

Proyecto Profesor Visitante

Responsable: Melchor Martínez Herrera

Título: "Síntesis, Caracterización y Evaluación de Aductos del Fullerenos C₆₀ como Inhibidores de la Agregación del Péptido β -amiloide.

Duración del Proyecto: 1 año

Institución: Universidad Autónoma Metropolitana

Dependencia: Unidad Cuajimalpa, Departamento de Ciencias Naturales

Ciudad de México, Octubre de 2020

1. Introducción

El proyecto aquí planteado responde a la necesidad de trabajar en la generación de conocimiento relativo a la síntesis y caracterización de fullerenos funcionalizados con potenciales aplicaciones biomédicas. Se espera que los compuestos aquí planteados puedan en un futuro cercano ser una alternativa terapéutica al tratamiento actual de enfermedades neurodegenerativas, contribuyendo al desarrollo tecnológico del país. La versatilidad en las opciones de modificación exohedrales tridimensionales derivados de la multifuncionalidad de los fullerenos, ha permitido obtener derivados funcionalizados solubles en medio acuoso con potenciales aplicaciones en el emergente campo de la nanomedicina. En el contexto de la enfermedad de Alzheimer, una de las recientes estrategias para el tratamiento de esta enfermedad está enfocada en la inhibición de agregados del péptido β -amiloide (P β A) en la forma de placas seniles en el cerebro.^[1] Estudios previos a través de experimentos *in vitro*, mostraron que el monoadducto del fullereno con sustituyente dimetoximetano, el $C_{61}(OCH_3)_2$, inhibe la agregación del péptido β -amiloide con 42 aminoácidos (P β A42) en etapas tempranas, enlazándose específicamente al sitio hidrofóbico de la región central KLVFF del péptido (residuos lis-leu-val-fen-fen).^[2] Otros derivados como el fullereno hidratado $(C_{60}:H_2O)_n$, el fullerenol $C_{60}(OH)_{16}$ o la sal del fullerenol $Na_4[C_{60}(OH)_{\sim 30}]$, han demostrado que previenen la formación de agregados del P β A, deteniendo la amiloidogénesis en la etapa de profibrillas cortas y estrechas.^[3] Estos resultados muestran que las interacciones hidrofóbicas son un elemento clave en la actividad anti-amiloide de los fullerenos y que la inserción de grupos funcionales en el fullereno es importante para incrementar su solubilidad y su afinidad al péptido, disminuyendo su citotoxicidad.

Basándonos en estos antecedentes y que en el grupo de trabajo contamos con experiencia en la síntesis y caracterización de fullerenos funcionalizados,^[4] se generó la siguiente hipótesis para este trabajo.

2. HIPOTESIS

Si se sintetizan aductos del C_{60} con diferente número de sustituyentes hidrofílicos entonces se incrementará su solubilidad en medio acuoso y su afinidad al péptido β -amiloide, inhibiendo su agregación y disminuyendo su citotoxicidad.

3. Objetivos del proyecto

Los objetivos de este proyecto incluyen un objetivo general y cuatro objetivos particulares.

Objetivo General

- Sintetizar aductos del fullereno C_{60} que pueden contener de dos hasta seis sustituyentes tipo malonato, evaluar su capacidad como inhibidores de la agregación del péptido β -Amiloide; así como su biocompatibilidad.

Objetivos Particulares

De Investigación:

- Sintetizar, purificar y caracterizar fullerenmalonatos de alquilo, de sodio o su ácido

correspondiente, pudiendo contener de dos hasta seis sustituyentes, del tipo $C_{60+n}(COR)_{2n}$ (n puede ser 2-6 y R puede ser $R = -OCH_2CH_3$, $-ONa$, $-NHC_6H_4CO_2CH_2CH_3$, $-NHC_6H_4CO_2Na$, $-NHC_6H_3(CO_2CH_2CH_3)_2$, $-NHC_6H_4(CO_2Na)_2$, $-OC_6H_4CO_2H$, $-OC_6H_3(CO_2H)_2$).

