UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS PÉPTIDOS MUTANTES A30W, K28A Y M35C EN FENOTIPOS ASOCIADOS A LA EXPRESIÓN DEL PÉPTIDO β -AMILOIDE EN *C. elegans* Y SUS POSIBLES MECANISMOS DE PROTECCIÓN CONTRA LA TOXICIDAD DE Aβ.

POR

DIANA PATRICIA QUIJANO GUERRERO

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA

2026

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS PÉPTIDOS MUTANTES A30W, K28A Y M35C EN FENOTIPOS ASOCIADOS A LA EXPRESIÓN DEL PÉPTIDO β -AMILOIDE EN *C. elegans* Y SUS POSIBLES MECANISMOS DE PROTECCIÓN CONTRA LA TOXICIDAD DE Aβ.

Comité de Tesis

Dra. Ana Carolina Martinez Torres

Director de tesis

Dra. Cristina Rodríguez Padilla

Secretario

Dra. Viviana Chantal Zomosa Signoret

Vocal 1

DIANA CABALLERO

Dra. Diana Elia Caballero Hernádez

Vocal 2

Dr. Román VidalTamayo

Vocal 3

SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO

Dra. Katiushka Arévalo Niño

Subdirectora de Posgrado

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS PÉPTIDOS MUTANTES A30W, K28A Y M35C EN FENOTIPOS ASOCIADOS A LA EXPRESIÓN DEL PÉPTIDO β -AMILOIDE EN *C. elegans* Y SUS POSIBLES MECANISMOS DE PROTECCIÓN CONTRA LA TOXICIDAD DE Aβ.

Dirección de Tesis



Dra. Ana Carolina Martinez Torres

Director de tesis



Dra. Viviana Chantal Zomosa Signoret

Director externo

HOJA DE DERECHOS RESERVADOS

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido 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.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Viviana Zomosa Signoret y el Dr. Román Vidaltamayo por su apoyo, guía y confianza que fue vital para el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Ana Carolina Martínez Torres, por la oportunidad, y a todo el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas.

Al Dr. Rubén de Jesús Montalvo Méndez por ser una constante fuente de plásmidos, consejos y café.

A todos los miembros del comité por su apoyo y observaciones.

A la directora del Centro de Excelencia en Ciencias Médicas e Innovación (CECMI) de la UDEM por permitirme el uso de los laboratorios.

A todas las personas del CECMI que me brindaron ayuda, conversación y palabras de aliento.

A todos los chicos del curso de asistente de investigación de la UDEM por sus ganas de aprender cosas nuevas.

Agradezco a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) la beca de manutención que me fue otorgada durante el periodo del posgrado. Este trabajo fue posible gracias al apoyo de Ciencia Básica no. 2018-A116282.

DEDICATORIAS

A mis gatitos,

mi familia y Joan

y a mí, tal vez.

"-I produced a detailed tribute to my wrongness.

-That is science."

-Nathan W. Pyle (2025)

ÍNDICE

RESUMEN 1
ABSTRACT 2
1. INTRODUCCIÓN 3
2. ANTECEDENTES 5
2.1 La enfermedad de Alzheimer 5
2.2 Etiología del Alzheimer 6
2.3 Producción del péptido Aβ 8
2.4 Estructura y agregación del péptido Aβ 9
2.5 Toxicidad del péptido Aβ 11
2.6 Inhibidores de la agregación de Aβ 12
2.7 *Caenorhabditis elegans*: descripción general 13
2.8 Estudio de la patología de Aβ en *C. elegans* 14
2.9 *Caenorhabditis elegans* para el estudio de tratamientos contra Aβ 16
3. JUSTIFICACIÓN 19
4. HIPÓTESIS 20
5. OBJETIVOS 21
5.1 Objetivo General 21
5.2 Objetivos específicos 21
6. MATERIAL Y MÉTODOS 22
6.1 Plásmidos 22
6.2 Cepas de *C. elegans* 22
6.3 Mantenimiento de nemátodos 23
6.4 Expresión de péptidos, y sincronización y tratamiento de nemátodos 23
6.5 Efecto de los péptidos mutantes A30W, K28A y M35C sobre rasgos fisiológicos y del comportamiento. 24
6.5.1 Ensayos de viabilidad 24
6.5.2 Ensayos de parálisis 24
6.5.3 Tasa de progenie 25
6.6 Mecanismos de protección de los péptidos mutantes A30W, K28A y M35C contra la toxicidad Aβ 25

6.6.1 Tinción de agregados de Aβ 25
6.6.2 Estrés oxidativo 25
6.6.3 Fugas de calcio 26
6.7 Inducción de la vía de señalización Daf-16 por los péptidos mutantes A30W, K28A y M35C 26
6.7.1 Localización celular de Daf-16 26
6.7.2 Detección de autofagosomas 27
6.8 Análisis estadístico 27
7. RESULTADOS 28
7.1 Expresión de los péptidos en *E. coli* 28
7.2 Efecto de los péptidos en la viabilidad y parálisis de nemátodos 29
7.3 Efecto de los péptidos en la eclosión interna de nemátodos 30
7.4 Efecto de los péptidos en la fecundidad de los nemátodos 31
7.5 Efecto en la formación de agregados amiloides 32
7.6 Efecto en el estrés oxidativo 33
7.7 Efecto en la homeostasis del calcio 34
7.8 Efecto en la localización celular de Daf-16 35
7.9 Efecto en la autofagia 36
8. DISCUSIÓN 38
9. CONCLUSIONES 45
10. PERSPECTIVAS 46
11. BIBLIOGRAFÍA 47
12. RESUMEN BIBLIOGRÁFICO 63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas de *Caenorhabditis elegans* 22

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Expresión del péptido Aβ en *E. coli*. 28
Figura 2. Efecto en la viabilidad de las cepas CL2006 y CL802 de *C. elegans.* 29
Figura 3. Efecto en la parálisis en la cepa CL4176 de *C. elegans* 30
Figura 4. Efecto en la eclosión interna de los nemátodos. 31
Figura 5. Efecto en la fecundidad de los nemátodos. 32
Figura 6. Efecto en la formación de agregados insolubles. 33
Figura 7. Efecto en el estrés oxidativo de nemátodos CL4176 y CL802. 34
Figura 8. Efecto en la homeostasis del calcio. 35
Figura 9. Efecto en la localización de Daf-16. 36
Figura 10. Efecto en la autofagia. 37

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

A30W: Péptido Aβ con sustitución de la alanina 30 por triptófano.

Aβ: Péptido β-amiloide.

Aβ-42: Péptido β-amiloide de 42 aminoácidos.

APP: Proteína precursora de Aβ

EA: Enfermedad de Alzheimer.

K28A: Péptido Aβ con sustitución de la lisina 28 por alanina.

L4: Estadio larvario 4.

M35C: Péptido Aβ con sustitución de la metionina 35 por cisteína.

NGM: Medio de crecimiento para nemátodos.

ROS: Especies reactivas de oxígeno.

TGN: Red del trans Golgi.

THS: Tioflavina S.

WT: Péptido Aβ *wildtype*.

RESUMEN

La agregación del péptido β-amiloide (Aβ) en oligómeros y agregados fibrilares es uno de los procesos patológicos principales de la enfermedad de Alzheimer (EA). Previamente, se observó que tres variantes del péptido Aβ con las sustituciones puntuales A30W, K28A, y M35C, respectivamente, son menos tóxicas, tienen menor tendencia a agregarse y pueden inhibir la formación de agregados *in vitro* del péptido Aβ *wildtype*. Por lo tanto, en este trabajo se buscó evaluar el efecto de las tres variantes en un modelo *in vivo*. El nemátodo de vida libre *Caenorhabditis elegans* se utiliza ampliamente como modelo de la EA, ya que es posible inducir la patología amiloide mediante la expresión del péptido Aβ humano. Para el tratamiento de *C. elegans*, los péptidos se expresaron en *Escherichia coli,* y se utilizó la bacteria transformada como alimento a los nemátodos. Se utilizaron las cepas CL2006 con expresión constitutiva de Aβ en tejido muscular, y la cepa CL4176 con expresión inducible por temperatura de Aβ muscular. La exposición a los péptidos aumentó el tiempo de vida de nemátodos CL2006, mientras que el péptido WT redujo la viabilidad. En particular, el péptido A30W también prolonga la vida de nemátodos control, sugiriendo un efecto sobre el envejecimiento. Por su parte, en los nemátodos CL4176, únicamente los péptidos M35C y WT lograron retrasar el establecimiento de la parálisis, independientemente de la inducción del estrés oxidativo. Adicionalmente, se observó que la expresión de Aβ en los nemátodos CL4176 reduce la señalización de calcio, la cual no pudo restaurarse mediante los tratamientos. Estos resultados mostraron que los péptidos A30W, K28A y M35C pueden proteger a *C. elegan*s frente a la toxicidad de Aβ mediante la reducción de los agregados fibrilares, la alteración del proceso de envejecimiento o la interacción con oligómeros. Además, las variantes son capaces de alterar la autofagia y el flujo de calcio de nemátodos control. En general, las observaciones sugieren que las sustituciones A30W, K28A y M35C podrían aplicarse en el desarrollo de tratamientos para la EA.

ABSTRACT

Aggregation of amyloid beta peptide (Aβ) into toxic oligomers and fibrils is one of the major events that drives Alzheimer´s disease pathology. It was previously observed that three Aβ variants with the amino acid substitutions A30W, K28A, and M35C display reduced cytotoxicity and aggregation, and decrease the formation of Aβ wild-type (WT) aggregates. *Caenorhabditis elegans* has been widely used as a model for AD, as expression of human Aβ in muscle cells induces amyloid pathology in the nematode. In this study, the Aβ WT peptide and the A30W, K28A, and M35C variants were expressed in *E. coli* and fed to *C. elegan*s. The CL2006 strain with constitutive expression of muscular Aβ, which led to the formation of fibrillar aggregates, was used. In these worms, the three variants increased lifespan, whereas the WT peptide reduced viability. Interestingly, the A30W variant also increased the longevity of the control strain CL802. In the temperature-sensitive strain CL4176, only M35C and WT delayed the onset of paralysis, a phenotype related to the formation of toxic oligomers. This effect was independent of oxidative stress, as only K28A treatment reduced the induction of reactive oxygen species (ROS), whereas A30W increased ROS. Additionally, it was observed that Aβ expression in CL4176 reduced the calcium signal, which our treatments couldn't restore. Results show that the A30W, K28A, and M35C variants can protect *C. elegan*s by reducing Aβ fibrillar aggregates, altering aging, or targeting oligomers. Moreover, the substitutions altered calcium flux and autophagy in control worms. Overall, this suggests that the amino acid substitutions A30W, K28A, and M35C in the peptide could be used to develop treatments for Alzheimer's disease.

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo progresivo e irreversible, reconocido como la principal causa de demencia senil a nivel mundial. En general, la sintomatología de la EA se caracteriza por una pérdida progresiva de la memoria, con la aparición gradual de deficiencias cognitivas, de lenguaje y visoespaciales. De acuerdo con su neuropatología, la presentación de los síntomas está asociada a la neurodegeneración en áreas específicas del cerebro, por lo que aparecen en etapas avanzadas de la enfermedad (Association, Alzheimer. Thies, W. and Bleiler, 2013). En una evaluación microscópica del cerebro se detectan placas amiloides extracelulares y ovillos neurofibrilares intracelulares, ambos considerados biomarcadores y lesiones más características de la EA, cuya presencia es necesaria para el diagnóstico definitivo de la enfermedad (Deture & Dickson, 2019). Específicamente, las placas amiloides están formadas por agregados fibrilares del péptido β-amiloide (Aβ), que se origina del procesamiento proteolítico de la proteína APP (Rak et al., 2007). La patogenicidad de Aβ parece derivarse de una "ganancia de función tóxica", en la que los monómeros del péptido forman agregados que pierden sus funciones fisiológicas y generan toxicidad. En este contexto, se ha observado que los oligómeros solubles del péptido actúan como los principales agentes patológicos, mientras que los agregados insolubles podrían servir como reservorios de oligómeros bioactivos (Bi & Daggett, 2018).

En general, los mecanismos de toxicidad del péptido Aβ incluyen la desestabilización de membranas y la inducción de estrés oxidativo mediante la producción de especies reactivas de oxígeno (Reiss et al., 2018). Actualmente, no existe ningún tratamiento efectivo para la EA y los fármacos probados hasta el momento han mostrado escasa mejoría cognitiva y no han logrado alterar la progresión de la enfermedad, además de estar asociados a la aparición de efectos secundarios graves (P. P. Liu et al., 2019). Por lo anterior, el diseño de mutantes de Aβ para su uso como inhibidores de la agregación del péptido ha surgido como una alternativa, ya que ofrece la posibilidad de una acción específica, con baja toxicidad y efectos clínicos significativos (Estrada & Soto, 2006)

Se ha demostrado que las mutaciones puntuales M35C, A30W y K28A, las cuales se localizan en regiones clave en la secuencia aminoacídica para la agregación e inducción de toxicidad del péptido Aβ, resultan en una reducción en la citotoxicidad y una disminución de la inducción de estrés

oxidativo in vitro en comparación con el péptido Aβ wildtype (WT) (Dai et al., 2007; Estrada & Soto, 2006; Yoshiike et al., 2007). Adicionalmente, una co-incubación demostró que las mutantes podían desorganizar agregados WT preformados e impedir su agregación *de novo* (Estrada-Rodríguez et al., 2019).

Por otro lado, el nemátodo de vida libre *Caenorhabditis elegans* es un organismo modelo ampliamente utilizado para el estudio de enfermedades neurodegenerativas y para el tamizaje de moléculas exógenas con posible actividad terapéutica (Kaletta & Hengartner, 2006). Por lo tanto, en este trabajo se buscó confirmar los efectos protectores de los péptidos mutantes A30W, K28A y M35C frente a la toxicidad del péptido Aβ WT en *C. elegans* y determinar algunos de los posibles mecanismos implicados en dicha protección.

2. ANTECEDENTES

2.1 La enfermedad de Alzheimer

La demencia es un término general que describe una pérdida de habilidades cognitivas que afecta las funciones sociales y ocupacionales, y disminuye la calidad de vida de quien las padece (Arvanitakis et al., 2019). Se estima que alrededor de 57 millones de personas viven con demencia, cifra que podría alcanzar los 153 millones en el 2050 (Livingston, et al, 2024). En México, aproximadamente 1.3 millones de personas padecen demencia y se espera un número de hasta 3.5 millones para el año 2050 (Gutiérrez-Robledo & Arrieta-Cruz, 2015). El desarrollo de la demencia puede deberse a distintas enfermedades o a una lesión cerebral, sin embargo, del 60 al 80% de los casos se asocian a la enfermedad de Alzheimer (EA), un desorden neurodegenerativo progresivo e irreversible (Association, Alzheimer. Thies, W. and Bleiler, 2013).

La EA es un trastorno neurodegenerativo progresivo e irreversible. Usualmente, se presenta con pérdida de memoria episódica, es decir, de la capacidad de recordar y retener experiencias personales recientes. También, se presentan otras deficiencias cognitivas, como problemas de atención y razonamiento, además de alteraciones del lenguaje y visoespaciales, y cambios en el estado de ánimo y el comportamiento (Atri, 2019; Perera Molligoda Arachchige et al., 2026). Esta sintomatología se asocia a la muerte neuronal que se inicia en el tallo cerebral y se extiende hacia la corteza entorrinal, las regiones del sistema límbico, como el hipocampo y la amígdala, e incluso hacia estructuras corticales. De forma macroscópica se observa una atrofia cortical moderada, un agrandamiento de los cuernos frontales y temporales de los ventrículos laterales y una disminución del peso del cerebro (Deture & Dickson, 2019; Thal et al., 2025). En una observación microscópica, la neurodegeneración en estas zonas se acompaña de la aparición de agregados proteicos. En el espacio extracelular se observan placas amiloides formadas por la deposición del péptido β-amiloide (Aβ), mientras que en el espacio intracelular se observan ovillos neurofibrilares compuestos por proteína tau anormalmente hiperfosforilada. La presencia de ambos tipos de agregados es necesaria para el diagnóstico de la EA, y su aparición precede la presentación de los síntomas hasta por 20 años (Deture & Dickson, 2019).

El riesgo de desarrollar la EA aumenta con la edad. La enfermedad afecta típicamente a adultos a partir de los 65 años. Desde esta edad, el riesgo se duplica cada 5 años, hasta alcanzar el 50% a los

85 años. Otros factores no modificables que aumentan el riesgo de la EA incluyen los antecedentes familiares, el síndrome de Down y la presencia de variantes genéticas específicas. Por otro lado, entre los factores adquiridos que incrementan el riesgo se encuentran las enfermedades metabólicas, como la obesidad y la diabetes, las lesiones cerebrales, la depresión, la poca actividad física y la baja reserva cognitiva (A. Armstrong, 2019; Atri, 2019). La EA afecta particularmente a las mujeres, pues representan dos de cada tres pacientes diagnosticados. Esta vulnerabilidad parece estar asociada tanto a factores biológicos, como las hormonas y el metabolismo, como a factores sociales, incluyendo la diferencia en el acceso a la educación. Sin embargo, aún falta más investigación para entender y atender esta disparidad de género (Lopez-Lee et al., 2024).

2.2 Etiología del Alzheimer

Desde su primera descripción en 1907 por el médico alemán Alois Alzheimer, se ha buscado comprender la causa de la EA. Inicialmente, surgió la hipótesis colinérgica a partir de la observación de una pérdida de la señalización de acetilcolina en áreas afectadas del cerebro desde etapas tempranas de la enfermedad. Además, esta disfunción colinérgica se correlaciona con el grado de deterioro cognitivo (Francis et al., 1999). Sin embargo, otros sistemas de neurotransmisores también se encuentran desregulados durante la patología, incluidos los glutamatérgico y serotoninérgico, lo que descarta que la patología se deba a la pérdida de un solo tipo de señalización. A su vez, las terapias basadas en alguno de estos neurotransmisores han demostrado una mejora escasa o nula en la cognición de los pacientes con la EA (Scarano et al., 2025).

El estudio de las variantes genéticas asociadas a la EA familiar ha sido uno de los principales focos de investigación para esclarecer su etiología. La EA familiar es una forma de inicio temprano de la enfermedad, heredada de forma autosómica dominante, que representa el 5% del total de casos. Su aparición se relaciona principalmente con mutaciones en los genes *PSEN1*, *PSEN2* y *APP*. El gen APP codifica la proteína precursora de β-amiloide (APP), mientras que los genes PSEN1 y PSEN2 codifican las presinilinas 1 y 2. Estas tres proteínas forman parte de la vía que conduce a la producción del péptido Aβ (Barber, 2012). Por su parte, las personas que acarrean el alelo ε4 del gen *APOE*, presentan un incremento significativo en el riesgo de desarrollar la forma más común de la enfermedad, la EA esporádica de inicio tardío. La lipoproteína codificada por el gen *APOE*

tiene la capacidad de unir proteínas amiloides incluyendo el péptido Aβ, y la presencia del alelo ε4 lleva a un mayor número de placas amiloides en el cerebro de los pacientes (C. C. Liu et al., 2013). Una forma adicional de la EA es la observada en el síndrome de Down. El gen *APP* se localiza en el cromosoma 21, por lo que la copia extra provoca un aumento patológico de la cantidad de la proteína y del péptido Aβ (Bertram et al., 2010; Piaceri, 2013).

Estas evidencias genéticas llevaron al desarrollo de la hipótesis de la cascada amiloide, que sitúa la producción y acumulación de Aβ en placas amiloides como el evento central de la EA (Hardy & Higgins, 1992). Otras observaciones que apoyaron esta hipótesis incluyen el efecto neurotóxico de altas concentraciones de agregados de Aβ *in vitro* (Yankner & Lu, 2009), y el desarrollo de la neuropatología típica de la EA en ratones con sobreexpresión de Aβ (Quon et al., 1991).

