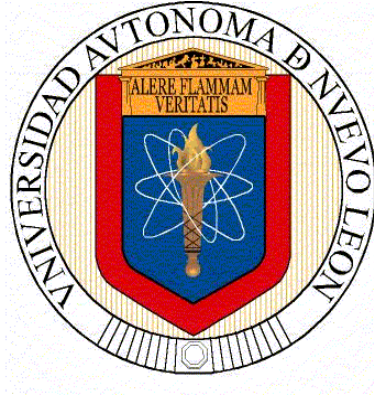


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



TESIS

**ESTANDARIZACIÓN DE C. ELEGANS COMO MODELO
BIOLÓGICO PARA EL ESTUDIO DEL EFECTO DE LA INHIBICIÓN
DE LA AGREGACIÓN DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE**

PRESENTA

MAURICIO GONZÁLEZ GONZÁLEZ

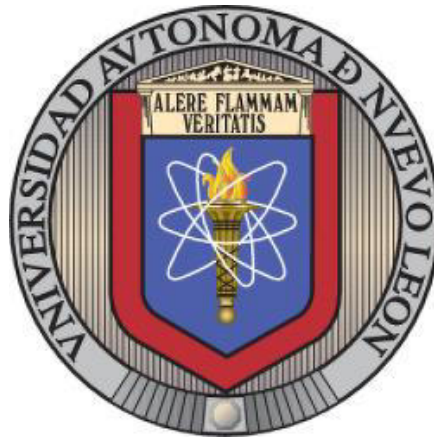
**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAestrÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN
BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA**

2021

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOMEDICINA MOLECULAR



Título

“Estandarización de C.elegans como modelo biológico para el estudio del efecto de la inhibición de la agregación del péptido beta amiloide”

Presentado por:

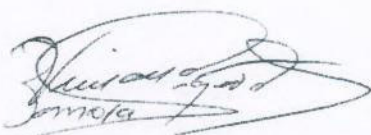
MAURICIO GONZÁLEZ GONZÁLEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA
GENÉTICA**

Director de Tesis: Dra. C. VIVIANA CHANTAL ZOMOSA SIGNORET

**Estandarización de C.elegans como modelo biológico para el estudio del efecto
de la inhibición de la agregación del péptido beta amiloide**

Aprobación de la tesis:



Dra. C. Viviana Chantal Zomosa Signoret
Directora de Tesis



Dr. C. Alberto Camacho Morales
Co-Director de Tesis



Dra. C. Ana María Guadalupe Rivas Estilla
Miembro de la Comisión



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez
Sub-Director de Estudios de Posgrado

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una patología neurodegenerativa crónica y la principal causa de demencia en el mundo, se caracteriza clínicamente por un deterioro progresivo y grave de las funciones cognitivas como memoria, lenguaje y orientación. Histológicamente esta patología se caracteriza por la formación y agregación de compuestos proteicos anormales, el péptido beta amiloide (A β) y la proteína tau. La agregación del beta amiloide monomérico en formas oligoméricas y fibrilares más grandes representa un paso importante en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. Los oligómeros solubles tempranos son la especie tóxica responsable de la neurodegeneración y muerte neuronal. Estos hallazgos han llevado a la hipótesis del empleo de moléculas peptídicas, las cuales afectan la agregación temprana de los oligómeros, como terapia novedosa para la enfermedad de Alzheimer. En este estudio se utilizó a *Caenorhabditis elegans*, un gusano nematodo no segmentado, como modelo biológico de la enfermedad de Alzheimer para observar si las variantes del péptido A β 42 A30W, K28A y M35C tienen un efecto neuroprotector y mejoran el fenotipo similar a la enfermedad de Alzheimer. Se realizó un ensayo de quimiotaxis para valorar el efecto que tienen las variantes del péptido beta amiloide sobre la función de memoria asociativa en el nemátodo. El péptido K28A presentó una mejoría sobre la función de memoria asociativa disminuyendo la agregación en los nemátodos que fueron tratados con el péptido. Por otro lado, las variantes A30W y M35C no mostraron un efecto en la memoria asociativa del nemátodo.

ÍNDICE

I.	Introducción.....	5
II.	Antecedentes:	
1.1	Enfermedad de Alzheimer.....	6
1.2	Datos epidemiológicos.....	8
1.3	Diagnóstico y clasificación de la enfermedad de Alzheimer.....	9
1.4	Mecanismos patogénicos de la Enfermedad de Alzheimer.....	10
1.4.1.	Histopatología de la EA: placas amiloides y ovillos neurofibrilares.....	11
1.4.2.	Enfermedad cardiovascular y cerebrovascular: factores de riesgo para EA.....	12
1.4.3.	ApoE y estrés oxidativo.....	13
1.5	Proteína precursora del amiloide (APP)	14
1.5.1	Metabolismo de APP.....	16
1.6	Péptido beta amiloide (A β).....	18
1.7	Caenorhabditis elegans: un organismo modelo para el estudio de EA.....	20
1.7.1	Ciclo de vida y reproducción de C. elegans.....	21
1.7.2	Anatomía y sistema nervioso de C. elegans.....	22
1.7.3	Genes relacionados con EA en C. elegans.....	24
1.7.4	Expresión de A β en C. elegans.....	25
1.7.5	Memoria asociativa en C. elegans.....	26
1.8	Variantes del péptido beta amiloide como posible terapia.....	27
1.9	Visualización de A β mediante microscopía de fluorescencia.....	28
II.	Justificación e hipótesis.....	29
III.	Objetivos.....	29
IV.	Materiales y métodos	
4.1	Equipo y material desechable.....	30
4.2	Reactivos.....	30
4.3	Manejo de Caenorhabditis elegans.....	32
4.3.1	Sincronización de poblaciones del nemátodo.....	32
4.3.2	Propagación de la cepa OH 441 para el ensayo de quimiotaxis.....	33

4.4	Ensayo de quimiotaxis.....	34
4.4.1	Placa para ensayo de quimiotaxis.....	34
4.4.2	Conteo de gusanos y elaboración de índice de quimiotaxis.....	34
4.5	Visualización del A β mediante microscopía de fluorescencia.....	35
V.	Resultados.....	36
5.1	Crecimiento de C. elegans.....	36
5.2	Ensayo de quimiotaxis.....	37
5.3	Ensayo de fluorescencia.....	38
5.4	Prueba con Tioflavina S.....	39
VI.	Discusión.....	41
VII.	Conclusiones.....	43
VIII.	Perspectivas.....	44
IX.	Bibliografía.....	45

Capítulo I.

Introducción

Demencia es un término que engloba a un conjunto de trastornos del cerebro que se caracterizan por la pérdida significativa de funciones cognitivas, como la memoria, orientación y el lenguaje. La enfermedad de Alzheimer (EA) es una patología neurodegenerativa crónica y la principal causa de demencia en el mundo, se caracteriza clínicamente por una alteración grave, progresiva e irreversible de las funciones mencionadas, siendo los adultos mayores la población con mayor riesgo e incidencia (Mendez M. F., 2012). La prevalencia aumenta con la edad tanto en hombres como en mujeres, y se duplica aproximadamente cada 5 años entre las edades de 50 y 80 años (Global Burden of Disease, 2016). A nivel celular y molecular, esta patología se caracteriza por la formación y agregación de compuestos proteicos anormales, el péptido beta amiloide ($A\beta$) y la proteína tau hiperfosforilada. Estos compuestos forman las lesiones cerebrales distintivas de la enfermedad de Alzheimer, las placas amiloides y los ovillos neurofibrilares, respectivamente. Este trabajo estará orientado al estudio del beta amiloide, péptido corto 39 a 43 aminoácidos de extensión, el cual deriva del corte proteolítico secuencial de una proteína transmembranal, la proteína precursora de amiloide (APP) (Chassigneux, S., & Allinquant, B., 2011). La agregación del beta amiloide monomérico en formas oligoméricas y fibrilares más grandes representa un paso importante en el desarrollo de la patología y la manifestación de la demencia. Evidencia apunta al hecho que los oligómeros solubles tempranos son la especie tóxica responsable de la neurodegeneración y muerte de células neuronales. Estos hallazgos han llevado a la hipótesis del empleo de moléculas peptídicas, las cuales afectan la agregación temprana de los oligómeros, como terapia novedosa para la enfermedad de Alzheimer (Giaccone et al., 2010). Diversos organismos han sido empleados como modelos para el estudio de trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer. *Caenorhabditis elegans*, es un gusano no segmentado y perteneciente al phylum nematoda. Este organismo ha sido utilizado como modelo biológico para el estudio de diversos trastornos y para ensayos en el campo de la farmacología y toxicología. Consta de características que lo vuelven un modelo

prometedor para el estudio de los mecanismos moleculares involucrados en la aparición de la enfermedad de Alzheimer. Dado que el conectoma, es decir, el mapa de la conectividad neuronal, ya ha sido dilucidado en *C. elegans*, este organismo también representa un modelo simplificado pero ventajoso para estudiar fenómenos como el aprendizaje y alteraciones de memoria observados en la EA (Li C, 2014). La EA representa uno de los grandes retos para los sistemas de salud del mundo. El número total de personas mayores en la población aumentará significativamente en las próximas décadas, lo que sugiere que la incidencia y prevalencia de EA sea mayor en el futuro. El aumento en el número de casos es aún más importante dado que actualmente no existe una cura o tratamiento modificador eficaz de la enfermedad. Por lo tanto, es necesaria una mejor comprensión de los mecanismos involucrados en la enfermedad para el desarrollo de nuevos y eficaces métodos diagnósticos y terapéuticos.

Capítulo II.

Antecedentes

1.1 Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una patología neurodegenerativa crónica y la principal causa de demencia en el mundo. Las demencias son un grupo heterogéneo de enfermedades que se caracterizan clínicamente por alteraciones importantes de las funciones cognitivas, como la memoria, el lenguaje, orientación, así como alteraciones motoras, y que pueden tener mecanismos etiopatogénicos distintos. Otros tipos de demencia son demencia por cuerpos de Lewy, demencia frontotemporal y demencia vascular (Ellenbogen, R. G. et al. 2019). En algunos casos, pueden coexistir más de una patología a la vez y la superposición clínica en la presentación de estos diversos tipos de demencia representa un desafío importante para el diagnóstico correcto de la enfermedad. La enfermedad fue reportada por primera vez en 1906 por el médico alemán Alois Alzheimer, estudiando el caso de una mujer de edad avanzada que presentaba un cuadro clínico de demencia atípico. Alzheimer hizo un análisis post mortem del cerebro de

la paciente y observó una asociación entre los síntomas neurológicos y los hallazgos histopatológicos.

La investigación actual identifica tres etapas de la enfermedad de Alzheimer: enfermedad de Alzheimer preclínica, deterioro cognitivo leve y demencia. El deterioro cognitivo y los síntomas aparecen de manera insidiosa y progresiva. En la etapa preclínica, los individuos presentan alteraciones detectables en cerebro, líquido cefalorraquídeo (LCR) y en plasma, que indican los primeros signos de la enfermedad de Alzheimer, pero aún no se han desarrollado síntomas. En pacientes con deterioro cognitivo leve por EA, se observa evidencia de biomarcadores cerebrales y en LCR relacionado con el Alzheimer y muestran un deterioro cognitivo mayor de lo esperado para su edad, sin embargo este deterioro no interfiere significativamente con las actividades diarias. En la etapa avanzada de la EA se observan los síntomas característicos de demencia, deterioro notable de memoria, pensamiento y comportamiento que afecta la capacidad de una persona para funcionar en la vida diaria, junto con evidencia de un cambio cerebral relacionado con el Alzheimer (C.H. Kawas, et al., 2011). A nivel neuronal, ocurre la agregación y acumulación de compuestos peptídicos anómalos, específicamente el oligómeros tóxicos de A β y la proteína Tau hiperfosforilada, lo cual lleva a la formación de las placas beta amiloide y ovillos neurofibrilares, ambos hallazgos patológicos característicos de la EA. En esta, ocurre deterioro de la neurotransmisión en diferentes áreas del sistema nervioso central (SNC), particularmente de la neurotransmisión colinérgica (fundamentalmente nicotínica) y glutamatérgica (L. Tapia, et al., 2006).

Esta enfermedad tiene mayor incidencia en los adultos mayores (más de 65 años) siendo la edad avanzada el factor de riesgo más importante, y suele tener un gran impacto en la calidad de vida de las personas que la padecen, ocasionando una dependencia casi total hacia familiares y cuidadores para llevar a cabo tareas cotidianas (Inouye, K. y et al., 2010). En cuanto al tratamiento, los inhibidores de la acetilcolinesterasa, como donepezilo, rivastigmina y galantamina, se recomiendan como tratamiento de primera línea en pacientes con EA leve a moderada. Sin embargo, los fármacos disponibles hasta ahora sólo proporcionan una mejoría

sintomática y no tienen un efecto sobre la patología subyacente de la enfermedad, además, los efectos benéficos sobre funciones cognitivas y el comportamiento son solo temporales (Tensfeldt, T. et al., 2012).

1.2 Datos epidemiológicos

Estimaciones realizadas en 2015 mostraron que alrededor de 46.8 millones de personas se ven afectadas por demencias en todo el mundo. Este número de casos nuevos es casi un 30% mayor (9.9 millones de casos nuevos) que la incidencia presentada en el informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2010 (Inouye, K., 2010). El número de muertes por demencia aumentó en un 148% entre 1990 y 2016. A nivel mundial, en 2016, la demencia fue la quinta causa de muerte más importante (2 millones de muertes) después de la cardiopatía isquémica, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, la hemorragia intracerebral y accidente cerebrovascular isquémico. En 2016, las muertes por demencia representaron el 4,4% del total de muertes, pero el 8,6% de las muertes en personas mayores de 70 años (2,2 millones de muertes) 13, lo que convierte a la demencia en la segunda causa de muerte en este grupo de edad después de la cardiopatía isquémica. La prevalencia es mayor en mujeres, con aproximadamente 27 millones de casos, que en hombres, siendo alrededor de 17 millones. La prevalencia aumentó sustancialmente con la edad tanto en hombres como en mujeres, y aproximadamente se duplicó cada 5 años entre las edades de 50 y 80 años.

