

Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería

Tesis Doctoral

**“Determinación del mecanismo de acción de inhibición  
de la L-tirosina en la formación de fibras amiloides de  
lisozima humana”**

Que presenta como requisito para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias Naturales e Ingeniería

Mtro. Santos Arturo López Guzmán

**Directores**

Dr. Hugo Nájera Peña

Dr. Arturo Rojo Domínguez

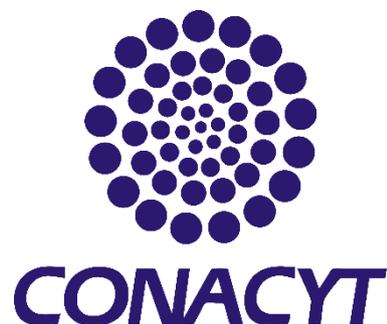
Asesores

Dr. Alejandro Sosa

Dr. Rafael Zubillaga

Laboratorio de Biofisiocoquímica

Ciudad de México, 11 de febrero de 2025.



Esta tesis de doctorado se realizó dentro del Programa de Doctorado del **Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería** de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería (DCNI) de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Cuajimalpa. El trabajo experimental y de cómputo se realizó de septiembre de 2021 a marzo de 2025 en el laboratorio de Biofísicoquímica de la DCNI. Durante este tiempo se contó con una beca otorgada por el **CONAHCYT**, sin la cual hubiese sido imposible lograr este trabajo.

## DECLARACIÓN DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D. F. el día 14 del mes 07 del año 2025, el que suscribe **Santos Arturo López Guzmán** alumno del Programa de Doctorado, en Ciencias Naturales e Ingeniería de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Cuajimalpa, manifiesta que es autor intelectual de la presente tesis titulada; **“Determinación del mecanismo de acción de inhibición de la L-tirosina en la formación de fibras amiloides”** realizada bajo la dirección de los doctores Hugo Nájera Peña y Arturo Rojo Domínguez cede los derechos de este trabajo a la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráfico o de datos del trabajo, sin el permiso expreso de los directores del trabajo como representantes de la UAM. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones: [hnajerap@gmail.com](mailto:hnajerap@gmail.com) y [arturorojod@gmail.com](mailto:arturorojod@gmail.com) .

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



\_\_\_\_\_ Santos Arturo López Guzmán \_\_\_\_\_

Nombre y firma del alumno

## DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

“El que suscribe, (Santos Arturo López Guzmán), alumno del Programa de Doctorado, en Ciencias Naturales e Ingeniería declara que los resultados reportados en esta idónea comunicación de resultados son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Así mismo, declaro que hasta donde es de mi conocimiento no contiene material previamente publicado o escrito por otras (s) persona (s) excepto donde se reconoce como tal a través de citas y que este fue usado con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, finalmente, que la redacción de este trabajo es producto de mi propia labor con la dirección y apoyo de mis directores y de mi comité tutorial, en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación y a la expresión escrita.”



\_\_\_\_\_ Santos Arturo López Guzmán \_\_\_\_\_

Nombre y firma del alumno

## DECLARACIÓN DE NO LUCRO:

El que suscribe, Santos Arturo López Guzmán alumno del Programa de Doctorado, en Ciencias Naturales e Ingeniería, manifiesta su compromiso de no utilizar con fines de difusión, publicación, protección legal por cualquier medio, licenciamiento, venta, cesión de derechos parcial o total o de proporcionar ventajas comerciales o lucrativas a terceros, con respecto a los materiales, datos analíticos o información de toda índole, relacionada con las actividades e intercambios de información derivados de la relación de investigación académica y tecnológica desarrollada entre la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) y Santos Arturo López Guzmán.



Santos Arturo López Guzmán

Nombre y firma del alumno

**Dedicada a mi hija Emma**

## **Agradecimientos**

Gracias a mi familia quienes siempre me han apoyado en todas mis decisiones y que sin su apoyo no hubiera sido posible llevar a cabo esta meta.

A Dafne mi esposa, quien me apoyo en todo momento, me ánimo a continuar y soportó mis frustraciones en el desarrollo de este proyecto.

Agradezco a mis directores Hugo Nájera y Arturo Rojo por brindarme el mejor asesoramiento, así como una gran dirección durante el proyecto y ayudarme a tener una formación profesional competente en diversas áreas.

A mi compañero Ricardo Cerón y Jesús Rojas por los consejos y sugerencias que me facilitaron el trabajo de laboratorio y en el desarrollo de los experimentos realizados.

A la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa por brindarme toda mi formación académica y a CONACYT por el otorgamiento de una beca que me permitió llevar a cabo mis estudios y el proyecto aquí presentado.

## Índice

Resumen .....	9
Introducción.....	10
<b>Proteínas</b> .....	10
<b>Fibras amiloides</b> .....	10
<b>Amiloidosis y formación de fibras amiloides</b> .....	12
<b>Tioflavina T como método de detección</b> .....	13
<b>Fluorescencia</b> .....	15
<b>Dicroísmo Circular (DC)</b> .....	15
<b>Lisozima humana como modelo de estudio</b> .....	16
<b>Compuestos fenólicos</b> .....	17
<b>Importancia de la investigación realizada</b> .....	19
<b>Hipótesis</b> .....	20
<b>Objetivos</b> .....	20
<b>Materiales y métodos</b> .....	21
<b>Resultados y discusión</b> .....	25
<b>Fibras amiloides a pH y temperatura fisiológicos</b> .....	25
<b>Efecto de los compuestos fenólicos en la fibrilogénesis de lisozima humana</b> .....	26
<b>Efecto inhibitorio de la L-tyr en la fibrilogénesis de lisozima humana</b> ..	28
<b>Efecto de otras concentraciones de L-tyr en la fibrilogénesis</b> .....	30
<b>Fluorescencia del ANS</b> .....	31
<b>Desnaturalización térmica</b> .....	32
<b>Calorimetría de barrido diferencial (DSC)</b> .....	34
<b>Desnaturalización por urea</b> .....	35
<b>Microscopía electrónica de barrido (SEM)</b> .....	37
<b>Dicroísmo circular (CD)</b> .....	38
<b>Simulación de las primeras fases de la desnaturalización</b> .....	40
<b>Simulación de la asociación molecular o “Docking”</b> .....	41
<b>Simulación de los primeros pasos de la desnaturalización en presencia de L-tyr</b> .....	43
<b>Conclusiones</b> .....	45
<b>Perspectivas</b> .....	46
<b>Artículo publicado</b> .....	47
<b>Referencias</b> .....	48

## Resumen

Las fibras amiloides son proteínas con un plegamiento no convencional caracterizado por una estructura en su mayoría de láminas  $\beta$  y un acomodo espacial de fibra. Estas proteínas están relacionadas con diversas enfermedades, conocidas como amiloidosis, algunas de las más relevantes son las enfermedades de Alzheimer, Parkinson, amiloidosis sistémica, entre otras. Por lo que la investigación en esta área es esencial para encontrar algún compuesto que pueda ayudar en el tratamiento de estos padecimientos. En este trabajo se demuestra la capacidad de la L-tirosina para inhibir la formación de fibras amiloides de lisozima humana. El efecto inhibitorio se presentó en una relación molar de 1:1 (proteína: compuesto) en condiciones fisiológicas, pH 7.4 y 37 °C. La inhibición de la formación de fibras reduce la señal de fluorescencia de la tioflavina T, compuesto que se usa como reportero de la formación de fibras amiloides. Por otro lado, durante la desnaturalización química de la lisozima, hubo un cambio en el espectro de fluorescencia intrínseca cuando estuvo presente la L-tirosina, indicando que existe interacción entre estas dos especies. El estudio de acoplamiento molecular por métodos computacionales (conocido como "*docking*") fue realizado con el paquete MOE, y este mostró evidencia importante de la estabilización de la proteína cuando ésta interacciona con la L-tirosina.

## Introducción

### Proteínas

Las proteínas son moléculas de suma importancia para la vida, debido a que cumplen múltiples funciones. Para que una proteína pueda ser funcional debe de cumplir dos requisitos primordiales, encontrarse en el ambiente indicado y tener la estructura correcta, en otras palabras, que esta tenga un plegamiento adecuado para su funcionamiento. Las células han desarrollado diversos mecanismos que ayudan a las proteínas a tener el plegamiento correcto y se encargan de eliminar las que tienen una síntesis incorrecta o un mal plegamiento [1]. Cuando estos mecanismos no actúan de forma correcta se pueden formar agregados desordenados o puede ocurrir la formación de estructuras amiloides, estas últimas son estructuras muy estables que se pueden reconocer debido a que poseen propiedades específicas de tinción, presentan birrefringencia al color verde-manzana cuando se tiñen con rojo Congo, se pueden observar por microscopía de luz polarizada [2] existen otros métodos como lo es la inmunquímica o en su efecto otros colorantes como el rojo corintio o la bezopurpurina 4B [3]. Actualmente se asocian estas fibras amiloides con enfermedades degenerativas del sistema nervioso central como son el Alzheimer y Creutzfeldt-Jakob [4], estas son neuropáticas, estas también son conocidas como locales ya que solo se encuentran en un solo órgano. Hay otro tipo de amiloidosis las cuales son sistémicas, las que pueden tener presencia en diferentes partes, forman depósitos de proteínas en tejidos, ligamentos y órganos como el corazón o la piel. Se han identificado más de 40 proteínas y péptidos, por ejemplo: péptido  $\beta$ A, tau,  $\alpha$ -sinucleína, hungtintina, amilina,  $\beta$ 2-microglobulina, lisozima, etc. que forman agregados amiloides en humanos principalmente como depósitos extracelulares [5].

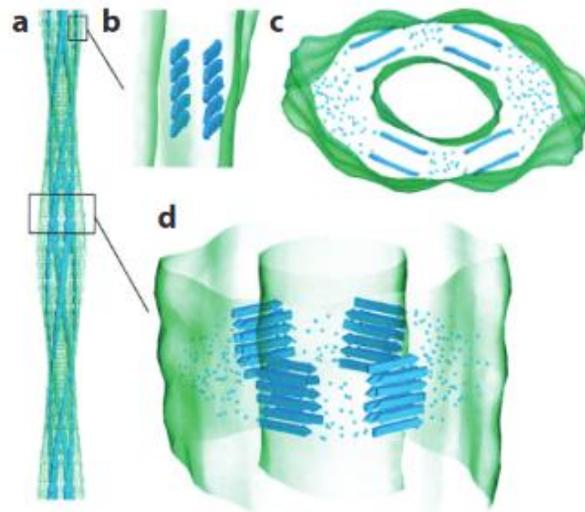
### Fibras amiloides

Estas fibras son proteínas con un plegamiento no convencional que se caracteriza por tener una estructura cruzada  $\beta$ , por lo cual suelen ser muy estables, debido a que este tipo de estructura posee la propiedad intrínseca de formar estructuras

laminares extendidas [6]. En las cuales se forman muchos puentes de hidrógeno, que en forma individual son débiles, pero al estar en una gran cantidad confieren una alta estabilidad y rigidez a las fibras [7].

Se ha propuesto que las fibras amiloides no presentan ramificaciones tienen un diámetro variable y longitud indefinida, dictada por la cantidad de proteína presente. Están constituidas de 2 a 4 protofilamentos, cada uno de estos protofilamentos está compuesto por 4 hebras  $\beta$  separadas por  $\sim 10$  Å [8,9]. La organización de las fibras se representa en la figura 1 donde se observa desde la fibra hasta la organización de las hebras  $\beta$ .

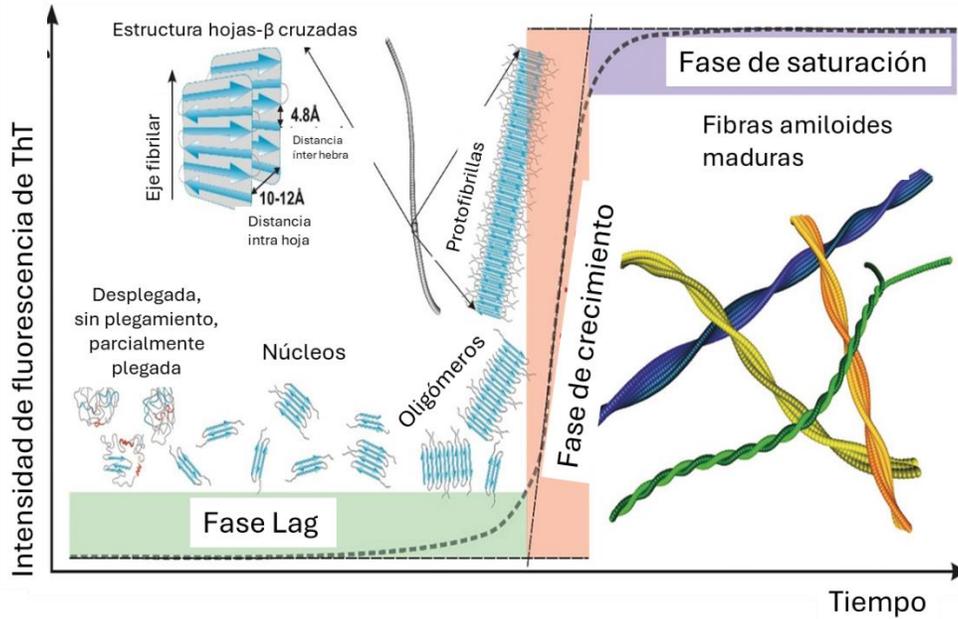
A pesar de que diferentes proteínas forman fibras amiloides, no se ha encontrado una estructura o secuencia de aminoácidos que esté directamente relacionada con la formación de amiloides, debido a que las proteínas no tienen una característica en común que las relacione. Debido a esto, se ha propuesto que la formación de fibras amiloides es una propiedad genérica que poseen las proteínas [10][11].



**Figura 1.** Modelo de una fibra amiloide de SH3 donde se observa la posición de las hojas beta. (a) Sobrevista de una fibra amiloide compuesta por cuatro protofilamentos. (b) Vista lateral de un protofilamento. (c) Sección cruzada de la fibra. (d) Vista lateral de la fibra. Figura tomada de: [10].

