

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ANÁLISIS DE LA DISPERSIÓN Y EFECTO DEL
PÉPTIDO MUTANTE A30W Y A β SOBRE
UN MODELO IN VIVO DE *C. ELEGANS*

Por

MIZABEL IZAGUIRRE RODRÍGUEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS CON
ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA

2024

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ANÁLISIS DE LA DISPERSIÓN Y EFECTO DEL
PÉPTIDO MUTANTE A30W Y A β SOBRE
UN MODELO IN VIVO DE *C. ELEGANS*

Por

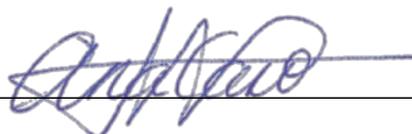
MIZABEL IZAGUIRRE RODRÍGUEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS CON
ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA

2024

ANÁLISIS DE LA DISPERSIÓN Y EFECTO DEL PÉPTIDO MUTANTE A30W Y A β
SOBRE UN MODELO *IN VIVO* DE *C. ELEGANS*

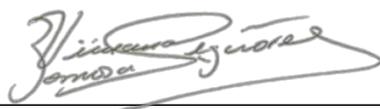
Comité de Tesis



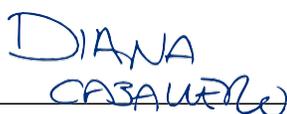
Dra. Ana Carolina Martínez Torres
Director de Tesis



Dra. María Cristina Rodríguez Padilla
Secretario



Dra. Viviana Chantal Zomosa Signoret
Vocal 1



Dra. Diana Elia Caballero Hernández
Vocal 2



Dra. Diana Reséndez Pérez
Vocal 3



Dra. Katiushka Arévalo Niño
Subdirectora de Posgrado



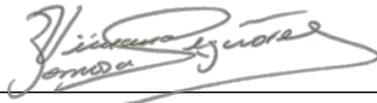
SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO

ANÁLISIS DE LA DISPERSIÓN Y EFECTO DEL PÉPTIDOMUTANTE A30W Y A β SOBRE
UN MODELO *IN VIVO* DE *C. ELEGANS*

Dirección de Tesis



Dra. Ana Carolina Martínez Torres
Director de Tesis



Dra. Viviana Chantal Zomosa Signoret
Director Externo

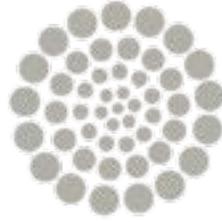
AVISO DERECHOS DE AUTOR

Derechos reservados ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material en esta tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) en colaboración con el Laboratorio de Ciencias Básicas de la Universidad de Monterrey.



CONAHCYT

CONSEJO NACIONAL DE HUMANIDADES
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS



Agradezco a la Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías, al Laboratorio de Inmunología y Virología de la Universidad Autónoma de Nuevo León y al Laboratorio de Ciencias Básicas de la Universidad de Monterrey por brindarme el apoyo económico y la infraestructura para realizar este proyecto.

AGRADECIMIENTOS

Principalmente a Dios, por ser mi guía y soporte en mi estancia en el laboratorio, por nunca dejarme y mostrarme su amor incondicional en cada tiempo, por ser mi luz en mis momentos de oscuridad y ayudarme a dar la milla extra.

A mi comité de tesis, por la disposición a resolver cualquier duda o inquietud, por asistir a mis presentaciones y retroalimentarme, y por toda la ayuda técnica proporcionada durante la maestría

A la Dra. Ana Carolina, gracias por brindarme la oportunidad de ser parte de su equipo de investigación. Gracias por su guía y sus consejos.

A la Dra. Viviana, gracias por su tiempo y paciencia en escucharme, y por permitirme ser parte de su laboratorio y desarrollarme en el área de Biología Molecular.

Al Dr. Román, gracias por la ayuda técnica, por los ánimos y por siempre estar dispuesto a escuchar cualquier duda o inquietud.

A Bere, por llegar de forma tan sencilla e inesperada y convertirme en un apoyo incondicional. Gracias por todo tu amor, por creer en mí y recordarme de lo que soy capaz aún en los momentos en los que yo no lo hacía. Gracias por caminar conmigo en este tiempo y compartir conmigo las altas y bajas.

A Ana, gracias por brindarme tu amistad y tomarme en cuenta aún a la distancia, por estar dispuesta a apoyarme con mis seminarios y por siempre aventarme a aprender cosas nuevas,

trabajar contigo ha sido un placer e hizo más amena mi estancia en el laboratorio.

A Diana, gracias por tu paciencia y por enseñarme a trabajar en el área de biología molecular. Por escuchar mis seminarios, responder mis dudas, y animarme a nunca darme por vencido.

A Tony y Arley, gracias por las salidas, las comidas, por escucharme en los momentos de dificultad y hacer todo más sencillo, sin ustedes no habría sido igual.

A Moisés, por las comidas, las pláticas y los consejos, por los días hasta tarde en el laboratorio, y por siempre recordarme que tarde o temprano, todo sale. Gracias por impulsarme a nunca conformarme con lo que sé, y apoyarme a mantener la paciencia y la cordura en los momentos de presión.

A Fati, gracias por la ayuda técnica, por siempre prestarme material y brindarme un lugar para esterilizar sin importar el día, sin duda fuiste un apoyo muy importante para que esto fuera posible.

A todos los integrantes del L-14, por siempre estar dispuestos a resolver dudas, a escuchar mis presentaciones y por corregirme y ayudar en diferentes aspectos a mi crecimiento profesional.

A mis compañeros de maestría y amigos, Roberto, Caro y Ada, por las risas y los momentos juntos, por las comidas en días de seminario, y por siempre estar dispuestos a retroalimentarme. Gracias por apoyarme tanto desde el inicio hasta el fin de la

maestría y haber hecho este tiempo más agradable.

Finalmente, a mi mayor motor, mi familia. A mi mamá, Leticia Rodríguez, por tu apoyo en todo este tiempo y por apoyarme a nunca bajar los brazos sin importar las adversidades. A mi papá, Mizael Izaguirre, gracias por enseñarme que con disciplina y constancia se puede lograr cualquier cosa. A mi hermana, gracias por compartir mis logros y emocionarte juntamente conmigo en todo.

A cada uno de ustedes, lo escrito aquí no representa la gratitud que les tengo, por poner su granito de arena para que todo fuera posible, y por permitirme disfrutar el proceso, gracias totales.

*La poca ciencia aleja de Dios, mientras que la mucha ciencia
devuelve a Él*

Louis Pasteur

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	5
2.1 Enfermedades neurodegenerativas	5
2.2 Alzheimer	6
2.3 Hipótesis de la cascada amiloide	7
2.4 Producción del péptido Aβ	8
2.5 Agregación del péptido beta-amiloide (Aβ)	10
2.6 Neurotoxicidad de la agregación Aβ	12
2.7 Tratamientos inhibidores de la agregación Aβ	13
2.7.2 Análogos farmacológicos	13
2.7.3 Extractos naturales	14
2.8 Péptidos mutantes del péptido beta-amiloide	14
2.9 Caenorhabditis elegans	15
2.10 Co expresión de péptidos mutantes y WT marcados con proteína fluorescente en Escherichia coli	17
3. JUSTIFICACIÓN	20
4. HIPÓTESIS	21
5. OBJETIVOS	22
5.1 OBJETIVO GENERAL	22
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
6. MATERIALES Y MÉTODOS	23
6.1 Cepas	23
6.2 Mantenimiento de los nemátodos	23
6.3 Diseño de construcciones	24
6.4 Mini-preps por lisis alcalina	25
6.5 Monitoreo de la dispersión de los péptidos en tiempo real	26
6.6 Análisis de viabilidad	27
6.7 Análisis de movilidad	27
6.8 Análisis estadístico	27

7. RESULTADOS.....	28
7.1 El péptido Aβ y su mutante A30W son capaces de expresarse en Escherichia coli	28
7.2 Monitoreo de la dispersión amiloide.....	32
7.3 El péptido A30W mejora la viabilidad de C. Elegans	33
7.4 El péptido A30W mejora la movilidad de C. Elegans.....	35
8. DISCUSIÓN	40
9. CONCLUSIONES.....	43
10. PERSPECTIVAS.....	44
11. BIBLIOGRAFÍA.....	45
12. RESUMEN BIOGRÁFICO	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Número de casos de discapacidad por enfermedades neurodegenerativas

a nivel mundial en 2016.....	6
Figura 2. Índice de mortalidad por enfermedades neurodegenerativas a nivel mundial en 2016.....	7
Figura 3. Procesamiento proteolítico de la proteína precursora amiloide y la biogénesis de A β	10
Figura 4. Etapas de la agregación del péptido A β	12
Figura 5. Monómeros en nucleación secundaria.....	12
Figura 6. Cassete base para la expresión de los péptidos en <i>E.coli</i> BL21 DE3.....	25
Figura 7. Esquema de ADN circular del péptido A β WT y su mutante A30W.....	30
Figura 8. Caracterización del péptido A β WT y su mutante A30W.....	31
Figura 9. Expresión del péptido A β WT en <i>E.coli</i> BL21 DE3.....	32
Figura 10. Expresión del péptido A30W en <i>E.coli</i> BL21 DE3.....	33
Figura 11. Dispersión del péptido WT en <i>C. elegans</i>	34
Figura 12. Efecto del péptido A β WT y su mutante A30W sobre la viabilidad de <i>C. elegans</i>	35
Figura 13. Efecto del péptido A β WT y su mutante A30W sobre la movilidad de <i>C. elegans</i> Con 24 horas de tratamiento.....	37
Figura 14. Efecto del péptido A β WT y su mutante A30W sobre la movilidad de <i>C. elegans</i> con 5 días de tratamiento.....	38
Figura 15. Efecto del péptido A β WT y su mutante A30W sobre la movilidad de <i>C. elegans</i> tratados en estadios larvarios	39

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Alanina 30 por triptófano	A30W
Ampicilina	AMP
Anticuerpos monoclonales	mAb
Apolipoproteína E	ApoE
Alzheimer de inicio tardío	EOAD
Alzheimer de inicio temprano	LOAD
Barrera hematoencefálica	BBB
Beta-amiloide	A β
Beta secretasa 1	BACE 1
Calcio	Ca ⁺²
Cloranfenicol	CM
4'6-diamidino-2-fenilindol	DAPI
Dominio intracelular de APP	AICD
Enfermedad de Alzheimer	AD
Especies reactivas de oxígeno	ROS
Faringe anterior defectuosa 1	APH1
Fragmento C terminal alfa	CTF α
Fragmento C terminal 99	C99
Fragmentos solubles de proteína precursora amiloide alfa	sAPP α
Gravedades por minuto	rfc
Hertz	Hz
Isopropil- β -D-1-Tiogalactopiranosido	IPTG
Kilodaltones	kDa
Líquido cefalorraquídeo	CRL
Luria Bertani	LB
Medio de crecimiento de nemátodos	NGM
Nicastrina	NCSTN
Pares de bases	Pb
Presenilina 1	PSEN1

Presenlina 2	PSEN2
Proteína precursora amiloide	APP
Proteínas priónicas	PrP
Proteína del shock térmico 16	Hsp-16
Proteína del shock térmico 70	Hsp-70
Proteína verde fluorescente	GFP
Retículo endoplásmico	ER
Tioflavina S	ThS
Wildtype	WT
Wormtrack	Wrmtrack

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (AD) es el tipo más común de demencia, y es la segunda causa de muerte por enfermedades neurodegenerativas a nivel mundial. Los tratamientos actuales se enfocan en la inhibición de proteínas específicas claves en la agregación amiloide. Sin embargo, no se ha descrito ningún tratamiento que tenga un efecto notable sobre la reversión del daño neurológico inducido por la agregación del péptido. Se ha descrito que cambios en la secuencia primaria del péptido beta-amiloide (A β) pueden interferir en sus propiedades de agregación. En este sentido, el péptido A30W es un mutante del péptido A β , que en estudios *in vitro* ha demostrado mediar la desorganización de la estructura A β y prevenir su agregación *de novo*; mientras que en un modelo *in vivo* de *C. elegans* se demostró que no afectó significativamente la viabilidad de los nemátodos. Además, indujo un retraso significativo en el fenotipo de parálisis progresiva y mejoró la memoria asociativa. Por otro lado, se ha descrito que la expresión de otros péptidos mutantes y WT en *Escherichia coli* y su marcaje con una proteína fluorescente permiten evaluar su efecto sobre la agregación amiloide *in vivo* de una manera no invasiva. Con base en lo anterior, el objetivo de esta tesis fue evaluar en tiempo real la dispersión de los péptidos A30W y A β WT expresados en *E.coli* así como en fenotipos asociados a la toxicidad en un modelo *in vivo* de *C. elegans*. Para ello, se evaluó la agregación amiloide en tiempo real inducida por los péptidos WT y A30W mediante microscopía de fluorescencia y su efecto sobre la viabilidad de *C. elegans* mediante su observación al estereoscopio. Además, se analizó el nivel de movilidad mediante el conteo de movimientos laterales (trashing). Esta investigación permitió determinar que la expresión de péptidos en *E.coli* es una estrategia prometedora para evaluar su efecto sobre un modelo *in vivo* para Alzheimer como *C. elegans*.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is the main type of dementia and the second leading cause of death from neurodegenerative diseases worldwide. Current treatments focus on the inhibition of key proteins in amyloid aggregation. Nevertheless, no treatment capable of reversing the neurological damage induced by beta-amyloid's aggregation has been described. It has been reported that changes in the primary sequence of beta-amyloid (A β) peptide may interfere with its aggregation properties. The peptide A30W is a mutant of the A β peptide that can induce A β disorganization and to prevent its *de novo* aggregation *in vitro*. Additionally, treatment of *C. elegans* as an *in vivo* model showed that A30W did not affect their viability, and that could induce a delay in a progressive paralysis phenotype and improve associative memory. On the other hand, it has been described that the expression of A β peptides with a fluorescent protein in *Escherichia coli* allows the assessment of its effect on amyloid aggregation *in vivo* in a non-invasive manner. Based on the above, the objective of this thesis was to evaluate in real time the dispersion of peptides A30W and WT expressed in *E. coli* and its effect over amyloid aggregation as well as amyloid-associated toxicity phenotypes in a *C. elegans* model. To this end, the real-time amyloid aggregation induced by WT and A30W peptides was evaluated by fluorescence microscopy and its effect on *C. elegans* viability. In addition, motility was analyzed by trashing count. This research allowed us to determine that *E. coli* peptides' expression is a promising strategy to assess the effect of therapeutic molecules in an Alzheimer *in vivo* model as *C. elegans*.

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (AD) es el tipo más común de demencia, y es la segunda causa de muerte por enfermedades neurodegenerativas a nivel mundial, afectando principalmente a los adultos mayores (Feigin *et al.* 2016). Existen diferentes tratamientos para la AD, destacando principalmente los anticuerpos monoclonales y los inhibidores de la agregación amiloide, los cuales se dirigen a blancos específicos claves en la agregación beta-amiloide (A β) (Shi *et al.* 2022; Novick *et al.* 2012)

Sin embargo, a pesar de los avances tanto en etapas clínicas como preclínicas, a la fecha no se ha descrito ningún tratamiento que tenga un efecto notable sobre la reversión del daño neurológico inducido por la agregación del péptido. Sin embargo, se ha descrito que cambios en la secuencia primaria del péptido A β pueden interferir en sus propiedades de agregación (Estrada *et al.* 2018). Por lo tanto, se ha propuesto la inhibición de la agregación A β como un blanco terapéutico para el tratamiento de esta enfermedad, generando péptidos mutantes a partir de la secuencia del péptido A β .

En este sentido, el péptido A30W es un mutante del péptido A β que en estudios *in vitro*, ha demostrado mediar la desorganización de la estructura A β y prevenir la agregación *de novo* del péptido A β ₁₋₄₂ WT. Además, disminuyó significativamente su citotoxicidad gracias a la disminución en la producción de ROS (Estrada Rodríguez *et al.* 2018).

