



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**“Efecto del ión Cu(II) y de péptidos no naturales en la  
agregación del fragmento 106-126 de la proteína prion  
humana”**

**T E S I S**

Que presenta

**Q.F.B. LUIS ALBERTO VALLEJO CASTILLO**

Para obtener el grado de  
**MAESTRO EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD  
DE FARMACOLOGÍA**

Directores de la Tesis:

**DR. GILBERTO CASTAÑEDA HERNÁNDEZ**

**DRA. LILIANA QUINTANAR VERA**

México, D.F.

Diciembre, 2014



# AGRADECIMIENTOS

**A mis papás Ma. Elena y Alberto, así como a mis hermanos Saúl y Mario.** Tienen toda mi admiración y mi gratitud por apoyarme incondicionalmente, por ser mis guías, mis compañeros de juegos y por darme todo el amor del mundo.

**A la Q.F.I. Anel Guadalupe Sánchez Portillo.** Gracias por estar siempre a mi lado, por ser mi inspiración, por darle sentido a mis risas y color a mi vida.

**A la Dra. Liliana Quintanar.** Muchas gracias por todo su apoyo y por permitirme ser parte de su grupo de trabajo donde aprendí muchas cosas buenas de usted, como por ejemplo tener siempre una pregunta para todo lo que observo.

**A todas las personas que forman parte del laboratorio 3 del Departamento de Química,** todos ellos buenas personas, excelentes maestros y aún mejores amigos. Especialmente le agradezco a Maripaz, Selena, Antonio y Carolina por brindarme invaluable consejos y compartir conmigo su amplia experiencia para poder llevar este proyecto a buen puerto.

**A la Biol. Lourdes Rojas,** por su amistad, tenacidad e inmensurable apoyo en las observaciones de Microscopía Electrónica de Trasmisión.

**Al Dr. Gilberto Castañeda.** Muchas gracias por su apoyo y por todos sus consejos que me han ayudado a tener bajo control mis perspectivas profesionales y el presente proyecto.

**A Lulú y Rodrigo** del grupo de trabajo del Dr. Gilberto, les agradezco sus provechosas sugerencias que me han ayudado a mejorar la forma en que expreso mis ideas, parte fundamental del quehacer de un científico.



**A mis sinodales: la Dra. Liliana Favari, la Dra. Claudia Pérez y el Dr. Carlos Cerda.** Muchas gracias por su preciado tiempo, sus útiles consejos y su estimable interés para conmigo y mi proyecto. Sin duda, han enriquecido mucho este trabajo.

**A mis amigos y compañeros de generación.** Gracias por todos esos buenos momentos que pasamos en el comedor, en las canchas, en las clases y en la biblioteca. Estos dos años que he convivido con ustedes he aprendido a apreciarlos mucho. Los voy a extrañar a todos.

No podía faltar darle gracias a ese poder supremo que estás más allá de nuestra comprensión. Muchas gracias por hacer que todos los engranes del universo giren al son del tiempo. Gracias por darme el pasado que he vivido, el presente que vivo y el futuro que viviré.

Le agradezco al **CONACyT** por la beca otorgada durante mis estudios de maestría y por los proyectos 128255 y 221134 que financian este proyecto. También le doy gracias a la unidad **LaNSE** del **Cinvestav** en cuyas instalaciones se realizaron las observaciones microscópicas de este proyecto.

Finalmente le agradezco al **Cinvestav Unidad Zacatenco**, y especialmente a los **departamentos de Química y Farmacología** por haberme recibido con los brazos abiertos y convertirse en mi segundo hogar durante los últimos dos años. Muchas gracias por dejar su esencia en mí ser y moldear mi espíritu.



# RESUMEN.

Las enfermedades priónicas son un grupo de enfermedades neurodegenerativas fatales e infecciosas. El agente causal es una glicoproteína extracelular conocida como la proteína prion (PrP), y puede presentarse en dos isoformas: la *celular* (PrP<sup>C</sup>) y la *Scrapie* (PrP<sup>Sc</sup>). El evento clave de estas patologías es la conversión de la isoforma PrP<sup>C</sup> a la isoforma infecciosa PrP<sup>Sc</sup>, la cual tiende a agregarse y formar fibras amiloides. Entre los factores que pueden inducir este proceso está el pH, estrés oxidativo, iones metálicos y la fuerza iónica, entre otros.

Por otro lado, los iones metálicos pueden jugar un papel importante en la modulación de la agregación de proteínas. Un ión que ha tomado mucha importancia en el caso de la PrP<sup>C</sup> es el ión Cu(II), ya que esta proteína puede coordinar iones Cu(II) con alta afinidad. Además, se ha reportado que existen alteraciones en los niveles de cobre en el tejido cerebral infectado por priones y que cambios en los niveles fisiológicos de este metal han mostrado modificar el tiempo de incubación de enfermedades priónicas experimentales. Sin embargo, existe una controversia del efecto del ión Cu(II) sobre la agregación amiloide de la PrP, pues no está claro si la promueve o la inhibe. Es por ello que el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del ión Cu(II) sobre la agregación amiloide de la PrP, empleando como modelo el fragmento 106-126 de la proteína prion humana (PrP(106-126)) y un tetrapéptido no natural y bifuncional con secuencia Met-Asp-DTrp-Aib, conocido como TP, el cual es capaz de modular la agregación amiloide y coordinar iones Cu(II).

Empleando ensayos de fluorescencia con tioflavina T y Microscopía Electrónica de Transmisión, se demostró que el ión Cu(II) tiene la capacidad de inhibir drásticamente la agregación amiloide del PrP(106-126) y modificar la morfología de sus agregados fibrilares. El uso de la molécula bifuncional TP permitió confirmar este resultado al mostrar un efecto de “recuperación” en la agregación amiloide del PrP(106-126) en presencia de Cu(II), observable tanto en la cinética de agregación del PrP(106-126) como en la morfología fibrilar.

El presente trabajo es una evidencia más para cimentar la importancia del ión Cu(II) como un agente modulador en la agregación amiloide de la PrP y como un posible blanco terapéutico para el desarrollo de terapias farmacológicas contra las enfermedades priónicas, donde el papel de las moléculas bifuncionales como el TP puede ser crucial.



## ABSTRACT.

Prion diseases are a group of fatal neurodegenerative and infectious diseases. The causative agent is an extracellular glycoprotein known as the prion protein (PrP), which can occur in two isoforms: *Cellular* (PrP<sup>C</sup>) and *Scrapie* (PrP<sup>Sc</sup>). The key event is the conversion of the isoform PrP<sup>C</sup> into the infectious PrP<sup>Sc</sup> isoform, which, being insoluble, tends to aggregate and form amyloid fibers. There are some factors that can induce this phenomenon, e.g., pH, oxidative stress, ionic strength and metal ions.

On the other hand, metal ions may take part in modulating protein aggregation. In the case of the PrP<sup>C</sup>, Cu(II) has gained relevance as this protein can coordinate Cu (II) with high affinity. Moreover, disturbances in copper levels have been reported in prion infected brain tissue and changes in physiological levels of copper have been shown to modify the incubation time of experimental prion diseases. However, there is controversy in the effect of ion Cu (II) on amyloid aggregation of PrP; it is not clear whether Cu(II) promotes or inhibits this process. The aim of this study was to evaluate the effect of Cu (II) on amyloid aggregation of PrP by using fragment 106-126 of the human prion protein (PrP (106-126)) as a model. A bifunctional non-natural peptide with sequence Met-Asp-DTrp-Aib, known as TP, that is able to modulate amyloid aggregation and coordinate Cu (II), was also used to confirm Cu(II) effect.

Using ThT fluorescence assays and transmission electron microscopy, we determined that Cu (II) has the ability to dramatically inhibit amyloid aggregation of PrP (106-126) and induce morphological changes in PrP aggregates. This effect was confirmed by TP, which displayed an effect of "recovery" of PrP (106-126) amyloid aggregation in the presence of Cu (II), observable both in aggregation kinetics of PrP (106- 126) and fibril morphology .

This study provides further evidence for the important role of Cu (II) as a modulator in PrP amyloid aggregation, and as a potential therapeutic target for the development of drug therapies against prion diseases, where the role of bifunctional molecules such as TP may be crucial.



# CONTENIDO.

<b>Índice de figuras</b>	5
<b>Índice de tablas</b>	6
<b>Capítulo I. Antecedentes.</b>	7
1.1 Enfermedades neurodegenerativas amiloidogénicas.	7
1.2 Encefalopatías Espongiformes Transmisibles.	9
1.3 La Proteína Prion (PrP).	13
1.4 Agregación amiloide.	18
1.5 Técnicas para el estudio de la agregación amiloide.	21
1.5.1 Ensayos de fluorescencia con tioflavina T.	21
1.5.2 Microscopía Electrónica de Transmisión.	23
1.5.3 Dicroísmo Circular Electrónico.	25
1.6 El cobre, la proteína prion y las enfermedades priónicas.	27
1.7 El fragmento 106-126 de la proteína prion humana.	30
1.8 Moléculas bifuncionales moduladoras de la agregación amiloide.	32
1.9 Planteamiento del problema.	36
1.10 Justificación.	37
1.11 Hipótesis.	37
<b>Capítulo II. Objetivos.</b>	38
<b>Capítulo III. Materiales y métodos.</b>	39
3.1 Obtención de péptidos.	40
3.1.1 Síntesis.	40
3.1.2 Purificación.	42
3.1.3 Liofilización.	43
3.1.4 Caracterización.	43



3.1.5 Preparación de soluciones stock de los péptidos.	43
3.2 Ensayos de agregación y espectros de fluorescencia.	44
3.3 Microscopía electrónica de transmisión.	46
<b>Capítulo IV. Resultados.</b>	47
4.1 Obtención de péptidos.	47
4.1.1 Caracterización.	48
4.1.2 Preparación de soluciones stock de los péptidos.	52
4.2 Ensayos de agregación.	53
4.3 Efecto de apagamiento de la fluorescencia.	55
4.4 Efecto del DP, TP y Cu(II) en la morfología fibrilar del PrP(106-126).	57
<b>Capítulo V. Discusión.</b>	59
<b>Capítulo VI. Conclusiones.</b>	66
<b>Capítulo VII. Perspectivas.</b>	67
<b>Capítulo VIII. Anexos</b>	
<b>Anexo 1. Estructura del PrP(106-126)</b>	68
<b>Bibliografía.</b>	69



# ÍNDICE DE FIGURAS.

	<b>Pág.</b>
<b>Capítulo I.</b>	
1.1	Algunas características histopatológicas de las enfermedades priónicas 11
1.2	Estructura de la proteína Prion 15
1.3	Isoformas de la PrP y propagación exponencial 15
1.4	Vías por las que puede ocurrir el cambio conformacional de PrP <sup>C</sup> a PrP <sup>Sc</sup> 17
1.5	Características moleculares compartidas entre las amiloidosis 19
1.6	Mecanismo básico de agregación amiloide 20
1.7	La ThT y el “modelo de interacción en canal” de unión a agregados amiloide 22
1.8	Cinética de agregación empleando microscopía de fluorescencia con ThT 23
1.9	Esquema de los componentes de un equipo de TEM 24
1.10	Espectro de CD de la cadena peptídica de proteínas con diferentes motivos estructurales secundarios 26
1.11	Modos de enlace identificados para el Cu(II) con la región OR y las His 96 y His 111 de la PrP a pH fisiológico 28
1.12	El fragmento 106-126 y su ubicación en la PrP completa 31
1.13	Estrategia para la intervención terapéutica del proceso amiloide de la PrP 32
1.14	Diseño de una molécula bifuncional mediante el esquema de <i>Linkage</i> 33
1.15	Diseño del Tetrapéptido (TP) 35
<b>Capítulo III.</b>	
3.1	Secciones experimentales del presente proyecto 39
<b>Capítulo IV.</b>	
4.1	Estructura y masa exacta de los péptidos sintetizados 47
4.2	Análisis por HPLC fase reversa de los péptidos sintetizados. 50
4.3	Espectros de MS-TOF de los péptidos sintetizados 51
4.4	Espectro de ECD que muestra el comportamiento de la estructura secundaria del PrP(106-126) sometido a sonicación 52
4.5	Efecto del ión Cu(II) en la cinética de agregación del PrP(106-126) 53
4.6	Efecto del DP y TP en la cinética de agregación del PrP(106-126) 54
4.7	Efecto del DP y TP en la cinética de agregación del PrP(106-126) en presencia de Cu(II) 55
4.8	Efecto del ión Cu(II), DP y TP sobre la fluorescencia de ThT-PrP(106-126) 56
4.9	Efecto DP y TP sobre la morfología fibrilar del PrP(106-126) 57
4.10	Efecto del ión Cu(II), de Cu(II)+DP y Cu(II)+TP en la morfología fibrilar del PrP(106-126) 58
<b>Capítulo V.</b>	
5.1	Modelo propuesto para la influencia del Cu(II) en la agregación amiloide del PrP(106-126) 64





## ÍNDICE DE TABLAS.

<b>Capítulo I.</b>		<b>Pág.</b>
1.1	Algunas enfermedades neurodegenerativas asociadas al plegamiento anómalo de proteínas.	8
1.2	Especies de mamíferos afectados por las enfermedades priónicas.	10
1.3	Fenotipos clínicos de enfermedades priónicas en humanos.	10
1.4	Incidencia de vCJD hasta agosto del 2012.	12
1.5	Algunos estudios de influencia del Cu(II) sobre la agregación amiloide de la proteína prion.	30
 <b>Capítulo III.</b>		
3.1	Secuencia de los péptidos sintetizados en este estudio	41
3.2	Condiciones cromatográficas para la purificación de los péptidos PrP(106-126), DP y TP.	42
3.3	Grupos de estudio evaluados en los ensayos de fluorescencia con ThT	45
3.4	Condiciones de los ensayos de fluorescencia con ThT.	46



# Capítulo I

## ANTECEDENTES.

### 1.1 Enfermedades neurodegenerativas amiloidogénicas.

El Sistema Nervioso Central (SNC) es sin duda el sistema más complejo en el cuerpo humano. El cerebro por sí solo contiene al menos 100 billones de neuronas que llevan a cabo más de 100 trillones de sinapsis al día. La tremenda actividad celular del cerebro demanda el 15% del gasto cardiaco, el 20% del oxígeno y el 25% de la glucosa total [1].

La complejidad del SNC y su altísima actividad metabólica lo hacen especialmente susceptible al daño. En niños y jóvenes, la causa más común de daño al SNC es el trauma. En contraste, en la vejez el daño más común al SNC está asociado con el desarrollo de *Enfermedades Neurodegenerativas* (EN), como el Alzheimer [1, 2]. Las EN pueden ser definidas como aquellos padecimientos donde se presenta pérdida de la estructura y/o función de las neuronas, incluyendo su muerte [3].

Es realmente difícil poder enumerar las EN, pues muchas de ellas no están del todo clasificadas debido a que sus aspectos clínicos se traslapan entre sí [3]. Sin embargo, dentro de las EN se puede distinguir un grupo de patologías las cuales se relacionan con el plegamiento anómalo y la deposición de proteínas, conociéndoselas entonces como *Enfermedades neurodegenerativas asociadas con el plegamiento anómalo de proteínas* [1, 3]. Se han identificado más de veinte enfermedades neurodegenerativas humanas en las que se presentan estas deposiciones. Entre ellas destacan la Enfermedad de Alzheimer, el mal de Parkinson, la enfermedad de Huntington y las enfermedades priónicas, como lo muestra la tabla 1.1 [1, 4].



Tabla 1.1. Algunas Enfermedades Neurodegenerativas asociadas al plegamiento anómalo de proteínas [1, 5].

Enfermedad	Proteína	Abreviación de la proteína
Enfermedad de Alzheimer	Proteína $\beta$ -Amiloide	A $\beta$
Angiopatía hereditaria cerebral	Proteína $\beta$ -Amiloide	A $\beta$
Kuru	Proteína Prion	PrP <sup>C</sup> /PrP <sup>Sc</sup>
Síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker	Proteína Prion	PrP <sup>C</sup> /PrP <sup>Sc</sup>
Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob	Proteína Prion	PrP <sup>C</sup> /PrP <sup>Sc</sup>
Scrapie	Proteína Prion	PrP <sup>C</sup> /PrP <sup>Sc</sup>
Encefalitis Espongiforme Bovina (Enfermedad de las vacas locas)	Proteína Prion	PrP <sup>C</sup> /PrP <sup>Sc</sup>
Mal de Parkinson	$\alpha$ -Sinucleína	AS
Demencia Frontotemporal	Tau	Tau
Esclerosis Lateral Amiotrófica	Superóxido Dismutasa-1	SOD-1
Enfermedades de repetición de tripletes (Enfermedad de Huntington)	Poliglutamina	PG

Aunque las *enfermedades neurodegenerativas asociadas con el plegamiento anómalo de proteínas* presentan signos, síntomas y características propias, todas comparten una misma propiedad: la formación de depósitos o placas amiloides (de ahí que también se les llame enfermedades amiloides o amiloidosis) [1]. En 1984, Rudolph Virchow fue el primero en observar estos agregados en tejidos y órganos de una gran variedad de estados clínicos [6, 7]. Este científico alemán acuñó el término “amiloide”, debido a que estos agregados amorfos parecían estar hechos de un material “parecido al almidón” [6]. Sin embargo, con el paso de las décadas se determinó que estos agregados no estaban constituidos por ningún tipo de carbohidrato sino de proteínas.

Actualmente, los depósitos amiloides pueden ser definidos como agregados proteicos altamente estables, organizados en una estructura no-nativa, con propiedades de tinción especiales (unión con Rojo de Congo y tioflavina T (ThT)), altamente resistentes a la degradación proteolítica y con una apariencia fibrilar [8]. El mecanismo por el que se forman estos agregados no está del todo comprendido. Sin embargo, se sabe que



proteínas y péptidos que normalmente son solubles, de alguna forma, adquieren una estructura rica en hojas  $\beta$ . Posteriormente, forman oligómeros que pasan a agruparse en fibras amiloides altamente ordenadas donde abundan estructuras hoja  $\beta$  orientadas perpendicularmente al eje de la fibra [1, 6, 9].

El creciente interés de estudiar la agregación amiloide radica en el hecho de que este evento se ha visto relacionado con una gran variedad de patologías cerebrales o sistémicas [4, 5]. Las enfermedades amiloides ya no se consideran raras, pues a pesar de haber sido descritas dos generaciones atrás, se han convertido en las condiciones médicas más comunes y dañinas que aquejan al mundo moderno [5].

### **1.2 Encefalopatías Espongiformes Transmisibles.**

Las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (TSE's del Inglés) o enfermedades priónicas, son un grupo heterogéneo de enfermedades neurodegenerativas, fatales y subagudas que afectan al hombre y a una gran variedad de especies de mamíferos, y para los cuales no existe cura alguna (tabla 1.2) [10-12]. Estas encefalopatías derivan de la aparición de anomalías en el procesamiento de la proteína prion (PrP) [13, 14], lo que causa su agregación, deposición y, finalmente, una neurodegeneración asociada a este proceso aberrante. A diferencia de otras patologías cerebrales amiloides que se presentan solo en forma esporádica y/o hereditaria, las enfermedades priónicas también pueden ser *transmitidas* horizontalmente, es decir, existe una propagación de la enfermedad entre individuos de una misma especie que no tienen una relación madre-hijo. Esta transmisión es causada por una isoforma de la proteína prion, considerándosele entonces un agente infeccioso único al tratarse simplemente de una proteína [11].

Como lo muestra la tabla 1.3, los fenotipos clínicos de las enfermedades priónicas en humanos son muy variados. Aunque algunas de estas enfermedades pueden permanecer de forma asintomática durante muchos años, éstas son siempre progresivas y fatales una vez iniciados los síntomas clínicos. Los síntomas generales incluyen: cambios de personalidad, depresión, problemas de memoria, insomnio, confusión y sacudidas

incontrolables. En los estados avanzados de la enfermedad se observa un deterioro cognitivo severo, pérdida del habla, imposibilidad de moverse y finalmente la muerte [15].

**Tabla 1.2. Especies de mamíferos afectados por las enfermedades priónicas [13, 16, 17].**

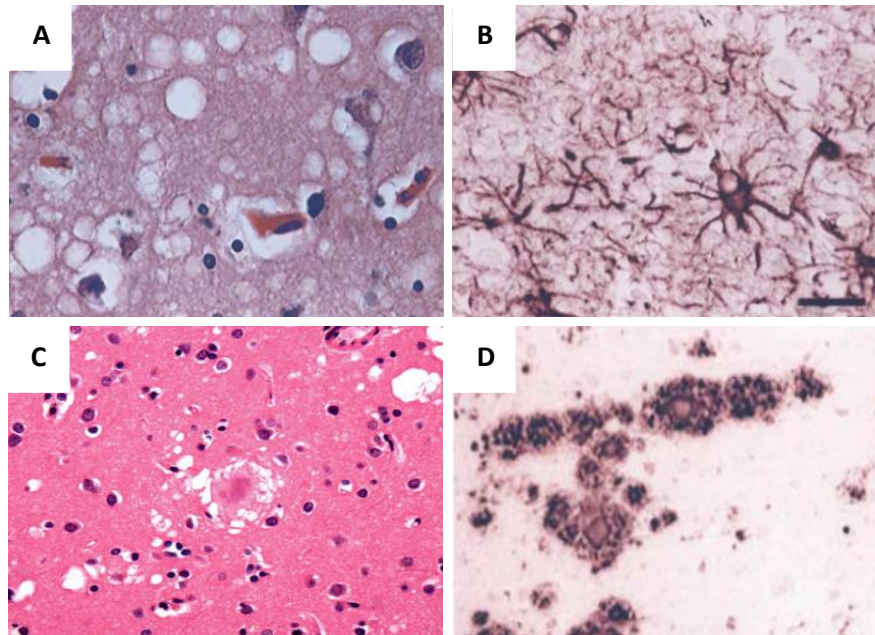
Especie afectada	Enfermedad (es).	Comentarios
<b>Humano</b>	Kuru	Descrita en aborígenes con prácticas de canibalismo ritual en Nueva Guinea.
	Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob iatrogénica (iCJD)	Infecciosa.
	CJD esporádica (sCJD)	Espontánea.
	CJD familiar (fCJD) o genética (gCJD)	Orígenes genéticos.
	Variante de CJD (vCJD)	Originada por consumir carne de vaca infectada por priones [18].
	Enfermedad de Garstmann-Sträussler Scheinker (GSS)	Hereditaria
	Insomnio Familiar Fatal (FFI)	Hereditaria
	Insomnio Esporádica (sFI)	Hereditaria
<b>Ovejas y Cabras</b>	Scrapie	Primera enfermedad priónica en ser descrita (año de 1732)
<b>Ganado vacuno</b>	Enfermedad espongiiforme bovina (BSE).	Conocida también como <i>enfermedad de las vacas locas</i> .
<b>Visones</b>	Encefalopatía transmisible del visón	Infección por priones de oveja o ganado vacuno
<b>Venado bura, venado de cola blanca, y alces</b>	Caquexia crónica	Presente en Canadá, E.U.A y posiblemente México.
<b>Felinos</b>	Encefalopatía felina espongiiforme	Infección por carne vacuna contaminada con priones.
<b>Gran kudu, Nyala, Orix.</b>	Encefalopatía de ungulados exótica.	

**Nota.** Las abreviaturas en esta tabla corresponden a las siglas usadas en inglés.

**Tabla 1.3. Fenotipos clínicos de enfermedades priónicas en humanos. Tomada de referencia [14].**

Enfermedad	Signos primarios	Edad de inicio (promedio)	Duración de la enfermedad	Características histopatológicas
Kuru	Ataxia, demencia	40 años (29-60)	3 meses – 1 año	Placas amiloides
sCJD	Ataxia, demencia, mioclonías.	61 años (17-83) Raras < 40	Menos de 1 año	Gliosis y vacuolización en materia gris.
fCJD	Ataxia, demencia, mioclonías.	Menor a 55 años (20s – 80s)	1 – 5 años	Gliosis y vacuolización en materia gris.
GSS	Ataxia, demencia	Típicamente < 55 años (20s – 60s)	2 – 6 años	Placas amiloides, gliosis, vacuolización menor.
FF1	Insomnio, disautonomía, ataxia, demencia.	35 – 55 años	Menos de un año	Gliosis focal talámica y deserción neuronal.
vCJD	Cambios conductuales, demencia.	Adolescentes, jóvenes adultos.	1.5 años	Placas floridas y espongiosis difusa.

