

6 Agentes de tinción específicos de estructura amiloide

Además de la microscopía electrónica de transmisión, otra técnica diagnóstica de la naturaleza amiloide son los agentes de tinción específicos. El más destacado de éstos es el colorante rojo Congo (CR), el cual aún hoy se utiliza en los diagnósticos post-mortem de enfermedades amiloides.

El CR no sólo se usa como agente de tinción en los análisis cualitativos utilizando microscopía óptica, sino que también existen técnicas espectrofotométricas que permiten cuantificar la cantidad de estructura amiloide presente. Otro compuesto muy utilizado para cuantificar el contenido amiloide es la tioflavina T (ThT), cuya interacción con fibras amiloides potencia la fluorescencia de esta molécula.

La forma en que estos compuestos interaccionan con las estructuras amiloides no es conocida, aunque se sabe que la unión se realiza mediante mecanismos diferentes y, en el caso del CR, existen estudios que apuntan a la importancia tanto de las interacciones hidrofóbicas como a las fuerzas de Van der Waals^{191,192}. Sorprendentemente, en la bibliografía¹⁹³ se señala que determinados lotes de péptido o preparaciones unen únicamente CR y no ThT, a pesar de mostrar estructuras amiloides indistinguibles mediante TEM de las obtenidas en preparaciones capaces de unir ambos compuestos.

6.1 Microscopía óptica en presencia de CR

Las fibras amiloides son anisotrópicas. Por este motivo, resultan birrefringentes cuando se observan en un microscopio bajo luz doblemente polarizada[♦] y, cuando las moléculas de CR se unen a ellas, éstas se orientan, dando lugar a una coloración verde manzana característica.

¹⁹¹ Pigorsch, E.; Elhaddaout, A.; Turrell, S. *Spectrochim. Acta* **1994**, 50A, 2145-2152.

¹⁹² Klunk, W. E.; Pettegrew, J. W.; Abraham, D. J. *Histochem. Cytochem.* **1989**, 37, 1293-1297.

¹⁹³ Goldsbury, C. S.; Wirtz, S.; Müller, S. A.; Sunderji, S.; Wicki, P.; Aebi, U.; Frei, P. *J. Struct. Biol.* **2000**, 130, 217-231.

♦ La luz doblemente polarizada se obtiene utilizando dos filtros polarizadores cruzados a 90°.

6 Agentes de tinción específicos

La aparición de este color verde, debido a la anisotropía de las fibras, es lo que se utiliza como criterio para determinar la naturaleza amiloide de un agregado. Además, como se detalla en el apartado 6.2, la unión de las moléculas de CR a las fibras amiloides conlleva un cambio macroscópico: el espectro de absorción del CR se ve alterado en el seno de las fibras, lo que se puede utilizar, en algunos casos, para cuantificar el contenido en estructuras amiloides.

6.1.1 Preparación de muestras

Los protocolos tradicionales¹⁹⁴ se basan en inmovilizar la muestra (mediante secado) sobre un portaobjetos y posteriormente deshidratarla con alcohol, teñir el sólido con CR, lavar y secar, como se detalla en el apartado 8.6.1.1.

Al utilizar este protocolo se detectaron problemas en la adhesión de la preparación (se pierde mucha muestra durante los lavados), además de observarse artefactos provenientes de las sales presentes en la muestra (las sales, procedentes de la solución tampón, difractan la luz). Por este motivo se decidió modificar el protocolo de preparación de muestras, realizando las medidas en suspensión y eliminando el uso de etanol, como se indica en el apartado 8.6.1.2.

La Figura 126 nos muestra el aspecto que ofrece una preparación de $\beta(1-42)$ con CR en suspensión al observarla en el microscopio óptico, según el tipo de luz.

La imagen obtenida bajo luz doblemente polarizada muestra que la preparación contiene estructuras amiloides (presenta agregados con el color verde característico), pero plantea varias dudas: ¿qué son las estructuras de color rojizo y/o brillante?, ¿es normal el aspecto de la preparación? Para poder determinar estas preguntas se compararon las muestras preparadas utilizando ambos métodos. La micrografía de la Figura 127 corresponde a una muestra de $\beta(1-42)$ teñida mediante el método clásico.

¹⁹⁴ Castaño, E. M.; Ghiso, J.; Prelli, F.; Gorevic, P. D.; Migheli, A.; Frangione, B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1986**, *141*, 782-789.

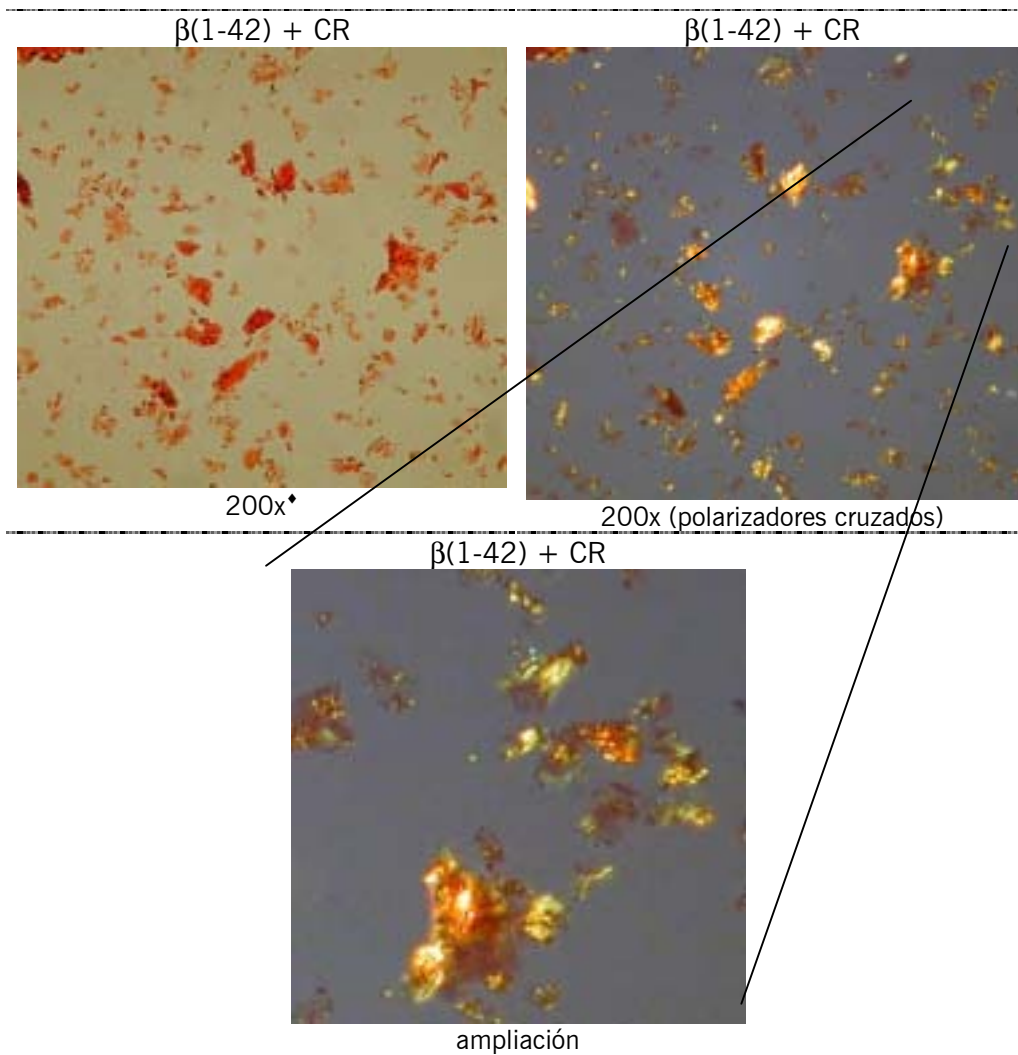


Figura 126. A la izquierda se muestra una micrografía de $\beta(1-42)$ con CR bajo luz visible normal. Se aprecian diversas estructuras con CR adsorbido. La figura de la derecha muestra el mismo encuadre observado bajo luz doblemente polarizada. Pueden apreciarse, bajo un fondo negro, partículas del característico color verde manzana, acompañadas de estructuras más brillantes y otras de color rojizo. En la parte inferior se muestra una ampliación donde se aprecian más claramente los diferentes colores.

En la preparación tradicional se pierde gran parte de la muestra, pero se pudo observar la estructura que se muestra en la Figura 127. La flecha indica una pequeña porción de sólido que presenta el color amarillo-verdoso característico de una estructura amiloide. La mayor parte del precipitado es de apariencia blanquecina, ligeramente rosada, con pequeños puntos brillantes. Por tanto podemos afirmar que esta gran masa corresponde a una estructura amorfa o sal (no adhiere CR), la cual no posee el brillo asociado a la estructura amiloide (los pequeños puntos brillantes que se observan en la ampliación de la Figura 127 podrían corresponder a microzonas de ordenación amiloide).

[♦] 200x indica que se utilizaron 200 aumentos ópticos.

6 Agentes de tinción específicos

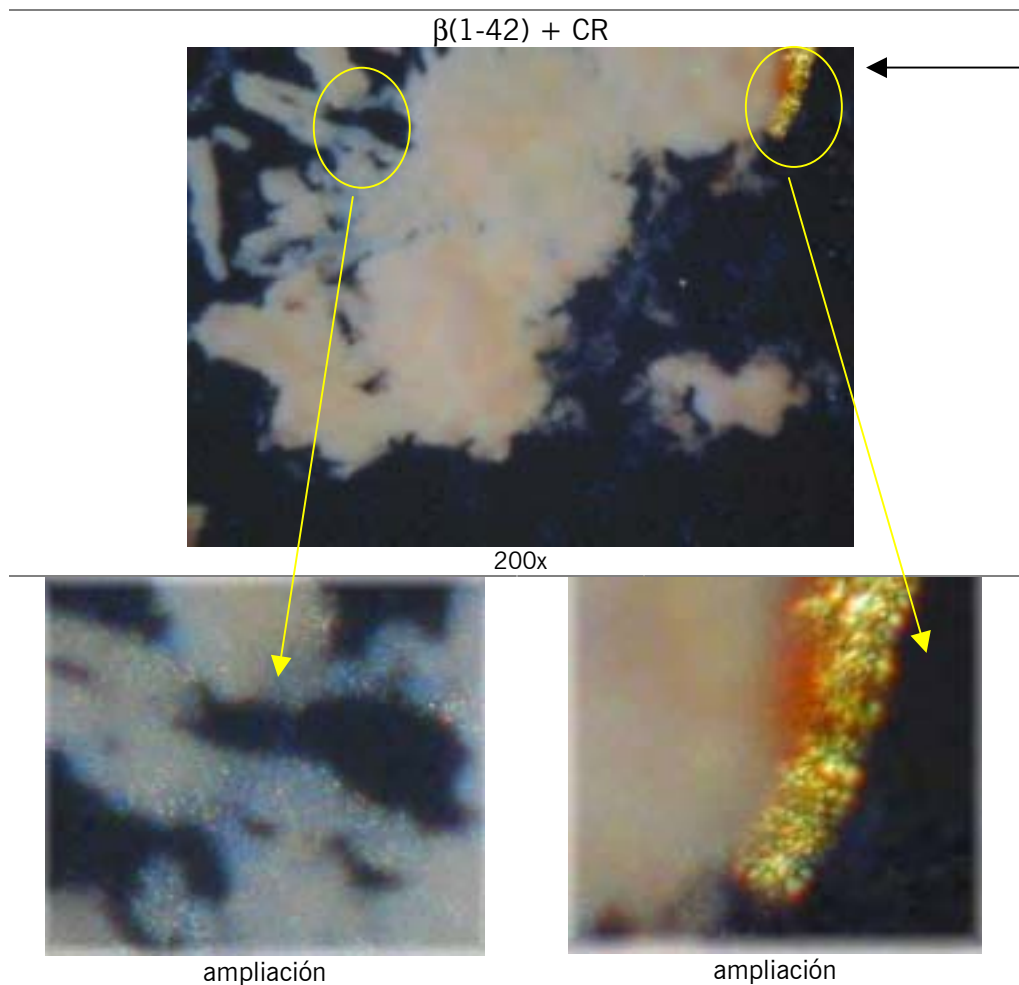


Figura 127. Arriba, muestra de $\beta(1-42)$ teñida con CR utilizando el protocolo clásico (apartado 8.6.1.1) y observada bajo luz doblemente polarizada, utilizando una aumento de 200x. Abajo, una ampliación de las zonas señaladas en amarillo.