Sin embargo, rápidamente surgieron objeciones a esta hipótesis, principalmente debido a la presencia de depósitos de Aβ en personas y modelos animales que no presentaban disfunción cognitiva (Arriagada et al., 1992; Kametani & Hasegawa, 2018). Esta contradicción resaltó el posible papel de otro factor: la proteína Tau. Tau es una proteína asociada a microtúbulos que favorece la estabilidad y el transporte a través de los microtúbulos axonales en las neuronas. En la EA, se observa una hiperfosforilación de Tau que provoca su disociación de los microtúbulos y su acumulación en las neuronas en forma de ovillos neurofibrilares. La aparición de estos agregados está tan estrechamente relacionada con la neurodegeneración y la progresión de la disfunción cognitiva de la EA que se utiliza para la categorización de las etapas de la enfermedad. Además, la acumulación de Tau se observa en otras patologías neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington. Sin embargo, la conexión entre Tau y otros procesos patológicos característicos de la EA era poco clara y, al igual que las hipótesis sobre los neurotransmisores, los tratamientos cuyo blanco es la proteína Tau han demostrado poca eficacia (Cáceres et al., 2023; Kametani & Hasegawa, 2018; J. Yang et al., 2024).

La hipótesis de la cascada amiloide se reavivó y continúa siendo la más aceptada gracias al descubrimiento de los oligómeros de Aβ en cerebros de pacientes (Gong et al., 2003), los cuales presentan una alta actividad neurotóxica (Lambert et al., 1998) y, a diferencia de los agregados fibrilares, sí correlacionan con el nivel de neurodegeneración (Lue et al., 1999). A su vez, se ha demostrado que los oligómeros de Aβ pueden inducir la hiperfosforilación y la agregación de Tau, principalmente mediante la activación de cinasas. De forma similar, estos agregados pequeños y

solubles de Aβ se han relacionado con la inhibición de receptores colinérgicos y la disminución de receptores glutamatérgicos post-sinápticos (Nong et al., 2025)). Aun así, ha surgido debate sobre el enfoque en el péptido Aβ, ya que ningún tratamiento desarrollado con base en esta hipótesis ha demostrado una gran eficacia (Cáceres et al., 2023).

2.3 Producción del péptido Aβ

La biogénesis del péptido Aβ comienza con la expresión del gen de la proteína precursora de Aβ (APP). *APP* pertenece a una familia génica que, en mamíferos, también incluye los genes que codifican las proteínas similares a APP 1 y 2 (APLP1 y APLP2). Los miembros de esta familia son proteínas integrales de membrana con un único paso transmembranal, un gran dominio extracelular y una cola citoplasmática corta. Además, presentan motivos conservados de aminoácidos, como los dominios E1 y E2, pero únicamente APP presenta la secuencia de Aβ (Bayer et al., 1999; O'Brien & Wong, 2011; H. Zheng & Koo, 2006). El gen APP consta de 19 exones que atraviesan procesos de empalme alternativo, dando lugar a hasta 8 isoformas distintas. La isoforma de 695 aminoácidos, APP695, es la más abundante en el cerebro y la más susceptible a producir el péptido Aβ (Belyaev et al., 2010; J. Chen et al., 2013).

En las neuronas, APP se produce en grandes cantidades y se metaboliza rápidamente a través de al menos dos vías de procesamiento proteolítico, que dependen en gran medida de su localización celular. Inicialmente, APP es sintetizada en el retículo endoplasmático y, a lo largo de la vía secretora, es procesada en la red trans del aparato de Golgi (TGN). La vía de procesamiento no amiloidogénica, es decir, que no termina en la producción del péptido Aβ, tiene lugar en la membrana celular y en la TGN. En esta vía, la α-secretasa, una endoproteasa membranal, corta a APP en un sitio interno de la secuencia de Aβ, generando el fragmento N-terminal soluble sAPPα y el fragmento membranal C-terminal CTF83. Posteriormente, el fragmento CTF83 es cortado por la γ-secretasa, un complejo multiproteico que incluye las presenilinas 1 y 2 (PSEN1 y PSEN2), la nicastrina y APH-1, lo que genera los fragmentos p3 y el dominio intracelular de APP AICD (O'Brien & Wong, 2011).

Las moléculas de APP que no fueron procesadas en la membrana celular por la α-secretasa pueden ser reinternalizadas en endosomas de reciclaje, e incluso, pueden ser transportadas de regreso al TGN (Das et al., 2015; O'Brien & Wong, 2011). En los endosomas, se localiza la β-secretasa o

BACE1, una aspartil-proteasa de membrana que media la ruta amiloidogénica al cortar a APP en un sitio adyacente a la secuencia de Aβ, generando los fragmentos sAPP-β y CTF99 (Cai & Sesti, 2009; Cole & Vassar, 2007). El fragmento sAPP-β, al igual que el fragmento sAPPα, es liberado al espacio extracelular, mientras que CTF99 es cortado por el complejo γ-secretasa, lo que produce el fragmento AICD y el péptido Aβ que es secretado al espacio extracelular (O'Brien & Wong, 2011). Dependiendo del corte de la γ-secretasa, el tamaño de Aβ puede variar de entre 37 a 43 aminoácidos (Gasca-Martínez et al., 2026). La isoforma más común es la de 40 aminoácidos (Aβ40) que representa del 50 al 70% de Aβ en el líquido cefalorraquídeo, mientras que el 10% corresponde Aβ42, la principal isoforma relacionada con la patología de la EA (Qiu et al., 2015).

Después de su liberación al espacio celular, el péptido Aβ es eliminado a través de múltiples vías, incluyendo su fagocitosis por astrocitos o microglía, su transporte a través de la barrera hematoencefálica hacia la circulación sanguínea, por la acción de enzimas de degradación como la neprilisina, la enzima degradadora de insulina, la metaloproteinasa de matriz 9 y la carboxipeptidasa de glutamato II, o mediante su reinternalización y degradación mediante autofagia (Bates et al., 2009; Yoon & Jo, 2012).

La producción de Aβ es importante para la función del sistema nervioso, pues se ha observado que su inhibición conduce a la muerte neuronal. En bajas concentraciones, Aβ coopera con la señalización neuronal al favorecer la potenciación a largo plazo (LTP), lo que mejora la plasticidad y los procesos de aprendizaje y memoria (Brothers et al., 2018; Morley et al., 2019). A su vez, se ha observado que los agregados del péptido Aβ ejercen efectos antimicrobianos y contribuyen al sellado de las fugas en la barrera hematoencefálica (Brothers et al., 2018). Sin embargo, en la EA se observa un aumento de la concentración de Aβ, y en particular de Aβ42, por encima de los niveles normales, debido a un incremento de su producción o a una disminución de su eliminación. Este aumento facilita la agregación del péptido en oligómeros y agregados solubles que son tóxicos y median la patología de la enfermedad (Schreiner et al., 2023).

2.4 Estructura y agregación del péptido Aβ

En condiciones patológicas, el péptido Aβ desencadena un proceso complejo de autoagregación. Se suelen identificar al menos tres etapas en el proceso: nucleación primaria, elongación y nucleación secundaria. En la nucleación primaria, los monómeros de Aβ pierden su estructura

nativa y se asocian entre sí para formar agregados solubles de bajo peso molecular. Durante el proceso de elongación, se añaden monómeros al núcleo ya formado, lo que conduce al crecimiento de estructuras fibrilares. Finalmente, en la nucleación secundaria, se cataliza la formación de nuevos agregados en la superficie de los agregados previamente formados (Giorgetti et al., 2018).

De forma nativa, los monómeros de Aβ presentan una estructura parcialmente desplegada con al menos una hélice α entre los residuos 13 y 23, y un giro β entre los residuos 21 y 30 flanqueado por dos regiones hidrofóbicas con alta tendencia a formar estructuras de láminas β. El aumento del contenido de láminas β en el monómero precede a la formación de los núcleos de agregación. Esta transformación es facilitada por el giro β al permitir el contacto entre el extremo carboxilo terminal y las regiones hidrofóbicas del péptido (Y. Lin et al., 2019; Vivekanandan et al., 2011; M. Yang & Teplow, 2008). A su vez, se ha observado que la cinética del proceso de agregación depende de la longitud del extremo C-terminal y de la estabilidad del monómero (Jarrett et al., 1993; Ni et al., 2011). En particular, los dos residuos hidrofóbicos adicionales presentes en Aβ42, en comparación con Aβ40, inducen un cambio hacia una estructura de lámina β más estable, lo que se traduce en una mayor tendencia a la agregación (Jarrett et al., 1993; Ni et al., 2011; Vivekanandan et al., 2011; M. Yang & Teplow, 2008). Una vez iniciada la nucleación primaria, se forman oligómeros solubles de Aβ. Estos presentan una naturaleza transitoria, dinámica y heterogénea, así como tamaños que van desde trímeros y tetrámeros hasta dodecámeros. Por un lado, imágenes de microscopía electrónica y de fuerza atómica muestran partículas esféricas de entre 3 a 10 nm, que desaparecen con la aparición de fibrillas maduras. A su vez, se ha observado que estos oligómeros pueden ser identificados mediante la unión del anticuerpo A11, el cual es dependiente de conformación (Glabe, 2008). Es probable que tanto el anticuerpo A11 como los oligómeros adopten una estructura de lámina α en la que los grupos amino y carbonilo del enlace peptídico se disponen en lados opuestos (Bi & Daggett, 2018; Shea et al., 2019).

Una vez iniciado el proceso de elongación, los oligómeros solubles dan lugar a fibrillas de Aβ. Los agregados fibrilares deben su estabilidad a las interacciones entre aminoácidos específicos de los monómeros de Aβ. Específicamente, las secuencias hidrofóbicas previamente mencionadas presentan una estructura de lámina-β con el extremo C-terminal plegado hacia el N-terminal en una característica estructura β-giro-β. A su vez, estos péptidos adoptan una estructura de cross-β, en la cual las cadenas de lámina β se disponen perpendicularmente al eje de la fibra, mientras que los

puentes de hidrógeno intramoleculares se disponen de forma paralela a dicho eje. Debido a su tendencia incrementada a formar láminas-β, la variante Aβ42 es la más abundante en las placas amiloides, presentando una máxima protección de grupos hidrofóbicos en comparación con Aβ40 (Ahmed et al., 2010; G. F. Chen et al., 2017; Sunde & Blake, 1998).

2.5 Toxicidad del péptido Aβ

Como se mencionó anteriormente, el péptido Aβ desempeña funciones fisiológicas importantes, por lo que se ha sugerido que su patogenicidad se debe a una "ganancia de función tóxica", en la que los monómeros neuroprotectores forman agregados tóxicos. Actualmente se considera a los oligómeros solubles como los principales agentes patológicos en la EA (Bi & Daggett, 2018; Reiss et al., 2018). Por su parte, las placas amiloides o agregados insolubles inducen toxicidad en neuronas cercanas (Tsai et al., 2004). Además, podrían actuar como reservorios de oligómeros bioactivos o disminuir su toxicidad al secuestrarlos y mantenerlos inertes (Bi & Daggett, 2018; Reiss et al., 2018).

Se han descrito múltiples mecanismos de toxicidad, lo que refleja directamente la variabilidad de las estructuras de los oligómeros de Aβ. Gran parte de estos mecanismos involucra la interacción con membranas. Los oligómeros son capaces de desestabilizar la membrana celular al formar poros que actúan como canales iónicos y al unirse a lípidos específicos, lo que induce su remoción de la membrana (Mrdenovic et al., 2022; Reiss et al., 2018). A su vez, Aβ es capaz de ingresar a la mitocondria, donde interviene en la cadena transportadora de electrones, interrumpe el metabolismo, interfiere directamente con la fusión y la fisión, desestabiliza la homeostasis del calcio e induce la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (de la Cueva et al., 2022; Reiss et al., 2018). De forma similar, se ha reportado que el péptido es capaz de inducir un aumento en la autofagia y, aunque inicialmente Aβ puede ser degradado mediante este proceso, durante la EA se observa una disfunción en la maduración de los autofagosomas lo que contribuye a la producción de Aβ. Sin embargo, no es claro si el péptido juega un papel directo en la alteración de la autofagia o si es consecuencia de otro proceso patológico (Cardoso et al., 2010).

El estrés oxidativo es otro de los mecanismos de toxicidad característicos de los agregados de Aβ. El péptido es capaz de interaccionar con metales como el hierro (Fe), el cobre (Cu) y el zinc (Zn), a través de residuos de aminoácidos específicos, incluyendo las histidinas 6, 13 y 14, y la metionina

35. Durante la patología, estos compuestos metal-Aβ llevan a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), a su vez, los metales son capaces de oxidar los residuos con los que interactúan generando radicales cationes (Cheignon et al., 2018).

2.6 Inhibidores de la agregación de Aβ

Debido a los mecanismos de toxicidad previamente descritos de los oligómeros y las placas amiloides de Aβ, una de las principales estrategias para el desarrollo de tratamientos consiste en inhibir la agregación del péptido. En 1976 se observó que la unión del colorante rojo Congo inhibía la agregación de Aβ en fibrillas y la neurotoxicidad de los agregados fibrilares preexistentes (Lorenzo & Yankner, 1994). Otros compuestos, como polifenoles (Porat et al., 2006) y melatonina (Pappolla et al., 1998), han demostrado interferir con la conversión de Aβ en estructuras de láminas β evitando su efecto neurotóxico. Sin embargo, el uso de estas moléculas se ha visto limitado por su falta de especificidad y por el escaso conocimiento de su mecanismo de acción (Barage & Sonawane, 2015). Otra estrategia consiste en el desarrollo de anticuerpos monoclonales capaces de unirse a oligómeros y agregados fibrilares de Aβ. Siguiendo esta línea, los fármacos Gantenerumab y Solanezumab, anticuerpos monoclonales, fueron evaluados en estudios clínicos de fase III en el 2017 encontrándose que ninguno de los dos era capaz de generar efectos clínicos significativos (Honig et al., 2018; Ostrowitzki et al., 2017). En 2021 la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) de los Estados Unidos otorgó una aprobación por la vía acelerada del anticuerpo monoclonal Aducanumab, el cuál es específico de oligómeros y agregados fibrilares de Aβ. Sin embargo, los ensayos fase III realizados no demostraron suficiente evidencia de un beneficio clínico significativo y el fármaco fue posteriormente descontinuado por la farmacéutica (FDA, 2021; Walsh, *et al.* 2021; Qi, et al., 2024). Otros dos anticuerpos monoclonales han sido aprobados por la FDA para su uso en el tratamiento de la AD: donanemab que reconoce específicamente variantes de Aβ con extremos amino truncos y lecanemab que es específico de protofibrillas de Aβ (Qi, et al., 2024). Este último también recibió la aprobación por parte de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (Cofepris) para su uso en México (Gobierno de México, 2024).

En 1996, Tjernberg y colaboradores encontraron que el fragmento de Aβ KLVFF era capaz de unirse al péptido íntegro y de prevenir su agregación en fibrillas, demostrando la importancia de

esta secuencia en el proceso de autorreconocimiento y autoagregación de Aβ (Tjernberg et al., 1999). Esto llevó al diseño de inhibidores a partir del propio péptido Aβ que contenían la secuencia de reconocimiento y modificaciones que generaban cambios conformacionales y estéricos para interferir con las interacciones necesarias para la agregación (Matharu et al., 2010). Recientemente, en un estudio con la variante de Aβ-40 con las mutaciones F19D y L34P encontraron que es capaz de disminuir el número de placas amiloides en ratones mediante su expresión utilizando un vector de virus adenoasociado; sin embargo, no se evaluó la mejora cognitiva del modelo ni los síntomas asociados (K. W. Park et al., 2021).

Anteriormente, se reportó que la sustitución de residuos básicos por residuos hidrofóbicos en las mutaciones puntuales R5A, K16A y K28A disminuye la agregación y la citotoxicidad del péptido al alterar las regiones de carga positiva que se forman en la superficie de los agregados de Aβ (Yoshiike et al., 2007). Específicamente, la mutación K28A parece estabilizar la conformación nativa del monómero de Aβ-42 incrementando el contenido de estructuras de hélice-α (Shuaib et al., 2020). A su vez, la sustitución del residuo de metionina 35 por cisteína, que participa en la inducción del estrés oxidativo, ha demostrado reducir la toxicidad del péptido sin alterar su capacidad de agregación (Dai et al., 2007). De forma similar, en el grupo de trabajo se diseñó la sustitución de la alanina 30 por triptófano, ya que este residuo se ubica en el núcleo hidrofóbico de una lámina β del péptido Aβ. En esta variante, la mutación A30W induce un impedimento estérico que desestabiliza los agregados fibrilares. Por lo tanto, se evaluaron *in vitro* los tres péptidos derivados del péptido Aβ42 con las sustituciones A30W, K28A y M35C. En estos experimentos se observó que las tres variantes podían desorganizar y prevenir la agregación del péptido Aβ42 WT y que, en particular, las mutantes K28A y M35C perdieron su actividad citotóxica. Sin embargo, las mutantes presentaron la formación de estructuras fibrilares similares a las del péptido WT, sin correlación entre la citotoxicidad y la capacidad de agregación (Estrada-Rodríguez et al., 2019)

2.7 *Caenorhabditis elegans*: descripción general

Caenorhabditis elegans es un nemátodo de vida libre, pequeño y transparente encontrado en ecosistemas terrestres, acuáticos, y actualmente en múltiples laboratorios alrededor del mundo. Su establecimiento como organismo modelo comenzó en la década de 1940 gracias a los trabajos de

Victor M. Nigon y Ellsworth C. Dougherty, y se solidificó con las extensas descripciones genéticas realizadas por Sydney Brenner (Brenner, 1974; Ferris & Hieb, 2015).

Entre las características que han llevado al nemátodo a ser uno de los modelos más utilizados destacan su fácil mantenimiento y su ciclo de vida corto. Las distintas cepas de *C. elegans* suelen cultivarse en cajas de cultivo con agar, inoculadas con *Escherichia coli* como fuente de nutrientes. Se distinguen dos sexos: machos y hermafroditas, siendo estos últimos capaces de reproducirse con machos o autofertilizarse. Un solo gusano hermafrodita puede poblar una caja echa con alrededor de 300 huevos. Después de eclosionar, los nemátodos atraviesan cuatro estadios larvarios (L1, L2, L3 y L4) y alcanzan la adultez en tan solo 3 días en una temperatura de 25 °C (Corsi et al., 2015; Meneely et al., 2019).

El grado de similitud de *C. elegans* con los organismos superiores ha permitido su uso específicamente para el modelado de diversas enfermedades. Aproximadamente el 83% de su proteoma tiene ortólogos potenciales en el humano, mientras que cerca del 53% del genoma codificante humano tiene un ortólogo reconocible en el nemátodo (Kim et al., 2018; Lai et al., 2000). Además, el mapeo completo de su sistema nervioso ha posibilitado su aplicación al estudio de las enfermedades neurodegenerativas (Sheppard et al., 1986).

2.8 Estudio de la patología de Aβ en *C. elegans*

El nemátodo cuenta con el gen relacionado a APP *apl-1*, el cuál codifica la proteína APL-1. Al igual que su contraparte humana, APL-1 presenta los dominios extracelulares E1 y E2 y una pequeña cola citoplasmática, que comparten 46%, 49% y 71% de similitud con APP, respectivamente. Sin embargo, a diferencia de APP, APL-1 no contiene la secuencia de Aβ. Adicionalmente, no se ha identificado actividad de β-secretasa en el nemátodo, lo que descarta la producción endógena del péptido Aβ (Hornsten et al., 2007). Por lo tanto, para el estudio de la toxicidad amiloide en *C. elegans* se han desarrollado múltiples cepas transgénicas que expresan Aβ humano.

