo Shaker TS-100C Boeco ®, Centrífuga minispín Hitachi ® CT15E, Mini Protean ® Universal 320R. Se llevó a cabo una electroforesis luego de realizar los ensayos de agregación, para verificar que se obtuvieron agregados oligoméricos. Para este procedimiento, se utilizó la proteína monomérica en una concentración de 440 µg/ml y luego esta, se agregó por un tiempo total de 48 horas. Se guardó una alícuota de monómero, luego se guardó una alícuota a las 24 y 48 horas. De cada una de estas alícuotas se diluyó, para estandarizar todo en concentración de 160 µg/ml, se tomó 48 µl más 12 µl de mezcla. Se cargó el gel, en el carril 1, 3 µl del estándar de peso molecular; en el carril 2, 20 µl del monómero; en el carril 3, 20 µl del agregado de 24 horas; en el carril 5, 20 µl del agregado de 48 horas. Se dejó correr la electroforesis durante 15 minutos y se volvió a cargar el gel, exactamente las mismas cantidades, de las mismas muestras en cada carril, como se muestra en la figura N°4. Dicho procedimiento se llevó a cabo 2 veces, para posteriormente realizar análisis estadístico.

4.5 MARCAJE DE MONÓMEROS DE PROTEÍNA

La proteína purificada, se conjugó con fluoróforo Alexa Fluor 488 NHS Succinimidyl Éster (Invitrogen ®), con el fin de monitorear la presencia de oligómeros de α -sinucleína y correlacionar sus efectos con la integridad del citoesqueleto celular.

El fluoróforo se diluyó en buffer DMSO; 0,2 mg de fluoróforo en 310 µl de buffer DMSO, y se realizaron alícuotas de 62 µl cada una en concentración 1mM.

Posteriormente, a 1 ml de proteína almacenada a -20°C en buffer PBS 0,1 mM (pH 7,4) se le realizó un cambio de buffer a bicarbonato sódico para que la reacción ocurra a pH 8.3, utilizando filtros de centrifugación Amicon ® Merck Millipore y centrífuga Hettich ® Universal 320R. Se añadió a la proteína una alícuota del fluoróforo diluido y la reacción se llevó a cabo durante 4 horas, a 37°C . Posteriormente se incubó a 4°C durante toda la noche, ambos pasos se llevaron a cabo en Classic Rocking Shaker Sk-R1807-E.

Finalmente, se realizó cambio de buffer, de bicarbonato a PBS en concentración 25 mM con filtros de centrifugación Amicon ® Merck Millipore y centrífuga Hettich ® Universal 320R, se alicuotó la proteína en volúmenes de 100 μl y se almacenó a -20°C hasta su uso.

4.6 ENSAYO DE AGREGACIÓN

Mediante ensayos de agregación, se monitoreó tanto la agregación de α -sinucleína conjugada con Alexa Flúor 488 NHS Succinimidyl Éster, como el contenido de hoja β presente en los estados agregados de la proteína, para este último caso se utilizó Tioflavina T. Cabe destacar que para realizar los ensayos se cargó en todos los pocillos que se encuentran al borde de la microplaca 300 μl de agua destilada, con el fin de mantener las condiciones de humedad y así evitar la evaporación de las muestras.

a.- Monitoreo de agregación de α -sinucleína marcado.

En microplaca de cultivo de 96 pocillos se añadieron 200 μl de monómero en concentración 30 μM conjugado con Alexa, en dos pocillos, y en forma paralela 200 μl de buffer PBS 0,1 mM a pH 7,4 en 2 pocillos, a modo de control.

Se midió la intensidad de fluorescencia en tiempo “0” en Fluorímetro Sinergy H1 BioTek ® con longitudes de onda de excitación 491 nm y emisión 519 nm. Luego, se

incubaron las muestras en tubos eppendorf a 37°C y 300 rpm durante 24 horas en Shaker ZHCHENG ZHWY-100B. Al cumplir las 24 horas, se volvió a medir en Fluorímetro, cargando el mismo volumen de proteína y buffer en la microplaca. Se continuó con la incubación bajo las mismas condiciones hasta las 48 horas y se midió nuevamente en fluorímetro. Para cada uno de los tiempos de medición se almacenaron 200-500 µl de proteína, para representar la agregación a la hora correspondiente. Finalmente los oligómeros obtenidos fueron almacenados en alícuotas de 25 µl a -20°C.

b.- Monitoreo del contenido de hoja β utilizando Tioflavina T (ThT).

Para determinar el contenido de hoja β de los agregados proteicos de α-sinucleína, se llevó a cabo un ensayo bajo las mismas condiciones descritas en el ensayo “a” (37°C, 300 rpm). Utilizando una microplaca se cargaron 100 µl de proteína purificada en concentración 30 µM en duplicado para tiempo “0” y en paralelo 2 pocillos con 100 µl cada uno de buffer PBS, como control de agregación.³⁹⁻⁴⁰

La Tioflavina T se utilizó a una concentración de 25 µM, en el mismo volumen que el de la muestra por cada pocillo (100 µl). La incubación se lleva a cabo en Thermo Shaker Incubator MB100-4A, durante una hora para medir el tiempo “0”, donde se añadieron 100 µl de ThT a 2 pocillos con proteína y a 2 pocillos con buffer, luego se midió fluorescencia a una longitud de onda de 440 nm de excitación y 485 nm de emisión en Fluorímetro Sinergy H1 BioTek ®. El mismo procedimiento se repitió para medir los siguientes tiempos correspondientes.⁴⁰

Luego, se incubaron las muestras en tubos eppendorf a 37°C y 300 rpm durante 24 horas en Shaker ZHCHENG ZHWY-100B. Al cumplir las 24 horas, se volvió a incubar con ThT durante una hora, cargando el mismo volumen de proteína, buffer y ThT en la microplaca, luego se volvió a medir en fluorímetro. Se continuó con la incubación bajo las mismas condiciones hasta las 48 horas. Para cada uno de los tiempos de medición se almacenaron 200-500 µl de proteína, para representar la agregación a la hora correspondiente. Finalmente los oligómeros obtenidos fueron almacenados en alícuotas de 25 µl a -20°C.

4.7 MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA DE REFLEXIÓN INTERNA TOTAL (TIRF)

Los oligómeros marcados con Alexa 488 NHS se analizaron en un microscopio Olympus IX81 conectado a una cámara Pixelink PL-B778F. Las muestras se diluyeron 1:10 en agua ultrapura. Se colocaron 5 µl sobre los cubreobjetos Menzel-Glaser (1,5 x 24 x 60 mm) sobre ig TIRF (TIRF LAB). El láser de 465 nm se conectó al Lanzador de Luz de Excitación de Extremo Lateral (TIRF LAB) para excitar el fluoróforo Alexa Fluor 488 succinimidil ester (NHS), Thermo fisher. Se seleccionó filtro adecuado (FITC/EGFP/Fluo 3/DiO Acridine Orange (+ DNA)). Luego de excitar el fluoróforo se obtuvieron imágenes escaneando la superficie de los cubreobjetos utilizando el software Pixelink Capture OEMa (exposición 250 ms y ganancia 8 db).

4.8 CULTIVO CELULAR

Células de neuroblastoma SH-SY5Y se cultivaron a 37°C en una atmósfera humidificada a 5% de CO₂, utilizando Estufa MMM Group®, CO₂Cell 190 Standard, en medio de cultivo DMEM 1X (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium) suplementado con suero fetal bovino al 20%® Biowest, ampicilina 1%® SIGMA-ALDRICH y estreptomina 1%® SIGMA-ALDRICH, para un volumen total de medio de 6 ml en Cell culture flasks T25. Para obtener células diferenciadas se añadió ácido retinoico® Sigma a una concentración de 10 µM. Se diferenciaron por aproximadamente 72 horas y se hizo cambio de medio por días alternos, según la revisión bibliográfica realizada.⁴¹

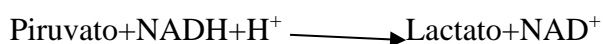
4.9 EVALUACIÓN DE INESTABILIDAD DEL CITOESQUELETO MEDIANTE INMUNOMARCACIÓN EN CULTIVO

Las células, previamente incorporadas con monómeros de α -sinucleína, se traspasaron a cubreobjetos de vidrio. Después, las células se lavaron dos veces con Buffer PBS 0,1 mM: (137 mM de NaCl, 10 mM de Na₂HPO₄, 2,7 mM de KCl, 1,76 mM KH₂PO), se fijaron durante 30 minutos con paraformaldehído al 4% a temperatura ambiente, se lavaron tres veces con Buffer PBS y se permeabilizaron durante 10 minutos con Tritón X100 0,5%, ® SIGMA-ALDRICH diluido en PBS. Se lavaron nuevamente, tres veces con Buffer PBS. Las células se incubaron con solución de bloqueo de proteínas BSA 1%, SIGMA-ALDRICH ® durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubaron a 37°C durante una hora con el anticuerpo β -III Tubulin Monoclonal Antibody (TU-20) ®, Invitrogen, que reconoce de manera específica el isotipo β -III de tubulina, diluido en bloqueo de proteínas BSA 0,1%, SIGMA-ALDRICH ®. Las células se lavaron 3 veces en PBS. Se realizó la incubación con el anticuerpo secundario Alexa Flúor™ 488 Goat anti-Mouse IgG por una hora a temperatura ambiente. Las células se lavaron nuevamente 3 veces en PBS. Posteriormente las células se montaron en portaobjetos junto con 4',6-diamidino-2-fenilindol (VECTASHIELD ®, Vector). Se realizó el mismo procedimiento para el resto de los anticuerpos primarios utilizados en la investigación, α -Tubulin Monoclonal Antibody (TU-01) ®, Invitrogen, y NF-09 (IgG2a) mouse monoclonal antibody against unphosphorylated NF-M ®, Invitrogen.⁴⁰⁻⁴² Cabe destacar que inicialmente se pensaba utilizar actina como otro marcador para citoesqueleto, sin embargo, este se cambió por α -tubulina.