## **Amiloidosis y formación de fibras amiloides**

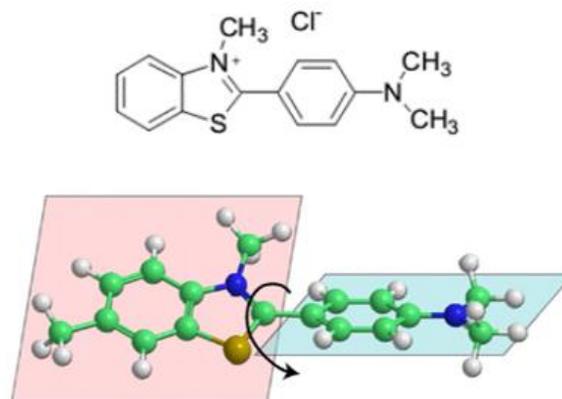
Las amiloidosis hacen referencia a depósitos extracelulares de proteínas que tienen un plegamiento no convencional, el cual consiste en hojas- $\beta$  como principal estructura secundaria. La presencia de estos depósitos fue reportada en muchas enfermedades [12]. Algunas de las enfermedades más conocidas son el Parkinson, el Alzheimer, y la amiloidosis sistémica, entre otras [4]. Por esta razón, es importante estudiar compuestos que puedan inhibir la amiloidogénesis [13]. Muchos compuestos se han estudiado, pero solo unos pocos tienen el efecto de inhibidor y menos aún son adecuados para el uso en humanos. Algunos compuestos naturales han sido prometedores en esta área, como lo son los fenoles y los aminoácidos [14]. Para encontrar compuestos que puedan inhibir es necesario saber el proceso de formación de dichas fibras. Este proceso se considera que es de nucleación el cual consiste en una fase de retraso (*lag*) inicial, donde los núcleos se ensamblan por lo que es la fase más lenta del proceso. Posteriormente aparece una fase exponencial de crecimiento, donde las fibras se ensamblan a partir de los oligómeros formados en la fase anterior; por último, existe la fase de saturación donde las fibras han alcanzado su tamaño final [15], este proceso se muestra en la figura 2. Estructuralmente las fibras están formadas de dos o más protofilamentos, cada uno de ellos con un núcleo de hojas- $\beta$  cruzadas. Cada fibra tiene un diámetro de 5 a 15 nm, con una longitud que varía en el intervalo de los micrómetros [16]. Los estudios *in vitro* que han usado péptidos o proteínas relacionados a estas enfermedades, han dado como resultado información acerca de las características fisicoquímicas de los procesos de agregación que probablemente ocurren *in vivo* [17].



**Figura 2.** Esquema de las etapas involucradas en la formación de fibras amiloides, conformado por la fase lag, log y de saturación o estacionaria. Figura tomada de: [18].

### Tioflavina T como método de detección

La forma más común de estudiar la formación de fibras amiloides, es mediante el uso de la tioflavina T (ThT) como método de detección [19]. La ThT es un benzotiazol catiónico, en su estructura química tiene un extremo hidrófobo con un grupo dimetil amino fenilo ligado a un grupo polar (benzotiazol) (figura 3).



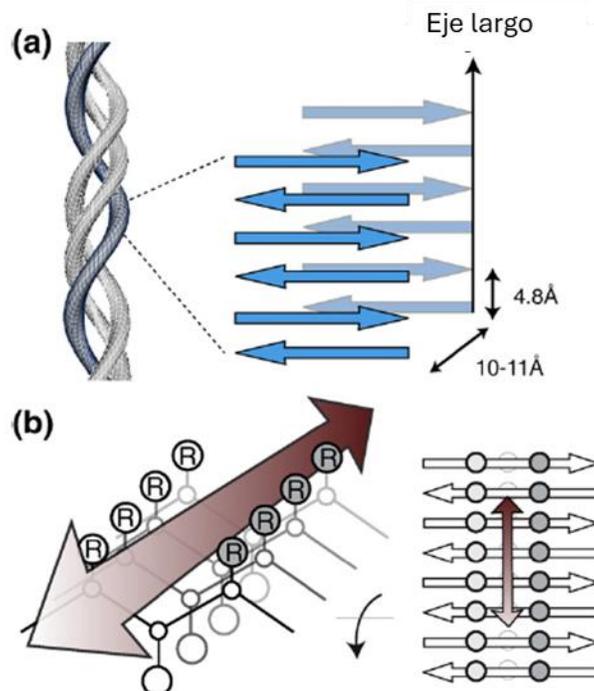
**Figura 3.** Estructura de la tioflavina T y sus planos de rotación. Figura tomada de: [20].

Una característica muy importante de esta molécula es su capacidad de rotación como se observa en el esquema de la figura 3 representado por una flecha. La

importancia de este movimiento radica en darle la capacidad de fluorescencia a la ThT cuando interacciona con las fibras.

El mecanismo por el cual se une la ThT a las fibras consiste en la intercalación de la tioflavina en los surcos o canales que se forman por la estructura común que tienen las fibras amiloides como se muestra en la figura 4. Al entrar en estos espacios, la molécula de tioflavina T pierde su capacidad de rotación, haciendo que se vuelva rígida lo que aumenta significativamente su fluorescencia [20]. Este mecanismo explica por qué el ThT es tan usado para la detección de fibras y su especificidad por ellas. Por lo tanto, cuando se une a fibras, presenta fluorescencia, ocasionando que entre mayor sea la presencia de fibras mayor será la intensidad de la fluorescencia [20]

También se ha descrito que para que haya una interacción en la superficie de las fibras con el ThT, es necesaria la presencia de aminoácidos aromáticos [21].



**Figura 4.** Estructura común de las fibras y canales en los cuales la interacción es ThT-Fibra. (a) Estructura  $\beta$  cruzada de fibras amiloides que forma capas de láminas de hebras  $\beta$ . (b) Canales o surcos en los cuales interacciona el ThT y que se forman por la estructura que toman las fibras, ThT representado por la flecha bidireccional. modificada de: [20].

## **Fluorescencia**

La fluorescencia es la luz que emite una molécula que ha absorbido energía electromagnética, tanto la emisión y la excitación son longitudes de onda únicas para cada molécula por lo que esta propiedad ha sido muy útil para investigaciones de procesos moleculares [22], usando ciertos compuestos como reporteros de algunos fenómenos.

Normalmente la fluorescencia se da en moléculas aromáticas, debido a su capacidad de resonancia [23]. En las proteínas se ha usado la fluorescencia intrínseca que corresponde a los aminoácidos aromáticos como reporteros de procesos de plegamiento y desplegamiento de las proteínas, en particular la fluorescencia del triptófano es muy sensible a los cambios estructurales de las proteínas [24].

Las propiedades de fluorescencia de cada proteína son características para ella, es decir, una proteína siempre tendrá las mismas propiedades a menos que esta sufra alguna perturbación, por lo que los cambios observables ayudan a discernir entre el estado plegado, desplegado o algún intermediario [25]. No existe una relación estricta del estado de la proteína con la fluorescencia de la proteína. En este sentido se ha encontrado que para algunas proteínas la fluorescencia del triptofano esta apagada cuando esta plegada y cuando se despliega aumenta la fluorescencia [26] y en el otro lado proteínas como la nucleasa de *Staphylococcus aureus* que al estar plegada tiene una alta fluorescencia del triptofano y cuando se despliega pierde la intensidad [27].

## **Dicroísmo Circular (DC)**

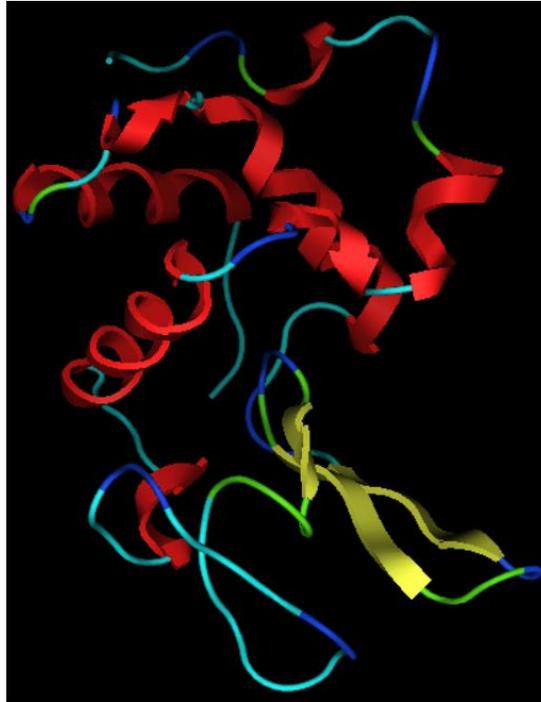
El dicroísmo circular corresponde a la diferencia de absorción de la luz circularmente polarizada en dos direcciones opuestas. En la región de 170 a 250 nm, la mayoría de las transiciones electrónicas de los enlaces peptídicos contribuyen al espectro de DC de las proteínas [28]. Dependiendo de la geometría local, el entorno y el patrón de enlaces de hidrógeno de los enlaces peptídicos, las cadenas

polipeptídicas con diferentes conformaciones pueden exhibir perfiles espectrales característicos y distintivos, lo que se manifiesta en los espectros de DC de proteínas de diferentes clases estructurales [29]. Usualmente un espectro de DC se obtiene de un promedio de ciertas repeticiones de los escaneos obtenidos de una muestra, el espectro obtenido se puede normalizar a unidades estándar de elipticidad residual, usando la concentración, el paso óptico de la celda, el número de residuos y la masa de la proteína [30]. Los espectros obtenidos sirven para averiguar la cantidad de estructura secundaria de las proteínas, ya que cada estructura tiene longitudes de onda e intensidades características. Las hélices  $\alpha$  presentan un espectro con picos negativos a 222 nm y a 208 nm, las hojas  $\beta$  tienen un espectro con un pico negativo a 215 nm y uno positivo en 198 nm, la estructura desordenada se asocia a un espectro con un pico negativo en 200 nm [28]. Estas bandas se conocen al analizar proteínas con solo un tipo estructura. Para las proteínas que tienen una combinación de todas estas variedades se obtienen espectros que combinan toda las características, lo que dificulta el análisis simple, para obtener los porcentajes de cada estructura es necesario descomponer el espectro obtenido, esto se realiza mediante la comparación del espectro con el de proteínas que se conoce su estructura por medio otras técnicas como NMR o difracción de rayos X, que se encuentran en bases de datos, adicionalmente se desarrollan algoritmos que hacen estimaciones de los porcentajes de cada estructura, por ejemplo el método llamado selector de estructura secundaria  $\beta$ , el cual toma en cuenta los giros de las estructura de hoja  $\beta$  [31]. En la actualidad hay diversos servidores que utilizan diferentes algoritmos para predecir la estructura secundaria de las proteínas.

### **Lisozima humana como modelo de estudio**

La lisozima es una hidrolasa glucosídica que está presente en el cuerpo humano [32]. Es uno de los mejores modelos para el estudio de fibras amiloides por su disponibilidad y pureza. Presenta dos dominios estructurales  $\alpha$  y  $\beta$  [33] como se muestra en la figura 5. En esta estructura se han encontrado al menos dos diferentes mutaciones relacionadas con la formación de fibras amiloides (D67H y I56T); estas ocurren en el dominio  $\beta$  dando como resultado la amiloidosis sistémica

[34]. La lisozima humana se encuentra en diversos fluidos del ser cuerpo humano, como lo son la saliva, las lágrimas y la sangre, todas comparten el pH 7.4 que es considerado fisiológico [35–38]



**Figura 5.** Estructura de la lisozima humana, donde se observa su dominio de hélices  $\alpha$  (rojo) y el dominio de hojas  $\beta$  (amarillo). (Obtenida del PDB 3FE0)

### **Compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos son aquellos que poseen una estructura química común que comprende un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilo, son el metabolito más abundante en plantas [39]. Más de 8000 compuestos fenólicos se han identificado, generalmente están involucrados en la defensa contra radiación a la luz ultravioleta o contra patógenos. En la última década ha habido un gran interés en su potencial en los beneficios para la salud [40]. En los últimos años se ha mostrado un incremento en las enfermedades degenerativas, los compuestos fenólicos han sido probados y se ha encontrado que pueden llegar a tener un efecto terapéutico [41]. Existen diversos estudios donde se han probado compuestos fenólicos para inhibir la formación de fibras amiloides en diferentes modelos de estudio, en el fragmento prion (106-108) se encontró que con la estructura básica

de una flavona se obtiene el efecto inhibidor [42], también se ha reportado efectos de inhibición de la fibrillogénesis en el péptido  $\beta$ -amiloide y colinesterasa [43,44], otro ejemplo de su uso es la funcionalización de nanopartículas para obtener mejores moléculas inhibidoras de la fibrillogénesis en insulina humana y  $\alpha$ -sinucleína [45]. Por lo que el grupo de los compuestos fenólicos emerge como un grupo particularmente prometedor [46].

## **Importancia de la investigación realizada**

El presente trabajo describe el potencial de la L-tirosina como inhibidor de la formación de fibras amiloides de lisozima humana a temperatura y pH fisiológicos. Cabe señalar que otros aminoácidos han sido probados en diferentes modelos de amiloidosis; por ejemplo, la arginina puede inhibir la formación de fibras de la  $\beta$ -caseína [47]. Otros compuestos se han probado previamente en la lisozima, algunos como monómeros, en otros casos como polímeros, la mayoría de estas pruebas se realizan a pH muy bajo o alto. Para poder considerarse como una simulación correcta del medio, es deseable trabajar con el pH fisiológico, es importante señalar que en estas condiciones solo pocos compuestos han resultado efectivos [48]. La búsqueda para encontrar compuestos nuevos ha mostrado que pequeños péptidos poseen la habilidad de inhibir la fibrillogénesis [49]. En este trabajo se propone como inhibidor de la fibrillogénesis un compuesto natural, abundante y que actúa en condiciones fisiológicas.

## **Hipótesis**

Si la L-tirosina es capaz de inhibir la formación de fibras amiloides de lisozima humana, esta lo hará mediante la interrupción del proceso de fibrilogénesis estabilizando una estructura intermediaria de la lisozima.

## **Objetivos**

### **General**

Inhibir la formación de fibras amiloides de lisozima humana a pH y temperatura fisiológica mediante el uso de L-tirosina y proponer el mecanismo de acción por el cual se lleva a cabo esta inhibición.

### **Particulares**

- Formar fibras amiloides de lisozima humana a temperatura y pH fisiológico.
- Demostrar la inhibición de la formación de fibras amiloides.
- Proponer un mecanismo de acción para el compuesto inhibitorio mediante experimentos de laboratorio y computacionales.

## **Materiales y métodos**

### **Materiales**

Los reactivos tioflavina T (ThT), lisozima humana, urea, L-tirosina (L-tyr), ácido cafeico, pirogalol, guayacol, ácido 6-(p-toluidino)-2-naftalenesulfónico (6-pT), epicatequina, crisina, quercetina y el ácido 8-anilino-naftaleno-1-sulfónico (ANS) y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  con el que se preparó la solución amortiguadora, se obtuvieron de Sigma-Aldrich, por último, el agua inyectable que se usó, fue de la marca PISA.

### **Formación de fibras amiloides**

La lisozima humana se preparó a una solución madre de  $50 \text{ mg mL}^{-1}$  (3.0 mM) en amortiguador de fosfatos de potasio 20 mM a un pH de 7.44, este tampón se utilizó para todos los experimentos. La ThT se preparó a una solución madre 10 mM en etanol absoluto. La fibrillogénesis se determinó por el seguimiento de la fluorescencia del ThT en placas negras Costar de fondo plano de 96 pozos, en un lector de placas TECAN Infinite M1000Pro. La concentración final de lisozima en los pozos fue de  $25 \text{ mg mL}^{-1}$  (1.5 mM) y  $66 \mu\text{M}$  para el ThT. Las muestras se excitaron a 450 nm y la emisión se colectó a 490 nm. Las lecturas de fluorescencia se tomaron cada 10 min durante 16 horas a  $37^\circ\text{C}$ .