La enfermedad de Alzheimer representa la demencia con mayor prevalencia en el mundo, afectando aproximadamente al 5% de las personas mayores de 65 años y al 20% de las personas mayores de 80 años. Esto significa que la tasa de prevalencia se duplica cada 5 años. Según el World Alzheimer Report del 2019, los costos de la enfermedad a nivel global fueron de aproximadamente 818 mil millones de dólares, con un aumento del 35.4%, en comparación con el mismo estudio en 2010. La EA es una de las cuatro enfermedades neurológicas, junto con infarto cerebral, migraña y meningitis, que representan la mayor carga a la salud de la población en el mundo. Esto último se evalúa de acuerdo a los AVAD o Años de vida ajustados por discapacidad (AVAD o DALY por sus siglas en inglés), medida de carga general de

una enfermedad, es una forma de comparar la salud y la esperanza de vida de diferentes países (Feigin, V. L. et al., 2019).

1.3 Diagnóstico y clasificación de la Enfermedad de Alzheimer

El diagnóstico mediante análisis histopatológico de la EA sigue siendo el estándar de oro para el diagnóstico. Si bien ciertas características de la EA se pueden determinar mediante estudios de imagen, como atrofia de áreas específicas, ninguna de las características macroscópicas es específica de la EA y las personas clínicamente normales que no se ven afectadas pueden tener atrofia cortical moderada. El diagnóstico definitivo requiere el examen microscópico de múltiples regiones del cerebro empleando métodos de tinción que pueden detectar cambios histológicos característicos de la enfermedad de Alzheimer, la presencia de placas amiloides extracelulares y ovillos neurofibrilares (Dickinson et al., 2019).

La enfermedad de Alzheimer se puede clasificar de acuerdo a la etiología genética en dos grupos o tipos: una llamada enfermedad de inicio temprano y la otra llamada enfermedad de inicio tardío, también conocida como enfermedad de Alzheimer esporádica; y los dos tipos implican etiologías y mecanismos moleculares distintas. La enfermedad de Alzheimer de aparición tardía se observa en la población mayor de 65 años de edad, representa la gran mayoría de los casos y se considera como una enfermedad multifactorial, siendo la edad avanzada el factor de riesgo de mayor importancia (Bertram, et. al., 2010). A pesar de que tiene una etiología genética compleja, la presencia del alelo e4 del gen APOE, que codifica la isoforma E4 de la Apolipoproteína E es considerado como el factor genético más importante.

La EA de inicio temprano, por otra parte, tiene una incidencia mucho menor, aproximadamente el 4–5% de los casos, y se caracteriza por la aparición de los síntomas antes de los 60 años, así como por un cuadro clínico atípico. La mayoría de los casos de este tipo tienen una aparición esporádica, sin una causa conocida; aproximadamente el 5% de los casos tienen mutaciones en genes de la proteína

precursora del amiloide (APP) y / o presenilinas 1 y 2, heredados de manera autosómica dominante, con una penetrancia casi del 100% (Mendez, 2012).

1.4 Mecanismos patogénicos de la Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer es una patología compleja y multifactorial. A pesar de que pasaron más de 100 años desde la primera descripción de sus síntomas, la etiología precisa de la EA sigue siendo desconocida, con la excepción del 1 al 5% de los casos, donde se ha identificado la presencia de factores genéticos como la causa (Reitz y Mayeux 2014). Aunque han ocurrido avances sustanciales realizados a lo largo de los años que han identificado al beta amiloide y la proteína tau hiperfosforilada como posibles responsables de la EA, la secuencia de eventos que conducen a la disfunción y pérdida neuronal aún no es del todo clara. A pesar de que existe también evidencia del papel que tienen algunos factores ambientales en la aparición de la enfermedad, el enfoque de esta investigación es sobre los factores de riesgo moleculares y genéticos.

La evidencia hasta ahora sugiere que la EA es causada por un desequilibrio en la concentración del péptido A β 42, producto del corte enzimático de la proteína precursora del amiloide (APP) el cual forma agregados tóxicos oligoméricos, y que a su vez generan depósitos de placas amiloides en el tejido cerebral (Lewczuk y et al., 2017). El mecanismo preciso por el cual el depósito de amiloide finalmente conduce a la neurodegeneración y la demencia sigue siendo desconocido. A pesar de lo anterior, se han estudiado diversos factores y procesos celulares que coexisten con el progreso natural de la enfermedad y que contribuyen al desarrollo de ésta, además de los factores genéticos ya mencionados. A nivel histopatológico, esta complejidad etiológica es evidente por el hecho de que las lesiones características de la enfermedad de Alzheimer rara vez ocurren independientemente de otras patologías. Una proporción significativa de cerebros con EA muestra la presencia de daño isquémico cerebrovascular, depósito de cuerpos de Lewy o patología por TDP-43 (Sleegers, K. y col., 2010).

Se ha propuesto una hipótesis vascular de "dos golpes" para la EA, que resalta la probable superposición e interacción de las vías vasculares y la vía clásica de

producción del beta amiloide y la subsecuente toxicidad del mismo (Slovakovic, 2011). En este modelo, la enfermedad vascular resultante de factores de riesgo conocidos, como la hipertensión y la diabetes, conduce a una disminución del flujo sanguíneo a las células cerebrales, así como una afectación de la barrera hematoencefálica, lo que puede conducir a una mayor producción o disminución del aclaramiento del péptido, que a su vez resulta en neurodegeneración, pérdida sináptica y neuronal, así como el eventual deterioro cognitivo y demencia (Snyder et al., 2015).

1.4.1. Histopatología de la EA: placas amiloides y ovillos neurofibrilares

El diagnóstico definitivo de Alzheimer se realiza mediante evidencia histopatológica post mortem. Los hallazgos a nivel histológico que determinan el diagnóstico de la EA son las placas amiloides y ovillos neurofibrilares (NFT). Las placas amiloides son cúmulos extracelulares de aproximadamente 20 a 100 μm de diámetro compuestos por el péptido β -amiloide. Representan un reservorio de distintas formas del péptido y otras moléculas bioactivas, las cuales pueden alterar las vías de señalización celular y provocar gliosis (Xiong, F. et al., 2019). Estas lesiones se clasifican morfológicamente en difusas (pre amiloideas), primitivas (neuríticas), clásicas (densas) y compactas (burn out). El péptido $A\beta_{42}$ es el componente más fibrogénico y predominante de las placas amiloides en la EA, aunque también se han detectado péptidos $A\beta$ que contienen entre 38 y 43 aminoácidos (Dickson et al., 2019). El descubrimiento del $A\beta$ como el componente molecular más importante de las placas amiloides condujo finalmente a la postulación de la hipótesis de cascada amiloidea como modelo fisiopatológico de la EA.

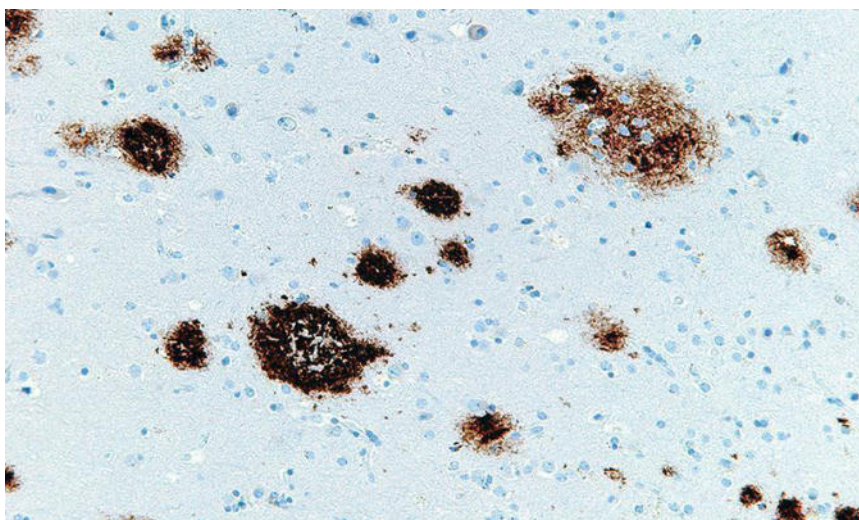


Figura 1. Corte histológico de cerebro donde se observan placas amiloides, lesiones características de la enfermedad de Alzheimer (C. Soto et al., 2012).

Los NFT son lesiones neuronales intracelulares, de aspecto filamentoso y compuestas por la proteína Tau hiperfosforilada. Tau es una proteína asociada a microtúbulos expresada predominantemente en neuronas en las que estabiliza los microtúbulos (MT) y promueve su ensamblaje. Además de los cambios en la fosforilación de esta proteína, ocurren múltiples cambios conformacionales donde el monómero sin plegar se transforma a una estructura polimérica, característica de los NFT. Se han establecido correlaciones entre la carga de NFT y el deterioro cognitivo en pacientes con EA (Iba et al., 2013). Diversos estudios coinciden en que los criterios patológicos clásicos para la enfermedad de Alzheimer, i.e., las placas neuríticas y los ovillos neurofibrilares, pueden representar el 40-70% de la afectación cognitiva observada en sujetos de edad avanzada, con patologías adicionales como la enfermedad cerebrovascular y por cuerpo de Lewy (Dolan et al. 2010).

1.4.2. Enfermedad cardiovascular y cerebrovascular: factores de riesgo para EA

A través de ensayos clínicos se han reconocido factores de riesgo vascular asociados con cardiopatía isquémica y/o accidente cerebrovascular que a su vez también son factores de riesgo para desarrollar demencia (Rosa et al., 2020). Las alteraciones cerebrovasculares como los infartos hemorrágicos, las vasculopatías y los cambios en la sustancia blanca aumentan el riesgo de demencia. Un

metaanálisis que incorpora datos de 22 cohortes hospitalarias y ocho poblacionales encontró que el 7.4% de los pacientes con accidente cerebrovascular por primera vez desarrollaron demencia post accidente cerebrovascular (O' Brien J. T., Markus H. G., 2014).

Estudios han indicado que la lipoproteína lipasa, una enzima que hidroliza los triglicéridos, puede estar involucrada en la base biológica tanto de la EA como de la enfermedad cerebrovascular, a través de su interacción con las lipoproteínas cerebrales así como por medio de modulación de la homeostasis del colesterol en células neuronales. La apolipoproteína E es crucial para el catabolismo de los componentes lipoproteicos ricos en triglicéridos y para el transporte de colesterol (R M Evans et al., 2004).

1.4.3. ApoE y estrés oxidativo

La Apolipoproteína E, o Apo E humana, es una glicoproteína de 34 KDa que se compone de 299 aminoácidos. Esta se expresa en diversos tejidos del cuerpo, y en el sistema nervioso central se expresa principalmente en astrocitos. APOE juega un papel crítico en la redistribución del colesterol y otros lípidos, entre neuronas y otras células, mediante la unión a los receptores APOE de la superficie celular (Liao, F., 2017). A pesar de que la función principal de esta proteína es el transporte de colesterol, también actúa regulando el metabolismo y aclaramiento del beta amiloide. Se ha observado que el receptor de ApoE LPR1 tiene un rol importante en el aclaramiento del amiloide del tejido cerebral (Kanekiyo et al., 2012). Esta proteína de transporte se modifica por oxidación y puede ser disfuncional en sujetos con EA, lo que podría contribuir a la acumulación de A β en cerebro (Owen et al., 2010). La ApoE existe en tres isoformas diferentes (E2, E3 y E4), diferenciadas por sustituciones de aminoácidos en los residuos 112 y 158. Estas diferencias en la secuencia aminoacídica conlleva diferencias conformacionales entre las tres isoformas, lo cual resulta en cambios en la interacción entre cada isoforma y otras proteínas, como el A β (Liao, F., 2017). Como ya se ha mencionado, la herencia del alelo e4 es el factor de riesgo genético más fuerte para la aparición de EA, mientras que el alelo e2 es protector (Zhao, N. et al., 2018). Los individuos heterocigotos para el alelo APOEe4, tienen un riesgo aproximadamente tres veces mayor de

desarrollar EA, mientras que los homocigotos tienen un riesgo 15 veces mayor en comparación con aquellos que no tienen alelo e4. Además, la herencia de este alelo tiene una influencia importante en el desarrollo de la EA a una edad más temprana (Kim J. et al., 2009).

El estrés oxidativo está involucrado en la alteración de diversas vías bioquímicas y procesos fisiológicos como el metabolismo de la glucosa, excitotoxicidad, síntesis y plegamiento de proteínas, inflamación, etc (Butterfield, 2020). Se ha observado en cultivo celular, en modelos animales y en cerebros humanos, que los oligómeros de A β provocan daño oxidativo a neuronas. A su vez, existen trabajos que han demostrado la presencia de índices elevados de carbonilos proteicos, 4-hidroxi-2-trans-nonenal (HNE) unida a proteínas y 3 nitrotirosina (3-NT) en los cerebros de personas con EA (Butterfield y Boyd-Kimbal, 2019). Además, se ha observado daño por estrés oxidativo en cerebros de pacientes de tercera edad sin demencia pero con lesiones histológicas características de la enfermedad, lo cual implica el papel que tiene el daño oxidativo en etapas preclínicas de la enfermedad (Scheff, et. al., 2016).

1.5 Proteína precursora de amiloide (APP)

La proteína precursora de amiloide (APP) es una glicoproteína transmembranal de tipo I, y en mamíferos pertenece a una familia de proteínas junto con APLP1 y APLP2, las cuales se caracterizan por poseer una gran región extracelular que contiene dominios E1 y E2 conservados, un dominio transmembrana único así como un dominio citosólico pequeño (Li C et al. 2014). El gen que codifica para APP consta de 18 exones y se encuentra en el cromosoma 21 (21q21.2-3). La región que codifica la secuencia amiloide comprende parte de los exones 16 y 17. Aunque APP se puede localizar en todas las células, presenta alta expresión en neuronas, especialmente durante procesos de maduración y diferenciación neuronal (Müller y Zheng, 2012). Aunque ha sido ampliamente estudiada desde su identificación, su función permanece en gran parte indeterminada. A pesar de lo anterior, se ha sugerido un papel para la APP en diversas funciones neuronales, como crecimiento de neuritas, la sinaptogénesis, el tráfico de proteínas neuronales a lo largo del axón, la transducción de señales transmembranales, entre otras (Zhang et al., 2011).