La observación de las láminas inmunofluorescentes, junto a la captura de imágenes de estas mismas, se realizó en un microscopio Olympus BX61.

4.10 DETERMINAR LA CITOTOXICIDAD MEDIANTE ENSAYOS CINÉTICOS POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE LDH

Para la determinación de la actividad enzimática de lactato deshidrogenasa (LDH) existente en el sobrenadante del cultivo celular, se utilizó el kit LDH SCE, LiquiUV, Human. Este kit, permite a través de un método cinético, la determinación de la actividad de LDH catalizando la reducción de piruvato a lactato.



En la medición de la actividad enzimática se utilizó un espectrofotómetro mindray BA 88A, Valtek, donde el NADH se midió a 340 nm. Para llevar el procedimiento a cabo, se preparó la solución de trabajo con 2 ml de SUB (sustrato \rightarrow NADH 0,8 mmol/L), más 8 ml de BUF (Buffer Tris pH 7.0 50 mmol/L, Piruvato 1,5 mmol/L). Para la reacción, se cargaron 10 μ l de muestra en 1000 μ l de solución de trabajo, y se midió en espectrofotómetro a 37°C a una longitud de onda de 340 nm durante 180 segundos.

4.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS

El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad Prism 6.0. Los datos se presentan como media \pm SEM y se analizaron mediante dos test de tipo paramétricos. Se utilizó one-way ANOVA en el análisis de los datos de ensayos de agregación correspondiente a las figuras 6, 8, 9 y 10; también para el análisis de los datos de medición de LDH en la figura 22. Para el análisis de los datos obtenidos de los histogramas de los marcadores fluorescentes en los cultivos celulares, que son las

figuras 16 y 21, se utilizó T-Student. La significancia se determinó individualmente para cada análisis realizado.

CAPÍTULO 5. RESULTADOS

5.1 “Evaluar la agregación de α -sinucleína mediante ensayos de fluorescencia”.

Para determinar el tiempo ideal de agregación, se realizaron dos tipos de mediciones en Fluorímetro Synergy H1; basada en la fluorescencia mediada por ThT y la fluorescencia que entrega la proteína marcada con Alexa Flúor 488 NHS. Todas las mediciones fueron realizadas en duplicado y los ensayos se realizaron un mínimo de tres veces para asegurar su reproducibilidad.

Para verificar que el marcaje de la proteína se realizó correctamente, se cargó un gel SDS-PAGE y se observó mediante un transiluminador. Al utilizar una luz azul, se logra observar el monómero marcado con Alexa 488 NHS cargado a dos concentraciones distintas, 15 μ M en el carril de la izquierda y 30 μ M en el carril de la derecha.

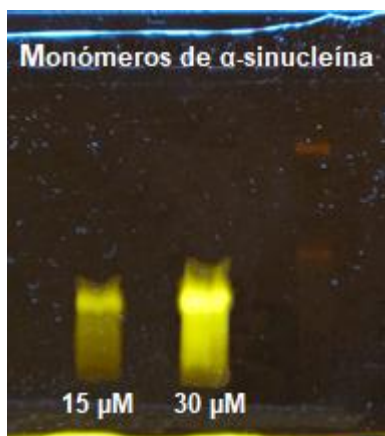


Figura N°5: Gel de electroforesis SDS-PAGE. Se observa monómero de α -sinucleína marcado con Alexa Flúor 488 NHS, en 2 diluciones distintas.

La figura 6 representa las mediciones obtenidas mediante fluorímetro (440 ex/485 em), luego de la incubación con ThT, para determinar el contenido de hoja β luego de 0, 24 y 48 horas de agregación. Un aumento en los valores de la medición implican una mayor presencia de agregados oligoméricos de α -sinucleína.

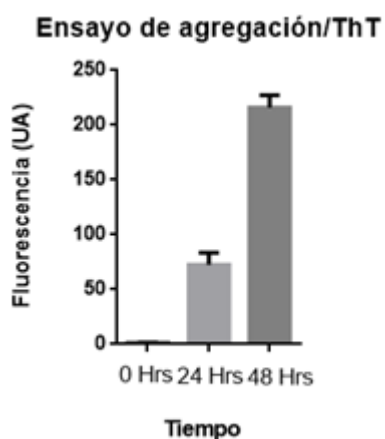


Figura N°6: Gráfico que representa los resultados de la agregación de α -sinucleína medidos a las 0, 24 y 48 horas. Para realizar la medición se utilizó Tioflavina T (440 ex/485 em)(n = 2, **** P \leq 0,0001).

Para observar las distintas estructuras que se forman durante el proceso de agregación, se cargó en un gel SDS-PAGE, proteína de distintos tiempos de agregación, 0, 24 y 48 horas (figura 9 carril 2, 3 y 5, respectivamente). Al teñir con solución de Coomassie se evidencian estructuras de distinto peso molecular.

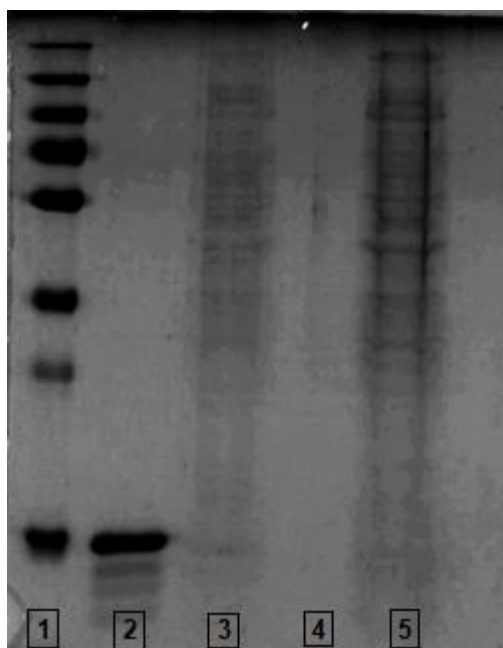


Figura N°7: Gel de electroforesis SDS-PAGE teñido con solución de Coomassie en donde se evidencia la agregación de α -sinucleína. De izquierda a derecha se cargó el peso molecular (carril N°1), monomero de α -sinucleína (carril N°2), α -sinucleína con 24 horas de agregación (carril N°3) y α -sinucleína con 48 horas de agregación (carril N°5).

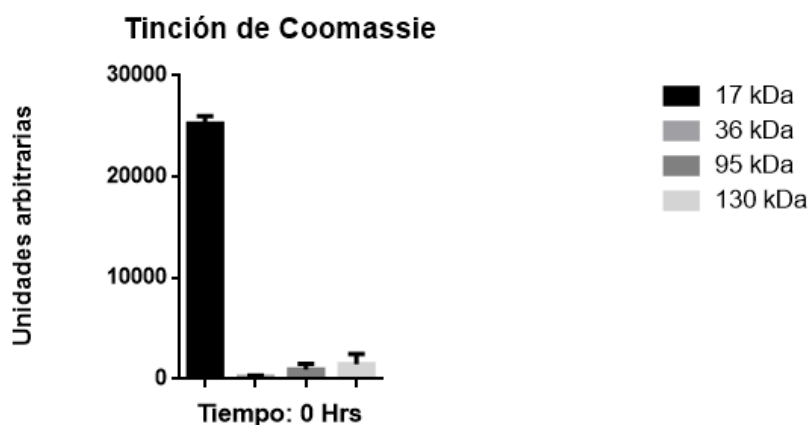


Figura N°8: Gráfico que representa la expresión de distintas bandas en gel de electroforesis SDS-PAGE teñido con solución de Coomassie. Los datos para realizar el gráfico fueron obtenidos previo análisis de área para cada banda en el programa Image J (n = 2, **** P ≤ 0,001).

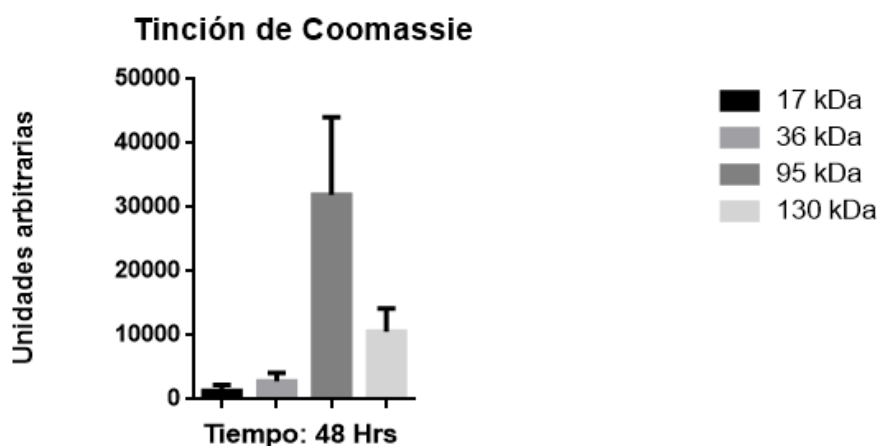


Figura N°9: Gráfico que representa la expresión de distintas bandas en gel de electroforesis SDS-PAGE, teñido con solución de Coomassie, tras 48 horas de agregación. Los datos para realizar el gráfico fueron obtenidos previo análisis de área para cada banda en el programa Image J (n = 2, * P ≤ 0,1).