Por lo que investigaciones posteriores en nuestro grupo de investigación se plantearon evaluar su efecto en un modelo *in vivo*, y se propuso el uso del nemátodo *Caenorhabditis elegans*. Los resultados mostraron que A30W no afectó significativamente la viabilidad de los nemátodos; además de mejorar significativamente su movilidad al administrar tratamientos en estadios larvarios. Estos resultados en conjunto demuestran el potencial del péptido A30W para mejorar fenotipos asociados a la toxicidad amiloide (Quijano-Guerrero 2021).

Sin embargo, se desconoce de qué manera los péptidos mutantes como el WT migran hacia el intestino y/o a otros órganos, así como su efecto en un modelo *in vivo* de Alzheimer como *C. elegans*. Por ello, se propuso la expresión de los péptidos mutantes y del WT en *Escherichia coli* marcados con una proteína fluorescente y, su posterior exposición a *C. elegans*. Investigaciones previas demostraron que el marcaje con la proteína fluorescente mScarlet ofrece la posibilidad de analizar la agregación amiloide *in vivo* en una manera no invasiva en tiempo real (Gallrein *et al.* 2021). A su vez, se ha descrito que la expresión de los péptidos mutantes en *E. coli* y su posterior exposición a *C. elegans* permiten evaluar su efecto sobre la agregación *in vivo*, así como su dispersión (Julien *et al.* 2018). Lo anterior demuestra que la expresión de péptidos mutantes y WT marcados con una proteína fluorescente en *E. coli* permite evaluar la agregación amiloide y su invasión hacia otros tejidos en tiempo real *in vivo*, así como su efecto en fenotipos asociados a la toxicidad amiloide.

Por lo que esta investigación buscó evaluar en tiempo real la dispersión de los péptidos y A β WT y su efecto sobre fenotipos asociados a toxicidad en un modelo *in vivo* de *C. elegans*, con la finalidad de dilucidar de qué manera los péptidos mutantes y WT migran hacia intestino y/u otros órganos, así como su efecto sobre *C. elegans* utilizando la expresión de los péptidos en *E.coli* como modelo de tratamiento.

2. ANTECEDENTES

2.1 Enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades o trastornos neurodegenerativos se definen como un conjunto de enfermedades en el que las células del sistema nervioso pierden su funcionamiento en una manera dependiente de la edad, y eventualmente mueren. Actualmente, es la segunda causa de muerte por enfermedades neurodegenerativas a nivel mundial (Figura 2) y de las principales causas de discapacidad (NIH 2022; Feigin *et al.* 2016). Los principales tipos de enfermedades neurodegenerativas son:

1. Derrame cerebral o accidente cerebrovascular
2. Migraña
3. Enfermedad de Alzheimer (AD)
4. Meningitis
5. Traumatismo craneoencefálico (Figura 1) (Feigin *et al.* 2016)

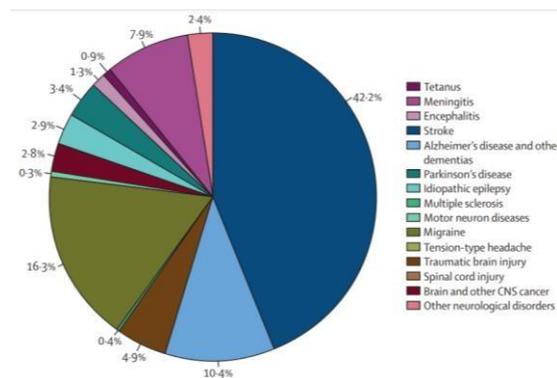


Figura 1. Número estimado de casos de discapacidad por enfermedades neurodegenerativas a nivel mundial en 2016, donde se muestra que la enfermedad de Alzheimer representa el 10.4% (Feigin *et al.* 2016)

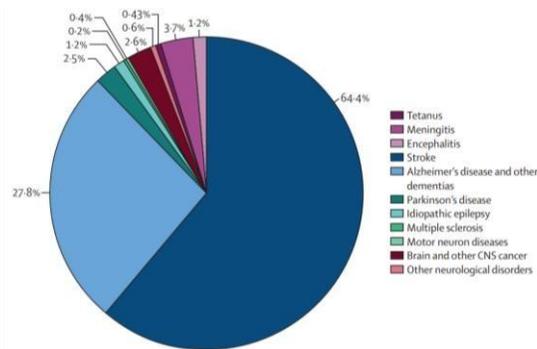


Figura 2. Índice de mortalidad por enfermedades neurodegenerativas a nivel mundial en 2016 (Tomado de Feigin *et al.* 2016)

2.2 Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (AD) es una enfermedad neurodegenerativa crónica e irreversible que constituye aproximadamente el 80% de los casos de demencia, siendo así la principal enfermedad de este tipo, y afecta principalmente a la población mayor de 65 años. Fue descubierta en 1906 por Alois Alzheimer, quien notó cambios en el tejido cerebral de una mujer que había muerto de una enfermedad desconocida hasta el momento. La mujer presentaba pérdida de memoria, problemas de lenguaje y comportamiento impredecible. En su análisis *post mortem*, fueron encontrados cúmulos anormales, actualmente conocidos como placas amiloides; así como haces de fibras enredadas, conocidas como neurofibrillas (NIA 2022).

Lo anterior deriva en el deterioro progresivo de la función cognitiva, que puede traducirse en una reducción significativa del volumen cerebral en pacientes con AD a comparación de los pacientes sanos. Esto debido a que la AD se caracteriza por 2 sellos distintivos: los depósitos extracelulares compuestos del péptido A β y las fibrillas intracelulares de la proteína Tau hiperfosforilada (Novick *et al.* 2012). Lo anterior resulta en la degeneración sináptica y la muerte neuronal, particularmente en células del hipocampo, región encargada de la memoria y orientación espacial, derivando en el trastorno de memoria y habilidades sociales, reflejándose en la dificultad o imposibilidad de realizar actividades cotidianas (Cheignon *et al.* 2018; OMS 2022; Álvarez *et al.* 2022).

Además, un factor determinante en los pacientes con AD es la edad, alcanzando un 50% de probabilidad de desarrollar esta enfermedad en pacientes mayores a 85 años, siendo las mujeres más susceptibles para padecerla dada su mayor esperanza de vida (Cheignon *et al.*

2018). A la fecha no ha sido posible dilucidar la etiología de la AD, por lo que se han propuesto distintas hipótesis que buscan dilucidar el mecanismo de esta enfermedad:

- **Hipótesis colinérgica:** la cual postula que una disfunción en las neuronas colinérgicas contribuye sustancialmente al deterioro cognitivo en pacientes con AD de edad avanzada (Terry y Buccafusco 2003)
- **Hipótesis de Tau:** Tau es una proteína asociada a microtúbulos que se encuentra en gran cantidad en axones. Esta hipótesis postula que, en condiciones patológicas, la agregación de Tau induce citotoxicidad en axones, causando neurodegeneración.
- **Hipótesis de hipometabolismo de glucosa:** Es un evento temprano en la patogénesis de AD y asociado con deterioro cognitivo. Se ha descrito que el hipometabolismo causado por una disminución en la captación de glucosa es observado en el cerebro de pacientes con AD. Por lo que se ha destacado este fenómeno, así como el déficit energético como sellos distintivos del AD (Du *et al.* 2018; Szablewski 2021).

A pesar de las distintas hipótesis actualmente descritas, la hipótesis de la cascada amiloide se ha mantenido como la hipótesis principal para explicar el mecanismo de la AD.

2.3 Hipótesis de la cascada amiloide

La hipótesis de la cascada amiloide, propuesta en 1992, postula que la neurodegeneración en la AD es causada por la acumulación anormal de placas A β en el cerebro, lo cual deriva en una serie de eventos patológicos que incluyen daño neuronal y formación de neurofibrillas, dando lugar a la disfunción neuronal y muerte celular en la AD (Hardy y Higgins 1992; Barage y Sonawane 2015).

Las evidencias principales que llevaron a la proposición de esta hipótesis se derivan de las mutaciones dadas en las distintas etapas del Alzheimer:

- **Alzheimer de inicio temprano (EOAD):** El Alzheimer de inicio temprano normalmente se desarrolla antes de los 60 años, y está caracterizado por mutaciones autosómicas dominantes en determinados genes, destacándose principalmente aquellos que codifican para la proteína precursora amiloide (APP), presenilina 1

(PSEN 1) y presenilina 2 (PSEN 2). Ambas son subunidades de la enzima γ secretasa, por lo que se han asociado a un incremento en la producción de $A\beta$, dando lugar a la formación de placas seniles, derivando en el desarrollo de la AD. En estos casos, normalmente se habla de mutaciones hereditarias, que constituyen menos del 2% de los casos (Álvarez *et al.* 2022; Xiao *et al.* 2021).

- **Alzheimer de inicio tardío (LOAD):** Los casos de Alzheimer de inicio tardío son asociados con menos variantes genéticas. La principal variante es el alelo $\epsilon 4$ de la apolipoproteína E (APOE), que incrementa de 5 a 20 veces el riesgo de padecer esta enfermedad, dado que este alelo promueve la oligomerización y formación de fibrillas, influyendo en la progresión del AD (Wisniewski y Drummond 2020; Álvarez *et al.* 2022).

A su vez, se ha descrito que la deposición de $A\beta$ y la formación de placas amiloides derivan en la activación de la microglía y astrocitos, liberación de citocinas, así como una respuesta inflamatoria (Barage y Sonawane 2015).

Bajo esta perspectiva, y dada la importancia del péptido amiloide como evento clave en la patología del Alzheimer, investigaciones posteriores a la hipótesis de la cascada amiloide se propusieron dilucidar su mecanismo de producción.

2.4 Producción del péptido $A\beta$

El péptido $A\beta$ es un fragmento de 4.3 kDa proveniente de la proteína precursora amiloide (APP), que, a su vez, es cortada por las enzimas β y γ secretasa. Este proceso genera variantes de diferente tamaño siendo los más prevalentes los fragmentos de 40 ($A\beta_{1-40}$) y 42 ($A\beta_{1-42}$) residuos de aminoácidos (Kumar *et al.* 2016; Gu y Guo 2013).

El procesamiento de APP ocurre principalmente mediante 2 vías distintas:

2.4.1 Vía no amiloidogénica: Al reconocer la proteína APP en el dominio $A\beta$, la enzima α -secretasa lleva a cabo un corte que resulta en la formación de los fragmentos solubles $sAPP\alpha$ y $CTF\alpha$, también denominado C83. C83 posteriormente la γ -secretasa cliva los fragmentos $p3$ y el dominio intracelular de APP AICD. Este complejo multiproteico, que incluye las presenilinas 1 y 2 (PSEN1 y PSEN2), la nicastrina y APH-1, es necesario para la proteólisis de varias proteínas transmembranales. (Kojro y Fahrenholz 2005; Sun *et al.* 2015). Finalmente, la enzima γ -secretasa divide C83, lo que resulta en la formación de los

fragmentos solubles P3 y AICD, como se muestra en la Figura 3 (Sun et al., 2015). Esta ruta no conduce a la producción del péptido A β , lo que ha sido relacionado con efectos protectores asociados al fragmento sAPP α . Por otro lado, el fragmento AICD es transportado al núcleo celular donde desempeña funciones regulatorias (Chow et al., 2010).

2.4.2 Vía amiloidogénica: el proceso de inicio del péptido A β , donde la APP es escindida por la enzima β secretasa, produciendo los fragmentos solubles β APP (sAPP β) y el fragmento C terminal (C99 ó CTF β). A su vez, el fragmento C terminal es nuevamente escindido por la enzima γ -secretasa, generando un dominio intracelular APP (AICD) y se generan los oligómeros de tamaño variable correspondientes al péptido beta-amiloide (Sun et al. 2015).

No obstante, posterior a la producción de A β , se ha destacado la agregación de éste como evento clave en la patología del AD. Por lo que, con la finalidad de descubrir distintas alternativas terapéuticas que puedan retrasar o inhibir su progresión, se ha estudiado su mecanismo de agregación, así como distintos factores involucrados en este proceso.

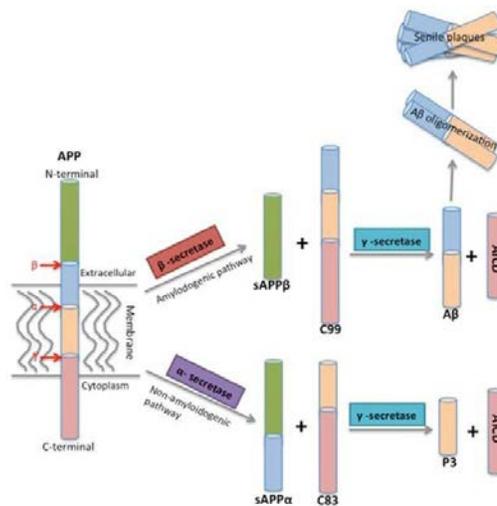


Figura 3. Procesamiento proteolítico de la proteína precursora amiloide (APP) y la biogénesis de A β (Tomado de Sun et al. 2015)

2.5 Agregación del péptido beta-amiloide (A β)

El péptido A β se agrupa formando estructuras insolubles conformadas por láminas β a través de un proceso de auto agregación. Se ha sugerido que este proceso consta de tres etapas principales: una nucleación primaria, donde se forman dímeros y oligómeros solubles; seguida de un proceso de elongación, donde la adición de monómeros conduce al crecimiento de estructuras fibrilares (Figura 4); y finalmente, una nucleación secundaria (Figuras 4 y 5) (Linse *et al.* 2019)

En la etapa de nucleación primaria se encuentran solamente monómeros involucrados, y puede darse en una sustancia en solución (Figura 4a) o en alguna superficie (Figura 4b).

Por otro lado, la nucleación secundaria es un proceso mediante el cual la formación de núcleos a partir de monómeros es catalizada por agregados compuestos por el mismo tipo de bloques monoméricos (Figura 4c), es decir, los monómeros forman un núcleo en la superficie de agregados existentes. A su vez, existen distintos mecanismos posibles para este proceso, lo anterior se puede ver representado en la figura 5, donde los colores verde y azul simbolizan su conformación en estado libre y estado agregado.

Por otro lado, se ha descrito que acelera la producción de agregados con la misma estructura que el agregado inicial, indicando que es específica del tamaño y secuencia del agregado inicial (Linse *et al.* 2019). Además, se ha descrito que el proceso de nucleación secundaria es enantio-específica, y se ha sugerido como modelo para explicar la propagación de priones (Kondepudi *et al.* 1990; Orgel 1996).