Las enfermedades priónicas también poseen sus características histopatológicas distintivas. En las TSE's se pueden observar la pérdida de neuronas, la aparición de vacuolas en el neuropilo (que le dan al tejido aspecto de esponja), la astrogliosis y la aparición de placas amiloides; todo esto en ausencia de inflamación [17]. Algunas de estas lesiones histológicas se muestran en la figura 1.1.



**Figura 1.1. Algunas características histopatológicas de las enfermedades priónicas.** A, degeneración esponjiforme en una muestra de corteza cerebral de un caso de CJD (tinción con hematoxilina y eosina). B, Gliosis en una muestra de corteza cerebral de un paciente con sCJD (inmunotinción con anticuerpos contra proteína fibrilar glial ácida). C, "Placa amiloide florida" típica de vCJD (hematoxilina y eosina). D, Placa amiloide en muestra de cerebelo de paciente GSS (inmunotinción). Las figuras A, B y D fueron tomadas de la referencia [13] y la figura C de la referencia [4].

La enfermedad priónica más común en humanos es la CJD, teniendo una incidencia promedio a nivel mundial de 1-2 casos por millón de habitantes [19]. Este padecimiento es el ejemplo por excelencia de las enfermedades priónicas, pues a diferencia de GSS y PrP-CAA que son solo hereditarias o de la enfermedad del Kuru que es solo infecciosa, la CJD puede presentarse de forma hereditaria (fCJD), de forma infecciosa o iatrogénica (iCJD) y de forma espontánea (sCJD), representando el 10%, 5% y 85% de los casos de CJD totales, respectivamente [14].



La CJD también sobresale de las demás TSE's porque en 1996 se describió una variante de este padecimiento (vCJD) asociada al consumo de carne bovina contaminada con priones [18]. Prueba de que el consumo de carne bovina contaminada con priones es la causa probable de la vCJD en humanos, es el hecho de que el pico de casos reportados de la vCJD así como la disminución de los mismos concordaron (aproximadamente diez años después) con el pico máximo y disminución de los casos de BSE [20]. La tabla 1.4 muestra el total de casos de vCJD a nivel mundial hasta agosto del 2012, pudiéndose observar que la gran mayoría de los casos han sido reportados en Europa y ninguno en países latinoamericanos.

**Tabla 1.4. Incidencia de vCJD hasta agosto del 2012. Tomada de referencia [21].**

País	Número de casos primarios	Número de casos secundarios (transfusión sanguínea)	Residencia acumulativa (>6 meses) en el Reino Unido (1980-1996)
Canadá	2	0	1
Francia	27	0	1
Italia	2	0	0
Japón	1	0	0
Países Bajos	3	0	0
Portugal	2	0	0
República de Irlanda	4	0	2
Arabia Saudita	1	0	0
España	5	0	0
Taiwán	1	0	1
Reino Unido	173	3	176
E.U.A	3	0	2
<b>Total</b>	<b>224</b>	<b>3</b>	<b>183</b>

Sin lugar a dudas, el surgimiento de una nueva enfermedad priónica (BSE) y el posterior desarrollo de una zoonosis (vCJD) fue el detonante para que varios grupos de investigación evocaran sus esfuerzos para estudiar estas intrigantes patologías. Actualmente, se sabe mucho sobre las enfermedades priónicas, pero aún quedan varias interrogantes por resolver. Por ejemplo: ¿Cuáles son los factores responsables de la aparición de enfermedades priónicas tipo esporádicas?, ¿Cuál es el mecanismo por el cual los priones entran a un organismo sano y cómo se propaga la infección?, ¿Por qué una enfermedad priónica puede ser transmitida entre distintas especies y otras son propias de una sola?, por mencionar algunas.



### 1.3 La Proteína Prion (PrP)

El agente etiológico de las enfermedades priónicas no fue descubierto hasta los años ochenta del siglo pasado, a pesar de que la primera enfermedad priónica fue descrita en animales desde 1732 (Scrapie) y por primera vez en humanos en 1920 (CJD) [3, 16]. Al principio, se pensaba que las TSE's eran causadas por un tipo de "virus lento", debido a la variación de los periodos de incubación [22] y al hecho de existir transmisión horizontal (de individuo a individuo).

Sin embargo, en 1982, Stanley Prusiner y cols. identificaron la relación que hay entre la enfermedad del Scrapie y el CJD [23]; y posteriormente lograron purificar y aislar una proteína del cerebro de ratón experimentalmente infectado con extractos cerebrales de una oveja con Scrapie, a la cual llamaron *Prion* (proteinaceous infectious) [22, 23]. Aunque la teoría del prion como agente causal de las TSE's fue fieramente debatida en un principio, experimentos posteriores demostraron que la PrP: i) carece de ácidos nucleicos, ii) tiene la capacidad de generar patologías similares en homínidos no humanos y iii) que esta infección depende de la expresión de PrP [22, 24]. Actualmente, la teoría de infección por priones es ampliamente aceptada, considerándosele a esta proteína un agente infeccioso único, pues rompe con el paradigma de que un agente infeccioso requiere de ácidos nucleicos para llevar a cabo una replicación o infección [13].

La PrP es una glicoproteína que se encuentra expresada principalmente en el SNC. Sin embargo, también es un constituyente normal de varios tejidos corporales y tipos celulares, como por ejemplo: pulmón, corazón, riñón, tracto gastrointestinal, aparato reproductivo, músculo y glándulas mamarias; así como células linfoides, del endotelio vascular y hematopoyéticas [25-28]. Además, la PrP es ubicua en el reino animal. Se ha encontrado expresada en todas las clases de mamíferos conservando un 90% de similitud, y existen proteínas muy similares en otras especies de vertebrados, como anfibios, reptiles e incluso peces [10, 27]. A pesar de que la PrP se expresa en muchas clases de animales, se ha visto que las TSE's son propias de mamíferos [26].

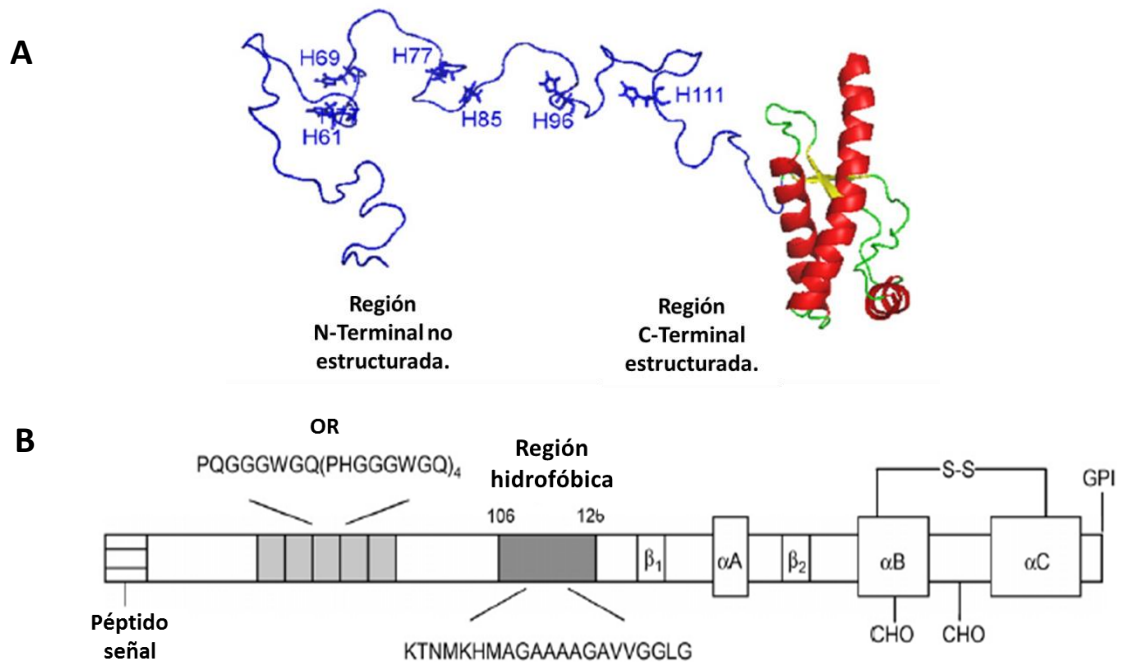




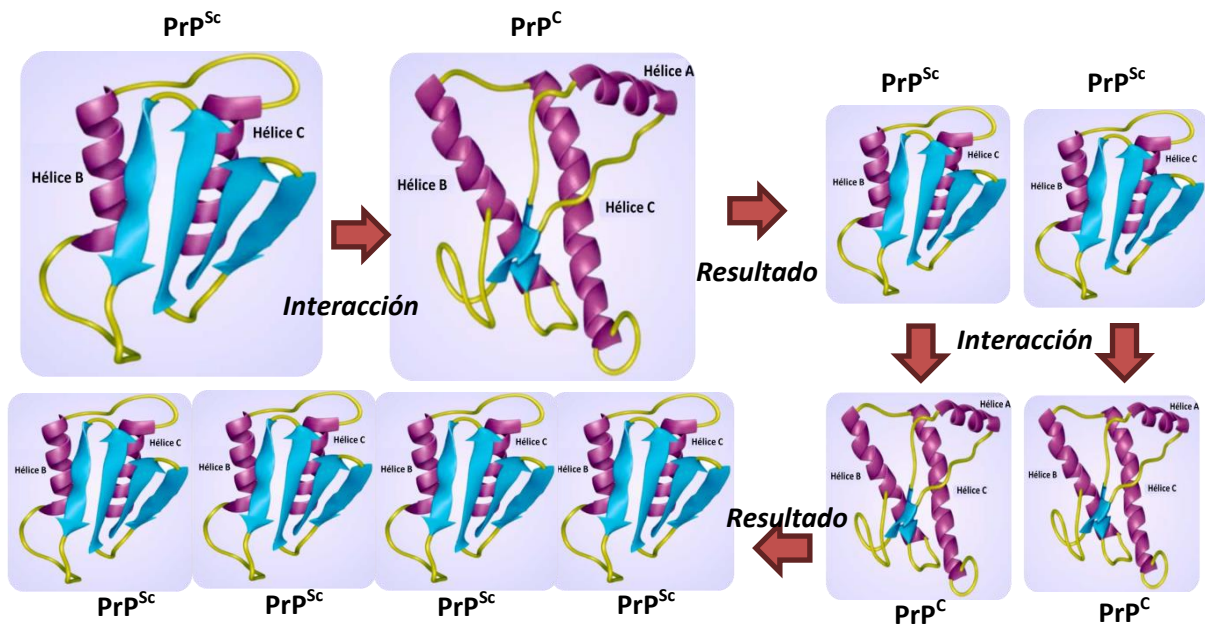
Se desconoce la función fisiológica de la PrP, aunque se piensa que debe ser importante dado su alta conservación evolutiva. Mediante una amplia gama de estudios, entre los que sobresale el uso de ratones *knockout* para PrP, se ha vinculado a la proteína prion con: la regulación de los ciclos circadianos; la modulación de la transmisión sináptica y la excitabilidad neuronal; protección contra el estrés oxidativo; la participación en la diferenciación y la maduración celular; la adhesión a la matriz extracelular; la muerte y la supervivencia celular; la inmunomodulación; la señalización transmembranal y la homeostasis de iones metálicos como el Cu(II) [10, 20, 25, 28].

El gen que codifica para la proteína prion en el humano (PRNP) se encuentra en el brazo corto del cromosoma 20 [14, 20]. Este gen está compuesto por tres exones, pero solo uno de ellos codifica para los 253 aminoácidos que integran la PrP [14, 20]. Como lo muestran las figuras 1.2 y 1.4, la PrP es una proteína extracelular que presenta varias modificaciones post-traduccionales. La PrP madura sufre el corte de un fragmento señal en el extremo N-terminal (residuos 1-22) y otro en el C-terminal cuando la proteína es enlazada a un grupo glicosilfosfatidilinositol (GPI, residuos 231-253), con el cual la PrP se ancla a la membrana celular en los dominios de balsas de colesterol [10, 25, 27]. Al final de las modificaciones post-traduccionales, la PrP se reduce a 209 residuos que van desde el 23 hasta el 231 [26].

Cuando la PrP alcanza la superficie externa celular, adopta una forma no estructurada en el extremo N-terminal y una forma globular bien estructurada en el C-terminal (figura 1.2). En el dominio globular, predominan las estructuras  $\alpha$ -hélices y se encuentran dos sitios de glicosilación (residuos 181 y 197) [10, 11]. También se han identificado regiones de la PrP con características particulares. Una de ellas es conocida como *octarepeat* (OR) y comprende los residuos 60-91 [27]. El OR tiene una secuencia de 8 residuos (PHGGGWGQ) que se repite varias veces dependiendo de la especie animal en cuestión [27]. También está una región hidrófoba comprendida por los residuos 106-126 que, al igual que el OR, se encuentra altamente conservada entre especies [11, 27]. Finalmente, se han identificado tres regiones ( $\alpha$ A,  $\alpha$ B,  $\alpha$ C) que poseen estructura secundaria de  $\alpha$ -hélice y dos ( $\beta$ 1,  $\beta$ 2) que forman hojas  $\beta$  [27].



**Figura 1.2. Estructura de la proteína Prion.** **A**, estructura secundaria de la PrP donde se aprecia la región N-terminal no estructurada, y la C-terminal globular y bien estructurada. **B**, esquema donde se observan las modificaciones post-traduccionales y las regiones de  $\alpha$  hélices y hojas  $\beta$  en la PrP. También se muestra la ubicación del *octarepeat* (OR) y de la secuencia 106-126. Figuras modificadas de [26] y [27], respectivamente.



**Figura 1.3. Isoformas de la PrP y propagación exponencial.** La PrP muestra dos isoformas, la Celular ( $PrP^C$ ) y la Scrapie ( $PrP^{Sc}$ ). Esta última puede interactuar con una isoforma  $PrP^C$  induciendo a que adquiera una conformación  $PrP^{Sc}$ . Este fenómeno se amplifica de forma exponencial, pues cada una de las  $PrP^{Sc}$  formadas puede repetir el proceso. Figuras tomadas y modificadas de la referencia [13].

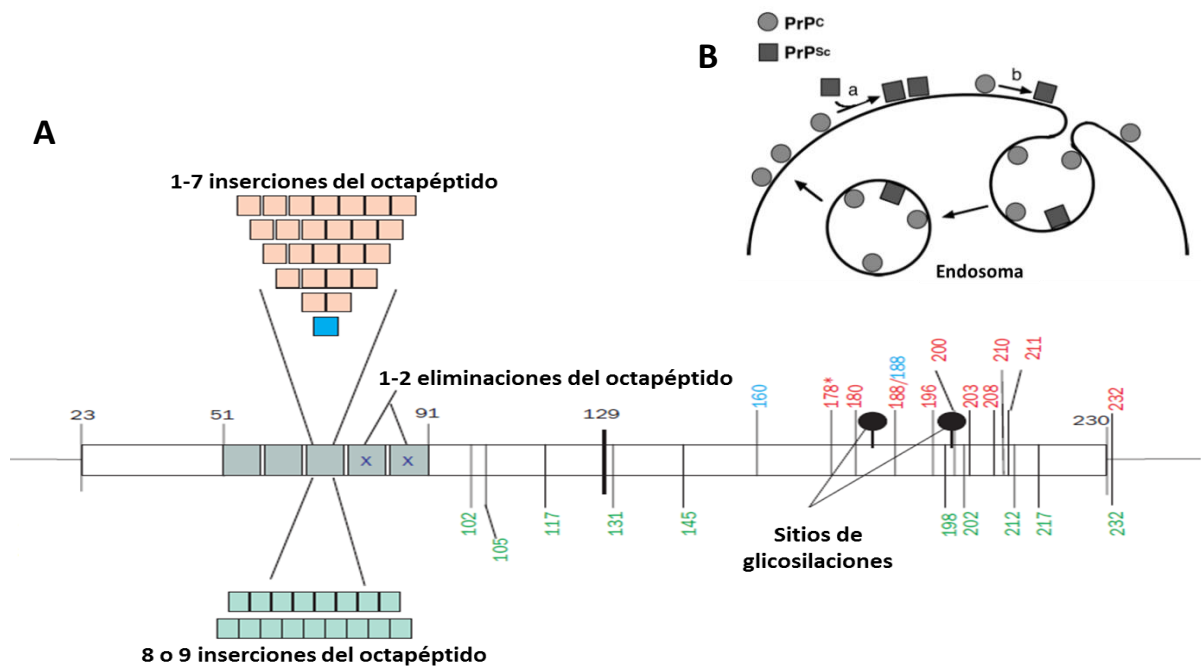


La PrP presenta dos isoformas con características fisicoquímicas y biológicas diferentes, a pesar de que comparten la misma secuencia de aminoácidos (figura 1.3) [20]. La *isoforma celular* (PrP<sup>C</sup>) es la forma constitutiva, tiene una estructura predominantemente de  $\alpha$ -hélice, es soluble y es sensible a la acción proteolítica. En contraste, la *isoforma Scrapie* (PrP<sup>Sc</sup>) presenta una estructura predominantemente de hojas  $\beta$ , tiene la facultad de formar agregados insolubles (depósitos amiloides), es parcialmente resistente a la acción proteolítica y es considerada el agente infeccioso de las TSE's [29, 30].

De acuerdo a la teoría de “infección debido a solo una proteína”, el evento clave para la generación de una enfermedad amiloide es el cambio conformacional de una isoforma PrP<sup>C</sup> a una PrP<sup>Sc</sup> [11, 29]. Aunque el mecanismo no está del todo comprendido, se ha observado que puede ocurrir por alguna de las siguientes vías (figura 1.4):

- a. **Polimorfismos genéticos (generan enfermedades tipo familiares).** Existen en la PrP mutaciones dominantes puntuales o de varios residuos que desestabilizan parcialmente la isoforma celular, promoviendo entonces la formación de la isoforma Scrapie [10, 20, 31].
- b. **Por interacción proteína-proteína (generan enfermedades tipo infecciosas).** Es bien conocido que la PrP<sup>Sc</sup>, al entrar en un organismo sano, de alguna forma llega al SNC donde interacciona como la PrP<sup>C</sup> y sirve como plantilla para generar nuevas estructuras PrP<sup>Sc</sup> [32]. Esta es la razón por el que existe la posibilidad de transmitir enfermedades priónicas mediante transfusiones sanguíneas, uso de hormonas humanas de origen cadavérico, trasplantes de córnea y uso de material quirúrgico contaminado con priones [33, 34]
- c. **De forma espontánea (generan enfermedades tipo esporádicas).** Se propone en estos casos que el cambio de conformación ocurre bajo cambios en las condiciones del microambiente, como el pH, la temperatura, la fuerza iónica,

los agentes caeotrópicos, el estrés oxidativo y los cambios en las concentraciones de iones metálicos como el Cu(II) [26].



**Figura 1.4.** Vías por las que puede ocurrir el cambio conformacional de PrP<sup>c</sup> a PrP<sup>Sc</sup>. **A**, por mutaciones en la PrP, asociadas con las formas familiares de CJD (confirmadas en rojo y no confirmadas en azul) y GSS (en verde). \* Asociados a CJD y FFI familiares. **B**, por interacción proteína-proteína (a), o como un evento espontáneo debido a cambios en las condiciones micro-ambientales, como el pH en las vesículas endosómicas (b). Figuras tomadas de referencias [20] y [25], respectivamente.

Es importante mencionar que, una vez que una proteína PrP<sup>Sc</sup> ha sido generada por cualquiera de las vías anteriormente mencionadas, esta nueva entidad sirve como plantilla para que otras isoformas celulares cambien su conformación a la isoforma Scrapie [14]. Posteriormente, las isoformas PrP<sup>Sc</sup> formadas se asocian en oligómeros, y éstos a su vez en los agregados amiloides característicos de las enfermedades priónicas [21, 30].

No está del todo claro si la PrP<sup>Sc</sup> es el único agente causal de las TSE's. Hay estudios que demuestran que la PrP<sup>Sc</sup> podría actuar en una relación compleja con otras biomoléculas para desencadenar las patologías amiloides y su cuadro clínico [21]. Sin embargo, está demostrado que la PrP<sup>Sc</sup> es el agente causal principal debido a que: i) los animales experimentales que no expresan la PrP no desencadenan enfermedades priónicas a pesar de ser inoculados con PrP<sup>Sc</sup> [21] y ii) la PrP<sup>Sc</sup> por si sola resulta tóxica en



varios cultivos celulares al formar oligómeros no fibrilares y comprometer la integridad de la membrana celular [35].

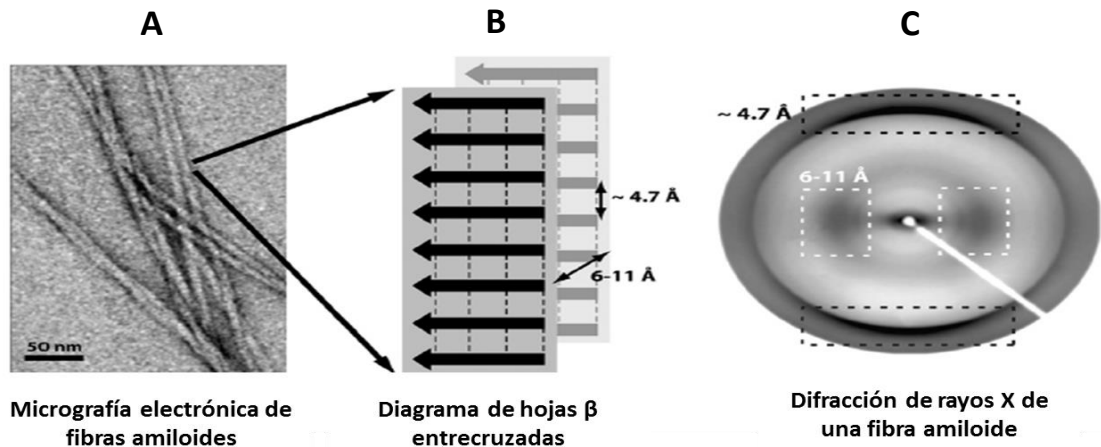
#### 1.4 Agregación amiloide.

La agregación amiloide es una característica distintiva de muchas enfermedades degenerativas. Este fenómeno se aprecia como deposiciones fibrilares (extracelulares o intracelulares) en una gran variedad de órganos, como en el cerebro y SNC (CJD, Enfermedad de Alzheimer, etc.); órganos periféricos como el corazón, páncreas, hígado y bazo (Amiloidosis sistémicas, Diabetes tipo II); y tejido esquelético y articulaciones (Amiloidosis relacionada con la hemodiálisis) [36, 37]. Los agregados amiloides pueden ser gigantescos y alterar la función de órganos enteros como en ciertas formas amiloides letales, o pequeñas y múltiples como las observadas en la enfermedad de Alzheimer [38].

A pesar de que las proteínas amiloides presentan funciones, localización y secuencias diferentes, y que además desencadenan enfermedades con cuadros clínicos distintos, todas estas patologías exhiben bases moleculares parecidas [6]. Entre las similitudes moleculares que presentan los depósitos amiloides, y que se muestran en la figura 1.5, están:

- a. **Propiedades tintoriales.** Este es el criterio más comúnmente empleado. Todos los agregados amiloides pueden ser teñidos con el colorante diazoico rojo de Congo y muestran una birrefringencia color verde manzana cuando son observados bajo la luz polarizada. Otro colorante importante que se une a las fibras amiloides es la tioflavina T (ThT), la cual cambia sus características de fluorescencia al interactuar con los agregados fibrilares [6].
- b. **Morfología fibrilar.** Bajo microscopía electrónica, los depósitos amiloides exhiben fibras amiloides de 6 a 10 nm de diámetro. Las fibras son no-ramificadas y tienen una superficie lisa [6]. Estas fibras están compuestas de estructuras hoja  $\beta$  de una misma proteína organizadas perpendicularmente al eje de la fibra formada, la cual, puede adquirir una longitud indefinida. [39].