En la preparación clásica, se procede a lavar la muestra sucesivas veces con EtOH, tanto antes como después de la tinción con CR. Así se elimina el exceso de colorante, adherido de forma no específica a las estructuras amorfas, y que confiere el tono rojizo (al lavar con EtOH sólo se aprecia una coloración rosada). En este tipo de preparación parece, por tanto, más clara la distinción entre estructuras amiloides (color verdoso y brillantes) y amorfas (blanquecinas y mates). No obstante, la pérdida de muestra durante la preparación hace que no sea el método de elección.

La micrografías de la Figura 126 y la Figura 127 recuerdan bastante a algunas encontradas en la bibliografía para estructuras amiloides¹⁹⁵, pero difieren

¹⁹⁵ Wickner, R. B.; Taylor, K. L.; Edskes, H. K.; Maddelein, M. L.; Moriyama, H.; Roberts, B. T. *J. Struct. Biol.* **2000**, *130* (2/3), 310-322.

considerablemente de otras¹⁹⁶. Por este motivo se decidió utilizar otro tipo de fibras de proteína amiloide, como son las fibras de insulina, para asegurar la validez del método de tinción.

Las fibras de insulina, como se detalla en el apartado 6.2.2.2, presentan la ventaja de ser obtenidas mediante un método sencillo y controlable¹⁹⁷, asegurando la interconversión de las estructuras solubles a fibras amiloides. Su utilización permite, por tanto, observar el aspecto de una preparación con un elevado contenido amiloide. En la Figura 128 se muestran fibras de insulina teñidas con CR utilizando el método en suspensión descrito en el apartado 8.6.1.2.

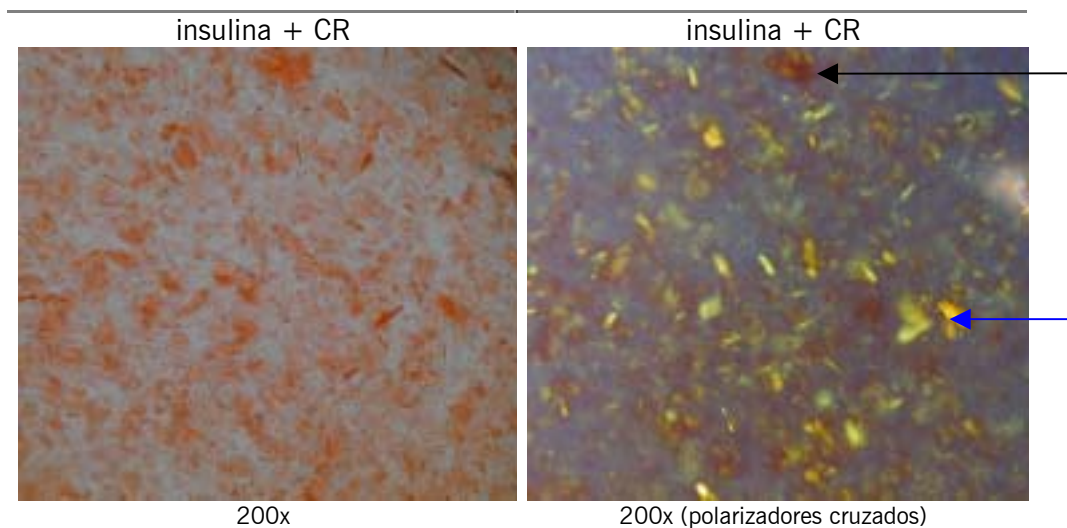


Figura 128. Muestra de fibras de insulina con CR, preparada según el protocolo del apartado 8.6.2.2.1. A la izquierda se muestra el aspecto al observarla bajo luz normal, mientras que en la micrografía de la derecha se han utilizado dos polarizadores cruzados.

Esta preparación se asemeja más a las micrografías más abundantes en la bibliografía¹⁹⁶ y en ella se aprecia claramente el color verde manzana característico de las fibras amiloides. Estas micrografías permiten afirmar que la medida de las muestras en suspensión utilizando microscopía óptica permite determinar el carácter amiloide.

En esta micrografía se observa que, en presencia de un elevado porcentaje de fibras más o menos aisladas, la mayoría de precipitados se tiñen con CR y, bajo la luz doblemente polarizada, adoptan una tonalidad verde-amarillenta, característica de estructuras amiloides: la observación de la muestra bajo luz normal muestra partículas de

¹⁹⁶ Lim, A.; Makhov, A. M.; Bond, J.; Inouye, H.; Connors, L. H.; Griffith, J. D.; Erickson, B. W.; Kirschner, D. A.; Costello, C. E. *J. Struct. Biol.* **2000**, *130* (2/3), 363-370.

¹⁹⁷ Burke, M. J.; Rougvie, M. A. *Biochemistry* **1972**, *11*, 2435-2439.

tamaño pequeño, aparentemente de poca densidad y sólo algunos de los agregados (como el que se señala con la flecha negra) siguen mostrando un tono rojizo bajo la luz polarizada, mientras que las estructuras más densas presentan un color amarillo intenso, casi blanco (flecha azul).

6.1.2 Diferencias y similitudes entre diversas preparaciones de fibras amiloides

La utilización de fibras de insulina no sólo valida el método de tinción de muestras, sino que también permite hacer algunas comparaciones adicionales sobre las estructuras amiloides obtenidas en ambos casos.

Al comparar la Figura 126 con la Figura 128 se pueden apreciar varias diferencias. $\beta(1-42)$ presenta, bajo luz sin polarizar, una mayor heterogeneidad de partículas, tanto en lo referente al tamaño como a la textura y la forma. Las fibras de insulina se presentan de forma homogénea, con estructura acicular. No obstante, las mayores diferencias se aprecian al utilizar polarizadores cruzados. En la preparación de insulina se aprecian de forma clara estructuras amiloides aisladas, tanto verdes como amarillas, además de algunos precipitados rojizos (sin brillo) correspondientes a agregados amorfos. La preparación de $A\beta$ presenta una elevada colocación de colores y, por tanto, indica una mezcla de estructuras: en la ampliación se ve claramente cómo las partículas presentan tonos verdes en los bordes y amarillos en el centro (debido quizás a la mayor densidad de materia). Sobre alguna de estas partículas se superponen otras de color rojizo, correspondientes a estructuras amorfas, las cuales presentan birrefringencia sólo cuando recubren estructuras amiloides (por sí solas, como se observa en muestras preparadas según el método clásico, no presentan brillo).

Estas diferencias en las preparaciones también se reflejaron al analizar las muestras utilizando TEM. Las muestras de $\beta(1-42)$ utilizadas para los estudios con CR presentaron haces de fibras o bien algunas fibras pequeñas aisladas, además de estructuras amorfas y de mosaico. Por otro lado las micrografías de las fibras de insulina correspondientes a esta preparación ofrecieron un aspecto muy diferente, como se aprecia en la Figura 129. Básicamente se observaron grandes cúmulos de fibras pequeñas entrelazadas.

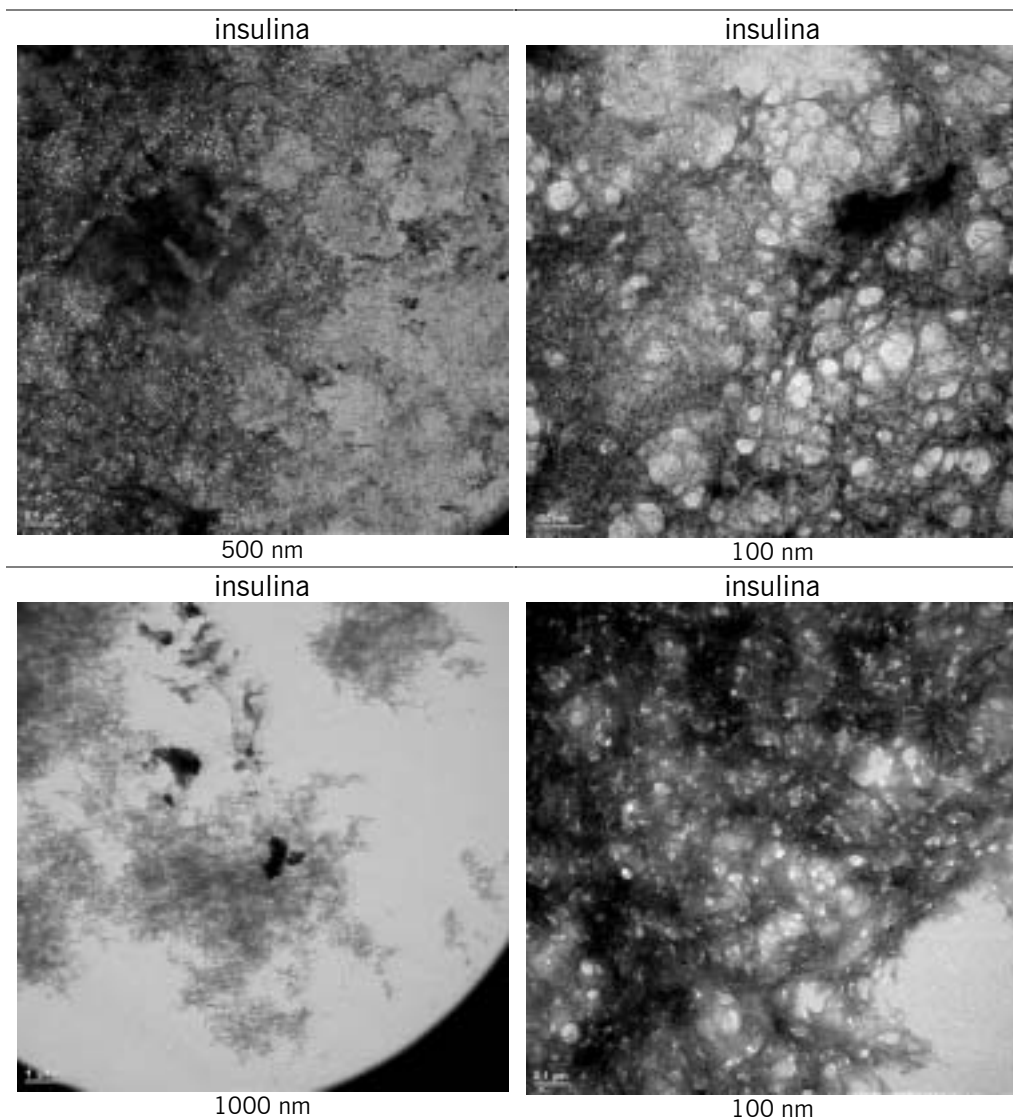


Figura 129. Micrografías de insulina (TEM). Muestra utilizada para realizar las medidas de microscopía óptica que se muestran en la Figura 128. Bajo cada figura se indica la escala a la que corresponde la barra.

Tal y como se refiere en el apartado 6.2, el comportamiento macroscópico de las preparaciones de A β y las de insulina mostradas en estas figuras fue totalmente diferente. Todas las evidencias apuntan a que, a pesar de que las preparaciones de A β contienen estructuras amiloides, la morfología de éstas es totalmente diferente a la que se obtiene utilizando insulina. Este aspecto se desarrolla en el apartado 6.2.