Actúa como receptor de membrana de kinesina I, mediando el transporte axonal de beta-secretasa y presenilina 1 (por similitud). Al actuar como un receptor de membrana de kinesina I, juega un papel en el transporte axonal anterógrado de carga hacia las sinapsis en los axones. Los péptidos beta-amiloides son quelantes de metales con actividad reductora. Se unen a metales como cobre, zinc y hierro. *In vitro*, puede reducir Cu^{2+} y Fe^{3+} a Cu^{+} y Fe^{2+} , respectivamente. Estudios *in vivo* han demostrado que APP es un modulador clave de la homeostasis neuronal del cobre, se observó en ratones knockout para APP que aumentaron los niveles de cobre en el cerebro. Por el contrario, los ratones transgénicos que sobreexpresan APP mostraron una reducción significativa de niveles de cobre en cerebro (R. Cappai et al., 1999).

La eliminación o reducción en la expresión de APP está asociada con una disminución en la viabilidad neuronal *in vitro* y una menor actividad sináptica *in vivo*. Un estudio con modelos murinos evidenció anomalías en la migración neuronal en embriones inyectados con iARN para APP (Young-Pearse y col. 2007). Hay evidencia que vincula APP con adhesión celular, se encontró que esta proteína se colocaliza con integrinas B1 en neuronas (Yamazaki y col., 1997). Además, un estudio en cultivos celulares demostró que APP puede formar homodímeros y heterodímeros con otros miembros de la familia de APP y que dicha dimerización promueve la adhesión intercelular (Soba, P et al., 2005). La evidencia hasta ahora sugiere que APP desempeña un papel importante en la regulación del tráfico de proteínas (Zhang, 2011).

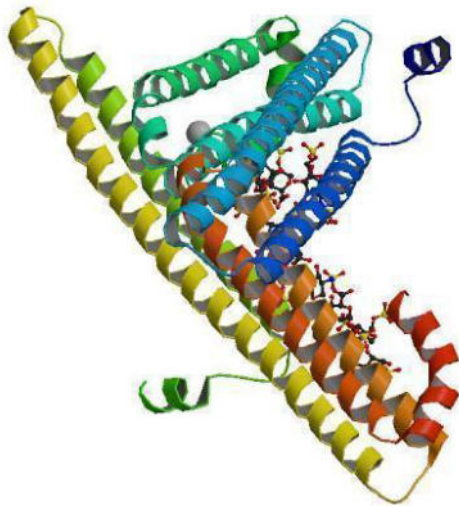


Figura 2. Estructura terciaria de la proteína precursora del amiloide (APP), la cual a través de una serie de cortes enzimáticos da como resultado el péptido β -amiloide (Picono et al., 2003).

1.5.1 Metabolismo de APP

El procesamiento de APP se lleva a cabo a través de dos vías enzimáticas distintas, y en las que participan diversos complejos proteolíticos, actuando de manera secuencial para producir moléculas diferentes. APP se sintetiza en el retículo endoplásmico y luego es transportada a través del aparato de Golgi a la red trans-Golgi (TGN), para después transportarse en vesículas a la superficie celular, donde pasa por un proceso de proteólisis. Por otra parte, APP puede también transportarse hacia endosomas, donde la actividad enzimática es diferente. La vía proteolítica principal, la cual sucede en la membrana celular, es llevada a cabo por una γ -secretasa, enzima identificada como una metaloproteasa de zinc. Este corte se lleva a cabo dentro de la secuencia $A\beta$, evitando la producción del amiloide neurotóxico y produciendo un ectodominio N-terminal, conocido como sAPPa, (Chasseigneaux, S., 2011).

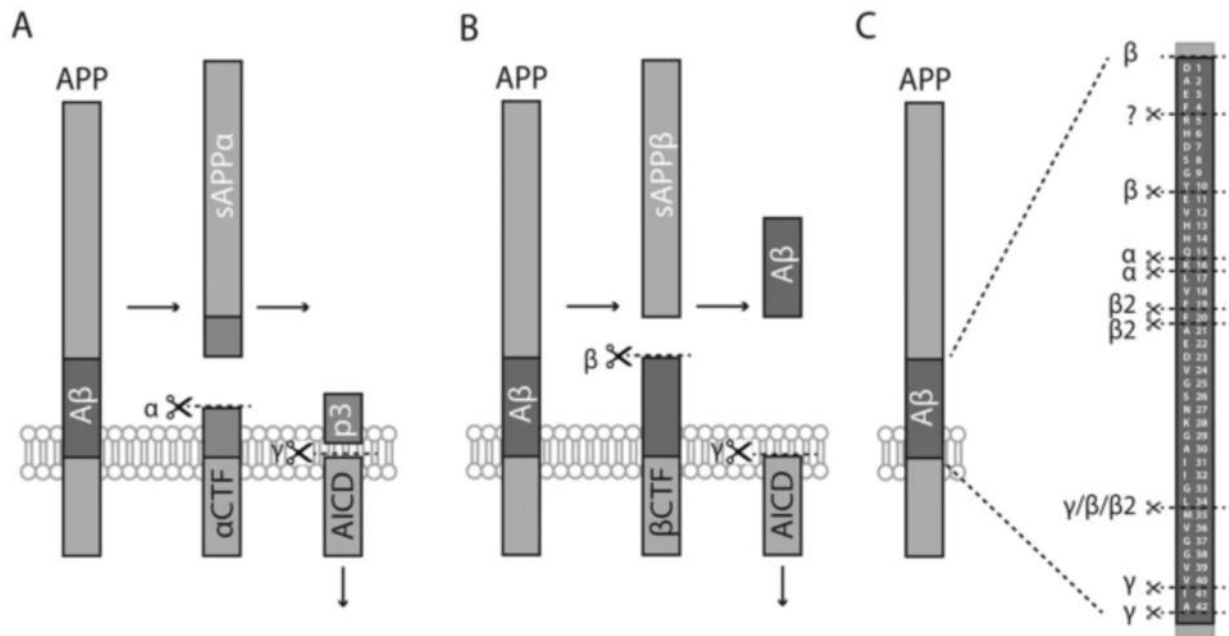


Figura 3. Ilustración esquemática de los sitios de escisión de la α - β - y γ -secretasa en la proteína precursora de amiloide (APP). (A) Vía no amiloidogénica en la que la escisión de la α -secretasa de la APP alrededor de los aminoácidos A β 15-16 da como resultado la liberación de APP α soluble (sAPP α), dejando un fragmento C-terminal (α CTF) en la membrana disponible para su procesamiento posterior. (B) Vía amiloidogénica en la que la escisión por β -secretasa de APP en el aminoácido 1 A β da como resultado la liberación de sAPP β , dejando un fragmento C-terminal (β CTF) en la membrana disponible para procesamiento adicional. La escisión adicional de β CTF por la γ -secretasa da como resultado la liberación de los péptidos A β de 38 a 42 aminoácidos de longitud. (C) Además de los péptidos A β de 38 a 42 aminoácidos de longitud, se pueden generar otros péptidos a través de sitios de escisión alternativos para α y β -secretasa (Agholme et al., 2016).

Se ha observado que sAPP α tiene un papel importante en procesos de plasticidad y supervivencia neuronal, así como en la protección contra estados de excitotoxicidad. Por otra parte, la vía proteolítica que termina en la producción del beta amiloide se lleva a cabo en compartimentos endosomales. Diversos grupos de investigación identificaron a la BACE1, también llamada Asp2 o memapsina 2, como la principal beta secretasa responsable de cortar APP (Vassar R y col., 1999; Yan R y col., 1999). Este corte por BACE1 da como resultado un fragmento corto carboxilo terminal, el cual a su vez es un sustrato para la enzima gamma secretasa, cuya actividad da como resultado al péptido β -amiloide de 40 o 42 aminoácidos (Kinoshita, A., 2003). En un estudio con ratones transgénicos la sobreexpresión de BACE1 condujo a un aumento en la producción de β -amiloide (Bodendorf et al., 2002), mientras que en ratones KO para BACE se observó poco o nulo β -amiloide (Roberds et al., 2001).

1.6 Péptido beta amiloide (A β)

La hipótesis de la presencia de depósitos amiloides como el principal factor que conduce al daño del tejido nervioso se ha postulado durante más de 25 años. Los estudios hasta ahora se han enfocado principalmente en la desregulación de la producción y aclaramiento del péptido beta amiloide como principales causas de la acumulación del péptido beta amiloide. Como ya ha sido mencionado, el péptido A β es generado a partir del metabolismo fisiológico de la APP (Haass et al. 1992). A β es una proteína pequeña compuesta de 39 a 43 aminoácidos la cual presenta una variedad de estados biológicos. Hay dos isoformas principales de A β , la A β 40 soluble y A β 42 insoluble, este último muestra una concentración más alta en pacientes con EA y es más propenso a agregarse (Burdick et al., 1992; Gravina et al., 1995; Kim et al., 2007). En condiciones fisiológicas, más del 90% de A β está en forma de la variante A β 40 mientras que menos del 5% se genera en forma de A β 42. La acumulación de A β dará como resultado inicialmente su oligomerización, después, su depósito en forma de fibrillas y las placas amiloides. Estos depósitos pueden conformarse de varios tamaños de A β , múltiples modificaciones postraduccionales así como configuraciones estructurales alternativas del amiloide (Jiang, H. et al, 2016).

Las placas amiloides representan agregados extracelulares macroscópicos del péptido A β , pero dentro de las neuronas el péptido se encuentra en forma de oligómeros y otras especies de menor tamaño. Inicialmente, se creía que las fibrillas del péptido eran las responsables de la toxicidad detrás de la EA, sin embargo, la evidencia hasta ahora respalda la idea de los oligómeros A β solubles como las principales especies tóxicas (Ferreira y Klein, 2011; Walsh et al., 2002). Se han detectado agregados de A β solubles en lisados de cerebro humano de pacientes con EA (Glabe, C. G et al., 2009).

La deposición de A β aparece una cantidad considerable de tiempo antes que los síntomas de demencia, así como también precede a la patología tau, sugiriendo a la acumulación del amiloide como un factor causal contribuyente en el desarrollo de la EA. Se han reportado ampliamente casos de personas de edad avanzada con funciones cognitivas normales quienes exhibieron hallazgos extensos de placas amiloides en cerebro (R. S. Wilson et al., 2006).

La agregación de A β altera la actividad cinasa / fosfatasa que conduce a la hiperfosforilación de la proteína Tau, lo que provoca la formación de ovillos neurofibrilares (NFT), resultando en activación de la microglía, células astrocitarias así como disfunción sináptica y neuronal. También se cree que la apoptosis inducida por A β a través de la interacción con receptores y proteínas de la superficie celular participa en la disfunción del sistema neuronal. Las células gliales activadas están estrechamente asociadas con las placas amiloides, lo que sugiere que las placas o formas solubles de A β alrededor de las placas pueden inducir cascadas inflamatorias (Small et al., 2001; Zhu et al., 2015).

En el cerebro, el A β puede alterar significativamente la excitabilidad de las neuronas tanto directa como indirectamente. En neuronas hipocampales que sobreexpresan APP, se ha demostrado que A β dirige la remodelación sináptica y deprime a la actividad sináptica excitatoria. Los niveles de A β también aumentan o disminuyen con los respectivos estados de excitación o depresión de la actividad neuronal, por tanto, se ha sugerido que el péptido contribuye a la regulación de la hiperexcitabilidad (McLane, R. D. et al., 2019). Se ha propuesto también que la deposición de A β está asociada con disfunción mitocondrial (Swerdlow RH, 2018). La acumulación progresiva de A β dentro de las mitocondrias puede conducir a disfunción, daño estructural, disminución de niveles de ATP (Calkins MJ et al., 2011) y por lo tanto, déficits energéticos (Yao J et al., 2009).

El péptido, a pesar de sus efectos neurotóxicos, también se encuentra en bajas concentraciones en cerebros de personas saludables, y está involucrado en diversos procesos fisiológicos. Estudios han demostrado que A β está involucrado en la memoria, actuando sobre la potenciación a largo plazo en neuronas hipocampales (Puzzo, D. et al., 2012). Así mismo, A β tiene un papel en el metabolismo del colesterol y esfingomielina (Hartmann et al., 2005). Se ha observado que los monómeros del A β inducen la supervivencia de neuronas en desarrollo bajo condiciones de privación de factor neurotrófico, así como también que protegen neuronas maduras contra la muerte celular excitotóxica (Giuffrida et al. 2009). Las propiedades de estos monómeros, incluidos los efectos neurotróficos y neuroprotectores, la proliferación de células progenitoras, así como la participación

en la función sináptica, implica que la presencia del péptido A β tiene una importancia fisiológica significativa en el sistema nervioso central.

Existe evidencia de los efectos benéficos que tiene sAPPa en el sistema nervioso. Los ratones transgénicos con sobreexpresión neuronal de APP humana mutada en el sitio de alfa secretasa muestran alteraciones conductuales como mayor agresividad, además de muerte prematura (Moechars et al. 1996). A su vez, se ha observado que sAPPa estimula la proliferación de células madre neurales en cerebros de embrión de rata (Hayashi Y et al., 1994). Además, existe evidencia que sugiere que sAPPa funciona como un factor de crecimiento *in vivo*. Se ha observado que está involucrado también en la proliferación de células no neuronales, como fibroblastos y también estimula el crecimiento de células epiteliales de la glándula tiroides. Tackenberg y Nitsch, en un estudio empleando cultivo celular y cortes cerebrales de ratón, observaron que la administración de sAPPa abolió la toxicidad inducida por A β , en comparación con sAPPb, el cual no mostró actividad protectora (Tackenberg & Nitsch, 2019).