- Evaluar la capacidad de los aductos sintetizados como inhibidores de la agregación del P β A42 y su biocompatibilidad con la línea celular de neuroblastoma humano.

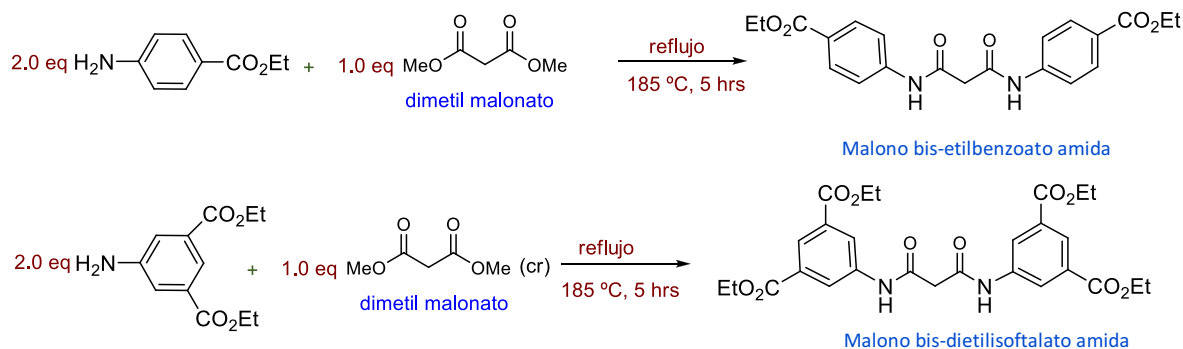
Institucional:

- Fortalecer la docencia e investigación a través de la impartición de cursos y formación de recursos humanos de alta especialidad a nivel licenciatura (Licenciatura en Biología Molecular) y Posgrado (Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería).
- Fortalecer el cuerpo académico de Físicoquímica y Diseño Molecular y otros cuerpos académicos del Departamento de Ciencias Naturales de la UAM-Cuajimalpa, a través de la colaboración científica y académica.

4. Metodología Científica

Síntesis y purificación de derivados malonato

Los derivados malonato conteniendo terminales benzocaína o aminoisofthalato de etilo, del tipo $R-OCCCCO-R$ ($R = -NHC_6H_4CO_2CH_2CH_3$, $-NHC_6H_3(CO_2CH_2CH_3)_2$), los cuales no se encuentran disponibles comercialmente, se obtendrán a partir de la reacción libre de disolvente de dimetil malonato con benzocaína o con dietil 5-aminoisofthalato a 185 °C siguiendo el procedimiento descrito por Neamati *et al.* (Esquema 1).^[5]

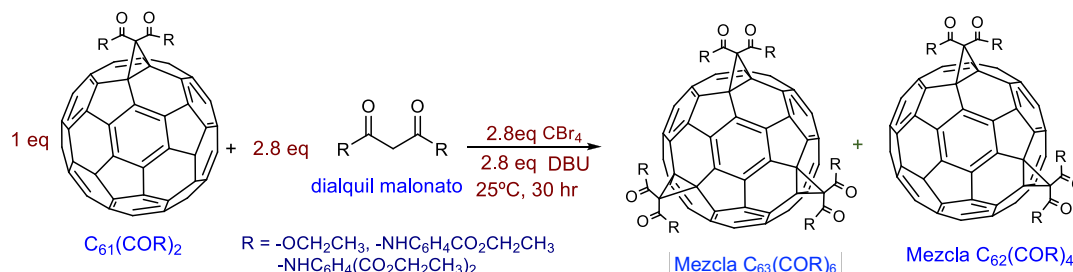


Esquema 1. Síntesis del derivado malono bis-etilbenzoato amida y del malono bis-dietilisofthalato amida