Lo anterior en conjunto da lugar al proceso de elongación, donde los monómeros inician el proceso de nucleación para formar oligómeros a partir de agregados preexistentes (Figura 4d) (Linse *et al.* 2019)

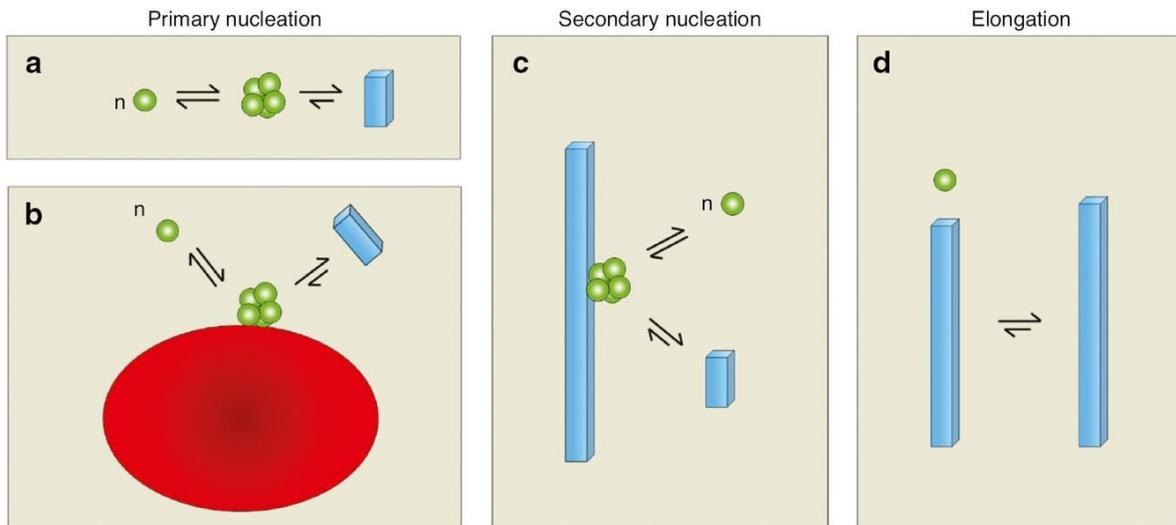


Figura 4. Etapas de la agregación del péptido A β (Tomado de Linse *et al.* 2019)

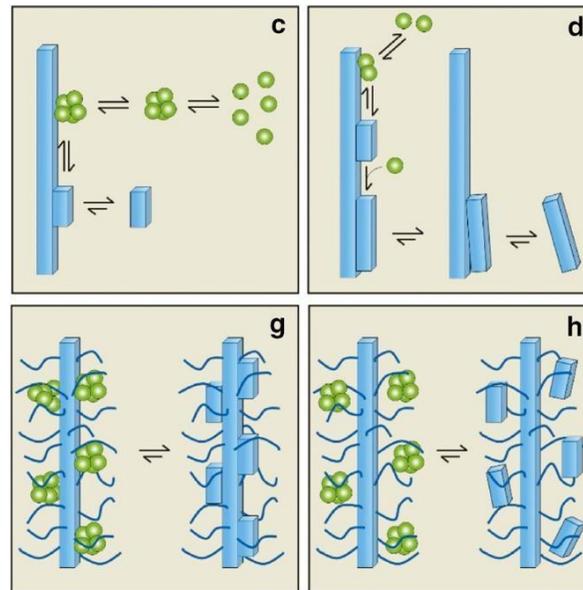


Figura 5. Monómeros en nucleación secundaria (Adaptado de Linse *et al.* 2019)

Adicionalmente, se han descrito otros factores que influyen en la agregación amiloide y está involucrado en la neurodegeneración, como la presencia de las proteínas priónicas (Prp), dado que se co-localiza con A β en las placas seniles y se demostró que existe una interacción entre PrP y la enzima limitante de la velocidad en la producción de A β , la β -secretasa BACE1, enzima encargada de escindir la proteína APP en la vía amiloidogénica, dando inicio a la agregación amiloide (Kellet y Hooper 2009).

Recientemente otros estudios demostraron que la PrP funciona como un receptor para los oligómeros A β , y la expresión de esta proteína está mediada por el dominio intracelular amiloide (AICD) presente en la vía amiloidogénica (Kellet y Hooper 2009).

En este contexto, las primeras hipótesis de la agregación amiloide postularon efectos adversos de las placas amiloides en las dendritas, los axones y la glía circundantes. Sin embargo, el descubrimiento posterior de los oligómeros solubles, concluyeron que las fibrillas amiloides insolubles que componen las placas amiloides podrían ser relativamente inactivos, pero sirven como reservorios de los oligómeros potencialmente neurotóxicos (Mucke y Selkoe 2012).

2.6 Neurotoxicidad de la agregación A β

Se ha descrito que la acumulación extracelular del péptido A β , deriva en la formación de neurofibrillas, características del Alzheimer, y en otros fenómenos intracelulares incluyendo:

- **Producción de especies reactivas de Oxígeno (ROS):** El estrés oxidativo es un evento temprano en la AD. Dado principalmente porque iones como Fe, Zn y Cu son encontrados en alta cantidad en el cerebro, y están implicados en la producción y regulación de estrés oxidativo. En la AD estos se encuentran desregulados y son capaces de unirse al péptido A β , aumentando la producción de ROS, derivando en la oxidación de proteínas y ácidos nucleicos, y disminuyendo el aclaramiento del A β (Choignon *et al.* 2018).
- **Alteración en la homeostasis de Ca⁺²:** La señalización del Ca⁺² regula la producción de energía y el metabolismo neuronal necesario para la transmisión sináptica. Se ha descrito que un incremento en la concentración de Ca⁺² en el retículo endoplásmico (ER) en las neuronas de pacientes con AD induce alteraciones en la señalización de Ca⁺², disminuyendo la función sináptica, dando lugar a la pérdida de memoria (Ge *et al.* 2022)
- **Alteraciones en la maquinaria autofágica:** A pesar de que no se ha dilucidado por completo el rol de la autofagia en el AD, se cree que la inducción errónea de la autofagia resulta en la acumulación de vacuolas autofágicas que contienen A β . Por otro lado, se cree que una eliminación inadecuada de proteínas mal plegadas mediante autofagia, da lugar a la acumulación de péptido beta-amiloide (Funderburk *et al.* 2010; Boland

et al. 2008) Lo anterior en conjunto deriva en un daño físico axonal, que finalmente da como resultado alteraciones del citoesqueleto, un factor importante en la patología de AD y la neurodegeneración, lo que conlleva a la disfunción mitocondrial y sináptica (Liting *et al.* 2020; Sun *et al.* 2015).

Por ello, con el fin de disminuir o inhibir la citotoxicidad neuronal inducida por la agregación del péptido beta-amiloide, existen diferentes tratamientos para la enfermedad de Alzheimer que se han enfocado en inhibir la agregación amiloide.

2.7 Tratamientos inhibidores de la agregación A β

2.7.1 Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales (mAb) actualmente son de los principales tratamientos utilizados para la enfermedad de Alzheimer, destacándose principalmente los anticuerpos monoclonales anti A β y antiproteína tau. Estos anticuerpos son distintos en selectividad por variantes polimórficas y reconocen epítomos específicos en función de la porción específica y las conformaciones del péptido beta-amiloide (Lacorte *et al.* 2022; Shi *et al.* 2022). Entre estos anticuerpos, aducanumab y gantenerumab se dirigen parcialmente a los oligómeros, mientras que la mayoría se enfocan en la eliminación de las placas A β insolubles (Tolar *et al.* 2020). Por lo que su mecanismo se dirige a diferentes vías metabólicas para eliminar A β y oligómeros mal plegados solubles, o bien, para evitar la adopción de conformaciones mal plegadas de A β , disminuyendo así los niveles y la citotoxicidad de A β en el cerebro. A su vez, se ha descrito que todos estos anticuerpos pueden reducir los niveles de agregación amiloide en líquido cefalorraquídeo (CRL) o plasma (Shi *et al.* 2022).

2.7.2 Análogos farmacológicos

Se ha buscado utilizar moléculas pequeñas capaces de modular múltiples vías involucradas en la patología del Alzheimer, destacándose el uso del benzofurano, un compuesto heterocíclico que ha demostrado tener actividad neuroprotectora e inhibir la agregación beta-amiloide (Cabrera *et al.* 2020) Por lo que se han estudiado análogos de este compuesto mediante modificaciones estructurales, observándose que el análogo de este compuesto

reduce los agregados beta-amiloides y mejora el fenotipo de aprendizaje y memoria en un modelo *in vivo* de ratón (Ha *et al.* 2018)

2.7.3 Extractos naturales

Previamente se habían desarrollado una amplia gama de compuestos con la finalidad de inhibir la agregación amiloide. Sin embargo, una de sus principales problemáticas son los efectos secundarios y la poca permeabilidad para atravesar la barrera hematoencefálica (BBB). Por lo que se han utilizado extractos naturales como alternativa terapéutica. En este sentido, dentro de los principales tratamientos de este grupo se encuentran las tetraciclinas y los polifenoles, que han demostrado interferir con la agregación de proteínas no amiloidogénicas como la alfa sinucleína.

Además, se ha propuesto que los tratamientos pertenecientes a este grupo son capaces de atenuar la acumulación del péptido beta-amiloide, mediante la modulación del estrés oxidativo; o bien, por la inhibición directa del péptido beta-amiloide (Pagano *et al.* 2020)

Sin embargo, a pesar de los avances tanto en etapas clínicas como preclínicas de los inhibidores amiloides convencionales, a la fecha, no se ha descrito ningún tratamiento que tenga un efecto notable sobre la reversión del daño neurológico inducido por la agregación del péptido. Se ha descrito que cambios en la secuencia primaria del péptido beta-amiloide pueden interferir en sus propiedades de agregación (Estrada *et al.* 2018). Por lo que se ha propuesto la inhibición de la agregación A β como un blanco terapéutico para el tratamiento de esta enfermedad, utilizando péptidos mutantes a partir de la secuencia del péptido A β .

2.8 Péptidos mutantes del péptido beta-amiloide

Los péptidos mutantes a partir de la secuencia beta-amiloide se generan a partir de la sustitución de residuos de aminoácidos específicos en la secuencia beta-amiloide (Estrada *et al.* 2018)

En este sentido, investigaciones previas han demostrado que modificaciones en la hoja beta plegada del péptido A β añadiendo un residuo de ácido antranílico, el cual es un beta-aminoácido aromático precursor del triptófano, induce efectos neuroprotectores contra la agregación del péptido A β , modulando la expresión de proteínas pro y antiapoptóticas como

Bax y Bcl-2, respectivamente. Además, disminuyó la producción de ROS y los niveles de Ca^{+2} intracelular (Kumar *et al.* 2016).

Investigaciones posteriores demostraron que la mutación K28A, que consiste en la sustitución de una lisina (K) por una alanina (A) en el residuo 28 estabiliza la conformación nativa del péptido $\text{A}\beta_{1-42}$, de manera que aumenta el número de estructuras alfa-hélices (Shuabib *et al.* 2020). Además, se demostró que el péptido K28A induce una disminución en el número de oligómeros $\text{A}\beta_{1-40}$ así como el tamaño de las fibrillas (Žganec *et al.* 2016).

Adicionalmente, se demostró que la sustitución de la metionina (M) ubicada en el residuo 35 (M35) del péptido $\text{A}\beta_{1-42}$ que contribuye al estrés oxidativo asociado con la neurotoxicidad beta-amiloide, disminuye la citotoxicidad del péptido sin afectar su capacidad de agregación (Butterfield y Sultana 2011; Dai *et al.* 2007).

Finalmente, investigaciones previas de nuestro grupo de investigación demostraron que la alanina (A) del residuo 30 (A30) localizada en el núcleo hidrofóbico de una lámina β , es necesaria para la formación y estabilización de las fibrillas, por lo que se probó su sustitución por triptófano (A30W), observando que esta mutación inducía la desestabilización de su estructura mediante un impedimento estérico. Por lo tanto, se evaluaron las características *in vitro* de esta mutante y de las previamente descritas K28A y M35C, donde se encontró que mediaron la desorganización de la estructura $\text{A}\beta$ y previnieron su agregación *de novo* del péptido $\text{A}\beta_{1-42}$ WT. Además, las mutantes A30W y K28A disminuyeron significativamente su citotoxicidad gracias a la disminución en la producción de ROS (Estrada Rodríguez *et al.* 2018)

Por ello, se planteó evaluar el efecto del péptido mutante A30W en un modelo *in vivo*, y se propuso el uso del nemátodo *Caenorhabditis elegans* dada su fácil manipulación y homología con el humano como la expresión del gen de la proteína precursora amiloide (APP); además de permitir la realización de revisiones periódicas.

2.9 *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans es un nemátodo no parásito de vida libre con un ciclo de vida corto de 3 días. Es un nemátodo redondo pequeño de 1 mm de longitud, y transparente, lo que facilita su manipulación y análisis. Este nemátodo se caracteriza por tener una vida útil de 2-3 semanas, lo que facilita su estudio (Alexandre *et al.* 2014).

Además, posee genes ortólogos con el ser humano, destacándose principalmente el gen que codifica para la proteína APP, que cumple un papel esencial en la patología del AD. Adicionalmente, se reportó la estructura del sistema nervioso de este nemátodo, describiendo las 302 neuronas, lo que ha posicionado a *C. elegans* como un interesante modelo para el estudio del AD (Alexander *et al.* 2014; White *et al.* 1986).

A pesar de que la cepa WT de *C. elegans* (N2) carece de la expresión del péptido A β , se han desarrollado cepas transgénicas capaces de expresar el péptido A β humano y permitan el uso de *C. elegans* como modelo de AD (Alexander *et al.* 2014).

Se ha descrito que una consecuencia de la acumulación de agregados amiloides es el deterioro sináptico (Cheignon *et al.* 2018; Bharadwaj *et al.* 2009), deriva en la pérdida de memoria y deterioro progresivo de la motilidad, llegando a causar parálisis en casos severos.

Por lo que en investigaciones previas se evaluó el efecto de la agregación amiloide sobre la motilidad y parálisis progresiva de *C. elegans* en la cepa WT N2, observando que un incremento en la formación de agregados amiloides deriva en un incremento en la fracción de nemátodos paralizados, además de inducir una disminución en el movimiento y actividad faríngea (Gallrein *et al.* 2021)

Otros estudios en la cepa transgénica CL2006, caracterizada por la expresión de A β en músculo que deriva en un fenotipo de parálisis progresiva, demostraron que el silenciamiento de proteínas con efecto protector contra la toxicidad de A β potencia el deterioro motor y la parálisis progresiva (Muñoz *et al.* 2014).

De manera similar, investigaciones en la cepa transgénica CL4176 que expresa el péptido A β muscular, demostraron que el tratamiento a *C. elegans* con diterpenos retrasa el fenotipo de parálisis progresiva (Cui *et al.* 2022).

No obstante, a pesar de la toxicidad amiloide muscular; en la AD el blanco principal de la toxicidad es el péptido A β , lo que condujo al desarrollo de la cepa CL2355, que se caracteriza por la expresión la secuencia de A β -42 humano bajo regulación del promotor neuronal *snb-1*, además de deficiencias en la quimiotaxis (Wu *et al.*, 2006).

En este contexto, estudios han evaluado el rol de la agregación amiloide sobre la memoria asociativa en la cepa CL2355. Se ha descrito que la cepa WT es sensible a la serotonina, que

cumple un papel en la regulación del aprendizaje, locomoción, fertilidad, etc., y se ha reportado que la serotonina exógena induce un fenotipo de parálisis. Por lo que en otro estudio se propuso evaluar el papel de la agregación amiloide sobre el fenotipo de parálisis inducido por serotonina exógena, donde se observó que el tratamiento con oligómeros disminuyó la fracción de nemátodos paralizados a comparación del control, resaltando el papel de la agregación amiloide sobre la inducción del fenotipo de parálisis (Kang *et al.* 2022)

Sin embargo, se desconocía el efecto de los péptidos mutantes sobre la viabilidad, parálisis y memoria asociativa de *C. elegans*, por lo que nuestro grupo de investigación se planteó evaluar el efecto de los péptidos A30W, K28A y M35C sobre estos fenotipos asociados a la toxicidad amiloide, observándose que ninguno de los péptidos afectó significativamente la viabilidad de los nemátodos. A su vez, los péptidos A30W y K28A indujeron un incremento significativo en la vida media de los nemátodos de hasta 3 días (Quijano-Guerrero 2021).

Por otro lado, en la cepa CL2006 se observó un retraso significativo en el fenotipo de parálisis progresiva, incrementando hasta 48 horas el tiempo en que el 50% de los nemátodos mostraba un fenotipo de parálisis (Quijano-Guerrero 2021).

Finalmente, en la cepa CL2355 se evaluó la memoria asociativa mediante ensayos de quimiotaxis, observándose una recuperación significativa en el índice de quimiotaxis (CI) en los nemátodos tratados con los péptidos K28A y M35C. (Quijano-Guerrero 2021).

Estos resultados en conjunto demuestran el potencial de los péptidos A30W, K28A y M35C para mejorar los fenotipos asociados a la toxicidad amiloide en *C. elegans*.

2.10 Co expresión de péptidos mutantes y WT marcados con proteína fluorescente en *Escherichia coli*

Investigaciones previas evaluaron la agregación amiloide utilizando el péptido A β ₁₋₄₂ desnudo, o sin marcar. Lo anterior les permitió la observación de oligómeros de distintos tamaños. Sin embargo, no pudieron observar la fibrilización amiloide, lo cual no permitía su evaluación en tiempo real (Ochiishi *et al.* 2016).

Por lo que en estudios posteriores se evaluó la agregación de A β y fenotipos asociados a la toxicidad de *C. elegans* utilizando un modelo sub-estequiométrico, con el péptido A β ₁₋₄₂ marcado con la proteína fluorescente mScarlet así como desnudo, dado que la traducción de

A β ₁₋₄₂-mScarlet así como A β ₁₋₄₂ desnudo, provenientes de un mRNA bicistrónico, genera un exceso de A β ₁₋₄₂ desnudo sobre el péptido marcado; donde se observó que la incorporación de la proteína fluorescente mScarlet a los agregados amiloides permitía su evaluación *in vivo* sin perturbar su agregación (Gallrein *et al.* 2021).

