



**Universidad nacional Andrés Bello
Facultad de Medicina
Escuela de Tecnología Médica campus Republica.**

**MOLÉCULAS DE ORIGEN NATURAL CON CAPACIDAD ANTI AGREGANTE
DE α -SINUCLEINA *IN VITRO***

Tesis de pregrado para optar al título de Tecnólogo Médico con especialidad en
Bioanálisis Clínico, Inmunohematología y Banco de Sangre

Autores:

Rosa María Aroca Herrera, Patricio Cristián Ignacio Vidal Olivares

Profesor tutor: Dr Alberto Jesús Cornejo Mora

Santiago de Chile, 2015

En memoria a nuestra compañera y amiga

Mónica Alexandra López Maldonado

(12/10/1987- 1/8/2015)

AGRADECIMIENTOS

La presente tesis se desarrolló en el Laboratorio CATEM, de la facultad de medicina de la Universidad Andrés Bello.

Queremos agradecer a nuestro tutor de tesis, Dr. Alberto Cornejo Mora por permitirnos contribuir en su unidad de investigación, además de orientarnos en el desarrollo de esta.

Agradecer a los miembros del Laboratorio CATEM Celicia Quiroga y Patricio Muñoz por ayudarnos siempre que los requerimos.

También queremos agradecer a nuestras familias por el apoyo incondicional que nos brindaron en todo este proceso.

ÍNDICE

ABREVIATURA	6
RESUMEN.....	7
1.- INTRODUCCIÓN.....	9
2. MARCO TEÓRICO	13
2.1 Genes que participan en la enfermedad de Parkinson	13
2.2 Proteína α-sinucleína estructura y función.	15
2.3 Agregación de α-sinucleína	18
2.4 Neurotoxicidad de α-sinucleína	19
2.5 Posibles estrategias terapéuticas para la enfermedad de Parkinson	21
2.6 Técnicas para evidenciar la agregación	26
Hipótesis	28
Objetivo general	28
Objetivos específicos	28
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
3.1 Materiales	29
3.1.1 Biológicos	29
3.1.3 Soluciones	30
3.1.4 Materiales	31
3.1.5 Equipos	31
3.2.1 Clonamiento de α-sinucleína en vectores de expresión bacteriana	33
3.2.2 Producción de proteína recombinante:	37
3.2.3 Expresión de α-sinucleína recombinante	37
3.2.4. Purificación de α-sinucleína recombinante	38
3.2.5 Diálisis y concentración de α-sinucleína recombinante	41
3.2.6 Estudios de agregación de α-sinucleína recombinante	42
3.2.7 Análisis estadístico	43
4. RESULTADOS	44

4.1. Clonamiento de α-sinucleína en vectores de expresión.....	44
4.2. Transformación bacteriana del sistema <i>E. coli</i> BL21(DE3)/pET-28a(+)	44
4.3. Expresión de α-sinucleína recombinante en cultivos de <i>E. coli</i>.....	44
4.4.- Purificación de la proteína α-sinucleína recombinante por IMAC	45
4.5.-Electroforesis SDS-PAGE de la proteína α-sinucleína recombinante.	46
4.6. Estudios de agregación α-sinucleína <i>in vitro</i>.....	47
4.6.1.- Ácido rosmarínico inhibe la agregación de α-sinucleína <i>in vitro</i>	48
4.6.2.- Clovamida inhibe la agregación de α-sinucleína <i>in vitro</i>	51
5.- DISCUSIÓN.....	54
6.-CONCLUSIÓN.	57
7.- BIBLIOGRAFÍA	59

ABREVIATURA

AMPc	monofosfato cíclico de adenosina
dNTP	desoxinucleósidos trifosfato
D.O	densidad óptica
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
IMAC	Cromatografía de afinidad con metal inmovilizado
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
Medio LB	Medio Luria-Bertoni
NF- κ B	factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
PCR	reacción de polimerasa en cadena
PLD2	fosfolipasa D2
PMA	forbol 12-miristato 13-acetato
PPAR γ	receptor de peroxisoma-proliferador activado de gamma
ROS	especies reactivas al oxígeno
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS
TEMED	N,N,N,N'-tetrametilenediamina
TH	tirosina hidroxilasa
ThT	tioflavina T
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
UPS	sistema ubiquitina-proteasoma

RESUMEN

La Enfermedad de Parkinson es uno de los trastorno neuro-degenerativo progresivo del sistema nervioso central que afecta aproximadamente a 4 millones de personas en todo el mundo[1].

Esta enfermedad se caracteriza por la degeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas y debido a la pérdida de función pre sináptica de la proteína α -sinucleína, proceso clave en el desarrollo de la enfermedad [2]. Cuando falla el plegamiento correcto de esta proteína, se produce una agregación anormal dando origen a inclusiones denominados cuerpos de Lewy, los cuales se encuentran en el cerebro de pacientes con la enfermedad de Parkinson [3]. Estos cuerpos contribuyen colectivamente a los síntomas motores de la enfermedad de Parkinson, tales como: temblor en reposo, bradicinesia, y rigidez del tono muscular de las personas que presentan la enfermedad[4]. Estudios han revelado que estas proteínas defectuosas pueden trasladarse a otras células, afectando de esta forma las células sanas que las rodean causando su destrucción[5].

Hasta ahora el método de referencia para el tratamiento en pacientes que sufren síntomas de Parkinson es Levodopa, sin embargo, en tratamientos prolongados los pacientes presentan manifestaciones secundarias como disquinesia comprometiendo más la calidad de vida de estos pacientes [6]. A pesar de los esfuerzos desplegados, no ha sido posible desarrollar un tratamiento no sólo efectivo sino que no presente efectos secundarios para los pacientes. Hasta ahora existen evidencias al menos *in vitro*, de que las moléculas aisladas de origen natural, tales como polifenoles, poseen un efecto

sobre la agregación de α sinucleína [7] [3], aspecto importante dentro del desarrollo de la enfermedad, a pesar que aún no posible elucidar claramente como estas moléculas estarían interactuando con determinados residuos de α -sinucleína, al menos evitarían que estos mismos continúen siendo tóxicos ([3]). Por lo tanto, proponemos en esta unidad de investigación mediante ensayos de fluorescencia por ThT, determinar la capacidad inhibitoria de polifenoles tipo catecoles, sobre el proceso de agregación de la α -sinucleína.

En donde uno de los compuestos a utilizar que fue la clovamida obtuvo los efectos antiagregantes que se esperaban, mientras que el otro compuesto que fue el ácido rosmarino no presento actividad antiagregante.

1.- INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Parkinson fue descrita por James Parkinson en Inglaterra el año 1817 con el nombre de parálisis agitante [8] en la actualidad es conocida como un trastorno neurodegenerativo progresivo, reconocida por sus características sintomáticas motoras, como son el temblor en reposo, la rigidez del tono muscular, la bradicinesia y la pérdida de los reflejos posturales. Afecta al 0,3% de los países industrializados y suele presentarse entre los 20 y los 80 años, con un peak entre los 55 y 65 años, manifestando un aumento exponencial de alrededor del 3% después de los 65 años[9].

La fisiopatología de la enfermedad indica que, los cambios ocurren en las neuronas dopaminérgicas que proyectan al estriado y se caracterizan por una disminución de dopamina en el núcleo caudado y putamen. Esta, causa múltiples alteraciones en la actividad de las neuronas, lo que produce que el paciente con enfermedad de Parkinson desarrolle acinesia, rigidez, temblor e inestabilidad. La acinesia se manifiesta como dificultad para iniciar el movimiento y para realizar movimientos voluntarios como caminar y escribir[10].

Hasta el momento se desconoce la etiología exacta de la enfermedad, sin embargo, se ha confirmado que la Enfermedad de Parkinson no es única sino que tiene un carácter multifactorial [11]. Sus factores de riesgo se reconocen como factores extrínsecos e intrínsecos. Los primeros son modificables, tales como la exposición a pesticidas, los traumatismos cráneo encefálicos y el consumo de tabaco. Los segundos son hereditarios, y por lo tanto, no susceptibles de ser controlados [12].

Para generar un tratamiento efectivo para la Enfermedad del Parkinson se hace necesario comprender como se producen los factores hereditarios. Una de las hipótesis que presenta mayor aceptación, es la que estudia la implicancia que presenta la proteína neuronal, α -sinucleína, en el desarrollo de la Enfermedad del Parkinson. La mutación del gen que codifica esta proteína deriva en la patogénesis de esta enfermedad, ya que es el componente principal de los agregados intracelulares proteicos conocidos como cuerpos y neuritas de Lewy, que son característicos en los pacientes con Parkinson[13].

Descubrimientos genéticos relacionan el padecimiento temprano de enfermedad de Parkinson, con la triplicación del gen que codifica la α -sinucleína, y a 3 mutaciones puntuales del mismo gen (A30P, E46K, A53T) [14, 15]. Otros genes son PARK6, LRRK2 ó PARK-8, PARK1/PARK4, PARK-2, esta última es la mutación más común hallada en la enfermedad de Parkinson, la cual genera un desorden en la función de la proteína Parkina e induce parkinsonismo juvenil de carácter autosómico recesivo[16].

El tratamiento de elección para esta enfermedad es la Levodopa, que es útil tanto en etapas iniciales como avanzadas, muchos pacientes severamente incapacitados mejoran de forma notable, aunque rápidamente presentan complicaciones. La introducción de este medicamento, proporciona una mejoría en la calidad de vida de los pacientes con Parkinson, pero no es una cura de la enfermedad sino que es un tratamiento paliativo de ella. A pesar de los múltiples beneficios del tratamiento con Levodopa, existen estudios que demuestran que aproximadamente un 40% de pacientes con Enfermedad de Parkinson, que han sido tratados con este fármaco desarrolla fluctuaciones

motoras y discinesias que son movimientos anormales e involuntarios, al cabo de 2-4 años de tratamiento.[17]

También se ha probado, la cirugía cerebral para la enfermedad de Parkinson, la cual se ha realizado desde principios del siglo XX. Dentro de este tipo de intervención se encuentran los procedimientos estereotácticos, que fueron incorporados en la década de los 40 y exploran blancos como el tálamo y el globo pálido interno. Entre los procedimientos introducidos existen dos tipos de cirugía para los pacientes con enfermedad de Parkinson que son: Procedimientos Ablativos y Estimulación Cerebral Profunda.