6.2 Estudios espectrofotométricos en presencia de CR

Las moléculas de CR se unen de forma específica a las fibras amiloides, lo que produce, además del efecto microscópico descrito, un cambio en el espectro UV-vis del colorante. Al unirse el CR a una fibra, el entorno del cromóforo se ve modificado, produciendo un desplazamiento batocrómico (el CR libre muestra una $\lambda_{\max} \sim 490$ nm, mientras que al unirse a fibras amiloides presenta $\lambda_{\max} \sim 520$ nm), además de un incremento en la intensidad de la banda de absorción. Macroscópicamente se observa cómo la disolución de CR pasa de un color rojo-anaranjado a un tono rosado, como se aprecia para el caso de la proteína A β , en la Figura 130.

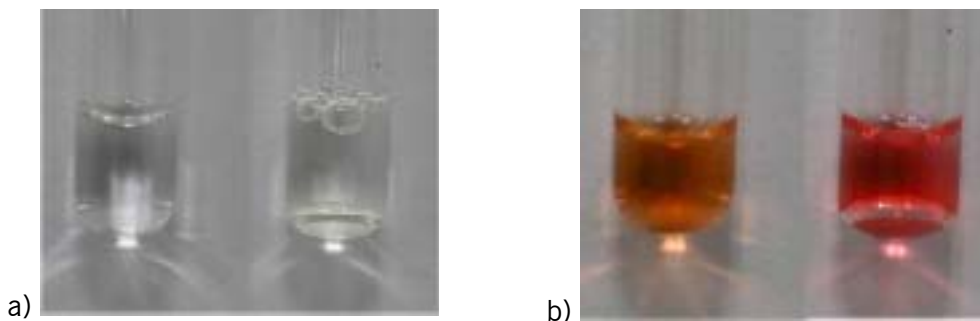


Figura 130. Blanco (tampón PBS, tubo de la izquierda en ambas fotografías) y disolución 40 μ M de β (1-42) preparada como se describe en el apartado 8.2.1.2.3 (tubo de la derecha) a) antes y b) después de añadir 16 μ L de una disolución 240 μ M de CR en PBS (concentración final 38 μ M en CR y 40 μ M en β (1-42)).

Curiosamente, el cambio en el espectro UV-vis no es igual para todas las fibras amiloides, sino que se observan diferencias en el máximo de la banda de absorción entre, por ejemplo, las fibras de A β , insulina y β -poli-L-lisina¹⁹⁸. Además, el número de moléculas de CR que se unen como máximo por cada cadena peptídica (B_{\max}) depende también de la naturaleza de ésta (en el caso de la insulina, $B_{\max} \sim 2$, mientras que para la β -poli-L-lisina se llegan a observar valores de $B_{\max} \sim 43$, dependiendo del pH).

La utilización de CR en la cuantificación de fibras amiloides fue descrita por Klunk y colaboradores en dos etapas diferentes. En 1989 publicaron dos artículos básicos en el tema, uno de los cuales¹⁹² describe de forma detallada cómo cuantificar la unión del colorante CR a fibras amiloides de insulina. Una lectura rápida de dicho trabajo ha inducido a muchos investigadores a utilizar el protocolo descrito en sus investigaciones

¹⁹⁸ Klunk, W. E.; Pettegrew, J. W.; Abraham, D. J. *J. Histochem. Cytochem.* **1989**, 37, 1273-1281.

sobre Alzheimer, sin tener en cuenta que las aproximaciones utilizadas hacen que no sea extrapolable directamente al estudio de fibras de A β .

Tras un largo periodo de tiempo, Klunk y colaboradores publicaron, en 1999, su estudio sobre la cuantificación de las fibras de proteína A β ¹⁹⁹. El protocolo descrito en este último trabajo es aplicable tanto a las disoluciones de β (1-40) como de β (1-42)²⁰⁰.

6.2.1 Fundamento de la cuantificación de fibras amiloides con CR

Durante el proceso de envejecimiento de una proteína amiloide se produce la transformación de la forma soluble de la proteína a fibras amiloides. Dichas fibras, además de tener capacidad de unir moléculas de CR, son capaces, debido a su elevado tamaño, de dispersar luz, lo que se manifiesta en forma de turbidez. Por consiguiente, la realización de un espectro UV-vis de una mezcla de CR y A β es la suma de tres especies diferentes: el CR no unido, el CR unido (ambos presentan un espectro diferente) y la turbidez de la muestra.

Cuando el proceso de envejecimiento tiene lugar de forma no ideal (parte del péptido no se transforma en estructuras amiloides) podemos encontrar que coexisten en disolución, junto con las fibras amiloides, estructuras amorfas (que también pueden causar turbidez) y péptido soluble. En la Figura 131 se representan los fenómenos ópticos que pueden tener lugar al incidir un haz de luz sobre una muestra que contiene CR en presencia de una proteína amiloide envejecida de forma no ideal.

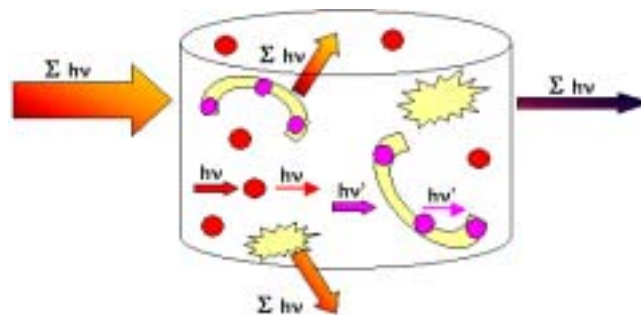


Figura 131. Representación de los efectos ópticos que pueden tener lugar cuando un haz de luz UV-vis incide sobre una mezcla de CR y proteína amiloide. Los círculos simbolizan las moléculas de CR libre (en rojo) o unido a fibras amiloides (en fucsia), mientras que las estructuras amarillas representan agregados de proteína, bien sean fibrilares (alargados) o amorfos (estrellas).

¹⁹⁹ Klunk, W. E.; Jacob, R. F.; Mason, R. P. *Anal. Biochem.* **1999**, 266, 66-76.

²⁰⁰ Klunk, W. Comunicación personal.

6 Agentes de tinción específicos

Diversos grupos de investigación utilizan la turbidez de la disolución para calcular el contenido en fibras amiloides^{193,201,202}. En la práctica, esta aproximación se ha de realizar con extremada cautela. La turbidez no sólo depende de la cantidad de fibras formadas, sino que también varía con otros factores, como son la morfología de éstas (longitud, diámetro, agrupación de fibras, etc.), la longitud de onda utilizada y la presencia de agregados no-amiloides. Por este motivo, la turbidez puede variar mucho entre muestras diferentes con un contenido amiloide similar, lo que da lugar a medidas poco comparables entre sí^{193,202,♦}, lo que hace recomendable medir, en cada experimento con CR, la contribución de la turbidez.

En los métodos de cuantificación con CR descritos por Klunk se considera siempre la contribución de la turbidez, ya sea de forma implícita o explícita. En los trabajos con A β no se registra el espectro de turbidez de la proteína sola, por lo que los valores de ésta se extrapolan considerando que el espectro de turbidez depende únicamente de la longitud de onda y de la concentración. Esto implica que las ecuaciones descritas en su trabajo sólo son utilizables en preparaciones que presenten fibras con una morfología similar y un contenido en estructuras amorfas equiparable. Además, Klunk considera que las moléculas de CR no se unen de forma inespecífica a la proteína A β , es decir, no existe CR unido a agregados amorfos o a péptido soluble, como demostró utilizando preparaciones de insulina¹⁹².

En los trabajos de Klunk^{192,199} se considera que la luz incidente en una mezcla de A β y CR puede sufrir tres procesos: ser absorbida por CR_{libre} ($\lambda_{\max} \sim 490$ nm) o por CR_{unido} ($\lambda_{\max} \sim 520$ nm) o bien ser dispersada por las fibras en suspensión. Teniendo en cuenta esto, la absorbancia total a una longitud de onda determinada se puede expresar como suma de las tres contribuciones (Ecuación 2).

$$A_{total} = A_{unido} + A_{libre} + A_{turbidez}$$

Ecuación 2.

²⁰¹ Jarret, J. T.; Berger, E. P.; Lansbury, P. T. *Biochemistry* **1993**, 32, 4693-4697.

²⁰² Findeis, M. A.; Musso, G. M.; Arico-Muendel, C. C.; Benjamín, H. W.; Hundal, A. M.; Lee, J.; Chin, J.; Kelley, M.; Wakefield, J.; Hayward, N. J.; Molineaux, S. M. *Biochemistry* **1999**, 38, 6791-6800.

♦ Las medidas de turbidez son más fiables si se realizan estudios cinéticos y se comparan muestras manipuladas en paralelo, reduciendo de esta forma la variabilidad en la obtención de fibras debida a factores externos.

Una forma sencilla de eliminar el término A_{turbidez} es medir la absorbancia aparente de la disolución de A β solo y sustraer el espectro resultante al obtenido en la mezcla A β +CR. Así la fórmula se simplifica y obtenemos la Ecuación 3, equivalente a la obtenida para la mezcla de dos cromóforos.

$$A_{CR} = A_{\text{total}} - A_{\text{turbidez}} = A_{\text{unido}} + A_{\text{libre}}$$

Ecuación 3.

Aplicando la ley de Lambert-Beer ($A = \epsilon \cdot \ell \cdot c$) y considerando que el paso de luz utilizado, ℓ , es de 1 cm, se cumple, a una longitud de onda λ , la Ecuación 4.

$$\lambda A_{CR} = \lambda \epsilon_{\text{unido}} \cdot [\text{CR}]_{\text{unido}} + \lambda \epsilon_{\text{libre}} \cdot [\text{CR}]_{\text{libre}}$$

Ecuación 4.

Donde $\lambda \epsilon$ es el coeficiente de extinción molar a la longitud de onda λ y $[\text{CR}]$ la concentración de CR en mol/L. Si realizamos la medida a dos longitudes de onda distintas, λ_1 y λ_2 , tenemos un sistema de dos ecuaciones con dos incógnitas ($[\text{CR}]_{\text{unido}}$ y $[\text{CR}]_{\text{libre}}$). Las longitudes de onda escogidas por Klunk y colaboradores son 541 y 403 nm, ya que a 541 nm la diferencia de absorbancia entre la especie unida y la libre es mayor, mientras que a 403 nm se encuentra un punto isobéptico (${}^{403}\epsilon_{\text{libre}} \sim {}^{403}\epsilon_{\text{unido}}$).

Despejando en una de ellas $[\text{CR}]_{\text{libre}}$ y sustituyendo en la otra podemos llegar a la Ecuación 5, donde se ha sustituido ${}^{403}\epsilon_{\text{unido}}/{}^{403}\epsilon_{\text{libre}}$ por su valor, 1.

$$[\text{CR}]_{\text{unido}} = \frac{\left(\frac{{}^{541}A_{CR}}{{}^{541}\epsilon_{\text{libre}}} \right) - \left(\frac{{}^{403}A_{CR}}{{}^{403}\epsilon_{\text{libre}}} \right)}{\left(\frac{{}^{541}\epsilon_{\text{unido}}}{{}^{541}\epsilon_{\text{libre}}} \right) - 1}$$

Ecuación 5.

Los valores de ϵ_{unido} a estas longitudes de onda, al igual que los de ϵ_{libre} se muestran en la Tabla 15.

6 Agentes de tinción específicos

Longitud de onda (nm)	$\epsilon_{\text{unido}} (\text{cm}^{-1}\cdot\text{M}^{-1})$	$\epsilon_{\text{libre}} (\text{cm}^{-1}\cdot\text{M}^{-1})$
541	70.500	22.700
403	18.070	18.040

Tabla 15. Valores de coeficiente de extinción molar de CR en medio acuoso, pH 7,4 (tampón PBS) a diferentes longitudes de onda, según se encuentre o no unido a fibras amiloides de A β ¹⁹⁹.