Se realizó el análisis de la figura 7 mediante el software Image J. Se analizaron las bandas de 17, 36, 95 y 130 kDa obtenidas en el carril 2, que corresponde a las 0 horas de agregación (figura 8). Se realizó el mismo procedimiento para analizar las bandas obtenidas a las 48 horas de agregación (carril 5, figura 9).

A las 0 horas de agregación, la banda que predomina es la que se observa aproximadamente a los 17 kDa y que corresponde al monómero de α -sinucleína (figura 8), mientras que a las 48 horas de agregación, la banda de 17 kDa disminuye considerablemente, y la que predomina es la de 95 kDa correspondiente a estructura oligoméricas (figura 9).

Para determinar la agregación de la proteína marcada, se midió utilizando Fluorímetro Synergy H1, al excitar el fluoróforo Alexa Flúor 488 NHS, conjugado con la proteína, a una longitud de onda 419/519 nm (excitación/emisión). Las mediciones se realizaron luego de 0, 24 y 48 horas de agregación. Un aumento en los valores de la medición indican la presencia de una mayor cantidad de estructuras oligoméricas.

Ensayo de agregación/Alexa 488 NHS

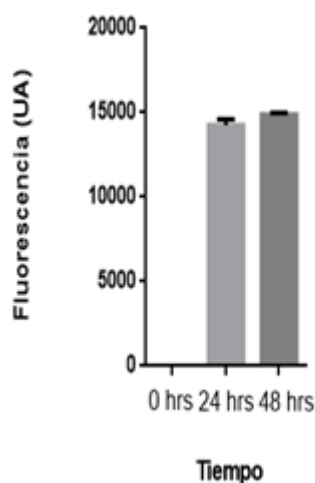


Figura N°10: Gráfico que representa los resultados de la agregación de α -sinucleína marcada con Alexa Flúor 488 NHS (n = 2, **** P \leq 0,0001).

Para verificar la formación de agregados de α -sinucleína marcados con Alexa flúor 488 se observó mediante microscopía TIRF (figura 8 A), la proteína que se incubó durante 48 horas. La figura (B) corresponde a un histograma realizado a partir de la imagen (A), utilizando un “script” desarrollado en el software Matlab®.

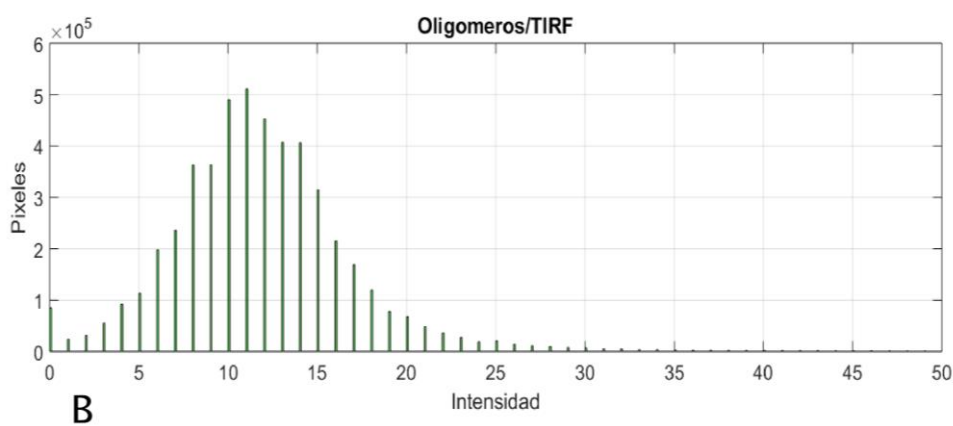
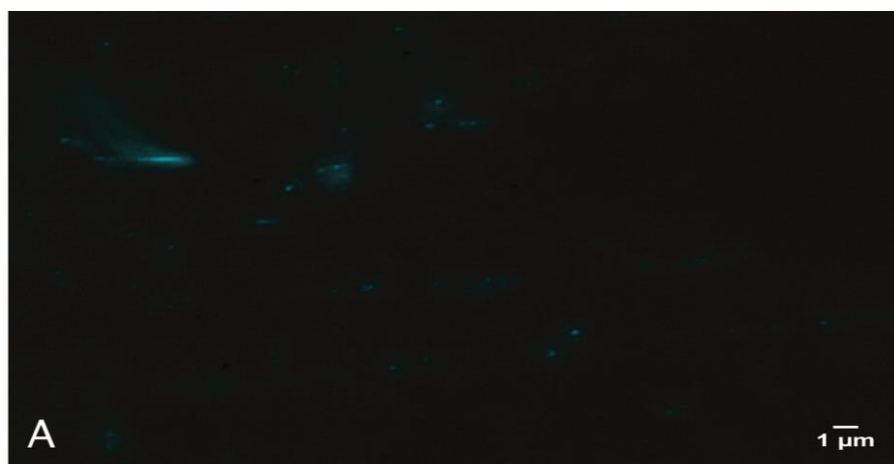


Figura N°11: (A) Imagen obtenida mediante microscopía TIRF. (B) Histograma realizado en Matlab®, el cual representa la cantidad de pixels iluminados y su distribución en la imagen A.

5.2 “Estudiar la desestabilización del citoesqueleto en cultivo SH-SY5Y, en presencia de oligómeros, mediante inmunomarcación de α -tubulina, neurofilamentos y tubulina β III”.

Para determinar el efecto de agregados de α -sinucleína en células SH-SY5Y, se realizó inmunomarcaje con anticuerpos α -tubulina (TU-01) y tubulina β III (TU-20), tanto para un grupo control como para células incubadas previamente con oligómeros.

CONTROL ALFA TUBULINA

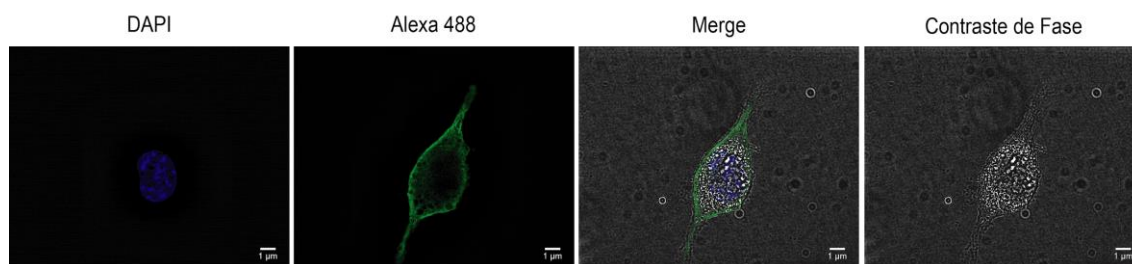


Figura N°12: Inmunomarcaje utilizando el anticuerpo primario α -tubulina (TU-01) y anticuerpo secundario Alexa Flúor 488 en células control SH-SY5Y. Escala 1 μ m. Se observa un expresión de α -tubulina (alexa 488) en la mayor parte de del cuerpo neuronal, excluyendo el sector cercano al núcleo (DAPI). La última imagen corresponde a un contraste de fase que permite distinguir los límites celulares, mientras que la imagen Merge corresponde a una combinación de las imágenes anteriores que entrega un contexto general de la distribución del inmunomarcaje.

OLIGÓMERO ALFA TUBULINA

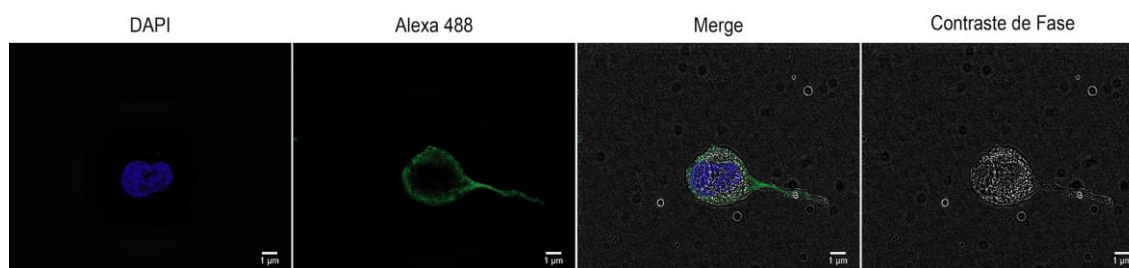


Figura N°13: Inmunomarcaje utilizando el anticuerpo primario α -tubulina (TU-01) y anticuerpo secundario Alexa Flúor 488 en células SH-SY5Y incubadas con oligómeros (48 horas de agregación). Escala 1 μ m. Se observa un expresión de α -tubulina (alexa 488) en la mayor parte de del cuerpo neuronal, excluyendo el sector cercano al núcleo (DAPI). La última imagen corresponde a un contraste de fase que permite distinguir los límites celulares, mientras que la imagen Merge corresponde a una combinación de las imágenes anteriores que entrega un contexto general de la distribución del inmunomarcaje.

