

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería



**Producción Recombinante de Alfa-Sinucleína de Humano e Implementación
de un Bioensayo para Determinar Microagregados Proteicos**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

P R E S E N T A

Cristian Osvaldo Armenta Montoya

Tijuana, Baja California, México.

Marzo de 2025.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA
COORDINACIÓN DE EXTENSIÓN Y VINCULACIÓN

FOLIO No. 070

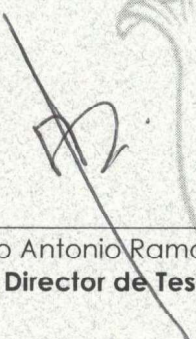
Tijuana, Baja California, a 27 de febrero de 2025

C. CRISTIAN OSVALDO ARMENTA MONTOYA
PASANTE DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGO
PRESENTE:

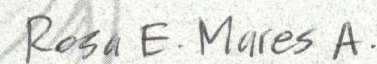
El tema de trabajo para su examen profesional, en la opción de Tesis, propuesto por el Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra y la Dra. Rosa Elena Mares Alejandre, quienes serán los responsables de la calidad del trabajo que usted presente, referido al tema: "**Producción Recombinante de Alfa-Sinucleína de Humano e Implementación de un Bioensayo para Determinar Microagregados Proteicos**", el cual usted deberá desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

- I. RESUMEN
- II. ABSTRACT
- III. INTRODUCCIÓN
- IV. OBJETIVOS Y META
- V. MATERIALES Y MÉTODOS
- VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN
- VII. CONCLUSIONES
- VIII. BIBLIOGRAFÍA





Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra
Director de Tesis



Dra. Rosa Elena Mares Alejandre
Co- Directora de Tesis



M.C. Roberto Alejandro Reyes Martínez
Director



Dra. Ana Alejandra Ramírez Rodríguez
Subdirectora

**Producción Recombinante de Alfa-Sinucleína de Humano e Implementación de un
Bioensayo para Determinar Microagregados Proteicos**

Tesis de Licenciatura

Todos los derechos sobre los datos y resultados, derivados de la investigación realizada, contenidos en este documento son propiedad de los autores y de las instituciones donde se realizó el estudio. Por tal motivo, se prohíbe la reproducción, distribución, publicación, traducción, y cualquier otro uso o adaptación (total o parcial) de la información, por cualquier medio o forma de difusión.

La prohibición anterior no tendrá validez, de forma exclusiva y limitada, cuando el uso o adaptación de la información cumpla los siguientes requisitos:

- (1) El material o medio de difusión sea utilizado sólo para fines académicos, no lucrativos ni comerciales; incluir la siguiente cita: **“Armenta Montoya Cristian Osvaldo. Producción Recombinante de Alfa-Sinucleína de Humano e Implementación de un Bioensayo para Determinar Microagregados Proteicos. Tesis de Licenciatura. Programa Educativo de Químico Farmacobiólogo, Universidad Autónoma de Baja California. Marzo de 2025.”**

- (2) Enviar un correo electrónico a mramos@uabc.edu.mx, solicitando anuencia y dando aviso de qué datos se van a utilizar y cuál es el propósito de su uso.

Lo anterior no otorga derecho o licencia alguna, respecto a la información utilizada.

Para cualquier otro asunto relacionado, contactar a mramos@uabc.edu.mx.

D.R. © Armenta Montoya Cristian Osvaldo. Tesista.

D.R. © Ramos Ibarra Marco Antonio. Director de tesis.

D.R. © Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería. Unidad Académica de la UABC.

D.R. © Universidad Autónoma de Baja California. Institución de Educación Superior.

©2025.

Tesis: Producción Recombinante de Alfa-Sinucleína de Humano e Implementación de un Bioensayo para Determinar Microagregados Proteicos

Grado: Químico Farmacobiólogo, Programa de Licenciatura

Institución: Universidad Autónoma de Baja California

Sustentante: Cristian Osvaldo Armenta Montoya

Fecha: Marzo de 2025

El presente trabajo se realizó en el **Laboratorio de Investigación en Biotecnología y Biociencias de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería (UABC)**, bajo la dirección de la **Dra. Rosa Elena Mares Alejandre** y del **Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra**.

Este documento de tesis fue **revisado y aprobado** por un **Comité Académico** conformado por los siguientes profesores:

Dr. Samuel Guillermo Meléndez López	Presidente
Dra. Rosa Elena Mares Alejandre	Secretaria
Dra. Patricia Lilián Alejandra Muñoz Muñoz	Sinodal
Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra	Suplente
M.C. Pablo Alfonso Madero Ayala	Suplente

AGRADECIMIENTOS

Al culminar esta etapa académica, es justo reconocer a quienes, con su apoyo y motivación, hicieron posible este logro.

Agradezco a mis directores de Tesis, Dr. Marco Ramos, y Dra. Rosy Mares por darme la oportunidad y la confianza de trabajar y pertenecer a este grandioso equipo de trabajo, personas con un conocimiento extraordinario, personas que me regañaron, personas que me llamaron la atención, pero, sobre todo las personas que me guiaron en todo camino, que sin ellos esto no fuera posible.

Agradezco a la vida, al universo, a Dios por permitirme estar hoy culminando esta bella etapa, este gran logro, porque si lo considero un Gran Logro para mí.

"Cogito, ergo sum." — René Descartes
Pienso luego existo.

DEDICATORIA

Cada página de esta tesis lleva consigo el esfuerzo, el aprendizaje y el apoyo de quienes han estado a mi lado. Sin duda alguna un camino muy grato, muy lindo, con personas que me acompañaron durante este trayecto...

Dedico esta tesis a personas que estuvieron apoyándome, motivándome, incluso preguntándome. ¿Cómo vas con la tesis? A todas esas personas que estuvieron ahí.

Primero que nada, dedico este esfuerzo a mi familia, a mis papas, mis hermanos que a pesar de que cada quien tiene sus actividades nunca han dejado de apoyarme, siempre me han motivado a seguir, a dar lo mejor de mí, incluso cuando yo mismo siento que no puedo. A mis tíos, a mis abuelos que también estuvieron ahí para animarme y preguntarme en cada llamada que hacía para saludarlos y que eso era lo primero que me preguntaban.

Mis amigos de la universidad, durante 4 años coseche dos amistades que hasta el día de hoy son esas personitas que han estado conmigo, Mariana y Dani, quiero dedicarles también este logro. Personitas que amo con todo mi corazón que durante este proceso me dedicaron tiempo, escuchándome, preguntándome, pero sobre todo por su gran corazón, su sencillez, diciéndome que se sentían orgullosas de mi por haber elegido este camino de titulación y sobre todo diciéndome que era una persona capaz y que lo lograría.

A Jorge mi amistad más leal, una persona que literal diario miraba, entonces fue la persona que más estuvo al tanto de todo el proceso, y que también siempre me preguntaba, ¿que si cómo iba?, ¿cuánto te falta?, ya mero?, aunque a veces bromeara diciéndome ya gradúate ya duraste mucho jajá.

A mis compañeros de laboratorio, que fueron los que me ayudaron, los que me enseñaron. A Pablo, Ale, Jess, que diario nos mirábamos en el laboratorio, trabajando juntos cada quien, en su proyecto, pero estaban ahí. A la Dra. Lilian que también me ayudo bastante, dándome consejos, ayudándome, y sobre todo compartiendo de su conocimiento.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	5
DEDICATORIA	6
INDICE DE FIGURAS Y TABLAS	9
ABREVIATURAS	10
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUCCIÓN	13
1.1. Plegamiento de proteínas.....	13
1.1.1. Fundamentos del plegamiento de proteínas.....	13
1.1.2. Plegamiento de proteínas y chaperonas moleculares.....	15
1.1.3. Plegamiento de proteínas y homeostasis celular	15
1.1.4. Mecanismos de agregación de las proteínas.....	16
1.1.5. Enfermedades del plegamiento en humanos.....	17
1.2. Plegamiento de proteínas y neurodegeneración	17
1.2.1. Enfermedad de Alzheimer.....	19
1.2.2. Enfermedad de Parkinson.....	21
1.2.3. Esclerosis Lateral Amiotrófica	21
1.2.4. Enfermedad de Huntington.....	22
1.2.5. Enfermedades priónicas.....	23
1.2.6. Demencia frontotemporal.....	25
1.3. Enfermedad de Parkinson.....	26
1.3.1. Diagnóstico.....	29
1.3.2. Fisiopatología	30
1.3.3. Factores genéticos y ambientales	32
1.3.4. Manifestaciones clínicas y síntomas motores	32
1.3.5. Síntomas no motores y otros posibles síntomas	33
1.3.6. Tratamientos farmacológicos y otras terapias actuales.....	35
1.3.7. Avances y perspectivas futuras en la investigación.....	35
1.3.8. Impacto sociocultural y económico de la enfermedad.....	36
1.4. Alfa-Sinucleína de Humano	37
1.4.1. Biología molecular y celular	37
1.4.2. Bioquímica	38
1.4.3. Genética.....	39
1.4.4. Relación estructura-función.....	39
1.4.5. Mecanismos de agregación proteica.....	40
1.4.6. Efectos en la función neuronal	41
1.4.7. Asociación con la enfermedad de Parkinson	41
1.4.8. Modelos experimentales de estudio.....	41
1.4.9. Terapias dirigidas y otras intervenciones	42
1.4.10. Avances en investigación y perspectivas futuras.....	43
1.5. Importancia de los estudios <i>in vitro</i> de la alfa-sinucleína de humano	43

2.	OBJETIVOS Y META	45
2.1.	Objetivo General.....	45
2.2.	Objetivos Específicos	45
2.3.	Meta.....	45
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	46
3.1.	Reactivos químicos, bioquímicos, y biológicos.....	46
3.2.	Medios de cultivo y células bacterianas	46
3.3.	Plásmido de expresión de la alfa-sinucleína de humano.....	46
3.4.	Protocolos Generales.....	48
3.4.1.	Cultivos bacterianos	48
3.4.2.	Preparación de bacterias competentes	48
3.4.3.	Transformación bacteriana mediante choque térmico	48
3.4.4.	Electroforesis de ADN en gel de agarosa.....	49
3.4.5.	Electroforesis de proteínas en gel SDS-poliacrilamida al 15%	49
3.4.6.	Cuantificación de proteínas	49
3.5.	Propagación y caracterización del plásmido pE21ASYN.....	50
3.6.	Transformación de <i>E. coli</i> Lemo21(DE3) con pE21ASYN.....	50
3.7.	Producción de rHuASYN a mini-escala	51
3.7.1.	Evaluación de la expresión proteica	51
3.7.2.	Evaluación de la solubilidad proteica	51
3.7.3.	Recuperación del monómero proteico.....	52
3.8.	Producción a escala media y purificación de rHuASYN.....	52
3.8.1.	Concentración mediante ultrafiltración	53
3.8.2.	Purificación mediante cromatografía de intercambio iónico.....	53
3.8.3.	Desalado mediante cromatografía exclusión molecular	54
3.9.	Determinación de microagregados de rHuASYN	54
3.9.1.	Evaluación simple de las condiciones de reacción	54
3.9.2.	Análisis cinético de formación de microagregados proteicos.....	55
3.9.3.	Detección espectrofluorométrica de microagregados.....	55
3.10.	Tratamiento de datos y análisis estadístico.....	55
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
4.1.	Caracterización molecular del pE21ASYN.....	57
4.2.	Expresión a mini-escala y caracterización de la rHuASYN.....	59
4.3.	Producción y purificación de la rHuASYN.....	63
4.4.	Determinación de microagregados de alfa-sinucleína	65
4.5.	¿Por qué es importante realizar estudios <i>in vitro</i> del comportamiento estructural de la alfa-sinucleína de humano?	69
5.	CONCLUSIONES	71
6.	BIBLIOGRAFÍA	73

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Perspectivas actuales sobre el mecanismo de plegamiento de proteínas.	13
Figura 2. Fundamentos moleculares del plegamiento incorrecto y la agregación de proteínas intrínsecamente desordenadas asociadas a END.	18
Figura 3. Hipótesis de la cascada amiloide en la enfermedad de Alzheimer.	20
Figura 4. Mecanismos patogénicos propuestos para enfermedad de Huntington.	23
Figura 5. Principales biomarcadores de la FTD y sus mecanismos patogénicos.	26
Figura 6. Transmisión neuronal hipotética de alfa-sinucleína y del desequilibrio redox intracelular que provoca la neurodegeneración.	28
Figura 7. Mecanismos moleculares que contribuyen a la enfermedad de Parkinson.	30
Figura 8. Papel central de alfa-sinucleína en la fisiopatología de la enfermedad de Parkinson.	31
Figura 9. Cronología de los signos clínicos expresados a lo largo de la enfermedad de Parkinson.	33
Figura 10. Impacto de las mutaciones de alfa-sinucleína en el desarrollo de síntomas no motores en la enfermedad de Parkinson.	34
Figura 11. Representación esquemática del plásmido pE21ASYN.	47
Figura 12. Análisis de restricción del plásmido pE21ASYN usando la endonucleasa BamHI.	58
Figura 13. Análisis de expresión y solubilidad de la proteína rHuASYN.	61
Figura 14. Análisis de recuperación de la proteína rHuASYN.	62
Figura 15. Purificación de rHuASYN monomérica mediante cromatografía de intercambio iónico.	64
Figura 16. Detección a punto final de microagregados de rHuASYN.	66
Figura 17. Detección cinética de microagregados de rHuASYN.	68
Tabla 1. Cepas de <i>E. coli</i> utilizadas en el presente estudio.	47
Tabla 2. Caracterización molecular del plásmido pE21ASYN. Fragmentos de restricción esperados usando diferentes endonucleasas.	57

ABREVIATURAS

β A	β -Amiloide
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALS	Esclerosis lateral amiotrófica
APP	Proteína precursora amiloide
ASYN	Alfa-Sinucleína, alfa-sinucleína,
ATP	Trifosfato de adenosina
DFT	Demencia frontotemporal
EA	Enfermedad de Alzheimer
EH	Enfermedad de Huntington
ELA	Esclerosis lateral amiotrófica
END	Enfermedades neurodegenerativas
EP	Enfermedad de Parkinson
PRNP	Proteína priónica nativa
RE	Reticulo endoplásmico
SNC	Sistema nervioso central
ThT	Tioflavina T
UFC	Unidad formadora de colonias

RESUMEN

En el presente estudio se desarrolló un sistema de producción recombinante de la proteína alfa-sinucleína humana (rHuASYN) y se implementó un bioensayo fluorométrico para detectar microagregados proteicos. El sistema bacteriano se estableció transformando células de *E. coli* Lemo21(DE3) con el plásmido pE21ASYN, el cual facilitó la expresión citosólica de rHuASYN en su forma soluble. Se consolidó un protocolo estándar para la producción a media escala y purificación de la rHuASYN en su estado monomérico nativo. Esta proteína se utilizó para determinar los parámetros de un microensayo fluorométrico sencillo para detectar microagregados de alfa-sinucleína humana. La reproducibilidad del microensayo se confirmó mediante la evaluación cinética de la fluorescencia emitida bajo condiciones de reacción controladas. De manera global, los resultados demostraron el establecimiento exitoso de un sistema de producción recombinante para la alfa-sinucleína humana y la implementación de un bioensayo estandarizado, sencillo y reproducible para su detección indirecta mediante fluorescencia. Este bioensayo representa una herramienta prometedora para la identificación sensible de formas priónicas, las cuales están asociadas con la manifestación temprana de la enfermedad de Parkinson, por lo tanto, ofrece una aplicación potencial en el diagnóstico temprano y en el desarrollo de estrategias terapéuticas para este trastorno neurodegenerativo.

ABSTRACT

This study aimed to develop a recombinant production system for human alpha-synuclein (rHuASYN) and implement a fluorometric bioassay to detect protein microaggregates. A bacterial expression system was established by transforming *E. coli* Lemo21(DE3) cells with the pE21ASYN plasmid to facilitate the cytosolic expression of soluble rHuASYN. A standard protocol for medium-scale production and native protein purification was developed to purify rHuASYN in its native monomeric state. Purified rHuASYN was used to determine the parameters for a simple fluorometric microassay to detect human alpha-synuclein microaggregates. The reproducibility of this microassay was confirmed by the kinetic evaluation of the fluorescence emitted under standard reaction conditions, confirming the viability of the proposed bioassay. The results demonstrated the successful establishment of a recombinant production system for human alpha-synuclein and the development of a standardized, simple bioassay for indirect fluorescent detection of human alpha-synuclein microaggregates. This bioassay can be useful as a sensitive system for identifying prion-like forms associated with the early manifestation of Parkinson's disease, offering potential applications in the early diagnosis and therapeutic development of this neurodegenerative disorder.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Plegamiento de proteínas

1.1.1. Fundamentos del plegamiento de proteínas

Existen dos enfoques que fundamentan el plegamiento de proteínas (Figura 1). Uno sostiene que las proteínas se pliegan siguiendo rutas definidas, donde regiones establecidas de la estructura se organizan hasta lograr su conformación nativa. El otro sugiere que el plegamiento es un proceso dinámico y menos predecible, donde las proteínas pueden seguir una o varias rutas alternativas, guiadas únicamente por una tendencia hacia estados más estables; esto es, las moléculas tienden a moverse espontáneamente hacia conformaciones de menor energía para alcanzar su estabilidad (Englander et al., 2007).

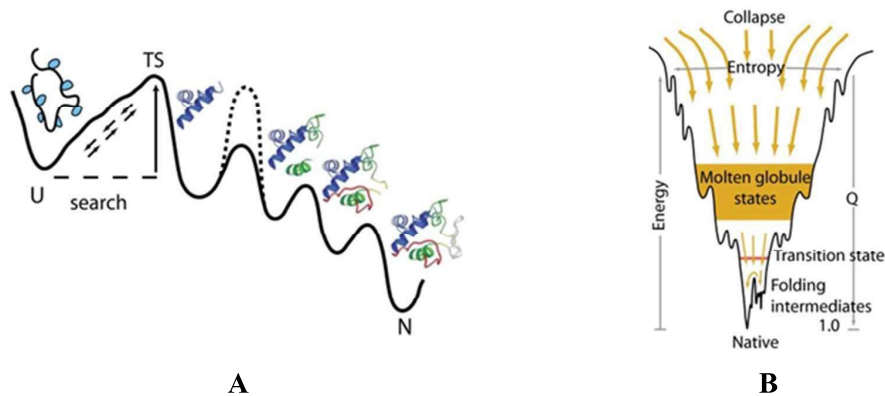


Figura 1. Perspectivas actuales sobre el mecanismo de plegamiento de proteínas.

(A) Ruta clásica de plegamiento definido, y (B) Múltiples rutas de plegamiento a través de un paisaje energético en forma de embudo. Tomado de (Englander & Mayne, 2014). La imagen conserva el texto original de la referencia.

En células, el plegamiento de proteínas involucra la participación de chaperonas moleculares, las cuales intervienen durante este proceso para evitar las interacciones no correctas entre regiones expuestas de proteínas parcialmente plegadas, reduciendo así el riesgo de agregación (Dobson, 2003; Englander et al., 2007).

Las proteínas deben plegarse y adoptar su estado nativo a través de distintas rutas impredecibles, por lo tanto, es importante definir la ruta de plegamiento de proteínas, ya sea mediante una ruta única con intermediarios definidos (visión clásica) o a través de varias rutas desordenadas (visión moderna), para comprender su función biológica. Sin embargo, como el plegamiento de proteínas suele ser complejo, es recomendable considerar diversos enfoques para su comprensión (Dobson, 2003; Englander & Mayne, 2014).

Generalmente, el plegamiento de proteínas se entiende como un proceso estructural donde un polipéptido adopta estados conformacionales intermedios de forma secuencial hasta adquirir su estructura tridimensional (3D) nativa-funcional (Dobson, 2003; Englander & Mayne, 2014).

Las cuatro etapas distinguibles del proceso de plegamiento de proteínas se definen a continuación (Englander et al., 2007; Englander & Mayne, 2014):

1. *Estado inicial desplegado*: Después de la síntesis por el ribosoma, la proteína inicia en estado desplegado. Durante esta etapa, la cadena polipeptídica no adopta ninguna estructura específica, permitiendo que las interacciones internas moldeen su destino durante el proceso de plegamiento.
2. *Intermediarios estructurales*: Conforme avanza el proceso, se forman los primeros intermediarios estructurales. Durante las fases iniciales, la cadena polipeptídica presenta conformaciones secundarias bien definidas, como hélices- α y láminas- β , las cuales son esenciales para la estabilización de la proteína, ya que proporcionan un marco preliminar para las siguientes etapas del plegamiento.
3. *Ruta de plegamiento*: La proteína sigue una ruta específica de plegamiento gradual, pasando a través de diferentes intermediarios. En cada paso, la conformación se vuelve más organizada y estabilizada energéticamente, lo cual significa que cada intermediario estructural es más favorable que el anterior.
4. *Estado nativo*: El proceso termina cuando la proteína alcanza su estado nativo, es decir, una conformación funcional estabilizada por interacciones no covalentes (puentes de hidrogeno, interacciones hidrofóbicas, y fuerzas de van der Waals). Cabe destacar que este estado asegura tanto la función como la longevidad de la proteína dentro del ambiente celular.

Además, el plegamiento de proteínas también debe considerarse como un proceso favorable desde un punto termodinámico, ya que la energía libre del sistema disminuye a medida que la proteína alcanza su estado conformacional nativo (Englander et al., 2007; Englander & Mayne, 2014).