Sustituyendo estos valores se obtiene la Ecuación 6, donde ${}^{\lambda}A_{\text{CR}}$ es la absorbancia de la mezcla CR+A β a la longitud de onda λ tras sustraerle la señal correspondiente a la turbidez (haciendo un blanco con la disolución de A β).

$$[\text{CR}]_{\text{unido}} = ({}^{541}A_{\text{CR}}/47.800) - ({}^{403}A_{\text{CR}}/38.100)$$

Ecuación 6.

En aquellos casos en los que no se puede determinar el valor de A_{turbidez} , se puede utilizar la Ecuación 7.

$$[\text{CR}]_{\text{unido}} = ({}^{541}A_{\text{total}}/47.800) - ({}^{403}A_{\text{total}}/68.300) - ([\text{CR}]/4,77)$$

Ecuación 7.

La Ecuación 7 se deduce teniendo en cuenta varias aproximaciones¹⁹⁹. Por un lado, al igual que para obtener la Ecuación 6, se considera que a 403 nm tenemos un punto isobéptico (no es estrictamente cierto si miramos los valores de ϵ de ambas especies), por lo que la diferencia entre la absorbancia que presenta una disolución de CR de concentración X y una disolución de la misma disolución de CR en presencia de fibras amiloides ha de ser igual a la turbidez. Esto permite obtener el valor de ${}^{403}A_{\text{turbidez}}$ en función de la concentración total de CR (Ecuación 10).

$${}^{403}A_{\text{total}} = {}^{403}\epsilon_{\text{unido}} \cdot [\text{CR}]_{\text{unido}} + {}^{403}\epsilon_{\text{libre}} \cdot [\text{CR}]_{\text{libre}} + {}^{403}A_{\text{turbidez}}$$

Ecuación 8.

$${}^{403}A_{\text{total}} = {}^{403}\epsilon \cdot [\text{CR}]_{\text{total}} + {}^{403}A_{\text{turbidez}}$$

Ecuación 9.

$${}^{403}A_{\text{turbidez}} = {}^{403}A_{\text{total}} - {}^{403}\epsilon \cdot [\text{CR}]_{\text{total}}$$

Ecuación 10.

Puesto que la turbidez a 541 nm no se puede relacionar de igual forma con un parámetro conocido, Klunk y colaboradores midieron diversas muestras de A β , llegando a la conclusión de que la relación $^{541}A_{\text{turbidez}} / ^{403}A_{\text{turbidez}}$ es aproximadamente constante e igual a 0,7. Utilizando estas dos aproximaciones, la definición de A_{CR} (Ecuación 3) y la Ecuación 6 se deduce la Ecuación 7.

6.2.1.1 Consideraciones previas

El objetivo de este tipo de ensayo es cuantificar la cantidad de fibras amiloides. Por este motivo, y para poder comparar los valores de $[\text{CR}]_{\text{unido}}$ que se obtienen de diferentes muestras y que estos sean proporcionales al contenido amiloide, es necesario trabajar siempre con un exceso de CR, de forma que se saturen todos los puntos de unión de A β .

Según los valores experimentales de Klunk, aproximadamente 2,2 moles de A β unen 1 mol de CR, pero para que la unión sea completa y las fibras amiloides se encuentren saturadas se requiere un exceso de CR. La proporción mínima para la cuantificación es aproximadamente 1 molécula de CR por cada 1,1 moléculas de A β . Además, y puesto que el equilibrio no se alcanza de forma inmediata, es necesario incubar la mezcla A β -CR durante un mínimo de 15 min, a T_{amb} .

La Ecuación 7 requiere la concentración exacta de CR. Debido al contenido en sales que presenta este colorante comercial y a su tendencia a formar micelas, que son eliminadas mediante filtración, no se obtiene una disolución de concentración exacta[♦], por lo que es necesario determinarla experimentalmente. La cuantificación experimental de la disolución madre de CR se realizó espectrofotométricamente (ver apartado 8.6.2.2.2).

La cuantificación con CR de estructuras amiloides requiere que los agregados amiloides tengan unas características adecuadas, tanto de tamaño medio como de homogeneidad aunque en los trabajos publicados no se menciona explícitamente²⁰³. Las fibras excesivamente grandes conllevan la aparición de precipitados de CR-A β en el fondo de la cubeta (el CR desaparece literalmente del medio, con lo que en lugar de tener un aumento de la señal debido a la unión de CR a las fibras amiloides se produce una

♦ Las muestras con CR siempre se filtran utilizando filtros de fibra de vidrio, ya que se pudo comprobar que los filtros convencionales de nylon, polipropileno y polietileno retienen cantidades significativas de colorante.

²⁰³ Klunk, W. Comunicación personal.

6 Agentes de tinción específicos

disminución de la intensidad total, dando estimaciones erróneas de la cantidad de fibras presentes). Incluso en las preparaciones de estructuras amiloides de tamaño adecuado, el complejo A β -CR sedimenta tras un periodo de tiempo, como se muestra en la Figura 132 (la precipitación de CR junto con fibras puede forzarse mediante centrifugación y es utilizada en métodos de cuantificación basados en la valoración del contenido de CR no unido²⁰⁴).

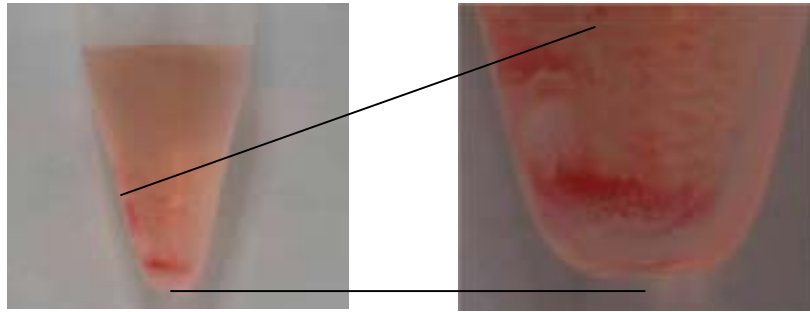


Figura 132. Preparación de A β con CR en una relación 1:3 tras reposar durante 12 h ([A β] =4 μ M en PBS. [CR]=11,4 μ M). La Figura 130 muestra una preparación fresca de la misma muestra de A β con un equivalente de CR antes de diluir la mezcla en PBS y en la Figura 141 se muestra el espectro UV-vis de dicha preparación tras diluirla en PBS.

La heterogeneidad y variabilidad de las fibras y la presencia de agregados amorfos hace que la afirmación $^{541}A_{\text{turb}}/^{403}A_{\text{turb}} \sim 0,7$ no sea aplicable en todos los casos. Por este motivo es recomendable verificar de forma experimental el valor de esta relación para cada una de las preparaciones utilizadas.

6.2.2 Intento de cuantificación de fibras amiloides utilizando CR

Se realizaron diversas pruebas enfocadas a la cuantificación de las fibras amiloides formadas en nuestras preparaciones de $\beta(1-42)$. A continuación se resumen algunos de los experimentos más significativos.

En algunos experimentos (aquellos en los que se utilizaron volúmenes finales ≥ 1 mL) se realizaron, en paralelo, experimentos de filtración¹⁹⁸. Este tipo de experimento mide la concentración de colorante no unido a A β , permitiendo estimar la cantidad de fibras amiloides, de forma indirecta, independientemente de la morfología de las fibras amiloides.

²⁰⁴ Brining, S. K. *Neurobiol. Aging* **1997**, *18*, 581-589.

6.2.2.1 Ensayo con $\beta(1-40)$

Inicialmente se intentó reproducir el experimento descrito por Klunk y colaboradores para la proteína $A\beta^{199}$. Por ello, se realizó un ensayo utilizando la secuencia $\beta(1-40)$ en lugar de $\beta(1-42)$ (el trabajo de Klunk detalla únicamente el comportamiento de $\beta(1-40)$, la cual es menos amiloidogénica que $\beta(1-42)$).

La disolución de $\beta(1-40)$ se realizó utilizando las condiciones descritas¹⁹⁹ (apartado 8.6.2.1, concentración 100 μM en tampón PBS a pH 7,4), introduciendo como modificación únicamente el tratamiento previo del péptido (se realizó el tratamiento disgregante descrito en el apartado 8.2.1.1.4 para obtener $A\beta$ en estado monomérico). Igualmente, las disoluciones madre de CR se prepararon en PBS a pH 7,4^{*}, con un 10% de EtOH para prevenir la formación de agregados micelares.

La preparación de $\beta(1-40)$ se envejeció durante 2 días a T_{amb} con agitación magnética. Se tomaron muestras a tiempo 0, 24 y 48 h y se registró su espectro UV-vis en presencia de CR (apartado 8.6.2.1).

Los resultados que se obtuvieron tras envejecer la muestra 0 o 24 h son similares a los mostrados para la muestra envejecida durante 48 h en la Figura 133 y la Figura 134. Por este motivo, sólo se discuten los resultados correspondientes a 48 h de incubación.

En la Figura 133 se aprecia cómo varía el espectro UV-vis en función del tiempo de incubación de la mezcla de $\beta(1-40)$ y CR. Sorprendentemente, se observó una disminución de la turbidez aparente con el tiempo de incubación (el CR no absorbe cerca de 700 nm, por lo que el incremento de la señal a esta longitud de onda se debe básicamente a la turbidez de $A\beta$). Para descartar que este comportamiento se debiera a la deposición del complejo $A\beta$ -CR, se realizaron medidas con agitación magnética (resultados no mostrados), pero no se apreció ningún cambio significativo en el espectro de la mezcla (únicamente se observó un incremento en el ruido de la lectura).

* El CR es, además de un agente de tinción histopatológico, un indicador de pH (adopta un color violeta a pH ácido). Por este motivo es importante realizar estos ensayos a pH neutros o básicos.

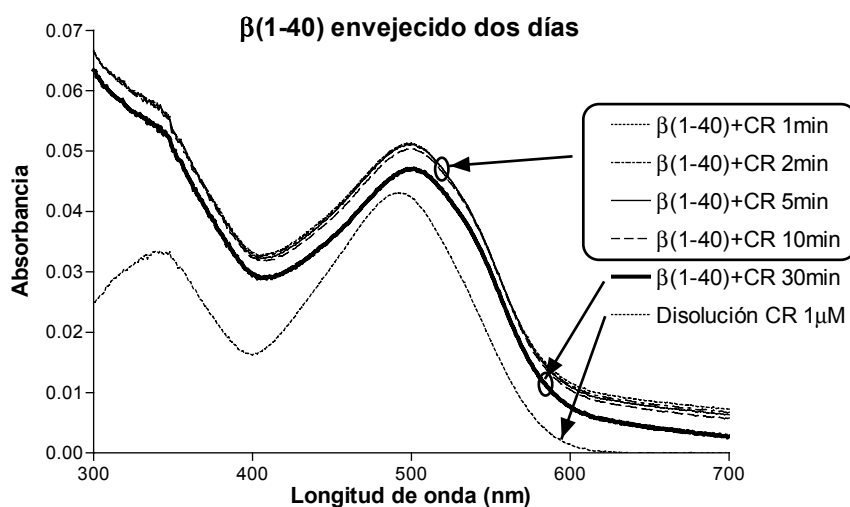


Figura 133. Espectro UV-vis de una mezcla de $\beta(1-40)$ ($2,5 \mu\text{M}$, envejecido 48 h a $100 \mu\text{M}$) y CR ($1 \mu\text{M}$) en PBS tras 1, 2, 5, 10 y 30 min de incubar la mezcla. Comparación con el espectro de CR $1 \mu\text{M}$ en PBS.

En la Figura 134 se observa cómo el espectro de la mezcla de $A\beta$ +CR no se corresponde con la suma aritmética de los espectros de $A\beta$ y de CR por separado. El máximo de absorción de CR sólo se sitúa a 490 nm , pero en la mezcla de CR y $\beta(1-40)$ se encuentra desplazado a valores de longitud de onda mayores ($\sim 500 \text{ nm}$). Esto indica que existe una interacción CR- $A\beta$.