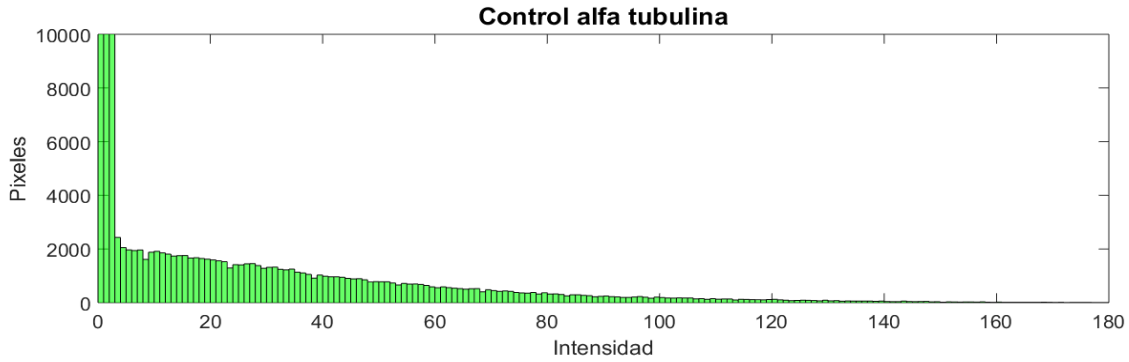


Figura N°14: Histograma realizado mediante el análisis del marcaje con Alexa Flúor 488 en células control (figura 12). Representa la distribución de los puntos iluminados en la imagen, determinados mediante un “script” en el software Matlab®.

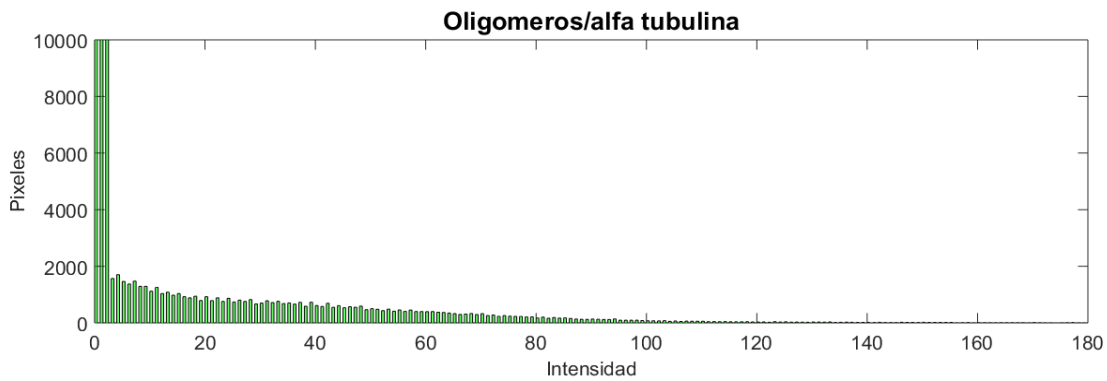


Figura N°15: Histograma realizado mediante el análisis del marcaje con Alexa Flúor 488 en células incubadas con oligómeros (figura 13). Representa la distribución de los puntos iluminados en la imagen, determinados mediante un “script” en el software Matlab®.

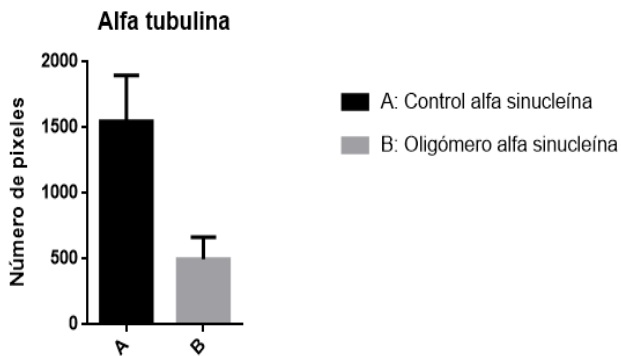


Figura N°16: Gráfico que representa los resultados obtenidos luego del análisis de los puntos iluminados con Alexa Flúor 488 en 5 células distintas pertenecientes al mismo cultivo, ya sea control como aquellas incubadas con oligómeros (n=3, * P ≤ 0,1).

CONTROL TUBULINA β III

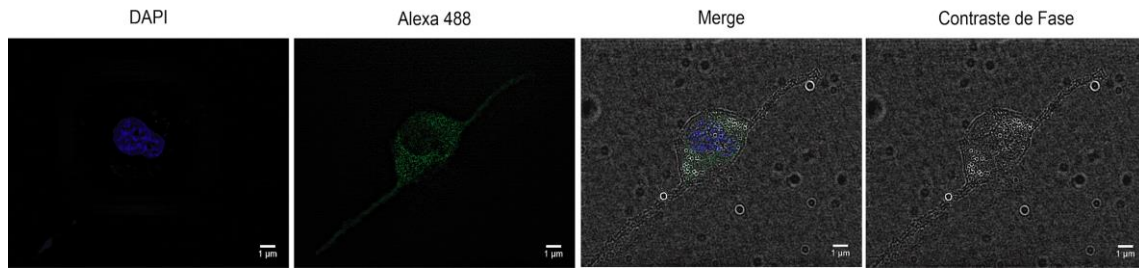


Figura N°17: Inmunomarcaje utilizando el anticuerpo primario tubulina β -III (TU-20) y anticuerpo secundario Alexa Flúor 488 en células control SH-SY5Y . Escala 1 μ m. Se observa un expresión de β -tubulina (alexa 488) en la mayor parte de del cuerpo neuronal, excluyendo el sector cercano al núcleo (DAPI). La última imagen corresponde a un contraste de fase que permite distinguir los límites celulares, mientras que la imagen Merge corresponde a una combinación de las imágenes anteriores que entrega un contexto general de la distribución del inmunomarcaje.

OLIGÓMERO TUBULINA β III

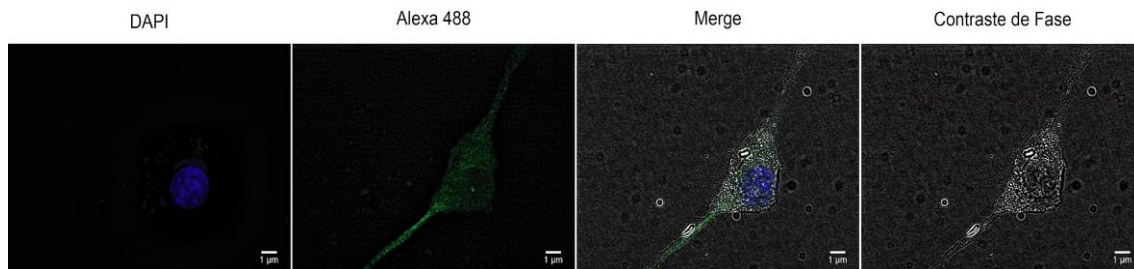


Figura N°18: Inmunomarcaje utilizando el anticuerpo primario tubulina β -III (TU-20) y anticuerpo secundario Alexa Flúor 488 en células SH-SY5Y incubadas con oligómeros (48 horas de agregación). Escala 1 μ m. Se observa un expresión de β -tubulina (alexa 488) en la mayor parte de del cuerpo neuronal, excluyendo el sector cercano al núcleo (DAPI). La última imagen corresponde a un contraste de fase que permite distinguir los límites celulares, mientras que la imagen Merge corresponde a una combinación de las imágenes anteriores que entrega un contexto general de la distribución del inmunomarcaje.

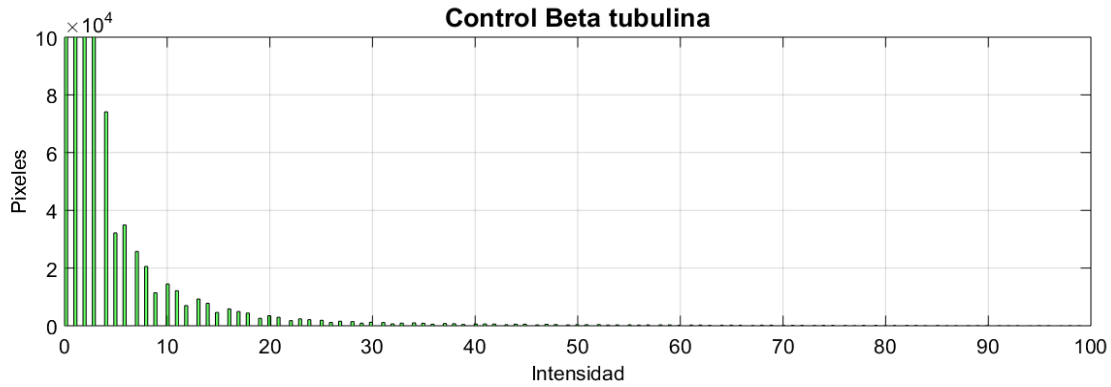


Figura N°19: Histograma realizado mediante el análisis del marcaje con Alexa Flúor 488 en células control (figura 17). Representa la distribución de los puntos iluminados en la imagen, determinados mediante un “script” en el software Matlab®.

