



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

**“Regulación de la señalización de las neurotrófinas y de la  
GSK-3/CREB por oligómeros de Amiloide Beta en Células  
Precursoras Neurales de Hipocampo Humano (hHippNPCs)”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA:  
GUSTAVO LÓPEZ TOLEDO

ASESORES:  
Dra. María del Carmen Cárdenas Aguayo  
M. en C. Socorro Sandra Martínez Robles

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN



**ASUNTO: VOTO APROBATORIO**

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

**Regulación de la señalización de las neurotrófinas y de la GSK-3/CREB por oligómeros de amiloide beta en células precursoras neurales de hipocampo humano (hHippNPCs).**

Que presenta el pasante: **Gustavo López Toledo**

Con número de cuenta: **411016588** para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

**ATENTAMENTE**

**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 18 de Agosto de 2016.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Dra. Ma. Esther Revuelta Miranda	
<b>VOCAL</b>	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
<b>SECRETARIO</b>	Dra. Ma. Del Carmen Cárdenas Aguayo	
<b>1er. SUPLENTE</b>	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	
<b>2do. SUPLENTE</b>	L.F. Raúl Sampieri Cabrera	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

## AGRADECIMIENTOS

*Muchas gracias queridos Padres (Jeremías y Tayde) por ser un excelente ejemplo de sacrificio y esfuerzo para mí, ustedes me inspiran a ser mejor y me dan las fuerzas necesarias para afrontar mis problemas con optimismo, jamás me he sentido solo en este mundo porque mis Padres siempre han estado a mi lado, gracias por protegerme, darme su cariño y hacerme sentir lo valioso que soy, esta tesis es más de ustedes que mía.*

*A mis hermanos (Tomás Antonio, Jeremías y Gerardo) les agradezco no solo por estar aportando buenas cosas a mi vida, sino por los grandes lotes de felicidad y de diversas emociones que siempre me han causado.*

*Raúl me siento muy privilegiado de tener a alguien como tú. Siempre te has encargado de hacerme olvidar los problemas y las preocupaciones que cargo día a día y muchas veces tu buen juicio ha evitado que cometa cualquier disparate. Realmente eres único y por ello me siento muy orgulloso de que nos llevemos tan bien y muchas gracias por la amistad de muchos años que seguiremos conservando para toda la vida.*

*A mis segundos padres (Mariano y Roselia) porque gracias a ustedes aprendí que muchos obstáculos se resuelven con el apoyo de la familia así mismo les agradezco por nunca haberme juzgado, por haberse esforzado a mi lado durante la licenciatura en todo lo que lo que llegué a necesitar, y por mostrarme tanto apoyo siempre voy a estar dándole gracias a Dios por haberme encontrado con dos ángeles en esta ciudad.*

*Gracias a ti Efrén por protegerme como un gran hermano y por ser una persona de carácter muy fuerte, ahora parte de tu personalidad es mía ayudándome a levantarme y defenderme de las situaciones hirientes de esta vida, a ti Axel porque nunca sentí sola mi habitación y podía dormir tranquilo porque siempre hubo alguien en ese cuarto para escucharme aunque las cosas que salían de mi boca fueran de la escuela, a ti Adal porque aun en los confines de esta vida estás en mi corazón y en mis pensamientos burlándote de mí o regañándome de no saber química sé que en algún momento de mi vida nos volveremos a ver y las gracias serán personales, mil gracias chicos.*

*A ustedes David, Aline y Gaby a los que conocí como niños gracias por pasar momentos divertidos a mi lado y gracias porque ustedes me hacen comprender la velocidad con la que el tiempo vuelve a escribir otra historia.*

*Guzmán gracias por la verdadera amistad esa que no necesita de un contacto continuo, Yo sé que tú estás y tú sabes que yo estoy cuando lo necesitas, amigo de toda la vida.*

*A Emilia y Daniel gracias porque muchas personas pueden llegar a mi vida, pero solo algunas se quedarán para siempre, gracias a ustedes comprendí que la amistad vale más que una calificación de 10. Son excelentes amigos y no tengo palabras para expresar lo que significativa su amistad para mí.*

*Gracias a los amigos (Pili, Uriel, Paty, Rox, Montse, Ana, María, Becky, Fer, Iván, Diana, Mike, Moy) y compañeros de la Universidad porque no cambiaría todos los momentos que hemos compartido por nada*

*en el mundo. Me hicieron pasar días llenos de confianza y complicidad, lograron que mis penas fueran más llevaderas y provocaron que tuviera el coraje para enfrentarme a cosas, que antes me hubieran hecho bajar la cabeza. Estoy seguro de que jamás en la vida podré encontrar grandes amigos como los que forme en la licenciatura ustedes representaron mi otra familia.*

*Gracias a mis profesores de la primaria, secundaria, preparatoria, licenciatura y maestría porque a ustedes les debo muchas cosas, pues desde mi tierna infancia me enseñaron a leer y a contar. Con ustedes descubrí las maravillas de las ciencias y aprendí que el placer por aprender algo nuevo es algo que, sin importar la edad, siempre nos ha de acompañar. ¡Gracias por su dedicación!*

*Gracias a la Dra. María del Carmen Cárdenas Aguayo por su importante aporte y participación activa en el desarrollo de esta tesis. Debo destacar, por encima de todo, su disponibilidad y paciencia que hizo que nuestras discusiones resultaran benéficamente tanto a nivel científico como personal en mi formación. No cabe duda que su participación ha enriquecido el trabajo realizado y, además, ha significado el surgimiento de una sólida amistad. Gracias por mostrarme que los límites de la ciencia se esconden más allá de los límites de mi país y que para ser un verdadero investigador se requiere de mucha preparación, constancia, esfuerzo y dedicación, es un verdadero orgullo y admiración poder ser su alumno.*

*Quiero agradecer a la M. en C. Sandra Martínez Robles porque no existe persona más sincera en el ámbito profesional para decirme las cosas de manera directa, porque usted me brindó el apoyo necesario para dar el salto a la maestría cuando lo requería, y porque ante todo somos grandes amigos, además estaré esperando con ansias el día que usted decida visitar su pequeña casa en Chicapa de Castro, Heroica Ciudad de Juchitán de Zaragoza, Oaxaca.*

*Gracias a las tres Doctoras que se convirtieron en mis amigas Dra. Maribel Cortés Ortiz, a la Dra. Laura Gómez Virgilio y a la Dra. Mónica Mendoza por darle su confianza a un chico de licenciatura y la oportunidad de involucrarse en grandes temas de investigación, así mismo por enseñarme los mejores secretos guardados para muchas técnicas moleculares, gracias infinitas por participar en mi formación y por mostrarme que mi desarrollo profesional se encontraba en Biofísica y Neurociencias.*

