

**EFFECTO DE FÁRMACOS ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDALES Y
NANOPARTÍCULAS SOBRE LA FORMACIÓN DE INSULINA AMILOIDE**

ZAYDA YURLEY FONSECA COBOS

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2014

**EFFECTO DE FÁRMACOS ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDALES Y
NANOPARTÍCULAS SOBRE LA FORMACION DE INSULINA AMILOIDE**

ZAYDA YURLEY FONSECA COBOS

**Trabajo de grado presentado como requisito para obtener el título de
químico**

**DIRECTOR DE PROYECTO:
RODRIGO GONZALO TORRES SÁEZ, PhD**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUIMICA
BUCARAMANGA**

2014

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	14
1. MARCO TEÓRICO	16
1.1 INSULINA	16
1.2 DIABETES MELLIUS TIPO II	18
1.3 INSULINA AMILOIDE	18
1.4 PROCESO DE FIBRILACIÓN	19
1.5 CITOTOXIDAD DE FIBRILLAS	22
1.5.1 Ensamblajes amiloidogénicos sobre la membrana celular (efecto directo).	22
1.5.2 A través de mecanismos celulares que pueden conducir a la muerte celular en conjunto con la proteína (efecto indirecto).	22
1.6 ESFERULITAS	22
1.7 FÁRMACOS ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDALES (AINES)	24
1.8 NANOPARTÍCULAS DE PLATA	25
1.9 MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS AMILOIDES	26
1.9.1 Espectroscopía de fluorescencia	26
1.9.2 Fluorescencia de proteínas	27
1.9.3 Microscopía de fuerza atómica (AFM).	28
1.9.4 DLS (dynamic light scattering).	29
2. OBJETIVOS	30
2.1 OBJETIVO GENERAL	30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30

3. MATERIALES Y MÉTODOS	31
3.1 REACTIVOS	31
3.2 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	32
3.2.1 Formación de insulina amiloide.	32
3.2.1.1 Metodología 1 de Formación de Insulina Amiloide.	32
3.2.1.2 Metodología 2 de Formación de Insulina Amiloide.	32
3.2.1.3 Metodología 3 de Formación de Insulina Amiloide.	32
3.2.3 Incubación en condiciones fisiológicas de especies preformadas.	33
3.2.4 Uso de fármaco antiinflamatorios no esteroidales.	33
3.2.5 Síntesis de nanopartículas de plata.	34
3.3 MÉTODOS ANALÍTICOS	35
3.3.1 Determinación de morfología de especies amiloides mediante microscopia de fuerza atómica	35
3.3.2 Cuantificación de tamaño hidrodinámico de las fibras por DLS.	36
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
4.1 FORMACIÓN DE INSULINA AMILOIDE	37
4.1.1 Metodología 1 de Formación de Insulina Amiloide.	37
4.1.2 Metodología 2 de Formación de Insulina Amiloide.	38
4.1.3 Metodología 3 de Formación de Insulina Amiloide.	40
4.2 INCUBACIÓN EN CONDICIONES FISIOLÓGICAS DE ESPECIES PREFORMADAS	42
4.3 EFECTO DE FÁRMACOS ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDALES (AINES) SOBRE LA FORMACIÓN DE AGREGADOS DE INSULINA AMILOIDE.	44
4.3.1 Efecto del Diclofenaco.	44
4.3.1.1 Efecto del Diclofenaco (ampolla).	44
4.3.2 Efecto del Diclofenaco (cápsula).	46
4.3.3 Efecto del Naproxeno sobre la formación de insulina amiloide.	50
4.3.4 Efecto del Ibuprofeno sobre la formación de insulina amiloide	53
4.3.5 Efecto del Paracetamol sobre la agregación de insulina amiloide.	56

4.3.6 Efecto de la Aspirina sobre la formación de Insulina amiloide.	59
4.4 MORFOLOGÍA DE INSULINA AMILOIDE	63
4.5 INHIBICIÓN DE FORMACIÓN DE AGREGADOS AMILOIDES DE INSULINA POR AINES	64
4.6 DEGRADACIÓN DE AGREGADOS AMILOIDE DE INSULINA POR AINES	67
4.7 NANOPARTÍCULAS	68
4.7.1. Caracterización de nanopartículas.	68
4.7.2. Efecto de nanopartículas sobre insulina amiloide	69
5. CONCLUSIONES	73
6. RECOMENDACIONES	74
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	75
BIBLIOGRAFIA	83

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura del monómero de insulina	16
Figura 2. a) Modelo general de formación de fibras amiloides b) Modelo estructural de la formación de insulina amiloide	20
Figura 3. Estructura de esferulitas.	23
Figura 4. Esquema de la metodología experimental	31
Figura 5. Ilustración de la inducción de la formación de agregados amiloides a partir de insulina	34
Figura 6. Cinética de formación de insulina amiloide medido como incremento de fluorescencia del complejo insulina amiloide-ThT	38
Figura 7. Cinética de formación de insulina amiloide medido como incremento de fluorescencia del complejo insulina amiloide-ThT.	39
Figura 8. Cinética de formación de insulina amiloide medido como incremento de fluorescencia del complejo insulina amiloide-ThT	41
Figura 9. Distribución de tamaño de insulina amiloide a diferentes tiempos incubación. Concentración 1 mg/ml de insulina, temperatura de incubación: 75°C, pH 1.6 en solución HCl.	42
Figura 10. Cinética de Formación de Agregados Amiloides de Insulina a partir de especies de preformadas medido como incremento de fluorescencia del complejo insulina amiloide-ThT	43
Figura 11. Cinética de Formación de agregados de insulina amiloide en presencia de diclofenaco en ampolla 78.58 μ M usando fluorescencia como medida del proceso.	45
Figura 12. Cinética de Formación de agregados de insulina amiloide en presencia de diclofenaco en cápsula 66.81 μ M usando fluorescencia como medida del proceso.	47

Figura 13. Cinética de Formación de agregados de insulina amiloide en presencia de naproxeno 479 μ M usando fluorescencia como medida del proceso.	50
Figura 14. Distribución de tamaño de insulina amiloide en presencia de naproxeno a 10 horas de incubación de: insulina (rojo), insulina-naproxeno** (verde), insulina-naproxeno*(azul).	51
Figura 15. Cinética de Formación de agregados de insulina amiloide en presencia de ibuprofeno 340 μ M usando fluorescencia como medida del proceso.	54
Figura 16. Distribución de tamaño de insulina amiloide en presencia de ibuprofeno a 10 horas de incubación de: insulina (rojo), insulina-ibuprofeno** (verde), insulina-ibuprofeno*(azul).	55
Figura 17. Distribución de tamaño de insulina amiloide en presencia de paracetamol a 10 horas de incubación de: insulina (rojo), insulina-paracetamol** (verde), insulina-paracetamol*(azul).	58
Figura 18. Cinética de Formación de agregados de insulina amiloide en presencia de aspirina 1.39 mM usando fluorescencia como medida del proceso.	60
Figura 19. Distribución de tamaño de insulina amiloide en presencia de aspirina a 10 horas de incubación de: insulina (rojo), insulina-aspirina** (verde), insulina-aspirina*(azul).	61
Figura 20. Equilibrio de ácidos carboxílicos en medio ácido.	64
Figura 21. Posible interacción del fármaco con monómeros de insulina. La interacción de ibuprofeno con el monómero de insulina se realizó usando el visualizador pyMOL. La estructura del monómero de insulina fue obtenido de Protein Data Bank (PDB). COD 2M1E.pdb.	66
Figura 22. Ilustración de la estructura amiloide de la insulina.	67
Figura 23. Distribución de tamaño de las nanopartícula de plata.	69
Figura 24. Distribución de potencial sobre la superficie de la nanopartícula.	69

Figura 25. Cinética de Formación de agregados de insulina amiloide en presencia nanopartículas de plata usando fluorescencia como medida del proceso.

70

LISTA DE TABLAS

	pÁF
Tabla 1. Fármacos antiinflamatorios no esteroideos de mayor uso.	24
Tabla 2. Imágenes de microscopia de fuerza atómica (AFM) de agregados de insulina amiloide en presencia de diclofenaco. NC-AFM, frecuencia resonancia 320 Khz, soluciones incubadas durante 12 horas.	48
Tabla 3. Imágenes de microscopia de fuerza atómica (AFM) de agregados de insulina amiloide en presencia de naproxeno. NC-AFM, frecuencia resonancia 320 Khz, soluciones incubadas durante 12 horas.	52
Tabla 4. Imágenes de microscopia de fuerza atómica (AFM) agregados amiloides en presencia de ibuprofeno. NC-AFM, frecuencia resonancia 320 KHz, soluciones incubadas durante 12 horas.	55
Tabla 5. Cinética de Formación de agregados de insulina amiloide en presencia de paracetamol 3.96 mM usando fluorescencia como medida del proceso.	57
Tabla 6. Imágenes de microscopia agregados amiloides en presencia de paracetamol. NC-AFM, frecuencia resonancia 320 Khz, soluciones de insulina incubadas durante 12 horas.	58
Tabla 7. Imágenes de microscopia de fuerza atómica (AFM) de agregados amiloides en presencia de aspirina. NC-AFM, frecuencia resonancia 320 Khz, soluciones incubadas durante 12 horas.	61
Tabla 8. Intensidades máximas relativas de fluorescencia de los ensayos realizados en presencia de fármaco y controles de insulina sin fármaco.	67
Tabla 9. Imágenes de microscopia de fuerza atómica (AFM) de agregados amiloides en presencia de aspirina. NC-AFM, frecuencia resonancia 320 Khz, soluciones incubadas durante 12 horas.	71

RESUMEN

TITULO: EFECTO DE FÁRMACOS ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDALES Y NANOPARTÍCULAS SOBRE LA FORMACION DE INSULINA AMILOIDE*

AUTOR: ZAYDA YULERY FONSECA COBOS**

PALABRAS CLAVE: insulina, fibras amiloides, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, nanopartícula.

El autoensamble de la insulina da lugar a estructuras amiloides en un proceso asociado a la diabetes tipo dos. Este proceso se caracteriza por el cambio conformacional de la insulina de su estado nativo a especies fibrilares compuestas en su mayoría por conformaciones de tipo hojas β . En este estudio se indujo la insulina a su forma amiloide *in vitro* bajo condiciones de pH ácido (pH inferior a 2) y temperatura elevada. De esta manera se analizó el efecto que tienen los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (diclofenaco, ibuprofeno, naproxeno, paracetamol y aspirina) y nanopartículas de plata sobre la formación de insulina amiloide. Con el fin de analizar la cinética de formación de insulina amiloide en presencia de los fármacos se hizo uso de técnicas como la fluorescencia, dispersión de luz dinámica (DLS) y microscopia de fuerza atómica.

La cinética de fibrilación de la insulina se caracteriza por una fase de retardo correspondiente a la nucleación, seguido de una fase exponencial referente a la elongación y finalmente una etapa asintótica en el que la proteína en solución se agota y la reacción se detiene, en este estudio se comprobó que la etapa lenta del proceso y que requiere mayor cantidad de energía es la nucleación.

Se encontró que fármacos como el naproxeno, el ibuprofeno y el paracetamol inhiben en cierto porcentaje el proceso de fibrilación cuando se adicionan antes de iniciar la incubación, mientras que la aspirina, el diclofenaco, el naproxeno, el ibuprofeno y el paracetamol influyen sobre las fibra de insulina preformadas disminuyendo las conformaciones tipo hoja β . Las nanopartícula de plata aumentaron la velocidad de fibrilación de la insulina.

* Proyecto de grado.

** Facultad de ciencias. Escuela de Química. Director Rodrigo Gonzalo Torres Saéz.

SUMMARY

TITLE: EFFECT OF NON-STEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS AND NANOPARTICLES ON THE AMYLOID INSULIN FORMATION*

AUTHOR: ZAYDA YULERY FONSECA COBOS**

KEY WORDS: insulin, amyloid fibers, non-steroidal anti-inflammatory drugs, nanoparticle.

The self-assembly of insulin leads to amyloid structures in a process associated with type II diabetes. This process is characterized by the conformational change of the native species of the insulin to fibrillar species, which are mainly composed by molecular conformations from β -sheet structure. In this study, the insulin was induced to the amyloid form *in vitro* under conditions of acidic pH (pH less than 2) and elevated temperature. Thus, the effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs (diclofenac, ibuprofen, naproxen, acetaminophen and aspirin) and silver nanoparticles on the formation of amyloid insulin was analyzed. In order to analyze the kinetics of formation of amyloid insulin in the presence of the drugs, they were implemented techniques as fluorescence, dynamic light scattering (DLS) and atomic force microscopy.

The kinetics of insulin fibrillation is characterized by a delay phase corresponding to the nucleation, followed by an exponential growth phase on the elongation, and finally an asymptotic stage where the protein in solution runs out and the reaction stops. In this study, it was found that the slowest phase of the process and the one that requires greater amounts of energy is nucleation.

The results show that drugs as naproxen, ibuprofen and acetaminophen inhibit the fibrillation process in a certain percentage when they were added before the incubation starting. While aspirin, diclofenac, naproxen, ibuprofen and acetaminophen have influence on the fiber of preformed insulin by the decrease of the conformations type β -sheet. The silver nanoparticles increased the speed of atrial fibrillation of the insulin.

* Grade project.

** Facultad de ciencias. Escuela de Química. Director Rodrigo Gonzalo Torres Saéz

INTRODUCCIÓN

Las proteínas amiloides son aquellas que adquieren un plegamiento anormal y se caracterizan principalmente por poseer estructuras de tipo hojas- β . En general, las proteínas amiloides están asociadas a patologías denominadas enfermedades amiloides, que son el resultado de la acumulación de proteínas fibrosas alrededor de las células, interfiriendo con el correcto funcionamiento de la misma. Cada enfermedad amiloide está relacionada con una proteína y órgano específico. Las enfermedades amiloides más comunes son: Alzheimer, Parkinson, artritis reumatoide, demencia de cuerpos de Lewy, esclerosis múltiple y diabetes mellitus tipo II. Actualmente, se conocen más de 20 proteínas asociadas a estas enfermedades. En general, los procesos de agregación de éstas proteínas están relacionados principalmente a desórdenes inflamatorios y de envejecimiento celular¹. Se ha demostrado que cualquier proteína puede fibrilarse bajo condiciones extremas adecuadas (pH, concentración de proteína, temperatura), incluso aquellas que no están asociadas con enfermedades².

El fenómeno de las proteínas amiloides es bastante frecuente, según se ha demostrado a partir de una amplia evidencia experimental. Puede ocurrir dentro y fuera de la célula. Por esta razón, la tendencia de las proteínas a agregarse ha jugado un papel relevante en la evolución de los procesos celulares. Además, su huella puede observarse a nivel de la estructura de las proteínas mismas y en los numerosos sistemas y grupos de factores presentes en todos los tipos celulares, cuya función primaria es evitar la formación y/o acumulación de agregados proteicos en el interior y exterior de la célula³.

La insulina es una de las principales proteínas usadas como modelo general para estudiar la formación de especies amiloides, por la facilidad y la rapidez en que

ocurre el proceso *in vitro*. Como se mencionó anteriormente, una de las principales enfermedades asociadas a las proteínas amiloides es la diabetes mellitus tipo II, la cual es consecuencia de la agregación de Insulina. La insulina amiloide se acumula sobre las células β -pancreáticas interfiriendo con la liberación de insulina al torrente sanguíneo. La formación de insulina amiloide *in vitro* permite evaluar el efecto de fármacos sobre este proceso. Se ha comprobado que pequeñas moléculas que presentan en su estructura anillos aromáticos influyen en la fibrilación de proteínas, cambiando la morfología de los agregados e impidiendo la formación en estructuras tipo hoja β características de los amiloides. Se ha evidenciado también que las nanopartículas no funcionalizadas aceleran el proceso de agregación proteica⁴.

El proceso de formación de fibrillas de la insulina implica varias etapas: monomerización, pérdida de la estructura nativa, nucleación y crecimiento de las fibras. *In vitro*, la formación de insulina amiloide se puede llevar a cabo modificando algunas propiedades del medio de reacción, tales como la temperatura, la fuerza iónica, el pH, o mediante la adición de agentes desnaturalizantes como el dodecil sulfato sódico (SDS)⁵.

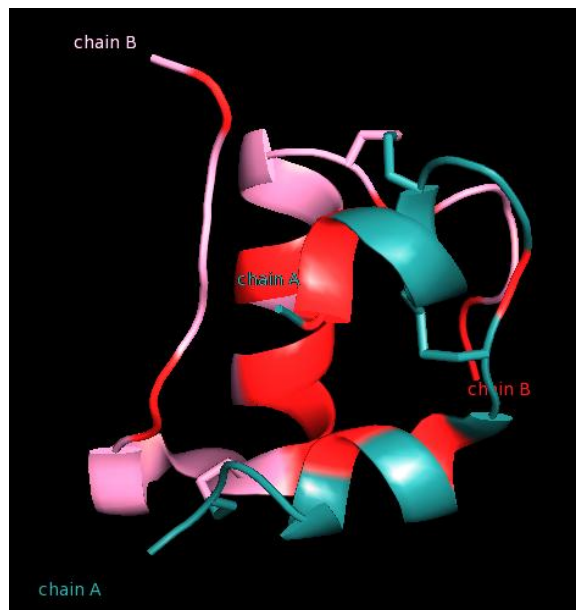
Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos pueden también influir en el proceso de fibrilación de la insulina evitando la formación de agregados fibrilares o degradando las estructuras amiloides ya formadas.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 INSULINA

La insulina es una proteína compuesta por 51 aminoácidos distribuidos en dos cadenas, la cadena A y la cadena B, unidas por dos enlaces disulfuro. La cadena A contiene 21 aminoácidos y la cadena B está compuesta por 30 aminoácidos, con un tercer puente disulfuro estando presente en la cadena A. La estructura secundaria de la cadena A se compone de una estructura α -hélice, un giro y una segunda estructura α -hélice alineada de manera antiparalela a la primera. La cadena B está formada por una α -hélice en su extremo N-terminal.

Figura 1. Estructura del monómero de insulina



Los aminoácidos hidrofóbicos fueron marcados usando el visualizador pyMOL. La estructura del monómero de insulina fue obtenida de Protein Data Bank (PDB). COD 2M1E.pdb.

En la figura 1 se muestra la estructura del monómero de la insulina: la cadena A en color azul y la cadena B en rosado, los aminoácidos hidrofóbicos están señalados en rojo. El monómero de insulina tiene un peso molecular de 5.808 Da y un tamaño de 1,11 nm⁶. Posee una carga neta positiva +6 en condiciones ácidas (pH inferior a 2) y un punto isoeléctrico (pI) de 5.4.

En su estado nativo, la insulina forma dímeros y tetrámeros en ausencia de zinc, mientras que la presencia de iones de zinc induce la formación de hexámeros formados por la asociación de 3 dímeros. Sin embargo, el monómero es el responsable de la función reguladora en el metabolismo. La asociación de monómeros de insulina a dímeros y agregados más grandes es un complejo equilibrio dinámico que depende del pH, la fuerza iónica y la concentración de proteína⁷.

Por otra parte, se cree que el extremo C-terminal de la cadena B (fragmento B24-B30) posee una flexibilidad inherente, que es crítica para la auto-asociación de moléculas de insulina, la unión de la insulina a su receptor, y determinante en el proceso de fibrilación. La flexibilidad del fragmento B24-B30, importante en la etapa clave de formación de insulina amiloide, depende de la contribución entrópica del C-terminal y es determinada por factores como pH, fuerzas electrostáticas o temperatura⁸.

En los mamíferos, la insulina se produce y secreta por grupos de células especializadas en el páncreas, conocidas como los islotes de Langerhans. Al igual que todas las hormonas, la insulina es un mensajero químico utilizado por el cuerpo para transferir señales de una célula a otra.

1.2 DIABETES MELLIUS TIPO II

La glucosa se genera a partir de la descomposición de los alimentos. Es la principal fuente de energía del cuerpo. Puede absorberse de la sangre a las células con ayuda de la insulina. La falta de insulina, o la resistencia a ella, causa diabetes⁹.

La diabetes tipo II, es conocida por la insuficiencia que tiene el cuerpo para fabricar insulina de forma correcta, ocasionando que la glucosa se acumule en la sangre y las células del cuerpo no reciban la energía que necesitan¹⁰.

La deficiencia de producción de insulina se da en el islote pancreático, que es una acumulación de diversos tipos de células: células alfa, beta, delta, F y G, encargadas de la producción de diferentes hormonas, entre ellas la insulina segregada por las células beta. Una de las principales causas de la diabetes es el daño de estas células causada por la acumulación de placas de insulina amiloide sobre la misma. La importancia de la diabetes como problema de salud viene determinada por el desarrollo y progresión de las complicaciones crónicas micro y macrovasculares que afectan a la calidad de vida del diabético, y provocan unas elevadas tasas de invalidez prematura y muerte¹¹. Uno de los principales problemas en la administración de insulina en pacientes con diabetes tipo II, es que esta proteína se deposita en la paredes arteriales en su forma amiloide y en la superficie de la membrana de las células β -pancreáticas, impidiendo la correcta producción, almacenamiento y liberación de la insulina en los pacientes.

1.3 INSULINA AMILOIDE

Las fibrillas amiloides son agregados filamentosos de proteína que carecen de actividad biológica y que miden aproximadamente 10 nm de ancho y 0,1 a 10

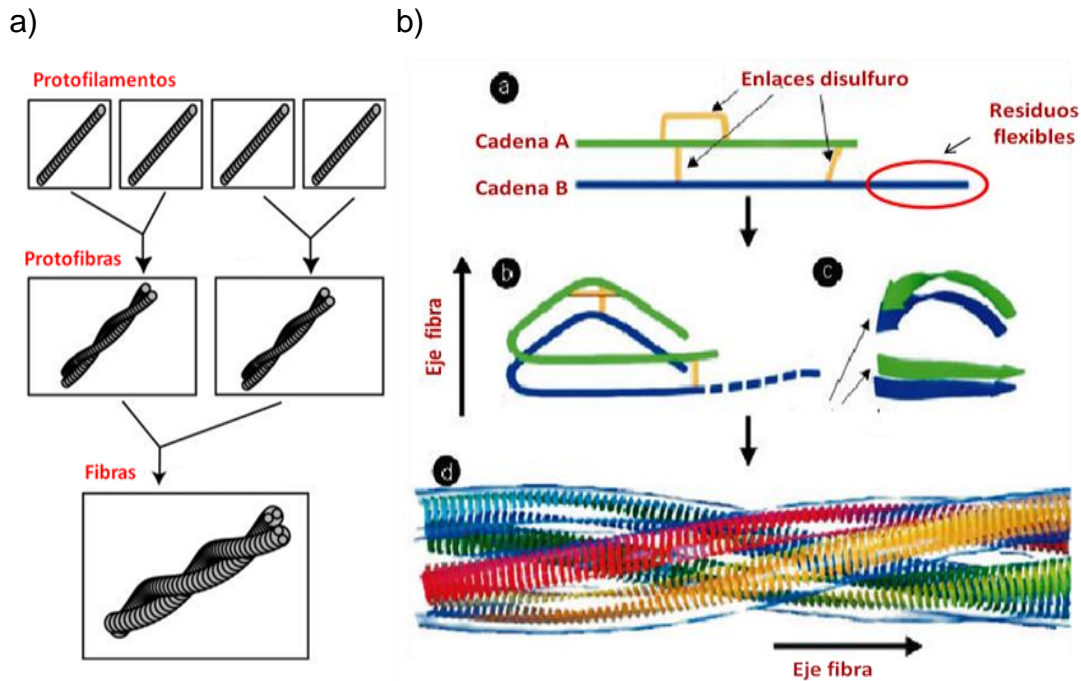
micras de longitud. Sin embargo, es posible que los agregados amiloides adquieran diferentes morfologías. Algunos son esféricos y otros altamente ramificados, dependiendo de las condiciones experimentales sobre las cuales se realice el proceso de inducción¹². Normalmente, las hojas β características de las proteínas amiloides se encuentran orientadas perpendicularmente respecto al eje de las fibras.

