

---

---

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE  
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

PARA OBTENER EL GRADO DE  
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

## **Análisis de la expresión de alfa- y beta- sinucleína en isquemia focal en un modelo de rata.**

QUE PRESENTA LA ALUMNA

**Arteaga Garcia Yasmin**

Matrícula  
2142035150

ASESORES:

Asesor interno  
Dra. Ana María Rosales Torres  
No. económico 09283  
Depto. Producción agrícola y animal

Asesor externo  
Dra. Alma Ortiz Plata  
Depto. Patología experimental

Ciudad de México a.

17 de febrero de 2020

## Resumen de la investigación.

La isquemia cerebral (IC) es una enfermedad cerebrovascular causada por la disminución del aporte sanguíneo a causa de un estrechamiento u obstrucción en los vasos sanguíneos provocando baja del suministro de oxígeno y glucosa, y alteración de los metabolitos de alta energía; debido a la importancia de la mitocondria en los procesos síntesis de los metabolitos de alta energía y su participación de manera clave en la muerte celular es importante analizar las proteínas y los cambios en su expresión en episodios isquémicos. Previamente por estrategia proteómica se identificó la presencia de  $\alpha$  y  $\beta$ -sinucleína durante la IC-focal en un modelo de rata, proteínas fuertemente vinculadas genética y patológicamente a la enfermedad de Parkinson y otras enfermedades neurodegenerativas. Por ello el objetivo de esta investigación es analizar la expresión de dichas proteínas en isquemia cerebral focal (ICF) en un modelo de rata y las alteraciones ultraestructurales que se producen durante la ICF. Para esto se trabajó con ratas Wistar-macho (280g-320g) a las cuales se les indujo ICF por 15' y 1h, 15' y 1h con reperusión sanguínea (rpf) por 24h. Se obtuvo material biológico de la región de la corteza (Cx), hipocampo (Hp) y cuerpo estriado (CE), se realizó análisis histológico, ultraestructural y de expresión proteica por inmunohistoquímica contra las proteínas de interés y por Western Blot (WB) con proteínas de fracción mitocondrial y proteínas totales de citosol. Resultados: Se observó que a partir de los 15min de IC se presentaron síntomas conductuales de deficiencia neurológica. Histológicamente hubo daño en el neurópilo, edema citotóxico y vasogénico, y presencia de células picnóticas. Por inmunohistoquímica  $\alpha$ -sinucleína mostró mayor señalización citoplásmica en Hp y CE en los grupos experimentales;  $\beta$ -sinucleína mostró reacción positiva en CE e Hp, siendo mayor su localización nuclear en la región de Hp. Por WB  $\alpha$ -sinucleína fue débil en todos los grupos experimentales, habiendo mayor expresión en corteza e hipocampo de las proteínas de la fracción mitocondrial.  $\beta$ -sinucleína mostró expresión en proteínas de citosol y fracción mitocondrial, en las tres regiones cerebrales, con aumento en la fracción mitocondrial en 1h/24rpf en Hp y en 15', 15'/24rpf y 1h/24rpf en CE. En conclusión los daños producidos tras un evento isquémico se pueden observar a partir de los primeros 15 minutos y van aumentando de acuerdo al tiempo que dure dicho episodio. La expresión  $\alpha$ -y  $\beta$ -sinucleína tuvo mayor visibilidad en los grupos isquémicos y presencia en núcleo neuronal lo cual no se encuentra reportado actualmente.

Palabras claves: Isquemia cerebral, mitocondria,  $\alpha$ -synucleína,  $\beta$ -sinucleína.

# Índice

<b>Marco teórico</b> .....	4
Proteómica .....	5
Alfa-sinucleína .....	5
Beta-sinucleína .....	6
<b>Objetivos</b> .....	7
Objetivo general .....	7
Objetivos particulares .....	7
<b>Método</b> .....	8
Cirugía y obtención del tejido cerebral.....	8
Histología .....	8
Biología Molecular .....	9
Análisis ultraestructural .....	11
<b>Resultados</b> .....	12
Análisis histológico .....	12
Análisis ultraestructural.....	13
Análisis por Inmunohistoquímica.....	19
Análisis proteico por Western Blot. ....	22
<b>Discusión</b> .....	24
<b>Conclusión</b> .....	26
<b>Agradecimientos</b> .....	28
<b>Referencias</b> .....	28

## Introducción

La isquemia cerebral es una enfermedad cerebrovascular la cual está originada por la disminución del flujo sanguíneo debido a la oclusión de un vaso, esta baja en el aporte sanguíneo puede ser tan grande que puede interferir con la función del sistema nervioso (Castillo, 2000). Éstas pueden ser de forma generalizada, llamada isquemia global, o en una parte determinada del cerebro, por la oclusión de una arteria en particular conocida como isquemia focal (Díez *et al.*, 2001). La enfermedad cerebrovascular (ECV) es uno de los principales problemas de salud pública en todos los países industrializados ya que de acuerdo con la OMS, ésta representa la tercera causa de muerte y la primera de invalidez en los adultos y genera una muerte cada 3 a 4 minutos, causando una mortalidad anual de más de 137 265 personas (Cassiani y Borrero, 2013; Ávila *et al.*, 2012). En México, se estima que la EVC contribuye con la mitad de los problemas neurológicos y representa la tercera causa de mortalidad general entre la población (Rodríguez, 2016; Baños *et al.*, 2011), cuarto lugar entre el género femenino y sexto en el masculino (Ávila *et al.*, 2012). Debido a la falta del aporte sanguíneo al cerebro a causa de la oclusión de un vaso o arteria, se desencadenan una serie de eventos bioquímicos conocidos como cascada isquémica la cual inicia con la pérdida de energía y termina con muerte neuronal (Arauz y Ruíz, 2012). En el daño celular tras un evento isquémico los mecanismos de necrosis juegan un papel importante, estos mecanismos son mediados por fenómenos de excitotoxicidad el cual se desencadena por el incremento en calcio citoplásmico a través de diversos canales dependientes de voltaje, por la activación de enzimas líticas, por un exceso de óxido nítrico y la formación de radicales libres, al igual que existe respuesta inflamatoria. Por otro lado las concentraciones moderadas de calcio intracelular favorecen la expresión de genes de muerte inductores de apoptosis (Alonso, 2011). El cerebro demanda gran cantidad de energía que la obtiene a través de ATP producto de la glucólisis aerobia y la reducción del oxígeno en la mitocondria para mantener su integridad funcional. Este proceso es afectado por la isquemia cerebral (IC) debido a la interrupción del flujo sanguíneo, por lo que se ha propuesto que las proteínas mitocondriales juegan un papel importante en el daño isquémico según Villafuerte *et al.*, (2017). De las proteínas mitocondriales previamente identificadas a partir de un perfil proteómico en IC,  $\alpha$  y  $\beta$ -synucleína juegan un papel considerable en la patología, pero aún no se cuenta con información suficiente. Para ello, se pretende analizar la expresión de dichas proteínas en el modelo de isquemia cerebral focal (ICF) en rata, así como la evaluación de las alteraciones celulares y ultraestructurales que se producen durante el evento de isquemia cerebral focal inducido en un modelo de rata.

## Marco teórico

Como consecuencia de la isquemia cerebral se presentan cambios en la expresión genética y de proteínas a nivel celular por lo que en un trabajo previo realizado en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “MANUEL VELASCO SUÁREZ” con el título “Identificación y caracterización de proteínas citoplásmicas y mitocondriales, del cuerpo estriado e hipocampo en la isquemia cerebral focal en un modelo de rata”, se estudiaron los cambios de expresión de proteínas las cuales fueron identificadas por espectrometría de masas. Dentro de las proteínas identificadas en este estudio se encontró la presencia de dos proteínas denominadas  $\alpha$  y  $\beta$ -sinucleína las cuales están fuertemente vinculadas con enfermedades neurodegenerativas pero de las que no se cuenta con información en enfermedades cerebrovasculares tal como la isquemia cerebral. Para la realización de mi servicio social

me incorporé al equipo de trabajo de éste proyecto, para colaborar con el análisis de la expresión de dichas proteínas en un evento isquémico producido en un modelo de rata.

## Proteómica

La secuencia del genoma humano y de una variedad de organismos, han revolucionado la biología y medicina, sin embargo, una vez concluida la secuenciación del genoma humano, es necesario disponer de técnicas que permitan comprender la relación entre la expresión de los genes y problemas biológicos tales como el conocimiento de las propiedades de las proteínas y cuáles son las responsables de las funciones celulares, teniendo así sesgos en el estudio del daño al sistema nervioso. Para esto es precisamente el campo de la proteómica, ciencia dedicada al estudio de la expresión de las proteínas y de sus cambios en dependencia del contexto biológico. La proteómica es una técnica que se basa en la separación y la identificación de muchas proteínas (en el orden de mil o más) simultáneamente. Muchos de los métodos utilizados en proteómica permiten obtener un despliegue (u ordenamiento o arreglo) físico de mezclas muy complejas de proteínas las cuales pueden ser separadas mediante la combinación de dos o más técnicas de separación. Esta información nos permite identificar y asignar las funciones de las proteínas involucradas en la patogénesis de enfermedades o envejecimiento (Castellanos *et al.*, 2001)

## Alfa-sinucleína

La  $\alpha$ -sinucleína es una proteína citosólica neuronal pequeña (14 kDa) abundante que se localiza predominantemente en las terminales presinápticas (a nivel de las terminales nerviosas en estrecha proximidad con vesículas sinápticas del sistema nervioso central) y se presenta sólo en vertebrados. Regula la función presináptica, la liberación de neurotransmisores, la unión de ácidos grasos, la regulación fisiológica de ciertas enzimas, así como las funciones en la supervivencia neuronal, al igual que está fuertemente vinculada genética y patológicamente a la enfermedad de Parkinson y otras enfermedades neurodegenerativas (Fortin , *et al.*, 2008). Si bien la acumulación de  $\alpha$ -sinucleína en forma de oligómeros mal plegados y grandes agregados define múltiples enfermedades neurodegenerativas denominadas "sinucleinopatías", su función celular sigue siendo en gran parte poco clara ya que sólo se conocen funciones putativas en condiciones normales (Burré, 2018; Pacheco, 2013). La  $\alpha$ -sinucleína es una proteína de 140 residuos que se expresa de manera predominante y ubícua en el cerebro, en particular en todo el neocórtex, el hipocampo, el bulbo olfatorio, el estriado, el tálamo y el cerebelo en el cerebro de rata (Burré, 2015).

Dentro del sistema nervioso, la expresión de  $\alpha$ -sinucleína está regulada por el desarrollo. La expresión del ARNm de  $\alpha$ -sinucleína comienza en estadios embrionarios tardíos en roedores, alcanza un pico en las primeras semanas postnatales y luego se reduce. La  $\alpha$ -sinucleína se distribuye desde el soma hasta los terminales presinápticos durante las primeras semanas de desarrollo en roedores y en humanos, donde se asocia con vesículas sinápticas. Se cree que la interacción entre la  $\alpha$ -sinucleína y las superficies lipídicas de la célula es una característica clave para mediar sus funciones celulares. Sorprendentemente, aunque está altamente concentrada en los terminales presinápticos, la  $\alpha$ -sinucleína es una de las últimas proteínas en alcanzar la sinapsis. Por otro lado, la fosforilación de la  $\alpha$ -sinucleína regula su estructura, la unión a la membrana, interacciones de proteínas, oligomerización, formación de fibrillas y neurotoxicidad, aunque las quinasas y fosfatasas exactas que regulan la fosforilación de la  $\alpha$ -sinucleína siguen siendo desconocidas (Burré, 2015; Fortin *et al.*, 2008). Cabe mencionar que a pesar que es una proteína citosólica se ha descrito una asociación entre la  $\alpha$ -sinucleína y la morfología mitocondrial, la

sobreexpresión de  $\alpha$ -sinucleína da lugar a mitocondrias anormalmente grandes que muestran la vacuolización de las crestas (Galindo *et al.*, 2014).