*A Biomedicina Molecular del CINVESTAV por la gran hospitalidad que se me brindó durante del desarrollo de esta tesis nunca olvidaré la impresionante infraestructura que ustedes poseen y será una de las cosas que algún día me gustaría replicar como investigador, muchas gracias.*

*Gracias a los nuevos amigos que hecho en la maestría (Leo, Mary, Lore, Quet, Luis y Lupita) afortunadamente los conocí en los buenos momentos de la maestría y con su ayuda motivaron a terminar este proyecto. Ha pasado un año y no me canso de agradecerles por darme la mano casi sin conocerme. Siempre voy a recordar a la nueva generación de chicos que buscamos ser investigadores.*

*A Misael, Carla y Mario gracias porque con tan poco tiempo de conocernos me han dado buenos momentos de diversión y porque vuelvo a recordar el chico de 18 años que algún día llegó a la FESC, y finalmente quiero agradecer a todas aquellas personas que de una u otra manera me ayudaron durante mi estancia en la licenciatura y durante la elaboración de esta tesis. A todos gracias.*



*Gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por darme su apoyo decidido, generoso y desinteresado durante mis estudios de licenciatura y desde luego en muchas otras ocasiones a través de sus múltiples instancias, porque es un orgullo pertenecer a su comunidad y decir que es mi segundo hogar, mi alma mater.*



*Gracias al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN por proporcionarme el equipo y la infraestructura necesaria para llevar a cabo el siguiente proyecto de tesis, y también por darme la formación neurocientífica.*

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	17
2.	OBJETIVO GENERAL.....	18
2.1.	OBJETIVOS PARTICULARES.....	18
3.	HIPÓTESIS.....	19
4.	MARCO TEÓRICO.....	20
4.1.	SISTEMA NERVIOSO.....	20
4.1.1.	SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.....	20
4.1.2.	LÓBULO TEMPORAL.....	22
4.1.3.	ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DEL HIPOCAMPO.....	23
4.1.4.	FUNCIONES DEL HIPOCAMPO.....	25
4.2.	CÉLULAS TRONCALES Y PRECURSORAS NEURONALES.....	25
4.2.1.	CÉLULAS MADRE HIPOCAMPALES DE HUMANO.....	27
4.2.2.	NICHOS NEUROGÉNICOS.....	28
4.2.3.	NEUROGÉNESIS.....	31
4.2.4.	CÉLULAS hHIPPO.....	31
4.3.	DEMENCIA.....	32
4.3.1.	ENFERMEDAD DE ALZHEIMER LA MÁS COMÚN DE LAS DEMENCIAS.....	33
4.3.2.	SIGNOS Y SÍNTOMAS DEL ALZHEIMER.....	34
4.3.3.	CLASIFICACIÓN.....	35
4.3.4.	ETIOPATOGENIA DEL ALZHEIMER.....	36
4.3.5.	BIOMARCADORES.....	37
4.4.	PÉPTIDO AMILOIDE BETA.....	40
4.4.1.	CONCENTRACIONES TÓXICAS Y FISIOLÓGICAS DE AMILOIDE BETA.....	40
4.4.2.	TIPOS DE AMILOIDE.....	43
4.4.3.	VIA AMILOIDOGENICA Y NO AMILOIDOGENICA.....	44
4.4.4.	VÍA NO AMILOIDOGENICA.....	44

4.4.5.	VÍA AMILOIDOGÉNICA.....	45
4.4.6.	<b>LA ACTIVIDAD DE <math>\gamma</math>-SECRETASA</b> .....	45
4.4.7.	SIGNIFICADO BIOLÓGICO DEL PROCESAMIENTO DE LA APP.....	46
4.4.8.	PRODUCCIÓN DE AMILOIDE BETA FISIOLÓGICO.....	47
4.5.	OLIGOMERIZACIÓN.....	47
4.5.1.	ENZIMAS DE DEGRADACIÓN DE OLIGÓMEROS.....	48
4.6.	<b>PAPEL FISIOLÓGICO DEL <math>A\beta</math></b> .....	50
4.6.1.	PLASTICIDAD SINÁPTICA.....	51
4.7.	<b>VÍA DE SEÑALIZACIÓN DEL <math>A\beta</math></b> .....	52
4.8.	VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE GSK3 EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.....	54
4.9.	NEUROTROFINAS Y SUS PROPIEDADES.....	56
4.9.1.	FACTOR DE CRECIMIENTO NEURAL.....	57
4.9.2.	FACTOR NEUOTRÓFICO DERIVADO DEL CEREBRO.....	57
4.9.3.	NEUROTROFINA-3.....	57
4.9.4.	NEUROTROFINA-4.....	57
5.	<b>METODOLOGÍA</b> .....	59
5.1.	<b>RESUSPENSIÓN Y MONOMERIZACIÓN DE PÉPTIDO SINTÉTICO DE <math>A\beta</math> POR HFIP (1, 1, 1, 3, 3, 3-hexafluoro-2-propanol) Y ALMACENAMIENTO DEL PÉPTIDO (Protocolo de Klein)</b> .....	59
5.2.	<b>PREPARACIÓN DE LOS OLIGÓMEROS DE <math>A\beta</math></b> .....	59
5.3.	CULTIVO CELULAR DE HIP-009 (Células precursoras de hipocampo humano).....	59
5.4.	VIABILIDAD CELULAR.....	61
5.5.	EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS.....	61
5.6.	ENSAYO DE CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA (BCA-PIERCE).....	62
5.7.	WESTERN BLOT.....	62
5.8.	INMUNOCITOFUORESCENCIA.....	63



5.9.	MICROSCOPIA CONFOCAL .....	64
5.10.	MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA.....	64
6.	RESULTADOS .....	65
6.1.	CARACTERIZACIÓN IMUNOCITOQUÍMICA DE LAS CÉLULAS hHIPP-009.....	65
6.2.	VIABILIDAD CELULAR DE LAS hHIPP-009 EN DIFERENTES MEDIOS DE CRECIMIENTO.....	65
6.3.	<b>CARACTERIZACIÓN DE OLIGÓMEROS DE A<math>\beta</math> MEDIANTE AFM Y WESTERN BLOT</b>	66
6.4.	EFFECTO DEL AMILOIDE BETA EN LA VIABILIDAD CELULAR.....	67
6.5.	<b>TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES POR EL A<math>\beta</math> 1-42</b> .....	67
6.6.	PROCESAMIENTO INTRACELULAR DEL AMILOIDE BETA .....	68
6.7.	INMUNOCITOQUÍMICA DE CÉLULAS hHIPP PARA MARCADORES DE AUTOFAGIA Y LISOSOMA.....	69
6.8.	PROCESAMIENTO AUTOFÁGICO Y PROTEOSOMAL DE AMILOIDE BETA 1-42 .....	69
6.9.	POSIBLE MODULACIÓN DE LA FOSFORILACIÓN DE TAU INDUCIDA POR AMILOIDE BETA 1-42.....	69
7.	ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	90
8.	CONCLUSIONES.....	98
9.	APENDÍCE (Artículos y Trabajos de Congreso Internacional).....	99
10.	REFERENCIAS .....	101