### **Fibrillogénesis en presencia de compuestos**

Todos compuestos (ácido cafeico, L-tyr, pirogalol, guayacol, ácido 6-(p-toluidino)-2-naftalenesulfónico (6-pT), epicatequina, crisina y quercetina) se prepararon a una solución madre a 2.5 mM. Para la inhibición, el experimento se realizó a una relación molar 1:1 (proteína:compuesto) (1.5 mM:1.5 mM) para todos los experimentos. Se siguió la fluorescencia del ThT en el lector de placas TECAN Infinite M1000Pro. Las muestras se excitaron a 450 nm y la emisión se colectó a 490 nm. Las lecturas de fluorescencia se tomaron cada 10 min durante 16 horas a  $37^\circ\text{C}$ .

### **Fibrillogénesis en presencia de diferentes concentraciones de L-Tyr**

La L-tirosina se preparó a una solución madre de 10 mM. Para la inhibición, el experimento se mantuvo a una concentración de lisozima de  $25 \text{ mg mL}^{-1}$  (1.5 mM),

se probaron diferentes concentraciones de L-tyr 1.25, 2.5, 5 y 7.5 mM. Se siguió la fluorescencia por medio de ThT con una concentración final de 66  $\mu\text{M}$ , en el lector de placas TECAN Infinite M1000Pro. Las muestras se excitaron a 450 nm y la emisión se colectó a 490 nm. Las lecturas de fluorescencia se tomaron cada 10 min durante 16 horas a 37 °C.

### **Fluorescencia del ANS**

El ANS se preparó a una solución madre de 5 mM en el amortiguador de fosfato de potasio. Se estudiaron dos condiciones, a saber: la formación de las fibras en ausencia y en presencia de L-tyr (inhibición). El experimento se realizó en placas de 96 pozos y se monitoreó por la fluorescencia del ANS en el lector de placas mencionado anteriormente, la concentración final del reportero en cada pozo fue de 20  $\mu\text{M}$ . Las muestras se excitaron a 365 nm y la emisión se colectó a 450 nm. Las lecturas de fluorescencia se tomaron cada 10 min durante 16 horas a 37 °C.

### **Desnaturalización por calor**

Estos experimentos se realizaron en un espectrofluorómetro Chronos BH, en una celda de cuarzo de 1 cm de paso de luz. La fluorescencia intrínseca del triptófano se usó como reportero. La muestra se excitó a 295 nm y la emisión se tomó a 334 nm durante 30 minutos con rampa de temperatura de 1 °C  $\text{min}^{-1}$ , empezando en 25 °C y terminando a 55 °C. Se usó una concentración de 12.5 mg  $\text{mL}^{-1}$  de lisozima y cuando se realizó el experimento en presencia de L-tyr se mantuvo la relación molar de 1:1. Los datos obtenidos se analizaron en el programa Origin 2016 y se ajustaron con el modelo de Boltzmann.

$$\text{Ecuación 1: } y = A_2 + (A_1 - A_2) / (1 + \exp((x - x_0) / dx))$$

Donde  $A_1$  es el valor inicial,  $A_2$  valor final,  $x_0$  el centro y  $dx$  es la constante de tiempo.

### **Calorimetría diferencial de barrido (DSC)**

Los experimentos se llevaron a cabo en el equipo MicroCal VP-Capillary DSC, USA; se analizaron dos condiciones, en la primera la concentración de lisozima fue de

0.020 mM, en un amortiguador de fosfatos de potasio a pH 7.44; en la segunda en presencia de L-tyr a una relación molar 1:1. El ensayo térmico se realizó con un calentamiento de 1 °C min<sup>-1</sup> en un rango de 15-90 °C. Los datos obtenidos se procesaron en Origin con el paquete para DSC. La línea base se sustrajo de los termogramas obtenidos durante el análisis de datos. La temperatura de transición T<sub>m</sub> es el máximo del pico, las entalpías ΔH se determinaron a partir del área debajo del perfil de transición.

### **Desnaturalización por urea**

Los experimentos se realizaron en el espectrofluorómetro Chronos BH, se usó una celda de cuarzo de 1 cm de paso de luz. La fluorescencia intrínseca del triptófano se utilizó como reportero. La muestra se excitó a 295 nm y la emisión se tomó a 334 nm durante 2 horas. La concentración final para la urea fue de 6.5 M, para lisozima de 12.5 mg mL<sup>-1</sup> (0.75 mM) y en presencia de L-tyr se mantuvo la relación molar de 1:1. Los datos obtenidos se analizaron en Origin 2016 y se ajustaron al modelo BiDoseResp:

Ecuación 2:

$$y = A_1 + (A_2 - A_1) \left[ \frac{p}{1 + 10^{(\text{LOG}x01 - x)h_1}} + \frac{1-p}{1 + 10^{(\text{LOG}x02 - x)h_2}} \right]$$

Donde A<sub>1</sub> = Valor más bajo, A<sub>2</sub> = Valor más alto, LOGx01 = primer EC<sub>50</sub>, LOGx02 = segundo EC<sub>50</sub>, h<sub>1</sub> = pendiente 1, h<sub>2</sub> = pendiente 2, p = proporción

### **Microscopía electrónica de barrido SEM**

La microscopía se llevó a cabo en el equipo TM3030Plus Hitachi. La muestra se preparó dejando secar una gota de la condición a observar en un cubreobjetos durante 24 horas. Se observaron dos condiciones: fibras amiloides de lisozima y el resultado de la inhibición de éstas por la L-tyr. Se utilizó cinta de carbono para fijar el cubreobjetos al porta muestra del microscopio.

### **Dicroísmo circular**

Se registraron espectros de dicroísmo circular (CD) para la lisozima humana nativa, fibras amiloides de lisozima humana y el resultado final de la fibrillogénesis en presencia de L-tyr usando un espectropolarímetro de CD Jasco J-815 (Tokio, Japón) en el rango de 260 a 190 nm. Todos los espectros de CD reportados son el promedio de tres exploraciones consecutivas. Los datos de los espectros de CD se analizaron utilizando el programa "BESTSEL" (<https://bestsel.elte.hu/index.php>). Se utilizó una concentración de 0.10 mg mL<sup>-1</sup> y una celda con un paso de luz de 1 mm.

### **Simulación de las primeras fases de la desnaturalización**

En esta nueva metodología se busca simular computacionalmente las primeras fases de la desnaturalización. Para este efecto, inicialmente se multiplican las coordenadas de los átomos de la proteína por un factor de expansión ligeramente mayor a 1 para crear una expansión o estiramiento de la proteína; para después someterla a un proceso de minimización de energía, donde se busca que la estructura regrese a su estado original, al repetir este proceso, que denominamos ciclo, se observa que ciertas partes de la proteína no regresan a su lugar original, las cuales se consideran como zonas débiles o de ruptura. Gracias a esto, se va perdiendo la estructura inicial, lo que se interpreta como las fases iniciales de la desnaturalización de una proteína. Para realizar lo anterior, se utilizó el programa Molecular Operating Environment (MOE). El PBD de la lisozima humana se obtuvo del archivo 3FE0 y se optimizó con el mismo programa, utilizando como campo de fuerza Charmm27. Se evaluaron diferentes factores de expansión desde 1.05 hasta 1.15 en incrementos de 0.05 y todos se probaron durante 100 ciclos.

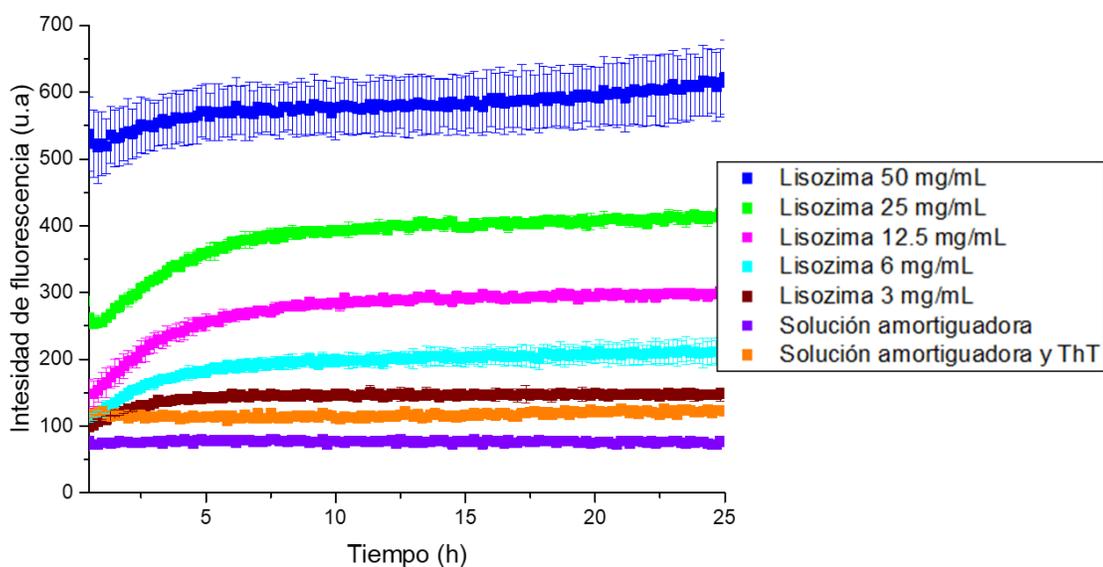
### **Docking**

El *docking* se realizó en el programa MOE. La estructura de la lisozima humana representativa de la fase inicial de la desnaturalización se obtuvo del ciclo 7 del proceso de simulación. El ligando L-tyr se obtuvo de PubChem (CID 6075). Se utilizó Charmm27 como campo de fuerza. Como posibles sitios de interacción se seleccionó a toda la proteína, el proceso de generación de poses iniciales se realizó con la función alpha triangle. Finalmente, como función de puntaje se utilizó London dG.

## Resultados y discusión

### Fibras amiloides a pH y temperatura fisiológicos

En este estudio, se investigó la formación de fibras amiloides a pH y temperatura fisiológicos, tanto en presencia como en ausencia de L-tyr. La formación de fibras amiloides se determinó mediante la emisión de fluorescencia del ThT, un indicador ampliamente utilizado que aumenta su fluorescencia al unirse a fibras amiloides [20]. La formación de fibrillas amiloides a pH y temperatura fisiológicos se evaluó a diversas concentraciones de proteína (3 - 50 mg mL<sup>-1</sup>), durante 26 horas. La formación de fibras se produce porque la concentración de proteína es muy alta en comparación con la concentración fisiológica (entre 6 y 12.5 mg/L) [50,51]; de esta forma, no todas las variables son físicas. Como se muestra en la Figura 6, la señal de ThT aumentó a concentraciones más altas de lisozima, lo que sugiere una formación de fibrillas más robusta [20,52].



**Figura 6.** Fluorescencia de ThT a diferentes concentraciones de lisozima: 3, 6, 12.5, 25, y 50 mg mL<sup>-1</sup> (vino, azul claro, rosa, verde y azul, respectivamente), en cuadros morados el buffer y en naranja el buffer más el ThT. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y la concentración de ThT es la misma para todas las condiciones.

Entre las concentraciones probadas, 25 mg mL<sup>-1</sup> de lisozima produjo resultados óptimos, ya que presenta una fluorescencia suficientemente alta para separarse de

las demás y no presenta el problema de la concentración más alta, específicamente  $50 \text{ mg mL}^{-1}$ , fue la menos consistente debido a las dificultades para lograr una solución homogénea. Esto significa la presencia de precipitados en la solución y la aparición de una disminución abrupta de la señal al inicio de las mediciones de ThT, que se pueden atribuir a la alta concentración de proteína y por otro lado las concentraciones bajas presentan una fluorescencia muy cercana a la de los controles.

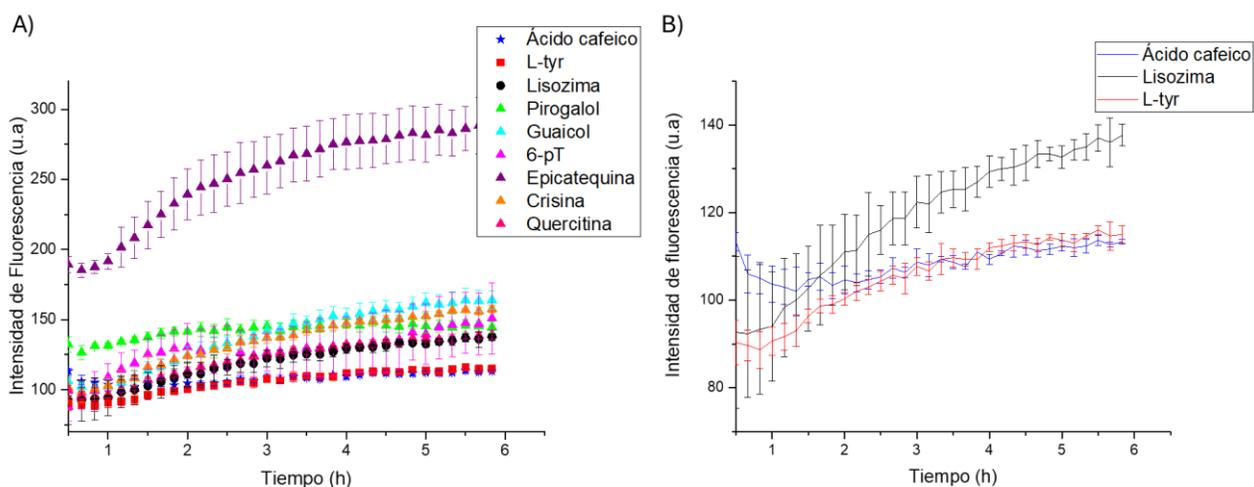
La Figura 6 ilustra que aumentar la concentración de lisozima, es suficiente para formar fibrillas amiloides; además, se forman completamente en 8 horas a una concentración de lisozima de  $25 \text{ mg mL}^{-1}$  y  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . En consecuencia, se seleccionaron  $25 \text{ mg mL}^{-1}$  para estudios adicionales sobre la inhibición con L-tirosina. El análisis microscópico confirmó la presencia de fibras amiloides (sección de microscopía), lo que demuestra que la lisozima humana puede formar estas estructuras en condiciones fisiológicas de pH 7,44 y  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , pero solo a concentraciones elevadas de proteína.

### **Efecto de los compuestos fenólicos en la fibrilogénesis de lisozima humana**

Después de establecer las condiciones para la formación de fibras amiloides se probaron diferentes compuestos fenólicos en la búsqueda de algún inhibidor.