1.7 Caenorhabditis elegans: un organismo modelo para el estudio de EA

Se han diseñado modelos vertebrados para el estudio de los mecanismos fisiopatológicos involucrados en la EA, pero los ensayos que utilizan estos organismos son complejos y por lo general requieren mucho tiempo. *C. elegans* es un gusano no segmentado perteneciente al phylum nematoda, el cual, posee características que lo vuelven un organismo práctico y ventajoso para el estudio de los mecanismos implicados en diversos trastornos neurodegenerativos. Sydney Brenner comenzó a investigar la fisiología y desarrollo de este organismo a principios de los años setenta, y desde ese entonces ha sido utilizado como modelo biológico para el estudio de diversos trastornos y para ensayos en el campo de la farmacología y toxicología (Chalfie et al., 2015). *C. elegans*, al ser un organismo entero, representa un modelo más complejo que el cultivo celular, tiene un total de 959 células somáticas. Por otra parte, es sencillo de manipular, su mantenimiento implica bajo costo, y su ciclo de vida corto lo vuelven más práctico que otros modelos animales. Las herramientas genéticas desarrolladas para *C. elegans* se han utilizado para construir modelos predictivos de la enfermedad de Alzheimer, así

como otros trastornos neurodegenerativos, como Parkinson, Huntington y ALS (Martinez, B. A., 2017; Dexter, P. M., 2012).

1.7.1 Ciclo de vida y reproducción de *C. elegans*

Al igual que otros nemátodos, el ciclo de vida de *C. elegans* se compone de la etapa embrionaria, cuatro etapas larvarias (L1-L4) y la edad adulta. Al final de la etapa L2, el animal puede entrar en un estado detenido llamado dauer si las condiciones ambientales no son favorables para un mayor crecimiento. Durante el estado de dauer, la alimentación se detiene indefinidamente y la locomoción se reduce notablemente. El estado de dauer termina cuando el animal experimenta condiciones favorables. *C. elegans* está conformado por dos sexos: hermafrodita autofecundante y macho. Los machos surgen con poca frecuencia (0.1%) por proceso de no disyunción espontánea en la línea germinal hermafrodita, y con mayor frecuencia (hasta 50%) a través del apareamiento. La autofecundación del hermafrodita permite que los gusanos homocigotos generen una progenie genéticamente idéntica, y el apareamiento de machos facilita el aislamiento y mantenimiento de cepas mutantes, así como el movimiento de mutaciones entre cepas.

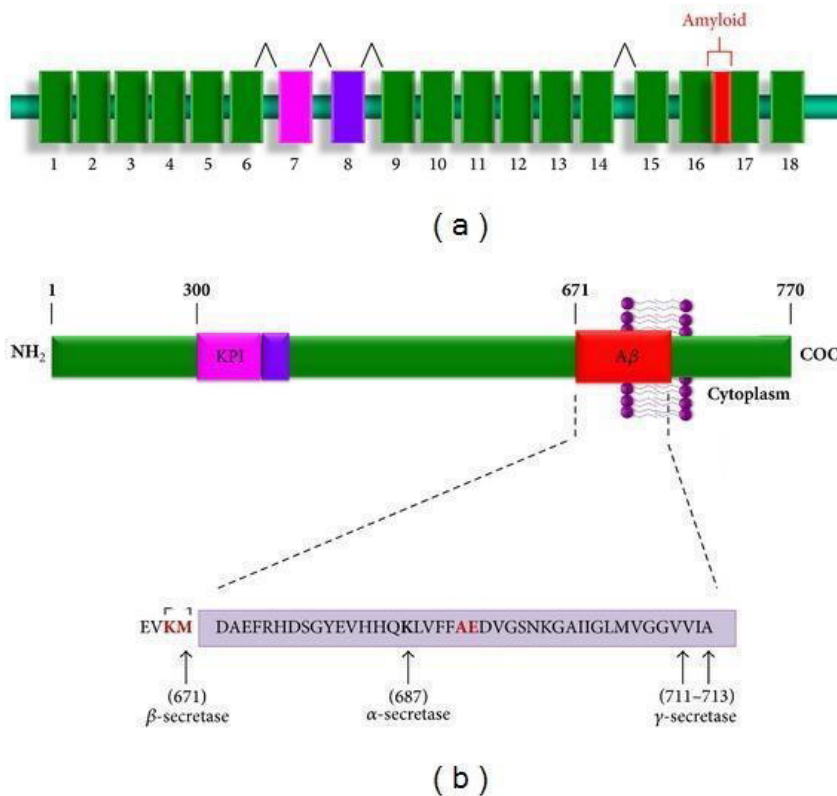


Figura 5. Estructura del gen de la APP humana. (a) El gen APP consta de 18 exones y se encuentra en el cromosoma 21 (21q21.2-3). La región que codifica la secuencia amiloide comprende parte de los exones 16 y 17 (recuadro rojo). b) APP consta de un gran dominio extracelular, un dominio transmembrana hidrófobo y un extremo carboxilo citoplásmico corto (Meraz-Rios et al., 2014).

1.7.2 Anatomía y sistema nervioso de *C. elegans*

Al igual que otros nemátodos, *C. elegans* tiene una forma de cuerpo cilíndrico no segmentado que se estrecha en los extremos, conformado por un tubo exterior y un tubo interior separados por el espacio pseudo celómico. El tubo externo (pared del cuerpo) está conformado por estructuras como la cutícula, tejido compuesto de colágeno y secretada por el epitelio subyacente, rodea al gusano por fuera y también reviste la faringe y el recto. Varias estructuras se abren al exterior a través de la cutícula, el poro excretor se encuentra en la línea media del lado ventral de la cabeza. La vulva es otra gran abertura en el lado ventral en la mitad del cuerpo, y el ano forma otra abertura ventral. Otras estructuras como del tubo externo son hipodermis, sistema excretor, neuronas y músculos; el tubo interno comprende la

faringe, el intestino y, en el adulto, la gónada. Todos estos tejidos están bajo una presión hidrostática interna, regulada por un sistema osmorregulador.

Su sistema nervioso se compone de 302 neuronas, las cuales están organizadas en ganglios o gangliones, ubicados en la cabeza y cola. Se han identificado aproximadamente 5000 sinapsis químicas, 600 uniones gap y 2000 uniones neuromusculares. El conectoma de *C. elegans*, es decir, el mapa de la conectividad neuronal, ya ha sido dilucidado, volviéndolo un modelo muy valioso en el campo de la neurobiología (Kinser et al. 2017).

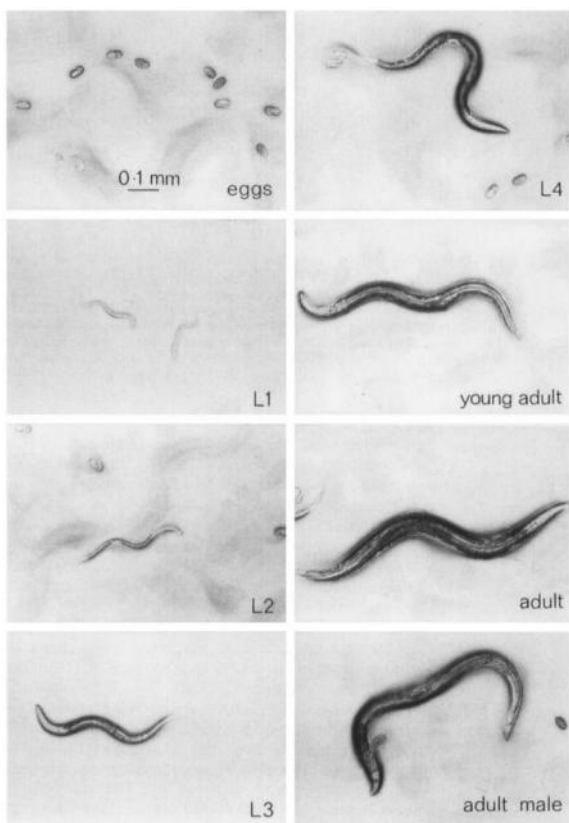


Figura 6. Micrografía de microscopio de campo claro de cada una de las etapas del desarrollo de *C. elegans*, huevos, larva (L1-L4) y adulto (Sulston y Hodgkin, 1988).

La mayoría de las neuronas de *C. elegans* se encuentran en la cabeza alrededor de la faringe. En el cuerpo, una fila continua de cuerpos neuronales se localiza en la línea media, adyacente a la hipodermis ventral. Además, hay dos pequeños ganglios laterales posteriores a los lados, así como algunas neuronas dispersas a lo largo del cuerpo lateral. Los procesos de la mayoría de las neuronas viajan en el

cordón nervioso ventral o dorsal y se proyectan al anillo nervioso (NR) en la cabeza. A pesar de la relativa simpleza de su sistema nervioso, el nemátodo muestra una rica variedad de patrones de comportamiento, incluidas varias formas de aprendizaje asociativo y no asociativo (Chatterjee, N., y Sinha, S., 2007). En este contexto, *C. elegans* ha sido de gran utilidad para estudiar funciones inherentes del sistema nervioso como el aprendizaje y la memoria, afectadas en la EA.



Figura 7. Imagen obtenida por microscopía electrónica de barrido de *C. elegans* en fase de adulto. La flecha grande señala la cola del nemátodo, la delgada la vulva y la cabeza de flecha la cabeza (Sulston y Hodgkin, 1988).

1.7.3 Genes relacionados con EA en *C. elegans*

La secuenciación completa del genoma de *C. elegans* en 1998 demostró que aproximadamente el 38% de los genes del nemátodo tienen un ortólogo humano, como APP y tau (Shaye and Greenwald, 2011). En el nemátodo sólo hay un gen relacionado con APP, *apl-1*. Al igual que la APP humana, *APL-1* contiene una gran región extracelular cuyos dominios E1 y E2 conservados comparten un 46% y un 49% de similitud de secuencia con la APP humana, respectivamente, un dominio transmembrana y un dominio citosólico relativamente pequeño, que comparte un 71% de similitud de secuencia con la APP humana. Al igual que la familia APP en mamíferos, *apl-1* se expresa en múltiples tipos de tejidos, se observa en neuronas, células de tejido conectivo y músculos de la cabeza durante todo el desarrollo (Hornsten et al., 2007). *APL-1* a su vez carece de sitios BACE, además, el genoma

de *C. elegans* no parece codificar un ortólogo de BACE, y hasta la fecha no se ha detectado ningún péptido similar a A β en el nemátodo, por lo tanto, el nemátodo no presenta producción fisiológica de beta amiloide (Li et al., 2014).

Otros genes relacionados con EA que tienen contrapartes en *C. elegans*, incluyen un homólogo de tau, *ptl-1* y homólogos de presenilina, como *sel-12* y *hop-1*. El gen *sel-12* / PSEN se identificó en un cribado genético para aislar supresores de un fenotipo multi vulva dominante *Lin-12* / Notch. La pérdida de *sel-12* / PSEN suprimió el fenotipo de *Lin-12* / Notch multivulva y produjo un defecto en la deposición de huevos, función rescatada al introducir PSEN1 o PSEN2 humanos, lo que sugiere una función conservada entre las presenilinas humanas y del nemátodo (Levitan & Greenwald, 1995). Dos proteínas con actividad α -secretasa están presentes en *C. elegans*, *SUP-17* y *ADM-4*. La escisión de *APL-1* por parte de la α -secretasa libera el fragmento extracelular, *sAPL-1*; la posterior escisión de este fragmento por el complejo γ -secretasa libera el dominio intracelular (Li et al., 2014).

1.7.4 Expresión de A β en *C. elegans*

A pesar de que *C. elegans* no produce el péptido beta amiloide de manera fisiológica, representa un ventajoso sistema genético *in vivo* para estudiar los efectos del beta amiloide neurotóxico a través del uso de modelos transgénicos (Li et al., 2014). Dado que el A β agregado es tóxico para las neuronas y causa parálisis muscular en *C. elegans*, las moléculas y vías involucradas en la formación y el desensamblaje de los agregados de A β se pueden detectar en este modelo. Se han generado diversas cepas transgénicas en las que una secuencia señal seguida de la secuencia A β humana se expresa en todas las células, en neuronas, o en células musculares. Estas cepas producen los péptidos A β 1-42 o A β 3-42. Líneas transgénicas en las que se expresó A β en neuronas glutamatérgicas mostraron neurodegeneración dependiente de la edad, los adultos de 7 días mostraron hasta 75% de neurodegeneración glutamatérgica (Treusch et al., 2011).

En un modelo de *C. elegans* con mutación en *APL-1*, el cual es ortólogo de *sAPPa*, la expresión del ectodominio de este revirtió letalidad en larvas (Hornsten et al. 2007). Por otro lado, Dostal y colaboradores, para saber si el estrés celular precede

a la toxicidad de A β o es producto de ella, generaron una cepa de *C. elegans* en la que la expresión de A β está restringida por la temperatura (cepa CL4176). Cuando los animales se cambian a la temperatura permisiva, los niveles de A β aumentan rápidamente y ocurre parálisis de manera progresiva (Dostal, V. et al., 2010).

1.7.5 Memoria asociativa en *C. elegans*

La quimiotaxis es una función observada en diversos organismos mediante la cual estos detectan diferencias de concentración de diferentes moléculas odorantes en el ambiente para localizar fuentes de alimento, evitar sustancias nocivas y encontrar pareja para la reproducción. Uno de los primeros comportamientos sensoriales examinados en *C. elegans* fue la quimiotaxis. El nemátodo siente atracción por una variedad de compuestos que incluyen nucleótidos cíclicos, cationes, y extractos bacterianos, y evita compuestos repelentes como CO₂ y D-triptófano (Luo, Y. et al., 2010). La respuesta sensorial al olor en *C. elegans* está mediada por la activación de neuronas sensoriales e interneuronas para estimular las neuronas motoras, dando como resultado un comportamiento de atracción y repulsión. El receptor de olor canónico en los nematodos, el receptor de diacetilo, es producto del gen ODR-10 y un miembro de una gran familia de receptores heterotriméricos acoplados a proteína G (Sengupta, P et al., 1996).