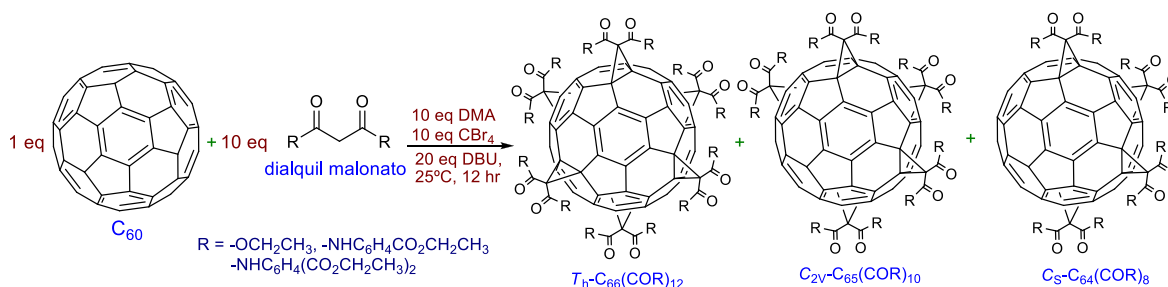
Síntesis, purificación y caracterización de aductos del C_{60}

Los fullerenmalonatos de alquilo que puedan contener 2 y 3 sustituyentes (mezclas isoméricas), se sintetizarán a partir de la ciclopropanación del C_{60} con el respectivo malonato (puede ser dietil malonato, malono bis-etilbenzoato amida, malono bis-dietilisofthalato amida), CBr_4 y DBU como base auxiliar, siguiendo la metodología propuesta por Malorni *et al.*^[6, 14] Para la síntesis de los aductos superiores (de 4 a 6 sustituyentes, si fuera el caso), se seguirá la metodología altamente regioselectiva propuesta por Hirsch *et al.*^[7], utilizando el 9,10-dimetil antraceno (DMA) como plantilla, el cual permite la síntesis

directa y regioselectiva del hexaducto con una adición octahedral (T_h -C₆₆(COR)₁₂) y como subproductos una considerable cantidad del tetraducto (C₅-C₆₄(COR)₈) y del pentaducto (C_{2v}-C₆₅(COR)₁₀, con incompleta adición octahedral (Esquemas 2 y 3). A continuación, los aductos se purificarán por cromatografía en columna utilizando sílica gel como fase estacionaria y tolueno, hexano o mezclas de tolueno/hexano, tolueno/acetonitrilo, tolueno/metanol como fase móvil.

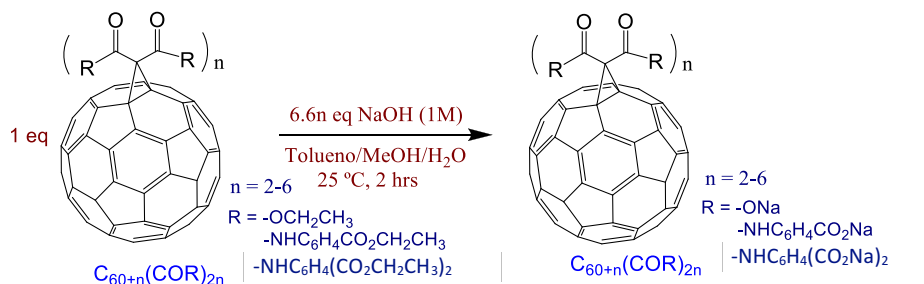


Esquema 2. Propuesta para la síntesis de bisaductos y trisaductos del C₆₀.



Esquema 3. Propuesta sintética del hexaducto, pentaaducto y tetraducto del C₆₀ (Adición octahedral).

Los fullerenmalonatos de sodio o sus ácido correspondientes se obtendrán a partir de la hidrólisis alcalina de los respectivos fullerenmalonatos de alquilo, siguiendo el procedimiento propuesto por Guldi *et al.*^[8] Para ello, se hará reaccionar 3.3 moles de una solución de NaOH en metanol (1 M) por cada mol de grupo éster o amida; 100 moles de agua por cada mol de aducto y una relación volumétrica disolvente-metanol de 24:1 (Esquema 4). Finalmente, todos los aductos se caracterizarán a través de espectroscopía UV-Vis, FTIR, RMN, espectrometría de masas (MS-ESI) y análisis elemental.