Adicionalmente, se estudió el efecto de la agregación *in vivo* sobre *C. elegans*, observando que el péptido A β ₁₋₄₂ disminuye la tasa de supervivencia y es capaz de inducir efectos sistémicos como la disminución del movimiento y actividad faríngea, así como un incremento en la parálisis progresiva. Por lo que se evaluó si el péptido A β ₁₋₄₂ era capaz de expandirse hacia otros tejidos, encontrando que el péptido A β ₁₋₄₂ es capaz de expandirse hacia coelomocitos e hipodermis, además de inducir la activación de la proteína Galectina-3 (Gal-3) indicativo de un daño a membrana (Gallrein *et al.* 2021).

Por otro lado, se evaluó el efecto de los agregados A β WT en *C. elegans* mediante la expresión del péptido WT en *E. coli*, para posteriormente alimentar al nemátodo, dado que esta bacteria es la base de la dieta de este nemátodo; encontrándose que la agregación amiloide es capaz de inducir la formación de endosomas y daño a membrana. A su vez, se evaluó el efecto de la sustitución de la Glicina ubicada en el residuo de aminoácidos 37 (G37) por una Leucina (G37L) expresada en *E. coli*, observando que el péptido G37L es capaz de disminuir la formación de endosomas inducida por la toxicidad amiloide, disminuyendo hasta niveles similares al control (Julien *et al.* 2018).

Estudios similares donde se expresó el péptido WT en *E. coli* con la finalidad de dilucidar su mecanismo de citotoxicidad, demostraron que la agregación amiloide induce daño a membrana mediante la expresión de proteínas chaperonas como hsp-16 y hsp-70, además de inducir la formación de vesículas endocíticas o endosomas (Hassan *et al.* 2015)

Estos resultados en conjunto proveen evidencia de las ventajas que ofrece la expresión de péptidos mutantes y WT marcados con una proteína fluorescente en *E. coli*, para evaluar la agregación amiloide y su invasión hacia otros tejidos en tiempo real *in vivo*, así como su efecto en fenotipos asociados a la toxicidad amiloide. Sin embargo, a la fecha no se ha monitoreado la dispersión en tiempo real de los agregados, por lo que se desconoce de qué manera los péptidos mutantes como el WT migran hacia el intestino y/o a otros órganos. Por ello, en un intento de solucionar esta problemática se propuso la expresión de los péptidos

mutantes y WT en *E. coli* marcados con una proteína fluorescente y su exposición a *C. elegans*. Por lo que esta investigación pretenderá evaluar en tiempo real la dispersión y efecto de los péptidos A30W, K28A, M35C y WT sobre fenotipos asociados a la toxicidad amiloide.

3. JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de Alzheimer (AD) es un síndrome de naturaleza crónica o progresiva que conduce al deterioro de la función cognitiva. Además, es la forma más común de demencia y afecta principalmente a los adultos mayores. Sin embargo, no se ha descrito ningún tratamiento que tenga un efecto notable sobre la reversión del daño neurológico inducido por la agregación del péptido. En este sentido, se ha propuesto que el principal evento en la patogénesis de esta enfermedad es la agregación del péptido A β en oligómeros que deriva en daño neurológico inducido por la formación de placas seniles. Por lo que se ha propuesto la inhibición de la agregación de A β como un blanco terapéutico para el tratamiento de esta enfermedad. Investigaciones previas han demostrado que sustituciones en aminoácidos específicos en la secuencia del péptido A β tienen un efecto inhibitorio sobre su agregación. Se ha propuesto el uso del nemátodo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) como modelo *in vivo*, debido a su fácil manipulación y similitud genética con el humano.

Bajo esta perspectiva, los péptidos mutantes A30W, K28A y M35C han demostrado prevenir la agregación *de novo* en un modelo *in vivo* de *C. elegans*, así como disminuir la producción de ROS y la citotoxicidad inducida por el péptido A β en células de glioblastoma *in vitro*.

Sin embargo, una problemática de este tratamiento es que se desconoce si estos péptidos son capaces de migrar de intestino a otros tejidos. Para ello, previas investigaciones han administrado de forma oral péptidos mutantes marcados con una proteína fluorescente mediante su expresión en *E. coli* utilizando un modelo *in vivo* de *C. elegans*, no obstante, su modelo no permitía observar la fibrilización.

Por lo que en este estudio se propuso la expresión de los péptidos mutantes A30W y WT en *E. coli* en un sistema que incluya el péptido marcado con una proteína fluorescente, así como desnudo, lo que permitirá monitorear la dispersión en tiempo real y conocer si la expresión de estos péptidos induce efectos sistémicos, mediante ensayos de viabilidad, dispersión y memoria

4. HIPÓTESIS

La coexpresión de A β y A β -mScarlet y su mutante A30W en *E. coli* permite monitorear la dispersión del péptido en tiempo real, evaluar su efecto sistémico su efecto terapéutico en un modelo *in vivo* de *C. elegans*.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Monitorear la dispersión y efecto de A β y A β -mScarlet expresados en *E.coli* y su mutante A30W sobre un modelo *in vivo* de *C. elegans*.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Expresar en *Escherichia coli* el péptido mutante A30W y el péptido A β marcados con la proteína fluorescente mScarlet así como sin marcaje.
2. Monitorear en tiempo real la dispersión del péptido mutante A30W y el péptido A β en *C. elegans*
3. Evaluar el efecto del péptido mutante A30W y el péptido A β sobre la viabilidad y movilidad de *C. elegans*

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Cepas

La cepa N2 Bristol del fenotipo Wildtype (WT) fue obtenida del *Caenorhabditis Genetics Center* de la Universidad de Minnesota (Minneapolis, Minnesota, USA).

Todas las cepas previamente mencionadas se encuentran descritas en la tabla 1.

Tabla 1. Cepas utilizadas de *C. elegans*

Cepa	Genotipo	Características
N2	Wildtype (WT)	Cepa silvestre de la variante Bristol

A su vez, las variantes utilizadas del péptido A β se encuentran descritas en la tabla 2.

Tabla 2. Variantes utilizadas del péptido A β

Péptido	Secuencia de aminoácidos
A β ₁₋₄₂ WT	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
A β ₁₋₄₂ A30W	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGWIIGLMVGGVVIA

6.2 Mantenimiento de los nemátodos

Los nemátodos se mantuvieron en incubación a una temperatura de 20°C. Para su alimentación, se inoculó una cepa de *Escherichia coli* OP50 en un medio de cultivo Luria-Bertani (LB) (1% tripton, 0.5% de extracto de levadura, 172 mM de cloruro de sodio, pH: y 250 μ L de estreptomicina), en un matraz de 50 mL, el cual se mantuvo en agitación durante 16 horas aproximadamente hasta alcanzar un valor de densidad óptica igual a 1.

Una vez obtenido el cultivo bacteriano, se inoculó la bacteria en placas Petri preparadas con medio de crecimiento de nemátodos (Nematode Growth Medium, NGM) y se dejaron secar al menos 2 horas. Posteriormente, se dejaron crecer los nemátodos colocándolos en incubadoras Digital Mini Incubator.

Para su sincronización, se utilizaron placas Petri con la mayoría de nemátodos adultos con la finalidad de obtener organismos en la misma etapa de desarrollo, mediante la metodología previamente utilizada por de la Porta y colaboradores (2012). Para ello, se recuperaron los nemátodos en un tubo estéril con 1.5 mL de medio M9, y se trataron con NaClO y NaOH a una concentración 5 N para ser homogeneizados durante 5 minutos.

Una vez realizado esto, se centrifugaron a 200 rpm durante 1 min y se decantó el sobrenadante. Posteriormente, se agregó 1 mL de medio M9 y se repitió la metodología previamente mencionada de 5 a 7 veces. Finalmente, se suspendieron los huevos de los nemátodos en un volumen mínimo para ser colocados en una nueva placa.

6.3 Diseño de construcciones

Para generar las cepas de *E. coli* capaces de expresar el péptido A β , se diseñó una construcción que incluye el gen del péptido A β_{1-42} WT o el mutante y río abajo la proteína fluorescente mScarlet fusionada a la secuencia del péptido correspondiente regulado por un RBS débil. Las secuencias se enviaron a sintetizar e insertar en el vector pET3a entre los sitios NdeI y BamHI a GeneUniversal.

Lo anterior se puede ver representado en la figura 4.



Figura 4. Cassette base para la expresión de los péptidos en *E. coli* BL21 DE3

6.3.1 Expresión de los péptidos en *E. coli*

Los vectores pET3a-AB-AB mScarlet y pET3a-A30W-A30W Scarlet se utilizaron para transformar bacterias *E. coli* BL21 DE3 pLYSS calcio competentes utilizando la metodología basada en choque térmico (Ausubel et al., 2003; Hanahan y Harbor, 1983) con las modificaciones correspondientes. Para ello, se mezclaron 100 μ L de bacterias calcio competentes con 1 μ L de plásmido a una concentración de 1 ng/ μ L y se incubaron por 30 minutos en hielo. Después, se indujo el choque térmico introduciendo el tubo en agua a 42°C por 1 min, y posteriormente incubando en hielo por 5 minutos. Se agregaron 200 μ L de medio LB y se incubó a 37°C en agitación. Finalmente, se inocularon en placas con ampicilina

[99.9983 µg/mL] y cloranfenicol [25 µg/mL] y se incubaron a 37° durante 12 a 15 horas.

Para confirmar la expresión de los péptidos, se indujo su expresión creciendo las bacterias en medio con IPTG (0.1mM) y se detectó la fluorescencia de mScarlet en el microscopio de fluorescencia.

Finalmente, se detectó la expresión del péptido Aβ mediante una tinción con tioflavina S (ThS). Para ello, se centrifugó el cultivo bacteriano de *E. coli* a 12,000 rfc, a una temperatura de 4°C por 15 minutos. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el cultivo en PBS. Se agregó a la suspensión Tioflavina S a 25 mM y se observó el microscopio de fluorescencia.

6.4 Mini-preps por lisis alcalina

Primeramente, se inoculó una colonia de *E.coli* BL21 DE3 en 3 mL de medio LB con 6 µL de ampicilina (AMP) y/o 3 µL de cloranfenicol (CM) o el antibiótico correspondiente y se incubó a 37°C en agitación. Posteriormente, se centrifugó de forma sucesiva 1.5 mL del cultivo por 2 min y se decantó. Una vez obtenido el pellet, se disgregó la pastilla generada en 100 µL de buffer de resuspensión (50 mM Tris Cl pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µL RNasa A) y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos.

Transcurrido este tiempo, se agregaron 200 µL de buffer de lisis (200 mM NaOH, 1% SDS), se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 5 minutos.

De manera similar, se agregaron 150 µL de buffer de neutralización (3.0 M CH₃CH₂K pH 5.5), se incubó en hielo y se centrifugó a 6000 rpm durante 5 minutos.

Una vez centrifugado, se transfirieron los sobrenadantes a tubos nuevos y se agregaron 500 µL de isopropanol 100%, se mezclaron por inversión y se incubaron en hielo durante 2 minutos. Se centrifugó a 6000 rpm durante 1 minuto y se decantó el sobrenadante. Una vez obtenido el pellet, se agregaron 200 µL de etanol al 70% y se centrifugó a 6000 durante 1 minuto.

Finalmente, se decantó y dejó secar la pastilla y se resuspendió en 20 µL de agua MiliQ para su posterior análisis mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

6.5 Monitoreo de la dispersión de los péptidos en tiempo real

Con el fin de conocer si los péptidos eran capaces de migrar al intestino del nemátodo y/o hacia otros órganos. Se evaluó la localización en tiempo real de los péptidos mediante microscopía de fluorescencia. Nemátodos de la cepa N2 fueron tratados alimentándose con cultivo de *E. coli* expresando los diferentes péptidos. Para ello, se agregó IPTG a una concentración de 0.1 mM al medio NGM y se inoculó con cultivo de *E. coli* transformada. Se contaron con cuatro tratamientos distintos: A β WT, A30W un vector control y sin vector. Se contó con 3 réplicas para cada grupo experimental.

Una vez que alcanzaron la etapa larvaria L4, los nemátodos se recuperaron y colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL con buffer M9 para su fijación. Para ello, los tubos se centrifugaron a 2000 rpm durante 1.5 min y se decantó el sobrenadante, después, se agregó 1 mL de buffer M9 y se repitió la metodología previamente descrita para eliminar el exceso de bacterias.

Una vez decantado el sobrenadante, se resuspendieron en 1 mL de etanol al 100% y se incubaron a -80°C durante 30 min. Posterior a la incubación, los tubos se descongelaron y se lavaron 2 veces con buffer M9.

Para su visualización, los nemátodos se colocaron en portaobjetos y se agregó una gota del marcador fluorescente 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Se observó la fluorescencia de DAPI y de mScarlet utilizando un microscopio de fluorescencia Zeiss Imager A2.

A su vez, para verificar que la señal emitida por mScarlet coincida con los agregados A β , se tiñeron los nemátodos con marcador Tioflavina S al 0.125% diluido en etanol al 50%, y se incubaron a 4°C en agitación durante 10 minutos. Finalmente, se lavaron con etanol al 50% para eliminar el exceso de Tioflavina S y se montaron para observarse en el microscopio de fluorescencia.

Las imágenes se obtuvieron utilizando el software Zenlite y se analizaron utilizando ImageJ.

6.6 Análisis de viabilidad

Con el fin de evaluar el porcentaje de inhibición de la viabilidad inducido por el péptido mutante A30W, así como por el péptido WT, se realizó el tratamiento de los nemátodos de la forma anteriormente descrita. Los tratamientos fueron: AB WT, A30W un vector control y sin vector. Se contó con 3 réplicas para cada grupo experimental.

Los nemátodos se mantuvieron a una temperatura de 25°C. Una vez que alcanzaron el estadio larvario 4 (L4), fueron transferidos cada 2 días a una nueva placa hasta que dejaron de ser fértiles. De manera simultánea, los nemátodos fueron observados diariamente en un estereoscopio para realizar el conteo de nemátodos viables.

6.7 Análisis de movilidad

Con el fin de evaluar el efecto inducido por el péptido WT y el péptido mutante A30W, sobre la movilidad, se analizó el “trashing” de los nemátodos, definido como el movimiento lateral que realizan los nemátodos para desplazarse.

Para ello, se realizó el tratamiento de los nemátodos de la forma anteriormente descrita, contando con cuatro tratamientos distintos: WT, A30W, un vector control y sin vector. Se realizaron 3 réplicas para cada grupo experimental.

Se colocaron en placas de 30 mm los nemátodos de la cepa N2 todos previamente sincronizados en el estadio L3 y mantenidos a una temperatura de 25°C.

Una vez realizado esto, se colocaron los nemátodos en una gota de buffer de fosfatos M9 y se dejaron durante 3 minutos. Transcurrido este tiempo, se observaron al estereoscopio y se grabaron durante 30 segundos.

Finalmente, los videos fueron analizados mediante el plugin WrMTrck (Wormtrack) del software ImageJ para determinar la frecuencia en Hertz (Hz).

6.8 Análisis estadístico

Para los datos de viabilidad se generaron gráficos con el estimador Kaplan Meier y se realizaron análisis estadísticos mediante la prueba log-Rank en el programa OASIS 2. Por otro lado, para el ensayo de movilidad el análisis estadístico se realizó con el software SPSS utilizando la prueba Mann-Whitney, considerando como significativos valores de $p < 0.05$. Los datos representan el promedio de al menos 3 experimentos independientes realizados por triplicado \pm DE.

7. RESULTADOS

7.1 El péptido A β y su mutante A30W son capaces de expresarse en *Escherichia coli*

Para determinar el correcto aislamiento de los vectores correspondientes al péptido A β y su mutante A30W, se realizó primeramente un gel *in silico* del péptido A β WT digerido con la enzima KpnI, observándose el sitio de corte a 676 y 1381 pares de bases (pb) (**Figura 7A**). De manera similar, se realizó el gel *in silico* para el péptido mutante A30W digerido con las enzimas AgeI-KpnI, observándose los sitios de corte de AgeI a 4099 y 4237 pb, y de KpnI a 4259 y 4264 pb (**Figura 7B**).