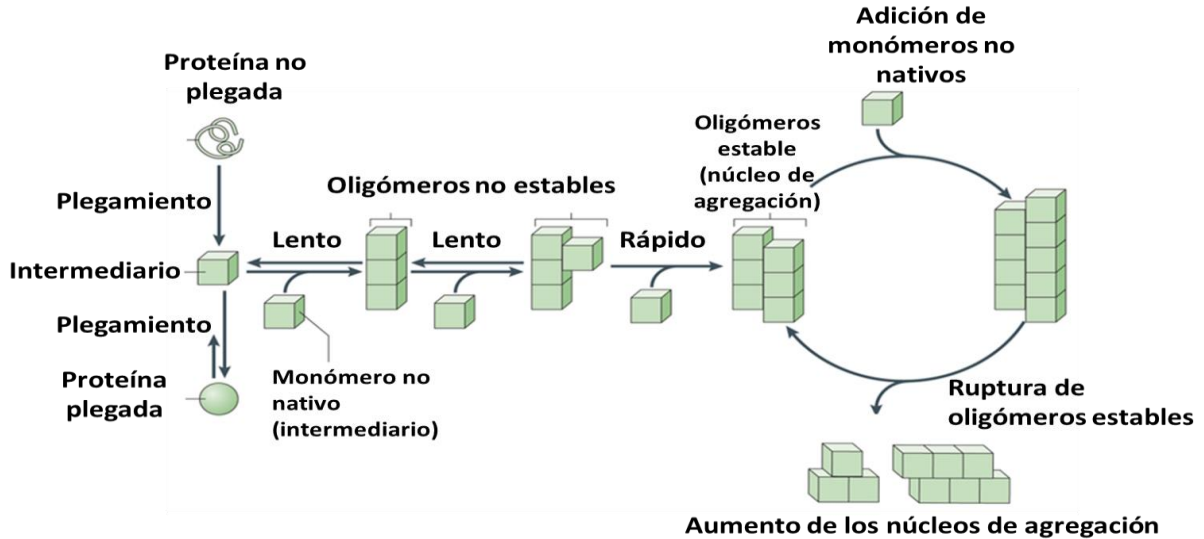
- c. **Patrón de difracción de rayos X.** Las fibras amiloides generan patrones de difracción de rayos X característicos. Presentan una reflexión meridional relativamente fina y densa a 4.7 Å y otra ecuatorial débil y más difusa de 6 a 11 Å. Estos patrones indican la presencia de estructuras  $\beta$  cruzadas [6, 39].



**Figura 1.5. Características moleculares compartidas entre las amiloidosis.** A, Fibras amiloides observadas mediante Microscopía Electrónica de Transmisión empleando una tinción negativa. B, Diagrama esquemático de hojas  $\beta$  con arreglo entrecruzado en una fibra. Las líneas punteadas representan el hidrógeno de la cadena peptídica, indicando los espacios que generan a C, el patrón de difracción de rayos X típico de las fibras amiloides. Figura tomada de referencia [39].

Las fibras amiloides surgen cuando una proteína o un péptido pasa de una forma soluble a una insoluble como resultado de un plegamiento anómalo. Este plegamiento anómalo ocurre cuando una proteína en su estado nativo cambia su conformación secundaria o cuando una proteína recién sintetizada no puede plegarse en su forma correcta. Las proteínas plegadas de forma incompleta o incorrectamente exponen residuos hidrófobos que normalmente deberían estar enterrados en el interior de la proteína en su estado nativo. Es entonces cuando estas proteínas individuales (monómeros) se vuelven propensas a la autoagregación y forman núcleos, los que posteriormente reclutan más monómeros [40]. El mecanismo básico de agregación se muestra en la figura 1.6, y en general puede ser visto como un proceso de polimerización dependiente de la oligomerización [37].

Una proteína plegada de manera anómala carece de su función fisiológica específica. Sin embargo, muchas de estas estructuras aberrantes presentan una “ganancia de función”, y son capaces de interactuar con componentes celulares (estructurales o moleculares) de forma inapropiada produciendo deterioro funcional y muerte celular. Por esto, las enfermedades amiloides pueden ser consideradas como padecimientos de “ganancia de función” [41].



**Figura 1.6. Mecanismo básico de agregación amiloide.** El plegamiento de nuevas proteínas o el plegamiento anómalo de proteínas en su estado nativo generan un proceso amiloide en el cual se presentan varios intermediarios. Tomada de la referencia [40].

La agregación amiloide, y el consecuente desarrollo de la patología, puede tener dos orígenes: familiar o esporádico (también infeccioso en el caso de los priones, sección 1.3). Las formas familiares se deben a mutaciones en los genes que expresan la proteína en cuestión, lo que hace que se sinteticen proteínas inestables que exhiben una mayor probabilidad de adquirir un plegamiento anómalo. En otros casos, los defectos en la expresión genética se encuentran en proteínas que participan en el control de la calidad de la síntesis de las proteínas amiloides [41].

Las formas esporádicas son mucho más comunes que las de origen genético e infeccioso. En estos eventos, la agregación se debe a un mal funcionamiento de algunas herramientas celulares, como las defensas de antioxidantes o la vía de la ubiquitina-proteosoma. En las formas esporádicas también se ven involucrados factores ambientales y una edad avanzada [41].



## 1.5 Técnicas para el estudio de la agregación amiloide

### 1.5.1 Ensayos de fluorescencia con tioflavina T.

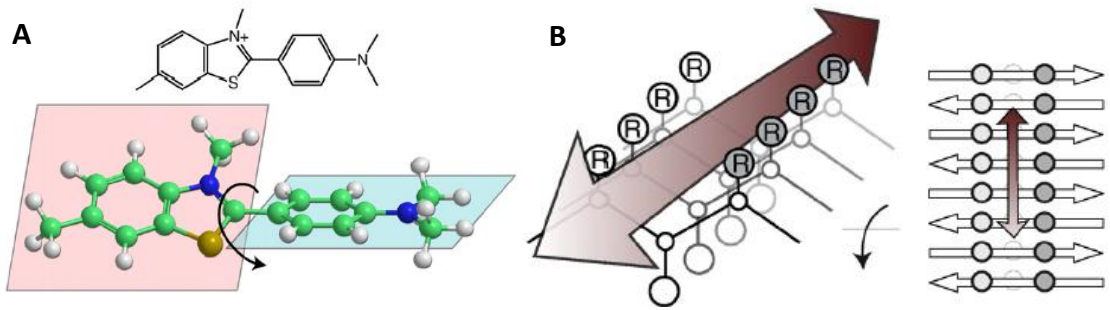
El modelo de agregación amiloide anteriormente descrito, ha sido validado mediante experimentos de “sembrado”, que consiste en acelerar el fenómeno de agregación al adicionar fibras amiloides preformadas. Sin embargo, el mecanismo de formación de fibras por cadenas peptídicas individuales no está del todo comprendido. Uno de los métodos más empleados para alcanzar este objetivo son los ensayos de fluorescencia con tioflavina T (ThT) [42].

Vassar y Cullin en 1959 reportaron que la ThT, un colorante catiónico benzotioazólico (figura 1.7), mostraba una exacerbada fluorescencia después de unirse a depósitos amiloides en secciones de tejido. Posteriormente, Saeed y Fine en 1967 demostraron la superioridad de la ThT sobre otros colorantes para teñir fibras amiloides, esto al comparar distintas tinciones de controles amiloides positivos y negativos con rojo de Congo, violeta cristal, colorante de van Gieson y ThT [43].

Las ventajas de la ThT radican en su mecanismo de interacción. La ThT es un compuesto que en solución presenta fluorescencia con una longitud máxima de excitación y emisión de 385 nm y 445 nm, respectivamente. Sin embargo, al interaccionar la ThT con las fibras amiloides, su intensidad de fluorescencia se incrementa varios órdenes de magnitud y sus longitudes máximas de excitación y absorción cambian a 450 nm y 485 nm, respectivamente [7, 44].

La explicación al cambio drástico en la fluorescencia se basa en el “modelo de interacción en canal”, el cuál se muestra en la figura 1.7. Este modelo propone que la ThT se va intercalando perpendicularmente a las estructuras hojas  $\beta$  que se van formando conforme avanza el proceso de agregación. Este intercalamiento propicia la estabilización de un rotámero de la ThT, el cual presenta un comportamiento de fluorescencia distinto al ThT no unido a fibras amiloides [44].





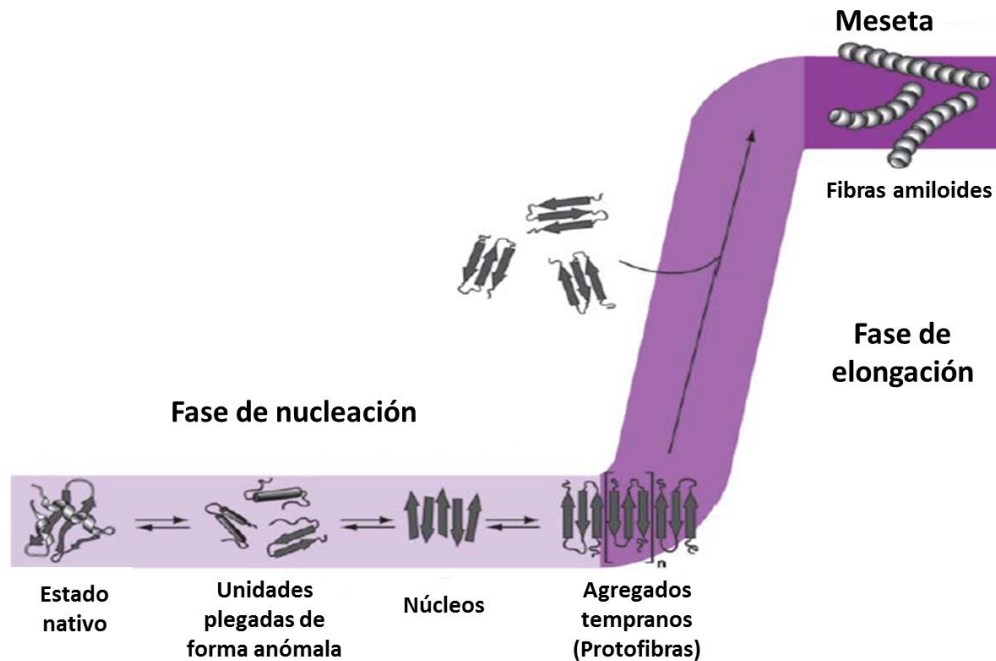
**Figura 1.7. La ThT y el “modelo de interacción en canal” de unión a agregados amiloides.** **A**, Estructura de la ThT con sus planos rotacionales. **B**, Modelo de unión tipo canal de la ThT a las fibras amiloides. La flecha roja indica el lugar y la dirección en la que la ThT se une a las fibras amiloides conformadas por estructuras hoja  $\beta$ . Figuras tomadas de la referencia [44].

Se han encontrado varias aplicaciones en las que el uso de la ThT es muy provechoso dado su unión específica a fibras amiloides. Entre estos usos está el diagnóstico de depósitos amiloides en secciones de tejidos, observación directa del crecimiento de fibras amiloides usando microscopía de fluorescencia con reflexión total interna, y el monitoreo en tiempo real de la agregación amiloide de proteínas o péptidos empleando espectroscopía de fluorescencia [43].

Al monitorear un proceso amiloide empleando ThT, los cambios en la intensidad de fluorescencia se pueden correlacionar con las fases del proceso de formación de fibras amiloides [37], como lo muestra la figura 1.8. En este tipo de estudios se puede apreciar una cinética de agregación tipo sigmoideal en donde se observan tres fases:

- a. Fase lag o de nucleación.** Esta fase comienza con un cambio en el plegamiento de la proteína nativa a conformaciones que son ricas en hojas  $\beta$ , lo cual les permite formar oligómeros, núcleos y posteriormente protofibras [36, 37].
- b. Fase de crecimiento, polimerización o de elongación.** En esta fase, las protofibras reclutan más intermediarios con conformación de hojas  $\beta$  y se van ensamblando entre ellos formando fibras amiloides con crecimiento exponencial [36, 37].

- c. **Meseta o plateau.** Esta fase representa un estado estacionario donde ha sido alcanzado el máximo crecimiento de las fibras amiloides [36].



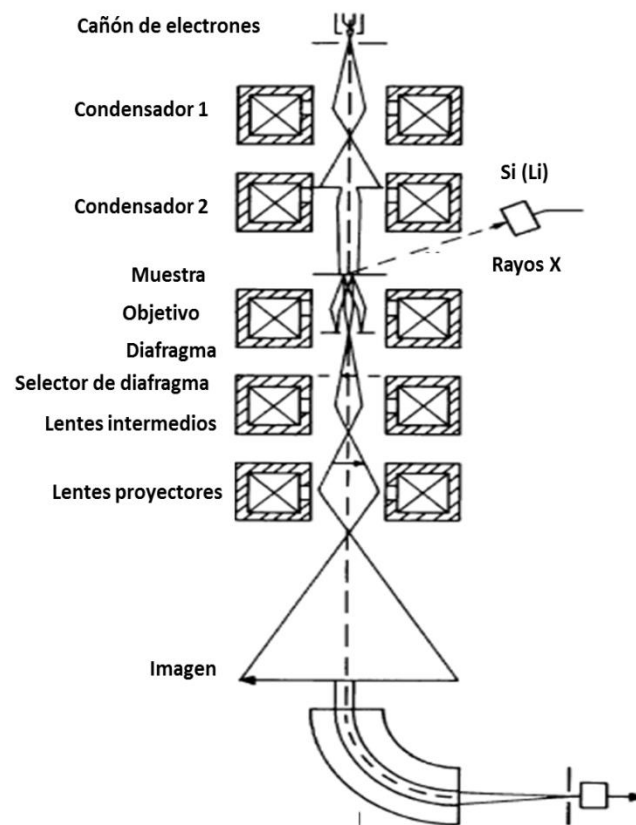
**Figura 1.8. Cinética de agregación empleando microscopía de fluorescencia con ThT.** Se pueden apreciar tres fases: nucleación, donde suceden los cambios conformacionales y la oligomerización; Elongación, donde se ensamblan fibras maduras; y Plateau, donde el proceso de formación de fibras amiloides ha concluido. Figura tomada de referencia [36].

### 1.5.2 Microscopía Electrónica de Transmisión.

Es de gran utilidad el determinar la morfología de las especies peptídicas formadas a lo largo de una cinética de agregación o en una etapa de este proceso (fase lag, log o meseta). El proceso de observación de la morfología fibrilar permite:

- Dar una idea de la cantidad de fibras formadas, ya que los ensayos de fluorescencia no son un método cuantitativo.
- Determinar la (s) población (es) de agregados amiloides para poder definir un efecto derivado de una condición experimental.

Las técnicas empleadas para poder observar la morfología de las fibras amiloides son algunas de las muchas técnicas de Microscopía Electrónica. Estas técnicas microscópicas fueron desarrolladas por la necesidad de observar objetos mucho más pequeños de los que un microscopio de luz puede “resolver”. La resolución de las imágenes observadas por los microscopios de luz está limitada por la longitud de onda de la luz visible, sin embargo, los microscopios electrónicos aprovechan la característica dual de los electrones, con una longitud de onda más pequeña que la luz visible, para poder ver objetos hasta con 1 millón de aumento [45].



**Figura 1.9. Esquema de los componentes de un equipo de TEM.** Esquema tomado de la referencia [46].

La Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM, por sus siglas en inglés) es una de las técnicas microscópicas más empleadas para la observación de la morfología fibrilar. En una TEM convencional, una muestra ultra-delgada es irradiada con un haz de electrones que interactúa con la muestra conforme la atraviesa. En un equipo de TEM (figura 1.9), estas partículas subatómicas son emitidas por un cañón de electrones, y condensadas y dirigidas sobre la muestra a observar por un sistema de lentes magnéticas. La imagen



puede ser vista mediante exposición directa sobre una emulsión fotográfica o sobre una placa fluorescente, la cual puede estar conectada mediante fibra óptica a una cámara CCD (*charged-coupled device*) [46].

Al igual que en la microscopia de luz visible, en TEM se emplean técnicas de contraste, las cuales son particularmente útiles para resaltar muestras con relieves superficiales muy débiles. En el caso de las fibras amiloides, al estar constituidas por elementos ligeros (C, H, O, N) es necesario realizar una tinción negativa. La técnica consiste en rodear a la estructura fibrilar con partículas opacas a los electrones (sales de metales pesados como el acetato de uranilo), lo que permite observar una estructura brillante contra un fondo oscuro [47].

### 1.5.3 Dicroísmo Circular Electrónico.

Una característica clave de cualquier sistema biológico es su quiralidad o asimetría. La quiralidad macroscópica así como la quiralidad a escala menor es dependiente de la quiralidad a nivel molecular. Así, dado que casi todas las moléculas en los sistemas biológicos son quirales y están presentes solo en una forma enantiomérica, las macroestructuras en las que se ensamblan serán quirales también. Un ejemplo de biomoléculas quirales son los aminoácidos [48].

El Dicroísmo Circular Electrónico (ECD, por sus siglas en inglés) es la diferencia de absorción en la región UV/Vis entre la luz circularmente polarizada derecha e izquierda, usualmente por una solución que contiene la molécula de interés. Una señal diferente a cero se obtiene cuando se analizan moléculas quirales como proteínas y péptidos [49]. Ésta técnica sigue la ley de Lambert-Beer, tanto como el equipo pueda leer la intensidad de los fotones que atraviesan la muestra [48].

El ECD es probablemente la técnica más simple y no destructiva que proporciona información sobre la asimetría de las moléculas. En el caso de los péptidos y las proteínas, el enlace amida, las cadenas laterales y cualquier grupo prostético determina el espectro de absorción en la región UV/Vis, con sus intensidades y longitudes de onda afectadas por

el ambiente local [48]. El espectro UV de las proteínas usualmente se divide en las regiones UV cercana (250-300 nm) y lejana (<250 nm), la primera determinada por la presencia de grupos aromáticos y puentes disulfuro, y la segunda por la cadena peptídica [48, 50].

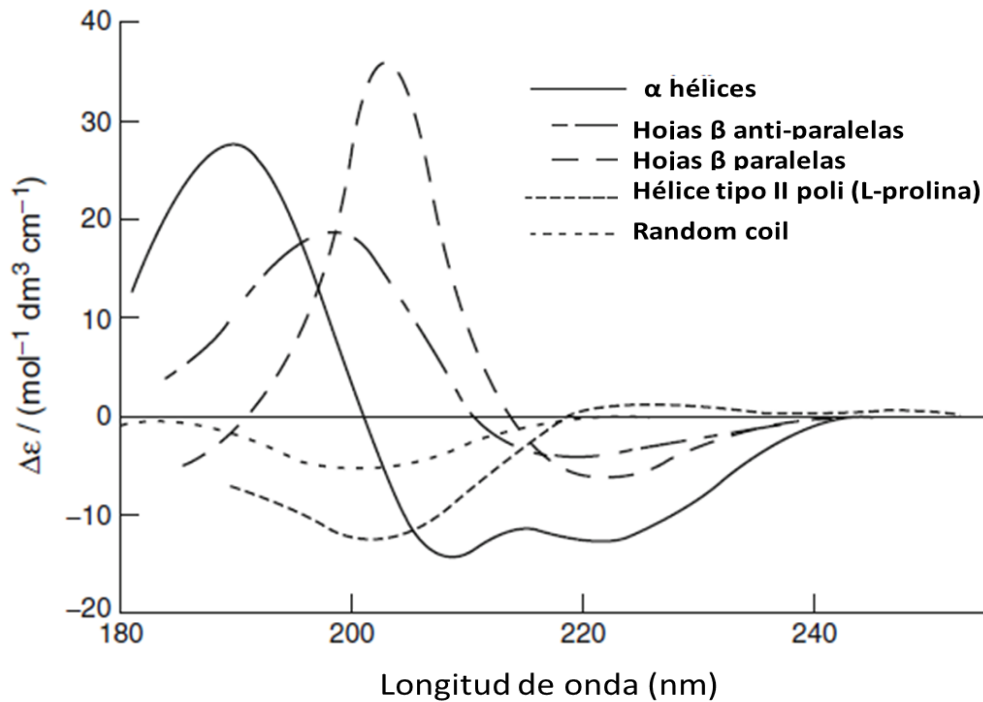


Figura 1.10. Espectro de CD de la cadena peptídica de proteínas con diferentes motivos estructurales secundarios. Figura tomada de la referencia [48].

Entre las utilidades del ECD para el estudio de proteínas destacan:

- Determinación de la estructura secundaria.** Esta utilidad se basa en el hecho que los péptidos y proteínas son cadenas largas de aminoácidos, entonces, los carbonos tetraédricos quirales de los aminoácidos exhibirán señales de CD en transición con los enlaces amida vecinos y las cadenas laterales. Además, el plegamiento de las proteínas es un fenómeno quiral por naturaleza, considerándose entonces a las conformaciones de  $\alpha$  hélices y hojas  $\beta$  como estructuras macro-quirales [48, 51]. Como lo muestra la figura 1.10, cada una de las estructuras  $\alpha$ -hélice, hoja  $\beta$  y random coil generan un espectro de CD con forma y magnitud característica [49, 50].



**b. Estudio de las interacciones metal-proteína.** Los sitios metálicos en las proteínas son usualmente centros con baja simetría. La absorción electrónica y el CD en la región UV-Vis permiten la caracterización de las transiciones electrónicas asociadas con el complejo metal-proteína, proporcionando información sobre la naturaleza y la geometría de la interacción ligando-metal [48].

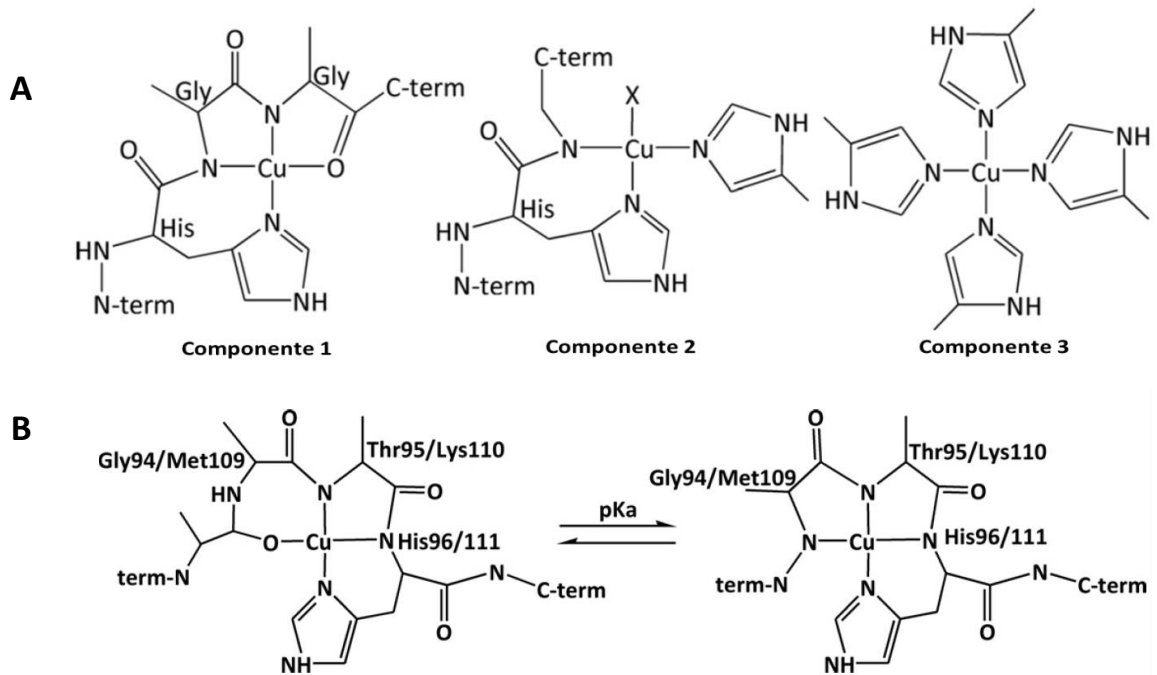
### 1.6 El cobre, la proteína prión y las enfermedades priónicas.

El cobre es un elemento traza indispensable para todos los organismos con un metabolismo oxidativo, y se encuentra principalmente en forma de ión (Cu(I) y Cu(II)). Este metal está presente en el cerebro para su uso metabólico, y al igual que en otros órganos, el cobre participa como cofactor de muchas enzimas involucradas en los procesos de fosforilación oxidativa mitocondrial, la desintoxicación de radicales libres, la síntesis y la desnaturalización de los neurotransmisores, la formación de tejido conectivo y el metabolismo del hierro [52, 53].

El cobre se encuentra en el cuerpo humano en cantidades relativamente altas. Un adulto sano de 70 kg de peso contiene aproximadamente 110 mg de este metal, de los cuales, 8.8 mg se encuentran en el cerebro [53]. El cerebro tiene una concentración de cobre de 3.1 a 5.1  $\mu\text{g/g}$  de peso húmedo, sin embargo, su distribución no es homogénea. En estudios en ratas se encontró que el 23% de todo el cobre cerebral se concentra en los sinaptosomas, y en el humano se estima que la concentración de Cu(II) extracelular es mayor a 10  $\mu\text{M}$ , alcanzándose una concentración de 100  $\mu\text{M}$  [25] en los procesos de despolarización neuronal. Se ha determinado también que el cobre se encuentra en una concentración de 290  $\mu\text{M}$  en las vesículas sinápticas y alcanza una concentración de más de 250  $\mu\text{M}$  en la hendidura sináptica durante el proceso sináptico [52].