Diferentes señales olfativas provocan distintas respuestas en el comportamiento de *C. elegans*, las cuales pueden utilizarse en ensayos de comportamiento, como el de memoria asociativa. Como paradigma de la quimiotaxis de memoria asociativa, el estímulo condicionado es un estímulo odorante, y la fuente de alimento bacteriana es el estímulo incondicionado (Wang, DY, 2006). Estudios han demostrado que los mecanismos de memoria a corto plazo en *C. elegans* se conservan con organismos superiores, además que puede aprender y formar memorias asociativas y no asociativas, que duran hasta 24 horas, estableciendo aún más a este organismo como un buen modelo para estudiar la regulación genética de la memoria asociativa a corto y medio plazo. (Ardiel & Rankin, 2010; Kauffman et al., 2010). Luo Y y colaboradores, empleando cepas transgénicas de *C. elegans* con expresión inducible de A β en neuronas, observaron que estos organismos mostraron una quimiotaxis deficiente para el atrayente benzaldehído (Luo Y et al., 2006). A su vez,

otros autores han demostrado que la memoria a largo plazo en el nemátodo requiere tanto la transcripción como la traducción, como es necesario para la memoria a largo plazo en otros organismos más complejos (Kauffman, et al., 2010; Timbers & Rankin, 2011; Vukojevic et al., 2012).

1.8 Variantes del péptido beta amiloide como posible terapia

Hasta ahora la terapia farmacológica para la enfermedad de Alzheimer funciona solamente para retrasar su progresión. Se ha propuesto el uso de péptidos como posible terapia para la enfermedad de Alzheimer. Estudios empleando mutantes de A β han destacado que la formación de oligómeros A β es muy sensible a la sustitución de un solo aminoácido lo cual conduce a un fenotipo diferente. Las posibles estrategias terapéuticas basada en péptidos proviene de la identificación de una mutación en el gen de APP, la cual resulta en una sustitución de alanina por valina en el codón 673, en la porción 2 N-terminal de la secuencia de A β (Di Fede et al., 2009). Esta variante (A β A2V) tiene un efecto negativo en la amiloidogénesis (Di Fede et al., 2009; Giaccone et al., 2010). Se ha observado que gente que es portadora en estado heterocigoto de la mutación A2V no desarrollan síntomas de Alzheimer. Aunque esta mutación incrementa la posibilidad de que el A β adopte una configuración estructural de hoja β , además de aumentar la formación de oligómeros incrementando la neurotoxicidad, la interacción entre el péptido mutante A2V y el silvestre impide la amiloidogénesis y neurotoxicidad consiguiente, lo cual explica la ausencia de enfermedad en los portadores heterocigotos de A673V (Di Fede et al., 2009; Giaccone et al., 2010).

En un antecedente directo, Estrada et al. en un modelo *in vitro* analizaron el papel de los aminoácidos en la agregación de A β ; generaron las mutaciones K28A, A30W y M35C y evaluaron la formación de amiloide mediante microscopía de fuerza atómica y si los cambios en las propiedades de agregación se correlacionan con los cambios en la producción de ROS y la citotoxicidad de los péptidos (Estrada-R, Zomosa-S et al., 2019).

1.9 Visualización de A β mediante microscopía de fluorescencia

La identificación de los depósitos del péptido beta amiloide es una parte importante de nuestro trabajo. Se pueden usar varios métodos de preparación de tejidos, tinciones histológicas y procedimientos inmunohistoquímicos para la detección del amiloide. Existen métodos de visualización del beta amiloide basados en el uso de compuestos que interactúan con la estructura del péptido (Link et al., 2001). El rojo Congo y la tioflavina S son las dos tinciones principales utilizadas para detectar cualquier forma de amiloide. Estos compuestos se unen a la conformación de hoja plegada β característica del amiloide. El desarrollo de estas metodologías ha permitido caracterizar la morfología de los depósitos beta amiloide en modelos murinos (Buttini et al., 2012). Trabajos previos han empleado la tioflavina S para visualizar el depósito de oligómeros de A β en *C. elegans* (Zhao et al., 2016).

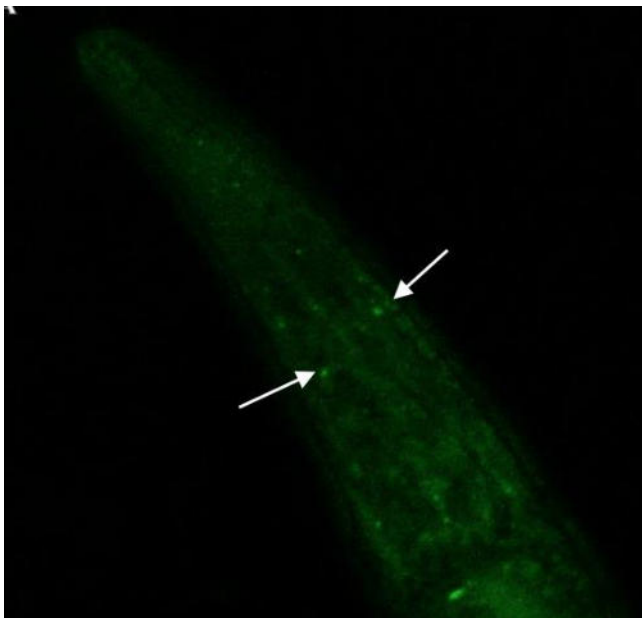


Figura 8. Fotografía de microscopía de fluorescencia (Li, M., 2018). Visualización de depósitos del péptido beta amiloide en *C. elegans* mediante tinción con tioflavina S. Las flechas indican depósitos del péptido.

Capítulo II.

Justificación e hipótesis

2.1 Justificación

La enfermedad de Alzheimer es la demencia más común y representa uno de los grandes retos para los servicios de salud en el mundo. Los cambios demográficos observados en países desarrollados implican un aumento en la incidencia de la enfermedad debido a mayor expectativa de vida. Una limitación importante en los modelos mamíferos usados para el estudio de la enfermedad de Alzheimer es el costo y tiempo que requiere su manejo. *C. elegans* representa un modelo biológico ventajoso que permite el estudio de los mecanismos moleculares involucrados en la patogenia de la EA.

2.2 Hipótesis

Las variantes del péptido A β 42 A30W, K28A y M35C tienen un efecto neuroprotector y mejoran el fenotipo similar a la enfermedad de Alzheimer en el nemátodo *Caenorhabditis elegans*

Capítulo III.

Objetivos

3.3 Objetivo general

Evaluar el efecto de los oligómeros del péptido A β 42 silvestre y variantes para preservar la función quimiotáctica y motilidad en la cepa OH441 de *Caenorhabditis elegans*.

3.4 Objetivos específicos

- 1) Estandarizar el modelo de *C. elegans* en el laboratorio.
- 2) Evaluar el efecto de los oligómeros del péptido beta amiloide silvestre y variantes en la memoria asociativa de la cepa de OH 441 mediante un ensayo de quimiotaxis.

3) Visualizar el efecto de los oligómeros del péptido beta amiloide, silvestre y variantes, mediante microscopía de fluorescencia, empleando tioflavina S como tinción.

Capítulo IV.

Materiales y métodos

4.1 Equipo y material desechable

- Placas petri redondas 60 x 15 mm
- Placas petri cuadradas 120 x 120 mm
- Micropipetas: volumen de 1000 μ L, 200 μ L y 20 μ L
- Puntillas para micropipeta
- Guantes desechables estériles
- Pipetas desechables, volumen 10 ml
- Portaobjetos
- Incubadora
- Mechero de Bunsen
- Balanza analítica
- Vortex
- Centrífuga
- Estereoscopio
- Microscopio de fluorescencia
- Espectrofotómetro
- Campana de bioseguridad

4.2 Reactivos

NGM (nematode growth medium)

- 1 M KPO4 buffer pH 6.0 (108.3 g KH₂PO₄, 35.6 g K₂HPO₄)
- 1 M MgSO₄
- Peptona, 2.5 g
- Agar, 3 g

- NaCl, 5 g
- Agregar 1 L de agua
- Esterilizar en autoclave
- 5 mg/ml colesterol en etanol
- Almacenar a 4°C

Buffer M9 1X

- 17mM de fosfato de sodio dibásico (Na₂HPO₄), 6 g
- 23 mM de fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄), 3.1 g
- 86 mM cloruro de sodio (NaCl), 5 g
- 1 mM sulfato de magnesio heptahidratado, 0.24 g
- Agregar un litro de agua y esterilizar la solución en autoclave.

LB (medio Luria Bertani)

- 1% Bacto Triptona
- 0.5% extracto de levadura
- 172 mM NaCl
- Ajustar pH a 7.0
- Agregar 1 L de agua y esterilizar la solución.

E. coli OP50

- La bacteria se almacena en viales a -80°C.
- Se retira un vial y se deja a temperatura ambiente.
- En condiciones estériles, se toma un volumen de aproximadamente 1 μ L de la bacteria y se agrega este a un matraz con medio LB.
- Se coloca el matraz en agitación a 37°C durante un periodo de 12-20 h
- Se realiza la lectura de densidad óptica mediante espectrofotometría, tomando como valor de referencia ideal 2.2-2.5 para el ensayo de quimiotaxis.
- Se almacena el matraz con el medio LB inoculado a 4°C.

Placas NGM con op50

- En condiciones de esterilidad dentro de campana de extracción se agregan 2.5 ml de medio LB con E. coli OP50.
- se dejan secar y se almacenan a 4°C

Péptido A β

-Variantes del A β 42 A30W, K28A y M35C.

-Péptido A β 42 silvestre.

-Se realiza solución del péptido en PBS con una concentración de 1 mg/ml.

-se agrega el péptido en el medio LB con E. coli OP50 a una concentración de 40 mM

4.3 Manejo de *Caenorhabditis elegans*

-El nemátodo crece y se propaga en placas petri con medio NGM esteril.

-E. coli OP50: cepa mutante de la bacteria utilizada para alimentar al nemátodo. Se siembra 1.5 ml en cada placa petri para propagación de 60 x 15 mm.

Cepa

- OH441: expresión pan neural del péptido beta amiloide.

Etapas del desarrollo de *C. elegans*

- Huevo
- Larva (L1-L4)
- Adulto (macho o hermafrodita)

Control de la temperatura: mantenimiento del nemátodo a 20°C para crecimiento y expresión del péptido β -amiloide.

Ciclo de vida a 20°C: 3 días desde etapa de huevo -> L1-L4 -> adultos -> huevos.

Con una vida útil de 2-3 semanas.

Descendencia: un gusano hermafrodita puede producir alrededor de 300 a 350 individuos bajo autofecundación.

4.3.1 Sincronización de poblaciones del nemátodo

Una característica que hace de *C. elegans* un modelo atractivo para trabajar es la posibilidad de obtener poblaciones de gusanos sincronizados en una etapa específica a través de un protocolo relativamente sencillo. La facilidad de

mantenimiento y propagación de este nemátodo sumado a la posibilidad de sincronización brindan una poderosa herramienta para obtener grandes cantidades de gusanos. La técnica usada en este trabajo emplea un tratamiento con NaOH y Cl, se utiliza para sincronizar cultivos de *C. elegans* en la primera etapa larvaria (L1). El principio del método radica en el hecho de que los gusanos son sensibles al NaOH, mientras que el huevo protege a los embriones (J. Cerón et al., 2012).

El protocolo es el siguiente:

- a. Permitir que los gusanos crezcan hasta la etapa adulta.
- b. Recuperar adultos grávidos en tubos de 15 ml empleando 1 ml de buffer M9.
- c. Agregar 1.3 ml de hipoclorito de sodio y 650 μ l de NaOH
- d. Aplicar vórtex durante 5 minutos, con pausas de 10 segundos cada minuto
- e. Centrifugar a 2000 r.p.m por un minuto.
- f. Retirar sobrenadante y después agregar 5 ml de buffer M9
- g. Repetir pasos e y f de 5 a 7 veces.

4.3.2 Propagación de la cepa OH 441 para el ensayo de quimiotaxis

-La cepa se almacena en viales a -80°C .

-Se coloca un vial a temperatura ambiente hasta que se descongele, después se retira el sobrenadante y se vierte el contenido del vial en una placa petri con NGM.

-Se realiza propagación del nemátodo a 20°C hasta tener 15 placas NGM con la cepa.

-Se recupera la población de cada placa para realizar el protocolo de sincronización y obtener huevos.

-Depósito de los huevos en 30 placas NGM con 2x *E. coli* OP50.

-Después de un periodo de 24 h se agrega en el lado interno de la tapa de cada placa petri 1 μ L de benzaldehído (15 placas tratamiento), así como 1 μ L de agua (15 placas control).

-Al transcurrir 24 h se retira el estímulo, cambiando las tapas de cada placa petri.

-Después de 48 h se procede con el ensayo de quimiotaxis.

4.4 Ensayo de quimiotaxis

4.4.1 Placa para ensayo de quimiotaxis

-Se emplea una placa petri cuadrada de 120 x 120 mm con medio NGM sin colesterol.

-La placa se marca con 5 líneas divisorias y se identifican dos extremos en la placa, uno denominado el área control, en el cual se coloca 1 μ l de la cepa OP50 de *E. coli.*, así como 0.5 M de NaN (azida de sodio). En el otro extremo, llamado área de tratamiento, se coloca 1 μ l de benzaldehído, al igual que 0.5 M de NaN.

4.4.2 Conteo de gusanos y elaboración de índice de quimiotaxis

-Después de un transcurso de 24 h se realiza el conteo manual de los gusanos bajo el estereoscopio.

-Se genera un índice de quimiotaxis usando la siguiente fórmula:

$$IQ = \frac{\text{\#gusanos en área tratamiento} - \text{\#gusanos en área control}}{\text{\#gusanos totales}}$$

-Un puntaje mayor o igual que 1 es reflejo de una función de quimiotaxis conservada o mejorada. Un puntaje negativo implica una función deteriorada, sin mejoría.