1.1.2. Plegamiento de proteínas y chaperonas moleculares

Las chaperonas moleculares son una familia de proteínas que desempeñan una función muy importante en la homeostasis proteica (proteostasis), y pueden ser clasificadas en dos grupos principales de acuerdo a su dependencia de ATP (Almeida & Brito, 2022). Estas actúan reconociendo regiones hidrofóbicas expuestas en proteínas recién sintetizadas, a las cuales se unen de manera temporal para evitar la agregación.

Además, las chaperonas moleculares son esenciales en condiciones de estrés celular, p. ej. altas temperaturas, evitando alteraciones en la estructura de las proteínas, ayudando así a mantener la homeostasis celular. Así mismo funcionan corrigiendo conformaciones no nativas, ya sea acelerando o retrasando el plegamiento de proteínas. Por otro lado, también asisten en el desplegado controlado y promueven la eliminación de proteínas inadecuadas mediante el sistema ubiquitina-proteasoma o el sistema de autofagia-lisosoma (Almeida & Brito, 2022).

1.1.3. Plegamiento de proteínas y homeostasis celular

El plegamiento de proteínas y la homeostasis celular se centra en comprender cómo las células mantienen la estructura-función proteica en condiciones normales y de estrés. El plegamiento de proteínas es un proceso complejo: las cadenas de aminoácidos adquieren una estructura tridimensional específica, la cual es importante para su función biológica. Este proceso está regulado por un sistema celular, llamado proteostasis, que mantiene un equilibrio entre los procesos de plegamiento y degradación para prevenir la acumulación innecesaria de proteínas (Díaz-Villanueva et al., 2015; Englander et al., 2007).

Las células eucarióticas emplean a chaperonas moleculares, como las proteínas de respuesta a choque térmico (Hsp, por sus siglas en inglés), para asistir en el plegamiento correcto de proteínas recién sintetizadas y así evitar interacciones no deseadas que pudieran

llevar a la formación de agregados potencialmente tóxicos. Además, en caso de desarrollo de estrés en el retículo endoplásmico (RE) por acumulación de proteínas desplegadas o mal plegadas, ya sea fisiológico o patológico, las células activan un mecanismo de respuesta llamado UPR (*unfolded protein response*), el cual se adapta a las condiciones prevalentes: reduce la síntesis de proteínas a la vez que aumenta la capacidad de plegamiento, ayudando de forma significativa a la proteostasis. Cabe resaltar que el mecanismo de UPR es crítico, ya que cualquier irregularidad funcional puede llevar a la acumulación tóxica de proteínas, la cual se relaciona con enfermedades neurodegenerativas, como Alzheimer y Parkinson (Díaz-Villanueva et al., 2015; Hoppe & Cohen, 2020).

Por lo tanto, comprender los mecanismos de UPR y los procesos asociados a la síntesis y degradación de proteínas es fundamental para el desarrollo de terapias que modulen la proteostasis en enfermedades asociadas con el mal plegamiento de proteínas (Díaz-Villanueva et al., 2015; Tsuboyama et al., 2023).

1.1.4. Mecanismos de agregación de las proteínas

De manera general, la proteostasis es un sistema celular que regula el equilibrio y la calidad de las proteínas. Para lograrlo, este sistema se apoya de chaperonas moleculares que favorecen y mantienen el plegamiento correcto de las proteínas o, en su defecto, se encargan de conducir las a sistemas de degradación para prevenir la acumulación de agregados tóxicos (Almeida & Brito, 2022; Wen et al., 2023).

Las proteínas que presentan una conformación alterada, ya sea por exposición a un ambiente de estrés o como resultado de una mutación génica inducida, tienden a formar agregados potencialmente tóxicos, los cuales se caracterizan por contener estructuras de láminas- β . En condiciones patológicas, este tipo de agregados se acumulan en los tejidos, causando disfunciones celulares. Además, pueden inducir un estrés sostenido en el RE (Wen et al., 2023). Por otro lado, los mecanismos celulares encargados de eliminar a estos agregados se deterioran con el envejecimiento, lo que implica un aumento del riesgo de padecer enfermedades neurodegenerativas, como Alzheimer o Parkinson, en personas de la tercera edad (Wen et al., 2023).

1.1.5. Enfermedades del plegamiento en humanos

El plegamiento incorrecto de proteínas es un proceso patológico que se asocia a la formación de agregados potencialmente tóxicos en las células, el cual se caracteriza por la dificultad de algunos polipéptidos de adquirir una estructura tridimensional nativa o la pérdida inducida de la estructura terciaria de proteínas funcionales. Este fenómeno celular es un factor clave en el desarrollo de diversas enfermedades, especialmente en trastornos neurodegenerativos y otras condiciones asociadas al envejecimiento. De manera específica, los agregados proteicos se acumulan en forma de estructuras amiloides (también llamadas fibrillas amiloides). En la enfermedad de Alzheimer, se deposita el péptido β -amiloide o la proteína Tau, y en Parkinson, se acumula la proteína alfa-sinucleína en forma de los llamados cuerpos de Lewy (Morato Torres et al., 2020; Wen et al., 2023).

1.2. Plegamiento de proteínas y neurodegeneración

Las enfermedades neurodegenerativas (END) y los trastornos del desarrollo neurológico se presentan como condiciones distintas, tanto en términos clínicos como neuropatológicos. Sin embargo, estudios recientes han resaltado sorprendentes similitudes y características convergentes que se manifiestan en distintos niveles: molecular, genómico y clínico (Morato Torres et al., 2020).

Tanto las END (p. ej., Alzheimer y Parkinson) como los trastornos del desarrollo neurológico (p. ej., autismo y el trastorno por déficit de atención e hiperactividad) exhiben patrones de progresión y deterioro que pueden compartir mecanismos subyacentes, los cuales incluyen alteraciones en la comunicación neuronal, disfunciones en las vías de señalización celular y cambios en la expresión de genes importantes para la regulación del desarrollo y supervivencia neuronal (Morato Torres et al., 2020).

Las END asociadas al plegamiento de proteínas se caracterizan por el daño progresivo de la función neuronal (Kovacs, 2016). Entre las END más estudiadas se encuentran Alzheimer, Parkinson y Huntington (Alraawi et al., 2022), siendo el plegamiento incorrecto y la agregación tóxica de proteínas, componentes fundamentales de estas afecciones neurológicas (Almeida & Brito, 2022).

Además del cuadro clínico, las END se clasifican con base en los componentes proteicos que se depositan en regiones afectadas del cerebro, siendo en su mayoría una clase de proteínas conocidas como intrínsecamente desordenadas (IDP, por sus siglas en inglés). De manera general, las IDP pueden carecer por completo de estructura terciaria (es decir, íntegramente desestructuradas) o constar de dominios bien estructurados ligados a regiones intrínsecamente desordenadas (IDR, por sus siglas en inglés). Interesantemente, estudios de diversos proteomas, incluido el de humano, han revelado una prevalencia significativa de IDP y su participación funcional en procesos celulares importantes, como la regulación de la transcripción y traducción, así como en vías de señalización y control del ciclo celular (Tsoi et al., 2023).

Algunas IDP asociadas a END incluyen el péptido β -amiloide (β A) y la proteína Tau en la enfermedad de Alzheimer, la proteína alfa-sinucleína (ASYN) en Parkinson, y la proteína de unión a ADN con respuesta transactiva de 43 kDa (TDP-43, por sus siglas en inglés) en la esclerosis lateral amiotrófica (ALS, por sus siglas en inglés). La Figura 2 muestra los principales fenómenos moleculares que ocurren previo a la agregación de proteínas intrínsecamente desordenadas ligadas a enfermedades neurodegenerativas.

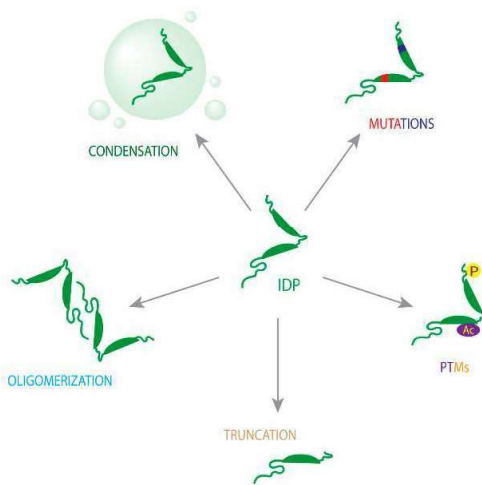


Figura 2. Fundamentos moleculares del plegamiento incorrecto y la agregación de proteínas intrínsecamente desordenadas asociadas a END.

Tomado de (Tsoi et al., 2023). La imagen conserva el texto original de la referencia.

1.2.1. Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo, progresivo, e irreversible que afecta a cerca del 10% de las personas mayores de 65 años, y aumenta al 50% en personas mayores de 85 años. El principal síntoma de la EA es la pérdida gradual de la memoria, como resultado de la disminución de actividad sináptica del cerebro. El origen de la EA aún se desconoce. Sin embargo, se ha propuesto al estrés del RE como un factor transversal en el desarrollo de la enfermedad (Rivera-Krstulović & Duran-Aniotz, 2020). De manera general, la EA es una patología compleja multifactorial, donde la disfunción neuronal tiene un papel fundamental en la patogénesis (Hetz & Mollereau, 2014).

En la EA, la función del RE es esencial en el correcto plegamiento de las proteínas, en el restablecimiento de la proteostasis y en la disminución del estrés celular. Diversos factores pueden alterar la homeostasis celular, lo que conduce a la acumulación progresiva de proteínas mal plegadas, como el péptido β A o la proteína Tau, generando un estrés en el RE. En consecuencia, las células activan mecanismo de señalización intracelular asociado al sistema UPR, el cual ayuda a reestablecer la función normal del RE, disminuyendo así la carga de proteínas mal plegadas. Este mecanismo de respuesta incluye la participación de tres sensores clave de la membrana del RE: PERK (una proteína quinasa del RE parecida a la proteína quinasa R), IRE1 (la enzima 1 del RE dependiente de inositol), y ATF6 (el factor 6 activador de la transcripción) (Bertolotti et al., 2000).

En relación con las proteínas asociadas a la EA, el péptido β A desempeña un papel fundamental en el proceso patológico que caracteriza a este trastorno neurodegenerativo. Este péptido consta de 39–43 residuos y se origina a partir del procesamiento anormal de la proteína precursora amiloide (APP, por sus siglas en inglés). Las placas amiloides, formadas a partir del depósito y la agregación del péptido β A, se consideran un marcador patológico fundamental en el diagnóstico de la enfermedad. Estas placas no se acumulan en las áreas cerebrales críticas para la función cognitiva, pero su presencia se relaciona con la muerte neuronal y la interrupción de la comunicación entre neuronas, lo que exacerba la disfunción sináptica. Además, la agregación del péptido β A tiene un impacto significativo sobre la neuroplasticidad, interfiriendo con los procesos de señalización neuronal, lo que

contribuye de forma sustancial a la progresión de la EA (Tsoi et al., 2023). La hipótesis de la cascada amiloide sugiere que el depósito de agregados βA desencadena la disfunción y muerte neuronal en el cerebro (Figura 3).

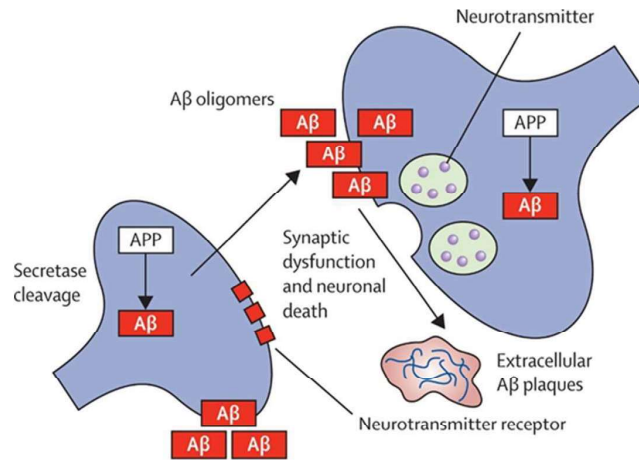


Figura 3. Hipótesis de la cascada amiloide en la enfermedad de Alzheimer.

La APP se procesa en βA , que se acumula dentro de las células neuronales y extracelularmente, donde se agrega en placas. En esta hipótesis, los depósitos de βA son considerados tóxicos. Tomado de (Ballard et al., 2011). La imagen conserva el texto original de la referencia.

Tau, una proteína que se asocia a microtúbulos (MAP, por sus siglas en inglés), es otro factor asociado a la EA. Esta proteína se expresa principalmente en regiones axónicas, donde controla la tasa de ensamblaje y estabilización de los microtúbulos. Por lo tanto, en el tejido nervioso sano, la expresión de Tau es mínima en regiones somato-dendríticas. Sin embargo, durante el desarrollo de la EA, se presenta una acumulación aberrante de Tau en las sinapsis, lo cual se relaciona con la pérdida y deterioro progresivo de las conexiones neuronales.

Por otro lado, evidencias recientes indican que la hiper-fosforilación de Tau se relaciona con sus efectos sinapto-tóxicos. Es decir, esta modificación postraduccional limita la interacción de Tau con los microtúbulos e impulsa su movimiento hacia las conexiones sinápticas, lo que ocasiona un descenso en la transmisión sináptica excitatoria (Harvey, 2024).

1.2.2. Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) es el trastorno neurodegenerativo progresivo relacionado con el movimiento. Algunos de los signos y síntomas que distinguen a esta condición son temblores en reposo, inestabilidad al caminar, e inestabilidad de posturas. Además, se caracteriza por la presencia de agregados cerebrales (intra-neuronales) llamados cuerpos de Lewy, los cuales contienen grandes cantidades de alfa-sinucleína (ASYN) fibrilar. Inicialmente, la EP causa el deterioro de neuronas dopaminérgicas, generando un trastorno de movimiento (Andrews et al., 2024; Balestrino & Schapira, 2020).

La ASYN es una proteína pequeña de 140 residuos, soluble, que se sintetiza principalmente en el sistema nervioso central. El proceso de la agregación inicia con el autoensamblaje de ASYN monomérica en pequeños y abundantes complejos proteicos, que posteriormente se convierten en estructuras intermediarias solubles. Esto conduce a la formación de una estructura de lámina- β cruzada. La ASYN agregada es el componente principal de los cuerpos de Lewy (Sulatskaya et al., 2018).

1.2.3. Esclerosis Lateral Amiotrófica

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una patología neurodegenerativa que afecta a las neuronas motoras superiores e inferiores que se encuentran agrupadas en la corteza cerebral y en la médula espinal. Algunos de los signos y síntomas que se manifiestan en los pacientes de ELA son dificultad de movimiento, disturbios oculares, disfagia, dificultad respiratoria, y disartria (López Pérez et al., 2023).

Algunos de los mecanismos celulares y moleculares asociados al desarrollo de esta patología son la agregación de proteínas citoplasmáticas, algunas mutaciones en proteínas con función enzimática, y la disfunción mitocondrial, entre otros factores. De manera específica, la agregación de proteínas se caracteriza por errores en el plegamiento. Estos agregados suelen depositarse y afectar de forma tóxica a organelos específicos, como la mitocondria, que a la vez provocan una disrupción de la membrana celular (Blokhuys et al., 2013; López Pérez et al., 2023)

La ELA se caracteriza por mutaciones en diversos genes. De manera particular, mutaciones en las secuencias codificantes para FUS (del inglés: *fused-in-sarcoma*) y

TARDBP (del inglés: *TAR DNA binding protein*; también llamada TDP-43) son los más frecuentes, ya que ocasionan agregación proteica y alteran procesos celulares esenciales. FUS se encuentra preferentemente en el núcleo (participando en la remoción de intrones, la estabilidad del ARN y la traducción), pero las mutaciones pueden provocar su acumulación patológica en el citoplasma, afectando estas funciones y alterando la homeostasis del ARN. TARDBP/TDP-43 es una proteína nuclear multifuncional esencial en diversas funciones celulares, especialmente en el metabolismo del ARN (procesamiento y regulación del ARN, así como modulación de la inclusión o exclusión de exones, entre otras). Las mutaciones génicas aumentan su propensión a formar agregados tóxicos en el citoplasma, afectando la función de neuronas y células gliales (Ederle et al., 2018).

1.2.4. Enfermedad de Huntington

La enfermedad de Huntington (EH) es un trastorno neurodegenerativo hereditario progresivo que afecta principalmente al cerebro, causando una combinación de síntomas motores, cognitivos y psiquiátricos-conductuales. La disfunción motora se caracteriza por deterioro de los movimientos involuntarios (como corea, rigidez y distonía) y la ausencia del control de los movimientos voluntarios, presentada como dificultades para planificar y completar tareas (Walker, 2007).

La EH es causada por una mutación única en el gen HTT, ubicado en el cromosoma 4p16.3, el cual codifica para la proteína Huntingtina. La expansión de la repetición del trinucleótido CAG en la región codificante de poliglutamina del exón 1 de HTT es el origen principal de esta enfermedad. La EH de inicio juvenil es una forma inusual de esta condición que afecta a personas menores de 20 años, la cual suele estar asociada con una longitud de repeticiones CAG mayor a 60, alcanzando en algunos casos infantiles hasta 80. Se estima que esta variante representa alrededor del 5% de todos los casos de la EH. Aunque comparte varias características con la enfermedad en adultos, la corea es poco frecuente en pacientes pediátricos. En su lugar, el fenotipo predominante incluye rigidez, acinesia y bradicinesia. Además, son comunes los déficits cognitivos progresivos, lo cual puede presentarse como retraso mental y dificultades de aprendizaje (Jiang et al., 2023).

Se han propuesto e investigado diversos mecanismos para la patogénesis de la EH. Las hipótesis fundamentales que constituyen la base para la investigación y desarrollo de terapias indican una ganancia de toxicidad aberrante por la expresión de la HTT mutante y una pérdida dominante de la actividad de la HTT silvestre. Los mecanismos patogénicos propuestos actualmente se muestran en la Figura 4.

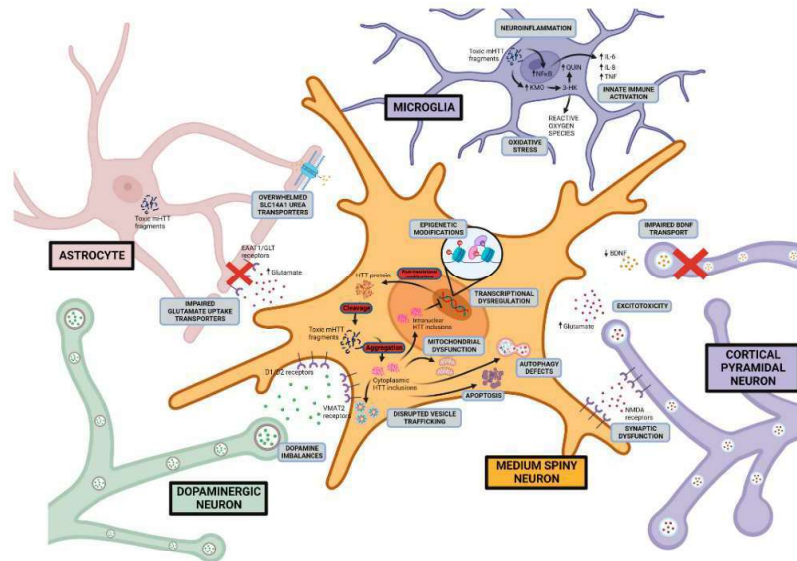


Figura 4. Mecanismos patogénicos propuestos para enfermedad de Huntington.

Posibles mecanismos de la EH y localización de la actividad aberrante, incluyendo excitotoxicidad, desequilibrio dopaminérgico, disfunción mitocondrial, alteración de la proteostasis, inicio de vías apoptóticas, desregulación transcripcional y neuro-inflamación. Tomado de (Jiang et al., 2023). La imagen conserva el texto original de la referencia.

1.2.5. Enfermedades priónicas

Las enfermedades priónicas (EP) son trastornos neurodegenerativos de progresión rápida y desenlace fatal, causados por la conversión de la proteína priónica nativa (PRNP, por sus siglas en inglés) en una isoforma patógena con propiedades anómalas, la cual es capaz de inducir su propia propagación y desencadenar neurotoxicidad, conduciendo a la disfunción neuronal progresiva y la muerte celular (Appleyby et al., 2022).

En condiciones normales, la proteína priónica celular (PrP^c) se encuentra en la superficie de las células neuronales y desempeña funciones biológicas aún no completamente comprendidas. Sin embargo, cuando esta proteína sufre un cambio conformacional, se transforma en su variante patológica (PrP^{Sc}), caracterizada por una estructura rica en láminas beta. Esta forma anómala es capaz de interactuar con las proteínas PrP^c normales, induciendo su conversión a la forma patológica. Este mecanismo desencadena una reacción en cadena que lleva a la acumulación de agregados proteicos insolubles en el tejido cerebral, provocando daño neuronal y la aparición de vacuolas que dan al cerebro una apariencia esponjosa.

La resistencia de los priones a métodos convencionales de inactivación, como el calor y las radiaciones ionizantes, dificulta su eliminación y contribuye a la propagación de las enfermedades priónicas. Además, la ausencia de material genético en los priones los distingue de otros agentes infecciosos, ya que su capacidad de replicación se basa únicamente en la transmisión de su conformación anómala a las proteínas normales (Mandujano et al., 2006).