Las cirugías ablativas incluyen talamotomía, palidotomía, leucotomía de las radiaciones prelemniscas y la subtalamotomía. Dichas cirugías son más económicas que la Estimulación Cerebral Profunda y han sido favorecidas en los países en desarrollo. De cualquier forma, en la actualidad la Estimulación Cerebral Profunda es preferida que la cirugía ablativa debido a sus ventajas, las cuales incluyen adaptabilidad y reversibilidad (16). Si bien estas cirugías en su mayoría son exitosas, el riesgo que estas conllevan es altísimo, e incrementa si añadimos la enfermedad de base y el estado funcional por el que se somete al paciente a dicha intervención.

Debido al aumento que ha presentado esta enfermedad, sobre todo en personas de avanzada edad, y a los tratamientos anteriormente mencionados, que si bien proporcionan una mejoría considerable en la calidad de vida de los pacientes, no representan una cura definitiva de la enfermedad, es necesario e importante desarrollar investigaciones que indaguen en el entendimiento y

tratamiento de los distintos factores de la Enfermedad del Parkinson. Dentro de esta línea se ubica esta unidad de investigación, la cual se centrara en evitar la agregación de la α -sinucleína, causante de los trastornos motores de la enfermedad. Para ello se probará la inhibición de esta proteína mediante el uso de catecoles.

Dentro de la familia de los catecoles utilizaremos él ácido rosmarínico y clovamida en este modelo de inhibición *in vitro*, debido a la evidencia científica, la cual muestra que estas sustancias de origen natural, ejercen efectos neuroprotectores contra el estrés oxidativo, excitotoxicidad y la lesión de isquemia, en células de origen neuronales [18].Basados en esta evidencia se probaran estas sustancias con el fin de detener el proceso de agregación de la proteína α -sinucleína, en un modelo *in vitro*.

La técnica analítica con la cual, se evidenciara la detección y la caracterización estructural de estos depósitos fibrilares, es la tinción con colorante específico de amiloides (ThT) [19].

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Genes que participan en la enfermedad de Parkinson

El gen LRRK-2 (Leucine-rich repeat kinase-2), localizado en el brazo largo del cromosoma 12 es de herencia autosómica dominante. Este gen codifica para una proteína llamada «dardarina» que tiene un dominio con actividad tirosin quinasa, la que participa en cascadas de señalización con funciones en la dinámica del citoesqueleto. Las mutaciones de este gen son las causas más comunes de la Enfermedad de Parkinson y son de un inicio tardío. [20]

La mutación del gen PARK2 se asocia con mayor frecuencia a la enfermedad de Parkinson de inicio temprano. Este gen se encuentra en el brazo largo del cromosoma 6 (6q25.2-6q27), es de herencia autosómica recesiva. Por otra parte, este gen codifica una proteína llamada «Parkina», la cual es una ligasa de ubiquitina E3 encargada de marcar ciertas proteínas para su degradación adecuada. También interviene en el mantenimiento y la reparación del ADN mitocondria[21]el gen PINK1 (PTEN-induced putative kinase 1), se encuentra en el locus 1p35-36. Sus mutaciones tienen una baja incidencia y son de inicio temprano, con patrón de herencia autosómico recesivo. PINK1 es una quinasa con una secuencia N-terminal que protege contra la disfunción mitocondrial y regula la morfología mitocondrial por la vía fisión/fusión. También actúa en las mismas cascadas que la Parkina, para el mantenimiento de la calidad mitocondrial, se encuentran en el 1-8% de los casos esporádicos de inicio temprano de la Enfermedad de Parkinson (16).

Por su parte, el gen PARK7, codifica para una proteína antioxidante llamada DJ-1 y se localiza en el locus 1p36. Este gen se asocia a la Enfermedad de Parkinson de inicio temprano, con patrón de herencia autosómico recesivo y en casos esporádicos. La proteína DJ-1 tiene función en la protección mitocondrial contra el estrés oxidativo y forma, junto con Parkina y PINK1, el complejo de ubiquitinación cuya función es degradar sustratos de Parkina mal plegados [22].

Finalmente, se encuentra el gen PARK1/PARK4, el cual codifica la proteína α -sinucleína, localizada en el brazo largo del cromosoma 4, de herencia autosómica dominante. La mutación de este gen resulta en la enfermedad de Parkinson, puesto que provoca que la α -sinucleína comience a formar agregados encontrados en los cuerpos de Lewys, que son inclusiones citoplasmáticas típicas de la enfermedad de Parkinson, que influyen en la muerte de las neuronas dopaminérgicas [22].

Cabe destacar, que algunos estudios han postulado que los agregados de α -sinucleína pueden inhibir el transporte entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, reduciendo los niveles del transporte vesicular de monoaminas a las sinapsis, dando como resultado la acumulación tóxica de dopamina libre en el citosol, que induce la formación de ROS, causando estrés oxidativo y finalmente la muerte de la célula [23].

2.2 Proteína α -sinucleína estructura y función.

La α -sinucleína, es una proteína con 140 aminoácidos, codificada por un único gen, el que consta de 7 exones ubicado en el cromosoma 4. Esta proteína fue descrita por primera vez por Maroteaux en 1988 como una proteína específica de neuronas localizadas en las terminales nerviosas presinápticas [24]. Se calcula que hasta un 1% de las proteínas total de las fracciones citosólicas solubles del cerebro [25]

En los últimos años, nuevos estudios muestran que la α -sinucleína también está presente en líquidos corporales, tales como, plasma, líquido cerebro espinal y líquido intersticial.[26] Estos recientes descubrimientos originan nuevas interrogantes en torno a la función que este polidéptido posee.

La α -sinucleína, pertenece a un grupo de proteínas, “intrínsecamente desordenadas”, puesto que carece de estructura secundaria definida en su estado monomérico, pudiendo adoptar múltiples conformaciones en su estado fisiológico, [27] lo que hace esencial comprender su estructura primaria.

La α -sinucleína, en su N- terminal contiene 7 repeticiones de 11 aminoácidos, lo que produce su forma de alfa hélice. Aproximadamente los primeros 100 aminoácidos de la proteína forman hélices anfipáticas al unirse con membranas, esta habilidad parece estar relacionada con su función fisiológica [28]. Estas repeticiones están muy altamente conservadas, ya sea en las diferentes especies como, en sus diferentes isoformas. Las mutaciones asociadas con la enfermedad de Parkinson son A53T, A30P, y E46K. Sin

embargo se han descritos nuevas mutaciones de la G51D y H50Q. [29]. Cabe destacar que las repeticiones de este polipeptidos y gracias al tamaño de la proteína, pueden dar 3 vueltas, e interactuar directamente con la superficie de la membrana a través de múltiples repeticiones [29].

Una de las hipótesis plantea que la agregación está determinada por el C-terminal de α -sinucleína (residuos 96-140), el cual es muy ácido y cargado negativamente, mientras que la región central (residuos 61-95) es ligeramente cargados positivamente. La atracción electrostática entre estas dos regiones podría, en parte ser responsable de las interacciones de largo alcance en α -sinucleína. Esta hipótesis está apoyada por la fibrilación acelerada de α -sinucleína inducida por la poliamina que se une y neutraliza las cargas negativas de C-terminal. [24] [27].

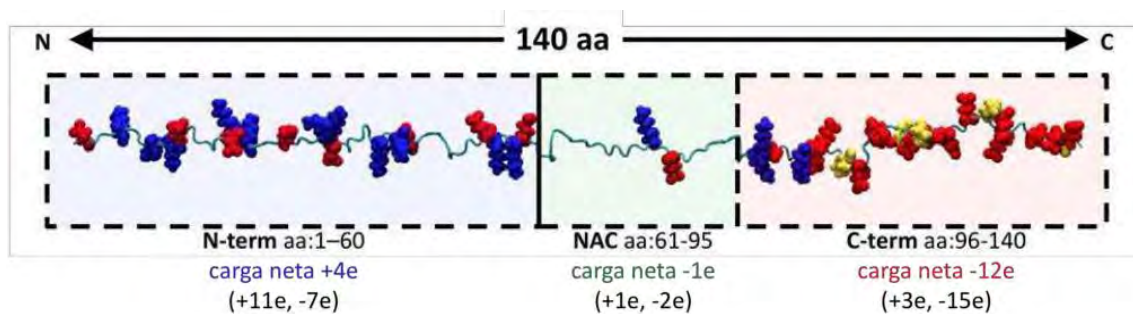


FIGURA 1. En esta imagen se muestra las 3 zonas que presenta la proteína α -sinucleína y se muestran las cargas netas que presenta cada una de ellas. [27]

La región C-terminal contiene una gran proporción de residuos ácidos y prolina y tres residuos tirosina, que se consideran una característica de α -y- β

La función de la α -sinucleína no se conoce con exactitud, pero se encuentran varias teorías de su función como: la regulación del reciclaje de las vesículas en las terminales presinápticas, en donde se incluye el tráfico de acoplamiento, la función y reciclado después de la exocitosis [19]. Por otra parte, Se ha observado que la α -sinucleína unida a membranas inhibe la (PLD2), sugiriendo su participación en la regulación de vesículas. [27].

Otra de las funciones que se cree que presenta la α -sinucleína, es que inhibe la acumulación de complejo I mitocondrial y aumenta la producción de [ROS], la inhibición de este complejo provoca la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial y a la liberación de citocromo c, el cual induce a la muerte celular apoptótica [19].

Finalmente, se demostró que síntesis de dopamina está limitada por la actividad de la enzima (TH). La sobreexpresión de la proteína α -sinucleína en las células mostró una actividad reduciendo la TH y la síntesis dopamina. Estos sugieren que la α -sinucleína juega un papel en la regulación de la biosíntesis de dopamina. [19]

2.3 Agregación de α -sinucleína

Las células han generado estrategias, para que el proceso de plegamiento, termine en la formación de una estructura nativa funcional. Este es el caso de las chaperonas moleculares, estas proteínas están presentes en todas las células y compartimentos celulares, asisten el correcto plegamiento de las

proteínas. Sin embargo en ocasiones el trabajo de estas proteínas no es suficiente, y se pueden producir errores durante el proceso de plegamiento, que pueden culminar en la formación de agregados proteicos [30].

Las condiciones que afectan el proceso de agregación son la concentración total de proteína inicial, el pH del buffer de agregación, la concentración del buffer, su fuerza iónica, la temperatura, la velocidad y forma de agitación. [27]. A diferencia de otras proteínas que agregan, la α -sinucleína, no es necesario adicionar moléculas inductoras para que esta comience a agregar.