La proteína prión humana puede coordinar hasta seis iones Cu(II) con afinidad y selectividad [2, 54]. Cuatro de estos iones se unen a la región del *octarepeat* (OR, secuencia: PHGGGWGQ). En esta región, un ión Cu(II) se coordina por cada secuencia de ocho aminoácidos, teniendo a los residuos de histidina como sitios de anclaje primarios

[25, 26]. Los otros dos iones Cu(II) se coordinan en la región comprendida del residuo 92 al 115, siendo la His96 y la His111, los sitios de anclaje primarios [26, 54, 55]. Tanto el OR como la región 92-115 se encuentran en el extremo no estructurado N-terminal de la PrP<sup>C</sup> y han sido estudiados ampliamente empleando técnicas espectroscópicas para determinar los modos de coordinación existentes a pH fisiológico (figura 1.11)



**Figura 1.11. Modos de enlace identificados para el Cu(II) con la región OR y las His 96 y 111 de la PrP a pH fisiológico.** **A**, modos de coordinación en el OR. El componente 1 representa el modo de coordinación principal a una alta ocupación (Cu(II)-Proteína 4:1), mientras que el componente 3 se favorece a una baja ocupación (Cu(II)-Proteína 1:4). El componente 2 representa un modo de coordinación intermedio. La X en el componente 1 puede ser una segunda amida desprotonada o dos moléculas de agua. **B**, unión del Cu(II) a la His96 y His111. La unión del Cu(II) es dependiente del pH, con un pKa de 7.8 para la His96 y de 7.5 para la His111. Esto ocasiona la existencia de dos modos de coordinación a pH fisiológico: 3NO y 4N, mostrados al lado izquierdo y derecho respectivamente. Figura tomada de la referencia [26].

Debido a la relación que hay entre el cobre y la PrP, a esta proteína amiloide se le atribuye un papel funcional en la homeostasis del cobre, en particular en la membrana pre-sináptica donde al coordinar el cobre liberado en la sinapsis evitaría el daño oxidativo a estructuras celulares [2, 56]. A esta teoría la sustentan estudios donde se ha visto que, en cultivos celulares de neuroblastoma, los cambios en las concentraciones extracelulares de Cu(II) inducen la endocitosis de la PrP [2], y que extractos cerebrales de ratones *Knockout* (PrP<sup>0/0</sup>) para la PrP contienen cantidades menores de cobre comparados con



ratones silvestres [25]. Además, los ratones PrP<sup>0/0</sup> exhiben un dramático incremento en la tasa de oxidación peptídica y lipídica, y una marcada deficiencia en la actividad de la enzima superóxido dismutasa y catalasa [25].

Por otro lado, se ha visto que el cobre no solo puede estar involucrado en la función fisiológica de la PrP, sino que también puede jugar un papel importante en las enfermedades priónicas. Esto por el hecho de que un péptido o proteína puede alterar su estructura secundaria al coordinar iones metálicos, lo que en el caso de la proteína prion pudiera favorecer la *isoforma Scrapie*. En vista de esta hipótesis, varios estudios han reportado la existencia de alteraciones en la homeostasis del cobre y otros metales en tejidos cerebrales infectados por PrP<sup>Sc</sup>, encontrándose en los agregados amiloides concentraciones de cobre mucho menores que las observadas en tejido sano [26, 57]. En otros experimentos sumamente interesantes, se ha visto que los periodos de incubación de enfermedades priónicas experimentales pueden estar inversamente influenciados por las variaciones en las concentraciones fisiológicas de cobre [58].

Debido a la relación entre el cobre, la PrP y las TSE's, muchos grupos de investigación se han dado a la tarea de investigar el efecto del cobre en la agregación amiloide de la proteína prion. Sin embargo, como lo muestra la tabla 1.5, los resultados son controversiales. La razón de esta disparidad radica en las diferentes condiciones experimentales empleadas, pues hay que recordar que la agregación amiloide es un proceso multifactorial. Otra causa de la variabilidad en los resultados es el uso de modelos diferentes; mientras unos ocupan la PrP completa otros emplean alguno de sus fragmentos, como la región 106-126 (PrP(106-126)).





Tabla 1.5. Algunos estudios de influencia del Cu(II) sobre la agregación amiloide de la proteína prion.

(rPrP, proteína prion recombinante)

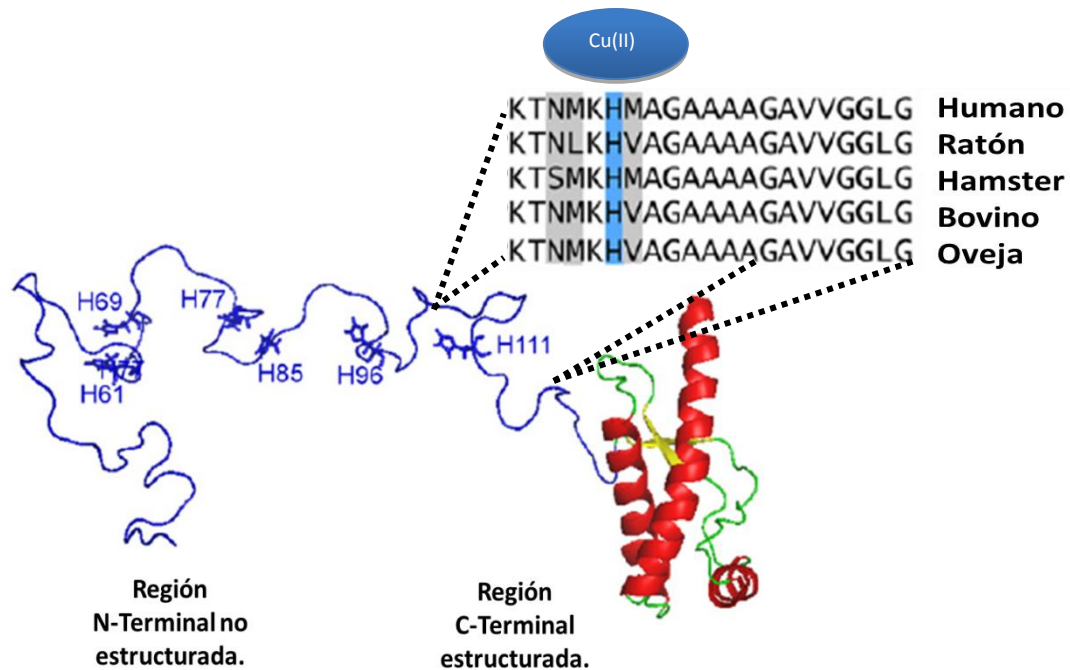
Referencia	Modelo	Conclusión
<i>Biochemistry</i> (2005), 44, 6776-6787 [59].	<i>In vitro</i> , rPrP(23-230) y PrP(89-230)	El Cu(II) <b>inhibe</b> la agregación de la PrP a pH 7.2 y en menor medida a pH 6.0
<i>Biochemistry</i> (2006), 45, 6724-6732 [60].	<i>In vitro</i> , PrP completa y fragmento 82-146.	La agregación amiloide es <b>inhibida</b> por la presencia de Cu(II).
<i>Biochemistry</i> (2001), 40, 8073-8084 [61].	<i>In vitro</i> , PrP(106-126)	El Cu(II) <b>acelera</b> y es necesario para la agregación amiloide.
<i>Biochemical and Biophysical Research Communication</i> (2004), 320, 1240-1246 [62].	<i>In vitro</i> , PrP completa	El Cu(II) <b>revierte</b> la agregación amiloide producida por el Mn(II).
<i>Journal of Biological Chemistry</i> (2011), 286, 38533-38545 [63].	<i>In vitro</i> , rPrP (23-231)	El Cu(II) <b>no promueve la agregación a 37 °C pero sí a temperaturas menores.</b>
<i>Journal of Biological Inorganic Chemistry</i> , (2014), 19, 839-851 [64].	<i>In vitro</i> , PrP(106-126)	El Cu(II) <b>disminuye la agregación</b> y aumenta la toxicidad en cultivos celulares.

### 1.7 El fragmento 106-126 de la proteína prión.

Muchas veces no se puede trabajar con la PrP humana completa debido a que es difícil de purificar y de aislar. Además, sus características amiloidogénicas ocasionan problemas instrumentales, pero sobre todo, por su alta capacidad infecciosa [65]. Es por ello que se sintetizan químicamente varias regiones peptídicas o fragmentos de la PrP para poder caracterizar fisicoquímicamente y patológicamente a esta proteína amiloide, lo cual es especialmente útil cuando se estudian regiones de la PrP que no tienen estructura definida, como lo es el extremo amino terminal [65, 66]. Entre los fragmentos peptídicos más empleados para el estudio de la proteína prion se encuentra el 106-126 (PrP(106-126)).

La secuencia y ubicación del fragmento 106-126 en la PrP se muestran en la figura 1.12. Esta región se encuentra conservada entre varias especies de animales y es considerada una región clave en la iniciación del cambio conformacional de PrP<sup>C</sup> a PrP<sup>Sc</sup> [65, 67]. La secuencia 106-126 se encuentra localizada en la región no estructurada del N-terminal y adyacente a la región globular y bien estructurada de la PrP [66]. Este péptido tiene una estructura primaria anfipática: una región N-terminal hidrofílica

(K<sup>106</sup>TNMKHM<sup>112</sup>) y una C-terminal hidrofóbica (A<sup>113</sup>GAAAAGAVVGGLG<sup>126</sup>); lo que le provee la habilidad de poder interactuar con membranas celulares [66].



**Figura 1.12.** El fragmento 106-126 y su ubicación en la PrP completa. El residuo de histidina 111 sirve como residuo primario para coordinar un ión Cu(II). Figura tomada y modificada de referencia [26].

Este fragmento comparte algunas de las características patogénicas y fisicoquímicas de la PrP<sup>Sc</sup>, entre las cuales se encuentran:

#### *Fisicoquímicas.*

- Presenta estructuras secundarias random coil y hoja  $\beta$  bajo distintas condiciones experimentales, como cambios en el pH [65-67].
- Tiene la capacidad de agregarse formando fibras amiloides resistentes a la acción proteolítica [65-67].

#### *Patogénicas y celulares.*

- Tiene la capacidad de inducir la muerte celular por apoptosis en una gran variedad de cultivos celulares, y al igual que la PrP<sup>Sc</sup>, esta toxicidad es dependiente de la expresión celular de PrP [61, 65, 66]. La causa de la toxicidad se debe a que el PrP(106-126) forma oligómeros no fibrilares, los cuales

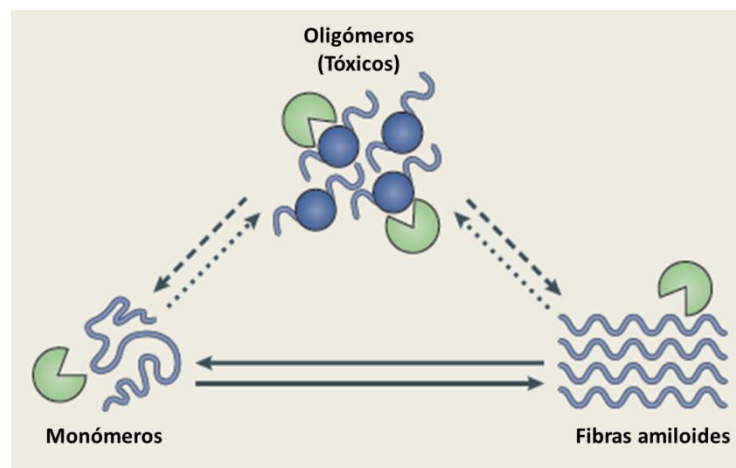
interactúan con la membrana celular y forman poros, lo que compromete la integridad de esta estructura celular [66, 68].

b. Causan proliferación e hipertrofia en cultivos de células gliales [65].

Además de las características mencionadas anteriormente, el PrP(106-126) tiene un residuo de histidina en la posición 111 el cual, como se vio en el punto 1.6, sirve de sitio primario de anclaje para la coordinación de un ión Cu(II). Todo esto hace que el PrP(106-126) sea un buen modelo para caracterizar las propiedades fisicoquímicas y patogénicas de la PrP, así como el efecto del Cu(II) en las mismas, evitando problemas instrumentales y de tipo infeccioso.

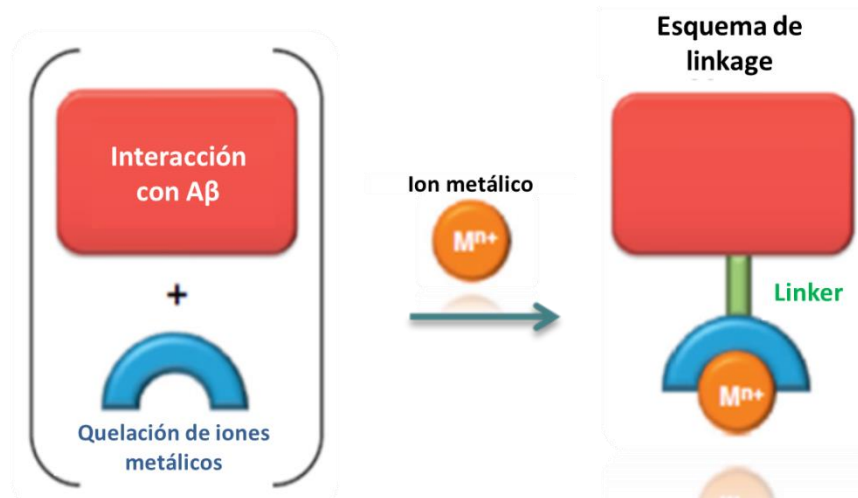
### 1.8 Moléculas bifuncionales moduladoras de la agregación amiloide.

Existe actualmente un gran esfuerzo multidisciplinario para poder desarrollar una terapia farmacológica en contra de las enfermedades priónicas. Como lo muestra la figura 1.13, la estrategia actual consiste en buscar moléculas que puedan modular el proceso de agregación amiloide de la PrP, logrando que el equilibrio entre las especies amiloides existentes se desplace hacia las que son menos tóxicas (fibras), disminuyendo así los daños celulares asociados a la presencia de las estructuras tóxicas (oligómeros) [5].



**Figura 1.13. Estrategia para la intervención terapéutica del proceso amiloide de la PrP.** Las estrategias terapéuticas se basan en la modulación del proceso amiloide, de manera que se reduzca el tiempo de permanencia de estructuras dañinas (oligómeros). Figura tomada de la referencia [5].

Aunque se han estudiado una gran variedad de moléculas con el objetivo de modular la agregación amiloide, hasta la fecha, ninguna de ellas ha podido demostrar ser efectiva en la práctica clínica como tratamiento contra las enfermedades amiloides [65, 69-71]. Una de las razones por las que actualmente no se cuenta con una terapia farmacológica para estos padecimientos es el hecho de que aún no se han comprendido sus mecanismos moleculares en su totalidad.



**Figura 1.14. Diseño de una molécula bifuncional mediante el esquema de *linkage*.** El esquema muestra una molécula bifuncional con la capacidad de interactuar con las fibras amiloides y coordinar los iones metálicos. Figura tomada y modificadas de la referencia [72].

El hecho de que los iones metálicos puedan jugar un papel importante en los mecanismos moleculares de la agregación amiloide ha dado pie al desarrollo de moléculas bifuncionales con el objetivo de caracterizar esta interacción. Una molécula bifuncional es un compuesto químico que, diseñado mediante varios esquemas como el *linkage*, conjunta en su estructura dos moléculas con funciones distintas: una que tiene la capacidad de interactuar con las fibras amiloides y otra que puede coordinar iones metálicos (figura 1.14) [72]. Estas moléculas representan una buena estrategia para el estudio de la interacción entre iones metálicos y agregados amiloides debido a que coordinan principalmente los iones metálicos que están interaccionando con los agregados amiloides y no los que se encuentran en el resto del sistema, como lo haría un agente quelante como el EDTA. Además, es posible que las moléculas bifuncionales al coordinar iones metálicos puedan desplazar el equilibrio amiloide hacia la formación de



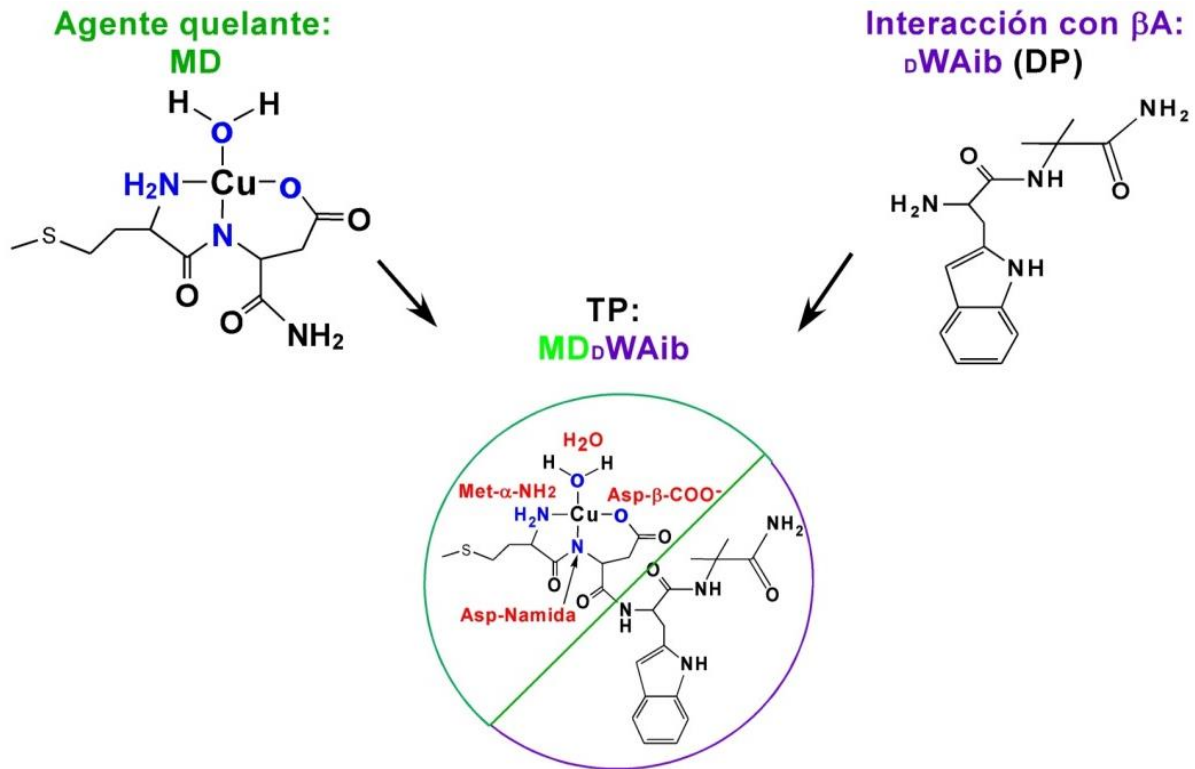
especies relativamente no tóxicas, cimentando las bases para el diseño de moléculas con propiedades terapéuticas contra las enfermedades priónicas.

En la literatura científica se han descrito varias moléculas bifuncionales para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Recientemente, se ha reportado el diseño de un tetrapéptido (TP), no natural, bifuncional y con secuencia M-D-DW-Aib, que tiene la capacidad de modular la agregación de la proteína  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) en presencia del ión Cu(II) [73]. La estructura del TP se muestra en la figura 1.15 y tiene las siguientes funciones:

- a. Interacción con las fibras amiloides (secuencia: DW-Aib). Esta estructura, conocida como DP, tiene la capacidad de interactuar con las fibras amiloides gracias a su residuo de D-Triptófano. Además, tiene función de  $\beta$ -Breaker debido a la presencia del residuo Aib (ácido aminoisobutírico). Reportado en el 2009 por Frydman-Marom y cols., el DP mostró poseer la capacidad de interferir con la agregación de la proteína  $\beta$ -amiloide, específicamente en el ensamble de oligómeros [74].
- b. Coordinación de iones Cu(II) con alta afinidad (secuencia: M-D). Binolfi y col. encontraron que la secuencia M-D (metionina y ácido aspártico) de la proteína  $\alpha$ -Sinucleína son los residuos mínimos necesarios para coordinar iones Cu(II) con una mayor afinidad en comparación con otros iones divalentes [75]. Como se aprecia en la figura 1.15, en la esfera de coordinación del ión Cu(II) están involucrados el grupo amino terminal y una amida desprotonada del MD, así como una molécula de agua.

Márquez y cols. demostraron que los efectos del TP en la agregación amiloide del péptido  $A\beta(1-40)$  son congruentes con su diseño. Por un lado, el TP demostró coordinar iones Cu(II) en forma idéntica a como lo hacen los residuos MD en la proteína  $\alpha$ -Sinucleína y en una relación 1:1, teniendo la capacidad de competir por los iones Cu(II) aun en presencia de la proteína  $A\beta$  [73]. Por otro lado, el TP mostró disminuir la formación de las

especies oligoméricas tempranas y modular la cinética de agregación de la proteína  $\beta$  amiloide, lo que concuerda con las propiedades de  $\beta$ -breaker de los residuos  ${}_D$ W-Aib [73].



**Figura 1.15. Diseño del Tetrapéptido (TP).** La molécula bifuncional TP (secuencia: M-D-DW-Aib) se inspira en dos estructuras con funciones distintas: El DP (secuencia: DW-Aib) que ha demostrado modular la agregación de la proteína  $\beta$ -amiloide; y el MD, que tienen la capacidad de coordinar iones Cu(II) con alta afinidad en la proteína  $\alpha$ -Sinucleína. Figura cortésmente proporcionada por Márquez y cols. [73].

Las proteínas amiloidogénicas, a pesar de tener secuencias de aminoácidos distintas y generar patologías con signos y síntomas diferentes, comparten mecanismos moleculares de agregación semejantes. Es por este motivo que resulta razonable el pensar que una molécula que ha mostrado modular la agregación de la proteína  $\beta$ -amiloide en presencia de Cu(II) presente efectos similares en otro modelo amiloidogénico. Tal es el caso del uso del TP en la agregación amiloide de la PrP en presencia de Cu(II).



### 1.9 Planteamiento del problema

Actualmente, se conocen varias enfermedades asociadas al plegamiento anómalo de las proteínas y la formación de agregados amiloides; por ejemplo, el mal de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, la diabetes mellitus tipo II y las enfermedades priónicas, por mencionar algunas. En todas ellas, aún no se conocen por completo los factores que propician la agregación amiloide ni el impacto de este fenómeno en la etiología de la enfermedad.

Se ha visto que los iones metálicos, especialmente el ión Cu(II), pueden jugar un papel importante en la agregación amiloide y en la toxicidad de la proteína PrP. Sin embargo, las implicaciones de la interacción Cu-PrP en la formación de fibras amiloides aún no está del todo comprendidas. El uso de moléculas bifuncionales capaces de interaccionar con las fibras amiloides del fragmento 106-126 y coordinar al ión Cu(II) será útil para determinar cual es el papel de este ión metálico en el mecanismo de agregación de la proteína prion.



### 1.10 Justificación.

Las enfermedades priónicas son patologías contra las que no existe un tratamiento farmacológico o de cualquier otro tipo. La carencia de información suficiente para comprender el mecanismo de conversión de PrP<sup>C</sup> a PrP<sup>Sc</sup>, los factores que propician la agregación amiloide y los mecanismos de toxicidad de la PrP<sup>Sc</sup> son algunas de las razones por las que no se han podido desarrollar tratamientos farmacológicos. El uso de moléculas bifuncionales que interaccionen con las fibras amiloides de la proteína prion y a la vez coordinen el ión Cu(II) será útil para discernir la influencia de estas entidades químicas sobre el fenómeno de agregación de la PrP. Esto ayudará a comprender los mecanismos moleculares de las enfermedades priónicas y el desarrollo de terapias farmacológicas contra estas enfermedades neurodegenerativas.

### 1.11 Hipótesis.

Los péptidos no naturales M-D (DP) y M-D<sub>D</sub>W-Aib (TP) son capaces de interactuar con el fragmento PrP(106–126) y afectar su agregación amiloide. El péptido TP es una molécula bifuncional capaz de quelar iones Cu(II) e interferir con la agregación amiloide del PrP(106–126) en presencia del ión Cu(II).





# Capítulo II

## OBJETIVOS.

### 2.1 Objetivo general.

- Evaluar el efecto del ión Cu(II) y de los péptidos no naturales M-D (DP) y M-D-DW-Aib (TP) en la agregación del fragmento 106-126 de la proteína prion humana.