Las EP humanas se pueden clasificar en tres categorías de acuerdo con su etiología: esporádicas, genéticas, y adquiridas. Las esporádicas constituyen la mayoría de los casos y ocurren de manera aleatoria, sin una causa identificable; por ejemplo, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ), la cual se presenta en individuos sanos sin antecedentes familiares ni exposición conocida a priones. Las genéticas incluyen como factores hereditarios a las mutaciones en el gen PRNP; por ejemplo, la ECJ familiar y el insomnio familiar fatal. Las adquiridas son el resultado de la transmisión de priones a través de medios externos, como el consumo de tejido infectado; por ejemplo, la encefalopatía espongiforme bovina o "mal de las vacas locas" (Appleby et al., 2022; Maddox et al., 2020).

De manera específica, los polimorfismos del gen PRNP y sus variantes patogénicas son fundamentales en la presentación y variabilidad de las EP, ya que, además de contribuir a la predisposición a desarrollar estas condiciones neurodegenerativas, también contribuyen a su presentación clínica, sumándose a otros factores como la edad de inicio y la progresión de los síntomas (Appleby et al., 2022).

1.2.6. Demencia frontotemporal

La demencia frontotemporal (DFT) es una enfermedad neurodegenerativa que ha generado mucho interés en años recientes, principalmente por su impacto en los pacientes y sus familias. Los principales signos y síntomas de la DFT (alteraciones en la conducta, en el lenguaje, y en las funciones ejecutivas) se derivan de lesiones en los lóbulos frontales y temporales del cerebro, lo que conlleva a una deficiencia en las habilidades mentales críticas que permiten a los individuos planificar, tomar decisiones, resolver problemas, controlar impulsos, e incluso adaptarse a nuevas situaciones. El deterioro progresivo observado en la DFT afecta la capacidad de una persona para funcionar adecuadamente en su vida diaria, creando desafíos emocionales y sociales tanto en los pacientes como en las personas que los asisten (Antonioni et al., 2023; Khan & De Jesus, 2024).

La DFT representa alrededor del 10% de las demencias de aparición temprana en individuos menores de 65 años y exhibe múltiples variantes, siendo las más comunes la variante conductual (bvFTD, por sus siglas en inglés) y la afasia progresiva primaria. Además, se ha observado que la DFT pudiera estar relacionada con ELA y otras END, lo que sugiere la existencia de mecanismos patológicos compartidos entre estas condiciones y resalta la complejidad de la DFT (Antonioni et al., 2023; Ghosh & Lippa, 2015).

El diagnóstico temprano y preciso de la DFT es crucial para mejorar la atención y la calidad de vida del paciente, ya que conlleva implicaciones significativas en términos de planificación y manejo de la enfermedad. Los criterios de diagnósticos aceptados incluyen historia clínica, factores de riesgo, y estudios neurológicos, los cuales apoyan a identificar las características centrales de la enfermedad. Además, la utilización de herramientas como la neuroimagen, así como las evaluaciones neuropsicológicas, pueden ser determinantes en la identificación temprana de la DFT (Antonioni et al., 2023; Bott et al., 2014).

La investigación en el campo de la DFT continúa avanzando, impulsada por el creciente interés en comprender mejor la enfermedad e identificar los factores genéticos que contribuyen a su desarrollo. Particularmente, se han asociado a mutaciones en los genes *C9orf72* y *MAPT* como relevantes en la patogénesis. Estos hallazgos abren nuevos caminos para el desarrollo de tratamientos dirigidos a mejorar los resultados clínicos de los pacientes afectados (Balendra & Isaacs, 2018; Sirkis et al., 2019).

La Figura 5 muestra los biomarcadores de la FTD y los mecanismos patogénicos en los cuales se centra la investigación actual.

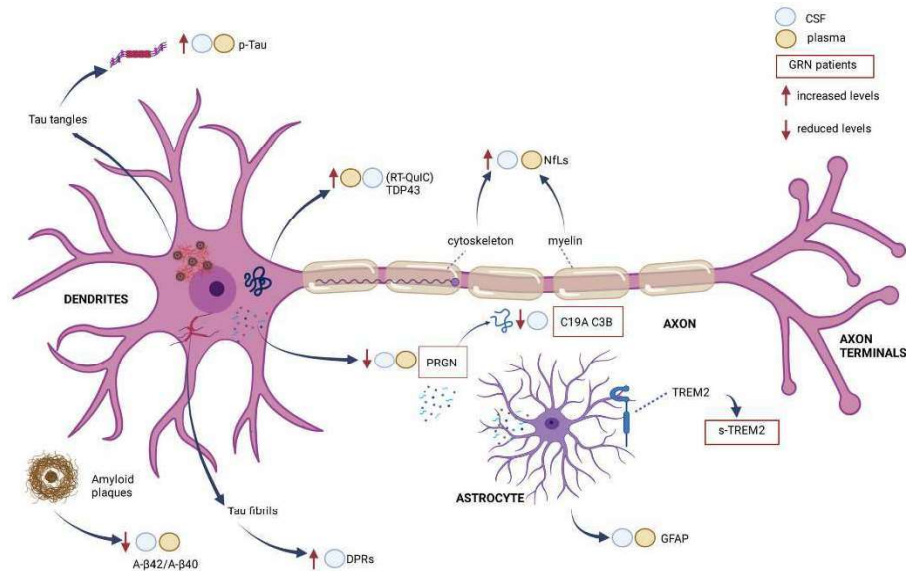


Figura 5. Principales biomarcadores de la FTD y sus mecanismos patogénicos.

LCR: líquido cefalorraquídeo; DPRs: proteínas de repetición de dipéptidos; GFAP: proteína ácida fibrilar glial; GRN: progranulina; NfLs: neurofilamentos; RT-QuIC: conversión inducida por temblores en tiempo real; s-TREM2: fracción soluble de la proteína receptora desencadenante expresada en células mieloides 2; TREM2: proteína receptora desencadenante expresada en células mieloides 2. Tomado de (Antonioni et al., 2023). La imagen conserva el texto original de la referencia.

1.3. Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurodegenerativo progresivo caracterizado primordialmente por alteraciones motoras. Estas incluyen temblor en reposo, rigidez muscular, inestabilidad postural y bradicinesia (ralentización progresiva o reducción de la velocidad de los movimientos). Además de los síntomas motores, la EP está asociada con una amplia variedad de síntomas no motores, como disfunción autonómica, deterioro

cognitivo, trastornos del sueño y síntomas neuropsiquiátricos (de los cuales destacan la depresión, ansiedad y las conductas obsesivo-compulsivas) (Balestrino & Schapira, 2020; Han et al., 2018).

La prevalencia de la EP es de aproximadamente 1% en personas mayores de 65 años. Estadísticamente, la forma esporádica de la enfermedad se diagnostica con mayor frecuencia en hombres, y esta diferencia se acentúa con la edad. En personas menores de 50 años la proporción hombre/mujer es menor a 1.2, mientras que en mayores de 80 años aumenta a 1.6 (Morato Torres et al., 2020).

A nivel celular, la EP se caracteriza por la pérdida de señal en la vía dopaminérgica de la sustancia nigroestriatal, lo que provoca un desequilibrio en las vías neuronales de los ganglios basales. En condiciones normales, esta región del cerebro es importante para la producción de dopamina, un neurotransmisor fundamental en la regulación del movimiento. En la EP, las neuronas dopaminérgicas se degeneran y mueren progresivamente, lo que resulta en una disminución significativa de la producción de dopamina. Este déficit provoca los síntomas motores característicos de la enfermedad, como temblores en reposo, rigidez muscular, bradicinesia y problemas de equilibrio (Schapira & Jenner, 2011). A pesar de los avances en la investigación, la causa de la muerte neuronal sigue siendo desconocida. Este proceso patológico es objeto de estudio intensivo debido a su relevancia en el desarrollo de tratamientos más efectivos para frenar o detener la progresión de la enfermedad (Fung & Peall, 2018; Morato Torres et al., 2020).

Un factor clave en la progresión patológica de la EP es el estrés oxidativo combinado con la disfunción mitocondrial. Un aumento significativo de estrés oxidativo en las neuronas afectadas, inducido por daño oxidativo. Las neuronas afectadas muestran un aumento significativo inducido por daño oxidativo, lo que acelera su degeneración y muerte. Las mitocondrias, responsables de producir la energía necesaria para la función celular, experimentan fallos importantes en su actividad, lo que exacerba aún más la degeneración neuronal. Además, la neuro-inflamación desempeña un papel clave en el proceso. La activación crónica de células gliales, los principales componentes inmunitarios del cerebro, contribuye al daño neuronal y al avance de la EP (Balestrino & Schapira, 2020; Schapira & Jenner, 2011).

La Figura 6 resalta la extensa hiper-ramificación que supone una carga adicional para la regulación metabólica (por ejemplo, para satisfacer la demanda de transporte axonal) y compromete la capacidad de eliminación de residuos para mitigar el estrés oxidativo.

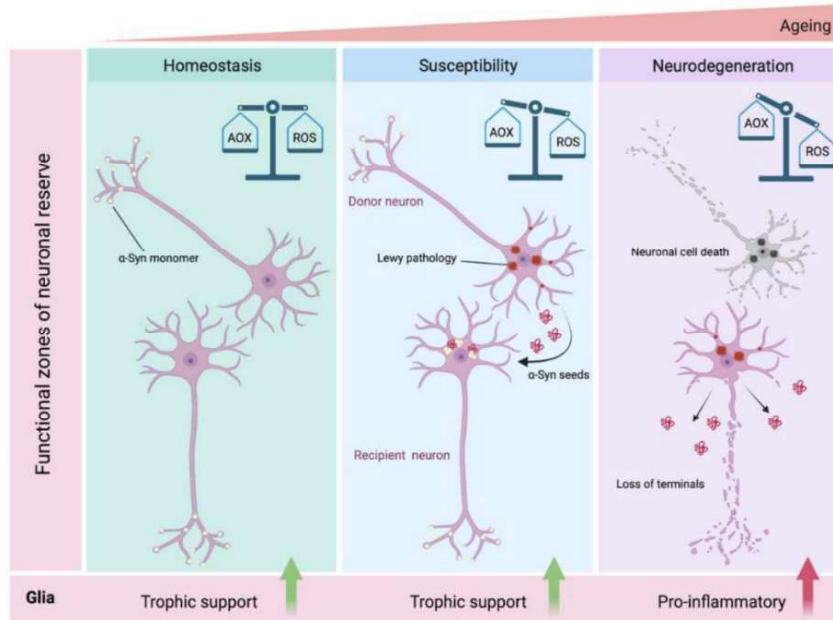


Figura 6. Transmisión neuronal hipotética de alfa-sinucleína y del desequilibrio redox intracelular que provoca la neurodegeneración.

En condiciones normales, la alfa-sinucleína (α -Syn) neuronal existe en conformaciones solubles no agregadas y los mecanismos de eliminación de antioxidantes (AOX) están en equilibrio con la generación intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS). La alfa-sinucleína mal plegada (patológica) perturba el equilibrio redox celular a favor de un exceso de ROS, lo que se ve agravado por otros factores de susceptibilidad/riesgo (p. ej., factores genéticos y envejecimiento) que promueven la agregación de alfa-sinucleína patológica y el estrés proteotóxico. La transmisión célula a célula de alfa-sinucleína patológica desde neuronas afectadas (donantes) a través de sus proyecciones sobre poblaciones neuronales adicionales da lugar a la transmisión de alfa-sinucleína patológica a neuronas receptoras. En éstas, la alfa-sinucleína patológica internalizada reclutan alfa-sinucleína soluble endógena y crean un círculo vicioso de agregación proteica y neurotoxicidad. En la patología neuronal establecida (es decir, a largo plazo), se produce una profunda desregulación del equilibrio AOX/ROS que se asocia con la pérdida de terminales sinápticas y la muerte neuronal. Las células neurogliales modulan estos procesos proporcionando apoyo trófico que sirve para mantener un microambiente local pro-supervivencia. Sin embargo, la implacable progresión de la enfermedad y la consiguiente neurodegeneración son fuertes desencadenantes de la respuesta neuroinflamatoria. Tomado de (Jan et al., 2021). La imagen conserva el texto original de la referencia.

El progreso de los síntomas de la EP sigue una secuencia bien definida. Antes de la aparición de los síntomas motores evidentes, muchas personas atraviesan una fase pre-motora caracterizada por la pérdida del olfato y trastornos del sueño. Con el tiempo, emergen los síntomas motores típicos, como temblores en reposo, rigidez muscular y bradicinesia. A medida que la enfermedad avanza, tanto los síntomas motores como los no motores se intensifican. En las etapas más avanzadas, la EP puede llevar a una pérdida severa de la movilidad, haciendo que los pacientes dependan completamente de otras personas para sus actividades cotidianas (Balestrino & Schapira, 2020).

1.3.1. Diagnóstico

Los avances en la identificación de marcadores en la fase prodrómica de la EP han permitido mejorar el diagnóstico temprano. De manera específica, la detección oportuna de biomarcadores clave permite identificar cambios en el cerebro y en el cuerpo antes de la aparición de los síntomas motores característicos de la enfermedad (Balestrino & Schapira, 2020; Mhyre et al., 2012).

Uno de los biomarcadores principales es la pérdida parcial del sentido del olfato (hiposmia), que puede manifestarse varios años antes del inicio de los síntomas motores. Además, se han identificado alteraciones en el sueño, como el trastorno de conducta del sueño REM, considerado uno de los predictores más fiables del desarrollo futuro de la EP. Las personas que padecen este trastorno presentan riesgo significativamente mayor de desarrollar EP en los años siguientes (Tolosa et al., 2021).

En el ámbito de neuroimagen, la tomografía por emisión de positrones (PET, por sus siglas en inglés) y la tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT, por sus siglas en inglés) se emplean para evaluar la dopamina en el cerebro. Estas técnicas permiten observar la pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra, lo que constituye un indicador claro del desarrollo de la enfermedad. Otros marcadores relevantes incluyen la detección de alfa-sinucleína (ASYN) en líquidos corporales, como el líquido cefalorraquídeo y la sangre. La ASYN es una proteína que tiende a acumularse en el cerebro de las personas con EP llamados cuerpos de Lewy. Su detección en etapas tempranas puede indicar un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad.

Por último, los avances en genética han permitido identificar variantes génicas asociadas a una mayor susceptibilidad a la EP. Mutaciones en genes LRRK2, SNCA y GBA han sido relacionadas con un mayor riesgo de padecer la enfermedad. El análisis genético puede ayudar a identificar personas en riesgo y a ofrecer información clave antes de la aparición de síntomas clínicos (Fung & Peall, 2018; Tolosa et al., 2021). La Figura 7 muestra los mecanismos moleculares que contribuyen a la EP.

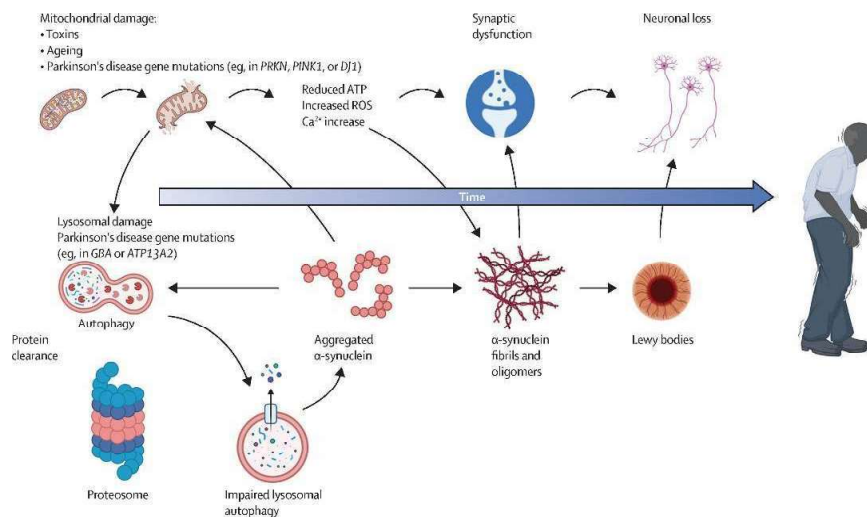


Figura 7. Mecanismos moleculares que contribuyen a la enfermedad de Parkinson.

La identificación de mutaciones asociadas a la EP ha proporcionado una mayor comprensión de los mecanismos moleculares que contribuyen a la patología. Además, la alteración de la homeostasis por deterioro de la función mitocondrial y lisosomal, la alteración del metabolismo lipídico, el estrés del RE y la señalización defectuosa entre el RE y las mitocondrias dan lugar a una cascada de acontecimientos asociados con la acumulación de alfa-sinucleína y la formación de cuerpos de Lewy. Tomado de (Morris et al., 2024). La imagen conserva el texto original de la referencia.

1.3.2. Fisiopatología

En el sistema nervioso central (SNC), las interacciones continuas entre las neuronas, las células gliales y el microambiente son esenciales para mantener la homeostasis neuronal. Los astrocitos, el tipo de células más abundante en el SNC, desempeñan un papel esencial en la homeostasis y el soporte estructural. Sus funciones principales son proveer soporte metabólico a las neuronas, encapsular las sinapsis neuronales, y controlar la permeabilidad

de la barrera hematoencefálica. Estas funciones son esenciales para mantener la actividad neuronal, y su disfunción puede contribuir a los procesos patológicos de la EP. La ASYN desempeña un papel clave en las terminaciones presinápticas, facilitando la función vesicular. Sin embargo, su oligomerización o fosforilación puede llevar a la formación de agregados amiloides, conocidos como cuerpos de Lewy. Estos agregados interrumpen la integridad de la membrana nuclear, afectando factores nucleares como las histonas, lo que finalmente induce la muerte neuronal. La degeneración de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra, combinada con la acumulación de ASYN, disminuye significativamente la secreción de dopamina, lo que se considera el principal factor responsable de los síntomas característicos de la EP (Morris et al., 2024).

Por otro lado, Los avances en patología estructural y bioquímica en humanos, junto con el uso de sistemas modelo, han contribuido significativamente al progreso en la comprensión de la patología de la EP (Figura 8). Por ejemplo, los cuerpos de Lewy están formados por filamentos que atrapan mitocondrias y lisosomas. Además, mutaciones patogénicas de la ASYN aceleran la formación de agregados, lo que sugiere que la disfunción de esta proteína es un paso temprano en la EP familiar, y probablemente de la forma esporádica (Morris et al., 2024).

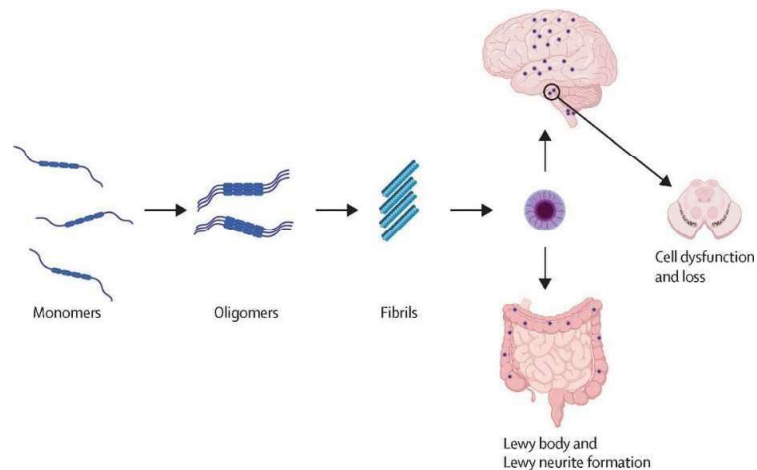


Figura 8. Papel central de alfa-sinucleína en la fisiopatología de la enfermedad de Parkinson.

Tomado de (Morris et al., 2024). La imagen conserva el texto original de la referencia.

1.3.3. Factores genéticos y ambientales

Estudios recientes han intentado explicar los factores de riesgo que predisponen al desarrollo de EP. La comprensión de la arquitectura genética de la enfermedad y los factores de riesgo asociados han permitido identificar a más de 90 factores genéticos relacionados, los cuales explican el 16 – 36% de la heredabilidad de la EP, un rango que coincide con las estimaciones de su prevalencia: 0.5 – 2%. Además, los genes relacionados con la EP están enriquecidos en vías de señalización química y rutas implicadas en la respuesta a factores estresantes (Blauwendraat et al., 2020).

Por otro lado, los factores ambientales también desempeñan un papel importante en la aparición de la EP. Exposiciones a ciertos elementos químicos, como metales, monóxido de carbono, solventes y productos químicos agrícolas, han sido asociados al deterioro de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra, lo que contribuye al daño nigroestriatal característico de la enfermedad. Además, factores como el tabaquismo y el consumo de alcohol también se consideran relevantes para aumentar el riesgo de desarrollar la EP (Chin-Chan et al., 2015).

El diagnóstico oportuno de la EP es clave para mejorar los resultados clínicos, ya que permite intervenir a la enfermedad antes de que los síntomas se tornen severos y ofrece la posibilidad de utilizar tratamientos que ralenticen la progresión de la enfermedad, que mejoren la calidad de vida de los pacientes y reduzcan la carga de los síntomas (Pagan, 2012).

1.3.4. Manifestaciones clínicas y síntomas motores

La bradicinesia, el temblor en reposo y la rigidez muscular son las primeras manifestaciones clínicas más comunes de la EP. Estos síntomas suelen iniciar de manera unilateral y, en estadios más avanzados, afectan el lado contralateral, aunque permanecen con una distribución asimétrica en la mayoría de los casos. Muchos pacientes describen la bradicinesia como una sensación de lentitud generalizada en el movimiento o incluso como una debilidad, lo que puede dificultar la realización de tareas cotidianas (Váradi, 2020).

La cronología propuesta para los síntomas de la EP sugiere que el inicio clínico de los síntomas motores primarios puede producirse años más tarde de iniciada la enfermedad (Figura 9).