## ÍNDICE DE TABLA

NÚMERO	TÍTULO	PÁGINA
1	Resumen de las características funcionales que se pueden utilizar para diferenciar entre células madre neuronales y células precursoras neuronales	26
2	Biomarcadores empleados para el diagnóstico de la Enfermedad de Alzheimer y sus avances en los últimos 10 años	38

## ÍNDICE DE FIGURAS

NÚMERO	TÍTULO	PÁGINA
1	Esquema del Sistema Nervioso Central humano	21
2	Lóbulos cerebrales	22
3	Hipocampo y estructuras adyacentes	23
4	Corte histológico de hipocampo	24
5	Células troncales neuronales y su diferenciación	26
6	Modelos de las células madre neurales y relación de linaje en la circunvolución dentada y zona subventricular adulta	28
7	Neurogénesis adulta en la zona subventricular del ventrículo lateral y el bulbo olfatorio	29
8	Neurogénesis en el giro dentado de hipocampo adulto	30
9	Cambios en el cerebro de una persona con Alzheimer	33

10	Signos y síntomas de un paciente con Alzheimer	34
11	Clasificación del Enfermedad del Alzheimer	35
12	Esquema de la etiología del Alzheimer	37
13	<b>La generación de la proteína A<math>\beta</math> por el procesamiento proteolítico normal de la proteína precursora de <math>\beta</math>-amiloide</b>	42
14	Nomenclatura de los diferentes tipos de amiloide y su ubicación en los órganos	43
15	Vías de procesamiento de APP y proceso de oligomerización de la vía amiloidogénica	44
16	Oligómeros y Fibras de amiloide Beta observados en microscopía electrónica de transmisión	48
17	Degradación extracelular de amiloide beta por células gliales previene la formación de placas amiloides	49
18	Papel patológico y fisiológico del amiloide beta	51
19	Modelo picomolar <b>de señalización inducido por A<math>\beta</math></b> a través de la vía Insulina-PI3K-Akt-ERK además de señalización intracelular mediante la activación mitocondrial	53
20	La glucógeno sintasa cinasa-3 (GSK3) se asocia con la neuropatología de la enfermedad de Alzheimer	55
21	Vía de señalización de las neurotrófinas	58
22	Crecimiento de células precursoras neurales de hipocampo humano (hHIPP-009) pase 13 en Neurobasal + EGF + bFGF + LIF observadas en microscopía de contraste de fases	70
23	Imágenes de microscopía confocal de marcadores inmucitoquímicos Neuronal y marcador Glial de las células precursoras neurales de hipocampo humano en dos medios de crecimiento diferentes Neurobasal +EGF+ bFGF + LIF y Medio definido de ITS 0.001% a 24 horas	70
24	Imágenes de microscopía confocal de marcadores inmucitoquímicos de proliferación celular y marcador de	71

	Precursor neuronal de las células precursoras neurales de hipocampo humano en dos medios de crecimiento diferentes Neurobasal +EGF+ bFGF + LIF y Medio definido de ITS 0.001% a 24 horas	
25	Viabilidad de las células precursoras neurales de hipocampo humano en diferentes medios de crecimiento	71
26	Microscopía de Fuerza Atómica (AFM, tapping) de Amiloide Beta 1-42 en medio de crecimiento Neurobasal + B27 + EGF+ bFGF + LIF	72
27	Microscopía de Fuerza Atómica (AFM, tapping) de Amiloide Beta 1-42 diluído en DMSO + PBS (Stock 100 $\mu$ M)	72
28	Microscopía de Fuerza Atómica (AFM, tapping) de Amiloide Beta 1-42 en medio de crecimiento Neurobasal + B27 + EGF + bFGF + LIF a 24 Horas	72
29	Microscopía de Fuerza Atómica (AFM, tapping) de Amiloide Beta 1-42 en medio de crecimiento Neurobasal + B27 + EGF + bFGF + LIF a 48 Horas	73
30	Microscopía de Fuerza Atómica (AFM, tapping) de Amiloide Beta 1-42 en medio de crecimiento definido ITS 0.001% a 24 Horas	73
31	Microscopía de Fuerza Atómica (AFM, tapping) de Amiloide Beta 1-42 en medio de crecimiento definido ITS 0.001% a 48 Horas	73
32	Western Blot de Amiloide Beta 1-40 en diferentes medios de crecimiento y soluciones a 0 horas	74
33	Western Blot de Amiloide Beta 1-40 en diferentes medios de crecimiento y soluciones a 24 horas	74
34	Western Blot de Amiloide Beta 1-40 en diferentes medios de crecimiento y soluciones a 48 horas	74
35	Western Blot de Amiloide Beta 1-40 en diferentes medios de crecimiento y soluciones a 72 horas	75
36	Western Blot de Amiloide Beta 1-42 en diferentes medios de crecimiento y soluciones a 0 horas	75
37	Western Blot de Amiloide Beta 1-42 en diferentes medios de crecimiento y soluciones a 24 horas	75
38	Western Blot de Amiloide Beta 1-42 en diferentes medios de crecimiento y soluciones a 48 horas	76