La agregación es la transición de la forma soluble a una forma insoluble, la cual consiste en la producción de sustancias intermedias, tales como diversas formas oligoméricas, derivados de A β o ADDL (amyloid- beta derived diffusible ligands) y protofibrilares. Este cambio conformacional es esencial para su neurotoxicidad. Estos agregados altamente organizados, son llamados fibras amiloides, las cuales son agregados proteicos, en forma de filamentos con estructuras altamente ordenadas y repetitivas con un núcleo común formado por hojas β [31]. La formación de amiloide requiere enlaces de hidrógeno intermoleculares de las hebras de polipéptidos [32].

2.4 Neurotoxicidad de α -sinucleína

Uno de los mecanismos más aceptados para explicar la neurotoxicidad de la α -sinucleína es la permeabilización de las membranas celulares que originan

los oligómeros proteicos. Sin embargo, todavía no está claro por cuál mecanismo pierde integridad la membrana. Por un lado, los oligómeros de α -sinucleína pueden integrarse en la membrana y formar poros a través de los cuales se pueden permeabilizar moléculas pequeñas, y por otro, es concebible que las interacciones entre los oligómeros proteicos y la bicapa fosfolipídica desestabilicen el empaquetamiento lipídico y que por tanto se pierda la integridad. [28] Esto explicaría la injuria celular que ocurre en las neuronas y por consiguiente la disminución de la dopamina, lo que conlleva a la sintomatología de la enfermedad.

En una neurona normal la α -sinucleína se degrada generalmente por el (UPS) y la autofagia. Sólo una fracción de α -sinucleína se libera por exocitosis. La α -sinucleína extracelular puede ser endocitada por las neuronas y glía vecina, y rápidamente degradado por la vía endolisosomal. Bajo condiciones de la enfermedad, los UPS y actividades autofagia se reducen y, por lo tanto, grandes cantidades de α -sinucleína se liberan de las neuronas. Después de la internalización por células vecinas, estas "semillas" pueden sobrevivir si la función lisosomal se ve afectada por el envejecimiento o mutaciones genéticas. A cúmulos exógenos de α -sinucleína son como una semilla para la propagación global en las neuronas y desencadena respuestas proinflamatorias en las células gliales, que exacerba aún más agregada difusión y neurodegeneración. [26]

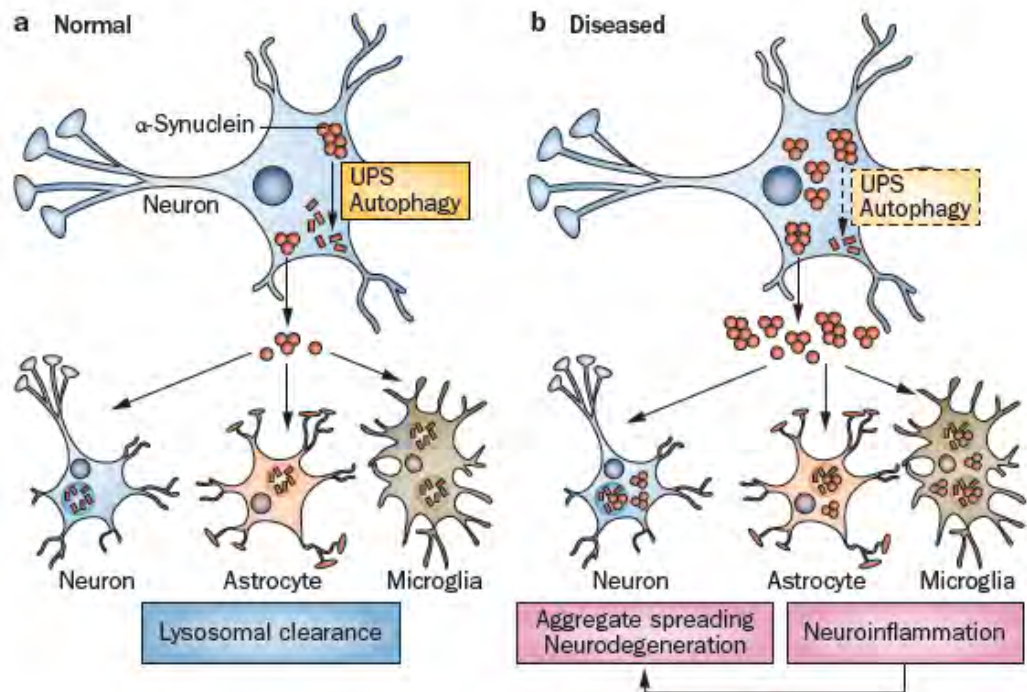


FIGURA 3. Esquema de procesamiento fisiológico versus el patológico de la eliminación de la proteína α -sinucleína [26]

2.5 Posibles estrategias terapéuticas para la enfermedad de Parkinson

Han sido varias las técnicas terapéuticas propuestas que buscan, ser una cura para esta enfermedad por medio de inhibir la propagación de la α -sinucleína extracelular.

Una de las estrategias, son las que apuntan a inhibir la α -sinucleína extracelular, como: la Inmunoterapia mediada por anticuerpos se podría acelerar la eliminación de α -sinucleína extracelular. Por otra parte el control de

estado fenotípico de la microglia para enriquecer la fagocitosis, y la microglia anti-inflamatoria, las cuales podría ayudar a despejar α sinucleína y aumentar de esta forma la supervivencia neuronal. También se encuentra la inhibición de la α -sinucleína mediada por respuestas inflamatorias microgliales podría reducir el daño tisular inducido por la inflamación. Además está el bloqueo de los receptores α -sinucleína en la superficie neuronal podría prevenir la transmisión interneuronal α -sinucleína. La inhibición de la exocitosis α -sinucleína podría evitar la acumulación α -sinucleína extracelular. Este enfoque, sin embargo, con el tiempo podría resultar en la muerte neuronal y la liberación de los agregados de α -sinucleína. Finalmente la inhibición de la agregación de la α - sinucleína podría interferir con la propagación agregados. [26]

En el siguiente esquema se muestra las estrategias terapéuticas anteriormente mencionadas

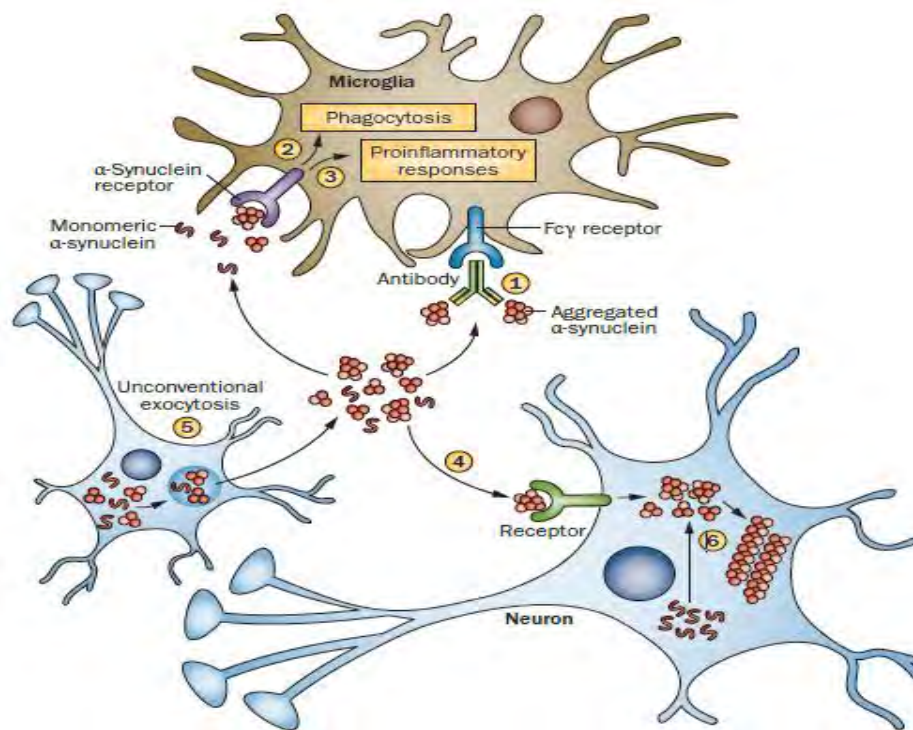


FIGURA 4, Se muestran las distintas estrategias terapéuticas, tales como: la inmunoterapia mediada por anticuerpos [1], control del estado de la microglia para favorecer la fagocitosis [2], inhibición de la respuesta inflamatoria[3], bloqueo de los receptores de superficie de α -sinucleína [4], inhibición de la exocitosis la α -sinucleína extracelular[5], inhibición de la agregación [6] mencionadas con anterioridad[26].

Otro camino para combatir la enfermedad se centra en inhibir la agregación de la α -sinucleína. Es esta la tarea que se propone esta investigación, por medio de la utilización de extractos de origen natural para eliminar la agregación de esta proteína.

Es por esto que en los últimos años han surgidos, nuevas investigaciones las cuales buscan sustancias químicas de bajo peso molecular, capaces de inhibir el proceso de agregación de la proteína α -sinucleína, uno de los precursores en esta área es, la utilización de Epigallocatechin Gallate, el cual es un polifenol

que se encuentra en el té verde, gracias sus propiedades anti amiloidogénicas, modula el mal plegamiento de las proteínas de la Enfermedad de Parkinson. El Epigallocatechin Gallate se une directamente a cadenas polipeptídicas plegadas e inhibe la formación β -hoja. Debido a que inmoviliza la región C-terminal y moderadamente reduce el grado de unión de los oligómeros a las membranas de la proteína α -sinucleína.[33]

Sin embargo nuevos estudios demuestran un mecanismo diferente. El tratamiento con Epigallocatechin Gallate no revierte el proceso de formación de amiloide, pero convierte directamente especies fibrilares en agregados proteicos benignos, disminuyendo la deposición de los agregados de proteína amiloide, sin aumentar la carga de los productos intermedios tóxicos pueden por lo tanto ser considerados como sustancias modelo para sus posibles tratamientos terapéuticos para enfermedades amiloides sistémicos y neurodegenerativas. [34]

Uno de los catecoles interesantes para su estudio es el ácido rosmarínico, [α -O-caffeoyl-3,4-dihydroxyphenyl lactic acid]que se encuentra ampliamente distribuida en las hierbas labiadas, como el romero, la albahaca y la perilla, presenta diferentes actividad como: antimicrobiana, antiviral, antioxidante, antiinflamatorio y efectos inmunosupresores. [18]

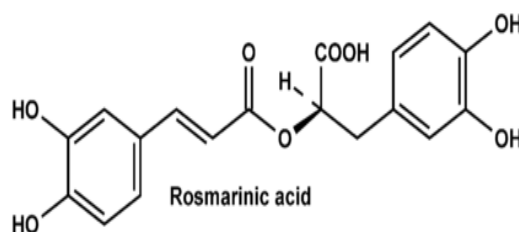


FIGURA 5 estructura del ácido rosmarínico (iupac) [35]

Otro de los compuestos a utilizar es la Clovamide la cual fue descrita por primera vez como un constituyente de trébol rojo; su estructura es muy similar a la del ácido rosmarínico, un análogo de este se producen en diversas plantas de la familia Lamiaceae, y especialmente en el romero, *Rosmarinus officinalis* L (15).