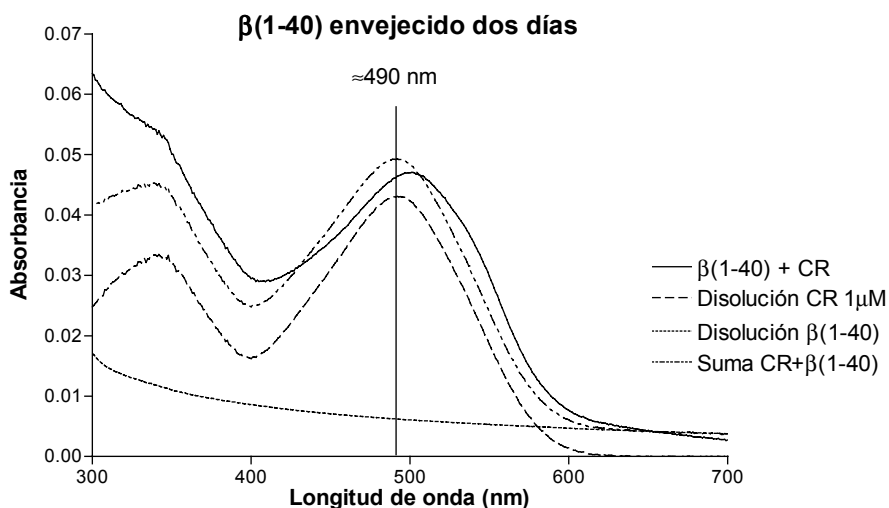


Figura 134. Espectro UV-vis de una mezcla de $\beta(1-40)$ ($2,5 \mu\text{M}$, envejecido 48 h a $100 \mu\text{M}$) y CR ($1 \mu\text{M}$) en PBS a los 30 min de preparar la mezcla. Comparación con el espectro mostrado por la disolución de $\beta(1-40)$ solo en PBS, una disolución de CR en PBS y la suma aritmética de ambas. La línea vertical indica el máximo de absorción del $\text{CR}_{\text{libre}} = 490 \text{ nm}$.

En las figuras anteriores no se observa ningún punto isobéptico a 403 nm^{199} (el valor de la absorbancia de la mezcla a esta longitud de onda no cumple $^{403}A_{\text{total}} = ^{403}A_{\text{CR}}$

+ $^{403}A_{\text{turbidez}}$, como se deduce de la Ecuación 10). Se puede comprobar, además, que en este caso la relación entre la turbidez a 541 nm y la observada a 403 nm no es 0,7, sino 0,64 ($^{541}A_{\text{turbidez}}/^{403}A_{\text{turbidez}}=0,00544/0,00848=0,64$).

Ambas observaciones hacen que las ecuaciones de Klunk para calcular el contenido de fibra amiloide presente no sean aplicables. Si no tuviéramos en cuenta las incongruencias que se observan en los espectros de UV-vis y utilizáramos estos valores en la Ecuación 7 para calcular la $[CR]_{\text{unido}}$, obtendríamos un valor de $[CR]_{\text{unido}}=0,1 \mu\text{M}$. Este valor puede parecer razonable, indicando un bajo contenido en fibras amiloides, pero en realidad no tiene sentido.

Este experimento, además de mostrar la dificultad que implica reproducir experimentos con $A\beta$, permite ver el riesgo que entraña el uso de medidas puntuales de absorbancia (muy comunes cuando se trabaja con placas de 96 pocillos) en lugar de registrar el espectro UV-vis entero.

6.2.2.2 Ensayos con insulina

Tras este resultado se decidió recabar más información sobre la cuantificación de $A\beta$ con CR. Por ello, y tras una comunicación personal de W. Klunk, se decidió repetir el mismo experimento utilizando fibras de insulina.

Una ventaja de trabajar con insulina en lugar de utilizar proteína $A\beta$ es que la conversión de la forma soluble a fibras amiloides se da de forma controlada y en su totalidad. Además, el proceso de fibrilogénesis, en este caso, no se ve influido por tantos factores como sucede en la obtención de fibras de $A\beta$ y se realiza en pocas horas. Otra ventaja muy importante de la insulina es su reducido precio, muy inferior al de la proteína $A\beta$ (100 mg de insulina bovina cuestan, en la casa comercial Sigma, menos de 80 €, mientras que 1 mg de $A\beta$ oscila entre 200 y 600 €, dependiendo de la casa comercial, la pureza, etc.).

La transformación de la forma soluble de la insulina en un agregado amiloide se lleva a cabo disolviéndola a pH ácido en un tubo sellado. En estas condiciones la proteína se disuelve a temperatura ambiente y, tras diversos ciclos con periodos de calentamiento y enfriamiento, se obtiene un gel que evoluciona hasta la precipitación de la proteína en

6 Agentes de tinción específicos

forma de fibras amiloides. En una última etapa, se ajusta el pH con la ayuda de una solución tamponada¹⁹⁷ (ver el protocolo detallado en el apartado 8.6.2.2.1). Esta suspensión de fibras se utiliza en un periodo de tiempo breve (el mismo día), ya que el proceso de formación de fibras es reversible, observándose una disminución del contenido en fibras amiloides con el tiempo, como se pudo verificar (resultados no mostrados).

Además de cambiar la proteína A β por insulina, también se decidió introducir modificaciones en la preparación de soluciones de CR. La disolución en tampón PBS (omitiendo la presencia de EtOH) da lugar a preparaciones más estables, por lo que se decidió utilizar este método en los experimentos posteriores (en el apartado 8.6.2.2.2 se describe la preparación de disoluciones de CR en PBS).

La insulina presenta tres puntos isobésticos bien definidos a 477, 406 y 349 nm respectivamente¹⁹², a diferencia de la proteína A β , que sólo tiene uno a 403 nm¹⁹⁹. Además, la turbidez de las preparaciones de insulina puede obtenerse fácilmente de forma experimental (se dispone de gran cantidad de fibras de insulina). Así, se puede restar el espectro debido a la turbidez al espectro total y se obtiene el espectro debido a la suma de CR_{libre} y CR_{unido}. Por este motivo no es necesario hacer tantas aproximaciones en los ensayos con insulina como en los ensayos con A β . La Ecuación 11, donde A_{CR} se obtiene experimentalmente restando al espectro de la mezcla la turbidez de las fibras, permite calcular la cantidad de colorante unido a fibras de insulina.

$$[CR]_{unido} = \frac{\left(\frac{{}^{540}A_{CR}}{{}^{540}\epsilon_{libre}} \right) - \left(\frac{{}^{477}A_{CR}}{{}^{477}\epsilon_{libre}} \right)}{\left(\frac{{}^{540}\epsilon_{unido}}{{}^{540}\epsilon_{libre}} \right) - 1}$$

Ecuación 11.

Esta ecuación es equivalente a la Ecuación 5, pero en ella se utilizan las longitudes de onda 540 y 477 nm en lugar de 541 y 403 nm ya que, en el caso de la insulina, 477 nm es el punto isobéstico más adecuado.

Se ha de destacar que los valores de $\epsilon_{CRunido}$ varían para cada proteína amiloide. En la Tabla 16 se muestran los valores de ϵ_{CR} descritos por Klunk¹⁹² para la insulina. Sustituyendo estos valores en la Ecuación 11 se obtiene la Ecuación 12, la cual permite

cuantificar fácilmente la cantidad de CR_{unido} (en el caso de la insulina se describe que la estequiometría de unión es dos moléculas de CR por cada molécula de insulina, así $[insulina]_{fibrilar} \sim [CR]/2$).

Longitud de onda (nm)	$\epsilon_{unido} (cm^{-1} \cdot M^{-1})$	$\epsilon_{libre} (cm^{-1} \cdot M^{-1})$
540	44.578	18.955
477	34.679	34.722

Tabla 16. Valores de ϵ para CR en tampón fosfato pH 7,4 según se encuentre unido o no a fibras de insulina¹⁹².

$$[CR]_{unido} = \frac{540 A_{total}}{25.295} - \frac{477 A_{total}}{46.306}$$

Ecuación 12.

6.2.2.2.1 Preparaciones de CR-insulina: comportamiento ideal

Al utilizar el método descrito en la bibliografía para la obtención de fibras amiloides¹⁹² se obtuvieron inicialmente resultados dispares, a pesar de la existencia de fibras amiloides en las preparaciones, como se pudo comprobar utilizando TEM.

Diversas pruebas permitieron observar que sólo aquellas preparaciones en las que la insulina se disuelve fácilmente a temperatura ambiente en medio ácido y que son calentadas hasta obtener un gel dan lugar a fibras adecuadas para su análisis utilizando CR (muestras preparadas como se detalla en el apartado 8.6.2.2.1). En general, aquellas preparaciones en las que la insulina no se disolvió adecuadamente en la etapa inicial* o que no fueron calentadas hasta la formación de un gel, mostraron comportamientos diferentes a los descritos por Klunk y colaboradores^{192,198}.

En la Figura 135 se muestra el espectro UV-vis en presencia de CR de una muestra de insulina que se comportó de forma ideal, es decir, según lo descrito por Klunk y colaboradores^{192,198}.

En la Figura 135 se pueden apreciar los puntos isobéuticos indicados por Klunk y colaboradores^{192,198} y, por tanto, tiene sentido utilizar las ecuaciones descritas en sus

* Se pudo observar que la insulina almacenada a $-20^{\circ}C$ durante un largo periodo de tiempo y sometida a diversos procesos de congelación y descongelación disminuye su solubilidad en medio ácido respecto a la insulina recién adquirida. Valores de pH superiores al indicado también producen una disminución de la solubilidad inicial de la insulina.

6 Agentes de tinción específicos

trabajos para la insulina. La aplicación de la Ecuación 12 para la concentración más baja de insulina ofrece un valor $[CR]_{unido}=2,1 \mu M$, lo que implica que la concentración de insulina en forma fibrilar es:

$$[insulina]_{fibrilar} \sim [CR]_{unido}/2 = 1,1 \mu M$$

Este valor es muy similar a la concentración total de insulina (1,25 μM), lo que indica que prácticamente toda la insulina se encuentra formando estructuras amiloides.

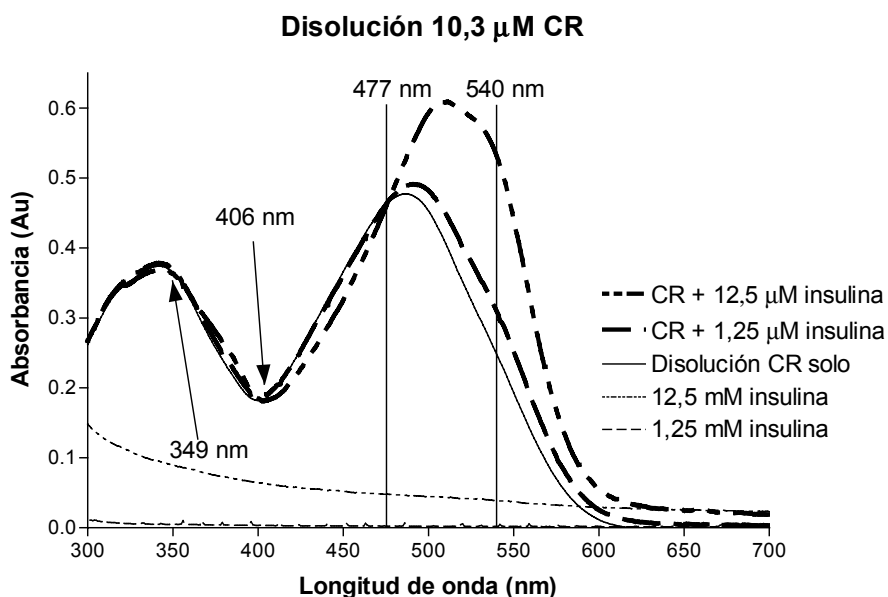


Figura 135. Disolución 10,3 μM de CR en PBS solo y en presencia de una concentración 1,25 y 12,5 μM de fibras amiloides de insulina. También se muestra el espectro de turbidez de la insulina sola a ambas concentraciones. Las flechas indican los dos puntos isobésticos no utilizados en la Ecuación 12, mientras que las líneas señalan el punto isobéstico correspondiente a 477 nm y el punto de máxima diferencia entre el espectro de CR_{unido} y CR_{libre} , a 540 nm. En los espectros de CR en presencia de insulina se ha sustraído la contribución de la turbidez.

