

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS

CINÉTICA DE FIBRILACIÓN DE LISOZIMA HUMANA RECOMBINANTE (LHR)
Y ACTIVIDAD CITOTÓXICA EN CÉLULAS DEL EPITELIO PIGMENTARIO
RETINAL HUMANO (CÉLULAS ARPE-19)

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

CON OPCIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

EVA DANIELA RUIZ ORTEGA

HERMOSILLO, SONORA

AGOSTO DE 2013.

Repositorio Institucional UNISON



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



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

FORMATO DE APROBACIÓN

Los miembros del Comité de Tesis designado para revisar la Tesis de **Eva Daniela Ruiz Ortega** la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito para obtener el Título de Licenciado en Biología con Opción en Acuicultura.

Dr. Josué Elías Juárez Onofre
Director de Tesis

Dra. María Guadalupe Burboa Zazueta
Sinodal Secretario

Dr. Miguel Ángel Valdés
Sinodal

Dr. Marco Antonio López
Suplente

DEDICATORIA

A mis padres, Irma y Leonardo.

A mis hermanos, Ibor y Héctor.

A mi nana Fide[†] y tata Pancho.

A Carolina y Dulce.

A Josué Juárez.

AGRADECIMIENTOS

Al Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS), por la creación de la Licenciatura en Biología.

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

Al Dr. Miguel Ángel Valdés del Departamento de Física de la Universidad de Sonora, por todo su apoyo, consejos y asesoramiento durante el desarrollo de mi trabajo de tesis y la oportunidad brindada de trabajar en su laboratorio de fluidos complejos.

A la Dra. María Guadalupe Burboa Zazueta del departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, por el asesoramiento y apoyo durante el desarrollo experimental, en su laboratorio de bioquímica y biología celular, así como miembro del comité de revisión de tesis.

Al Dr. Marco Antonio López por aceptar formar parte del comité de revisión de tesis, su apoyo, consejos y correcciones durante el proceso de revisión de mi trabajo.

Al Dr. Alf Enrique Meling López, coordinador de la carrera de biología, por todo su apoyo y enseñanzas compartidas durante la Licenciatura en Biología.

A mi compañero de laboratorio Mario Almada por su apoyo durante el desarrollo de mi trabajo experimental.

A CONACyT por el apoyo otorgado al proyecto # 151794 .

CONTENIDO

	Página
LISTA DE TABLAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMEN	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
II. 1. Jerarquía de la Estructura de las Proteínas	4
II. 1. 1. Estructura primaria de proteínas	4
II. 1. 2. Estructura secundaria	4
II. 1. 3. Estructura secundaria: α -hélices y hojas- β	5
II. 1. 4. Estructura terciaria	8
II. 1. 5. Estructura cuaternaria	9
II. 2. Características de Plegamiento	10
II. 3. Plegamiento Incorrecto y Disfunción celular	11
II. 3. 1. Fibras de amiloide	12
II. 4. Lisozima	14
II. 4. 1. Lisozima humana	15
II. 5. Amiloidosis Sistémica por Lisozima	16
III. JUSTIFICACIÓN	18
IV. HIPÓTESIS	19
V. OBJETIVO	20
V. 1. Objetivo General	20
V. 2. Objetivos Específicos	20
VI. METODOLOGÍA	21
VI. 1. Formación de Fibras Amiloides	21
VI. 2. Estudio de la Cinética de Fibrilación de Lisozima Humana Recombinante (LHr)	21
VI.2.1. Fluorescencia de thioflavina T (ThT)	21
VI. 2. 2. Dispersión dinámica de luz (DLS)	21
VI. 2. 3. Tensión superficial	23
VI. 3. Determinación de la morfología de estructuras de LHr	30
VI. 3.1. Microscopía de fuerza atómica (AFM)	30

VI. 4. Determinación de Transición en la Conformación Estructural de LHr	32
VI. 4. 1. Espectroscopía infrarroja con transformadas de Fourier (FT-IR)	32
VI. 5. Determinación de Potencial Zeta	34
VI. 6. Viabilidad Celular	38
VII. RESULTADOS	42
VII. 1. Cinética de Fibrilación de Lisozima Humana Recombinante (LHr)	42
VII. 1. 2. Fluorescencia de thioflavina T (ThT)	42
VII. 1. 3. Dispersión dinámica de luz (DLS)	42
VII. 1. 4. Tensión superficial	42
VII. 1. 4. 1. Constante de adsorción	44
VII. 1. 5. Modelaje teórico de fibrilación de LHr	46
VII. 2. Determinación de la Morfología de Estructuras de LHr	46
VII. 2. 1. Microscopía de fuerza atómica	46
VII. 3. Determinación de Transición en la Conformación Estructural de Lisozima Humana Recombinante (LHr)	52
VII. 3. 1. Espectroscopía infrarroja con transformadas de Fourier (FT-IR)	52
VII. 4. Determinación de Potencial Zeta	53
VII. 5. Viabilidad Celular	55
VIII. DISCUSIÓN	56
IX. CONCLUSIONES	59
X. LITERATURA CITADA	61

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla I. Constantes de fibrilación aparente y fase de retardo obtenidas ajustando al modelo cinético	45
Tabla II. Transición de la composición de estructuras secundaria de LHR monitoreada por FT-IR y aplicando análisis	52
Tabla III. Porcentaje de estructuras secundaria de lisozima nativa, obtenidos por cristalografía de rayos X y por FT-IR (Kumosinski y Unrush, 1999)	53
Tabla IV. Valores de análisis estadístico ANOVA presentados como la media \pm errores estándares de la media (SEM) obtenidos mediante el Test de Comparación Múltiple de Newman-Keuls de los tratamientos a los diferentes tiempos de incubación de proteína a 5mM, 10 mM y 20 mM	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estructura secundaria de proteínas	7
Figura 2	Esquema de niveles estructurales de las proteínas	9
Figura 3	Entrecruzamiento de hojas- β que conforma la estructura de las fibras	13
Figura 4	Estructura típica del entrecruzamiento de hoja- β	14
Figura 5	Estructura de lisozima humana (Koradi et al., 1996)	16
Figura 6	Representación esquemática de un experimento de dispersión de la luz común	23
Figura 7	Fotografía de Equipo de Dispersión Dinámica de Luz (DLS)	24
Figura 8	Esquema de tensión superficial a) Película de jabón sobre bastidor de alambre, con un brazo móvil, b) Burbuja de jabón. (Adamson, 1990)	26
Figura 9	Esquema para describir una superficie curva: a) Sección de una superficie curva bajo condiciones de equilibrio mecánico, b) Descripción del perfil de una gota, donde X es la distancia a partir del eje de la gota, y Z la vertical. (Adamson, 1990)	29
Figura 10	Esquema de Tensiómetro de gota	30
Figura 11	Esquema de representación de AFM	31
Figura 12	Fotografía de equipo de AFM	32
Figura 13	Esquema de funcionamiento de IR	34
Figura 14	Esquema de una partícula cargada y la doble capa que la rodea (Malvern Instruments, 2001)	36
Figura 15	Fotografía del equipo Zetasizer Nano-Zs (Malvern Instruments, 2012)	37
Figura 16	Fotografía de las celdas Zetasizer Nano Cells, Malvern Instruments (Malvern Instruments, 2012)	37
Figura 17	Fotografía de lector de microplacas para la cuantificación de densidad óptica	40
Figura 18	Cinética de fibrilación de Lisozima Humana recombinante	43
Figura 19	Constantes de Difusión obtenidos mediante las medidas de Tensión Superficial utilizando la ecuación de Graham y	44

	Philips (1979)	
Figura 20	Modelaje teórico de fibrilación de Lisozima Humana recombinante	46
Figura 21	Imagen de AFM de agregados de LHr a 0 minutos de incubación	47
Figura 22	Disociación de LHr a 30 minutos de incubación	48
Figura 23	Disociación de proteína en monómeros, dímeros y trímeros a los 120 minutos	48
Figura 24	Agregación de oligómeros a 120 minutos	49
Figura 25	Formación de estructuras fibrilares a los 480 minutos de incubación	49
Figura 26	Protofibras formadas y en crecimiento a los 600 minutos	50
Figura 27	Formación de fibras maduras a los 720 minutos	50
Figura 28	Imagen a) y b) muestran fibras maduras a los 1620 minutos de incubación.	51
Figura 29	Viabilidad celular de tratamiento en células ARPE-19	54

RESUMEN

Las proteínas pueden ser consideradas como los arquitectos de la vida pues, son cruciales en todo proceso celular. La función biológica correcta de las proteínas depende de su auto-ensamblaje en estructuras bien definidas y altamente ordenadas. Por otro lado, el plegamiento incorrecto de proteínas y el montaje anormal están relacionados en más de 30 trastornos humanos, incluyendo la enfermedad de Alzheimer, diabetes mellitus tipo II, entre otras. La patología de estos trastornos puede estar relacionada con el auto-ensamblaje de péptidos amiloidogénicos en diversas formas de agregados transitorios tales como oligómeros, protofibras, fibras de amiloide. La lisozima humana recombinante (LHr) es una enzima bacteriolítica, ampliamente distribuida en una variedad de tejidos y fluidos corporales y se ha relacionado en la formación de depósitos de amiloide en la amiloidosis sistémica hereditaria autosómica. En este trabajo se monitorizó la formación de fibras de amiloide de LHr, in vitro, por aumento de fluorescencia de ThT, DLS, tensión superficial; aspectos de su morfología y transición de estructura secundaria obtenidos mediante AFM e IR respectivamente. La actividad citotóxica de las formas transitorias de LHr, fue probada en la línea celular ARPE-19. Obteniéndose que LHr en condiciones de desnaturalización parcial, solución de sales acidificada a pH 2, 136.7mM NaCl y 2.68 mM KCl, incubada a 55°C, sigue cinética de fibrilación característica de tipo sigmoidal, dependiente de nucleación. Los datos de viabilidad de la línea celular Arpe-19, sugieren que la citotoxicidad está relacionada con las conformaciones prefibrilares y fibras de amiloide maduras, pues los mayores efectos de toxicidad pueden apreciarse a partir la etapa de en que finaliza la etapa nucleación y los protofilamentos están formados, en la que la viabilidad disminuye a 53.46 ± 2.35 % a 5mM, 20.52 ± 3.23 % a 10mM y 24.76 ± 2.84 % a 20 mM.

I. INTRODUCCIÓN

La complejidad de la vida en la Tierra cuenta la historia, como consecuencia de un fluir de energía que obliga a los sistemas químicos a adoptar ordenamientos jerárquicos consistentes en la aparición de nuevas estructuras y nuevos procesos (Anfinsen et al., 1961; Creighton, 1990). Todas las cosas que vemos a nuestro alrededor, tales como las rocas, galaxias, olas del mar, son, en mayor o menor grado, configuraciones dinámicamente estables pues, forman una colección de átomos lo bastante permanente en tiempo y/o cantidad para merecer un nombre. En los organismos vivientes modernos existen grandes moléculas que son estructuralmente más complicadas en comparación a un cristal o a una gota de lluvia. Por ejemplo, la hemoglobina de nuestra sangre es una típica molécula de proteína que está formada por 574 moléculas más pequeñas, los aminoácidos, y cada una de ellas contiene unas cuantas docenas de átomos dispuestos en un arreglo conformacional determinado para formar una estructura globular tridimensional de sorprendente elaboración en apariencia caótica, como un gran arbusto.

Las proteínas son consideradas como los arquitectos de la vida (el origen de su nombre deriva de la palabra griega protos, que significa de primera importancia) pues son cruciales en todo proceso celular, dado que llevan a cabo funciones muy diversas; por ejemplo, las enzimas proporcionan las superficies moleculares que facilitan la gran cantidad de reacciones químicas de una célula. Algunas proteínas anidadas en la membrana plasmática forman canales y bombas que controlan el paso de pequeñas moléculas hacia el interior y hacia el exterior de la célula; unas transportan mensajes de una célula a otra, mientras que otras actúan como integradoras de señales, capaces de compartir la información de ciertas señales desde la membrana plasmática hasta el núcleo de las células; algunas actúan como delicadas máquinas moleculares que tienen funciones móviles y otras especializadas actúan como anticuerpos, toxinas, hormonas, fibras elásticas, cuerdas o fuentes de luminiscencia y desde luego como soporte estructural celular, confiriéndoles soporte, elasticidad y resistencia.

Las proteínas son polímeros lineales constituidos por subunidades o bloques menores de construcción denominados aminoácidos. Las proteínas se sintetizan dentro de la célula mediante una acción conjunta entre el ADN y ARN (proceso de transcripción y traducción), las cuales generan en el proceso una cadena lineal de aminoácidos única para cada proteína. Esta configuración es conocida como estructura primaria (Olivares-Quiroz

et al., 2004) y contiene la información necesaria para que en condiciones fisiológicas la molécula adopte una estructura tridimensional estable y funcional (Anfinsen et al., 1961; Creighton, 1990).

Todas las proteínas se pliegan, desde una estructura unidimensional primaria, a estructuras secundarias y terciarias. Una vez definida la secuencia específica de aminoácidos que integra la proteína, la estructura primaria transita por una serie de estados en los cuales su configuración espacial se modifica hasta alcanzar un estado termodinámicamente estable con una estructura tridimensional particular, la cual depende de la secuencia de aminoácidos y por consecuencia es distinta para cada proteína. Esta estructura, conocida como estado nativo, define los sitios activos de la macromolécula y es la única relevante desde el punto de vista biológico (Fersht, 1999).

En la actualidad se conoce un gran número de disfunciones celulares que se producen como consecuencia del plegamiento anormal de un grupo particular de proteínas, las cuales pueden depositarse en el espacio extracelular en forma de agregados fibrilares insolubles (fibras de amiloides). Estos agregados están relacionados con más de 30 enfermedades tanto humanas como animales, conocidas con el nombre genérico de amiloidosis (Kastorna et al., 2012). En estas enfermedades las proteínas, que en general cumplen roles funcionales específicos, se vuelven inactivas y potencialmente tóxicas cuando sufren alteraciones conformacionales y cambian su arquitectura de una estructura α -hélice a hoja β .

Las fibras de amiloides son sustancias patológicas, constituidas en su mayoría por proteínas que se pueden depositar en diversos órganos y tejidos. Estas patologías han captado el interés en los últimos años pues, a pesar de que ya han sido descritas como enfermedades características de la vejez, comprender su origen ha ocasionado una revolución bastante compleja en el ámbito científico, siendo el blanco de varias teorías desde la década de los años sesenta. En estas, no es tan evidente qué tipo de agregados de proteína inducen el daño o la muerte celular a través de mecanismos moleculares específicos, (Malisauskas et al., 2005). Sin embargo, se observa la formación de fibras ordenadas de amiloide allí donde hay muerte celular.

Los depósitos amiloidales (placas proteicas) están compuestos, principalmente, de agregados fibrilares con una estructura secundaria en hojas- β , los cuales están formados por un número variable de filamentos rectos (con un diámetro de 1.5-2.0 nm), trenzados entre sí (Stefani, 2004), miden alrededor de 6-12 nm de diámetro y 1 mm de longitud, aproximadamente (Kayed et al., 2003; Tycko, 2004). La base molecular de la

patogenicidad de los agregados prefibrilares de proteína y depósitos amiloidales, es un tema de carácter central en la comprensión de las causas de una amplia gama de enfermedades con gran impacto, incluyendo la enfermedad Alzheimer (Andersson et al., 2002; Dobson, 2003) misma que posee una incidencia significativa en adultos mayores de 65 años; en México, aproximadamente 610 mil personas padecen Alzheimer, representando el 10 % de la población mayores de 65 años.

En el presente estudio se trabajó con la proteína Lisozima Humana recombinante (LHr). La lisozima está ligada a una forma de amiloidosis sistémica como resultado de una mutación en uno o más de los siguientes genes: gen de la lisozima (LYZ El gen LYZ, situado en el brazo largo del cromosoma 12 (12q15), que codifica a la lisozima humana, cuyo sustrato natural es el peptidoglucano de la pared celular bacteriana, escindiendo las uniones β -glucosídicas (1-4) existentes entre el ácido N-acetilmurámico y la N-acetilglucosamina (Chiti et al., 2000; Gerum et al., 2010). La lisozima se encuentra en la leche materna y también en el bazo, pulmón, riñón, leucocitos, plasma, saliva, y lágrima. En este tipo de amiloidosis se afectan los órganos internos, pero no se afecta el sistema nervioso. Los hechos clínicos se caracterizan por presentar afectación renal con un síndrome nefrótico, hipertensión arterial, hepatosplenomegalia, colestasis y exantema cutáneo petequiral.

La contribución a elucidar los mecanismos de fibrilación, o fibrilogénesis, y la relación con la citotoxicidad, por los cuáles los agregados prefibrilares y los depósitos amiloidales comprometen el tejido y la función del órgano, puede conducir a nuevos enfoques terapéuticos para prevenir o revertir la formación de las estructuras evitando así el desarrollo de esta enfermedad. En este trabajo se propone estudiar la cinética de la fibrilación de la Lisozima Humana recombinante (LHr) mediante dispersión dinámica de luz, espectroscopía de fluorescencia thioflavina T (ThT) y tensión superficial como método propuesto para caracterizar las propiedades hidrofóbicas de los agregados prefibrilares formados durante el proceso de fibrilación. La identificación de las estructuras de los diferentes agregados prefibrilares y depósitos amiloidales se realizará utilizando microscopía de fuerza atómica, AFM. Asimismo, se evaluará la citotoxicidad de las estructuras oligoméricas transitorias bajo el supuesto de que estos agregados estructurados comprometen la viabilidad en las células in vitro.

II. ANTECEDENTES

II. 1. Jerarquía de la Estructura de las Proteínas

Una molécula de proteína está formada por una larga cadena de aminoácidos, cada uno de los cuales está unido a su vecino mediante un enlace covalente peptídico. Por ello, a las proteínas también se les conoce como polipéptidos. Cada tipo de proteína tiene una secuencia única de aminoácidos y se conocen muchos miles de diferentes proteínas, cada una de ellas con su particular secuencia de aminoácidos. La secuencia repetida de átomos a lo largo de la cadena se conoce como el esqueleto peptídico. Las cadenas polipeptídicas tienen dos grupos terminales: por un lado, poseen un grupo amino con polaridad positiva y, por el otro, un grupo carboxílico con polaridad negativa. Por convención, el grupo amino se ha considerado el principio de la cadena de polipéptido. Unidas a esta cadena repetitiva están aquellas partes de los aminoácidos, cadenas laterales, que le confieren a cada uno de los aminoácidos sus propiedades características. Algunas de las 20 cadenas laterales son apolares e hidrofóbicas, otras están cargadas positiva o negativamente, algunas forman enlaces covalentes, etc. (Fersht, 1999).

II. 1. 1. Estructura primaria de proteínas

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

II. 1. 2. Estructura secundaria

La estructura secundaria de la proteína se construye alrededor de las unidades unidimensionales del enlace peptídico. La estructura secundaria de un segmento de la

cadena de polipéptido se define como las disposiciones espaciales de sus átomos de la cadena principal, sin tener en cuenta la conformación de sus cadenas laterales o de su relación con otros segmentos. La estructura secundaria se organiza en elementos repetitivos regulares, tales como hélices y hojas que están unidas por bucles. El examen de un gran número de proteínas revela otras características, tales como la organización hélices- α u hojas- β en motivos recurrentes o estructuras súpersecundarias (Fersht, 1999).