Esquema 4. Propuesta sintética de las sales de fullereno (bisaductos, trisaductos, tetraaductos, pentaaductos y hexaductos).

Evaluación de la capacidad inhibitoria y biocompatibilidad de aductos del C₆₀

Obtención de monómeros del P β A

Los ensayos cualitativos de agregación se realizarán utilizando el péptido β -amiloide con 42 aminoácidos (P β A42) (Sigma Aldrich, A9810). Para obtener soluciones monoméricas homogéneas, sin pre-agregados del P β A42 se utilizará hexafluoruro-2-propanol (HFIP), el cual es capaz de romper las estructuras hojas- β . Para ello, el P β A42 se solubilizará 1:1 (1mg/1ml) en HFIP y se mantendrá a 4°C en oscuridad durante 30 minutos. Posteriormente se eliminará el disolvente utilizando un secador "speedvac" durante 25 min sin calentamiento, para posteriormente almacenarse en un ultracongelador a -80°C hasta su uso.

Ensayo de polimerización de proteínas

Se utilizará un modelo estandarizado de polimerización *in vitro* del P β A42 con base en los protocolos de Stine *et al.*^[9, 17] Para promover la agregación del péptido se utilizará buffer de polimerización, el cual está compuesto por buffer PBS 1x (pH 7.4) con 1% de DMSO. La formación de los polímeros se promoverá solubilizando el P β A42 (previamente tratado con HFIP y liofilizado en tubos eppendorf) en el buffer de polimerización y se incubará a 37°C a diferentes tiempos.

Cuantificación de polímeros del P β A42 por análisis fluorométrico de tioflavina T

El proceso de polimerización el péptido β -amiloide con 42 aminoácidos (P β A42), se cuantificará por fluorescencia de la tioflavina T (TfT) en un lector de placas TECAN Infinite (M1000PRO). La actividad inhibitoria de la formación de polímeros del P β A42 de cada uno de los aductos sintetizados, se determinará a partir de la disminución de la frecuencia relativa (FR) con respecto al control sin los aductos de fullereno. Para ello, se prepararán soluciones stock de los aductos del C₆₀ a una concentración final de 100 μ M y se mezclarán en una solución buffer de polimerización en presencia del P β A42 y TfT excepto en las muestras control. Las concentraciones finales de la TfT, los aductos y el P β A42 en la mezcla serán de 10 μ M, 13Mm y 20 μ M respectivamente, como lo indica el procedimiento descrito realizados por Kim *et al.*^[21] La mezcla resultante se adicionará en una placa negra de 96 pozos y se incubará durante 24 horas a 37 °C; tomando lecturas de la FR de la TfT cada 10 minutos, a una longitud de onda de excitación y emisión de 450 nm y 490 nm, respectivamente.

Evaluación de la biocompatibilidad de aductos del C₆₀

Cada uno de los aductos del fullereno C₆₀ sintetizados se incubarán individualmente en células SH-SY5Y (neuroblastoma humano) cultivadas y mediante el ensayo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) se cuantificará la supervivencia celular posterior a la incubación. Para esta determinación, 2 μ L de la solución de cada uno de los aductos antes descritos se adicionará en 98 μ L de medio DMEM/F12 suplementado alcanzando una concentración final de 13 μ M. El medio, junto con los compuestos se adicionarán directamente a 10,000 células en cultivo y se incubarán durante 24 horas a 37 °C con 5% de CO₂. De igual manera, para evaluar la posible toxicidad de los vehículos de los compuestos, se colocarán 2 μ L de cada uno de los disolventes en 98 μ L de medio DMEM/F12 suplementado. Transcurridas las 24 horas de incubación se retirarán los tratamientos y se

agregarán 10 μL de MTT a 120 μM en 90 μL de medio DMEM/F12 suplementado y se incubarán por 3 horas a 37 °C con 5% de CO_2 . Finalmente, el medio con MTT se retirará para después agregar 100 μL de isopropanol e inmediatamente se tomarán la lectura de absorbancia a 495 nm en un lector de micro placas iMark Biorad (168-1130). Todos los tratamientos y controles serán realizados por triplicado.