Se ha demostrado que las proteínas y péptidos no asociados con enfermedades amiloides pueden convertirse en estructuras fibrilares con las mismas propiedades de las fibras amiloides, sugiriendo que la habilidad de formar fibras es inherente a todas las secuencias peptídicas¹³. Una característica común de los amiloides es la capacidad de interactuar con el colorante tioflavina T, modificando las propiedades fluorescentes de esta molécula¹⁴. El carácter insoluble y la rigidez de las fibras amiloides ha impedido hasta el ahora dilucidar su estructura interna a nivel atómico, pues no son aplicables los métodos estructurales convencionales como la difracción de rayos X de monocristales y la resonancia magnética nuclear (RMN) en medio líquida².

1.4 PROCESO DE FIBRILACIÓN

Aunque el mecanismo de fibrilación de la insulina es aún desconocido, se han planteado modelos generales que pueden ayudar a elucidar esta transformación. El modelo más usual plantea que durante la cinética de crecimiento, las primeras especies formadas, son intermediarios de 3 o 4 monómeros, que se encuentran parcialmente plegados, y que darán lugar a fibras sencillas y alargadas conocidas como protofilamentos. Estos interactuarán con otros protofilamentos vecinos para formar protofibrillas, y finalmente la unión de protofibrillas generaran fibras maduras¹⁵(figura 2a).

Figura 2. a) Modelo general de formación de fibras amiloides (Tomado de Jiménez et al., 2002, p. 9199)¹⁵ b) Modelo estructural de la formación de insulina amiloide



Tomado de Khurana et al.,2003, p.1139¹⁶.

La interacción de protofilamentos a protofibrillas, y protofibrillas a fibrillas, y la formación de conglomerados de fibrillas, constituyen un proceso físico entrópicamente impulsado por fuerzas electrostáticas e hidrofóbicas. A partir de la variación de ciertos parámetros, tales como el pH, la fuerza iónica, la concentración de proteína y la temperatura, es posible aumentar o disminuir la velocidad de formación de las fibras y alterar la morfología de las especies finales. Se ha demostrado que cuando un péptido es introducido entre el N-terminal de la cadena A y el C-terminal de la cadena B, con el fin de ciclar la proteína, el plegamiento nativo es conservado pero se pierde la habilidad de fibrilarse, sugiriendo que el movimiento de estos residuos tiene un papel fundamental en la formación de las fibrillas¹⁷.

La fibrilación de la insulina se caracteriza por una cinética sigmoide, que incluye tres etapas: la primera es la nucleación (tiempo de latencia), seguida de la fase de elongación, caracterizada por el alargamiento de los núcleos a protofilamentos, y finalmente, un periodo asintótico donde se agota la proteína en solución y se detiene el proceso de fibrilación¹⁸. Para que se produzca la nucleación, es necesario someter la proteína a temperaturas superiores a 37 °C, mientras que la elongación fácilmente puede presentarse a temperatura ambiente hasta en temperaturas por debajo de ésta.

La nucleación es la etapa determinante en la cinética de formación. En esta etapa, los monómeros pierden su conformación nativa, lo que da lugar a intermediarios parcialmente doblados que formarán los núcleos. Además, es importante mantener el pH por debajo de 2, porque de esta manera se garantiza que las unidades hexaméricas que protegen en mayor grado los aminoácidos hidrofóbicos de la hormona se disocian en unidades monoméricas. Por su tamaño molecular, los monómeros aumentan el área superficial hidrofóbica expuesta, convirtiéndose en especies menos estables, y por tanto, más propensas a cambios conformacionales en interfaces hidrofóbicas; además, estas condiciones de pH brindan una mayor flexibilidad del C-terminal de la cadena B, aumentando los efectos entrópicos que favorecen la formación de intermediarios¹⁸. Con el movimiento del fragmento B24-B30, los residuos hidrofóbicos del monómero quedan muy expuestos e impulsan el cambio conformacional. Los monómeros que una vez están parcialmente plegados se combinan con otros para formar los núcleos¹⁹ (figura 2b). Una vez que se alcanza un tamaño crítico, y los intermediarios tienen suficiente área superficial que les brinde estabilidad, pueden empezar a reaccionar con monómeros en su estado nativo hasta formar fibras maduras.

1.5 CITOTOXIDAD DE FIBRILLAS

Aunque la patogénesis derivada de insulina amiloide es aún desconocida, es posible que la insulina reabsorbida pueda no ser procesada por el sistema del proteosoma, conduciendo a una alta concentración de proteína al interior de las células, lo cual lleva a la agregación de la misma. Es decir, que mayoritariamente la insulina administrada al paciente, lejos de cumplir su función biológica, sufre un proceso de fibrilación. Además, la agregación de insulina amiloide *in vitro* también causa serios problemas en la producción, almacenamiento y distribución de este importante compuesto biofarmacéutico.

Para explicar el efecto citotóxico de las proteínas amiloides se han planteados dos hipótesis diferentes:

1.5.1 Ensamblas amiloidogénicos sobre la membrana celular (efecto directo).

Lo cual puede llevar a la formación de poros en la membrana celular aumentando en gran medida su permeabilidad y generando inestabilidad en la misma.

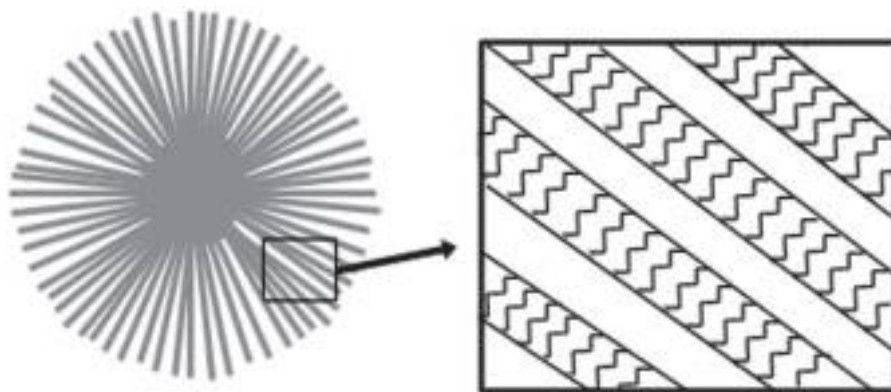
1.5.2 A través de mecanismos celulares que pueden conducir a la muerte celular en conjunto con la proteína (efecto indirecto). La manera en que este mecanismo puede afectar la célula se explica mediante el incremento de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, hiperfosforilación de proteínas acumuladas en depósitos de proteína agregada, anormalidad en sistemas redox celulares, y pérdida de la función de la proteína después de la agregación²⁰.

1.6 ESFERULITAS

Como se mencionó anteriormente, en el proceso de fibrilación es posible encontrar diferentes morfologías, y dentro de éstas, las esferulitas, que son agregados con

características amiloides pero de aspecto esférico²¹. La hipótesis más sugerente de la forma como se ensamblan estas esferulitas, sugiere como primera etapa la formación de un núcleo que se agrega de manera no específica. Éste puede identificarse como el precursor en el proceso de agregación, seguido del ensamble de fibrillas en forma radial alrededor del núcleo²² (figura 3).

Figura 3. Estructura de esferulitas.



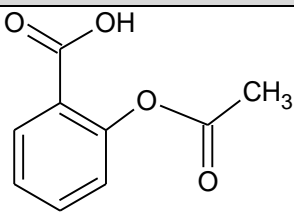
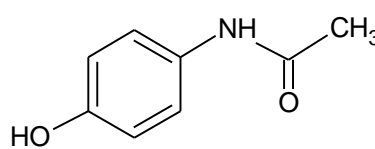
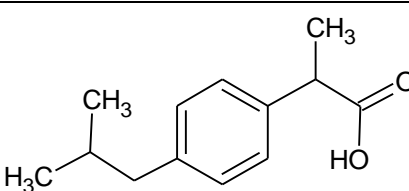
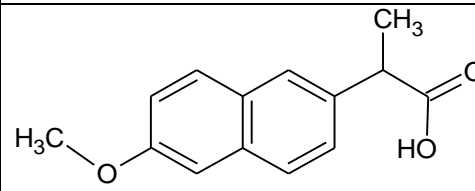
La temperatura, el pH, la fuerza iónica y la concentración de proteína son factores que pueden ser determinantes en la formación de esferulitas. La manera en que ocurre esto responde a la disminución del tiempo de nucleación, lo que lleva a una mayor probabilidad de formación de núcleos sin un patrón específico de agregación. No obstante, esto conlleva a que la concentración de proteína finalmente sea la que determinará el tamaño de la esfera amiloide²³.

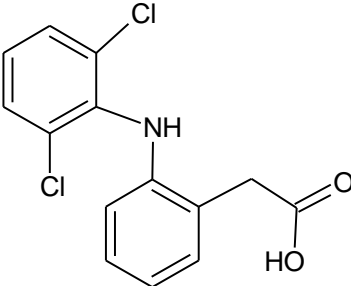
Aunque la importancia de estos agregados sobre la salud humana aún no se han establecido, es posible que cause el mismo efecto de las fibrillas individuales. Sin embargo, las esferulitas tienen la capacidad de secuestrar las fibras ya formadas y sus precursores en regiones localizadas, ayudando a proteger el organismo al unirse a las fibrillas, es decir, permite que una mayor concentración de proteína se encuentre en un espacio menor

1.7 FÁRMACOS ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDALES (AINES)

Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son compuestos orgánicos que tienen como efecto primario inhibir la síntesis de prostaglandinas a través de la inhibición de la enzima cicloxigenasa. La aspirina es el prototipo del grupo de fármacos conocidos como agentes “anticicloxigenasa”, debido a que inhiben a esta enzima responsable de la síntesis de prostaglandinas, las cuales son mediadoras de la producción de fiebre, dolor e inflamación²⁴.

Tabla 1. Fármacos antiinflamatorios no esteroideos de mayor uso.

NOMBRE	ESTRUCTURA	PROPIEDADES
Aspirina		Peso molecular: 180.16 g/mol Punto de fusión: 138 °C pK_a: 3.5
Paracetamol		Peso molecular: 151.17 g/mol Punto de fusión: 169 °C pK_a: 9.5
Ibuprofeno		Peso molecular: 206.29 g/mol Punto de fusión: 76 °C pK_a: 5.2
Naproxeno		Peso molecular: 230.26 g/mol Punto de fusión: 153 °C pK_a : 4.2

NOMBRE	ESTRUCTURA	PROPIEDADES
Diclofenaco		Peso molecular: 296.14 g/mol Punto de fusión: 287 °C pK_a : 4.0

Los AINEs son ácidos carboxílicos débiles con un pKa menor a 5, permanecen disociados a un pH de 2 unidades por encima de su pKa, y son altamente liposolubles. La mayoría de los AINEs se unen a las proteínas plasmáticas. El paracetamol no se considera parte de este grupo, sin embargo, actúa de la misma manera que los AINEs. En la tabla 1, se relacionan los fármacos de mayor uso y serán los que se estudien sobre la formación de insulina amiloide en esta tesis.

1.8 NANOPARTÍCULAS DE PLATA

El uso de nanopartículas de plata en medicina ha tenido un gran auge gracias a sus propiedades bactericidas. Sin embargo, es poca la información que se tiene sobre el efecto que las mismas causan al interactuar con las proteínas presentes en el organismo. Se ha demostrado que una gran variedad de nanopartículas aceleran el proceso de agregación proteica, y por lo tanto, aumentan el riesgo de enfermedades amiloides²⁵.

Normalmente cuando una nanopartícula se expone a un medio donde hay alta concentración de proteína, la nanopartícula tiene la capacidad de interactuar con la proteína por fenómenos de adsorción y atracción electrostática, formándose una capa proteica sobre la superficie de la nanopartícula. Cuando esto ocurre, la

proteína en la superficie funciona como un punto de anclaje que favorece la agregación de amiloides²⁵.

A pesar de este efecto citotóxico, es posible realizar modificaciones sobre la superficie de la nanopartícula, adicionando grupos funcionales que inhiban la formación de los agregados amiloides²⁶. La afinidad de la superficie de las nanopartículas por las proteínas también puede ser aprovechada para unir selectivamente agregados amiloides ya formados alrededor de las células y facilitar la extracción del complejo nanopartícula-proteína a través de las propiedades físicas del complejo, como por ej. las propiedades magnéticas²⁷.

1.9 MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS AMILOIDES

1.9.1 Espectroscopía de fluorescencia. La fluorescencia es un proceso de fotoluminiscencia en el que los átomos y moléculas se excitan con la absorción de la radiación electromagnética. Posteriormente, la especie excitada se relaja al estado fundamental y emite su exceso de energía como fotones. La característica más atractiva de la fluorescencia molecular es su sensibilidad inherente. Otra ventaja de los métodos de fluorescencia es su amplio intervalo de concentración lineal, significativamente mayor que en la espectroscopia de absorción²⁸. La fluorescencia molecular se cuantifica al excitar la muestra a la longitud de onda de absorción, también llamada longitud de onda de excitación, y medir la emisión a una longitud de onda mayor, denominada longitud de onda de emisión o fluorescencia. Generalmente, la emisión de fluorescencia se mide en ángulo recto al haz incidente, para no medir radiación incidente. La emisión que tiene un tiempo de vida más corto se denomina fluorescencia, mientras que la luminiscencia que permanece por más tiempo se llama fosforescencia.

Todas las moléculas absorbentes tienen potencial para ser fluorescente; pero muchos compuestos no lo hacen porque su estructura permite otros mecanismos de relajación sin radiación que ocurren con mayor rapidez que la emisión de fluorescencia²⁹.

1.9.2 Fluorescencia de proteínas Las proteínas por poseer estructuras aromáticas tienen emisión de fluorescencia molecular, los principales aminoácidos que contribuyen a esta emisión son el triptófano y la tirosina. Además, las proteínas tienen la capacidad de formar enlaces covalentes con colorantes fluorescentes intensificando la emisión de fluorescencia del colorante. Estos enlaces se pueden dar a través del grupo ϵ -amino de la lisina, el grupo α -amino del extremo N-terminal, o el grupo tiol de la cisteína, sirviendo de ayuda para caracterizar intermediarios de plegamiento, medir la hidrofobicidad de superficie, y detectar la fibrilación o agregación. Los principales mecanismos que explican las propiedades de fluorescencia de muchos tintes extrínsecos, están vinculados a los procesos de relajación y las reacciones intramoleculares de transferencia de carga, que se ven afectados por el ambiente y por las interacciones de los colorantes con las proteínas.

Los mecanismos comunes que rigen las propiedades de fluorescencia de tintes extrínsecos son: la transferencia de carga intramolecular (ICT), y la transferencia de carga molecular trenzada (TICT). En ICT y TICT, un electrón es transferido desde un grupo donador de electrones (por ejemplo grupo amino) a un grupo aceptor de electrones (por ejemplo sistema aromático) en la excitación del colorante. Para TICT un cambio en la conformación del colorante, por ejemplo, la rotación o giro, es un requisito previo para que tenga lugar la transferencia de electrones³⁰.

La Tioflavina T es utilizada como colorante para teñir depósitos de proteínas amiloide en los tejidos y para la cuantificación de las fibrillas amiloides in vitro. En

presencia de amiloides, la Tioflavina T exhibe un pico de absorción adicional y se convierte en una molécula altamente fluorescente. Se ha propuesto que la tioflavina T interactúa con estructuras de hojas β a lo largo del eje paralelo de las fibras, ya que estos son un elemento estructural predominante en fibrillas amiloides³¹. Generalmente la afinidad decrece con el pH, probablemente por la repulsión electrostática por debajo del punto isoeléctrico de la proteína, sin embargo, a un pH superior a 7.2 la tioflavina T pierde las propiedades fluorescentes adquiridas al interactuar con las fibrillas³².

1.9.3 Microscopía de fuerza atómica (AFM). La microscopia de fuerza atómica AFM funciona cuando la superficie de una muestra interacciona con una punta muy aguda, de un par de micras de largo y menos de 100 Å de diámetro. La punta se localiza al final del brazo de un cantilever de 100 a 200 micras de largo. La muestra se analiza a continuación debajo de la punta, la fuerza entre la punta y la superficie de la muestra hace que el cantilever se doble o flexione, estas deformaciones se registran y procesan mediante un software de imagen y la imagen resultante es una representación topográfica de la muestra que acaba de ser fotografiada. Varias son las fuerzas que contribuyen a la flexión del cantilever, siendo la más común la fuerza de van der Waals. Es por ello que la microscopia de fuerza atómica puede medir un número de propiedades características de la muestra que otras formas de microscopía no pueden³³.

Las mediciones por microscopia de fuerza atómica (AFM) pueden aportar nuevos conocimientos en la topografía de fibras amiloides durante el proceso de formación, ayudando a la comprensión de este tipo de enfermedades. La AFM es un método adecuado para la formación de imágenes de amiloides porque ofrece la posibilidad de visualizar toda la gama de estructuras presentes en diferentes momentos de la polimerización, en contraste con las otras técnicas que se utilizan para caracterizar³⁴.

La AFM permite tomar imágenes de diferentes modos, entre esos, el modo de no contacto (NC-AFM). En esta técnica, se excita el cantilever cerca de su frecuencia de resonancia de modo que vibre cerca de la superficie de la muestra, a una distancia comprendida entre 10 y 100 Å. De esta manera, se conserva intacta la superficie de la muestra ya que la fuerza que ejerce la punta sobre la muestra es muy baja. Las ventajas de la microscopia de NC-AFM es que no existen modificaciones ni contaminaciones de la superficie de la muestra, sin embargo, para obtener una buena resolución se requiere que la punta se sitúe muy cerca de la superficie y el barrido debe ser muy lento para no perder el “contacto” con la superficie; la oscilación de la punta se puede ver frenada por la existencia de capas de agua/contaminación; las gotas de agua se confunden con la topografía de la muestra³⁵.

1.9.4 DLS (dynamic light scattering). Esta técnica es uno de los métodos más populares utilizados para determinar el tamaño de las partículas. Un haz de luz monocromática, tal como un láser, en una solución con partículas esféricas en movimiento browniano provoca un efecto Doppler cuando la luz incide en la partícula en movimiento, cambiando la longitud de onda de la luz entrante. Este cambio está relacionado con el tamaño de la partícula. Es posible calcular la distribución del tamaño de la esfera y dar una descripción del movimiento de la partícula en el medio, midiendo el coeficiente de difusión de la partícula y el uso de la función de autocorrelación³⁶.

Aunque la dispersión dinámica es, en principio, capaz de distinguir si una proteína es un monómero o dímero, es mucho menos precisa para distinguir oligómeros pequeños o velocidad de sedimentación. La ventaja de usar la dispersión dinámica es la posibilidad de analizar muestras que contienen distribuciones amplias de especies de muy diferentes masas moleculares (por ejemplo, una proteína nativa y diversos tamaños de agregados), y para detectar cantidades muy pequeñas de las especies de mayor masa molecular³⁷.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar la formación y el efecto de fármacos antiinflamatorios no esteroidales y de nanopartículas metálicas sobre la síntesis de insulina amiloide *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Encontrar el método más efectivo de formación de insulina amiloide *in vitro* variando las condiciones de pH, temperatura y concentración de la proteína.

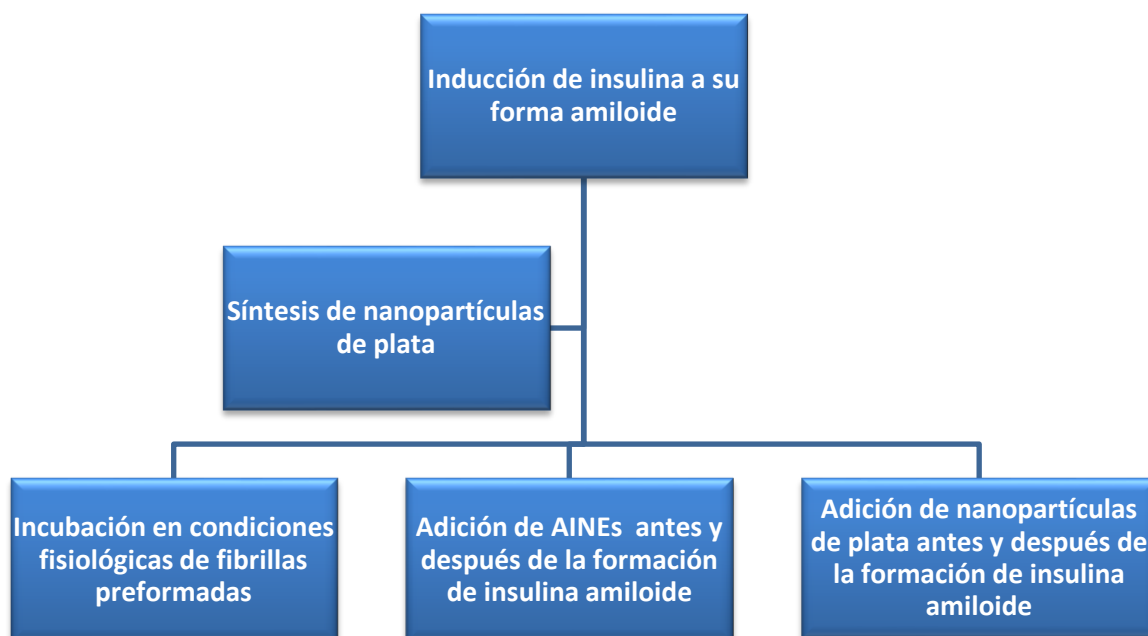
Analizar el comportamiento de las fibrillas de insulina preformadas en condiciones fisiológicas de pH y temperatura.

Estudiar el efecto de la adición de fármacos antiinflamatorios no esteroidales antes y después de inducir la agregación de la insulina.

Describir el efecto de la adición de nanopartícula antes y después de la formación de insulina amiloide, sobre el comportamiento de formación de las fibras amiloides

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 4. Esquema de la metodología experimental



3.1 REACTIVOS

Insulina humana recombinante (Sigma-Aldrich, $\geq 95\%$), Tioflavina T (Sigma-Aldrich, ThT, 75 %), ácido clorhídrico (HCl, J.T. Baker, 36-38 %), ácido sulfúrico (H₂SO₄, Merck, 95-97%), nitrato de plata (AgNO₃, 99.998%), bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB, 99%), polivinil alcohol (PVA, 99+%), L-cisteína (C₃H₇NO₂S, >99%), aspirina (Bayer, presentación 0.5 g), diclofenaco (laboratorio american generics, presentación capsula 10 mg) , naproxeno (laboratorio Mk,

presentación 500 mg), ibuprofeno (laboratorio Genfar, presentación 800 mg) y paracetamol(laboratorio Mk, presentación 500 mg).