39	Western Blot de Amiloide Beta 1-42 en diferentes medios de crecimiento y soluciones a 72 horas	76
40	Efecto de distintas concentraciones de los <b>oligómeros de A<math>\beta</math> 1-40</b> en la viabilidad de las células hHIPP-009 a 24 Hrs	77
41	Efecto de distintas concentraciones de los <b>oligómeros de A<math>\beta</math> 1-40</b> en la viabilidad de las células hHIPP-009 a 48 Hrs	77
42	Efecto de distintas concentraciones de los <b>oligómeros de A<math>\beta</math> 1-40</b> en la viabilidad de las células hHIPP-009 a 72 Hrs	78
43	Efecto de distintas concentraciones de los <b>oligómeros de A<math>\beta</math> 1-40</b> en la viabilidad de las células hHIPP-009 a 96 Hrs	78
44	Efecto de distintas concentraciones de los <b>oligómeros de A<math>\beta</math> 1-42</b> en la viabilidad de las células hHIPP-009 a 24 Hrs	79
45	Efecto de distintas concentraciones de los <b>oligómeros de A<math>\beta</math> 1-42</b> en la viabilidad de las células hHIPP-009 a 48 Hrs	79
46	Efecto de distintas concentraciones de los <b>oligómeros de A<math>\beta</math> 1-42</b> en la viabilidad de las células hHIPP-009 a 72 Hrs	80
47	Efecto de distintas concentraciones de los <b>oligómeros de A<math>\beta</math> 1-42</b> en la viabilidad de las células hHIPP-009 a 96 Hrs	80
48	Efecto de distintas concentraciones de los <b>oligómeros de A<math>\beta</math> 42-1r</b> en la viabilidad de las células hHIPP-009 a 48 Hrs	81
49	<b>Modulación de TrkB por oligómeros de A<math>\beta</math></b> en células precursoras neurales de hipocampo humano fetal	81
50	<b>Modulación de TrkB por oligómeros de A<math>\beta</math></b> en células precursoras neurales de hipocampo humano fetal	82
51	<b>Modulación de AKT por oligómeros de A<math>\beta</math></b> en células precursoras neurales de hipocampo humano fetal	82
52	<b>Modulación de GSK3 por oligómeros de A<math>\beta</math></b> en células precursoras neurales de hipocampo humano fetal	83
53	<b>Modulación de CREB por oligómeros de A<math>\beta</math></b> en células precursoras neurales de hipocampo humano fetal	83
54	<b>Recuperación de oligómeros de A<math>\beta</math></b> en medio de ITS 0.001% con células precursoras neurales en condiciones decrecimiento a 24	84

	Hrs	
55	<b>Recuperación de oligómeros de A<math>\beta</math></b> en medio de ITS 0.001% con células precursoras neurales en condiciones de crecimiento a 48 Hrs	84
56	Cinética de modulación crónica de LC3 y PSMB5 por oligómeros <b>de A<math>\beta</math> 1-42 sin oligómeros de A<math>\beta</math></b>	85
57	Gráfico de la cinética <b>de modulación del LC3 por el A<math>\beta</math> 1-42</b> en células hHIPP-009 durante un periodo crónico	85
58	Gráfico de la cinética <b>de modulación de PSMB5 por el A<math>\beta</math> 1-42</b> en células hHIPP-009 durante un periodo crónico	86
59	Cinética de modulación crónica de Tau por oligómeros <b>de A<math>\beta</math> 1-42 con y sin oligómeros de A<math>\beta</math></b>	86
60	Gráfico de la cinética de modulación de la fosforilación de Tau <b>(T181) por el A<math>\beta</math> 1-42</b> en células hHIPP durante un periodo crónico	87
61	Gráfico de la cinética de modulación de la fosforilación de Tau <b>(T231) por el A<math>\beta</math> 1-42</b> en células hHIPP durante un periodo crónico	87
62	Cinética de tiempo de localización subcelular de los oligómeros de Amiloide Beta en las células precursoras de hipocampo humano	89
63	Vía de señalización generada por activación de los receptores TrkB a través <b>de su activación por los oligómeros de A<math>\beta</math> 1-42.</b>	95

## TABLA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
<b>A<math>\beta</math></b>	Amiloide Beta
APP	Proteína Precursora Amiloidea
<b>sAPP<math>\alpha</math></b>	Fragmento secretado de APP alfa
<b>sAPP<math>\beta</math></b>	Fragmento secretado de APP beta
CTFs	Fragmento Carboxilo Terminal secretado
BACE	<b>Enzima de escisión del sitio <math>\beta</math> de APP</b>
BDNF	Factor neurotrófico derivado de cerebro
GSK3	Glicógeno Sintasa Cinasa 3
TRK	Receptor tropomiosina cinasa
WB	Western Blot
AFM	Microscopía de Fuerza Atómica
CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc
SN	Sistema Nervioso
DG	Giro dentado
SB	Subículo
CA	Cuerno de Amón
REM	Movimiento Ocular Rápido
EEG	Electroencefalograma
LIA	Movimiento ocular lento
ZSV	Zona Subventricular
SGZ	Zona Subgranular
NPCs	Células Progenitoras Neurales
NSC	Células Stem Neurales
DCX	Células Stem Neurales
LTP	Potenciación a Largo Plazo
GC	Células Granulares

PG	Periglomerular
OB	Bulbo olfatorio
GFAP	Proteína Glial Ácida Fibrilar
NeuN	Antígeno Neuronal Nuclear
GCL	Capa de Células Granulares
BLBP	Proteína cerebral de unión a lípidos
SNC	Sistema Nervioso Central
IPSCs	Células Pluripotentes Inducidas
HIP-009	Células Precursoras Hipocampales
NMDAR	N-metil-D- Aspartato
AMPA	Ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
EA	Enfermedad de Alzheimer
PS2	Presenilina 2
ApoE	Apopoliproteína
PS1	Presenilina 1
NIA/AA	National Institute on Aging y la Alzheimer's Association
CSF	Fluido Ceforraquídeo
TMDs	Dominios Transmembranales
RIP	Proteólisis intermembranal regulada
CDI	Dominios Intracelulares
ADAM	Metaloendopeptidasa
APH1	Anterior pharynx defective
NTF	Factor neurotrófico
AICD	Dominio intracelular de APP
TNFR	Receptor del factor de necrosis tumoral
IDE	Enzima degradadora de Insulina
AKT/PKB	Protein Kinasa B
PDK-1	Cinasa 1 dependiente de fosoinositol
MAPK	Proteínas Cinasas activadas por mitógenos



TRPC	Transient receptor potential cation channels
VDCC	Canal de calcio dependiente de voltaje
Bad	Promotor de muerte asociado a BCL-2
CypD	Ciclofilina D
NT-1	Neurotrofina 1
NT-2	Neurotrofina 2
NT-3	Neurotrofina 3
NT-4	Neurotrofina 4
HFIP	Hexafluoroisopropanol
DMSO	Dimetilsulfóxido
PBS	Solución Bufferada de fosfatos
GBS	Solución Bufferada de glucosa
EGF	Factor de crecimiento epidermal
bFGF	Factor de crecimiento básico de fibroblastos
LIF	Factor inhibidor de la Leucemia
AAS	Solución de Antibiótico y Antimicótico
hHIPP	Células humanas hipocampales
RIPA	Buffer para extracción y precipitación de proteína
BCA	Ensayo de ácido bicinconíico
ITS	Insulina-Transferrina-Selenio
Ki67	Marcador de proliferación

# 1. INTRODUCCIÓN

El Amiloide Beta ( $A\beta$ ) es un péptido generado por la vía amiloidogénica del procesamiento de la Proteína Precursora Amiloidea (APP). Inicialmente APP, una proteína transmembranal es **escindida por alfa y gamma secretasa, generando fragmentos secretados largos y solubles (sAPP $\alpha$  y sAPP $\beta$ ) y un Fragmento Carboxilo Terminal asociado a membrana (CTFs)**. El péptido  $A\beta$  puede tener varios tamaños, que van de 38 a 43 aminoácidos, siendo la isoforma predominante la de tipo  $A\beta$  1-40 en un 90% y **la forma más fibrológica el  $A\beta$  1-42 en un 10%**, estas son generadas por el **corte de la  $\beta$ -secretasa (conocido como BACE1,  $\beta$ -site APP cleaving enzyme)**, seguido por el corte **de la  $\gamma$ -secretasa**. El péptido  $A\beta$  tiene la propiedad de autoagregarse, por lo que es capaz de existir como monómero, dímeros u oligómeros, con la capacidad de poder generar fibras con estructura  $\beta$ -hoja, y pudiéndose depositar en forma de placas extracelulares denominadas placas neuríticas.