Es importante señalar que clovamida es estructuralmente similar a algunos β -2 adrenérgicos (dobutamina, denopamine) capaces aumentar el AMPc través receptores de β -2- adrenérgicos que se encuentran en las células U937. [36, 37]

El AMPc el cual es denominado un segundo mensajero, está involucrado en el mecanismo de acción y en procesos de transducción de la señal de múltiples moléculas como son hormonas, neurotransmisores, citocinas y factores de crecimiento[38]

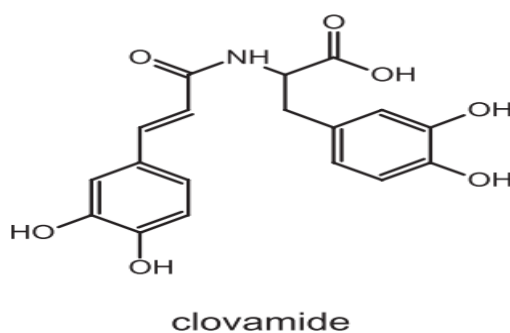


FIGURA 6. Estructura de clovamida (iupac) [18]

Hay estudios que demuestran que tanto la clovamide como el ácido rosmarínico inhiben, con diferentes potencias, la producción de O_2 inducida por PMA, liberación de citoquinas, y la activación de NF- κ B en monocitos humanos, tanto el PMA como el NF- κ B son inductores de la apoptosis. Curiosamente, clovamide, que también mejora la actividad PPAR γ , el cual es fundamental para la regulación de los procesos inflamatorios.[39]

2.6 Técnicas para evidenciar la agregación

Se utilizó como monitoreo de la agregación la técnica de ThT, debido a que este compuesto, presenta un sitio de unión cuando la proteína α -sinucleína cambia su conformación pasando de random coil a una hoja- β , este sitio es denominado “cross-strand ladders”, esto consiste en la repetición de las interacciones de la cadena lateral que se ejecutan dentro de una capa de hoja- β (es decir, paralelamente al eje longitudinal de la fibrilla)[40]

El ThT se une de forma lineal al paralelo del eje largo de la superficie de las fibrillas, en las ranuras que forman la denominada zipper, como se muestra en la siguiente figura. (33) La unión del ThT con las fibras amiloides, potencia la fluorescencia intrínseca que tiene el ThT, es decir mayor cantidad de formación de hoja- β , mayor será la fluorescencia.

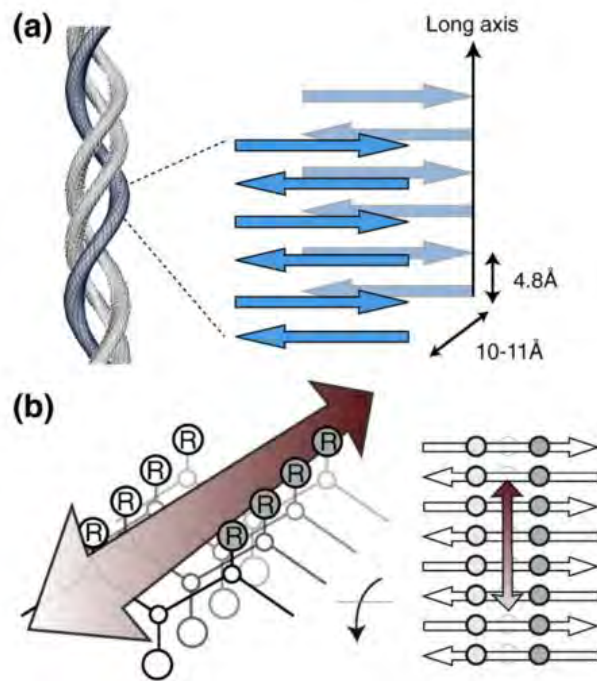


FIGURA 7. Interacciones que presenta el ThT con las fibras amiloides (33)

Hipótesis

De acuerdo con los antecedentes presentados, se propone la hipótesis que “Catecoles de origen natural inhiben el proceso de agregación de la α -sinucleína humana recombinante en un modelo *in vitro*”.

Objetivo general

Estudiar el proceso de agregación de la proteína α -sinucleína humana recombinante en la presencia y ausencia de compuestos tipo catecoles, tales como ácido rosmarínico y clovamida.

Objetivos específicos

- Clonación de α -sinucleína en vector de expresión de proteína recombinante.
- Inducir y purificar la proteína α -sinucleína recombinante humana desde cultivos de *E. coli*.
- Determinar la capacidad de los compuestos propuestos en la inhibición de la agregación de la α -sinucleína mediante técnicas de espectroscopia de fluorescencia mediante ThT.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Biológicos

Cepas bacterianas: *E. coli* BL21(DE3).

3.1.2 Reactivos

3.1.2.1 Plásmidos

pET28a+

3.1.2.2 Reactivos para Generación de bacterias competentes:

Buffer 1 (1,47 g CaCl₂; 1,42 g MgCl₂; 0,32 g CH₃COONa en 100 ml de H₂O)

Buffer 2 (1,47 g CaCl₂+ 15 mL glicerol en 100 mL de H₂O)

3.1.2.3 Reactivos para clonamiento de α -sinucleína en vectores de expresión bacteriana.

BamHI 10 u/ μ L (Fermentas, USA), NdeI 10 U/ μ L (Fermentas, USA),
amortiguador

BamHI+ 10X (Fermentas, USA), T4 DNA ligasa (Fermentas, USA),
amortiguador T4

DNA ligasa 10X (Fermentas, USA), Agua Nanopura, E. Z. N. A. Gel
Extraction Kit

3.1.2.4 Reactivos para geles de agarosa DNA

Agarosa, bromuro de etidio

3.1.2.5 Reactivos para aislamiento de plásmidos

QIAprep Spin Miniprep Kit (50) (Qiagen Inc., USA).

3.1.3 Soluciones

3.1.3.1 Medios de Cultivo Bacteriano

Medio LB

3.1.3.2 Soluciones para la purificación de α -sinucleína recombinante

Purificación por diálisis The Pur-A-Lyzer Dialysis Tub.

1L de Acetato de sodio 100 mM

Purificación por TALON COLUMN METAL AFFINITY (Clontech)

Amortiguador de extracción: 20 mM NaH₂PO₄, 20 mM Imidazol, 500 mM NaCl, pH 7,4.

Amortiguador de unión: 20 mM NaH₂PO₄, 20 mM Imidazol, 500 mM NaCl, pH 7,4

Amortiguador de lavado: 20 mM NaH₂PO₄, 30 mM Imidazol, 500 mM NaCl, pH 7,4

Amortiguador de elución: 20 mM NaH₂PO₄, 200 mM Imidazol, 500 mM NaCl, pH 7,4

3.1.4 Materiales

Columna Clontech

Columnas de plástico purificación proteínas Pur-A-L-lyzer mega 6000 (Da) dialysis

Filtro de 4 mL Centrifugal filtre devices Amicon ultra-4

3.1.5 Equipos

3.1.5.1 Equipos purificación de α -sinucleína recombinante

Sonicador omni sonic ruptor 400, Incubador shaker zhwy 100b, centrifuga Hermle Z 300 K y Arquimed centrifuge 5804

3.1.5.2 Equipos para la determinación del grado de pureza de la proteína

Marcador de proteínas Precision Plus Protein™ Unstained Standards* (bio-rad)

3.1.5.3 Equipos para estudios de agregación de α -sinucleína in vitro y su inhibición

Fluorímetro Synergy H1 Biotek (Monocromador).

3.1.5.4 Otros equipos

PH metro Strarter 2100 Farmalatina, Centrifuga Arquimed centrifuge 5804, Balanza analítica AUX120 (SHIMADZU), Agitador magnético FISATOM, Agitador de tubos MOBIL TUB (JP selecta), Baño termostático YSW-01, Espectrofotómetro semi-automático con pantalla digital BA-88^a, Fuente de Poder Bio-RadPower Pac 200, Cámara Electroforética Mini-Protean Tetra System, Refrigerador -80°C marca Panasonic modelo MDF-U33V-PB, refrigerador -20°C consul 260, Refrigerador 4°C Mademsa.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Clonamiento de α -sinucleína en vectores de expresión bacteriana

3.2.1.1. Plásmido bacteriano

Para la transformación y expresión de proteínas α -sinucleína *in vitro*, se utilizó la cepa de Bacteriana de *E. coli* BL21(DE3) con el plásmido pET28a+. En la **Figura 8** se presenta el mapa del plásmido pET28a+ en el cual se insertó la secuencia codificante de la proteína α -sinucleína, es un vector de clonación que contiene el promotor T7, el cual es utilizado para la expresión de genes que usan la T7 RNA polimerasa. El vector contiene un promotor T7 RNA polimerasa, gen que codifica la resistencia a Kanamicina.

3.2.1.2. *Generación de bacterias competentes:*

Para la generación de bacterias competentes utilizamos el método descrito por Zuliani [41] donde se obtuvo una colonia de E.coli BL21(DE3) en agar LB, se inoculó un vial de 10mL de caldo LB el cual se incubó a 37°C a 200 rpm aproximadamente con una duración de 18 horas.

Se obtuvo el 1% de este cultivo y se inoculó en 200 mL en medio LB donde fue incubado a 37°C a 200 rpm hasta obtener una D.O de 0,45-0.60 en 600nm, luego se colocó en hielo durante 20 min, posteriormente se centrifuga a 4000 rpm a 4°C durante 5 min donde se desechó el sobrenadante, y se resuspendió Buffer 1 (1,47 g CaCl₂; 1,42 g MgCl₂; 0,32 g CH₃COONa en 100 ml de H₂O) paulatinamente hasta completar los 40 mL.