La estructura secundaria de las proteínas depende de cuatro factores: i) la longitud de los enlaces y ángulos de los enlaces peptídicos; ii) la disposición coplanar de los átomos sustituidos en los grupos amida, iii) los enlaces de hidrógeno formados por los grupos funcionales $-C=O$ y $-NH$, con el fin de mantener estabilidad estructural: iv) la distancia de los enlaces de hidrógeno que se forman (Sun, 2004). Por ejemplo, los segmentos de las cadenas polipeptídicas están en una conformación en espiral debido a la interacción intramolecular, es decir, los átomos que participan en la formación de los grupos amida deben permanecer coplanares, y para la máxima estabilidad, cada uno de los grupos $-NH$ debe formar un puente con un grupo $-CO$ y viceversa, cada $-CO$ debe enlazarse a un grupo $-NH$ mediante un puente de hidrógeno. En condiciones ideales, los grupos funcionales (grupos carboxílicos y amina) de aminoácidos pueden formar puentes de hidrógeno, con una energía de 5 kcal / mol. Las cadenas de polipéptidos tienden a adoptar hasta tres diferentes configuraciones que permiten la formación de un número máximo de enlaces de hidrógeno: alfa hélice, hoja beta, vueltas o bucles (Sun, 2004).

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

Tras el análisis de la estructura de la molécula de mioglobina, realizado por Kendrew en 1958, tomó fuerza la interrogante sobre los mecanismos que utiliza la proteína para generar estructuras termodinámicamente estables. Planteándose que el mecanismo principal en el plegamiento de las proteínas es de carácter físico y se debe a la interacción entre los aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos con las moléculas de H_2O , aquellos aminoácidos hidrofóbicos tienden a agruparse en el interior de la macromolécula, evitando el contacto con el medio acuoso. Mientras que los grupos hidrofílicos tienden a ocupar la superficie exterior, quedando expuestos a la interacción atractiva con las moléculas del disolvente (Fersht, 1999). Para aglutinar a los aminoácidos hidrofóbicos en el núcleo, los átomos del $C\alpha$ correspondientes deben también agruparse en el núcleo. Sin embargo, se sabe que la

cadena principal de átomos de carbono $C\alpha$ es básicamente de carácter polar. Para anular la interacción polar de la cadena $C\alpha$ con las moléculas de H_2O , se requiere la presencia de puentes de hidrógeno que balanceen esta interacción. La formación de los puentes de hidrógeno conduce a la formación de dos tipos de estructuras en el interior de la macromolécula: las hélices- α y las hojas- β , como se observa en la Figura 1. Ambas estructuras, conocidas como estructuras secundarias, se caracterizan por la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos amino ($-NH_2$) y los grupos carboxílicos ($-COOH$) de la cadena principal. La mayoría de las proteínas están constituidas por combinaciones de estas dos estructuras secundarias, conectadas entre sí mediante cadenas de aminoácidos con forma irregular, hebras de enlace (loop regions), las cuales están constituidas, en promedio por no más de 8 aminoácidos.

En el siguiente nivel de organización de los aminoácidos, distintas estructuras secundarias se agrupan entre sí para formar lo que se conoce como un dominio. Por convención, se llama dominio a un conjunto de hélices- α , hojas- β y hebras de enlace que pueden plegarse en forma simultánea e independiente de las partes restantes de la proteína y que además realiza una función específica (Fersht, 1999).

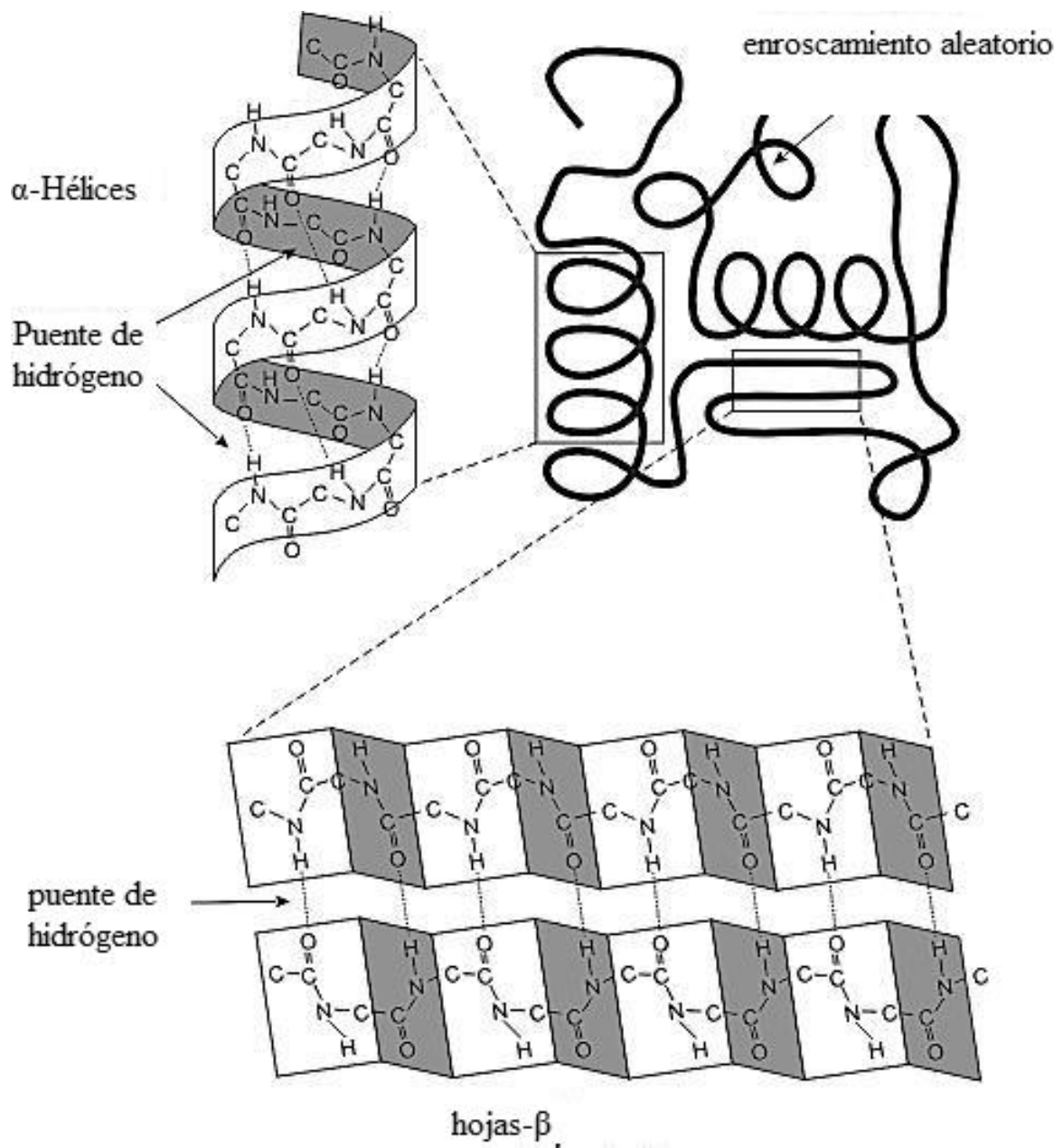


Figura 1. Estructura secundaria de proteínas

II. 1. 4. Estructura terciaria

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

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

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

hidrocarburos también contribuyen a la estabilidad de la estructura terciaria de proteínas (Berg et al., 2003).

II. 1. 5. Estructura cuaternaria

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

Figura 2.

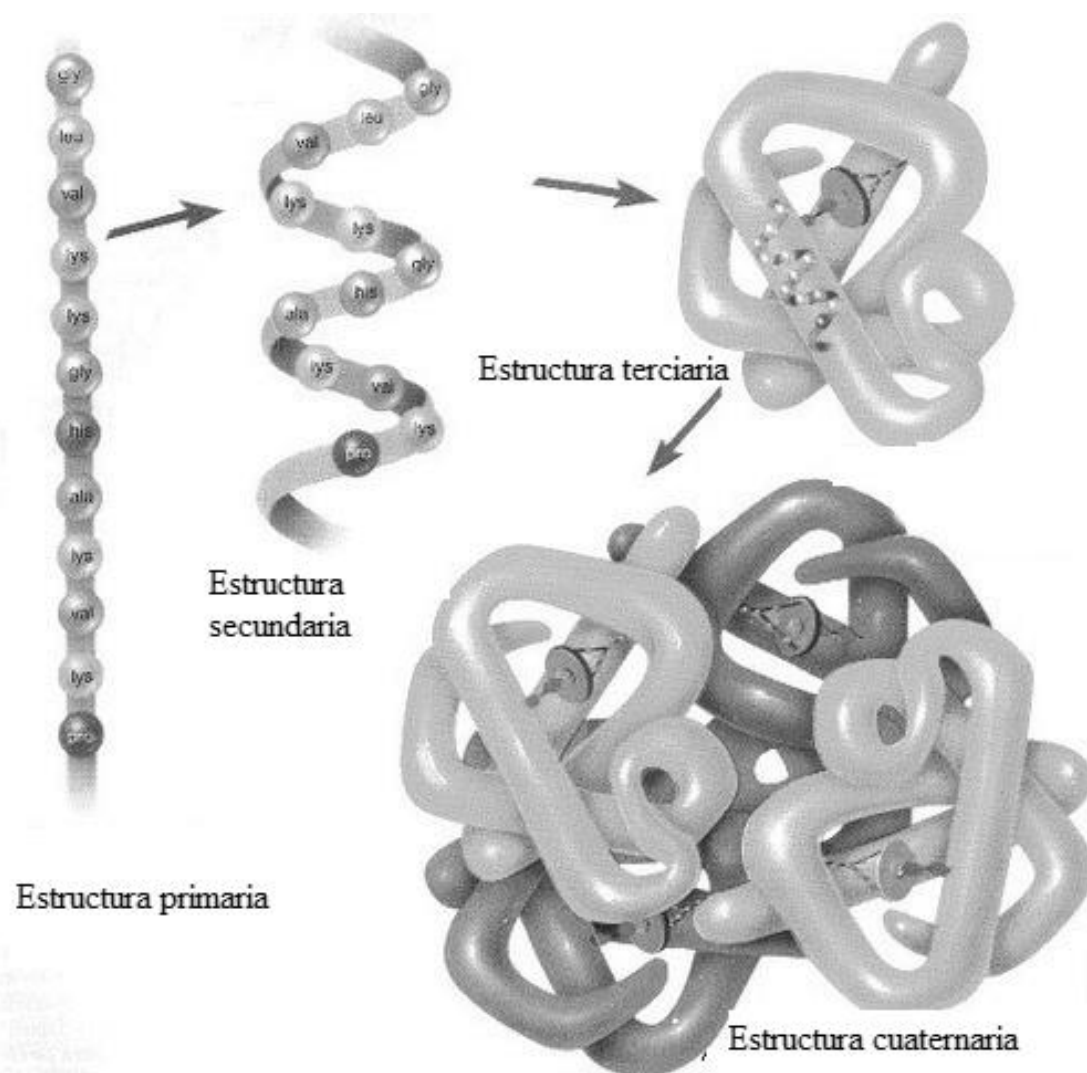


Figura 2. Esquema de niveles estructurales de las proteínas.

II. 2. Características de Plegamiento

Todos los organismos vivos poseen complejos sistemas multi-proteicos presentes en los diferentes compartimientos celulares donde ocurre la síntesis de proteína, los cuales controlan y asisten el correcto plegamiento de estas nuevas moléculas proteicas y eliminan a las que no consiguen plegarse correctamente, así como a las que, habiendo alcanzado previamente su estado nativo, lo han perdido por el efecto de condiciones ambientales adversas (Lee et al., 2005). Estos sistemas de control del plegamiento de las proteínas se caracterizan por ser muy dinámicos, pudiendo responder a los cambios en el microambiente intracelular, ajustando la concentración de varios de sus componentes de acuerdo a la demanda celular.

Uno de los componentes fundamentales de los sistemas de control del plegamiento son las chaperonas moleculares (Lee, 2005). Esta clase de proteínas se unen reversiblemente a las moléculas de proteína de reciente síntesis y, mediante mecanismos diversos que pueden requerir la hidrólisis de ATP, las ayudan a plegarse hasta alcanzar el estado nativo (Hartl et al., 2002; Clarke, 2006).

Algunas chaperonas pueden revertir el plegamiento de las moléculas que están plegadas incorrectamente, dándoles una nueva oportunidad de iniciar el proceso y potencialmente alcanzar su estado nativo funcional (Bosl et al., 2006). Además de las chaperonas moleculares, los sistemas de control del plegamiento se componen de varias proteasas muy especializadas cuya distribución intracelular semeja a la de las chaperonas. Estas proteasas, cuya función está coordinada con la de las chaperonas, degradan a las moléculas de proteínas plegadas incorrectamente, generalmente una vez que chaperonas específicas las han desplegado convenientemente (Esser et al., 2004). La vía fundamental de eliminación de las proteínas incorrectamente plegadas en el compartimiento citoplasmático, es el complejo del proteosoma. Este sistema degrada a las proteínas que han sido marcadas para tal fin mediante la unión covalente a su estructura de un número variable de moléculas de ubiquitina (Esser et al., 2004). La vía del proteosoma es también el destino de algunas de las proteínas sintetizadas en los ribosomas unidos al retículo endoplásmico y que por algún motivo no alcanzaron su estado nativo.

El análisis comparativo de la secuencia de cientos de proteínas y los estudios estructurales y biofísicos han aportado evidencias que sugieren que, a través de la evolución, estas moléculas han incorporado estos elementos cuya función es la de protegerlas de la agregación (Thirumalai et al., 2003).

En algunas proteínas se ha demostrado que la sustitución de ciertos aminoácidos se asocia a la acumulación de intermediarios estables con un plegamiento anormal que muestra tendencia a la agregación. Estas especies pueden ser componentes de la vía cinética normal o encontrarse fuera de ella, y su acumulación puede responder tanto a variaciones de las constantes cinéticas del plegamiento como de sus equilibrios termodinámicos (Brockwell et al., 2007; Dobson, 2004). Estos hallazgos pueden interpretarse en términos de cómo las proteínas evolucionaron, selección de formas estables, no solo para plegarse en forma funcional y estable, sino también para asegurar que este estado se alcance a través de una vía que no represente riesgo de acumulación de formas no nativas con propiedades potencialmente perjudiciales para la célula.

II. 3. Plegamiento Incorrecto y Disfunción Celular

Un gran número de enfermedades graves como el mal de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, diabetes tipo II, la amiloidosis sistémica, por mencionar algunas, están asociados con los depósitos de agregados proteicos insolubles en varios órganos y tejidos humanos (Glabe, 2006; Stefani, 2004). El descubrimiento de esta correlación ha centrado el interés en el plegamiento de proteínas y la agregación. Las proteínas que en general cumplen roles funcionales específicos, se vuelven inactivas cuando forman especies de agregados prefibrilares y formas insolubles de amiloides (Bergstrom et al., 2005; Morozova-Roche et al., 2000; Pepys et al., 1993). En la actualidad se tiene conocimiento sobre más de 30 proteínas que pueden llegar a formar agregados tóxicos, cada una de las cuales está asociada con una enfermedad particular (Kastorna et al., 2012). La evidencia creciente apoya la idea de que la formación de amiloide es una característica genérica de la cadena polipeptídica, independientemente de la secuencia específica de aminoácidos (Chiti et al., 1999; Stefani, 2008). Por ejemplo, según Dobson (1999), padecimientos como la fibrosis quística y el enfisema pulmonar familiar, comparten una conexión clara entre el plegamiento anormal de una proteína y una disfunción celular específica. Los factores, tales como pH ácido, alta temperatura, la falta de ligando o concentraciones moderadas de sales, pueden reducir la estabilidad conformacional de una proteína y provocar con ello la agregación.

El plegamiento *in vitro* de las proteínas ha sido extensamente estudiado mediante el empleo de una amplia variedad de métodos espectroscópicos y bioquímicos, así como

mediante simulaciones computacionales (Oliveberg et al., 2005). En muchas de las proteínas afectadas, se alteran los mecanismos moleculares que normalmente aseguran la permanencia de las proteínas en sus estados funcionales correctamente plegados.

Las mutaciones puntuales en algunas proteínas- como lisozima- pueden reducir su estabilidad respecto de la forma nativa permitiendo un plegamiento cooperativo transitorio. Este proceso parece ser el evento crítico que dispara el proceso de agregación de la proteína que lleva a la formación de fibras de amiloide. Los depósitos de amiloide son extracelulares y pueden ser localizados en un órgano o encontrarse en diferentes órganos. Los depósitos locales pueden encontrarse en la piel, tiroides, islotes de Langerhans, tumores, corazón, riñones, hígado, pulmones, nervios periféricos, aorta, suprarrenales, articulaciones, encéfalo e hipófisis.

II. 3. 1. Fibras de amiloide

Las fibras de amiloide están conformadas por dos filamentos helicoidales que tienen de entre 7 a 10 nm de diámetro. Los filamentos que componen las fibras miden entre 1.5-2.0 nm de diámetro, y están trenzados una alrededor de la otra (Stefani, 2004). Una característica que define a estas fibras es la presencia de estructura de hoja- β cruzada, revelada por estudios de difracción de rayos X, dicroísmo circular, RMN y RPE (Chiti et al., 1999; Kaye et al., 2003; Tycko, 2004). Las hebras de filamentos, o los protofilamentos, son estabilizados tanto por enlaces de hidrógeno inter e intramoleculares, interacciones hidrófobas e interacciones de pares iónicos y por el entrecruzamiento de hojas- β orientadas en paralelo, y hebras- β perpendicular al eje de las fibras. En la figura 2 puede apreciarse la estructura típica del entrecruzamiento de hoja- β . Por otro lado en la Figura 4 puede apreciarse una imagen de difracción de rayos X; en esta, las flechas indican las posiciones de la reflexión β -cruzada en el meridiano situado a 4,7 Å y en el ecuador a 10 Å. (Makin et al., 2006).

Esta estructura súpersecundaria, muestra que la columna está formada por diferente número de hebras beta, protofilamentos, trenzados entre sí, ya sea en arreglos compactos o empaquetamiento de en forma de cinta, o cremallera. Este modelo se caracteriza por un núcleo de hebras- β alineadas perpendicularmente al eje de las fibras que forman las hojas- β extendidas (Figura 3). La estructura hoja- β surge de la unión de hidrógeno entre las cadenas laterales de los aminoácidos.