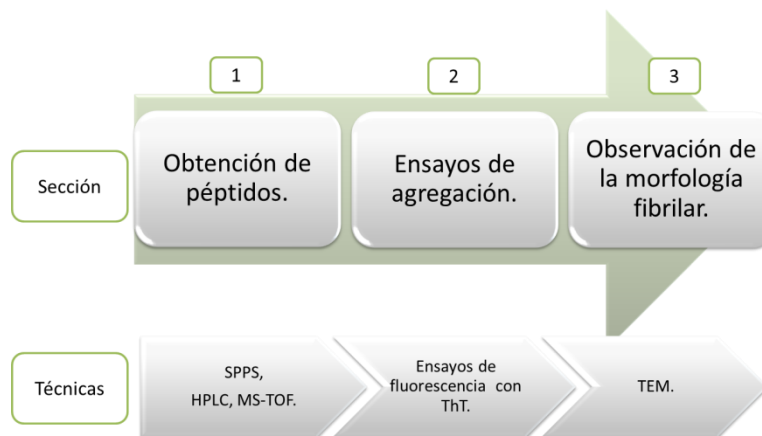
### 2.2 Objetivos particulares.

- Sintetizar, purificar, liofilizar y caracterizar los péptidos PrP(106-126), M-D (DP) y M-D-DW-Aib (TP).
- Determinar el efecto del ión Cu(II) en la agregación del fragmento 106-126 de la proteína prion humana.
- Evaluar el efecto de los péptidos no naturales M-D (DP) y M-D-DW-Aib (TP) en la cinética de agregación del PrP(106-126) en ausencia y presencia del Cu(II). El DP servirá como control para determinar los efectos del TP.
- Determinar el efecto del ión Cu(II) y de los péptidos TP y DP sobre la morfología de las estructuras fibrilares formadas por el fragmento 106 – 126 de la proteína prion humana.

# Capítulo III

## MATERIALES Y MÉTODOS.

Las actividades experimentales realizadas para cumplir los objetivos del presente proyecto se dividieron en tres secciones, como lo muestra la figura 3.1.



**Figura 3.1. Secciones experimentales del presente proyecto.** Acrónimos del Inglés: SPPS, Síntesis Peptídica en Fase Sólida; HPLC, Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia; MS-TOF, Espectrometría de Masas con detección de Tiempo de Vuelo; ThT, tioflavina T; TEM, Microscopía Electrónica de Transmisión.

La primera sección tuvo el objetivo particular de sintetizar los péptidos DP, TP y PrP(106-126) a partir de aminoácidos individuales mediante la Síntesis Peptídica en Fase Sólida (SPPS). En esta misma etapa, los péptidos fueron purificados por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC), liofilizados y caracterizados por HPLC y Espectrometría de Masas con detector de Tiempo de Vuelo (MS-TOF). Una vez obtenidos los péptidos con una pureza adecuada (mayor al 95.0 %), se prepararon soluciones stock de los mismos y su concentración se determinó mediante Absorción Electrónica. En el caso del PrP(106-126), su estructura secundaria fue monitoreada durante la preparación de su solución stock empleando Dicroísmo Circular Electrónico (ECD).



La segunda etapa de este proyecto consistió en evaluar las cinéticas de agregación del PrP(106-126) mediante ensayos de fluorescencia con tioflavina T (ThT). También se evaluó el efecto del ión Cu(II), DP, TP, DP+Cu(II) y TP+Cu(II) en las cinéticas de agregación del PrP(106-126). Todos los ensayos de agregación se corrieron por triplicado como mínimo. Además, se realizó una serie de espectros de fluorescencia para determinar el posible efecto de apagamiento de la fluorescencia (quenching) del PrP(106-126)-ThT debido a la presencia del Cu(II), del DP o del TP.

La observación de la morfología fibrilar se llevó a cabo a la par de los ensayos de fluorescencia con ThT. Para ello, se tomó una muestra al final de la cinética de agregación de cada una de las condiciones evaluadas en los ensayos de fluorescencia (excepto PrP+0.5 eq. de DP y PrP+1.0 eq. de DP). Estas muestras se sometieron a un proceso de tinción negativa con acetato de uranilo y la morfología fibrilar se determinó empleando un microscopio electrónico de transmisión. Estas observaciones se realizaron por duplicado.

### 3.1 Obtención de péptidos.

#### 3.1.1 Síntesis.

Los péptidos empleados para este estudio fueron sintetizados mediante SPPS empleando la estrategia del grupo protector fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc) en reactores tipo jeringa de 10 mL y a temperatura ambiente. Para ello se empleó una resina MBHA Rink Amide (0.59 mmol/g) marca *NovaBiochem*. Los lavados de la resina se realizaron con dimetilformamida (DMF, *Meyer*), alcohol isopropílico (IPA, *Fermont*) y diclorometano (DCM, *Meyer*). Todos los compuestos mencionados anteriormente fueron grado reactivo (GR).

Los aminoácidos empleados para la síntesis de los péptidos fueron aminoácidos con grupo N-protector Fmoc y en algunos casos con grupo protector de cadena lateral (*NovaBiochem*, *CEM*). El orden de síntesis (acoples) se hizo comenzando del extremo carboxilo terminal y de acuerdo a la secuencia de los péptidos en cuestión (tabla 3.1). Por



cada ciclo de acople se empleó 1-hidroxibenzotriazol (HOBt, *CEM*) como supresor de la racemización; N,N-diisopropil-carbodiimida (DIC, *Sigma Aldrich*, 99.0%) como agente activador; y DCM (*Meyer*, GR) y 1-metil-2-pirrolidinona (NMP, *Sigma Aldrich*, 99.5%) como disolventes. La desprotección de los aminoácidos se realizó mediante tres ciclos de 45 minutos empleando una solución ternaria de: 30% de piperidina (*Sigma Aldrich*, 99.0%), 0.1% de 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU, *Fluka*, grado analítico) y 69.9 % de DMF (*Meyer*, GR).

**Tabla 3.1. Secuencia de los péptidos sintetizados en este estudio.**

Nombre	Secuencia
PrP(106-126)	$\text{CH}_3\text{CO}-\text{NH}_2\text{-KTNMKHMAGAAAAGAVVGGGLG}-\text{CO}-\text{NH}_2$
DP	$\text{NH}_2\text{-DTrp-Aib}-\text{CO}-\text{NH}_2$
TP	$\text{NH}_2\text{-Met-Asp-DTrp-Aib}-\text{CO}-\text{NH}_2$

Todos los ciclos de acople y desprotección fueron monitoreados por la prueba colorimétrica de *Káiser* (prueba de Ninhidrina), la cual da un color azul en presencia de grupos amino libre (primarias o secundarias) o amarillo en su ausencia. La prueba consiste en hacer reaccionar en baño de vapor un poco de resina de síntesis con una solución A y una B en proporción 2 a 1. La solución A contiene fenol (*SAFC*, 99.0%), cianuro de potasio (*Sigma Aldrich*, GR), piridina (*Sigma Aldrich*, 99.0%), alcohol etílico absoluto (*Reproquifin*, 99.5%) y agua MiliQ (Resistividad mayor de 18 megaOhms/cm); y la solución B ninhidrina (*Sigma Aldrich*, GR) en alcohol etílico absoluto (*Reproquifin*, 99.5%).

Los extremos C-terminal de todos los péptidos sintetizados estuvieron amidados, mientras que los extremos N-terminal del DP y TP se dejaron con el grupo amino libre. El extremo N-terminal del PrP(106-126) fue el único que estuvo acetilado. La acetilación se llevó a cabo empleando una solución 1:1:1 de piridina (*Sigma Aldrich*, 99.0%), anhídrido acético (*Sigma Aldrich*, 98.0%) y DMF (*Meyer*, GR). Al finalizar la síntesis, los péptidos fueron desanclados de la resina (*cleavage*) empleando una solución de ácido trifluoroacético (TFA, *Sigma Aldrich*, GR), tri-isopropilsilano (TIS, *Sigma Aldrich*, 99.0%), 1,2-etanoditiol (EDT, *Fluka*, 98%) y agua MiliQ (resistividad mayor de 18 megaOhms/cm)



en un porcentaje de 92.5% : 2.5% : 2.5% : 2.5%, respectivamente. Después de 2 horas en el proceso de *cleavage* se adicionó éter etílico frío (*Analitika*, GR) con el objetivo de precipitar el péptido desanclado. Posteriormente, la mezcla obtenida se sometió a tres ciclos de centrifugación (marca Eppendorf, modelo 5810 R) de 3800 rpm durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se decantó en un frasco de vidrio y el precipitado se dejó secar toda una noche.

### 3.1.2 Purificación.

La purificación se realizó mediante HPLC fase reversa. Para ello, el sólido obtenido al final de la síntesis se pesó (*Ohaus*, modelo AS200), se disolvió en agua MilliQ (resistividad mayor de 18 megaOhms/cm) y se filtró por membranas Millipore PVDF con tamaño de poro de 45 µm. Posteriormente, se hicieron los cálculos necesarios para tener un tamaño de carga no mayor a 8 mg por inyección cromatográfica. El equipo cromatográfico empleando fue un HPLC marca *Wáter* modelo 1525, con detector de arreglo de diodos modelo 2998 de la misma marca. Las condiciones cromatográficas se muestran en la tabla 3.2.

**Tabla 3.2. Condiciones cromatográficas para la purificación de los péptidos PrP(106-126), DP y TP.**

Parámetro	Descripción
<b>Columna</b>	Waters C18 µBondapack semipreparativa (7.8 mm x 300 mm, 10 µm, 125 Å)
<b>Temperatura</b>	Ambiente
<b>Vel. de flujo</b>	2.5 mL/min
<b>Tipo de flujo</b>	Gradiente (composición de fase móvil)
<b>Fase móvil</b>	A. TFA (GR) al 0.05% en agua MilliQ (resistividad mayor de 18 megaOhms/cm) B. TFA (GR) al 0.01% en acetonitrilo ( <i>J. T. Baker</i> , grado HPLC)
<b>Detección</b>	214 nm para PrP(106-126) 280 nm para DP y TP.

De cada una de las inyecciones realizadas al sistema cromatográfico se colectaron las fracciones, que fueron analizadas en un equipo *Agilent Technologies* 1100 series MSD-TOF. Las fracciones se clasificaron y agruparon de acuerdo al patrón de señales



observadas en los espectros de masas, siendo las más puras aquellas que tuvieran mayoritariamente señales asociadas al ión molecular y/o aductos del mismo.

### 3.1.3 Liofilización.

Las fracciones finales resultantes de la purificación fueron congeladas empleando nitrógeno líquido y se almacenaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  en un equipo de ultra congelación marca *SO-LOW*. La liofilización se llevó a cabo en un equipo LABCONCO a una temperatura menor de  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  y a una presión de 0.18 mBar. Al final de la liofilización, los péptidos fueron resguardados hasta su uso en un desecador.

### 3.1.4 Caracterización.

Para caracterizar a los péptidos se preparó de cada uno de ellos una solución de 1 mg/mL en agua MilliQ (resistividad mayor de 18 megaOhms/cm). Esta solución se analizó mediante HPLC y MS-TOF usando el mismo equipo y las mismas condiciones descritas en el numeral 3.1.2., excepto la columna (Waters Symetry C18, 4.6x150 mm) y el volumen de flujo (1.0 mL/min). Los criterios para decidir si un péptido podría ser ocupado para las pruebas de agregación fueron:

- a. Área del pico cromatográfico de interés mayor al 95.0% de la suma total del área de todos los picos cromatográficos registrados en el cromatograma (área relativa).
- b. Las señales más abundantes observadas en el espectro de masas deben de provenir del ión molecular o de distintos aductos del péptido de interés.

### 3.1.5 Preparación de soluciones stock de los péptidos.

Se prepararon soluciones acuosas de los péptidos sintetizados y se cuantificaron empleando Absorción Electrónica en la región UV. En el caso del DP y TP, dado sus características de difícil manipulación, se adicionó 1 mL de agua MilliQ (resistividad mayor de 18 megaOhms/cm) a los viales donde se obtuvo el sólido liofilizado. La solución resultante se filtró por una membrana *Millipore* PVDF de tamaño de poro de 45  $\mu\text{m}$  y se



cuantificó a 280 nm (espectrofotómetro UV Agilent 8453) empleando la ecuación de la ley de Lambert-Beer con un coeficiente de extinción molar de  $3.328 \text{ cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$  para el DP y  $3.77$  para el TP  $\text{cm}^{-1} \text{mM}^{-1}$ . Ambos coeficientes fueron determinados con anterioridad en nuestro laboratorio. Las soluciones de DP y TP fueron almacenadas en refrigeración ( $8 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

En el caso del PrP(106-126), se pesaron con precisión  $2.0 \text{ mg}$  del péptido liofilizado y se disolvieron en  $1.5 \text{ mL}$  de agua MilliQ (resistividad mayor de  $18 \text{ megaOhms/cm}$ ). La solución resultante se sometió a sonicación (3 ciclos de cinco minutos con dos minutos de reposo entre ciclos) con el fin de aumentar la solubilidad, se filtró por una membrana Millipore PVDF de tamaño de poro de  $45 \text{ }\mu\text{m}$  y se cuantificó de la misma manera que los otros péptidos empleando un coeficiente de extinción molar de  $16.77 \text{ cm}^{-1} \text{mM}^{-1}$ , el cual se determinó en estudios anteriores en nuestro laboratorio.

Se empleó ECD (equipo *Jasco J815 CD*) para monitorear la estructura secundaria del PrP(106-126) durante la sonicación. Para estos experimentos se empleó una solución de PrP(106-126) con concentración  $10 \text{ }\mu\text{M}$  en una solución amortiguadora de fosfatos ( $2.5 \text{ }\mu\text{M}$ ) (Sigma Aldrich, GR) con un pH  $7.4$  y una concentración salina de NaCl  $5 \text{ mM}$  (J.T. Baker, GR).

Finalmente, se fraccionó la solución de PrP(106-126) en alícuotas cuyo volumen fuera apenas suficiente para preparar una corrida de ensayos de agregación (aproximadamente  $250 \text{ }\mu\text{L}$  por alícuota). Estas alícuotas se almacenaron en congelación ( $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ ) y se descongelaron una a una dependiendo el progreso de los ensayos de agregación. Los residuos de cada alícuota no fueron vueltos a ocupar en ensayos de agregación posteriores.

### **3.2 Ensayos de agregación y espectros de fluorescencia.**

Se caracterizó la cinética de agregación del PrP(106-126) solo, y en presencia de Cu(II), DP, TP, DP+Cu(II) y TP+Cu(II) mediante ensayos de fluorescencia con ThT. Los distintos grupos de estudio, así como las concentraciones de cada componente se muestran en la tabla 3.3. Estos ensayos se evaluaron por triplicado como mínimo.



**Tabla 3.3. Grupos de estudio evaluados en los ensayos de fluorescencia con ThT.** La abreviación eq. corresponde a “equivalentes”, los cuales fueron calculados en base a la concentración usada del PrP(106-126) ( $20 \mu\text{M} = 1$  equivalente).

Grupo	Nombre	PrP(106-126) ( $\mu\text{M}$ )	Cu(II) ( $\mu\text{M}$ )	DP ( $\mu\text{M}$ )	TP ( $\mu\text{M}$ )
1	PrP	20	-	-	-
2	PrP+0.6 eq. Cu(II)	20	12	-	-
3	PrP+0.5 eq. DP	20	-	10	-
4	PrP+1.0 eq. DP	20	-	20	-
5	PrP+2.0 eq. DP	20	-	40	-
6	PrP+4.0 eq. DP	20	-	80	-
7	PrP+2.0 eq. TP	20	-	-	40
8	PrP + 0.6 eq. Cu(II) + 2.0 eq. DP	20	12	40	-
9	PrP + 0.6 eq. Cu(II) + 2.0 eq. TP	20	12	-	40

Para llevar a cabo los experimentos de agregación se prepararon las siguientes soluciones:

- Solución amortiguadora pH  $7.400 \pm 0.004$  de 4-etilmorfolina (NEM, *Sigma Aldrich*, 97.0%) y cloruro de sodio (*J. T Baker*, GR).
- Solución de ThT (*Sigma Aldrich*, GR). Se filtró por membrana Millipore ( $45 \mu\text{m}$  de tamaño de poro) y se cuantificó mediante Absorción Electrónica en la región UV empleando un coeficiente de extinción molar de  $22\,000 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ .
- Solución de sulfato de cobre pentahidratado (*Sigma Aldrich*, 99.0%).

Todas las soluciones anteriores se prepararon en agua MilliQ (resistividad mayor de 18 megaOhms/cm), se filtraron por membrana Millipore de  $45 \mu\text{m}$  y se almacenaron a temperatura ambiente. Las cinéticas de agregación se realizaron bajo las condiciones descritas en la tabla 3.4 empleando un espectrofluorómetro *Cary Eclipse*.





Tabla 3.4. Condiciones de los ensayos de fluorescencia con ThT.

Condición	Valor	Condición	Valor
Temperatura	30 ° C	Concentración salina	NaCl, 10 mM
$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$	450 nm/485 nm	pH	7.4
Volumen por celda	2 mL	Amortiguador de pH	NEM, 10 mM
Fluoróforo	ThT, 20 $\mu$ M		

### 3.3 Microscopía Electrónica de Trasmisión.

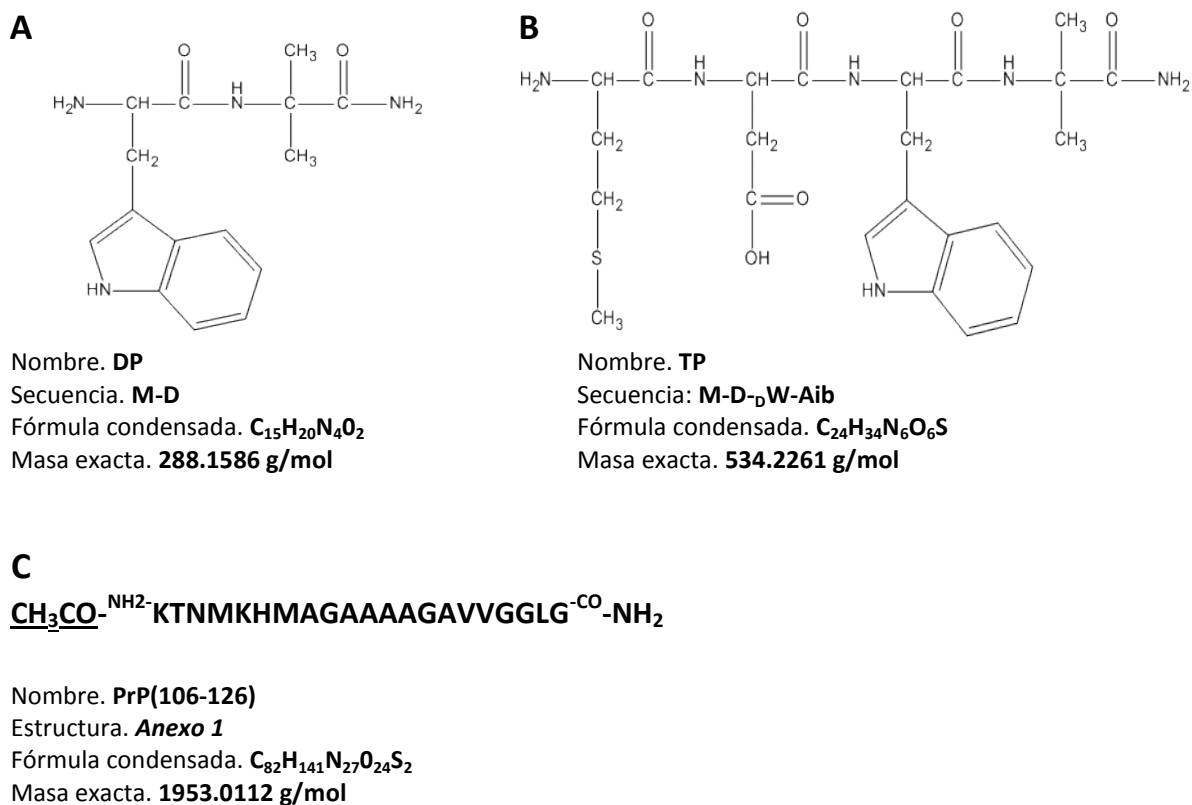
Para la observación de la morfología fibrilar del PrP(106-126) se empleó microscopía electrónica de transmisión. Una vez terminados los ensayos de fluorescencia con ThT, el contenido de las celdas (aproximadamente 2 mL) fue almacenado en refrigeración (8 °C) y 24 horas después de su almacenamiento se les retiró 1700  $\mu$ L de sobrenadante. La muestra restante (aproximadamente 300  $\mu$ L) se resuspendió cuidadosamente, e inmediatamente después se tomó una alícuota de 10  $\mu$ L y se colocó en una rejilla de cobre (*Electron Microscopy Sciences*, 200 líneas/pulgada) previamente preparada con el polímero Formvar (*Polysciences Inc.*, GR) y sombreada con carbón. Posteriormente, las rejillas con muestra se sometieron a un proceso de tinción negativa empleando una solución al 1.0% de acetato de uranilo dihidratado (*Electron Microscopy Science*, GR). Las observaciones se realizaron por duplicado en un microscopio electrónico de transmisión JEOL-1400 EX en la unidad de microscopía LaNSE del Cinvestav, Unidad Zacatenco.

# Capítulo IV.

## RESULTADOS.

### 4.1 Obtención de péptidos

La primera parte del proyecto consistió en la síntesis, purificación y liofilización de los péptidos DP (molécula control), TP (molécula bifuncional) y PrP(106-126), cuyas estructuras y masas exactas se muestran en la figura 4.1. La estructura completa del fragmento 106-126 se muestra en el anexo 1.



**Figura 4.1. Estructuras y masa exacta de los péptidos sintetizados. A, B,** estructuras químicas del DP y TP, respectivamente. **C,** secuencia del fragmento 106-126 de la proteína prion humana, el cual se encuentra acetilado en el extremo N-terminal y amidado en el C-terminal. La estructura química del PrP(106-126) se muestra en el anexo 1.



De los péptidos sintetizados solo el PrP(106-126) fue acetilado en el extremo N-terminal. Esta acetilación tuvo el objetivo de evitar la interferencia del grupo amino libre del residuo K111 en la coordinación del ión Cu(II). Los grupos amino libres pueden participar en la esfera de coordinación de los iones metálicos, como en el caso del TP, donde el grupo  $-NH_2$  de la metionina forma parte de la esfera de coordinación del Cu(II) [73]. Al evitar que el grupo amino libre del extremo N-terminal del PrP(106-126) participe en la coordinación se emula lo que pasa en la PrP completa.