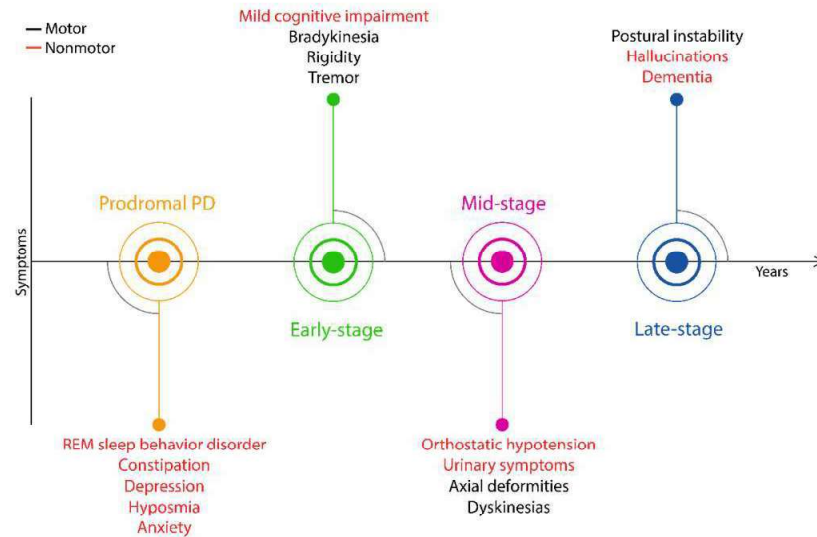


Figura 9. Cronología de los signos clínicos expresados a lo largo de la enfermedad de Parkinson.

La línea de tiempo de la patología de la enfermedad sugiere que es un trastorno multisistémico que afecta a los sistemas nerviosos periférico y central, y que los síntomas motores se manifiestan mucho después de iniciada la neurodegeneración. En cuanto a la aparición de los síntomas, la EP puede dividirse en fases preclínica, prodrómica y clínica. Una neurodegeneración constante sin signos clínicos caracteriza a la fase preclínica, mientras que una duración mayor a 10 años con pérdida neuronal continua y expresión leve de algunos síntomas no motores es propia de la fase prodrómica. Tomado de (Váradi, 2020). La imagen conserva el texto original de la referencia.

1.3.5. Síntomas no motores y otros posibles síntomas

Los déficits cognitivos y la demencia son considerados síntomas no motores de la EP, y suelen manifestarse en etapas tardías. La aparición de la demencia en estas fases se caracteriza por una disminución en las habilidades de construcción y percepción espacial, así como dificultades en el reconocimiento visual. También se observa una pérdida progresiva de la memoria semántica y episódica (Meireles & Massano, 2012).

Otros síntomas no motores incluyen cambios en la expresión facial, una reducción en los niveles del habla y la escritura, que suele volverse más pequeña y menos legible

(micrografía). Estos síntomas no motores, aunque presentes en la mayoría de los pacientes, suelen desarrollarse de forma gradual durante años y frecuentemente no son reportados por los afectados. Además, más del 90% de los pacientes presentan síntomas como hiposmia o anosmia (reducción o pérdida del sentido del olfato), que suelen manifestarse 4 – 6 años antes de la aparición de los síntomas motores característicos (Lee & Koh, 2015). La Figura 10 muestra como la acumulación de ASYN es relevante para el desarrollo de la enfermedad y la predisposición a características particulares, especialmente no motoras. Además, la propagación de ASYN puede conducir al sistema inmune hacia un estado proinflamatorio, perpetuando el proceso neurodegenerativo (Magistrelli et al., 2021).

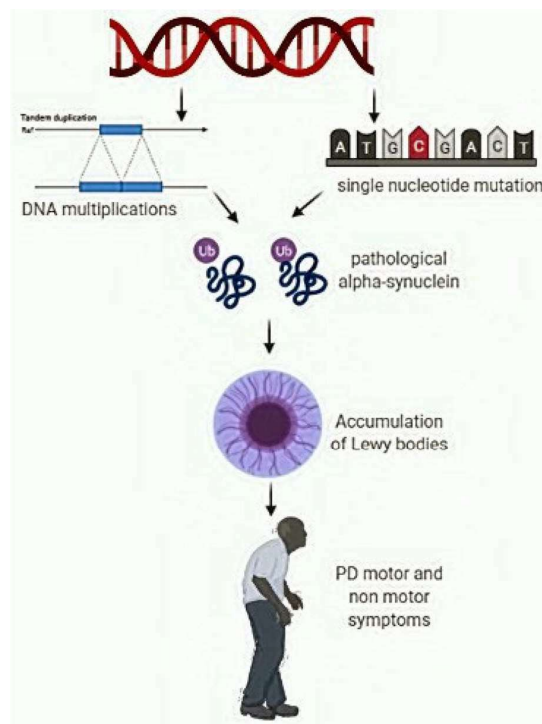


Figura 10. Impacto de las mutaciones de alfa-sinucleína en el desarrollo de síntomas no motores en la enfermedad de Parkinson.

Las mutaciones y polimorfismos generan diferentes niveles de transcripción del gen SNCA. La ASYN se acumula en cuerpos de Lewy o circula por fluidos corporales. Su interacción con células inmunitarias impulsa una respuesta proinflamatoria que favorece la muerte celular. La producción, propagación y deposición de ASYN contribuyen a las manifestaciones motoras y no motoras. Tomado de (Magistrelli et al., 2021). La imagen conserva el texto original de la referencia.

1.3.6. Tratamientos farmacológicos y otras terapias actuales

Existen diversos tratamientos farmacológicos para la EP, entre los cuales destacan los agonistas dopaminérgicos y los inhibidores de la monoamino oxidasa B. La L-DOPA (L-3,4-dihidroxifenilalanina) es un precursor metabólico de la dopamina con capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica y es ampliamente utilizado como fármaco para el tratamiento de la EP. Específicamente, los agonistas dopaminérgicos estimulan los receptores postsinápticos dopaminérgicos, aumentando la actividad del sistema de secreción (Zahoor et al., 2018).

Para pacientes con fluctuaciones motoras refractarias o un control insuficiente del temblor, una opción terapéutica no farmacológica es la estimulación cerebral profunda. Este procedimiento consiste en colocar electrodos en áreas específicas del cerebro (subcutáneas), conectados a un generador de impulsos. Sin embargo, antes de considerar esta intervención, es fundamental evaluar las condiciones psicológicas, psiquiátricas y cognitivas del paciente para determinar su idoneidad (Zahoor et al., 2018).

La rehabilitación es otra intervención que ayuda a mejorar la calidad de vida de los pacientes con EP. Estudios recientes con modelos animales han demostrado que el ejercicio ofrece beneficios significativos, ya que puede promover cambios en la neuroprotección y la neurorestauración después de lesiones cerebrales inducidas, favoreciendo la neurogénesis y otros procesos reparativos (Hirsch & Farley, 2009).

El desarrollo de terapias génicas y celulares representa una estrategia prometedora en el manejo futuro de la EP. Una estrategia es el uso de células madre mesenquimales que incluyen nanopartículas biológicas diseñadas para proteger las áreas afectadas del cerebro. Además, se están explorando terapias con exosomas y ARN mensajero como moduladores activos, lo que podría abrir nuevas posibilidades terapéuticas para tratar y potencialmente detener la progresión de la enfermedad (Palanisamy et al., 2023).

1.3.7. Avances y perspectivas futuras en la investigación

Hoy en día, se están investigando biomarcadores genéticos y tecnologías avanzadas de amplificación de proteínas, como PMCA (*Protein Misfolding Cyclic Amplification*) y RT-QuIC (*Real-Time Quaking-Induced Conversion*). La técnica PMCA (Protein

Misfolding Cyclic Amplification) permite amplificar proteínas priónicas mal plegadas de manera similar a cómo se amplifica ADN en una PCR, pero utilizando proteínas. Funciona al mezclar la proteína priónica normal (PrP^c) con su forma patológica (PrP^{Sc}). La PrP^{Sc} induce la conversión de las proteínas normales a la forma mal plegada. El proceso se repite mediante ciclos de sonicación e incubación: la sonicación fragmenta los agregados en partículas más pequeñas para aumentar su superficie, lo que favorece más conversiones durante la incubación. Este ciclo continuo permite amplificar incluso pequeñas cantidades de PrP^{Sc}, siendo una herramienta muy sensible para detectar priones en tejidos y fluidos.

Por otro lado, la técnica RT-QuIC (Real-Time Quaking-Induced Conversion) también amplifica priones, pero con la ventaja de monitorear el proceso en tiempo real. Se basa en agitar mezclas de PrP^c y PrP^{Sc} para facilitar el contacto entre ellas y, así, acelerar la conversión. La detección de la formación de agregados se realiza mediante colorantes fluorescentes, como la Tioflavina T, que se une a las láminas beta de los agregados priónicos y emite fluorescencia al hacerlo. Esto permite observar el proceso en tiempo real y obtener resultados más rápidos. Debido a su alta sensibilidad, RT-QuIC se emplea en el diagnóstico de enfermedades priónicas a partir de fluidos corporales como el líquido cefalorraquídeo. Ambas técnicas son fundamentales para el estudio de la propagación y detección temprana de enfermedades asociadas a priones.(Atarashi, 2023; Castilla et al., 2006)

Así mismo, se están desarrollando métodos más precisos para detectar la EP antes de que aparezcan los síntomas graves. De manera general, estos enfoques mejoran la capacidad de diagnóstico temprano y facilitan la diferenciación entre la EP y otras enfermedades neurodegenerativas, contribuyendo a tratamientos más específicos y personalizados (Tolosa et al., 2021).

1.3.8. Impacto sociocultural y económico de la enfermedad

La EP representa un desafío médico que tiene un impacto en los ámbitos cultural y económico, ya que es una enfermedad costosa: los gastos relacionados con medicamentos, consultas médicas y hospitalizaciones son elevados. Además, existen costos indirectos asociados, como la pérdida de productividad del paciente y la necesidad de personal de

apoyo (cuidadores) para realizar tareas diarias, lo que incrementa la carga económica para las familias y los sistemas de salud. Por otro lado, las condiciones de los sistemas de salud también son importantes en el manejo de la EP. Por ejemplo, en regiones marginadas o con sistemas de salud deficientes, la falta de acceso a medicamentos, recursos médicos y una adecuada atención agravan la enfermedad, afectando de manera general la calidad de vida de los pacientes con EP, generando un impacto significativo para el manejo y tratamiento de la enfermedad (Albarmawi et al., 2022).

1.4. Alfa-Sinucleína de Humano

La alfa-sinucleína (ASYN) de humano es una proteína compuesta por 140 residuos y está constituida por tres segmentos principales: una región anfipática con repeticiones (N-terminal), una región hidrofóbica central, y una región ácida (C-terminal). Su naturaleza intrínsecamente desordenada está bien establecida en su forma monomérica soluble. Esto significa que ASYN no adopta una estructura tridimensional fija o estable en su estado nativo. En lugar de ello, se encuentra en un estado flexible y desorganizado, lo que la hace más propensa a experimentar cambios conformacionales. Este desorden intrínseco está estrechamente relacionado con su papel clave en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (A. Li et al., 2022).

La ASYN puede adoptar distintas conformaciones, p. ej. estructuras α -helicoidales altamente ordenadas cuando se une a lípidos. Codificada por el gen humano SNCA (NCBI Gene ID: 6622), la ASYN desempeña un papel clave en la patogénesis de la EP y en otras sinucleinopatías relacionadas. Este gen se identificó en 1997 como el primer factor genético asociado a la EP. Su importancia radica en su contribución a la formación de agregados proteicos tóxicos, como los cuerpos de Lewy (Li et al., 2022).

1.4.1. Biología molecular y celular

La ASYN es una proteína multifuncional cuya estructura está relacionada con sus funciones. La región N-terminal interactúa con las membranas lipídicas, mientras que la región central facilita el plegamiento en estructuras de tipo hélices- α . Por otro lado, el

dominio C-terminal (desordenado) participa en las interacciones proteína-proteína. La capacidad de este polipéptido para plegarse y desplegarse le permite adaptarse a diferentes entornos celulares. Su interacción con lípidos y otras proteínas es esencial en diversos procesos, como la regulación de membranas y el transporte sináptico. Además, participa como un regulador esencial de la homeostasis y el tráfico de vesículas sinápticas, la neurotransmisión de dopamina y otros mecanismos implicados en la plasticidad sináptica de las neuronas (Surguchov & Surguchev, 2022).

La ASYN se expresa de manera abundante en todo el cerebro, especialmente en las terminales nerviosas presinápticas. Una de sus funciones clave es unirse a las vesículas sinápticas, promoviendo su agrupamiento. También interactúa con la proteína VAMP2 (*vesicle-associated membrane protein 2*), actuando como chaperona para el ensamblaje del complejo proteico SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor activating protein receptor*), que regula el acoplamiento, ensamblaje y distribución de las vesículas sinápticas (Budday et al., 2015; Morato Torres et al., 2020).

1.4.2. Bioquímica

La ASYN es una proteína que desempeña un papel crucial en el SNC del humano. Como se mencionó antes, su región N-terminal es rica en segmentos anfipáticos que forman hélices- α al interactuar con membranas, su región central es rica en residuos hidrofóbicos esenciales para la agregación en láminas- β , y su región C-terminal es rica en residuos con cargas negativas que previenen la agregación espontánea. Esta proteína tiene una alta afinidad por las membranas fosfolipídicas, especialmente aquellas que contienen lípidos aniónicos. Su interacción con membranas depende del empaquetamiento lipídico, lo que afecta su capacidad para adoptar estructuras ordenadas. Funcionalmente, la ASYN participa en el mantenimiento y reciclaje de las vesículas sinápticas, así como en la regulación de neurotransmisores como la dopamina. Aunque en solución la proteína es desordenada, su interacción con membranas facilita la transición hacia conformaciones más organizadas, un aspecto clave tanto en sus funciones como en los procesos de agregación asociados a enfermedades neurodegenerativas (Vidović & Rikalovic, 2022).

1.4.3. Genética

Un aumento en la expresión del gen SNCA se ha asociado con la acumulación tóxica de ASYN en humanos. Tanto las mutaciones puntuales (polimorfismos genéticos) como la duplicación y la triplicación génica están asociadas con patrones de herencia autosómica dominante de la EP (Stefanis, 2012).

El gen SNCA está ubicado en el cromosoma 4 (*locus* 4q22.1). La primera mutación identificada fue A53T (alanina por treonina en la posición 53). Esta variante afecta la unión a membranas y aumenta la cinética de auto-agregación proteica. Otra mutación, A30P (alanina por prolina en la posición 30), se caracteriza por alteraciones en la termodinámica de plegamiento y una mayor propensión a la agregación. Estudios recientes determinaron que las variantes A18T (alanina por treonina en la posición 18) y A29S (alanina por serina en la posición 29) también exhiben alteraciones en el plegamiento y se agregan más rápido que la proteína silvestre. Por otro lado, se ha observado que polimorfismos en sus regiones reguladoras incrementan el riesgo de padecer la EP, ya que alteran la expresión de ASYN. Además de las mutaciones puntuales, la multiplicación génica (duplicación y triplicación) contribuye a la sobreexpresión de ASYN, incrementando la formación de agregados. Esto desencadena factores clave en la patogénesis de la EP, como la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo y la activación de vías de muerte celular (Srinivasan et al., 2021).

1.4.4. Relación estructura-función

Comprender la relación estructura-función es fundamental para vislumbrar su papel biológico en condiciones normales y patológicas. En su estado nativo, la ASYN es flexible, desordenada y soluble. La región N-terminal es rica en residuos de glutamina y lisina, lo que le permite interactuar con membranas lipídicas celulares, una característica clave para su función. La región central contiene una secuencia rica en prolina que facilita la formación de estructuras hélice- α , desempeñando un papel clave en la regulación de las membranas. La región C-terminal es la menos estructurada y está involucrada en interacciones proteína-proteína y proteína-membrana (Bisi et al., 2021).

En su estado normal, la ASYN participa en la regulación de las vesículas sinápticas, la liberación de neurotransmisores (como la dopamina), la modulación del tráfico celular,

y la homeostasis lipídica. Además, interactúa con otras proteínas para mantener la función neuronal y la homeostasis celular, desempeñando un papel esencial en la integridad del sistema nervioso. Sin embargo, en condiciones patológicas, tiende a formar oligómeros y agregados proteicos denominados cuerpos de Lewy, que son marcadores característicos de enfermedades neurodegenerativas como la EP (Sharma & Burré, 2023).

1.4.5. Mecanismos de agregación proteica

La agregación de ASYN puede estar impulsada por diversos mecanismos clave que amplifican la acumulación de la proteína, creando un ambiente favorable para la formación de fibrillas y cuerpos de Lewy (Stefanis, 2012; Vidović & Rikalovic, 2022).

1. Interacción con lípidos y membranas celulares. ASYN muestra afinidad por membranas lipídicas ricas en cargas negativas, como las compuestas por dimiristoilfosfatidilserina (DMPS). Estas interacciones aumentan la concentración local de ASYN, favoreciendo su agregación. Además, factores como la composición lipídica y la curvatura de las bicapas lipídicas influyen significativamente en la cinética de agregación, potenciando el proceso en entornos lipídicos específicos.
2. Estrés oxidativo. El estrés oxidativo, particularmente causado por especies reactivas de oxígeno (ROS), induce modificaciones estructurales en la ASYN, lo que facilita su agregación. La acumulación de ASYN genera un ciclo vicioso: el daño mitocondrial aumenta la producción de ROS, lo cual a su vez favorece la agregación de la proteína, perpetuando el proceso neurodegenerativo.
3. Modificaciones postraduccionales
 - Fosforilación: La fosforilación en residuos como la serina-129 altera la estructura y función de la proteína, promoviendo la formación de cuerpos de Lewy
 - Ubiquitinación: Alteraciones en este proceso también contribuyen a la disfunción estructural de ASYN, aumentando su acumulación y agregación.
4. Deficiencias en los mecanismos de degradación proteica. Los defectos en la autofagia mediada por chaperonas y en la degradación mediada por proteasoma dificultan la eliminación de ASYN.

1.4.6. Efectos en la función neuronal

La ASYN desempeña un papel crucial en el funcionamiento neuronal, regulando las vesículas sinápticas y facilitando la liberación de neurotransmisores mediante la formación del complejo SNARE en la membrana presináptica. Sin embargo, su acumulación en formas anómalas, como oligómeros o fibrillas, interfiere con estos procesos esenciales. Los agregados de ASYN afectan de manera negativa la fusión de vesículas y la liberación de neurotransmisores, lo que compromete la comunicación neuronal. Además, alteran la integridad de membranas celulares, generando ROS que dañan las mitocondrias y afectan la producción de energía celular, exacerbando el estrés oxidativo y contribuyendo al deterioro neuronal (Gao et al., 2023; Sharma & Burré, 2023).

1.4.7. Asociación con la enfermedad de Parkinson

El gen SNCA está estrechamente relacionado con la EP, ya que codifica para la ASYN. Esta proteína tiene funciones esenciales en la regulación de la actividad sináptica, la plasticidad neuronal y el mantenimiento de las vesículas sinápticas. Las variantes proteicas (por mutaciones) y la multiplicación del gen SNCA pueden generar un efecto de dosis génica, aumentando la expresión de ASYN y favoreciendo la formación de agregados tóxicos de la proteína (Oliveira et al., 2021; Stefanis, 2012).

1.4.8. Modelos experimentales de estudio

Diversos modelos experimentales han generado avances significativos sobre la EP y el papel de la ASYN en el desarrollo de la neurodegeneración. El uso de cultivos celulares ha sido clave para analizar en profundidad el proceso de agregación proteica, así como su propagación similar a los priones (Gómez-Benito et al., 2020; Stefanis, 2012).

Los modelos celulares ofrecen importantes ventajas, como un alto grado de control experimental y una menor complejidad ética en comparación con los modelos animales. Sin embargo, presentan limitaciones al no replicar completamente la complejidad del cerebro humano, lo que puede afectar la extrapolación de los resultados a sistemas más complejos. Diversos estudios han utilizado herramientas innovadoras como líneas celulares

inmortalizadas, neuronas primarias, y células madre pluripotentes inducidas (iPSC) (Cetin et al., 2022).

Por otro lado, los estudios sobre mecanismos priónicos han proporcionado una comprensión más profunda sobre la propagación de ASYN entre neuronas. Estos modelos experimentales exploran cómo proteínas mal plegadas interactúan con proteínas endógenas, promoviendo la acumulación de formas tóxicas, lo que contribuye a la neurodegeneración. Este enfoque ha sido fundamental para comprender las bases moleculares de la patología de la EP y el desarrollo de posibles intervenciones terapéuticas (Frost & Diamond, 2010; Jan et al., 2021),

1.4.9. Terapias dirigidas y otras intervenciones

La ASYN es una diana terapéutica clave para el desarrollo de estrategias terapéuticas dirigidas a tratar las sinucleinopatías, incluidas la EP y otras afecciones relacionadas. Los enfoques para abordar estas patologías se clasifican en tres grupos principales:

1. Inhibición de la formación de agregados tóxicos. Este enfoque se basa en el uso de inhibidores de la agregación para prevenir o reducir la formación de oligómeros y fibrillas tóxicas. Estas moléculas están diseñadas para interferir las interacciones entre regiones críticas de la ASYN, dificultando su auto-agregación.
2. Reducción de la expresión de ASYN. Una estrategia prometedora es la terapia anti-sentido, que emplea oligonucleótidos complementarios dirigidos al ARN mensajero para reducir los niveles de expresión. Este enfoque busca disminuir la cantidad de ASYN disponible en las células, limitando su propensión a formar agregados.
3. Eliminación de agregados tóxicos. Esta estrategia se centra en la eliminación de los agregados de ASYN a través de anticuerpos específicos diseñados para reconocer y eliminar las formas tóxicas de la proteína. Este enfoque también puede modular la respuesta inmune para prevenir la formación y acumulación de agregados.