Para finalizar se volvió a centrifugar a 4000rpm a 4°C durante 15min, se desechó el sobrenadante y se re suspendió en 4mL buffer 2 estéril frío (1,47 g CaCl₂+ 15 mL glicerol en 100 mL de H₂O). Para finalizar se alícuotan en tubos eppendorf de 200 µL y se conserva a -80°C. Esto se realizó con el fin de ayudar la entrada del vector con la secuencia de alfa sinucleína a las bacterias, para su posterior inducción.

3.2.1.3. Amplificación por PCR

Fue realizado previamente en el laboratorio la técnica de PCR para la amplificación del gen codificador de α -sinucleína por el Dr. Alberto Cornejo. Donde los tubos fueron incubados a 95°C por 3 min para asegurar la completa desnaturalización de la hebra de ADN. La amplificación se realizó a 30 ciclos de 95°C por 30 segundos para la desnaturalización, 51°C durante 1 min para hibridación y 72°C durante 1 min para la elongación. El producto finalizado del PCR fue clonado en el vector pET28a+.

3.2.1.4. Clonaje Bacteriano:

El clonaje de α -sinucleína humana (gentilmente donada por Dr. Claudio Fernández de la Universidad de Rosario-Argentina) fue realizado en el vector pET28a+, utilizando los siguientes cebadores: iniciador con un sitio de restricción para NdeI; y reverso con un sitio de restricción para HindIII. La mezcla de la reacción incluye 10 pmol de cada cebador, 200 μ M de cada dNTP, 1,5 mM MgCl₂ y 2,5 unidades de Taq DNA Polymerase (GIBCO-BRL) en un volumen final de 50 μ L de PCR buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.4; 50 mM KCl).

3.2.1.5. Transformación bacteriana:

Se incubaron 100 μ l de bacterias competentes con 5 μ l de plásmido pET28a+ por 30 minutos a 0° C. Luego se incubó 1 minuto más a 42° C, por último se las dejó 5 minutos más en hielo. Se agrega 1 ml de medio LB y se las

deja crecer una hora a 37° C con agitación 140 rpm aproximadamente. A partir de bacterias transformadas, se las diferencia de aquellos que no hayan incorporado el plásmido debido a su resistencia no natural al antibiótico Kanamicina.

3.2.2 Producción de proteína recombinante:

Las cepas de *E. coli* BL21 (DE3) fueron crecidas en un matraz de aforo de 50 ml en medio LB. A partir de una colonia se inocularon 30 mL de medio LB con 90 µL de Kanamicina dejándolas crecer alrededor de 18 horas a 37°C con agitación constante (220 rpm aprox. Al día siguiente, se sacaron 5 ml del cultivo, al cual se le adiciona glicerina y se congela a -80°C para mantener un stock de la bacteria y con los 25 mL restantes de este cultivo se inocularon 250 mL de medio LB con 750 µL de kanamicina. Se crecieron a 37°C con la misma agitación hasta alcanzar DO a 600 nm entre 0,45 –0,65. Al alcanzar esta DO se colocara 250 µL de IPTG se dejaron creciendo por 4 horas con la misma temperatura y agitación. Las bacterias obtenidas se llevaron a tubos falcon de 50 mL para luego ser centrifugados a 5.000 rpm por 10 min a 4°C descartando el sobrenadante y obteniendo el pellet de nuestra bacteria competente los cuales fueron guardados a -80°C su uso.

3.2.3 Expresión de α -sinucleína recombinante

3.2.3.1 Control de la Expresión de la proteína α -sinucleína recombinante:

Se utilizó una colonia de *E. coli* BL21(DE3) transformada con su plasmidios pET28a+, se creció a 37°C en un tubo con 5 mL de medio LB con Kanamicina como antibiótico de selección hasta alcanzar una DO a 600 nm de 0,65 aproximadamente. Posteriormente se indujo la expresión α -sinucleína recombinante por 4 horas a 37°C con 1 mM de IPTG y se centrifugó a 5.000xg por 10 min a 4°C. Se utilizaron como controles negativos bacterias no transformadas, en presencia de IPTG.

3.2.4. Purificación de α -sinucleína recombinante

3.2.4.1. Preparación de los pellets:

Los pellets obtenidos fueron tratados con 3 mL de 20 mM NaH₂PO₄, que fue utilizado como amortiguador de resuspensión de células, sonicados por 90 seg a máxima potencia en Sonicador omni sonic ruptor 400 y centrifugados a 4.000 rpm por 5 min. Se separaron las fracciones solubles e insolubles.

3.2.4.2. Cromatografía de afinidad con metal inmovilizado IMAC

También conocido como TALON metal Affinity Resin que es una cromatografía de afinidad, que consta de un quelante tetradentado cargada con cobalto, que tiene una afinidad y especificidad para las proteínas marcado con

el aminoácido histidina. Esta resina permite la purificación de proteínas en condiciones nativas o desnaturalización.[42]

Se utilizó esta cromatografía de afinidad donde atravesó la resina una fase móvil de Amortiguador de extracción: 20 mM NaH_2PO_4 , 20 mM Imidazol, 500 mM NaCl, pH 7,4.

Amortiguador de unión: 20 mM NaH_2PO_4 , 20 mM Imidazol, 500 mM NaCl, pH 7,4

Amortiguador de lavado: 20 mM NaH_2PO_4 , 30 mM Imidazol, 500 mM NaCl, pH 7,4

Amortiguador de elución: 20 mM NaH_2PO_4 , 200 mM Imidazol, 500 mM NaCl, pH 7,4

Se saca el sobrenadantes el cual se mezcló con (columna TALON), esto se incubó en agitación constante con el Agitador de tubos MOBIL TUB (JP selecta), en frio durante 2hrs. Pasado este tiempo se centrifugo durante 5min a 2000rpm, de donde se obtuvo el sobrenadante al cual se le denomina FRACCION 1, que se guardó a -20°C .

La resina que ya se encuentra libre de la fracción 1, se le agregó 6ml de Buffers 20mM de NaH_2PO_4 , 500Mm de NaCl, 30mM Imidazol, para realizar de esta forma el lavado, el cual se deja a 4°C durante 10min en agitación constante, una vez transcurrido este periodo se montó en un soporte universal un tubo filtro en el cual, se trasvasijo el contenido del tubo falcón y se recuperara en un tubo eppendorf, la proteína que no se unió con la resina, a la que se le denominara FLOW 1, que es el primer ml que decanta, este también

se congelara a -20°C al igual que la fracción 1. El procedimiento del lavado se realizó 3 veces agregando de esta forma al igual que en el paso anteriormente mencionado los 6ml de Buffers 20mM de NaH_2PO_4 , 500Mm de NaCl, 30nM Imidazol, se deja a 4°C durante 10min en agitación constante, una vez transcurrido este periodo se montó en un soporte universal un tubo filtro en el cual, se trasvasijara el contenido del tubo falcón y se espera a que decante todo el buffer, evitando que se seque la resina.

El último paso de la purificación será la elución la cual consiste en agregar buffers 20mM de NaH_2PO_4 , 500Mm de NaCl, 200nM Imidazol el cual se dejó a 4°C durante 10min en agitación constante, una vez transcurrido este periodo se montó en un soporte universal un tubo filtro en el cual, se trasvasijara el contenido del tubo falcón y se recuperara en 6 tubos eppendorf, de 1.5 ml cada uno y a cada tubo de le denominara con la letra E y el número de la elución que corresponda.

3.2.4.3 Determinación del grado de pureza de α -sinucleína recombinante:

Las fracciones de proteínas fueron separadas mediante la técnica SDS-PAGE, donde se formaron geles acrilamida / bisacrilamida con una concentración del 15% (Tabla 1), las muestras fueron tratadas con SDS y llevados a 90°C por 5 min al baño termostático YSW-01, donde finalmente son cargadas 20 μL de la muestra dentro de los pocillos del gel concentrador. La corrida electroforética va a correr con un tiempo determinado de alrededor de 2 horas a 100 watts. Como resultado de la electroforesis se obtienen los geles donde posteriormente son separados de la cámara y depositados en frascos con agua destiladas con la finalidad de lavarlos de remanes que

quedan en la corrida electroforética, finalmente los geles son teñidos con azul de Coomassie y llevados al incubadora shaker zhwy 100b a 23°C con una agitación constante (120 rpm aprox.) por alrededor de 12 horas, posteriormente son lavados y visualizados.

Componentes	Gel separador	Gel concentrador
30% Acrilamida/bisacrilamida	7.5mL	0.65mL
Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8	3.75mL	---
Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8	---	1.25mL
Persulfato de Amonio (PSA) (0.1 mg/mL)	0.05mL	0.025mL
H ₂ O	3.75mL	3.05mL
TEMED	0.01mL	0.005mL

TABLA 1.- Composición de un gel de SDS/PAGE al 15%

3.2.5 Diálisis y concentración de α -sinucleína recombinante

3.2.5.1 Diálisis de α -sinucleína recombinante:

Se utilizó la técnica de diálisis de proteína por medio del kit Pur-A-L-lyzer mega 6000 dialysis (Sigma Aldrich). Se depositó en los pocillos de diálisis las eluciones de proteínas que se obtuvieron, en un vaso precipitado de 500 mL se colocó nuestro pocillos de diálisis con su flotador en una solución de Acetato de

sodio 100 mM por alrededor de 18 horas y se mantuvieron en agitación constante por medio del agitador magnético.

3.2.5.2 Concentración de α -sinucleína recombinante:

La solución obtenida de la diálisis son llevadas a filtros concentradores (clontech) en donde se centrifugaron a 4.000 rpm por 10 min, y lo que quedo dentro del filtro es el resultado final los cuales son separados en tubos eppendorf con un volumen final de 500 μ L y se congelaron hasta su uso (-80).

Para medir la concentración final de la proteína se utilizó el fluorimetro en modo de absorbancia, en el cual se obtiene la concentración de la muestra y gracias a la siguiente ecuación, se obtiene la concentración final:

$$A = 1 \times \varepsilon \times C$$

En donde A es la absorbancia de la muestra, ε es el coeficiente de extinción molar que en este caso es de 5600 y C es la concentración. El resultado se expresa como μ M⁻¹ cm⁻¹.

3.2.6 Estudios de agregación de α -sinucleína recombinante

3.2.6.1 Estudios por medio de ThT

La agregación de la proteína α -sinucleína, fue monitoreada con Tioflavina T[ThT], se escogió este compuesto, puesto que la α -sinucleína al agregarse cambia su conformación, pasando de una alfa hélice a una hoja- β , y diversos estudios demuestran que en este tipo de conformación se encuentra un sitio de unión para el ThT, denominado “escaleras de hebras transversales” traducir este término.[40] Lo cual permite monitorear de una manera más eficiente la agregación.