En 1995 Christopher D. Link generó la cepa CL2006, mediante la integración de la secuencia de Aβ42 bajo regulación del promotor específico de músculo *unc-54*. Debido a esta expresión de Aβ42 muscular, los nemátodos CL2006 presentan la formación de depósitos amiloides detectables

mediante distintas tinciones, y un fenotipo progresivo de parálisis (Link, 1995). Más tarde, el mismo grupo de investigación desarrolló la cepa CL4176 que expresa Aβ42 muscular de forma dependiente de la temperatura. CL4176 exhibe un fenotipo más agudo que CL2006, quedando paralizados 32 horas después de la inducción por temperatura, lo que resulta en la muerte de los nemátodos antes de la detección de agregados amiloides (Drake et al., 2003). Estas cepas han sido ampliamente utilizadas para evaluar moléculas con posible efecto terapéutico. La administración de las moléculas candidatas en el medio y la determinación de su efecto sobre la parálisis permiten seleccionar rápidamente aquellas con mayor potencial terapéutico (Lublin & Link, 2013). Sin embargo, la expresión de Aβ en el músculo no recapitula su papel en la neurodegeneración observada en la EA. En la cepa CL2355, la expresión neuronal de Aβ42 induce la formación de agregados en el sistema nervioso. Estos nemátodos muestran una disfunción de la quimiotaxis, sensibilidad a la serotonina exógena y alteraciones en comportamientos asociados al aprendizaje (Dosanjh et al., 2010; Wu et al., 2006).

Estas cepas y otras similares se han utilizado para replicar y estudiar distintas características de la patología observadas en pacientes con la EA. Por un lado, se ha confirmado la toxicidad de los oligómeros de Aβ en los gusanos. En la cepa transgénica GMC101 se encontró que el mayor deterioro en la movilidad se asocia principalmente a la detección de oligómeros de $A\beta_{1-42}$ (Aprile et al., 2020). De forma similar, en la cepa CL2006 se observó que los oligómeros, mas no las especies de alto peso molecular, correlacionaban con la toxicidad de $A\beta_{1-42}$ (Cohen et al., 2006). De igual forma, oligómeros formados a partir de la incubación de $A\beta_{1-42}$ monomérico provocan una reducción del bombeo faríngeo en nemátodos silvestres (Stravalaci et al., 2012).

A su vez, la desregulación del proceso de autofagia como parte de la patología amiloide en los modelos de *C. elegans*. Esta desregulación se evidencia en las observaciones de una acumulación de autofagosomas en las cepas Cl4176, GMC101 y JKM7 con expresión de Aβ en tejido muscular (Florez-McClure et al., 2007; Gallrein et al., 2021; H. Lin et al., 2022). Específicamente en la cepa CL4176, se encontró que estos autofagosomas correspondían a diferentes etapas de maduración y que su acumulación se exacerbaba al inhibir la acidificación de los lisosomas (Florez-McClure et al., 2007). Aun así, en la cepa GMC101 se observa que la desregulación de la autofagia no se debe a una reducción a la acidez lisosomal y, por el contrario, la expresión de Aβ resulta en un incremento en la actividad y la acidificación de los lisosomas. En estos nemátodos, la acumulación

de autofagosomas parece estar asociada a una disminución de la transcripción de genes de fusión (H. Lin et al., 2022). Por su parte, en los gusanos JKM7 se encontró que los autofagosomas acumulados presentaban defectos en el cierre de membrana (Gallrein et al., 2021).

Por otro lado, en una cepa con expresión de Aβ42 únicamente en un par de neuronas sensoriales glutamatérgicas denominadas neuronas BAG muestra una sobreexcitación de estas, similar a la hiperactivación neuronal observada en cerebros con la EA (Sinnige et al., 2019). De forma similar, un grupo de trabajo pudo monitorear *in vivo* la agregación de Aβ42 en el nemátodo mediante la expresión del péptido con un marcaje fluorescente subestequiométrico. En estos gusanos observó la acumulación de anfisomas, la formación de poros membranales, y una pérdida de neuronas colinérgicas, lo que se correlaciona con las observaciones en humanos (Gallrein et al., 2021). Estos trabajos confirman la relevancia del uso de *C. elegans* como modelo de la EA.

2.9 *Caenorhabditis elegans* para el estudio de tratamientos contra Aβ

Las diferentes cepas transgénicas de *C. elegans* ya descritas han sido ampliamente utilizadas para evaluar la capacidad de diversas moléculas de inhibir la agregación y la toxicidad de Aβ (X. Chen et al., 2015). Entre estos, el tratamiento con gliciteína, una isoflavina derivada de la soya, logró disminuir los agregados amiloides en nemátodos CL2006, y retrasar el establecimiento de la parálisis en esta cepa y la CL4176 que expresan Aβ-42 muscular. Este efecto se asoció a la actividad antioxidante de la gliciteína al disminuir los niveles de ROS en los gusanos tratados (Gutierrez-Zepeda et al., 2005). El extracto EGb 761 del árbol *Ginkgo biloba* retrasó el fenotipo de parálisis, disminuyó los niveles de ROS, y redujo la formación de oligómeros y agregados insolubles en estas cepas. Además, EGb 761 demostró actividad neuroprotectora al normalizar el índice de quimiotaxis en la cepa CL2355 que expresa Aβ-42 en neuronas (Wu et al., 2006). El extracto de *Ginkgo* suele utilizarse como medicina alternativa en el manejo de AD y algunos estudios han encontrado asociación a la mejora de los síntomas de la demencia (Ihl, 2012; Janßen et al., 2010). Recién se identificó un compuesto similar derivado del pepino de mar, *Cucumaria frondosa,* cuya evaluación en *C. elegans* mostró una actividad terapéutica superior a la de los compuestos de *Ginkgo* (Tangrodchanapong et al., 2020). De forma similar, la fluoxetina, un antidepresivo de la clase de inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (SSRIs), mostró un retraso del fenotipo de parálisis y una reducción en la concentración de oligómeros en los

nemátodos (Keowkase et al., 2010), así como una asociación con niveles bajos de Aβ y con la mejora de la actividad cognitiva en pacientes con AD (Liu et al., 2019).Otras moléculas que mejoran la patología amiloide en *C. elegans* incluyen la cafeína, el ácido tánico, la bacitracina, la oleuropeína, la rifampicina, el ácido ferúlico, la tioflavina, la metformina, el litio, la curcumina y el extracto butanólico de *Hedyotis difusa* (X. Chen et al., 2015; DanQing et al., 2020; Teo et al., 2020). Por otro lado, también se han probado péptidos con un posible efecto terapéutico. Entre estos, el péptido resistente al calor (SVHRP) purificado a partir de veneno del escorpión *Buthus martensii,* y el péptido 13L derivado de la cocoa, fueron capaces de disminuir la parálisis, reducir la presencia de oligómeros de Aβ y mantener niveles bajos de ROS (Monto et al., 2013; X. G. Zhang et al., 2016). Sin embargo, hasta el momento no hay reportes sobre la evaluación de variantes del péptido Aβ en el nemátodo.

Por lo tanto, en el grupo de trabajo se evaluaron los efectos de las mutantes de Aβ-42: A30W, K28A y M35C en *C. elegans.* Se realizaron ensayos de viabilidad en la cepa N2 para evaluar la toxicidad de los péptidos a distintas concentraciones; y posteriormente, se monitoreo y la progresión de parálisis de la cepa CL2006. El tratamiento de nemátodos de la cepa N2 demostró que los péptidos mutantes no son tóxicos para *C. elegans* a las concentraciones de 15, 25 y 40 μM, y, por el contrario, generaron una extensión en la vida media. De igual forma, la administración de los tres péptidos mutantes a nemátodos de la cepa CL2006 retrasó el tiempo medio de desarrollo del fenotipo de parálisis asociado a la expresión muscular de Aβ42. Este fenotipo se ha asociado con la inducción del estrés oxidativo por Aβ42, lo que se refleja en un alto porcentaje de carbonilación de proteínas (Yatin et al., 1999), lo cual sugiere que los péptidos mutantes son capaces de ejercer una actividad antioxidante. Por otro lado, algunos autores han señalado que sustancias identificadas por su capacidad de mejorar el fenotipo de parálisis también logran prolongar la viabilidad de nemátodos WT mediante su interacción con distintas vías (Lublin & Link, 2013). Estos resultados indican que los péptidos A30W, K28A y M35C mejoran algunos de los fenotipos relacionados a la expresión y agregación de Aβ en *C. elegans*. Debido a esto, en este trabajo se buscó confirmar los efectos protectores de los péptidos mutantes A30W, K28A y M35C frente a la toxicidad del péptido Aβ42 en *C. elegans* y determinar algunos de los posibles mecanismos implicados en dicha protección.

3. JUSTIFICACIÓN

La causa más común de demencia en la población adulta mayor es la enfermedad de Alzheimer. A pesar de que el número de casos aumenta cada año, hasta ahora no existe ninguna terapia eficaz para prevenir o revertir el daño en el sistema nervioso. Según la hipótesis de la cascada amiloide, el evento principal de la enfermedad es la aparición de agregados tóxicos de Aβ debido a una desregulación de la producción y la eliminación del péptido, lo que conduce a su agregación. Por ello, evitar este proceso ha surgido como objetivo en el desarrollo de estrategias terapéuticas para la EA. *Caenorhabditis elegans* es un organismo ampliamente utilizado para el modelado de enfermedades neurodegenerativas, lo que facilita su uso como modelo *in vivo* para estudiar la inhibición de la agregación del péptido Aβ. Previamente, el tratamiento con nemátodos WT demostró que los péptidos mutantes no son tóxicos para *C. elegans*. De forma similar, en cepas transgénicas el tratamiento mejoró fenotipos de parálisis y quimiotaxis asociados a la expresión del péptido Aβ WT. Lo anterior sugiere que las mutantes A30W, K28A y M35C ejercen un efecto protector frente a la toxicidad de Aβ *in vivo*. Por lo tanto, en este trabajo se buscó confirmar los efectos protectores de los péptidos mutantes A30W, K28A y M35C frente a la toxicidad del péptido Aβ en *C. elegans* y determinar algunos de los posibles mecanismos implicados en dicha protección.

4. HIPÓTESIS

Los péptidos mutantes A30W, K28A y M35C presentan mecanismos de protección contra la toxicidad del péptido β-amiloide, mejorando fenotipos asociados a la expresión de Aβ en *C. elegans.*

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de los péptidos mutantes A30W, K28A y M35C en fenotipos asociados a la expresión el péptido β-amiloide en *C. elegans* y sus posibles mecanismos de protección contra la toxicidad de Aβ.

5.2 Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de los péptidos mutantes A30W, K28A y M35C sobre rasgos fisiológicos y del comportamiento asociados a la expresión de Aβ WT en cepas transgénicas de *C. elegans.*

2. Estudiar los cambios en la agregación, estrés oxidativo y homeostasis del calcio después del tratamiento con los péptidos mutantes A30W, K28A y M35C en cepas transgénicas de *C. elegans* con expresión de Aβ WT.

3. Evaluar cambios en factores de la respuesta inmune innata por las mutantes A30W, K28A y M35C en cepas transgénicas de *C. elegans* con expresión de Aβ WT.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Plásmidos

Las secuencias que codifican para Aβ-42 y cada una de las mutantes A30W, K28A y M35C optimizadas al uso de codones de *E. coli* fueron sintetizadas y clonadas al vector pET3a entre los sitios NdeI y BamHI por Gene Universal (Newark, DE, EE. UU.). Los plásmidos liofilizados obtenidos de la empresa fueron resuspendidos en de H_2O miliQ y se amplificaron mediante la transformación de bacterias calciocompetentes TOP10 siguiendo el protocolo establecido de choque térmico (Ausubel et al., 2003; Hanahan & Harbor, 1983). Brevemente se mezcló 1 ng con 100 µL de bacterias calciocompetentes en un tubo Eppendorf de 1.7 mL y se incubó durante 30 min en hielo. Posteriormente, se realizó el choque térmico introduciendo el tubo en agua a 42ºC por 1 min y rápidamente se regresó a incubación en hielo durante 5 min. Pasado este tiempo se añadió 200 µL de medio LB (Luria Bertani, Teknova) y se incubó a 37°C por 1 h a 200 rpm. Finalmente, las bacterias se inocularon en placas Petri preparadas con agar LB y suplementadas con ampicilina a una concentración de 100 µg/mL.

6.2 Cepas de *C. elegans*

Las cepas de *C. elegans* utilizadas en este trabajo se adquirieron del *Caenorhabditis Genetics Center* de la Universidad de Minnesota (Minneapolis, MN, EE. UU.) incluyendo la cepa N2 Bristol de fenotipo *wildtype* (WT), las cepas CL2006 y CL4176 que expresan Aβ WT en tejido muscular, y su cepa control CL802, la cepa transgénica HBR4 que expresa un indicador de calcio; la cepa transgénica, AMH43 que expresa LGG-1, un marcador específico de autofagosomas, fusionado a GFP; y la cepa transgénica TJ356 que expresa el factor de transcripción Daf16 marcado con GFP (tabla 1).

Tabla 1. Cepas de *Caenorhabditis elegans*.

Cepa	Genotipo	Descripción
N2	*wildtype* (WT)	Cepa silvestre de la variante Bristol

CL2006	dvIs2 [pCL12(unc-54/human A-Beta(1-42) minigene) + rol-6(su1006)]	Expresión constitutiva del péptido Aβ-42 humano en células musculares. Desarrolla un fenotipo progresivo de parálisis.
CL4176	dvIs27 [myo-3p::A-Beta (1-42)::let-851 3'UTR) + rol-6(su1006)] X	Expresión muscular del péptido Aβ-42 humano inducida por aumento de temperatura de 15 a 20°C. Desarrolla un fenotipo de parálisis severa.
CL802	smg-1(cc546) I; rol-6(su1006) II	Control para las cepas CL2006 y CL4176. Presenta fenotipo silvestre.
HBR4	goeIs3 [myo-3p::SL1::GCamP3.35::SL2::unc54 3'UTR + unc-119(+)]	Expresión del indicador de calcio GCaMP3 en tejido muscular.
AMH43	adIs2122 [lgg-1p::GFP::lgg-1 + rol-6(su1006)]	Expresión de LGG-1 marcado con la proteína fluorescente verde GFP.
TJ356	zIs356 [daf-16p::daf 16a/b::GFP + rol-6(su1006)]	Expresión de Daf16 marcado con la proteína fluorescente verde GFP.

6.3 Mantenimiento de nemátodos

Se utilizaron condiciones estándar para el manejo y mantenimiento de las cepas. En un matraz con 50 mL de medio LB se creció un inóculo de *Escherichia coli* OP50 a 37°C en agitación por 16 horas o hasta alcanzar una densidad óptica (O.D.) igual a uno. Con el cultivo obtenido se inocularon placas Petri de 60 mm preparadas con medio de crecimiento de nemátodos (Nematode Growth Media NGM; NaCl 2 g/L, triptona 4 g/L, KH_2PO_4 3 g/L, K_2HPO_4 0.5 g/L, agar 20 g/L, colesterol 5.2 µM) y se dejaron secar por al menos dos horas. Los nemátodos se crecieron colocando las placas en incubadoras Digital Mini Incubator (Gilson, EE. UU.) a una temperatura de 15°C.

6.4 Expresión de péptidos, y sincronización y tratamiento de nemátodos

Las bacterias calciocompetentes de la cepa BL21 (DE3) pLysS fueron transformadas con cada vector de acuerdo con el protocolo de choque térmico descrito anteriormente. Para el tratamiento de los nemátodos, los cultivos de *E. coli* transformada fueron inoculados en tubos con medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/mL) y cloranfenicol (30 µg/mL) e incubados a 37°C en agitación hasta por 16 horas o hasta alcanzar una densidad óptica igual a uno. Posteriormente, cada cultivo fue diluido con medio LB fresco hasta una O.D. de 0.5 y suplementado con isopropil-ß-D-tiogalactopiranosido (IPTG) para inducir la expresión de los péptidos durante 4 h manteniendo la

incubación a 37°C en agitación. Finalmente, placas Petri con agar NGM se inocularon con 100 µL del cultivo y se dejaron secar.

Para los experimentos, se colocaron alrededor de 10 nemátodos hermafrodita adultos en las placas con tratamiento y se dejaron durante 4 a 5 horas para obtener huevos de aproximadamente la misma edad. Posteriormente, se retiraron todos los nemátodos adultos y se incubaron los huevos hasta su eclosión o de acuerdo con cada procedimiento.

6.5 Efecto de los péptidos mutantes A30W, K28A y M35C sobre rasgos fisiológicos y del comportamiento.

6.5.1 Ensayos de viabilidad

Se realizaron ensayos de viabilidad de acuerdo con la metodología ya establecida (Park et al., 2017). Nemátodos de la cepa muscular CL2006 y de la cepa control CL802 fueron expuestos desde huevos al tratamiento con los péptidos A30W, K28A, M35C y WT, así como al vector pET3a vacío como control. Se utilizaron tres repeticiones para cada grupo experimental con al menos 30 nemátodos por placa. Los nemátodos se mantuvieron en incubación a 16°C y, una vez que alcanzaron la etapa larvaria L4, cada placa fue examinada diariamente bajo el estereoscopio para contabilizar el número de nemátodos vivos y muertos. Los nemátodos fueron transferidos a placas nuevas con tratamiento fresco cada dos días durante su etapa reproductiva. Posteriormente, se suplementaron con cultivo fresco cada dos días y se transfirieron a placas nuevas cada semana.

6.5.2 Ensayos de parálisis

Se realizaron ensayos sobre el establecimiento de un fenotipo de parálisis siguiendo la metodología ya reportada (A. Yang et al., 2017). Nemátodos de la cepa muscular CL4176 y de la cepa control CL802 fueron expuestos desde huevos al tratamiento con los péptidos A30W, K28A, M35C y WT, así como al vector pET3a vacío como control.

Se utilizaron cinco repeticiones por grupo experimental, con al menos 30 nemátodos por placa. Una vez que los nemátodos alcanzaron el estadio larvario L4 se subió la temperatura de incubación de 15°C a 25°C para inducir la expresión del péptido Aβ. A partir de las 24 h después del aumento

de la temperatura y cada 2 h se examinaron las placas bajo el estereoscopio para contabilizar el número de nemátodos paralizados, es decir, aquellos que presentaban un movimiento mínimo al estímulo con un asa de platino.

6.5.3 Tasa de progenie

Para evaluar el posible efecto de las mutantes sobre la fecundidad de C. elegans, 10 nemátodos L4 de las cepas CL2006 y CL802 expuestos a los tratamientos mencionados anteriormente fueron colocados en placas con el tratamiento fresco. Diariamente, los adultos fueron transferidos a una placa nueva y se contabilizaron el número de huevos y larvas de la placa anterior. Se realizaron tres repeticiones por grupo experimental.

6.6 Mecanismos de protección de los péptidos mutantes A30W, K28A y M35C contra la toxicidad Aβ

6.6.1 Tinción de agregados de Aβ

Para evaluar la agregación del péptido Aβ en respuesta al tratamiento con los péptidos, se utilizaron nemátodos de las cepas CL2006 y CL802 expuestos a los tratamientos ya descritos. A los 5 días de vida, los nemátodos se recuperaron y lavaron utilizando buffer M9, y se tiñeron en 1 mL de tioflavina S (THS) a 0.125% diluida en etanol al 70% durante 1 h en agitación. Posteriormente, se realizaron lavados sucesivos con etanol al 70% para eliminar el exceso de tioflavina. Finalmente, los nemátodos se colocaron en gotas en un portaobjetos, se añadió medio de montaje y se colocó un cubreobjetos. Se obtuvieron imágenes utilizando un microscopio de fluorescencia Zeiss Imager.A2 acoplado con una cámara AxioCam MRc. Se contabilizó el número de agregados en las cabezas de los nemátodos.

6.6.2 Estrés oxidativo

Para evaluar el posible efecto de las mutantes en la inducción de estrés oxidativo se utilizaron nemátodos de la cepa CL4176 y CL802 expuestos a los tratamientos ya descritos. Las placas se mantuvieron a 15°C y, una vez que los nemátodos alcanzaron el estadio larvario L4, se subió la

temperatura de incubación a 25°C para inducir la expresión del péptido Aβ. Los nemátodos se recolectaron y lavaron con buffer fosfato (PBS), y se transfirieron aproximadamente 50 nemátodos por pozo a una placa de 96 pozos conteniendo 200 µL de PBS, Tween-20 0.01% y H2DCF-DA 50 mM. La fluorescencia a una longitud de onda de 485 nm de excitación y 530 nm de emisión se midió cada 30 minutos por 2.5 horas en un lector de placas GloMax Promega.