Estas estrategias buscan prevenir o mitigar los efectos tóxicos asociados con la agregación de ASYN, mejorando así las perspectivas de terapia. Aún más, la combinación

de estrategias podría ofrecer tratamientos más eficaces y personalizados para los pacientes afectados (Baggett et al., 2024; Brundin et al., 2017; Menon et al., 2022).

1.4.10. Avances en investigación y perspectivas futuras

Los avances actuales se centran en el diseño de moléculas capaces de prevenir la acumulación y formación de fibrillas de ASYN, o bien eliminarlas de manera efectiva. Así mismo, las perspectivas futuras se enfocan en la utilización de técnicas avanzadas, como la crio-microscopía electrónica, para analizar en forma detallada los mecanismos moleculares implicados en la agregación de ASYN. Este conocimiento podría proporcionar las bases necesarias para desarrollar tratamientos personalizados que aborden las causas subyacentes de la EP, en lugar de centrarse únicamente en el alivio de los síntomas (Guerrero-Ferreira et al., 2020; Menon et al., 2022; Sechi & Sechi, 2024).

1.5. Importancia de los estudios *in vitro* de la alfa-sinucleína de humano

Los estudios *in vitro* de ASYN son fundamentales para comprender los mecanismos que regulan su plegamiento y las conformaciones que promueven su disfunción, agregación y acumulación en formas tóxicas. Estos ensayos permiten caracterizar los procesos de formación de agregados y fibrillas amiloides, como los cuerpos de Lewy, asociados con enfermedades neurodegenerativas (Domingues et al., 2022; Narkiewicz et al., 2014; Oliveira et al., 2021).

Además, estos estudios son esenciales para analizar las variantes genéticas y mutaciones que afectan la estabilidad y el comportamiento de la ASYN, proporcionando información clave sobre su implicación en patologías específicas. También contribuyen al desarrollo de métodos para detectar microagregados, los cuales podrían servir como biomarcadores para el diagnóstico temprano de enfermedades relacionadas con ASYN, como la EP (Hatano et al., 2024; Oliveira et al., 2021).

Así mismo, los ensayos *in vitro* facilitan la creación de modelos experimentales más precisos, capaces de simular condiciones fisiopatológicas asociadas a la agregación y toxicidad de la ASYN. Estos modelos pueden ser herramientas cruciales para avanzar en la

investigación y el desarrollo de estrategias terapéuticas dirigidas a reducir o mitigar los efectos tóxicos de esta proteína en diversas enfermedades neurodegenerativas (Gómez-Benito et al., 2020; Henriquez & Narayan, 2023; Narkiewicz et al., 2014).

2. OBJETIVOS Y META

2.1. Objetivo General

Integrar un procedimiento para la producción recombinante de la alfa-sinucleína de humano mediante protocolos estándar de expresión en un sistema bacteriano y técnicas de purificación proteica, para desarrollar un bioensayo fluorométrico de detección eficiente de microagregados proteicos.

2.2. Objetivos Específicos

1. Establecer un sistema bacteriano de expresión citosólica de alfa-sinucleína de humano mediante la transformación estable de *E. coli* con el plásmido pE21ASYN, para evaluar la producción recombinante a pequeña escala.
2. Desarrollar un procedimiento para la producción de alfa-sinucleína humana recombinante mediante ensayos de expresión y purificación nativa, para implementar un protocolo confiable y eficiente de producción proteica a escala media.
3. Ejecutar un protocolo de purificación de alfa-sinucleína humana recombinante mediante el empleo de un sistema semiautomatizado de cromatografía de intercambio iónico, para separar a la proteína en estado nativo-monomérico.
4. Determinar los parámetros de un microensayo fluorométrico para la detección simple de microagregados de alfa-sinucleína de humano mediante la evaluación de diferentes relaciones fluorocromo:proteína, para proponer un bioensayo reproducible.
5. Validar el bioensayo para la detección de microagregados de alfa-sinucleína humana mediante la evaluación cinética de la fluorescencia emitida en condiciones estándar de reacción, para comprobar la viabilidad del microensayo propuesto.

2.3. Meta

Presentar un bioensayo estándar simple para la detección indirecta fluorescente de microagregados de alfa-sinucleína de humano como sistema sensible para identificar formas priónicas asociados a la manifestación temprana de la enfermedad de Parkinson.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reactivos químicos, bioquímicos, y biológicos

Todos los reactivos químicos y bioquímicos, grado BM, se obtuvieron de proveedores locales o representantes nacionales de diferentes casas comerciales. Las endonucleasas BamHI, NdeI y XhoI, en conjunto con los amortiguadores recomendados por el proveedor (New England Biolabs), se utilizaron para los análisis de restricción. Los marcadores de peso molecular DNA Ladder 100-pb y λ -HindIII (New England Biolabs) se emplearon para la electroforesis de ADN. El estuche comercial QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (Qiagen) se utilizó para la purificación de ADN plasmídico. Para los lisados bacterianos totales, el reactivo comercial CellLytic[®] B (Sigma) se usó para las condiciones nativas, mientras que la solución 8UTB (urea a 8 M en amortiguador de Tris-HCl a 100 mM, pH 8) se utilizó para las condiciones desnaturalizantes. El marcador de peso molecular *Blue Prestained Protein Marker Broad Range* (New England Biolabs) se usó para la electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes y reductoras.

3.2. Medios de cultivo y células bacterianas

Los medios de cultivo Luria-Bertani (LB) y 2X YT se prepararon de acuerdo con protocolos estándar de laboratorio. Las cepas ER2738 y Lemo21(DE3) de *Escherichia coli* (New England Biolabs) se obtuvieron de la reserva celular del Laboratorio de Investigación en Biotecnología y Biociencias (LIBB) de la FCQI-UABC. La cepa ER2738 se utilizó para propagar plásmidos, mientras que la cepa Lemo21(DE3) se empleó para sobre-expresar la proteína recombinante (Tabla 1).

3.3. Plásmido de expresión de la alfa-sinucleína de humano

El plásmido pET21a-alpha-synuclein, proporcionado por la Fundación Michael J. Fox (Addgene ID: 51486), permite la expresión citosólica de la alfa-sinucleína de humano

Tabla 1. Cepas de *E. coli* utilizadas en el presente estudio.

Cepa	Genotipo
ER2738	<i>F' proA+B+ lacI^f Δ(lacZ)M15 zzf::Tn10(Tet^R)/ fhuA2 glnV Δ(lac-proAB) thi-1 Δ(hsdS-mcrB)5</i>
BL21(DE3)	<i>fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS</i> λ DE3 = λ sBamHIo ΔEcoRI-B int::(<i>lacI::PlacUV5::T7 gene1</i>) <i>i21 Δnin5</i>
Lemo21(DE3)	<i>BL21(DE3)/pLemo(Cam^R)</i> <i>pLemo = pACYC184-PrhaBAD-lysY</i>

nativa recombinante (rHuASYN). Para fines prácticos, este plásmido se renombró como pE21ASYN (Figura 11).

Este plásmido de expresión contiene el gen SNCA (Gene ID: 6622), codificante para la ASYN de humano, bajo el control del promotor T7/lacO (reconocido por la ARN polimerasa del bacteriófago T7 y regulado por el represor LacI). Además, incluye los genes codificantes para la β -lactamasa (expresión constitutiva, confiere resistencia a ampicilina) y para el represor LacI (expresión constitutiva, regulador del operón Lac), y el origen de replicación ColE1 (bacteriano). El vector pE21ASYN se obtuvo de la reserva de materiales biológicos del LIBB de la FCQI-UABC.

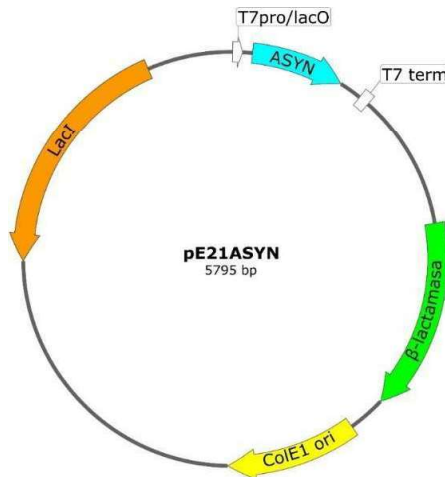


Figura 11. Representación esquemática del plásmido pE21ASYN.

Este vector contiene el gen para la alfa-sinucleína de humano (cian: ASYN) flanqueado por las regiones de regulación del bacteriófago T7 (blanco: promotor [T7pro/lacO]–terminador [T7 term]). Además, incluye el gen para la resistencia a ampicilina (verde: β -lactamasa) y el gen para el represor LacI (naranja). También contiene el origen de replicación bacteriana ColE1 (amarillo).

3.4. Protocolos Generales

3.4.1. Cultivos bacterianos

Las bacterias se cultivaron en LB (líquido o sólido) suplementado con antibióticos: ampicilina a 150 µg/mL y cloranfenicol a 15 µg/mL. A menos que se describa diferente, los cultivos de expresión se prepararon a dos escalas: mini (2–5 mL) o media (100 mL), con diluciones 1:50 de cultivos jóvenes (nocturnos). La propagación celular se realizó mediante incubación a 30 °C durante la noche (12–14 h, 300 rpm).

3.4.2. Preparación de bacterias competentes

Las bacterias competentes para choque térmico se prepararon mediante un protocolo estándar de tratamiento con CaCl₂. Brevemente, 1 mL de LB se inoculó con 20 µL de una suspensión bacteriana y se incubó a 30 °C durante la noche con agitación constante. Al día siguiente, 2 mL de LB se inocularon con 40 µL del cultivo joven y se incubaron a 37 °C durante 2–3 h con agitación constante (hasta lograr una DO₆₀₀ = 0.4–0.6). Inmediatamente, las células bacterianas de 1 mL de cultivo se cosecharon por centrifugación a 10,000 rpm (2 min). La pastilla celular se lavó dos veces (en condiciones estériles): primero con 0.5 mL de agua destilada y luego con 0.5 mL de CaCl₂ a 100 mM. Las células bacterianas lavadas se resuspendieron en 100 µL de CaCl₂ a 100 mM. Después de 5 min en hielo, se emplearon en el protocolo de transformación bacteriana.

3.4.3. Transformación bacteriana mediante choque térmico

Una suspensión celular de bacterias competentes se mezcló con 2 µL del plásmido de interés y se incubó en hielo durante 30 min. La mezcla bacteria-plásmido se sometió a choque térmico como sigue: 1.5 min a 42 °C seguidos de 5 min en hielo. Inmediatamente, las células se recuperaron en 1 mL de 2X YT y se incubaron a 37 °C durante 60 min con agitación constante. Posteriormente, se tomó una muestra (50 µL) de la suspensión celular y se sembró en LB sólido suplementado con antibióticos selectivos. La proliferación de bacterias transformantes (unidades formadoras de colonias, UFC) se llevó a cabo mediante incubación a 37 °C durante la noche (12–14 h).

3.4.4. Electroforesis de ADN en gel de agarosa

Las muestras analíticas fueron preparadas mezclando 10 volúmenes de solución de ADN con 1 volumen de solución 10X para cargado (azul de bromofenol al 0.25%, azul de xilencianol al 0.25%, glicerol al 30%). Enseguida, una alícuota de 10 μ L de cada muestra se cargó en un gel de agarosa al 1%, suplementado con 0.5 μ g/mL de bromuro de etidio. La separación electroforética se realizó a 100 V durante 30–45 min. Una vez concluida, el gel se reveló usando el filtro UV para BrEt en un fotodocumentador.

3.4.5. Electroforesis de proteínas en gel SDS-poliacrilamida al 15%

Las muestras analíticas se prepararon mezclando 1 volumen de solución de proteínas con 1 volumen de solución 2X para SDS-PAGE (glicerol al 10%, SDS al 2.5%, 2-mercaptoetanol al 5%, azul de bromofenol al 0.002%, Tris-HCl a 50 mM, pH 6.8). Enseguida, las proteínas se desnaturalizaron a 95–100 °C durante 10 min. Una alícuota (10 μ L) de cada muestra se cargó en un gel de SDS-poliacrilamida al 15% (Laemmli, 1970). La separación de proteínas (con base a su talla molecular) se realizó a 8–10 mA durante su paso por el gel concentrador (15-30 min) y a 12-14 mA durante su paso por el gel separador (60–90 min). Una vez concluida la separación electroforética, el gel se tiñó durante la noche (12–14 h) con una solución CBB-alcohol-ácido (isopropanol al 25%, ácido acético al 10%, azul brillante de Coomassie® R250 al 0.2%) y se destiñó durante 12–18 h con una solución alcohol-ácido (isopropanol al 10%, ácido acético al 10%).

3.4.6. Cuantificación de proteínas

La concentración total de proteínas se determinó siguiendo un protocolo típico de laboratorio, basada en el ensayo de Bradford (Kielkopf et al., 2020), usando a la albúmina sérica bovina (BSA, por sus siglas en inglés) como estándar para una curva de calibración. En pocillos de una microplaca, se prepararon mezclas (50 μ L) conteniendo las diluciones de BSA (0, 10, 20, 30, 40, y 50 μ g/mL) y de la muestra de interés (habitualmente 1:50, 1:25, 1:20, 1:10, 1:5). En seguida, se añadió el reactivo de Bradford (100 μ L) a cada pocillo y se mezcló suavemente por pipeteo. Después de 5 min a temperatura ambiente (desarrollo del color), la absorbancia a 450 nm (A_{450}) y 595 nm (A_{595}) se registró usando un lector de

microplacas. Los valores obtenidos de absorbancia se emplearon para calcular la relación A_{695}/A_{450} . Las relaciones correspondientes a la BSA se emplearon para realizar una curva estándar, graficando concentración de BSA [$\mu\text{g}/\text{mL}$] contra relación A_{695}/A_{450} . A partir de los datos de la línea recta ($Y = m + aX$; donde Y es la relación A_{695}/A_{450} mientras que X es la concentración en $\mu\text{g}/\text{mL}$), se determinó la concentración de la proteína de interés usando el programa GraphPad® Prism.

3.5. Propagación y caracterización del plásmido pE21ASYN

Una muestra (2 μL) de una mini-preparación del plásmido pE21ASYN se empleó para transformar a células de *E. coli* ER2738 mediante choque térmico. Una vez obtenido el desarrollo colonial (UFC portadoras del plásmido; es decir, resistentes a ampicilina), se seleccionó de manera aleatoria una colonia y se inoculó en 3 mL de LB suplementado con ampicilina (LB/Amp). El cultivo se incubó a 30 °C y 300 rpm durante una noche. El ADN plasmídico se purificó usando un estuche comercial, siguiendo el protocolo recomendado por del proveedor. La caracterización molecular del plásmido pE21ASYN se realizó mediante un análisis de los polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción usando las endonucleasas comerciales BamHI, NdeI y XhoI.

3.6. Transformación de *E. coli* Lemo21(DE3) con pE21ASYN

El plásmido pE21ASYN (puro) se empleó para transformar a *E. coli* Lemo21(DE3) mediante choque térmico. Una vez obtenido el desarrollo colonial (UFC portadoras del plásmido; es decir, resistentes a ampicilina y cloranfenicol), se seleccionó de manera aleatoria una colonia y se inoculó en 3 mL de LB suplementado con los antibióticos (LB/Amp-Cm). Este cultivo se mantuvo en refrigeración y se utilizó como semilla para las etapas posteriores del proyecto.

La cepa Lemo21(DE3) es derivada de BL21(DE3) y promete diferentes propiedades que favorecen la expresión de la proteína rHuASYN. Esta cepa porta al plásmido pLemo, el cual es compatible con plásmidos pET. Lemo21(DE3) ofrece las bondades bioquímicas

de BL21(DE3) a la vez que permite la expresión modulable de proteínas recombinantes dificultosas (p. ej., tóxicas, de membrana, o propensas a la insolubilidad). Cabe destacar que la modulación génica se consigue variando el nivel de expresión de la lisozima del bacteriófago T7, el inhibidor natural de la ARN polimerasa del bacteriófago T7, lo cual se logra añadiendo L-ramnosa (0–2 mM) al cultivo de expresión recombinante.

3.7. Producción de rHuASYN a mini-escala

Primeramente, se realizaron cultivos de expresión a mini-escala para verificar tanto la expresión y la solubilidad como la recuperación de la proteína rHuASYN. El protocolo estándar se realizó como se describe a continuación. 5 mL de LB/Amp-Cm se inocularon con 100 μ L de un cultivo joven de transformantes de *E. coli* Lemo21(DE3) portadora de pE21ASYN. Enseguida, se incubaron a 37 °C y 300 rpm durante 2 h (proliferación celular pre-inducción). Posteriormente, el cultivo se suplementó con 2.5 μ L de IPTG a 1 M. La incubación continuó durante 16 h a 30 °C (proliferación celular post-inducción y expresión proteica). En condiciones similares, se preparó un cultivo carente de IPTG que se utilizó como un control sin inducir. Una vez concluido, los cultivos se fraccionaron en volúmenes de 1.5 mL. Las pastillas celulares se cosecharon mediante centrifugación a 12,000 rpm (2 min) y se conservaron en congelación.

3.7.1. Evaluación de la expresión proteica

Un lote de pastillas celulares, inducido y sin inducir, se descongeló a temperatura ambiente y se resuspendió en 200 μ L de solución 8UTB. De manera inmediata, se realizó una disrupción celular durante 5 min (3,000 rpm). Muestras analíticas (25 μ L) de los lisados bacterianos totales (LBT) se utilizaron para evaluar la expresión de la proteína rHuASYN mediante electroforesis en gel SDS-poliacrilamida.

3.7.2. Evaluación de la solubilidad proteica

Dos lotes de pastillas celulares, inducido y sin inducir, se descongelaron y resuspendieron tal como se indica a continuación. Un lote (CN) en 200 μ L del reactivo

CeLytic[®] B (nativa), y el otro lote (CD) en 200 µL de la solución 8UTB (desnaturalizante). Después de la disrupción celular, el lisado se agitó durante 10 min (*rocking*). La fracción soluble se aisló mediante centrifugación a 13,000 rpm (15 min). Muestras analíticas (25 µL) de los lisados bacterianos solubles totales (LBST) se usaron para determinar la solubilidad de la proteína rHuASYN mediante electroforesis en gel SDS-poliacrilamida.

3.7.3. Recuperación del monómero proteico

Tres lotes de pastillas celulares, inducido y sin inducir, se descongelaron como se indicó arriba. El primer lote se resuspendió en 200 µL de solución TE (Tris-HCl a 10 mM, EDTA a 1 mM; pH 8.0), el segundo lote se resuspendió en 200 µL de solución TELS (TE con NaCl a 50 mM), y el tercer lote se resuspendió en 200 µL de solución TEHS (TE con NaCl a 500 mM). Después, todas las suspensiones se suplementaron con 100 µL de perlas de vidrio (0.1 mm) y se realizó la disrupción celular. Enseguida, se calentaron a 95–100 °C durante 15 min. Las fracciones solubles (es decir, sobrenadantes) se separaron mediante centrifugación a 13,000 rpm (30 min). Muestras analíticas de 25 µL se utilizaron para valorar el nivel de recuperación de la proteína rHuASYN monomérica mediante electroforesis en gel SDS-poliacrilamida al 15%.

3.8. Producción a escala media y purificación de rHuASYN

Primeramente, se realizaron cultivos de expresión a escala media para recuperar la proteína rHuASYN monomérica soluble en alta concentración. El protocolo estándar se realizó como se describe a continuación. Lotes de 100 mL de LB/Amp-Cm se inocularon con 2 mL de un cultivo joven de transformantes de *E. coli* Lemo21(DE3) portadoras de pE21ASYN. Enseguida, se incubaron a 37 °C y 300 rpm durante 2 h (proliferación celular pre-inducción). Posteriormente, el cultivo se suplementó con 50 µL de IPTG a 1 M. La incubación continuó durante 16 h a 30 °C (proliferación celular post-inducción y expresión proteica). Una vez concluido, las pastillas celulares se cosecharon mediante centrifugación a 9,500 rpm (15 min, 10 °C) y se conservaron en congelación.

La pastilla celular se descongeló a temperatura ambiente y se resuspendió en 5 mL de solución TEHS. Inmediatamente, la suspensión se sometió a un protocolo de disrupción celular por ultrasonido [10 pulsos: 30 s x 30 s ON/OFF, 80% de potencia; 5 min, en hielo]. Enseguida, se calentó a 95–100 °C durante 15 min. La fracción soluble (sobrenadante) se separó mediante centrifugación a 13,000 rpm (30 min). Muestras analíticas de 25 µL se utilizaron para verificar la recuperación de la proteína rHuASYN monomérica mediante electroforesis en gel SDS-poliacrilamida al 15%.

3.8.1. Concentración mediante ultrafiltración

La columna Microsep Advance 3K (Pall) se preparó siguiendo las recomendaciones del proveedor. Las fracciones solubles (ricas en rHuASYN) se cargaron a la columna en volúmenes de 2 mL. El proceso de concentración se realizó mediante centrifugaciones continuas (5000 rpm durante 10 min). Para reducir la concentración de NaCl, el volumen mínimo del concentrado (1 mL) se mezcló con un volumen de una solución amortiguadora de Tris-HCl (25 mM, pH 8.0) y se centrifugó hasta recuperar nuevamente el mínimo. Este proceso se repitió cuatro veces más con la finalidad de diluir la concentración de NaCl por lo menos 30 veces (es decir, menor a 20 mM).