La Amiloidosis es una condición en la cual las proteínas solubles normales se transforman en insolubles y estas son depositadas en el espacio extracelular de varios tejidos. Los depósitos **extracelulares de  $A\beta$**  son característicos de varias condiciones neurológicas severas incluyendo la Enfermedad de Alzheimer, Síndrome de Down, Daños traumáticos al cerebro y otros. **Particularmente el  $A\beta$**  es una proteína predominante en las placas neuríticas, por lo cual es una de las principales características histológicas de los cerebros con la Enfermedad de Alzheimer. La Enfermedad de Alzheimer es la causa más común de demencia en personas ancianas, y es característico por un decline progresivo y pérdida de la memoria y la incapacidad para desarrollar tareas **comunes**. **Aunque los péptidos  $A\beta$**  son producidos en altas concentraciones en condiciones patológicas, también existen en concentraciones bajas en cerebros normales, particularmente durante la actividad sináptica. Por muchos años no ha sido **esclarecido el papel de la APP y el  $A\beta$**  en condiciones **no patológicas, donde el  $A\beta$**  era un producto incidental del catabolismo de la APP sin presentar papel fisiológico. La APP es una proteína integral de membrana con alta afinidad por el cobre, expresada ubicuamente además de encontrarse involucrada en el desarrollo neuronal siendo requerida para el crecimiento neuronal. APP también participa en la sinaptogénesis y en la adhesión celular. Además, anticuerpos anti-APP bloquean la formación de la memoria.

**Las propiedades funcionales del  $A\beta$**  no han sido completamente elucidadas, sin embargo numerosos estudios apoyan que los péptidos **de  $A\beta$**  poseen propiedades neurotróficas. Recientemente fue demostrado **que las formas solubles de  $A\beta$**  juegan un papel importante en la facilitación del crecimiento neuronal, sobrevivencia celular, la modulación de la función sináptica y defensor contra el estrés oxidativo. También, concentraciones fisiológicas de amiloide beta favorecen los procesos de aprendizaje y memoria. Por lo que el siguiente estudio pretende dilucidar las vías que posiblemente se encuentren involucradas en la modulación neurotrófica mediada por  $A\beta$ , así como posibles dianas terapéuticas para **etiopatologías que involucren al  $A\beta$**  como es el caso de la Enfermedad de Alzheimer.

## 2. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de los oligómeros de Amiloide beta 1-40 y 1-42 en la vía de señalización de las neurotrofinas (BDNF), así como la inhibición de la GSK3, mediante un estudio molecular de señalización en células precursoras hipocampales de humano, para establecer posibles vías de transducción del Amiloide Beta desencadenadas de forma fisiológica.

### 2.1. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Establecer el cultivo de precursores neurales de hipocampo humano (de la compañía Phoenix Songs Biol).
2. Generar los oligómeros de Amiloide beta 1-40, 1-42 por el método de Klein et al (2002).
3. Determinar la cinética de oligomerización del Amiloide Beta 1-40 y 1-42 en distintos medios de cultivo a 24, 48 y 72 Hrs por WB y AFM.
4. Evaluar el efecto de concentraciones crecientes de Amiloide beta en la sobrevivencia de los precursores neurales.
5. Analizar las vías de señalización de las neurotrófinas y de GSK3 en células neurales tratadas con los oligómeros de Amiloide beta 1-42 así como verificar la activación o inhibición de las vías de señalización que hayan resultado modificadas por los oligómeros de Amiloide beta, con anticuerpos específicos por Western blot.
6. Evaluar la posible activación del receptor a neurotrofina BDNF/TrkB por efecto de los oligómeros de Amiloide beta por la técnica de Western blot.
7. Evaluar el **procesamiento intracelular del A $\beta$  1-42** tanto por vía autofágica como por la vía proteosomal.

### 3. HIPÓTESIS

Concentraciones fisiológicas de oligómeros de Amiloide Beta activan y modulan los receptores de neurotrofinas con la señalización río abajo de GSK3/CREB en células precursoras neurales de hipocampo humano pudiendo repercutir en la viabilidad de las hHIPP.

## 4. MARCO TEÓRICO

### 4.1. SISTEMA NERVIOSO

Un sistema se caracteriza por sus componentes, sus estructuras de comunicación y por sus entradas y salidas (Alfaro, 2005). El Sistema Nervioso (SN) es una compleja red de estructuras que regulan numerosas funciones entre las que se encuentran los circuitos neuronales responsables de la memoria y el aprendizaje. En el SN los componentes celulares básicos son las neuronas y las células gliales (Martínez I. M., 2013). Las neuronas se consideran las unidades anatómicas funcionales del SN. Establecen entre ellas y con otras células una precisa estructura de comunicaciones a través de nexos eléctricos y químicos que constituyen la base de la integración o procesamiento de la información nerviosa.

#### 4.1.1. SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

El Sistema Nervioso Central o Neuroeje del ser humano está formado por el encéfalo y la médula espinal. EL encéfalo se encuentra dentro del cráneo; la médula espinal se ubica en el conducto raquídeo, extendiéndose desde el agujero occipital hasta la segunda vértebra lumbar. En términos generales el encéfalo se puede dividir en cerebro, cerebelo y tronco encefálico.

Sobre la base de su ontogenia el encéfalo se puede dividir en tres partes principales: rombencéfalo, mesencéfalo y prosencéfalo. El rombencéfalo incluye la médula oblongada (bulbo raquídeo) y el metencéfalo que forma una gran protusión ventral conocida como puente, en conjunto la médula oblongada, el puente y el mesencéfalo forman el tronco encefálico (FitzGerald, 2012).