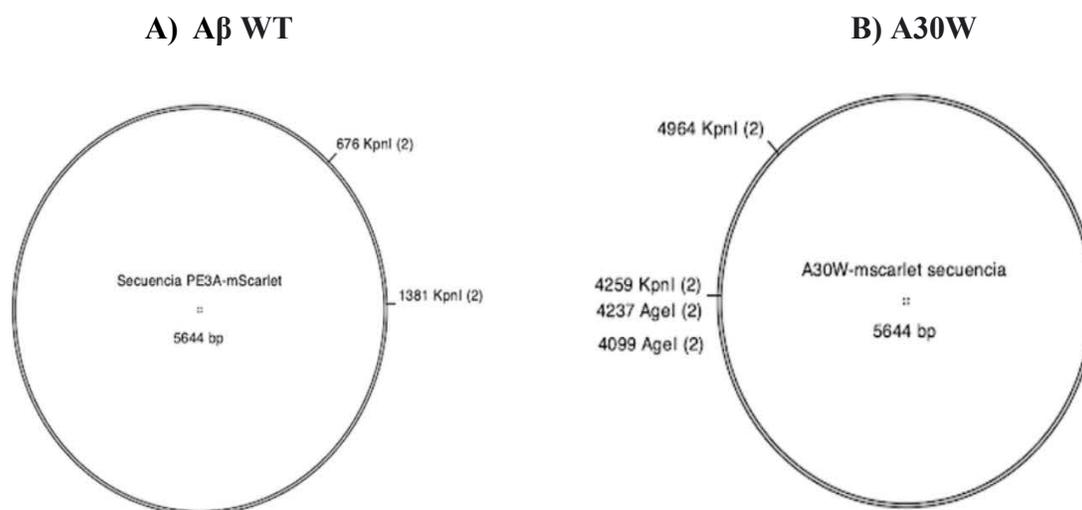


Figura 7. Esquema de ADN circular del péptido A β WT y su mutante A30W. Las secuencias correspondientes al péptido A β WT (**A**) y A30W (**B**) fueron analizadas *in silico* previo a su caracterización y se simuló la digestión con KpnI (**A**) y KpnI-AgeI (**B**) como enzimas de restricción utilizando mediante el software “A Plasmid Editor” (APE). Los datos representan el promedio de al menos 3 experimentos independientes realizados por triplicado.

Una vez realizado el aislamiento de los vectores correspondientes al péptido A β WT y su mutante A30W, se realizó la caracterización de éstos mediante la técnica de mini preps por lisis alcalina, posteriormente se analizaron en un gel de agarosa 0.8% mediante la técnica de electroforesis en gel. Teniendo en el carril izquierdo el grupo control, observando la

precipitación de las bandas a 676 pb en los carriles 2, 3, 9 y 11 (**Figura 8A**). Por otro lado, se realizó el mismo procedimiento para el mutante A30W, teniendo en el carril izquierdo el grupo control, observándose la precipitación de ambas bandas (central e inferior) correspondientes a ambas enzimas en la mayoría de las colonias aisladas (**Figura 8B**).

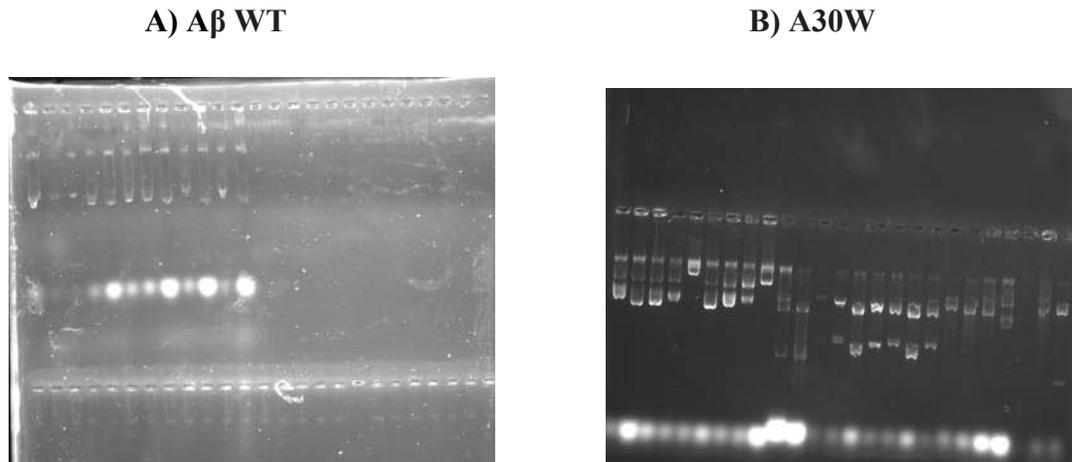


Figura 8. Caracterización del péptido Aβ WT y su mutante A30W. Las colonias de *Escherichia coli* BL21 expresando Aβ WT (**A**) y A30W (**B**) fueron tratadas mediante lisis alcalina y digeridas con KpnI (**A**) y KpnI-AgeI (**B**). La caracterización de los péptidos fue analizada mediante la técnica de electroforesis en gel. Los datos representan el promedio de al menos 3 experimentos independientes realizados por triplicado.

Una vez que se realizó el aislamiento de los vectores, así como la correcta caracterización de los péptidos Aβ y su mutante A30W, y con el fin de evaluar si ambos péptidos eran capaces de expresarse en *Escherichia coli* y, posteriormente, darse como alimento a *C. Elegans*, se indujo la expresión del péptido Aβ y su mutante A30W en *E. coli* BL21 DE6.

Para ello, se utilizó para cada péptido un grupo con el péptido inducido con Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), un grupo control (sin IPTG), así como *E. coli* que expresa GFP como control positivo de fluorescencia, utilizándose para cada grupo una n de 30 nemátodos.

Posteriormente, se analizó la expresión del péptido Aβ en *E. coli* BL21 DE6 incubadas durante 4 y 6 h mediante la técnica de tinción con Tioflavina S (ThS) y su análisis por microscopía de fluorescencia utilizando un microscopio Zeiss Imager Z1, observando la expresión del péptido Aβ en forma de cuerpos de inclusión a los extremos de los bacilos a partir de las 4 h de tratamiento y manteniéndose a las 6 h del mismo (**Figura 9A**), contrario

a lo observado en los controles de 4 y 6 h, donde solamente se observaron residuos de Tioflavina S (**Figura 9B**). Finalmente, se observó la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) en una cepa transgénica de *E. coli* que expresa GFP (**Figura 9C**).

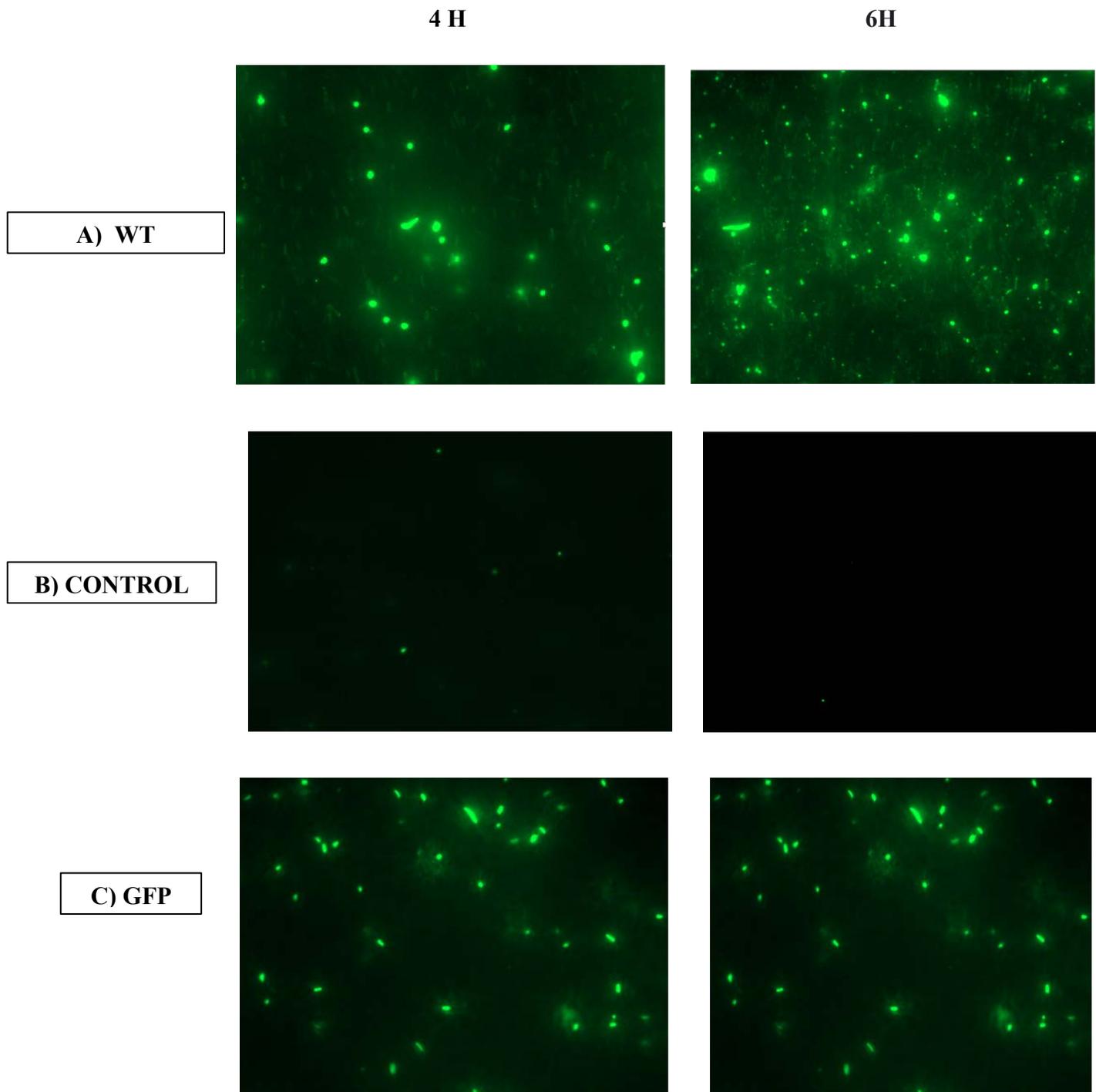


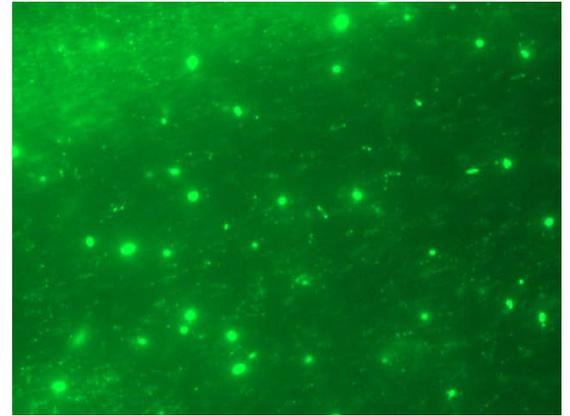
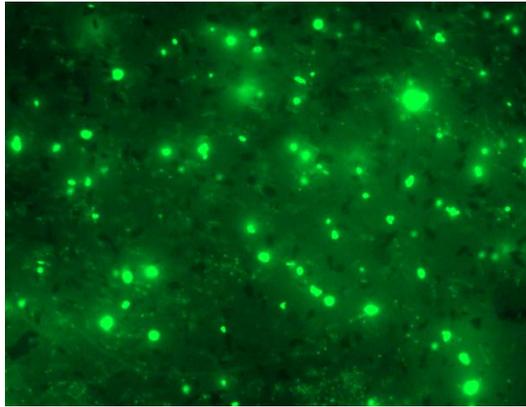
Figura 9. Expresión del péptido A β WT en *E.coli* BL21 DE3. Se inocularon colonias de *Escherichia coli* BL21 en agar LB y se tomó un grupo induciendo la expresión del péptido

A β WT con IPTG (A), un grupo control (B) así como *E.coli* que expresa GFP como control positivo de fluorescencia (C) y se incubaron durante 4 y 6 horas. La expresión de los péptidos fue analizada mediante microscopía de fluorescencia y la tinción con ThS. Los datos representan el promedio de al menos 3 experimentos independientes realizados por triplicado.

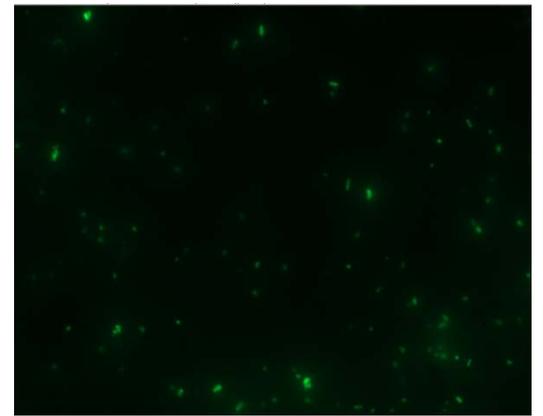
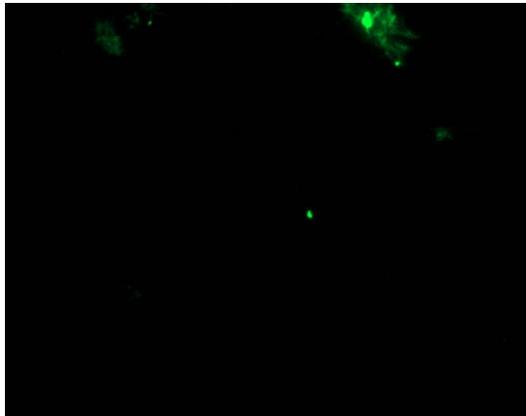
4 H

6H

A) A30W



B) CONTROL



C) GFP

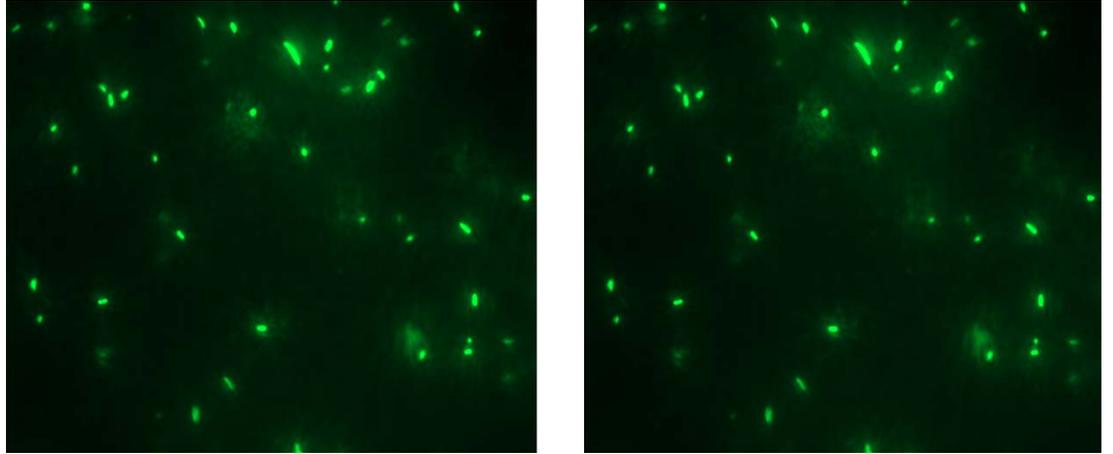


Figura 10.

Expresión del péptido A30W en *E.coli* BL21 DE3. Se inocularon colonias de *Escherichia coli* BL21 en agar LB y se tomó un grupo induciendo la expresión del péptido A30W con IPTG (A), un grupo control (B) así como *E.coli* que expresa GFP como control positivo de fluorescencia (C) y se incubaron durante 4 y 6 horas. La expresión de los péptidos fue analizada mediante microscopía de fluorescencia y la tinción con ThS. Los datos representan el promedio de al menos 3 experimentos independientes realizados por triplicado.