3.2 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.2.1 Formación de insulina amiloide. La inducción de insulina a fibras amiloides se realizó bajo condiciones ácidas y temperatura elevada. Fue necesario ensayar diferentes metodologías con el fin de escoger las condiciones apropiadas que favorecieran el uso de fármacos antiinflamatorios no esteroidales (AINEs). Estas condiciones se describen a continuación:

3.2.1.1 Metodología 1 de Formación de Insulina Amiloide. La insulina fue disuelta en una solución de HCl, 50 mM (pH 1.3), a una concentración de proteína de 0.1 mg/ml (17 μ M). La solución de proteína fue distribuida en tubos eppendorff, cada uno con un volumen de 1.5ml de solución para su posterior incubación a 65 °C. Las muestras fueron incubadas a diferentes intervalos de tiempo para analizar la cinética de crecimiento de formación de fibras amiloides mediante espectroscopia de fluorescencia. Las muestras de proteínas se incubaron durante: 0, 3, 6, 12, 20, 24, 48, 72 y 96 horas.

3.2.1.2 Metodología 2 de Formación de Insulina Amiloide. La concentración de insulina en solución fue 0.3mg/ml (52 μ M), disuelta en una solución de H₂SO₄, 25 mM (pH 1.6). Las soluciones fueron distribuidas e incubadas en tubos eppendorff con volumen de 1.5ml a 65°C, a los siguientes tiempos de incubación: 0, 1, 3, 6, 8, 10, 12,18, 24 y 30 horas.

3.2.1.3 Metodología 3 de Formación de Insulina Amiloide. Se preparó una solución de insulina en HCl 25mM (pH 1.6) a una concentración de proteína de 1mg/ml (172 μ M) e incubada a 75°C a diferentes tiempos.. Las muestras fueron

distribuidas e incubadas en tubos eppendorf con capacidad de 1.5 ml durante: 0, 1, 2,3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 y 12 horas.

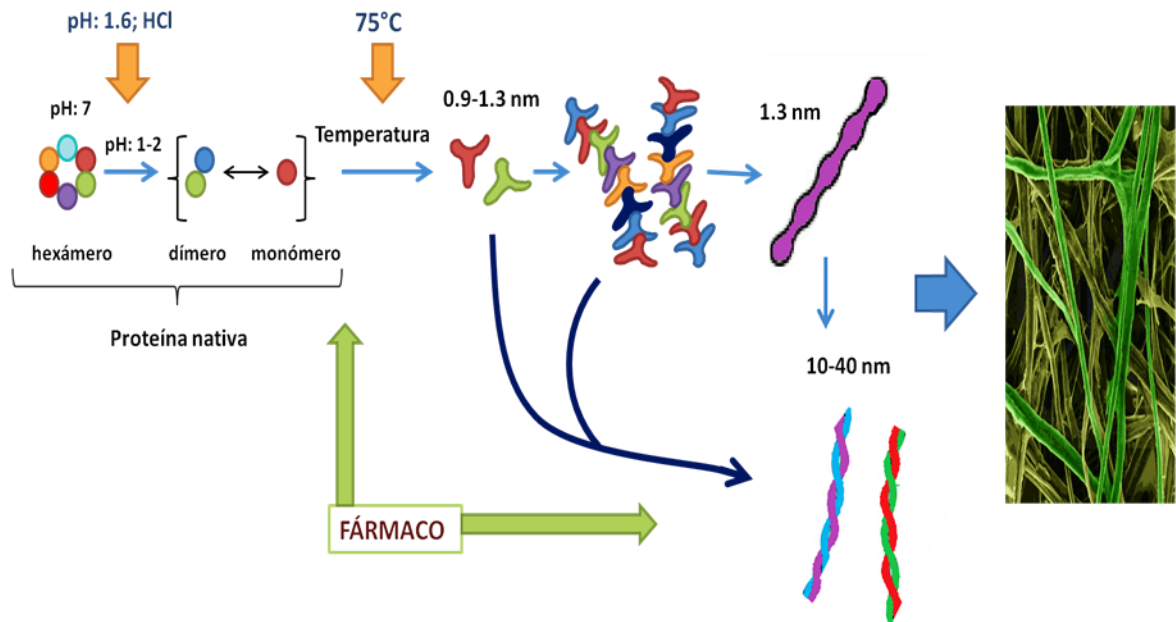
3.2.3 Incubación en condiciones fisiológicas de especies preformadas. La insulina se disolvió en una solución de HCl 25 mM (pH 1.6) con una concentración final de 1mg/ml. A continuación, se incubó a 75 °C como se establece en la metodología 3. Las soluciones de insulina después de ser retiradas del baño termostataado se neutralizaron con una solución de NaOH (1M) y luego fueron incubadas a 37 °C durante 10 horas. En este caso todas las soluciones preincubadas permanecieron durante 10 horas a 37 °C.

3.2.4 Uso de fármaco antiinflamatorios no esteroideos. Los fármacos utilizados para analizar el efecto que ejercen sobre el proceso de formación de insulina amiloide fueron: aspirina, diclofenaco, naproxeno, ibuprofeno y paracetamol. Los AINEs fueron disueltos en dimetil sulfóxido (DMSO) teniendo en cuenta la baja solubilidad de estos en soluciones acuosas ácidas.

La insulina fue disuelta en solución de HCl 25mM (pH 1.6) siguiendo todos los parámetros de la metodología 3. En los ensayos para cada fármaco se compararon tres grupos (figura 5):

- Grupo de control: Este contiene insulina disuelta en solución HCl 25mM y DMSO en concentración de 1 %(v/v).
- Preincubación de la solución de Insulina-fármaco: en estos ensayos a la solución de insulina se adiciono una solución DMSO-fármaco antes de inducir la formación de agregados amiloides (en concentraciones indicadas de fármaco);
- Post-incubación de la solución Insulina-fármaco: en estos ensayos, se añadió a la solución de insulina una solución con fármaco disuelto en DMSO una vez se produjo la formación de agregados amiloides;

Figura 5. Ilustración de la inducción de la formación de agregados amiloides a partir de insulina



La concentración de DMSO en todos los ensayos realizados fue 1 %(v/v), tanto de las muestras que contenían fármaco como las de control, por tanto, los resultados a nivel comparativo no se ven afectados por la presencia de este reactivo. Es importante mencionar que el DMSO no interfiere en la agregación de proteínas en concentraciones inferiores al 10%(v/v)³⁸. La concentración final de fármaco en la solución de proteína para la aspirina, el diclofenaco, el naproxeno, el ibuprofeno y el paracetamol, fueron 1.39 mM, 66.81 μ M, 479 μ M, 340 μ M y 3.96 mM, respectivamente.

3.2.5 Síntesis de nanopartículas de plata. Se llevó a cabo mediante reducción por cisteína en presencia de CTAB. Para ello se prepararon soluciones de CTAB 0.01 M y de cisteína 0.01 M. A esta solución se añadió nitrato de plata AgNO_3 hasta alcanzar una concentración de 0.01 M. Finalmente, esta solución se completó a un volumen final de 20 ml con una solución de PVA 3.3 mM. Esta solución fue sometida a ultrasonido durante 4 horas para la síntesis de

nanopartículas de plata. La muestra fue almacenada en un recipiente transparente hasta que la misma adquirió una coloración vinotinto. La síntesis de nanopartícula de plata en cisteína fue estandarizada en el laboratorio de bioquímica y microbiología (GIBIM)³⁹.

3.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

Determinación de especies amiloides mediante espectroscopia de fluorescencia
Las medidas de fluorescencia fueron realizadas utilizando ThT (tioflavina T). Se tomaron 750 µl de las soluciones de insulina incubadas bajo diferentes condiciones para la formación de proteína amiloide, y se llevaron a un volumen final de 2ml completando con agua destilada. Posteriormente, se añadió ThT hasta alcanzar una concentración final de 40 µM. A esta solución se tomó un espectro de fluorescencia en un espectrofluorímetro y luminómetro modular PTI Quantmaster QM-2000-6SE, trabajando a una longitud de onda de excitación de 450 nm y emisión de 485 nm⁴⁰.

3.3.1 Determinación de morfología de especies amiloides mediante microscopia de fuerza atómica. Las muestras almacenadas en tubos eppendorf fueron centrifugadas durante 5 minutos a 5000 rpm, descartando el sobrenadante y conservando el pellet, el cual se resuspendió en agua tipo I, y redisolvió por agitación con vortex. De esta suspensión se tomaron 5 µl de muestra, la cual fue dispuesta sobre una mica de moscovita, la muestra se secó con ayuda de una corriente de nitrógeno. Inmediatamente después se adicionó agua tipo I sobre la superficie de la mica con el fin de eliminar residuos de proteína nativa que pudieran quedar en la superficie e interferir con las imágenes. La superficie se secó nuevamente utilizando un flujo de nitrógeno. Las imágenes de las proteínas amiloide fueron captadas en un microscopio de fuerza atómica, marca veeco, di

CP-II y realizadas en modo NC-AFM, con una frecuencia de resonancia de aproximadamente 320 kHz⁴¹.

3.3.2 Cuantificación de tamaño hidrodinámico de las fibras por DLS. Las medidas de tamaño de las fibras por DLS fueron realizadas a partir de las soluciones incubadas a diferentes intervalos de tiempo, de cada una de estas soluciones se tomaron 250 μl y se llevaron a un volumen final de 500 μl , los análisis fueron realizados en el equipo Zetasizer Nano ZS90, a temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$.

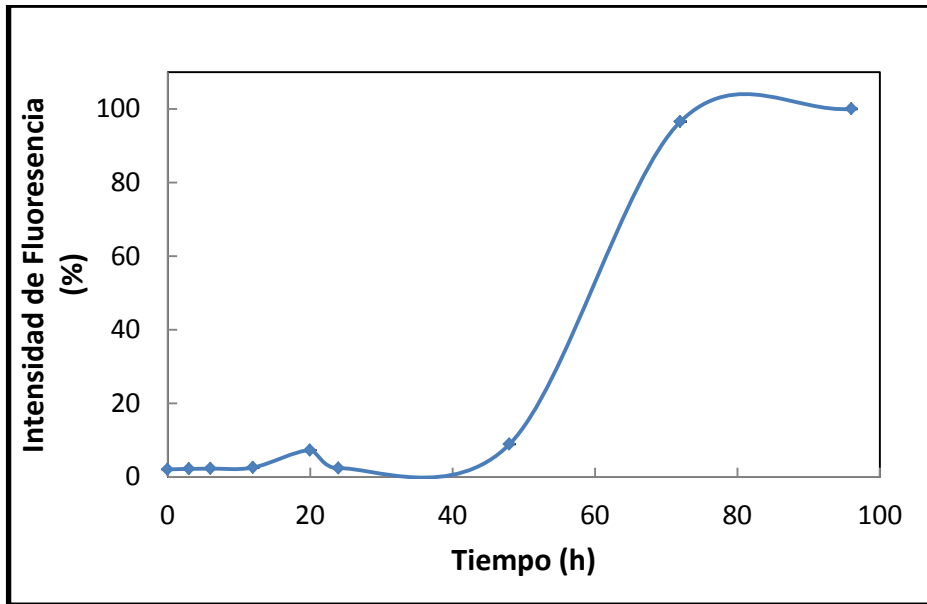
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 FORMACIÓN DE INSULINA AMILOIDE

Primero que todo, se llevó a cabo la formación de proteínas amiloides bajo diferentes condiciones de pH, concentración de proteína y temperatura, buscando obtener una cinética de crecimiento sigmoideal. Además, se esperaba encontrar condiciones de formación de las proteínas amiloides con bajas cantidades de proteína y tiempos de reacción no mayores de 24 h. Esto se desarrolló con el objeto de evaluar el efecto de AINEs sobre la formación de proteínas amiloides de insulina.

4.1.1 Metodología 1 de Formación de Insulina Amiloide. Mediante espectroscopia de fluorescencia se evaluó la formación de insulina amiloide a diferentes tiempos. En estas experiencias se obtuvo la cinética de crecimiento de la insulina amiloide, obteniendo una curva sigmoideal característica de este proceso (Figura 6). El tiempo total de reacción fue de 96 horas y el crecimiento de las fibras amiloides solo se dio después de 48 horas. Esta cantidad de tiempo podría favorecer la morfología de los agregados, ya que la etapa de nucleación es lenta, lo que permite una mayor organización en la estructura de las fibras⁴². Sin embargo, algunos AINEs se descomponen fácilmente por degradación térmica en condiciones ácidas, situación que hace necesario que se asegure la formación de las fibras en menos de 24 horas. Además de los agregados amiloides, se ha descrito que la temperatura permite la formación de productos resultantes de la degradación de algunos fármacos, los cuales pueden llegar a interferir en las mediciones de fluorescencia⁴³. De esta manera, se intentó reducir el tiempo de reacción modificando las condiciones de formación de las fibras amiloides de insulina.

Figura 6. Cinética de formación de insulina amiloide medido como incremento de fluorescencia del complejo insulina amiloide-ThT



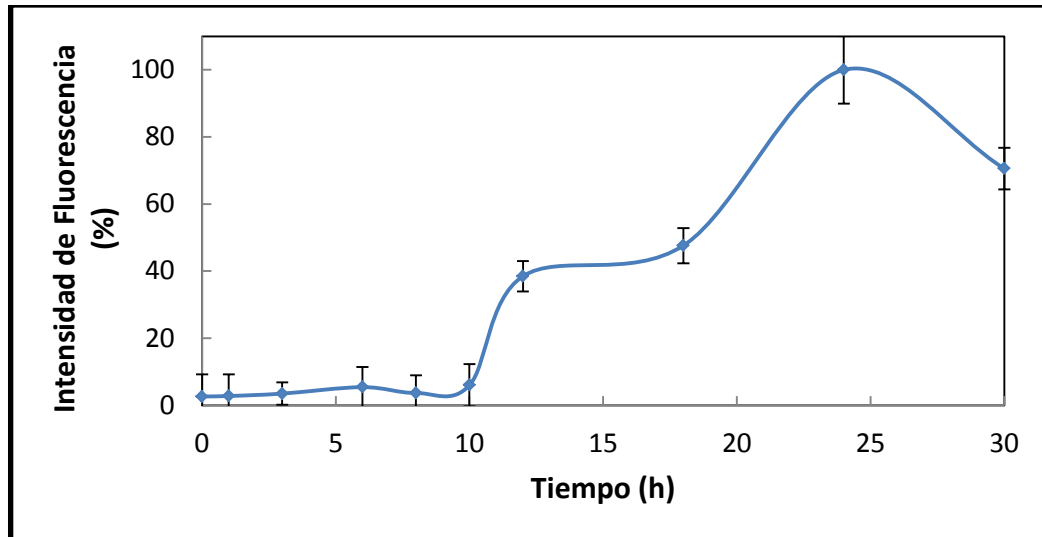
Condiciones de Formación de las Fibras Amiloides: Concentración 0.1 mg/ml de insulina, temperatura de incubación 65°C, pH 1.3 en solución HCl

4.1.2 Metodología 2 de Formación de Insulina Amiloide. En este caso, se utilizó ácido sulfúrico y aumentó la concentración de insulina. Los datos obtenidos reflejan una reducción del tiempo de reacción a 36 horas para la formación de las fibras (figura 7). No obstante, este tiempo de reacción sigue siendo muy extendido para garantizar que las condiciones del medio no lleven a una degradación térmica de algunos fármacos.

En este proceso de formación de insulina amiloide, se obtuvo una cinética no sigmoide. Los cambios en la curva de la cinética podrían explicarse porque el uso de ácido sulfúrico aporta iones sulfato, que podrían interactuar con el monómero de insulina al neutralizar las cargas del mismo. A un pH bajo, los monómeros de insulina tienen una carga neta positiva de +6. Debido a que los iones sulfato son más grandes que los iones cloruro, generados por la disociación de HCl, es

posible que se genere un mayor impedimento en la flexibilidad de la molécula, interfiriendo en el proceso de fibrilación. No obstante, es poco significativa la inhibición de la formación de las fibras.

Figura 7. Cinética de formación de insulina amiloide medido como incremento de fluorescencia del complejo insulina amiloide-ThT.

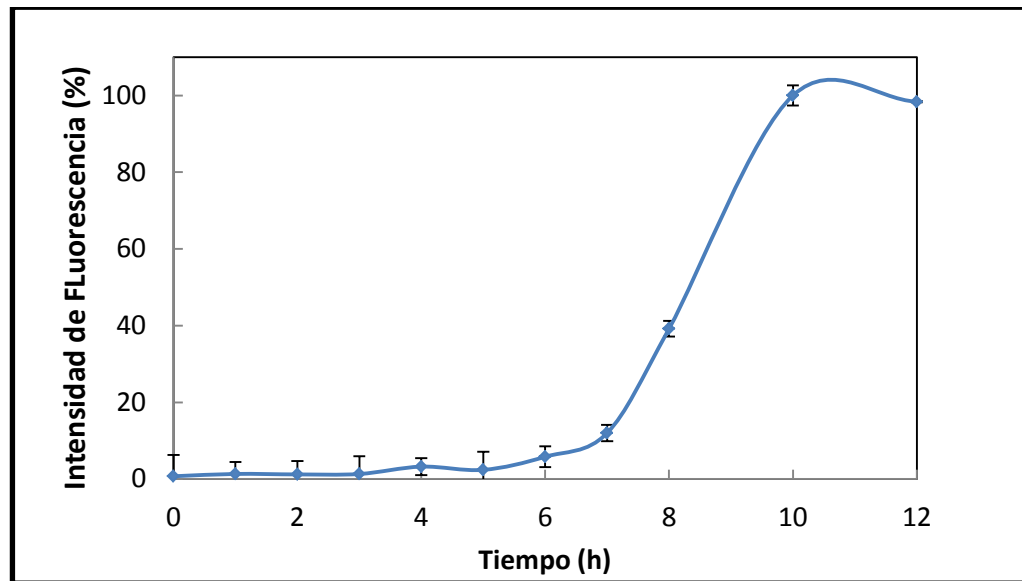


Condiciones de formación de las fibras: Concentración 0.3 mg/ml de insulina, temperatura de incubación 65°C, pH 1.6 en solución H₂SO₄

La cinética de crecimiento de la insulina amiloide mostró una disminución de fluorescencia en la muestra sometida a 30 horas de incubación. La última etapa del proceso de agregación corresponde a la maduración de los agregados y formación de estructuras más rígidas. Esta etapa finaliza cuando se agota la proteína soluble en el medio, lo cual provoca la detención de la reacción de formación de insulina amiloide. Sin embargo, si las muestras siguen sometidas a altas temperaturas, se puede producir la agrupación de los agregados, formando complejos amiloideos, de tal manera que cuando el colorante ThT interactúa con los complejos proteicos, éste es secuestrado por el complejo impidiendo la correcta medición de sus propiedades fluorescentes⁴⁴.

4.1.3 Metodología 3 de Formación de Insulina Amiloide. La principal modificación realizada en esta metodología fue el aumento en la concentración de proteína y temperatura, lo que reduce significativamente el tiempo de formación de los agregados. Además, en la última etapa de la reacción, la curva se hace asintótica, lo que asegura que la proteína soluble presente en el medio se consuma casi por completo (figura 8a). El tiempo necesario para que el proceso se lleve a cabo son 12 horas, siendo una ventaja para el uso de los AINEs, ya que la degradación térmica de los fármacos es poco significativa en este tiempo de reacción. Haciendo uso de las condiciones plateadas para la metodología 3, se logró que la reacción fuera rápida, que la proteína se consumiera casi por completo, y que la cinética obtenida fuera sigmoideal. Por estas razones, todos los ensayos se realizaron siguiendo las condiciones propuestas en la metodología 3. El aumento de temperatura redujo el tiempo de reacción principalmente porque al aumentar la energía del medio, el cambio de conformación de los monómeros se hizo más rápido, y por lo tanto, la etapa de nucleación que es la determinante en el proceso ocurre a mayor velocidad. El aumento de la concentración de proteína favorece termodinámicamente el proceso, teniendo en cuenta que la cantidad de monómeros predispuesto al cambio es mayor⁴⁵.

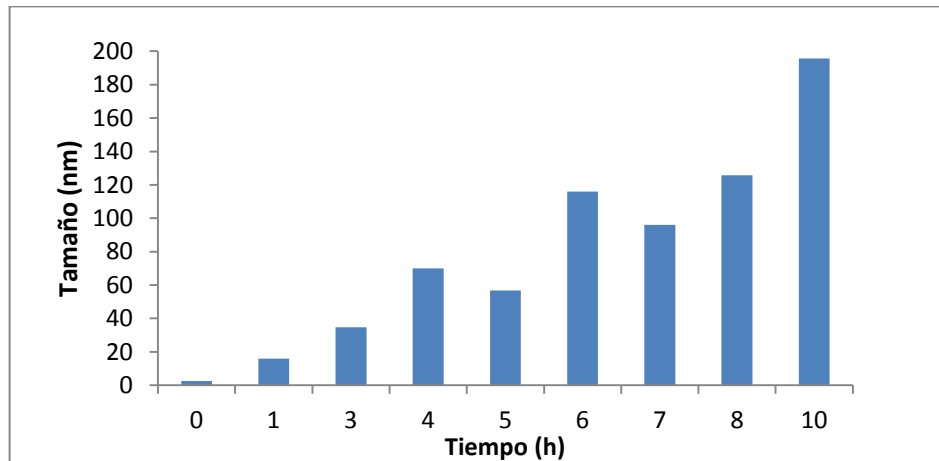
Figura 8. Cinética de formación de insulina amiloide medido como incremento de fluorescencia del complejo insulina amiloide-ThT



Condiciones de formación de las fibras: Concentración 1 mg/ml de insulina, temperatura de incubación: 75°C, pH 1.6 en solución HCl.

El tamaño de las especies proteicas durante el proceso de fibrilación fue medido utilizando la técnica de DLS (figura 8b). Mediante estos experimentos se demostró el aumento de tamaño molecular de la insulina a medida que aumentaba el tiempo de reacción, lo que sugiere la formación de los agregados proteicos de alta masa molecular a través del tiempo.

Figura 9. Distribución de tamaño de insulina amiloide a diferentes tiempos incubación. Concentración 1 mg/ml de insulina, temperatura de incubación: 75°C, pH 1.6 en solución HCl.