### Beta-sinucleína

La proteína  $\beta$ -sinucleína se expresa ampliamente en todo el sistema nervioso central; al igual que  $\alpha$ -sinucleína se localiza en los terminales sinápticos, y se superponen con la expresión de ésta en ciertas áreas del cerebro, sin embargo, las funciones fisiológicas de ambas proteínas siguen siendo desconocidas (Burré, 2018). Los hallazgos recientes han apoyado la opinión de que la  $\beta$ -sinucleína puede actuar como un regulador de protección de la neurotoxicidad inducida por la  $\alpha$ -sinucleína, ya que  $\beta$ -sinucleína suprime fuertemente tanto la agregación inducida por lípidos como la nucleación secundaria de  $\alpha$ -sinucleína, al competir por los sitios de unión en las superficies de las vesículas lipídicas y las fibrillas, respectivamente. Por lo tanto, se sugiere que  $\beta$ -sinucleína puede actuar como un inhibidor natural de la agregación de  $\alpha$ -sinucleína al reducir tanto el inicio de su autoensamblaje como la proliferación de sus agregados, teniendo así capacidad neuroprotectora más que neurodegenerativa (Taschenberger, *et al.*, 2013; Brown, *et al.*, 2016).

Sin embargo, se cree que todas las sinucleínas pueden estar involucradas en enfermedades neurodegenerativas. Un ejemplo de esto es que, aunque esta proteína está ausente de los cuerpos de Lewy (enfermedad neurodegenerativa provocada por la acumulación de proteínas en determinadas zonas del cerebro) se han identificado polimorfismos en la sinucleína  $\beta$  que predispone a la demencia con cuerpos de Lewy y la enfermedad del cuerpo de Lewy difusa, mientras que la coexistencia de  $\beta$ -sinucleína con  $\alpha$ -sinucleína en las inclusiones neuronales de tipo esferoide en la enfermedad de Parkinson, en la demencia con los cuerpos de Lewy y la PKAN también lo demuestra (Burré, 2015).

## Objetivos

### Objetivo general

Analizar los cambios en la expresión de las proteínas  $\alpha$ - y  $\beta$ -sinucleína en corteza cerebral, cuerpo estriado e hipocampo así como alteraciones histológicas y ultraestructurales, durante la isquemia cerebral focal (ICF).

### Objetivos particulares

1. Identificar los niveles de expresión de las proteínas  $\alpha$ - y  $\beta$ -sinucleína en corteza cerebral, cuerpo estriado e hipocampo con ICF de 15 min, 1h, 15 min con 24h de reperfusión y 1h con 24h de reperfusión.
2. Analizar las alteraciones histológicas y ultraestructurales producidas por la isquemia cerebral focal, en la corteza cerebral, cuerpo estriado e hipocampo, en los diferentes grupos experimentales.

## Método

### Cirugía y obtención del tejido cerebral

Para la obtención del material biológico se emplearon ratas de la cepa Wistar, machos con un peso aproximado de 280 a 320g. A los ejemplares seleccionados se le realizó cirugía con el fin de inducir un evento isquémico de acuerdo a la técnica descrita por Longa, *et al.*, (1989)

Se indujo la isquemia cerebral focal en el hemisferio izquierdo; el ejemplar se anestesió con una mezcla de isoflurano-oxígeno en una dosis de 2.5 a 3%, administrado con una mascarilla mediante un evaporador con un equipo de anestesia (Ohmeda, UK). Posteriormente se colocó la rata en una plancha en posición decúbito supina, se limpió y rasuró el cuello en donde se realizó un corte vertical para exponer la arteria carótida común con sus ramificaciones, arteria carótida externa y arteria carótida interna por la cual se introdujo vía intraluminal un hilo de nylon monofilamento de 3-0 de 17 mm de longitud hasta ocluir la arteria cerebral media. Se produjo evento isquémico por los siguientes intervalos de tiempo: 15 minutos y 1h de ICF sin restablecimiento de la circulación sanguínea (reperusión), 15min y 1h de ICF con 24h de reperusión. Como controles se emplearon dos grupos denominados control y sham (ejemplares con el procedimiento quirúrgico sin inducirle isquemia cerebral). A los individuos a los que se les provocó un episodio isquémico se les realizaron evaluaciones neurológicas, de acuerdo Capdeville, *et al.*, (1986), para medir el deterioro funcional después de dicho evento. La evaluación consistió en observar movimiento espontáneo al colocarla sobre una mesa, flexión de la pata delantera derecha, giros hacia la derecha.

Una vez transcurrido el tiempo, los individuos se sacrificaron. Bajo anestesia se realizó perfusión intracardiaca con solución salina-heparina al 2.5%, posteriormente se hizo pasar fijador de paraformaldehído al 4% - PBS 0.1 M pH 7.4 con el fin de conservar el tejido. En frascos previamente etiquetados y con paraformaldehído 4% se depositaron los cerebros y se dejaron en fijación por una hora. Transcurrido el tiempo se realizaron cortes coronales con la ayuda de una matriz de corte para exponer las zonas del hipocampo y cuerpo estriado y se fijaron por 18 horas más en el mismo fijador. Los tejidos de las zonas del hipocampo y cuerpo estriado fueron colocados en cassettes plásticos para ser deshidratados en series de alcohol de concentración ascendente, aclarados en Xilol y embebidos en parafina en un procesador automático de tejidos (Histokinette 2000, Reichert-Jung). Los tejidos fueron incluidos en bloques de parafina que fueron cortados en micrótomos (HistoSTAT, Reichert) a un grosor de 4  $\mu$ m, algunos de los cortes obtenidos se montaron en portaobjetos los cuales fueron utilizados en la tinción de hematoxilina y eosina, otros cortes fueron montados en portaobjetos pre-tratados con una solución (1:10) de poly-L-Lisina (Sigma, Life Science, USA) en los cuales se realizó la técnica de inmunohistoquímica.

### Histología

#### Tinción de Hematoxilina y Eosina.

Los cortes que se elaboraron de las regiones hipocampo y estriado, se identificaron con un número seriado (Ejem.E-162-18). Una vez identificados se llevaron a un proceso de desparafinación con xilol e hidratación en soluciones de alcohol de concentraciones descendentes, hasta agua destilada; posteriormente los tejidos se tiñeron con hematoxilina por un minuto, se viraron en carbonato de litio por 20 segundos y se tiñeron con Eosina por 10 segundos, seguido a esto se deshidrataron en soluciones de alcohol de concentración gradual ascendente, aclarados en Xilol y montadas con la resina Entellan



(Merk) (Técnica modificada de Montalvo, 2010). Posteriormente se realizó el análisis bajo un fotomicroscopio óptico Nikon (Japon).

### Inmunohistoquímica

Con el fin de evaluar la expresión de  $\alpha$  y  $\beta$  synucleina durante el evento isquémico se realizó la técnica de Inmunohistoquímica, la cual gracias a la especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo, permite localizar el sitio de expresión de las proteínas. Esta técnica fue realizada de acuerdo a Prophet *et al.*, (1995). A los tejidos montados en laminillas con poly-L-Lisina se le realizó un proceso de desparafinación e hidratación (como se explicó anteriormente); se realizó recuperación antigénica con un amortiguador comercial (Reveal Decloaker, Biocare Medical) en baño María en una olla de presión por 1 min, y se bloqueó la peroxidasa endógena en una solución de peróxido de hidrógeno 0.3% por 20 min. Se incubaron en 500  $\mu$ l de cloruro de amonio 50mM por 30 minutos sin dejar secar la laminillas, pasado el tiempo se enjuagaron con agua destilada. Se realizaron enjuagues en PBS y PBS-Tritón por 3 min cada uno; se incubaron en el anticuerpo primario Alfa-Syn (1:250; Genetex) y Beta-Syn (1:200; Genetex) por toda la noche a 4° C en una cámara húmeda. Después se realizó enjuague en PBS-Tritón y se incubó en el anticuerpo secundario biotinilado por 30 min (Super Sensitive MultiLink BioGenex), se enjuagó en el mismo amortiguador y se incubó en Streptavidin Peroxidasa (Supr Sensitive HRP Label, BioGenex) por 30 min y se enjuagó con el amortiguador. Se reveló con diaminobencidina (2-Component DAB Pack, BioGenex), cromógeno el cual crea precipitados marrón indicando la presencia de la proteína. La laminilla se contra tiñó con Hematoxilina por 20 segundos, se pasaron por carbonato de litio, se deshidrataron en soluciones de alcohol de concentración gradual ascendente, aclarados en Xilol, se montaron con la resina Entellan (Merk) y se observaron en el microscopio óptico Nikon (Japon)

### Biología Molecular

#### Extracción de proteínas citosólicas y de la fracción mitocondrial

Se empleó otro grupo de ratas experimentales. Cada tiempo experimental (15 minutos de ICF, 15min y 1h de ICF con 24h de reperfusión, y un grupo control) consto de tres individuos a los cuales se les indujo episodio isquémico y se sacrificaron con un mililitro de Pentobarbital sódico intracardiaco, de este material se extrajeron proteínas del citosol y fracción mitocondrial según un método ya descrito por Orozco *et al.*, (2018). Se extrajo el material en fresco con el que se realizó un pool de tejido de cada una de las regiones (corteza cerebral, hipocampo y estriado) y se colocaron en buffer MSEGTA (Manitol, Sacarosa, HEPES 100mM, EGTA10mM, pH-7). Los tejidos se procesaron de forma mecánica con un homogenizador en buffer MSEGTA, el contenido se centrifugó a 500 g por 5 minutos, se obtuvo el sobrenadante y se centrifugó nuevamente a 14000 g por 10 minutos. Se recuperó la fracción citosólica que se encuentra en el sobrenadante y el pellet obtenido se re-suspendió en buffer MSEGTA 1ml+ digitoxina 3 $\mu$ l, esta mezcla se centrifugó a 14000g por 10 minutos. Se deshecho el sobrenadante y se lavó el pellet re-suspendiéndolo en 0.4 ml de 12% percoll-buffer + MSEGTA. De esta mezcla se tomaron 0.2ml y se le agregó 1 ml de 24% percoll-buffer + MSEGTA y se centrifugó a 18000g por 15 minutos. Se tomó 0.9 ml procurando retirar todo lo turbio de la muestra y se añadió 1.2 ml MSEGTA, se centrifugó a 18000 g por 5 minutos. Se retiró 1.5 ml de sobrenadante y el pellet se resuspendió en el resto del buffer MSEGTA sobrante del tubo, posteriormente de le añadió 1.5 ml MSEGTA, se mezcló y se centrifugó a 14000 g por 15 minutos. Por último se desechó sobrenadante y el pellet se resuspendió en 0.1 ml de buffer MSEGTA.