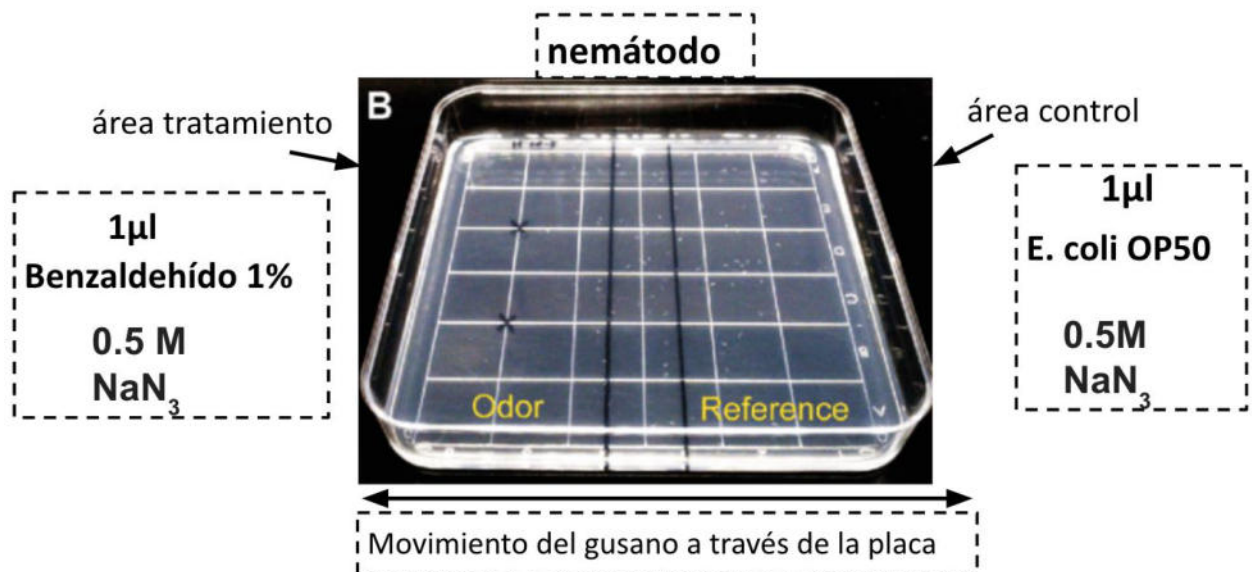


Figura 6. Placa con medio NGM para ensayo de quimiotaxis. Se divide la placa en dos áreas, una de tratamiento donde se coloca 1 μ l de la sustancia odorante, benzaldehído 1%, así como azida de sodio 0.5 M; en la otra área, control, se coloca 1 μ l de *E. coli* OP50 y azida de sodio 0.5 M.

4.5 Visualización del A β mediante microscopía de fluorescencia

4.5.1 Fijación de *C. elegans*

-Se propagó hasta tener cuatro placas de la cepa OH441

-Se colectaron los nemátodos de cada placa con 1mL de buffer y se pasó a cuatro tubos de 1.5mL a los que se aplicaron distintos métodos de fijación:

1. Sin fijar. Se lavó dos veces con PBS y se decantó hasta dejar un volumen pequeño. Se montó colocando 3 gotas con los gusanos en un portaobjetos y se añadió medio de montaje/DAPI.

2. Fijación con etanol. Se lavó dos veces con PBS. Se añadió 1 mL de etanol 70% y se incubó durante 30 mins. Se centrifugó durante 2 min a 2000 r.p.m. y se decantó. Se montó colocando 3 gotas en un portaobjetos y se añadió medio de montaje/DAPI.

3. Fijación con etanol + acetona. Se lavó dos veces con PBS. Se añadió 1 mL de etanol 70% y se incubó 30 mins. Se centrifugó por 2 min a 2000 r.p.m. y se decantó. Se añadió 1 mL de acetona y se incubó por 30 mins. Se centrifugó por 2 min a 2000 r.p.m. y se decantó- Se montó colocando 3 gotas en un portaobjetos y se añadió medio de montaje/DAPI.

4. Fijación con frío. Se lavó dos veces con PBS y se decantó hasta dejar un volumen pequeño. Se congeló el pellet de gusanos por 1 min y se incubó en frío hasta su descongelación. Se montó colocando 3 gotitas en un portaobjetos y se añadió medio de montaje/DAPI.

4.5.2 Tinción con tioflavina S

-Incubación de cepa OH441 durante 24 horas con el péptido 40 WT.

-Recuperación de los nemátodos y fijación con etanol y acetona.

-Preparación de solución de tioflavina S al 0.125% en etanol 50%.

-Se agregaron 500 μ L de tioflavina al tubo con nemátodos fijados, después se incubó durante 30 minutos.

-Lavado con etanol 50% hasta eliminar el exceso de tioflavina.

-Colocación en portaobjeto con medio de montaje y cubreobjetos

-Se observó al microscopio de fluorescencia con objetivo de 64x

Capítulo V.

Resultados

5.1 Crecimiento de *C. elegans*

La cepa OH441 se almacenó a -80°C en viales con glicerol. El contenido del vial se trasladó a una placa NGM. Se valoró la viabilidad de la cepa un par de horas después de ser descongelada, observando gusanos en movimiento. Los gusanos crecieron en incubadora a 20°C , temperatura a la cual fue propagada la cepa para los ensayos posteriores. Se observó contaminación bacteriana de algunas placas, para lo cual realizamos el protocolo de sincronización de poblaciones, éste permite obtener los huevos del nemátodo sin organismos contaminantes.



Figura 7. Fotografía de microscopio estereoscópico de placa NGM con *C. elegans* donde se puede observar un gusano viable después de ser descongelado.



Figura 8. Fotografía de microscopio estereoscópico de placa NGM con *C. elegans*. Se observa en el quinto día de crecimiento una mayor confluencia de gusanos, así como contaminación bacteriana.

5.2 Ensayo de quimiotaxis

Empleamos esta metodología para evaluar la capacidad de una cepa transgénica de *C. elegans* que expresa el beta amiloide para generar memoria asociativa en respuesta a un estímulo odorante, esto después de ser expuesto a variantes peptídicas del A β . Se realizó un ensayo de quimiotaxis (Margie et al., 2013) con la cepa OH 441 después de exponer a los gusanos a los péptidos, tanto variantes peptídicas como silvestre, a una concentración de 40 mM. Se realizó una división de las placas en 5 grupos, tres tratados con las variantes peptídicas (A30W, K28A, M35C), un grupo tratado con el péptido silvestre (WT) y otro que no recibió tratamiento (NoTx). Se realizó un conteo de los gusanos después de haber transcurrido 12 horas del ensayo, y en base a los resultados, se elaboró un índice de quimiotaxis, el cual se considera un reflejo de la función neuronal involucrada en la adaptación olfativa en *C. elegans* (Watanabe et al., 2019).

Un índice mayor o igual que uno indica una memoria asociativa respetada o mejorada, un índice negativo, menor o igual que menos uno, representa un deterioro de la función adaptativa del gusano. Las poblaciones que no recibieron exposición al péptido (No Tx) ni pasaron por entrenamiento (NE), es decir, que no recibieron el estímulo odorante, obtuvieron el menor índice de quimiotaxis (-0.38) en relación a los demás grupos (Figura 9); estos últimos no pasaron por el proceso de formación de la asociación entre el estímulo odorante y el alimento. Las poblaciones de gusanos entrenadas (E/K28A) que fueron expuestas a la variante peptídica K28A mostraron el mayor índice de quimiotaxis (0.14) en relación a los demás grupos. A su vez, las poblaciones de gusanos tratados con el péptido K28A pero que no recibieron el entrenamiento con el odorante (NE/K28A) obtuvieron un índice de -0.125. Los nemátodos entrenados que fueron tratados con la variantes M35C (E/M35C) obtuvieron un índice de quimiotaxis de -0.21. Por otro lado, los gusanos entrenados y expuestos a la variante A30W (E/A30W), presentaron un índice de -0.02. Los nemátodos que no recibieron entrenamiento y que a su vez sí fueron tratados con la variantes M35C (NE/M35C) obtuvieron un índice de quimiotaxis de 0.03. Por otro lado, los nemátodos que no recibieron entrenamiento y que sí fueron tratados con la variante del péptido A30W (NE/A30W) obtuvieron un índice de quimiotaxis de 0.05. Los grupos no entrenados y que recibieron tratamiento con las

variantes M35C y A30W obtuvieron un índice de quimiotaxis menor que los grupos que no fueron sometidos al entrenamiento.

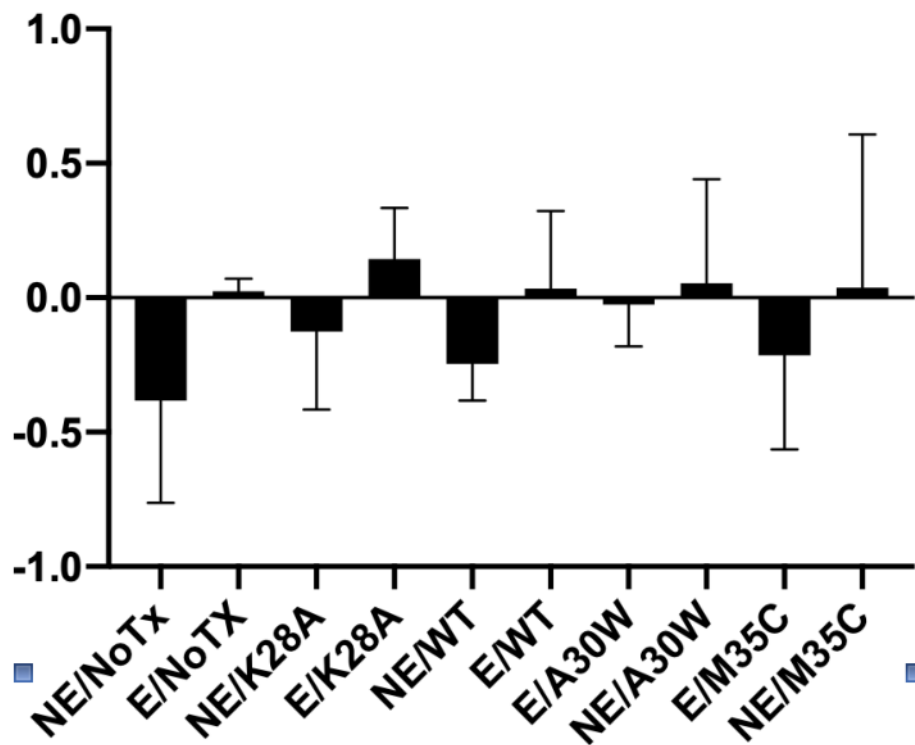


Figura 9. Resultados del ensayo de quimiotaxis. Se elaboraron índices de quimiotaxis a partir de los resultados del ensayo. Un puntaje mayor o igual que 1 es reflejo de una función de quimiotaxis conservada o mejorada. Un puntaje negativo implica una función deteriorada, sin mejoría. El péptido K28A, el cual contiene una sustitución de lisina por valina en el sitio 28 de la cadena aminoacídica, presentó una mejoría sobre la función de memoria asociativa, reflejada en un mayor índice de quimiotaxis (0.14) en comparación con las poblaciones que no fueron tratadas con péptidos ni entrenadas.

5.3 Ensayo de fluorescencia

Para observar los depósitos del beta amiloide en *C. elegans* empleamos un protocolo de tinción con tioflavina S. De esta manera se pueden detectar visualmente cambios en la agregación como respuesta a la exposición a las variantes peptídicas; para el cual, primero realizamos la fijación de los gusanos. Para lograr la internalización de la tioflavina S en el nemátodo utilizamos un protocolo para permeabilizar la cutícula.

Se compararon cuatro métodos distintos de fijación utilizando el compuesto DAPI como marcador fluorescente. Los nemátodos sin fijar mostraron poca o nula señal de DAPI indicando una pobre internalización del reactivo debido a la cutícula. Los tres métodos de fijación permitieron la internalización de DAPI, sin embargo, el método de frío solo mostró señal en un porcentaje bajo de la población de nemátodos. Por lo tanto, los métodos de fijación por etanol o por etanol y acetona son los mas adecuados.

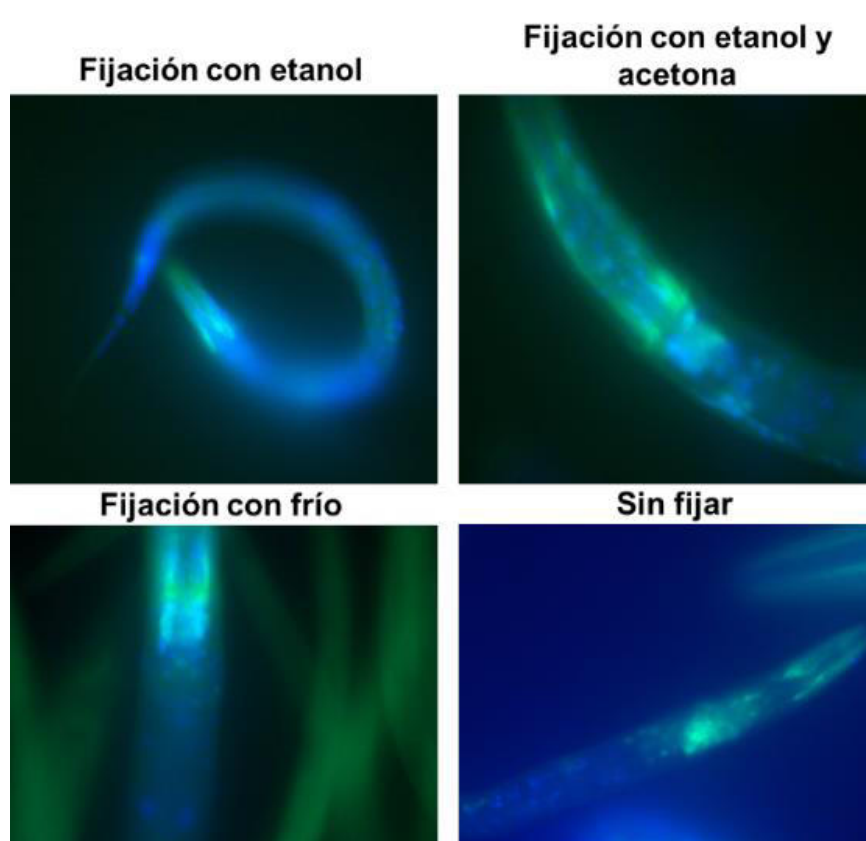


Figura 10. Microscopía de fluorescencia de *C. elegans*. Comparación de distintos métodos de fijación, con etanol; con etanol y acetona; con frío y sin fijar. Los nemátodos sin fijar mostraron poca o nula señal de DAPI. Los métodos de fijación con etanol o con etanol y acetona mostraron una mayor internalización del marcador.