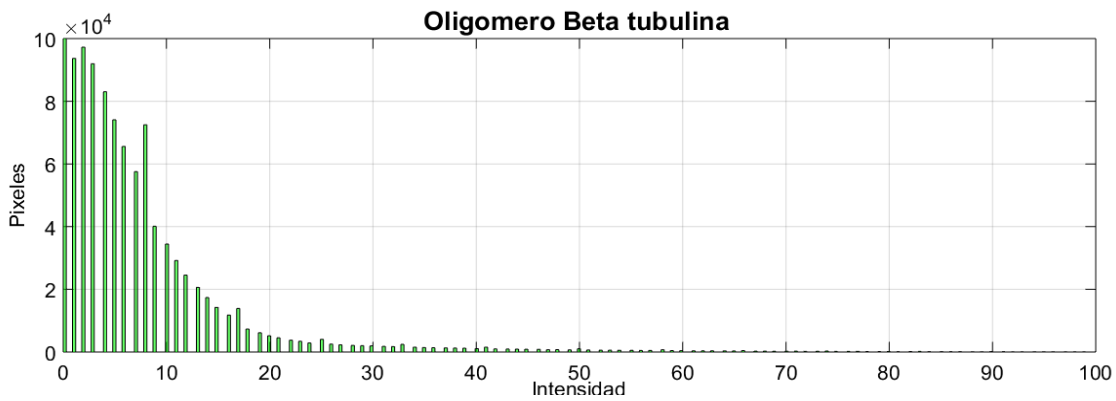


Figura N°20: Histograma realizado mediante el análisis del marcaje con Alexa Flúor 488 en células incubadas con oligómeros (figura 18). Representa la distribución de los puntos iluminados en la imagen, determinados mediante un “script” en el software Matlab®.

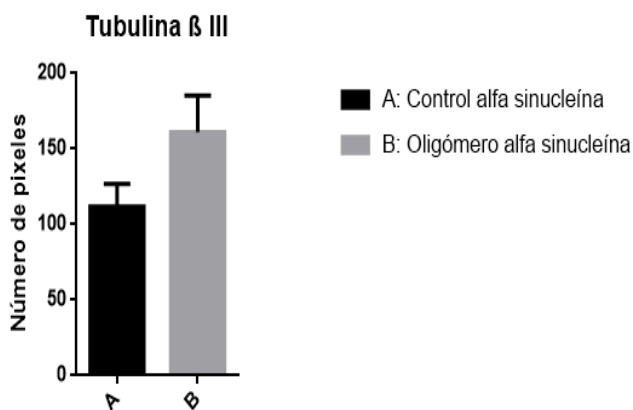


Figura N°21: Gráfico que representa los resultados obtenidos luego del análisis de los puntos iluminados con Alexa Flúor 488 en 5 células distintas, ya sea control como aquellas incubadas con oligómeros (n=3, * P ≤ 0,1).

Dentro de los objetivos iniciales de esta investigación, el anticuerpo para neurofilamentos NF-09 era parte de los marcadores utilizados para evaluar los efectos de los agregados oligoméricos en células SH-SY5Y, pero debido a que los resultados obtenidos no se correlacionan con la marcación esperada, según datos bibliográficos revisados en este tipo celular, se decidió dejar fuera de las variables analizadas. Estos defectos en el inmunomarcaje son atribuibles probablemente a la manipulación inadecuada durante la etapa pre-analítica.

5.3 “Determinar el daño celular inducido por los agregados oligoméricos de α -sinucleína, mediante ensayos de LDH”.

Para determinar el grado de citotoxicidad que generan los agregados oligoméricos en células SH-SY5Y, se recuperó el medio de cultivo de células control y aquellas incubadas con oligómeros. Se midió la concentración de la enzima lactato deshidrogenasa mediante un ensayo cinético por espectrofotometría.

Espectrofotometría de enzima LDH

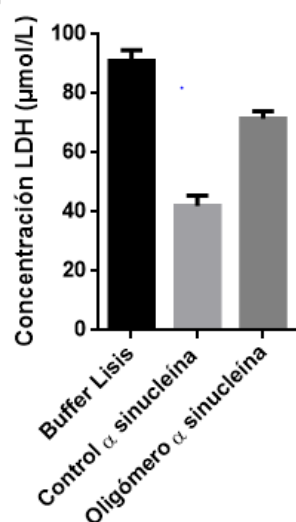


Figura N°22: Gráfico que representa la concentración de la enzima lactato deshidrogenasa en células control y aquellas incubadas con oligómeros. En la columna A se muestran los valores que arrojó la medición del Buffer de Lisis, como control positivo de los niveles máximos de LDH celular. En la columna B se muestra el resultado de las células control sin tratamiento, y en la columna C se muestran los resultados para las células tratadas con

oligómero de alfa sinucleína. (n = 2, ** P ≤ 0,001). Por lo tanto, permitió evidenciar un aumento en los niveles de LDH en las células tratadas (columna C), lo que demuestra entonces la toxicidad inducida por la presencia de estructuras oligoméricas.

CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN

La presente unidad de investigación se llevó cabo continuando con procedimientos realizados en el CATEM V en investigaciones anteriores, esto implica, que para las etapas de obtención y purificación de proteína recombinante se realizaron protocolos ya estandarizados ³⁹.

6.1 EVALUAR LA AGREGACIÓN DE α -SINUCLEÍNA MEDIANTE ENSAYOS DE FLUORESCENCIA

6.1.1 PURIFICACIÓN Y MARCAJE DE MONÓMERO

La proteína se obtuvo a partir de un cultivo bacteriano de *Escherichia coli* BL21 (DE3) según protocolos estandarizados anteriormente, se purificó utilizando una columna manual Pro Imac. Como se observa en la figura 4, a distintas concentraciones de imidazol, se logró obtener proteína purificada a concentración 80 mM de imidazol. A partir de esta purificación, se realizó el inmunomarcaje del monómero de alfa sinucleína al conjugarse con el fluoróforo Alexa Flúor 488 Succinimidyl Éster (NHS) como se observa en la figura 5.

Como se comentó en el marco teórico, la estructura de alfa sinucleína se divide en 3 regiones, una amino terminal, una región denominada NAC y la región carboxilo terminal. La región amino terminal comprende desde el residuo 1 hasta el 60, tiene carga positiva, es anfipático, y presenta un motivo hexamérico altamente conservado, que está constituido por la secuencia aminoacídica “KTKEGV”. Esta región amino es esencial para el marcaje de la de α -sinucleína pues los ésteres NHS se utilizan

frecuentemente para marcar aminas primarias (NH₂) presente tanto en el extremo N de la cadena polipeptídica como también las presentes en la cadena lateral de los residuos de lisina. Debido a sus propiedades anfipáticas, es que estas aminas se orientan frecuentemente hacia afuera de la estructura proteica, permitiendo que sean accesibles para su conjugación sin la desnaturalización o pérdida estructural.⁴³

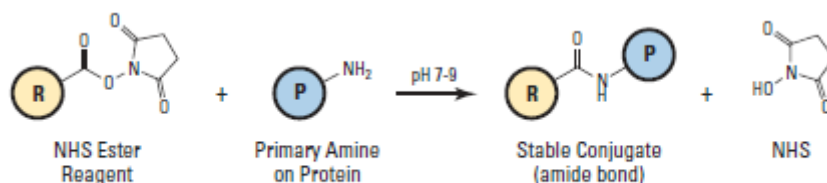


Figura N°23: Esquema de la interacción entre grupos NHS y aminas primarias presente en las proteínas.⁴³

Existen diversos grupos reactivos para marcar aminas primarias pero el más comúnmente utilizado es el grupo N-hidroxisuccinimida éster (NHS esters). Los grupos NHS reaccionan con aminas en condiciones ligeramente alcalinas para producir enlaces amida estables. Por este motivo, se utilizó bicarbonato de sodio para que la reacción ocurra a pH 8.3.⁴³⁻⁴⁴

Como se observa en la figura 5 el monómero marcado se corrió en un gel de acrilamida SDS-PAGE y se observó mediante un transiluminador SmartView MUVC-111, el cual incorpora una luz azul que permite excitar en el rango de los 488 nm haciendo posible la visualización del monómero marcado. Esto permitió verificar que el primer objetivo correspondiente al procedimiento del marcaje de la proteína se realizó efectivamente sobre la forma monomérica de α -sinucleína, debido a que se obtuvo una banda de aproximadamente 17 kDa, lo que representa la expresión de α -sinucleína en estado monomérico, cuya masa molecular es de 14.460 kDa, lo que concuerda con los datos bibliográficos revisados.⁴⁻⁴⁵

6.1.2 AGREGACIÓN DE PROTEÍNA

En estudios de patologías neurodegenerativas, se postula que estas se desarrollan en base a un mecanismo común, el cual engloba tanto un nivel celular, como molecular. Dicho mecanismo incluye la formación de cuerpos de inclusión y la agregación de proteínas.¹²