## Western Blot

Las muestras de la fracción mitocondrial y citosólica se dividieron por región cerebral (corteza, hipocampo y estriado). Previamente a la electroforesis se determinó la concentración de proteína por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

Se calculó el volumen de muestra a tomar para tener la concentración de proteína deseada a partir de la siguiente fórmula:

$$\mu\text{g de proteína} = \mu\text{g de proteína deseada} * 1000 / \mu\text{g/ml de proteína de la muestra obtenida por el método de Lowry}$$

La concentración de la carga de muestra fue de un aproximado de 30  $\mu\text{g}$  de proteína para la fracción citosólica y 50  $\mu\text{g}$  de proteína para la fracción mitocondrial.

Se realizaron geles de acrilamida-bisacrilamida al 15% (acrilamida 29%- bis-acrilamida 1%; Tris 1.5M-pH-8.8; Tris 0.5M-pH-6.8; Duodecil sulfato de sodio 10%; Persulfato de amonio 10%; TEMED), con un grosor de 1.5 mm.

A las muestras se le añadió buffer de carga 1x (desnaturalizante) (Tris-HCl 50mM, pH-6.8, Mercaptoetanol 0.2%, Duodecil sulfato de sodio 2%, azul de bromofenol 0.1%, glicerol 10%) completando un volumen total de 40  $\mu\text{l}$ , las muestras fueron homogenizadas en vortex y se incubaron a 100°C por 5 minutos con una agitación de 500 RPM (Labnet accuTherm). Posteriormente se centrifugaron y se mantuvieron a temperatura ambiente. En el primer pozo se colocó un control de peso molecular (PageRule Plus, Thermo Scientific) y en los pozos posteriores se distribuyeron las muestras por fracción/región y tiempo experimental. Se le añadió buffer a la cámara de electroforesis (Tris base 25mM, Glicina 250mM y SDS 0.1%) y una vez finalizada la carga, el gel se sometió a un campo electromagnético generado por una fuente de alimentación a 100 volts. El progreso del gel se monitoreó observando el frente de corrida y la posición de los marcadores de peso molecular. Una vez que se desplegaron los pesos del marcador, se termina la electroforesis y las proteínas del gel se transfieren a una membrana de nitrocelulosa (Amersham<sup>TM</sup> Hybond-ECL, GE Healthcare), la cual se activó por 2 minutos en agua destilada y 20 minutos en buffer de transferencia (Tris base 25mM, metanol 20%, Glicina 192 mM y SDS 0.1%). Se realizó un “sándwich” con esponjas, papel filtro, la membrana activada, el gel y cassettes en húmedo con buffer de transferencia, a éste se aplican 400 Amperes por 45 minutos. Posteriormente a la membrana se le realizó bloqueo con leche descremada (Difco, Skim Milk) al 5% disuelto en PBS-T por 90 minutos a 25 RPM y se eliminó el excedente con PBS-T. Se depositó cada membrana en una bolsa plástica y se disminuyó la mayor área sobrante posible, se incubó con el anticuerpo primario Alfa-Syn (1: 1000; Genetex) y Beta-Syn (1:1000; Genetex) diluido en amortiguador salino de fosfatos-Tween (PBS-T) toda la noche a 4°C. Después de la incubación se recuperó anticuerpo primario y la membrana se enjuagó con amortiguador salino de fosfatos-Tween. Posteriormente se incubó en el anticuerpo secundario (rabbit IgG 1:20,000) durante 60 minutos con una agitación de 50 RPM a temperatura ambiente, se enjuagó con PBS-T y se realizó la detección por quimioluminiscencia ocupando el kit 1:1 (SuperSignal, West Femto, Thermo) en la cámara (Fusion FX7 VILBER, Francia) (Colín *et al.*, 2013).

## Análisis ultraestructural

### Microscopia electrónica.

Para este ensayo se emplearon 6 grupos diferentes con 2 ejemplares en cada uno. Estos grupos se clasificaron en control, sham, individuos con 15 min y 1h de ICF; individuos con 15 min ICF y 1h de ICF con 24 hrs de RPF. Los individuos fueron perfundidos vía intracardiaca con paraformaldehído al 4% en PBS 0.1 M pH 7.4 y de cada uno se disecó la zona del hipocampo, corteza y cuerpo estriado del hemisferio izquierdo. Los tejidos obtenidos fueron colocados en el mismo fijador por 1 h, seguido de esto se realizó el procesamiento en resina hidrofílica LR- White. Los tejidos se deshidrataron con alcohol a diferentes concentraciones, se pre-incluyeron en una mezcla de alcohol absoluto y resina, posteriormente se incluyeron en resina pura 12 horas con 3 cambios posteriores de 1 hora y se polimerizaron a 60°C por 48hr en una capsula de gelatina.

Con los tejidos incluidos en bloques de resina se elaboraron cortes semifinos de 1 µm de grosor en un ultramicrotomo (American optical, Drukker International), los cuales fueron montados en laminillas y teñidos con azul de toluidina que se observaron en microscopio óptico (Olympus BH-2, Japón). Una vez seleccionados los tejidos a analizar, se elaboraron cortes finos de aproximadamente 60 nm de grosor en el espectro gris plata de colores de interferencia, los cuales fueron montados en rejillas de cobre cubiertos con membrana de colodión (EMS). Los cortes fueron contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo y observados en microscopio electrónico Jeol JEM-1400 (Japón).

.

# Resultados

## Análisis histológico

### Tinción por H&E

El análisis histológico evaluado por tinción de hematoxilina-eosina mostró daño celular producido por el evento isquémico a partir de 15 minutos de ICF, el cual fue en aumento en relación al tiempo de isquemia y reperfusión mostrando un mayor el número de células afectadas cuando el tiempo del episodio isquémico fue mayor y en los grupos donde se reestableció el flujo sanguíneo (reperfusión).

Como podemos observar en la figura 1, las células dañadas que se caracterizan por ser más pequeñas, por perder su estructura normal al igual que retracción del núcleo con condensación de la cromatina (células picnóticas). También podemos ver que en el neurópilo existen alteraciones estructurales con dilataciones de las prolongaciones membranales. Conforme el tiempo del evento isquémico fue mayor y en los casos donde el flujo sanguíneo se reestableció se presentaron mayor número de neuronas con edema (daño citotóxico) y edema vascular (daño vasogénico) teniendo así una disminución considerable de neuronas morfológicamente normales, las cuales se caracterizan por ser células con ligera disminución en el volumen citoplasmático, ligera o nula alteración de la membrana nuclear y ausencia de edema citotóxico, las cuales se pueden observar en los grupos control y sham.

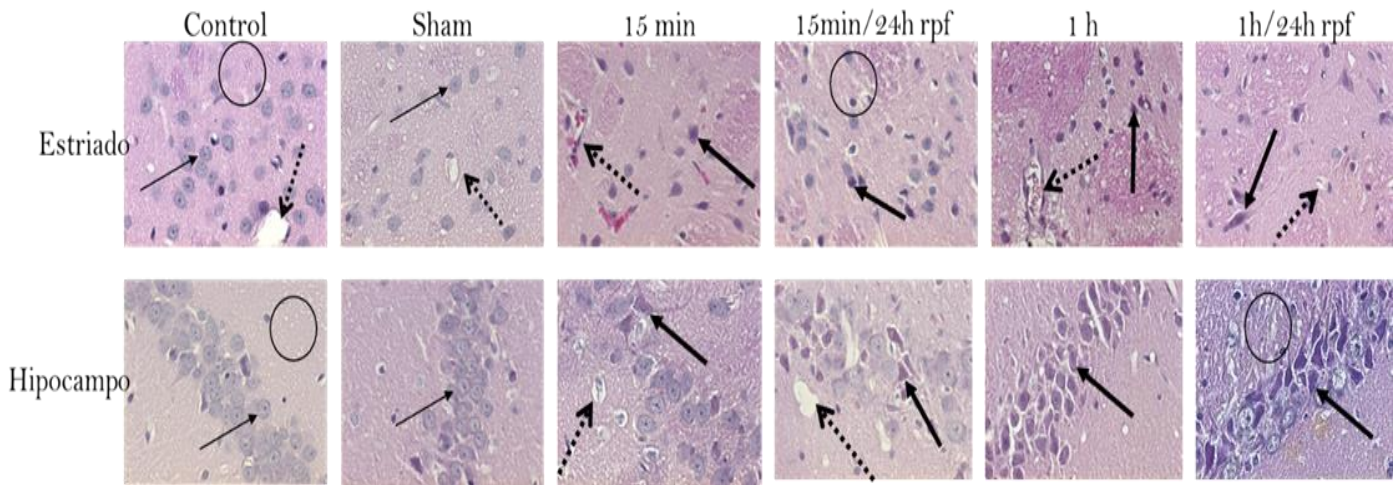


Figura 1. Cortes coronales de cerebro de rata con un grosor de 4  $\mu$ m, teñidos con hematoxilina y eosina (40X). En los grupos control y sham se puede observar el neurópilo (circulo), neuronas (flecha continua) y vasos (flecha discontinua) conservados tanto en estriado como hipocampo. Los grupos isquémicos (15 min, 15min/24hrpf, 1h y 1h/24hrpf) presentan daño celular: neuronas con núcleo picnótico y edema citotóxico (flecha continua), vasos sanguíneos con edema (flechas discontinuas) y daño en neurópilo (circulo).

## Análisis ultraestructural.

Estructuralmente, tras un evento isquémico las células sufren daño los cuales pueden ser estudiados de manera más profunda a través de un análisis ultraestructural, mediante microscopía electrónica.

Conforme mayor es el tiempo del evento isquémico el daño va aumentando y va siendo más evidente tanto en la estructura de la neurona, células de la glía y unidad neurovascular, como en los organelos que la componen. Como se puede observar en el grupo control de la figura 2, las neuronas a las cuales no se les privó de flujo sanguíneo se encuentran preservadas, vasos sanguíneos completos y conservados, neuropilo sin alteración. En el grupo de 15 minutos de isquemia se comienzan a observar alteraciones morfológicas. En corteza podemos distinguir neuronas con núcleo picnótico, en estriado e hipocampo algunas neuronas comienzan a tener edema citotóxico, alteraciones estructurales tanto en núcleo celular como en vasos sanguíneos, algunos de los vasos comienzan a presentar edema vasogénico y cambios visibles en neuropilo (figura 3). Cuando se reestableció el flujo sanguíneo después de 15 minutos de isquemia el daño es más notorio, los vasos sanguíneos (sobre todo de hipocampo y estriado) presentan edema, las alteraciones en neuropilo son más visibles al existir ruptura del mismo y las neuronas comienzan a tener alteraciones estructurales en núcleo (deformación de la membrana nuclear) y edema citotóxico, pudiéndose distinguir también en una célula la cual se encuentra cerca de un vaso (Hp-15min/24hrpf) (figura 4). Como se puede observar en una neurona de la corteza, las mitocondrias comienzan a presentar edema, se distinguen conservadas pero con mayor volumen.