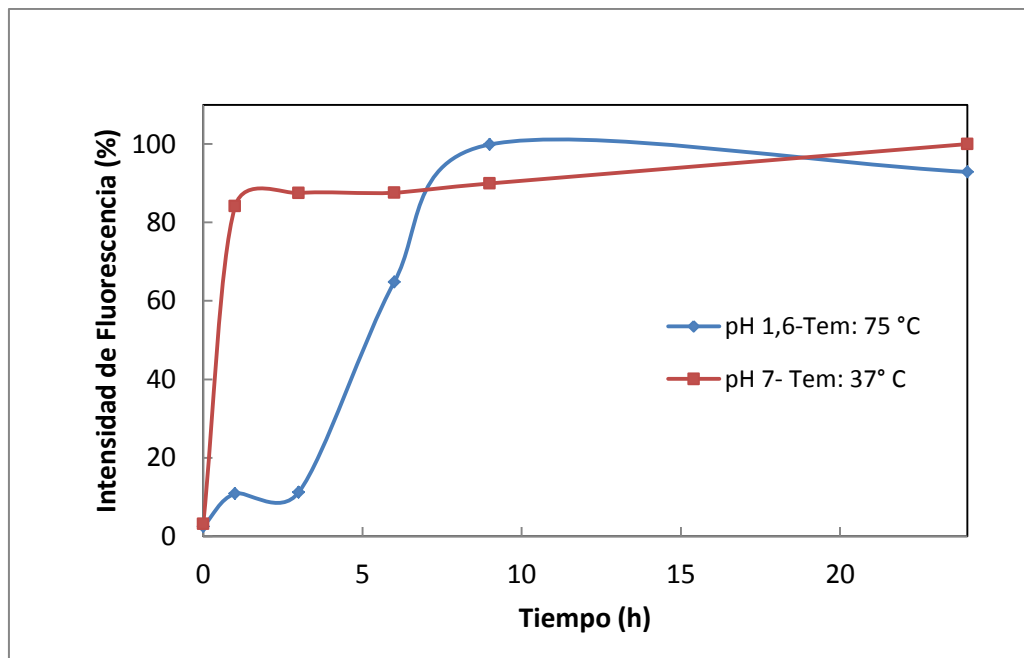
4.2 INCUBACIÓN EN CONDICIONES FISIOLÓGICAS DE ESPECIES PREFORMADAS

Los resultados obtenidos muestran que las soluciones sometidas a 75°C bajo un pH de 1.6 siguen una cinética sigmoide (figura 9). En la gráfica se comparan dos cinéticas de crecimiento, la serie “pH 1,6-Tem: 75 °C”, en la cual las soluciones fueron sometidas a las condiciones de reacción propuestas en la metodología 3, y la serie “pH 7- Tem: 37° C”, en el que a partir de los ensayos de la primera serie, se neutralizaron las muestras con una solución de hidróxido de sodio 1M y se calentaron a 37 °C durante 10 horas. En la serie “pH 7- Tem: 37° C”, todas las soluciones incubadas con agregados preformados obtienen un máximo de intensidad después de ser sometidas a 10 horas de incubación, lo que permite inferir que una vez que se inicia la etapa de nucleación, el proceso de crecimiento de las especies preformadas ocurre rápidamente sin necesidad de someter las soluciones a condiciones fuertes de reacción. Esto permite que sea menor la

cantidad de energía necesaria para continuar la fibrilación, lo que confirma que la nucleación es la etapa determinante en la formación de agregados amiloides⁴².

Estos resultados demuestran el efecto tóxico de los núcleos, los cuales, una vez formados, facilitan la agregación de insulina en las células β -pancreáticas, lo cual hace difícil detener el proceso de agregación de insulina, con la consecuente acumulación de las placas proteicas sobre estas células⁸.

Figura 10. Cinética de Formación de Agregados Amiloides de Insulina a partir de especies de preformadas medido como incremento de fluorescencia del complejo insulina amiloide-ThT



Condiciones de Formación de insulina amiloide: a pH 1.6 y 75°C (\diamond), Especies preformadas de Insulina para posteriormente ser incubadas a pH 7 y 37° C (\square).

4.3 EFECTO DE FÁRMACOS ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDALES (AINES) SOBRE LA FORMACIÓN DE AGREGADOS DE INSULINA AMILOIDE.

En los ensayos realizados con diclofenaco, naproxeno, ibuprofeno, paracetamol y aspirina se compararon tres grupos:

- Grupo de control, el cual contienen insulina disuelta en solución HCl 25mM y DMSO en concentración de 1 %.
- Preincubación de Insulina-fármaco: en estos ensayos se adicionó a la solución de insulina una solución DMSO-fármaco antes de inducir la formación de agregados amiloides (en concentraciones indicadas de fármaco);
- Post-Incubación de Insulina-fármaco: en estos ensayos se adición a la solución de insulina una solución DMSO-fármaco después de inducir la formación de agregados amiloides.

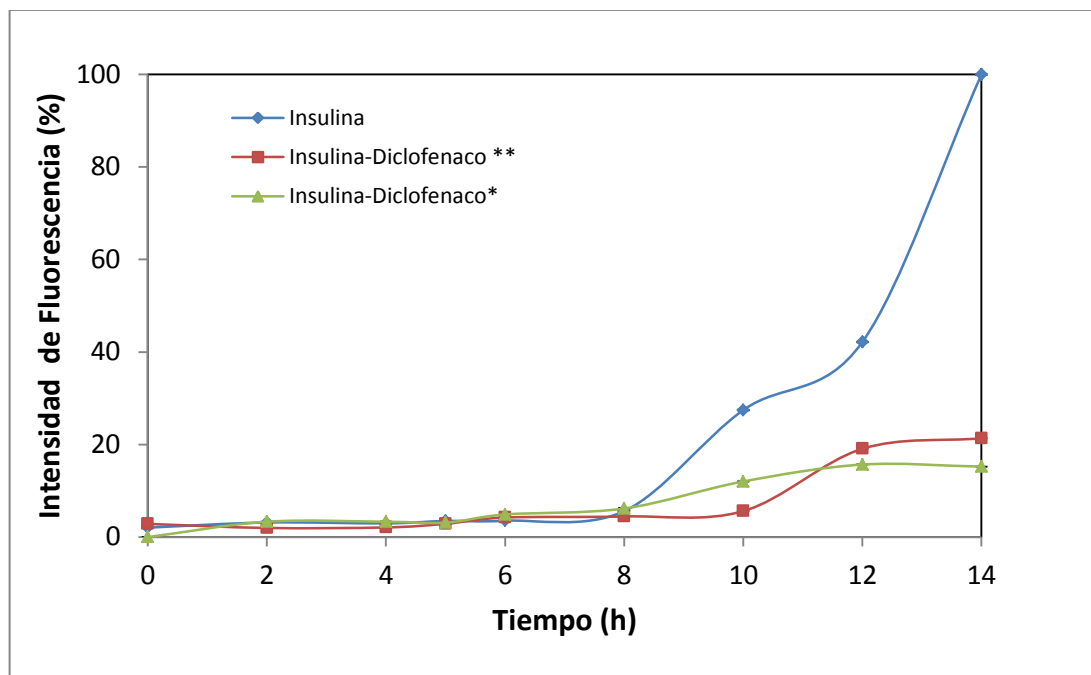
Nota: para simplificar las etiquetas de las gráficas se han adoptado las siguientes convenciones: el grupo de control aparecerá como “insulina”; el grupo Insulina-fármaco preincubacion estará representado por “insulina-fármaco**”; y el grupo Insulina-fármaco posincubacion simbolizado por “insulina-fármaco*”.

4.3.1 Efecto del Diclofenaco. En los ensayos realizados con diclofenaco se compararon dos presentaciones del fármaco adquiridas comercialmente; la primera, el diclofenaco se encuentra en ampolla y, la segunda, el diclofenaco, en forma de cápsula. El diclofenaco en ampolla es ampliamente usado en tratamientos contra el dolor; por esta razón, se decidió realizar ensayos con el mismo. Sin embargo, los otros AINEs ensayados se adquirieron en tableta. Por tal motivo, se hizo necesario usar el diclofenaco en cápsula para lograr una mejor comparación de todos los AINEs.

4.3.1.1 Efecto del Diclofenaco (ampolla). Los resultados obtenidos del proceso de agregación de la insulina en presencia de diclofenaco se presentan en la figura

10. Se observa claramente que los datos de fluorescencia obtenidos para la insulina en presencia de ThT y en ausencia del fármaco son los más intensos en la gráfica. Las especies amiloides del ensayo de control (ya que la fluorescencia con ThT fue mayor) están presentes en mayor medida que en las muestras en las que se adicionó diclofenaco, lo cual sugiere que el fármaco tiene la capacidad de modificar los agregados amiloides e inhibir la agregación de insulina amiloide. Estos resultados fueron corroborados por microscopia de fuerza atómica (AFM). Las imágenes obtenidas (tabla 2) revelan morfologías alargadas y ramificadas para la insulina en ausencia de fármaco y agregados amorfos en las muestras que fueron expuestas al diclofenaco. Vale la pena resaltar que para este ensayo la presentación del fármaco adquirido fue en ampolla, donde el diclofenaco es suspendido en una fase lipofílica.

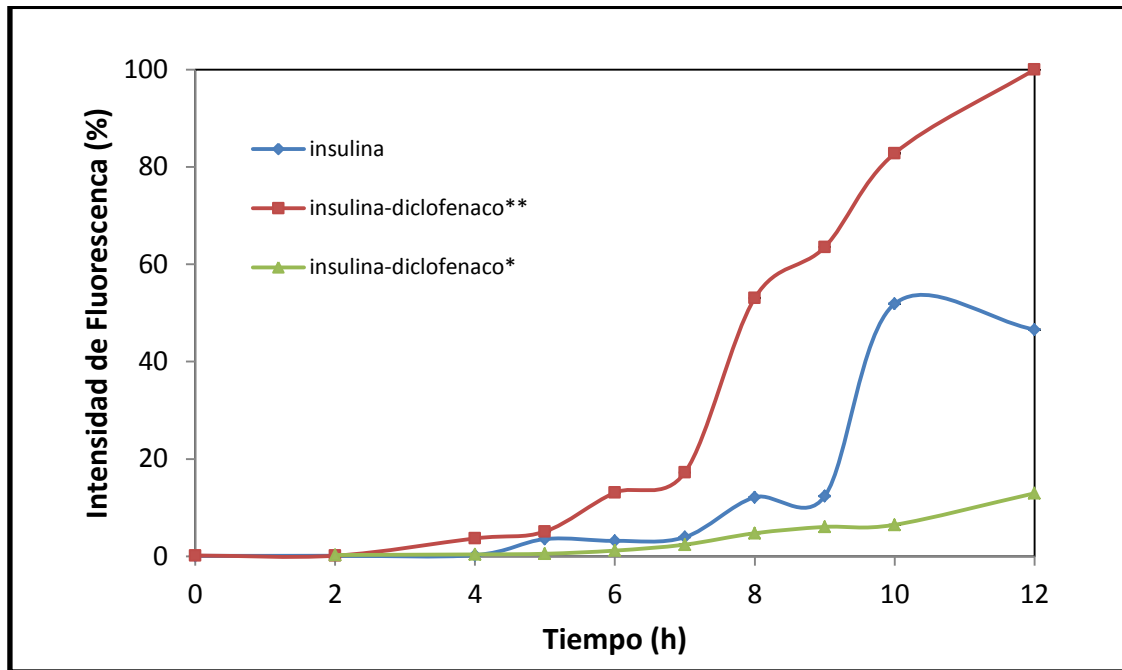
Figura 11. Cinética de Formación de agregados de insulina amiloide en presencia de diclofenaco en ampolla 78.58 μM usando fluorescencia como medida del proceso.



Concentración 1 mg/ml de insulina, temperatura de incubación: 75°C, pH 1.6 en solución HCl.

4.3.2 Efecto del Diclofenaco (cápsula). Se realizó un nuevo ensayo utilizando diclofenaco en cápsula (figura 11). La curva que representa los ensayos en el que se añadió el fármaco después de concluir el proceso de fibrilación (insulina-diclofenaco*), muestra una disminución de fluorescencia coincidiendo con los ensayos en los que se usa la presentación en ampolla. Por otra parte, la curva que muestra el diclofenaco adicionado antes de inducir el proceso de fibrilación (insulina-diclofenaco**), exhibe una mayor intensidad que el ensayo de control, indicando que se forma una mayor cantidad de especies amiloides. Mediante imágenes de AFM se evidencia la presencia de estructuras amiloides en el ensayo de control y el ensayo en que se adicionó el fármaco antes de la incubación (insulina-diclofenaco**), mientras que las muestras a las que se les adicionó el fármaco después de someterlas a calentamiento (insulina-diclofenaco*), se observaron agregados amorfos (Tabla 2).

Figura 12. Cinética de Formación de agregados de insulina amiloide en presencia de diclofenaco en cápsula 66.81 μM usando fluorescencia como medida del proceso.



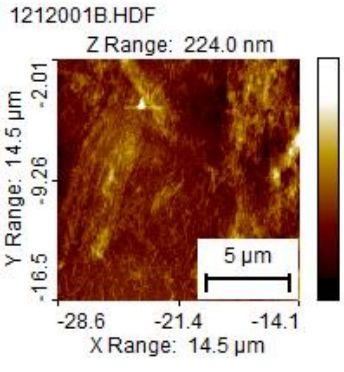
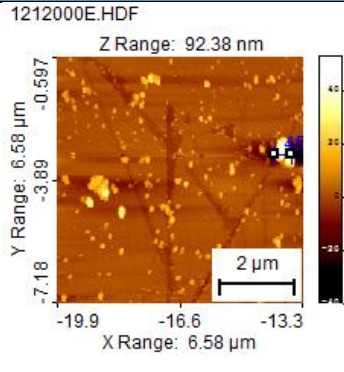
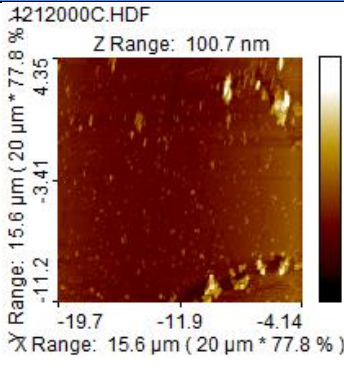
Concentración 1 mg/ml de insulina, temperatura de incubación: 75°C, pH 1.6 en solución HCl.

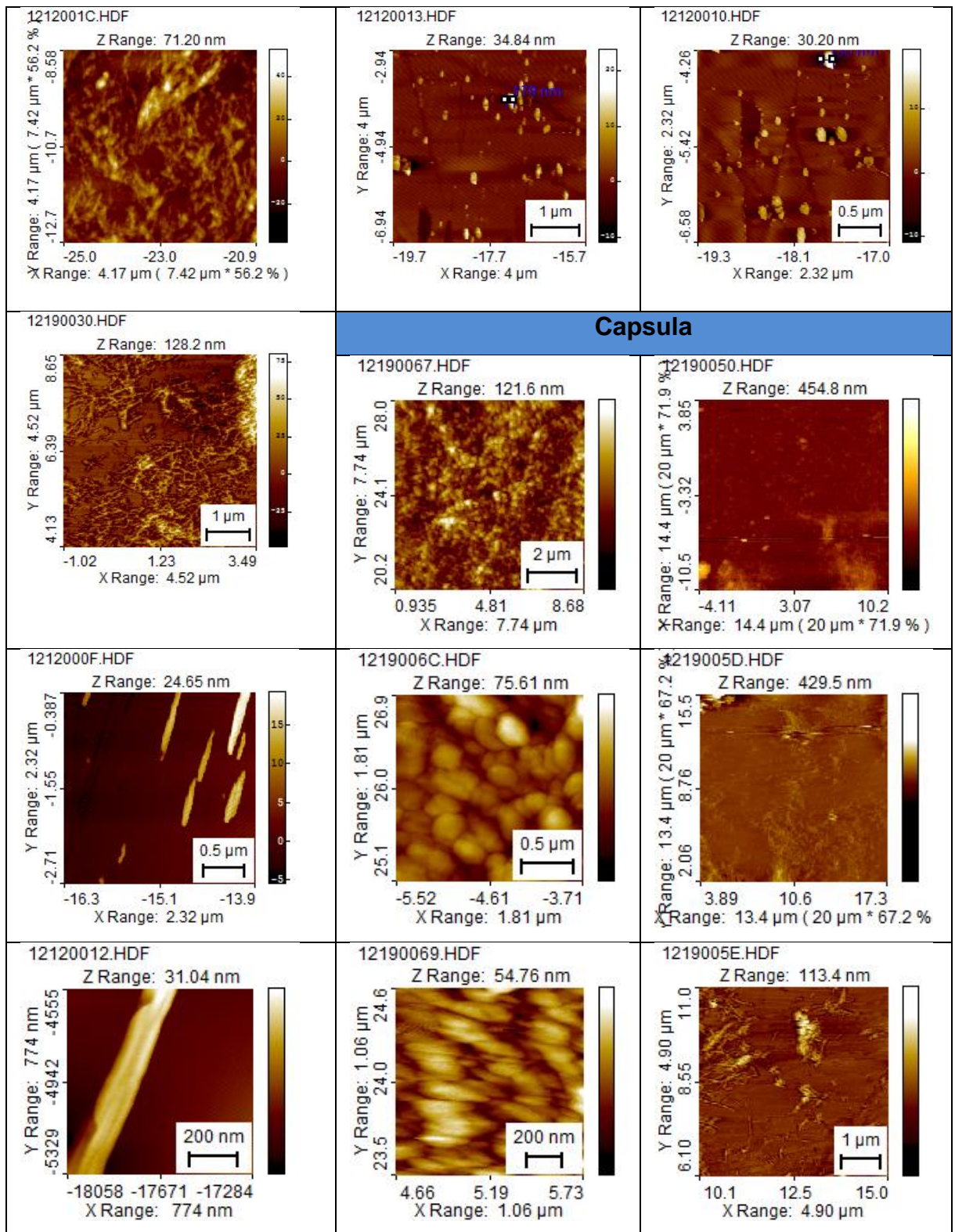
Las curvas que representan el efecto del diclofenaco, adicionado después de la incubación (insulina-diclofenaco*), tanto en ampolla como en cápsula, muestran una disminución significativa de fluorescencia, indicando menor cantidad de amiloides, lo cual fue corroborado por las imágenes de AFM. En la estructura de las fibras amiloides, los aminoácidos hidrofóbicos normalmente quedan expuestos, lo que podría favorecer la afinidad del diclofenaco por estos aminoácidos. Esta interacción sería la responsable del cambio de conformación de las especies ya formadas, lo cual generaría agregados amorfos.

Por otra parte, en los ensayos en el que el fármaco se adicionó antes de inducir la formación de amiloides, existe una marcada diferencia entre diclofenaco en ampolla y el diclofenaco en cápsula. El diclofenaco en ampolla muestra una disminución de la fluorescencia mientras que el diclofenaco en cápsula mostró un aumento en relación al ensayo de control. La diferencia principal entre las dos presentaciones del fármaco es que el diclofenaco en ampolla está suspendido en una solución lipofílica⁴⁶.

Durante la nucleación, que es la etapa clave del proceso de fibrilación, las moléculas de insulina se desdoblaron exponiendo la zona hidrofóbica. Por lo tanto, es probable que la fase lipofílica que acompaña al fármaco interactúe con los monómeros de insulina, lo cual produciría un efecto protector sobre los aminoácidos hidrofóbicos. Por lo tanto, la disminución en la intensidad de la curva no corresponda al efecto del fármaco, si no que al del dispersante del mismo.

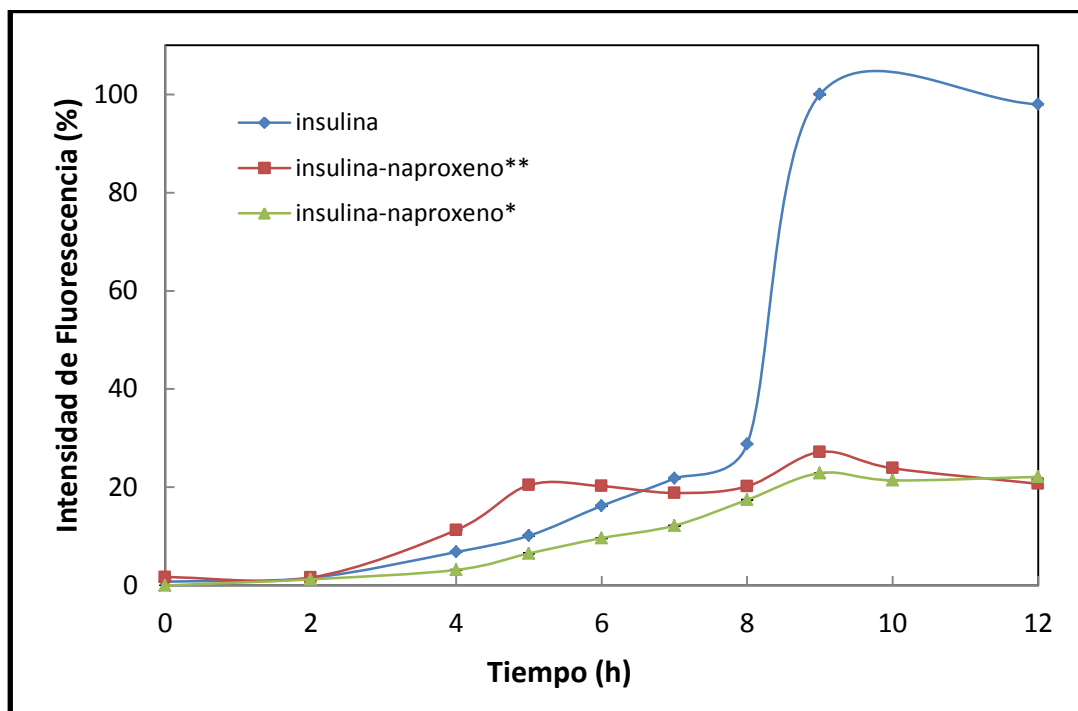
Tabla 2. Imágenes de microscopia de fuerza atómica (AFM) de agregados de insulina amiloide en presencia de diclofenaco. NC-AFM, frecuencia resonancia 320 Khz, soluciones incubadas durante 12 horas.

Insulina	Insulina-Diclofenaco*	Insulina-Diclofenaco**
Ampolla		
 <p>1212001B.HDF Z Range: 224.0 nm Y Range: 14.5 µm X Range: 14.5 µm 5 µm</p>	 <p>1212000E.HDF Z Range: 92.38 nm Y Range: 6.58 µm X Range: 6.58 µm 2 µm</p>	 <p>1212000C.HDF Z Range: 100.7 nm Y Range: 15.6 µm (20 µm * 77.8 %) X Range: 15.6 µm (20 µm * 77.8 %) 4.35 µm</p>



4.3.3 Efecto del Naproxeno sobre la formación de insulina amiloide. En la Figura 12a, se observa la formación de estructuras de tipo hoja- β evidenciada mediante el aumento de fluorescencia del grupo de control. Los ensayos en los que la proteína interactúa con naproxeno, se observa una reducción de la fluorescencia comparados con el grupo de control, lo que indica una menor cantidad de estructuras amiloides por efecto de la presencia de naproxeno en la solución. Para ambos casos se produjo una disminución en la intensidad de fluorescencia de 80% (figura 12a). A su vez, mediante AFM se confirmó el cambio de morfología, obteniendo agregados amorfos en los ensayos que registraron baja intensidad de fluorescencia. (Tabla 4)

Figura 13. Cinética de Formación de agregados de insulina amiloide en presencia de naproxeno 479 μ M usando fluorescencia como medida del proceso.



Concentración 1 mg/ml de insulina, temperatura de incubación: 75°C, pH 1.6 en solución HCl.