Para monitorear la agregación de α -sinucleína, se llevaron a cabo ensayos de agregación in-vitro, estos requieren ajustar una serie de condiciones con el fin de obtener resultados fidedignos y reproducibles. En primer lugar, una vez purificada la proteína, se midió la concentración de ésta en Fluorímetro Synergy H1 BioTek®, basándose en la fluorescencia intrínseca de esta proteína, otorgada por la presencia de aminoácidos aromáticos en su composición. La longitud de onda que se utilizó es 275 nm para excitación y 310 nm para emisión, lo cual corresponde al aminoácido tirosina (Tyr); a lo largo de la secuencia aminoacídica de α -sinucleína se encuentran 4 residuos de Tyr.⁴⁶

De acuerdo a la revisión bibliográfica, se sugiere para los ensayos de agregación utilizar la proteína en concentración de 35 μ M a 70 μ M, sin embargo en estos ensayos se estandarizó una concentración de 30 μ M, cuya concentración fue medida con el método de la fluorescencia intrínseca.⁴⁷ Esto permite mantener un control respecto de la disponibilidad de monómero en el medio, debido a que existe una relación directamente proporcional entre la cantidad de proteína soluble y la formación de agregados, es decir, que a mayor concentración de monómeros de proteína se produce una mayor elongación de las fibrillas. Por lo tanto, al mantener una concentración estándar, se conoce la cantidad de monómero disponible y por ende, se sabe que se agotará progresivamente durante la reacción y los agregados formados no se podrán seguir elongando.⁴⁸

Otro factor a tener en consideración es el buffer, y para esto se probaron los ensayos de agregación en buffer fosfato, tris y PBS. Estos ensayos se desarrollaron en forma

paralela, de modo que la única variable fue el buffer, y a pesar que existen estudios donde señalan que las sales pueden inducir la formación de diferentes oligómeros de amiloide α -sinucleína, con el buffer que se obtuvieron mediciones más estables de ThT fue con PBS. Además de la elección del buffer, es importante el pH de éste, hay estudios donde varían las condiciones de pH, realizando pruebas a 7,4, como también con una leve disminución, en un rango de 6,3-6,5.⁴⁸ La morfología de las oligómeros obtenidas no presenta alteración, sin embargo, esta leve acidificación del pH genera un aumento en la nucleación secundaria y una disminución en la afinidad de los oligómeros por la unión a ThT. Por esta razón, los ensayos de agregación se llevaron a cabo a pH fisiológico, en buffer PBS.⁴⁹

La temperatura, también ejerce efectos sobre la agregación de α -sinucleína, particularmente, en la formación de oligómeros de tipo amiloide, con contenido de hoja β . La temperatura elevada, 37°C, incrementa la velocidad de la reacción de formación y elongación de agregados, ayudando a superar las altas barreras energéticas, sobre todo en el caso de la nucleación primaria.⁴⁸

Un último factor externo involucrado en la agregación de la proteína, corresponde a la agitación, la cual ejerce una acción mecánica en donde aumenta la colisión entre monómeros y oligómeros, generando un efecto potenciador de la agregación y obtención de especies oligoméricas. Se describe el uso de agitación en un rango entre 120 hasta 900 rpm, y en concordancia con estos datos, de acuerdo a los ensayos de agregación llevados a cabo, se determinó como agitación óptima el uso de 300 rpm.⁴⁷

Los ensayos de agregación fueron monitoreados utilizando como marcador fluorescente la tioflavina T, en una concentración de 25 μ M. La ThT se une específicamente a estructuras en conformación de hoja β , es por esto que un aumento en los valores obtenidos de la medición de ThT implica un aumento en el contenido de hoja β en los agregados oligoméricos, manteniendo así una relación directamente proporcional.²¹ Para que se genere esta unión, requiere de una incubación durante un período de una hora, manteniendo las mismas condiciones del ensayo de agregación, 37°C y agitación a 300 rpm.

Los datos obtenidos de la medición con el fluorímetro fueron todos analizados estadísticamente, y tanto la figura 6 y 7 concuerdan con los datos bibliográficos, en donde manteniendo las condiciones previamente estandarizadas, se logró realizar los ensayos de agregación y monitorearlos a través del uso de ThT, comprobando esto en la figura 6 donde los valores de ThT están próximos a 0, indicando que en la forma monomérica no existe contenido de hoja β , luego en la figura 7, en el segundo carril correspondiente al monómero, sólo se observa una banda a nivel de los 17kDa. Para el tiempo 24 hrs, la figura 6 permite establecer que a mitad del tiempo de incubación ya se están formando estructuras de tipo oligoméricas ya que hay un aumento en el contenido de hoja β y queda en evidencia en la figura 7, donde a nivel de los 17 kDa ya no se observa ninguna banda, por ende los monómeros disponibles en solución están formando agregados como dímeros y tetrámeros. Finalmente en el tiempo 48 hrs, en la figura 6, existe una diferencia totalmente considerable respecto a lo que se observa en el tiempo 0, lo que se condice con la figura 7 donde nuevamente no se observan bandas a nivel del monómero, pero se observan bandas de hasta incluso 250 kDa, es decir estructuras oligoméricas como tal.

La figura 7, correspondiente al gel de electroforesis, representa una población de monómeros en el tiempo 0, la mitad del tiempo de agregación a las 24 horas y la formación de oligómeros en el tiempo 48. Esta figura fue analizada utilizando Image J, un software que cuenta con herramientas para análisis de imágenes. Para realizar el análisis fue necesario llevar la imagen a una escala de grises y posteriormente los datos arrojados por el Image J se graficaron como se ilustra en la figuras 8 y 9. Estos gráficos fueron hechos en función de los tiempos medidos en el ensayo de agregación 0, 24 y 48; se estableció una comparación de las bandas marcadas en cada gel de acuerdo al estándar de peso molecular en kDa. La figura 8 demuestra que en el tiempo 0 predomina una población de proteína monomérica, entorno a los 17 kDa, con diferencias estadísticamente significativas respecto a las bandas de 36, 95 y 130 kDa del mismo tiempo 0.

Por otro lado, la figura 9 fue analizada de la misma forma, pero esta vez para el

tiempo de 48 horas de agregación, se observa que efectivamente la mayor cantidad de proteína ya no se encuentra a la altura del monómero, sino que la población se encuentra distribuida mayormente en torno a los 95 kDa, lo que concuerda con lo observado en la figura 7 y por ende se confirmó la formación de agregados oligoméricos de α -sinucleína, existiendo incluso algunos oligómeros en torno a los 130 kDa.

Es importante mencionar, que el grado de confianza con el que se realizó el análisis estadístico de la figura 9 fue de un 90%, sin embargo, el resultado obtenido del gel en la figura 7, junto a los valores de la medición de ThT de la figura 6, constituyen el respaldo de la figura 9, es decir, que a pesar de tener un error del 10%, se confirmó la formación de oligómeros a las 48 horas de agregación.

Otro modo que se utilizó para monitorear la agregación, fue desarrollar el mismo ensayo de agregación, bajo las mismas condiciones, pero esta vez se hizo a partir del monómero marcado Con Alexa Flúor 488 NHS. Se midió en el fluorímetro el tiempo 0, 24 y 48, con una longitud de onda de 491 nm de excitación y 519 nm de emisión. Como se observa en la figura 10, en el tiempo 0 no hay emisión de fluorescencia, sin embargo, tanto en el tiempo 24 como 48 horas, se observa un aumento considerable en la fluorescencia, y por ende indica un aumento en la formación de agregados oligoméricos. La forma de evidenciar la formación de oligómeros fue a través de TIRF, correspondiente a la figura 11, dada la especificidad de detección del TIRF, su elevada resolución y la poca señal residual, permite comprobar la presencia de oligómeros.

6.2 ESTUDIAR LA DESESTABILIZACIÓN DEL CITOESQUELETO EN CULTIVO SH-SY5Y, EN PRESENCIA DE OLIGÓMEROS, MEDIANTE INMUNOMARCAJE DE α -TUBULINA, TUBULINA β III Y NEUROFILAMENTO.

Para establecer el comportamiento de alfa y β -III tubulina en presencia de agregados oligoméricos de α -sinucleína, se realizó una inmunofluorescencia utilizando los

anticuerpos monoclonales de ratón anti α -tubulina (TU-01) y anti-tubulina β -III (TU-20), en cultivos celulares control y en aquellos incubados junto con agregados oligoméricos.

Como se observa en la figura 12, α -tubulina se expresa en la mayor parte del cuerpo neuronal, excluyendo la zona del núcleo, mientras que forma parte de las neuritas producidas por la diferenciación con ácido retinoico durante 72 horas; debido a que el epítipo que reconoce abarca la región aminoacídica que comprende desde el residuo 65 al 97 en el dominio estructural N-terminal. A simple vista, no existen variaciones significativas en el marcaje que se observa en las células control (figura 12) y las células incubadas con agregados oligoméricos (figura 13), pero mediante el análisis de los puntos iluminados con Alexa Flúor 488, utilizando un “script” desarrollado en MATLAB®, se logra identificar una variación en la expresión de α -tubulina, la que disminuye en las células afectadas por los agregados, como se muestra en las figura 14 y 15. Se analizaron los puntos iluminados en 5 células distintas, tanto controles como oligómeros, y se obtuvieron resultados similares, los que se grafican en la figura 16.