A partir de 1 hora de evento isquémico y con restablecimiento de flujo sanguíneo (figuras 5 y 6) las alteraciones son mucho más visibles. Tanto los vasos como las neuronas comienzan a presentar edema muy marcado al haber desprendimiento total del neuropilo, comienzan a ser notorios los núcleos neuronales cuya cromatina comienza a fragmentarse y acumularse alrededor de la membrana nuclear teniendo como resultado la condensación de la misma, la doble membrana nuclear ya no es visible. Los organelos que conforman las neuronas también sufren modificaciones al presentar edematización con ruptura de membranas, mitocondrias inflamadas y sin membranas visibles, retículos endoplásmico y los núcleos de vasos dilatados.

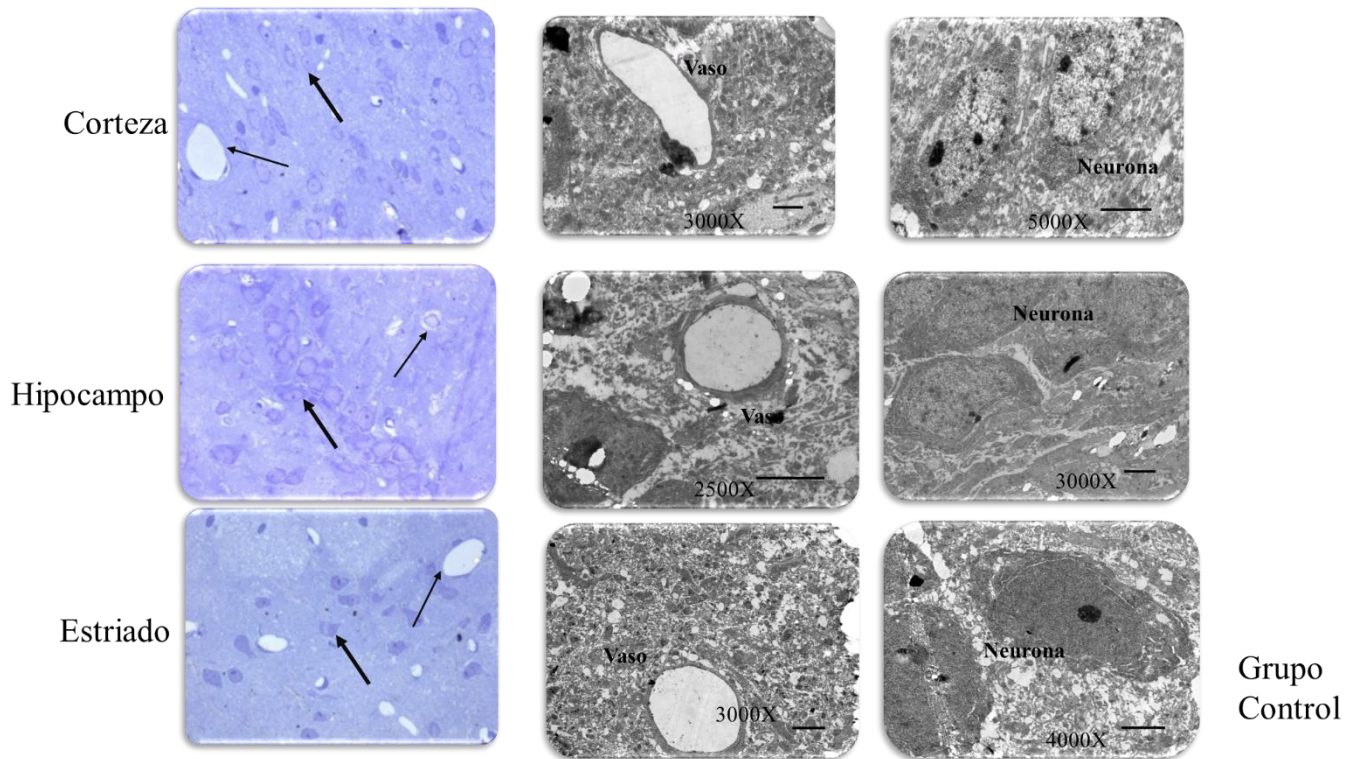


Figura 2. Análisis ultraestructural de la conformación morfológica en neuronas (flecha gruesa) de las regiones corteza, hipocampo y estriado de grupo control. Se muestra células con características normales, vasos sanguíneos (flecha delgada) sin alteración y neuropilo conservado. Vista de baja potencia 2500X.

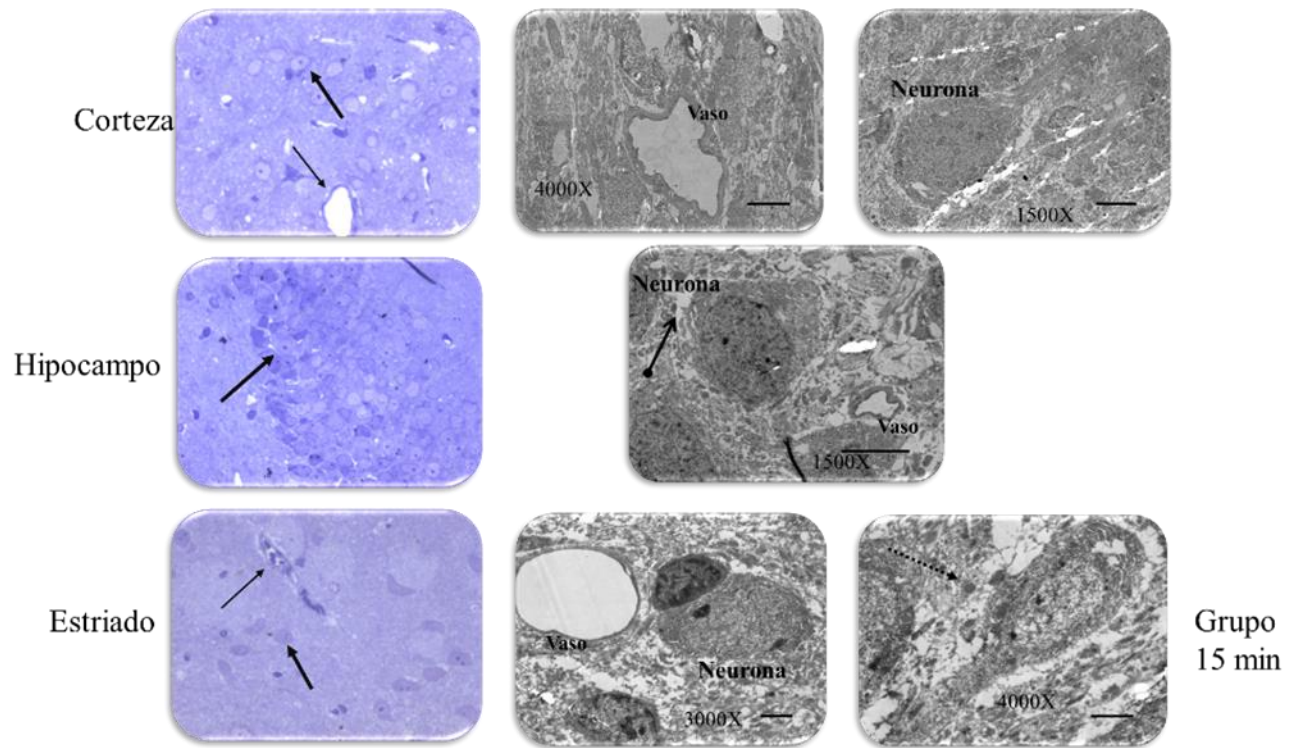


Figura 3. Análisis ultraestructural de la conformación morfológica en neuronas de las regiones corteza, hipocampo y estriado de grupo isquémico 15min. Se observan neuronas con edema citotóxico (flecha puntada) y núcleo picnótico (Corteza, 1500X), ligero daño estructural en mitocondria (flecha discontinua), edema vasogénico poco considerable y poco daño en neurópilo.

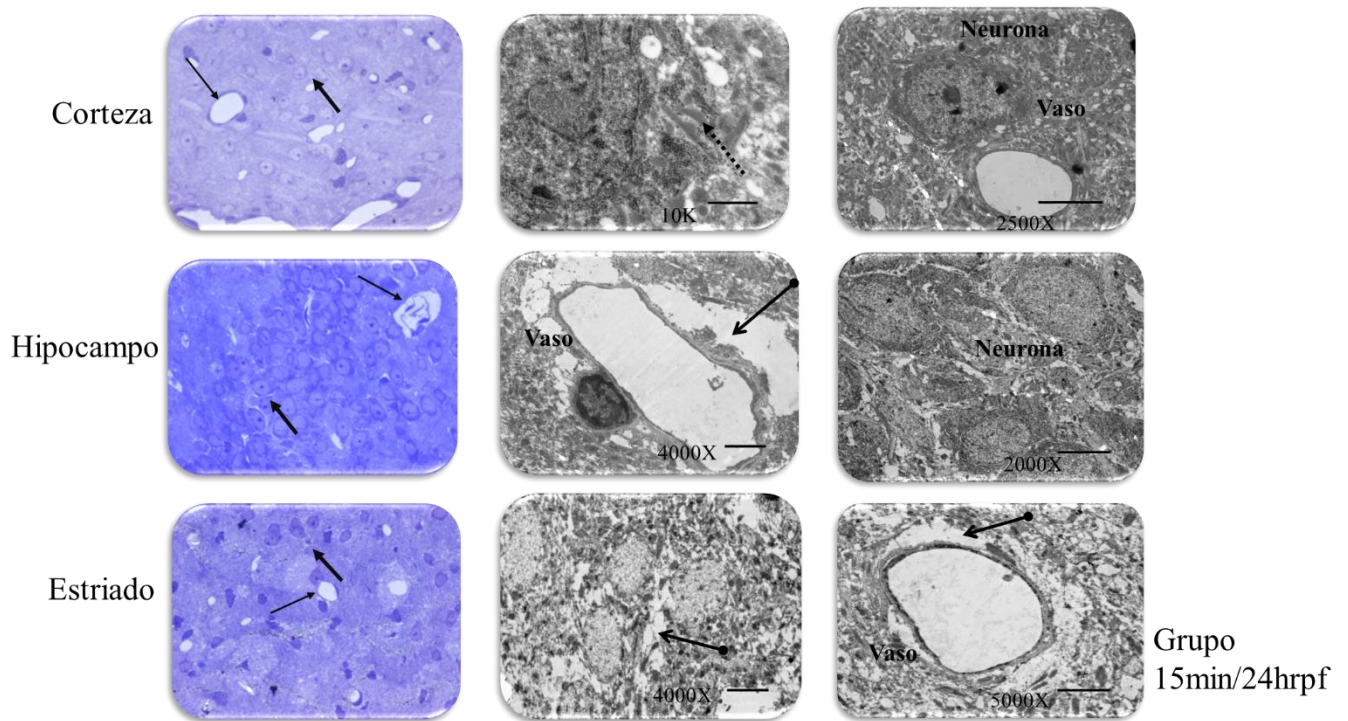


Figura 4. Análisis ultraestructural de la conformación morfológica en las regiones de la corteza, hipocampo y estriado del grupo isquémico 15min/24hrpf. Se observa aumento en daño celular y pérdida en la estructural de los vasos (Hipocampo, 4000X; Estriado, 5000X). Aumento en edema citotóxico y vasogénico (flecha puntada). Pérdida de membrana nuclear (Estriado, 4000X) y alteración en mitocondria (flecha discontinua).