Las muestras que fueron incubadas durante 10 horas se examinaron por DLS con el fin de comparar el tamaño de los agregados (Ver figura 12b). En estos experimentos, se encontró que la muestra de control tiene una mayor distribución de tamaño con especies más grandes en comparación a las que se expusieron al fármaco. En la figura 12b, la curva de color rojo representa la distribución de tamaño de la insulina amiloide expuesta a 10 horas de incubación bajo las condiciones de la metodología 3; la curva de color verde corresponde a la insulina incubada en presencia de naproxeno durante 10 horas; y la curva de color azul muestra la distribución de tamaño de la insulina amiloide a la cual se adicionó naproxeno una vez terminó el tiempo de incubación de 10 horas. Estas mediciones de tamaño demuestran que la solución que no interacciona con el fármaco, presenta un mayor diámetro hidrodinámico y una mayor distribución de tamaño de partículas, comparado con los otros ensayos. Esta información muestra que el naproxeno actuaría como inhibidor en la formación de agregados amiloides.

Figura 14. Distribución de tamaño de insulina amiloide en presencia de naproxeno a 10 horas de incubación de: insulina (rojo), insulina-naproxeno (verde), insulina-naproxeno*(azul).**

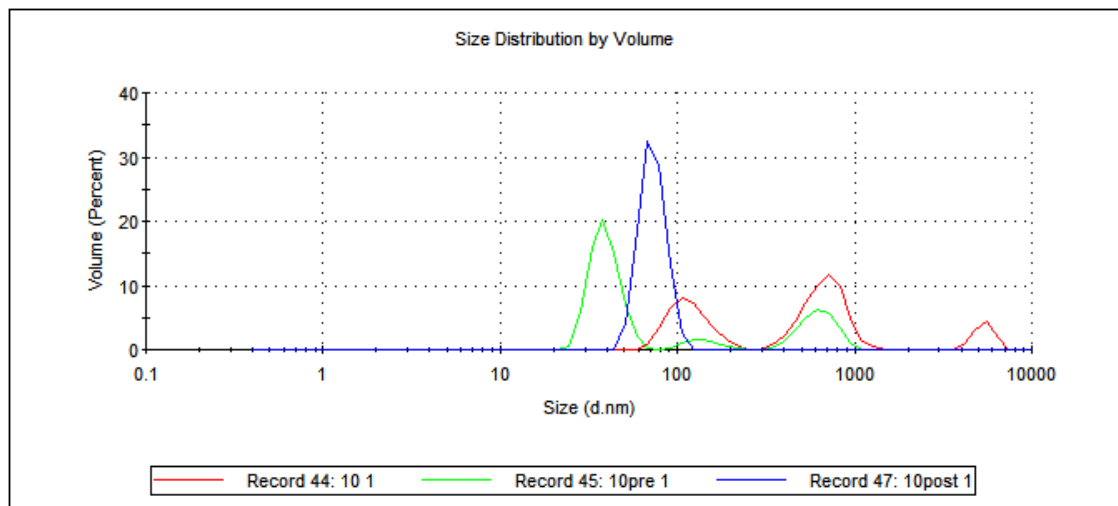
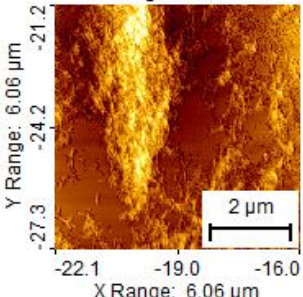
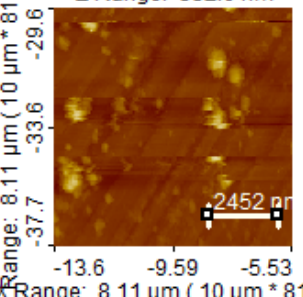
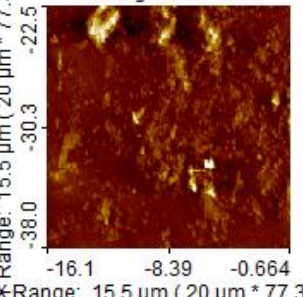
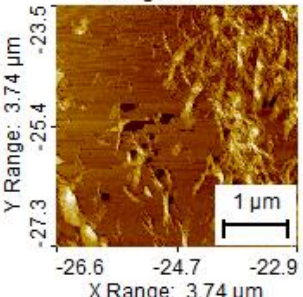
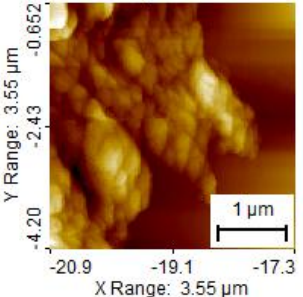
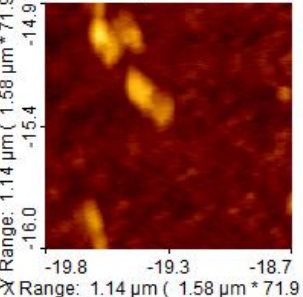
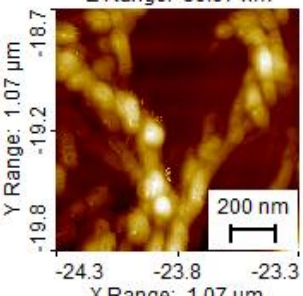
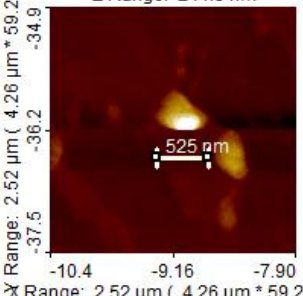
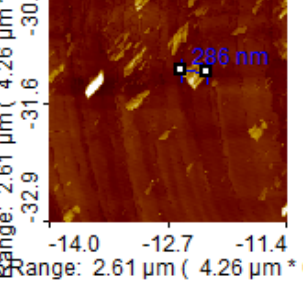
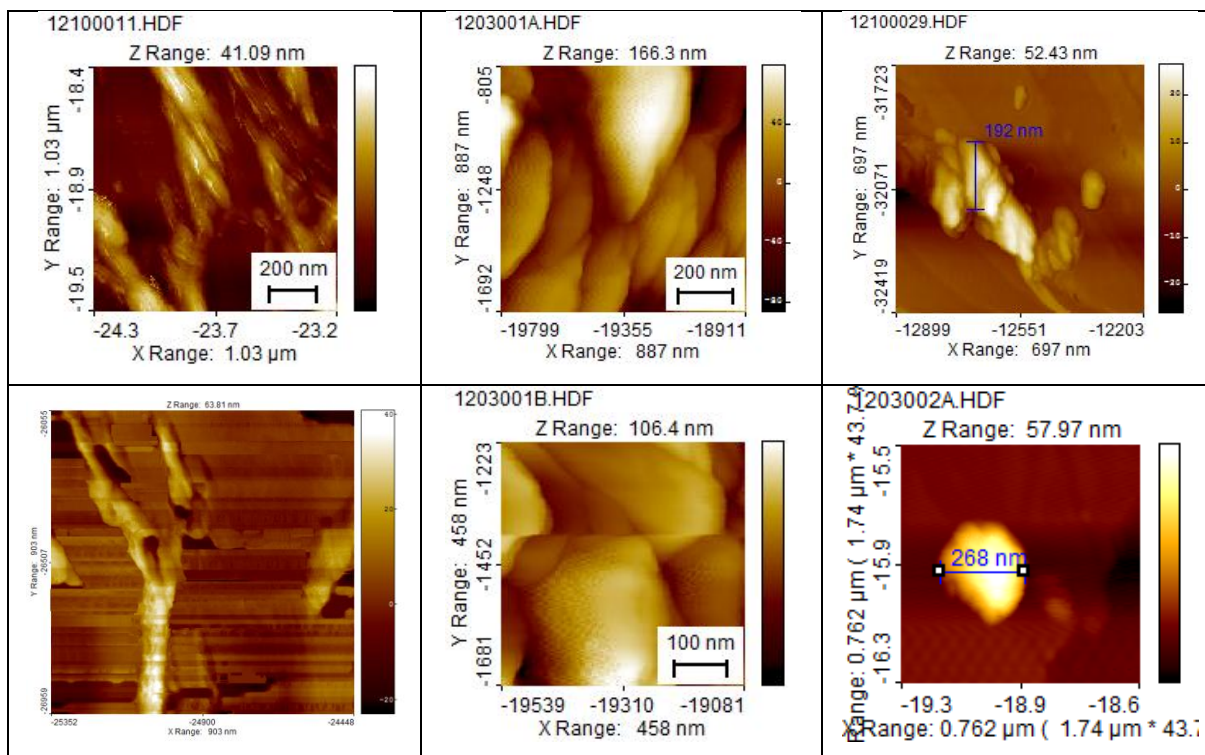


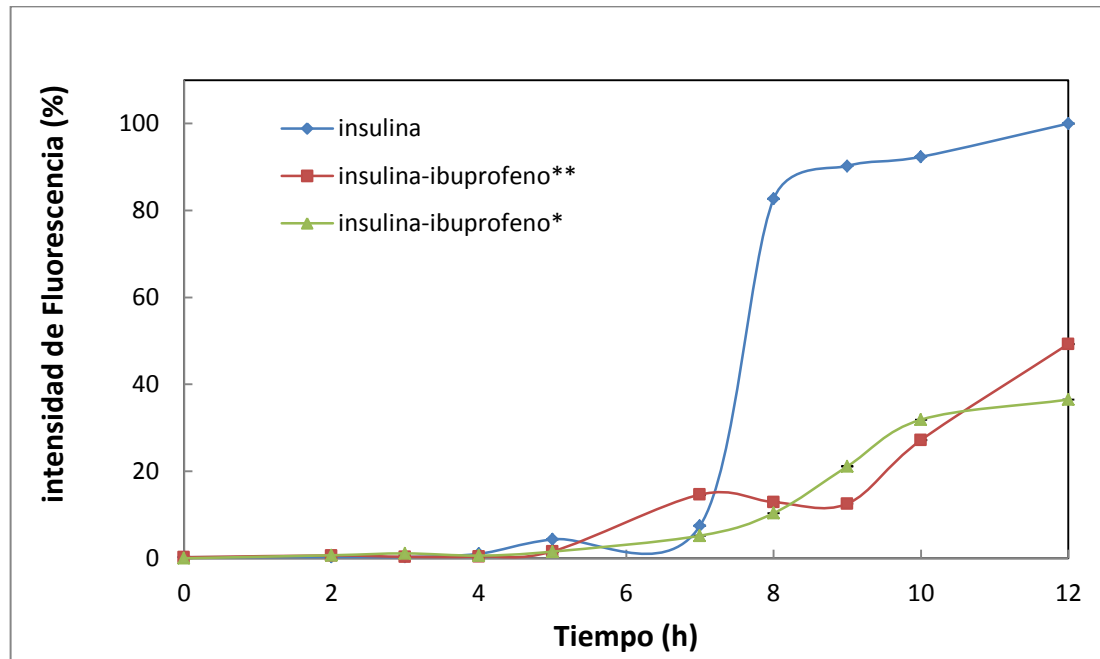
Tabla 3. Imágenes de microscopia de fuerza atómica (AFM) de agregados de insulina amiloide en presencia de naproxeno. NC-AFM, frecuencia resonancia 320 Khz, soluciones incubadas durante 12 horas.

Insulina	Insulina-Naproxeno*	Insulina-Naproxeno**
<p>12100019.HDF Z Range: 120.4 nm</p>  <p>Y Range: 6.06 μm X Range: 6.06 μm</p>	<p>12100033.HDF Z Range: 352.6 nm</p>  <p>Y Range: 8.11 μm (10 μm * 81.1%) X Range: 8.11 μm (10 μm * 81.1%)</p>	<p>12100026.HDF Z Range: 219.4 nm</p>  <p>Y Range: 15.5 μm (20 μm * 77.3%) X Range: 15.5 μm (20 μm * 77.3%)</p>
<p>12100015.HDF Z Range: 67.34 nm</p>  <p>Y Range: 3.74 μm X Range: 3.74 μm</p>	<p>12030019.HDF Z Range: 387.7 nm</p>  <p>Y Range: 3.55 μm X Range: 3.55 μm</p>	<p>12030026.HDF Z Range: 32.18 nm</p>  <p>Y Range: 1.14 μm (1.58 μm * 71.9%) X Range: 1.14 μm (1.58 μm * 71.9%)</p>
<p>12100012.HDF Z Range: 39.97 nm</p>  <p>Y Range: 1.07 μm X Range: 1.07 μm</p>	<p>1210002E.HDF Z Range: 241.5 nm</p>  <p>Y Range: 2.52 μm (4.26 μm * 59.2%) X Range: 2.52 μm (4.26 μm * 59.2%)</p>	<p>12100024.HDF Z Range: 52.27 nm</p>  <p>Y Range: 2.61 μm (4.26 μm * 61.3%) X Range: 2.61 μm (4.26 μm * 61.3%)</p>



4.3.4 Efecto del Ibuprofeno sobre la formación de insulina amiloide La cinética de agregación de insulina amiloide en presencia de ibuprofeno muestra el efecto inhibitorio del fármaco en este proceso. Se logra también evidenciar la disminución de fluorescencia sobre especies ya formadas que interactuaron con el ibuprofeno. La disminución de fluorescencia de la insulina que interactuó con el fármaco fue aproximadamente del 60% (figura 13). Las imágenes tomadas por AFM de estos ensayos, muestran estructuras fibrilares y ramificadas en el ensayo de control, y agregados amorfos en los ensayos en los que se adicionó ibuprofeno (tabla 6).

Figura 15. Cinética de Formación de agregados de insulina amiloide en presencia de ibuprofeno 340 μ M usando fluorescencia como medida del proceso.



Concentración 1 mg/ml de insulina, temperatura de incubación: 75°C, pH 1.6 en solución HCl.

En la figura 13b, la curva de color rojo representa la distribución de tamaño de la insulina amiloide en ausencia de fármaco incubada durante 10 horas; la curva de color verde corresponde a la insulina incubada en presencia de ibuprofeno durante 10 horas; y la curva de color azul muestra la distribución de tamaño de la insulina amiloide a la cual se adicionó ibuprofeno una vez termino el tiempo de incubación de 10 horas. La distribución de tamaño de la insulina en ausencia del fármaco expone un pico intenso alrededor de los 20 nanómetros, aunque este sea el diámetro más pequeño entre las muestras comparadas, es importante tener en cuenta que la curva de la insulina presenta una mayor variedad de tamaños en el diámetro hidrodinámico. Esto se explica por la gran cantidad de precursores que

se forman en el proceso de agregación de insulina amiloide (protofilamentos, protofibrillas, protofibras).

Figura 16. Distribución de tamaño de insulina amiloide en presencia de ibuprofeno a 10 horas de incubación de: insulina (rojo), insulina-ibuprofeno (verde), insulina-ibuprofeno* (azul).**

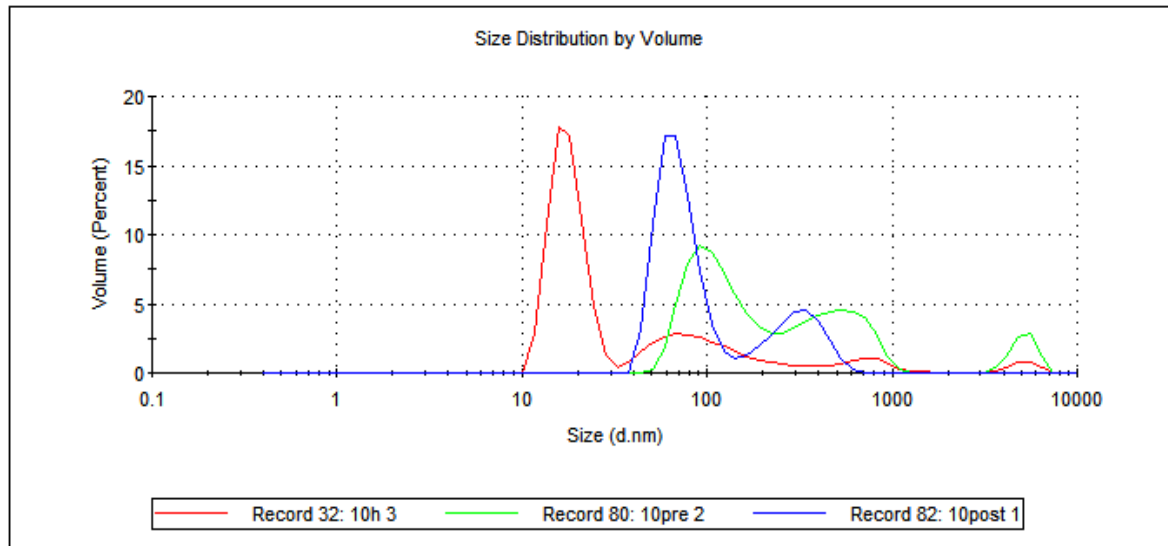
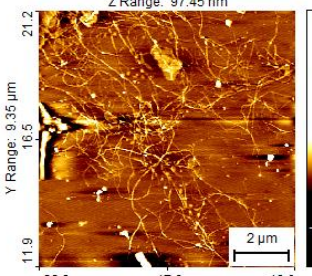
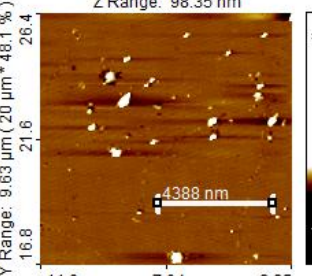
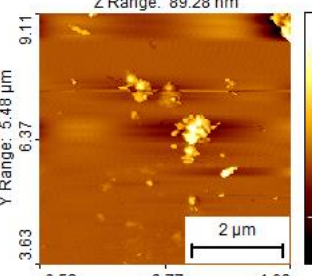
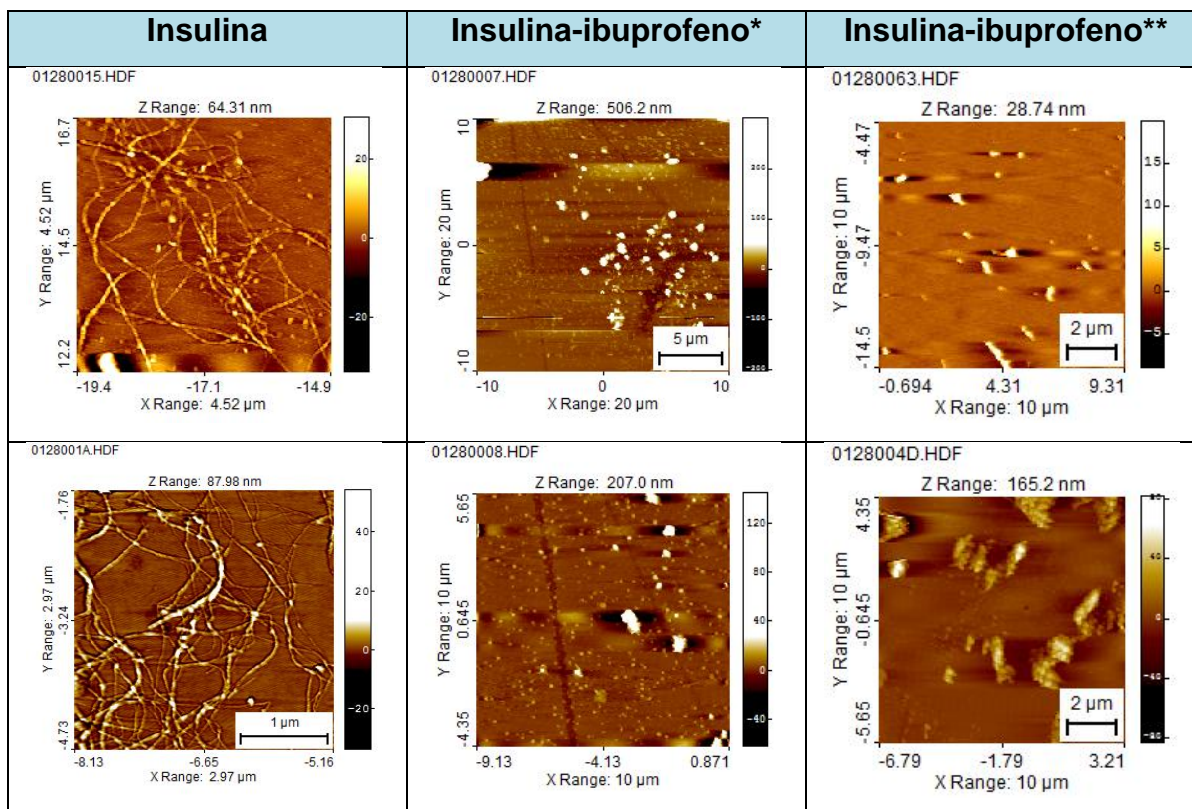


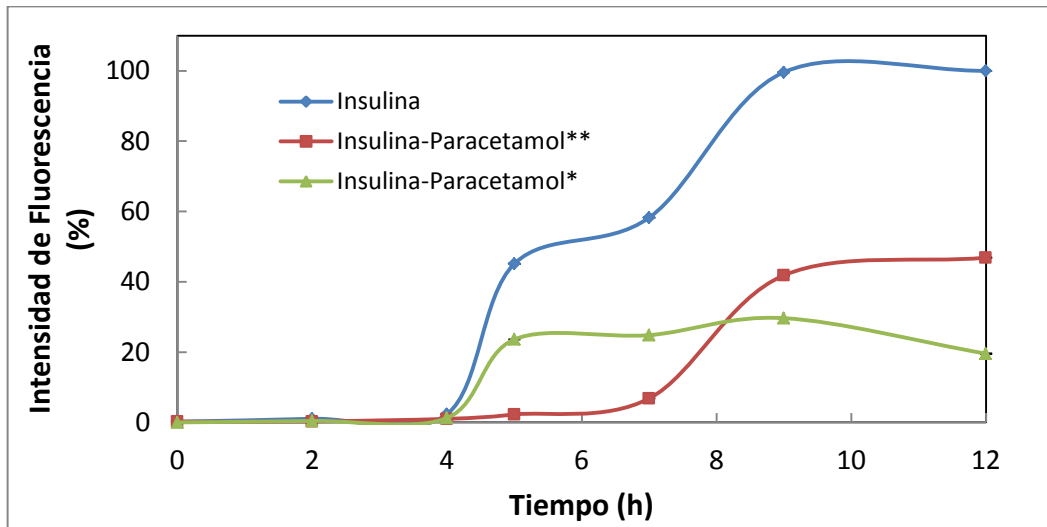
Tabla 4. Imágenes de microscopia de fuerza atómica (AFM) agregados amiloides en presencia de ibuprofeno. NC-AFM, frecuencia resonancia 320 KHz, soluciones incubadas durante 12 horas.

Insulina	Insulina-ibuprofeno*	Insulina-ibuprofeno**
<p>01280014.HDF</p> <p>Z Range: 97.45 nm</p>  <p>Y Range: 9.35 μm X Range: 9.35 μm</p> <p>2 μm</p>	<p>01280013.HDF</p> <p>Z Range: 98.35 nm</p>  <p>Y Range: 9.63 μm (20 μm * 48.1 %) X Range: 9.63 μm (20 μm * 48.1 %)</p> <p>4388 nm</p>	<p>01280025.HDF</p> <p>Z Range: 89.28 nm</p>  <p>Y Range: 5.48 μm X Range: 5.48 μm</p> <p>2 μm</p>



4.3.5 Efecto del Paracetamol sobre la agregación de insulina amiloide. En la Figura 14 se muestra el efecto del paracetamol sobre la formación de agregados amiloides. En ella se observa una inhibición de la formación de insulina amiloide, y un efecto de aparente degradación de las estructuras amiloides (figura 14a). El paracetamol produjo una disminución en las intensidades de fluorescencia de la insulina de hasta un 60%. Por otro lado, se observaron estructuras fibrilares en el ensayo de control y agregados amorfos en los ensayos en el que el paracetamol fue añadido a la solución de insulina (Ver Tabla 8).