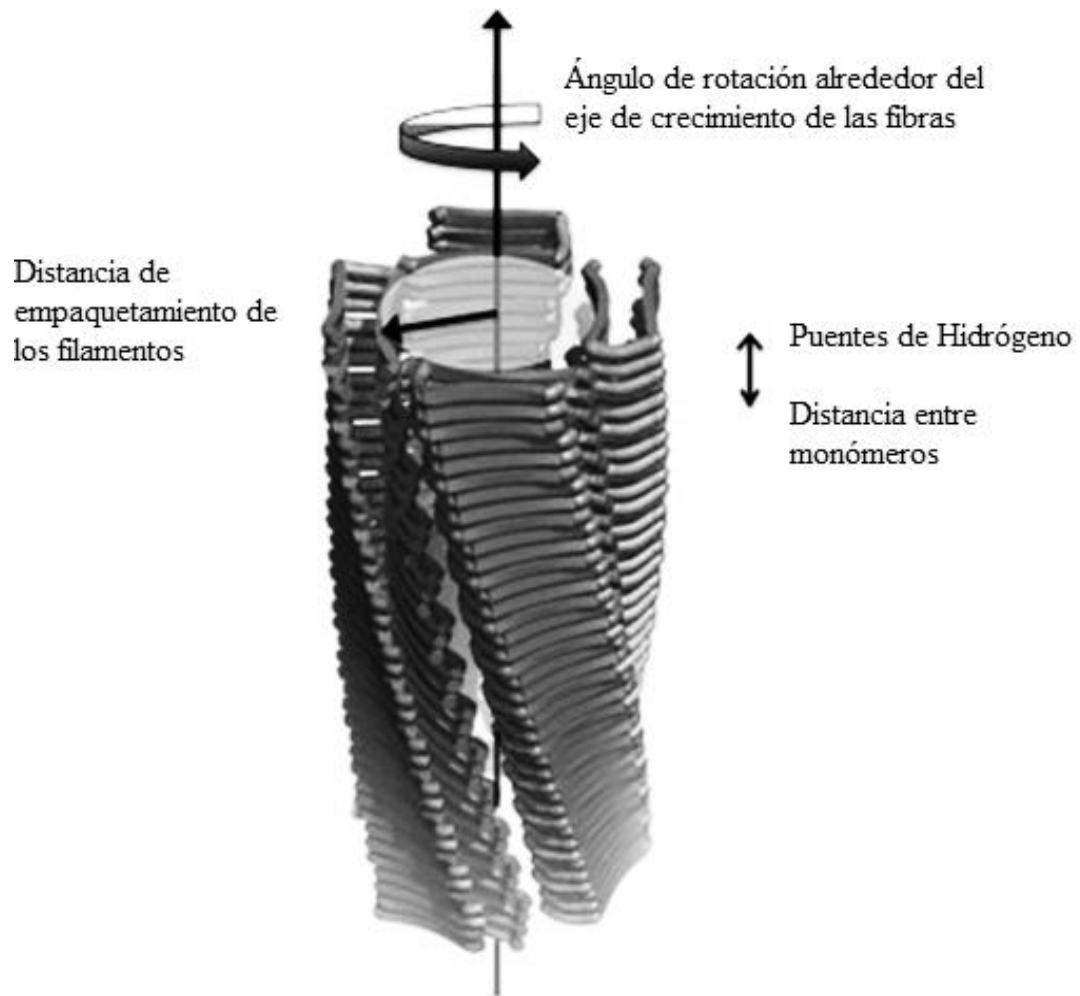


Figura 3. Entrecruzamiento de hojas- β que conforma la estructura de los protofilamento.

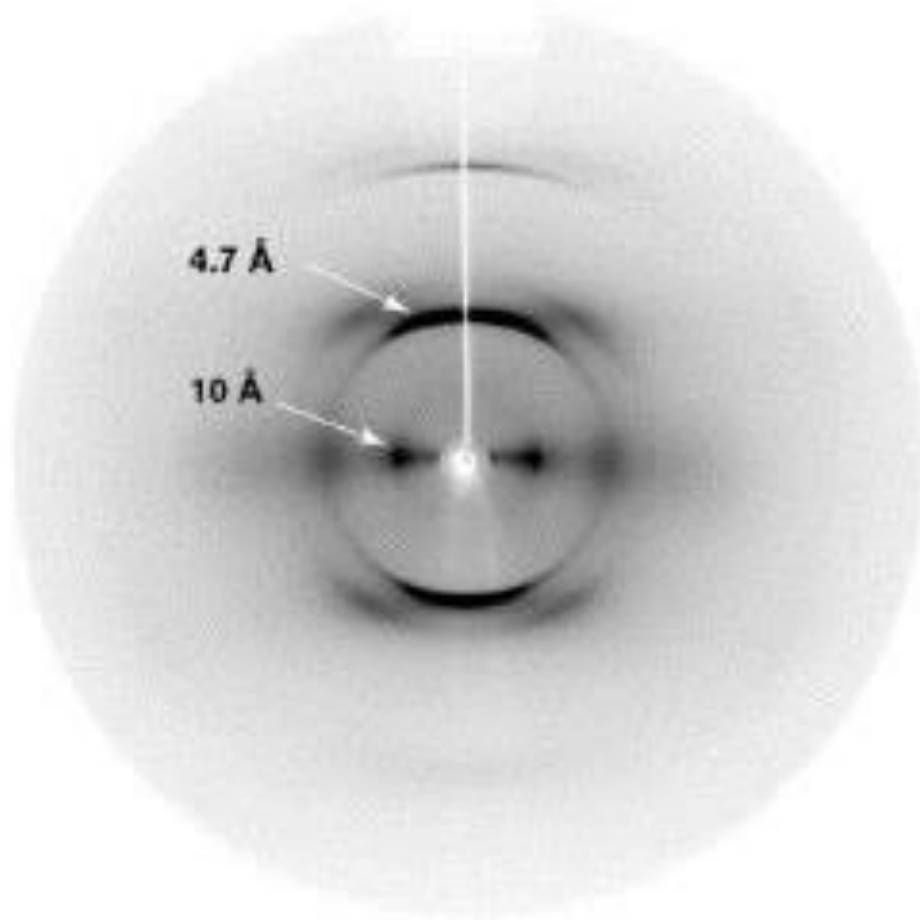


Figura 4. Estructura típica del entrecruzamiento de hoja- β .

II. 4. Lisozima

La lisozima es quizás la proteína cuya estructura, estabilidad y comportamiento de plegado, se ha estudiado más ampliamente durante muchos años. Una observación, relativamente reciente, es que la lisozima es una de las proteínas cuya conversión en depósitos de amiloide se asocia con enfermedades en las cuales hay una acumulación de proteínas en los tejidos y órganos corporales. Estas proteínas reemplazan lentamente el tejido normal, llevando a insuficiencia del órgano comprometido. Lisozima (Figura 5) se relaciona con un tipo de enfermedad que no tiene localización específica, es decir afecta a todo el cuerpo, la amiloidosis sistémica. Por tal motivo, lisozima ha sido una proteína modelo que ha permitido la investigación sobre la naturaleza y el origen de los acontecimientos de la desnaturalización proteica que subyacen a este tipo de enfermedades

amilogénicas. En este tipo de amiloidosis se afectan los órganos internos, pero no se afecta el sistema nervioso. Los hechos clínicos se caracterizan por presentar afectación renal con un síndrome nefrótico, hipertensión arterial, hepatosplenomegalia, colestasis y exantema cutáneo petequial. (Mireille et al., 2007). La lisozima humana, junto con la lisozima de clara de huevo, se ha usado ampliamente en los últimos 25 años como un sistema modelo para estudiar muchos aspectos de la estructura y función de proteínas, incluyendo el mecanismo de plegamiento de proteínas y los factores determinantes de la estabilidad de la proteína (Blake et al., 1977).

La lisozima es una enzima bacteriolítica (CE 3.2.1.17) que está ampliamente distribuida en una variedad de tejidos y fluidos corporales, incluyendo el hígado, el cartílago articular, plasma, saliva, lágrimas, y leche (Reitamo et al., 1978). Hidroliza preferentemente uniones glucosídicos β -1,4 entre el ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina del peptidoglicano que se encuentra en la pared celular de ciertos microorganismos, especialmente de bacterias Gram-positivas, y por lo tanto parece tener un papel en la defensa del huésped. La lisozima es altamente expresada en células hematopoyéticas y se encuentra en los granulocitos, monocitos y macrófagos, así como sus precursores en la médula ósea (Reitamo et al., 1978).

II. 4. 1. Lisozima humana

Lisozima humana es una proteína de 130 residuos y pertenece a la clase de tipo C de lisozimas. La estructura de la proteína se ha estudiado en detalle por cristalografía de rayos X y espectroscopía de resonancia magnética nuclear de alta resolución. Se divide en dos dominios: un dominio- α (Residuos 1-40 y 83-100) y un dominio- β (residuos 41-82). El dominio- α comprende cuatro hélices (denominados A, B, C, y D) y dos hélices 3_{10} . El dominio- β comprende un triple trenzado de hojas β , una hélice 3_{10} , y un bucle largo. En la figura 5 puede observarse la estructura de lisozima humana (Koradi et al. 1996).

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

Lisozima Humana recombinante (LHr) está ligada a la forma de amiloidosis como resultado de una mutación en uno o más de los siguientes genes: gen de la lisozima (LYZ

El gen LYZ, situado en el brazo largo del cromosoma 12 (12q15), que codifica a la lisozima humana. En este tipo de amiloidosis se afectan los órganos internos, pero no se afecta el sistema nervioso. Los hechos clínicos se caracterizan por presentar afectación renal con un síndrome nefrótico, hipertensión arterial, hepatosplenomegalia, colestasis y exantema cutáneo petequeial.

Lisozima Humana

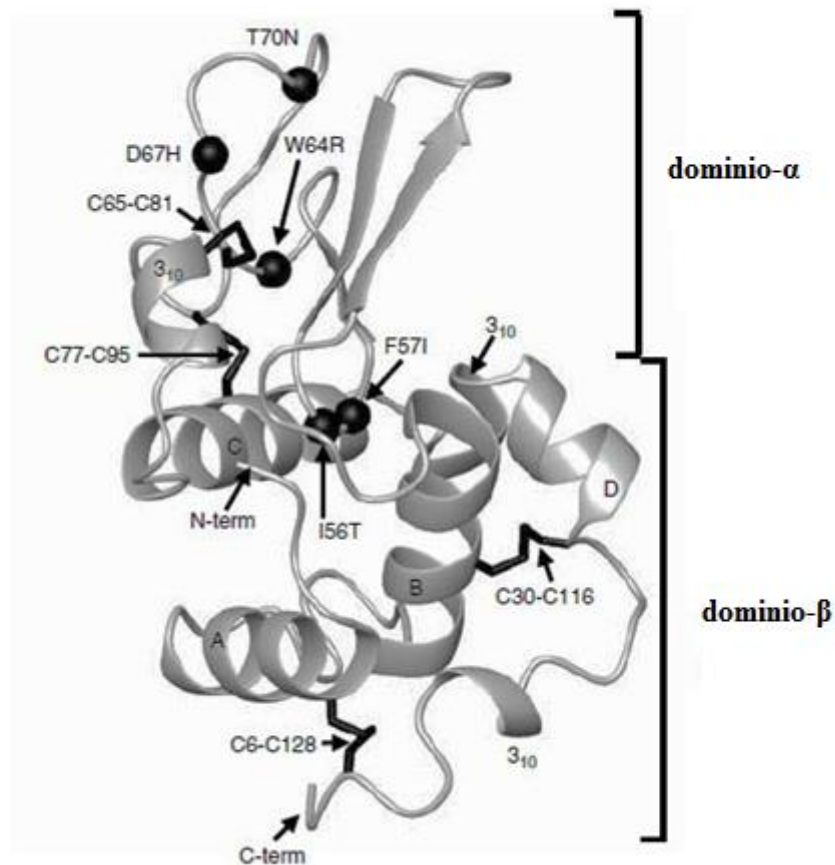


Figura 5. Estructura de lisozima humana (Koradi et al. 1996).

II. 5. Amiloidosis Sistémica por Lisozima

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

de amiloide ha sido bien documentada para una variedad de sistemas. (Chiti et al., 2000; Gerum et al., 2010).

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

III. JUSTIFICACIÓN

Un gran número de evidencias apoyan la hipótesis de que los agregados prefibrilares u oligoméricos son los responsables de la citotoxicidad tanto in vivo como in vitro. La importancia del estudio de los mecanismos fisicoquímicos involucrados en la formación de estos agregados así como la citotoxicidad de los mismos, radica en sus implicaciones tanto biomédicas como biotecnológicas. Por otro lado, en este estudio se propone el estudio de la cinética de fibrilación mediante tensión superficial.

IV. HIPÓTESIS

Debido a sus características y antecedentes como agentes infecciosos de proteína, los estadios prefibrilares o agregados oligoméricos son los responsables de la citotoxicidad comprometiendo la viabilidad de las células *in vitro*. Pues sus propiedades anfipáticas les confiere la habilidad de perturbar la integridad celular, así como múltiples receptores de la superficie celular.

V. OBJETIVOS

V. 1. Objetivo General

Determinar la cinética de fibrilación de la lisozima humana recombinante (LHr) y evaluar la citotoxicidad de los agregados transitorios sobre un cultivo de células del epitelio pigmentario retinal humano (células ARPE-19).

V. 2. Objetivos Específicos

Determinar las condiciones adecuadas de disolución para la obtención de fibras de amiloides.

Determinar la cinética de agregación de la LHr mediante espectroscopía de fluorescencia, dispersión dinámica de luz y tensión superficial.

Identificar los agregados estructurados en el proceso de fibrilación de la LHr mediante microscopía de fuerza atómica y corroborar la transición de estructuras secundaria mediante espectroscopía de infrarrojo de transformadas de Fourier.

Determinar la carga neta de las fibras de amiloides mediante potencial z.

Determinar las especies citotóxicas de los agregados estructurados en un cultivo del epitelio pigmentario retinal humano (células ARPE-19) in vitro.

VI. METODOLOGÍA

VI. 1. Formación de Fibras Amiloides

Se adaptó a la técnica de Hirano et al., (2012). Para la formación de fibras amiloides de la lisozima humana recombinante (LHr) se utilizó una solución madre de lisozima a una concentración de 2mg/ml (pH 2, en una solución de 136.7mM NaCl y 2.68 mM KCl ajustando pH con HCl), incubada a 55°C en agitación constante. Se tomaron alícuotas a distintos tiempos (0, 15, 30, 60, 120, 240, 360, 480, 600, 720, 1140, 1620, 1800, 2880, 3600, 4320 minutos).

VI. 2. Cinética de Fibrilación de Lisozima Humana Recombinante (LHr)

VI. 2. 1. Fluorescencia de thioflavina T (ThT)

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

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

VI. 2. 2. Dispersión dinámica de luz (DLS)

La dispersión Dinámica de Luz, DLS, también conocido como espectroscopía de correlación de fotones (PCS) o dispersión de luz cuasi-estática (QELS) es una técnica óptica ampliamente utilizada para la medición de diámetros medios y de coloides poliméricos con partículas de tamaño submicrométrico (Chu, 1991). Básicamente, el instrumental empleado consiste en: a) una fuente de luz láser monocromática que incide sobre una solución muy diluida de la sustancia a analizar; b) un fotómetro posicionado a un ángulo de detección dado, θ_r , medido con respecto a la dirección de incidencia del láser sobre la muestra, y que colecta la luz dispersada por las partículas; c) un correlador digital que conjuntamente con un software, permiten obtener la función de autocorrelación de primer orden de la intensidad de luz dispersada a cada ángulo, $g^{(1)}(\tau)$, para diferentes valores del retardo de tiempo τ .

Las aplicaciones más usuales del DLS son las mediciones de tamaño y distribución de tamaños de las gotas de una emulsión y moléculas dispersas o disueltas en un líquido como proteínas, polímeros, micelas, carbohidratos, nanopartículas y dispersiones coloidales (McClements, 1999). En la Figura 7 puede observarse una fotografía del equipo de DLS.

En una dispersión coloidal, la intensidad dispersada a un determinado ángulo fluctúa en el tiempo debido al movimiento Browniano de las partículas puesto que la intensidad dispersada en un tiempo t depende de la configuración espacial de las partículas en ese mismo instante. El movimiento de las partículas coloidales en el seno del fluido ocasiona fluctuaciones de la intensidad. La función que describe las fluctuaciones de la intensidad dispersada $I(q, t)$ es una función del tiempo. Es decir, los movimientos difusivos de partículas en solución dan lugar a fluctuaciones en la intensidad de la luz dispersada en la escala de tiempo de microsegundos. Esta fluctuación provoca un “ruido” en la señal de luz dispersada. Las fluctuaciones de ese “ruido” son una medida de la velocidad de desplazamiento. La velocidad del movimiento Browniano se define por una propiedad conocida como coeficiente de difusión de translación (D) y se relaciona con el tamaño de la partícula por medio de la ecuación de Stokes-Einstein: $R_{(H)} = kT / (6\pi\eta D)$ donde $R_{(H)}$ es el radio hidrodinámico, D es el coeficiente de difusión traslacional ($m^2 s^{-1}$), k la constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23} \text{ NmK}^{-1}$), T la temperatura absoluta (K) y η la viscosidad (Nsm^{-2}). Así, mediante esta ecuación, el radio de partícula determinado representa el radio del volumen esférico, que cualquier partícula, no necesariamente esférica, ocupa en su

desplazamiento acompañado de su libre rotación; este es el denominado radio hidrodinámico y corresponde aproximadamente a la mitad de la dimensión más larga de la partícula. El radio calculado es indicativo del tamaño aparente tomando en cuenta los procesos de atracción y asociación con moléculas del solvente.

En la figura 6 puede observarse una representación esquemática de un experimento de dispersión de la luz común (Teraoka, 2002).

Debido a la dependencia del tamaño de partícula con la intensidad de dispersión de luz, en este trabajo se seleccionó esta técnica con el objetivo de evaluar la cinética de asociación, la agregación o el autoensamblaje de LHR. Para realizar la medición de Dispersión Dinámica de Luz se tomó una alícuota de 0.1 mL de solución de proteína stock y se diluyó en 1 mL de solución salina para posteriormente realizar la medición en un instrumento ALV-5000 a un ángulo de dispersión de 90° .

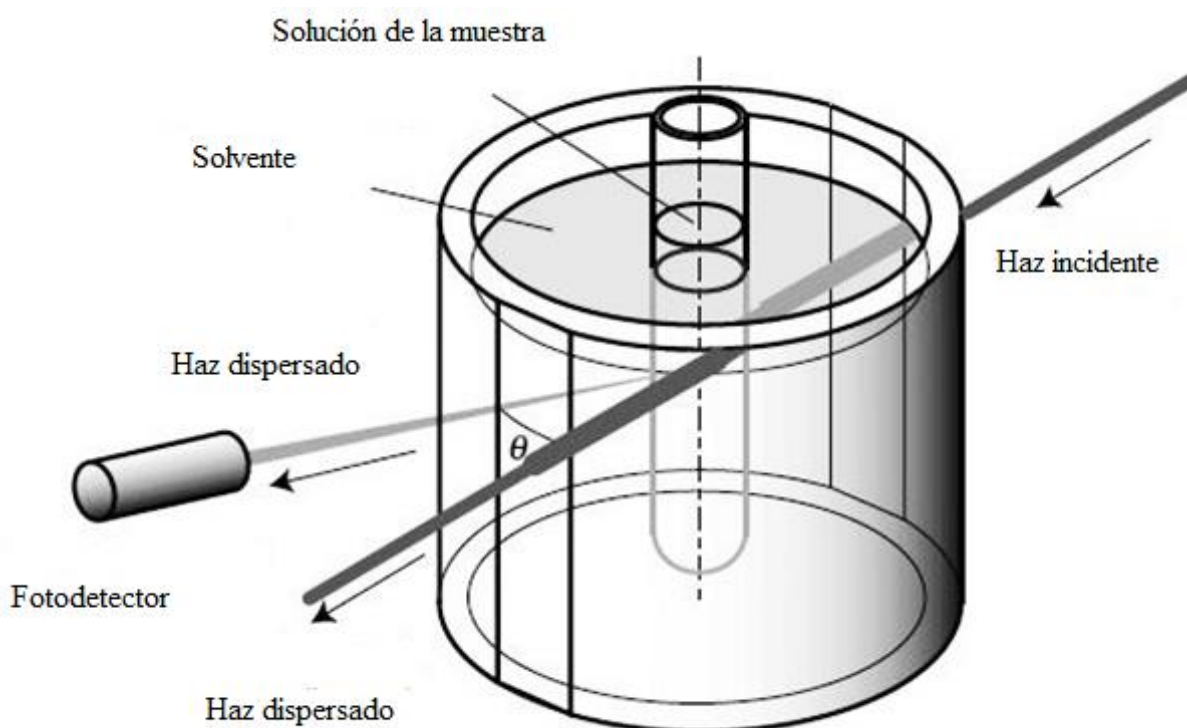


Figura 6. Representación esquemática de un experimento de dispersión de la luz común.