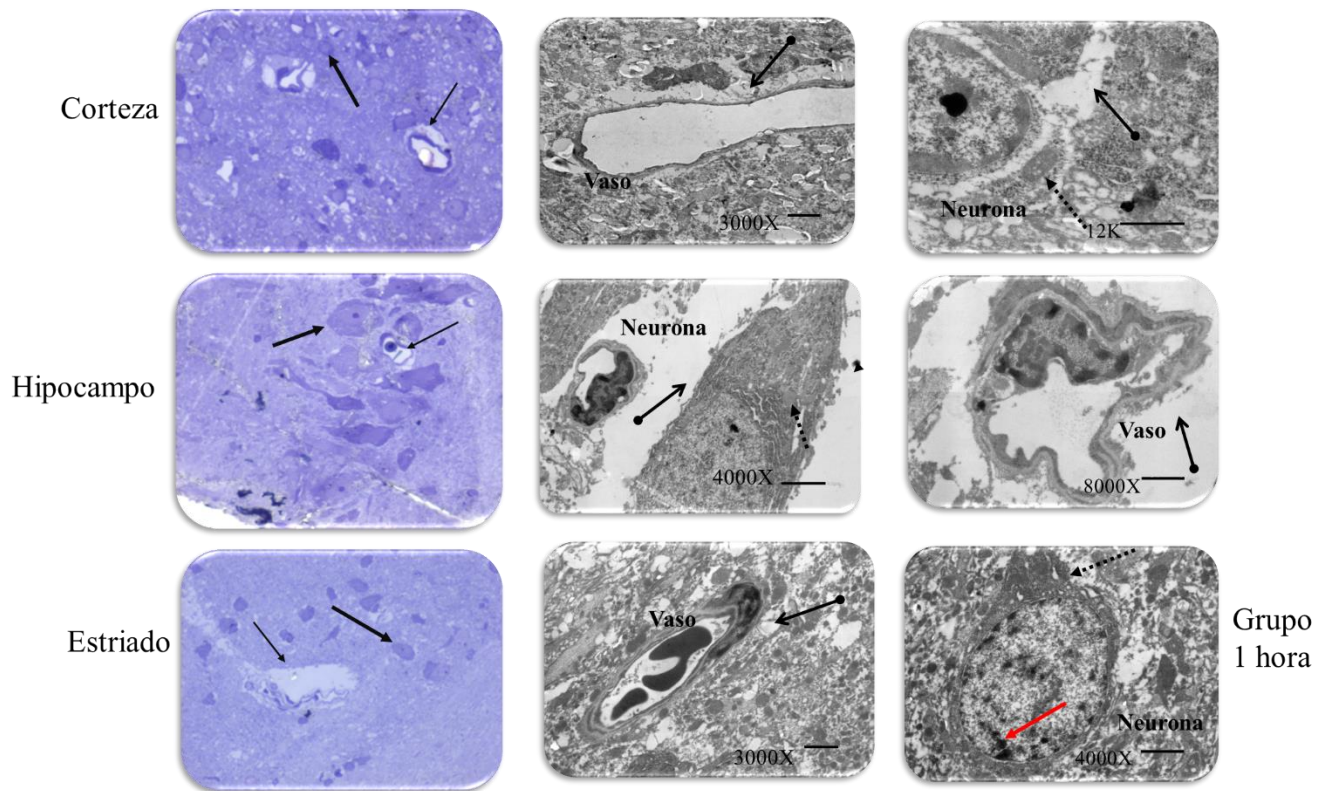


Figura 5. Análisis ultraestructural de la conformación morfológica en la región de la corteza, hipocampo y estriado del grupo isquémico de 1 hora. Se observó aumento en daño estructural tanto de vasos como de neuronas. Comienza a observarse condensación de cromatina alrededor de la membrana nuclear (flecha roja). Mayor edema citotóxico y vasogénico (flecha puntada y discontinua).

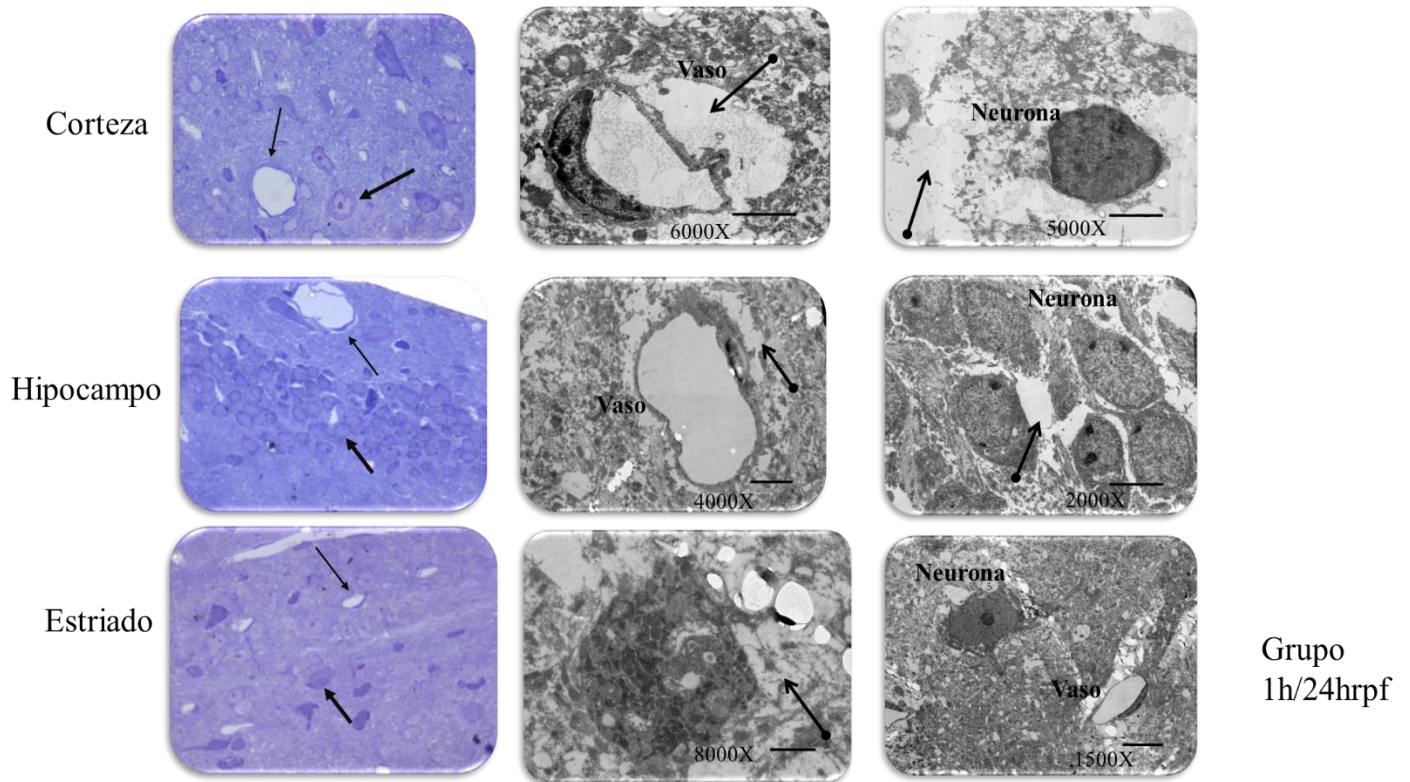


Figura 6. Análisis ultraestructural de la conformación morfológica de la región de la corteza, hipocampo y estriado del grupo isquémico 1h/24hrpf. Se observa aumento en daño estructural tanto de vasos como de neuronas. Comienza a observarse condensación de cromatina alrededor de la membrana nuclear y núcleos picnóticos (Corteza, 5000X). Mayor presencia de edema citotóxico y vasogénico (Flacha punteada). Mayor daño en neurópilo (acetato de uranilo – Citrato de plomo).

## Análisis por Inmunohistoquímica

### Expresión de Alfa-sinucleína y Beta-sinucleína.

En el análisis de la expresión de  $\alpha$ -sinucleína (figura 7) se puede observar que en el grupo control hubo poca señalización proteica en las tres regiones de estudio (corteza, estriado e hipocampo); en estriado en los grupos isquémicos (15 min, 15min/24hrpf, 1h y 1h/24h rpf) se encontró mayor señalización comparada con el grupo control, sobre todo en el neurópilo. Mientras que en hipocampo y en corteza en el grupo de 1h/24h rpf se observa tenue señalización. Como se puede observar, los tiempos de 15 min y 15min/24hrpf fueron los que mayor inmunorreacción de proteína mostraron.

Por otro lado se puede ver acumulación proteica en núcleo de las neuronas de corteza en el grupo de 15 minutos y 1h siendo tenue su visualización.

Por otro lado  $\beta$ -sinucleína mostró expresión elevada en los grupos experimentales de isquemia. En el grupo control se puede distinguir ligera señalización siendo más notable en estriado seguido de hipocampo, mientras que en corteza la señal fue muy tenue. En los grupos isquémicos su visualización es mayor en neurópilo, principalmente en corteza y estriado; también se observó señalización en núcleo neuronal en todos tiempos experimentales. En 15min y 1h de ICF en hipocampo la expresión nuclear es mayor en comparación a los demás tiempos de isquemia con ligera tinción en neurópilo. Por otro lado el grupo 1h/24hrpf presentó señalización citoplasmática en la región de hipocampo denotando diferencia con los demás grupos experimentales (figura 8).