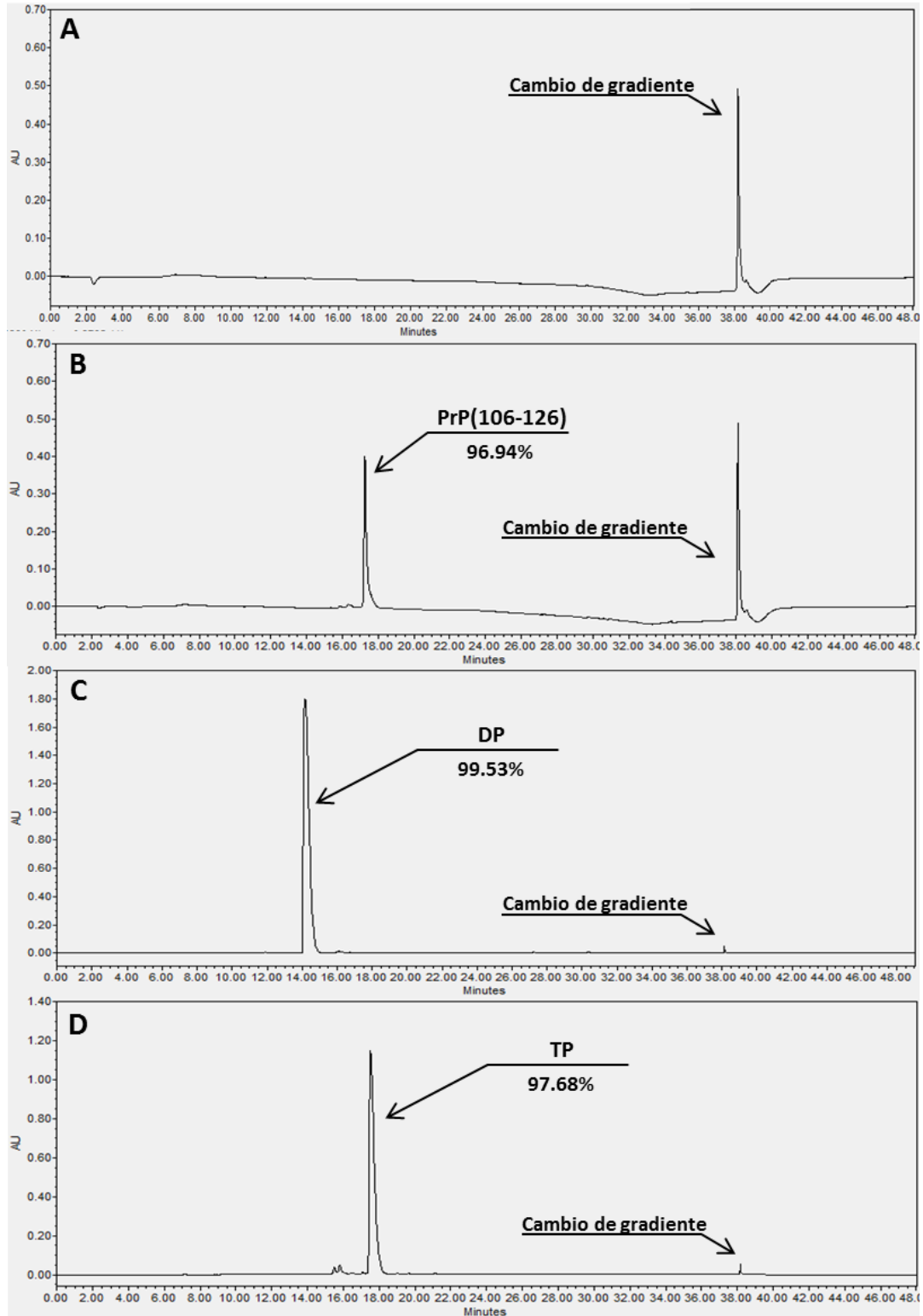
Por otro lado, los péptidos sintetizados se caracterizaron por HPLC fase reversa y por MS-TOF. La espectroscopía de masas se empleó como prueba de identidad, tanto para el monitoreo del avance y término de la síntesis, así como para el péptido final. Esta técnica es muy importante, pues tiene la capacidad de encontrar en la muestra estructuras distintas a la esperada, como por ejemplo, la presencia de PrP(106-126) con uno o dos residuos de metionina oxidados. En caso de que el producto mayoritario de la síntesis hubiera estado oxidado, se hubiera requerido la síntesis de un nuevo lote de PrP(106-126) dado que la oxidación de estos residuos altera la coordinación de los iones Cu(II). Por su parte, la prueba de HPLC en fase reversa fue empleada como criterio de pureza, pues tiene la capacidad de separar los componentes de una muestra dependiendo de sus características de solubilidad (polar/no polar). Empleando esta técnica se determinó que los péptidos liofilizados tienen una pureza de más del 95.0%.

#### 4.1.1 Caracterización.

La figura 4.2 muestra los cromatogramas tipo de las soluciones acuosas preparadas con los péptidos purificados y liofilizados. En los cromatogramas del PrP(106-126), DP y TP se puede apreciar un solo pico cromatográfico principal a los 17.2 min., 14.1 min. y a los 17.5 min., respectivamente. Los picos cromatográficos de interés estuvieron acompañados por otros de área mucho menor registrados alrededor de los 16 minutos. En todos los casos, el área relativa del pico principal fue mayor al 95.0% (96.94% para el PrP(106-126), 99.53% para el DP y 97.68% para el TP).



Los espectros de masas del PrP(196-126), DP y TP, que se muestran en la figura 4.3, muestran que los compuestos químicos más abundantes presentes en los sólidos liofilizados corresponden a las estructuras químicas de cada uno de los péptidos de interés. En el caso del PrP(106-126) se observa la señal del ión molecular (PrP(106-126)-H<sup>+</sup>) a 1954.0420 m/z y de dos aductos, uno diprotonado a 977.5269 m/z (PrP(106-126)-2H<sup>+</sup>) y otro con un protón y un ión sodio a 988.5276 m/z ((PrP(106-126)-Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>)). En el espectro de masas del DP se aprecia su ión molecular (DP-H<sup>+</sup>) y un aducto con un ión sodio (DP-Na<sup>+</sup>) con señales a 289.1805 m/z y a 311.1492 m/z, respectivamente. En este mismo espectro se puede apreciar que el DP también ionizó en forma de dímero (DP-DP) con un H<sup>+</sup> y un Na<sup>+</sup>, mostrando para la primera especie una señal a 577.3292 m/z y para la segunda 599.3071 m/z. Finalmente, el espectro del TP solo muestra una señal abundante correspondiente al ión molecular de este péptido (TP- H<sup>+</sup>) a 535.2413 m/z.



**Figura 4.2.** Análisis por HPLC fase reversa de los péptidos sintetizados y del disolvente empleado para realizar las soluciones stock. **A**, Agua MilliQ. **B**, PrP(106-126) tr = 17.2 min. **C**, DP tr = 14.1 min. **D**, TP tr = 17.5 min. El área relativa de los picos de interés para el PrP(106-126), DP y TP fue de 96.94%, 99.53% y 97.68%, respectivamente. Tiempo de retención (tr).

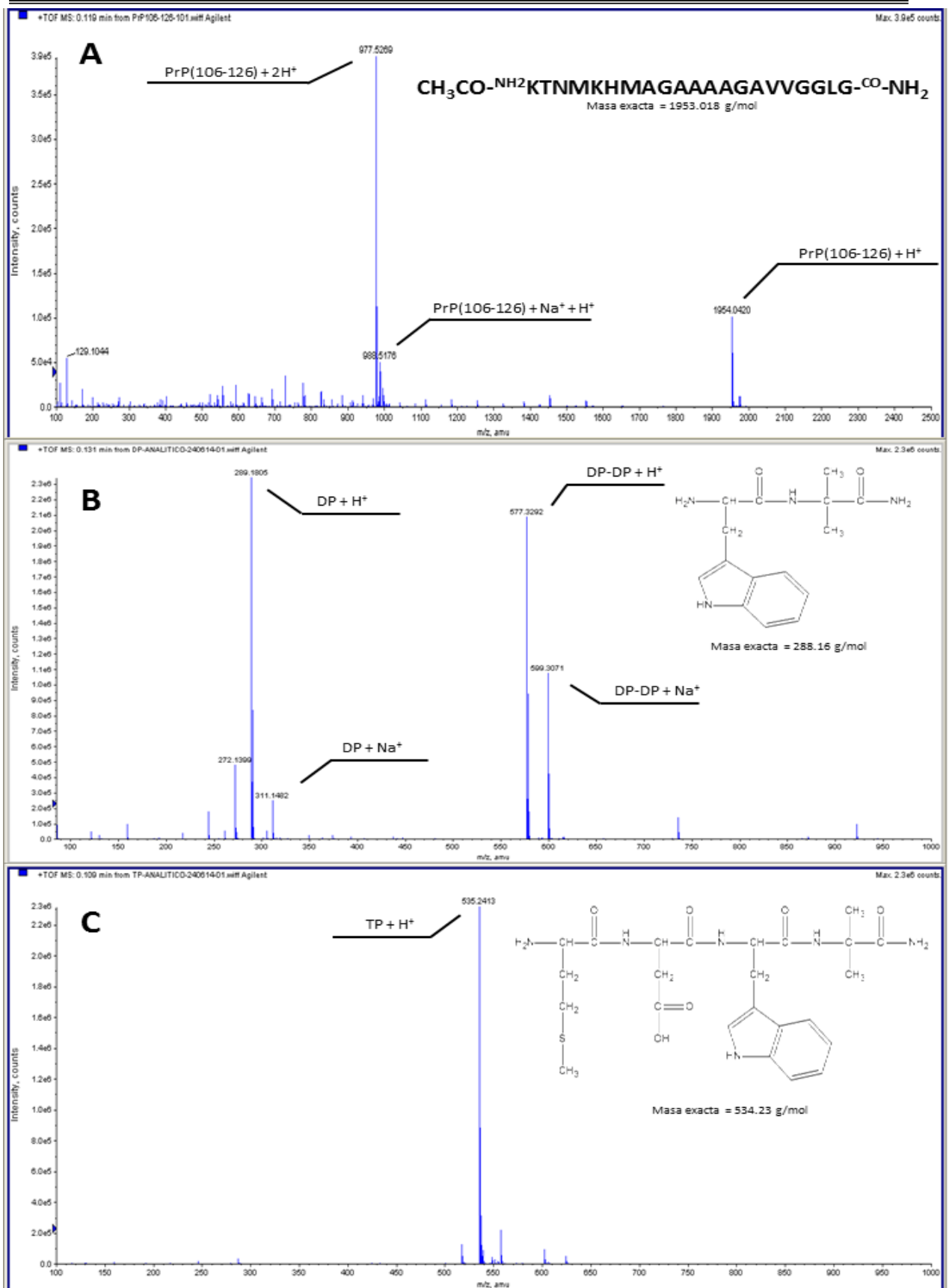
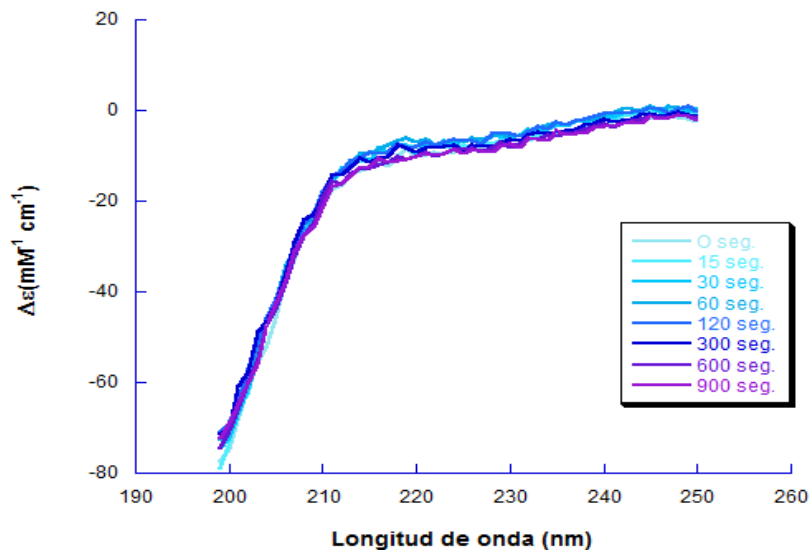


Figura 4.3. Espectros de MS-TOF de los péptidos sintetizados. **A**, PrP(106-126), **B**, DP y **C**, TP. En cada uno de los espectros se muestra la secuencia o estructura química de los péptidos y se indican las señales correspondientes a sus aductos y su ión molecular.

#### 4.1.2 Preparación de soluciones stock de los péptidos (monitoreo de la estructura secundaria del PrP(106-126) empleando ECD).

En el proceso de preparación de las soluciones stock de los péptidos sintetizados, solo el PrP(106-126) fue sometido a un proceso de sonicación con el objetivo de incrementar la fracción disuelta, sin embargo, la sonicación es una fuente de estrés para las proteínas y los péptidos pudiendo inducir la formación de hojas  $\beta$  [76]. Para demostrar que el proceso de sonicación no tiene ningún efecto en la estructura secundaria del PrP(106-126) se empleó ECD, pues es una técnica espectroscópica en la que se pueden observar bandas características de la estructura secundaria de péptidos y proteínas.

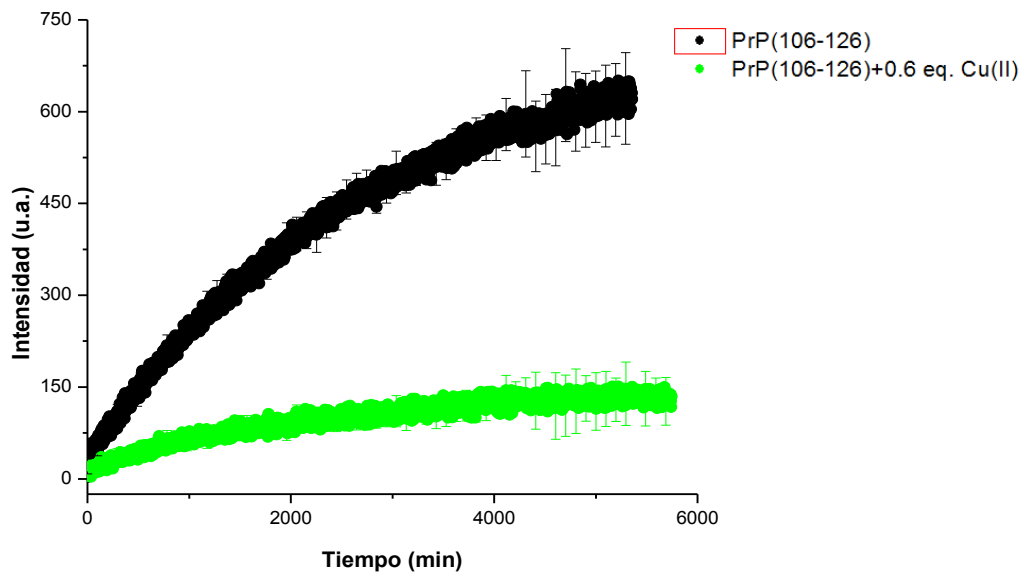
En la figura 4.4, se observa que la estructura del PrP(106-126) permanece sin cambios significativos a lo largo de los 900 segundos de sonicación a los cuales es sometido, durante la preparación de las soluciones stock. En el mismo espectro de ECD se puede apreciar una banda negativa con un mínimo alrededor de 198 nm, la cual es característica de una estructura tipo *Random-coil*, que coincide con lo reportado en la literatura para el PrP(106-126) [77]. Con esta prueba se asegura que el comportamiento de las cinéticas de agregación es propio de la condición evaluada y no por un artefacto de la preparación de la solución de partida del PrP(106-126).



**Figura 4.4. Espectro de ECD que muestra el comportamiento de la estructura secundaria del PrP(106-126) sometido a sonicación.** Condiciones: PrP(106-126) 10  $\mu$ M, solución amortiguadora de fosfatos 2.5 mM y NaCl 5.0 mM a pH 7.4.

## 4.2 Ensayos de agregación.

Primero, se determinó el comportamiento de la cinética de agregación del PrP(106-126) (control), utilizando el ensayo de fluorescencia de ThT. Posteriormente, se evaluó el efecto de la presencia de Cu(II), DP, TP, DP+Cu(II) y Tp+Cu(II). La figura 4.5 muestra la cinética de agregación del PrP(106-126), en presencia y ausencia del ión Cu(II), en la cual se observa que la respuesta promedio de la fluorescencia del PrP(106-126) alcanza las 600 u.a., mientras que en presencia de Cu(II) la intensidad se ve disminuida drásticamente, alcanzando valores no mayores a 150 u.a. Este decremento en la fluorescencia de las cinéticas de agregación del PrP(106-126) en presencia de Cu(II) está asociado a una inhibición drástica la agregación amiloide. Otra posible consecuencia de la disminución de la fluorescencia es que el ión Cu(II) interfiera con el proceso de fluorescencia de la ThT unida a fibras amiloides del PrP(106-126), ejerciendo un fenómeno de apagado o quenching. Sin embargo, como se explica en el apartado 4.3, este no fue el caso.

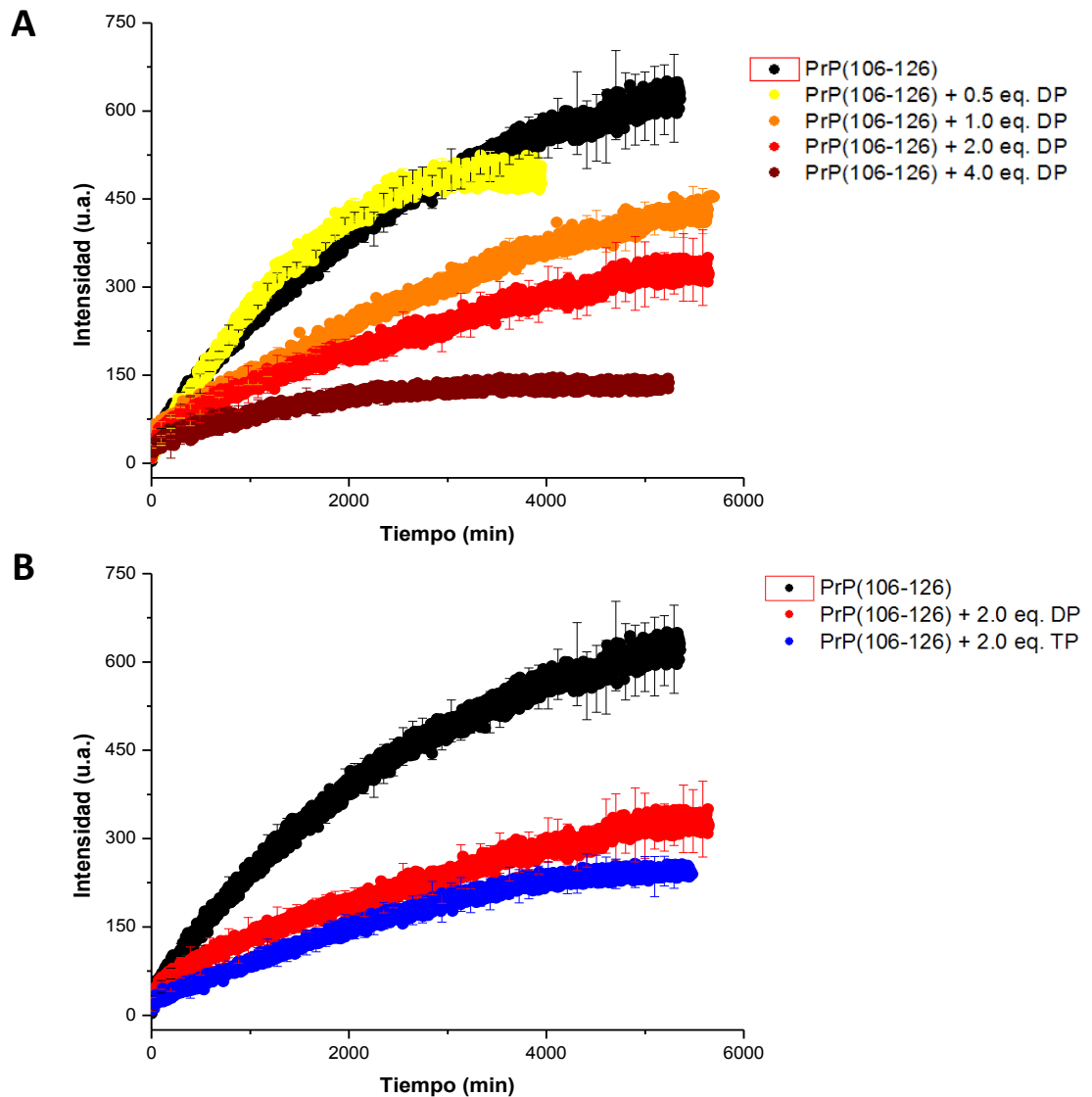


**Figura 4.5. Efecto del ión Cu(II) en la cinética de agregación del PrP(106-126).** Cinéticas de agregación amiloide del péptido PrP(106-126) en ausencia (negro) y presencia (verde) de 0.6 eq. de Cu(II), seguidas con el ensayo de fluorescencia de ThT: solución amortiguadora de NEM 10 mM, pH 7.4; 30 °C; concentración salina (NaCl) 10 mM; concentración de PrP(106-126) 20  $\mu$ M.

Para determinar el efecto de los péptidos no naturales en la agregación del PrP(106-126) se corrió primeramente un barrido con distintas concentraciones de DP. En

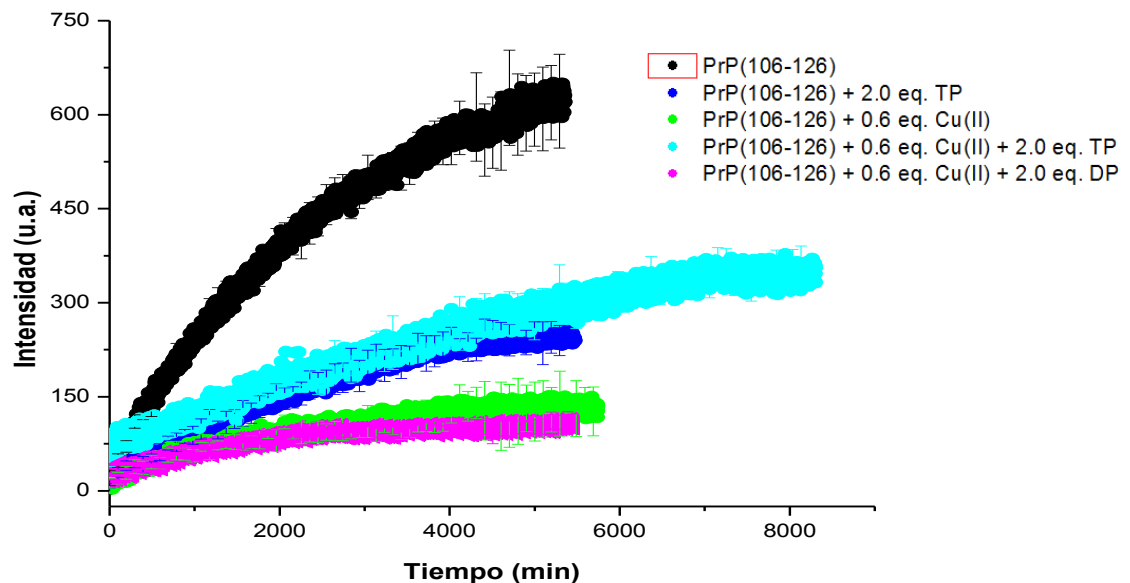


la figura 4.6 se puede apreciar que la intensidad de la fluorescencia del ThT-PrP(106-126) disminuye en forma dependiente de la cantidad de DP adicionada (de 0.5 a 4.0 eq.), alcanzando valores menores a 150 u.a. al adicionarse 4.0 eq. de DP. Posteriormente, se evaluó el efecto de 2.0 eq. de TP en la agregación del PrP(106-126) y se comparó con el efecto observado en la adición de la misma concentración de DP. En la figura 4.5 se observa que tanto el DP como el TP inhiben la agregación del PrP(106-126) en magnitud similar.



**Figura 4.6. Efecto del DP y TP en la cinética de agregación del PrP(106-126).** A, Cinética de agregación del PrP(106-126) en presencia de concentraciones crecientes de DP (de 0.5 a 4.0 eq.) B, comparación del efecto de inhibición de 2.0 eq. de DP (rojo) y 2.0 eq. de TP (azul) en la agregación del PrP(106-126). Condiciones de los ensayos de fluorescencia con ThT: Solución amortiguadora de NEM 10 mM, pH 7.4; 30 °C; concentración salina (NaCl) 10 mM; concentración de PrP(106-126) 20  $\mu$ M.

Finalmente, se evaluó el efecto de la adición de 2.0 equivalentes de DP o TP en la cinética de agregación del PrP(106-126) en presencia de 0.6 equivalentes de Cu(II). Como lo muestra la figura 4.7, ambas condiciones muestran un efecto de inhibición. El efecto de DP+Cu(II) es muy parecido al que se observó cuando se adicionó solo Cu(II). Por su parte, el efecto de TP+Cu(II) tiene un comportamiento similar al mostrado cuando se adicionó solo TP.