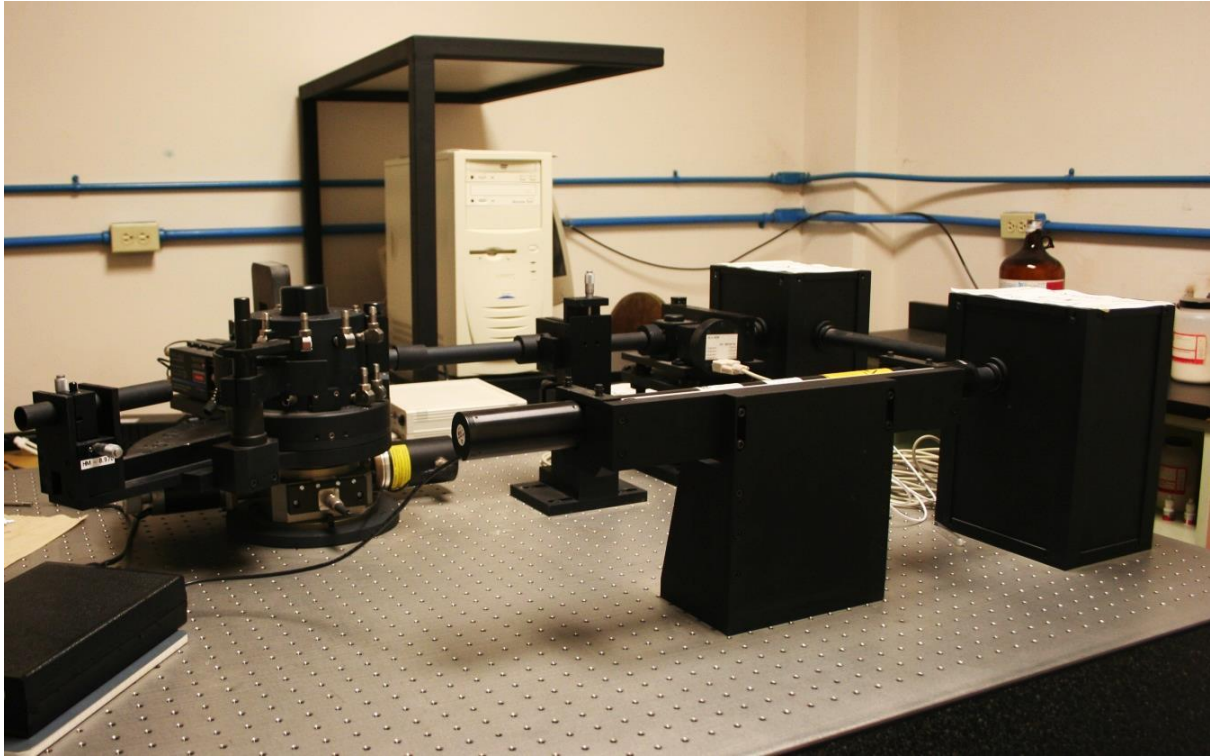


Figura 7. Fotografía de equipo de Dispersión Dinámica de Luz (DLS).

VI. 2. 3. Tensión superficial

A lo largo de la superficie del líquido actúan fuerzas, denominadas fuerzas de tensión superficial. Así, el líquido se parece a una película de goma dina, estirada de modo isotrópico en todas direcciones en el plano de la superficie. (Matvéev, 1981).

La existencia de la tensión superficial se muestra perfectamente con ayuda de las películas jabonosas, si suponemos que se extiende una película de jabón sobre un bastidor de alambre (Figura 8a), el cual posee un lado móvil. Experimentalmente se puede observar que existe una fuerza que actúa sobre la parte móvil en dirección opuesta a la flecha, como se muestra en el diagrama. Si el valor de esta fuerza por unidad de longitud se denota como γ , entonces el trabajo que se requiere para extender la parte movable a una distancia dx es: (Adamson, 1990)

$$\text{Trabajo} = \gamma dx$$

que también puede escribirse como:

$$\text{trabajo} = \gamma dA$$

Donde $dA = ldx$, en la segunda fórmula γ es la energía por unidad de área. Las unidades SI correspondientes para γ son, Joules por metro cuadrado (Jm^{-2}) o Newton por metro (Nm^{-1}) (Adamson, 1990). Dado que para un volumen fijo la esfera posee mínima superficie, en condiciones de ingravidez el líquido toma la forma de una esfera (Matvéev, 1981). En condiciones de gravedad terrestre solo las gotas relativamente pequeñas adquieren la forma de una esfera. Por ejemplo, considerando una burbuja de jabón de radio r , como se ilustra en la (Figura 8b). Su energía libre total es $4\pi r^2\gamma$, si el radio disminuye por dr , entonces el cambio de energía libre de superficie será $8\pi r\gamma dr$. Puesto que este encogimiento disminuye la energía superficial, el sistema queda balanceado mediante una diferencia de presión a través de la película ΔP , tal que el trabajo realizado en contra de esta diferencia de presión $\Delta P 4\pi r^2 \gamma dr$ es igual a la disminución de la energía libre de superficie (Adamson, 1990).

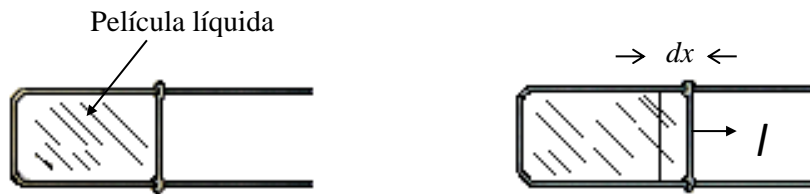
$$\Delta P 4\pi r^2 dr = 8\pi r\gamma dr$$

$$\Delta P = \frac{2\gamma}{r}$$

La ecuación resultante, ecuación de Laplace, expresa fundamentalmente que la presión en el interior de una burbuja pequeña es mayor que la del exterior.

Las gotas o burbujas que son pequeñas tienden a ser esféricas debido al efecto que ejerce la fuerza o tensión superficial, la cual es dependiente del área y disminuye en forma cuadrática, en una dimensión lineal, por otra parte, la distorsión debida al efecto gravitacional depende del volumen de la gota, disminuyendo en forma cúbica (Figura 8).

a)



b)

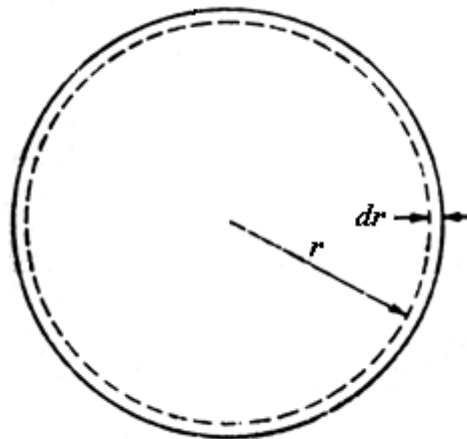


Figura 8. Esquema de tensión superficial. a) Película de jabón sobre bastidor de alambre, con un brazo móvil, b) Burbuja de jabón. (Adamson, 1990).

Así pues, la forma real de la gota es el resultado del equilibrio que se origina entre la tensión interfacial y el efecto de gravedad. Mientras que por un lado, la tensión superficial le confiere una conformación esférica a la gota, por otra parte, el efecto de gravedad hace que esta se alargue, resultando una gota en forma de pera. Este efecto permite observar la influencia del cambio de la tensión superficial sobre la forma de la gota, conforme se lleva a cabo la adsorción de moléculas en la interfase de dos fluidos (Adamson, 1990).

En forma general para describir una superficie curva es necesario mencionar dos radios de curvatura; los cuales son iguales para una esfera, pero no necesariamente para cualquier otra. Una pequeña sección de una superficie curva se muestra en la Figura 9a.

Los dos radios de curvatura R_1 y R_2 y tomando una sección suficientemente pequeña para que R_1 y R_2 permanezcan prácticamente constantes. Bajo este argumento, si la superficie se desplaza a una pequeña distancia, el cambio del área es (Adamson, 1990):

$$\Delta A = (x + dx)(y + dy) - xy = xdy + ydx$$

El trabajo que se realiza para obtener esta cantidad adicional de superficie entonces es:

$$trabajo = \gamma(xdy + ydx)$$

Entonces la diferencia de presión ΔP a través de la superficie que actúa sobre el área xy y a través de la distancia dz . El trabajo ahora corresponde a:

$$trabajo = \Delta Pxydz$$

Por comparación se obtiene que:

$$\frac{x + dx}{R_1 + dz} = \frac{x}{R_1} \quad \text{ó} \quad dx = \frac{xdz}{R_1}$$

y

$$\frac{y + dy}{R_2 + dz} = \frac{y}{R_2} \quad \text{ó} \quad dy = \frac{ydz}{R_2}$$

Si la superficie se encuentra en equilibrio, los dos términos de trabajo se igualan, sustituyendo en la ecuación las expresiones obtenidas para dx y dy , se obtiene:

$$\Delta P = \gamma \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right)$$

La ecuación de Young-Laplace expresa la diferencia en presión (ΔP), entre la interfase de dos fluidos, en donde la presión de superficie es proporcional a la curvatura promedio, el

coeficiente de proporcionalidad es la tensión superficial (γ), y R_1 y R_2 representan dos radios de curvatura del área superficial. Sobre el ápice de la gota ambos radios de curvatura son iguales, por lo tanto:

$$\frac{1}{R_1} = \frac{1}{R_2} = \frac{1}{R_{\text{ápice}}} = b$$

El peso de la gota está parcialmente compensado por la fuerza de empuje, y de acuerdo al principio de Arquímedes, para una gota de volumen V , la fuerza de gravedad puede escribirse de la siguiente manera:

$$F = V(\rho_1 - \rho_2)g = V\Delta\rho g$$

en donde ρ_1 y ρ_2 son las densidades de los dos fluidos, respectivamente y g es la aceleración gravitacional (Adamson, 1990).

El sistema de coordenadas curvilíneas que describen el perfil de la gota resulta del equilibrio entre la fuerza de gravedad y la tensión superficial (Figura 9b) en el equilibrio y para cualquier plano horizontal, se obtiene la siguiente ecuación:

$$2\pi r\gamma \sin\theta = V\Delta\rho g + \pi R_{\text{ápice}}^2 \Delta P$$

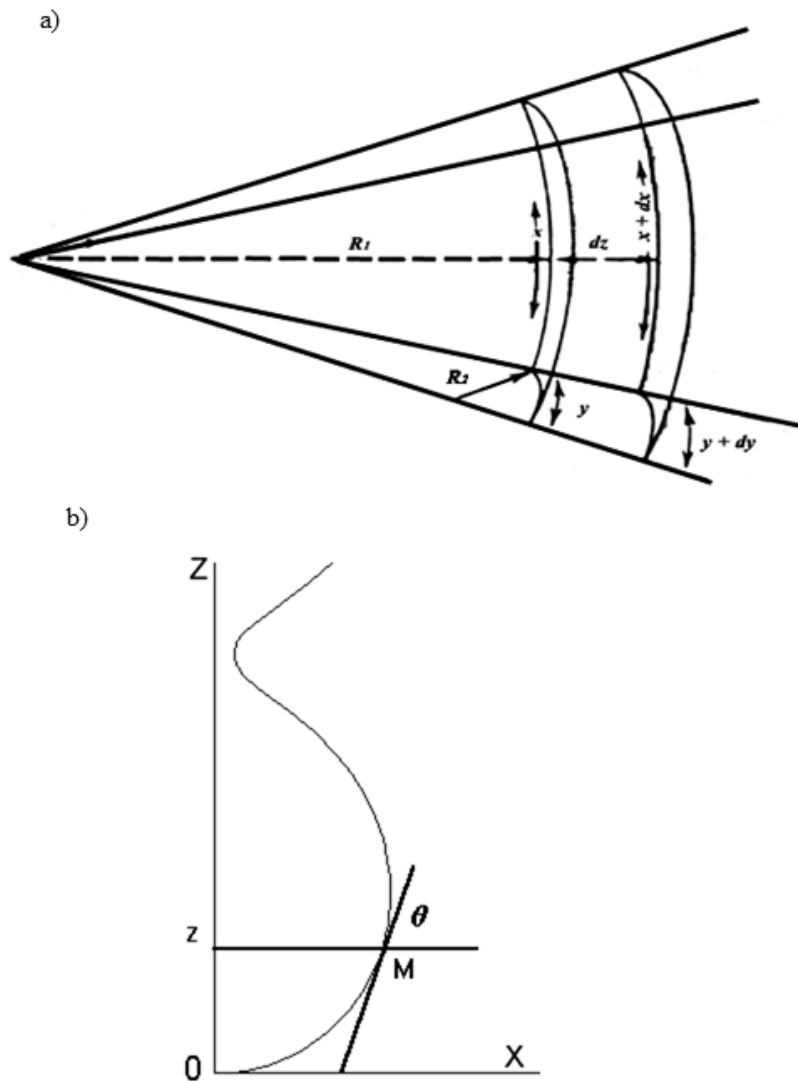


Figura 9. Esquema para describir una superficie curva: a) Sección de una superficie curva bajo condiciones de equilibrio mecánico, b) Descripción del perfil de una gota, donde X es la distancia a partir del eje de la gota, y Z la vertical. (Adamson, 1990).

Para realizar las mediciones de tensión superficial, se procedió a tomar 100 μl de solución stock en incubación a los distintos tiempos (min) determinados: 0, 15, 30, 60, 120, 240, 360, 480, 600, 720, 1140, 1620, 1800, 2880, 3600, 4320; Agregando 7 mL de solución salina y transfiriendo, posteriormente, las diluciones a una celda de cuarzo para su medición en Tensiómetro de gota (Drop tensiometer ITC tracker), el cual consta de una microjeringa unida a un capilar cilíndrico sobre la que se forma la gota. Para monitorear la

tensión interfacial, del sistema líquido-aire, respecto al tiempo, la celda se colocó en una cámara conectada a un controlador de temperatura y el equipo tomó las imágenes de la gota, mediante una videocámara CCD de alta velocidad, para así realizar el análisis digital. (Möbius y Millar, 1998). En la Figura 10 se muestra un esquema del tensiómetro de gota.

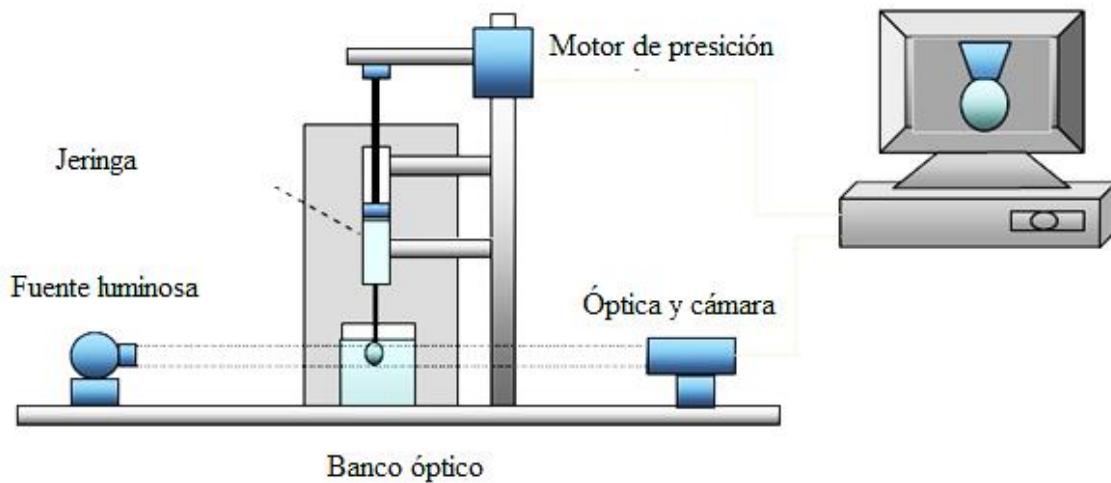


Figura 10. Esquema de Tensiómetro de gota.

VI. 3. Determinación de la Morfología de estructuras de LHr

VI. 3. 1. Microscopía de fuerza atómica (AFM)

La microscopía de fuerza atómica es una de las varias técnicas llamadas SPM (Scanning Probe Microscopes) La resolución de los microscópicos ópticos está determinada por la longitud de onda de la luz y típicamente es de aproximadamente 500 nm. Por otro lado la microscopía electrónica con electrones de alta energía permite aumentar la resolución, pero requiere que la muestra se examine en alto vacío y en muchas ocasiones requiere de preparaciones muy complejas (Sato, 2001).

Los SPM generan imágenes midiendo fuerzas electrostáticas (entre otras) entre los átomos del microscopio y átomos de la muestra- sintiendo o tocando la muestra-. Así, se basan en medir cambios en la magnitud de la interacción entre una punta (probe) y la superficie de la muestra, de manera que la punta mide la fuerza de atracción o repulsión de la muestra. La microscopia de fuerza atómica (AFM) representa una herramienta capaz de realizar análisis de la superficie, a nivel nanométrico, al generar imágenes de alta resolución en tres dimensiones.

Las imágenes obtenidas por AFM proporcionan información sobre las diferencias morfológicas o topográficas. Mediante esta técnica se pueden medir fuerzas tan pequeñas midiendo deflexiones del orden de 10^{-10} m ($0.1\text{nm}= 1\text{Å}$) Para realizar dicha observación se procedió a tomar 100 μl de solución stock en incubación a los distintos tiempos (min) determinados: 0, 15, 30, 60, 120, 240, 360, 480, 600, 720, 1140, 1620, 1800, 2880, 3600, 4320. Posteriormente se vertió la alícuota en un sustrato sólido (mica), la muestra se dejó secar y posteriormente se procedió a observar en el microscopio de fuerza atómica (AFM) marca JOEL modelo JSPM 4210, utilizando el modo de contacto. (Figura 11 y 12).