En las figura 17 y 18 se muestran los resultados de la inmunofluorescencia con tubulina β -III. Se observa una distribución similar en las células control como en las afectadas por los agregados, formando parte del cuerpo neuronal, incluyendo la zona del núcleo, y de las neuritas producidas por la diferenciación; en este caso, el epítipo que reconoce comprende los aminoácidos desde el 441 al 448, “ESESQGPK”. Similar al caso de α -tubulina, no es apreciable a simple vista una variación significativa en la distribución ni en la intensidad del marcaje de tubulina β -III. Aunque existen algunas células que muestran zonas, especialmente en las neuritas, que concentran una mayor cantidad de fluorescencia. Esto se condice con los resultados obtenidos luego del análisis de los puntos iluminados en la imagen, pues como se observa en las figura 19 y 20, los puntos iluminados aumentan en las células incubadas con agregados oligoméricos. Se analizaron 5 células, tanto control como incubadas con oligómeros y se obtuvieron resultados similares como muestra la figura 21.

Es posible observar una diferencia a nivel nuclear, específicamente en la distribución

de la cromatina. En células control se aprecia una cromatina laxa, mientras que las células incubadas con oligómeros, se observan núcleos con cromatina compacta y contornos nucleares irregulares, características posiblemente atribuibles a un proceso de apoptosis en curso.

Existen diversos isotipos de β -tubulina. Mientras que β -I es necesaria para la supervivencia celular, β -II es esencial para lograr la diferenciación, especialmente en el desarrollo de neuritas. β -III no tiene mayor relevancia para la supervivencia, desarrollo o diferenciación celular, pero posee una función protectora que se asocia con la capacidad de adaptación frente a estrés oxidativo producido en la célula.²⁷⁻⁵⁰

Como se describe en estudios previos,²⁷⁻⁵¹ tubulina β -III se expresa en células de neuroblastoma, formando microtúbulos tanto en aquellas células no diferenciadas como en aquellas que sí lo están. Es posible observar, tanto en células control como en las afectadas con agregados, como tubulina β -III se distribuye a lo largo del cuerpo neuronal y de las neuritas, que se desarrollan producto de la diferenciación celular.⁵²

Se conoce que el isotipo β -III está estrechamente relacionado con mecanismos de protección celular, debido a que interviene ante radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ROS), sustancias que provienen como efecto secundario de la activación del receptor N-metil D-aspartato (NMDA) presente en las neuronas, mediante la interacción de este último con glutamato/glicina y que, en niveles altos, pueden llegar a ser tóxicos para la célula.²⁷ Según estudios previos,²⁷⁻⁵⁰ β -III tubulina carece de cisteína en la posición 239 dentro de su composición aminoacídica, lo que la hace menos susceptible a radicales libres y ROS, que los otros isotipos. En contraste, β -III tubulina posee una cisteína en la posición 124, que no se encuentra en los isotipos β -I y β -II, y que junto a cisteínas 127 y 129 forman un clúster frente a posibles agentes oxidantes. Esta interacción entre cisteínas y oxidantes se debe a la presencia de grupos sulfhidrilos, lo que se traduce en la inhibición de la polimerización de microtúbulos.

Debido al rol protector que se le atribuye a tubulina β -III, se puede considerar el

aumento en la inmunomarcación en las células expuestas a agregados oligoméricos de α -sinucleína como una respuesta o mecanismo de protección frente al daño producido por agentes oxidantes, la liberación de radicales libres y ROS, lo que se traduce en una mayor expresión de isotipos β -III.

6.3 DETERMINACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO INDUCIDO POR LOS AGREGADOS OLIGOMÉRICOS DE α -SINUCLÉINA SOBRE CÉLULAS SH-SY5Y MEDIANTE ENSAYOS DE LDH

Como se describió previamente en el marco teórico de la presente investigación los agregados oligoméricos de α -sinucleína, en especial los denominados oligómeros pre-fibrilares se encuentran altamente relacionados con las alteraciones que producen a nivel de membrana en las células SH-SY5Y debido a su alto contenido de hoja β , conllevando a un aumento en la permeabilidad celular que finalmente ocasionará la muerte neuronal.³⁵

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) se forman normalmente como subproductos del metabolismo oxidativo e incluyen moléculas como el superóxido, radicales hidroxilos, peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y óxido nítrico (NO),⁵³ pero también se generan durante eventos patológicos como en las enfermedades neurodegenerativas, especialmente asociado a la agregación de α -sinucleína a nivel mitocondrial.

Estudios previos describen distintos tipos de oligómeros de α -sinucleína (A1 y A2)⁵⁴ los cuales al asociarse a la membrana celular ya sea de vesículas sintéticas, en ensayos *in vitro*⁵⁵ o en células, participan en la formación de poros lo que conlleva a una desestabilización de la homeostasis del calcio, aumentando los niveles de Ca^{+2} intracelular. Sumado a lo anterior, se evidencia la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en el medio de cultivo en la figura 22 en presencia de los agregados oligoméricos a diferencia de la muestra control, lo que hace presumir que

serían estas sustancias descritas en otras investigaciones⁵⁴ las cuales ocasionan este aumento en la liberación de enzima LDH por parte de la célula y que está en directa relación con el efecto citotóxico que genera la acumulación de α -sinucleína a nivel de membrana.

Una vez descritos con anterioridad los hallazgos de estudios previos los cuales demuestran efecto tóxico sobre células SH-SY5Y es que se logró determinar con certeza que el aumento de la enzima LDH que se obtuvo en los ensayos realizados (Figura 22) se asocian a este mismo efecto, ocasionado por los agregados oligoméricos de α -sinucleína a nivel de membrana sobre las células de neuroblastoma SH-SY5Y.

CAPÍTULO 7: CONCLUSIONES

Las técnicas llevadas a cabo durante la unidad de investigación, permitieron finalmente evidenciar que los agregados oligoméricos de α -sinucleína generan un efecto tóxico en las células de neuroblastoma SH-SY5Y. Dicho efecto fue demostrado a través de marcadores inmunofluorescentes, pero de manera más significativa mediante la medición de LDH en el sobrenadante del cultivo. Es por esto que se puede concluir que los agregados oligoméricos de α -sinucleína interactúan principalmente con membranas celulares, y además poseen un efecto a nivel de citoesqueleto celular que es significativo pero no determinante para establecer un proceso apoptótico por sí solo. Estos resultados coinciden con datos no publicados sobre estudios realizados en membranas DOPC en donde se pudo comprobar que estructuras fibrilares de gran tamaño se unen a membranas lipídicas. Esta investigación aporta a la comprensión sobre la composición de las estructuras oligoméricas y sus efectos a nivel celular.

Ahora que se ha comprobado la citotoxicidad provocada por los oligómeros, sería importante continuar investigando otros marcadores que permitan determinar si en estas células afectadas se está produciendo un proceso de apoptosis. Para esto se podrían estudiar marcadores de distintas etapas de la vía de apoptosis, tales como caspasa III, anexina V, actina.

CAPÍTULO 8: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Moussaud, S., Jones, D. R., Moussaud-Lamodière, E. L., Delenclos, M., Ross, O. A., & McLean, P. J. (2014). α -synuclein and tau: teammates in neurodegeneration?. *Molecular neurodegeneration*, 9(1), 43.
2. Goedert, M., Jakes, R., & Spillantini, M. G. (2017). The synucleinopathies: twenty years on. *Journal of Parkinson's disease*, 7(s1), S51-S69.
3. Iwabuchi, M. F., Hetu, M. M., & Tong, W. G. (2016). Sensitive analysis of α -synuclein by nonlinear laser wave mixing coupled with capillary electrophoresis. *Analytical biochemistry*, 500, 51-59.
4. Breydo, L., Wu, J. W., & Uversky, V. N. (2012). α -Synuclein misfolding and Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1822(2), 261-285.
5. Azizi, S. A., & Azizi, S. A. (2017). Synucleinopathies in neurodegenerative diseases: Accomplices, an inside job and selective vulnerability. *Neuroscience letters*.
6. Auluck, P. K., Caraveo, G., & Lindquist, S. (2010). α -Synuclein: membrane interactions and toxicity in Parkinson's disease. *Annual review of cell and developmental biology*, 26, 211-233.
7. Emamzadeh, F. N. (2016). Alpha-synuclein structure, functions, and interactions. *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 21.
8. Conway, K. A., LEE, S. J., ROCHET, J. C., Ding, T. T., Harper, J. D.,

Williamson, R. E., & Lansbury, P. T. (2000). Accelerated Oligomerization by Parkinson's Disease Linked α -Synuclein Mutants. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 920(1), 42-45.

9. Brown, J., & Horrocks, M. H. (2018, May). A sticky situation: Aberrant protein–protein interactions in Parkinson’s disease. In *Seminars in cell & developmental biology*. Academic Press.

10. Maltsev, A. S., Ying, J., & Bax, A. (2012). Impact of N-terminal acetylation of α -synuclein on its random coil and lipid binding properties. *Biochemistry*, 51(25), 5004-5013.

11. Marsh, J. A., Singh, V. K., Jia, Z. C., and Forman-Kay, J. D. (2006) Sensitivity of secondary structure propensities to sequence differences between α - and γ -synuclein: Implications for fibrillation. *Protein Sci.* 15, 2795–2804.