Hay que notar que este cálculo no es aplicable para 12,5 μM de concentración de insulina. Los resultados que se obtendrían en este caso no son reales (la Ecuación 12 da un valor de $[CR]_{unido} = 10,9 \mu M$, que corresponde a $[insulina]_{fibrilar} = 5,5 \mu M$!!!). En estas condiciones hay un déficit importante de CR, por lo que todo el CR presente en la muestra se encuentra unido a fibras amiloides $[CR]_{total} \sim [CR]_{unido} \sim 10,5 \mu M$. A concentraciones bajas de CR, las fibras amiloides no se encuentran saturadas y la $[CR]_{unido}$ no es proporcional a la concentración de estructuras amiloides. Este efecto de saturación se aprecia en la Figura 136.

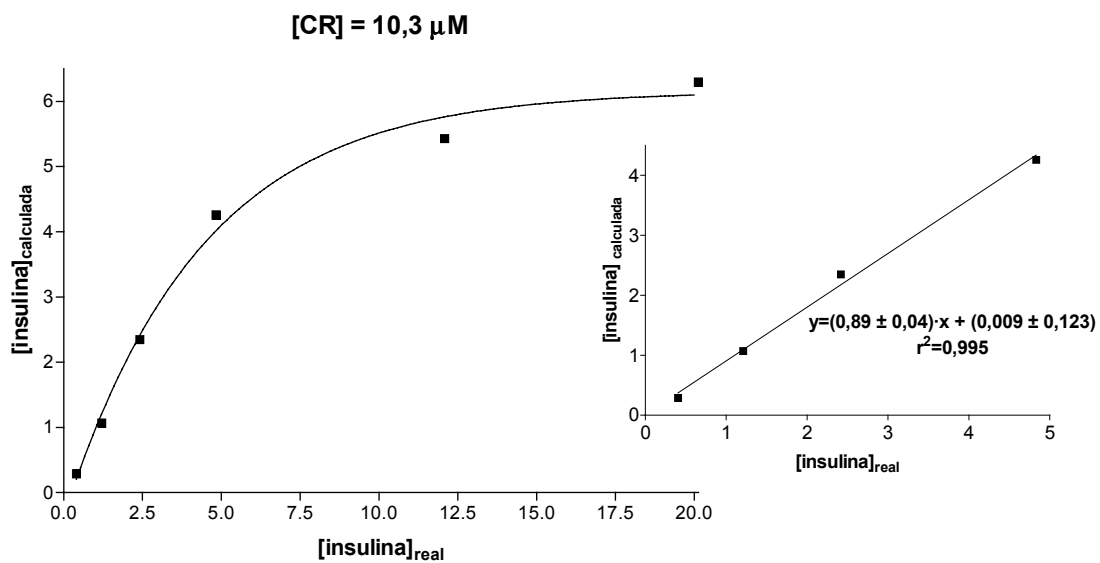


Figura 136. Valores de $[\text{insulina}]_{\text{fibrilar}}$ calculados mediante el método del CR respecto al valor real (el valor de $[\text{insulina}]_{\text{real}}$ se obtiene mediante análisis de aminoácidos) utilizando una disolución de CR 10,3 μ M. El gráfico de la derecha muestra una ampliación de la zona lineal, junto con su ajuste a una ecuación de primer grado.

En esta representación se observa cómo el comportamiento deja de ser lineal cuando la $[\text{insulina}] \sim [\text{CR}]/2$. Además, en esta preparación se obtiene que $[\text{insulina}]_{\text{calculada}} \sim 0,9 \cdot [\text{insulina}]_{\text{real}}$. Esta diferencia se puede deber al error experimental (tanto en la determinación de las concentraciones, como en los valores de ϵ , etc.) o bien a que sólo el 90% de la insulina se encuentra en forma fibrilar.

Independientemente del origen de esta pequeña diferencia entre los valores reales y calculados, podemos decir que los valores obtenidos utilizando la Ecuación 12 son una estimación aceptable del contenido amiloide de la preparación de insulina.

El análisis de la preparación utilizada en la Figura 136 mediante microscopía óptica utilizando dos polarizadores cruzados dio lugar a la Figura 128 (página 189) y el estudio mediante TEM mostró estructuras amiloides pequeñas y entrecruzadas muy abundantes (Figura 129, página 191). Ambos resultados, junto con el espectro mostrado en la Figura 136, indican que esta preparación de fibras amiloides es una preparación *ideal*. Como se muestra en el siguiente apartado, no todas las preparaciones de insulina presentan este comportamiento ideal.

6 Agentes de tinción específicos

6.2.2.2 Preparaciones de CR-insulina: comportamiento no ideal

Además de la preparación de insulina mostrada en el apartado anterior, se obtuvieron diversas preparaciones *no ideales*. En la Figura 137 se muestra un ejemplo del tipo de espectros observados en estas preparaciones no ideales.

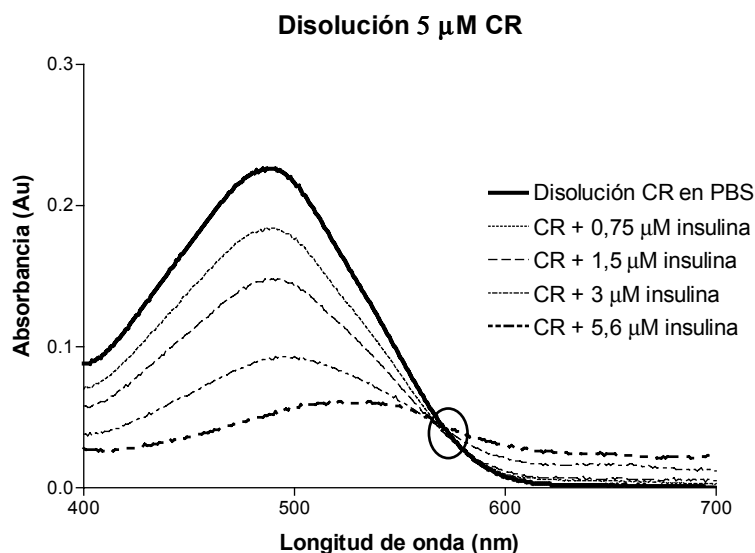


Figura 137. Disolución 5 μ M de CR en PBS solo y en presencia de concentraciones variables de fibras amiloides de insulina. En los espectros en presencia de insulina la contribución debida a la turbidez ha sido sustraída. El óvalo resalta un punto isobéptico a 570 nm

Durante la manipulación de ésta y otras muestras no ideales se pudo observar que, al trabajar con concentraciones de insulina y CR elevadas, se forma un precipitado rojizo en el fondo de la cubeta en el intervalo de tiempo necesario para la adquisición del espectro de absorción (2-3 min).

Además, los casos no ideales se detectan fácilmente ya que los puntos isobéuticos observados (cuando los hay) no coinciden con los de la bibliografía. En la Figura 137 se observa un punto isobéptico a \sim 570 nm (en lugar de los tres puntos isobéuticos a 477, y 406 y 349 nm) y, al contrario de lo esperado, la intensidad de la señal se reduce al aumentar la concentración de insulina. El único comportamiento que coincide con las variaciones en el espectro UV-vis descritas es el desplazamiento gradual del máximo hacia longitudes de onda mayores. Aparentemente es como si la cantidad de CR total disminuyera al aumentar la concentración de insulina.

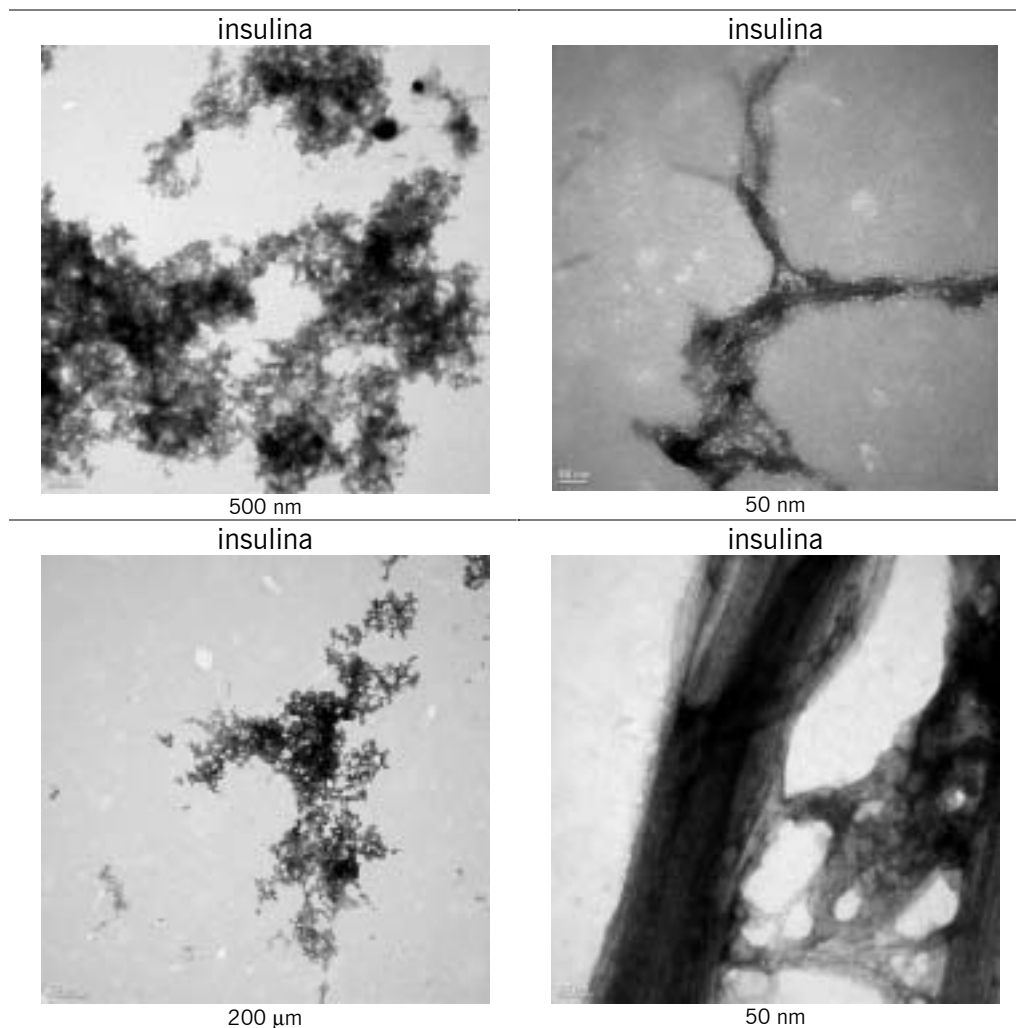


Figura 138. Micrografías de insulina (TEM) correspondientes a muestras no ideales. Bajo cada figura se indica la escala a la que corresponde la barra.