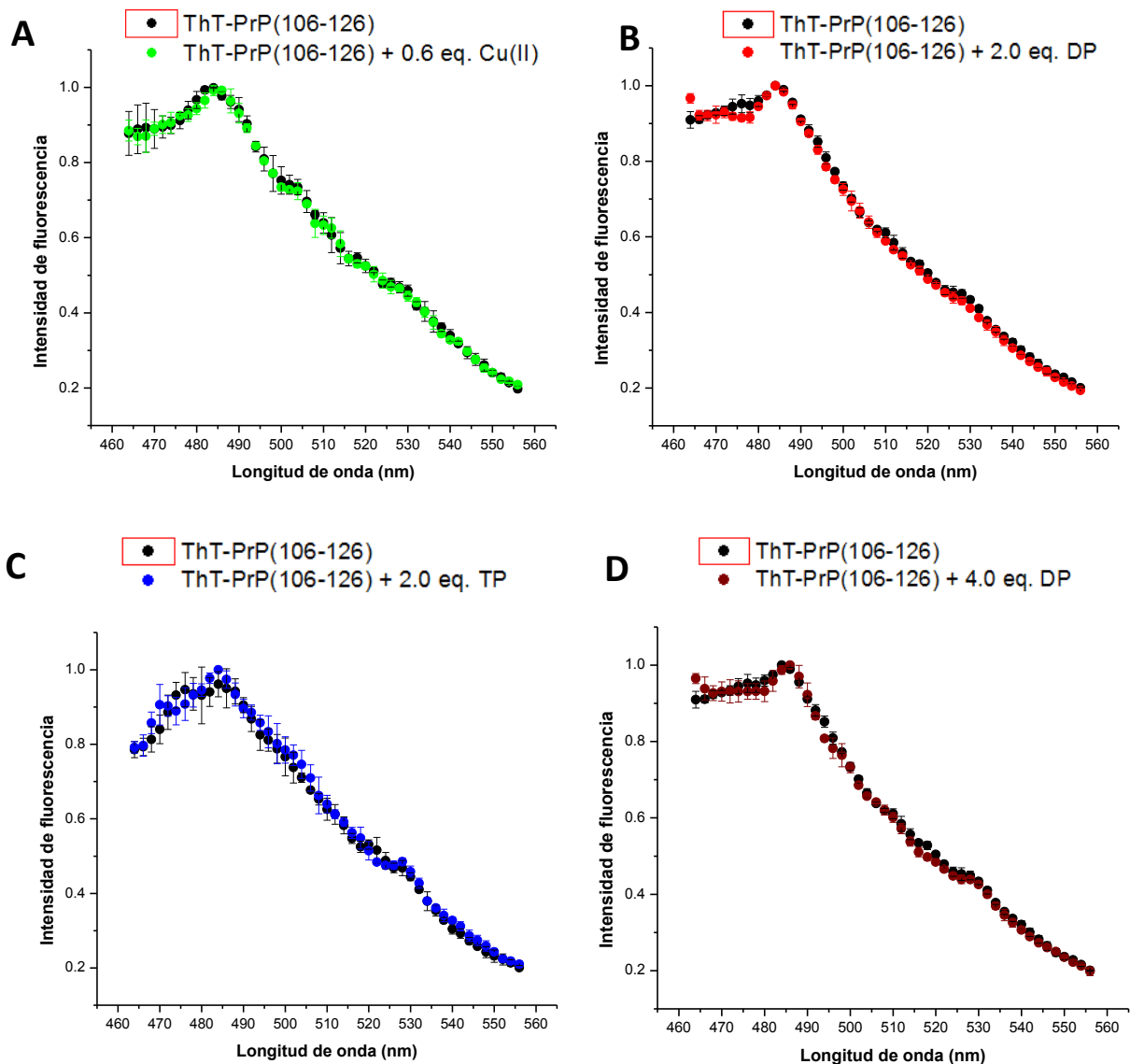


**Figura 4.7. Efecto del DP y TP en la cinética de agregación del PrP(106-126) en presencia de Cu(II).** Esta gráfica también muestra la comparación de la magnitud del efecto de inhibición entre el Cu(II) y Cu(II)+DP así como entre el Cu(II)+TP y TP. Condiciones de los ensayos de fluorescencia con ThT: Solución amortiguadora de NEM 10 mM, pH 7.4; 30 °C; concentración salina (NaCl) 10 mM; concentración de PrP(106-126) 20  $\mu$ M.

### 4.3 Efecto de apagamiento de la fluorescencia.

La disminución de la fluorescencia de la ThT en los ensayos de agregación es interpretada como un decremento en la agregación amiloide del PrP(106-126). Sin embargo, existe la posibilidad de que la fluorescencia de la ThT unida a las fibras amiloides sea apagada (efecto de quenching) por la presencia de metales de transición como el ión Cu(II), o de moléculas aromáticas como los péptidos DP y TP. Para determinar si existe un posible efecto de apagamiento de la fluorescencia del ThT-PrP(106-126) debido a estas moléculas, se colectaron muestras de fibras amiloides de PrP(106-126) tomadas en la etapa de meseta de los ensayos de agregación de PrP(106-126), y se monitoreó el

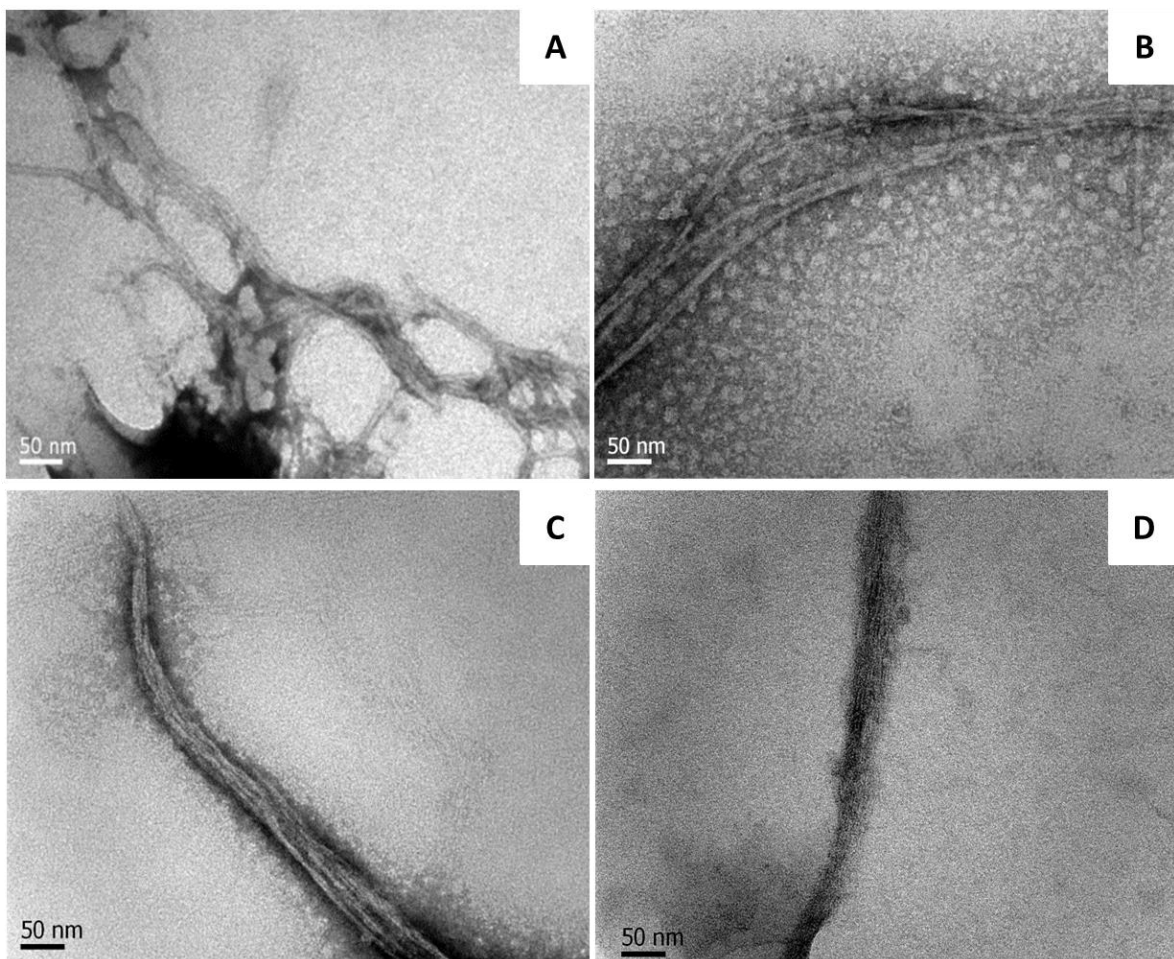
espectro de emisión de fluorescencia antes y después de la adición de Cu(II), DP o TP. La figura 4.8 muestra que el espectro de emisión del ThT unido a fibras amiloides de PrP(106-126) no se ve alterado significativamente cuando se adicionan 0.6 eq. de Cu(II), 2.0 eq. de DP, 2.0 eq. de TP o 4.0 eq. de DP. Con este resultado, se puede descartar la posibilidad de que el apagamiento de la fluorescencia observado en las cinéticas de agregación anteriormente presentadas se deba a un efecto de apagamiento de la fluorescencia ocasionado por el Cu(II) o los péptidos DP y TP.



**Figura 4.8. Efecto del ión Cu(II), DP y TP en el espectro de emisión de fluorescencia de ThT unida a fibras amiloides de PrP(106-126).** Cambios en el espectro de fluorescencia de ThT-PrP(106-126) al adicionar: **A**, 0.6 eq. de Cu(II); **B**, 2.0 eq. de DP; **C**, 2.0 eq. de TP; o **D**, 4.0 eq. de DP. Estos experimentos se corrieron bajo las mismas condiciones que los ensayos de fluorescencia con ThT. Los valores del eje Intensidad de fluorescencia fueron normalizados en todos los casos.

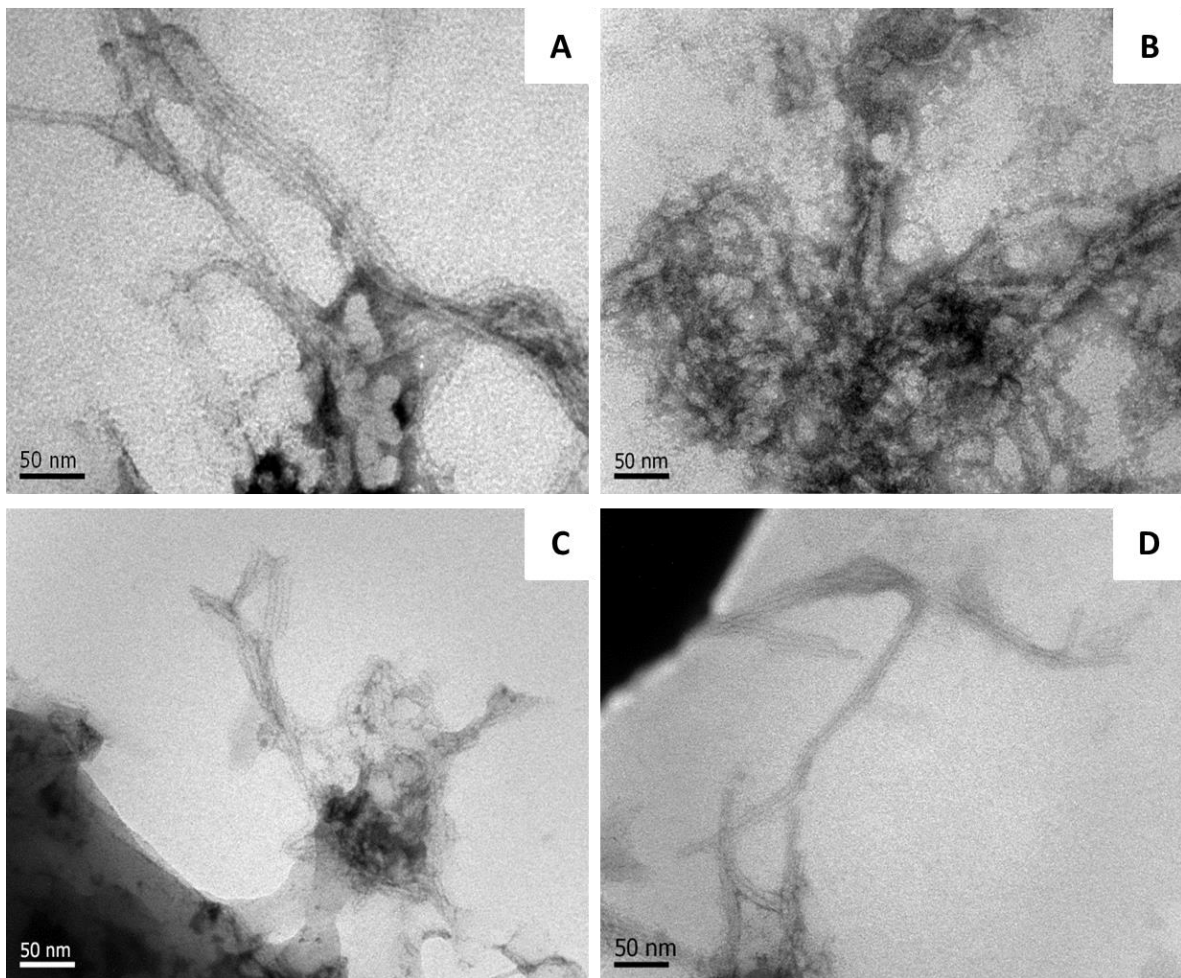
#### 4.4 Efecto del DP, TP y Cu(II) en la morfología fibrilar del PrP(106-126).

Para poder observar los efectos del Cu(II), DP y TP sobre la morfología de las fibras amiloides formadas por el PrP(106-126) se empleó la Microscopía Electrónica de Transmisión. Las micrografías de la figura 4.9 muestran como el DP y TP (ambos a una concentración de 2.0 eq.) inducen la formación de fibras amiloides más delgadas y de una longitud mucho mayor en comparación con las formadas por el PrP(106-126). Por otro lado, se observa que el efecto del DP es dependiente de la concentración, pues al adicionar 4.0 eq. se observan fibras aún más delgadas.



**Figura 4.9. Efecto DP y TP sobre la morfología fibrilar del PrP(106-126).** Micrografías de la Microscopía Electrónica de Transmisión donde se muestra **A**, la morfología fibrilar del PrP(106-126); así como el efecto debido a la presencia de: **B**, 2.0 eq. de DP; **C**, 2.0 eq. de TP; y **D**, 4.0 eq. de DP. Condiciones: Tinción negativa con acetato de uranilo al 1.0%, 200K X de amplificación.

En la figura 4.10 se muestra el efecto del ión Cu(II) en la morfología fibrilar de los agregados de PrP(106-126). Claramente, se puede apreciar que el cobre induce la formación de fibras más gruesas, amorfas y difusas. Sin embargo, este fenómeno se ve contrarrestado (“efecto de recuperación”) cuando también se adiciona TP, observándose fibras amiloides bien definidas y largas. Este efecto de recuperación en la morfología fibrilar no es tan apreciable cuando se adiciona DP a la cinética de agregación del PrP(106-126) en presencia de Cu(II).



**Figura 4.10.** Efecto del ión Cu(II), de Cu(II)+DP y Cu(II)+TP en la morfología fibrilar del PrP(106-126). **A**, Fibras amiloides formadas por el PrP(106-126) y en presencia de: **B**, 0.6 eq. de Cu(II); **C**, 0.6 eq. Cu(II) + 2.0 eq DP; y **D**, 0.6 eq. Cu(II) + 2.0 eq TP. Condiciones: Tinción negativa con acetato de uranilo al 1.0%, 250K X de amplificación.



# Capítulo V.

## DISCUSIÓN.

En las últimas décadas, la agregación amiloide ha atraído la atención de la comunidad médica y científica de todo el mundo debido a que se le ha relacionado con una gran variedad de enfermedades, tanto centrales como periféricas. Algunas de estas patologías son consideradas pandemias, como la Diabetes tipo II. En otras, como el mal de Parkinson o la Enfermedad de Alzheimer, se estima que el número de casos mundiales alcance el orden de decenas de millones en las próximas décadas, comprometiendo así la viabilidad de muchos sistemas gubernamentales de salud.

En contraste, la incidencia de las enfermedades priónicas es muy baja. La CJD tiene una incidencia de apenas dos casos por millón de habitantes [19], y de la vCJD solo se habían registrados 224 casos hasta agosto del 2012 [21]. Por otro lado, la FFI, solo se presenta en algunas familias en todo el mundo que poseen la mutación genética que desencadena esta enfermedad, mientras que el Kuru se cree actualmente extinto [78]. Considerando estas estadísticas es lógico el preguntarse la razón de estudios como el presente, ¿No será mejor colocar a las TSE's en el grupo de las enfermedades huérfanas y dedicar tiempo y recursos al estudio de enfermedades amiloides mucho más frecuentes?

Existen varias razones por las que se deben estudiar las enfermedades priónicas. Primero, por aportación al conocimiento básico de una enfermedad. Se está ante una molécula única en su tipo que ha abierto las puertas para replantear algunos paradigmas, como el que un agente infeccioso requiera de ácidos nucleicos para llevar a cabo la infección. Segundo, las enfermedades amiloides comparten mecanismos moleculares similares, y por ello, los resultados encontrados en el estudio de la agregación amiloide de la PrP, o en el diseño de una molécula que module la agregación de la misma, podrían ser



aplicables a otras proteínas amiloides. Tercero, existe la probabilidad de que se vuelva a presentar una crisis de vCJD como la que se vivió a finales del siglo pasado. Se estima que en el Reino Unido por cada 2000 habitantes hay un portador asintomático de vCJD (30 000 casos totales), lo que incrementa la probabilidad de una infección cruzada por donación de fluidos, y además, recientemente se han detectado priones en la orina de pacientes con vCJD [79]. Finalmente, estas patologías tienen un gran impacto económico en el sector ganadero, ya que un bovino o caprino infectado debe ser separado del rebaño y sacrificado a la brevedad con el objetivo de evitar la propagación de los priones, lo cual no siempre se logra, habiendo años en los que se han sacrificado hasta 35 000 cabezas de ganado tan solo en la Gran Bretaña [12]. La situación se complica debido a que no se ha logrado implementar una técnica para la detección de estas partículas infecciosas en tejidos y fluidos biológicos tanto de animales como de humanos.

El no contar con una terapia farmacológica contra las enfermedades priónicas es el resultado de la falta de información sobre los mecanismos de conversión de la PrP<sup>C</sup> a PrP<sup>Sc</sup> y del papel de los factores involucrados tanto en este cambio de conformación como en la agregación amiloide. El ión Cu(II) se ha visto relacionado con estos procesos debido a que la PrP tiene la capacidad de coordinar iones Cu(II) [25, 26, 55], la presencia de iones Cu(II) altera la agregación de la PrP y el periodo de incubación de enfermedades priónicas experimentales [54, 58, 61]. Además, la homeostasis de este metal se ve alterada en los tejidos infectados por priones [57]. Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos por los que el Cu(II) puede modular la agregación amiloide de la PrP.

Este proyecto tuvo por objetivo determinar el efecto del ión Cu(II) y de dos péptidos no naturales (DP y TP) en la agregación de la proteína prion usando como modelo el fragmento 106-126 de la PrP. Nuestros resultados concuerdan con los estudios donde se ha reportado que el Cu(II) inhibe la agregación de la PrP [59, 60, 64, 76]. El efecto inhibitorio del ión Cu(II) se comprobó al observar un “efecto de recuperación” cuando se evaluó la agregación del PrP(106-126) en presencia de la molécula bifuncional TP y del ión Cu(II).



El fragmento 106-126 de la proteína prion humana es un buen modelo para caracterizar la agregación *in vitro* de la PrP. Es cierto que los fragmentos de una proteína pueden no representar el comportamiento de la proteína completa, pero el uso de regiones peptídicas sirve para aislar y caracterizar un fenómeno que podría estar enmascarado por el efecto de otras regiones cuando se ocupa la estructura proteica completa. La ventaja de emplear como modelo al fragmento 106-126 es que este péptido representa una parte del N-terminal no estructurado de la PrP, por lo que ambos comparten características similares en cuanto a su exposición al medio. La situación sería muy diferente en el caso de utilizar un péptido que tratara de emular una región del C-terminal de la PrP, pues esta región es globular y bien estructurada debido a las interacción que existen entre las hojas  $\beta$  y las  $\alpha$  hélices de la proteína, las cuales estarían ausentes cuando se emplea solo un péptido.

El PrP(106-126) ha sido ampliamente estudiado y ha mostrado características fisicoquímicas (agregados amiloides) y patogénicas (es neurotóxico en cultivos celulares) muy similares a la PrP<sup>Sc</sup> [65-68], de hecho se le considera una pieza clave en el cambio conformacional de PrP<sup>C</sup> a PrP<sup>Sc</sup>. El uso del PrP(106-126) como modelo de estudio tiene la ventaja de evitar los problemas instrumentales y sobre todo infecciosos que representa la PrP<sup>Sc</sup>, además, este fragmento contiene el residuo His111 que ha demostrado ser el residuo primario de anclaje para la coordinación de un ión Cu(II) [27, 48, 55].

El ión Cu(II) mostró tener la capacidad de inhibir la agregación y modificar la morfología fibrilar del PrP(106-126) a una concentración de 12  $\mu$ M, la cual es fisiológicamente relevante dado que la concentración extracelular de Cu(II) en la hendidura sináptica va de 10  $\mu$ M en el reposo a más de 100  $\mu$ M en la sinapsis [25]. Esta inhibición concuerda con una de las funciones fisiológicas propuestas para la PrP: se ha propuesto que la proteína prion tiene un papel importante en la protección celular contra daños asociados a las elevadas concentraciones de Cu(II) alcanzadas durante la sinapsis. Por lo contrario, el que el ión Cu(II) induzca la agregación de la PrP no concuerda con lo observado fisiológicamente, pues en condiciones normales existe una constante interacción entre la PrP<sup>C</sup> y el ión Cu(II), lo que ocasionaría una mayor probabilidad de





formación de agregados fibrilares y las enfermedades priónicas serían padecimientos bastante comunes.

Por otro lado, el TP, cuya secuencia es Met-Asp-DTrp-Aib, mostró ser una molécula bifuncional capaz de modular la agregación del PrP(106-126) al interactuar con los agregados amiloides y al coordinar iones Cu(II). Para evidenciar la primera función se hizo uso del DP como molécula control. EL DP, una molécula con características de  $\beta$ -breaker, ha mostrado previamente inhibir la agregación de la proteína  $\beta$  amiloide (A $\beta$  1-40) [73, 74], y ahora en este estudio mostró tener un efecto similar en el fragmento 106-126 de la proteína prion humana. Sucede lo mismo con el TP que también ha demostrado modular la agregación amiloide y la morfología fibrilar tanto del A $\beta$  1-40 [73] como ahora en el PrP(106-126), lo cual era de esperarse dado que el DP y TP comparten la secuencia  $_D$ W-Aib. El hecho de que una molécula pueda modular la agregación amiloide de dos péptidos muy diferentes, como lo son el A $\beta$  1-40 y el PrP(106-126), sugiere que las proteínas amiloides, a pesar de sus diferencias, comparten un mecanismo de agregación similar.

La segunda función del TP es la coordinación de iones Cu(II), la cual es conferida por los aminoácidos Met-Asp. Esta función es de especial valor para este estudio, pues uno de nuestros objetivos es tomar una postura sólida sobre el papel del Cu(II) en la agregación de la PrP tomando como modelo el fragmento 106-126. El PrP(106-126) mostró cinéticas de agregación muy parecidas en presencia de Cu(II) y de Cu(II)+DP, lo cual es consistente con el diseño del péptido control, pues no contiene el motivo Met-Asp, y al tener solo actividad de  $\beta$ -Breaker, el efecto predominante en ambos casos fue la drástica inhibición de la agregación debido a la presencia del Cu(II). Sin embargo, la cinética de agregación del PrP(106-126) en presencia de Cu(II)+TP fue muy similar a la observada en presencia de solo TP. Este resultado se explica debido a un “efecto de recuperación” por parte del TP, pues al coordinar al cobre, evita que éste se una al PrP(106-126) e inhiba su agregación. Sin embargo, es claro que, a pesar de quelar al Cu(II), el TP todavía es capaz de interactuar con el péptido 106-126, ya que prevalece el efecto observado previamente del TP: el retraso en el crecimiento de las fibras amiloides y los cambios en las morfologías de las fibras finales.