7.2 Monitoreo de la dispersión amiloide

Una vez que se observó que el péptido A β WT y su mutante A30W son capaces de expresarse en *E. coli*, y de esta manera optimizar el tratamiento, decidimos evaluar si éstos eran capaces de migrar hacia intestino y/o hacia otros órganos, por lo que *E.coli* expresando A β WT y A30W se expuso como alimento a *C. Elegans*.

Para ello, decidimos evaluar la dispersión dejándolos a distintos tiempos de tratamiento. Primeramente, se analizaron durante 24 horas de tratamiento, posteriormente, durante 5 días, y finalmente, se analizó tratándose desde estadios larvarios o huevos, donde la tonalidad amarilla/roja se asoció con una mayor intensidad en la fluorescencia. Sin embargo, no pudimos observar una diferencia significativa en la intensidad de fluorescencia entre los grupos tratados con el péptido WT IPTG y sus controles (**Figura 11A-C**).

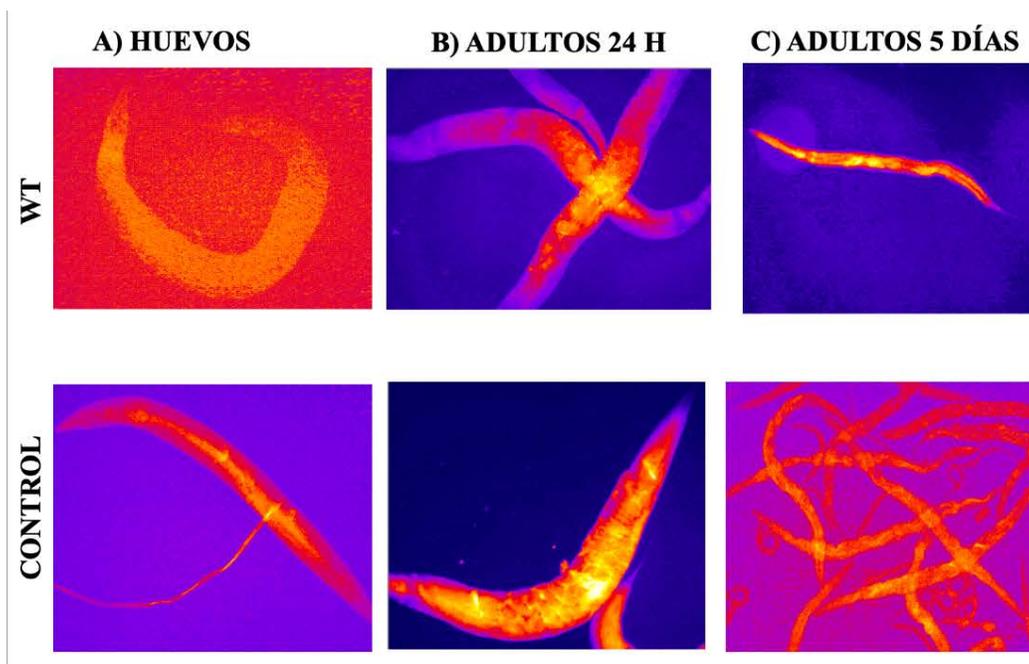


Figura 11. Dispersión del péptido WT en *C. elegans*. Se inocularon colonias de *Escherichia coli* BL21 en agar LB y se tomó un grupo induciendo la expresión del péptido WT con IPTG y un grupo control, y se expusieron como alimento a *C. elegans* en distintas etapas: huevos (A); adultos 24 horas (B); adultos 5 días (C). La expresión de los péptidos fue analizada mediante microscopía de fluorescencia y la tinción con ThS. Los datos representan el promedio de al menos 3 experimentos independientes realizados por triplicado.

A su vez, se realizaron análisis en la intensidad de fluorescencia para poder observar la diferencia de manera cuantitativa. Sin embargo, no observamos una diferencia significativa en los nemátodos tratados con WT IPTG a comparación de su control (datos no mostrados).

A pesar de que no pudimos observar con claridad una diferencia en la intensidad del péptido WT a comparación de su control, decidimos evaluar cuál era su efecto sobre la viabilidad de los nemátodos.

7.3 El péptido A30W mejora la viabilidad de *C. Elegans*

Una vez que se observó si el péptido A β WT y su mutante A30W son capaces de migrar hacia el intestino, decidimos evaluar su efecto sobre fenotipos asociados a la toxicidad amiloide. Por ello, se evaluó su efecto sobre la viabilidad de los nemátodos, analizando

grupos tratados con A β WT inducido con IPTG (**gris medio**) y su control (**negro**); su mutante A30W IPTG (**gris oscuro**) y su control (**negro**); así como *E.coli* OP50 (**gris claro**) y su control (**negro**).

En este sentido, se observó que el péptido A β WT (**gris medio**), indujo una disminución en la vida media de los nemátodos, alcanzando solamente 14 días, siendo el ciclo de vida del nemátodo de 21 días, tiempo similar al observado en el control de A β WT (**negro**) (**Figura 12A**).

Por el contrario, se observó que el mutante A30W no afectó la viabilidad de los nemátodos, al tiempo que indujo una extensión en la vida media, llegando hasta 27 días (**gris oscuro**), obteniendo valores similares a su control (**negro**) (**Figura 12B**). A su vez, se observaron valores similares a *E.coli* OP50 IPTG (**gris claro**) y su control (**negro**), alcanzando valores de 21 y 24 días, respectivamente (**Figura 12C**).

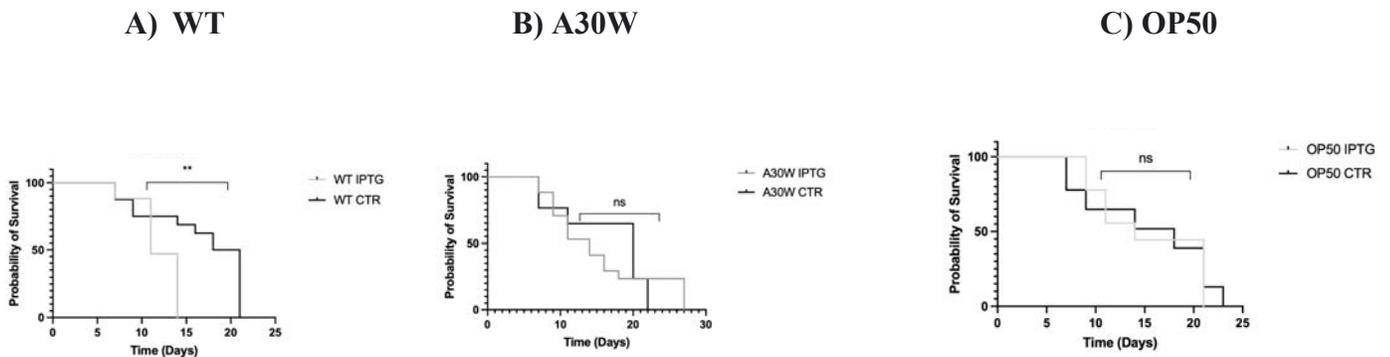


Figura 12. Efecto del péptido A β WT y su mutante A30W sobre la viabilidad de *C.elegans*. Se inocularon colonias de *Escherichia coli* BL21 en agar LB y se tomó un grupo induciendo la expresión del péptido A β WT con IPTG (**rosa**) y su control (**azul**); A30W con IPTG (**dorado**) y su control (**guindo**); así como *E.coli* OP50 IPTG como control negativo (**celeste**) y su control (**verde**). La viabilidad de los nemátodos fue analizada mediante su observación al estereoscopio. Los datos representan el promedio de al menos 3 experimentos independientes realizados por triplicado.

7.4 El péptido A30W mejora la movilidad de *C. Elegans*

Una vez que se comprobó que el péptido A30W no afecta la viabilidad de *C. elegans*, contrario al péptido WT donde se observó una disminución en la viabilidad, decidimos evaluar el efecto de ambos péptidos sobre la movilidad del nemátodo, dado que deficiencias en la movilidad están asociadas con un daño neuromotor en *C. elegans*. Para este fin, se realizó una curva de tiempo, dejándolos en tratamiento durante 24 horas inicialmente.

Se encontró que el péptido A30W IPTG (**gris oscuro**) mejoró significativamente ($p < 0.05$) la movilidad de los nemátodos a comparación de su control, alcanzando valores de 1.06 Hz (movimientos por segundo). Además, no se encontró diferencia significativa en los nemátodos tratados con A30W IPTG (**gris oscuro**) y los tratados con OP50 IPTG (**gris claro**), indicando que el péptido A30W induce frecuencias de movilidad similares a los nemátodos alimentados con la dieta base (OP50) (**Figura 13A**).

Por el contrario, se observó que el péptido A β WT induce una disminución significativa en la movilidad de los nemátodos, alcanzando solamente un valor de 0.4329 Hz (**gris medio**), siendo menor a su control, donde se observó una frecuencia de 1.2460 Hz. A su vez, se observó que los nemátodos tratados con A β WT IPTG (**gris medio**) induce una disminución significativa en la movilidad a comparación de los tratados con OP50 (**gris claro**) (**Figura 13A**).

Finalmente, no se observó diferencia significativa en los nemátodos tratados con OP50 IPTG a comparación de su control (**Figura 13A**).

Por otro lado, a los 30 minutos se observó que el péptido A30W no indujo una diferencia significativa en la movilidad de los nemátodos a comparación de su control. A su vez, no se observó diferencia significativa con los nemátodos tratados con OP50 IPTG. Sin embargo, se observó un incremento significativo en la movilidad a comparación de los nemátodos tratados con WT IPTG (**Figura 13B**).

De manera similar, al dejarlos durante 1 hora en buffer, a pesar de que se observó una diferencia significativa en los nemátodos tratados con A30W IPTG a comparación de su control, no se observó una diferencia o mejora significativa a comparación de los nemátodos tratados con WT IPTG (**Figura 13C**). Este comportamiento se extendió hasta el tiempo de

2.5 horas, indicando que el péptido WT es capaz de inducir una disminución en la movilidad en los nemátodos en todos los tiempos analizados con 24 horas de tratamiento, mientras que el péptido A30W no induce un efecto óptimo sobre *C. elegans* con 24 horas de tratamiento (Figura 13D-F).

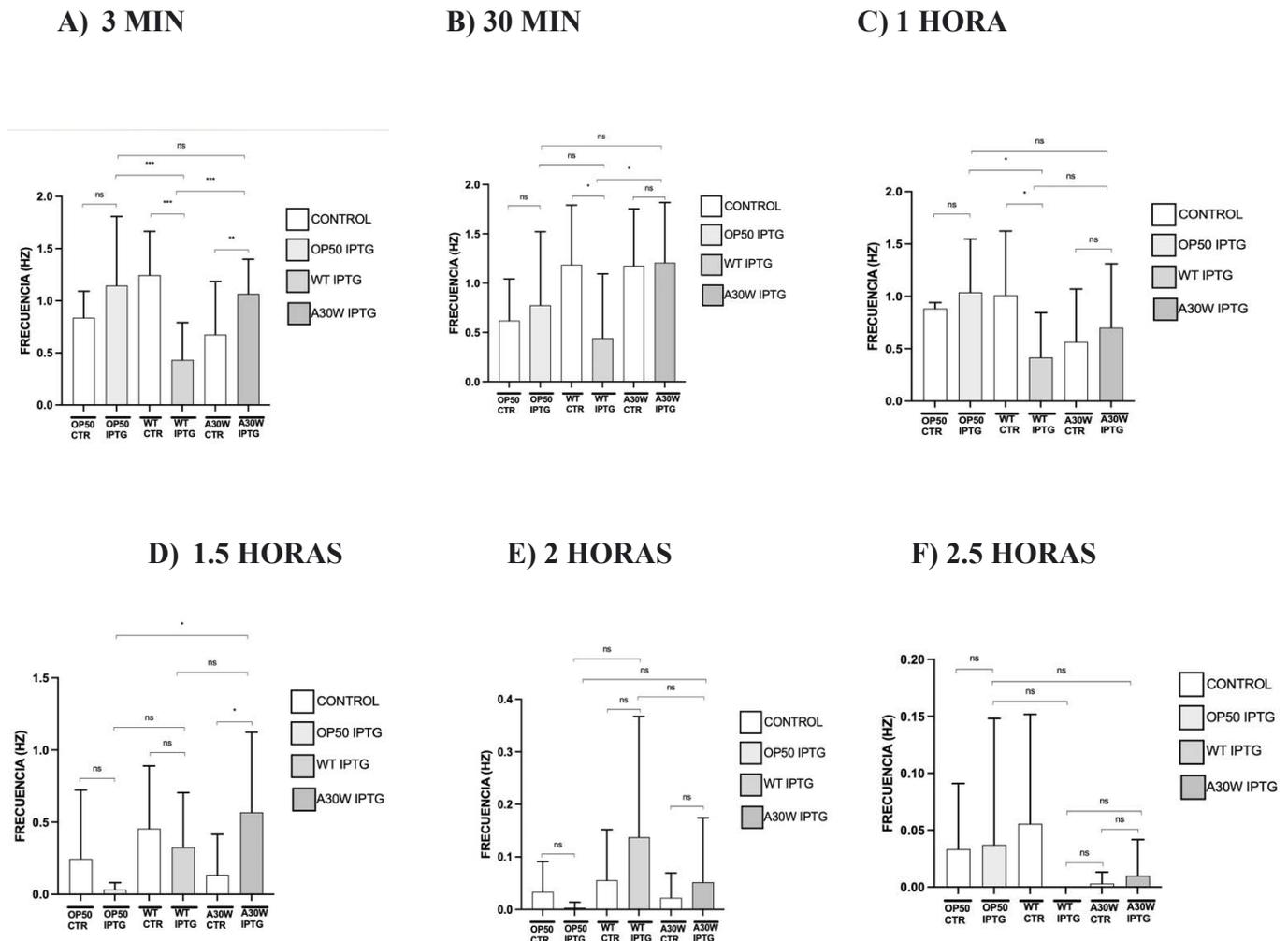


Figura 13. Efecto del péptido A β WT y su mutante A30W sobre la movilidad de *C. elegans* tratados por 24 horas. Se inocularon colonias de *Escherichia coli* BL21 en agar LB y se tomó un grupo induciendo la expresión del péptido A β WT con IPTG y su control; A30W con IPTG y su control; así como *E. coli* OP50 IPTG y su control y se expusieron como alimento a *C. elegans* durante 24 horas. La movilidad de los nemátodos fue analizada mediante el software Wrmtrck de Image J. Los datos representan el promedio de al menos 3 experimentos independientes realizados por triplicado \pm DE.

Por ello, y dado que se ha descrito que la agregación amiloide incrementa conforme el tiempo en un modelo *in vivo* de *C. elegans* (Gallrein 2021), decidimos analizar el efecto de los tratamientos utilizados sobre la movilidad de *C. elegans* durante 5 días de tratamiento en etapa adulta.

Se observó que el péptido A30W (**gris oscuro**) no indujo un cambio significativo en la movilidad a comparación de su control, mientras que sí se observó una disminución significativa en la movilidad a comparación del péptido WT (**gris medio**), alcanzando valores solamente de hasta 0.2601 (**Figura 14A**).

A su vez, se observó que los nemátodos tratados con A β WT IPTG (**gris medio**) se produjo una disminución significativa en la movilidad a comparación de los tratados con OP50 (**gris claro**) (**Figura 14A**)

Finalmente, no se observó diferencia significativa en los nemátodos tratados con OP50 IPTG a comparación de su control al dejarlos durante 3 min en buffer (**Figura 14A**). De manera similar, este efecto se mantuvo al analizar los nemátodos durante 30 min y 1 hora (**Figura 14 B-C**).