La proteína α -sinucleína (75 μ M) se dejó agregar *in vitro* a 37°C con agitación leve (80 rpm), se le agrego los compuestos a estudiar en distintas concentraciones las cuales fueron 10, 25,50, 75, 100 μ M para cada uno de los compuestos a analizar y se dejó incubando durante 24hrs, después de cumplido este periodo se le agrego el ThT 100 μ l a 25 μ M y se deja incubar por una hora. Como control negativo se dejó agregar la proteína en las mismas condiciones que la que presentaba el compuesto. Todo esto fue leído en el equipo Synergy H1 microplate reader (biotek)

3.2.7 Análisis estadístico

Los resultados del análisis estadístico se expresaron como error estándar de la media (SEM). En todos los experimentos, las diferencias estadísticas entre tratamientos y su respectivo control se determinaron mediante análisis t student, el nivel de significancia fue establecido para $p < 0.001$. Todos los análisis fueron hechos con el software SIGMAPLOT 13.

4. RESULTADOS

4.1. Clonamiento de α -sinucleína en vectores de expresión

Las secuencias de α -sinucleína fue amplificada por PCR y posteriormente fue clonado en un vector de expresión bacteriana pET-28a(+), con la finalidad de expresarlos en cultivos de *E. coli* y permitir su purificación por IMAC. Como resultado se obtuvo el vector pET-28a(+) con la secuencia de α -sinucleína.

4.2. Transformación bacteriana del sistema *E. coli* BL21(DE3)/pET-28a(+)

La transformación bacteriana, consiste en introducir un plásmido externo a la bacteria, es decir la presencia del vector con la secuencia de alfa sinucleína, se verifico la correcta incorporación del vector dentro de la bacteria, de momento que la bacteria obtiene resistencia a la Kanamicina, dando como resultado crecimiento bacteriano en presencia de Kanamicina en medio LB.

4.3. Expresión de α -sinucleína recombinante en cultivos de *E. coli*

Para la expresión de α -sinucleína recombinante se utilizó el sistema *E. coli* BL21(DE3). Se indujo con IPTG 1 Mm, con el sistema *E. coli* BL21(DE3)/pET-28a(+), que expresa α -sinucleína, se comprobó la expresión de una banda de

14 kDa para α -sinucleína. Este valor se corresponde con el peso molecular descrito para α -sinucleína estudiada “**Figura 9**”

En esta unidad de investigación se optimizó la concentración del inductor IPTG y también se optimizó el D.O, la concentración final del inductor fue de 1mM, con un tiempo de inducción de 4 horas a 37°C, con una agitación constante de 220 rpm aprox. Y una D.O de 600 nm entre 0,45 y 0,65. La expresión proteica se verifico mediante electroforesis SDS-PAGE “**Figura 9**”

4.4.- Purificación de la proteína α -sinucleína recombinante por IMAC

Para la purificación de la proteína α -sinucleína, se modificó el método descrito por Dr. Cornejo[43]. Se dejó creciendo la bacteria *E.coli* BL21(DE3) transformadas previamente con los plásmidos pET-28a (+) en 250ml de medio de cultivo.

Para comenzar con la etapa de purificación, se utilizó el extracto α -sinucleína, la técnica utilizada se diferenció de la descrita por Jiménez[44], en la que se utilizó agitación constante con temperatura de 4°C en todos los tiempos de incubación, teniendo como resultado eluciones de α -sinucleína puras. La figura 9 muestra el análisis electroforético de las fracciones eluidas desde la columna donde se aprecia proteínas con un peso molecular 14 kDa, este valor se corresponde con el peso molecular descrito.

4.5.-Electroforesis SDS-PAGE de la proteína α -sinucleína recombinante.

Para nuestra electroforesis utilizamos geles de poliacrilamida compuesto por acrilamida / bisacrilamida, en donde se polimerizara en acción de un iniciador ión persulfato ($S_2O_8^{2-}$) y como catalizador el reactivo de TEMED, donde la velocidad de polimerización va a estar determinada por la concentración de estos dos reactivos. Para poder evidenciar la presencia de la proteína α -sinucleína se realizó una electroforesis SDS-PAGE, utilizando el marcador de proteínas que se observa a continuación en la “figura 9”.

La “figura 9” muestra el análisis electroforético de las fracciones eluidas con el fin de evidenciar la proteína α -sinucleína recombinante que tiene un peso molecular de 14 kDa.

En la figura 9 se muestra los distintos carriles de la electroforesis los que son descritos a continuación:

- A: Marcador de proteínas Precision Plus Protein™ Unstained Standards (BIORAD).
- B: Observa una serie de bandas de menor peso molecular correspondientes a productos de degradación de las bacterias, después de una incubación de 2 horas.
- C: Fracción de bajo peso molecular que corresponden a productos que no se unieron en la primera incubación y tampoco en el primer lavado.

- D-I: Corresponden a las eluciones obtenidas al purificar de α -sinucleína por IMAC

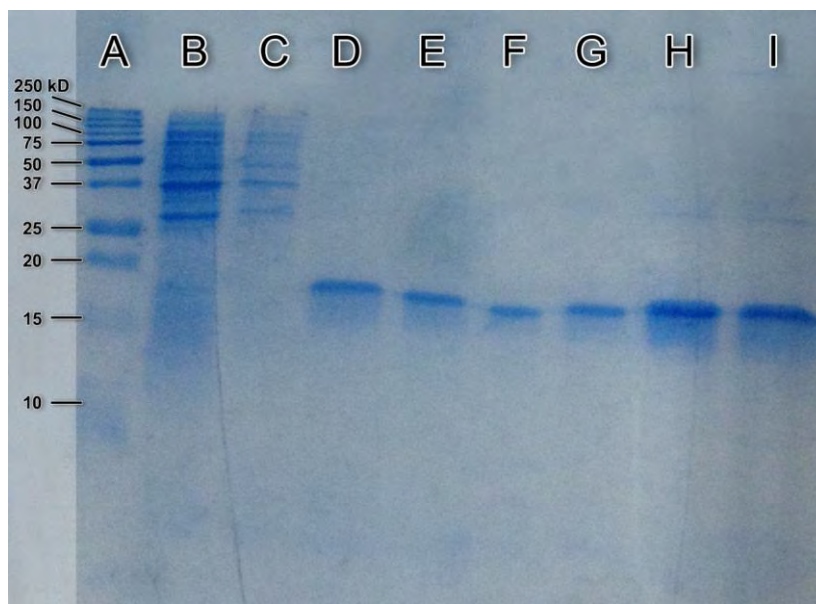


FIGURA 9 Análisis electroforético de SDS-PAGE en gel de acrilamida 15%, evidenciando la presencia de α -sinucleína con un peso de 14kDa.

4.6. Estudios de agregación α -sinucleína *in vitro*

Los compuestos a estudiar fueron ensayados con el test de fluorescencia con ThT. Cada compuesto fue probado con 5 concentraciones diferentes las cuales fueron 10, 25, 50, 75, 100 μ M para cada uno de los compuestos a analizar.

Las concentraciones de la proteína α -sinucleína, fueron estandarizadas a una concentración de $75\mu\text{M}$, a esta concentración la agregación de la proteína fue la óptima, y se dejó incubando a 37°C con agitación constante por 24 horas, para su a agregación.

4.6.1.- Ácido rosmarínico inhibe la agregación de α -sinucleína *in vitro*

El estándar de ácido rosmarínico fue ensayado en el test de fluorescencia con ThT. Se probó distintas concentraciones como se mencionó anteriormente para dicho compuesto. Los resultados del efecto en la agregación de α -sinucleína se aprecian en la “Figura 10”.

En el gráfico de la “Figura 10”, se muestra que a bajas concentraciones del ácido rosmarínico, existe una disminución de la agregación cercana a un 20%, la cual va disminuyendo a medida que se le adiciona mayor concentración del catecol, teniendo una inhibición cercana al 10% en las concentraciones más altas del compuesto. En el gráfico de la figura número 11 podemos observar y comparar el ácido rosmarínico en relación con el control positivo de agregación.

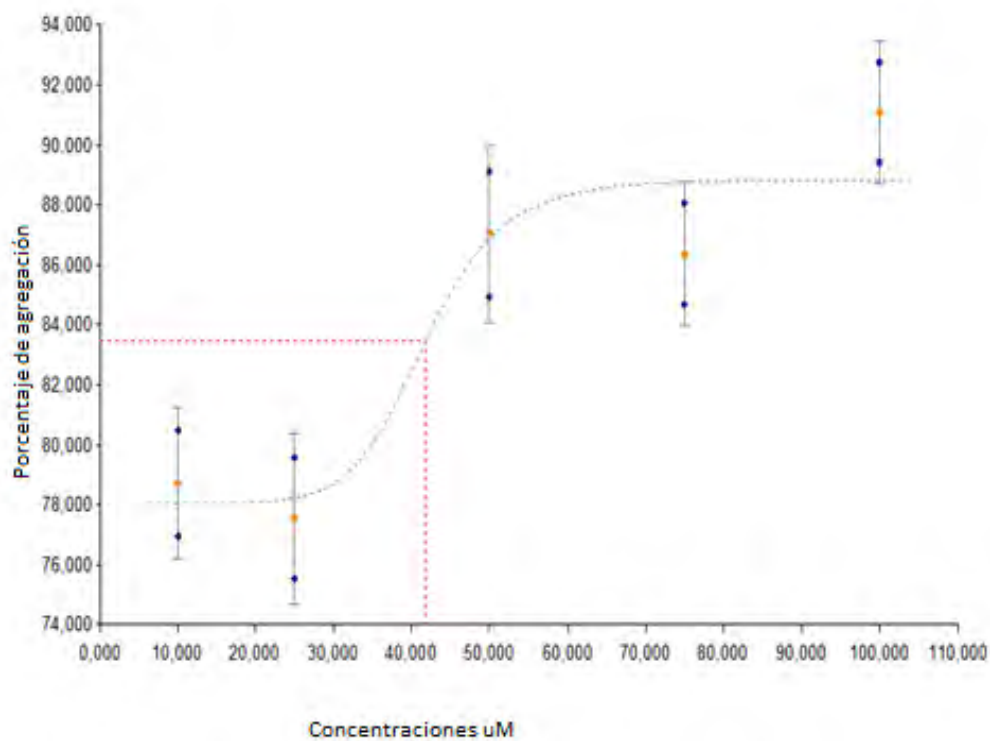


FIGURA 10. Gráfico inhibición ácidos rosmarínico en α -sinucleína in vitro, eje Y es el porcentaje de agregación y el eje X es la concentración del compuesto (*t*-student $p < 0.001$)