El efecto de los compuestos fenólicos en la fibrilogénesis de lisozima humana se investigó en condiciones fisiológicas de pH (7.44) y temperatura ( $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ). El estudio se centró en los efectos que pueden tener los compuestos fenólicos, así como en la búsqueda de alguno(s) que pueda(n) inhibir la formación de fibras amiloides. La formación de fibras se determinó por la emisión de fluorescencia de ThT; se examinaron ocho compuestos: ácido cafeico, L-tyr, pirogalol, guayacol, sal sódica del ácido 6-(p-toluidino)-2-naftalenosulfónico (6-pT), epicatequina, crisina y quercetina (Figura 7). Se lograron observar tres diferentes efectos: 1) un incremento en la fluorescencia, lo cual indica una mayor aparición de fibras amiloides, tal es el caso de la epicatequina, con la que la fluorescencia se incrementó ca. 300 (u. a.), este comportamiento sugiere que este compuesto es un promotor de la fibrilogénesis. Este efecto concuerda con lo reportado en otras investigaciones

relacionadas con el polipéptido amiloide de los islotes o amilina (IAPP) [53]. Otros compuestos que también presentaron un incremento en la señal de fluorescencia, son: el guayacol, la crisina y el pirogalol. 2) intensidad de fluorescencia similar a la de la lisozima control, como son el 6-pT y la quercitina, lo que sugiere que no tienen efecto alguno sobre la fibrillogénesis. 3) Intensidad de fluorescencia de ThT, menores a los obtenidos en la lisozima control, los compuestos que tuvieron este último efecto son la L-Tyr y el ácido cafeico como se muestra en la figura 7B, sugiriendo que posiblemente tienen un efecto inhibitorio en la formación de fibras amiloides [54]. Después de las dos horas la señal de fluorescencia es similar para ambos compuestos hasta el final de la cinética. El efecto inhibitorio de compuestos fenólicos ya se ha documentado para algunos compuestos en la lisozima de clara de huevo [55,56]. El ácido cafeico ya se ha reportado con un efecto similar para la enfermedad de Alzheimer [57], por otro lado, derivados de la L-tyr se han identificados como inhibidores de la agregación del péptido beta amiloide [58].



**Figura 7.** Efecto de los compuestos fenólicos en la formación de fibras amiloides. A) Circulo negro (lisozima), rojo (L-tyr), azul (ácido cafeico), triángulo verde (pirogalol), triángulo azul claro (guayacol), triángulo magenta (6-pT), triángulo morado (epicatequina), triángulo naranja (crisina) y triángulo rosa (quercitina). B) Lisozima y los compuestos con efecto inhibitorio, línea negra (lisozima), roja (L-tyr) y línea azul (ácido cafeico). Todos los experimentos se realizaron a una relación molar de 1:1 (proteína: compuesto) y por triplicado.

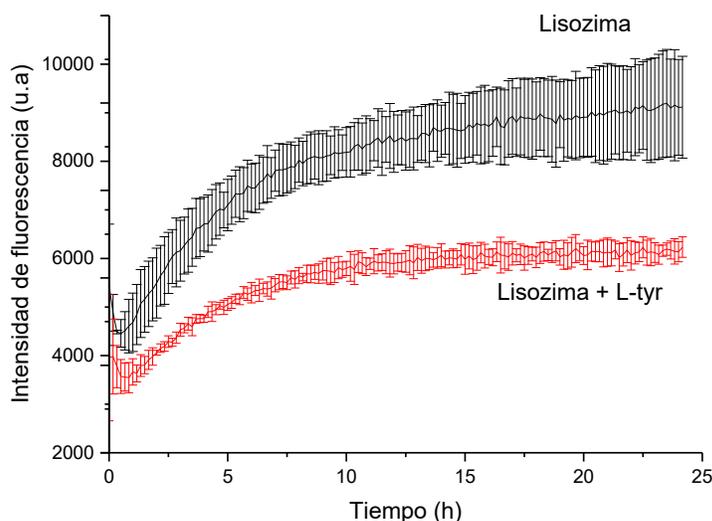
Los resultados anteriores sugieren que ambas moléculas pueden ser bases prometedoras (farmacóforos), para encontrar agentes terapéuticos dirigidos a diversas enfermedades.

Algunos estudios indican que los diferentes efectos inducidos por los compuestos fenólicos, probablemente pueden atribuirse a sutiles diferencias estructurales entre ellos, incluidas variaciones en los anillos fenólicos, grupos funcionales, carga y tamaño [59,60]. Investigaciones anteriores también han destacado la correlación entre la actividad biológica y el número de grupos hidroxilo en estos compuestos [61].

De todos los compuestos analizados se decidió continuar con la L-tyr, debido a su fácil obtención, adicionalmente es de interés, ya que es un aminoácido, por lo que se investigó el mecanismo por el cual inhibe la formación de fibras amiloides de lisozima humana.

### **Efecto inhibitorio de la L-tyr en la fibrillogénesis de lisozima humana**

Se ha reportado que nanopartículas de oro funcionalizadas con L-tyr o L-Trp pueden inhibir la formación de fibras en insulina, pero no ven inhibición con los aminoácidos libres [62]. En este estudio, se investigó a la L-tyr libre como inhibidor, los resultados se muestran en la Figura 8. Los datos revelan una reducción significativa en la intensidad de la fluorescencia de la ThT. Esta disminución en la fluorescencia indica una reducción en el contenido de láminas  $\beta$ , que son fundamentales para la estructura de las fibras amiloides, ya que el ThT interactúa específicamente con estas estructuras [20,63]. Estos hallazgos concuerdan con la literatura existente, que sugiere que los polifenoles exhiben propiedades de inhibición en la fibrillogénesis [64,65].



**Figura 8.** Cinética de inhibición de la fibrillogénesis de la lisozima humana por la L-tyr, seguida por la intensidad de fluorescencia del ThT. Lisozima en ausencia (negro) y en presencia de L-tyr (rojo). Relación molar (1:1).

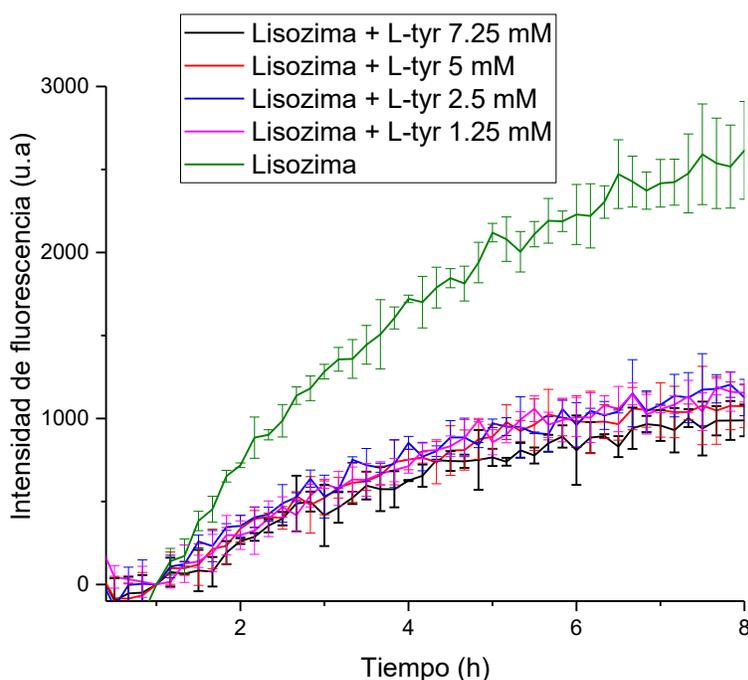
Los resultados demuestran un notable efecto inhibitorio en la formación de fibras amiloides de la lisozima humana por la L-tyr, lo que destaca su potencial en el campo de las inhibiciones. Esta observación respalda la idea de que los aminoácidos aromáticos, en lugar de ser esenciales para la formación de fibra amiloide, pueden alterar el proceso [66]. De hecho, muchos péptidos que inhiben la fibrillogénesis amiloide incluyen aminoácidos aromáticos en su estructura [67].

En particular, la inhibición de la fibrillogénesis fue efectiva en una proporción molar de 1:1 (lisozima a L-tyr), lo que enfatiza su potencial como agente inhibitorio. El efecto de inhibición fue evidente en las primeras etapas del proceso de fibrillogénesis, lo que sugiere un papel preventivo prometedor. Es probable que al interrumpir este proceso se formen especies, que sean oligómeros que conservan la capacidad de unirse a ThT, lo que indica la presencia de estructuras de lámina  $\beta$  con una afinidad específica por el reportero. Esta característica es consistente con otros oligómeros formados en condiciones de bajo pH [68]. Esto es importante, considerando que algunos estudios anteriores, han demostrado que la L-tyr puede autoensamblarse y actuar como semilla de otras proteínas que promueve la fibrilación; estos estudios difieren de los resultados actuales porque la metodología para formar fibras es

diferente; en uno de ellos, se calienta la solución de L-tyr a 90 °C y luego se enfría gradualmente para formar las fibras de tirosina [69]. En otro trabajo, imitan las condiciones fisiológicas como en el presente trabajo, y la tirosina a 2 mM, se reportó que es capaz de autoensamblarse después de una incubación, por lo que las fibras aparecen después de 25 horas de incubación [70]. Contrastando con los resultados mostrados en la figura 8, donde el proceso de inhibición ocurre en las primeras 2 horas, esto sugiere que la L-tyr (1.5 mM) interactúa primero con la proteína que consigo misma.

### Efecto de otras concentraciones de L-tyr en la fibrilogénesis

Para continuar con las pruebas de inhibición, se probó el aumento de la concentración del compuesto sobre la fibrilogénesis, esto con la finalidad de establecer si era un efecto dependiente de concentración. El resultado de este experimento se muestra en la figura 9.

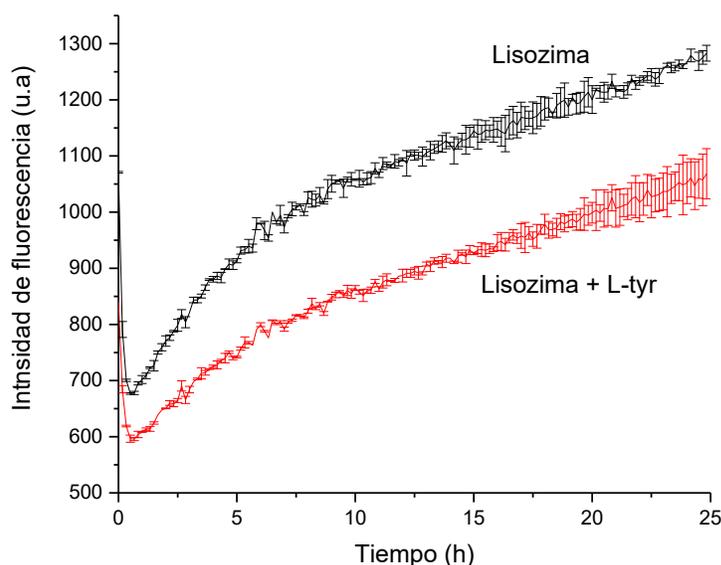


**Figura 9.** Efecto de diferentes concentraciones de L-tyr en la formación de fibras amiloides de lisozima humana, seguido por la intensidad de fluorescencia del ThT. Lisozima sola (verde), en presencia L-tyr a 1.25 mM (rosa), 2.5 mM (azul), 5 mM (rojo) 7.5 mM (negro). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Como se muestra en la Figura 9, la intensidad de fluorescencia es aparentemente la misma para todas las concentraciones, por lo que el aumentar la concentración de la L-tyr no aumenta el efecto de inhibición de la fibrillogénesis, por lo que se decidió continuar con la menor relación molar en la que hay efecto, que responde a la de 1:1 (compuesto: proteína), es probable que este efecto se deba a que la interacción necesaria para inhibir la formación de fibras se logre tan solo con la unión de una sola molécula de L-tyr a la lisozima, esta idea se trabajará en la sección de docking que se presenta más adelante.

### Fluorescencia del ANS

El aumento de superficie hidrófoba de la lisozima se monitoreó por los cambios en la fluorescencia del ANS, el cual interacciona con las cavidades hidrófobas de las proteínas [71].



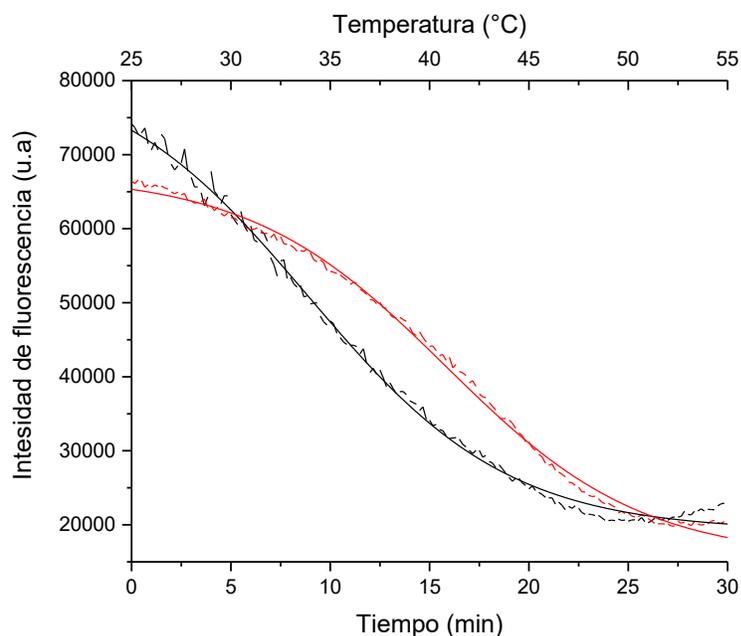
**Figura 10.** Fluorescencia del ANS en una cinética de la formación de fibras amiloides de lisozima humanal. En negro los datos de lisozima y en rojo la lisozima en presencia de L-tyr.

La Figura 10 muestra que la fluorescencia del ANS es mayor cuando la L-tyr se encuentra ausente. Esto significa que hay un menor número de zonas hidrófobas expuestas cuando se encuentra presente el aminoácido. La presencia de la L-tyr reduce o cambia el proceso de fibrillogénesis, lo que sugiere que el estado final de

la proteína en los dos casos es diferente. Esta reducción en la fluorescencia indica que la L-tyr evita la exposición de zonas hidrófobas y probablemente la formación de hojas- $\beta$ , esto quizás ocurre debido a un efecto de estabilización de la proteína por el compuesto, ocasionando una interrupción en la fibrilogénesis, dando lugar a otras estructuras que tienen una menor exposición de zonas hidrófobas. Lo que concuerda con lo obtenido anteriormente, en ambas pruebas (ThT y ANS) la intensidad del reportero disminuye y esto está directamente relacionado con la formación de fibras amiloides [72].

### Desnaturalización térmica

Este experimento se realizó en el intervalo de temperatura de 25 a 50 °C. Para analizar el efecto de la L-tyr, se estudiaron dos condiciones, lisozima sola y en presencia del compuesto como se muestra en la figura 11. En este rango de temperatura se observa el apagamiento de la fluorescencia del triptofano que ocurre por un aumento de la temperatura y está relacionado con los cambios en el medio [73].



**Figura 11.** Desnaturalización de lisozima por temperatura (intervalo 25-55 °C) seguido por la fluorescencia intrínseca del triptófano. La línea punteada negra, representa a la lisozima, y la línea punteada roja es la lisozima en presencia de L-tyr. Las líneas continuas son el ajuste de la ecuación 1.