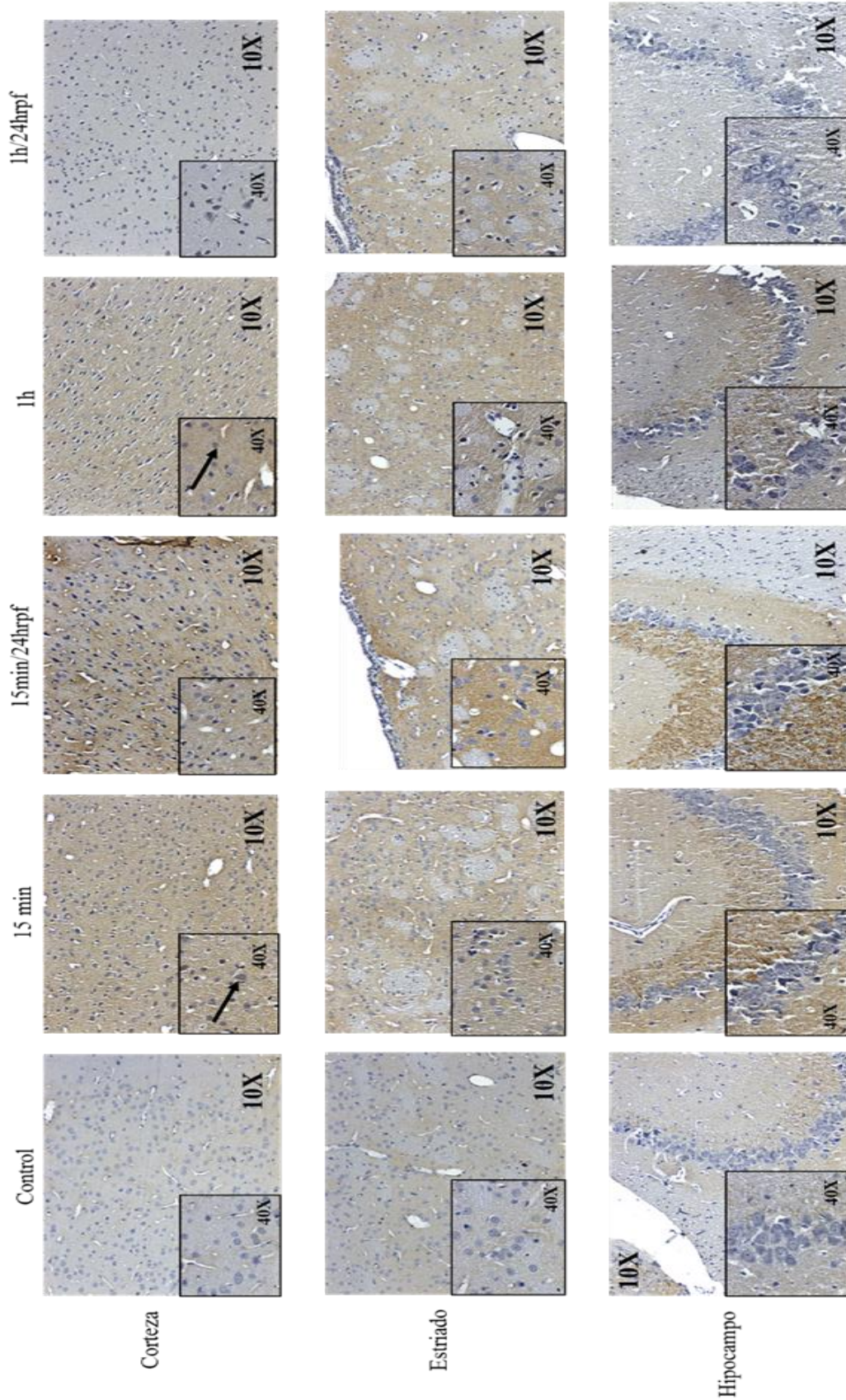


Figura 7. Análisis inmunohistoquímico de  $\alpha$ -sinucleína en cortes coronales de 4  $\mu$ m de grosor. En los grupos isquémicos de 15 min, 15min/24h rpf y 1h, la mayor expresión se encuentra en el área de neocórtex. En el grupo experimental de 15min y 1h ICF las neuronas de la corteza presentaron leve expresión nuclear (flecha). En 1h/24h rpf se observó leve expresión en corteza e hipocampo siendo más visible en estriado

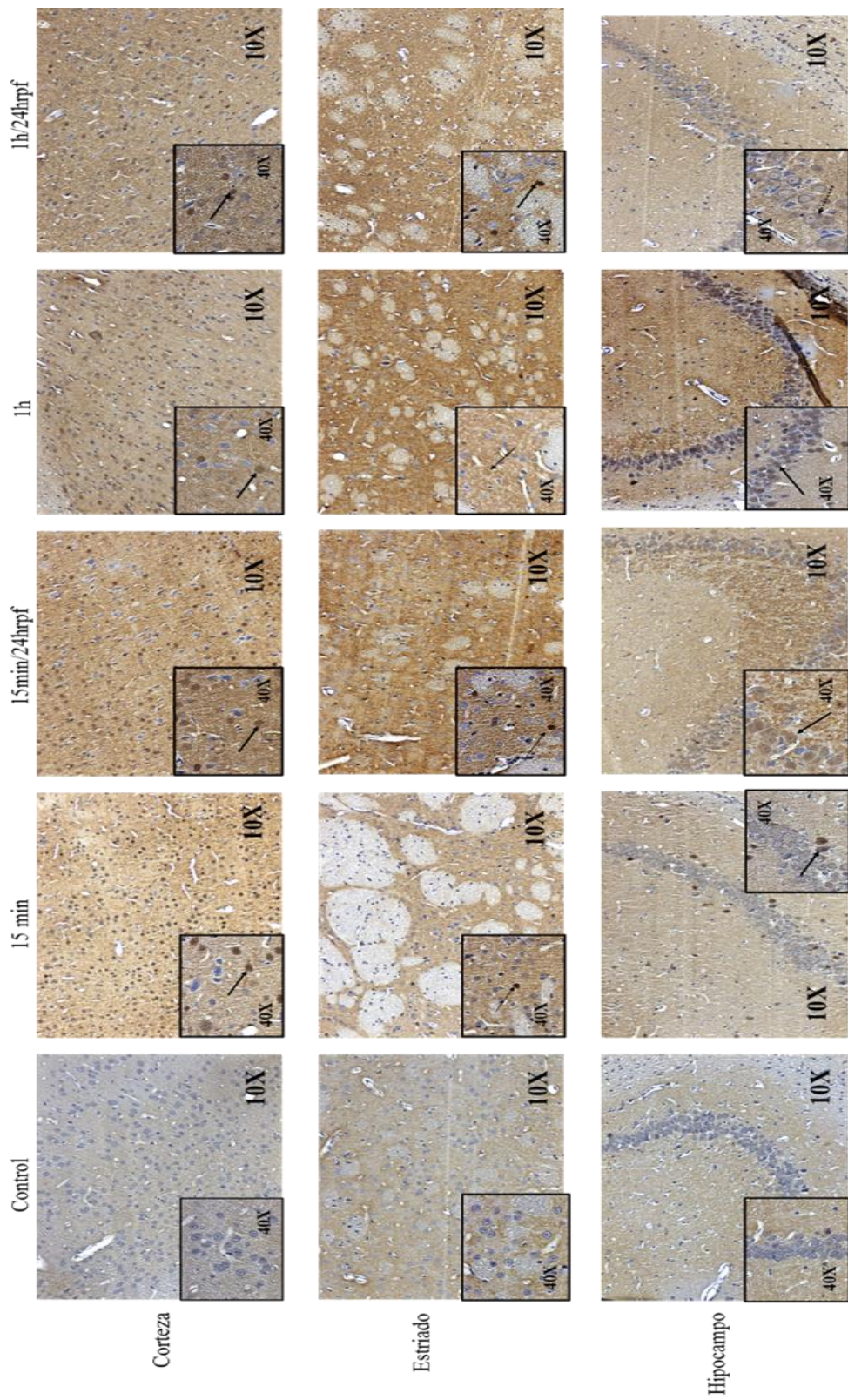


Figura 8. Análisis inmunohistoquímico de  $\beta$ -synucleína en cortes coronales de 4  $\mu$ m de grosor. En todos los grupos experimentales (15 min, 15min/24h rpf, 1h y 1h/24h rpf) se encontró expresión en el área de neurópilo en Cx, CE e Hp, con localización en el núcleo de la neurona (flecha gruesa) exceptuando Hp de 1h/24hrpf cuya señal se presentó en citoplasma.

## Análisis proteico por Western Blot.

### Expresión de Alfa-sinucleína.

Con el fin de analizar la expresión de  $\alpha$ -Sinucleína por Western Blot con muestras de los diferentes grupos experimentales se realizó un lisado tisular donde se separaron proteínas totales de citosol y fracción mitocondrial. En los resultados se observó que  $\alpha$ -sinucleína, cuyo peso aproximado es 14 kDa, se expresó de manera muy tenue en las regiones de corteza e hipocampo. Su expresión aumentó en extracto de fracción mitocondrial de corteza e hipocampo mientras que en proteínas de citosol se observó ligera expresión en la corteza. Tanto en la fracción mitocondrial como en el citosol, la corteza mostró un ligero incremento en los tiempos experimentales de 15min y 15min/24hrpf. En hipocampo la expresión en los diferentes tiempos es de manera homogénea (figura 9).

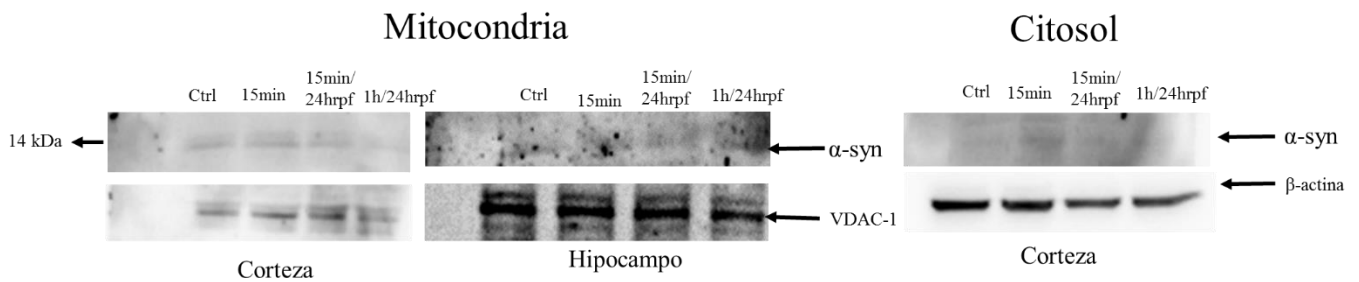


Figura 9. Análisis por Western Blot de alfa-sinucleína. Primer carril indicador de peso molecular, grupo control y tiempos de episodio isquémico y reperfusión en carriles posteriores (parte superior). Controles de carga: VDCA-1 para proteínas de fracción mitocondrial y  $\beta$ -actina para proteínas de citosol (parte inferior).

## Expresión de Beta-sinucleína.

La expresión de  $\beta$ -sinucleína cuyo peso molecular es similar al de su homóloga  $\alpha$ -sinucleína (14 kDa) se analizó a partir de proteínas obtenidas de lisado tisular y fracción mitocondrial. Se observó su expresión de manera clara en las tres regiones de estudio (corteza, hipocampo y estriado) tanto en fracción mitocondrial como en proteínas de citosol. En la fracción mitocondrial de corteza y estriado se aparecía de manera cualitativa que la expresión proteica aumenta de manera gradual en relación al tiempo experimental, siendo mayor en 1h/24hrpf. En hipocampo se observó un incremento considerable en 1h/24hrpf en comparación a los otros tiempos, en los cuales también se observó ligero incremento de expresión entre 15min y 15min/24hrpf (figura 10A).

En la fracción citosólica (figura 10B) de la corteza, la expresión fue mayor en los tiempos de isquemia. Por otro lado en hipocampo y estriado la expresión de  $\beta$ -sinucleína se muestra de manera homogénea no observándose cambios tan notorios entre los tiempos experimentales.