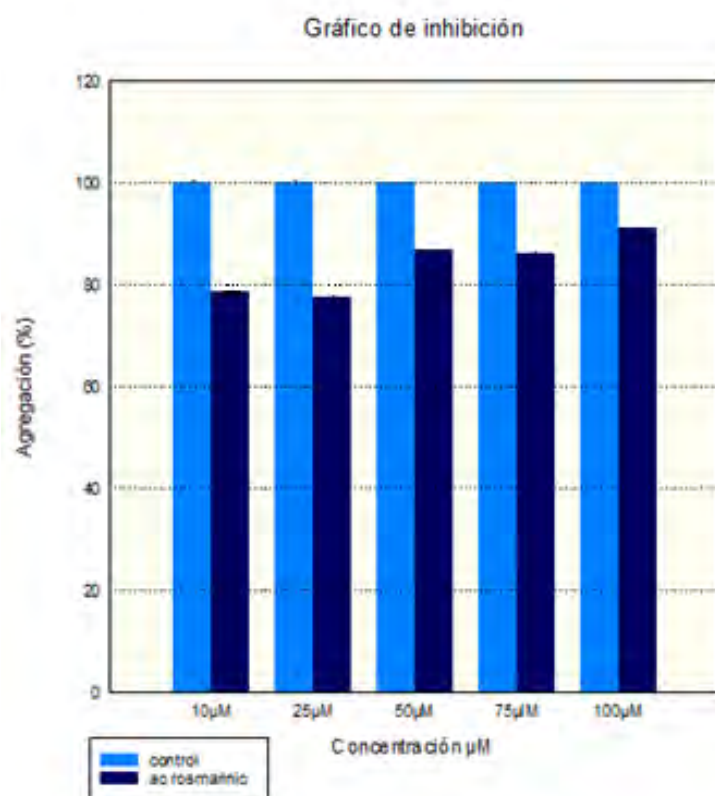


FIGURA 11 En este gráfico se muestra una comparación entre la agregación de α -sinucleína (control positivo) versus inhibición con el ácido rosmarínico (t student $p < 0.001$).

4.6.2.- Clovamida inhibe la agregación de α -sinucleína *in vitro*

El estándar de clovamida fue ensayado en el test de fluorescencia con ThT. Se probó distintas concentraciones como se mencionó anteriormente para dicho compuesto. Los resultados del efecto en la agregación de α -sinucleína se aprecian en la Figura 12 y 13. Los resultados obtenidos fueron los siguientes.

En este gráfico se observa que la clovamida presenta un efecto desagregante significativo, ya que a medida que aumenta la concentración de esta va disminuyendo de forma significativa la agregación de la α -sinucleína, llegando a casi un 70% de inhibición de la agregación a la concentración de 100 μ M también se puede observar el IC₅₀ el cual equivale al 50 μ M.

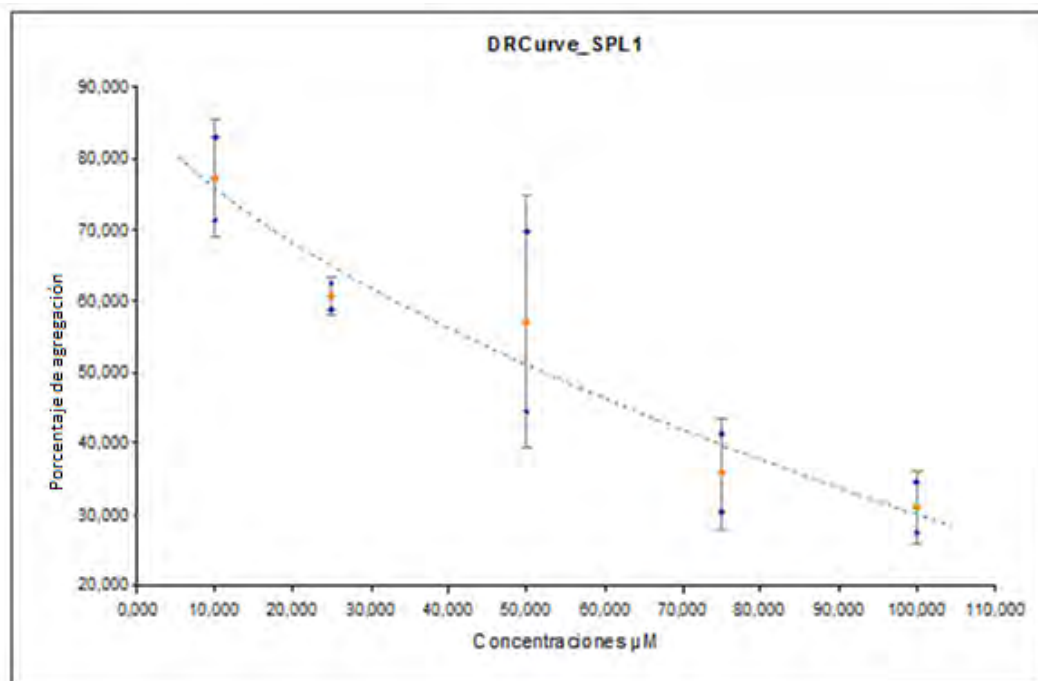


FIGURA 12. Grafico inhibición clovamide en α -sinucleína in vitro, eje Y es el porcentaje de agregación y el eje X es la concentración del compuesto. (t student $p < 0.001$)

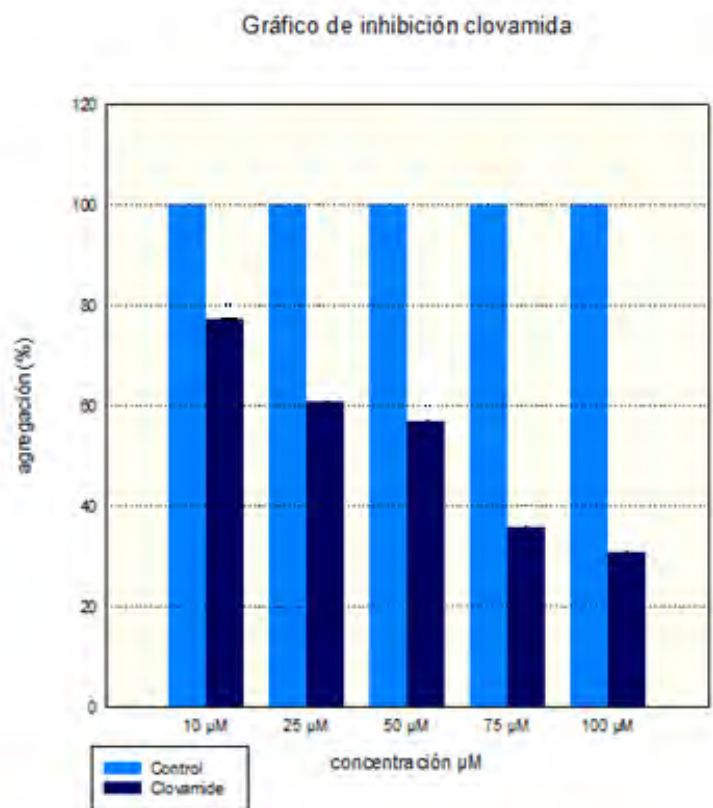


FIGURA 13 En este gráfico se muestra una comparación entre la agregación de α -sinucleína versus inhibición con clovamida (*t student* $p < 0.001$).

5.- DISCUSIÓN

Durante la etapa de clonación, al clonar el fragmento de la alfa sinucleína se le adicionó un hexapéptido de histidina en su extremo aminoterminal (his-tagged), para poder purificar la proteína por el método de cromatografía por IMAC. Una de las aplicaciones más importantes de este método, es la purificación de proteínas recombinantes. Debido a su alta afinidad y especificidad de la etiqueta His, una sola etapa de purificación IMAC en la mayoría de los casos conduce a un grado de pureza de la preparación de proteína diana que es suficiente para muchas aplicaciones. [42].

Para la expresión de la proteína α -sinucleína recombinante se utilizó la cepa de bacteriana de *E. coli* BL21 (DE3) con el plásmido pET28a siendo un procedimiento de expresión simple, de fácil reproducción obteniéndose un alto grado de pureza de la proteína.

Para la obtención de células competentes como se comentó con anterioridad, se incubaron 100 μ l de bacterias competentes con 5 μ l de plásmido pET28a+ por 30 minutos a 0° C. Luego se incubó 1 minuto más a 42° C, por último se las dejó 5 minutos más en hielo, este tratamiento de choque por calor altera la membrana externa y aumenta de esta forma la permeabilidad del ADN.

Para la determinación del grado de pureza de la α -sinucleína, se escogió la técnica electroforética SDS-PAGE. Se utilizó esta técnica debido a la capacidad que tienen las proteínas, de tener diferentes cargas eléctrica a un pH diferente al de su punto isoeléctrico, para evitar este problema las proteínas van a estar en contacto con SDS, que es un detergente aniónico que carga las

proteínas en forma negativa y gracias al calor se van a desnaturalizar perdiendo su estructura tridimensional, con el fin de esperar una migración de proteínas exclusivamente por su peso molecular y no a su carga neta y forma.[45]

Mediante los estudios realizados con ThT, se demuestra de forma cualitativa la presencia de hoja- β que se encuentra en la proteína.

Un factor relevante es ver la concentración necesaria que debe presentar la proteína con el fin de presentar una agregación óptima al momento de probar los compuestos a estudiar, por tanto se llegó a que esta concentración es de 75 μ M, debido a que a una menor concentración la agregación no fue la suficiente para obtener valores de lectura apropiados para determinar efectivamente la acción de los compuestos.

Los resultados de la inhibición de la agregación con el ácido rosmarínico que se muestran en figura 11, no son los esperados ya que esta presenta un bajo índice de inhibición, puesto que a una concentración de 10 μ M inhibe cerca de un 20%, mientras que al aumentar las dosis de este catecol, esta inhibición disminuye hasta un 10%, lo que se contradice con los resultados que presento con la proteína TAU otro modelo de agregación *in vitro* asociado a enfermedades neurodegenerativas, la cual también presenta una agregación de tipo amiloide, en la cual estas mismas concentraciones, si presentó efecto sobre la agregación del fragmento 4R de la proteína tau. (datos no publicados). Esto se puede deber a que al ser distintas proteínas presentan secuencias de aminoácidos diferentes y por lo tanto la molécula se une a alguna región que no

es tan importante desde el punto de vista de la interacción entre residuos aminoácidos para gatillar el proceso de agregación.