El decaimiento de la fluorescencia sugiere un cambio conformacional de los triptófanos, que indica cambios en el entorno local [74]. Para comparar ambas condiciones se realizó un ajuste con la ecuación 1 descrita en materiales y métodos. En este ajuste hay dos parámetros esenciales para realizar esta comparativa. El primero es  $x_0$ , el cual indica la temperatura a la que se obtiene la mitad del cambio en la fluorescencia del proceso y el segundo es  $dx$  que es la constante cinética, como se explican a continuación:

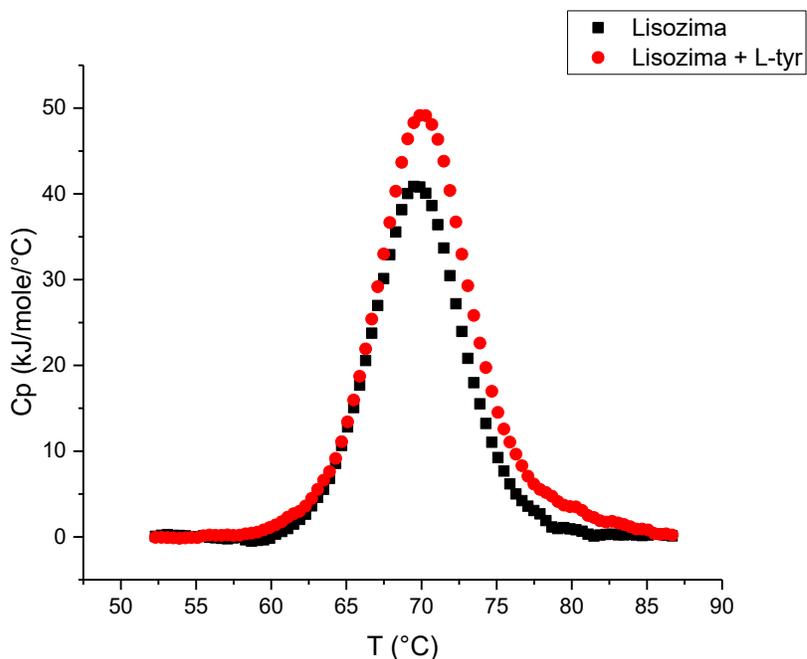
1. Punto medio ( $x_0$ ): Este parámetro refleja la temperatura en el cual están expuestos la mitad de los triptófanos, se obtuvieron valores de  $33.90 \pm 0.17$  °C y  $40.81 \pm 0.09$  °C para la lisozima en ausencia y presencia de L-tyr, respectivamente. Al compararlas se aprecia que hay una diferencia de 6.91 °C, lo que sugiere que la presencia de la L-tyr aumenta la temperatura necesaria para llegar a este punto, indicando que probablemente evita que los triptófanos se expongan al medio por una probable estabilización de la estructura.

2. Constante de ( $dx$ ): Este parámetro indica la temperatura a la que los triptófanos se exponen al solvente. Los valores obtenidos son: para lisozima  $5.04 \pm 0.12$  °C y para lisozima en presencia de L-tyr el valor es de  $4.93 \pm 0.10$  °C. La similitud en los datos significa que ambos casos necesitan la misma temperatura para ocurrir, lo que sugiere que los procesos son igual de cooperativos, pero desfasados. Tomando en cuenta el parámetro anterior ( $x_0$ ) se puede observar que, aunque el proceso necesita aproximadamente la misma temperatura, este no ocurre de la misma forma, cuando está presente la L-tyr, la primera mitad de dicho proceso es más lenta, indicando que el efecto de dicho compuesto ocurre en el inicio de la exposición de los triptófanos dificultando este proceso, para después acelerarlo, ocasionando que el proceso en ambos casos tenga aproximadamente la misma duración.

Puede que el efecto de la L-tyr sea el responsable de inhibir la formación de fibras amiloides, pues las fases iniciales del proceso son cruciales para la aparición de dichas fibras [75].

## Calorimetría de barrido diferencial (DSC)

Para complementar el estudio, se realizó DSC, donde se probaron de nuevo las dos condiciones (lisozima sola y lisozima en presencia de L-tyr). El resultado se muestra en la Figura 12.



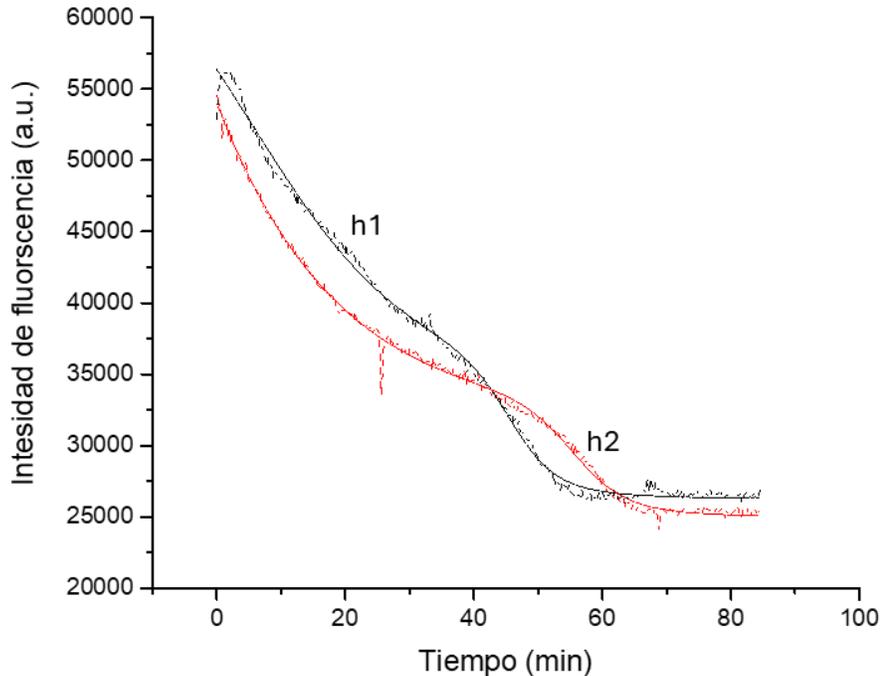
**Figura 12.** Termograma de la DSC que muestra el efecto de la L-tyr en la estabilidad de la lisozima. Los cuadros negros corresponden a la lisozima y los círculos rojos a la lisozima en presencia de la L-tyr

En ambos casos se obtuvo solo un pico endotérmico típico de una desnaturalización de proteína [76], cuando se comparan los parámetros obtenidos, la  $T_m$  es casi la misma, 69.5 °C para la lisozima y 69.6 °C en presencia de L-tyr, la diferencia es de 0.1 °C, la cual es no significativa. Para  $\Delta H$ , cuando la lisozima está sola, el valor es de 311.79 kJ mol<sup>-1</sup>; en presencia del compuesto es de 407.25 kJ mol<sup>-1</sup>. La diferencia es de 95.46 kJ mol<sup>-1</sup>; esto indica que es necesaria mayor energía calorífica para pasar del estado nativo al desnaturalizado, cuando se encuentra presente la L-tyr. Añadido a esto, el valor de la capacidad calorífica (Cp) en la  $T_m$  para la lisozima es de 40.86 kJ °C<sup>-1</sup>mol<sup>-1</sup>, y en presencia de L-tyr es 49.14

$\text{kJ } ^\circ\text{C}^{-1}\text{mol}^{-1}$ , la diferencia entre estas dos condiciones es de  $8.28 \text{ kJ } ^\circ\text{C}^{-1}\text{mol}^{-1}$ . Esta medición indica que, aunque la  $T_m$  es prácticamente la misma para ambos casos, la energía necesaria para llegar a este punto es diferente, siendo mayor lo requerido cuando la lisozima se encuentra en presencia de la L-tyr. El valor de  $\Delta H$  y  $C_p$  se pueden tomar como parámetros que indican una mayor estabilidad energética de la proteína [77,78]. Después de estas comparaciones es evidente que la L-tyr causa un requerimiento energético mayor en ambos parámetros, debió a esto se puede considerar un aumento en la estabilidad de la proteína. Lo que concuerda con lo obtenido en la sección anterior. Cabe mencionar que las  $T_m$  determinadas por DSC son diferentes de las obtenidas anteriormente (valor de  $x_0$ ), debido a que en el experimento del seguimiento de la fluorescencia el triptófano se obtiene información de los cambios locales en el ambiente y en la estructura que rodea al aminoácido [79,80], estas perturbaciones no son lo suficientemente grandes para coincidir con la  $T_m$  obtenida por DSC.

### **Desnaturalización por urea**

Para confirmar lo obtenido en las secciones anteriores se siguió la cinética de desnaturalización por urea de nuevo en ambas condiciones (lisozima y lisozima en presencia de L-tyr), los resultados obtenidos se muestran en la figura 13.



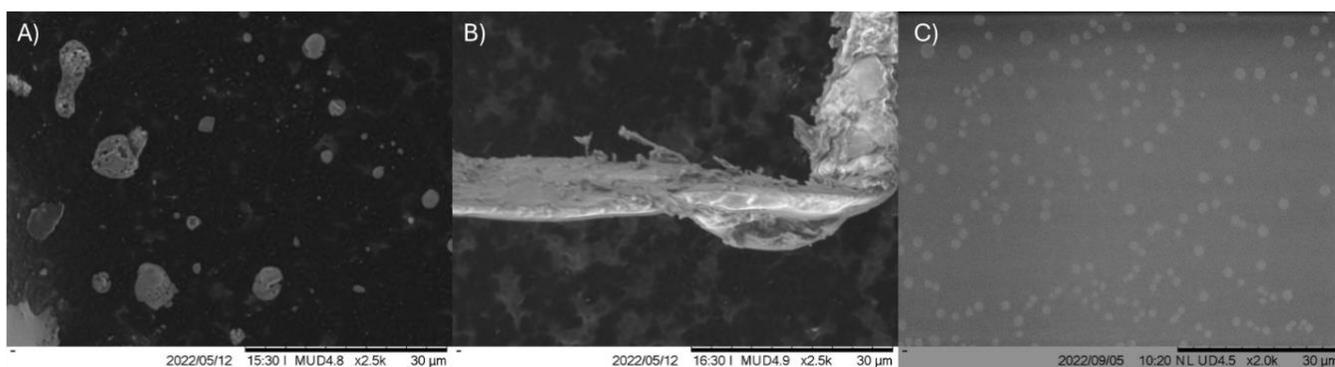
**Figura 13.** Cinéticas de desnaturalización de lisozima. Lisozima (puntos negros) y lisozima en presencia de L-tyr (puntos rojos) ambas en presencia de urea 6.5 M. Las líneas continuas muestran el ajuste realizado a la ecuación 2.

En esta desnaturalización, la urea interacciona con los residuos hidrófilos y transforma la estructura terciaria en una estructura laxa [81,82]. Es notable el comportamiento complejo de los trazos, señalando al menos dos etapas de desnaturalización. Con el ajuste realizado para ambas condiciones, es posible comparar parámetros importantes, como son las pendientes, que se pueden considerar como las constantes de tiempo;  $h_1$  se refiere a la primera caída y  $h_2$  es la segunda caída. Los valores para  $h_1$  son  $0.030 \pm 0.002 \text{ min}^{-1}$  para la lisozima y cuando está presente la L-tyr es de  $0.020 \pm 0.002 \text{ min}^{-1}$ , estos valores son casi idénticos, por lo que se puede decir que el inicio del proceso en ambas condiciones es el mismo. Probablemente se deba a que la urea interacciona inicialmente con los residuos hidrófilos de la proteína [81]. Para la segunda caída se obtuvo para la lisozima, un valor de  $0.120 \pm 0.008 \text{ min}^{-1}$  y cuando está presente la L-tyr  $0.100 \pm 0.006 \text{ min}^{-1}$ , la diferencia entre ambos valores es pequeña, lo que indica que la presencia del compuesto hace solo un poco más lento este proceso. El siguiente

parámetro para comparar es el punto medio de la segunda rampa. En este apartado se obtuvo  $45.57 \pm 0.16$  min para la lisozima y en presencia de L-tyr  $55.46 \pm 0.16$  min. Esto indica que se requiere un mayor tiempo para completar este segundo proceso o caída cuando la L-tyr está presente. Tomando en cuenta los experimentos anteriores, es posible decir que la L-tyr causa un efecto de estabilización estructural en la proteína debido a que en todos los resultados muestran un cambio hacia esa dirección cuando el aminoácido está presente.

### Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Para corroborar el efecto de la L-tyr se realizaron microscopías electrónicas de barrido bajo tres condiciones: 1) lisozima nativa, 2) fibras amiloides resultantes de la fibrillogénesis y 3) resultado de la fibrillogénesis en presencia de L-tyr. Los resultados de la microscopía indican que hay diferencias notorias en las tres condiciones mostradas en la Figura 14.



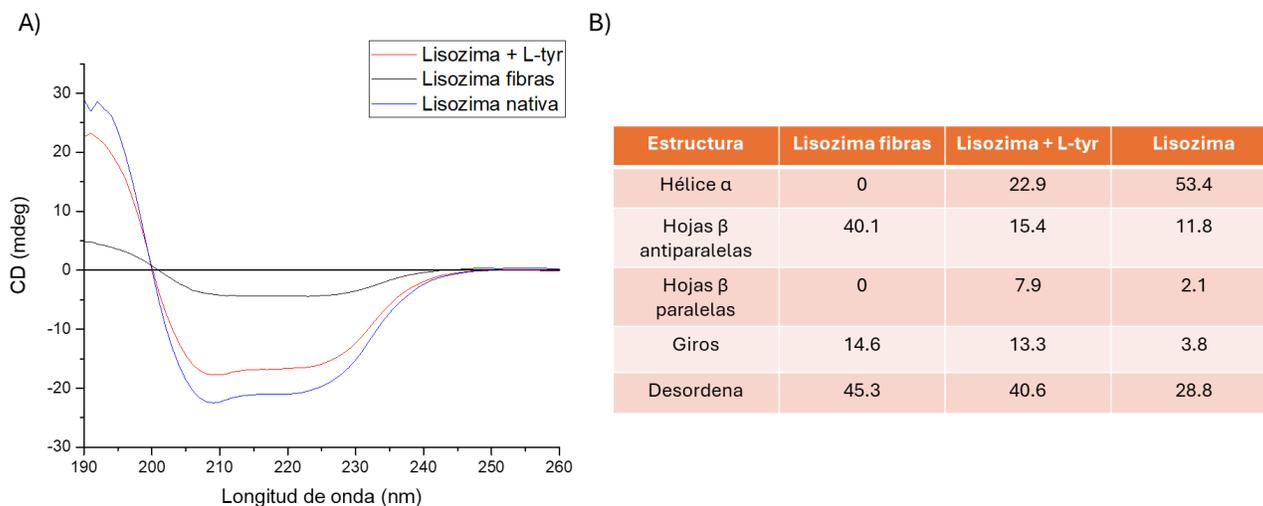
**Figura 14.** Imágenes SEM de lisozima en diferentes condiciones. A) Lisozima nativa. B) Fibra amiloide obtenida de la fibrillogénesis de lisozima. C) Fibrillogénesis de lisozima humana en presencia de L-tyr.