5.4 Prueba con Tioflavina S

Para este ensayo se empleó el método de fijación con etanol y acetona, mencionado anteriormente. Se observó internalización de la tioflavina S en el nemátodo. Se puede observar fluorescencia a lo largo de todo el cuerpo del gusano (Figura 10). La cutícula es un tejido compuesto principalmente de colágeno, el cual

cubre al nemátodo y le brinda protección al medio ambiente. La impermeabilidad que confiere la cutícula hace que la tinción con tioflavina S pueda ser complicada. A partir de estos resultados hemos establecido las bases para realizar ensayos de fluorescencia de trabajos posteriores. Observar el patrón de agregación del péptido beta amiloide dentro del nemátodo permitirá establecer una correlación entre el fenotipo y el grado de agregación del amiloide, y si existen diferencias de agregación entre la cepa silvestre y las mutantes. El estudio del empleo de las variantes peptídicas como posible terapia en *C. elegans* requiere de la visualización de los péptidos dentro del gusano para comprobar que en realidad hayan tenido un efecto significativo en el organismo.

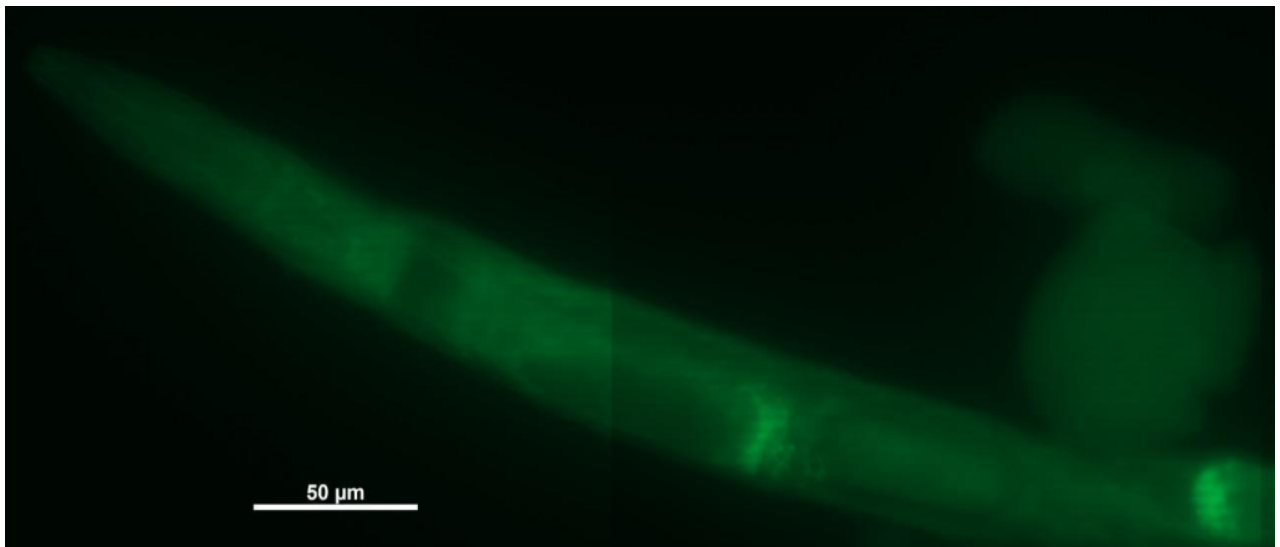


Figura 11. Microscopía de fluorescencia de *C. elegans*. Se realizó la fijación de los nemátodos con etanol y acetona, posteriormente un método de internalización de la tioflavina S, lo cual permitió la tinción del péptido A β . Se observaron los depósitos del péptido A β como señales fluorescentes a lo largo del nemátodo.

Capítulo VI.

Discusión

El nemátodo *C. elegans* ha demostrado ser un sistema *in vivo* ventajoso para estudiar los efectos del beta amiloide neurotóxico. Dado que el A β agregado es tóxico para las neuronas y causa parálisis muscular en *C. elegans*, las moléculas y vías involucradas en la formación y el desensamblaje de los agregados de A β se pueden identificar en este modelo. Se han generado diversas cepas transgénicas en las que el péptido A β humano se expresa en todas las células, en neuronas, o en células musculares (Treusch et al., 2011).

La quimiotaxis es una función de diversos organismos mediante la cual estos detectan diferencias de concentración de diferentes moléculas odorantes en el ambiente para localizar fuentes de alimento, evitar sustancias nocivas y encontrar pareja para la reproducción. Esta función ha sido utilizada para evaluar la función neuronal en *C. elegans* en diversos contextos (Watanabe et al., 2017). Empleamos esta metodología para evaluar la capacidad de una cepa transgénica de *C. elegans* que expresa el beta amiloide para generar una memoria asociativa en respuesta a un estímulo odorante, esto después de ser expuesto a variantes peptídicas del A β .

Existen trabajos en los que se ha investigado el uso de variantes del péptido A β como una posible terapia para la enfermedad de Alzheimer (Matharu B et al., 2010). Zhao et al. evaluaron el efecto del tratamiento con péptidos sobre el fenotipo de toxicidad en un modelo transgénico de *C. elegans*, evaluando la función quimiotáctica del nemátodo (Zhao et al., 2016). Estrada y colaboradores, empleando un protocolo de tinción con Tioflavina S, observaron que la mutante A30W exhibió una menor capacidad para formar agregados de tipo amiloide, en comparación con el péptido WT. Además, esta variante actuó como inhibidor de la agregación y presentó aclaramiento de estructuras similares a amiloides formadas previamente (Estrada-R, Zomosa-S et al., 2019).

Por nuestra parte, y siguiendo la línea de investigación de trabajos anteriores de nuestro laboratorio, utilizamos las variantes peptídicas K28A, A30W y M35C. Estas

variantes presentan sustituciones aminoacídicas puntuales. Este cambio en la secuencia aminoacídica de los fragmentos A β ocasiona una interferencia en la agregación del amiloide y, por lo tanto, en la formación de oligómeros tóxicos. Hayden et al., empleando mutantes de A β , observaron que la formación de oligómeros de A β tóxicos es muy sensible a sustitución de un solo aminoácido, lo cual conduce a un fenotipo no patogénico (Hayden et al., 2017).

De nuestros resultados, destaca el péptido K28A, el cual contiene una sustitución de lisina por valina (K28A) en el sitio 28 de la cadena aminoacídica, presentando una mejoría sobre la función de memoria asociativa de *C. elegans*, reflejado en un mayor índice de quimiotaxis en comparación con las poblaciones que no fueron tratadas con péptidos ni entrenadas. Los residuos de lisina (K28) juegan un papel crítico en el autoensamblaje de A β 42. Simulaciones de dinámica molecular han destacado que esta mutación puntual provoca cambios estructurales importantes en el monómero A β 42, aumentando el contenido de estructuras hélice y disminuyendo el contenido de hojas beta (Goyal, B., 2019).

Como ya ha sido reportado antes, la toxicidad del péptido beta amiloide está correlacionada con su secuencia y estructura (M Q Liao et al., 2007), por lo que el cambio en la secuencia de K28A puede estar implicado en la preservación de la memoria asociativa de los nemátodos que fueron expuestos a esta variante. Esto último puede verse reflejado en nuestros resultados como una disminución de la agregación en los nemátodos que fueron tratados con el péptido, permitiendo la generación de memoria asociativa en el gusano. Por otra parte, los grupos no entrenados y que recibieron tratamiento con las variantes M35C y A30W obtuvieron un índice de quimiotaxis menor que los grupos que no fueron sometidos al entrenamiento. Estos resultados contrastan con el trabajo de Xue-Ling et al., quienes reportaron una atenuación en la toxicidad de la variante de A β 40 con la sustitución M35C, así como de Butterfield et al., los cuales observaron que el aminoácido M35 tiene un rol importante en la citotoxicidad del péptido al asociarse con el estrés oxidativo, y que un estado oxidado de M35 tiene un efecto en la toxicidad y agregación del beta amiloide (Butterfield et al., 2002). Es importante volver a realizar el ensayo con un mayor número de repeticiones para corroborar

estos resultados y comprobar si el tratamiento con nuestros péptidos tiene influencia en la toxicidad celular.

Capítulo VII.

Conclusiones

Se han establecido las condiciones para trabajar con el modelo biológico *Caenorhabditis elegans*. Se realizó un ensayo de quimiotaxis para valorar el efecto que tienen las variantes del péptido beta amiloide sobre la función de memoria asociativa en el nemátodo. El péptido K28A presentó una mejoría sobre la función de memoria asociativa durante el ensayo de quimiotaxis comparado con los demás grupos. Esto último puede verse reflejado en una disminución de la agregación en los nemátodos que fueron tratados con el péptido. Por otro lado, las variantes A30W y M35C no mostraron un efecto en la memoria asociativa del nemátodo. Pese a que se recomienda aumentar el número de ensayos para corroborar estos hallazgos, podemos decir como conclusiones preliminares que la variante peptídica K28A presentó una mejoría en la adaptación olfatoria de *C. elegans*, reflejada en el índice de quimiotaxis. Por otro lado, se ha logrado visualizar la internalización de los péptidos dentro del nemátodo, esto es indispensable para comprobar el efecto de estos en la función neuronal y muscular, así como para establecer una correlación entre el grado de agregación del péptido beta amiloide y el fenotipo de cada cepa. Lograr esto es muy relevante debido a que se favorece el empleo de ensayos de fluorescencia en futuros experimentos.

Capítulo VIII.

Perspectivas

Algunas de las perspectivas del presente trabajo son:

- 1) Aumentar el número de repeticiones del ensayo de quimiotaxis y fluorescencia.
- 2) Emplear distintas cepas del nematodo con otros fenotipos. Esto permitirá diversificar el modelo y poder estudiar una mayor cantidad de variables.
- 3) Comparar el ensayo de quimiotaxis utilizado con otros reportados por demás autores. En este trabajo empleamos un método de quimiotaxis, sin embargo, es importante comparar los resultados obtenidos con otros métodos.
- 4) Evaluar el peso molecular de los agregados presentes en *C. elegans* en respuesta al tratamiento con las variantes peptídicas. De esta manera podemos hacer una asociación entre la función neuronal preservada y la cantidad de péptido agregado.
- 5) Comparar resultados de los ensayos de memoria en *C. elegans* con ensayos en un modelo murino.

Bibliografía

1. Prince, M., Guerchet, M. & Prina, M. Policy brief for heads of government: the global impact of dementia, 2013–2050 (2013).
2. Zhang, Y., Thompson, R., Zhang, H., & Xu, H. (2011). APP processing in Alzheimer's disease. *Molecular Brain*, 4(1), 3.
3. Inouye, K.; Pedrazzani, E.S.; Pavarini, S.C.I. [Alzheimer's disease influence on the perception of quality of life from the elderly people]. *Rev. Esc. Enferm. USP*, 2010, 44(4), 1093-1099.
4. Feigin, V. L., Nichols, E., Alam, T., Bannick, M. S., Beghi, E., Blake, N., Ellenbogen, R. G. (2019). Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology*.
5. Mendez M. F. (2012). Early-onset Alzheimer's disease: nonamnestic subtypes and type 2 AD. *Archives of medical research*, 43(8), 677–685.
6. Moustafa, A. A., Hassan, M., Hewedi, D. H., Hewedi, I., Garami, J. K., Al Ashwal, H., Hornberger, M. (2017). Genetic underpinnings in Alzheimer's disease – a review. *Reviews in the Neurosciences*, 29(1).
7. Selkoe DJ: The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol* 1998, 8:447-445
8. Zlokovic BV. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nature Reviews Neuroscience*. 2011;12(12):723–738.
9. Yamazaki T, Koo EH, Selkoe DJ: Cell surface amyloid beta-protein precursor colocalizes with beta 1 integrins at substrate contact sites in neural cells. *J Neurosci* 1997, 17:1004-1010
10. Soba P, Eggert S, Wagner K, Zentgraf H, Siehl K, Kreger S, Lower A, Langer A, Merdes G, Paro R, et al: Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion. *Embo J* 2005, 24:3624-3634.
11. Greenfield JP, Tsai J, Gouras GK, Hai B, Thinakaran G, Checler F, Sisodia SS, Greengard P, Xu H: Endoplasmic reticulum and trans-Golgi network generate distinct populations of Alzheimer beta-amyloid peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 96:742-747

12. Sisodia SS: Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane bound protease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, 89:6075-6079
13. Furukawa K, Sopher BL, Rydel RE, Begley JG, Pham DG, Martin GM, Fox M, Mattson MP: Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of alpha-secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain. *J Neurochem* 1996, 67:1882-1896
14. Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Eplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, et al: Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 1999, 286:735-741.
15. Yan R, Bienkowski MJ, Shuck ME, Miao H, Tory MC, Pauley AM, Brashier JR, Stratman NC, Mathews WR, Buhl AE, et al: Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature* 1999, 402:533-537.
16. Luo Y, Bolon B, Kahn S, Bennett BD, Babu-Khan S, Denis P, Fan W, Kha H, Zhang J, Gong Y, et al: Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's betasecretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. *Nat Neurosci* 2001, 4:231-232
17. Dostal, V., and Link, C. D. (2010) Assaying β -amyloid toxicity using a transgenic *C. elegans* model. *J. Vis. Exp.* e2252.
18. Martinez, B. A., Caldwell, K. A., and Caldwell, G. A. (2017) *C. elegans* as a model system to accelerate discovery for Parkinson disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 44, 102–109.
19. Dexter, P. M., Caldwell, K. A., and Caldwell, G. A. (2012) A predictable worm: application of *Caenorhabditis elegans* for mechanistic investigation of movement disorders. *Neurotherapeutics* 9, 393–404.
20. The $a\beta$ oligomer hypothesis for synapse failure and memory loss in Alzheimer's disease ST FerreiraWL Klein (2011) *Neurobiology of Learning and Memory* 96:529–543.
21. Lim, C. H., Kaur, P., Teo, E., Lam, V., Zhu, F., Kibat, C., Gruber, J., Mathuru, A. S., & Tolwinski, N. S. (2020). Application of optogenetic Amyloid- β distinguishes between metabolic and physical damages in neurodegeneration. *eLife*, 9, e52589.