5. Plan de Trabajo

Objetivo 1 de investigación:

Sintetizar aductos del fullereno C_{60} que pueden contener de dos hasta seis sustituyentes tipo malonato.

Actividad	Producto Esperado
1.1 Realizar la síntesis y purificación de fullerenmalonatos de alquilo, de sodio o su ácido correspondiente, que pueden ser del tipo bisaducto $\text{C}_{62}(\text{COR})_4$, trisaducto $\text{C}_{63}(\text{COR})_6$, tetraaducto $\text{C}_{64}(\text{COR})_8$, pentaducto $\text{C}_{65}(\text{COR})_{10}$ o hexaducto $\text{C}_{66}(\text{COR})_{12}$, (donde R puede ser $\text{R} = -\text{OCH}_2\text{CH}_3$, $-\text{ONa}$, $-\text{NHC}_6\text{H}_4\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{NHC}_6\text{H}_4\text{CO}_2\text{Na}$, $-\text{NHC}_6\text{H}_3(\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, $-\text{NHC}_6\text{H}_3(\text{CO}_2\text{Na})_2$, $-\text{OC}_6\text{H}_4\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{OC}_6\text{H}_3(\text{CO}_2\text{H})_2$). Caracterizar por medio de técnicas espectroscópicas como UV-Vis, FTIR, RMN, espectrometría de masas y análisis elemental los fullerenmalonatos sintetizados (aductos del C_{60}).	1.1.1 Involucrar al menos a un estudiante de Licenciatura para realizar su proyecto terminal I y II o un estudiante de Posgrado en la síntesis, purificación y caracterización de los Fullerenmalonatos de alquilo, de sodio o su ácido correspondiente. 1.1.2. Presentar los resultados de la síntesis, purificación y caracterización de fullerenmalonatos en al menos un congreso nacional o internacional.

Objetivo 2 de investigación:

Evaluar la capacidad de los materiales nanohíbridos como agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

Actividad	Producto Esperado
2.1. Evaluación <i>in vitro</i> de la biocompatibilidad y de la capacidad de los fullerenmalonatos de alquilo, de sodio o su ácido correspondiente como inhibidores de la agregación del péptido β -amiloide.	2.1.1 Involucrar al menos a un estudiante de Licenciatura para realizar su proyecto terminal I y II o un estudiante de Posgrado en la evaluación o en la síntesis y evaluación de los fullerenmalonatos como inhibidores del péptido β -amiloide. 2.1.2. Presentar los resultados de la evaluación <i>in vitro</i> o de la síntesis y evaluación <i>in vitro</i> de la biocompatibilidad

	<p>y como inhibidores de la agregación en al menos un congreso nacional o internacional.</p> <p>2.1.3. Publicar los resultados de la evaluación o de la síntesis y evaluación <i>in vitro</i> de los fullerenmalonatos como inhibidores de la agregación a través de al menos 1 artículo de investigación en una revista indizada de impacto internacional.</p>
--	---

Objetivo 1 Institucional:

Fortalecimiento de la Docencia e Investigación

Actividad	Producto Esperado
1.1. Participar en la impartición de 4 cursos en la Licenciatura en Biología Molecular y el Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería de la UAM-Cuajimalpa.	1.1.1. Docencia a nivel Licenciatura y Posgrado.
1.2 Participar en el proceso de refrendo de la acreditación de la Licenciatura en Biología Molecular.	1.2.1 Fortalecimiento de la Licenciatura
1.3 Participar en las modificaciones y adecuaciones pertinentes de los planes de estudio de la Licenciatura en Biología Molecular.	1.3.1 Fortalecimiento de la Licenciatura
1.4 Formar recursos humanos de alta especialización a través de la dirección de al menos un proyecto terminal a nivel Licenciatura o una tesis de Posgrado y Difundir los resultados obtenidos en simposios nacionales o internacionales.	<p>1.4.1 Fortalecimiento de la Licenciatura en Biología Molecular y del Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería de la UAM-Cuajimalpa (PNPC-CONACyT).</p> <p>1.4.2 Difusión y divulgación científica.</p>

Objetivo 2 institucional:

Fortalecimiento de Cuerpos Académicos

Actividad	Producto Esperado
2.1 Fortalecer la línea de investigación "Síntesis, Funcionalización y Caracterización de Fullerenos como Inhibidores de la Agregación de Proteínas y como Ligandos para la Construcción de Redes-Metalorgánicas Nanoporosas" perteneciente al cuerpo académico	<p>2.1.1 Consolidación de líneas de generación y aplicación del conocimiento.</p> <p>2.1.2. Fortalecimiento y consolidación de cuerpos académicos.</p>

Consolidado de Fisicoquímica y Diseño Molecular de la UAM-Cuajimalpa.	
2.2 Fortalecer colaboraciones científicas y académicas con los cuerpos académicos del Departamento de Ciencias Naturales y con el cuerpo académico de Ingeniería Biomédica de la Universidad de Guanajuato, campus León.	2.2.1. Fortalecimiento y consolidación de cuerpos académicos.
2.3. Participar en proyectos de investigación e innovación interdisciplinarios para resolver problemas en el sector salud (Enfermedades neurodegenerativas).	2.3.1. Gestión/obtención de recursos financieros con incidencia indirecta en el proyecto.

6. Bibliografía:

- [1] a) Härd, T.; Lendel, Ch. *J. Mol. Biol.* **2012**, 421, 441-465. b) Li, Ch.; Mezzenga, R. *Nanoscale*, **2013**, 5, 6207–6218. c) Xie, L. Wei, G. *Nanoscale*, **2014**, 6, 9752–9762.
- [2] Kim, J. E.; Lee, M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, 303, 576–579.
- [3] a) Bednarikova, Z.; Huy, P. D. Q.; Gazova, Z. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2016, 18, 18855–18867. b) Bobyleva, A. G.; Marsagishvilia, L. G.; Podlubnaya, Z. A. *Biophysics*, **2010**, 55, 699–702.
- [4] a) Martínez-Herrera Melchor, Figueroa-Gerstenmaier Susana, Beltrán Hiram I, Lerma-Romero Jorge, López-Camacho Perla, Basurto-Islas Gustavo. *RSC Advances*, 2018, 8, 39667-39677. b) Melchor Martinez Herrera, Estudio Termoquímico de Fullerenos y Fullerenos Funcionalizados, Tesis Doctoral, Cinvestav-IPN, **2010**. c) Martínez-Herrera, M.; Rojas-Aguilar, A. *J. Phys. Chem. C* **2011**, 115, 20849-20855. d) Martínez-Herrera, M.; Rojas-Aguilar, A. *J. Phys. Chem. C* **2011**, 115, 1541-1547.
- [5] Sechi, M.; Azzena, U.; Delussu, M. P.; Neamati, N. *Molecules* **2008**, 13, 2442-2461.
- [6] Straface, E., Natalini, B., Monti, Malorni, W. *FEBS Letters*, **1999**, 454, 335–340.
- [7] Camps, X.; Hirsch, A. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1997**, 1595-1596.
- [8] Guldi, D. M.; Hungerbuehler, H.; Asmus, K. D. *J. Phys. Chem.* **1995**, 99, 13487–13493.
- [9] Stine, W. B.; Jungbauer, L.; Yu, C., Ladu, M. J. *Methods Mol Biol.* **2011**, 670, 13–32.