El panel A muestra la lisozima humana nativa y correctamente plegada, asemeja a una película de proteína. En el panel B se muestran las fibras amiloides resultantes de la fibrillogénesis de la lisozima, se obtuvo con el modo electrones secundarios (SE) a 5 kV, lo que exhibe mejor información de la morfología de la muestra [83]. En esta imagen se aprecia una fibra que está conformada por pequeñas fibras amiloides, esto es debido a que la base de este modelo de formación de fibras es la alta concentración de proteína ( $25 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Como se esperaba, cuando la L-tyr está presente, no hay presencia de fibras amiloides como se puede observar en el

panel C, lo que demuestra el efecto inhibitorio del compuesto. También se logra evidenciar, que en lugar de fibras hay una especie de puntos, estos pueden ser pequeños agregados con estructura diferente a la de la lisozima nativa, pero también diferente a la estructura de las fibras amiloides. Tomando en cuenta los resultados anteriores referentes a la fluorescencia de ThT y de ANS donde la intensidad de la fluorescencia disminuyó, pero no se volvió cero se puede decir que estos puntos resultantes de la inhibición la fibrillogénesis por L-tyr pueden unir tanto ThT como ANS en menor medida que las fibras amiloides, por lo que podrían ser algún intermediario entre la proteína nativa y las fibras amiloides. Dada la forma de estos puntos y características que presentan, otra posible explicación es que sean esferulitas, que se han reportado en la lisozima de huevo y lisozima humana [84]. En lisozima humana, también se han reportado, cuando hay un proceso de inhibición de la fibrillogénesis por arginina y alcohol bencílico que interrumpe la formación en los primeros pasos [85].

### **Dicroísmo circular (CD)**

CD-UV lejano, es una técnica espectroscópica ampliamente utilizada para analizar los cambios de la estructura secundaria en proteínas. En el caso de la fibrilación de lisozima, los cambios conformacionales pueden ser monitoreados mediante esta técnica [86]. La transición de la forma nativa a las fibras amiloides se caracteriza por un cambio en la estructura hacia una conformación de lámina  $\beta$  [87]. La Figura 15 muestra los cambios estructurales en la lisozima cuando cambia a estructuras de fibras y cuando L-tyr está presente en este proceso. Se puede observar para la lisozima nativa (línea azul), un pico negativo que es característico de la lisozima humana nativa a 208 nm y un hombro negativo a 222 nm [88]. Este espectro obtenido nos confirma que la proteína inicialmente está correctamente plegada, por lo que se puede utilizar como control para comparar las dos estructuras resultantes de la fibrillogénesis en presencia y ausencia de L-tyr. Los tres espectros se presentan en la figura 15 (A).



**Figure 15.** A) Cambios en el espectro de CD de la lisozima durante la fibrilación y la estructura final después del efecto de la L-tyr en la fibrilogénesis. B) Análisis de CD para lisozima, fibras de lisozima y la lisozima en presencia de L-tyr.

Después de un período de incubación de 8 h, las fibras de lisozima (negra) muestran una pérdida del espectro nativo (Figura 15 A). En la Figura 15 (B) se muestra el cambio estructural de lisozima nativa a fibras amiloides donde la hélice  $\alpha$  pasa del 53.4 al 0%, las hojas  $\beta$  paralelas cambian del 2.1 a 0 % y las antiparalelas del 11.8 al 40.1 %, los giros pasan del 3.8 al 14.6 % y la estructura desorganizada pasa del 28.8 al 45.3 %. Estos cambios sugieren un aumento notable de hoja  $\beta$  antiparalela y la pérdida de la estructura de hélice  $\alpha$ . La estructura de hoja  $\beta$  es más común en escalas y tiempos pequeños y es la primera en aparecer en muchos procesos de agregación de amiloides [89]. Cuando la L-tyr está presente, la lisozima conserva la hélice  $\alpha$  con un 22.9% y tiene menos cambios en la hoja  $\beta$  solo un 23,3%, los giros cambian al 13,3% y la estructura no organizada al 40,6%. Este resultado sugiere que la estructura final de la lisozima cuando la L-tyr está presente es un intermediario que se crea por la interrupción en el proceso de fibrilogénesis. Esta estructura se asemeja mucho a la reportada como fibra reversible de lisozima humana que recientemente ha sido descubierta donde se tiene que hay un 28.9% de hélice  $\alpha$ , 28.9 de hoja  $\beta$ , 2% de giros y 40.2% de estructura no organizada [90], por lo cual cabe la posibilidad de que el compuesto forme estructuras muy similares lo que hablaría de que debilita a las fibras normales que son irreversibles a unas reversibles. El aumento de la lámina  $\beta$  podría ser responsable de la propiedad de

unirse a ThT y ANS. Esto está respaldado por los resultados obtenidos de los ensayos de fluorescencia, donde se observó el mismo comportamiento.

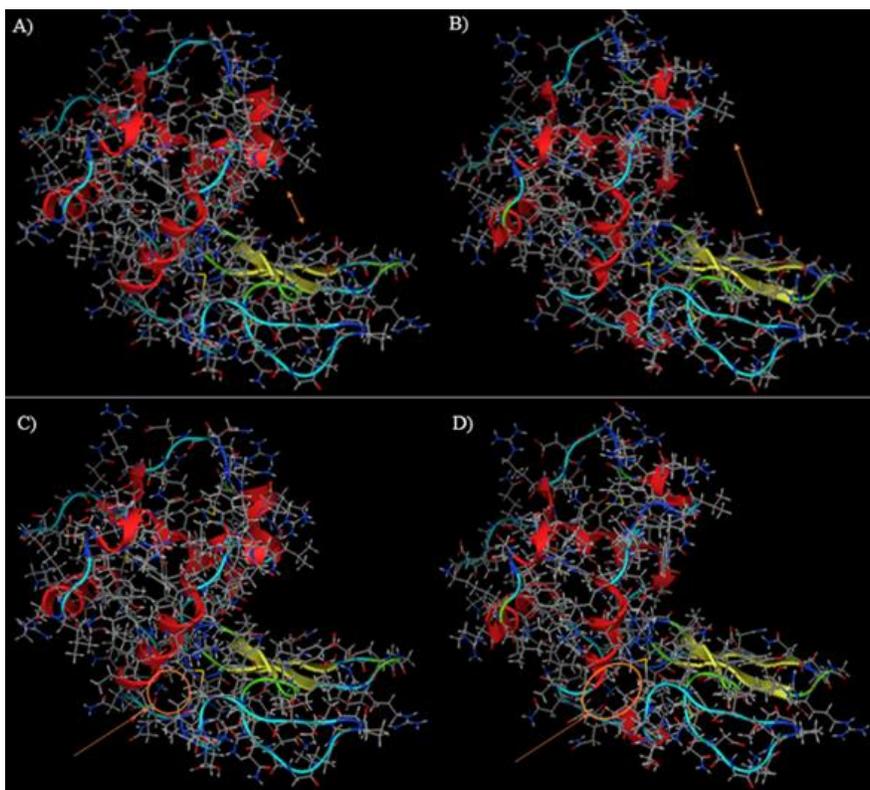
### **Simulación de las primeras fases de la desnaturalización**

En la búsqueda de otra opción a la dinámica tradicional, se desarrolló una nueva metodología como alternativa para simular un proceso de desnaturalización, esta consiste en multiplicar todas las coordenadas de los átomos de la proteína por un factor mayor a 1, para causar que la proteína en cuestión se expanda o estire, para después someterla a un proceso de minimización de energía; cabe mencionar que esta metodología no busca representar una ley física, ya que la expansión es meramente mecánica, el cambio de la posición de los átomos se garantiza ya que la proteína está posicionada en su centro de masa. Este proceso se repite las veces deseadas que se denominan ciclos, es decir una expansión seguida de una minimización es un ciclo. A medida que transcurren los ciclos algunos átomos no regresan a su lugar de origen, dando lugar a las primeras rupturas en la estructura de la proteína. De esta forma se trata de simular las primeras fases de la desnaturalización. Es como estirar una liga con cierta fuerza constante repetidamente, para observar en qué lugares empiezan a aparecer las primeras fracturas antes de romperse y perder su forma. Conceptualmente funciona igual que la dinámica tradicional se le inyecta energía al sistema (estiramiento de los átomos), para después dejar que regrese al equilibrio (fase de minimización) y por último se observan los cambios en el sistema.

Para este experimento se utilizó un factor de expansión de 1.1 y se realizó durante 100 ciclos. Las estructuras resultantes de este proceso se analizaron comparando su energía y el radio de giro de estas. De este análisis, se obtuvo que la estructura del ciclo 7 es la más indicada para continuar con los experimentos, esta se seleccionó debido que está en el inicio del proceso, al analizar las gráficas de radio de giro vs ciclos y energía vs ciclos es una disruptiva en el comportamiento de las gráficas lo que indica un cambio importante en la estructura la proteína.

Como se muestra en la Figura 16, el resultado de someter a la lisozima a un factor de 1.1 por 7 ciclos, se obtiene una lisozima que presenta una mayor abertura en la

zona de pinza de la proteína comparada a la nativa, como se puede observar al comparar los paneles A y B de la Figura 16. Esta diferencia está marcada con flechas naranjas. También existe la aparición de una nueva abertura en el lado opuesto de la zona principal, la cual se observa al comparar el panel C con el D, al igual que la diferencia anterior, está resaltada en color naranja, lo interesante de estas dos posiciones es que se encuentra en la zona donde se encuentra la unión de los dos dominios de la lisozima, abriendo la posibilidad de que exista una interacción con cualquiera de los dos dominios o ambos.

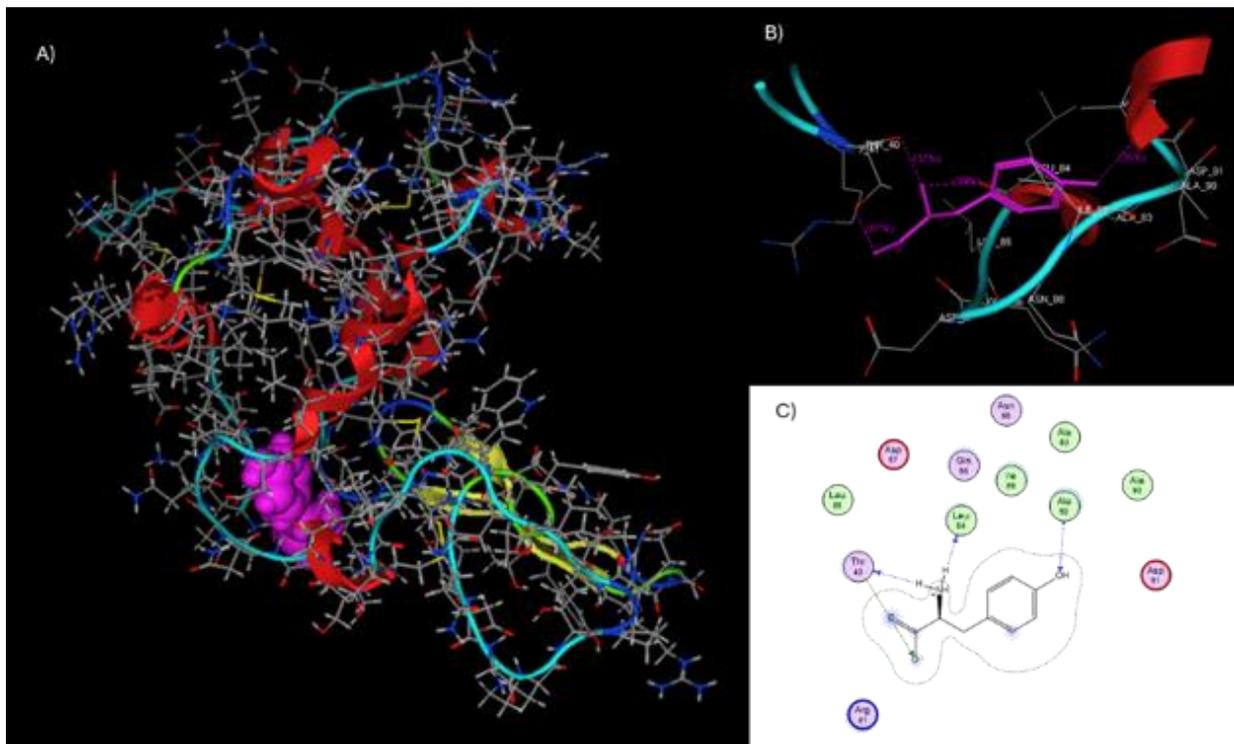


**Figura 16.** Comparativa entre la lisozima obtenida del PBD 3FE0 y la obtenida después de 7 ciclos de expansión y compresión. A) Lisozima nativa, B) Lisozima después los ciclos con una mayor apertura en la zona de pinza. C) Lisozima nativa sin aperturas resaltado en naranja. D) Lisozima después de los ciclos con una abertura mostrada en naranja.

### **Simulación de la asociación molecular o “Docking”**

Como se mencionó en la sección de materiales y métodos se realizó el experimento de docking con la estructura obtenida de la simulación y la L-tyr. Los resultados se muestran en la Figura 17. No se utilizó la estructura nativa de la lisozima ya que

todos los experimentos que se muestran en las secciones anteriores señalan que la interacción de la L-tyr no es con la estructura inicial de la proteína, sino que ocurre después de que inicia el proceso de fibrillogénesis, por lo que se apuesta a que sea una estructura de los primeros pasos en el cambio estructural que sufre la lisozima a fibras [91].



**Figura 17.** Complejo resultante del docking entre la lisozima obtenida de la simulación de desnaturalización y la L-tyr. A) Complejo lisozima/L-tyr. B) Interacciones de L-tyr (representada en color rosa). C) Mapa de interacciones entre la L-tirosina y la lisozima.

Al analizar los resultados se puede observar que el lugar donde interacciona la L-tyr es la abertura que apareció en la lisozima descrita en la sección anterior, esto se puede apreciar en el panel A de la Figura 17. En el panel B se aprecia que la L-tyr interacciona con las dos hojas  $\beta$  y con la cola de una hélice  $\alpha$ , esto indica que tiene una interacción con ambos dominios, dando indicios de que la interacción en este lugar funciona como un estabilizador estructural de la proteína, esto se reafirma lo obtenido por medio de los resultados experimentales. En el panel C, se muestra el detalle de las interacciones, siendo que la L-tyr forma dos puentes de hidrógeno con la Thr40, que corresponde al dominio  $\alpha$  y por el otro lado, forma puentes de

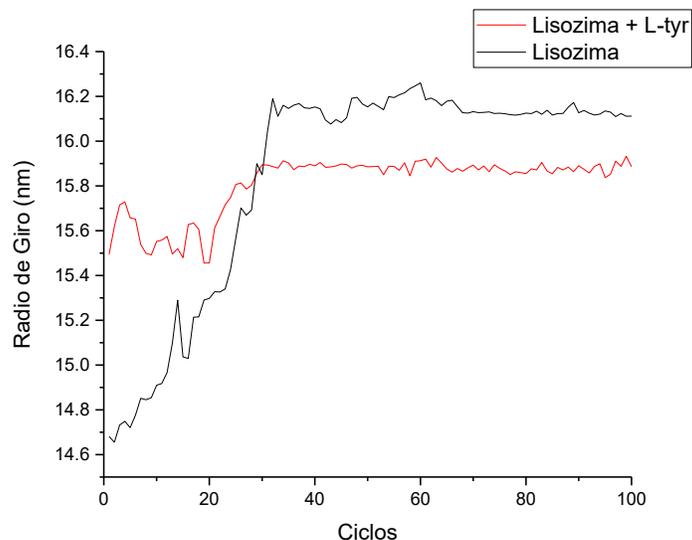
hidrógeno con la Leu84 y la Ala92 que corresponden al dominio  $\beta$  de la proteína. Estos últimos dos aminoácidos con los que interacciona se han reportado como segmentos propensos a la agregación que son predichos en diferentes programas [92], lo que podría sugerir que son de suma importancia en el proceso de fibrillogénesis y al interactuar con la L-tyr impide su rol en la agregación.