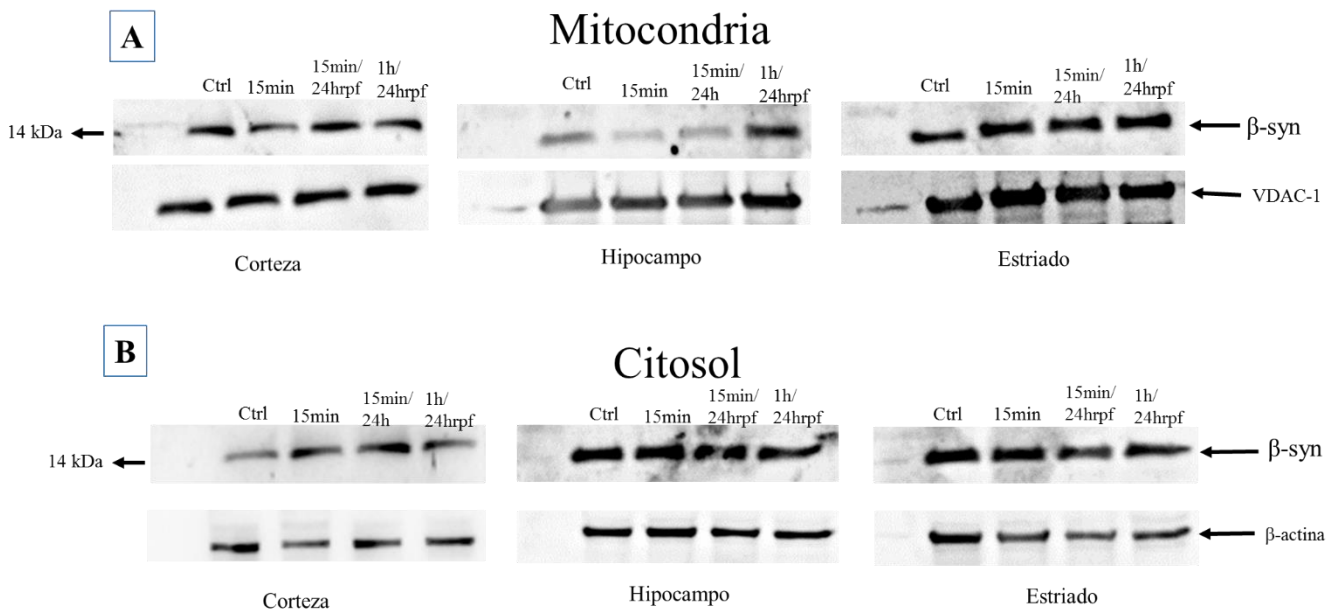


Figura 10. Análisis de expresión de beta-sinucleína. A) Proteínas de fracción mitocondrial. Primer carril indicador de peso molecular, grupo control y tiempos de episodio isquémico y reperfusión en carriles posteriores. Control de carga: VDCA-1. B) Proteínas de totales de citosol. Primer carril indicador de peso molecular, grupo control y tiempos de episodio isquémico y reperfusión en carriles posteriores; Control de carga:  $\beta$ -actina

## Discusión

En el presente trabajo se estudió el daño que se produce en un evento isquémico inducido en un modelo de isquemia cerebral focal en rata. Desde los primeros 15 minutos de la isquemia se presentó inflamación y aumento en el volumen celular (edema celular), eosinofilia citoplasmática, picnosis nuclear, ruptura de la membrana nuclear y cariolisis, al igual que edema vasogénico. Con el transcurso del tiempo comenzó a aumentar el daño en el neuropilo haciéndose mayor la ruptura del mismo y evidenciándose de manera considerable el edema, todo esto visible a través de microscopio óptico. Por microscopio electrónico se observó edematización de organelas con ruptura de membrana, fragmentación y distribución periférica de la cromatina y daño estructural de mitocondrias. El tamaño de la lesión crece con el transcurso del tiempo haciéndose significativa al alcanzar una hora de producida la isquemia cerebral. De acuerdo a Alonso (2011) y Cassiani (2013) la muerte celular por necrosis en isquemia depende de las alteraciones bioquímicas producidas por el déficit energético y por la activación de enzimas líticas constitutivas que destruyen componentes celulares. Como consecuencia en la baja de energía se produce alteración de membrana con pérdida del gradiente iónico y paso de agua al interior del citoplasma y los organelos con el consiguiente edema celular. Finalmente tiene lugar la lisis de las membranas y la pérdida de la diferenciación de los compartimentos celulares. También indica que la muerte celular por apoptosis depende de la puesta en marcha de una cascada de eventos que se inician merced a señales específicas y de la expresión selectiva de determinados genes. Morfológicamente se caracteriza por la preservación de las membranas, de manera que en microscopía electrónica se pueden identificar adecuadamente los organelos, y por la fragmentación y condensación periférica de la cromatina nuclear. Si bien no se produce la lisis de membranas, la membrana plasmática se divide dando lugar a la fragmentación de la célula en numerosas vesículas, denominadas cuerpos apoptóticos, que se pueden identificar en microscopía óptica. Con respecto a lo observado existen cada vez más evidencias que ambos tipos de muerte celular están implicados en el daño producido por isquemia, ya que se ha podido demostrar que en una misma lesión algunas células mueren por necrosis, otras por apoptosis y otras por una combinación de ambas (Alonso, 2011)

Por otro lado las mitocondrias tienen un papel importante para la producción de ATP en la célula y en la regulación de los mecanismos de muerte neuronal. Tras un evento isquémico el aumento de calcio intracelular origina un aumento del mismo dentro de la mitocondria inhibiendo la producción de ATP y activa una serie de enzimas que degradan fosfolípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Montaner, 2007; Villafuerte, *et al.*, 2017).

Para esta investigación se utilizaron modelos de isquemia cerebral focal en rata con el fin de obstruir la arteria cerebral media, este tipo de modelos han sido de suma importancia para el estudio del evento isquémico, especialmente por su similitud con la lesión humana y también porque permite evaluar fenómenos de estrés celular en el foco isquémico o penumbra como el hipocampo o el sector medial del estriado (Cassiani, 2013; Prieto, *et al.*, 2008). A parte de que la observación de la anatomopatología y la histopatología en dicho modelo no se aleja de las descripciones clásicas de la muerte celular por necrosis en el cerebro humano (Arango, 2016).



El análisis de la expresión de  $\alpha$ - y  $\beta$ -sinucleína demostró que la inmunodetección que observamos fue más visible en el área de neurópilo para ambas proteínas, por lo que se demuestra su presencia en terminales neuronales. En el caso de  $\alpha$ -sinucleína su expresión también se observó en núcleo de neuronas en corteza en un tiempo isquémico de 15 minutos, de acuerdo a Yu, *et al.* (2007) se puede esperar presencia de ésta proteína en núcleos de neuronas, sin embargo Burré (2015) reporta que si bien se han encontrado registros nucleares, estos informes no han sido consistentes a diferencia de su ubicación presináptica la cual se tiene bien establecida, por lo cual se sugiere un análisis con mayor profundidad ya que se cree que su presencia nuclear se debe a su capacidad de translocarse en el interior del núcleo en respuesta a fenómenos de estrés oxidativo (Elcoroaristizabal, *et al.*, 2011). Por su parte  $\beta$ -sinucleína expresó inmunoreactividad en neurópilo con un patrón de distribución similar en todas las regiones de estudio tras evento isquémico, también se notó señalización nuclear siendo mayor el número de células marcadas en hipocampo y corteza en los tiempos 15min/24hrpf y 1h de ICF para ambas zonas; por otro lado en hipocampo se encontró inmunorreactividad en citoplasma celular después de un evento isquémico de 1h/24hrpf. Estudios como el de Mori, *et al.*, 2002 reporta presencia basal en núcleo, citoplasma y terminaciones presinápticas de  $\alpha$ - y  $\beta$ -sinucleína en varias regiones cerebrales de ratas adultas resaltando lo encontrado en corteza cerebral. Sin embargo, lo obtenido en esta investigación indica que el aumento en la señalización se observa en casos isquémicos (sobre todo en núcleo neuronal) lo cual no se ha encontrado registro hasta ahora.

Se ha descrito que dichas proteínas son altamente homólogas (62% idénticas) y que están co-localizados dentro de las terminales presinápticas de la neurona en el sistema nervioso central de manera natural (Vigneswara, *et al.*, 2013; Weinreb, *et al.*, 1996).

Lo encontrado en el análisis por Western Blot demuestra que tanto  $\alpha$ - como  $\beta$ -sinucleína fueron detectadas en proteínas totales de citosol y de fracción mitocondrial de tejido cerebral de rata adulta. En el caso de isquemia cerebral Villafuerte, *et al.* (2017) detectaron, mediante de un estudio proteómico, la presencia de ambas proteínas a nivel mitocondrial. En el caso de  $\alpha$ - sinucleína su expresión fue mayor en proteínas de fracción mitocondrial de corteza e hipocampo, mientras que en proteínas de citosol solo se expresó de manera discreta en corteza cerebral. Cremades, *et al.* (2012) menciona que  $\alpha$ -sinucleína no parece ser una proteína esencial pero tiene múltiples funciones propuestas que interactúan específicamente con numerosas proteínas involucradas en la transducción de señales, el tráfico vesicular, el comportamiento sináptico, la regulación del estrés oxidativo y la función mitocondrial. A su vez que Hsu, *et al.* (2000) sugiere que la acumulación anormal de  $\alpha$ -sinucleína podría conducir a alteraciones mitocondriales que pueden provocar estrés oxidativo y, finalmente, la muerte celular. Por otro lado  $\beta$ -sinucleína tuvo mayor expresión en todas las regiones de estudio (Cx, Hp y CE) con un aumento gradual según el tiempo experimental. Mori, *et al.* (2002) reportó presencia de ambas proteínas en núcleo celular y coincidiendo con lo encontrado en este estudio la expresión citoplasmática sobre todo de  $\beta$ -sinucleína.

Es importante mencionar que la presencia de ambas proteínas está relacionada con enfermedades neurodegenerativas, sobre todo  $\alpha$ -sinucleína la cual se ha encontrado en patologías tales como Parkinson, la enfermedad de cuerpos de Lewy y Alzheimer (James, *et al.*, 1999; Burré, 2015; Brown, *et al.*, 2016; James, *et al.*, 2016).

Varios estudios han descrito que  $\beta$ -sinucleína puede jugar un papel neuroprotector, lo que sugiere que su interacción con  $\alpha$ -sinucleína puede disminuir o limitar la capacidad de agregación, de la formación de

fibrillas y así disminuir su respuesta neurotóxica (Hashimoto, *et al.*, 2001; Janowska, *et al.*, 2015; James, *et al.*, 2016; Leitao, *et al.*, 2018; Williams, *et al.*, 2018; Yang, *et al.*, 2019). Esto se da debido a que las secuencias de aminoácidos de  $\alpha$ -sinucleína y  $\beta$ -sinucleína no son lo suficientemente similares como para permitir un grado significativo de agregación cruzada, a través del cual ambos tipos de moléculas de proteínas se incorporarían en última instancia a la estructura rica en *láminas*  $\beta$  ordenadas de fibrillas amiloides. Por otro lado, las dos proteínas son lo suficientemente similares como para competir por los mismos sitios de unión en superficies que pueden inducir la formación de fibrillas de  $\alpha$ -sinucleína, ya sea que la superficie sea una membrana lipídica, el compañero de unión funcionalmente importante de las sinucleínas, o un  $\alpha$ -sinucleína fibrilar, cuya formación está vinculada a la enfermedad de Parkinson (James, *et al.*, 2016). De acuerdo a lo descrito por Williams, *et al.* (2018) indica que las interacciones inhibitorias multisitio distribuidas a lo largo de las cadenas de sinucleína pueden ser críticas para el desarrollo de terapias diseñadas las cuales pueden imitar los efectos inhibidores de la  $\beta$ -sinucleína.

## Conclusión

En conclusión los daños producidos tras un evento isquémico a nivel funcional, tisular y celular pueden ser observados a partir de los primeros 15 minutos y van aumentando de acuerdo al tiempo que dure dicho episodio.