12. Ross, C. A., & Poirier, M. A. (2004). Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nature medicine*, 10(7), S10.

13. Giasson, B. I., Murray, I. V., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. Y. (2001). A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of α -synuclein is essential for filament assembly. *Journal of Biological Chemistry*, 276(4), 2380-2386.

14. Biere, A. L., Wood, S. J., Wypych, J., Steavenson, S., Jiang, Y., Anafi, D., & Martin, F. (2000). Parkinson's disease-associated α -synuclein is more fibrillogenic than β - and γ -synuclein and cannot cross-seed its homologs. *Journal of Biological Chemistry*, 275(44), 34574-34579.

15. Conway, K. A., Harper, J. D., & Lansbury, P. T. (1998). Accelerated in vitro fibril formation by a mutant α -synuclein linked to early-onset Parkinson disease.

Nature medicine, 4(11), 1318.)

16. Hashimoto, M., Hsu, L. J., Sisk, A., Xia, Y., Takeda, A., Sundsmo, M., & Masliah, E. (1998). Human recombinant NACP/ α -synuclein is aggregated and fibrillated in vitro: relevance for Lewy body disease. *Brain research*, 799(2), 301-306.
17. Rospigliosi, C. C., McClendon, S., Schmid, A. W., Ramlall, T. F., Barré, P., Lashuel, H. A., & Eliezer, D. (2009). E46K Parkinson's-linked mutation enhances C-terminal-to-N-terminal contacts in α -synuclein. *Journal of molecular biology*, 388(5), 1022-1032.
18. Khurana, R., Coleman, C., Ionescu-Zanetti, C., Carter, S. A., Krishna, V., Grover, R. K., ... & Singh, S. (2005). Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils. *Journal of structural biology*, 151(3), 229-238.
19. Xing, Y., & Higuchi, K. (2002). Amyloid fibril proteins. *Mechanisms of ageing and development*, 123(12), 1625-1636.
20. Elghetany, M. T., & Saleem, A. (1988). Methods for staining amyloid in tissues: a review. *Stain technology*, 63(4), 201-212.
21. Biancalana, M., & Koide, S. (2010). Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1804(7), 1405-1412.
22. Fish, K. N. (2009). Total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy. *Current protocols in cytometry*, 12-18.
23. Axelrod, D. (2008). Total internal reflection fluorescence microscopy. *Methods in cell biology*, 89, 169-221.
24. Jean, D. C., Black, M. M., & Baas, P. W. (2011). The cytoskeleton of the

neuron an essay in celebration of Paul Letourneau's career. *Developmental neurobiology*, 71(9), 790-794.

25. Howard, J., & Hyman, A. A. (2003). Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature*, 422(6933), 753.

26. Ludueña, R. F. (1997). Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications. In *International review of cytology* (Vol. 178, pp. 207- 275). Academic Press.

27. Guo, J., Walss-Bass, C., & Ludueña, R. F. (2010). The β isotypes of tubulin in neuronal differentiation. *Cytoskeleton*, 67(7), 431-441.

28. Suzuki, Y., Jin, C., Iwase, T., & Yazawa, I. (2014). β -III Tubulin fragments inhibit α -synuclein accumulation in models of multiple system atrophy. *Journal of Biological Chemistry*, 289(35), 24374-24382.

29. Magiera, M. M., & Janke, C. (2014). Post-translational modifications of tubulin. *Current Biology*, 24(9), R351-R354.

30. Fukushima, N., Furuta, D., Hidaka, Y., Moriyama, R., & Tsujiuchi, T. (2009). Post-translational modifications of tubulin in the nervous system. *Journal of neurochemistry*, 109(3), 683-693.

31. Janke, C., & Kneussel, M. (2010). Tubulin post-translational modifications: encoding functions on the neuronal microtubule cytoskeleton. *Trends in neurosciences*, 33(8), 362-372.

32. Yuan, Aidong, Mala V. Rao, and Ralph A. Nixon. "Neurofilaments at a glance." (2012): 3257-3263.

33. Bocquet, A., Berges, R., Frank, R., Robert, P., Peterson, A. C., & Eyer, J.

(2009). Neurofilaments bind tubulin and modulate its polymerization. *Journal of Neuroscience*, 29(35), 11043-11054.

34. Rudrabhatla, P., Jaffe, H., & Pant, H. C. (2011). Direct evidence of phosphorylated neuronal intermediate filament proteins in neurofibrillary tangles (NFTs): phosphoproteomics of Alzheimer's NFTs. *The FASEB Journal*, 25(11), 3896-3905.

35. Lashuel, H. A., Overk, C. R., Oueslati, A., & Masliah, E. (2013). The many faces of α -synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(1), 38.

36. Stefanis, L. (2012). α -Synuclein in Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(2), a009399.

37. Wakabayashi, K., Tanji, K., Mori, F., & Takahashi, H. (2007). The Lewy body in Parkinson's disease: Molecules implicated in the formation and degradation of α -synuclein aggregates. *Neuropathology*, 27(5), 494-506.

38. Cornejo, A., Jiménez, 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), 143-153.

39. Guzmán, C. & Caro, V. (2017). "Comparación del proceso de agregación entre monómeros y oligómeros de alfa sinucleína y su remodelamiento mediante moléculas de origen natural in vitro" (Tesis de pregrado). Universidad Andrés Bello, Santiago, Chile.

40. Kostka, M., Högen, T., Danzer, K. M., Levin, J., Habeck, M., Wirth, A., ... & Garidel, P. (2008). Single particle characterization of iron-induced pore-forming α -synuclein oligomers. *Journal of Biological Chemistry*, 283(16), 10992-11003.

41. Kovalevich, J., & Langford, D. (2013). Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. In *Neuronal Cell Culture* (pp. 9-21). Humana Press, Totowa, NJ.
42. Viklický, V., Dráber, P., Hašek, J., & Bártek, J. (1982). Production and characterization of a monoclonal antitubulin antibody. *Cell biology international reports*, 6(8), 725-731.
43. Scientific, T. (2012). *Crosslinking technical handbook*. Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham.
44. Freundt, E. C., Maynard, N., Clancy, E. K., Roy, S., Bousset, L., Sourigues, Y., ... & Brahic, M. (2012). Neuron-to-neuron transmission of α -synuclein fibrils through axonal transport. *Annals of neurology*, 72(4), 517-524.
45. Li, H. T., Lin, D. H., Luo, X. Y., Zhang, F., Ji, L. N., Du, H. N., ... & Hu, H. Y. (2005). Inhibition of α -synuclein fibrillization by dopamine analogs via reaction with the amino groups of α -synuclein. *The FEBS journal*, 272(14), 3661-3672.
46. Machuca, L. (2017). "Evaluación del efecto antiagregante de compuestos naturales, frente a la agregación de α -sinucleína" (Tesis de pregrado). Universidad Andrés Bello, Santiago, Chile.
47. Narkiewicz, J., Giachin, G., & Legname, G. (2014). In vitro aggregation assays for the characterization of α -synuclein prion-like properties. *Prion*, 8(1), 19-32.
48. Buell, A. K., Galvagnion, C., Gaspar, R., Sparr, E., Vendruscolo, M., Knowles, T. P., ... & Dobson, C. M. (2014). Solution conditions determine the relative importance of nucleation and growth processes in α -synuclein aggregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(21), 7671-7676.
49. Bousset, L., Pieri, L., Ruiz-Arlandis, G., Gath, J., Jensen, P. H., Habenstein, B,

Madiona, K, Olieric, V, Bckmann, A, Meier, B. H, & Melki, R. (2013) Structural and functional characterization of two alpha-synuclein strains. *Nat Commun* 4, 2575.

50. Guo, J., Kim, H. S., Asmis, R., & Ludueña, R. F. (2018). Interactions of β tubulin isotypes with glutathione in differentiated neuroblastoma cells subject to oxidative stress. *Cytoskeleton*.

51. Draberova, E., Lukás, Z., Ivanyi, D., Viklický, V., & Dráber, P. (1998). Expression of class III β -tubulin in normal and neoplastic human tissues. *Histochemistry and cell biology*, 109(3), 231-239.

52. Lombet A, Zujovic V, Kandouz M, Billardon C, Carvajal-Gonzalez S, Gompel A, Rostene W. 2001. Resistance to induced apoptosis in the human neuroblastoma cell line SK-N-SH in relation to neuronal differentiation. Role of Bcl-2 protein family. *Eur J Biochem* 268:1352–1362.

53. Ojala, J. O., Timonen, A., Sutinen, E. M., Anderson, G., Kangas, L., & Thornell, A. (2018). Oxidative Stress and Neuronal Damages: Estrogenic Compounds, Anti-Apoptotic Factors, and Amyloidogenesis.

54. Danzer, K. M., Haasen, D., Karow, A. R., Moussaud, S., Habeck, M., Giese, A., ... & Kostka, M. (2007). Different species of α -synuclein oligomers induce calcium influx and seeding. *Journal of Neuroscience*, 27(34), 9220-9232.

55. Volles, M. J., Lee, S. J., Rochet, J. C., Shtilerman, M. D., Ding, T. T., Kessler, J. C., & Lansbury, P. T. (2001). Vesicle permeabilization by protofibrillar α -synuclein: implications for the pathogenesis and treatment of Parkinson's disease. *Biochemistry*, 40(26), 7812-7819.