6.6.3 Fugas de calcio

Para evaluar el posible efecto de las mutantes en la homeostasis de calcio se realizó una cruza entre la cepa HBR4 que expresa el indicador de calcio GCaMP3 en tejido muscular y las cepas con expresión de Aβ. Se generaron machos HBR4 colocando nemátodos hermafrodita a 34°C durante 4 horas. Posteriormente, se colocaron de 7 a 10 machos HBR4 con 1 a 3 hermafroditas jóvenes CL4176 en una placa. De la progenie resultante se aislaron nemátodos hermafrodita que contenían el marcador *roller* correspondiente a las cepas de Aβ y la señal fluorescente correspondiente a la cepa HBR4. Una vez obtenida la cruza estable, los nemátodos se expusieron a los tratamientos ya descritos, se incubaron a 15°C, y se subió la temperatura a 25°C al alcanzar la etapa larvaria L4. Para la visualización de la señal de calcio, 36 horas después hasta diez nemátodos fueron transferidos a blocs de agarosa al 2% colocados sobre portaobjetos y suplementados con azida de sodio al 5% para su anestesia. Se obtuvieron imágenes con el microscopio de fluorescencia y se analizó la intensidad de fluorescencia en ImageJ.

6.7 Inducción de la vía de señalización Daf-16 por los péptidos mutantes A30W, K28A y M35C

6.7.1 Localización celular de Daf-16

Para evaluar la activación del factor de transcripción Daf-16, perteneciente a la vía de insulina/IGF-1, nemátodos TJ356 se expusieron a los tratamientos ya descritos, y se incubaron a 15°C hasta alcanzar la etapa larvaria L4. Para la visualización de la señal de Daf-16, hasta diez nemátodos fueron transferidos a blocs de agarosa al 2% colocados sobre portaobjetos y suplementados con azida de sodio al 5% para su anestesia. Se obtuvieron imágenes de los nemátodos con el microscopio de fluorescencia para la localización de la señal de Daf-16::GFP. Los nemátodos se

clasificaron en tres fenotipos según la localización de la señal de Daf-16: citosólico, nuclear e intermedio. Se consideró como nuclear a los nemátodos que presentaban la señal en puntos a lo largo de todo el cuerpo. Los nemátodos con presencia de algunos puntos fluorescentes se consideraron como intermedios. Ante la ausencia de puntos fluorescentes se clasificó a los gusanos como citosólicos (Oh et al., 2005).

6.7.2 Detección de autofagosomas

Para evaluar posibles cambios en la autofagia en respuesta al tratamiento con los péptidos mutantes, nemátodos AMH43 se expusieron a los tratamientos ya descritos, y se incubaron a 15°C hasta alcanzar la etapa larvaria L4. Para la visualización de la señal de calcio, hasta diez nemátodos fueron transferidos a blocs de agarosa al 2% colocados sobre portaobjetos y suplementados con azida de sodio al 5% para su anestesia. Se obtuvieron imágenes de los nemátodos mediante el microscopio de fluorescencia y se contabilizó el número de puntos con señal de GFP::LGG1 mediante el plug-in "analyze particle" Image-J con un tamaño de 1 a 20 μm^2 y una circularidad de 0.1 a 1.

6.8 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad Prism 11 (IBM Corp, N.Y.). La significancia se determinó mediante un análisis de varianza de un factor (ANOVA), seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey para evaluar diferencias entre los grupos experimentales. Para los datos de viabilidad y parálisis se generaron gráficos con el estimador Kaplan Meier y se evaluaron las diferencias entre los grupos mediante la prueba de log-rank.

7. RESULTADOS

7.1 Expresión de los péptidos en *E. coli*

El vector que incluye la secuencia del péptido WT optimizada para *E. coli*, pET3a-WT (figura 1A), se utilizó para transformar bacterias de la cepa BL21. Después de una inducción de 4 horas con IPTG, se realizó una tinción con tioflavina S (THS) para visualizar el péptido. Se observó la formación de cuerpos de inclusión dentro de las bacterias con señal de THS, indicando la presencia del péptido Aβ-42 WT (figura 1B). El cultivo sin inducción con IPTG no muestra los cuerpos de inclusión positivos a THS.

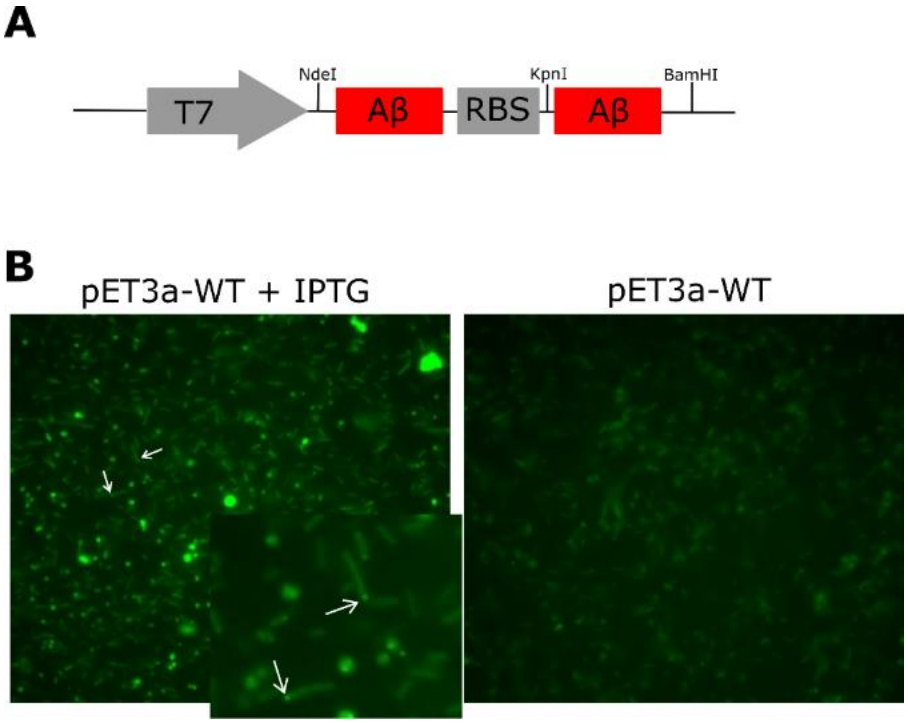


Figura 1. Expresión del péptido Aβ en *E. coli*. A. Cassette de expresión diseñado con dos secuencias para la codificación del péptido Aβ subclonado entre los sitios NdeI y BamhI del vector pET3a que incluye el promotor inducible T7. B. Tinción con THS de cultivo de E. coli BL21 transformado con el vector pET3a e inducido o no con IPTG.

7.2 Efecto de los péptidos en la viabilidad y parálisis de nemátodos

Se trataron nemátodos transgénicos CL2006 con expresión de Aβ en músculo, y de la cepa control CL802, y se monitoreó su viabilidad. El tratamiento con A30W extendió de manera significativa el tiempo de vida de nemátodos CL2006 (figura 2A), en comparación con el grupo control, mostrando una vida media similar a la de los gusanos CL802 control (tabla 2). De forma interesante, los nemátodos CL802 tratados con A30W muestran una extensión significativa en la viabilidad, con una vida media de 21 días. De forma similar, el tratamiento con K28A y M35C incrementó el tiempo de vida de nemátodos CL2006, sin afectar la viabilidad de la cepa CL802 (figuras 2B y 2C). En el caso del péptido WT, el tratamiento fue tóxico para los nemátodos CL2006 disminuyendo su viabilidad, mientras que los gusanos control no se vieron afectados (figura 2D).

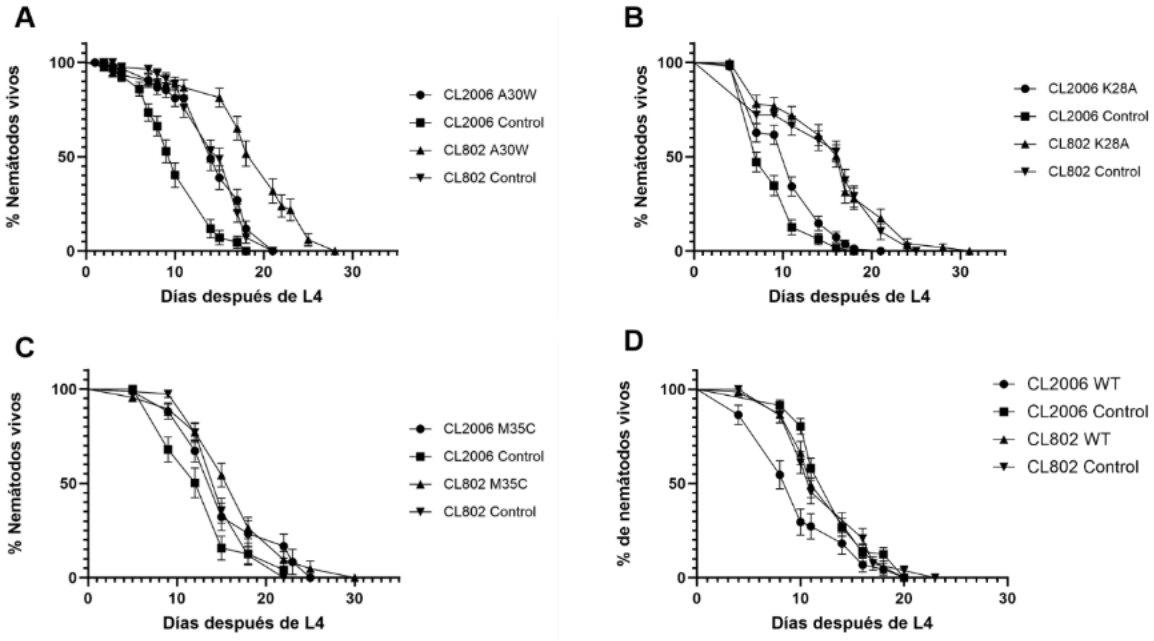


Figura 2. Efecto en la viabilidad de las cepas CL2006 y CL802 de *C. elegans.* A. Análisis de viabilidad de nemátodos CL2006 y de la cepa control CL802 con y sin tratamiento con A30W. Pruebas de log-rank mostraron diferencias significativas entre los nemátodos CL2006 tratados con A30W y control ($p<0.0001$), y CL802 tratado y control ($p<0.0001$). B. Análisis de viabilidad con y sin tratamiento con K28A. Pruebas de log-rank mostraron diferencias significativas entre CL2006 tratado con K28A y control ($p=0.0160$). C. Análisis de viabilidad con y sin tratamiento con M35C. Pruebas de log-rank mostraron diferencias significativas entre CL2006 tratado con M35C y control ($p=0.0008$). D. Análisis de viabilidad con y sin tratamiento con WT. Pruebas de log-rank mostraron diferencias significativas entre CL2006 tratado con WT y control ($p<0.0001$). A-D. Barras representan error estándar.

Al igual que la cepa CL2006, los nemátodos CL4176 expresan el péptido Aβ en células musculares, sin embargo, presentan un fenotipo más agudo de parálisis (figura 3). Únicamente los tratamientos con M35C y, inesperadamente, con WT lograron retrasar la parálisis de los gusanos CL4176, en comparación con los péptidos A30W, K28A y el tratamiento control.

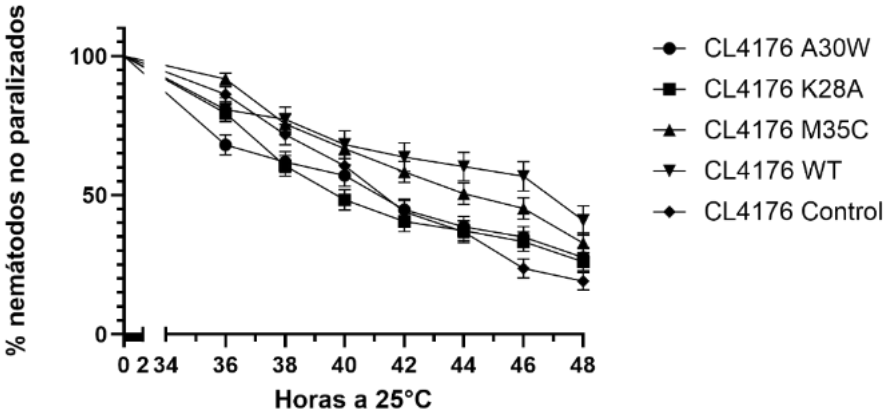


Figura 3. Efecto en la parálisis en la cepa CL4176 de *C. elegans.* Ensayo de parálisis en nemátodos CL4176 con y sin tratamiento. Pruebas de log-rank mostraron diferencia significativa entre M35C y control (p=0.00021), y entre WT y control (p<0.0001). Barras representan error estándar.

7.3 Efecto de los péptidos en la eclosión interna de nemátodos

Durante los ensayos de viabilidad se observó la ocurrencia de eclosión interna (figura 4). La eclosión interna consiste en la retención de huevos fertilizados, lo que lleva a la eclosión y desarrollo de la larva dentro de la hermafrodita y resulta en la muerte prematura de la madre. Las placas de CL2006 tratadas con A30W mostraron una reducción significativa de eventos de eclosión interna en comparación con las placas control. Sin embargo, los eventos en el resto de las placas con o sin tratamiento fueron mínimos.

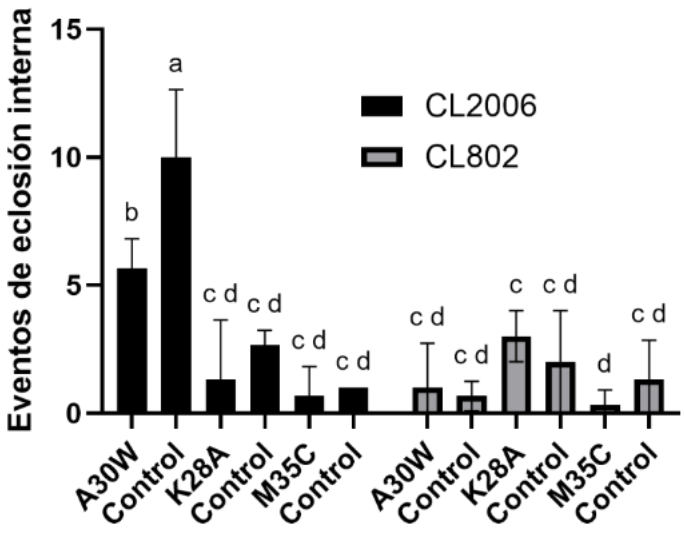


Figura 4. Efecto en la eclosión interna de los nemátodos. Gráfico que representa el número de eventos de eclosión interna en nemátodos CL2006 y CL802 después del tratamiento con los péptidos mutantes A30W, K28A y M35C o control. El tratamiento con A30W mostró una disminución significativa con respecto al control (p=0.0015). Barras representan error estándar.

7.4 Efecto de los péptidos en la fecundidad de los nemátodos

Para evaluar el efecto de los péptidos en la fecundidad de los nemátodos, se trataron gusanos de la cepa CL2006 y se contabilizó el número de huevos y larvas dejados por las hermafroditas adultas durante su etapa reproductiva (figura 5). No se encontraron diferencias en el número de progenie entre los distintos tratamientos, ni entre la cepa control y la cepa CL2006.

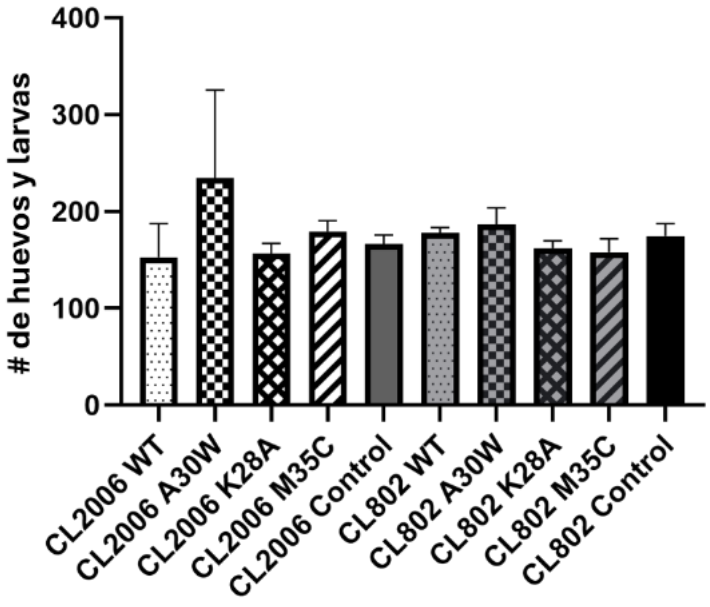


Figura 5. Efecto en la fecundidad de los nemátodos. Gráfica del número de larvas y huevos de nemátodos CL2006 y CL802 con y sin tratamiento. Barras representan error estándar.

7.5 Efecto en la formación de agregados amiloides

La expresión endógena de Aβ en gusanos de la cepa CL2006 genera la deposición de agregados insolubles en el tejido muscular que pueden ser visualizados mediante marcadores fluorescentes (Drake et al., 2003). La tinción con tioflavina S mostró una disminución significativa en el número de agregados en los nemátodos tratados con los péptidos K28A y M35C en comparación con el control (figura 6). Por el contrario, los nemátodos tratados con los péptidos A30W y WT mostraron una agregación similar a la del control.

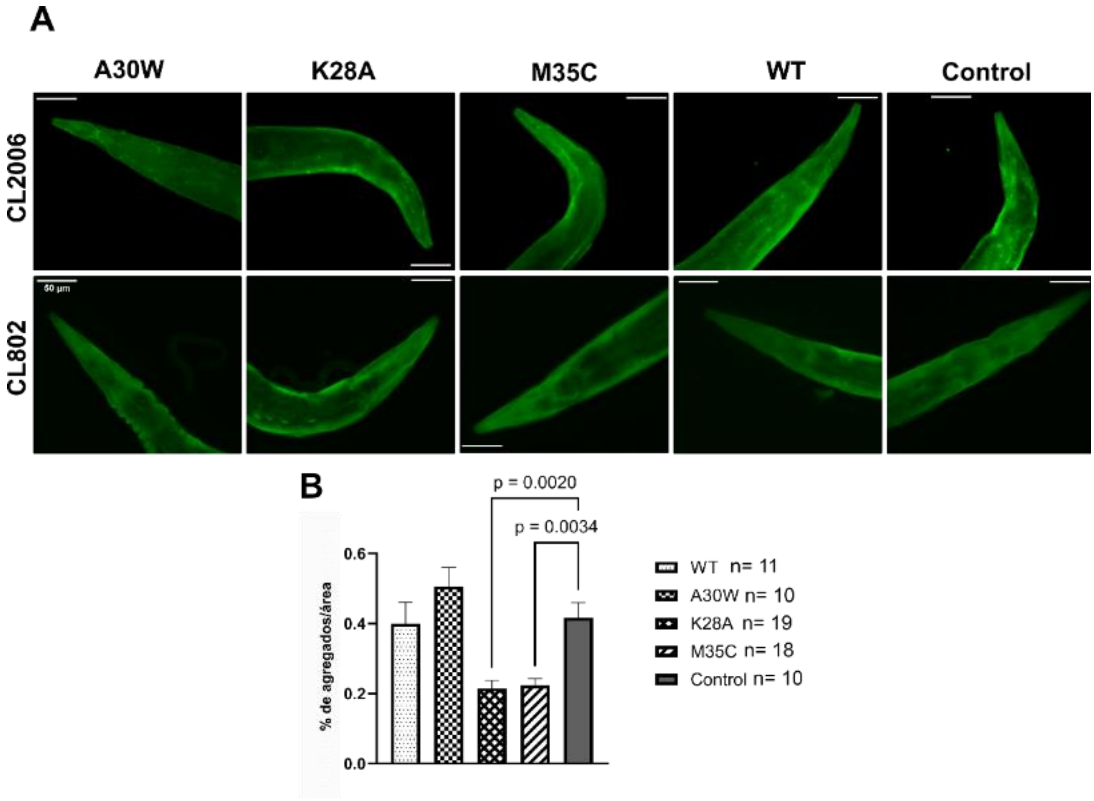


Figura 6. Efecto en la formación de agregados insolubles. A. Imágenes representativas de nemátodos CL2006 y CL802 con y sin tratamiento después de la tinción con tioflavina S. B. Cuantificación del número de agregados en la cabeza de los nemátodos. Barras representan error estándar.