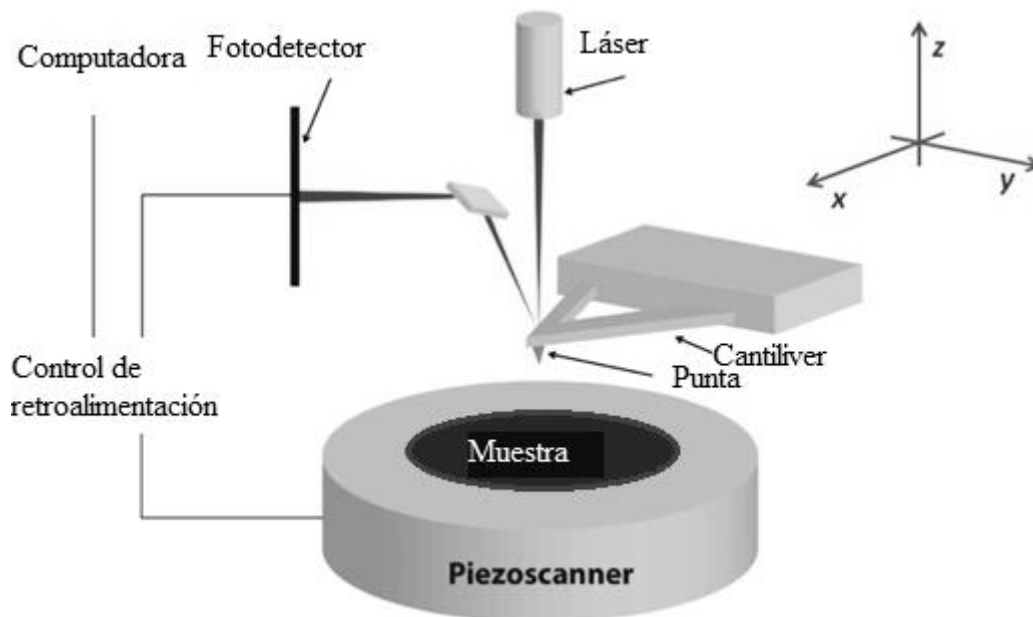


Figura 11. Esquema de representación de AFM.



Figura 12. Fotografía de equipo de AFM.

VI. 4. Determinación de Transición en la Conformación Estructural de LHr

VI. 4. 1. Espectroscopia infrarroja con transformadas de Fourier (FT-IR)

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

4000 y 670 cm^{-1} . La región útil que nos interesa para macromoléculas biológicas se encuentra en el intervalo entre 4000 y 1400 cm^{-1} . Las bandas de estos espectros son anchas y centradas en frecuencias de grupos característicos tales como $-\text{C}=\text{O}$, $-\text{C}=\text{N}$, $-\text{N}-\text{H}$, amidas en proteínas, éster fosfato en ácidos nucleicos, etc. La mayoría de estudios de IR se centran en la caracterización de las estructuras secundarias de proteínas mediante el uso de bandas de absorción que reflejan los movimientos de grupos de péptidos. El grupo peptídico produce hasta 9 bandas características, sin embargo, las bandas Amida I y Amida II son las dos principales bandas de los espectros IR de proteínas; La banda Amida I es la más intensa de las bandas de absorción en proteínas, entre el intervalo de 1600 y 1700 cm^{-1} , estando asociada principalmente a la vibración de tensión del grupo $\text{C}=\text{O}$ (70-85%) y está directamente relacionada con la conformación del esqueleto polipeptídico y el patrón de enlaces de H.

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

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

El método utilizado es el método de ajuste de bandas el cual está basado en la suposición de que los espectros de bandas simples (cada banda estrecha característica de un elemento de estructura secundaria) experimentan un ensanchamiento en disolución o en estado sólido dando como consecuencia un solapamiento de las bandas y no pueden distinguirse en la envoltura. En este método se realiza una operación de corrección del efecto de ensanchamiento de las bandas, operación llamada desconvolución, normalmente

mediante la desconvolución de Fourier (con frecuencia referida erróneamente como autodesconvolución por razones históricas). El objeto es identificar el número y posición aproximada de las bandas que componen la Amida I. Con el espectro así corregido se realiza un ajuste de bandas en la Amida I por un algoritmo iterativo que minimiza la desviación cuadrática media de la envolvente resultante del ajuste y la experimental. El área de una banda se asigna a una estructura de acuerdo con su posición (Byler y Susi, 1986; Goormaghtigh, et al., 1994). Esta asignación descansa en los intervalos de aparición aceptados para las diferentes estructuras secundarias. Este método ha sido validado por comparación con los datos de difracción de rayos X, siendo los errores absolutos en la estimación de porcentajes de estructura secundaria del 2-9% (Byler y Susi, 1986; Goormaghtigh, et al.,1994; Kumosinski y Unrush).

Las siguientes frecuencias vibratorias se han asignado a: 1654 cm^{-1} para la hélice- α ; 1624 , 1631 , 1637 , y 1675 cm^{-1} para hojas- β ; 1663 , 1670 , 1683 , 1688 , y 1694 cm^{-1} para giros; y 1645 cm^{-1} para otras estructuras (Dobson, 2003; Gorzny et al. 2010; Ostrov y Gazit, 2010). Las cantidades relativas de las cuatro estructuras secundarias están determinadas por las áreas relativas bajo los picos de la banda.

Las mediciones se hicieron tras liofilizar la solución madre de LHr correspondiente a los 0, 30, 120, 300, 600, 720, 1440 y 3000 minutos de incubación.

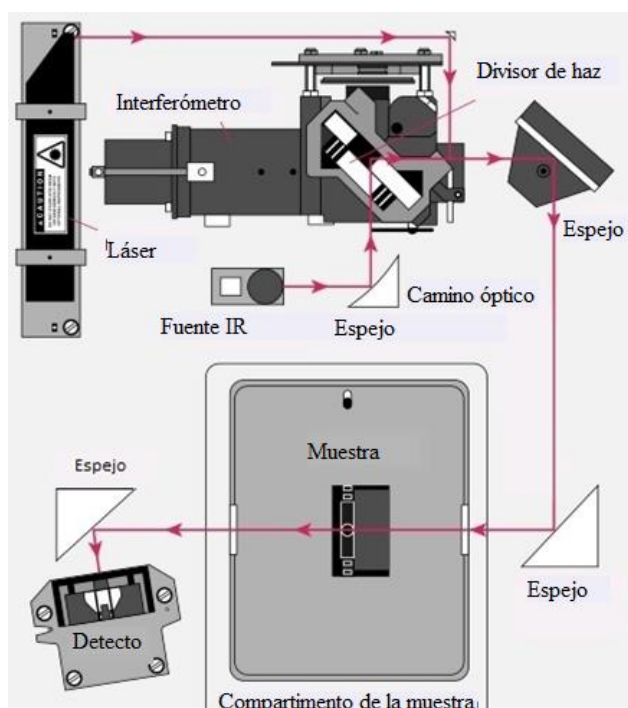


Figura 13. Esquema de funcionamiento de IR.

VI. 5. Determinación de Potencial Zeta

Todo medio coloidal, por ejemplo la sangre, el líquido intracelular y extracelular, fármacos, entre muchos otros, está formado por partículas con cargas eléctricas. La fuerza de repulsión entre estas partículas es definida por el potencial zeta, el cual es una medida de la fuerza eléctrica que existe entre átomos, moléculas, partículas y células en una suspensión. Esta fuerza que mantiene separadas a las partículas coloides en los seres vivos evita la aglomeración o coagulación intravascular.

El factor más importante que afecta el potencial zeta es el pH, especialmente cuando se estudian proteínas. A pH mayores al punto isoeléctrico, el potencial zeta es mayor a cero; a pH menores al punto isoeléctrico, el potencial zeta es negativo y cero en el punto isoeléctrico.

El desarrollo de una carga neta en la superficie de una partícula, afecta la distribución de iones de la región interfacial circundante. Esto resulta en un aumento de la concentración de iones de carga opuesta a la partícula que están cercanos a la superficie. Así, una doble capa eléctrica se genera alrededor de cada partícula. La capa de líquido que rodea a la partícula se la puede encontrar de dos formas: una región interna, conocida como capa de Stern donde los iones están fuertemente ligados, y una región externa, conocida como capa difusa, donde los iones están ligados con menos fuerza a la partícula. Existe un límite imaginario que termina en la capa difusiva, donde los iones y la partícula forman una entidad estable (capa de Stern). Cuando una partícula se mueve lo hace con los iones que conforman la capa Stern y la difusa. Este límite se conoce como plano slipping y su correspondiente se conoce como potencial zeta.

Una consecuencia importante de la existencia de cargas eléctricas en la superficie de la partícula es que exhiben ciertos efectos cuando se aplica un campo eléctrico. El efecto que se analiza para la determinación del potencial zeta es la electroforesis (movimiento relativo de una partícula cargada en el líquido en el cual está suspendida bajo la influencia de un campo eléctrico).

Con la movilidad electroforética conocida se usa la aproximación de Smoluchowski para obtener el potencial zeta (ζ), ecuación 14:

$$\zeta = \frac{\eta\mu}{\epsilon}$$

donde, η : viscosidad del fluido y ϵ : constante dieléctrica.

En el presente estudio, la medida del potencial zeta de los estados transitorios de LHR se consideró con el objeto de obtener información acerca del efecto del medio de incubación sobre las propiedades de agregación y su la posible relación de la carga de los estadios de LHR con el efecto citotóxico.

Para realizar las mediciones de potencial zeta, se diluyó la solución madre de proteína de la LHR correspondiente a los 0, 30, 120, 300, 600, 720, 1440 y 3000 minutos de incubación en un factor de 5 y se procedió a realizar las medidas.

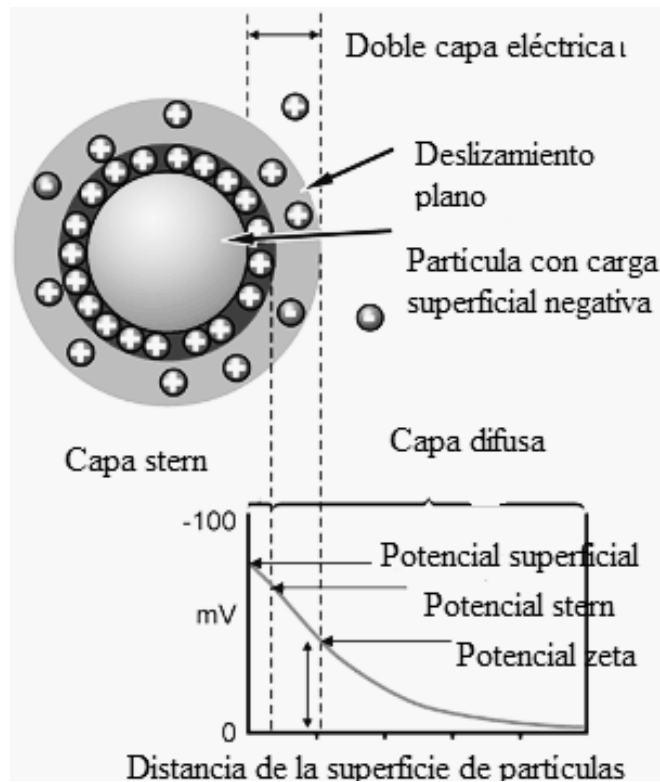


Figura 14. Esquema de una partícula cargada y la doble capa que la rodea (Malvern Instruments, 2001)



Figura 15. Fotografía del equipo Zetasizer Nano-Zs (Malvern Instruments, 2012)

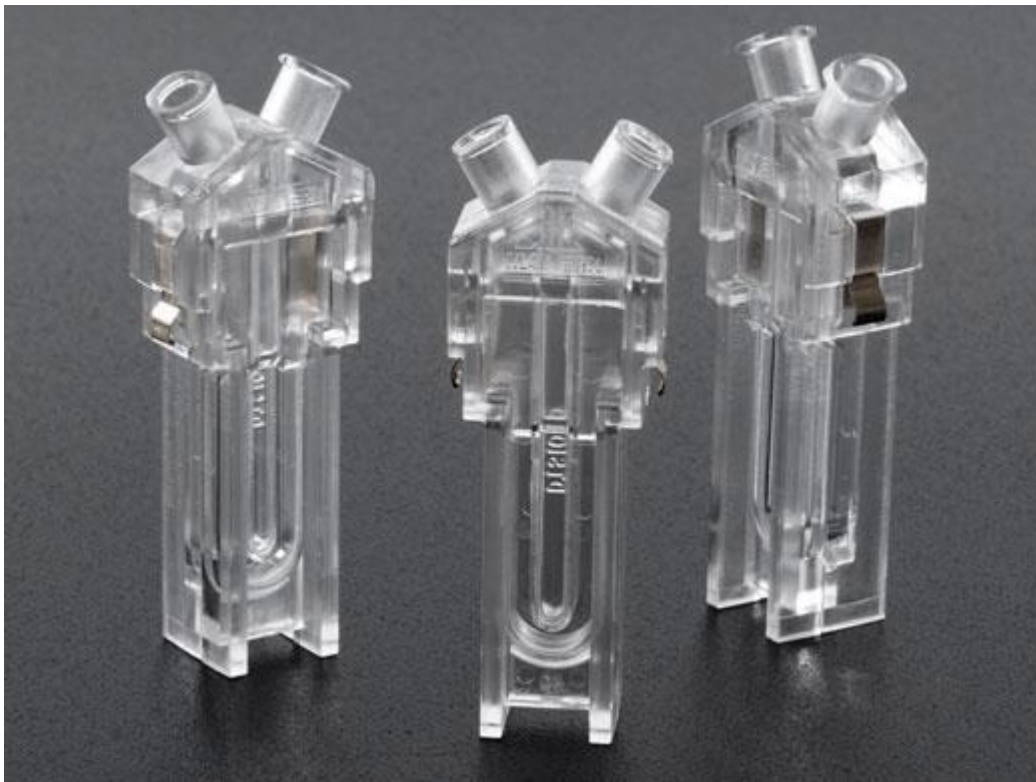


Figura 16. Fotografía de las celdas Zetasizer Nano Cells, (Malvern Instruments, 2012)

VI. 6. Viabilidad Celular

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

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

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

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

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

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

$$\% = \text{D.O de células tratadas} \times 100 / \text{D.O de células controles}$$

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

Las células fueron sometidas a tripsinación por 7 minutos con tripsina-EDTA 0.2%, luego de lavar las mismas con PBS-EDTA. Posteriormente fueron centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos y resuspendidas en 1 ml de medio de cultivo. Inmediatamente después se realizó el conteo preparando una solución de 10 µl de células en medio y 90 µl colorante azul Tripan. Mediante la tinción con azul Tripan, las células muertas captan el colorante, mientras que las células vivas no lo hacen, ya que el colorante se une a las proteínas intracelulares de las células muertas por presentar una membrana celular permeable, de esta forma se descartan del conteo las células teñidas. El tratamiento se llevó a cabo en placas de 96 pozos con ~10,000 células por pozo en 100 µL de medio. Se prepararon las diluciones de estructuras amiloides correspondientes a 5mM, 10 mM y 20 mM de los tiempos de incubación correspondientes a 0, 30, 120, 300, 600, 720 y 3000 minutos, en medio y se le añadieron alícuotas de 50 µL a cada pozo. La viabilidad celular se evaluó después de 48 h de incubación con las estructuras de cada tiempo de incubación. Después de la incubación de las placas con los tratamientos se agregaron 10µl de 3 - (4,5-

dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio (MTT) de reactivo de marcado, a cada pozo, y las muestras se incubaron durante 4 h. Por último se realizó la medición mediante el lector de microplacas para la cuantificación de densidad óptica (Figura 17).

Los datos fueron sujetos a análisis estadístico mediante ANOVA usando el programa estadístico GraphPad Prism versión 6.0. La prueba de Comparación Múltiple de Newman-Keuls fue usado para comparar los datos dentro de cada experimento. Además los datos se presentan como media \pm errores estándares de la media (SEM). Los experimentos fueron realizados en triplicado. Los valores $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.



Figura 17. Fotografía de lector de microplacas para la cuantificación de densidad óptica.

VII. RESULTADOS

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

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

La medición de las intensidades mediante estas dos técnicas, fluorescencia de ThT y DLS, muestra una fase de latencia o de retardo dependiente de nucleación, la cual determina la tasa de formación de fibras amiloides. En esta fase, los monómeros recién formados reaccionan entre sí, así como con oligómeros de diferente tamaño con el fin de convertirse en grupos más grandes hasta que se supera la concentración de proteína; Una vez que las protofibras se forman, sus extremos sirven como núcleos y se produce una interacción de tipo catalítica provocando que estas se agreguen entre sí y se formen fibras más largas. El aumento drástico en la fase de crecimiento indica la existencia de mecanismos de cooperatividad. Finalmente, las reacciones avanzan hasta que las agrupaciones de proteínas más solubles están agotadas y es alcanzado el equilibrio de las fibras. La longitud de la fase de latencia y la elongación, o crecimiento de las fibras, es dependiente de los factores de concentración inicial de proteína y el pH, pues estos afectan el grado de supersaturación en la solución.

VII. 1. 2. Fluorescencia de thioflavina T (ThT)

La intensidad de fluorescencia mostró una curva observada comúnmente en los proceso de fibrilación dependiente de nucleación. El tiempo de latencia antes del crecimiento de las fibras se ha observado en numerosas publicaciones y se asemeja a un período de incubación. En la cinética de LHr esta fase de retardo se aprecia hasta aproximadamente los 600 minutos de incubación (figura 18) la cual corresponde al proceso de nucleación de

LHr hasta alcanzar la formación de las fibras de amiloide. Entre los 600 y 720 minutos de incubación, la intensidad de la fluorescencia aumentó de forma pronunciada debida a un crecimiento de las fibras. El proceso de fibrilación se considera terminado a los 3000 minutos de incubación, cuando la intensidad de fluorescencia de ThT alcanzó el equilibrio.

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

VII. 1. 3. Dispersión dinámica de luz (DLS)

Para detectar el tamaño de los agregados de LHr, se midió la intensidad de luz dispersada de proteína por dispersión dinámica de luz. Los resultados obtenidos mostraron una curva aparentemente sigmoideal de manera similar a la obtenida por fluorescencia de ThT (figura 19), sin embargo, se obtuvo una intensidad mayor en la fase de latencia en DLS y una intensidad menor en la fase de elongación. Siendo la intensidad obtenida para DLS en la fase de latencia, alrededor de los 600 minutos de incubación, igual a 0.129 (a. u) contra 0.066 (a. u) en emisión de fluorescencia de ThT. Por otro lado el intervalo para la fase de elongación de DLS se obtuvo a 0.22 a 0.62 (a. u); Mientras que en fluorescencia este intervalo de intensidad corresponde a 0.076 a 0.86 (a. u).

Es importante tener en cuenta que las medidas de la intensidad por dispersión de luz nos arrojan datos relacionados con la agregación, y los tamaños de los mismos agregados, que se encuentran en la solución de nuestra la muestra. Mientras que la emisión de fluorescencia de ThT mide la interacción de tioflavina y las fibras amiloides, uniéndose con las fibras ricas en hojas- β . Es decir, arroja información sobre la conformación de los agregados.