3.8.2. Purificación mediante cromatografía de intercambio iónico

Un sistema de cromatografía a baja presión BioLogic™ LP acoplado a un colector de fracciones BioFrac™ (Biorad) se usó para purificar al monómero soluble de la proteína rHuASYN, siguiendo un protocolo estándar de laboratorio. Para la corrida, se utilizaron dos soluciones amortiguadoras típicas: *Buffer A* (Tris-HCl a 25 mM, pH 8.0) y *Buffer B* (NaCl a 0.5 M en Tris-HCl a 25 mM, pH 8.0), y una columna de intercambio iónico (*Bio-Scale™ Mini Macro-Prep® High Q Anion Exchange*).

Primero, el sistema se purgó con *Buffer A* durante 5 min a una velocidad de flujo de 6 mL/min para verificar garantizar la estabilidad de las conexiones. Enseguida, se inyectó 1 mL de la solución de proteína concentrada en el espiral de muestra. Posteriormente, inició la corrida de purificación usando las siguientes condiciones (velocidad de flujo 1.5 mL/min, constante): 3 min de *Buffer A*, 10 min de gradiente 0–50% de *Buffer B*, 6 min de *Buffer B*,

6 min de *Buffer* A. Fracciones de 1.5 mL se colectaron durante todo el proceso. Además, la conductividad y la absorbancia a 280 nm (A_{280}) se registraron en todo momento. Muestras analíticas (10 μ L) de las fracciones con mayor registro de A_{280} se utilizaron para verificar la recuperación de la proteína rHuASYN monomérica mediante electroforesis en gel SDS-poliacrilamida al 15%.

3.8.3. Desalado mediante cromatografía exclusión molecular

Primeramente, la columna PD-10 (Pharmacia), que contiene a la resina Sephadex[®] G-25 (útil para un rápido desalado e intercambio de soluciones amortiguadoras), se preparó siguiendo un procedimiento estándar (recomendado por el proveedor). Las fracciones de la purificación por intercambio iónico (ricas en rHuASYN) se juntaron y se aforaron a un volumen mayor (múltiplo de 2.5 mL) con solución TE. Enseguida, una muestra de 2.5 mL de la solución rica en proteína se cargó en la columna y el efluente se descartó. La proteína rHuASYN monomérica se recuperó mediante elución con 3.5 mL de solución TE.

3.9. Determinación de microagregados de rHuASYN

Los ensayos para detectar los microagregados proteicos se realizaron utilizando al agente químico Tioflavina T (ThT, por sus siglas en inglés), ampliamente reconocido por su capacidad para unirse a fibrillas amiloides y producir una señal fluorescente distintiva. De manera particular, ThT emite fluorescencia a 485 nm cuando es excitada a 450 nm. Este fenómeno ocurre en estructuras proteicas con un mínimo de cuatro láminas- β consecutivas, lo que permite su empleo como marcador altamente sensible para detectar estructuras amiloides en etapas tempranas; es decir, microagregados (Xue et al., 2017).

3.9.1. Evaluación simple de las condiciones de reacción

El efecto de la agitación se determinó usando una incubadora estática y otra con agitación constante (300 rpm), ambas con ambiente controlado 37 °C. Se prepararon siete mezclas de reacción conteniendo 0–300 ng de rHuASYN monomérica (con incrementos de 50 ng) en 50 μ L de solución salina amortiguadora de fosfatos (DPBS). Una mezcla de

reacción con 10 µg de BSA se utilizó como control negativo. Enseguida, las mezclas fueron suplementadas con 50 µL de ThT a 50 µM. Inmediatamente, las reacciones se incubaron durante 24 h en las condiciones mencionadas. La formación de microagregados se detectó mediante un análisis espectrofluorométrico.

3.9.2. Análisis cinético de formación de microagregados proteicos

En condiciones de incubación a 37 °C estática (es decir, sin agitación), se analizó la cinética de formación de los microagregados proteicos durante 96 h, usando variantes del microensayo antes mencionado con ajustes mínimos en la relación fluorocromo:proteína. Primeramente, se prepararon dos lotes de mezclas de reacción conteniendo 25 o 50 ng de rHuASYN monomérica por cada 50 µL (en DPBS). Paralelamente, se prepararon mezclas carentes de proteína, las cuales se usaron como controles. Enseguida, todas las mezclas se suplementaron con un volumen de ThT a 50 µM. De manera inmediata, las reacciones se incubaron en las condiciones mencionadas. La formación de microagregados se determinó cada 24 h mediante un análisis espectrofluorométrico.

3.9.3. Detección espectrofluorométrica de microagregados

Las mediciones de señal fluorescente se llevaron a cabo en un equipo *Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer* (Varian), utilizando una longitud de onda de 450 nm para la excitación y un barrido de 460–600 nm para la emisión, utilizando el registro a 485 nm como la máxima señal para el análisis de los resultados.

3.10. Tratamiento de datos y análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron al menos tres veces. Los datos que mostraron evidencias de un sesgo (p. ej. error experimental, técnico, o humano) se eliminaron sin consideración. Todos los resultados se expresaron como media ± desviación estándar y su significancia estadística se analizó mediante ANOVA y, de ser necesario, con una prueba de Tukey. Los valores $p < 0.05$ se consideraron significativos. Todos los análisis de datos

se realizaron utilizando el paquete biocomputacional GraphPad® Prism 4.03 para Windows (GraphPad Software; www.graphpad.com).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización molecular del pE21ASYN

El plásmido pE21ASYN (nombre original: pET21a-alpha-synuclein) fue diseñado para permitir la expresión citosólica de la alfa-sinucleína de humano nativa recombinante (rHuASYN). Este plásmido contiene el gen SNCA bajo el control del promotor T7/lacO, el cual es reconocido por la ARN polimerasa del bacteriófago T7 y regulado por el represor LacI. Para confirmar su autenticidad, se realizó una caracterización molecular mediante análisis de restricción usando endonucleasas específicas que generan fragmentos de tamaño conocido después de digerir al plásmido. Por ejemplo, al utilizar una endonucleasa que corta a pE21ASYN en un único sitio, se espera un fragmento lineal de 5,795 pb. La Tabla 2 presenta las endonucleasas empleadas y los fragmentos esperados.

Tabla 2. Caracterización molecular del plásmido pE21ASYN. Fragmentos de restricción esperados usando diferentes endonucleasas.

Endonucleasas de restricción	Fragmentos esperados (pb)
BamHI	5,795
NdeI	5,795
XhoI	5,795
BamHI + NdeI	355; 5,440
BamHI + XhoI	79; 5,716
NdeI + XhoI	434; 5,361

El plásmido pE21ASYN fue transformado en *E. coli* ER2738 y propagado bajo condiciones estándar. Posteriormente, se realizó una mini-preparación para aislamiento de ADN plasmídico a partir de una pastilla celular obtenida de 3 mL de cultivo. De acuerdo con los datos reportados por el proveedor de estuche comercial, el rendimiento habitual del procedimiento varía entre 5 y 10 µg (50–100 ng/µL; elución de 0.1 mL), cantidad suficiente para varias aplicaciones de biología molecular, incluyendo caracterización, amplificación, secuenciación, transformación y clonación. Estos valores fueron considerados adecuados para los fines del proyecto, permitiendo avanzar con la caracterización molecular.

El primer análisis de restricción se realizó usando a la endonucleasa BamHI. Como el plásmido pE21ASYN contiene un único sitio para esta enzima, se esperaba un fragmento lineal de 5,795 pb (correspondiente a la longitud total del plásmido). Este enfoque es comúnmente utilizado para confirmar la autenticidad e integridad estructural de plásmidos recombinantes (Sambrook & Russell, 2001). Para el ensayo, se mezclaron 3 μ L de solución de ADN plasmídico (150–300 ng) con la cantidad de enzima y las condiciones óptimas recomendadas por el proveedor. La reacción se realizó siguiendo un protocolo estándar de laboratorio. El producto de la digestión se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa suplementado con bromuro de etidio (BrEt), un agente fluorescente intercalante que permite visualizar los fragmentos de ADN bajo luz UV.

Como se observa en la Figura 12, la digestión del plásmido pE21ASYN con la enzima BamHI generó el fragmento de restricción del tamaño esperado, indicativo de un resultado exitoso.

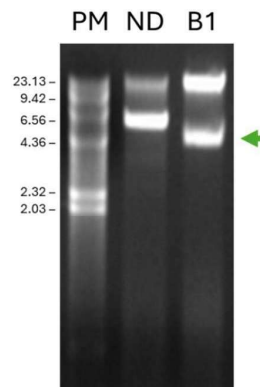


Figura 12. Análisis de restricción del plásmido pE21ASYN usando la endonucleasa BamHI.

Fotodocumento. Electroforesis de ADN en gel de agarosa al 1.2%, teñido con BrEt. En la parte superior se indica la muestra cargada en cada carril: PM, marcador de peso molecular (λ -HindIII); ND, plásmido no digerido (control); B1, plásmido digerido con BamHI. En la parte izquierda se muestran los pesos moleculares correspondientes al marcador (en Kb), mientras que en la parte derecha se señala con una flecha (verde) el fragmento correspondiente al plásmido digerido.

Un segundo análisis de restricción, más exhaustivo, se llevó a cabo utilizando las endonucleasas BamHI, NdeI y XhoI, tanto en digestiones simples y combinadas (dobles). Dado que el plásmido pE21ASYN contiene un sitio único de corte para cada una de estas

enzimas, se esperaba que las digestiones simples produjeran un fragmento de 5,795 pb. Por otro lado, las digestiones combinadas estaban diseñadas para generar dos fragmentos de tamaños específicos, según las predicciones presentadas en la Tabla 2. Para los ensayos de digestión, se prepararon mezclas conteniendo 3 μ L de solución de ADN plasmídico (150–300 ng), la cantidad correspondiente de cada enzima y la solución amortiguadora óptima recomendada por el proveedor. Las reacciones se realizaron siguiendo protocolos estándar de laboratorio, que aseguran la eficiencia y reproducibilidad de los resultados (Sambrook & Russell, 2001). En seguida, los productos de digestión resultantes se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa suplementado con BrEt.

Los resultados obtenidos se ajustaron a las predicciones teóricas, demostrando que las digestiones simples produjeron un único fragmento de 5,795 pb, mientras que las combinadas generaron los fragmentos esperados en función de los sitios de corte específicos para cada enzima. Este análisis confirmó la integridad estructural del plásmido pE21ASYN y respaldó su utilidad como vector funcional para la expresión recombinante, permitiendo avanzar hacia las etapas experimentales posteriores.

4.2. Expresión a mini-escala y caracterización de la rHuASYN

El plásmido pE21ASYN fue transformado posteriormente en células competentes de *E. coli* Lemo21(DE3). Cabe destacar que esta cepa, derivada de BL21(DE3), exhibe las características moleculares y bioquímicas requeridas para producir de manera eficiente a la proteína rHuASYN, incluyendo una expresión génica regulada por la ARN polimerasa del bacteriófago T7 (la cual es inducida por IPTG).

En términos generales, Lemo21(DE3) combina las ventajas de la cepa parental con la capacidad de facilitar la expresión modulable de proteínas recombinantes dificultosas, p. ej. proteínas tóxicas o propensas a la insolubilidad por agregación. Su singularidad radica en la presencia del plásmido pLemo (compatible con vectores del sistema pET), el cual permite la modulación del nivel de expresión de la lisozima del bacteriófago T7 (inhibidor natural de la ARN polimerasa del mismo bacteriófago). A partir de estas características, la expresión de la proteína rHuASYN se ajustó a condiciones estándar de cultivo bacteriano,

orientadas a maximizar el rendimiento mientras se minimizaban los problemas asociados con la producción de una proteína intrínsecamente desordenada.

Los ensayos preliminares de producción recombinante se realizaron a mini-escala, con el propósito de verificar la expresión y solubilidad proteica, así como la recuperación de la proteína rHuASYN. Para esto, se obtuvieron extractos proteicos totales a partir de pastillas celulares de 1.5 mL, derivadas de cultivos bacterianos producidos siguiendo un protocolo estándar: proliferación inicial de 2 horas (37 °C y 300 rpm), inducción con IPTG (concentración final de 0.5 mM), y proliferación final extendida durante 16 horas (30 °C y 300 rpm). Estas condiciones demostraron ser óptimas para la producción proteica y viables para el proceso de escalamiento.

Como parte del análisis inicial de producción de la proteína rHuASYN, se estimó su expresión en condiciones no inducidas e inducidas (0.5 mM de IPTG), así como su solubilidad en dos ambientes: uno desnaturizante (urea a 8 M) y otro nativo (CellLytic® B). Los lisados totales para el ensayo de expresión se obtuvieron directamente (después de la lisis celular), mientras que las fracciones solubles en los diferentes ambientes se aislaron mediante centrifugación. Los extractos proteicos resultantes fueron analizados mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 15%.

Como se muestra en la Figura 13, la concentración de IPTG empleada fue suficiente para inducir una expresión eficiente de la rHuASYN (14.5 KDa), lo cual coincide con valores óptimos reportados para sistemas de expresión recombinante utilizando promotores T7 (Choi & Geletu, 2018). Este hallazgo valida las condiciones experimentales empleadas, mostrando una producción recombinante robusta. Por otro lado, los resultados revelaron que el ambiente desnaturizante proporcionado por urea a 8 M facilitó una mayor recuperación de rHuASYN en comparación con el ambiente nativo ofrecido por CellLytic® B. Este resultado es consistente con diversos estudios previos que destacan la efectividad de los agentes desnaturizantes como la urea para solubilizar proteínas propensas a la formación de agregados (Bennion & Daggett, 2003). De manera específica, la urea interfiere con las interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno que estabilizan los agregados proteicos, promoviendo la solubilidad de las proteínas en condiciones desnaturizantes (Candotti et al., 2013; Zou et al., 1998).

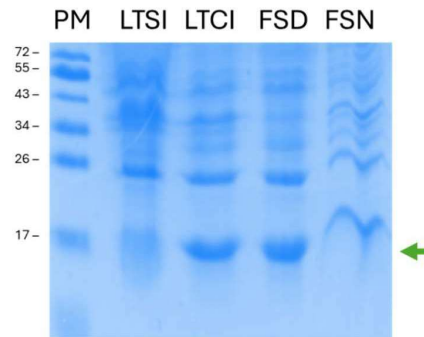


Figura 13. Análisis de expresión y solubilidad de la proteína rHuASYN.

Fotodocumento. Electroforesis de proteínas en gel de SDS-poliacrilamida al 15%, teñido con azul brillante de Coomassie® (ABC). En la parte superior se indica la muestra cargada en cada carril: PM, marcador de peso molecular (*Blue Prestained Protein Standard Broad Range*); LTSI, lisado total de un cultivo no inducido (control); LTCl, lisado total de un cultivo inducido (IPTG a 0.5 mM); FSD, fracción soluble de un lisado obtenido en un ambiente desnaturalizante (urea a 8 M); FSN, fracción soluble de un lisado obtenido en un ambiente nativo (CelLytic® B). En la parte izquierda se muestran los pesos moleculares correspondientes al marcador (en kDa), mientras que en la parte derecha se señala con una flecha (verde) la banda a la proteína rHuASYN.

Por otro lado, los resultados obtenidos en el ambiente proporcionado por CelLytic® B confirmaron que la solubilidad de rHuASYN está altamente condicionada por el entorno. La baja recuperación proteica observada puede atribuirse a su tendencia intrínseca a formar agregados, característica de alfa-sinucleína, así como a la incapacidad de las condiciones nativas típicas para mantenerla en solución. Sin embargo, este hallazgo destacó la necesidad de explorar estrategias alternas para la obtención eficiente de la proteína recombinante.

Estudios previos han reportado protocolos que emplean ambientes con alta salinidad y temperaturas elevadas para recuperar a la rHuASYN. Incorporar NaCl hasta 750 mM ha demostrado prevenir la agregación y estabilizar conformaciones solubles, mientras que la aplicación de tratamientos térmicos controlados puede ayudar a desestabilizar los agregados preformados y favorecer la solubilización (Al-Azzani et al., 2022).

En consideración a estos antecedentes, se implementó una estrategia alternativa para optimizar la recuperación de rHuASYN en la siguiente etapa del proceso de producción. Esta estrategia incluyó la evaluación de dos entornos con distintos niveles de salinidad: uno bajo (50 mM de NaCl) y otro alto (500 mM de NaCl). Además, se utilizó un entorno carente

de sal como control. Las fracciones solubles se aislaron mediante centrifugación, después de la ruptura celular asistida por perlas de vidrio (0.1 mm) y un tratamiento térmico a 95–100 °C, diseñado para desestabilizar agregados proteicos y mejorar la solubilidad de la proteína recombinante. Posteriormente, los extractos proteicos se analizaron mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 15%.

Como se muestra en la Figura 14, la condición de alta salinidad (NaCl a 500 mM) fue más efectiva, logrando una recuperación mayor de rHuASYN en comparación con las otras condiciones: baja salinidad (NaCl a 50 mM) o ausencia de sal. Este resultado es consistente con estudios previos, los cuales demostraron que altas concentraciones de NaCl pueden estabilizar a la proteína y reducir su tendencia a la agregación (Al-Azzani et al., 2022). Además, un alto nivel de salinidad puede ayudar a prevenir interacciones no específicas (Janarthanam et al., 2024), favoreciendo la recuperación de la rHuASYN.

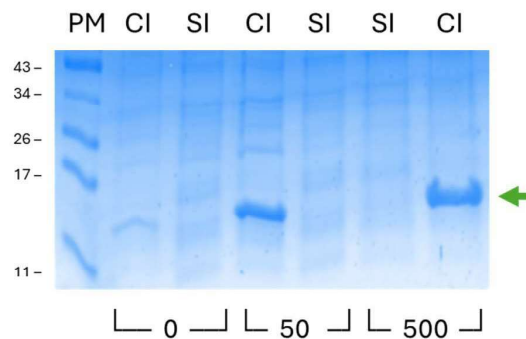


Figura 14. Análisis de recuperación de la proteína rHuASYN.

Fotodocumento. Electroforesis de proteínas en gel de SDS-poliacrilamida al 15%, teñido con ABC. En la parte superior se indica la muestra cargada en cada carril: PM, marcador de peso molecular (*Blue Prestained Protein Standard Broad Range Pre-Stained Protein Marker*); CI, lisado total de un cultivo inducido (IPTG a 0.5 mM); SI, lisado total de un cultivo no inducido. En la parte opuesta (abajo) se indican los carriles correspondientes a muestras tratadas con diferente concentración de NaCl (mM). En el lado izquierdo se muestran los pesos moleculares del marcador (en kDa), mientras que en el lado derecho se señala con una flecha (verde) la banda a la proteína rHuASYN.

De manera global, el entorno de alta salinidad (500 mM de NaCl) se destacó como la opción más adecuada para la recuperación eficiente de rHuASYN, proporcionando una base sólida para avanzar a las siguientes etapas del estudio.

4.3. Producción y purificación de la rHuASYN

En esta fase del proyecto, se realizaron cultivos de expresión a escala media (100 mL) para recuperar la proteína rHuASYN en su forma nativa, monomérica y soluble en alta concentración. Los cultivos celulares se llevaron a cabo utilizando a *E. coli* Lemo21(DE3) transformada con pE21ASYN, siguiendo un protocolo estándar de laboratorio que incluyó una proliferación inicial de 2 horas (37 °C y 300 rpm), seguida de la inducción con IPTG (concentración final de 0.5 mM), y proliferación celular final extendida de 16 horas (30 °C y 300 rpm).

Los extractos proteicos totales se obtuvieron a partir de pastillas celulares derivadas de los cultivos anteriores. Inicialmente, estos paquetes bacterianos se resuspendieron en una solución amortiguadora conteniendo 500 mM de NaCl y se sometieron a disrupción celular mediante ultrasonido. Enseguida, los extractos crudos se trataron térmicamente (95–100 °C durante 15 min), lo que indujo la desnaturalización y precipitación de proteínas celulares (no recombinantes). En el paso anterior, se aprovechó la capacidad de la rHuASYN, como una proteína intrínsecamente desordenada, para tolerar temperaturas elevadas, facilitando su separación del resto de las proteínas celulares mediante centrifugación. La recuperación de rHuASYN se verificó mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 15%.

Cabe destacar que el proceso de purificación de la rHuASYN, en su forma nativa y monomérica soluble, se realizó mediante tres procedimientos consecutivos: concentración de la proteína mediante ultrafiltración (con la concomitante dilución de sales y sustitución del amortiguador), una separación de la forma monomérica mediante una cromatografía de intercambio iónico a baja presión, y remoción de sal (desalado) mediante cromatografía de exclusión molecular.

Primero, las fracciones solubles ricas en rHuASYN se sometieron a ultrafiltración utilizando una columna estándar para dilución de sales, con un tamaño de exclusión de 3K (MWCO 3K), lo que permitió reducir la concentración de sal al menos 30 veces; es decir, una solución con menos de 20 mM de NaCl, en un volumen mínimo de amortiguador Tris-HCl a 25 mM (pH 8.0). Enseguida, la solución proteica resultante se procesó mediante un protocolo estándar de cromatografía de intercambio iónico a baja presión, utilizando un

sistema *BioLogic™ LP* (acoplado a un colector de fracciones *BioFrac™*) con una columna de intercambio iónico *Bio-Scale™ Mini Macro-Prep® High Q Anion Exchange*. Durante este proceso de purificación, se registraron continuamente la conductividad y la absorbancia a 280 nm (A_{280}), y se recolectaron fracciones de 1.5 mL. Muestras analíticas de las fracciones purificadas con mayor registro de A_{280} se utilizaron para verificar la recuperación de la proteína rHuASYN mediante electroforesis en gel SDS-poliacrilamida al 15%.