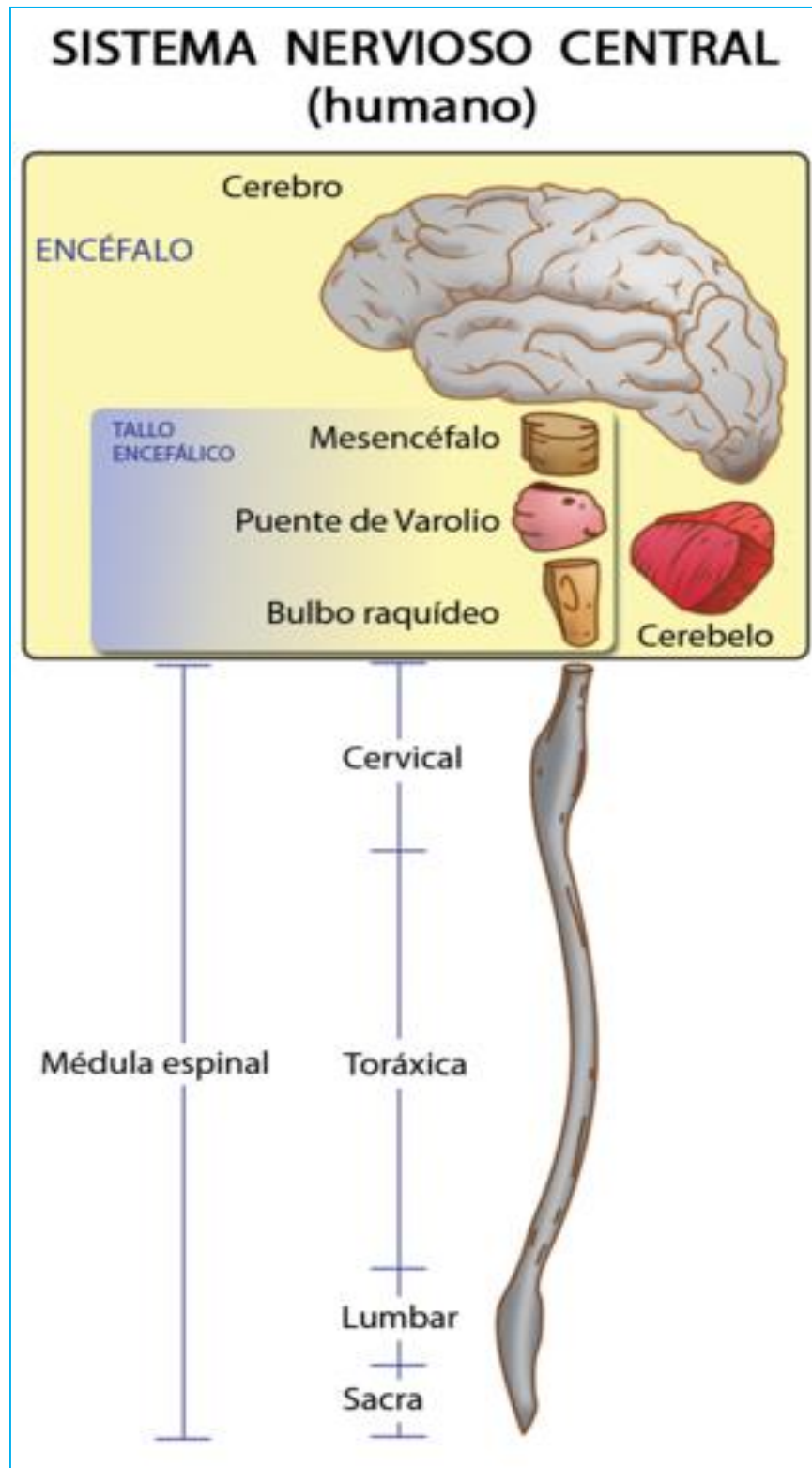


Figura 1. Esquema del Sistema Nervioso Central humano. Se compone de dos partes: encéfalo (cerebro, cerebelo, tallo encefálico) y médula espinal (Snell, 2013).

El prosencéfalo comprende el diencefalo y el telencefalo. El primero contiene dos complejos nucleares importante: el tálamo, el hipotálamo y epítalamo, mucho más pequeño y de forma similar al de un embudo. El telencefalo está compuesto, principalmente, por los dos hemisferios cerebrales junto con el telencefalo impar, los hemisferios cerebrales son a diferencia las partes más grandes del encéfalo humano, rodean y recubren tanto el diencefalo como el mesencefalo.

Los hemisferios cerebrales se subdividen en cinco partes principales o lóbulos; lóbulo frontal, lóbulo parietal, lóbulo temporal, lóbulo occipital y lóbulo límbico, la mayoría de los límites, aunque no todos, entre estos lóbulos coinciden con surcos o fisuras.

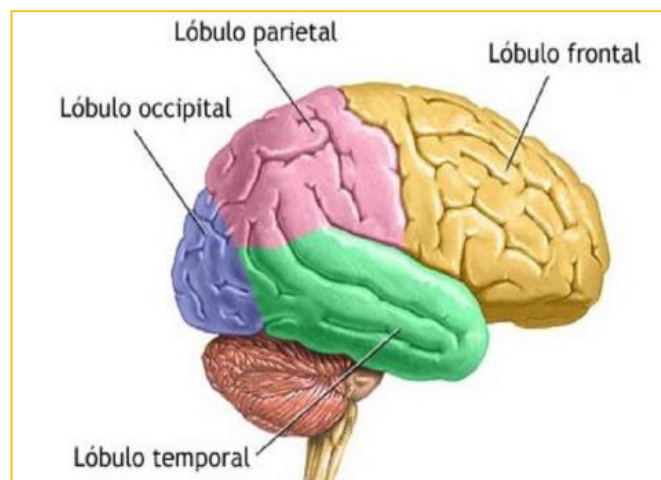


Figura 2. Lóbulos cerebrales. Esquema de los cuatro lóbulos del cerebro (Lóbulo Frontal-Amarillo), (Lóbulo parietal-Rosa), (Lóbulo occipital-Morado), (Lóbulo temporal-Verde) (Galera, 2015).

#### 4.1.2. LÓBULO TEMPORAL

El lóbulo temporal medial es una estructura heterogénea, desde el punto de vista morfológico, que abarca la porción temporal bien diferenciada de la formación hipocámpica, la corteza entorrinal, las áreas TH (área cortical de van Economo) y TF (área cortical de van Koskina), y las áreas perirrinales (Nieuwenhuys, 2008).