VII. 1. 4. Tensión superficial

A través de las medidas de tensión superficial se observó un aumento dependiente del tiempo, las cuales presentaron un aumento continuo a partir de los períodos tempranos de incubación, por lo que no se observó una fase de retardo perceptible en esta técnica hasta que se alcanzó la región estabilizada, como puede observarse en la figura 18 (línea punteada con rectángulos). La proteína LHr, presentó una hidrofobicidad relativa en

aumento al acercarse a los 600 y 1600 minutos, región estabilizada donde se observa la aparente fase de retardo, estabilizándose casi por completo después de los 3000 minutos. Este aumento continuo es resultado de la manifestación de conformaciones estructurales que tienden a adsorberse en la interfase en un periodo de tiempo cada vez más largo a consecuencia del efecto hidrofóbico. La forma en la que las propiedades de adsorción de los estadios se relacionan con el carácter hidrofóbico que adquiere LHR durante la cinética de fibrilación, se puede establecer en base a los resultados obtenidos mediante fluorescencia de ThT, DLS e IR; los cuales corroboran los cambios conformacionales que modifican el carácter hidrofóbico y de agregación de cada especie prefibrilar, la cual da como resultado un aumento la actividad superficial reflejada en las propiedades de adsorción.

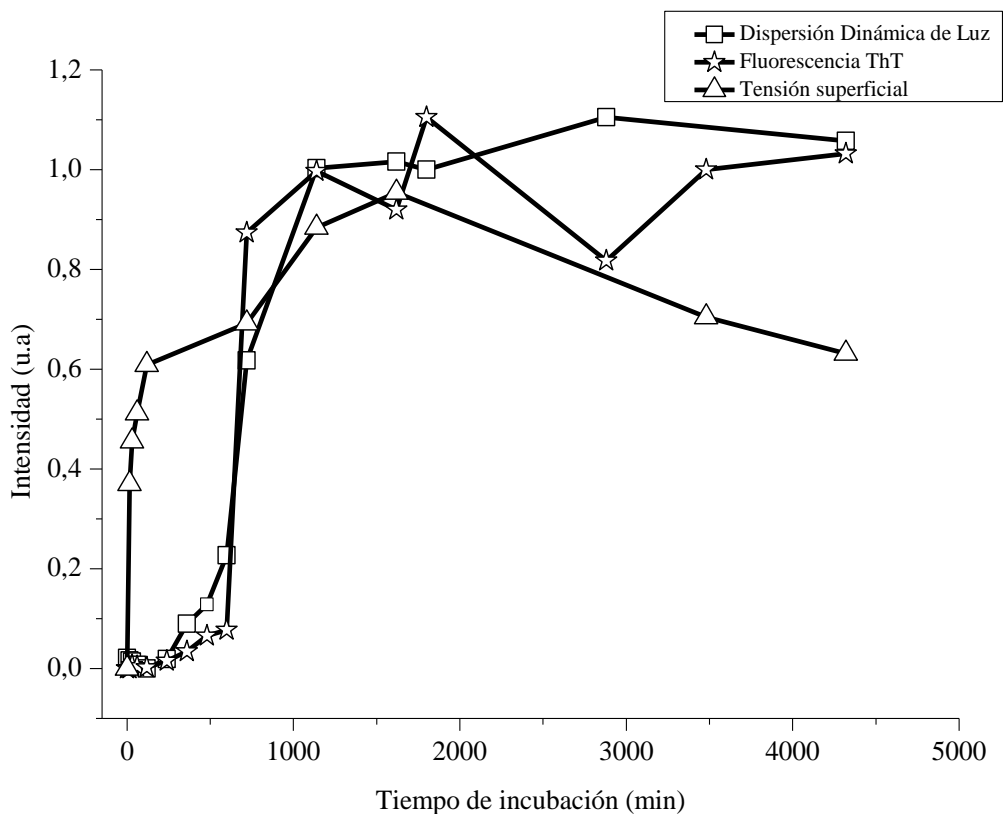


Figura 18. Cinética de fibrilación de Lisozima Humana recombinante (LHR).

VII. 1. 4. 1. Constante de adsorción

A la hora de analizar la penetración en la interfase y el reordenamiento de las moléculas adsorbidas en la interfase, se emplea la siguiente ecuación semiempírica de primer orden (Graham y Philips, 1979):

$$\ln \left(\frac{\pi_f - \pi_t}{\pi_f - \pi_0} \right) = -kt$$

donde, π_f y π_0 son los valores de presión superficial en el momento inicial $t = 0$, y en cada momento t , respectivamente, y k es la constante de difusión.

Tras la aplicación de esta ecuación es factible interpretar los datos obtenidos mediante las medidas de tensión superficial para entablar una asociación con la capacidad de las distintas estructuras, transitorias prefibrilares y fibrilares, de LHR para penetrar en la interfase aire-agua, capacidad que puede estar relacionada con las modificaciones estructurales de la proteína por el efecto del reordenamiento de secuencias con residuos hidrofóbicos e hidrofílicos.

En la Figura 19 puede observarse que la constante de adsorción aumenta en los primeros estadios y entre los 400 y 800 minutos de incubación.

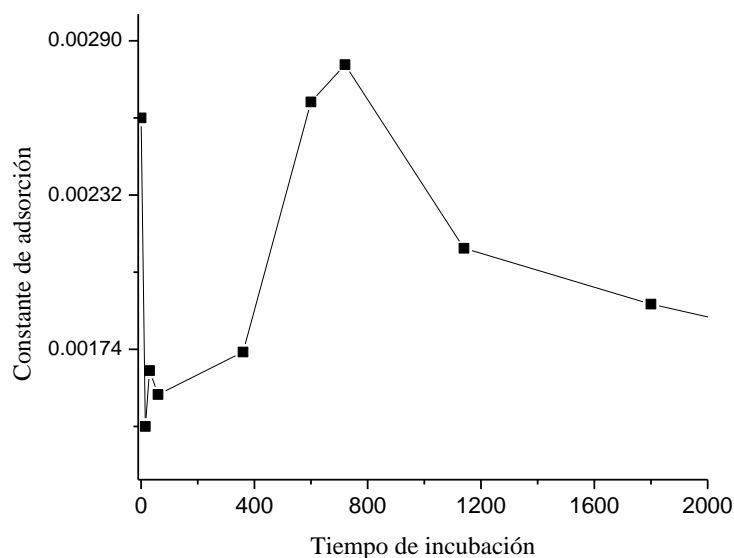


Figura 19. Constante de adsorción obtenida mediante las medidas de Tensión Superficial utilizando la ecuación de Graham y Philips (1979).

A medida que el tiempo de incubación transcurre y aumenta la hidrofobicidad relativa de la LHR, se esperaría que estos grupos hidrofóbicos se comportarían como un surfactante, ya

que sus moléculas se adsorben preferencialmente en la interfase, provocan un descenso de la tensión superficial y el aumento de la adsorción en la interfase, sin embargo como observamos en la Figura 19, la constante de adsorción en los primeros estadios disminuye y la tensión aumenta, esto pudiera explicar el fenómeno por una considerable lenta difusión hacia la interfase en el que el tiempo en las medidas de tensión superficial no fue suficiente.

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

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

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

Independiente del tipo de proteína amiloide, la ecuación se ajusta razonablemente bien a los datos, incluso para los obtenidos en DLS. Esto sugiere que el proceso de formación de fibras es similar para diferentes proteínas. Es una forma especializada de la función logística que se ha utilizado con frecuencia en el campo de la biología de la población. Los parámetros de este modelo incluyen la constante de velocidad aparente para el crecimiento de fibras (k_{app}) igual a $1/\tau$, τ es la constante de tiempo de crecimiento de las fibras y es igual a $1/k_{app}$, y el tiempo de retraso igual a $t_0 - 2\tau$, t_0 es el tiempo para el 50% de la señal máxima o el tiempo de punto de inflexión. Los valores obtenidos para la constante de crecimiento de fibras (k_{app}) y la fase de retardo (lag) se muestran en la tabla I.

Tabla I. Constantes de fibrilación aparente y fase de retardo obtenidas ajustando el modelo cinético.

Intensidad por	Kapp (min ⁻¹)	Fase de retardo (min ⁻¹)	R ²
Fluorescencia	0.0396	616.6698	0.98143
DLS	0.0117	526.6983	0.99432

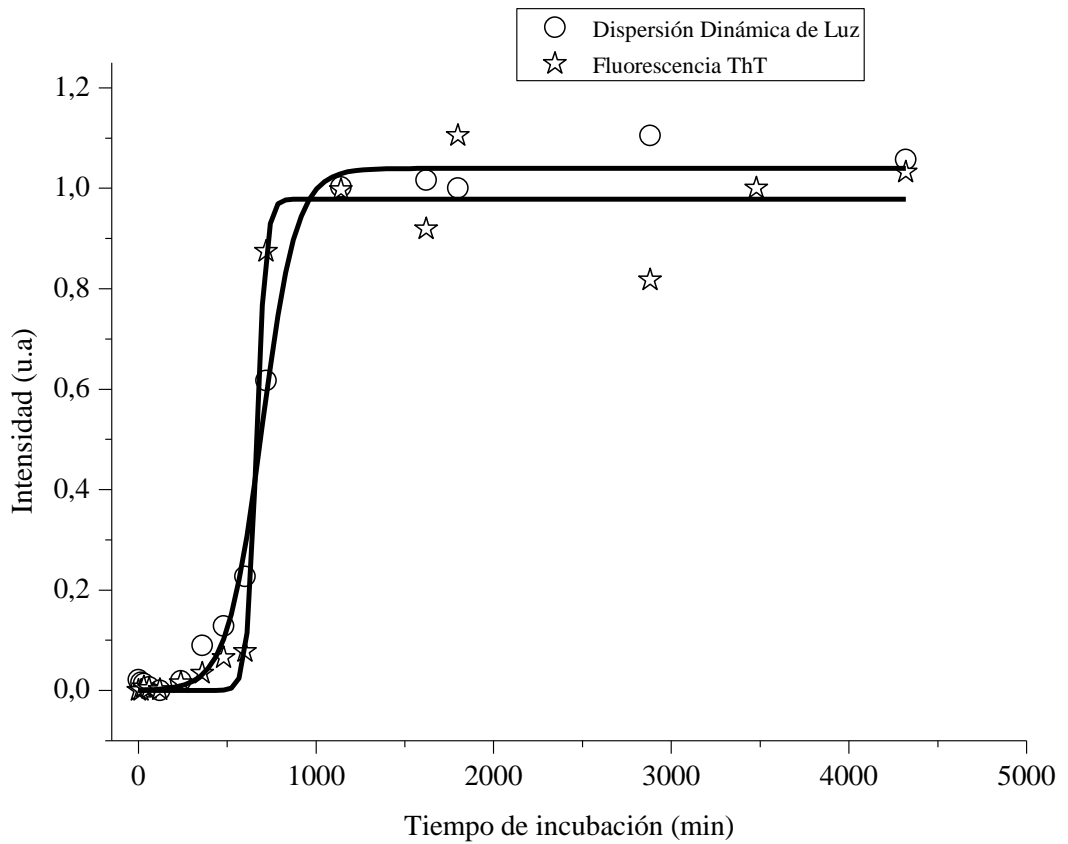


Figura 20. Modelaje teórico de fibrilación de Lisozima Humana recombinante (LHr).

VII. 2. Determinación de la Morfología de Estructuras de Lisozima Humana Recombinante (LHr)

VII. 2. 1. Microscopía de fuerza atómica

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

En la figura 21 se puede apreciar agregados proteína lisozima humana recombinante a tiempo cero. La agregación de la proteína puede explicarse por la exposición de lisozima a un medio parcialmente desnaturante, acidificado a pH 2. Por otro lado, a los 30 y 120 minutos de incubación a 55°C en la solución acidificada, fue posible observar una disminución de los tamaños, disociación y formación de dímeros, trímeros (Figura 22 y 23); así como la interacción o lo que se asemeja a una alineación de los oligómeros (Figura 24).

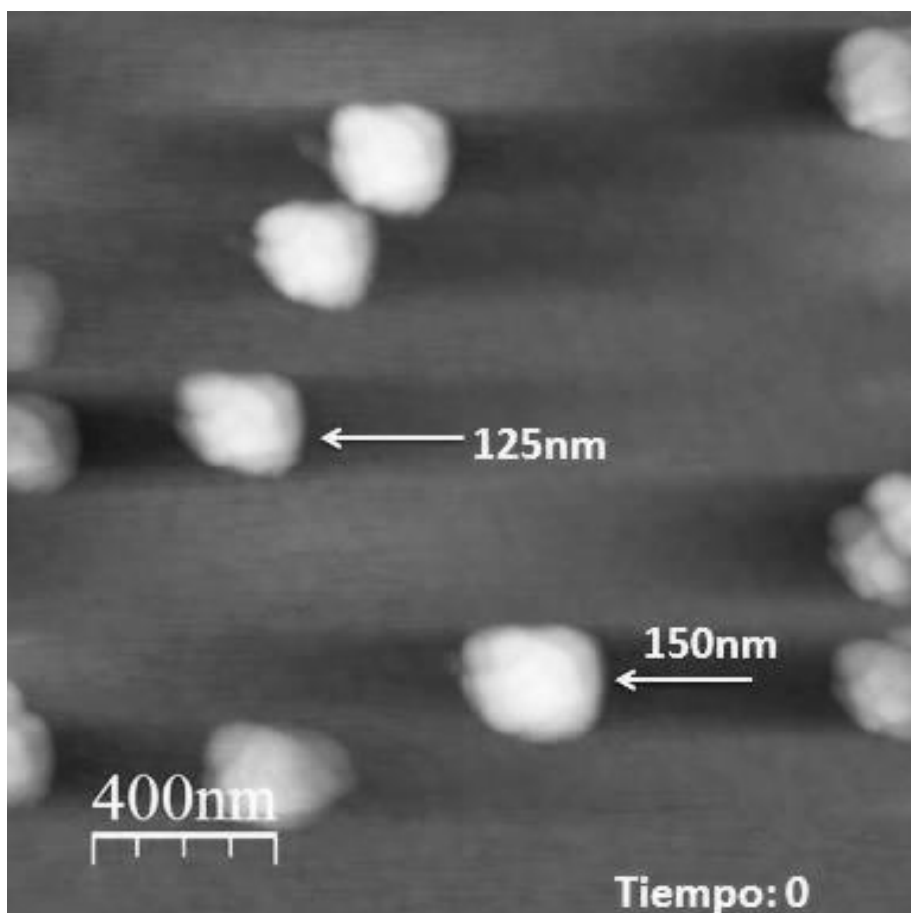


Figura 21. Imagen de AFM de agregados de LHR a 0 minutos de incubación

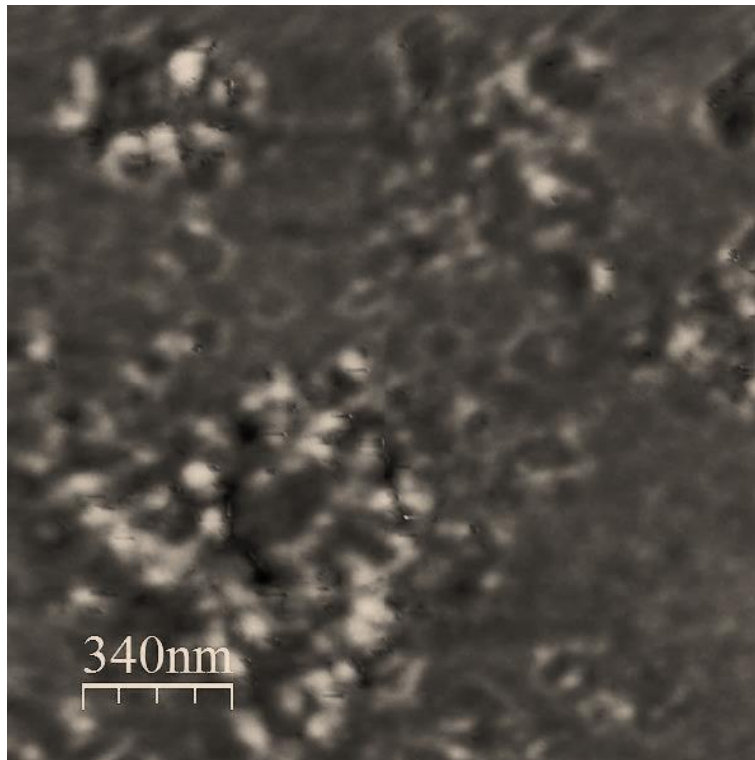


Figura 22. Disociación de LHR a 30 minutos de incubación

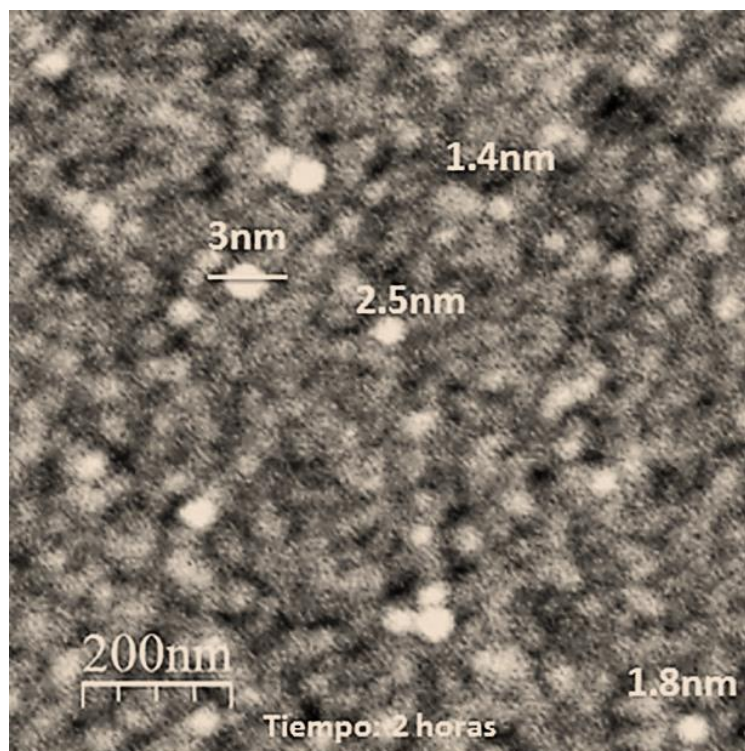


Figura 23. Disociación de proteína en monómeros, dímeros y trímeros a los 120 minutos.

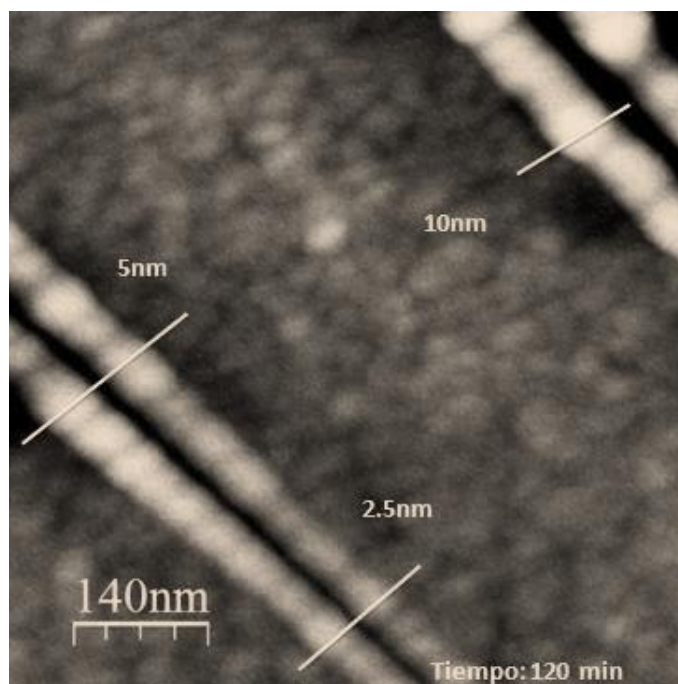


Figura 24. Agregación de oligómeros a 120 minutos.