Estos resultados sugieren que ocurre una interacción con ambos dominios de la proteína, dando como resultado una posible función de estabilizador de la L-tyr sobre la lisozima lo que implica una interrupción o enlentecimiento en la formación de estructuras que conduzcan a las fibras amiloides.

### **Simulación de los primeros pasos de la desnaturalización en presencia de L-tyr**

Los resultados de los experimentos presentados anteriormente sugieren que la acción de la L-tyr sobre la lisozima consiste en ser un estabilizador estructural, para poder conocer si la L-tyr funciona de esta manera, se repitió el experimento de simulación de la desnaturalización, pero tomando como estructura inicial el complejo lisozima/L-tyr obtenido de la sección anterior de docking y se sometió al mismo factor de expansión de 1.1 durante 100 ciclos el cual se utilizó para generar la estructura de lisozima abierta. Mediante este experimento se busca saber si este complejo es más resistente a la misma perturbación a la cual se sometió la lisozima nativa o inicial (la obtenida del PBD 3FE0).

En la figura 18 se muestra la comparación de las dos condiciones, con respecto al radio de giro, cómo cambia este parámetro cuando se somete al proceso de expansión y compresión de la proteína. En esta figura se aprecia como al estar presente la L-tyr hay menor variación en el radio de giro empezando en 15.5 nm y terminando en 15.9 nm, mientras que en la lisozima sola, empieza en 14.7 nm y termina en 16.1 nm. Lo que sugiere que la L-tyr ocasiona que la estructura se abra menos o sea más resistente a este proceso.



**Figura 18.** Comparativa del cambio en el radio de giro durante una corrida de 100 ciclos entre la lisozima inicial (línea negra) y la Lisozima abierta (obtenida el proceso de simulación de desnaturalización) en presencia de la L-tyr (línea roja).

El resultado de este experimento es que la estructura de la lisozima abierta con L-tyr no sufre cambios significativos en su tamaño cambia de 15.5 nm a 15.9 nm, mientras de la lisozima nativa mostró cambios en su estructura pasando de 14.7 nm a 16.2 nm, por lo que se puede decir que el complejo lisozima/L-tyr se mantiene con el mismo tamaño en todo el proceso a pesar de que es una estructura inicialmente abierta, sugiriendo que la presencia del aminoácido es suficiente para que no se presenten cambios significativos, es decir que hay una estabilización.

## Conclusiones

Los resultados demuestran que la lisozima puede formar fibras amiloides en condiciones fisiológicas (pH 7,4, 37 °C) y que la L-tirosina inhibe eficazmente este proceso en una proporción molar de 1:1. La L-tyr actúa como un potente estabilizador de la proteína, como lo demuestran los experimentos de desnaturalización, donde su presencia altera significativamente el perfil de desnaturalización de la lisozima. Esto indica que la unión de L-tirosina proporciona una estabilización sólida, lo que ayuda a la proteína a mantener la integridad estructural incluso en condiciones ambientales fluctuantes. El experimento de CD demostró que la estructura producida cuando la L-tyr está presente es diferente de la lisozima nativa y las fibras. Pero es muy similar a la reportada como fibra reversible. Esto se confirma mediante microscopía, la cual revela la formación de estructuras que aparentemente son esferulitas como intermediarios en el proceso de inhibición. Los estudios de acoplamiento molecular identifican un sitio de unión favorable en el núcleo de la proteína, donde la L-tyr interactúa con ambos dominios de lisozima, adicional a esto interactúa con aminoácidos que han sido reportados como segmentos propensos a la agregación. Estas interacciones probablemente impulsan la estabilización e inhibición observadas en este estudio. Estos hallazgos destacan a la L-tirosina como un candidato prometedor para modular la estabilidad de las proteínas y prevenir la formación de fibras amiloides.

## **Perspectivas**

- Explorar otros compuestos tanto fenólicos, como otros aminoácidos.
- Explorar las pruebas en cultivo celular para checar si se repite el mismo fenómeno.
- Utilizar la L-tyr como molécula base para desarrollar otras con mayores efectos inhibitorios.

## Artículo publicado

Parte de esta tesis se publicó en la revista Amino Acids cuya cita completa es la siguiente: López, S., Rojo-Domínguez, A., López-Simeon, R., Sosa-Peinado A, and Nájera H. L-tyrosine inhibits the formation of amyloid fibers of human lysozyme at physiological pH and temperature. Amino Acids 57, 15 (2025). <https://doi.org/10.1007/s00726-025-03445-6>

The screenshot shows the Springer Nature Link interface for an article. At the top, there is a navigation bar with 'SPRINGER NATURE Link' on the left and 'Log in' on the right. Below this is a search bar with 'Find a journal', 'Publish with us', 'Track your research', and a search icon. A shopping cart icon labeled 'Cart' is also present. The main content area has a dark brown background. On the left, the article title 'L-tyrosine inhibits the formation of amyloid fibers of human lysozyme at physiological pH and temperature' is displayed in white. Below the title, it says 'Original Article | Open access | Published: 16 February 2025' and 'Volume 57, article number 15, (2025) | Cite this article'. A 'Download PDF' button is visible, along with a notification that the user has full access to this open access article. On the right, there is a thumbnail of the journal cover 'Amino Acids' and a 'View PDF' button. Below the journal cover, there are links for 'Aims and scope' and 'Submit manuscript'. At the bottom left, the authors' names are listed: Santos López, Arturo Rojo-Domínguez, Roxana López-Simeon, Alejandro Sosa-Peinado & Hugo Nájera. There is also a 'Use our pre-submission checklist' link and a notification about avoiding common mistakes. At the bottom right, there are tabs for 'Sections', 'Figures', and 'References'. The word 'Abstract' is partially visible at the bottom left.

## Referencias

- [1] Harvey Lodish, *Biología celular y molecular*, 2016th ed., Médica Panamericana, Buenos Aires, 2016.
- [2] C.M. Dobson, B.E.P. Swoboda, M. Joniau, C. Weissman, The structural basis of protein folding and its links with human disease, in: *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, Royal Society, 2001: pp. 133–145. <https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0758>.
- [3] E.I. Yakupova, L.G. Bobyleva, I.M. Vikhlyantsev, A.G. Bobylev, Congo Red and amyloids: History and relationship, *Biosci Rep* 39 (2019). <https://doi.org/10.1042/BSR20181415>.
- [4] D. Eisenberg, M. Jucker, The Amyloid State of Proteins in Human Diseases, *Cell* 148 (2012) 1188–1203. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.022>.
- [5] J. Ghiso, B. Frangione, Amyloidosis and Alzheimer's disease, *Adv Drug Deliv Rev* 54 (2002) 1539–1551. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(02\)00149-7](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00149-7).
- [6] L. Pauling, R.B. Corey, Configurations of Polypeptide Chains With Favored Orientations Around Single Bonds, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 37 (1951) 729–740. <https://doi.org/10.1073/pnas.37.11.729>.
- [7] T.P. Knowles, A.W. Fitzpatrick, S. Meehan, H.R. Mott, M. Vendruscolo, C.M. Dobson, M.E. Welland, Role of Intermolecular Forces in Defining Material Properties of Protein Nanofibrils, *Science* (1979) 318 (2007) 1900–1903. <https://doi.org/10.1126/science.1150057>.
- [8] O.N. Antzutkin, J.J. Balbach, R.D. Leapman, N.W. Rizzo, J. Reed, R. Tycko, Multiple quantum solid-state NMR indicates a parallel, not antiparallel, organization of  $\beta$ -sheets in Alzheimer's  $\beta$ -amyloid fibrils, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (2000) 13045–13050. <https://doi.org/10.1073/pnas.230315097>.
- [9] T. Shirahama, M.D. Benson, A.S. Cohen, A. Tanaka, Fibrillar Assemblage of Variable Segments of Immunoglobulin Light Chains: An Electron Microscopic Study, *The Journal of Immunology* 110 (1973) 21–30. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.110.1.21>.
- [10] C. V. Robinson, Christopher Dobson, 1949–2019: Mentor, Friend, Scientist Extraordinaire, *Annu Rev Biochem* 89 (2020) 1–19. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-011520-105226>.
- [11] C.M. Dobson, Protein-misfolding diseases: Getting out of shape, *Nature* 418 (2002) 729–730. <https://doi.org/10.1038/418729a>.
- [12] R. Kisilevsky, S. Raimondi, V. Bellotti, Historical and current concepts of Fibrillogenesis and In vivo Amyloidogenesis: Implications of amyloid tissue targeting, *Front Mol Biosci* 3 (2016). <https://doi.org/10.3389/fmolb.2016.00017>.

- [13] D.M. Walsh, I. Klyubin, J. V. Fadeeva, M.J. Rowan, D.J. Selkoe, Amyloid- $\beta$  oligomers: their production, toxicity and therapeutic inhibition, *Biochem Soc Trans* 30 (2002) 552–557. <https://doi.org/10.1042/bst0300552>.
- [14] H. Shoval, D. Lichtenberg, E. Gazit, The molecular mechanisms of the anti-amyloid effects of phenols, *Amyloid* 14 (2007) 73–87. <https://doi.org/10.1080/13506120601116674>.
- [15] W.-F. Xue, S.W. Homans, S.E. Radford, Systematic analysis of nucleation-dependent polymerization reveals new insights into the mechanism of amyloid self-assembly, 2008. [www.pnas.org/cgi/content/full/](http://www.pnas.org/cgi/content/full/).
- [16] M.N. Hassan, F. Nabi, A.N. Khan, M. Hussain, W.A. Siddiqui, V.N. Uversky, R.H. Khan, The amyloid state of proteins: A boon or bane?, *Int J Biol Macromol* 200 (2022) 593–617. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.01.115>.
- [17] G. Marcon, G. Plakoutsi, C. Canale, A. Relini, N. Taddei, C.M. Dobson, G. Ramponi, F. Chiti, Amyloid formation from HypF-N under conditions in which the protein is initially in its native state, *J Mol Biol* 347 (2005) 323–335. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.01.034>.
- [18] J. Adamcik, R. Mezzenga, Amyloid-Polymorphie in der Energielandschaft der Faltung und Aggregation von Proteinen, *Angewandte Chemie* 130 (2018) 8502–8515. <https://doi.org/10.1002/ange.201713416>.
- [19] S. Bondos, Methods for Measuring Protein Aggregation, *Curr Anal Chem* 2 (2006) 157–170. <https://doi.org/10.2174/157341106776359140>.
- [20] M. Biancalana, S. Koide, Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1804 (2010) 1405–1412. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.04.001>.
- [21] K.J. Robbins, G. Liu, V. Selmani, N.D. Lazo, Conformational Analysis of Thioflavin T Bound to the Surface of Amyloid Fibrils, *Langmuir* 28 (2012) 16490–16495. <https://doi.org/10.1021/la303677t>.
- [22] D.M. Jameson, *Introduction to Fluorescence*, 2025th ed., CRC Press, 2025.
- [23] Y.W. Chen, *Introduction to Fluorescence*, in: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer US, Boston, MA, 2006: pp. 1–26. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4_1).
- [24] C.A. Royer, *Fluorescence Spectroscopy*, in: *Protein Stability and Folding*, Humana Press, New Jersey, n.d.: pp. 65–90. <https://doi.org/10.1385/0-89603-301-5:65>.
- [25] M.J. KRONMAN, L.G. HOLMES, THE FLUORESCENCE OF NATIVE, DENATURED AND REDUCED-DENATURED PROTEINS\*, *Photochem Photobiol* 14 (1971) 113–134. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1971.tb06157.x>.

- [26] S.M. Janes, G. Holtom, P. Ascenzi, M. Brunori, R.M. Hochstrasser, Fluorescence and energy transfer of tryptophans in *Aplysia* myoglobin, *Biophys J* 51 (1987) 653–660. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(87\)83390-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(87)83390-8).
- [27] M.R. Eftink, I. Gryczynski, W. Wiczak, G. Laczko, J.R. Lakowicz, Effects of temperature on the fluorescence intensity and anisotropy decays of Staphylococcal nuclease and the less stable nuclease-conA-SG28 mutant, *Biochemistry* 30 (1991) 8945–8953. <https://doi.org/10.1021/bi00101a005>.
- [28] G. Fasman, ed., *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*, Springer US, Boston, MA, 1996. <https://doi.org/10.1007/978-1-4757-2508-7>.
- [29] A. Micsonai, É. Bulyáki, J. Kardos, BeStSel: From Secondary Structure Analysis to Protein Fold Prediction by Circular Dichroism Spectroscopy, in: 2021: pp. 175–189. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0892-0\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0892-0_11).
- [30] A.J. Miles, R.W. Janes, B.A. Wallace, Tools and methods for circular dichroism spectroscopy of proteins: a tutorial review, *Chem Soc Rev* 50 (2021) 8400–8413. <https://doi.org/10.1039/D0CS00558D>.
- [31] A. Micsonai, F. Wien, L. Kernya, Y.-H. Lee, Y. Goto, M. Réfrégiers, J. Kardos, Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (2015) E3095–E3103. <https://doi.org/10.1073/pnas.1500851112>.
- [32] R.M. Parry, R.C. Chandan, K.M. Shahani, Isolation and characterization of human milk lysozyme, *Arch Biochem Biophys* 130 (1969) 59–65. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(69\)90009-5](https://doi.org/10.1016/0003-9861(69)90009-5).
- [33] R. Swaminathan, V.K. Ravi, S. Kumar, M. Venkata, N. Chandra, LYSOZYME: A MODEL PROTEIN FOR AMYLOID RESEARCH, (2011). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386483-3.00003-3>.
- [34] M.B. Pepys, P.N. Hawkins, D.R. Booth, D.M. Vigushin, G.A. Tennent, A.K. Soutar, N. Totty, O. Nguyen, C.C.F. Blake, C.J. Terry, T.G. Feest, A.M. Zalin, J.J. Hsuan, Human lysozyme gene mutations cause hereditary systemic amyloidosis, *Nature* 362 (1993) 553–557. <https://doi.org/10.1038/362553a0>.
- [35] S. Baliga, S. Muglikar, R. Kale, Salivary pH: A diagnostic biomarker, *J Indian Soc Periodontol* 17 (2013) 461–465. <https://doi.org/10.4103/0972-124X.118317>.
- [36] N.R. Council. Staff, P.E. Flattau, *Considerations in Contact Lens Use Under Adverse Conditions*, National Academies Press, Washington, D.C., 1991. <https://doi.org/10.17226/1773>.
- [37] I.A. Hashim, Blood gases and acid-base homeostasis, *Tutorials in Clinical Chemistry* (2024) 419–438. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822949-1.00004-8>.
- [38] J.E. Brinkman, S. Sharma, *Physiology, Metabolic Alkalosis*, StatPearls (2023). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482291/> (accessed June 13, 2025).