Como se muestra en la Figura 15, los procedimientos implementados hasta este punto fueron eficientes para proporcionar altos niveles de pureza de la proteína rHuASYN en su forma monomérica. Estos resultados están en concordancia con sistemas de purificación reportados en estudios previos (Janarthanam et al., 2024; Luth et al., 2015; Stephens et al., 2020), los cuales enfatizan la eficacia de la cromatografía de intercambio iónico para el aislamiento de proteínas. De manera específica, las fracciones 17–20 (separación proteica en presencia de 250–500 mM de NaCl) mostraron altos niveles de rHuASYN monomérica, tal como se observa en el perfil de elución y la electroforesis.

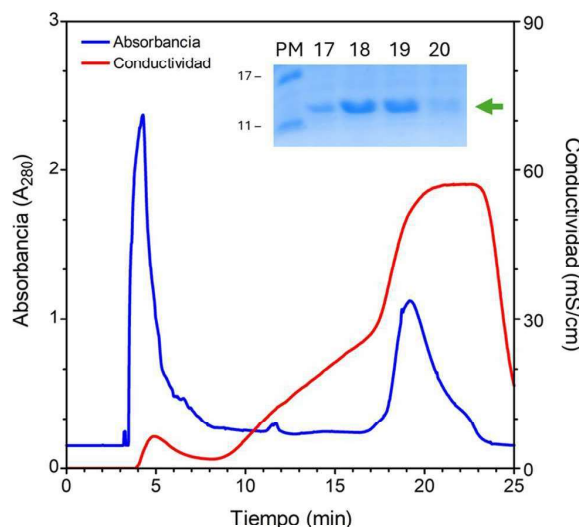


Figura 15. Purificación de rHuASYN monomérica mediante cromatografía de intercambio iónico. Cromatograma. Panel principal: perfiles de absorbancia A_{280} (azul) y conductividad (rojo) relativos al tiempo de elución de las fracciones. Panel menor (interno): electroforesis de proteínas en gel de SDS-poliacrilamida al 15%, teñido con ABC. Parte superior: PM, marcador de peso molecular (*Blue Prestained Protein Standard Broad Range*); 17–20, fracciones de elución. Lado izquierdo: kDa de los marcadores. Lado derecho: banda correspondiente a la proteína rHuASYN (flecha verde).

Este comportamiento es consistente con la afinidad iónica de la proteína por condiciones de salinidad controlada, facilitando su separación eficiente de impurezas y otras formas agregadas. Estos hallazgos validan la aplicabilidad del protocolo empleado para una producción recombinante robusta, reproducible y adecuada para futuras aplicaciones experimentales.

Finalmente, las fracciones con mayor registro de A_{280} , correspondientes a muestras con mayor concentración de rHuASYN, se agruparon y sometieron a un paso adicional de desalado mediante cromatografía de exclusión molecular. Este procedimiento fue diseñado para garantizar la recuperación de la proteína en su forma monomérica, nativa y soluble, empleando un amortiguador con baja concentración de NaCl. Siguiendo un protocolo estándar, la solución proteica se cargó en una columna conteniendo a Sephadex® G-25, una resina ampliamente utilizada en procesos de desalado debido a su capacidad para separar moléculas pequeñas de macromoléculas proteicas de mayor tamaño (Ó'Fágáin et al., 2017). La proteína recombinante se recuperó mediante elución con una solución amortiguadora de Tris:EDTA (10:1 mM, pH 8.0), asegurando condiciones para preservar la solubilidad y funcionalidad de la proteína purificada.

Este paso final permitió reducir la concentración de sales residuales y confirmó la robustez global del protocolo para obtener rHuASYN en un entorno químico compatible con aplicaciones experimentales subsecuentes.

4.4. Determinación de microagregados de alfa-sinucleína

La formación de microagregados de alfa-sinucleína (rHuASYN) se evaluó utilizando un ensayo fluorométrico basado en la Tioflavina T (ThT), una herramienta ampliamente utilizada para detectar estructuras amiloides. ThT es capaz de unirse a fibrillas amiloides y producir una señal fluorescente a 485 nm (después de excitación a 450 nm). Como dato relevante, la unión fibrilla-ThT depende de la presencia de cuando menos cuatro láminas- β consecutivas, lo que garantiza una detección específica y sensible de los microagregados proteicos (Xue et al., 2017).

En la primera parte de este análisis, se evaluaron dos factores clave en la formación de microagregados: la concentración de rHuASYN monomérica y el efecto de la agitación

durante la incubación (como medida indirecta de las interacciones proteicas). Para esto, se prepararon mezclas conteniendo cantidades crecientes proteína (0–150 ng, en incrementos de 25 ng) y ThT a una concentración final de 25 μ M. Estas mezclas se incubaron a 37 °C, tanto sin agitación como agitadas a 300 rpm y se analizaron después de 24 horas. Este diseño experimental permitió analizar el impacto de las interacciones proteína-proteína bajo diferentes configuraciones ambientales.

Como se muestra en la Figura 16, las condiciones estáticas favorecen la formación de microagregados, observándose un aumento sostenido en la intensidad fluorescente en las muestras con rHuASYN, independiente de la concentración. Esto sugiere que la ausencia de agitación facilita las interacciones proteína-proteína necesarias para la nucleación y el crecimiento constante de los agregados durante el periodo analizado.

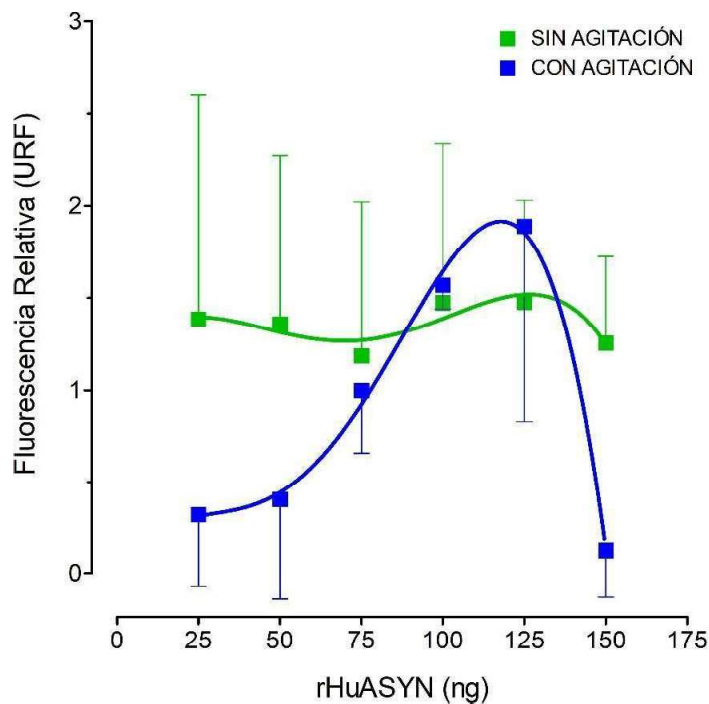


Figura 16. Detección a punto final de microagregados de rHuASYN.

Efecto de la cantidad de rHuASYN y de las condiciones de agitación (identificadas en colores, verde o azul), durante un periodo de 24 horas, sobre la capacidad de la Tioflavina T (ThT) para unirse a microagregados proteicos y actuar como biosensor sensible en la formación de estructuras amiloides tempranas.

Por el contrario, las condiciones de agitación constante revelaron variabilidad en la fluorescencia, caracterizada por un perfil de baja-creciente-máxima-baja señal y el valor más elevado a 125 ng de rHuASYN. El aumento inicial sugiere que la agitación, hasta cierto punto, permite la formación de estructuras detectables. Sin embargo, a cantidades mayores, se observó un descenso abrupto de la fluorescencia, lo que podría indicar la saturación del sistema derivada de una cantidad insuficiente de ThT para unirse a las estructuras amiloides de mayor tamaño molecular. Este comportamiento es consistente con estudios previos, donde la proporción entre ThT y las fibrillas es crítica para una detección eficiente, precisa y reproducible ((Khurana et al., 2005)). Alternativamente, esta disminución en la señal fluorescente podría atribuirse al efecto de la agitación sobre las interacciones proteína-proteína necesarias para la estabilización de los microagregados. La agitación constante puede alterar los procesos de nucleación y elongación, promoviendo la formación de conformaciones no amiloides o desestabilizando las estructuras en formación. Este fenómeno es coherente con observaciones previas que destacan cómo el movimiento mecánico puede interrumpir los contactos específicos entre las láminas- β , impidiendo la organización adecuada de las estructuras amiloides (Xue et al., 2017). Además, el descenso de la fluorescencia a concentraciones elevadas de rHuASYN puede estar relacionado con la generación de agregados más grandes y compactos, que son inaccesibles para la unión del ThT debido a su encapsulación interna, limitando su capacidad de emitir fluorescencia (Biancalana & Koide, 2010).

Estos hallazgos resaltan la importancia de optimizar las condiciones experimentales del proceso de agregación proteica para maximizar la sensibilidad y reproducibilidad del ensayo. Es evidente que, mientras que las cantidades crecientes de rHuASYN favorecen la formación de agregados detectables, las condiciones de agitación ejercen un impacto significativo en este proceso, posiblemente interfiriendo las etapas iniciales de nucleación y elongación necesarias para la formación estable de fibrillas amiloides.

Como parte final, se evaluó el efecto del tiempo en la formación de microagregados durante 96 horas. Para esto, se prepararon mezclas de reacción conteniendo ThT a 25 μ M (final) y 0, 25 o 50 ng de rHuASYN. Estas mezclas se incubaron a 37 °C sin agitación. La fluorescencia se registró a las 24, 48, 72 y 96 horas.

Como se muestra en la Figura 17, no se observó un aumento significativo en la señal a las primeras 24 horas, lo que indica que los procesos iniciales de nucleación son lentos. En cambio, a las 48 horas, se produjo un aumento notable en la señal, evidenciando la formación de microagregados detectables por el biosensor (ThT). De igual manera, a las 72 horas, la señal continuo su aumento, siendo significativamente mayor en la reacción con 50 ng, lo que sugiere una relación directa entre la concentración de proteína y la formación de agregados. Sin embargo, después de este punto, la fluorescencia tiende a estabilizarse, detectándose valores similares a las 96 horas. Este fenómeno podría explicarse por una saturación del sistema, donde la cantidad de ThT disponible se vuelve insuficiente para unirse a los agregados de mayor tamaño, o porque las fibrillas maduras interfieren con la fluorescencia de ThT al encapsular sus sitios de unión (Fodero-Tavoletti et al., 2007).

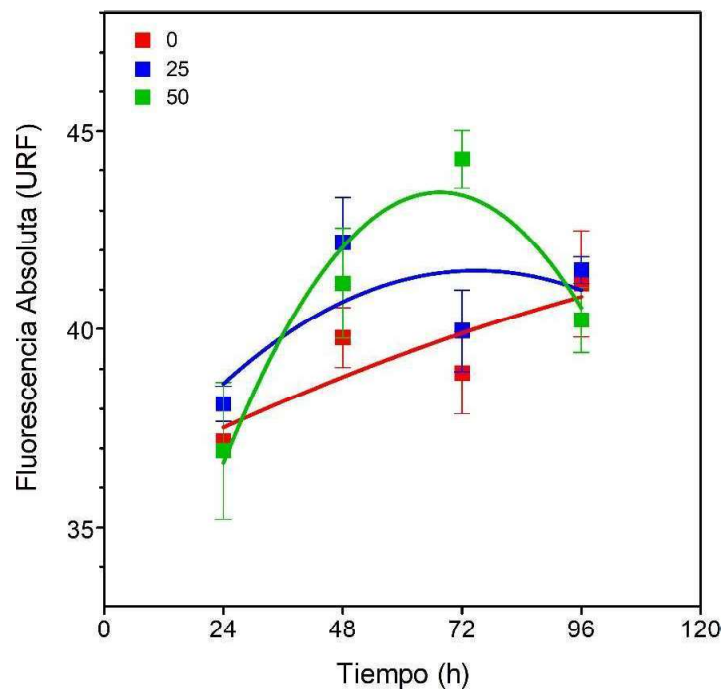


Figura 17. Detección cinética de microagregados de rHuASYN.

Efecto del tiempo de agregación proteica, usando diferentes cantidades rHuASYN (identificadas en colores, rojo, azul o verde), sin agitación, durante un periodo de 96 horas, sobre la capacidad de Tioflavina T (ThT) para unirse a microagregados proteicos y actuar como biosensor sensible en la formación de estructuras amiloides tempranas.

En términos generales, los resultados demuestran que factores experimentales que aparentan ser secundarios, como el movimiento mecánico, pueden influir en la formación y estabilidad de los microagregados. Además, respaldan la idea de que la formación de microagregados de alfa-sinucleína es un proceso que depende del tiempo, la concentración proteica y las condiciones ambientales. Comprender estas variables resulta fundamental para el diseño de ensayos más precisos y para la interpretación adecuada de los resultados en el contexto de estudios *in vitro* relacionados con la enfermedad de Parkinson y otras sinucleinopatías.

4.5. ¿Por qué es importante realizar estudios *in vitro* del comportamiento estructural de la alfa-sinucleína de humano?

Los estudios *in vitro* de alfa-sinucleína son fundamentales para comprender los mecanismos que regulan tanto su plegamiento como las conformaciones estructurales que promueven su disfunción. En su estado nativo, alfa-sinucleína es una proteína intrínsecamente desordenada; sin embargo, bajo ciertas condiciones ambientales, puede adoptar estructuras tóxicas, formando microagregados y fibrillas amiloides, características de diversas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson.

El análisis de las etapas tempranas del proceso de agregación es crucial, ya que las especies oligoméricas intermedias se consideran altamente tóxicas y desempeñan un papel crítico en el deterioro neuronal. Investigar las condiciones que favorecen o previenen la formación de oligómeros, como el pH, la presencia de lípidos, las interacciones con otras proteínas y el estrés oxidativo, podría identificar puntos críticos de intervención terapéutica (Casella et al., 2019; Diociaiuti et al., 2021).

Un aspecto particularmente relevante de los estudios *in vitro* es el desarrollo de métodos avanzados para detectar microagregados de alfa-sinucleína en etapas tempranas de su formación. Estas especies intermedias podrían servir como biomarcadores de diagnóstico para identificar sinucleinopatías antes de la manifestación de síntomas clínicos evidentes. Asimismo, proporcionan una base para la creación de modelos experimentales *in vitro* que

simulan condiciones fisiopatológicas controladas, facilitando su estudio y la evaluación de potenciales estrategias terapéuticas en modelos celulares.

Finalmente, en los últimos años, la implementación de tecnologías avanzadas, como la criomicroscopía electrónica, ha revolucionado la capacidad de caracterizar las estructuras intermedias y finales de alfa-sinucleína en estados patológicos. Esta tecnología ha permitido extraer detalles estructurales sin precedentes, ofreciendo nuevas perspectivas para el diseño de terapias específicas dirigidas a prevenir o revertir la toxicidad asociada a la agregación proteica (Li et al., 2018; Sanchez et al., 2024). De igual manera, la integración de modelos computacionales con estudios experimentales *in vitro* está ayudando a predecir el impacto de diversas mutaciones y condiciones ambientales que afectan la agregación y función de la alfa-sinucleína. Este enfoque multidisciplinario proporciona una visión más integral de los mecanismos moleculares asociados a las sinucleinopatías, cimentando las bases para el desarrollo de terapias más efectivas para combatir condiciones neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson.

5. CONCLUSIONES

La alfa-sinucleína de humano es una proteína relevante en la fisiopatología de la enfermedad de Parkinson y otras sinucleinopatías, derivado de su tendencia a formar agregados tóxicos bajo ciertas condiciones. Comprender su bioquímica y biofísica, así como los mecanismos que regulan agregación proteica es esencial para el desarrollo de herramientas diagnósticas y terapéuticas.

Este proyecto se centró en establecer un sistema de producción recombinante de esta proteína humana (rHuASYN) eficiente, diseñar un protocolo de purificación optimizado e implementar un bioensayo fluorométrico para detectar microagregados proteicos, logrando cumplir con todos sus objetivos. Las conclusiones derivadas se enlistan a continuación:

1. Un procedimiento de expresión, extracción y purificación fue integrado con éxito para la producción de la rHuASYN usando a *E. coli* Lemo21(DE3) como sistema bacteriano. Este proceso se validó a pequeña y mediana escala, estableciendo una base sólida para el escalamiento futuro.
2. La transformación estable de *E. coli* con el plásmido pE21ASYN demostró ser funcional y adecuada para la expresión de rHuASYN. Además, el procedimiento diseñado permitió obtener la proteína en su estado nativo, monomérico y soluble, con una purificación exitosa utilizando cromatografía de intercambio iónico.
3. Un ensayo fluorométrico basado en Tioflavina T (ThT) se implementó y validó con éxito, mostrando reproducibilidad en la detección de microagregados de rHuASYN. La concentración de ThT a 25 μ M fue adecuada para generar señales fluorescentes en muestras con rHuASYN, demostrando su eficiencia como agente biosensor. Además, permitió evaluar la formación de microagregados en un rango de 24 a 96 horas, confirmando la capacidad del ensayo propuesto para monitorear dinámicas de agregación bajo condiciones controladas.
4. La concentración de proteína y la agitación son factores experimentales que influyen de manera significativa en el proceso de nucleación y elongación de los agregados. Mientras las concentraciones crecientes de rHuASYN favorecieron la formación de

microagregados, la agitación alteró este proceso, probablemente interfiriendo en las interacciones proteicas necesarias para estabilizar las estructuras amiloides.

De manera general, la implementación de un bioensayo estándar, simple y eficiente para la detección indirecta de microagregados de alfa-sinucleína humana constituye una herramienta accesible para identificar formas priónicas tempranas de la enfermedad de Parkinson. La aplicación clínica de un bioensayo como el propuesto en el presente estudio es fundamental para futuros estudios biomédicos, contribuyendo al diagnóstico temprano y a la investigación de enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson.