Tabla 5. Cinética de Formación de agregados de insulina amiloide en presencia de paracetamol 3.96 mM usando fluorescencia como medida del proceso.



Concentración 1 mg/ml de insulina, temperatura de incubación: 75°C, pH 1.6 en solución HCl.

Para la evaluación del proceso de agregación, se midió el tamaño de los agregados de insulina utilizando DLS (figura 14b). La muestra de insulina incubada durante 10 horas (curva roja) exhibe 3 picos diferentes, dos de estos se aproximan al tamaño de diámetro de las muestras que estuvieron expuestas al paracetamol (curva verde y azul). Sin embargo, se presentan partículas con un diámetro aproximado de 5000 nm, correspondientes a los agregados proteicos que no interaccionan con el fármaco. Esto sugiere que el paracetamol evita la formación de estructuras con tamaños similares a especies amiloides.

Figura 17. Distribución de tamaño de insulina amiloide en presencia de paracetamol a 10 horas de incubación de: insulina (rojo), insulina-paracetamol (verde), insulina-paracetamol* (azul).**

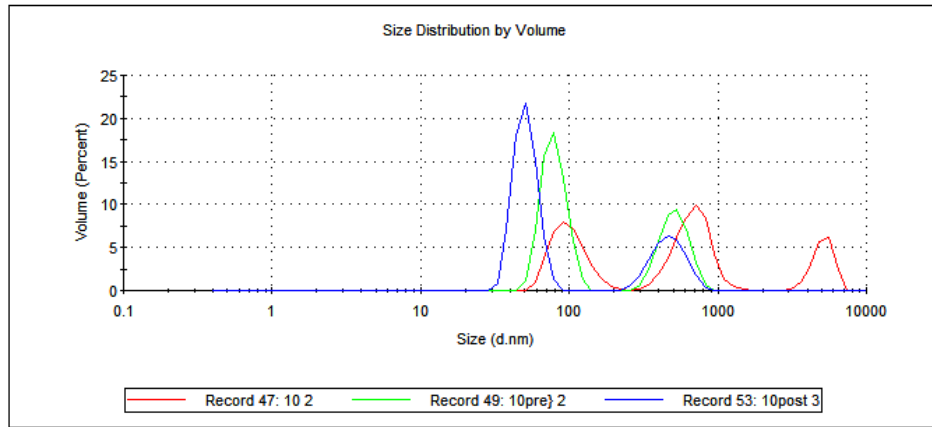
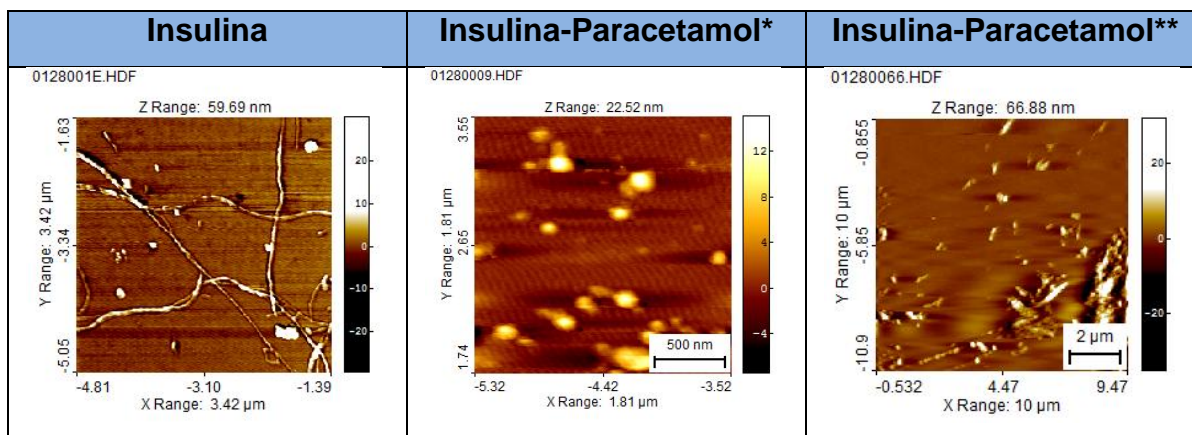


Tabla 6. Imágenes de microscopia agregados amiloides en presencia de paracetamol. NC-AFM, frecuencia resonancia 320 Khz, soluciones de insulina incubadas durante 12 horas.

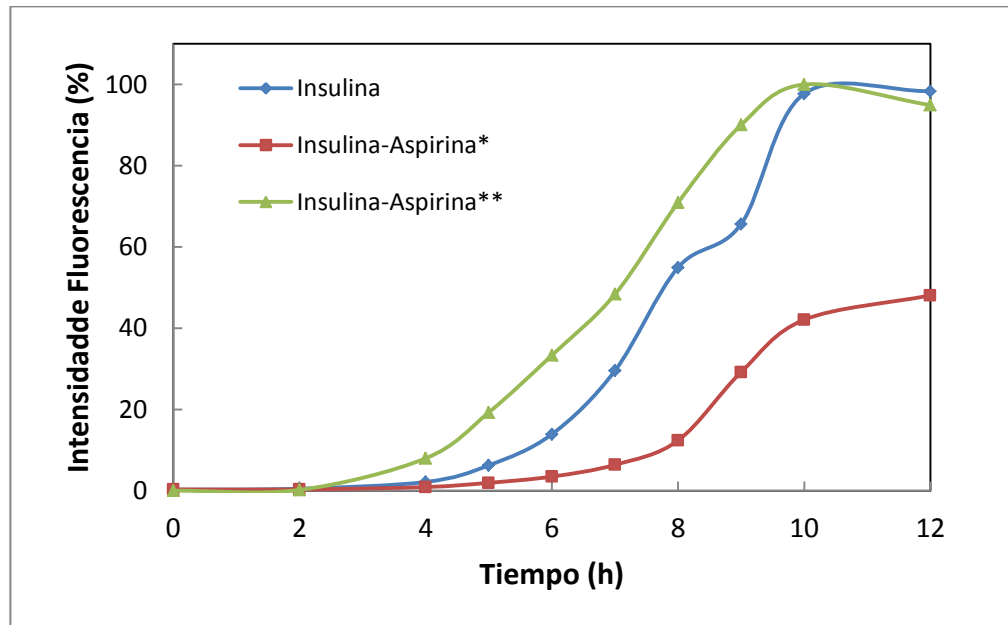
Insulina	Insulina-Paracetamol*	Insulina-Paracetamol**
<p>01280022.HDF</p> <p>Z Range: 104.3 nm</p> <p>Y Range: 7.87 μm</p> <p>X Range: 7.87 μm</p>	<p>0128005E.HDF</p> <p>Z Range: 60.89 nm</p> <p>Y Range: 15 μm</p> <p>X Range: 15 μm</p> <p>5 μm</p>	<p>0128004A.HDF</p> <p>Z Range: 197.9 nm</p> <p>Y Range: 15 μm</p> <p>X Range: 15 μm</p> <p>5 μm</p>
<p>01280023.HDF</p> <p>Z Range: 59.62 nm</p> <p>Y Range: 3.16 μm</p> <p>X Range: 3.16 μm</p>	<p>01280024.HDF</p> <p>Z Range: 168.2 nm</p> <p>Y Range: 20 μm</p> <p>X Range: 20 μm</p> <p>5 μm</p>	<p>01280039.HDF</p> <p>Z Range: 58.00 nm</p> <p>Y Range: 11.0 μm</p> <p>X Range: 11.0 μm</p> <p>2 μm</p>



4.3.6 Efecto de la Aspirina sobre la formación de Insulina amiloide. En la Figura 15 se puede observar el efecto de la aspirina en la formación de agregados amiloides. En ella puede verse que se produjo un aumento en la formación de estas especies cuando la aspirina se adiciona antes de iniciar la incubación, y una disminución de estructuras amiloides cuando la aspirina se adicionada después de inducir la formación de las fibras (Ver figura 15). En las imágenes obtenidas por AFM (tabla 10) se reconocen las estructuras fibrilares en la muestra de control. Sin embargo, las imágenes de las muestras de insulina en presencia aspirina antes de la incubación y que tienen la misma intensidad de fluorescencia de las muestras de insulina control, muestran estructuras esféricas aglomeradas. Aunque estas estructuras exhiban una apariencia esférica, generaron un aumento de su fluorescencia, corroborando que en los aglomerados abundan las estructuras de hojas tipo β . A su vez, la adición de aspirina a la insulina, pero antes de iniciar el proceso de incubación, aunque promueve la formación de estructuras amiloides, conduce a la síntesis de esferulitas.

A su vez, los ensayos en que se adiciona la aspirina a los agregados amiloides ya formados mostraron un descenso de fluorescencia del 50 %.

Figura 18. Cinética de Formación de agregados de insulina amiloide en presencia de aspirina 1.39 mM usando fluorescencia como medida del proceso.



Concentración 1 mg/ml de insulina, temperatura de incubación: 75°C, pH 1.6 en solución HCl.

Se midió el tamaño de la insulina incubada durante 10 horas en presencia y ausencia de aspirina (figura 15b). Las curvas de color rojo y verde representan la insulina pre-incubada en presencia del fármaco (insulina-aspirina**) y post-incubada (insulina-aspirina*), respectivamente, mientras que la curva roja representa a la insulina. Estas curvas se encuentran parcialmente solapadas, coincidiendo con los datos de la cinética obtenidos por fluorescencia (figura 15a), que demuestran el efecto nulo de la aspirina sobre el proceso de fibrilación de la insulina. La distribución de tamaño para las muestras a las que se adicionó aspirina después de inducir la fibrilación, presentan diámetros hidrodinámicos más bajos, confirmando la capacidad que tiene la aspirina para degradar insulina amiloide.

Figura 19. Distribución de tamaño de insulina amiloide en presencia de aspirina a 10 horas de incubación de: insulina (rojo), insulina-aspirina (verde), insulina-aspirina*(azul).**

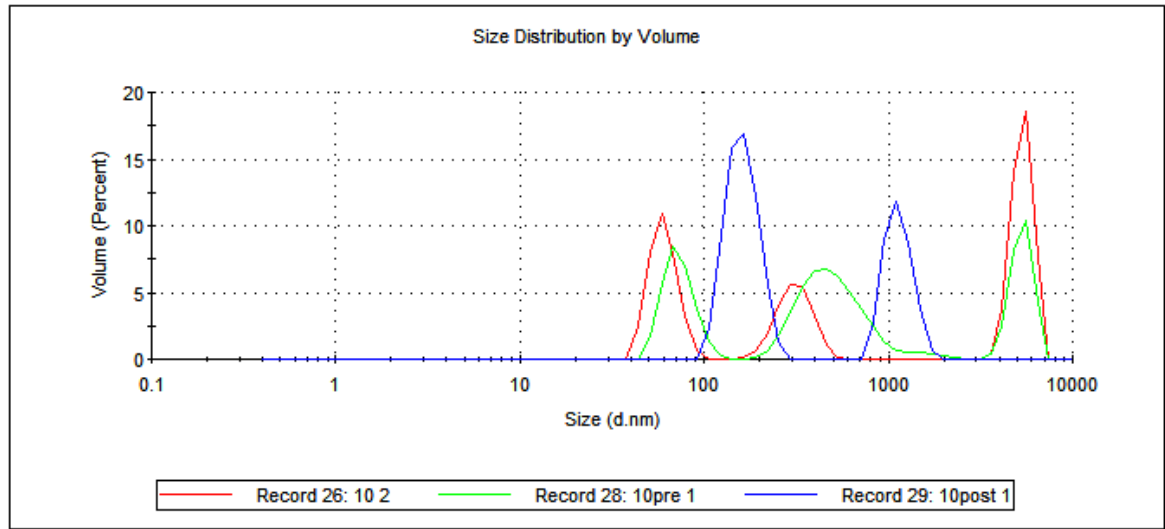
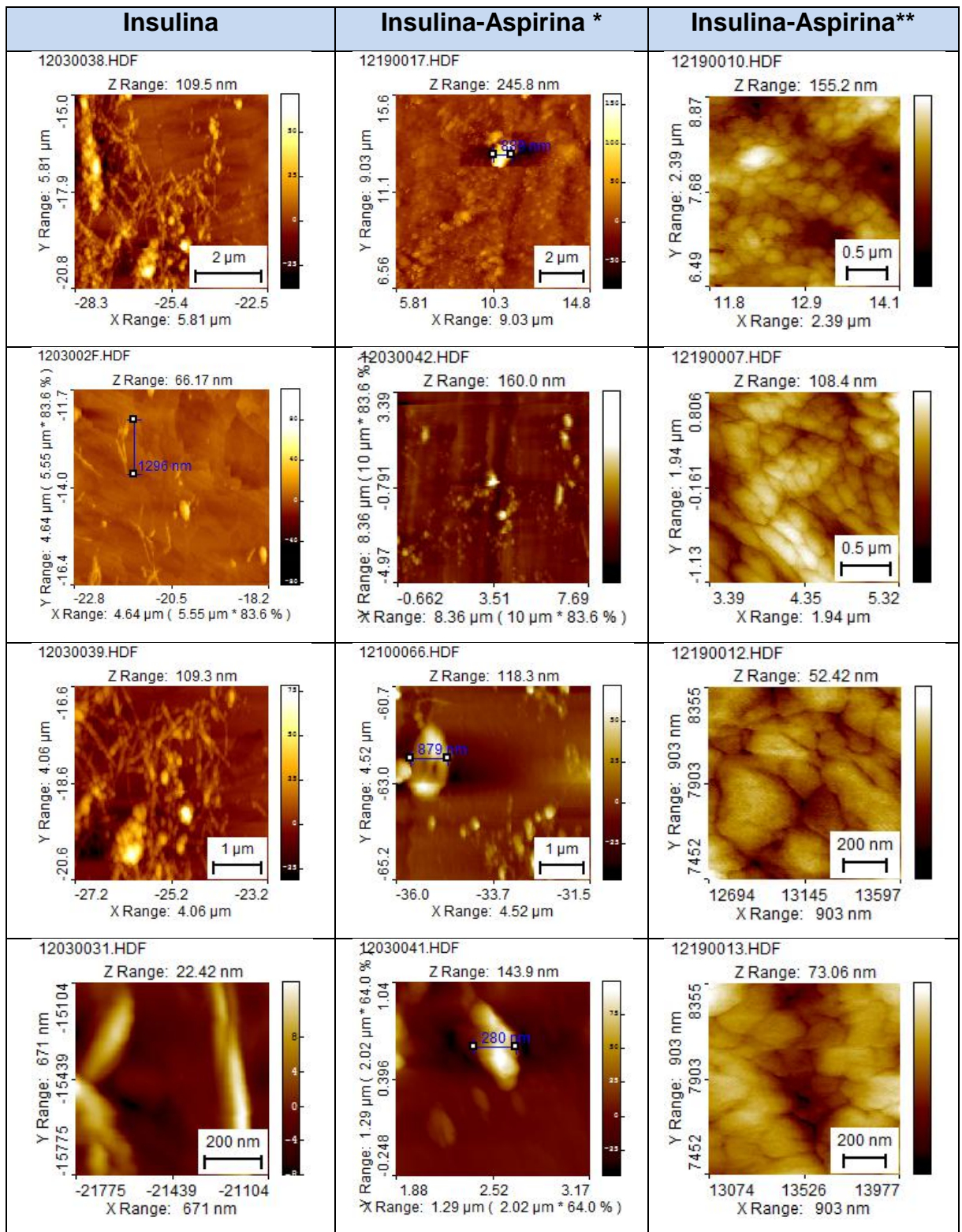


Tabla 7. Imágenes de microscopia de fuerza atómica (AFM) de agregados amiloides en presencia de aspirina. NC-AFM, frecuencia resonancia 320 Khz, soluciones incubadas durante 12 horas.

Insulina	Insulina-Aspirina *	Insulina-Aspirina**
<p>12030035.HDF</p> <p>Z Range: 162.4 nm</p> <p>Y Range: 7.73 μm (10 μm * 77.3 %)</p> <p>X Range: 7.73 μm (10 μm * 77.3 %)</p>	<p>121100065.HDF</p> <p>Z Range: 318.5 nm</p> <p>Y Range: 16.7 μm (20 μm * 83.6 %)</p> <p>X Range: 16.7 μm (20 μm * 83.6 %)</p>	<p>12190000F.HDF</p> <p>Z Range: 168.3 nm</p> <p>Y Range: 5.48 μm</p> <p>X Range: 5.48 μm</p> <p>2 μm</p>



Las imágenes demuestran que estas estructuras permanecen aglomeradas comparadas con los agregados amorfos que no tienen propiedades fluorescentes y se ven separados uno de otros. Si bien la morfología amiloide más habitual está constituida por fibras, es posible encontrar otro tipo de empaquetamiento con lo son las esferulitas.

Las esferulitas son estructuras amiloides, que se componen de un núcleo formado por insulina agregada de manera no específica, y rodeada de fibrillas amiloides orientadas radialmente⁴⁷. Es posible que la aspirina interactúe con los monómeros de insulina en la etapa de nucleación; aunque esta interacción no logra inhibir el proceso de formación de agregados amiloides si incide en la morfología de las especies finales. Las esferulitas se forman a partir de un núcleo agregado de manera no específica. En el momento en el que la aspirina puede interactuar con los monómeros parcialmente plegados, se impide una correcta nucleación, lo que llevaría finalmente a que las estructuras formadas sean esferulitas y no fibras. Algunas imágenes de las esferulitas tomadas por AFM muestran partículas que no son completamente esféricas mostrando que estas estructuras son inestables cuando se secan, lo que resulta en su deformación.

4.4 MORFOLOGÍA DE INSULINA AMILOIDE

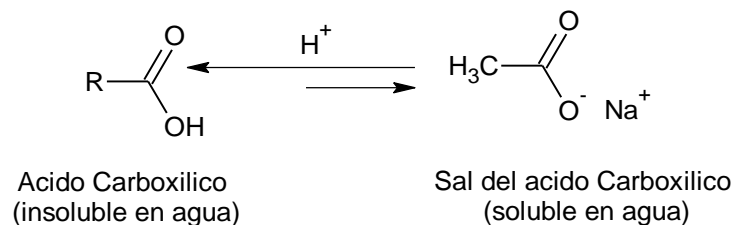
En todas las imágenes mostradas de la insulina amiloide en ausencia de fármacos los agregados exponen gran cantidad de ramificaciones. En los ensayos iniciales unos de los parámetros modificados fue la temperatura, que se aumentó hasta 75°C. Este cambio aumentó la velocidad de nucleación de los agregados, es decir, si el tiempo de nucleación disminuye, la formación de estructuras no lineales es favorecida, ya que los núcleos no tendrán tiempo suficiente para ensamblarse en estructuras más organizadas⁴⁸.

El proceso de agregación de la insulina se realiza bajo condiciones ácidas (HCl y H₂SO₄). Las condiciones ácidas, además de generar equilibrio de monómeros y dímeros, proporcionan un ambiente cargado en el que se incrementan las fuerzas de atracción entre las moléculas de proteína⁴⁸. El ácido clorhídrico provoca un aumento en la velocidad de formación de agregados amiloides, por lo tanto, es probable que la morfología ramificada de los agregados obtenidos esté influenciada por el uso de este ácido fuerte.

4.5 INHIBICIÓN DE FORMACIÓN DE AGREGADOS AMILOIDES DE INSULINA POR AINES

Una característica general de los AINES es que son ácidos carboxílicos, poco solubles en agua. Aunque las sales de los metales alcalinos de estos compuestos son muy solubles por su carácter iónico, lamentablemente en condiciones ácidas, como lo es el medio de la reacción de los agregados amiloides, el equilibrio se desplaza hacia la izquierda (figura 16)⁴⁹, impidiendo en alguna medida la interacción de estas moléculas con los aminoácidos de la proteína.

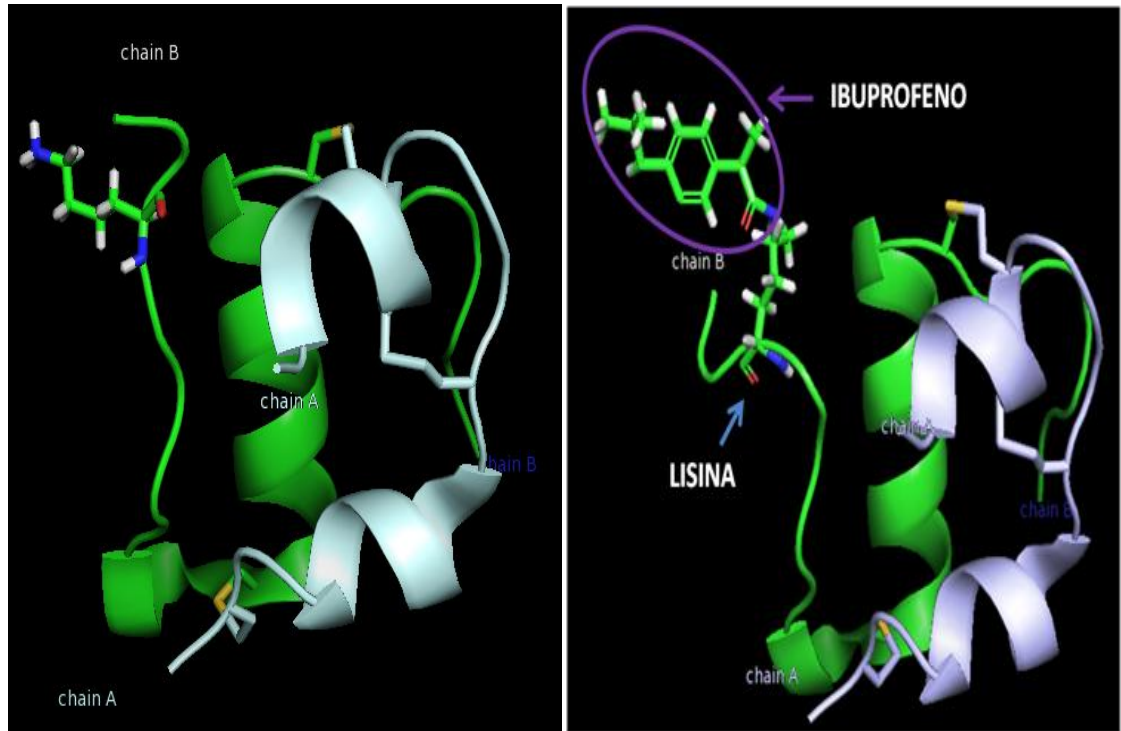
Figura 20. Equilibrio de ácidos carboxílicos en medio ácido.