El lóbulo temporal medial, que corresponde aproximadamente con el giro parahipocámpico, desempeña un papel importante en el aprendizaje y la memoria, esto se demostró por primera vez, notoriamente, en el caso clínico, ahora famoso del paciente HM (Henry Molaison), que fue sometido a resección bilateral del lóbulo temporal medial para mejorar una epilepsia resistente al tratamiento, después de esta operación presentó un síndrome de amnesia grave, sufría de una pérdida profunda de la capacidad para crear recuerdos a corto plazo y parecía incapaz de codificar recuerdos a corto plazo y parecía incapaz de decodificar nueva información en recuerdos a largo plazo (Beecher, 1957).

### 4.1.3. ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DEL HIPOCAMPO

El hipocampo o formación hipocámpica es una gran estructura en forma de C que forma parte de la pared medial del hemisferio cerebral, desde un punto de vista morfológico se puede subdividir en tres partes: precomisural, supracomisural, retrocomisural. Las primeras dos partes son estructuras vestigiales, relativamente pequeñas, en cambio el hipocampo retrocomisural está bien desarrollado y representa la principal porción de la formación hipocámpica.

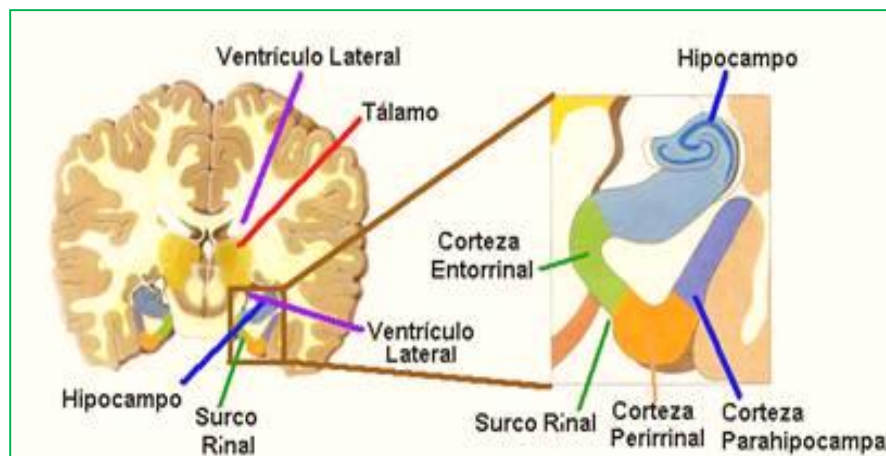


Figura 3. Hipocampo y estructuras adyacentes. El hipocampo junto a otras estructuras adyacentes constituyen la Formación Hipocámpica (Netter, 1999).

El hipocampo retrocomisural se diferencia con claridad en tres estructuras paralelas de disposición longitudinal: el giro dentado, el cuerno de Amón y el subículo. Es el extremo expandido, morfológicamente más caudal, de la formación hipocámpica, que está incorporado al lóbulo temporal medial, durante la ontogenia esta parte del hipocampo se repliega sobre sí misma a lo largo de un surco longitudinal, la fisura hipocámpica (Nieuwenhuys, 2008).

El giro dentado, el cuerno de Amón y el subículo están compuestos de tres capas distintas. El asa de Amón y el subículo tienen cada uno una capa piramidal de células, una capa molecular, y una capa polimórfica. La capa de células piramidales contiene los cuerpos celulares piramidales. La capa molecular consta de dendritas apicales de las células piramidales, junto con los axones procedentes de otras fuentes. La capa polimórfica contiene varias interneuronas, incluyendo las células de la cesta. El giro dentado tiene una capa de células granulares, una capa molecular que consiste en las dendritas apicales de las células granulares, y una capa polimórfica. Las células piramidales son neuronas eferentes, mientras que las células granulares son interneuronas. Las células de la cesta son interneuronas inhibitorias que hacen sinapsis en las células piramidales (Giap, 2000).

El subículo y el cuerno de Amón se componen principalmente de las células piramidales, que son las neuronas eferentes que se proyectan hacia varias estructuras. El giro dentado envía



proyecciones sólo para el hipocampo. El subículo envía proyecciones a los núcleos septales, núcleos talámicos, la cama del núcleo estriatal terminal, y el núcleo de accumbens, así la formación del hipocampo recibe la entrada de varias estructuras, información de la circunvolución del cíngulo y otras partes del sistema límbico viaja a través de la corteza entorrinal en la vía perforante de la circunvolución dentada. Por lo tanto, existe la formación del hipocampo como un sitio para la integración de la cantidad de información. (Giap,2000).

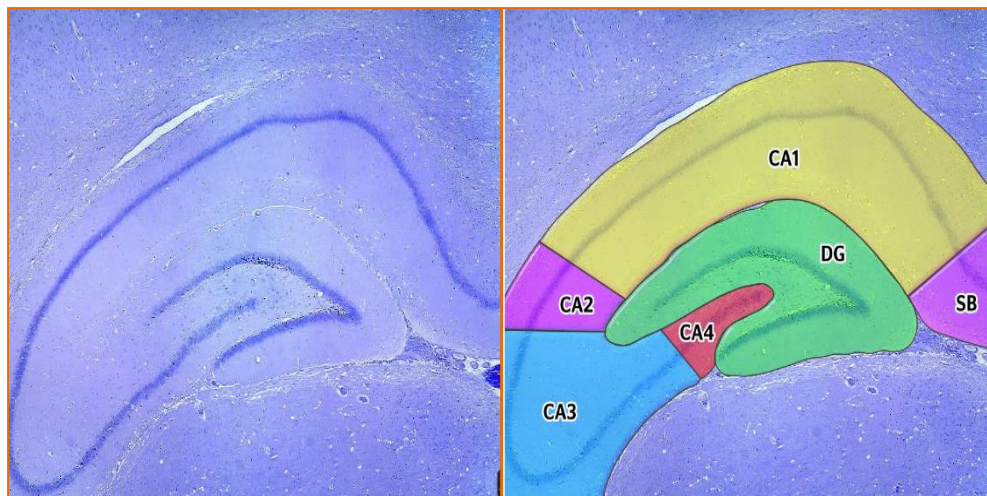


Figura 4. Corte histológico de hipocampo. Estructuras que conforman el hipocampo humano, DG: Giro dentado, SB: Subiculum, CA: Cuerno de Amon (Martin, 2012).

El hipocampo muestra dos modos de actividad "principales", cada uno asociado con un patrón distinto de la actividad de la población neuronal y las ondas de actividad eléctrica, el modo theta aparece durante los estados de comportamiento activo, alerta, y también durante el sueño REM. En el modo theta, el EEG está dominado por grandes olas regulares con un rango de frecuencia de 6 a 9 Hz, y los principales grupos de neuronas del hipocampo muestran una actividad escasa poblacional, lo que significa que, en cualquier intervalo de tiempo corto, la gran mayoría de las células son silenciosas, mientras que la pequeña fracción restante presenta tasas relativamente altas, de hasta 50 picos en un segundo (Buzsáki, 1990).