7.6 Efecto en el estrés oxidativo

Se ha reportado que la cepa CL4176 muestra un aumento en el estrés oxidativo en respuesta a la expresión de Aβ muscular (Drake et al., 2003). Para evaluar el efecto de los tratamientos en la inducción de ROS, se midió la señal del reactivo H2DCFDA en nemátodos CL4176 y CL802 (figura 7). En la cepa transgénica CL4176, el tratamiento con los péptidos A30W generó un incremento significativo en el estrés oxidativo en comparación con el control, mientras que el péptido M35C generó una disminución significativa. Por su parte, los tratamientos con WT y M35C no mostraron diferencia con el control. En la cepa CL802, el tratamiento con M35C mostró una reducción en contraste con los péptidos WT y A30W, sin embargo, ningún tratamiento presentó diferencia significativa con respecto al control.

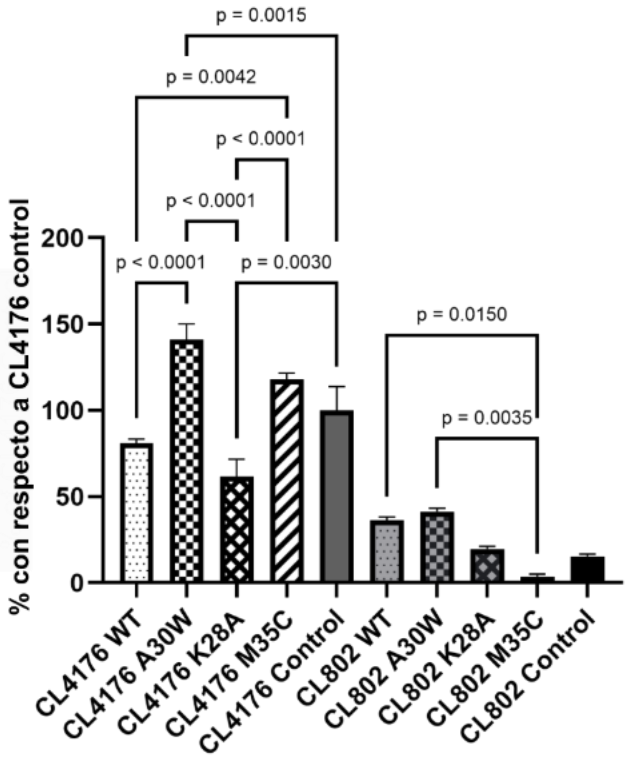


Figura 7. Efecto en el estrés oxidativo de nemátodos CL4176 y CL802. Cuantificación de la señal fluorescente de H2DCFDA en CL4176 y CL802 con y sin tratamiento. Los resultados se presentan en porcentaje de fluorescencia relativo al grupo de CL4176 control, el cual representa el 100%. Las barras de error corresponden al error estándar.

7.7 Efecto en la homeostasis del calcio

Para evaluar cambios en la homeostasis del calcio en respuesta a nuestros tratamientos se realizó una cruza entre las cepas CL802 y CL4176 con la cepa HBR4 con expresión del sensor de calcio GCamp en células musculares (figura 8A). En la cepa CL4176xHBR4 se observó poca señal de calcio y una señal fluorescente similar entre todos los tratamientos. En contraste, en la cepa CL802xHBR4 se observa mayor señal que en los nemátodos CL4176xHBR4, además de un aumento significativo en los nemátodos tratados con A30W, y una disminución significativa con el tratamiento de K28A en comparación con el control (figura 8B).

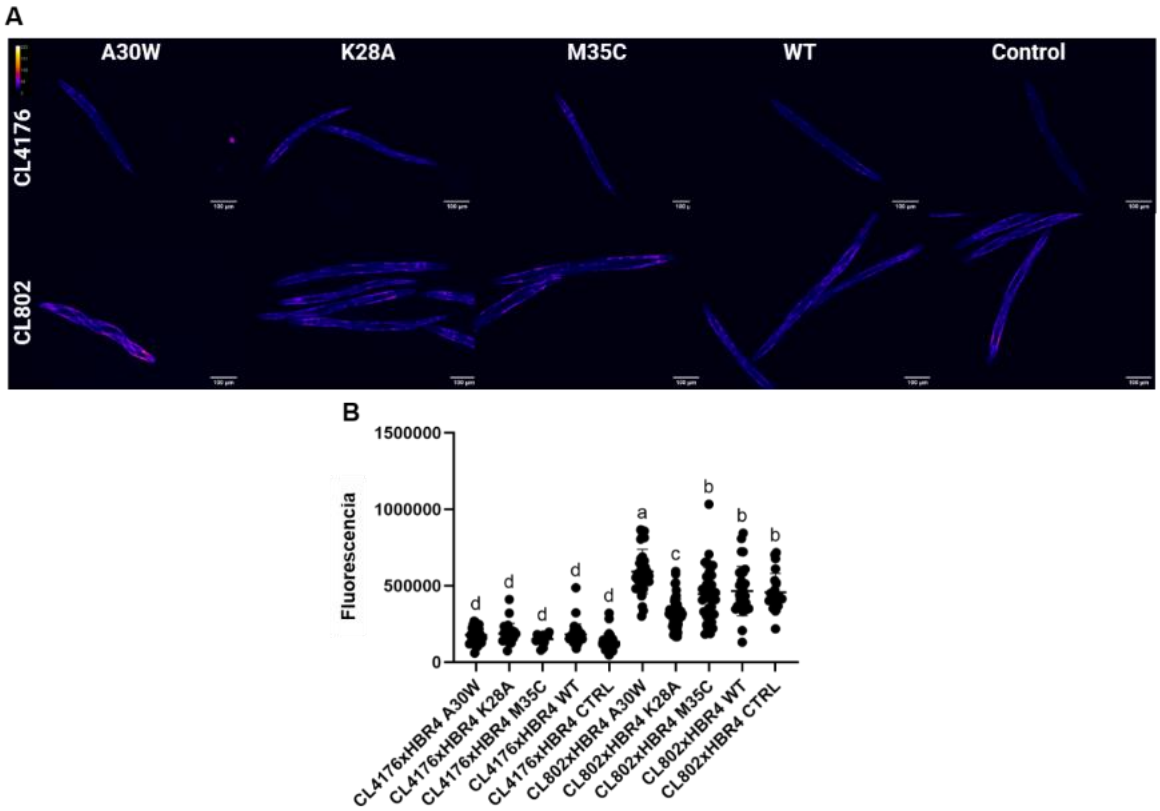


Figura 8. Efecto en la homeostasis del calcio. A. Imágenes representativas de nemátodos CL4176xHBR4 con expresión de Aβ y el sensor de calcio GCamP en músculo, y la cepa CL802xHBR4 con expresión de GCamP muscular, ambas con y sin tratamiento. B. Cuantificación de la señal fluorescente que corresponde a la señal de calcio en color fire. Las barras de error corresponden al error estándar.

7.8 Efecto en la localización celular de Daf-16

En el nemátodo adulto, el factor de transcripción Daf-16 se activa durante el envejecimiento mediante su traslocación al núcleo, incrementando de esta forma el tiempo de vida y la resistencia a estrés (K. Lin et al., 2001; Tissenbaum, 2018). Se ha reportado que la activación constitutiva de Daf-16 puede provocar que los nemátodos vivan hasta tres veces más tiempo del normal (K. Lin et al., 2001). Para evaluar si este factor de transcripción se relaciona con la extensión en la viabilidad observada en los nemátodos tratados con los péptidos, se utilizó la cepa TJ356 que expresa Daf-16 fusionado a la proteína fluorescente verde GFP (figura 9A). Se observó que el tratamiento con WT y M35C aumentó la retención de Daf-16 en el núcleo, en comparación con el grupo control. Aunque los grupos tratados con A30W y K28A mostraron un número de nemátodos con fenotipo intermedio similar al control, la señal de Daf16::GFP fue más evidente en los grupos tratados con los péptidos mutantes (figura 9B).

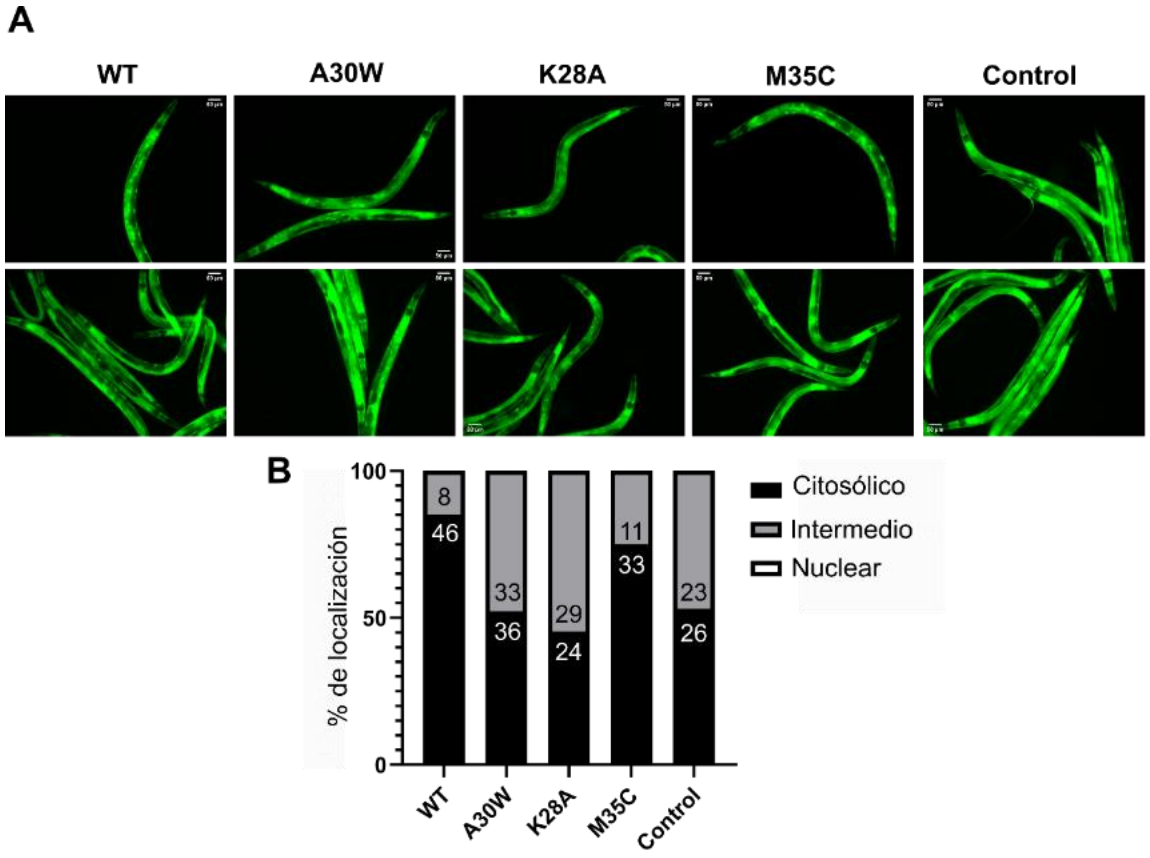


Figura 9. Efecto en la localización de Daf-16. A. Imágenes representativas de nemátodos TJ356 con expresión de Daf-16::GFP con y sin tratamiento. B. Cuantificación del número de nemátodos con fenotipo citosólico, nuclear o intermedio, de acuerdo con la localización subcelular de Daf-16::GFP.

7.9 Efecto en la autofagia

Para evaluar el efecto sobre el proceso de autofagia en los nemátodos, se trataron nemátodos AMH43 que expresan el transgén GFP::LGG-1. LGG-1 es una proteína similar a ubiquitina perteneciente a la familia de proteínas ATG8, que es reclutada a las membranas internas y externas de los autofagosomas en formación (Leboutet et al., 2023; H. Zhang et al., 2015). En los nemátodos de 5 días de edad, se observó la formación de puntos de señal fluorescente en hipodermis, faringe y neuronas; mientras que en los nemátodos de 10 días la señal se vio restringida principalmente a la faringe (figura 10A). La cuantificación de los puntos de fluorescencia mostró una tendencia a un menor número en los nemátodos tratados con los péptidos mutantes, sin embargo, solo se obtuvo

una diferencia estadísticamente significativa con el tratamiento con M35C en ambas edades, y con A30W en gusanos de 10 días de edad (figura 10B y C).

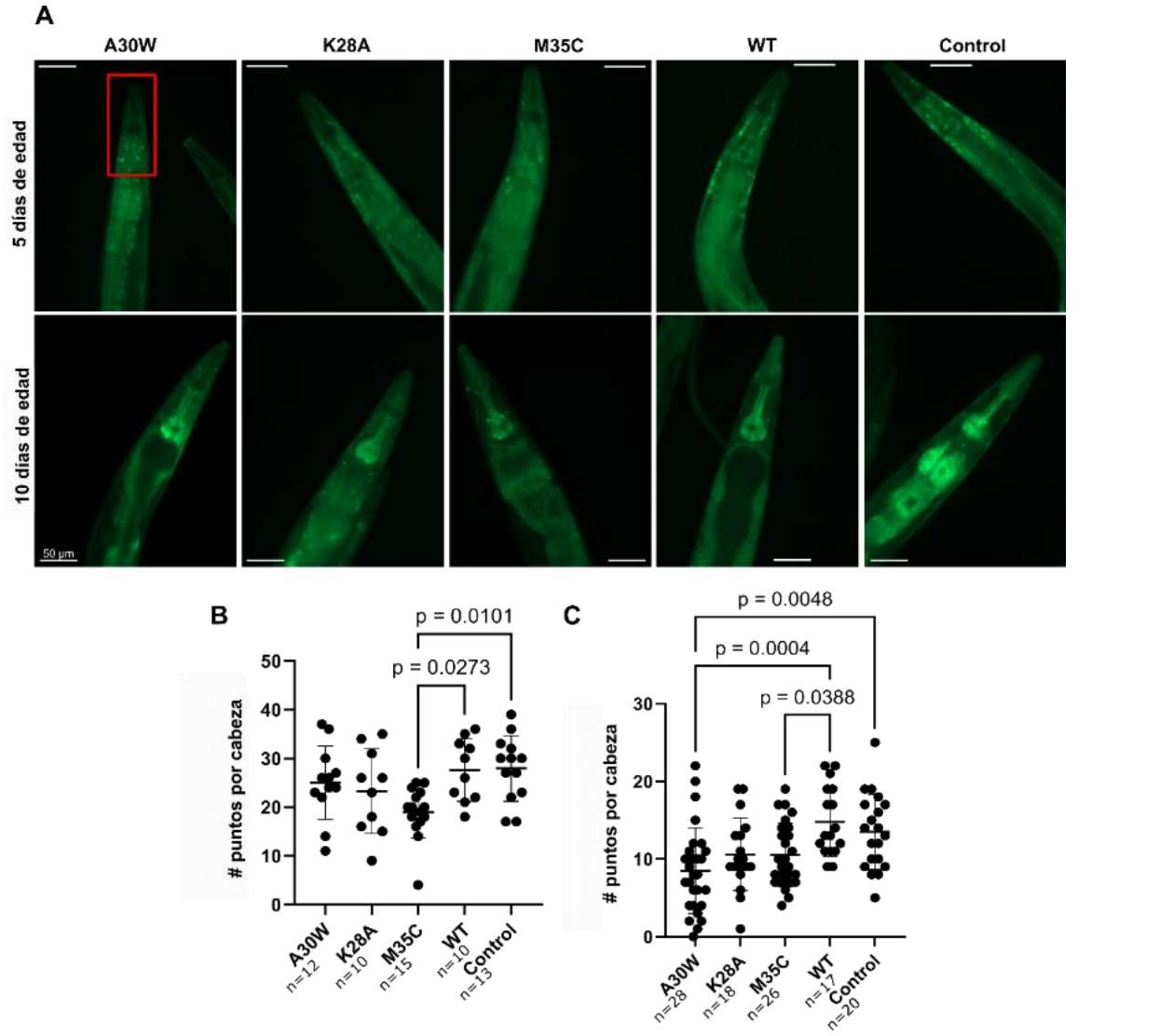


Figura 10. Efecto en la autofagia. A. Imágenes representativas de nemátodos AMH43 de 5 y 10 días de edad con expresión de GFP::LGG-1 con y sin tratamiento. B. Cuantificación del número de puntos de señal fluorescente en la cabeza de nemátodos de 5 días. C. Cuantificación del número de puntos de señal fluorescente en la cabeza de nemátodos de 10 días.

8. DISCUSIÓN

En este trabajo se evaluaron los efectos de las variantes de Aβ-42 con las mutaciones puntuales A30W, K28A y M35C en un modelo de Alzheimer en *C. elegans*. Se observó que el tratamiento con los péptidos K28A extendió el tiempo de vida y disminuyó la formación de agregados insolubles en nemátodos CL2006 con expresión de Aβ en tejido muscular. Por su parte, el péptido A30W logró prolongar la vida media de los nemátodos CL2006 y CL802, lo que sugiere un efecto no específico. Por otro lado, los péptidos M35C y WT lograron retrasar el establecimiento de la parálisis en la cepa CL4176. En particular, el péptido A30W podría ejercer su efecto protector mediante la activación del factor de transcripción DAF-16 y la regulación de la autofagia. El péptido M35C parece proteger específicamente contra los oligómeros de Aβ, además de regular la autofagia. Finalmente, aunque el péptido K28A disminuyó las ROS en nemátodos CL4176, no mejoró el fenotipo de parálisis. Los resultados obtenidos muestran que los péptidos A30W, K28A y M35C tienen la capacidad de proteger a *C. elegans* frente a la toxicidad de Aβ-42 mediante distintos mecanismos y sugieren su posible aplicación en el desarrollo de tratamientos contra la enfermedad de Alzheimer.

Para facilitar el tratamiento de los nemátodos, realizamos la expresión de cada péptido en *E. coli,* observando su acumulación en cuerpos de inclusión dentro de la bacteria. Lo anterior coincide con lo reportado en literatura que la expresión de Aβ en *E. coli* genera cuerpos de inclusión en los poros de la célula visibles mediante tinción con THS (Pouplana et al., 2014). A su vez, se ha demostrado que las características del péptido Aβ-42 sintético o producido en *E. coli* no varían (Walsh et al., 2009). Adicionalmente, se ha demostrado que el tratamiento de *C. elegans* con otros péptidos amiloides a través de su expresión en *E. coli* permite su internalización a través del intestino e induce efectos sistémicos (Perni et al., 2021) y específicamente la expresión de Aβ genera un daño en la membrana intestinal del nemátodo (Julien et al., 2018). Este trabajo muestra que esta estrategia también puede utilizarse para evaluar en *C. elegans* péptidos con posible efecto terapéutico frente a Aβ.

Los ensayos de viabilidad en la cepa y en CL802 corroboran la ausencia de toxicidad de los péptidos A30W, M35C y K28A, previamente observada en cultivo celular (Estrada-Rodríguez et al., 2019). De forma similar, el péptido WT exógeno no afectó la viabilidad de los nemátodos

control. Aunque se ha encontrado que la exposición a bacterias *E. coli* que expresan Aβ induce daño al intestino (Hassan et al., 2009; Julien et al., 2018; Shea et al., 2019), no se han reportado efectos sistémicos.

En la cepa CL2006 con expresión de Aβ en músculo, el tratamiento con el péptido WT exógeno fue tóxico al disminuir el tiempo de vida de los nemátodos. Por su parte, los péptidos mutantes lograron incrementar el tiempo de vida de los gusanos, sugiriendo un mecanismo de protección contra la toxicidad de Aβ endógeno. Otros estudios han relacionado la extensión de la viabilidad de nemátodos CL2006 con la disminución del número de depósitos de Aβ (Diomede et al., 2013). En relación con lo anterior, las variantes ya han demostrado anteriormente una disminución en la tendencia a formar agregados (Estrada-Rodríguez et al., 2019; Fay et al., 2002; Shuaib et al., 2020), además de la capacidad de disminuir la formación de agregados del péptido WT (Estrada-Rodríguez et al., 2019). Esto concuerda con los resultados obtenidos, en los que se observó una disminución de la formación de agregados insolubles en los gusanos CL2006 en respuesta al tratamiento con K28A y M35C. En el caso del péptido WT, no se observó una diferencia significativa en la agregación, por lo que debe existir otro mecanismo por el cual el péptido exógeno contribuya a la toxicidad.