22. Fay, D. S., Fluet, A., Johnson, C. J., and Link, C. D. (1998) In vivo aggregation of betaamyloid peptide variants. *J. Neurochem.* 71, 1616–1625.
23. Diomede, L., Romeo, M., Cagnotto, A., Rossi, A., Beeg, M., Stravalaci, M., Tagliavini, F., Di Fede, G., Gobbi, M., and Salmona, M. (2016) The new β amyloid-derived peptide A β 1–6A2VTAT(D) prevents A β oligomer formation and protects transgenic *C. elegans* from A β toxicity.
24. Chasseigneaux, S., & Allinquant, B. (2011). Functions of A β , sAPP α and sAPP β : similarities and differences. *Journal of Neurochemistry*, 120, 99–108.
25. Thinakaran G, Koo EH. 2008 Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J. Biol. Chem.* 283:29615–19
26. McLane, R. D., Schmitt, L. M., Pedapati, E. V., Shaffer, R. C., Dominick, K. C., Horn, P. S., ... Erickson, C. A. (2019). Peripheral Amyloid Precursor Protein Derivative Expression in Fragile X Syndrome. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, 13. doi:10.3389/fnint.2019.00049
27. Zhu, L.; Zhong, M.; Elder, G.A.; Sano, M.; Holtzman, D.M.; Gandy, S.; Cardozo, C.; Haroutunian, V.; Robakis, N.K.; Cai, D. Phospholipid dysregulation contributes to ApoE4-associated cognitive deficits in Alzheimer's disease pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2015, 112(38), 11965-11970.
28. Swerdlow RH (2018) Mitochondria and mitochondrial cascades in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 62:1403–1416
29. Calkins MJ, Manczak M, Mao P, Shirendeb U, Reddy PH (2011) Impaired mitochondrial biogenesis, defective axonal transport of mitochondria, abnormal mitochondrial dynamics and synaptic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 20:4515–4529
30. Yao J, Irwin RW, Zhao L, Nilsen J, Hamilton RT, Brinton RD (2009) Mitochondrial bioenergetic deficit precedes Alzheimer's pathology in female mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:14670–14675.
31. Tobore TO (2019) On the central role of mitochondria dysfunction and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurol Sci* 40:1527–1540.
32. Amyloid precursor protein increases cortical neuron size in transgenic mice. Oh ES, Savonenko AV, King JF, Fangmark Tucker SM, Rudow GL, Xu G, Borchelt DR, Troncoso JC *Neurobiol Aging*. 2009 Aug; 30(8):1238-44.

33. Nikolaev A, McLaughlin T, O'Leary DD, Tessier-Lavigne M. APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature*. 2009;457:981–89.
34. Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, Brett FM, Farrell MA, Rowan MJ, Lemere CA, et al: Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med*. 2008, 14: 837-842.
35. Alexander AG, Marfil V and Li C (2014) Use of *Caenorhabditis elegans* as a model to study Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *Front. Genet*. 5:279
36. Margie, O., Palmer, C., & Chin-Sang, I. (2013). *C. elegans* chemotaxis assay. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (74).
37. Kim J., Basak, J. M., & Holtzman, D. M. (2009). The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron*, 63(3), 287–303.
38. c, Lambert, J.-C., Bertram, L., Cruets, M., Amouyel, P., & Van Broeckhoven, C. (2010). The pursuit of susceptibility genes for Alzheimer's disease: progress and prospects. *Trends in Genetics*, 26(2), 84–93. doi:10.1016/j.tig.2009.12.004
39. Yamazaki, Y., Zhao, N., Caulfield, T. R., Liu, C.-C., & Bu, G. (2019). Apolipoprotein E and Alzheimer disease: pathobiology and targeting strategies. *Nature Reviews Neurology*. doi:10.1038/s41582-019-0228-7
40. Harold D, Abraham R, Hollingworth P, Sims R, Gerrish A, Hamshere ML, Pahwa JS, Moskvina V, Dowzell K, Williams A, et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet*. 2009;41(10):1088–93.
41. Lambert JC, Heath S, Even G, Campion D, Sleegers K, Hiltunen M, Combarros O, Zelenika D, Bullido MJ, Tavernier B, et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet*. 2009;41(10):1094–9.
42. DeMattos RB, Cirrito JR, Parsadanian M, May PC, O'Dell MA, Taylor JW, Harmony JA, Aronow BJ, Bales KR, Paul SM, et al. ApoE and clusterin cooperatively suppress A β levels and deposition: evidence that ApoE regulates extracellular A β metabolism in vivo. *Neuron*. 2004;41(2):193–202.

43. Bertram, L., Lill, C. M., & Tanzi, R. E. (2010). The Genetics of Alzheimer Disease: Back to the Future. *Neuron*, 68(2), 270–281.
44. Liao, F., Yoon, H., & Kim, J. (2017). Apolipoprotein E metabolism and functions in brain and its role in Alzheimer's disease. *Current opinion in lipidology*, 28(1), 60–67.
45. D.A. Butterfield, D. Boyd-Kimball. Redox proteomics and amyloid β -peptide: insights into Alzheimer disease. *J. Neurochem.*, 151 (2019), pp. 459-487
46. C.D. Aluise, R.A. Robinson, T.L. Beckett, M.P. Murphy, J. Cai, W.M. Pierce, W.R. Markesbery, D.A. Butterfield. Preclinical Alzheimer disease: brain oxidative stress, Abeta peptide, and proteomics. *Neurobiol. Dis.*, 39 (2010), pp. 221-228
47. Takahisa Kanekiyo, Chia-Chen Liu, Mitsuru Shinohara, Jie Li and Guojun Bu. LRP1 in Brain Vascular Smooth Muscle Cells Mediates Local Clearance of Alzheimer's Amyloid- β . *Journal of Neuroscience* 14 November 2012, 32 (46) 16458-16465.
48. J.B. Owen, R. Sultana, C.D. Aluise, M.A. Erickson, T.O. Price, G. Bu, W.A. Banks, D.A. Butterfield. Oxidative modification to LDL receptor-related protein 1 in hippocampus from subjects with Alzheimer's disease: implications for A β accumulation in AD brain. *Free Radic. Biol. Med.*, 49 (2010), pp. 1798-1803.
49. Haass, C., Schlossmacher, M. G., Hung, A. Y., Vigo-Pelfrey, C., Mellon, A., Ostaszewski, B. L., ... Selkoe, D. J. (1992). Amyloid β -peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature*, 359(6393), 322–325.
50. Müller UC, Zheng H. Physiological functions of APP family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(2):a006288.
51. Allinquant B, Hantraye P, Mailleux P, Moya K, Bouillot C, Prochiantz A. Downregulation of amyloid precursor protein inhibits neurite outgrowth in vitro. *J Cell Biol.* 1995 Mar; 128(5):919-27.
52. Atherosclerosis, dementia, and Alzheimer disease in the Baltimore Longitudinal Study of Aging cohort. Dolan H, Crain B, Troncoso J, Resnick SM, Zonderman AB, O'Brien RJ *Ann Neurol.* 2010 Aug; 68(2):231-40.
53. Kinoshita, A. (2003). Demonstration by FRET of BACE interaction with the amyloid precursor protein at the cell surface and in early endosomes. *Journal of Cell Science*, 116(16), 3339–3346.

54. Mroczko, B., Groblewska, M., Litman-Zawadzka, A. Amyloid β oligomers (A β O) in Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 125, 177–191 (2018).
55. Xiong, F., Ge, W., & Ma, C. (2019). Quantitative proteomics reveals distinct composition of amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*.
56. Puzzo, D., Privitera, L., & Palmeri, A. (2012). Hormetic effect of amyloid-beta peptide in synaptic plasticity and memory. *Neurobiology of Aging*, 33(7), 1484.e15–1484.e24.
57. Marcus O. W. Grimm, Heike S. Grimm, Andreas J. Pätzold, Eva G. Zinser, Riikka Halonen, Marco Duering, Jakob-A. Tschäpe, Bart De Strooper, Ulrike Müller, Jie Shen & Tobias Hartmann. Regulation of cholesterol and sphingomyelin metabolism by amyloid- β and presenilin. *Nature Cell Biology* volume 7, pages1118–1123(2005).
58. Dosanjh, L. E., Brown, M. K., Rao, G., Link, C. D., & Luo, Y. (2010). Behavioral Phenotyping of a Transgenic *Caenorhabditis Elegans* Expressing Neuronal Amyloid- β . *Journal of Alzheimer's Disease*, 19(2), 681–690.
59. Ye HY, Ye BP, Wang DY (2006) Learning and learning choice in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Neurosci Bull* 22, 355-360.
60. Wu Y, Wu Z, Butko P, Christen Y, Lambert MP, Klein WL, Link CD, Luo Y (2006) Amyloid-beta-induced pathological behaviors are suppressed by Ginkgo biloba extract EGb 761 and ginkgolides in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 26, 13102-13113.
61. Chatterjee, N., & Sinha, S. (2007). Understanding the mind of a worm: hierarchical network structure underlying nervous system function in *C. elegans*. *Models of Brain and Mind - Physical, Computational and Psychological Approaches*, 145–153.
62. Alexander AG, Marfil V and Li C (2014) Use of *Caenorhabditis elegans* as a model to study Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *Front. Genet.* 5:279
63. Levitan, D., and Greenwald, I. (1995). Facilitation of lin-12-mediated signalling by sel-12, a *Caenorhabditis elegans* S182 Alzheimer's disease gene. *Nature* 377, 351–354.
64. Hornsten, A., Lieberthal, J., Fadia, S., Malins, R., Ha, L., Xu, X., et al. (2007). APL-1, a *Caenorhabditis elegans* protein related to the human beta-amyloid

- precursor protein, is essential for viability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 1971–1976.
65. Treusch, S., Hamamichi, S., Goodman, J. L., Matlack, K. E., Chung, C. Y., Baru, V., et al. (2011). Functional links between A β toxicity, endocytic trafficking, and Alzheimer's disease risk factors in yeast. *Science* 334, 1241–1245.
66. Li, Y., Guan, S., Liu, C., Chen, X., Zhu, Y., Xie, Y., Li, M. (2018). Neuroprotective effects of *Coptis chinensis* Franch polysaccharide on amyloid-beta (A β)-induced toxicity in a transgenic *Caenorhabditis elegans* model of Alzheimer's disease (AD). *International Journal of Biological Macromolecules*, 113, 991–995.
67. Porta-de-la-Riva, M., Fontrodona, L., Villanueva, A., & Cerón, J. (2012). Basic *Caenorhabditis elegans* methods: synchronization and observation. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (64), e4019.
68. Estrada-Rodríguez, A. E., Valdez-Pérez, D., Ruiz-García, J., Treviño-Garza, A., Gómez-Martínez, A. M., Martínez-Rodríguez, H. G., Rivas-Estilla, A. M., Vidaltamayo, R., & Zomosa-Signoret, V. (2019). Effects of Single Amino Acid Substitutions on Aggregation and Cytotoxicity Properties of Amyloid β Peptide. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 25(2), 493-509.
69. Matharu B, El-Agnaf O, Razvi A, Austen BM (2010) Development of retro-inverso peptides as anti-aggregation drugs for β -amyloid in Alzheimer's disease. *Peptides* 31:1866–1872.
70. A.R. White, R. Reyes, J.F.B. Mercer, J. Camakaris, H. Zheng, A.I. Bush, G. Multhaup, K. Beyreuther, C.L. Masters, R. Cappai *Brain Res.*, 842 (1999), pp. 439-444.
71. Ito, K., Ahadieh, S., Corrigan, B., French, J., Fullerton, T., & Tensfeldt, T. (2010). Disease progression meta-analysis model in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 6(1), 39–53.
72. G.M. McKhann, D.S. Knopman, H. Chertkow, B.T. Hyman, C.R. Jack, C.H. Kawas, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease *Alzheimer's Dement*, 7 (2011), pp. 263-269

73. Neuropathology of older persons without cognitive impairment from two community-based studies D. A. Bennett, J. A. Schneider, Z. Arvanitakis, J. F. Kelly, N. T. Aggarwal, R. C. Shah, R. S. Wilson *Neurology* Jun 2006, 66 (12) 1837-1844.
74. Delaere P, Duyckaerts C, He Y, Piette F, Hauw JJ. Subtypes and differential laminar distribution of β /A4 deposits in Alzheimer's disease: relationship with the intellectual status of 26 cases. *Acta Neuropathol* 1991; 81: 328-335.
75. Odr-10 encodes a seven transmembrane domain olfactory receptor required for responses to the odorant diacetyl. Sengupta P, Chou JH, Bargmann CI *Cell*. 1996 Mar 22; 84(6):899-909.
76. Tomic, J. L., Pensalfini, A., Head, E. & Glabe, C. G. Soluble fibrillar oligomer levels are elevated in Alzheimer's disease brain and correlate with cognitive dysfunction. *Neurobiology of disease* 35, 352–358 (2009).
77. Esparza, T., Wildburger, N., Jiang, H. et al. Soluble Amyloid-beta Aggregates from Human Alzheimer's Disease Brains. *Sci Rep* 6, 38187 (2016).
78. Michiyo Iba, Jing L. Guo, Jennifer D. McBride, Bin Zhang, John Q. Trojanowski and Virginia M.-Y. Lee. Synthetic Tau Fibrils Mediate Transmission of Neurofibrillary Tangles in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's-Like Tauopathy. *Journal of Neuroscience* 16 January 2013, 33 (3) 1024-1037.
79. Michael A. DeTure & Dennis W. Dickson. The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration* volume 14, Article number: 32 (2019).
80. Amyloid precursor protein expression and processing are differentially regulated during cortical neuron differentiation Petra Bergström, Lotta Agholme, Faisal Hayat Nazir, Tugce Munise Satir, Jamie Toombs, Henrietta Wellington, Joakim Strandberg, Thomas Olsson Bontell, Hlin Kvartsberg, Maria Holmström, Cecilia Boreström, Stina Simonsson, Tilo Kunath, Anders Lindahl, Kaj Blennow, Eric Hanse, Erik Portelius, Selina Wray & Henrik Zetterberg *Scientific Reports* volume 6, Article number: 29200 (2016).