- [39] R. Ayad, S. Akkal, Phytochemistry and biological activities of algerian *Centaurea* and related genera, in: *Studies in Natural Products Chemistry*, Elsevier B.V., 2019: pp. 357–414. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817901-7.00012-5>.
- [40] K.B. Pandey, S.I. Rizvi, Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease, *Oxid Med Cell Longev* 2 (2009) 270–278. <https://doi.org/10.4161/OXIM.2.5.9498>.
- [41] M.L. Luna-Guevara, J.J. Luna-Guevara, P. Hernández-Carranza, H. Ruíz-Espinosa, C.E. Ochoa-Velasco, Phenolic Compounds: A Good Choice Against Chronic Degenerative Diseases, in: *Studies in Natural Products Chemistry*, Elsevier B.V., 2018: pp. 79–108. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64179-3.00003-7>.
- [42] D. Regmi, S. Haque, M.R.U. Karim, A. Stanic, D. Du, Inhibition of amyloid formation of prion fragment (106–128) by polyphenolic compounds, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1869 (2025) 130778. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2025.130778>.
- [43] E. El Maaiden, Phenolic Profiling and Inhibitory Activities of Cholinesterase and  $\beta$ -Amyloid Aggregation in *Ziziphus* Species Fruit Fractions, *J Food Biochem* 2024 (2024) 4695284. <https://doi.org/10.1155/JFBC/4695284>.
- [44] A. Porzoor, B. Alford, H.M. Hügel, D. Grando, J. Caine, I. Macreadie, Anti-Amyloidogenic Properties of Some Phenolic Compounds, *Biomolecules* 2015, Vol. 5, Pages 505-527 5 (2015) 505–527. <https://doi.org/10.3390/BIOM5020505>.
- [45] B. Mirzaei-Behbahani, A.A. Meratan, B. Moosakhani, M. Mohammad-Zaheri, Z. Mousavi-Jarrahi, N. Nikfarjam, M.B. Shahsavani, A.A. Saboury, Efficient inhibition of amyloid fibrillation and cytotoxicity of  $\alpha$ -synuclein and human insulin using biosynthesized silver nanoparticles decorated by green tea polyphenols, *Sci Rep* 14 (2024) 1–17. <https://doi.org/10.1038/S41598-024-54464-4>;SUBJMETA=337,378,45,631;KWRD=BIOCHEMISTRY,MOLECULAR+BIOLOGY,NEURO SCIENCE.
- [46] M. Stefani, S. Rigacci, Protein folding and aggregation into amyloid: the interference by natural phenolic compounds, *Int J Mol Sci* 14 (2013) 12411–12457. <https://doi.org/10.3390/IJMS140612411>.
- [47] J. Wang, H. Xie, Q. Dong, J. Liu, J. Su, Y. An, B. Zeng, B. Sun, J. Liu, The effect of arginine on inhibiting amyloid fibril derived from  $\beta$ -casein and the binding studies with multi-spectroscopic techniques, *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 282 (2022) 121681. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.121681>.
- [48] Y. Chen, Q. Liu, F. Yang, H. Yu, Y. Xie, W. Yao, Lysozyme amyloid fibril: Regulation, application, hazard analysis, and future perspectives, *Int J Biol Macromol* 200 (2022) 151–161. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.12.163>.

- [49] B. Neddenriep, A. Calciano, D. Conti, E. Sauve, M. Paterson, E. Bruno, D. A. Moffet, Short Peptides as Inhibitors of Amyloid Aggregation, *Open Biotechnol J* 5 (2011) 39–46. <https://doi.org/10.2174/1874070701105010039>.
- [50] J. Hankiewicz, E. Swierczek, Lysozyme in human body fluids, *Clinica Chimica Acta* 57 (1974) 205–209. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(74\)90398-2](https://doi.org/10.1016/0009-8981(74)90398-2).
- [51] T.A. Pankratov, A. V. Gannesen, Y.A. Nikolaev, Regulation of Lysozyme Activity by Human Hormones, *Iran Biomed J* 27 (2023) 58–65. <https://doi.org/10.52547/ibj.3614>.
- [52] R. Khurana, C. Coleman, C. Ionescu-Zanetti, S.A. Carter, V. Krishna, R.K. Grover, R. Roy, S. Singh, Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils, *J Struct Biol* 151 (2005) 229–238. <https://doi.org/10.1016/J.JSB.2005.06.006>.
- [53] P. Cao, D.P. Raleigh, Analysis of the inhibition and remodeling of islet amyloid polypeptide amyloid fibers by flavanols, *Biochemistry* 51 (2012) 2670–2683. <https://doi.org/10.1021/bi2015162>.
- [54] M.R.H. Krebs, E.H.C. Bromley, A.M. Donald, The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications, *J Struct Biol* 149 (2005) 30–37. <https://doi.org/10.1016/J.JSB.2004.08.002>.
- [55] F. Mohammadi, A. Mahmudian, M. Moeeni, L. Hassani, Inhibition of amyloid fibrillation of hen egg-white lysozyme by the natural and synthetic curcuminoids, *RSC Adv* 6 (2016) 23148–23160. <https://doi.org/10.1039/c5ra18992f>.
- [56] Z. Gazova, K. Siposova, E. Kurin, P. Mučaji, M. Nagy, Amyloid aggregation of lysozyme: The synergy study of red wine polyphenols, *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics* 81 (2013) 994–1004. <https://doi.org/10.1002/prot.24250>.
- [57] S. Andrade, J.A. Loureiro, M.C. Pereira, Caffeic acid for the prevention and treatment of Alzheimer’s disease: The effect of lipid membranes on the inhibition of aggregation and disruption of A $\beta$  fibrils, *Int J Biol Macromol* 190 (2021) 853–861. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.08.198>.
- [58] F. Xu, M. Okada, K. Makabe, H. Konno, Synthesis and evaluation of L-dopa and L-Tyr derivatives as amyloid-beta aggregation inhibitors, *Phytochem Lett* 57 (2023) 239–247. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2023.08.014>.
- [59] Y. Porat, A. Abramowitz, E. Gazit, Inhibition of amyloid fibril formation by polyphenols: Structural similarity and aromatic interactions as a common inhibition mechanism, *Chem Biol Drug Des* 67 (2006) 27–37. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2005.00318.x>.
- [60] T. Akaishi, T. Morimoto, M. Shibao, S. Watanabe, K. Sakai-Kato, N. Utsunomiya-Tate, K. Abe, Structural requirements for the flavonoid fisetin in inhibiting fibril formation of amyloid  $\beta$  protein, *Neurosci Lett* 444 (2008) 280–285. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.08.052>.

- [61] K. Ono, Y. Yoshiike, A. Takashima, K. Hasegawa, H. Naiki, M. Yamada, Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols in vitro: Implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease, *J Neurochem* 87 (2003) 172–181. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01976.x>.
- [62] K. Dubey, B.G. Anand, R. Badhwar, G. Bagler, P.N. Navya, H.K. Daima, K. Kar, Tyrosine- and tryptophan-coated gold nanoparticles inhibit amyloid aggregation of insulin, *Amino Acids* 47 (2015) 2551–2560. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-2046-6>.
- [63] B.H. Toyama, J.S. Weissman, Amyloid Structure: Conformational Diversity and Consequences, (2011). <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-090908-120656>.
- [64] V.L.N. Ngoungoure, J. Schluesener, P.F. Moundipa, H. Schluesener, Natural polyphenols binding to amyloid: A broad class of compounds to treat different human amyloid diseases, *Mol Nutr Food Res* 59 (2015) 8–20. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201400290>.
- [65] D.N. Bloch, S. Ben Zichri, S. Kolusheva, R. Jelinek, Tyrosine carbon dots inhibit fibrillation and toxicity of the human islet amyloid polypeptide, *Nanoscale Adv* 2 (2020) 5866–5873. <https://doi.org/10.1039/D0NA00870B>.
- [66] I.M. Stanković, S. Niu, M.B. Hall, S.D. Zarić, Role of aromatic amino acids in amyloid self-assembly, *Int J Biol Macromol* 156 (2020) 949–959. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.064>.
- [67] A. Mitra, N. Sarkar, Sequence and structure-based peptides as potent amyloid inhibitors: A review, *Arch Biochem Biophys* 695 (2020) 108614. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108614>.
- [68] M. Malisauskas, A. Darinskas, V. V. Zamotin, A. Gharibyan, I.A. Kostanyan, L.A. Morozova-Roche, Intermediate amyloid oligomers of lysozyme: Is their cytotoxicity a particular case or general rule for amyloid?, *Biochemistry (Moscow)* 71 (2006) 505–512. <https://doi.org/10.1134/S0006297906050063>.
- [69] D. Zaguri, T. Kreiser, S. Shaham-Niv, E. Gazit, Antibodies towards tyrosine amyloid-like fibrils allow toxicity modulation and cellular imaging of the assemblies, *Molecules* 23 (2018). <https://doi.org/10.3390/molecules23061273>.
- [70] B.G. Anand, K.P. Prajapati, D.S. Shekhawat, K. Kar, Tyrosine-Generated Nanostructures Initiate Amyloid Cross-Seeding in Proteins Leading to a Lethal Aggregation Trap, *Biochemistry* 57 (2018) 5202–5209. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00472>.
- [71] L. Stryer, The interaction of a naphthalene dye with apomyoglobin and apohemoglobin: A fluorescent probe of non-polar binding sites, *J Mol Biol* 13 (1965) 482–495. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(65\)80111-5](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(65)80111-5).

- [72] M.I. Sulatsky, A.I. Sulatskaya, O.I. Povarova, I.A. Antifeeva, I.M. Kuznetsova, K.K. Turoverov, Effect of the fluorescent probes ThT and ANS on the mature amyloid fibrils, *Prion* 14 (2020) 67–75. <https://doi.org/10.1080/19336896.2020.1720487>.
- [73] J. Eisinger, G. Navon, Fluorescence quenching and isotope effect of tryptophan, *J Chem Phys* 50 (1969) 2069–2077. <https://doi.org/10.1063/1.1671335>.
- [74] F. Lefevre, B. Fauconneau, J.W. Thompson, T.A. Gill, Thermal Denaturation and Aggregation Properties of Atlantic Salmon Myofibrils and Myosin from White and Red Muscles, *J Agric Food Chem* 55 (2007) 4761–4770. <https://doi.org/10.1021/jf063045d>.
- [75] A. Francioso, P. Punzi, A. Boffi, C. Lori, S. Martire, C. Giordano, M. D’Erme, L. Mosca,  $\beta$ -Sheet interfering molecules acting against  $\beta$ -amyloid aggregation and fibrillogenesis, *Bioorg Med Chem* 23 (2015) 1671–1683. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.02.041>.
- [76] S. Cinelli, A. De Francesco, G. Onori, A. Paciaroni, Thermal stability and internal dynamics of lysozyme as affected by hydration, *Physical Chemistry Chemical Physics* 6 (2004) 3591–3595. <https://doi.org/10.1039/b402003k>.
- [77] C.M. Johnson, Differential scanning calorimetry as a tool for protein folding and stability, *Arch Biochem Biophys* 531 (2013) 100–109. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.09.008>.
- [78] S. Singh, J. Singh, Effect of polyols on the conformational stability and biological activity of a model protein lysozyme, *AAPS PharmSciTech* 4 (2003) 101–109. <https://doi.org/10.1208/pt040342>.
- [79] J.T. Vivian, P.R. Callis, Mechanisms of Tryptophan Fluorescence Shifts in Proteins, *Biophys J* 80 (2001) 2093–2109. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)76183-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)76183-8).
- [80] P. Sindrewicz, X. Li, E.A. Yates, J.E. Turnbull, L.-Y. Lian, L.-G. Yu, Intrinsic tryptophan fluorescence spectroscopy reliably determines galectin-ligand interactions, *Sci Rep* 9 (2019) 11851. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47658-8>.
- [81] A. Hédoux, S. Krenzlin, L. Paccou, Y. Guinet, M.-P. Flament, J. Siepmann, Influence of urea and guanidine hydrochloride on lysozyme stability and thermal denaturation; a correlation between activity, protein dynamics and conformational changes, *Physical Chemistry Chemical Physics* 12 (2010) 13189. <https://doi.org/10.1039/c0cp00602e>.
- [82] A. Hédoux, R. Ionov, J.-F. Willart, A. Lerbret, F. Affouard, Y. Guinet, M. Descamps, D. Prévost, L. Paccou, F. Danéde, Evidence of a two-stage thermal denaturation process in lysozyme: A Raman scattering and differential scanning calorimetry investigation, *J Chem Phys* 124 (2006) 14703. <https://doi.org/10.1063/1.2139087>.
- [83] M.T. Postek, A.E. Vladár, J.S. Villarrubia, A. Muto, Comparison of Electron Imaging Modes for Dimensional Measurements in the Scanning Electron Microscope, *Microscopy and Microanalysis* 22 (2016) 768–777. <https://doi.org/10.1017/S1431927616011430>.

- [84] M.C.R. Heijna, M.J. Theelen, W.J.P. Van Enckevort, E. Vlieg, Spherulitic growth of hen egg-white lysozyme crystals, *Journal of Physical Chemistry B* 111 (2007) 1567–1573. <https://doi.org/10.1021/jp0643294>.
- [85] P. Sharma, N. Verma, P.K. Singh, S. Korpole, Ashish, Characterization of heat induced spherulites of lysozyme reveals new insight on amyloid initiation, *Sci Rep* 6 (2016) 22475. <https://doi.org/10.1038/srep22475>.
- [86] A. Das, G. Jana, S. Sing, A. Basu, Insights into the interaction and inhibitory action of palmatine on lysozyme fibrillogenesis: Spectroscopic and computational studies, *Int J Biol Macromol* 268 (2024) 131703. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.131703>.
- [87] L.C. Serpell, Alzheimer's amyloid fibrils: structure and assembly, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1502 (2000) 16–30. [https://doi.org/10.1016/S0925-4439\(00\)00029-6](https://doi.org/10.1016/S0925-4439(00)00029-6).
- [88] K. Ikeda, K. Hamaguchi, S. Miwa, T. Nishina, Circular Dichroism of Human Lysozyme, *The Journal of Biochemistry* 71 (1972) 371–378. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a129778>.
- [89] A.A.H. Zanjani, N.P. Reynolds, A. Zhang, T. Schilling, R. Mezzenga, J.T. Berryman, Amyloid Evolution: Antiparallel Replaced by Parallel, *Biophys J* 118 (2020) 2526–2536. <https://doi.org/10.1016/J.BPJ.2020.03.023>.
- [90] L. Frey, J. Zhou, G. Cereghetti, M.E. Weber, D. Rhyner, A. Pokharna, L. Wenchel, H. Kadavath, Y. Cao, B.H. Meier, M. Peter, J. Greenwald, R. Riek, R. Mezzenga, A structural rationale for reversible vs irreversible amyloid fibril formation from a single protein, *Nat Commun* 15 (2024) 8448. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-52681-z>.
- [91] R. Cerón, M. Peimbert, A. Rojo-Domínguez, H. Nájera, Hen lysozyme fibrillogenesis, molten globule intermediate and effect of copper salts, *J Biomol Struct Dyn* 41 (2023) 423–434. <https://doi.org/10.1080/07391102.2021.2006090>.
- [92] S. Karimi-Farsijani, K. Sharma, M. Ugrina, L. Kuhn, P.B. Pfeiffer, C. Haupt, S. Wiese, U. Hegenbart, S.O. Schönland, N. Schwierz, M. Schmidt, M. Fändrich, Cryo-EM structure of a lysozyme-derived amyloid fibril from hereditary amyloidosis, *Nat Commun* 15 (2024) 9648. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-54091-7>.