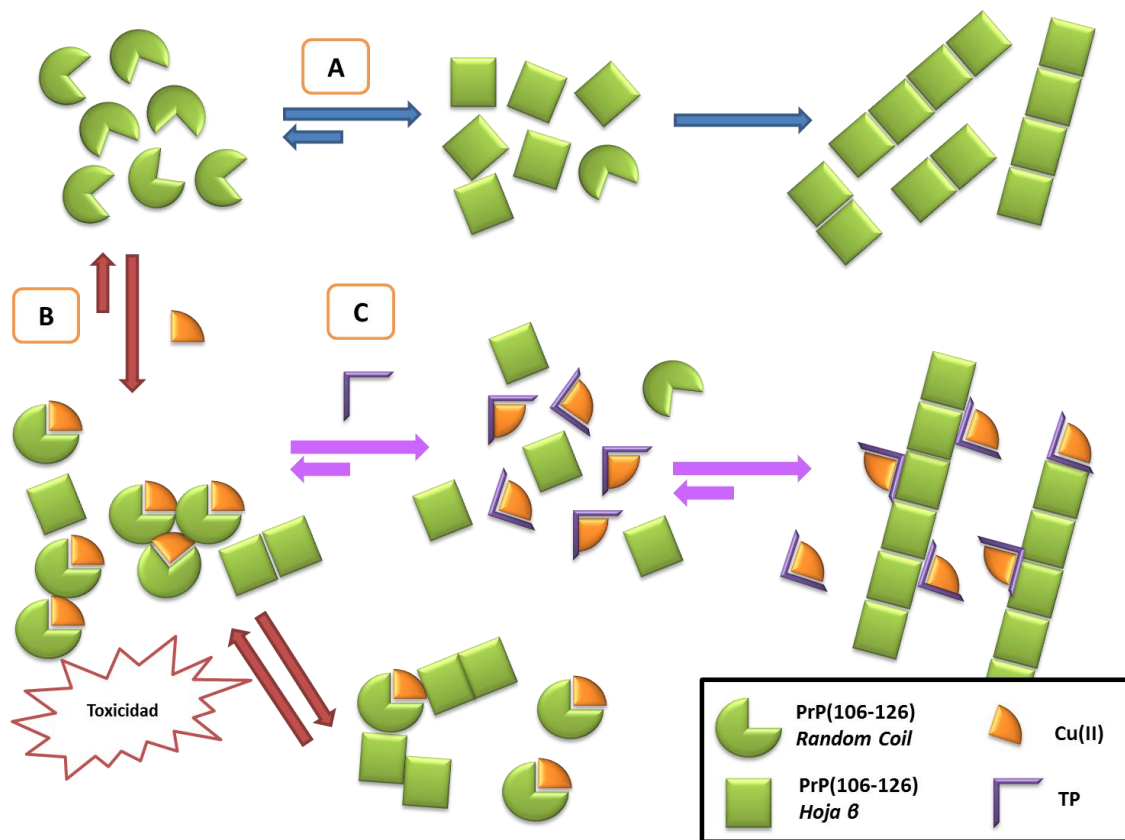
De manera global, podemos citar tres puntos importantes respecto al uso de la molécula bifuncional TP, en el estudio de la agregación amiloide del PrP(106-126):

- a. Las propiedades bifuncionales del TP permitieron confirmar el efecto inhibitorio del Cu(II) en la agregación del PrP(106-126).
- b. El TP sirve como ejemplo de la utilidad de las moléculas bifuncionales en la investigación del papel que juegan los factores involucrados en la agregación amiloide.
- c. Al mostrar el TP efectos similares en la agregación de la proteína  $\beta$ -amiloide y en la PrP, se confirma que las proteínas amiloides, a pesar de tener secuencias de aminoácidos distintas y generar patologías con cuadros clínicos diferentes, comparten mecanismos moleculares de agregación amiloide.

Considerando los resultados de este proyecto y que se ha reportado que el ión Cu(II) induce en el PrP(106-126) la formación de oligómeros [64], se puede plantear un modelo de agregación del fragmento 106-126 bajo la influencia de ión Cu(II). Este modelo, el cual se muestra en la figura 5.1, propone que el ión Cu(II) desplaza el equilibrio de la formación de fibras hacia la formación de oligómeros, los cuales exhiben toxicidad en cultivos celulares, posiblemente a causa de su interacción con la membrana celular [35] o a la generación de estrés oxidativo [80]. Sin embargo, cuando se emplea un agente que coordina los iones Cu(II) como el TP, el equilibrio se desplaza hacia la formación de fibras las cuales son mucho menos tóxicas que los oligómeros. En nuestros resultados se observa que tanto el DP como el TP promueven la formación de fibras amiloides largas y delgadas, lo que nos dice que hay una interacción entre estos péptidos y los agregados amiloides del PrP(106-126) aún en presencia de cobre. Sin embargo, se necesitan hacer más estudios para ver cómo se llevan a cabo dichas interacciones.

El modelo propuesto muestra el potencial que tiene el Cu(II) como posible blanco terapéutico para el tratamiento de las TSE's. Para poder confirmar esta hipótesis son necesarios muchos estudios. Primeramente, se necesitaría evaluar si el TP tiene la capacidad de impedir que el PrP(106-126) forme oligómeros tanto en ausencia como en

presencia del ión Cu(II). Posteriormente, tendrían que realizarse estudios en cultivos neuronales para determinar si la marcada toxicidad que exhibe el PrP(106-126) en presencia de Cu(II) [64] disminuye cuando se adiciona una molécula bifuncional como el TP. Es importante mencionar que en todo este proceso debería de seguirse de cerca el comportamiento del TP, esto con el objetivo de identificar posibles modificaciones químicas para que fuese considerado una molécula con capacidades terapéuticas contra las enfermedades priónicas.



**Figura 5.1. Modelo propuesto para la influencia del Cu(II) en la agregación amiloide del PrP(106-126).** La agregación del PrP(106-126) normalmente sigue el camino **A**: cambio de conformación, formación de oligómeros y maduración en fibras amiloides. Sin embargo, en presencia de Cu(II) sigue la vía **B**, donde se favorece la formación de oligómeros tóxicos y la formación de escasas fibras amiloides amorfas. Sin embargo, si el PrP(106-126) está en presencia de Cu(II) y de una molécula capaz de coordinar iones Cu(II) como el TP, entonces seguirá una vía **C**, donde al eliminar el efecto del Cu(II) se permite que el equilibrio se desplace de los oligómeros a la formación de fibras observándose un efecto de "recuperación". La formación de fibras más largas en el camino C se debe a la interacción entre el TP y las fibras amiloides del PrP(106-126)



Hasta el momento existe poca información para poder comprender los mecanismos involucrados en la patogénesis de las enfermedades priónicas, y más aún para diseñar moléculas con capacidades farmacológicas para el tratamiento de las TSE's. Sin embargo, trabajos como el presente acercan un poco más al día en que la humanidad cuente con opciones terapéuticas para las enfermedades priónicas, contra las cuales actualmente estamos indefensos.



# Capítulo VI.

## CONCLUSIONES.

El Cu(II) juega un papel importante no solo en la función fisiológica de la PrP, sino también en la modulación de su agregación amiloide. En este estudio se encontró que el Cu(II) inhibe drásticamente la agregación en el modelo PrP(106-126), observándose al final fibras amorfas y difusas. Este efecto de inhibición por parte del Cu(II) se comprobó al presenciar un “efecto de recuperación” cuando la agregación del PrP(106-126) se realiza en presencia de Cu(II) y TP. Este efecto se debe a que el TP es una molécula bifuncional capaz de interactuar con las fibras amiloides y coordinar iones Cu(II), poniendo de manifiesto la utilidad de moléculas bifuncionales en el esclarecimiento del papel que juegan los iones metálicos en la agregación amiloide de proteínas.

Por otro lado, el papel modulador mostrado por el ión Cu(II) en la agregación del PrP(106-126) hace que este ión metálico pueda ser considerado como un posible blanco terapéutico en el tratamiento de las TSE's. Por su parte, moléculas que tienen la capacidad de coordinar al ión Cu(II) pueden desplazar el equilibrio amiloide hacia la formación de fibras, lo que traería en consecuencia una disminución de los efectos tóxicos derivados de la presencia de oligómeros. Es por ello que moléculas bifuncionales como el TP pueden sentar las bases para el desarrollo de una terapia farmacológica contra las enfermedades priónicas.

Finalmente, el TP ha mostrado tener la capacidad de modular la agregación amiloide de dos péptidos completamente diferentes: el A $\beta$  1-40 y ahora el demostrado aquí, el PrP(106-126). Esto sugiere que los mecanismos moleculares de agregación amiloide deben ser generales, por lo que una misma molécula puede tener implicaciones en la agregación amiloide asociada a varias enfermedades.



# Capítulo VII.

## PERSPECTIVAS.

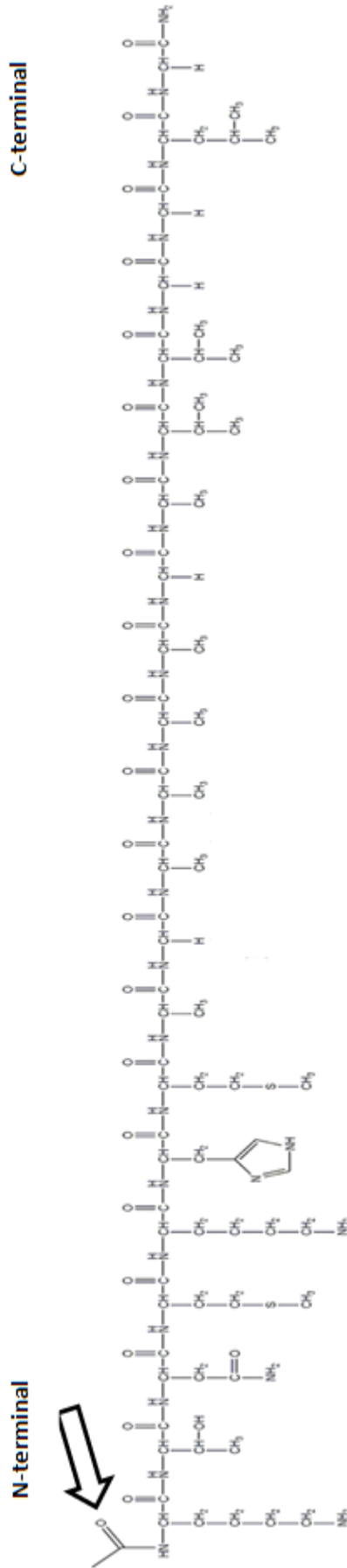
Para determinar si el TP tiene la capacidad de disminuir los marcados efectos tóxicos del PrP(106-126) en presencia de Cu(II), es necesario hacer ensayos de toxicidad en cultivos neuronales. Por otro lado, es conveniente realizar estudios de Dispersión Dinámica de Luz para corroborar si los efectos de toxicidad y protección observados en la relación PrP(106-126)-Cu(II)-TP derivan de los cambios a nivel de oligómeros.

Posteriormente, se recomienda replicar los estudios de este proyecto en modelos *in vivo* de enfermedades priónicas o en su defecto en la proteína prion humana completa. La complejidad de un modelo animal permitirán establecer, primeramente, si el ión Cu(II) realmente es un objetivo terapéutico, y por otro, si el diseño del TP requiere de mejoras estructurales y funcionales para ser propuesto como una opción farmacológica en el tratamiento de las enfermedades priónicas.

Dada la utilidad mostrada por el TP en la determinación del papel del ión Cu(II) en la agregación amiloide del PrP(106-126), sería muy interesante el diseñar otras moléculas peptídicas bifuncionales para evaluar el efecto de los iones metálicos en otras proteínas amiloides, como la amilina, la  $\alpha$ -Sinucleína, entre otras.

## Capítulo VIII.

### Anexo 1.



**Estructura química del PrP(106-126).** Se indica con una flecha el grupo acetilo adicionado en el extremo N-terminal con el objetivo de emular la interacción con el ión Cu(II) como ocurriría en la proteína prion humana completa. Por otro lado, este fragmento se encuentra amidado en el extremo C-terminal.



## BIBLIOGRAFÍA.

1. Teplow D. Molecular biology and translational science. *Academic Press*, 2012: p. 295-299.
2. Crichton R., Ward R. Metal-based neurodegeneration. *John Wiley & Sons*, 2006: p. 133-134.
3. Ahmad SI. Neurodegenerative diseases. *Landes Biosciences, Springer*, 2012: p. 76-88, 143-151.
4. Harris J.R. Protein aggregation and fibrillogenesis in Cerebral and Systemic Amyloid Disease. *Springer*, 2012: p. 3, 4.
5. Knowles TPJ, Vendruscolo M, Dobson CM. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2014; 15(6):384-396.
6. Xing Y, Higuchi K. Amyloid fibril proteins. *Mech. Ageing Dev.* 2002; 123(12):1625-1636.
7. Levine H. Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease  $\beta$ -amyloid peptides: Detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci.* 1993; 2(3):404-410.
8. Rodriguez-Rodriguez C, Telpoukhovskaia M, Ali-Torres J, et al. Thioflavin-based molecular probes for application in Alzheimer's disease: from in silico to in vitro models. *Metallomics*. 2014. doi:10.1039/C4MT00167B.
9. Patel HP, Pithadia AS, Brender JR, et al. In search of aggregation pathways of IAPP and other amyloidogenic proteins: finding answers through NMR spectroscopy. *J. Phys. Chem. Lett.* 2014; 5:1864-1870.
10. Tatzelt J. Prion Protein. *Springer*, 2011: p. 2-4, 167.
11. Haïk S, Brandel JP. Infectious prion diseases in humans: cannibalism, iatrogenicity and zoonoses. *Infect. Genet. Evol.* 2014; 26:303-312.
12. Hueston W, Bryant CM. Transmissible spongiform encephalopathies. *JFS R.* 2005; 70(5):R77-R87.
13. Prusiner SB. Shattuck lecture--neurodegenerative diseases and prions. *N. Engl. J. Med.* 2001; 344(20):1516-1526.
14. Brown K, Mastrianni JA. The prion diseases. *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* 2010; 23(4):277-298.
15. Underdown S. A potential role for transmissible spongiform encephalopathies in Neanderthal extinction. *Med. Hypotheses.* 2008; 71(1):4-7.
16. Schneider K, Fangerau H, Michaelsen B, Raab WH-M. The early history of the transmissible spongiform encephalopathies exemplified by scrapie. *Brain Res. Bull.* 2008; 77(6):343-355.
17. Gelpi E, Kovacs GG. Prion diseases: a primer for general pathologists. *Diagnostic Histopathol.* 2011; 17(5):217-224.





18. Collee JG, Bradley R, Liberski PP. Variant CJD (vCJD) and bovine spongiform encephalopathy (BSE): 10 and 20 years on: part 2. *Folia Neuropathol.* 2006; 44(2):102-110.
19. Peden AH, McGuire LI, Appleford NEJ, et al. Sensitive and specific detection of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease brain prion protein using real-time quaking-induced conversion. *J. Gen. Virol.* 2012; 93(Pt 2):438-449.
20. Collins SJ, Lawson V, Masters CL. Transmissible spongiform encephalopathies. *Lancet.* 2004; 363(9402):51-61.
21. Lee J, Kim SY, Hwang KJ, et al. Prion diseases as transmissible zoonotic diseases. *Osong. Public Heal. Res. Perspect.* 2013; 4(1):57-66.
22. Brown D. Neurodegeneration and prion diseases. *Springer*, 2005: p. 13-15.
23. Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, 1982; 216(4542): 136-144.
24. Prusiner SB. Biology and genetics of prions causing neurodegeneration. *Annu. Rev. Genet.* 2013; 47:601-623.
25. Millhauser GL, Copper binding in the prion protein. *Acc Chem Res.* 2004. 37(2): 79-85.
26. Quintanar L, Rivillas-Acevedo L, Grande-Aztatzi R, et al. Copper coordination to the prion protein: Insights from theoretical studies. *Coord. Chem. Rev.* 2013; 257(2):429-444.
27. Arena G, La Mendola D, Pappalardo G, et al. Interactions of Cu<sup>2+</sup> with prion family peptide fragments: Considerations on affinity, speciation and coordination. *Coord. Chem. Rev.* 2012; 256(19-20):2202-2218.
28. Barrenetxea G. Iatrogenic prion diseases in humans: an update. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2012; 165(2):165-169.
29. Trevitt CR, Hosszu LLP, Batchelor M, et al. N-terminal domain of prion protein directs its oligomeric association. *J. Biol. Chem.* 2014; 289(37):25497-25508.
30. Zhou Z, Xiao G. Conformational conversion of prion protein in prion diseases. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai).* 2013; 45(6):465-476.
31. Mehrpour M, Codogno P. Prion protein: From physiology to cancer biology. *Cancer Lett.* 2010; 290(1):1-23.
32. McKintosh E, Tabrizi SJ, Collinge J. Prion diseases. *J. Neurovirol.* 2003; 9(2):183-193.
33. Foster J, Hunter N. Transmissible spongiform encephalopathies: transmission, mechanism of disease, and persistence. *Curr. Opin. Microbiol.* 1998; 1(4):442-447.
34. Belay ED. Transmissible spongiform encephalopathies in humans. *Annu. Rev. Microbiol.* 1999; 53: 283-314.
35. Walsh P, Vanderlee G, Yau J, et al. The mechanism of membrane disruption by cytotoxic amyloid oligomers formed by prion protein (106-126) is dependent on bilayer composition. *J. Biol. Chem.* 2014; 289(15):10419-10430.
36. Wilson MR, Yerbury JJ, Poon S. Potential roles of abundant extracellular chaperones in the control of amyloid formation and toxicity. *Mol. Biosyst.* 2008; 4(1):42-52.



37. DeToma AS, Salamekh S, Ramamoorthy A, et al. Misfolded proteins in Alzheimer's disease and type II diabetes. *Chem. Soc. Rev.* 2012; 41(2):608-621.
38. Westermark GT, Westermark P. Prion-like aggregates: infectious agents in human disease. *Trends Mol. Med.* 2010; 16(11):501-507.
39. Greenwald J, Riek R. Biology of amyloid: structure, function, and regulation. *Structure* 2010; 18(10):1244-1260.
40. Brundin P, Melki R, Kopito R. Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010. 11(4): 301-307.
41. Smith J. Protein misfolding in neurodegenerative diseases. *CRC Press*, 2008: p. 10-11.
42. Ban T, Hamada D, Hasegawa K, et al. Direct observation of amyloid fibril growth monitored by thioflavin T fluorescence. *J. Biol. Chem.* 2003; 278(19):16462-16465.
43. Khurana R, Coleman C, Ionescu-Zanetti C, et al. Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils. *J. Struct. Biol.* 2005; 151(3):229-238.
44. Biancalana M, Koide S. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochim. Biophys. Acta.* 2010; 1804(7):1405-1412.
45. Williams DB, Carter CB. Transmission electron microscopy. *Springer*, 2009: p. 3-4.
46. Rhodes WT. Transmission electron microscopy: physics of image formation. *Springer*, 2008: p. 1-3.
47. Ayache J, Beaunier L, Boumendil J, et al. Sample preparation handbook for transmission electron Microscopy. *Springer*, 2010: p. 287-295.
48. Williams MA, Daviter T. Protein-ligand interactions. Methods and applications. 2<sup>nd</sup> edition. *Humana Press Inc.*, 2013: p. 211-215, 267-269.
49. Fina B. Dicroísmo circular. Laboratorio de biología ósea y metabolismo mineral. Rosario, Argentina. 2006. [On Line] <http://www.biologiaose8a.com.ar/>. Consulta 24-Oct-14.
50. Alliance Protein Laboratories Inc. Circular dichroism (CD) spectroscopy. 2014. [On line] [http://www.ap-lab.com/circular\\_dichroism.htm#CD\\_secondary](http://www.ap-lab.com/circular_dichroism.htm#CD_secondary). Consulta 24-Oct-14.
51. Shirley BA. Protein stability and folding. Theory and practice. *Humana Press Inc.*, 1995: p. 115.
52. Scheiber IF, Mercer JFB, Dringen R. Metabolism and functions of copper in brain. *Prog. Neurobiol.* 2014; 116:33-57.
53. Linert W, Kozlowsky H. Metal ions in neurological systems. *Springer*, 2012: p. 47, 48, 60.
54. Migliorini C, Sinicropi A, Kozlowski H, et al. Copper-induced structural propensities of the amyloidogenic region of human prion protein. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2014; 19(4-5):635-645.
55. Rivillas-Acevedo L, Grande-Aztatzi R, Lomelí I, et al. Spectroscopic and electronic structure studies of copper(II) binding to His111 in the human prion protein fragment 106-115: evaluating the role of protons and methionine residues. *Inorg. Chem.* 2011; 50(5):1956-1972.
56. Zhou F, Millhauser GL. The Rich Electrochemistry and Redox Reactions of the Copper Sites in the Cellular Prion Protein. *Coord. Chem. Rev.* 2012; 256(19-20):2285-2296.



57. Johnson CJ, Gilbert PUP, Abrecht M, et al. Low copper and high manganese levels in prion protein plaques. *Viruses* 2013; 5(2):654-662.
58. Sigurdsson EM, Brown DR, Alim M, et al. Copper chelation delays the onset of prion disease. *J. Biol. Chem.* 2003; 278(47):46199-46202.
59. Bocharova OV, Breydo L, Salnikov VV, et al. Copper(II) inhibits in vitro conversion of prion protein into amyloid fibrils. *Biochemistry.* 2005; 44(18):6776-6787.
60. Ricchelli F, Buggio R, Drago D, et al. Aggregation/fibrillogenesis of recombinant human prion protein and Gerstmann-Straussler-Scheinker disease peptides in the presence of metal ions. *Biochemistry.* 2006; 45(21): 6724-6732.
61. Jobling MF, Huang X, Stewart LR, et al. Copper and zinc binding modulates the aggregation and neurotoxic properties of the prion peptide PrP106-126. *Biochemistry.* 2001; 40(27): 8073-8084.
62. Giese A, Levin J, Bertsch U, et al. Effect of metal ions on de novo aggregation of full-length prion protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004; 320(4):1240-1246.
63. Thakur AK, Srivastava AK, Srinivas V, et al. Copper alters aggregation behavior of prion protein and induces novel interactions between its N- and C-terminal regions. *J. Biol. Chem.* 2011; 286(44):38533-38545.
64. Chaves JP, Sanchez-López C, Gomes MPB, et al. Biophysical and morphological studies on the dual interaction of non-octarepeat prion protein peptides with copper and nucleic acids. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2014; 19(6):839-851.
65. Kanapathipillai M, Ku SH, Girigoswami K, et al. Small stress molecules inhibit aggregation and neurotoxicity of prion peptide 106-126. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008; 365(4):808-813.
66. Zhong J, Yang C, Zheng W, et al. Effects of lipid composition and phase on the membrane interaction of the prion peptide 106-126 amide. *Biophys. J.* 2009; 96(11):4610-4621.
67. Hanan E, Goren O, Eshkenazy M, et al. Immunomodulation of the human prion peptide 106-126 aggregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001; 280(1):115-120.
68. Walsh P, Neudecker P, Sharpe S. Structural Properties and Dynamic Behavior of Nonfibrillar Oligomers Formed by PrP (106– 126). *J. Am. Chem Soc.* 2010; (12):7684-7695.
69. Cavaliere P, Torrent J, Prigent S, et al. Binding of methylene blue to a surface cleft inhibits the oligomerization and fibrillization of prion protein. *Biochim. Biophys. Acta* 2013; 1832(1):20-28.
70. Achour A. Phenothiazines and prion diseases: a potential mechanism of action towards oxidative stress. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2002; 20(4): 305-306.
71. Pérez M, Sadqi M, Muñoz V, et al. Inhibition by Aplidine of the aggregation of the prion peptide PrP 106–126 into  $\beta$ -sheet fibrils. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 2003; 1639(2):133-139.



72. Pithadia AS, Lim MH. Metal-associated amyloid- $\beta$  species in Alzheimer's disease. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2012; 16(1-2):67-73.
73. Márquez M, Blancas-Mejía LM, Campos A, Rojas L, et al. A bifunctional non-natural tetrapeptide modulates amyloid-beta peptide aggregation in the presence of Cu(II). *Metallomics.* 2014; 6(12):2189-2192.
74. Frydman-Marom A, Rechter M, Shefler I, et al. Cognitive-Performance Recovery of Alzheimer's Disease Model Mice by Modulation of Early Soluble Amyloid Assemblies. *Angew. Chemie.* 2009; 121(11):2015-2020.
75. Binolfi A, Quintanar L, Bertoncini CW, et al. Bioinorganic chemistry of copper coordination to alpha-synuclein: Relevance to Parkinson's disease. *Coord. Chem. Rev.* 2012; 256(19-20):2188-2201.
76. Inayathullah M, Satheeshkumar KS, Malkovskiy AV, et al. Solvent microenvironments and copper binding alters the conformation and toxicity of a prion fragment. *PLoS One* 2013; 8(12):e85160.
77. Walsh P, Simonetti K, Sharpe S. Core structure of amyloid fibrils formed by residues 106-126 of the human prion protein. *Structure.* 2009; 17(3):417-426.
78. Liberski PP, Brown P. Kuru: its ramifications after fifty years. *Exp. Gerontol.* 2009; 44(1-2):63-69.
79. Moda F, Gambetti P, Notari S, et al. Prions in the Urine of Patients with Variant Creutzfeldt-Jakob Disease. *N. Engl. J. Med.* 2014; 371(6):530-539.
80. Turnbull S, Tabner BJ, Brown DR, et al. Copper-dependent generation of hydrogen peroxide from the toxic prion protein fragment PrP106-126. *Neurosci Lett.* 2003. 336(3):159-162.