Consideramos que el análisis ultraestructural es una herramienta efectiva para la evaluación de daño producido a nivel celular ya que nos permite una visión más amplia y detallada de la zona afectada.

La expresión  $\alpha$ -y  $\beta$ -sinucleína tuvo mayor visibilidad en los grupos isquémicos y presencia en núcleo neuronal lo cual no se encuentra reportado actualmente.

Lo reportado en esta investigación invita a continuar el estudio no solo de las proteínas en cuestión, también de realizar un trabajo multidisciplinario para así entender cómo es su relación en neuropatologías y su posible utilización en terapias o prevención de las mismas.

Este trabajo fue realizado en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” en el Laboratorio de Neuropatología Experimental, bajo la tutoría de la Dra. Alma Ortiz Plata.

## **Agradecimientos**

Agradezco a la Dra. Marisol Orozco Ibarra, a la Dra. Norma Serrano García y a la Dra. Francisca Fernández Valverde por su amable colaboración y asesoría en las técnicas realizadas en este proyecto.

El proyecto fue realizado con los apoyos de CONACYT # 226201 y 156906.

## Referencias

- Alonso de Leciñana, M., 2011. Fisiopatología de la isquemia. En: S. D. Neurología, ed. *guía neurológica 8. enfermedad cerebrovascular*. Madrid: Hospital universitario Ramón y Cajal., pp. 5-17.
- Arango-Dávila, C. y Vera, A., 2016. Isquemia Cerebral: Evolución Histopatológica en un modelo experimental.. *Revista Médica Sanitas* , 19(2), pp. 93-107.
- Arauz, A. y Ruíz Franco, A., 2012. Enfermedad vascular cerebral. *Facultad de Medicina de la UNAM* , 55(3), pp. 11-21.
- Ávila Saldivar, M. N., Ordoñez Cruz, A. . E. y Ramírez Flores, H. . J., 2012. Enfermedad vascular cerebral: incidencia y factores de riesgo en el Hospital General La Perla. *Medicina Interna de México* , 28(4), pp. 342-344.
- Baños-González, M. Cantú-Brito, C. Chiquete, E. Arauz, A. Ruiz-Sandova, J.L. Villarreal-Careaga, J. Barinagarrementeria, F. Lozano, J.J. , 2011. Presión arterial sistólica y pronóstico funcional en pacientes con enfermedad vascular cerebral aguda: Registro mexicano de enfermedad vascular cerebral.. *Archivos de Cardiología de México*, 81(3), pp. 169-175.
- Brown, J. W. K. Buell, A. CT Michaels, T. Meisl, G. Carozza, J. Flagmeier , P. Vendruscolo , M. PJ Knowles, T. M. Dobson, C. Galvagnion, C., 2016.  $\beta$ -Synuclein suppresses both the initiation and amplification steps of  $\alpha$ -synuclein aggregation via competitive binding to surfaces. *Scientific Reports*, Volumen 6, pp. 1-10.
- Burré , J., 2015. The Synaptic Function of  $\alpha$ -Synuclein. *Journal of Parkinson's Disease*, 5(4), p. 699-713.
- Burré J, Sharma M, Südhof T.C., 2018. Cell Biology and Pathophysiology of  $\alpha$ -Synuclein. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 8(3).
- Capdeville C., Pruneau D., Allix M., Plotkine M., Boulu R. G., 1986. Naloxone effect on the neurological deficit induced by forebrain ischemia in rats. *Life Sci* 38:437-42.,.
- Cassiani Miranda, C. A. y Borrero Varona, M. T., 2013. Isquemia cerebral experimental y sus aplicaciones en la investigación en neurociencias.. *Salud Uninorte*, 29(3), pp. 430-440.
- Castellanos, L., González, L. J. y Padrón, . G., 2001. Proteómica. En: *Introducción. Algunos conceptos básicos*. Habana, Cuba: Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, pp. 367-403.
- Castillo, J., 2000. Fisiopatología de la isquemia cerebral. *Revista de Neurología*, 30(5), pp. 459-464 .
- Colín-González AL, Orozco-Ibarra M, Chánez-Cárdenas ME, Rangel-López E, Santamaría A, Pedraza-Chaverri J, Barrera-Oviedo D, Maldonado PD, 2013. Heme oxygenase-1 (HO-1) upregulation delays morphological and oxidative damage induced in an excitotoxic/pro-oxidant model in the rat striatum. *Neuroscience*.231:91-101.

Cremades , N. Cohen SI, Deas E, Abramov AY, Chen AY, Orte A, sandalia M, Clarke RW, Dunne P, Aprile FA, Bertoncini CW, madera NW, Knowles TP, Dobson CM, Klenerman D, 2012. Direct Observation of the Interconversion of Normal and Toxic Forms of  $\alpha$ -Synuclein. *Cell*, 149(5), p. 1048–1059..

Díez Tejedor, E. Del Brutto, O. Álvarez-Sabín, J. Muñoz, M. Abiusi, G., 2001. Clasificación de las enfermedades cerebrovasculares. *Revista de Neurología*, 33(5), pp. 455-464.

Elcoroaristizabal , X., Gómez , F., González Fernández y M. de Pancorbo, M., 2011. Papel de la genética en la etiología de las sinucleinopatías. *Revista Española de Geriatria y Gerontología*, 46(1), pp. 3-11.

Fortin , D. L., Nemani , V. M. y Edwards , R. H., 2008. Parkinson's disease. Molecular and Therapeutic Insights From Model Systems. En: R. Nass & S. Przedborski, edits. *The Dynamics of  $\alpha$ -Synuclein at the Nerve Terminal*. s.l.:Academic Press, pp. 237-246.

Galindo, M. F., Solesio, M. E. y Jordan, J., 2014. Role of Mitochondrial Fission and Mitophagy in Parkinson's Disease. En: M. Hayat, ed. *Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging*. s.l.:Academic press, pp. 213-225.

Hashimoto, M., Rockenstein E , Mante M , Mallory M , Masliah E ., 2001. beta-Synuclein inhibits alpha-synuclein aggregation: a possible role as an anti-parkinsonian factor.. *Neuron*, Volumen 32, p. 213–223.

Hsu, L. J. Sagara Y , Arroyo A , Rockenstein E , Sisk A , Mallory M , Wong J , Takenouchi T , Hashimoto M , Masliah E ., 2000.  $\alpha$ -Synuclein Promotes Mitochondrial Deficit and Oxidative Stress. *The American Journal of Pathology*, 157(2), pp. 401-410.

James , E. G., Kunihiro , U., Virginia , M.-Y. L. y John , Q. T., 1999. Axon pathology in Parkinson's disease and Lewy body dementia hippocampus contains  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -synuclein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American* , 96(23), pp. Axon pathology in Parkinson's disease and Lewy body dementia hippocampus contains  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -synuclein.

James , W. P. B. , Buell AK, Michaels TC, Meisl G, Carozza J, Flagmeier P, Vendruscolo M, Knowles TP, Dobson CM, Galvagnion C, 2016.  $\beta$ -Synuclein suppresses both the initiation and amplification steps of  $\alpha$ -synuclein aggregation via competitive binding to surfaces.. *Scientific Reports*, Volumen 6, pp. 1-10.

Janowska M.K., Wu K.P., Baum J., 2015. Unveiling transient protein-protein interactions that modulate inhibition of alpha-synuclein aggregation by beta-synuclein, a pre-synaptic protein that co-localizes with alpha-synuclein.. *Scientific Reports*, Volumen 5, p. 15164.

Leitao, A. Bhumkar A, Hunter DJB, Gambin Y, Sierceki E, 2018. Unveiling a Selective Mechanism for the Inhibition of  $\alpha$ -Synuclein Aggregation by  $\beta$ -Synuclein. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), pp. 1-17.

Longa E, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R, 1989. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in Rats. *Stroke* 20;84-911,.

Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193(1);265-75.

Montaner, J., 2007. *Fisiopatología de la isquemia cerebral*. Priemra ed. Valencia, España: Medica Book.

Montalvo, C. E., 2010. *Técnica Histológica*. Mexico: CAPES.

Mori, F. Tanji K, Yoshimoto M, Takahashi H, Wakabayashi K, 2002. Immunohistochemical comparison of  $\alpha$ - and  $\beta$ -synuclein in adult rat central nervous system.. *Brain Research*, Volumen 941, p. 118–126.

Orozco-Ibarra M, García-Morales J, Calvo-Silva FJ, Fernández-Valverde F, Serrano-García N, 2018. Striatal mitochondria response to 3-nitropropionic acid and fish oil treatment. *Nutr Neurosci.*;21(2):132-142.

Prieto Arribas, R. Moreno-Gutiérrez, A. Simal-Hernández, P. Pascual-Garvi, JM. Matías-Guiu, J. Roda, JM. Barcia-Albacar, JA., 2008. Modelos experimentales de isquemia cerebral.. *Revista de Neurología*, 47(8), pp. 414-426.

Prophet B. P., Mills B., Arrington B. J., Sobin L.H., 1995. Métodos Histotecnológicos. *Instituto de Patología de las fuerzas armadas de Estados Unidos de América*.

Rodríguez Salgado, . M., 2016. Mortalidad intrahospitalaria por enfermedades cerebrovasculares en las principales instituciones públicas de salud de México.. *CONAMED*, Volumen 14, pp. 7-11.

Yu S, Li X, Liu G, Han J, Zhang C, Li Y, Xu S, Liu C, Gao Y, Yang H, Uéda K, Chan P., 2007. Extensive nuclear localization of  $\alpha$ -synuclein in normal rat brain neurons revealed by a novel monoclonal antibody. *Neuroscience*, 145(2), pp. 539-555.

Taschenberger, G. Toloe J, Tereshchenko J, Akerboom J, Gales P, Benz R, Becker S, Outeiro TF, Looger LL, Bähr M, Zweckstetter M, Kügler S, 2013.  $\beta$ -synuclein aggregates and induces neurodegeneration in dopaminergic neurons.. *Annals of neurology*, 74(1), pp. 109-18.

Vigneswara, V. Cass S, Wayne D, Bolt EL, Ray DE, Carter WG, 2013. Molecular Ageing of Alpha- and Beta-Synucleins: Protein Damage and Repair Mechanisms. *Plos One*, 8(4), pp. 1-12.

Villafuerte Morquecho, L. E. Orozco-Ibarra, M, Corzo-Toledo, JD, Cázares-Raga, FE, Hernández-Hernández, FC, Ortiz-Plata, A, 2017. Respuesta de la mitocondria en un modelo de isquemia cerebral focal en rata. *Archivos de Neurociencias*, 22(4), pp. 26-32.

Williams, J. K. Yang X, Atieh TB, Olson MP, Khare SD, Baum J, 2018. Multi-Pronged Interactions Underlie Inhibition of  $\alpha$ -Synuclein Aggregation by  $\beta$ -Synuclein.. *J Mol Biol*, 430(26), p. 2360–2371.

Weinreb , P. Zhen W, Poon AW, Conway KA, Lansbury PT Jr., 1996. NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded.. *Biochemistry.* , 35(43), pp. 13709-15.

Yang, X. Williams JK, Yan R, Mouradian MM, Baum J , 2019. Increased Dynamics of  $\alpha$ -Synuclein Fibrils by  $\beta$ -Synuclein Leads to Reduced Seeding and Cytotoxicity.. *Scientific Reports* , Volumen 9, p. 17579.