Los aminoácidos que tienen grupos aminos expuestos, como la histidina, la arginina y la lisina, permanecerán en condiciones ácidas protonados con carga positiva. Bajo las condiciones de reacción de la fibrilación, es muy probable que los grupos carboxilo de los fármacos interactúen con los grupos amino de estos

aminoácidos, formando interacciones iónicas e influyendo en la conformación final de la estructura amiloide. La lisina presente en la insulina se encuentra muy cerca del carbono terminal de la cadena B (lys28) y hace parte del fragmento determinante en la nucleación del monómero (B24-B30). La exposición de este aminoácido en el monómero, en su forma nativa, favorece la interacción con el fármaco. Esta interacción lleva a una reducción en la flexibilidad del fragmento B24-B30 por el impedimento estérico que puede aportar el fármaco, disminuyendo así el aporte entrópico, lo que desfavorece la nucleación (figura 17); si este fragmento pierde su flexibilidad, los aminoácidos hidrofóbicos ubicados en las estructuras α -hélices de la cadena B y la cadena A, quedarán menos expuestos al medio acuoso. Lo anteriormente expuesto explicaría la inhibición del naproxeno y el ibuprofeno en el proceso de fibrilación. Ahora bien, el paracetamol no es un ácido carboxílico, pero sí un alcohol con un pKa de 9.5, lo que facilita la disociación de este alcohol a su ión alcoxi, el cual tiene la posibilidad de interactuar con la lys28, favoreciendo así la formación de puentes salinos que aumentarían la rigidez del fragmento B24-B30, y causarían un efecto similar al del naproxeno e ibuprofeno.

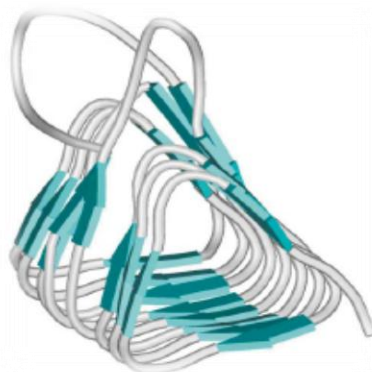
Figura 21. Posible interacción del fármaco con monómeros de insulina. La interacción de ibuprofeno con el monómero de insulina se realizó usando el visualizador pyMOL. La estructura del monómero de insulina fue obtenido de Protein Data Bank (PDB). COD 2M1E.pdb.



A partir de los datos obtenidos, se puede concluir que fármacos como el diclofenaco y la aspirina no presentan una propiedad inhibitoria sobre la formación de agregados amiloides de insulina. Para explicar estos resultados, es posible proponer que la aspirina no puede unirse completamente a la lys28. En lugar de esto, la aspirina sólo logra acetilar el aminoácido. Aunque, este aminoácido está acetilado, el residuo será más pequeño comparado con el resto de moléculas, reduciendo en menor grado la flexibilidad del fragmento B24-B30 y, por tanto, interfiriendo poco en la etapa de nucleación, lo que se vería reflejado en la formación de esferulitas y no de estructuras ramificadas⁵⁰.

4.6 DEGRADACIÓN DE AGREGADOS AMILOIDE DE INSULINA POR AINES

Figura 22. Ilustración de la estructura amiloide de la insulina. (Wetzel , 2002, p. 1032)51.



La estructura fibrilar de los amiloides hace que los aminoácidos que componen la proteína queden más expuestos que en su forma nativa (figura18), lo que facilita las interacciones con otras moléculas. En este estudio, los fármacos utilizados podrían vincularse fácilmente con algunos aminoácidos como: la arginina, la lisina, la histidina y el ácido glutámico formando puentes salinos, influyendo en la estructura fibrilar de la insulina y contribuyendo en la desagregación y cambio conformacional de la proteína fibrosa, sin recuperar la estructura nativa de la proteína pero impidiendo la forma fibrilar.

Tabla 8. Intensidades máximas relativas de fluorescencia de los ensayos realizados en presencia de fármaco y controles de insulina sin fármaco.

Fármaco	Insulina	Insulina-fármaco *	Insulina-fármaco **
Diclofenaco (66.81 μ M)	52	13	100
Naproxeno (473 μ M)	100	22	27
Ibuprofeno	100	36	49

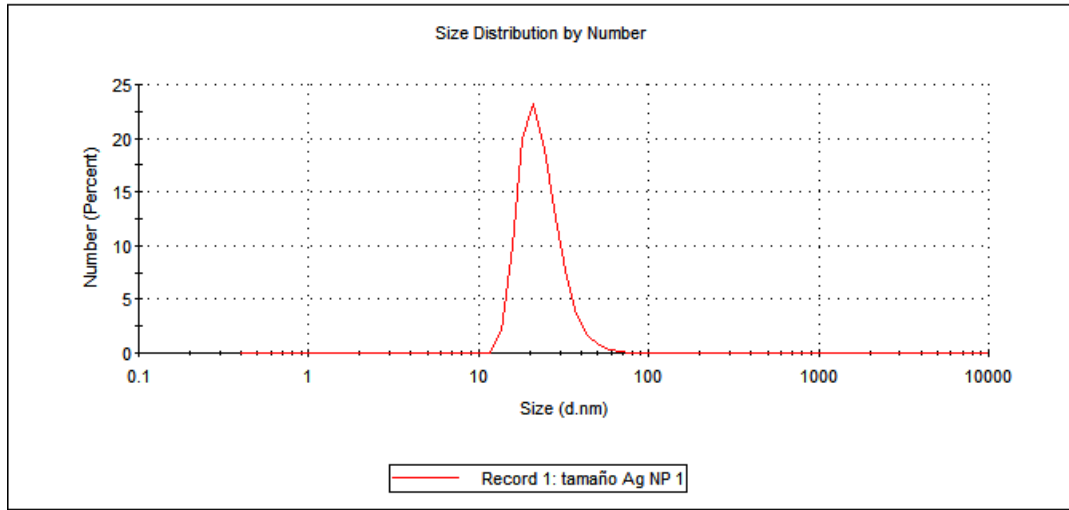
Fármaco	Insulina	Insulina-fármaco *	Insulina-fármaco **
(340 μM)			
Paracetamol (3.96 mM)	100	29	46
Aspirina (1.39 mM)	100	48	98

La tabla 11 muestra las intensidades máximas de fluorescencia de cada uno de los ensayos. Además, se relaciona con las concentraciones de los fármacos utilizados. En este caso, las intensidades en los ensayos de diclofenaco no son comparativas con el resto de los fármacos, teniendo en cuenta que en los mismos la mayor intensidad no se obtuvo en el grupo de control como sucedió con las otras moléculas. El paracetamol fue el fármaco que presentó mayor concentración. Sin embargo, no fue el que mostró los niveles más bajos de fluorescencia, lo que indica que las interacciones que tiene este fármaco con los aminoácidos de la insulina no son tan fuertes como lo podrían ser las del naproxeno e ibuprofeno, que aunque están en concentraciones mucho más bajas, logran una mayor disminución de fluorescencia en comparación al grupo de control.

4.7 NANOPARTÍCULAS

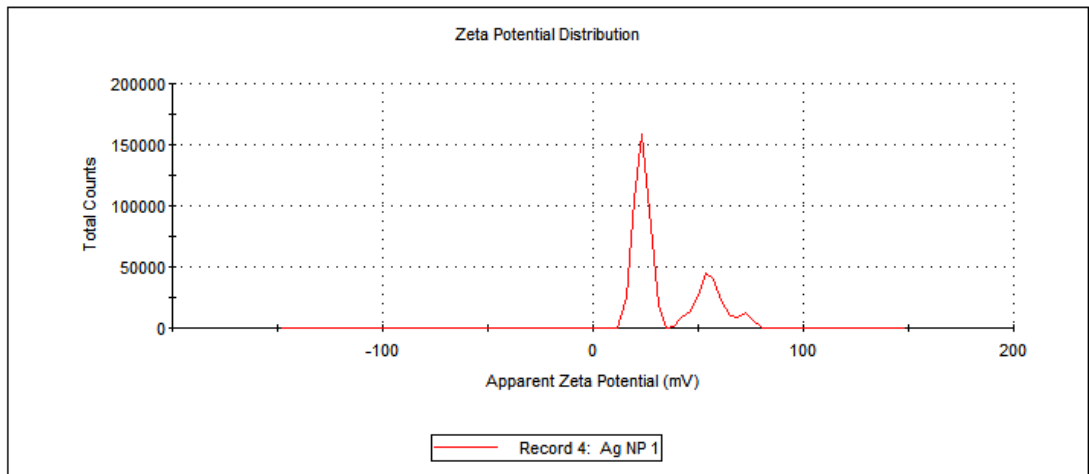
4.7.1. Caracterización de nanopartículas. En estos estudios se evaluó el efecto de nanopartículas de plata sobre la formación de agregados de insulina amiloide. El tamaño de las nanopartículas de plata obtenido fue en promedio de 23 nm (figura 19a). Por tratarse de nanopartículas pequeñas, se favorece la interacción de nanopartícula-proteína, teniendo presente que en un menor volumen habrá mayor cantidad de nanopartícula y el área superficial que interactúa será mayor.

Figura 23. Distribución de tamaño de las nanopartícula de plata.



La distribución de potencial Z, que está relacionado con la carga superficial de la nanopartícula, exhibe dos picos (figura 19b). El primero alrededor de 23 mv y el segundo en 55 mv de carga positiva, esta carga superficial de la nanopartícula favorece las interacciones electrostáticas nanopartícula-proteína.

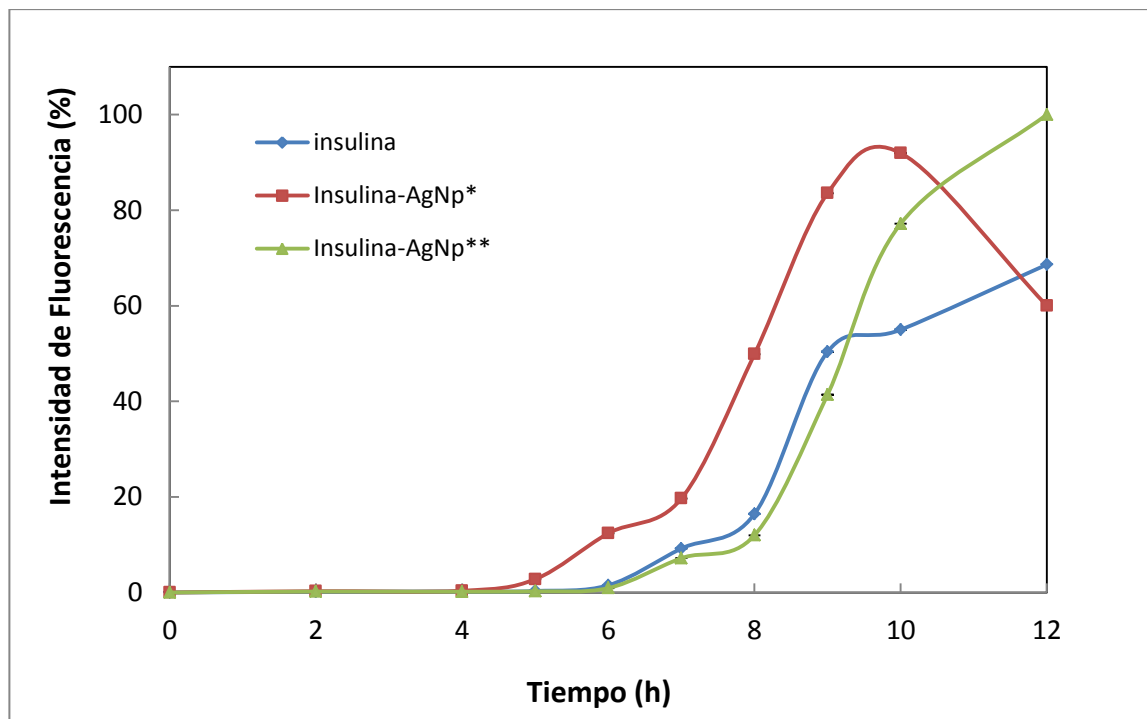
Figura 24. Distribución de potencial sobre la superficie de la nanopartícula.



4.7.2. Efecto de nanopartículas sobre insulina amiloide En la figura 20 se observan los resultados del efecto de las nanopartículas sobre la formación de

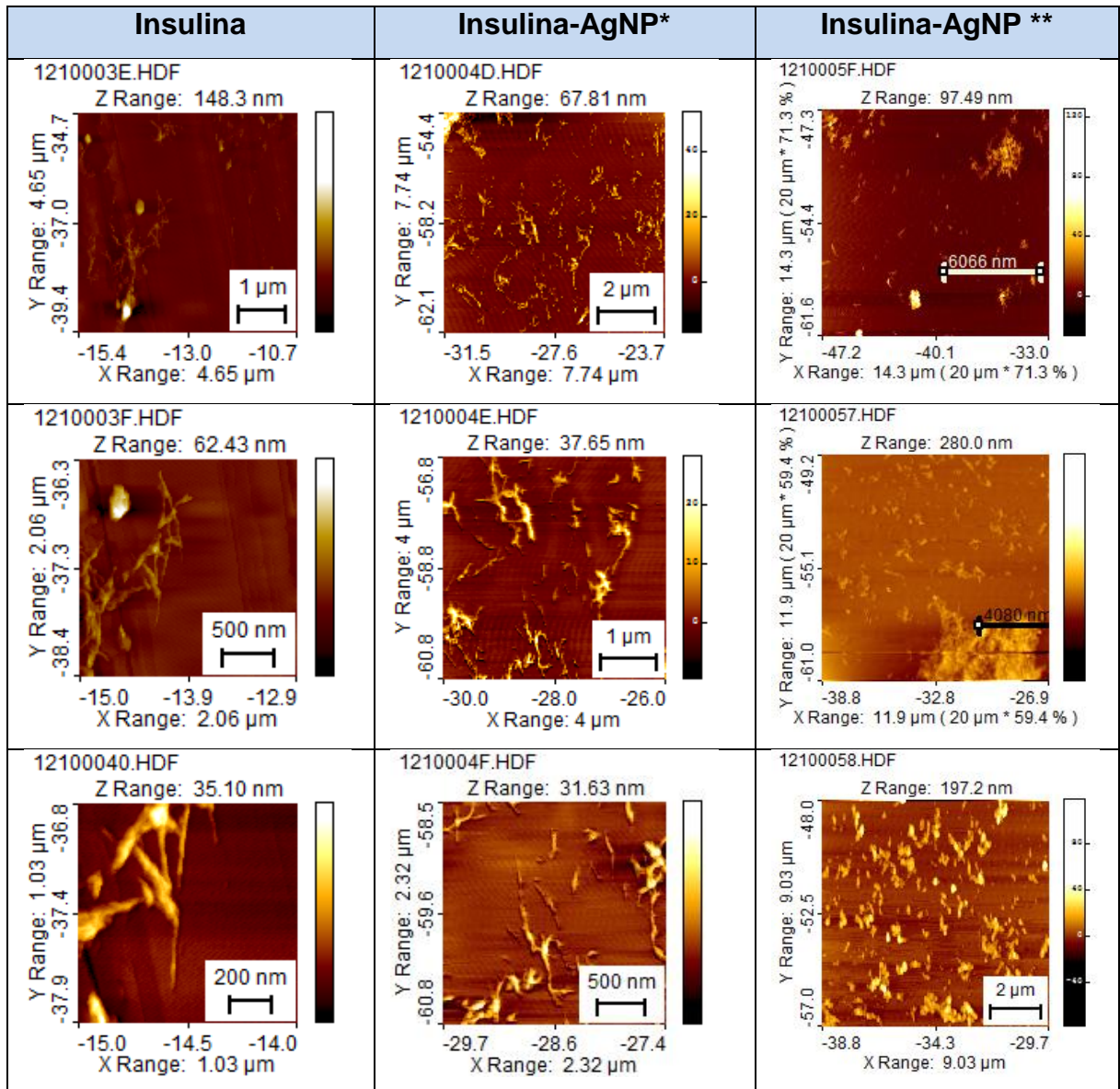
fibras amiloides. Las nanopartículas favorecen el proceso de fibrilación. Es probable que la capacidad de absorción que tienen sobre las proteínas hace que las nanopartículas funciones como punto de anclaje para los núcleos. Este efecto favorece la formación de insulina amiloide alrededor de las nanopartículas, mientras que las nanopartículas adicionadas posformación parece que no tienen efecto alguno sobre los agregados ya formados. Las imágenes tomadas por AFM concuerdan con los resultados obtenidos por fluorescencia, ya que en los tres grupos se logró evidenciar morfologías fibriladas⁵² (tabla 12).

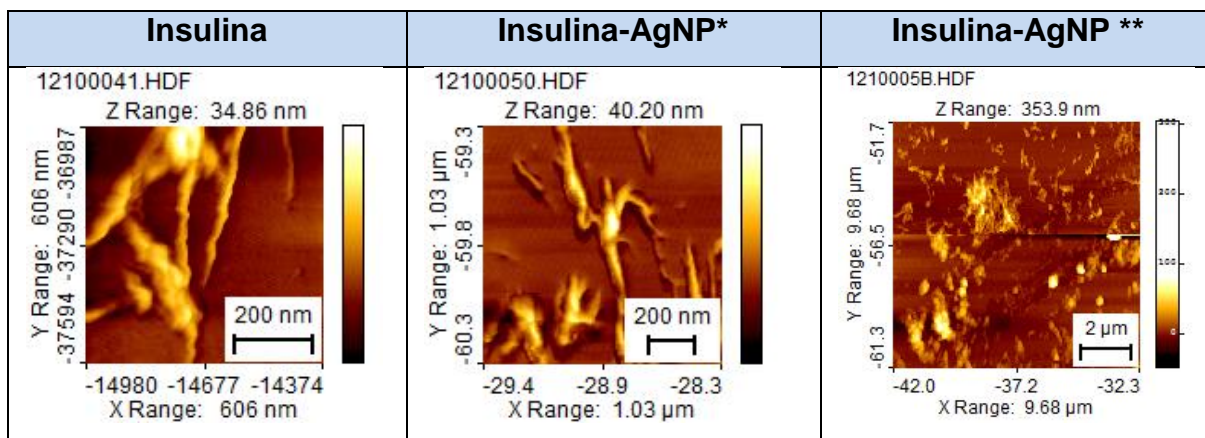
Figura 25. Cinética de Formación de agregados de insulina amiloide en presencia nanopartículas de plata usando fluorescencia como medida del proceso.



Concentración 1 mg/ml de insulina, temperatura de incubación: 75°C, pH 1.6 en solución HCl.

Tabla 9. Imágenes de microscopia de fuerza atómica (AFM) de agregados amiloides en presencia de aspirina. NC-AFM, frecuencia resonancia 320 Khz, soluciones incubadas durante 12 horas.





5. CONCLUSIONES

Se demostró el efecto de algunas condiciones fisico-químicas sobre la velocidad de formación de insulina amiloide, lo cual permitió determinar que la concentración de insulina y la temperatura son dos parámetros muy importantes que afectan la velocidad de formación de agregados amiloides.

Se confirmó que la nucleación es la etapa determinante en la cinética de formación de insulina amiloide. Se comprobó que una vez se completa la etapa de nucleación de proteínas, no se requiere mayor cantidad de energía para continuar con el proceso de ensamble de las fibras amiloides.

Se logró inhibir el proceso de formación de insulina amiloide mediante la adición de fármacos antiinflamatorios no esteroideos, los cuales se adicionan antes de inducir la formación, obteniendo agregados amorfos que no presentan intensidades de fluorescencia significativa.

Se determinó el efecto que tienen los fármacos antiinflamatorios no esteroideos sobre las estructuras amiloides cuando los mismos interactúan con especies ya formadas conduciendo a un cambio de morfología, tamaño molecular y de sus propiedades fluorescentes en su interacción con Tioflavina T.

6. RECOMENDACIONES

Aunque se obtuvieron agregados amorfos, la estructura de estas especies es desconocida y su carácter citotóxico también. Por tal motivo, se recomienda realizar ensayos de hemólisis en eritrocitos para analizar el efecto de estos agregados amiloides de insulina sobre las células.

Realizar análisis por espectrometría de masas del monómero de insulina con los fármacos, con el fin de determinar si existen interacciones covalentes entre el fármaco y los residuos aminoácidos de la proteína.

Adicionar los fármacos después de inducir solo la etapa de nucleación, e incubar a condiciones fisiológicas para analizar el efecto de los fármacos sobre la etapa de elongación de los agregados amiloides, con el propósito de evitar que la insulina inyectada en pacientes se agregue y mantener la actividad biológica.

Funcionalizar las nanopartículas con moléculas inhibitorias y de bajo peso molecular, para de esta manera intentar reducir la toxicidad de las mismas. Analizar las propiedades físicas de las nanopartículas que permiten la eliminación de las especies amiloides.

Realizar ensayos a diferentes concentraciones de los AINEs para estudiar el efecto de la concentración del fármaco sobre la formación de agregados amiloides, y teniendo como parámetro la biodisponibilidad de fármaco.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. MURAT İNANÇ Cengiz, KUDDUSI Cengiz. Amyloidosis – an insight to disease of systems and novel therapies. Croacia: InTech, 2011. Pág. (77-85).
2. THIRUMALAI D, KLIMOV DK, DIMA RI, Emerging ideas on the molecular basis of protein and peptide aggregation. En: Current Opinion in Structural Biology. Vol. 13, No. 2 (abr-2003); p. 146-159.
3. RICHARDSON JS, RICHARDSON DC: Natural b-sheet proteins use negative design to avoid edge-to-edge aggregation. En: Proc Natl Acad Sci. Vol. 99, No. 5 (may-2002); p.2754-2759.
4. MAREK Peter, ABEDINI Andisheh, SONG BenBen, KANUNGO Mandakini, JOHNSON Megan E., GUPTA Ruchi, ZAMAN Warda. Aromatic Interactions Are Not Required for Amyloid Fibril Formation by Islet Amyloid Polypeptide but Do Influence the Rate of Fibril Formation and Fibril Morphology. En: Biochemistry. Vol. 46. No. 11. 2007; P.3255-3261.
5. JAVED Khan, ATIYATUL Qadeer, SDS Can Be Utilized as an Amyloid Inducer: A Case Study on Diverse Proteins, En: Plos one. Vol. 7, (ene-2012), p. e29694.
6. CISZAK Ewa , BEALS John, FRANK Bruce, BAKER Jeffrey, CARTER Nancy. Role of C-terminal B-chain residues in insulin assembly: the structure of hexameric LysB28ProB29-human insulin. En: Structure. Vol. 3, No 6 (jun-1995); p. 615-622.