A pesar de este comportamiento espectrofotométrico anómalo, en las preparaciones de insulina no ideales también se observó la presencia de fibras amiloides mediante el uso de TEM, como se muestra en la Figura 138. Si comparamos estas micrografías con las observadas en la Figura 129 (correspondientes a una muestra “ideal” de insulina), podemos decir que, en general, las muestras no ideales parecen presentar acumulaciones de fibras más densas que en el caso de las muestras ideales, constituidas mayoritariamente por agrupaciones poco densas de fibras pequeñas entrecruzadas. En la Figura 139 se muestra el aspecto de la muestra de insulina utilizada en el experimento anterior tras teñirla con CR y observarla en el microscopio óptico.

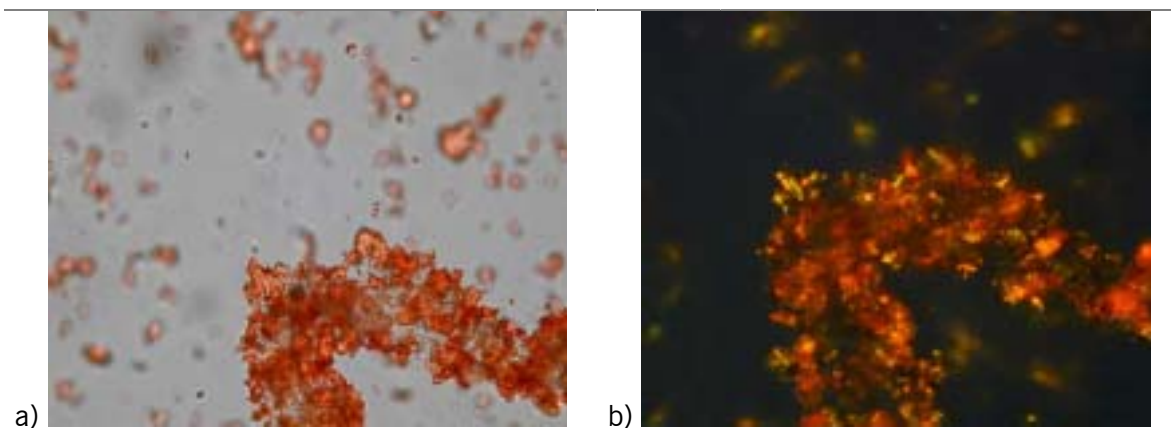


Figura 139. Micrográficas de la preparación de insulina utilizada en la obtención del gráfico de la Figura 137 tras teñirla con CR (según el protocolo del apartado 8.6.2.2.1). a) observada bajo luz no polarizada y b) doblemente polarizada utilizando en ambos casos 200 aumentos.

Al comparar estas imágenes con las mostradas en la Figura 126 (CR con $\beta(1-42)$) y en la Figura 128 (CR con insulina, preparación ideal mostrada en el apartado 6.2.2.2.1) se observa que la preparación de insulina no ideal es más similar a las preparaciones de A β con CR que a la preparación ideal de fibras amiloides de insulina. En la Figura 139 se observan grumos o acumulaciones rojizas junto con otras de tono amarillo-verdoso y el precipitado presenta un aspecto más compacto que el mostrado por la insulina ideal (se diferencian claramente precipitados grandes de proteína unida a colorante).

Otras preparaciones de insulina no ideales mostraron el mismo tipo de agregado que se aprecia en la Figura 139, lo que parece indicar una correlación entre el comportamiento espectrofotométrico anómalo y la observación microscópica de partículas o agregados, relativamente grandes, con capacidad de unir CR dando un color rojizo bajo los polarizadores cruzados a 90° (las muestras con un buen comportamiento espectrofotométrico presentan un aspecto homogéneo, con partículas pequeñas de color verde-amarillento bajo luz doblemente polarizada). Estas observaciones, junto con los resultados de TEM, hacen pensar en una posible explicación estructural para el comportamiento no ideal de las preparaciones amiloides analizadas.

Considerando el tamaño y la densidad de las partículas observadas en las muestras no ideales mediante microscopía óptica, es probable que estas estructuras sean las responsables de la desaparición del complejo CR-amiloide, lo que impide la correcta cuantificación. La desaparición del colorante podría deberse a la elevada densidad, que produce la sedimentación de los complejos CR-insulina (como se observa durante las

medidas espectrofotométricas de las muestras más concentradas) o bien al elevado tamaño que presentan los agregados y que podría convertirlos en especies opacas a la luz, “secuestrando” de esta forma el CR unido a ellas.

6.2.2.2.3 El riesgo de las medidas a longitudes de onda puntuales

El mayor problema del método de cuantificación de fibras amiloides descrito por Klunk es que puede dar un resultado engañoso si se intenta cuantificar la cantidad de estructura amiloide sin registrar el espectro UV-vis de la mezcla proteína amiloide-CR o sin, al menos, analizar con detalle los valores obtenidos.

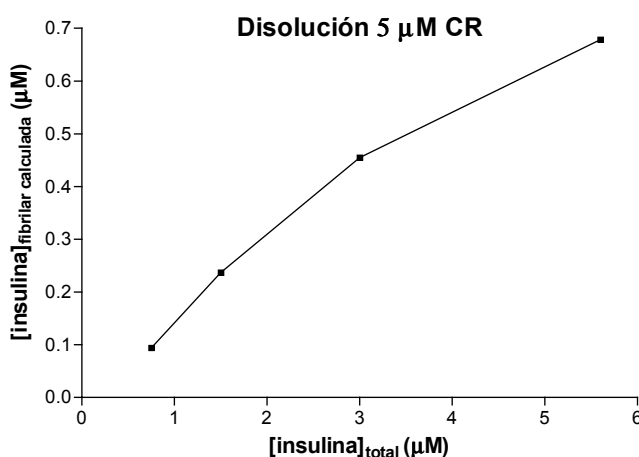


Figura 140. Valores de $[\text{insulina}]_{\text{fibrilar calculada}}$ vs $[\text{insulina}]_{\text{real}}$ para la preparación de fibras de insulina+CR cuyos espectros se muestran en la Figura 137.

Esta afirmación se pone de manifiesto si observamos la Figura 140. En ella se representa, para el caso de la preparación de insulina “no ideal” de la Figura 137, los valores de $[\text{insulina}]_{\text{fibrilar}}$ calculados respecto a la concentración total de insulina, igual que se ha hecho en la Figura 136. A pesar de que los valores de $[\text{insulina}]_{\text{fibrilar}}$ encontrados son casi un orden de magnitud inferiores a la concentración total, es fácil dejarse confundir por el comportamiento prácticamente lineal observado (a mayor cantidad de insulina, mayor contenido en estructuras amiloides se detecta) y obviar el hecho de que la disolución que se está midiendo presenta un espectro de absorción diferente del esperado (a mayor concentración de fibras amiloides en la disolución, menos señal se detecta).

6.2.2.3 Ensayos de $\beta(1-42)$

Tras estudiar el comportamiento de las fibras de insulina en presencia de CR y establecer que, para obtener unas medidas espectrofotométricas adecuadas, es necesario que las fibras amiloides tengan una morfología concreta, se analizaron nuestras preparaciones habituales de $\beta(1-42)$.

En la Figura 141 se muestra el mejor resultado obtenido en un ensayo de cuantificación utilizando CR con $\beta(1-42)$ envejecido según el protocolo habitual de agregación en esta tesis, pero utilizando agitación orbital durante el proceso de agregación.

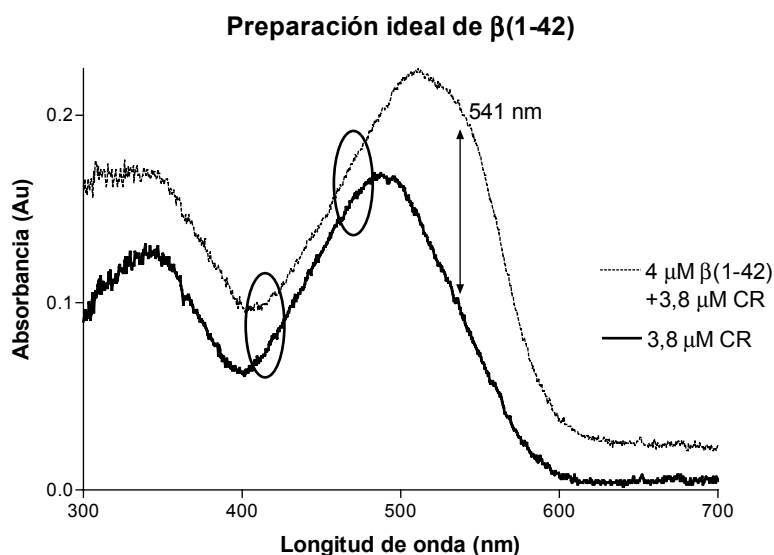


Figura 141. Disolución 3,8 μM de CR solo y en presencia de 4 μM $\beta(1-42)$ en PBS. En este caso los espectros no han sido corregidos para eliminar la contribución de la turbidez. La flecha resalta el punto experimental de mayor diferencia entre ambos espectros (coincide con el valor teórico). Los óvalos marcan la zona aproximada donde se sitúan los puntos isobásticos de este sistema, tras restar la turbidez.

Debido a la limitada cantidad de muestra disponible, no se registró la contribución de la turbidez. Aun así, se puede ver que la diferencia máxima entre ambos espectros está, como indica Klunk¹⁹⁹, aproximadamente a 541 nm.

En la región $\sim 400-500$ nm, la diferencia entre el espectro de CR y el espectro de la mezcla es menor que la turbidez que se observa a 700 nm; así, si se resta la turbidez, se obtendrían dos puntos isobásticos como los descritos¹⁹⁹.

El comportamiento de esta preparación es muy similar al descrito por Klunk para $A\beta$ y al observado en preparaciones ideales de insulina. En este caso y a diferencia de lo que

sucede en el ejemplo del apartado 6.2.2.1, tiene sentido aplicar las ecuaciones detalladas en el apartado 6.2.1. Además, puesto que el rango de concentraciones utilizado se encuentra dentro de los límites de cuantificación (la relación CR:A β es 3,8/4, mayor que la relación 1/1,1 necesaria).

Al aplicar la Ecuación 7 se obtiene que la concentración de CR unido es 1,8 μ M, por lo que la $[A\beta_{\text{fibrilar}}]=2\cdot[CR_{\text{unido}}]=3,9 \mu\text{M}$. Este valor es muy similar a 4 μ M, la concentración total de A β en esta preparación.

Desafortunadamente, sólo se obtuvo este comportamiento en una de las múltiples preparaciones de $\beta(1-42)$ analizadas durante la realización de esta tesis^{♦,205}. Las restantes preparaciones presentaron un comportamiento anómalo, similar al descrito para las muestras de insulina no ideales (se pudo apreciar una reducción de la señal total correspondiente al CR_{total} al añadir cantidades crecientes de A β , además del desplazamiento del máximo de absorción hacia longitudes de onda mayores característico de la unión de CR a fibras amiloides).

La imposibilidad de obtener un espectro ideal utilizando las muestras envejecidas de la forma estándar (protocolo del apartado 8.2.1.2.3) hizo descartar la posibilidad de cuantificar el contenido de fibras de A β y/o sus mezclas con inhibidores mediante este método.

El envejecimiento de A β sin agitación da lugar a fibras amiloides, como muestra el uso de TEM y la microscopía en presencia de CR, y dichas fibras son citotóxicas. El problema es que, en estas condiciones, parece estar favorecida la formación de fibras y haces de fibras excesivamente grandes para poder cuantificarlas mediante este método^{♦♦}.

♦ La muestra en concreto, se preparó de la forma habitual pero utilizando un volumen mayor del normal (400 μ L en lugar de los 50-150 μ L habituales) y se envejeció a 37°C en un incubador con agitación orbital. Quizás sea ésta la causa del comportamiento observado (es posible inducir cambios conformacionales mediante agitación²⁰⁵ y se sabe que A β da lugar a fibras amiloides de morfología diferente, según se envejecen o no con agitación¹⁹³).

²⁰⁵ Caussette, M. M.; Planche, H.; Delepine, S.; Monsan, P.; Gaunand, A.; Lindet, B. *Protein Eng.* **1997**, *10*, 1235-1240.