Por su parte, el péptido A30W logró extender el tiempo de vida de nemátodos control y de nemátodos con expresión de Aβ muscular, sin disminuir la agregación en la cepa CL2006. Estos resultados sugieren que el tratamiento con A30W afecta el envejecimiento de forma independiente de su interacción con el péptido Aβ endógeno. En estudios previos se ha encontrado que la protección contra Aβ en cepas de *C. elegans* transgénicas es dependiente del factor de transcripción DAF-16 (Keowkase et al., 2010; Wang et al., 2016; Y. Zhang et al., 2025). DAF-16 forma parte de la vía de señalización de la Insulina y el Factor de Crecimiento Similar a la Insulina (IIS) en el nemátodo, actuando río abajo del receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1 DAF-2. La disminución de la activación de DAF-2 lleva a la translocación de DAF-16 al núcleo, donde regula la expresión de genes involucrados en la respuesta a estrés por calor, ROS, patógenos y proteínas mal plegadas (Halaschek-Wiener et al., 2005; Lee et al., 2003) . En conjunto, la activación de DAF-16 y la regulación de sus genes blanco protegen a los nemátodos contra el estrés y extienden su viabilidad (Henderson & Johnson, 2001). De forma similar, el factor de transcripción FOXO3A, el homólogo de DAF-16 en mamíferos, también se ha asociado a vidas

más longevas en humanos. Además, se ha encontrado que una disminución de FOXO3A en suero se correlaciona con un incremento en el riesgo de desarrollar AD, lo que sugiere una posible interacción del factor de transcripción con el péptido Aβ y otros factores asociados a la enfermedad (Du & Zheng, 2021; Q. Liu et al., 2025; Pradhan et al., 2020). Específicamente en *C. elegans*, la producción constitutiva de Aβ puede inducir la sobreexpresión del gen de DAF-16 y sus genes blanco (Gallrein et al., 2021; Godini et al., 2019; Lichty et al., 2025), lo cual crea un fenómeno de hormesis en el que las bajas dosis de Aβ en nemátodos jóvenes generan un fenotipo resistente al estrés por calor (Lichty et al., 2025). Es posible que los efectos observados tras el tratamiento con A30W se deban a la activación de DAF-16. En nuestros experimentos se observó que la señal nuclear de DAF-16::GFP era más evidente en los nemátodos TJ356 expuestos al péptido A30W, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el número de nemátodos con fenotipos citosólicos o intermedios entre nuestros grupos. Por lo tanto, se requieren estudios adicionales para determinar el posible papel de DAF-16 en el efecto protector de A30W. También es posible que estén involucrados otros factores relacionados a la toxicidad amiloide y la longevidad, por ejemplo, la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) y el factor inducible por hipoxia I (HIF-1) (Lichty et al., 2025; Uno & Nishida, 2016; Xue et al., 2024).

Por otro lado, entre los péptidos mutantes, únicamente M35C logró retrasar el inicio de la parálisis en la cepa CL4176. A diferencia de CL2006, los nemátodos CL4176 muestran un fenotipo más agudo, con la parálisis de los nemátodos ocurriendo antes de la aparición de agregados amiloides, lo que sugiere que la toxicidad se debe a la presencia de oligómeros de Aβ en esta cepa (Drake et al., 2003). Se ha reportado que la metionina del residuo 35 está directamente relacionada con la formación de oligómeros (Bitan et al., 2003; Durell et al., 2022), por lo que su sustitución por cisteína podría reducir la presencia de estas especies tóxicas. Por su parte y de forma inesperada, el péptido WT también provocó un retraso en la parálisis de los nemátodos. Es posible que este efecto se deba a la capacidad de los agregados amiloides fibrilares para secuestrar oligómeros (Gaspar et al., 2010; A. Yang et al., 2017) , reduciendo sus efectos tóxicos.

Se ha reportado que la expresión del péptido Aβ muscular en *C. elegans* afecta el desove, probablemente debido a una afección de las neuronas que controlan la contracción de los músculos de la vulva de los nemátodos hermafroditas (Estevez et al., 2012; Gallrein et al., 2021). Sin embargo, bajo nuestras condiciones no observamos diferencias en la fecundidad de los nemátodos

transgénicos CL2006 en comparación con la cepa control, y ninguno de los tratamientos afectó el número de larvas ni de huevos. Además de una disminución en la progenie, otra afección en el desove provoca la eclosión de los huevos dentro del nemátodo, resultando en la muerte de la madre. Esta retención de huevos se asocia con el envejecimiento o con un estrés ambiental como la falta de comida (J. Chen & Caswell-Chen, 2004; Mignerot et al., 2024; Pickett & Kornfeld, 2013). Durante los ensayos de viabilidad realizados con los tratamientos con K28A y M35C, se observaron pocos eventos de eclosión interna y sin diferencias entre los grupos, lo que coincide con la ausencia de cambios en la fertilidad. Por el contrario, durante el ensayo con el péptido A30W se observó un aumento significativo en los eventos de eclosión interna de los nemátodos CL2006 en comparación con los gusanos control. Además, el tratamiento con el péptido A30W disminuyó de forma significativa los eventos. Es posible que una pequeña variación en alguna de las condiciones de los experimentos sea responsable de esta diferencia en los eventos de eclosión interna, pero es necesario realizar más estudios para determinar la variable.

Uno de los principales mecanismos de toxicidad del péptido Aβ es la inducción de estrés oxidativo a través de distintas vías, entre ellas la interacción con metales y la interrupción de la cadena respiratoria mitocondrial (Tamagno et al., 2021). El residuo M35 es particularmente relevante, ya que su oxidación lleva a la formación de un catión radical sulfuranilo (Butterfield & Sultana, 2011), por lo tanto, su sustitución reduce la producción de ROS en cultivo celular y en el nemátodo (Butterfield & Sultana, 2011; Estrada-Rodríguez et al., 2019; Yatin et al., 1999). En este trabajo, se observó una disminución de la cantidad de ROS en nemátodos CL802 tratados con M35C en comparación con los tratamientos con los péptidos WT y A302. Sin embargo, no se observó diferencia respecto al control. Por el contrario, los efectos observados en los nemátodos CL4176 fueron distintos. En esta cepa, el contenido de proteínas oxidadas aumenta significativamente 32 horas después de la inducción de la expresión de Aβ muscular (Drake et al., 2003).

Los tratamientos con M35C y WT no afectaron el estrés oxidativo en los gusanos CL4176; únicamente el péptido K28A logró disminuir los niveles de ROS. Es posible que M35C ejerza un efecto antioxidante en gusanos control, pero resulta ineficaz en presencia de Aβ constitutivo. Aunque otros compuestos han mostrado mediar en la protección de nemátodos transgénicos contra Aβ mediante la reducción del estrés oxidativo (Gutierrez-Zepeda et al., 2005; X. G. Zhang et al., 2016), nuestros resultados muestran que la parálisis de los nemátodos CL4176 no está relacionada

con el estrés oxidativo. De forma similar, en otro estudio se encontró que el rescate del fenotipo de parálisis mediante el extracto EGb 761 del árbol *Ginkgo biloba* se asociaba al número de oligómeros de Aβ y no a los niveles de H_2O_2 (Wu et al., 2006). Por su parte, A30W incrementó la cantidad de ROS de forma aparente en los nemátodos CL802 y de manera significativa en CL4176. El aumento de los niveles de ROS se ha relacionado con la extensión de la viabilidad y con el incremento de la resistencia al estrés oxidativo en múltiples cepas (Dues et al., 2017), lo que podría asociarse específicamente con el efecto de A30W en los nemátodos.

El péptido Aβ también ha demostrado alterar la homeostasis del calcio mediante múltiples mecanismos, entre ellos la formación de poros en la membrana que permiten la entrada de Ca^{2+} a la célula (Bezprozvanny & Mattson, 2008). En *C. elegans*, se ha reportado que la exposición a una alta concentración de calcio extracelular exacerba la toxicidad de Aβ (Z. Zheng et al., 2022). Además, se ha observado la formación de poros en el nemátodo, que generan flujos de calcio anormales y permiten la localización de Aβ en otros tejidos a partir de las células de expresión (Gallrein et al., 2021). Debido a esto, en este estudio se esperaba observar un aumento de la señal de calcio en los nemátodos que expresan Aβ y el sensor de calcio GCamP. Sin embargo, se observó lo contrario, con una menor fluorescencia en los nemátodos CL4176xTJ356 en comparación con los controles, y sin diferencia entre los tratamientos. Es posible que, en el tiempo evaluado, el fenotipo de parálisis ya esté tan avanzado que no permita detectar el aumento del calcio. Por otro lado, sí se observaron diferencias entre los tratamientos en los nemátodos control, con un aumento de la señal con el péptido A30W y una reducción con el péptido K28A. Estos resultados reflejan el comportamiento observado en los ensayos de estrés oxidativo.

Los niveles de calcio se asocian estrechamente con los niveles de ROS. Un aumento del Ca^{2+} intracelular induce la activación de las NADPH oxidasas, lo que lleva al incremento de las ROS, mientras que las altas concentraciones de ROS activan los transportadores de calcio membranales, incrementando los niveles de Ca^{2+} intracelular (Madreiter-Sokolowski et al., 2020).

Un elemento central en la patogenia de la EA es la desregulación del sistema inmune. En particular, la agregación de Aβ lleva a una activación de la microglía, lo que inicialmente favorece la eliminación de los agregados. Posteriormente, la activación constante afecta la función de estas células, induce un estado de inflamación crónica y contribuye a la formación de agregados y a la activación del sistema inmune periférico (Gol Mohammad Pour Afrakoti et al., 2025). Por lo tanto,

se buscaría que las mutaciones evaluadas disminuyeran el impacto del péptido Aβ sobre el sistema inmune como parte de su efecto terapéutico. Sin embargo, el modelo utilizado en este trabajo presenta la limitación de no contar con un sistema inmune adaptativo ni con células inmunitarias móviles especializadas. En cambio, *C. elegans* hace uso de una serie de vías evolutivamente conservadas que se activan en respuesta a la presencia de patógenos, incluyendo al ya discutido factor de transcripción DAF-16 (Pukkila-Worley & Ausubel, 2012). Como se mencionó anteriormente, no se observó una diferencia significativa en el fenotipo de localización de DAF-16 en los nemátodos, aunque sí se observó una localización nuclear más evidente en los gusanos tratados con A30W y K28A. Muchas de estas vías de señalización de la inmunidad innata se traslapan con la respuesta a otros tipos de estrés biótico y abiótico (Martineau et al., 2021). En particular, DAF-16 promueve la autofagia mediante la activación de la expresión de genes como lgg-1 (Lange et al., 2025).

La evaluación de la autofagia fue de particular interés, ya que se ha reportado que la desregulación de este proceso se asocia con la EA (Lior et al., 2025). En *C. elegans*, la toxicidad de Aβ se asocia tanto a la sobreexpresión como a la inhibición de la autofagia, lo que destaca la importancia de su correcta regulación (Florez-McClure et al., 2007; H. Lin et al., 2022). En este estudio, se observó una disminución en el número de puntos con fluorescencia de GPF::LGG-1 en nemátodos AMH43 de 5 y 10 días de edad tratados con M35C, y en nemátodos de 10 días tratados con A30W. De acuerdo con Chang et al., (2007), la cantidad de puntos de LGG-1 en los gusanos incrementa con la edad en la faringe, las neuronas, el intestino y el músculo. Además, este aumento parece reflejar una disminución en la autofagia relacionada con el envejecimiento (Chang et al., 2017). Aunque en este trabajo se contabilizaron menos puntos fluorescentes en los nemátodos más envejecidos, estos se observaron exclusivamente en la faringe, a diferencia de los nemátodos de 5 días, que presentaron la señal de fluorescencia principalmente en la hipodermis. Es posible que la reducción de los puntos de GPF::LGG-1 causada por los tratamientos con A30W y M35C se asocie con una protección contra la disfunción de la autofagia asociada a la edad; sin embargo, se requieren experimentos adicionales para confirmar esta hipótesis.

En general, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que los péptidos A30W, K28A y M35C protegen contra la toxicidad de Aβ en un modelo de *C. elegans* mediante distintos mecanismos, entre ellos la disminución de los agregados, la reducción de ROS, la regulación del

calcio, así como la activación de DAF-16 y la regulación de la autofagia. Análisis posteriores podrían confirmar la aplicabilidad de estos péptidos en el desarrollo de tratamientos para la enfermedad de Alzheimer.

9. CONCLUSIONES

Las variantes del péptido Aβ K28A y M35C protegen a los nemátodos CL2006 contra la toxicidad de los agregados insolubles de Aβ mediante la disminución de agregados insolubles.

La variante A30W extiende la vida de nemátodos CL2006 y CL802 contra la toxicidad de los agregados insolubles de Aβ, sugiriendo un efecto no específico.

El tratamiento con los péptidos M35C y WT protege nemátodos CL4176 contra la toxicidad de oligómeros Aβ al retrasar el establecimiento del fenotipo de parálisis.

El péptido K28A disminuye el estrés oxidativo en nemátodos CL4176 sin alterar la parálisis.

Los péptidos A30W y K28A alteran el flujo de calcio en nemátodos CL802xHBR4.

Los péptidos A30W y K28A podrían activar el factor de transcripción DAF-16 en nemátodos TJ356.

Los péptidos A30W y M35C regulan la autofagia en nemátodos AMH43.

10. PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que las variantes A30W, K28A y M35C protegen contra la toxicidad de Aβ mediante múltiples mecanismos. Sin embargo, es necesario investigar con mayor profundidad las vías moleculares implicadas en la protección inducida por estos péptidos. Entre los posibles experimentos a realizar se encuentra la evaluación de la expresión génica en los nemátodos. En particular, el factor de transcripción *daf-16* y algunos de sus genes blanco, incluyendo *lgg-1*, *hsp-16* y *sod-3;* además de otros factores cuyas vías están involucradas en la resistencia al estrés, la longevidad y la protección contra la toxicidad de Aβ en *C. elegans*, por ejemplo, HIF-I, AMPK y SKN-1. A su vez, para verificar si las sustituciones pueden incrementar el efecto hormético observado tras la exposición de los nemátodos a Aβ WT, sería interesante evaluar la resistencia de los gusanos a altas temperaturas y al estrés oxidativo, entre otros, tras su tratamiento con las variantes. Otros puntos para explorar incluyen la incorporación de técnicas adicionales al reportero GFP::LGG-I para evaluar los cambios en la autofagia. Es importante verificar si el cambio observado es debido a una disfunción en la autofagia, o a una mejora en la función.

Anteriormente, se demostró in vitro que la interacción directa entre las variantes y el péptido WT inhibe la agregación de este último. Sin embargo, con la metodología empleada en este trabajo no fue posible determinar si los efectos observados en el nemátodo se deben a la interacción entre los péptidos o a un efecto indirecto derivado de la modulación de vías celulares relacionadas con el estrés. Por lo tanto, una perspectiva consiste en el uso de péptidos marcados con reporteros fluorescentes que permitan monitorear su localización en el nemátodo a partir de su tratamiento, para determinar si el efecto es debido directamente a la interacción directa con las variantes y el péptido WT o si es debido a la activación de algún mecanismo celular implicado. Este tipo de estrategias también nos permitiría evaluar la agregación en tiempo real en los nemátodos, por ejemplo, mediante microscopía de tiempo de vida de fluorescencia (FLIM).

Finalmente, es esencial trasladar el estudio de las variantes A30W, K28A y M35C a otros modelos animales que permitan evaluar aspectos de la patología que no son posibles de modelar en el nemátodo, incluyendo el papel de células inmunitarias especializadas.

11. BIBLIOGRAFÍA

A. Armstrong, R. (2019). Risk factors for Alzheimer's disease. *Folia Neuropathologica*, *57*(2), 87–105. https://doi.org/10.5114/fn.2019.85929

Ahmed, M., Davis, J., Aucoin, D., Sato, T., Ahuja, S., Aimoto, S., Elliott, J. I., Van Nostrand, W. E., & Smith, S. O. (2010). Structural conversion of neurotoxic amyloid-B 1-42 oligomers to fibrils. *Nature Structural and Molecular Biology*, *17*(5), 561–567. https://doi.org/10.1038/nsmb.1799

Aprile, F. A., Sormanni, P., Podpolny, M., Chhangur, S., Needham, L.-M., Ruggeri, F. S., Perni, M., Limbocker, R., Heller, G. T., Sneideris, T., Scheidt, T., Mannini, B., Habchi, J., Lee, S. F., Salinas, P. C., Knowles, T. P. J., Dobson, C. M., & Vendruscolo, M. (2020). Rational design of a conformation-specific antibody for the quantification of Aβ oligomers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *117*(24), 13509–13518. https://doi.org/10.1073/pnas.1919464117

Arriagada, P. V., Growdon, J. H., Hedley-Whyte, E. T., & Hyman, B. T. (1992). Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology*, *42*(3), 631–639. https://doi.org/10.1212/wnl.42.3.631

Arvanitakis, Z., Shah, R. C., & Bennett, D. A. (2019). Diagnosis and Management of Dementia: Review. *JAMA*, *322*(16), 1589. https://doi.org/10.1001/jama.2019.4782

Association, Alzheimer. Thies, W. and Bleiler, L. (2013). Alzheimer ' s disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, *9*, 208–245.

Atri, A. (2019). The Alzheimer's Disease Clinical Spectrum: Diagnosis and Management. *Medical Clinics of North America*, *103*(2), 263–293. https://doi.org/10.1016/j.mcna.2018.10.009

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K., Wiley, C. J., Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Smith, J. A., Allison, R. D., Bittner, M., & Blackshaw, S. (2003). *Current Protocols in Molecular Biology*.

Barage, S. H., & Sonawane, K. D. (2015). Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides*, *52*, 1–18. https://doi.org/10.1016/j.npep.2015.06.008

Barber, R. C. (2012). The Genetics of Alzheimer's Disease. *Scientifica*, *2012*(2), 1–14. https://doi.org/10.6064/2012/246210

Bates, K. A., Verdile, G., Li, Q. X., Ames, D., Hudson, P., Masters, C. L., & Martins, R. N. (2009). Clearance mechanisms of Alzheimer's amyloid-B peptide: Implications for

therapeutic design and diagnostic tests. *Molecular Psychiatry*, *14*(5), 469–486. https://doi.org/10.1038/mp.2008.96

Bayer, T. A., Cappai, R., Masters, C. L., Beyreuther, K., & Multhaup, G. (1999). It all sticks together - The APP-related family of proteins and Alzheimer's disease. *Molecular Psychiatry*, *4*(6), 524–528. https://doi.org/10.1038/sj.mp.4000552

Belyaev, N. D., Kellett, K. A. B., Beckett, C., Makova, N. Z., Revett, T. J., Nalivaeva, N. N., Hooper, N. M., & Turner, A. J. (2010). The transcriptionally active amyloid precursor protein (APP) intracellular domain is preferentially produced from the 695 isoform of APP in a β-secretase-dependent pathway. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(53), 41443–41454. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.141390

Bertram, L., Lill, C. M., & Tanzi, R. E. (2010). The genetics of alzheimer disease: Back to the future. *Neuron*, *68*(2), 270–281. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.10.013

Bezprozvanny, I., & Mattson, M. P. (2008). Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 31, Number 9, pp. 454–463). https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.06.005

Bi, T. M., & Daggett, V. (2018). The role of α-sheet in amyloid oligomer aggregation and toxicity. *Yale Journal of Biology and Medicine*, *91*(3), 247–255.