Figura 25. Formación de estructuras fibrilares a los 480 minutos de incubación.

Entre los 600 y 720 minutos fue posible observar imágenes de estructuras protofibrilares y el crecimiento de las mismas, como se observa en las figuras 27 y 28. La morfología fibrilar de los estadios de LHR tomados a estos tiempos de incubación, 600 y 720, presentó la mayor citotoxicidad en las células ARPE-19 en los ensayos realizados.

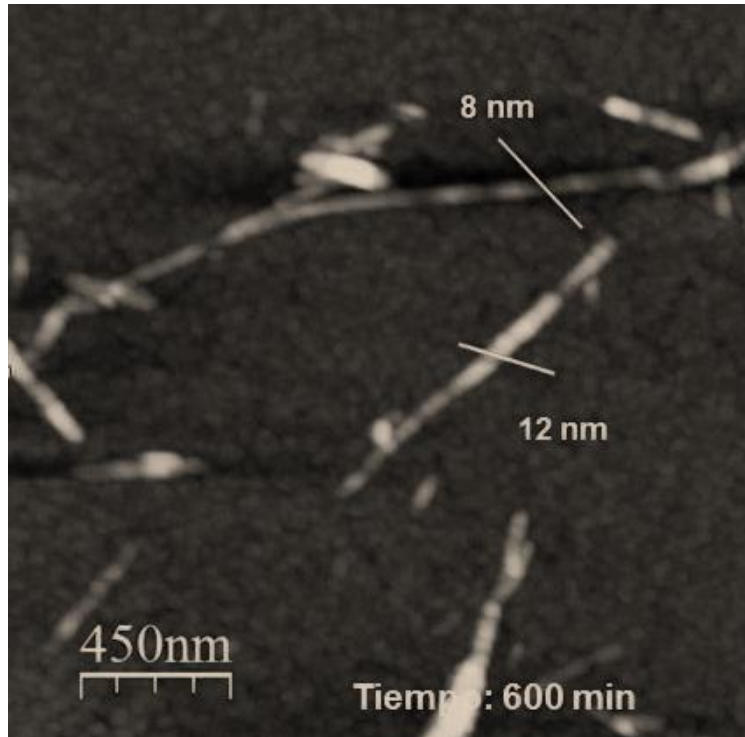


Figura 26. Protofibras formadas y en crecimiento a los 600 minutos.

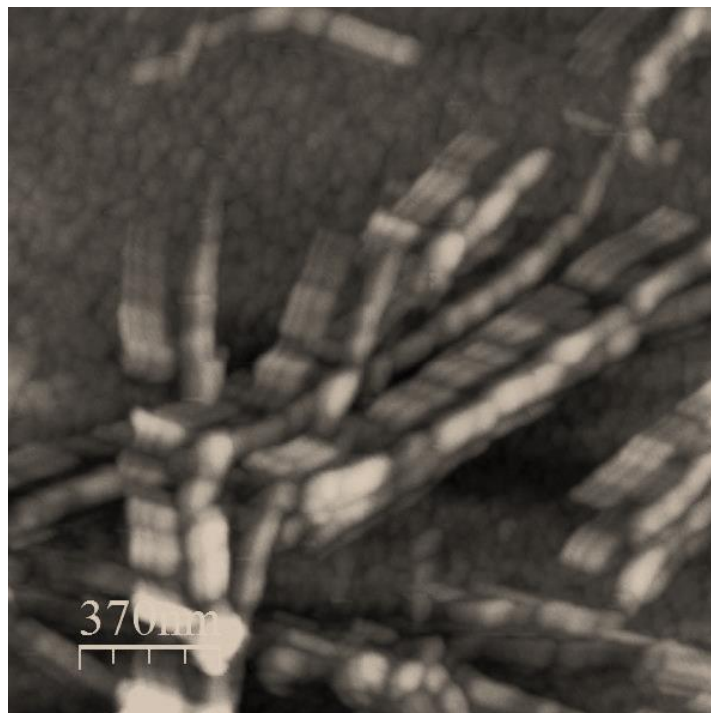
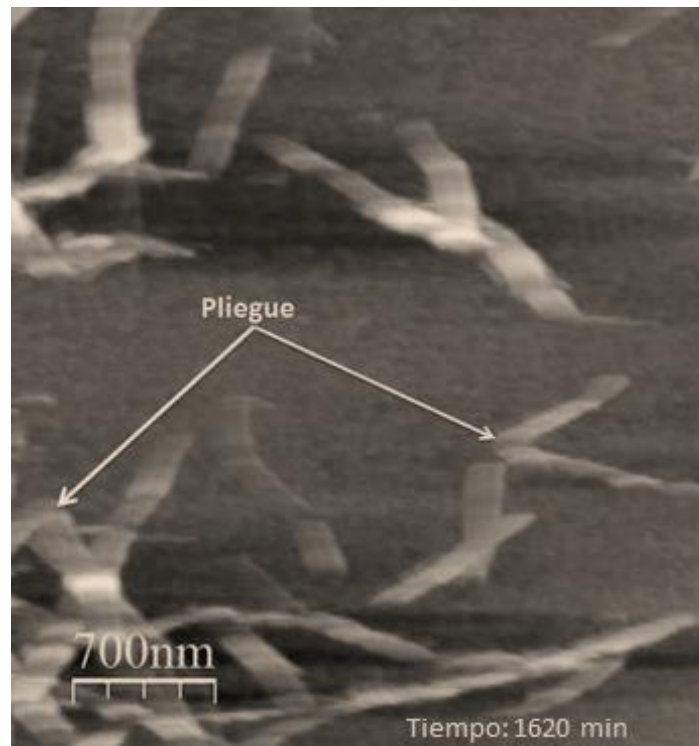


Figura 27. Formación de fibras maduras a los 720 minutos.

a)



b)

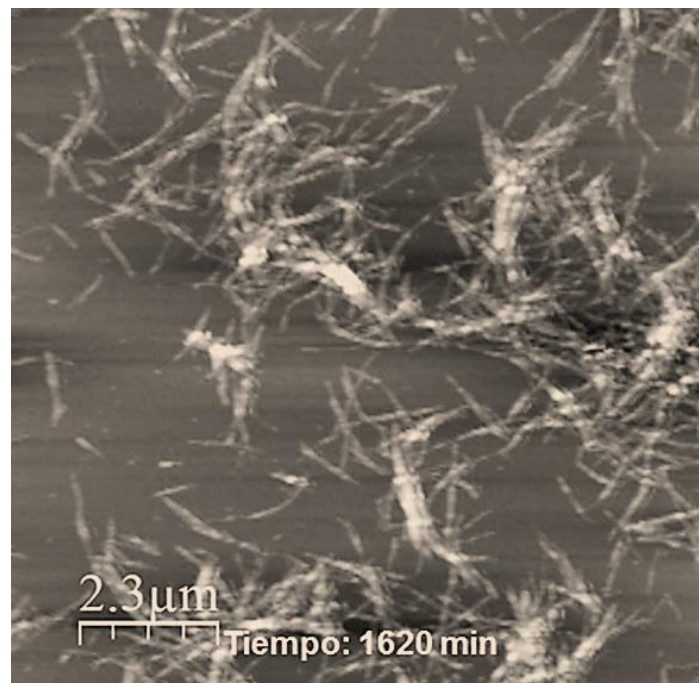


Figura 28. Imagen a) y b) muestran fibras maduras a los 1620 minutos de incubación.

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

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

El proceso de agregación y la transición de la composición de estructura secundaria de hélices- α a hoja- β fueron monitoreados por la técnica de FT-IR. Tras la obtención de datos y al realizar en análisis de desconvoluciones, se obtuvieron los porcentajes de estructuras secundarias que se muestran en la tabla II.

Tabla II. Transición de la composición de estructuras secundaria de LHr monitoreada por IR y aplicando análisis de desconvolución.

Tiempo de Incubación (min)	Hélice- α	Hoja- β	Azar	Potencial Z (mV)
0	32.05%	8.78%		18.3
30	38.94%	28,86%		20.43
120	17.53%	39,13%	43,34%	29.16
600		77,31%	22.69%	26.03
720		76.9%	23.10%	27.13
1440		78.17%	21.83%	26.76

La tabla II, representa los porcentajes de la composición de LHr con forme se sigue la formación de fibras. Los porcentajes obtenidos a tiempo 0 es de 32.05% de estructuras hélices- α y 8.78% de hojas- β . Puede apreciarse la transición de estructuras conforme aumenta el tiempo de incubación. A partir de los 600 minutos de incubación, se puede apreciar que ocurre una transición estructuras correspondientes a hojas- β y otras ordenadas al azar. Por otro lado, en la tabla III se muestran los porcentajes asignados en la literatura para la proteína nativa de lisozima mediante la técnica de rayos x y FT-IR.

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

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

VII. 4. Determinación de Potencial zeta

Como se ha mencionado con anterioridad, el potencial zeta es una función de la superficie cargada de una partícula, cualquier capa adsorbida en la interfase, la naturaleza y la composición del medio en el que la partícula está suspendida. La carga primaria puede provenir de grupos cargados con partículas superficiales o puede ser ganada por adsorción de una capa de iones provenientes del medio circundante por reemplazo isomórfico. Cuando dos partículas coloidales, como las proteínas, se acercan una a la otra actúan dos fuerzas: la electrostática de repulsión (o de Coulomb) que tiende a separar las partículas y las fuerzas atractivas de Van Der Waals. Cada aminoácido de determinada proteína tiene unos grupos ionizables con unas constantes de ionización (pKa) características, el valor de dichas constantes puede verse ligeramente modificado por el entorno proteico.

Las moléculas complejas, tales como las proteínas, se combinan con los iones hidrógeno y con otros iones presentes en la disolución, dando lugar a la carga neta de la molécula. A la concentración de iones hidrógeno, o al pH, para el cual la concentración del ion híbrido de una proteína es máxima y el movimiento neto de las moléculas de soluto en un campo eléctrico es prácticamente nulo, se le denomina punto isoelectrico. A pHs menores que el punto isoelectrico de una proteína dada, los grupos ionizables están protonados, y la carga neta de la proteína es de signo positivo. Cuando el pH es alto respecto a su punto isoelectrico, los grupos ionizables están desprotonados, y la carga neta es de signo negativo. El punto isoelectrico de la proteína lisozima es de 11 pero al encontrarse en un medio por debajo de este, pH 2, podemos inferir que la carga neta de la Lhr es positiva y corroborar esto con los valores obtenidos en las medidas de potencial zeta. La carga de los estadios correspondientes a los ensayos de viabilidad celular a los

tiempos de incubación de 0, 30 120,300, 600, 720, 1440 y 3000 minutos fueron de 18.3 mV, 20.43, mV, 29.16, 26.66 mV, 26.03 mV, 27.13 mV, 26.76 mV y 26.53 mV respectivamente, como se muestran en la tabla II.

VII. 5. Viabilidad Celular

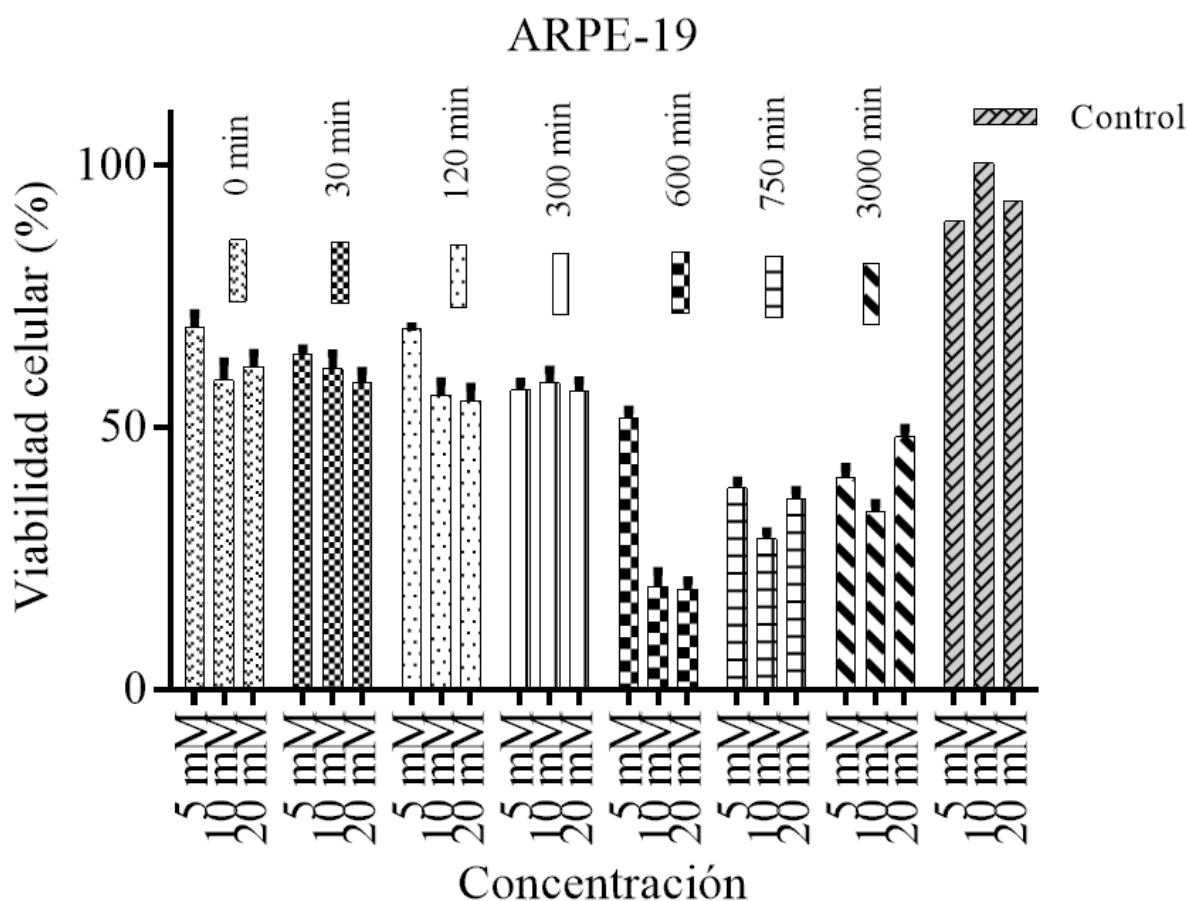


Figura 29. Viabilidad celular de tratamiento en células ARPE-19.

Los ensayos de viabilidad en la línea celular Arpe-19 mediante el tratamiento con MTT de diferentes estadios de oligómeros, protofibras y fibras de amiloide sugieren, en primer lugar, que los agregados iniciales de proteína Lisozima disuelta en el medio de solución de sales a pH 2 afectó la viabilidad celular, obteniéndose valores del 72.43 ± 3.08 % en la concentración más baja, 51.04 ± 1.92 % a concentración de 10mM y 59.93 ± 1.88 % a 20 mM como se puede apreciar en la tabla IV. Los mayores efectos de toxicidad pueden

apreciarse a partir de los 600 minutos de incubación, en los que la viabilidad disminuye a 53.46 ± 2.35 % a 5mM, 20.52 ± 3.23 % a 10mM y 24.76 ± 2.84 % a 20 mM. Esta tendencia podría indicar que la toxicidad está relacionada en mayor medida con la formación de las fibras al término de la fase de nucleación.

Tabla IV. Valores de análisis estadístico ANOVA presentados como la media \pm errores estándares de la media (SEM) obtenidos mediante el Test de Comparación Múltiple de Newman-Keuls de los tratamientos a los diferentes tiempos de incubación de proteína a 5mM, 10mM y 20mM.

	0 min	30 min	120 min	300 min	600 min	720 min	3000 min
5 mM	72.43 ± 3.08 %	64.58 ± 3.41 %	75.46 ± 3.40 %	59.58 ± 2.42 %	53.46 ± 2.35 %	44.42 ± 3.33 %	44.49 ± 2.24 %
10 mM	51.04 ± 1.92	52.09 ± 4.37 %	57.87 ± 4.38 %	57.79 ± 1.81 %	20.52 ± 3.23 %	28.41 ± 1.02 %	38.23 ± 2.24
20 mM	59.93 ± 1.88	47.80 ± 4.26 %	54.50 ± 1.92 %	56.15 ± 1.73 %	24.76 ± 2.84 %	37.27 ± 1.35 %	45.14 ± 3.46 %

VIII. DISCUSIÓN

Mediante la realización de este trabajo se determinó que el proceso de fibrilación de la Lisozima Humana recombinante (LHr) muestra el mecanismo clásico de nucleación, mismo que se caracteriza por la presencia de una fase de latencia o de retardo, una fase de elongación o crecimiento y por último una fase de estabilización, la cual se interpreta como el proceso final de la fibrilación. Estos resultados son corroborados por las técnicas de dispersión dinámica de luz (DLS) y de fluorescencia de ThT, los cuales muestran una curva sigmoideal típica. En contraste, los datos de las mediciones de presión de superficie ponen en evidencia un comportamiento dependiente del tiempo, en el que aparentemente la agregación de LHr tiende a ser más hidrófoba cuando aumenta el tiempo de incubación, resultado de la evolución conformacional de la proteína durante todo el proceso de fibrilación. La observación mediante microscopía de AFM reveló la interacción de oligómeros de diversos tamaños y conformación estructural de LHr en los primeros periodos; Seguidos de estructuras filamentosas similares a las ya reportadas en la literatura como protofibras y fibras maduras. Asimismo los datos obtenidos mediante FTIR confirmaron las alteraciones conformacionales y cambios de arquitectura de la LHr hacia una composición mayoritaria de estructura secundaria β , sin rastro aparente de estructuras de hélice- α a partir de periodos más o menos tempranos de incubación. Los cambios conformacionales observados predisponen a la LHr a la agregación. La actividad y aumento de la hidrofobicidad fue confirmada mediante las medidas de tensión superficial. Por último, tras los ensayos de viabilidad de células ARPE-19, se sugiere que la estructura y el carácter hidrófobo de los diferentes agregados prefibrilares de la LHr pueden estar relacionados directamente con el efecto citotóxico.

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

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

dificultando la adsorción, a una interfase es la hidrofobicidad y las interacciones electrostáticas, respectivamente. Este comportamiento y la hidrofobicidad medida en los tiempos de incubación donde disminuyó drásticamente la viabilidad de la línea celular Arpe-19 sugiere que los agregados hidrofóbicos se insertan en la membrana celular, interfiriendo así con la permeabilidad de esta, como sugieren Chaudhary et al., (2009) y Gharibyan et al., (2007).

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

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

En cuanto a la relación observada entre la carga de lisozima y la interacción con la membrana, se pueden mencionar un par de casos muy interesantes, por ejemplo, mediante un estudio de interacción entre liposomas y lisozima de clara de huevo, se encontró que las fibras de amiloide de la lisozima eran capaces de perturbar la carga negativa de los liposomas conformados por DOPG/DOPC con calceína dentro (Hirano et al. 2012). En este estudio la fuga de calceína, después de mezclar los liposoma con las fibras de amiloide, aumentó conforme aumentaba el tiempo de incubación. La disrupción de los liposomas fue atribuida a la atracción electrostática entre las fibras de la lisozima y los liposomas pues la fuga de la caceína hacia el medio disminuyó conforme el pH se reducía cerca del punto isoeléctrico de la lisozima, donde la carga de esta es cero. Además, este resultado indicó que las moléculas de lisozima monoméricas no interrumpieron la conformación de los liposomas, mientras que las fibras de amiloide sí, lo que implica la importancia de la morfología agregada de lisozima en la interrupción.