Finalmente, este proyecto sienta las bases para avanzar en el estudio de la biología, bioquímica y biofísica de la alfa-sinucleína, abriendo nuevas oportunidades en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades neurodegenerativas asociadas a la disfunción de esta proteína humana (sinucleinopatías). Asimismo, los resultados de este trabajo vislumbran oportunidades para el desarrollo de herramientas diagnósticas accesibles y rápidas. Una perspectiva ideal sería la generación de métodos que permitan identificar microagregados proteicos directamente en muestras biológicas, como sangre periférica y otros fluidos corporales, mediante ensayos similares a los utilizados en otras enfermedades.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Al-Azzani, M., König, A., & Outeiro, T. F. (2022). Production of Recombinant Alpha-Synuclein: Still No Standardized Protocol in Sight. *Biomolecules*, *12*(2), 324. <https://doi.org/10.3390/biom12020324>
- Albarmawi, H., Zhou, S., Shulman, L. M., Gandhi, A. B., Johnson, A., Myers, D. E., Gray, D., Alvir, J., & Onukwugha, E. (2022). The economic burden of Parkinson disease among Medicare beneficiaries. *Journal of Managed Care & Specialty Pharmacy*, *28*(4), 405–414. <https://doi.org/10.18553/jmcp.2022.28.4.405>
- Almeida, Z. L., & Brito, R. M. M. (2022). Amyloid Disassembly: What Can We Learn from Chaperones? *Biomedicines*, *10*(12), 3276. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10123276>
- Alraawi, Z., Banerjee, N., Mohanty, S., & Kumar, T. K. S. (2022). Amyloidogenesis: What Do We Know So Far? *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(22), 13970. <https://doi.org/10.3390/ijms232213970>
- Andrews, R., Fu, B., Toomey, C. E., Breiter, J. C., Lachica, J., Tian, R., Beckwith, J. S., Needham, L.-M., Chant, G. J., Loiseau, C., Deconfin, A., Baspin, K., Magill, P. J., Jaunmuktane, Z., Freeman, O. J., Taylor, B. J. M., Hardy, J., Lashley, T., Ryten, M., ... Lee, S. F. (2024). Large-scale visualisation of α -synuclein oligomers in Parkinson's disease brain tissue. <https://doi.org/10.1101/2024.02.17.580698>
- Antonioni, A., Raho, E. M., Lopriore, P., Pace, A. P., Latino, R. R., Assogna, M., Mancuso, M., Gragnaniello, D., Granieri, E., Pugliatti, M., Di Lorenzo, F., & Koch, G. (2023). Frontotemporal Dementia, Where Do We Stand? A Narrative Review. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(14), 11732. <https://doi.org/10.3390/ijms241411732>
- Appleby, B. S., Shetty, S., & Elkasaby, M. (2022). Genetic aspects of human prion diseases. *Frontiers in Neurology*, *13*, 1003056. <https://doi.org/10.3389/fneur.2022.1003056>
- Atarashi, R. (2023). RT-QuIC as ultrasensitive method for prion detection. *Cell and Tissue Research*, *392*(1), 295–300. <https://doi.org/10.1007/s00441-021-03568-8>
- Baggett, D., Olson, A., & Parmar, M. S. (2024). Novel approaches targeting α -Synuclein for Parkinson's Disease: Current progress and future directions for the disease-modifying therapies. *Brain Disorders*, *16*, 100163. <https://doi.org/10.1016/j.dscb.2024.100163>
- Balendra, R., & Isaacs, A. M. (2018). C9orf72-mediated ALS and FTD: Multiple pathways to disease. *Nature Reviews. Neurology*, *14*(9), 544–558. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0047-2>
- Balestrino, R., & Schapira, A. H. V. (2020). Parkinson disease. *European Journal of Neurology*, *27*(1), 27–42. <https://doi.org/10.1111/ene.14108>

- Ballard, C., Gauthier, S., Corbett, A., Brayne, C., Aarsland, D., & Jones, E. (2011). Alzheimer's disease. *Lancet (London, England)*, *377*(9770), 1019–1031. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61349-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61349-9)
- Bennion, B. J., & Daggett, V. (2003). The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(9), 5142–5147. <https://doi.org/10.1073/pnas.0930122100>
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L. M., Harding, H. P., & Ron, D. (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nature Cell Biology*, *2*(6), 326–332. <https://doi.org/10.1038/35014014>
- Biancalana, M., & Koide, S. (2010). Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1804*(7), 1405–1412. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.04.001>
- Bisi, N., Feni, L., Peqini, K., Pérez-Peña, H., Ongeri, S., Pieraccini, S., & Pellegrino, S. (2021). α -Synuclein: An All-Inclusive Trip Around its Structure, Influencing Factors and Applied Techniques. *Frontiers in Chemistry*, *9*, 666585. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.666585>
- Blauwendraat, C., Nalls, M. A., & Singleton, A. B. (2020). The genetic architecture of Parkinson's disease. *The Lancet. Neurology*, *19*(2), 170–178. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(19\)30287-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30287-X)
- Blokhuis, A. M., Groen, E. J. N., Koppers, M., Van Den Berg, L. H., & Pasterkamp, R. J. (2013). Protein aggregation in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathologica*, *125*(6), 777–794. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1125-6>
- Bott, N. T., Radke, A., Stephens, M. L., & Kramer, J. H. (2014). Frontotemporal dementia: Diagnosis, deficits and management. *Neurodegenerative Disease Management*, *4*(6), 439–454. <https://doi.org/10.2217/nmt.14.34>
- Brundin, P., Dave, K. D., & Kordower, J. H. (2017). Therapeutic approaches to target alpha-synuclein pathology. *Experimental Neurology*, *298*(Pt B), 225–235. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.10.003>
- Candotti, M., Esteban-Martín, S., Salvatella, X., & Orozco, M. (2013). Toward an atomistic description of the urea-denatured state of proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(15), 5933–5938. <https://doi.org/10.1073/pnas.1216589110>
- Cascella, R., Perni, M., Chen, S. W., Fusco, G., Cecchi, C., Vendruscolo, M., Chiti, F., Dobson, C. M., & De Simone, A. (2019). Probing the Origin of the Toxicity of Oligomeric Aggregates of α -Synuclein with Antibodies. *ACS Chemical Biology*, *14*(6), 1352–1362. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.9b00312>
- Castilla, J., Saá, P., Morales, R., Abid, K., Maundrell, K., & Soto, C. (2006). Protein misfolding cyclic amplification for diagnosis and prion propagation studies. *Methods in Enzymology*, *412*, 3–21. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(06\)12001-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(06)12001-7)

- Cetin, S., Knez, D., Gobec, S., Kos, J., & Pišlar, A. (2022). Cell models for Alzheimer's and Parkinson's disease: At the interface of biology and drug discovery. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *149*, 112924. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112924>
- Chin-Chan, M., Navarro-Yepes, J., & Quintanilla-Vega, B. (2015). Environmental pollutants as risk factors for neurodegenerative disorders: Alzheimer and Parkinson diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *9*, 124. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00124>
- Choi, T.-J., & Geletu, T. T. (2018). High level expression and purification of recombinant flounder growth hormone in *E. coli*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, *16*(2), 347–355. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.03.006>
- Díaz-Villanueva, J., Díaz-Molina, R., & García-González, V. (2015). Protein Folding and Mechanisms of Proteostasis. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(8), 17193–17230. <https://doi.org/10.3390/ijms160817193>
- Diociaiuti, M., Bonanni, R., Cariati, I., Frank, C., & D'Arcangelo, G. (2021). Amyloid Prefibrillar Oligomers: The Surprising Commonalities in Their Structure and Activity. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(12), 6435. <https://doi.org/10.3390/ijms22126435>
- Dobson, C. M. (2003). Protein folding and misfolding. *Nature*, *426*(6968), 884–890. <https://doi.org/10.1038/nature02261>
- Domingues, R., Sant'Anna, R., Da Fonseca, A. C. C., Robbs, B. K., Foguel, D., & Outeiro, T. F. (2022). Extracellular alpha-synuclein: Sensors, receptors, and responses. *Neurobiology of Disease*, *168*, 105696. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2022.105696>
- Ederle, H., Funk, C., Abou-Ajram, C., Hutten, S., Funk, E. B. E., Kehlenbach, R. H., Bailer, S. M., & Dormann, D. (2018). Nuclear egress of TDP-43 and FUS occurs independently of Exportin-1/CRM1. *Scientific Reports*, *8*(1), 7084. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25007-5>
- Englander, S. W., & Mayne, L. (2014). The nature of protein folding pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(45), 15873–15880. <https://doi.org/10.1073/pnas.1411798111>
- Englander, S. W., Mayne, L., & Krishna, M. M. G. (2007). Protein folding and misfolding: Mechanism and principles. *Quarterly Reviews of Biophysics*, *40*(4), 1–41. <https://doi.org/10.1017/S0033583508004654>
- Fodero-Tavoletti, M. T., Smith, D. P., McLean, C. A., Adlard, P. A., Barnham, K. J., Foster, L. E., Leone, L., Perez, K., Cortés, M., Culvenor, J. G., Li, Q.-X., Laughton, K. M., Rowe, C. C., Masters, C. L., Cappai, R., & Villemagne, V. L. (2007). In vitro characterization of Pittsburgh compound-B binding to Lewy bodies. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *27*(39), 10365–10371. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0630-07.2007>
- Frost, B., & Diamond, M. I. (2010). Prion-like mechanisms in neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neuroscience*, *11*(3), 155–159. <https://doi.org/10.1038/nrn2786>

- Fung, W., & Peall, K. J. (2018). Does 22q11.2 deletion syndrome contribute to the genetic aetiology of Parkinson's disease? *Journal of Neurology*, *265*(10), 2463–2465. <https://doi.org/10.1007/s00415-018-9046-x>
- Gao, V., Briano, J. A., Komer, L. E., & Burré, J. (2023). Functional and Pathological Effects of α -Synuclein on Synaptic SNARE Complexes. *Journal of Molecular Biology*, *435*(1), 167714. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2022.167714>
- Ghosh, S., & Lippa, C. F. (2015). Clinical Subtypes of Frontotemporal Dementia. *American Journal of Alzheimer's Disease and Other Dementias*, *30*(7), 653–661. <https://doi.org/10.1177/1533317513494442>
- Gómez-Benito, M., Granado, N., García-Sanz, P., Michel, A., Dumoulin, M., & Moratalla, R. (2020). Modeling Parkinson's Disease With the Alpha-Synuclein Protein. *Frontiers in Pharmacology*, *11*, 356. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00356>
- Guerrero-Ferreira, R., Kovacic, L., Ni, D., & Stahlberg, H. (2020). New insights on the structure of alpha-synuclein fibrils using cryo-electron microscopy. *Current Opinion in Neurobiology*, *61*, 89–95. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2020.01.014>
- Han, J. W., Ahn, Y. D., Kim, W.-S., Shin, C. M., Jeong, S. J., Song, Y. S., Bae, Y. J., & Kim, J.-M. (2018). Psychiatric Manifestation in Patients with Parkinson's Disease. *Journal of Korean Medical Science*, *33*(47), e300. <https://doi.org/10.3346/jkms.2018.33.e300>
- Harvey, J. (2024). Novel Leptin-Based Therapeutic Strategies to Limit Synaptic Dysfunction in Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(13), 7352. <https://doi.org/10.3390/ijms25137352>
- Hatano, T., Okuzumi, A., Matsumoto, G., Tsunemi, T., & Hattori, N. (2024). α -Synuclein: A Promising Biomarker for Parkinson's Disease and Related Disorders. *Journal of Movement Disorders*, *17*(2), 127–137. <https://doi.org/10.14802/jmd.24075>
- Henriquez, G., & Narayan, M. (2023). Targeting α -synuclein aggregation with immunotherapy: A promising therapeutic approach for Parkinson's disease. *Exploration of Neuroprotective Therapy*, 207–234. <https://doi.org/10.37349/ent.2023.00048>
- Hirsch, M. A., & Farley, B. G. (2009). Exercise and neuroplasticity in persons living with Parkinson's disease. *European Journal of Physical and Rehabilitation Medicine*, *45*(2), 215–229.
- Hoppe, T., & Cohen, E. (2020). Organismal Protein Homeostasis Mechanisms. *Genetics*, *215*(4), 889–901. <https://doi.org/10.1534/genetics.120.301283>
- Jan, A., Gonçalves, N. P., Vaegter, C. B., Jensen, P. H., & Ferreira, N. (2021). The Prion-Like Spreading of Alpha-Synuclein in Parkinson's Disease: Update on Models and Hypotheses. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(15), 8338. <https://doi.org/10.3390/ijms22158338>
- Janarthanam, C., Clabaugh, G., Wang, Z., Melvin, B. R., Scheibe, I., Jin, H., Anantharam, V., Urbauer, R. J. B., Urbauer, J. L., Ma, J., Kanthasamy, A., Huang, X., Donadio, V., Zou, W., & Kanthasamy, A. G.

- (2024). High-Yield α -Synuclein Purification and Ionic Strength Modification Pivotal to Seed Amplification Assay Performance and Reproducibility. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(11), 5988. <https://doi.org/10.3390/ijms25115988>
- Jiang, A., Handley, R. R., Lehnert, K., & Snell, R. G. (2023). From Pathogenesis to Therapeutics: A Review of 150 Years of Huntington's Disease Research. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(16), 13021. <https://doi.org/10.3390/ijms241613021>
- Khan, I., & De Jesus, O. (2024). Frontotemporal Lobe Dementia. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559286/>
- Khurana, R., Coleman, C., Ionescu-Zanetti, C., Carter, S. A., Krishna, V., Grover, R. K., Roy, R., & Singh, S. (2005). Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils. *Journal of Structural Biology*, 151(3), 229–238. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2005.06.006>
- Kielkopf, C. L., Bauer, W., & Urbatsch, I. L. (2020). Bradford Assay for Determining Protein Concentration. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2020(4), 102269. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot102269>
- Kovacs, G. (2016). Molecular Pathological Classification of Neurodegenerative Diseases: Turning towards Precision Medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(2), 189. <https://doi.org/10.3390/ijms17020189>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lee, H. M., & Koh, S.-B. (2015). Many Faces of Parkinson's Disease: Non-Motor Symptoms of Parkinson's Disease. *Journal of Movement Disorders*, 8(2), 92–97. <https://doi.org/10.14802/jmd.15003>
- Li, A., Rastegar, C., & Mao, X. (2022). α -Synuclein Conformational Plasticity: Physiologic States, Pathologic Strains, and Biotechnological Applications. *Biomolecules*, 12(7), 994. <https://doi.org/10.3390/biom12070994>
- Li, B., Ge, P., Murray, K. A., Sheth, P., Zhang, M., Nair, G., Sawaya, M. R., Shin, W. S., Boyer, D. R., Ye, S., Eisenberg, D. S., Zhou, Z. H., & Jiang, L. (2018). Cryo-EM of full-length α -synuclein reveals fibril polymorphs with a common structural kernel. *Nature Communications*, 9(1), 3609. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05971-2>
- López Pérez, I., Valencia Silva, A., Varela Polit, L., & Galarza, C. F. (2023). Bioinformatic Studies for the Identification of Possible Therapeutic Targets in Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) Disease: Estudios bioinformáticos para la identificación de posibles dianas terapéuticas en la enfermedad de Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA). *Alimentos Ciencia e Ingeniería*, 30(1), 1–26. <https://doi.org/10.31243/aci.v30i1.2034>
- Luth, E. S., Bartels, T., Dettmer, U., Kim, N. C., & Selkoe, D. J. (2015). Purification of α -synuclein from human brain reveals an instability of endogenous multimers as the protein approaches purity. *Biochemistry*, 54(2), 279–292. <https://doi.org/10.1021/bi501188a>

- Maddox, R. A., Person, M. K., Blevins, J. E., Abrams, J. Y., Appleby, B. S., Schonberger, L. B., & Belay, E. D. (2020). Prion disease incidence in the United States: 2003–2015. *Neurology*, *94*(2). <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000008680>
- Magistrelli, L., Contaldi, E., & Comi, C. (2021). The Impact of SNCA Variations and Its Product Alpha-Synuclein on Non-Motor Features of Parkinson's Disease. *Life (Basel, Switzerland)*, *11*(8), 804. <https://doi.org/10.3390/life11080804>
- Mandujano, A., Montes, S., Guzman, A., Espinosa, B., Rembao, D., Martínez-Cairo, S., Zenteno, E., & Guevara, J. (2006). Fisiopatología de las enfermedades por priones. *Gaceta médica de México*, *142*(5), 399–406.
- Meireles, J., & Massano, J. (2012). Cognitive impairment and dementia in Parkinson's disease: Clinical features, diagnosis, and management. *Frontiers in Neurology*, *3*, 88. <https://doi.org/10.3389/fneur.2012.00088>
- Menon, S., Armstrong, S., Hamzeh, A., Visanji, N. P., Sardi, S. P., & Tandon, A. (2022). Alpha-Synuclein Targeting Therapeutics for Parkinson's Disease and Related Synucleinopathies. *Frontiers in Neurology*, *13*, 852003. <https://doi.org/10.3389/fneur.2022.852003>
- Mhyre, T. R., Boyd, J. T., Hamill, R. W., & Maguire-Zeiss, K. A. (2012). Parkinson's Disease. En J. R. Harris (Ed.), *Protein Aggregation and Fibrillogenesis in Cerebral and Systemic Amyloid Disease* (Vol. 65, pp. 389–455). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-5416-4_16
- Morato Torres, C. A., Wassouf, Z., Zafar, F., Sastre, D., Outeiro, T. F., & Schüle, B. (2020). The Role of Alpha-Synuclein and Other Parkinson's Genes in Neurodevelopmental and Neurodegenerative Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(16), 5724. <https://doi.org/10.3390/ijms21165724>
- Morris, H. R., Spillantini, M. G., Sue, C. M., & Williams-Gray, C. H. (2024). The pathogenesis of Parkinson's disease. *Lancet (London, England)*, *403*(10423), 293–304. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(23\)01478-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)01478-2)
- Narkiewicz, J., Giachin, G., & Legname, G. (2014). In vitro aggregation assays for the characterization of α -synuclein prion-like properties. *Prion*, *8*(1), 19–32. <https://doi.org/10.4161/pri.28125>
- Ó'Fágáin, C., Cummins, P. M., & O'Connor, B. F. (2017). Gel-Filtration Chromatography. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1485*, 15–25. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6412-3_2
- Oliveira, L. M. A., Gasser, T., Edwards, R., Zweckstetter, M., Melki, R., Stefanis, L., Lashuel, H. A., Sulzer, D., Vekrellis, K., Halliday, G. M., Tomlinson, J. J., Schlossmacher, M., Jensen, P. H., Schulze-Hentrich, J., Riess, O., Hirst, W. D., El-Agnaf, O., Mollenhauer, B., Lansbury, P., & Outeiro, T. F. (2021). Alpha-synuclein research: Defining strategic moves in the battle against Parkinson's disease. *NPJ Parkinson's Disease*, *7*(1), 65. <https://doi.org/10.1038/s41531-021-00203-9>
- Pagan, F. L. (2012). Improving outcomes through early diagnosis of Parkinson's disease. *The American Journal of Managed Care*, *18*(7 Suppl), S176–182.

- Palanisamy, C. P., Pei, J., Alugoju, P., Anthikapalli, N. V. A., Jayaraman, S., Veeraraghavan, V. P., Gopathy, S., Roy, J. R., Janaki, C. S., Thalamati, D., Mironescu, M., Luo, Q., Miao, Y., Chai, Y., & Long, Q. (2023). New strategies of neurodegenerative disease treatment with extracellular vesicles (EVs) derived from mesenchymal stem cells (MSCs). *Theranostics*, *13*(12), 4138–4165. <https://doi.org/10.7150/thno.83066>
- Rivera-Krstulović, C., & Duran-Aniotz, C. (2020). La respuesta a proteínas mal plegadas como blanco terapéutico en la enfermedad de Alzheimer. *Revista Médica de Chile*, *148*(2), 216–223. <https://doi.org/10.4067/s0034-98872020000200216>
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual* (3rd ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez, J. C., Pierson, J., Borcik, C. G., Rienstra, C. M., & Wright, E. R. (2024). High-Resolution Cryo-EM Structure Determination of α -synuclein—A Prototypical Amyloid Fibril. *bioRxiv: The Preprint Server for Biology*, 2024.09.18.613698. <https://doi.org/10.1101/2024.09.18.613698>
- Schapira, A. H., & Jenner, P. (2011). Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Movement Disorders*, *26*(6), 1049–1055. <https://doi.org/10.1002/mds.23732>
- Sechi, G. P., & Sechi, M. M. (2024). Small Molecules, α -Synuclein Pathology, and the Search for Effective Treatments in Parkinson's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(20), 11198. <https://doi.org/10.3390/ijms252011198>
- Sharma, M., & Burré, J. (2023). α -Synuclein in synaptic function and dysfunction. *Trends in Neurosciences*, *46*(2), 153–166. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2022.11.007>
- Sirkis, D. W., Geier, E. G., Bonham, L. W., Karch, C. M., & Yokoyama, J. S. (2019). Recent advances in the genetics of frontotemporal dementia. *Current Genetic Medicine Reports*, *7*(1), 41–52. <https://doi.org/10.1007/s40142-019-0160-6>
- Srinivasan, E., Chandrasekhar, G., Chandrasekar, P., Anbarasu, K., Vickram, A. S., Karunakaran, R., Rajasekaran, R., & Srikumar, P. S. (2021). Alpha-Synuclein Aggregation in Parkinson's Disease. *Frontiers in Medicine*, *8*, 736978. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.736978>
- Stefanis, L. (2012). α -Synuclein in Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *2*(2), a009399. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009399>
- Stephens, A. D., Matak-Vinkovic, D., Fernandez-Villegas, A., & Kaminski Schierle, G. S. (2020). Purification of Recombinant α -synuclein: A Comparison of Commonly Used Protocols. *Biochemistry*, *59*(48), 4563–4572. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.0c00725>
- Sulatskaya, A. I., Rodina, N. P., Sulatsky, M. I., Povarova, O. I., Antifeeva, I. A., Kuznetsova, I. M., & Turoverov, K. K. (2018). Investigation of α -Synuclein Amyloid Fibrils Using the Fluorescent Probe Thioflavin T. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(9), 2486. <https://doi.org/10.3390/ijms19092486>

- Tolosa, E., Garrido, A., Scholz, S. W., & Poewe, W. (2021). Challenges in the diagnosis of Parkinson's disease. *The Lancet Neurology*, *20*(5), 385–397. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(21\)00030-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(21)00030-2)
- Tsoi, P. S., Quan, M. D., Ferreon, J. C., & Ferreon, A. C. M. (2023). Aggregation of Disordered Proteins Associated with Neurodegeneration. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(4), 3380. <https://doi.org/10.3390/ijms24043380>
- Tsuboyama, K., Dauparas, J., Chen, J., Laine, E., Mohseni Behbahani, Y., Weinstein, J. J., Mangan, N. M., Ovchinnikov, S., & Rocklin, G. J. (2023). Mega-scale experimental analysis of protein folding stability in biology and design. *Nature*, *620*(7973), 434–444. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06328-6>
- Váradí, C. (2020). Clinical Features of Parkinson's Disease: The Evolution of Critical Symptoms. *Biology*, *9*(5), 103. <https://doi.org/10.3390/biology9050103>
- Vidović, M., & Rikalovic, M. G. (2022). Alpha-Synuclein Aggregation Pathway in Parkinson's Disease: Current Status and Novel Therapeutic Approaches. *Cells*, *11*(11), 1732. <https://doi.org/10.3390/cells11111732>
- Walker, F. O. (2007). Huntington's disease. *Lancet (London, England)*, *369*(9557), 218–228. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60111-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60111-1)
- Wen, J.-H., He, X.-H., Feng, Z.-S., Li, D.-Y., Tang, J.-X., & Liu, H.-F. (2023). Cellular Protein Aggregates: Formation, Biological Effects, and Ways of Elimination. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(10), 8593. <https://doi.org/10.3390/ijms24108593>
- Xue, C., Lin, T. Y., Chang, D., & Guo, Z. (2017). Thioflavin T as an amyloid dye: Fibril quantification, optimal concentration and effect on aggregation. *Royal Society Open Science*, *4*(1), 160696. <https://doi.org/10.1098/rsos.160696>
- Zahoor, I., Shafi, A., & Haq, E. (2018). Pharmacological Treatment of Parkinson's Disease. In T. B. Stoker & J. C. Greenland (Eds.), *Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects*. Codon Publications. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK536726/>
- Zou, Q., Habermann-Rottinghaus, S. M., & Murphy, K. P. (1998). Urea effects on protein stability: Hydrogen bonding and the hydrophobic effect. *Proteins*, *31*(2), 107–115.