Bitan, G., Tarus, B., Vollers, S. S., Lashuel, H. A., Condron, M. M., Straub, J. E., & Teplow, D. B. (2003). A Molecular Switch in Amyloid Assembly: Met35 and Amyloid β-Protein Oligomerization. *Journal of the American Chemical Society*, *125*(50), 15359–15365. https://doi.org/10.1021/ja0349296

Brenner, S. (1974). The Genetics of CAENORHABDITIS ELEGANS. *Genetics*, *77*(1), 71–94. https://doi.org/10.1002/cbic.200300625

Brothers, H. M., Gosztyla, M. L., & Robinson, S. R. (2018). The physiological roles of amyloid-β peptide hint at new ways to treat Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *10*(APR), 1–16. https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00118

Butterfield, D. A., & Sultana, R. (2011). Methionine-35 of A β (1–42): Importance for Oxidative Stress in Alzheimer Disease. *Journal of Amino Acids*, *2011*(Figure 1), 1–10. https://doi.org/10.4061/2011/198430

Cáceres, C., Heusser, B., Garnham, A., & Moczko, E. (2023). The Major Hypotheses of Alzheimer's Disease: Related Nanotechnology-Based Approaches for Its Diagnosis and Treatment. In *Cells* (Vol. 12, Number 23). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). https://doi.org/10.3390/cells12232669

Cai, S. Q., & Sesti, F. (2009). Oxidation of a potassium channel causes progressive sensory function loss during aging. *Nature Neuroscience*, *12*(5), 611–617. https://doi.org/10.1038/nn.2291

Cardoso, S. M., Pereira, C. F., Moreira, P. I., Arduino, D. M., Esteves, A. R., & Oliveira, C. R. (2010). Mitochondrial control of autophagic lysosomal pathway in Alzheimer's disease. In *Experimental Neurology* (Vol. 223, Number 2, pp. 294–298). https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.06.008

Chang, J. T., Kumsta, C., Hellman, A. B., Adams, L. M., & Hansen, M. (2017). Spatiotemporal regulation of autophagy during Caenorhabditis elegans aging. *ELife*, *6*. https://doi.org/10.7554/eLife.18459

Cheignon, C., Tomas, M., Bonnefont-Rousselot, D., Faller, P., Hureau, C., & Collin, F. (2018). Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. In *Redox Biology* (Vol. 14, pp. 450–464). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.10.014

Chen, G. F., Xu, T. H., Yan, Y., Zhou, Y. R., Jiang, Y., Melcher, K., & Xu, H. E. (2017). Amyloid beta: Structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacologica Sinica*, *38*(9), 1205–1235. https://doi.org/10.1038/aps.2017.28

Chen, J., & Caswell-Chen, E. P. (2004). Facultative Vivipary is a Life-History Trait in Caenorhabditis elegans. *Journal of Nematology*, *36*(2), 107–113. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19262794

Chen, J., Wang, M., & Turko, I. V. (2013). Quantification of Amyloid Precursor Protein Isoforms Using Quantification Concatamer Internal Standard. *Analytical Chemistry*, *85*(1), 303–307. https://doi.org/10.1021/ac3033239

Chen, X., Barclay, J. W., Burgoyne, R. D., & Morgan, A. (2015). Using C. elegans to discover therapeutic compounds for ageing-associated neurodegenerative diseases. *Chemistry Central Journal*, *9*(65), 1–20. https://doi.org/10.1186/s13065-015-0143-y

Cohen, E., Bieschke, J., Perciavalle, R. M., Kelly, J. W., & Dillin, A. (2006). Opposing Activities Protect Against Age-Onset Proteotoxicity. *Science*, *313*(5793), 1604–1610. https://doi.org/10.1126/science.1124646

Cole, S. L., & Vassar, R. (2007). The Alzheimer's disease β-secretase enzyme, BACE1. *Molecular Neurodegeneration*, *2*(1), 1–25. https://doi.org/10.1186/1750-1326-2-22

Corsi, A. K., Wightman, B., & Chalfie, M. (2015). A transparent window into biology: A primer on Caenorhabditis elegans. *Genetics*, *200*(2), 387–407. https://doi.org/10.1534/genetics.115.176099

Dai, X. L., Sun, Y. X., & Jiang, Z. F. (2007). Attenuated cytotoxicity but enhanced βfibril of a mutant amyloid β-peptide with a methionine to cysteine substitution. *FEBS Letters*, *581*(7), 1269–1274. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.02.038

DanQing, L., YuJie, G., ChengPeng, Z., HongZhi, D., Yi, H., BiSheng, H., & Yan, C. (2020). N-butanol extract of Hedyotis diffusa protects transgenic Caenorhabditis elegans from Aβ-induced toxicity. *Phytotherapy Research*, (July), 1–14. https://doi.org/10.1002/ptr.6871

Das, U., Wang, L., Ganguly, A., Saikia, J. M., Wagner, S. L., Koo, E. H., & Roy, S. (2015). Visualizing APP and BACE-1 approximation in neurons yields insight into the amyloidogenic pathway. *Nature Neuroscience*, *19*(1), 55–64. https://doi.org/10.1038/nn.4188

de la Cueva, M., Antequera, D., Ordoñez-Gutierrez, L., Wandosell, F., Camins, A., Carro, E., & Bartolome, F. (2022). Amyloid-β impairs mitochondrial dynamics and autophagy in Alzheimer's disease experimental models. *Scientific Reports*, *12*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-022-13683-3

Deture, M. A., & Dickson, D. W. (2019). The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, *14*(1), 1–18. https://doi.org/10.1186/s13024-019-0333-5

Diomede, L., Rigacci, S., Romeo, M., Stefani, M., & Salmona, M. (2013). Oleuropein Aglycone Protects Transgenic C. elegans Strains Expressing Aβ42 by Reducing Plaque Load and Motor Deficit. *PLoS ONE*, *8*(3). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058893

Dosanjh, L. E., Brown, M. K., Rao, G., Link, C. D., & Luo, Y. (2010). Behavioral phenotyping of a transgenic caenorhabditis elegans expressing neuronal amyloid-β. *Journal of Alzheimer's Disease*, *19*(2), 681–690. https://doi.org/10.3233/JAD-2010-1267

Drake, J., Link, C. D., & Butterfield, D. A. (2003). Oxidative stress precedes fibrillar deposition of Alzheimer's disease amyloid β-peptide (1-42) in a transgenic Caenorhabditis elegans model. *Neurobiology of Aging*, *24*(3), 415–420. https://doi.org/10.1016/S0197-4580(02)00225-7

Du, S., & Zheng, H. (2021). Role of FoxO transcription factors in aging and age-related metabolic and neurodegenerative diseases. In *Cell and Bioscience* (Vol. 11, Number 1). BioMed Central Ltd. https://doi.org/10.1186/s13578-021-00700-7

Durell, S. R., Kayed, R., & Guy, H. R. (2022). The amyloid concentric β-barrel hypothesis: Models of amyloid beta 42 oligomers and annular protofibrils. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, *90*(5), 1190–1209. https://doi.org/10.1002/prot.26301

Estevez, A. O., Mueller, C. L., Morgan, K. L., Szewczyk, N. J., Teece, L., Miranda-Vizuete, A., & Estevez, M. (2012). Selenium induces cholinergic motor neuron degeneration in

Caenorhabditis elegans. *NeuroToxicology*, *33*(5), 1021–1032. https://doi.org/10.1016/j.neuro.2012.04.019

Estrada, L., & Soto, C. (2006). Disrupting β-Amyloid Aggregation for Alzheimer Disease Treatment. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, *7*(1), 115–126. https://doi.org/10.2174/156802607779318262

Estrada-Rodríguez, A. E., Valdez-Pérez, D., Ruiz-García, J., Treviño-Garza, A., Gómez-Martínez, A. M., Martínez-Rodríguez, H. G., Rivas-Estilla, A. M., Vidaltamayo, R., & Zomosa-Signoret, V. (2019). Effects of Single Amino Acid Substitutions on Aggregation and Cytotoxicity Properties of Amyloid β Peptide. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, *25*(2), 493–509. https://doi.org/10.1007/s10989-018-9693-x

Fay, D. S., Fluet, A., Johnson, C. J., & Link, C. D. (2002). In Vivo Aggregation of β-Amyloid Peptide Variants. *Journal of Neurochemistry*, *71*(4), 1616–1625. https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1998.71041616.x

Ferris, H., & Hieb, W. F. (2015). Ellsworth C. Dougherty: A pioneer in the selection of Caenorhabditis elegans as a model organism. *Genetics*, *200*(4), 991–1002. https://doi.org/10.1534/genetics.115.178913

Florez-McClure, M. L., Hohsfield, L. A., Fonte, G., Bealor, M. T., & Link, C. D. (2007). Decreased insulin-receptor signaling promotes the autophagic degradation of beta-amyloid peptide in C. elegans. *Autophagy*, *3*(6), 569–580. https://doi.org/10.4161/auto.4776

Francis, P. T., Palmer, A. M., Snape, M., & Wilcock, G. K. (1999). The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, *66*(2), 137–147. https://doi.org/10.1136/jnnp.66.2.137

Gallrein, C., Iburg, M., Michelberger, T., Koçak, A., Puchkov, D., Liu, F., Ayala Mariscal, S. M., Nayak, T., Kaminski Schierle, G. S., & Kirstein, J. (2021). Novel amyloid-beta pathology C. elegans model reveals distinct neurons as seeds of pathogenicity. *Progress in Neurobiology*, *198*(May 2020), 101907. https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2020.101907

Gasca-Martínez, Y., Ontiveros-Torres, M. A., López-Gallegos, I., & Jarero-Basulto, J. J. (2026). Amyloid Beta Oligomers as Early Triggers of Neuronal Cytoskeleton Dysfunction in Alzheimer's Disease. In *Pathophysiology* (Vol. 33, Number 1). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). https://doi.org/10.3390/pathophysiology33010014

Gaspar, R. C., Villarreal, S. A., Bowles, N., Hepler, R. W., Joyce, J. G., & Shughrue, P. J. (2010). Oligomers of β-amyloid are sequestered into and seed new plaques in the brains of an AD mouse model. *Experimental Neurology*, *223*(2), 394–400. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.09.001

Giorgetti, S., Greco, C., Tortora, P., & Aprile, F. A. (2018). Targeting amyloid aggregation: An overview of strategies and mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(9). https://doi.org/10.3390/ijms19092677

Glabe, C. G. (2008). Structural classification of toxic amyloid oligomers. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(44), 29639–29643. https://doi.org/10.1074/jbc.R800016200

Godini, R., Pocock, R., & Fallahi, H. (2019). Caenorhabditis elegans hub genes that respond to amyloid beta are homologs of genes involved in human Alzheimer's disease. *PLoS ONE*, *14*(7). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219486

Gol Mohammad Pour Afrakoti, L., Daneshpour Moghadam, S., & Hadinezhad, P. (2025). Alzheimer's disease and the immune system: A comprehensive overview with a focus on B cells, humoral immunity, and immunotherapy. *Journal of Alzheimer's Disease Reports*, *9*. https://doi.org/10.1177/25424823251329188

Gong, Y., Chang, L., Viola, K. L., Lacor, P. N., Lambert, M. P., Finch, C. E., Krafft, G. A., & Klein, W. L. (2003). Alzheimer's disease-affected brain: Presence of oligomeric Aβ ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(18), 10417–10422. https://doi.org/10.1073/pnas.1834302100

Gutiérrez-Robledo, L. M., & Arrieta-Cruz, I. (2015). Dementia in Mexico: The need for a National Alzheimer´s Plan. *Gaceta Medica de Mexico*, *151*(5), 667–673. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26526483

Gutierrez-Zepeda, A., Santell, R., Wu, Z., Brown, M., Wu, Y. J., Khan, I., Link, C. D., Zhao, B., & Luo, Y. (2005). Soy isoflavone glycitein protects against beta amyloid-induced toxicity and oxidative stress in transgenic Caenorhabditis elegans. *BMC Neuroscience*, *6*, 1–9. https://doi.org/10.1186/1471-2202-6-54

Halaschek-Wiener, J., Khattra, J. S., McKay, S., Pouzyrev, A., Stott, J. M., Yang, G. S., Holt, R. A., Jones, S. J. M., Marra, M. A., Brooks-Wilson, A. R., & Riddle, D. L. (2005). Analysis of long-lived C. elegans daf-2 mutants using serial analysis of gene expression. *Genome Research*, *15*(5), 603–615. https://doi.org/10.1101/gr.3274805

Hanahan, D., & Harbor, C. S. (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, *166*(4), 557–580.

Hardy, J. A., & Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's Disease: The Amyloid Alzheimer's disease. *Science*, *256*, 184–185.

Hassan, W. M., Merin, D. A., Fonte, V., & Link, C. D. (2009). AIP-1 ameliorates β-amyloid peptide toxicity in a Caenorhabditis elegans Alzheimer's disease model. *Human Molecular Genetics*, *18*(15), 2739–2747. https://doi.org/10.1093/hmg/ddp209

Henderson, S. T., & Johnson, T. E. (2001). daf-16 integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode Caenorhabditis elegans. *Current Biology*, *11*(24), 1975–1980. https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00594-2

Honig, L. S., Vellas, B., Woodward, M., Boada, M., Bullock, R., Borrie, M., Hager, K., Andreasen, N., Scarpini, E., Liu-Seifert, H., Case, M., Dean, R. A., Hake, A., Sundell, K., Poole Hoffmann, V., Carlson, C., Khanna, R., Mintun, M., DeMattos, R., … Siemers, E. (2018). Trial of Solanezumab for Mild Dementia Due to Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine*, *378*(4), 321–330. https://doi.org/10.1056/nejmoa1705971

Hornsten, A., Lieberthal, J., Fadia, S., Malins, R., Ha, L., Xu, X., Daigle, I., Markowitz, M., Plasterk, R., Li, C., & in, P. (2007). *APL-1, a Caenorhabditis elegans protein related to the human-amyloid precursor protein, is essential for viability*. www.pnas.org/cgi/content/full/

Ihl, R. (2012). Gingko biloba extract EGb 761®: Clinical data in dementia. *International Psychogeriatrics*, *24*(SUPPL. 1). https://doi.org/10.1017/S1041610212000543

Janßen, I. M., Sturtz, S., Skipka, G., Zentner, A., Garrido, M. V., & Busse, R. (2010). Ginkgo biloba in Alzheimer's disease: A systematic review. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, *160*(21–22), 539–546. https://doi.org/10.1007/s10354-010-0844-8

Jarrett, J. T., Berger, E. P., & Lansbury, P. T. (1993). The Carboxy Terminus of the β Amyloid Protein Is Critical for the Seeding of Amyloid Formation: Implications for the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Biochemistry*, *32*(18), 4693–4697. https://doi.org/10.1021/bi00069a001

Julien, C., Tomberlin, C., Roberts, C. M., Akram, A., Stein, G. H., Silverman, M. A., & Link, C. D. (2018). In vivo induction of membrane damage by β-amyloid peptide oligomers. *Acta Neuropathologica Communications*, *6*(1), 131. https://doi.org/10.1186/s40478-018-0634-x

Kaletta, T., & Hengartner, M. O. (2006). Finding function in novel targets: C. elegans as a model organism. *Nature Reviews Drug Discovery*, *5*(5), 387–399. https://doi.org/10.1038/nrd2031

Kametani, F., & Hasegawa, M. (2018). Reconsideration of amyloid hypothesis and tau hypothesis in Alzheimer's disease. In *Frontiers in Neuroscience* (Vol. 12, Number JAN). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00025

Keowkase, R., Aboukhatwa, M., & Luo, Y. (2010). Fluoxetine protects against amyloid-beta toxicity, in part via daf-16 mediated cell signaling pathway, in Caenorhabditis elegans. *Neuropharmacology*, *59*(4–5), 358–365. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.04.008

Kim, W., Underwood, R. S., Greenwald, I., & Shaye, D. D. (2018). Ortholist 2: A new comparative genomic analysis of human and caenorhabditis elegans genes. *Genetics*, *210*(2), 445–461. https://doi.org/10.1534/genetics.118.301307

Lai, C. H., Chou, C. Y., Ch'ang, L. Y., Liu, C. S., & Lin, W. C. (2000). Identification of novel human genes evolutionarily conserved in Caenorhabditis elegans by comparative proteomics. *Genome Research*, *10*(5), 703–713. https://doi.org/10.1101/gr.10.5.703

Lambert, M. P., Barlow, A. K., Chromy, B. A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., Morgan, T. E., Rozovsky, I., Trommer, B., Viola, K. L., Wals, P., Zhang, C., Finch, C. E., Krafft, G. A., & Klein, W. L. (1998). Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A 1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(11), 6448–6453. https://doi.org/10.1073/pnas.95.11.6448

Lange, C. M., Higuchi-Sanabria, R., & Kumsta, C. (2025). Autophagy in proteostasis and aging in Caenorhabditis elegans. *Cell Stress and Chaperones*, *30*(6). https://doi.org/10.1016/j.cstres.2025.100115

Leboutet, R., Largeau, C., Müller, L., Prigent, M., Quinet, G., Rodriguez, M. S., Cuif, M. H., Hoppe, T., Culetto, E., Lefebvre, C., & Legouis, R. (2023). LGG-1/GABARAP lipidation is not required for autophagy and development in Caenorhabditis elegans. *ELife*, *12*, e85748. https://doi.org/10.7554/eLife.85748

Lee, S. S., Kennedy, S., Tolonen, A. C., & Ruvkun, G. (2003). DAF-16 target genes that control C. elegans life-span and metabolism. *Science*, *300*(5619), 644–647. https://doi.org/10.1126/science.1083614

Lichty, J. D., Mane, H., Yarmey, V. R., & Miguel, A. S. (2025). Amyloid β induces hormetic-like effects through major stress pathways in a C. elegans model of Alzheimer's Disease. *PLoS ONE*, *20*(4 April). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0315810

Lin, H., Gao, Y., Zhang, C., Ma, B., Wu, M., Cui, X., & Wang, H. (2022). Autophagy Regulation Influences β-Amyloid Toxicity in Transgenic Caenorhabditis elegans. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *14*. https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.885145

Lin, K., Hsin, H., Libina, N., & Kenyon, C. (2001). *Regulation of the Caenorhabditis elegans longevity protein DAF-16 by insulin/IGF-1 and germline signaling* (Vol. 28). http://genetics.nature.com

Lin, Y., Im, H., Diem, L. T., & Ham, S. (2019). Characterizing the structural and thermodynamic properties of Aβ42 and Aβ40. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *510*(3), 442–448. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.01.124

Link, C. D. (1995). Expression of human β-amyloid peptide in transgenic Caenorhabditis elegans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*(20), 9368–9372. https://doi.org/10.1073/pnas.92.20.9368

Lior, N., Chen, D., Dan, F., & Ronit, P. K. (2025). The connection between autophagy and Alzheimer's disease. In *Inflammation Research* (Vol. 74, Number 1). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. https://doi.org/10.1007/s00011-025-02118-0

Liu, C. C., Kanekiyo, T., Xu, H., & Bu, G. (2013). Apolipoprotein e and Alzheimer disease: Risk, mechanisms and therapy. In *Nature Reviews Neurology* (Vol. 9, Number 2, pp. 106–118). https://doi.org/10.1038/nrneurol.2012.263

Liu, P. P., Xie, Y., Meng, X. Y., & Kang, J. S. (2019). History and progress of hypotheses and clinical trials for alzheimer's disease. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 4, Number 1). Springer Nature. https://doi.org/10.1038/s41392-019-0063-8

Liu, Q., Song, S., Liu, L., & Hong, W. (2025). In Vivo Seeding of Amyloid-β Protein and Implications in Modeling Alzheimer's Disease Pathology. In *Biomolecules* (Vol. 15, Number 4). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). https://doi.org/10.3390/biom15040571

Lopez-Lee, C., Torres, E. R. S., Carling, G., & Gan, L. (2024). Mechanisms of sex differences in Alzheimer's disease. In *Neuron* (Vol. 112, Number 8, pp. 1208–1221). Cell Press. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2024.01.024

Lorenzo, A., & Yankner, B. A. (1994). Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *91*(25), 12243–12247. https://doi.org/10.1073/pnas.91.25.12243

Lublin, A. L., & Link, C. D. (2013). Alzheimer's disease drug discovery: In vivo screening using Caenorhabditis elegans as a model for β-amyloid peptide-induced toxicity. *Drug Discovery Today: Technologies*, *10*(1), e115–e119. https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2012.02.002