Por otro lado, en otro estudio realizado por el mismo autor, se encontró que nanotubos de carbono con lisozima tuvieron efectos perjudiciales en las membranas lipídicas, y esto fue atribuido a la presencia de la proteína cargada positivamente en los nanotubos de carbono.

Además destacan que el efecto perjudicial fue similar a los de las fibras de amiloide asociando el fenómeno, nuevamente, con la fibrilación (Hirano et al., 2010).

A la hora de interpretar los resultados de citotoxicidad, en este estudio, es necesario tener en cuenta que el mismo medio ácido (pH 2) en el que se realizó la fibrilación de LHr, también tuvo un efecto perjudicial, repercutiendo en disminución de la viabilidad celular desde los primeros estadios a los que no se les atribuye la presencia de estructuras oligoméricas, prefibrilares o de fibras de amiloides. Es decir, el medio ácido ocasiona una desnaturalización parcial en lisozima y esta afecta en mayor o menor grado a las células. Sin embargo, la disminución de la viabilidad en los estadios monoméricos de lisozima comparados a la viabilidad de los estadios prefibrilares y fibrilares, es considerablemente mayor en estos últimos. Por lo que podemos decir que la morfología de los agregados de la LHr y su actividad citotóxica están muy relacionadas en la interrupción de viabilidad.

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

Novitskaya et al., (2006) reportaron por primera vez que tanto las especies oligoméricas solubles y las fibras maduras de amiloides, producidos a partir de la proteína prión, indujeron muerte celular hasta del 90 y 80% de la población de células neuronales. Ellos probaron el efecto de tres estadios conformacionales (monómeros de hélice- α , β -oligómeros y fibras maduras) de proteínas priones de mamíferos (rPrP) en células cultivadas y neuronas primarias, reportando además que la muerte celular se producía a través de un mecanismo apoptótico. Una explicación es que estas especies eran capaces de inducir un aumento en la conductancia y permeabilidad de la membrana, seguido por una rápida elevación intracelular de Ca^{2+} , la cual era capaz de reducir el potencial de membrana y la síntesis de ATP por acumulación de este ion en la mitocondria; Ocasionando la apoptosis o necrosis celular.

IX. CONCLUSIONES

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

Mediante medidas de tensión superficial, fue posible obtener valores cuantitativos sobre la hidrofobicidad y comportamiento superficial durante la cinética de fibrilación de LHR.

Mediante medidas de potencial z se obtuvieron datos cuantitativos sobre la carga de la LHR durante la formación de fibras de amiloides que posibilitan corroborar algunas hipótesis en cuanto al papel de las cargas en la citotoxicidad.

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

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

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

Como perspectivas futuras se sugiere el estudio acerca de los efectos del crecimiento de las fibras de amiloide en la interacción con modelos de membrana, como la adsorción e interrupción de la misma.

X. LITERATURA CITADA

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

- Caughey, B., y Lansbury, P. T. 2003. Annual Review of Neuroscience 26: 267–298.
- Clarke, A.R. Cytosolic Chaperonins: A Question of Promiscuity. 2006. Molecular Cell 24:165-167.
- Chanez-Cárdenas, M.E., Cisneros-Armas, D., Del Pozo-Yauner, L., Becerril, B., y Fernandez-Velasco. 2002. Enfermedades Relacionadas al Plegamiento Anómalo de las Proteínas. En: Cea Bonilla A, del Arenal Mena IP, Riveros Rosas H, Vázquez Contreras E (eds). Mensaje Bioquímico 26: 73-97.
- Chaudhary, N. y Nagaraj, R. 2009. Hen lysozyme amyloid fibrils induce aggregation of erythrocytes and lipid vesicles. Molecular and Cellular Biochemistry 328: 209–215.
- Chow, M.K.M., Lomas, D.A., y Bottomley, S.P. 2004. Promiscuous Beta-Strand Interactions and the Conformational Diseases. Current Medicinal Chemistry 11(4):491-499.
- Chiti, F., Taddei, N., Bucciantini, M., White, P., Ramponi, G., y Dobson, C. M. 2000. Mutational Analysis of the Propensity for Amyloid Formation by a Globular Protein. EMBO Journal 19:1441–1449.
- Chiti, F., Webster, P., Taddei, N., Clark, A., Stefani, M., Ramoni, G., y Dobson, C. 1999. Designing Conditions for In Vitro Formation of Amyloid Protofilaments and Fibrils. Proceedings of the National Academy of Sciences 90:3590–3594.
- Chu, B. 1991. Laser Light Scattering. 2nd Edition, Academic Press, Boston. Estados Unidos de América
- Conway, K. A., Lee, S. J., Rochet, J. C., Ding, T., Williamson, R., y Lansbury, P. 2000. Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both α -synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: Implications for pathogenesis and therapy. Proceedings of the National Academy of Sciences 97:571–576.
- Creighton, T.E. 1993. Proteins: Structure and Molecular Properties. 2nd Ed., W. H. Freeman y Co. Estados Unidos de América.
- De Felice, F. G., Vieira, M. N. N., Meirelles, M. N. L., Morozova-Roche L. A., Dobson C. M., y Ferreira S. T. 2004. Formation of Amyloid Aggregates From Human Lysozyme and Disease-Associated Variants Using Hydrostatic Pressure. The FASEB Journal 18:10 1099-110.
- Dobson, C. 1999. Protein Misfolding, Evolution and Disease. Trends in Biochemical Sciences 24:329-332.

- Dobson, C. 2001. The Structural Basis of Protein Folding and its Links with Human Disease. *Philosophical Transactions of the Royal Society Biological Sciences* 356:133-145.
- Dobson, C. 2003. Protein Folding and Misfolding. *Nature* 426:884–890.
- Dobson, C. 2004. Navigating the Pathway from Embryonic Stem Cells to Beta Cells. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 15:3-16.
- Esser, C., y Alberti, S., Höhfeld, J. 2004. Cooperation of Molecular Chaperones with the Ubiquitin/proteasome System. *Biochim Biophys Acta* 1695(1-3):171-88.
- Fentem J.H. 1994. The Use of Human Tissues in In Vitro Toxicology, Summary of General Discussions. *Human Experimental Toxicology* 13(2):445-449.
- Fersht A. 1999. Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding. Freeman, New York. Estados Unidos de América.
- Gerum, C., Schlepckow, K., y Schwalbe, H.2010. The Unfolded State of the Murine Prion Protein and Properties of Single-point Mutants Related to Human Prion Diseases. *Journal of Molecular Biology* 401:7–12.
- Gharibyan, A.L., Zamotin, V., Yanamandra, K., Moskaleva, O.S., Margulis, B.A., Kostanyan, I.A., y Morozova-Roche, L. 2007. Lysozyme amyloid oligomers and fibrils induce cellular death via different apoptotic/necrotic pathways. *Journal of Molecular Biology* 365:1337–1349.
- Glabe, C., 2006. Common Mechanisms of Amyloid Oligomer Pathogenesis in Degenerative Disease. *Neurobiology of Aging* 27:570–575.
- Gong, Y., Chang, L., Viola, K. L., Lacor, N., Lambert, M., Finch, C., Krafft, G., y Klein, W. 2003. Alzheimer's disease-affected brain: Presence of oligomeric A β ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (18): 10417–10422.
- Goormaghtigh, E., Cabiliaux, V. y Ruyschaert, J. 1994. Determination of soluble and membrane protein structure By Fourier transform infrared spectroscopy. III. Secondary structures. *Subcellular Biochemistry* 23: 405-450.
- Górzny, M., Walton, A., y Evans, S.2010.Synthesis of High-Surface-Area Platinum Nanotubes Using a Viral Template. *Advanced Functional Materials*. 20: 1295–1300.
- Haataja, L., Gurlo, T., Huang, C., y Butler, P. 2008. Islet Amyloid in Type 2 diabetes, and the Toxic Oligomer Hypothesis. *Endocrine Reviews* 29 (3): 303–16.

- Harrison, R. F., Hawkins, P. N., Roche, W. R., MacMahon, R. F., Hubscher, S. G., y Buckels, J. A. 1996. Fragile liver and massive hepatic haemorrhage due to hereditary amyloidosis. *Journal in Gastroenterology* 38: 151–152.
- Hartl, F. y Hayert-Hartl, M. 2002. Molecular Chaperones in the Cytosol: from Nascent Chain to Folded Protein. *Science* 295: 1852-1858.
- Hartley, D., Walsh, D., Ye, C., Diehl, T., Vasquez, S., Vassilev, P., Teplow, D., y Selkoe, D. 1999. Protofibrillar Intermediates of Amyloid-B-Protein Induce Acute Electrophysiological Changes and Progressive Neurotoxicity in Cortical Neurons. *The Journal of Neuroscience* 19: 8876–8884.
- Hirano, A.; Uda, K.; Maeda, Y.; Akasaka, T. y Shiraki, K. 2010. Onedimensional protein-based nanoparticles induce lipid bilayer disruption: carbon nanotube conjugates and amyloid fibrils. *Langmuir* 26: 17256–17259.
- Hirano, A., Yoshikawa, H., Matsushita, S., Yamada, Y. y Shiraki, K. 2012. Adsorption and Disruption of Lipid Bilayers by Nanoscale Protein Aggregates. *Langmuir* 28: 3887-3895.
- Huang, B., He, J., Ren, J., Yan, X., y Zeng, C. 2009. Cellular membrane disruption by amyloid fibrils involved intermolecular disulfide cross-linking. *Biochemistry* 48: 5794–5800.
- Jahn, T. y Radford, S. 2005. The Yin and Yang of protein folding. *Federation of European Biochemical Societies* 272: 5962-5970.
- Jarrett, J., Berger, E., y Lansbury, P. 1993. The Carboxy Terminus of the Beta Amyloid Protein is Critical for the Seeding of Amyloid Formation: Implications for the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Biochemistry* 32: 4693-4697.
- Kastornaa, A., Trusovaa, V., Gorbenkoa, G., y Kinnunenb, P. 2012. Membrane Effects of Lysozyme Amyloid Fibrils. *Chemistry and Physics of Lipids. Chemistry and Physics of Lipids* 165: 331–33.
- Kayed, R., Head, E., Thompson, J., McIntire, M., Milton, C., Cotman, C., y Glabe, C. 2003. Common Structure of Soluble Amyloid Oligomers Implies Common Mechanism of Pathogenesis. *Science* 300:486–489.
- Kayed, R., Sokolov, Y., Edmonds, B., McIntire, T.M., Milton, S.C., Hall, J.E., y Glabe, C. G. 2004. Permeabilization of Lipid Bilayers is a Common Conformation-Dependent Activity of Soluble Amyloid Oligomers in Protein Misfolding Diseases. *Journal of Biological Chemistry* 279(45):46363-6.

- Kerr, J., Wyllie, A. y Currie, A. 1972. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. *British Journal of Cancer* 26: 239-257.
- Kirkitadze, M. D., Bitan, G., y Teplow, D. B. 2002. *Journal of Neuroscience Research* 69:567–577.
- Koradi R., Billeter M., y Wuthrich K.1996. MOLMOL: programa para la visualización y el análisis de estructuras macromoleculares. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 14:51–55.
- Kumosinski, T., y Unrush, J. 1996. Quantitation of the global secondary structure of globular proteins by FTIR spectroscopy; comparison with X-ray crystallographic structure. *Talanta* 43: 199-219.
- Lashuel, H. y Butterfield. S. 2010. Amyloidogenic Protein–Membrane Interactions: Mechanistic Insight from Model Systems. *Angewandte Chemie International Edition* 49(33):5628-54.
- Lashuel, H., y Lansbury, P. 2006. Are Amyloid Diseases Caused by Protein Aggregates that Mimic Bacterial Pore-forming Toxins? *Q. Review of Biophysics* 39 (2): 167.
- Lee, D., Haris, P. Chapman D. y Mitchell, R. C.1990. Determination of protein secondary structure using factor analysis of infrared spectra. *Biochemistry* 29: 9185-9193
- Lee, K., Lee, S., Kim, H., Song, J., Yang, S., Paik, S., y Han, P. 2004. Progressive Cognitive Impairment and Anxiety Induction in the Absence of Plaque Deposition in C57Bl/6 Inbred Mice Expressing Transgenic Amyloid Precursor Protein. *Journal of Neuroscience Research* 76: 572–580.
- Lee, S., y Tsai F.T.F. 2005. Molecular Chaperones in Protein Quality Control. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 38: 259-265.
- Lesné, S., Koh, M., Kotilinek, L., Kaye, R., Glabe, C., Yang, A., Gallagher, M., y Ashe, K. 2006. A Specific Amyloid-beta Protein Assembly in the Brain Impairs Memory. *Nature* 440:352–357.
- Lin, H., Bhatia, R., y Lal, R. 2001. Amyloid Beta Protein Forms Ion Channels: Implications for Alzheimer's Disease Pathophysiology. *The Journal of Federation of American Societies for Experimental Biology* 15(13):2433-44.
- Lin, M., Chiu, H., Fan, F., Tsai, H., Wang, S., Chan, Y., y Chen, W. 2007. Kinetics and Enthalpy Measurements of Interaction Between Beta-amyloid and Liposomes by Surface Plasmon Resonance and Isothermal Titration Microcalorimetry. *Colloids and Surfaces Biointerfaces* 58 (2): 231–236.

- Makin S., Sikorski P. y Serpell C. 2006. Diffraction to study protein and peptide assemblies. *Current Opinion in Chemical Biology* 10 (5): 417-422.
- Malisauskas M., Johan O., Darinskas A., Zamotin V., Liutkevicius E., Lundgren E., y Morozova-Roche A. 2005. Does the Cytotoxic Effect of Transient Amyloid Oligomers from Common Equine Lysozyme in Vitro Imply Innate Amyloid Toxicity? *The Journal of Biological Chemistry* 280 (8): 6269-6275.
- Matagne A. y Dobson C. 1998. The Folding Process of Hen Lysozyme: A Perspective From the 'New View'. *Cellular and Molecular Life Sciences* 54 (4): 363–371.
- Möbius, D. y Millar, R. 1998. Proteins at liquid Interfaces, *ELSERVIER* 303-339.
- Mossuto, M., Dhulesia, A., Devlin, G., Frare, E., Kumita, J. R., de Laureto, P., Dumoulin, M., Fontana, A., Dobson, C., y Salvatella, X. 2010. The Non-Core Regions of Human Lysozyme Amyloid Fibrils Influence Cytotoxicity. *Journal of Molecular Biology* 402: 783–796.
- Neet, K. E., y Timm D. E. 1994. Conformational Stability of Dimeric Proteins: Quantitative Studies by Equilibrium Denaturation. *Protein Science* 3: 2167-2174.
- Nelson, D., y Cox, M. 2000. *Lehninger Principles of Biochemistry*, Worth Publisher, Nueva York. Estados Unidos de América.
- Nielsen L, Khurana R, Coats A, Frokjaer S, Brange J, Vyas S, Uversky VN, Fink A. 2001. Effect of environmental factors on the kinetics of insulin fibril formation: elucidation of the molecular mechanism. *Biochemistry* 40:6036-6046.
- Nilsson, M. R. 2004. Techniques to Study Amyloid Fibril Formation In Vitro. *Methods* 34: 151–160.
- Novitskaya, V., Bocharova, O., Bronstein, I., y Baskakov, I., 2006. Amyloid Fibrils of Mammalian Prion Protein are Highly Toxic to Cultured Cells and Primary Neurons. *Journal of Biological Chemistry* 281: 13828–13836.
- Oliveberg, M., y Wolynes, P. 2005. The Experimental Survey of Protein-folding Energy Landscapes. *Quarterly Reviews of Biophysics* 38: 245-288.
- Ostrov, N., y Gazit, E. 2010 Genetic Engineering of Biomolecular Scaffolds for the Fabrication of Organic and Metallic Nanowires. *Angewandte Chemie International Edition* 49: 3018–3021
- Pandit, A., Jha, A., Freed, K., y Sosnick, T. 2006. Small Proteins Fold Through Transition States with Native-like Topologies. *Journal of Molecular Biology* 361: 755-770.

- Pasternack R., Gibbs E., Sibley S., Woodard L., Hutchinson P., Genereux J., y Kristian K., 2006. Formation kinetics of insulin-based amyloid gels and the effect of added metalloporphyrins. *Biophys Journal* 90:1033-1042.
- Pauling, L., Corey, R.B., y Branson, H.R. 1951. Atomic Coordinates and Structure Factors for Two Helical Configurations of Polypeptide Chains. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 37 (4): 205-211.
- Pepys, M., Hawkins, P., Booth, D., Vigushin, D., Tennent, G., Soutar, A., Totty, N., Nguyen, O., Blake, C., Terry, C., Feest, G., Zalin, A., y Hsuan J.1993. Human Lysozyme Gene Mutations Cause Hereditary Systemic Amyloidosis. *Nature* 362: 553–557.
- Pollard, H. B., Arispe, N., y Rojas, E. 1995. Ion Channel Hypothesis for Alzheimer Amyloid Peptide Neurotoxicity. *Cellular and Molecular Neurobiology*15: 513-26.
- Pountney, D., Voelcker, N., y Gai, W. 2005. Annular Alpha-Synuclein Oligomers are Potentially Toxic Agents in Alpha-Synucleinopathy. *Neurotoxicity Research* 7:59-67.
- Richardson, J.S., y Richardson D. 2002. Natural β -sheet Proteins Use Negative Design to Avoid Edge-to-Edge Aggregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99 (5): 2754-2759.
- Sato T., Kwon C., Miyake H., Taniguchi T. y Maeda E. 2001. *Plant Production Science* 4:145-150.
- Shayne G.1999. Alternatives to in vivo studies in toxicology.178-182,p. En: Balantyne B, Marrs T, Syversen T. *General and applied toxicology*. Estados Unidos de América.
- Slocik, J., Kim, S., Whitehead, T., Clark, D., y Naik, R., Biotemplated Metal Nanowires Using Hyperthermophilic Protein Filaments. *Small* 2009, 5: 2038–2042.
- Sokolov, Y., Kozak, J., Kaye, R., Chanturiya, A., Glabe, C., Hall, J., Gen, J., Chanturiya, A., Glabe, C., y Hall, J., 2006. Soluble Amyloid Oligomers Increase Bilayer Conductance by Altering Dielectric Structure. *Physiology* 128 (6): 637–647.
- Sousa, M. M., Cardoso, I., Fernandes, R., Guimaraes, A., y Saraiva, M. J. 2001. *American Journal of Pathology* 159: 1993–2000.
- Stefani, M., y Dobson, C. 2003. Protein Aggregation and Aggregate Toxicity: New Insights into Protein Folding, Misfolding Diseases and Biological Evolution. *Journal of Molecular Medicine* 81 (11): 678–699.
- Stefani, M., 2004. Protein misfolding and aggregation: New Examples in Medicine and Biology of the dark side of the protein world. *Biochimica et Biophysica Acta* 1739 (1): 5–25.

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