Por otro lado, al analizarlos durante 1.5 horas se observó que el péptido A30W IPTG (**gris oscuro**) indujo un cambio significativo en la movilidad a comparación del WT IPTG (**gris medio**) y OP50 (**gris claro**) (**Figura 14D**). A las 2 horas de análisis el péptido WT IPTG mantuvo una disminución significativa en la movilidad, mientras que no se observó un cambio significativo en la movilidad en ninguno de los otros grupos, a comparación de sus controles (**Figura 14E**). Finalmente, a las 2.5 horas de análisis no se observó una diferencia significativa en la movilidad en ninguno de los grupos analizados a comparación de sus controles (**Figura 14F**)

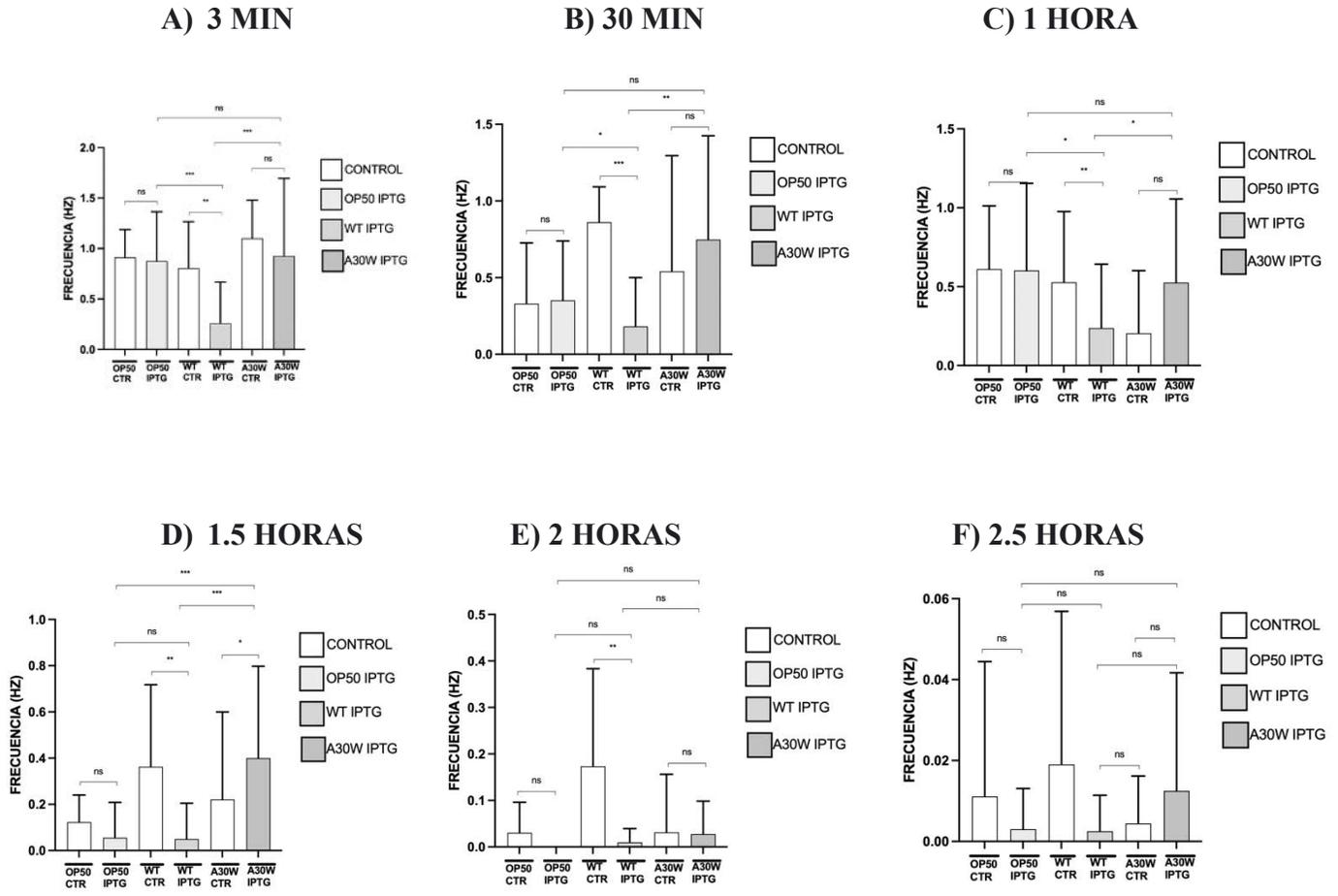


Figura 14. Efecto del péptido A β WT y su mutante A30W sobre la movilidad de *C.elegans* tratados durante 5 días. Se inocularon colonias de *Escherichia coli* BL21 en agar LB y se tomó un grupo con una n de 30 nemátodos induciendo la expresión del péptido A β WT con IPTG y su control; A30W con IPTG y su control; así como *E.coli* OP50 IPTG y su control y se expusieron como alimento a *C. elegans* durante 5 días. La movilidad de los nemátodos fue analizada mediante el software Wrmtrck de Image J. Los datos representan el promedio de al menos 3 experimentos independientes realizados por triplicado \pm DE.

Finalmente, decidimos evaluar si el mutante A30W inducía un mejor efecto sobre la movilidad de los nemátodos, por lo que los tratamos desde estadios larvarios (huevos). Se observó que el péptido A30W indujo un cambio significativo en la movilidad a comparación de sus controles desde los 3 min de análisis, alcanzando valores superiores a 1 Hz; mientras que sí se observó una disminución significativa en la movilidad en nemátodos tratados con el péptido WT, alcanzando valores menores a 0.5 Hz (**Figura 15A**). De manera similar, este efecto se mantuvo al analizar los nemátodos durante 30 min (**Figura 15B**); 1 hora (**Figura**

15C) y 1.5 horas (Figura 15D). Finalmente, a las 2 y 2.5 horas no se observó un cambio significativo en la movilidad en ninguno de los grupos tratados a comparación de sus controles (Figura 15E-F).

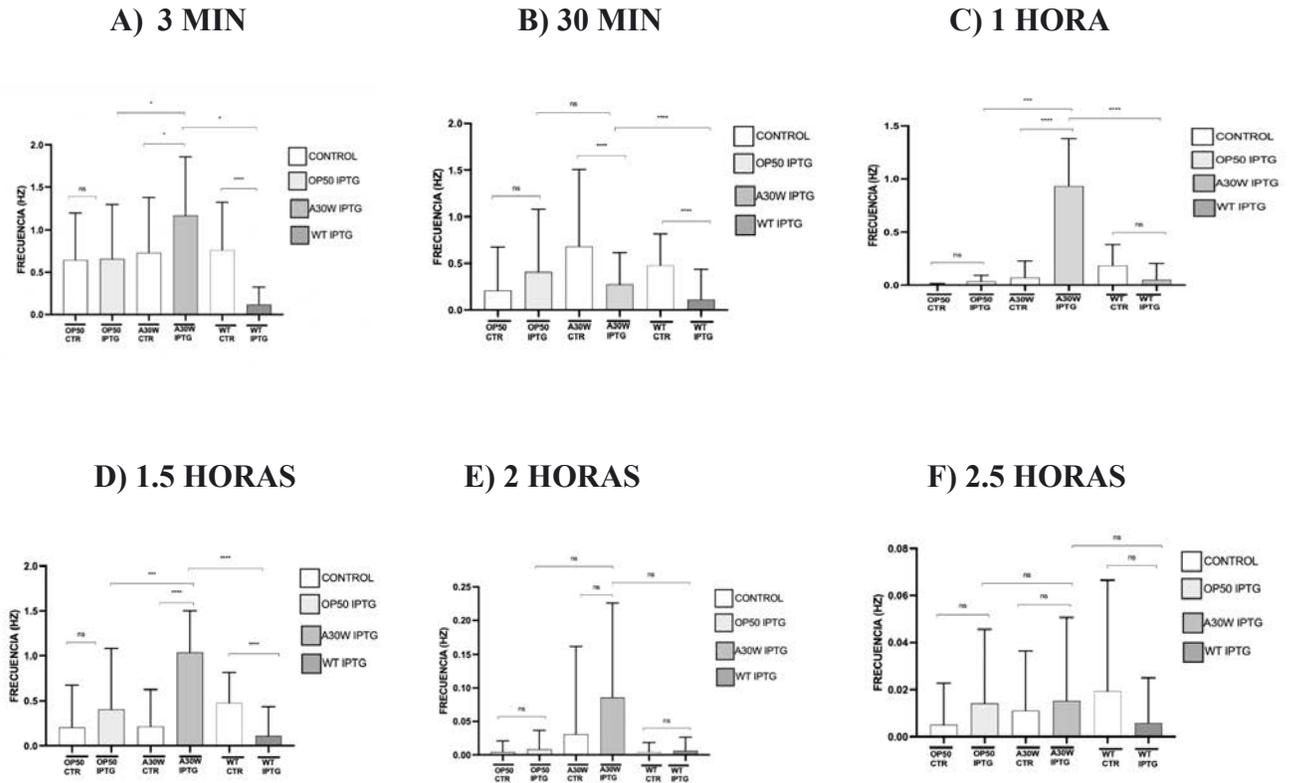


Figura 15. Efecto del péptido A β WT y su mutante A30W sobre la movilidad de *C.elegans* tratados desde estadios larvarios. Se inocularon colonias de *Escherichia coli* BL21 en agar LB y se tomó un grupo induciendo la expresión del péptido A β WT con IPTG y su control; A30W con IPTG y su control; así como *E.coli* OP50 IPTG y su control y se expusieron como alimento a *C. elegans* desde estadios larvarios. La movilidad de los nemátodos fue analizada mediante el software Wrmtrck de Image J. Los datos representan el promedio de al menos 3 experimentos independientes realizados por triplicado \pm DE.

8. DISCUSIÓN

Para evaluar el efecto del péptido A β y su mutante A30W sobre fenotipos asociados a la toxicidad amiloide en un modelo *in vivo* de Alzheimer en *C. elegans*, se probó su expresión en *E. coli* utilizando la cepa transgénica BL21 DE3, y posteriormente se expuso a *C. elegans* a esta bacteria como alimento. Previa investigación han evaluado fenotipos asociados a la toxicidad amiloide utilizando péptidos encapsulados en vesículas (Estrada Rodríguez *et al.* 2018). Sin embargo, dado su alto costo se probó su expresión en *E. coli* como alternativa.

En este sentido, se observó que el péptido WT y su mutante A30W son capaces de expresarse en *E. coli* en forma de cuerpos de inclusión. Investigaciones previas han analizado la expresión del péptido A β en *Escherichia coli* mediante la electroforesis en gel de agarosa y SDS-PAGE, donde se observó que la banda de los geles de agarosa migró conforme al peso correspondiente al péptido A β y la banda en SDS-PAGE migró entre 4-5 kDa, indicando la presencia de los agregados amiloides (Walsh *et al.* 2009).

A la fecha, no se ha evaluado la expresión del mutante A30W en *E. coli*. Sin embargo, dada su naturaleza proveniente del péptido A β , observamos su expresión en forma de cuerpos de inclusión. Una vez que se evaluó que el péptido WT y su mutante A30W eran capaces de expresarse en *E. coli*, decidimos evaluar si eran capaces de migrar hacia intestino y/o hacia otros órganos con la finalidad de explicar su comportamiento en el nemátodo. Para ello, se analizó la dispersión del péptido A β tratándose desde estadíos larvarios (huevos); durante 24 horas; así como durante 5 días. Sin embargo, no pudimos observar una diferencia en la intensidad de fluorescencia entre los nemátodos tratados con respecto a su control.

Previamente se ha descrito que el péptido WT es capaz de migrar hacia intestino e interactuar con neuronas colinérgicas utilizando péptidos sintéticos y analizándolo mediante microscopía confocal (Gallrein *et al.* 2021), por lo que concluimos que sería necesario evaluar la dispersión amiloide utilizando otro tipo de microscopía, o una proteína fluorescente distinta. A pesar de que no pudimos observar si el péptido WT era capaz de migrar hacia intestino y/o hacia otros órganos, decidimos evaluar cuál era su efecto, así como el de su mutante, A30W, sobre fenotipos asociados a la toxicidad amiloide como la viabilidad.

Se observó que el péptido WT indujo una disminución en la viabilidad comparado a sus controles, alcanzando solamente un promedio de 15 días, siendo que la vida media del nemátodo es de alrededor de 21 días. Previa investigación evaluaron el efecto del péptido A β sobre la cepa WT de *C. Elegans* (N2), observando que el péptido A β disminuye la tasa de supervivencia, similar a lo observado en nuestro estudio (Gallrein *et al.* 2021). En este sentido, otros estudios demostraron que la agregación amiloide induce daño a membrana mediante la expresión de proteínas chaperonas como hsp-16 y hsp-70, además de inducir la formación de vesículas endocíticas o endosomas (Gallrein *et al.* 2021; Hassan *et al.* 2015), pudiendo ser un mecanismo del péptido WT para inducir una disminución en la viabilidad de *C. elegans*. Sin embargo, sería necesario evaluar el nivel de expresión de HSP-16 y HSP-70 en nemátodos tratados por el péptido A β para determinar si esto ocurre.

Por otro lado, el péptido mutante A30W no indujo un cambio en la vida media de los nemátodos a comparación de sus controles, sin embargo, sí indujo un incremento en la vida media a comparación del péptido WT, alcanzando valores de hasta 27 días. De manera similar, estudios previos de nuestro grupo de investigación demostraron que la mutación A30W no afectó significativamente la viabilidad de los nemátodos, al tiempo que indujo una extensión en su vida media de hasta 3 días (Quijano-Guerrero 2021).

En este sentido, investigaciones previas demostraron que la sustitución de la Alanina 30 (A30) presente en las láminas β es encargada de la formación y estabilización de fibrillas, por lo que su sustitución por triptófano ha demostrado desestabilizar su estructura (Estrada-Rodríguez *et al.* 2018). A su vez, se demostró que la adición de un residuo de triptófano disminuye la producción de ROS y la concentración de Ca²⁺ intracelular (Kai *et al.* 2007; Hassan *et al.* 2016), pudiendo ser un mecanismo del mutante A30W para no inducir una afectación a la viabilidad de los nemátodos, al tiempo que indujo una extensión en la vida media de hasta 3 días. Sin embargo, sería necesario evaluar la producción de ROS y la concentración de Ca²⁺ intracelular para determinar si esto ocurre.

Una de las principales características que se han asociado a un daño neuromotor en *C. elegans* han sido alteraciones en la movilidad, por lo que nos propusimos evaluar el efecto del péptido WT y su mutante A30W sobre la movilidad de *C. elegans* en distintos tiempos de tratamiento, observando que el péptido WT disminuye significativamente la movilidad de *C. elegans*

desde tiempos cortos de tratamiento (24 horas) indicando las propiedades tóxicas del péptido amiloide sobre *C. elegans*, mientras que su mutante A30W no indujo afectaciones en la movilidad en ninguno de los tiempos analizados, al tiempo que indujo una mejora en la movilidad de los nemátodos tratándose desde estadíos larvarios.

Investigaciones previas han descrito que la agregación amiloide inicia desde las neuronas colinérgicas en *C. elegans*, teniendo como subtipo las neuronas motoras, pudiendo ser un causante en la disminución de la movilidad observada. A su vez, estudios posteriores demostraron que DAF-16 en conjunto con HSF-1 es capaz de regular la agregación amiloide mediante la inhibición de la vía de señalización del factor de crecimiento de insulina 1 (IIS-I), la cual se ha destacado por ser una de las principales vías de toxicidad amiloide, por lo que se evaluó el rol DAF-16 y HSF-1 en un fenotipo de parálisis progresiva, observando que ambos factores mejoran el fenotipo de parálisis (Gallrein *et al.* 2021; Martin y Preedy 2015; Cohen *et al.* 2016), sugiriendo la activación de DAF-16 y HSF-1 como posible mecanismo de toxicidad del péptido amiloide sobre *C. elegans*.

A la fecha, se desconoce el efecto del mutante A30W sobre ambos factores. Sin embargo, dada la naturaleza del mutante A30W derivado del péptido WT, pudiera inducir la activación de DAF-16 y mejorar la movilidad de *C. elegans* de esta manera. Sin embargo, sería necesario evaluar los niveles de expresión de ambos factores en nemátodos tratados con WT y A30W para determinar si esto ocurre.

9. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en esta investigación se concluye que el péptido A β y su mutante A30W son capaces de expresarse en *E.coli* y observarse en forma de cuerpos de inclusión.

A pesar de que no pudimos observar si estos péptidos eran capaces de migrar hacia intestino y/o hacia otros órganos, el péptido WT indujo una disminución en la vida media de los nemátodos, viviendo solamente hasta los 15 días. Por otro lado, el mutante A30W no afectó la vida media de los nematodos en comparación con los controles, pero sí indujo una extensión de la vida media de hasta 6 días.