♦♦ Las medidas de turbidimetría realizadas en nuestro laboratorio por Dolors Grillo apoyan dicha observación. En ausencia de agitación la turbidez de las preparaciones es menor, lo que se puede atribuir a la presencia de un menor número de fibras de mayor tamaño.

6.3 Estudios de fluorescencia en presencia de ThT

La ThT, al igual que las moléculas de CR, se une de forma específica a las fibras amiloides mediante un mecanismo desconocido. Esta unión potencia la fluorescencia intrínseca de la ThT, la cual pasa de tener un pequeño máximo de excitación a 415 nm a tener un máximo mucho más intenso a 450 nm. La variación en el espectro de excitación va acompañada de la aparición de un máximo de emisión a 482 nm²⁰⁶.

La fluorescencia de la ThT_{libre} es despreciable frente a la contribución de ThT_{unida}, por ello la cuantificación se realiza directamente, midiendo el valor de la emisión a 482 nm mientras se excita a 450 nm (en este caso no es necesario tener en cuenta la turbidez, ni utilizar ecuaciones complejas). El inconveniente es que la fluorescencia no da valores absolutos (la intensidad depende de parámetros experimentales tales como la intensidad de excitación, la abertura de los monocromadores, etc.), por lo que siempre se comparan los resultados con una preparación de referencia.

Los intentos de cuantificación utilizando CR han mostrado la poca idoneidad de la mayoría de preparaciones de A β obtenidas en esta tesis para su cuantificación espectrofotométrica en presencia de CR. Por ello, no nos extrañó que los intentos de cuantificar las fibras amiloides de dichas preparaciones utilizando la fluorescencia de la ThT fuesen igual de infructuosos.

En la Figura 142 se muestra el espectro de excitación y emisión de la ThT en solución y en presencia de fibras amiloides obtenidas de la forma habitual.

En este ejemplo la diferencia entre ambos espectros es mínima: en la mezcla con fibras amiloides, continua apareciendo el máximo de excitación a 415 nm correspondiente a la ThT sin unir, aunque también se aprecia la aparición de un hombro a longitudes de onda mayores. La bibliografía describe, en condiciones similares²⁰⁶, una banda a 450 nm con una intensidad un orden de magnitud superior a la banda mostrada para la ThT sola, la cual desaparece totalmente.

²⁰⁶ LeVine, H. *Protein Sci.* **1993**, 2, 404-410.

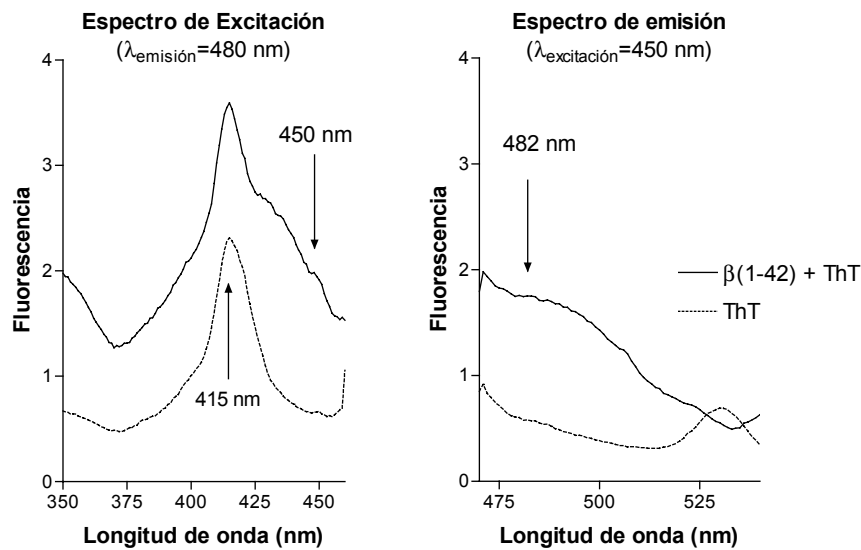


Figura 142. Espectros de excitación ($\lambda_{\text{emisión}}=482$ nm) y emisión ($\lambda_{\text{excitación}}=450$ nm) para una disolución 3 μM ThT en tampón fosfato 20 mM pH 7,4. ThT en las mismas condiciones pero en presencia de 1,4 μM de βA envejecido durante 4 días (apartado 8.6.3). La intensidad de excitación utilizada en todos los casos es 740 mV.

Ninguna de las preparaciones de $\beta(1-42)$ ensayadas dieron un espectro comparable al de la bibliografía²⁰⁶. No obstante, se pudo obtener un espectro similar al esperado (ver la Figura 143) al medir una de las preparaciones de $\beta(1-42)$ obtenida en el IIBB^{207,♦} utilizando las mismas condiciones experimentales de análisis detalladas en el apartado 8.6.3. Las medidas de varias muestras de $\beta(1-42)$ preparadas en el IIBB dieron resultados similares a los mostrados en la Figura 142, y no se pudo atribuir el comportamiento observado en la Figura 143 a ninguna causa concreta (preparación de la muestra, lote, etc.).

Al igual que las medidas de CR ideales, este resultado permite ver la utilidad de la ThT para detectar y cuantificar fibras amiloides, pero no es aplicable a las preparaciones obtenidas en nuestro laboratorio.

En este caso no se pudieron realizar medidas adicionales de microscopía óptica en presencia de CR para correlacionar la apariencia de la muestra con su comportamiento espectroscópico en presencia de ThT.

²⁰⁷ Casals, C., Tesis Doctoral. Departamento de Farmacología y Toxicología, Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona-CSIC, IDIBAPS. Universidad de Barcelona, **2002**.

♦ Los espectros mostrados se obtuvieron utilizando péptido $\beta(1-42)$ de la casa Sigma disuelto directamente en H_2O miliQ a una concentración 100 μM , congelado y posteriormente envejecido durante 7 días a 37°C.

6 Agentes de tinción específicos

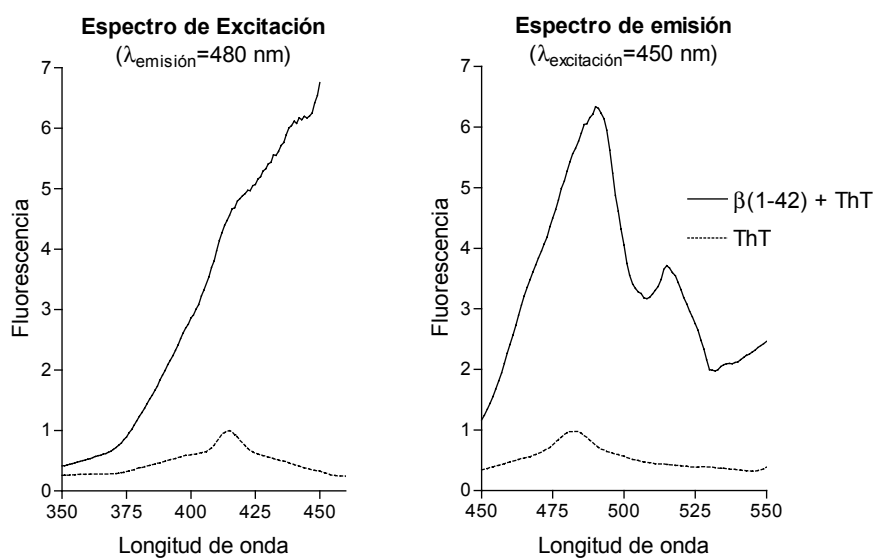


Figura 143. Espectros de excitación ($\lambda_{\text{emisión}}=482 \text{ nm}$) y emisión ($\lambda_{\text{excitación}}=450 \text{ nm}$) para una disolución $3,9 \mu\text{M}$ ThT en tampón fosfato 20 mM pH $7,4$ sola y en presencia de $3,5 \mu\text{M}$ de βA envejecido durante 7 días²⁰⁷. La intensidad de excitación utilizada en todos los casos es 680 mV .

6.4 Resumen y conclusiones sobre los estudios con agentes de tinción específicos

Los métodos espectrofotométricos de cuantificación de estructuras amiloides descritos en la bibliografía (CR y ThT) no son aplicables a la mayoría de muestras preparadas en esta tesis. Aunque la microscopía óptica en presencia de CR permite observar la presencia de estructuras amiloides, corroborando los resultados observados mediante TEM, el complejo CR-A β obtenido no es cuantificable mediante técnicas espectrofotométricas. Las muestras apropiadas para la cuantificación espectrofotométrica presentan un tipo de estructura, en el microscopio óptico, diferente al que presentan las muestras no cuantificables: mientras que las primeras están formadas por pequeñas estructuras aciculares, de color verde intenso[♦], las segundas muestran estructuras más compactas y densas, de color rojizo con zonas verdes y/o amarillas.

A nivel macroscópico se produce un cambio de color que no permite distinguir, a simple vista, la naturaleza de las fibras amiloides: tanto las ideales como las no ideales pasan del rojo-anarajado típico del CR a un tono rosado al añadir las fibras amiloides de A β , aunque en algunos casos las preparaciones amiloides no ideales presentan una rápida deposición del complejo CR-amiloide que las delata (las muestras aptas para la cuantificación mediante CR forman suspensiones estables).

Los procesos heterogéneos suelen estar muy influenciados por factores como la agitación, la temperatura, la fuerza iónica, o la presencia de centros de nucleación. En el caso del envejecimiento de A β , esta afirmación parece ser clave en la obtención de suspensiones cuantificables.

Los ensayos realizados con insulina muestran la importancia que tiene tanto la disolución inicial de la proteína como el proceso de maduración. Igualmente, en el caso de la proteína A β , los resultados obtenidos parecen indicar que el *problema* que no permite cuantificar nuestras preparaciones de β (1-42) se encuentra en el proceso de fibrillogénesis. Al introducir agitación orbital durante el envejecimiento de una muestra de β (1-42) obtenida de la forma habitual, rindió una preparación apta para la cuantificación con CR. No obstante, las restantes preparaciones de β (1-42) ensayadas, envejecidas sin agitación

[♦] Al observar la muestra teñida con CR bajo la luz de polarizadores cruzados a 90°.

6 Agentes de tinción específicos

(apartado 8.2.1.2.3), no son apropiadas para la cuantificación. Sorprendentemente, la preparación de $\beta(1-40)$ realizada según el protocolo descrito por Klunk y envejecida con agitación magnética (apartado 8.6.2.1.1) tampoco fue apta para la cuantificación, aunque mostró un perfil más próximo al *ideal* que el obtenido con las preparaciones de $\beta(1-42)$ sin agitación. Esto podría indicar la existencia de otros factores importantes en el proceso de envejecimiento, además de la agitación.

La utilización de nuestro protocolo habitual junto con una agitación orbital suave parece propiciar la formación de fibras pequeñas, ideales para su cuantificación espectrofotométrica, mientras que la ausencia de ésta rinde estructuras de mayor tamaño y, por tanto, no cuantificables. Así, aunque el método de envejecimiento de A β usado en la presente tesis rinde fibras amiloides, como se demuestra mediante TEM y microscopía óptica, y presenta un comportamiento citotóxico como el descrito, dichas fibras no son susceptibles de ser cuantificadas utilizando los métodos de CR o de ThT descritos.

La solución más sencilla a la imposibilidad de cuantificar nuestras fibras amiloides es variar el método de obtención de éstas para conseguir un protocolo adecuado (utilizando agitación orbital, etc.), pero en este caso, un posible problema que puede aparecer es que alguna de las mezclas favorezca la formación de fibras no cuantificables.

La cuantificación de nuestras fibras amiloides y, en general, de cualquier otra preparación de fibras amiloides “no ideal”, podría realizarse mediante el método de filtración descrito también por Klunk¹⁹², pero tiene como inconveniente la necesidad de grandes cantidades de muestra.