Lue, L., Kuo, Y., Roher, A. E., Brachova, L., Shen, Y., Sue, L., Beach, T., Kurth, J. H., Rydel, R. E., & Rogers, J. (1999). Soluble Amyloid β Peptide Concentration as a Predictor of Synaptic Change in Alzheimer's Disease. *The American Journal of Pathology*, *155*(3), 853–862. https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65184-X

Madreiter-Sokolowski, C. T., Thomas, C., & Ristow, M. (2020). Interrelation between ROS and Ca2+ in aging and age-related diseases. In *Redox Biology* (Vol. 36). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101678

Martineau, C. N., Kirienko, N. V., & Pujol, N. (2021). Innate immunity in C. elegans. In *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 144, pp. 309–351). Academic Press Inc. https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2020.12.007

Matharu, B., El-Agnaf, O., Razvi, A., & Austen, B. M. (2010). Development of retro-inverso peptides as anti-aggregation drugs for β-amyloid in Alzheimer's disease. *Peptides*, *31*(10), 1866–1872. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.06.033

Meneely, P. M., Dahlberg, C. L., & Rose, J. K. (2019). Working with Worms: Caenorhabditis elegans as a Model Organism. *Current Protocols in Essential Laboratory Techniques*, *19*(1), 1–35. https://doi.org/10.1002/cpet.35

Mignerot, L., Gimond, C., Bolelli, L., Bouleau, C., Sandjak, A., Boulin, T., & Braendle, C. (2024). *Natural variation in the Caenorhabditis elegans egg-laying circuit modulates an intergenerational fitness trade-off*. https://doi.org/10.7554/eLife.88253.2

Monto, F., Beatriz, A., Martorell, P., Bataller, E., Llopis, S., Ortiz, P., & Ramo, D. (2013). *A Cocoa Peptide Protects Caenorhabditis elegans from Oxidative Stress and b -Amyloid Peptide Toxicity*. *8*(5). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063283

Morley, J. E., Farr, S. A., Nguyen, A. D., & Xu, F. (2019). What is the Physiological Function of Amyloid-Beta Protein? In *Journal of Nutrition, Health and Aging* (Vol. 23, Number 3, pp. 225–226). Springer-Verlag France. https://doi.org/10.1007/s12603-019-1162-5

Mrdenovic, D., Pieta, I. S., Nowakowski, R., Kutner, W., Lipkowski, J., & Pieta, P. (2022). Amyloid β interaction with model cell membranes – What are the toxicity-defining properties of amyloid β? In *International Journal of Biological Macromolecules* (Vol. 200, pp. 520–531). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.01.117

Ni, C., Shi, H., Yu, H., Chang, Y., & Chen, and Y. (2011). Folding stability of amyloid-β 40 monomer is an important determinant of the nucleation kinetics in fibrillization. *The FASEB Journal*, *25*(4), 1390–1401. https://doi.org/10.1096/fj.10-175539

Nong, Y., Kim, J. S., Jia, L., Arancio, O., & Wang, Q. (2025). The interaction between neurotransmitter receptor activity and amyloid-β pathology in Alzheimer's disease. In *Journal of Alzheimer's Disease* (Vol. 106, Number 2, pp. 391–409). SAGE Publications Ltd. https://doi.org/10.1177/13872877251342273

O'Brien, R. J., & Wong, P. C. (2011). Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease. *Annual Review of Neuroscience*, *34*(1), 185–204. https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113613

Oh, S. W., Mukhopadhyay, A., Svrzikapa, N., Jiang, F., Davis, R. J., & Tissenbaum, H. A. (2005). *JNK regulates lifespan in Caenorhabditis elegans by modulating nuclear translocation of forkhead transcription factorDAF-16*. www.pnas.orgcgidoi10.1073pnas.0500749102

Ostrowitzki, S., Lasser, R. A., Dorflinger, E., Scheltens, P., Barkhof, F., Nikolcheva, T., Ashford, E., Retout, S., Hofmann, C., Delmar, P., Klein, G., Andjelkovic, M., Dubois, B., Boada, M., Blennow, K., Santarelli, L., & Fontoura, P. (2017). A phase III randomized trial of gantenerumab in prodromal Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research and Therapy*, *9*(1), 1–15. https://doi.org/10.1186/s13195-017-0318-y

Pappolla, M., Bozner, P., Soto, C., Shao, H., Robakis, N. K., Zagorski, M., Frangione, B., & Ghiso, J. (1998). Inhibition of Alzheimer β-Fibrillogenesis by Melatonin. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(13), 7185–7188. https://doi.org/10.1074/jbc.273.13.7185

Park, H. E. H., Jung, Y., & Lee, S. J. V. (2017). Survival assays using Caenorhabditis elegans. *Molecules and Cells*, *40*(2), 90–99. https://doi.org/10.14348/molcells.2017.0017

Park, K. W., Wood, C. A., Li, J., Taylor, B. C., Oh, S. W., Young, N. L., & Jankowsky, J. L. (2021). Gene therapy using Aβ variants for amyloid reduction. *Molecular Therapy*, *29*(7), 2294–2307. https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.02.026

Perera Molligoda Arachchige, A. S., Schmiliver, B., & Alves, G. A. M. (2026). Alzheimer's disease: A comprehensive review of epidemiology, pathophysiology, diagnosis, and treatment. *AIMS Neuroscience*, *13*(2), 208–243. https://doi.org/10.3934/NEUROSCIENCE.2026009

Perni, M., Mannini, B., Xu, C. K., Kumita, J. R., Dobson, C. M., Chiti, F., & Vendruscolo, M. (2021). Exogenous misfolded protein oligomers can cross the intestinal barrier and cause a disease phenotype in C. elegans. *Scientific Reports*, *11*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-021-93527-8

Piaceri, I. (2013). Genetics of familial and sporadic Alzheimer s disease. *Frontiers in Bioscience*, *E5*(1), E605. https://doi.org/10.2741/E605

Pickett, C. L., & Kornfeld, K. (2013). Age-related degeneration of the egg-laying system promotes matricidal hatching in Caenorhabditis elegans. *Aging Cell*, *12*(4), 544–553. https://doi.org/10.1111/acel.12079

Porat, Y., Abramowitz, A., & Gazit, E. (2006). Inhibition of amyloid fibril formation by polyphenols: Structural similarity and aromatic interactions as a common inhibition mechanism. *Chemical Biology and Drug Design*, *67*(1), 27–37. https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2005.00318.x

Pouplana, S., Espargaro, A., Galdeano, C., Viayna, E., Sola, I., Ventura, S., Munoz-Torrero, D., & Sabate, R. (2014). Thioflavin-S Staining of Bacterial Inclusion Bodies for the Fast, Simple, and Inexpensive Screening of Amyloid Aggregation Inhibitors. *Current Medicinal Chemistry*, *21*(9), 1152–1159. https://doi.org/10.2174/09298673113206660256

Pradhan, R., Yadav, S. K., Prem, N. N., Bhagel, V., Pathak, M., Shekhar, S., Gaikwad, S., Dwivedi, S. N., Bal, C. S., Dey, A. B., & Dey, S. (2020). Serum FOXO3A: A ray of hope for early diagnosis of Alzheimer's disease. *Mechanisms of Ageing and Development*, *190*. https://doi.org/10.1016/j.mad.2020.111290

Pukkila-Worley, R., & Ausubel, F. M. (2012). Immune defense mechanisms in the Caenorhabditis elegans intestinal epithelium. In *Current Opinion in Immunology* (Vol. 24, Number 1, pp. 3–9). https://doi.org/10.1016/j.coi.2011.10.004

Qiu, T., Liu, Q., Chen, Y. X., Zhao, Y. F., & Li, Y. M. (2015). Aβ42 and Aβ40: similarities and differences. *Journal of Peptide Science*, *21*(7), 522–529. https://doi.org/10.1002/psc.2789

Quon, D., Wang, Y., Catalano, R., Scardina, J. M., Murakami, K., & Cordell, B. (1991). Formation of β-amyloid protein deposits in brains of transgenic mice. In *Nature* (Vol. 352, Number 6332, pp. 239–241). https://doi.org/10.1038/352239a0

Rak, M., Del Bigio, M. R., Mai, S., Westaway, D., & Gough, K. (2007). Dense-core and diffuse Aβ plaques in TgCRND8 mice studied with synchrotron FTIR microspectroscopy. *Biopolymers*, *87*(4), 207–217. https://doi.org/10.1002/bip.20820

Reiss, A. B., Arain, H. A., Stecker, M. M., Siegart, N. M., & Kasselman, L. J. (2018). Amyloid toxicity in Alzheimer's disease. *Reviews in the Neurosciences*, *29*(6), 613–627. https://doi.org/10.1515/revneuro-2017-0063

Scarano, N., Musumeci, F., Casini, B., Brullo, C., D'Ursi, P., Fossa, P., Schenone, S., & Cichero, E. (2025). Alzheimer's Disease Etiology Hypotheses and Therapeutic Strategies: A Perspective. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 26, Number 14). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). https://doi.org/10.3390/ijms26146980

Schreiner, T. G., Schreiner, O. D., Adam, M., & Popescu, B. O. (2023). The Roles of the Amyloid Beta Monomers in Physiological and Pathological Conditions. In *Biomedicines* (Vol. 11, Number 5). MDPI. https://doi.org/10.3390/biomedicines11051411

Shea, D., Hsu, C. C., Bi, T. M., Paranjapye, N., Childers, M. C., Cochran, J., Tomberlin, C. P., Wang, L., Paris, D., Zonderman, J., Varani, G., Link, C. D., Mullan, M., & Daggett, V. (2019). α-Sheet secondary structure in amyloid β-peptide drives aggregation and toxicity in Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *116*(18), 8895–8900. https://doi.org/10.1073/pnas.1820585116

Sheppard, P. M., Turner, J. R. G., Brown, K. S., Benson, W. W., & Singer, M. C. (1986). The structure of the nervous system of the nematode Caenorhabditis elegans. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, *314*(1165), 1–340. https://doi.org/10.1098/rstb.1986.0056

Shuaib, S., Saini, R. K., Goyal, D., & Goyal, B. (2020). Impact of K16A and K28A mutation on the structure and dynamics of amyloid-β42 peptide in Alzheimer's disease: key insights from molecular dynamics simulations. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, *38*(3), 708–721. https://doi.org/10.1080/07391102.2019.1586587

Sinnige, T., Ciryam, P., Casford, S., Dobson, C. M., De Bono, M., & Vendruscolo, M. (2019). Expression of the amyloid-β peptide in a single pair of C. elegans sensory neurons modulates the associated behavioural response. *PLoS ONE*, *14*(5), 1–14. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217746

Stravalaci, M., Bastone, A., Beeg, M., Cagnotto, A., Colombo, L., Di Fede, G., Tagliavini, F., Cantù, L., Del Favero, E., Mazzanti, M., Chiesa, R., Salmona, M., Diomede, L., & Gobbi, M. (2012). Specific recognition of biologically active amyloid-β oligomers by a new surface plasmon resonance-based immunoassay and an in vivo assay in Caenorhabditis elegans. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(33), 27796–27805. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.334979

Sunde, M., & Blake, C. C. F. (1998). From the globular to the fibrous state: Protein structure and structural conversion in amyloid formation. *Quarterly Reviews of Biophysics*, *31*(1), 1–39. https://doi.org/10.1017/S0033583598003400

Tamagno, E., Guglielmotto, M., Vasciaveo, V., & Tabaton, M. (2021). Oxidative stress and beta amyloid in alzheimer's disease. Which comes first: The chicken or the egg? In *Antioxidants* (Vol. 10, Number 9). MDPI. https://doi.org/10.3390/antiox10091479

Tangrodchanapong, T., Sobhon, P., & Meemon, K. (2020). Frondoside A Attenuates Amyloid-β Proteotoxicity in Transgenic Caenorhabditis elegans by Suppressing Its Formation. *Frontiers in Pharmacology*, *11*(September), 1–12. https://doi.org/10.3389/fphar.2020.553579

Teo, E., Lim, S. Y. J., Fong, S., Larbi, A., Wright, G. D., Tolwinski, N., & Gruber, J. (2020). A high throughput drug screening paradigm using transgenic Caenorhabditis elegans model of Alzheimer's disease. *Translational Medicine of Aging*, *4*, 11–21. https://doi.org/10.1016/j.tma.2019.12.002

Thal, D. R., Poesen, K., Vandenberghe, R., & De Meyer, S. (2025). Alzheimer's disease neuropathology and its estimation with fluid and imaging biomarkers. In *Molecular Neurodegeneration* (Vol. 20, Number 1). BioMed Central Ltd. https://doi.org/10.1186/s13024-025-00819-y

Tissenbaum, H. A. (2018). DAF-16: FOXO in the Context of C. elegans. In *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 127, pp. 1–21). Academic Press Inc. https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2017.11.007

Tjernberg, L. O., Callaway, D. J. E., Tjernberg, A., Hahne, S., Lilliehöök, C., Terenius, L., Thyberg, J., & Nordstedt, C. (1999). A molecular model of Alzheimer amyloid β-peptide fibril formation. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(18), 12619–12625. https://doi.org/10.1074/jbc.274.18.12619

Tsai, J., Grutzendler, J., Duff, K., & Gan, W.-B. (2004). Fibrillar amyloid deposition leads to local synaptic abnormalities and breakage of neuronal branches. *Nature Neuroscience*, *7*(11), 1181–1183. https://doi.org/10.1038/nn1335

Uno, M., & Nishida, E. (2016). Lifespan-regulating genes in c. Elegans. *Npj Aging and Mechanisms of Disease*, *2*(1). https://doi.org/10.1038/npjamd.2016.10

Vivekanandan, S., Brender, J. R., Lee, S. Y., & Ramamoorthy, A. (2011). A partially folded structure of amyloid-beta(1-40) in an aqueous environment. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *411*(2), 312–316. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.06.133

Walsh, D. M., Thulin, E., Minogue, A. M., Gustavsson, N., Pang, E., Teplow, D. B., & Linse, S. (2009). A facile method for expression and purification of the Alzheimer's disease-associated amyloid β-peptide. *FEBS Journal*, *276*(5), 1266–1281. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06862.x

Wang, X., Cao, M., & Dong, Y. (2016). Royal jelly promotes DAF-16-mediated proteostasis to tolerate β-amyloid toxicity in *C. elegans* model of Alzheimer's disease. *Oncotarget*, *7*(34), 54183–54193. https://doi.org/10.18632/oncotarget.10857

Wu, Y., Wu, Z., Butko, P., Christen, Y., Lambert, M. P., Klein, W. L., Link, C. D., & Luo, Y. (2006). Amyloid-β-induced pathological behaviors are suppressed by Ginkgo biloba extract EGB 761 and ginkgolides in transgenic Caenorhabditis elegans. *Journal of Neuroscience*, *26*(50), 13102–13113. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3448-06.2006

Xue, W., Lei, Z., Liu, B., Guo, H., Yan, W., Jin, Y. N., & Yu, Y. V. (2024). Olfactory dysfunction as an early pathogenic indicator in C. elegans models of Alzheimer's and polyglutamine diseases. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *16*. https://doi.org/10.3389/fnagi.2024.1462238

Yang, A., Wang, C., Song, B., Zhang, W., Guo, Y., Yang, R., Nie, G., Yang, Y., & Wang, C. (2017). Attenuation of β-Amyloid Toxicity In Vitro and In Vivo by Accelerated Aggregation. *Neuroscience Bulletin*, *33*(4), 405–412. https://doi.org/10.1007/s12264-017-0144-z

Yang, J., Huang, X. B., Wan, Q. L., Ding, A. J., Yang, Z. L., Qiu, M. H., Sun, H. Y., Qi, S. H., & Luo, H. R. (2017). Otophylloside B Protects Against Aβ Toxicity in Caenorhabditis elegans Models of Alzheimer's Disease. *Natural Products and Bioprospecting*, *7*(2), 207–214. https://doi.org/10.1007/s13659-017-0122-1

Yang, J., Zhi, W., & Wang, L. (2024). Role of Tau Protein in Neurodegenerative Diseases and Development of Its Targeted Drugs: A Literature Review. In *Molecules* (Vol. 29, Number 12). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). https://doi.org/10.3390/molecules29122812

Yang, M., & Teplow, D. B. (2008). Amyloid β-Protein Monomer Folding: Free-Energy Surfaces Reveal Alloform-Specific Differences. *Journal of Molecular Biology*, *384*(2), 450–464. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.09.039

Yankner, B. A., & Lu, T. (2009). Amyloid β-protein toxicity and the pathogenesis of Alzheimer disease. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(8), 4755–4759. https://doi.org/10.1074/jbc.R800018200

Yatin, S., Varadarajan, S., Link, C. D., & Butterfield, A. (1999). In vitro and in vivo oxidative stress associated with Alzheimer's amyloid beta-peptide (1-42). *Neurobiology of Aging*, *20*(3), 325–330. https://doi.org/10.1016/S0197-4580(99)00056-1

Yoon, S. S., & Jo, S. A. (2012). Mechanisms of amyloid-β peptide clearance: Potential therapeutic targets for Alzheimer's disease. *Biomolecules and Therapeutics*, *20*(3), 245–255. https://doi.org/10.4062/biomolther.2012.20.3.245

Yoshiike, Y., Akagi, T., & Takashima, A. (2007). Surface structure of amyloid-β fibrils contributes to cytotoxicity. *Biochemistry*, *46*(34), 9805–9812. https://doi.org/10.1021/bi700455c

Zhang, H., Chang, J. T., Guo, B., Hansen, M., Jia, K., Ková, A. L., Kumsta, C., Lapierre, L. R., Legouis, R., Lin, L., Lu, Q., Meléndez, A., O'Rourke, E. J., Sato, K., Sato, M., Wang, X., & Wu, F. (2015). Guidelines for monitoring autophagy in Caenorhabditis elegans. In *Autophagy* (Vol. 11, Number 1, pp. 9–27). Landes Bioscience. https://doi.org/10.1080/15548627.2014.1003478

Zhang, X. G., Wang, X., Zhou, T. T., Wu, X. F., Peng, Y., Zhang, W. Q., Li, S., & Zhao, J. (2016). Scorpion venom heat-resistant peptide protects transgenic Caenorhabditis elegans from β-amyloid toxicity. *Frontiers in Pharmacology*, *7*(JUL). https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00227

Zhang, Y., Zhang, X., Zhou, J., Li, Y., Kai, T., & Zhang, L. (2025). Lycium ruthenicum Murray exosome-like nanovesicles alleviated Alzheimer's disease–like symptoms induced by Aβ protein in transgenic Caenorhabditis elegans through the DAF-16 pathway. *International Journal of Biological Macromolecules*, *304*. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.140758

Zheng, H., & Koo, E. H. (2006). The amyloid precursor protein: Beyond amyloid. In *Molecular Neurodegeneration* (Vol. 1, Number 1). https://doi.org/10.1186/1750-1326-1-5

Zheng, Z., Wu, K., Ruan, Q., Li, D., Liu, W., Wang, M., Li, Y., Xia, J., Yang, D., & Guo, J. (2022). Suppression of Selective Voltage-Gated Calcium Channels Alleviates Neuronal Degeneration and Dysfunction through Glutathione S-Transferase-Mediated Oxidative Stress Resistance in a Caenorhabditis elegans Model of Alzheimer's Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2022*. https://doi.org/10.1155/2022/8287633

12. RESUMEN BIBLIOGRÁFICO

Diana Patricia Quijano Guerrero

Candidata para el grado de Doctor en Ciencias con orientación en Inmunobiología

Tesis:	Evaluación de efecto de los péptidos mutantes A30W, K28A y M35C en fenotipos asociados a la expresión del péptido β -amiloide en *C. elegans* y sus posibles mecanismos de protección contra la toxicidad de Aβ
Campo de Estudio:	Biología molecular y neurociencias.
Datos Personales:	Nacida en el municipio de Celaya, Gto., México el 02 de octubre de 1995.
Educación Profesional:	Egresada de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Grado obtenido: Licenciatura en Biotecnología Genómica. Egresada de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Grado obtenido: Maestría en Ciencias con orientación en Biología molecular e Ingeniería Genética.