Finalmente, el péptido A30W indujo una mejora significativa en la movilidad de *C. elegans* cuando los nemátodos se trataron desde estadíos larvarios, mientras que en tratamientos en etapa adulta no indujo cambios significativos en la movilidad en la mayoría de los tiempos analizados. Por el contrario, el péptido WT indujo una disminución significativa en la movilidad de *C. elegans* en todos los tiempos de tratamiento estudiados.

Los resultados obtenidos en esta investigación proveen evidencia fidedigna de que la expresión proteica del péptido WT y su mutante A30W en *E. coli* representan una estrategia efectiva para evaluar el efecto de moléculas terapéuticas sobre fenotipos asociados a la toxicidad amiloide en un modelo *in vivo* de Alzheimer como *C. elegans*.

10. PERSPECTIVAS

- Análisis de la dispersión y efecto de otros mutantes derivados del péptido WT como K28A y M35C sobre *C. elegans*
- Análisis del efecto del péptido WT y los mutantes A30W, K28A y M35C fusionados a la proteína fluorescente mRFP1 sobre *C. elegans*.
- Análisis de la dispersión del péptido WT y los mutantes A30W, K28A y M35C fusionados a la proteína fluorescente mRFP1 en *C. elegans* mediante microscopía confocal.
- Análisis de memoria por quimiotaxis en nemátodos tratados con el péptido WT y los mutantes A30W, K28A y M35C.
- Evaluación de la producción de ROS, Ca⁺² intracelular y la formación de autofagosomas en nemátodos tratados con el péptido WT y los mutantes A30W, K28A y M35C.
- Mecanismo de dispersión del péptido WT y los mutantes A30W, K82A y M35C sobre *C. elegans*.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Alexander AG, Marfil V, Lu C. 2014. Use of *Caenorhabditis elegans* as a model to study Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *Frontiers in Genetics*. 5
- Ávila J, Hernández F. 2007. GSK-3 inhibitors for Alzheimer's disease. *Future drugs*. 7:1527-1533
- Barage SH, Sonawane KD. 2015. Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. 52: 1-18
- Bharadwaj PR, Dubey AK, Masters CL, Martins RN, Macreadie IG. 2009. AB aggregation and possible implications in Alzheimer's disease pathogenesis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 13:412-421
- Boland B, Kumar A, Lee S, Platt FM, Wegiel J, Haug W, Nixon RA. 2008. Autophagy induction and autophagosomes clearance in neurons: relationship to autophagic pathology in Alzheimer's disease. 28: 6926-6937
- Butterfield DA, Sultana R. 2011. Methionine-35 of AB (1-42): Importance for oxidative stress in Alzheimer Disease. *Journal of Amino Acids*. 198430
- Cabrera JR, Fuentealba J, Gavilán J, Cajas D, Becerra J, Napiórkowska M. 2020. Exploring the multi-target neuroprotective chemical space of benzofuran Scaffolds: A new strategy in drug development for Alzheimer's Disease. *Frontiers in Pharmacology*. 10
- Cui WB, Zhang ZP, Bai X, Wang SS, Chen XH, Liu X, Su PJ, Zhi DJ, Fei DQ, Zhang ZX, Wang DS. 2022. Cryptotanshinone alleviates oxidative stress and reduces the level of abnormally aggregated protein in *Caenorhabditis elegans* AD Models. *International Journal of Molecular Sciences*. 23:10030

Colović MB, Krstić DZ, Lazarević-Pašti TD, Bondžić AM, Vasić VM. 2013. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Current Neuropharmacology*. 11:315-335

Cheignon C, Tomas M, Rouselot D, Faller P, Hureau C, Collin F. 2018. Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biol*. 14:450-464

Chow VW, Mattson MP, Wong PC, Gleichmann M. 2010. An overview of APP processing enzymes and products. *Neuromolecular medicine*. 12:1-12

Dai XL, Sun YX, Jiang ZF. 2007. Attenuated cytotoxicity but enhanced β fibril of a mutant amyloid β -peptide with a methionine to cysteine substitution. *FEBS Letters*. 581:1269-1274

Du X, Wang X, Geng M. 2018. Alzheimer's disease hypothesis and related therapies. *Translational neurodegeneration*. 7:2

Estrada AE, Valdez D, Ruíz J, Treviño A, Gómez AM, Martínez HG, Rivas AM, Vidal Tamayo R, Zomosa V. 2018. Effect of single aminoacid substitutions on aggregation and cytotoxicity properties of amyloid β peptide. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. 25:493-509

Feigin VL, Vos T, Nichols E, Owolabi MO, Carrol WM, Dichgans M, Deuschl G, Parmar P, Brainin M, Murray C. 2019. The global burden of neurological disorders: translating evidence into policy. *The Lancet*. 18:459-480

Finkelman HE, Martínez A. 2011. GSK-3 inhibitors: Preclinical and clinical focus on CNS. *Frontiers in molecular neuroscience*. 4:1-18

Funderburk SF, Marcellino BK, Yue Z. 2010. Cell "Self-Eating" (Autophagy) mechanism in Alzheimer's disease. 77:59-68

Gallrein C, Iburg M, Michelberger T, Koçak A, Puchkov D, Liu F, Ayala SM, Nayak T, Kaminski GS, Kirstein J. 2021. Novel amyloid-beta pathology *C. elegans* model reveals distinct neurons as seeds of pathogenicity. *Progress in Neurobiology*. 198:101907

Garai K, Crick SL, Mustafi SM, Frieden C. 2009. Expression and purification of amyloid-B peptides from *Escherichia coli*. *Protein. Exp. Purif.* 66:107-112

Ge M, Zhang J, Chen S, Huang Y, Chein W, He L, Zhang Y. 2022. Role of calcium homeostasis in Alzheimer's disease. *Neuropsychiatric disease and treatment.* 18:487-498

Gu L, Guo Z. 2013. Alzheimer's AB42 and AB40 peptides form interlaced amyloid fibrils. *Journal of Neurochemistry.* 126: 305-311

Ha HJ, Wook D, Kim HM, Kang JM, Ann J, Jung H, Hwan J, Hee S, Kim H, Choi K, Hong HS, Kim Y, Jo DG, Lee J, Lee J. 2018. Discovery of an orally bioavailable benzofuran analogue that serves as a B-amyloid aggregation inhibitor for the potential treatment of Alzheimer's disease. 61.396-402

Hardy JA, Higgins GA. 1992. Alzheimer's disease: The amyloid Alzheimer's disease. *Science.* 256:184-185

Hassan WM, Dostal V, Huemann BN, Yerg JE, Link CD. 2015. Identifying AB-specific pathogenic mechanisms using a nematode model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging.* 36:857-866

Herholz K. 2008. Acetylcholine esterase activity in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging.* 35:25-29

Julien C, Tomberlin C, Roberts CM, Akram A, Stein GH, Silverman MA, Link CD. 2018. In vivo induction of membrane damage by B-amyloid peptide oligomers. *Acta NeuropathologicaCommunications.* 6:131

Kang N, Luan Y, Jang Y, Chen W, Liu Y, Su Z, Liu Y, Tan P. 2022. Neuroprotective effects of oligosaccharides in *Rehmannia radix* on transgenic *Caenorhabditis elegans* models for Alzheimer's disease. *Frontiers in Pharmacology.* 13:878631

- Kellet KA, Hooper NM. 2009. Prion protein and Alzheimer disease. *Prion*. 3:190-194
- Kondepudi DK, Kaufman RJ, Singh N. 1990. *Science*. 250:975
- Kumar S, Paul A, Kalita S, Kumar A, Mandal B, Chandra A. 2016. Protective effects of B-sheet breaker α/β -hybrid peptide against amyloid β -induced neuronal apoptosis in vitro. *Chemical Biology & Impact Design*. 89:888-900
- Kojro E, Fahrenholz F. 2005. The non-amyloidogenic pathway: structure and function of alpha-secretases. *Sub-cellular biochemistry*. 38: 105-127
- Lacorte E, Ancidoni A, Zaccaria V, Remoli G, Tariciotti L, Bellomo G, Sciancalepore F, Corbo M, Lombardo FL, Bacigalupo I, Canevelli M, Piscopo P, Vanacore N. 2022. Safety and efficacy of monoclonal antibodies for Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis of published and unpublished clinical trials. *Journal of Alzheimer Disease*. 87:101-129
- Linse S. 2019. Mechanism of amyloid protein aggregation and the role of inhibitors. *Pure and applied chemistry*. 91:211-219
- Liting D, Paul H, Yunqi W, Ardeshir A, Shantaram K, Jemma W, Kanishka P, Veer G, Stuart G, Vivek G, Mirzaei M. 2020. Amyloid-beta peptide neurotoxicity in human neuronal cells is associated with modulation of insulin-like growth factor transport, lysosomal machinery and extracellular matrix receptor interactions. 15: 2131-2142
- Mehta M, Adem A, Sabbagh S. 2011. New acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *International Journal of Alzheimer's Disease*. 2012:728983
- Mucke L, Selkoe DJ. 2012. Neurotoxicity of Amyloid β -Amyloid protein: Synaptic and network dysfunction. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 7
- Muñoz F, Rodríguez MJ, Naranjo FJ, Shepard F, Gaffney CJ, Szewczyk NJ, Hamamichi S, Caldwell KA, Caldwell GA, Link CD, Vizuete AM. 2014. Protective role of DNJ-27/ERdj5 in *Caenorhabditis elegans* models of human neurodegenerative diseases. *Antioxid Redox Signal*. 10:217-235
- NIA. 2021. Alzheimer's disease fact sheet. [En línea] Disponible

en:<https://www.nia.nih.gov/health/alzheimers-disease-fact-sheet>

NIH. 2022. Neurodegenerative diseases. [En línea] Disponible en:<https://www.niehs.nih.gov/research/supported/health/neurodegenerative/index.cfm#:~:text=Neurodegenerative%20diseases%20affect%20millions%20of,Alzheimer's%20Disease%20Association%20in%202022.>

Novick PA, Lopes DH, Branson KM, Esteras A, Graef IA, Bitan G, Pande VS. 2012. Design of β -Amyloid Aggregation inhibitors from a predicted structural motif. *Journal of Medicinal Chemistry*. 55:3002-3010

Ochiishi T, Doi M, Yamasaki K, Hirose K, Kitamura A, Urabe T, Hattori N, Kinjo M, Ebihara T, Shimura H. 2016. Development of new fusion proteins for visualizing amyloid-B oligomers in vivo. *Scientific Reports*. 6:1-15

Orgel LE. 1996. *Chemical Biology*. 3:413

Pagano K, Tomasselli S, Molinari H, Ragona L. 2020. Natural compounds as inhibitors of AB peptide aggregation: chemical requirement and molecular mechanisms. *Frontiers in neuroscience*. 14

Quijano-Guerrero D. 2021. Evaluación del efecto de la capacidad inhibitoria de la agregación de los mutantes A30W, K28A, M35C y β -amiloide en un modelo in vivo de *C. elegans*. Facultad de Ciencias Biológicas.

Shi M, Chu F, Zhu F, Zhu J. 2022. Impact of anti-amyloid B monoclonal antibodies on the pathology and clinical profile of Alzheimer's disease: A focus on Aducanumab and Lecanemab. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 14

Shuaib S, Saini RK, Goyal D, Goyal B. 2020. Impact of K16A and K28A mutation on the structure and dynamics of amyloid- β 42 peptide in Alzheimer's disease: key insights from molecular dynamics simulations. *Journal of Biomolecular structure and dynamics*. 38:708-721

Sun X, Dong W, Dong Y. 2015. β -Amyloid: the key peptide in the pathogenesis of

Alzheimer's disease. *Frontiers in Pharmacology*. 6

Szablewski L. 2021. Brain glucose transporters: role in pathogenesis and potential targets for the treatment of Alzheimer's disease. *29:8142*

Tolar M, Abushakra S, Hey JA, Porsteinsson A, Sabbagh M. 2020. Aducanumab, gantenerumab, BAN2401 and ALZ-801: the first wave of amyloid-targeting drugs for Alzheimer's disease with potential for new term approval. *Alzheimers Res Ther*. 12:95

Terry VA, Buccafusco JJ. 2003. The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapy*. 306:821-827

Walsh DM, Thulin E, Minogue AM, Gustavsson N, Pang E, Teplow DB, Linse S. 2009. A facile method for expression and purification of the Alzheimer's disease-associated amyloid β peptide. *The FEBS Journal*. 276:1266-1281

Wisniewski T, Drummond E. 2020. APOE-amyloid interaction: therapeutic targets. *Frontiers in Neuroscience*. 138:104784

World Health Organization. 2022. Dementia. [En línea] Disponible en:<https://www.who.int/newsroom/factsheets/detail/dementia#:~:text=Alzheimer's%20disease%20is%20the%20most,dependency%20among%20older%20people%20globally>

Wu Y, Wu Z, Butko P, Christen Y, Lambert MP, Klein WL, Luo Y. 2006. Amyloid-B induced pathological behaviors are suppressed by Ginkgo biloba extract EGB761 and ginkgolides in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Neuroscience*. 26:13102-13113

Xiao X, Liu H, Liu X, Zhang W, Zhang S, Jiao B. APP, PSEN1, and PSEN2 variants in Alzheimer's disease: Systematic re-evaluation according to ACMG guidelines. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 13.

Žganec M, Kruczek N, Urbanc B. 2016. Amino acid substitutions [K16A] and [K28A] distinctly affect amyloid β -protein oligomerization. *Journal of biological physics*. 42: 453–476.

Zhou Q, Li S, Li M, Ke D, Wang Q, Yang Y, *et al.* 2022. Human tau accumulation promotes glycogen synthase kinase-3B acetylation and thus upregulates the kinase: A vicious cycle in Alzheimer neurodegeneration. *eBioMedicine*. 78:103970

12. RESUMEN BIOGRÁFICO

Mizael Izaguirre Rodríguez

Candidato para el grado de Maestro en Ciencias con Orientación en Inmunobiología

Título de tesis: ANÁLISIS DE LA DISPERSIÓN Y EFECTO DEL PÉPTIDO MUTANTE A30W Y A β SOBRE UN MODELO IN VIVO DE *C. ELEGANS*

Campo de estudio: Biología molecular e ingeniería genética

Datos personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León el 6 de marzo del 2000.

Educación: Egresado de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido de Lic. Químico Bacteriólogo Parasitólogo, 2022. Tesis titulada: “Estudio del efecto citotóxico inducido por el Immunepotent CRP en combinación con ciclofosfamida o etopósido en células de leucemia linfocítica aguda de células T.”

Reconocimientos:

- Acreditación del Examen General de Egreso de Licenciatura (EGEL), 2022.
- Mención honorífica por defensa de tesis titulada: “Estudio del efecto citotóxico inducido por el Immunepotent CRP en combinación con ciclofosfamida o etopósido en células de leucemia linfocítica aguda de células T”, para obtener el grado Lic. Químico Bacteriólogo Parasitólogo, 2022.
- Acreditación del Examen de Inglés TOEFL-IBT nivel B2, 2022.

Experiencia profesional:

- Asistente de investigación en Laboratorio de Ecomateriales y Energía, Facultad de Ingeniería Civil, Universidad Autónoma de Nuevo León (Noviembre 2020-Abril 2021). Actividades: Elaboración de gel antibacterial, calibración del viscosímetro, cámara de intemperismo y mufla.
- Evaluador en II Evento de Estudiantes de Psicología y Neurociencias. Monterrey, México. Octubre 2022

Presentaciones en modalidad póster:

- “El Immunepotent CRP en combinación con ciclofosfamida o etopósido induce citotoxicidad sinérgica en células CEM y L5178Y-R”. XXII Reunión Internacional de Ciencias Médicas. León, México. Agosto 2022.
- “Immunepotent CRP in combination with cyclophosphamide or etoposide induces synergistic cell death in tumoral T-cell lymphoblasts”. Querétaro, México. Junio 2023.

Presentaciones en modalidad oral:

- “El Immunepotent CRP en combinación con ciclofosfamida o etopósido induce citotoxicidad sinérgica en células CEM y L5178Y-R”. Congreso Nacional de Investigación de Innovación en Medicina.

Cursos/Capacitaciones:

- Introducción a toma de muestra sanguínea. Monterrey, México. Agosto 2017.
- Sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control. Monterrey, México. Junio 2024.