7. NIELSEN L., FROKJAER S., BRANGE J., Probing the Mechanism of Insulin Fibril Formation with Insulin Mutants. En: *Biochemistry*. Vol. 40, No 28 (jun-2001); p. 8397–8409.
8. BRANGEX Jens, ANDERSEN Lennart, LAURSEN Erik. Toward Understanding Insulin Fibrillation. En: *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol. 86, No. 5 (May-1997); p. 517-525.
9. WOOD Debra. Diabetes tipo 2 (en línea), fecha: 15 septiembre 2012, disponible en (<http://www.empowher.com/media/reference/diabetes-tipo-2>).
10. FRAN Kestel, RN, BSN, EDUCACIÓN SANITARIA DEL PACIENTE, diabetes tipo 2, Educador clínico Health Care Network, Pa., Estados Unidos. 2005, Volumen 23, Número 5.
11. AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. En: *Diabetes Care*, Vol. 30 (ene-2007) ; p.62-69.
12. GEBBINK M., CLAESSEN D., BOUMA B., DIJKHUIZEN L., Amyloids- A functional coat for microorganisms. En: *Nature Reviews. Microbiology* Vol. 3 (abr-2005); p.333–341.
13. HARRISON R., SHARPE P., SINGH Y., FAIRLIE D.; Amyloid peptides and proteins in review. En: *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Vol. 159 (abr-2007); p. 1-77.
14. GROENNING Minna., Binding mode of Thioflavin T and other molecular probes in the context of amyloid fibrils—current status. En: *J Chem Biol*, Vol. 3 (2010); p.1–18.

15. KHURANA Ritu, IONESCU-ZANETTI Cristian, POPE Maighdlin, LI Jie, NIELSON Liza, RAMÍREZ-ALVARADO Marina, A General Model for Amyloid Fibril Assembly Based on Morphological Studies Using Atomic Force Microscopy. En: *Biophysical Journal*, Vol. 85 (Ago-2003); p. 1135–1144.
16. JIMÉNEZ José L., NETTLETON Ewan J., BOUCHARD Mario, ROBINSON Carol V., DOBSON Christopher M., SAIBI Helen R., The protofilament structure of insulin amyloid fibrils. En: *PNAS*. Vol. 99, No. 14, (jul-2002); p. 9196-9201.
17. HELDT Caryn, SORCI Mirco, POSADA David, HIRSA Amir, BELFORT Georges, Detection and reduction of microaggregates in insulin preparations. En: *Biotechnology and Bioengineering*. Vol.108, No 1 (ene-2011); p. 237–241.
18. NIELSEN Liza, KHURANA Ritu, COATS Alisa, FROKJAER Sven, BRANGE jens, VYAS Sandip , UVERSKY Vladimir, FINK Anthony. Effect of Environmental Factors on the Kinetics of Insulin Fibril Formation: Elucidation of the Molecular Mechanism. En: *Biochemistry*. Vol. 40, No: 20 (abr-2001); p. 6036–6046.
19. BRANGE Jens, ANDERSEN Lennart, LAURSEN Erik, MEYN Giorgio, RASMUSSEN Eigil. Toward Understanding Insulin Fibrillation. En: *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol.: 86, No. 6, (may-1997); p. 517-525.
20. PORA Yair t, ABRAMOWITZ Adel, GAZIT Ehud. Inhibition of Amyloid Fibril Formation by Polyphenols: Structural Similarity and Aromatic Interactions as a Common Inhibition Mechanism. En: *Chemical biology and drug design*. Vol. 67, 2006. P. 27-37.

21. KREBS M., BROMLEY E., ROGERS S., DONALD A., The mechanism of amyloid spherulite formation by bovine insulin. En: *Biophys J. Vol. 88 No. 3 (mar-2005); 2013-2021.*
22. KREBS Mark, MACPHEE Cait, MILLE Aline, DUNLOP Iain, DOBSON Christopher, DONALD Athene. The formation of spherulites by amyloid fibrils of bovine insulin. En: PNAS, Vol. 101, No. 40 (oct-2004); p.14420–14424.
23. SMITH Michael, FODERÀ Vito, SHARP James, ROBERTS Clive, DONALD Athene. Factors affecting the formation of insulin amyloid spherulites. En: *Colloids and Surfaces B: Biointerface. Vol.89, No. 1 (ene-2012); p. 216–222.*
24. LORENZO-VELAZQUEZ P, MORENA A., farmacología básica y clínica. 18ª edición. Buenos aires: médica panamericana, 2008. Pag: 519
25. COLVIN Vicki, KULINOWSKI Kristen. Nanoparticles as catalytics for protein fibrillation. En: PNAS, Vol. 104, No. 21 (May-2007); p. 8679–8680.
26. ISEULT lynch, DAWSON kenneth a., protein-nanoparticle interactions. En: *nanotoday. Vol. 3, No: 1, (feb-2008); p. 40-47.*
27. BELLOVA Andrea, BYSTRENOVA Eva, KONERACKA Martina, KOPCANSKY Peter, VALLE Francesco, TOMASOVICOVA Natalia, TIMKO Milan, BAGELOVA Jaroslava. Effect of Fe₃O₄ magnetic nanoparticles on lysozyme amyloid aggregation. En: *Nanotechnology, Vol. 21 (ene-2010) 065103 (6pp).*
28. FREIFELDER D. Técnicas de bioquímica y microbiología molecular, editorial reverté S.A. Barcelona 1981.

29. DOUGLAS A.SKOOG, DONALD M. WEST, Fundamentos de química analítica, Thomson, Octava edición Pag 837-840.
30. HAWE Andrea, SUTTER Marc, JISKOOT Wim, Extrinsic Fluorescent Dyes as Tools for Protein Characterization. En: Pharmaceutical Research, Vol. 25, No. 7, (Jul-2008); p.1487-1499.
31. KHURANA R., COLEMAN C., IONESCU-ZANETTI C., CARTER S., KRISHNA V., GROVER R., ROY R., SINGH S.. Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils. En: J. Struct. Biol. Vol. 151, No. 3, (sep-20005); p. 229–238.
32. FODERÀ Vito, GROENNING Minna, VETRI Valeria, LIBRIZZI Fabio, SPAGNOLO Salvatore, CORNETT Claus, OLSEN Lars, VAN DE WEERT Marco, LEONE Maurizio. Thioflavin T Hydroxylation at Basic pH and Its Effect on Amyloid Fibril Detection. En: J. Phys. Chem. B. Vol. 112. No. 47. (oct-2008); p. 15174–15181.
33. GALLOWAY Group Atomic Force Microscopy: A Guide to Understanding and Using the AFM Spring 2004
34. Non-Contact mode (en línea), Fecha: 02 de enero de 2014, disponible en (<http://www.ntmdt.com/spm-principles/view/non-contact-mode>).
35. Y. Martin, C.C. Williams, H.K. Wickramasinghe. Atomic Force Microscope-Force Mapping and Profiling on a sub-100 Angstrom Scale. En: J. Appl. Phys., Vol. 61, No. 10, (May- 1987); p.4723-4729.
36. CEDERVALL Tommy, LYNCH Iseult, FOY Martina, BERGGÅRD Tord, DONNELLY Seamas, Detailed Identification of Plasma Proteins Adsorbed on

Copolymer Nanoparticles. En: Angew. Chem. Int. Ed. Vol. 46, No. 30 (jul-2007); p. 5754-5756.

37. SARTOR Marta, DYNAMIC LIGHT SCATTERING, University of California San Diego. (En línea), Fecha: 15 septiembre 2012. Disponible en: http://physics.ucsd.edu/neurophysics/courses/physics_173_273/dynamic_light_scattering_03.pdf.
38. WANG JB, WANG YM, ZENG CM. Quercetin inhibits amyloid fibrillation of bovine insulin and destabilizes preformed fibrils. En: Biochem. Biophys. Res. Vol. 415; p. 675–679.
39. PAREDES GUERRERO, Daissy Julieth. ESTUDIO DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA SOBRE Escherichia coli Y Staphylococcus aureus. Bucaramanga, pag: 30. UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER, Facultad de ciencias, Escuela de Química.
40. HAWE Andrea, SUTTER Marc, JISKOOT Wim, Extrinsic Fluorescent Dyes as Tools for Protein Characterization. En: Pharmaceutical Research, Vol. 25, No. 7,(Jul-2008); p. 1487-1499.
41. PODESTÀ Alessandro, TIANA Guidop, MILANI Paolo, MANNO Mauro, Early Events in Insulin Fibrillization Studied by Time-Lapse Atomic Force Microscopy. En: Biophysical Journal, Vol. 90, No. 2, (ene-2006); p. 589-597.
42. SERIO Tricia R., CASHIKAR Anil G., KOWAL Anthony S., SAWICKI George J., MOSLEHI JAHAN J., SERPELL Louise, ARNSDORF Morton F., LINDQUIST Susan L. Nucleated conformational Conversion and the Replication of Conformational Information by a Prion Determinant. En: science. Vol. 289. No. 25 august 2000´.

43. GILPIN R.K., ZHOU W., Studies of the Thermal Degradation of Acetaminophen Using a Conventional HPLC Approach and Electrospray Ionization–Mass Spectrometry. En: Journal of Chromatographic Science, Vol. 42, No. 1 (ene-2004); p. 15-20.
44. CRUZ GATELL Montse, "Diseño, síntesis y evaluación de inhibidores de la proteína β -amiloide. Desarrollo de un modelo de fibrillogénesis", Barcelona, 2003. P 191-202. Universidad de Barcelona, Departamento de Química organica. Facultad de Química.
45. POWERS Evan T., POWERS David L., The Kinetics of Nucleated Polymerizations at High Concentrations: Amyloid Fibril Formation Near and Above the "Supercritical Concentration". En: Biophysical Journal. Vol. 91. No. 1, (Jul-2006); p. 122–132.
46. DICLOFENACO: Información para pacientes (en línea), fecha: 24 de enero de 2014, disponible en: <http://www.medizzine.com/pacientes/medicamentos/diclofenaco.php>.
47. ROGERS S., KREBS M., BROMLEY E., VAN DER LINDEN E., DONALD A., Optical microscopy of growing insulin amyloid spherulites on surfaces in vitro. En: Biophys. J. Vol. 90 (2006); p. 1043 -54.
48. WHITTINGHAM JL, SCOTT DJ, CHANCE K, WILSON A, FINCH J, BRANGE J, Guy Dodson G. Insulin at pH 2: structural analysis of the conditions promoting insulin fibre formation. En: J Mol Biol. Vol. 318, No 2. (abr-2002); p. 479-90.
49. MCMURRY, J., Química Orgánica, 5^a. Edición, México, Ed. International Thomson Editores, S.A. de C.V., 2001. Pág.782.

50. LIYASOVA Mariya, SCHOPFER Lawrence, LOCKRIDGE Oksana. Reaction of human albumin with aspirin in vitro: Mass spectrometric identification of acetylated lysines 199, 402, 519, and 545. En: *Biochemical Pharmacology*. Vol. 79 (2010); p. 784–791.
51. WETZEL Ronald, Ideas of Order for Amyloid Fibril Structure Review, En: *Structure*, Vol. 10, (Ago-2002); p. 1031–1036.
52. FEI Li, PERRETT Sarah, Effect of Nanoparticles on Protein Folding and Fibrillogenesis Review. *Int. J. Mol. Sci.* Vol. 10, (feb-2009); p. 646-655.

BIBLIOGRAFIA

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. En: Diabetes Care, Vol. 30 (ene-2007) ; p.62-69.

BELLOVA Andrea, BYSTRENOVA Eva, KONERACKA Martina, KOPCANSKY Peter, VALLE Francesco, TOMASOVICOVA Natalia, TIMKO Milan, BAGELOVA Jaroslava. Effect of Fe₃O₄ magnetic nanoparticles on lysozyme amyloid aggregation. En: Nanotechnology, Vol. 21 (ene-2010) 065103 (6pp).

BRANGE Jens, ANDERSEN Lennart, LAURSEN Erik, MEYN Giorgio, RASMUSSEN Eigil. Toward Understanding Insulin Fibrillation. En: Journal of Pharmaceutical Sciences. Vol.: 86, No. 6, (may-1997); p. 517-525.

BRANGEX Jens, ANDERSEN Lennart, LAURSEN Erik. Toward Understanding Insulin Fibrillation. En: Journal of Pharmaceutical Sciences. Vol. 86, No. 5 (May-1997); p. 517-525.

CEDERVALL Tommy, LYNCH Iseult, FOY Martina, BERGGÅRD Tord, DONNELLY Seamas, Detailed Identification of Plasma Proteins Adsorbed on Copolymer Nanoparticles. En: Angew. Chem. Int. Ed. Vol. 46, No. 30 (jul-2007); p. 5754-5756.

CISZAK Ewa , BEALS John, FRANK Bruce, BAKER Jeffrey, CARTER Nancy. Role of C-terminal B-chain residues in insulin assembly: the structure of hexameric LysB28ProB29-human insulin. En: Structure. Vol. 3, No 6 (jun-1995); p. 615-622.

COLVIN Vicki, KULINOWSKI Kristen. Nanoparticles as catalytics for protein fibrillation. En: PNAS, Vol. 104, No. 21 (May-2007); p. 8679–8680.

CRUZ GATELL Montse, "Diseño, síntesis y evaluación de inhibidores de la proteína β -amiloide. Desarrollo de un modelo de fibrillogénesis", Barcelona, 2003. P 191-202. Universidad de Barcelona, Departamento de Química organica. Facultad de Química.

DICLOFENACO: Información para pacientes (en línea), fecha: 24 de enero de 2014, disponible en: <http://www.medizzine.com/pacientes/medicamentos/diclofenaco.php>.

DOUGLAS A.SKOOG, DONALD M. WEST, Fundamentos de química analítica, Thomson, Octava edición Pag 837-840.

FEI Li, PERRETT Sarah, Effect of Nanoparticles on Protein Folding and Fibrillogenesis Review. Int. J. Mol. Sci. Vol. 10, (feb-2009); p. 646-655.

FODERÀ Vito, GROENNING Minna, VETRI Valeria, LIBRIZZI Fabio, SPAGNOLO Salvatore, CORNETT Claus, OLSEN Lars, VAN DE WEERT Marco, LEONE Maurizio. Thioflavin T Hydroxylation at Basic pH and Its Effect on Amyloid Fibril Detection. En: J. Phys. Chem. B. Vol. 112. No. 47. (oct-2008); p. 15174–15181.

FRAN Kestel, RN, BSN, EDUCACIÓN SANITARIA DEL PACIENTE, diabetes tipo 2, Educador clínico Health Care Network, Pa., Estados Unidos. 2005, Volumen 23, Número 5.

FREIFELDER D. Técnicas de bioquímica y microbiología molecular, editorial reverté S.A. Barcelona 1981.

GALLOWAY Group Atomic Force Microscopy: A Guide to Understanding and Using the AFM Spring 2004

GEBBINK M., CLAESSEN D., BOUMA B., DIJKHUIZEN L., Amyloids- A functional coat for microorganisms. En:Nature Reviews. Microbiology Vol. 3 (abr-2005); p.333–341.

GILPIN R.K., ZHOU W., Studies of the Thermal Degradation of Acetaminophen Using a Conventional HPLC Approach and Electrospray Ionization–Mass Spectrometry. En: Journal of Chromatographic Science, Vol. 42, No. 1 (ene-2004); p. 15-20.

GROENNING Minna., Binding mode of Thioflavin T and other molecular probes in the context of amyloid fibrils—current status. En: J Chem Biol, Vol. 3 (2010); p.1–18.

HARRISON R., SHARPE P., SINGH Y.,FAIRLIE D.; Amyloid peptides and proteins in review. En: Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Vol. 159 (abr-2007); p. 1-77.

HAWE Andrea, SUTTER Marc, JISKOOT Wim, Extrinsic Fluorescent Dyes as Tools for Protein Characterization. En: Pharmaceutical Research, Vol. 25, No. 7, (Jul-2008); p.1487-1499.

HAWE Andrea, SUTTER Marc, JISKOOT Wim, Extrinsic Fluorescent Dyes as Tools for Protein Characterization. En: Pharmaceutical Research, Vol. 25, No. 7,(Jul-2008); p. 1487-1499.

HELDT Caryn, SORCI Mirco, POSADA David, HIRSA Amir, BELFORT Georges, Detection and reduction of microaggregates in insulin preparations. En: *Biotechnology and Bioengineering*. Vol.108, No 1 (ene-2011); p. 237–241.

ISEULT lynch, DAWSON kenneth a., protein-nanoparticle interactions. En: *nanotoday*. Vol. 3, No: 1, (feb-2008); p. 40-47.

JAVED Khan, ATIYATUL Qadeer, SDS Can Be Utilized as an Amyloid Inducer: A Case Study on Diverse Proteins, En: *Plos one*. Vol. 7, (ene-2012), p. e29694.

JIMÉNEZ José L., NETTLETON Ewan J., BOUCHARD Mario, ROBINSON Carol V., DOBSON Christopher M., SAIBI Helen R., The protofilament structure of insulin amyloid fibrils. En: *PNAS*. Vol. 99, No. 14, (jul-2002); p. 9196-9201.

KHURANA R., COLEMAN C., IONESCU-ZANETTI C., CARTER S., KRISHNA V., GROVER R., ROY R., SINGH S.. Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils. En: *J. Struct. Biol*. Vol. 151, No. 3, (sep-20005); p. 229–238.

KHURANA Ritu, IONESCU-ZANETTI Cristian, POPE Maighdlin, LI Jie, NIELSON Liza, RAMÍREZ-ALVARADO Marina, A General Model for Amyloid Fibril Assembly Based on Morphological Studies Using Atomic Force Microscopy. En: *Biophysical Journal*, Vol. 85 (Ago-2003); p. 1135–1144.

KREBS M., BROMLEY E., ROGERS S., DONALD A., The mechanism of amyloid spherulite formation by bovine insulin. En: *Biophys J*. Vol. 88 No. 3 (mar-2005); 2013-2021.

KREBS Mark, MACPHEE Cait, MILLE Aline, DUNLOP Iain, DOBSON Christopher, DONALD Athene. The formation of spherulites by amyloid fibrils of bovine insulin. En: *PNAS*, Vol. 101, No. 40 (oct-2004); p.14420–14424.

LIYASOVA Mariya, SCHOPFER Lawrence, LOCKRIDGE Oksana. Reaction of human albumin with aspirin in vitro: Mass spectrometric identification of acetylated lysines 199, 402, 519, and 545. En: *Biochemical Pharmacology*. Vol. 79 (2010); p. 784–791.

LORENZO-VELAZQUEZ P, MORENA A., farmacología básica y clínica. 18ª edición. Buenos aires: médica panamericana, 2008. Pag: 519

MAREK Peter, ABEDINI Andisheh, SONG BenBen, KANUNGO Mandakini, JOHNSON Megan E., GUPTA Ruchi, ZAMAN Warda. Aromatic Interactions Are Not Required for Amyloid Fibril Formation by Islet Amyloid Polypeptide but Do Influence the Rate of Fibril Formation and Fibril Morphology. En: *Biochemistry*. Vol. 46. No. 11. 2007; P.3255-3261.

MCMURRY, J., Química Orgánica, 5ª. Edición, México, Ed. International Thomson Editores, S.A. de C.V., 2001. Pág.782.

MURAT İNANÇ Cengiz, KUDDUSI Cengiz. Amyloidosis – an insight to disease of systems and novel therapies. Croacia: InTech, 2011. Pág. (77-85).

NIELSEN Liza, KHURANA Ritu, COATS Alisa, FROKJAER Sven, BRANGE jens, VYAS Sandip , UVERSKY Vladimir, FINK Anthony. Effect of Environmental Factors on the Kinetics of Insulin Fibril Formation: Elucidation of the Molecular Mechanism. En: *Biochemistry*. Vol. 40, No: 20 (abr-2001); p. 6036–6046.

NIELSEN L., FROKJAER S., BRANGE J., Probing the Mechanism of Insulin Fibril Formation with Insulin Mutants. En: *Biochemistry*. Vol. 40, No 28 (jun-2001); p. 8397–8409.

Non-Contact mode (en línea), Fecha: 02 de enero de 2014, disponible en (<http://www.ntmdt.com/spm-principles/view/non-contact-mode>).

PAREDES GUERRERO, Daissy Julieth. ESTUDIO DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA SOBRE *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*. Bucaramanga, pag: 30. UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER, Facultad de ciencias, Escuela de Química.

PODESTÀ Alessandro, TIANA Guidop, MILANI Paolo, MANNO Mauro, Early Events in Insulin Fibrillization Studied by Time-Lapse Atomic Force Microscopy. En: *Biophysical Journal*, Vol. 90, No. 2, (ene-2006); p. 589-597.

PORA Yair t, ABRAMOWITZ Adel, GAZIT Ehud. Inhibition of Amyloid Fibril Formation by Polyphenols: Structural Similarity and Aromatic Interactions as a Common Inhibition Mechanism. En: *Chemical biology and drug design*. Vol. 67, 2006. P. 27-37.

POWERS Evan T., POWERS David L., The Kinetics of Nucleated Polymerizations at High Concentrations: Amyloid Fibril Formation Near and Above the “Supercritical Concentration”. En: *Biophysical Journal*. Vol. 91. No. 1, (Jul-2006); p. 122–132.

RICHARDSON JS, RICHARDSON DC: Natural β -sheet proteins use negative design to avoid edge-to-edge aggregation. En: *Proc Natl Acad Sci*. Vol. 99, No. 5 (may-2002); p.2754-2759.

ROGERS S., KREBS M., BROMLEY E., VAN DER LINDEN E., DONALD A., Optical microscopy of growing insulin amyloid spherulites on surfaces in vitro. En: *Biophys. J*. Vol. 90 (2006); p. 1043 -54.

SARTOR Marta, DYNAMIC LIGHT SCATTERING, University of California San Diego. (En línea), Fecha: 15 septiembre 2012. Disponible en: http://physics.ucsd.edu/neurophysics/courses/physics_173_273/dynamic_light_scattering_03.pdf.

SERIO Tricia R., CASHIKAR Anil G., KOWAL Anthony S., SAWICKI George J., MOSLEHI JAHAN J., SERPELL Louise, ARNSDORF Morton F., LINDQUIST Susan L. Nucleated conformational Conversion and the Replication of Conformational Information by a Prion Determinant. En: science. Vol. 289. No. 25 august 2000´.

SMITH Michael, FODERÀ Vito, SHARP James, ROBERTS Clive, DONALD Athene. Factors affecting the formation of insulin amyloid spherulites. En: Colloids and Surfaces B: Biointerface. vol.89, No. 1 (ene-2012); p. 216–222.

THIRUMALAI D, KLIMOV DK, DIMA RI, Emerging ideas on the molecular basis of protein and peptide aggregation. En: Current Opinion in Structural Biology. Vol. 13, No. 2 (abr-2003; p. 146-159.

WANG JB, WANG YM, ZENG CM. Quercetin inhibits amyloid fibrillation of bovine insulin and destabilizes preformed fibrils. En: Biochem. Biophys. Res. Vol. 415; p. 675–679.

WETZEL Ronald, Ideas of Order for Amyloid Fibril Structure Review, En: Structure, Vol. 10, (Ago-2002); p. 1031–1036.

WHITTINGHAM JL, SCOTT DJ, CHANCE K, WILSON A, FINCH J, BRANGE J, Guy Dodson G. Insulin at pH 2: structural analysis of the conditions promoting insulin fibre formation. En: J Mol Biol. vol. 318, No 2. (abr-2002); p. 479-90.

WOOD Debra. Diabetes tipo 2 (en línea), fecha: 15 septiembre 2012, disponible en (<http://www.empowher.com/media/reference/diabetes-tipo-2>).

Y. Martin, C.C. Williams, H.K. Wickramasinghe. Atomic Force Microscope-Force Mapping and Profiling on a sub-100 Angstrom Scale. En: J. Appl. Phys., Vol. 61, No. 10, (May- 1987); p.4723-4729.