Los estudios realizados con la clovamida, mostraron que es capaz de inhibir la formación de agregación, presentando una buena relación dosis-respuesta en la proteína α -sinucleína, este proceso de inhibición estaría relacionado con una disminución en la formación de estructuras hoja- β , como se desprende indirectamente por los ensayos con fluorescencia con ThT. Alterando ya sea los agregados formados o inhibiendo alguna etapa en la formación de fibras.

Los catecoles utilizados se comportaron de forma diferente, estudios científicos anteriores, se muestra que estas sustancias de origen natural, ejercen efectos neuroprotectores contra el estrés oxidativo, excitotoxicidad y la lesión de isquemia, en células de origen neuronales [18]. Estos resultados permiten continuar trabajando en unidades de investigación posteriores, evaluando la capacidad de la clovamida y otros compuestos de características estructurales similares a los catecoles, analizando aspectos biofísicos en relación con la interacción de la clovamida.

6.-CONCLUSIÓN.

En esta unidad de investigación, se provó la efectividad de dos catecoles para inhibir el proceso de agregación de la proteína α -sinucleína, la cual tiene un rol activo en el desarrollo de la enfermedad de Parkinson. [13]

Los catecoles utilizados fueron el ácido rosmarinico y la clovamida, se escogieron estos debido a la previa evidencia científica, la cual muestra que estas sustancias de origen natural, ejercen efectos neuroprotectores contra el estrés oxidativo, excitotoxicidad y la lesión de isquemia, en células de origen neuronales [18].

Los resultados fueron obtenidos mediante estudios realizados con fluorescencia ThT, se demuestra cuanto es la presencia de hoja- β que se encuentra en la proteína(33), en el caso del ácido rosmarínico los resultados no son los esperados ya que este presenta un bajo índice de inhibición, puesto que a una concentración de 10 μ M inhibe cerca de un 20%, mientras que al aumentar las dosis de estos catecoles, esta inhibición disminuye hasta un 10%, sin embargo en un modelo de agregación de la proteína tau, involucrada en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, este catecol presenta una buena respuesta desde el punto de inhibición, esto puede sugiere que la unión del catecol en regiones que no están involucradas en la agregación puede ser crucial en el momento de inhibir el proceso.

Sin embargo, la clovamida es capaz de inhibir la formación de agregación en la proteína α -sinucleína, este proceso de inhibición estaría relacionado con una disminución en la formación de estructuras hoja- β presentando una inhibición dosis-respuesta (33).

La importancia de esta unidad de investigación es la oportunidad de generar nuevos estudios con compuestos de origen natural, para la inhibición de la agregación de la proteína α -sinucleína, los cuales podrían servir como una nueva estrategia terapéutica para la Enfermedad de Parkinson.

7. - BIBLIOGRAFÍA

1. Huse, D.M., et al., *Burden of illness in Parkinson's disease*. *Mov Disord*, 2005. **20**(11): p. 1449-54.
2. Dauer, W. and S. Przedborski, *Parkinson's disease: mechanisms and models*. *Neuron*, 2003. **39**(6): p. 889-909.
3. Lorenzen, N., et al., *How epigallocatechin gallate can inhibit alpha-synuclein oligomer toxicity in vitro*. *J Biol Chem*, 2014. **289**(31): p. 21299-310.
4. Hirsch, E.C. and S. Hunot, *Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection?* *Lancet Neurol*, 2009. **8**(4): p. 382-97.
5. Kalia, L.V., et al., *alpha-Synuclein oligomers and clinical implications for Parkinson disease*. *Ann Neurol*, 2013. **73**(2): p. 155-69.
6. Okun, M.S., et al., *Subthalamic deep brain stimulation with a constant-current device in Parkinson's disease: an open-label randomised controlled trial*. *Lancet Neurol*, 2012. **11**(2): p. 140-9.
7. Ehrnhoefer, D.E., et al., *EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers*. *Nat Struct Mol Biol*, 2008. **15**(6): p. 558-66.
8. Micheli, F.E., *Enfermedad de Parkinson y trastornos relacionados*. 2006: Ed. Médica Panamericana.
9. GPe, D., *Enfermedad de Parkinson*. 2013: p. 12.
10. Hunot, S. and E.C. Hirsch, *Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease*. *Annals of Neurology*, 2003. **53**(S3): p. S49-S60.
11. Foltynie, T., et al., *The genetic basis of Parkinson's disease*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2002. **73**(4): p. 363-70.
12. Ben-Shlomo, Y. and K. Sieradzan, *Idiopathic Parkinson's disease: epidemiology, diagnosis and management*. *Br J Gen Pract*, 1995. **45**(394): p. 261-8.
13. Uversky, V.N., *Neuropathology, biochemistry, and biophysics of alpha-synuclein aggregation*. *Journal of Neurochemistry*, 2007. **103**(1): p. 17-37.
14. Conway, K.A., J.D. Harper, and P.T. Lansbury, *Fibrils Formed in Vitro from alpha-Synuclein and Two Mutant Forms Linked to Parkinson's Disease are Typical Amyloid*. *Biochemistry*, 2000. **39**(10): p. 2552-2563.
15. Kumaran, R. and M.R. Cookson, *Pathways to Parkinsonism Redux: convergent pathobiological mechanisms in genetics of Parkinson's disease*. *Hum Mol Genet*, 2015. **24**(R1): p. R32-44.
16. Cookson, M.R., G. Xiromerisiou, and A. Singleton, *How genetics research in Parkinson's disease is enhancing understanding of the*

- common idiopathic forms of the disease*. Current Opinion in Neurology, 2005. **18**(6): p. 706-711.
17. María Rosario Luquin, *Levodopa en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson: mitos y realidades*. 2012.
 18. Fallarini, S., et al., *Clovamide and rosmarinic acid induce neuroprotective effects in in vitro models of neuronal death*. Br J Pharmacol, 2009. **157**(6): p. 1072-84.
 19. Rodrigues, E.S.F., *Comparative study of the effect of selected mutations on alpha-synuclein oligomerization in living cells using bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assay*. 2012.
 20. Hardy, J., *Genetic analysis of pathways to Parkinson disease*. Neuron, 2010. **68**(2): p. 201-206.
 21. Irwin, D.J., et al., *Neuropathologic substrates of Parkinson disease dementia*. Annals of neurology, 2012. **72**(4): p. 587-598.
 22. Romo-Gutierrez, <gm151o.pdf>. 2015.
 23. Lashuel, H.A. and H. Hirling, *Rescuing defective vesicular trafficking protects against alpha-synuclein toxicity in cellular and animal models of Parkinson's disease*. ACS Chem Biol, 2006. **1**(7): p. 420-4.
 24. Breydo, L., J.W. Wu, and V.N. Uversky, *Alpha-synuclein misfolding and Parkinson's disease*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1822**(2): p. 261-85.
 25. Dev, K.K., et al., *Part II: α -synuclein and its molecular pathophysiological role in neurodegenerative disease*. Neuropharmacology, 2003. **45**(1): p. 14-44.
 26. Lee, H.J., E.J. Bae, and S.J. Lee, *Extracellular alpha--synuclein-a novel and crucial factor in Lewy body diseases*. Nat Rev Neurol, 2014. **10**(2): p. 92-8.
 27. Fauerbach, J., <Tesis_5357_Fauerbach.pdf>. 2015.
 28. Pedraza, N.L.V., et al., *Análisis funcional de oligómeros de alfa-sinucleína en la permeabilidad de membranas*. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana.
 29. Bendor, J.T., T.P. Logan, and R.H. Edwards, *The function of alpha-synuclein*. Neuron, 2013. **79**(6): p. 1044-66.
 30. Espargaró Colomé, A., S. Ventura Pedret, and R. Sabaté Lagunas, *Modelos proteicos para el estudio de la agregación amiloide in vitro e in vivo*. 2013.
 31. Laganowsky, A., et al., *Atomic view of a toxic amyloid small oligomer*. Science, 2012. **335**(6073): p. 1228-1231.
 32. Garrancho-Barnés, M.-P., *Análisis del papel protector de los polifenoles en enfermedades neurodegenerativas*. 2014.
 33. Lorenzen, N., et al., *How Epigallocatechin Gallate Can Inhibit α -Synuclein Oligomer Toxicity in Vitro*. The Journal of Biological Chemistry, 2014. **289**(31): p. 21299-21310.

34. Bieschke, J., et al., *EGCG remodels mature alpha-synuclein and amyloid-beta fibrils and reduces cellular toxicity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(17): p. 7710-5.
35. Petersen, M., <Rosmarinic acid.pdf>. 2003.
36. Arlorio, M., et al., *Roasting impact on the contents of clovamide (N-caffeoyl-L-DOPA) and the antioxidant activity of cocoa beans (Theobroma cacao L.)*. Food Chemistry, 2008. **106**(3): p. 967-975.
37. Park, J.B., *N-coumaroyldopamine and N-caffeoyldopamine increase cAMP via beta 2-adrenoceptors in myelocytic U937 cells*. FASEB J, 2005. **19**(6): p. 497-502.
38. Irisarri, E.R., *FOSFODIESTERASAS DEL AMPc Y DEL GMPc EN EL CEREBRO: EXPRESIÓN EN PROCESOS NEUROINFLAMATORIOS Y NEURODEGENERATIVOS*. 2007.
39. Zeng, H., et al., *Anti-inflammatory properties of clovamide and Theobroma cacao phenolic extracts in human monocytes: evaluation of respiratory burst, cytokine release, NF-kappaB activation, and PPARgamma modulation*. J Agric Food Chem, 2011. **59**(10): p. 5342-50.
40. Biancalana, M. and S. Koide, *Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1804**(7): p. 1405-12.
41. Álvarez, L.Z., *OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA FURB DE ANABAENA SP*. 2010.
42. Block, H., et al., *Chapter 27 Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC)*. 2009. **463**: p. 439-473.
43. Cornejo, A., et al., *Fulvic acid inhibits aggregation and promotes disassembly of tau fibrils associated with Alzheimer's disease*. J Alzheimers Dis, 2011. **27**(1): p. 143-53.
44. RUBILAR, J.M.J., *HACIA LA BÚSQUEDA DE MOLÉCULAS CON CAPACIDAD ANTIAGREGANTE DE PROTEÍNA TAU: IMPLICACIONES EN EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER*. 2011.
45. Weber, K. and M. Osborn, *The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*. Journal of Biological Chemistry, 1969. **244**(16): p. 4406-4412.