El modo LIA aparece durante el sueño de ondas lentas, y también durante los estados de inmovilidad vigilia como descansar o comer. En el modo LIA el EEG está dominado por ondas agudas que son al azar a destiempo grandes desviaciones de la señal de EEG con una duración de 25 a 50 milisegundos. Ondas agudas se generan frecuentemente en conjuntos con que contienen hasta 5 o más ondas agudas y una duración de hasta 500 ms. La actividad de adición de neuronas en el hipocampo está altamente correlacionada con la actividad de las ondas agudas. La mayoría de las neuronas disminuyen su tasa de disparo entre ondas agudas, sin embargo, durante una ola fuerte hay un aumento espectacular de la tasa de disparos de hasta el 10% de la población del hipocampo (Buzsáki, 1990).

#### 4.1.4. FUNCIONES DEL HIPOCAMPO

Históricamente, la hipótesis más temprana ampliamente sostenida fue que el hipocampo participa en el olfato. Esta idea fue puesta en duda por una serie de estudios anatómicos que no encontraron ninguna proyección directa al hipocampo del bulbo olfatorio. Sin embargo, el trabajo posterior confirmó que el bulbo olfatorio hace proyecciones en la parte ventral de la corteza entorrinal lateral, y el campo CA1 del hipocampo ventral envía axones al bulbo olfatorio principal, el núcleo olfatorio anterior, y para la corteza olfativa primaria. Sigue existiendo un cierto interés en las respuestas olfativas del hipocampo, en particular el papel del hipocampo en la memoria de los olores.

El hipocampo, es la estructura más grande del sistema límbico, cumple una función importante en la adquisición de recuerdos. Respalda esta conclusión numerosas pruebas clínicas, incluyendo notables estudios del paciente Henry Gustav Molaison, que es quizá el sujeto más famoso de la psicología (Gerrig, 2009).

Estudios ulteriores en seres humanos y en primates no humanos han demostrado que el daño bilateral limitado a la formación hipocámpica puede provocar alteración persistente de la memoria. La imposibilidad de crear nuevos recuerdos, que caracteriza el comienzo de la enfermedad de Alzheimer, también se puede atribuir a daño de la formación hipocámpica y las regiones corticales adyacentes. En esta enfermedad, hay una pérdida casi total de neuronas piramidales del campo CA1 y el subículo. Estas neuronas establecen relaciones importantes en el circuito hipocámpico intrínseco y también dan origen a eferentes del hipocampo que transcurren por el fornix hacia varias dianas subcorticales telencéfalicas y diencefálicas. En la enfermedad de Alzheimer también se observan varios cambios patológicos en la capa II de la corteza entorrinal y en la capa molecular del giro dentado, es decir, los sitios de origen y terminación, respectivamente, de la vía perforante (Small, 2011).

## 4.2. CÉLULAS TRONCALES Y PRECURSORAS NEURONALES

En 1992 se cultivaron por primera vez precursores neuronales en neuroesferas como método para aislar, propagar y diferenciar eficientemente en cultivo, células madre neurales (NSC) de mamíferos, incluidos humanos para generar grandes cantidades de neuronas, capaces de producir distintos tipos neuronales con el objeto de ser usados en terapia celular, terapia génica, cribado de factores de crecimiento y cribado de fármacos para enfermedades del Sistema Nervioso (Gage, 2013). Las células troncales neuronales se definen sobre la base de dos propiedades funcionales: una capacidad aparentemente ilimitada de autorrenovación y la capacidad de generar múltiples tipos de células neuronales maduras (multipotencialidad). Por el contrario, las células precursoras neuronales son células proliferativas con una capacidad limitada para la autorrenovación y son a menudo unipotentes (Seaberg, 2003).

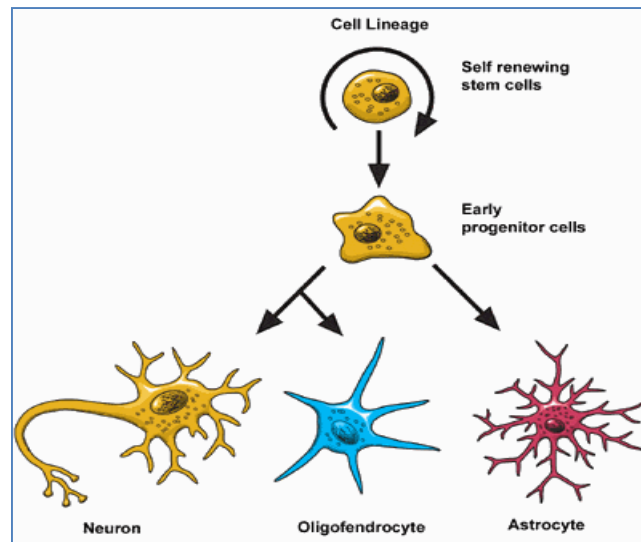


Figura 5. Células troncales neuronales y su diferenciación. Las células pluripotentes o troncales son capaces de diferenciarse en varios tipos celulares, una célula troncal neuronal es capaz de generar tres tipos de linaje: neurona, oligodendrocito y astrocito (Gutiérrez, 2007).

TABLA 1: Resumen de las características funcionales que se pueden utilizar para diferenciar entre células madre neuronales y células precursoras neuronales (Gage, 2013).

Característica	Células Madre Neuronales	Células Precursoras Neuronales
Auto-renovación <i>in vivo</i>	Ilimitado; durante toda la vida del organismo	Limitado; transitoria
Auto-renovación <i>in vitro</i>	Ilimitado; puede alcanzar el número máximo de duplicaciones de la población antes de la diferenciación	No alcanza el número máximo de duplicaciones de la población
Potencialidad	Multipotentes (por ejemplo: capacidad de generar neuronas, astrocitos y oligodendrocitos)	Lo más a menudo unipotente; puede ser multipotentes
Mantenimiento de auto-renovación y pluripotencialidad	Sí	No

Las células troncales neurales presentan las propiedades de autorrenovación y pluripotencialidad ilimitada. Por otra parte, estas características están presentes en el aislamiento de las células troncales neurales y no surgen después del cultivo o la inmortalización a largo plazo, y se mantienen *in vivo* durante toda la vida del organismo. *In vitro*, las células troncales pueden mantener su multipotencialidad sobre pasajes extendidos y pueden autorrenovarse. Una vez que se producen eventos de transformación *in vitro*, la población es diferente de la población de partida y, por lo tanto, las células ya no exhiben verdaderamente autorrenovación. Por lo tanto, el término "ilimitado" *in vitro* o autorrenovación se puede decir que se produce hasta cierto punto (número de pasajes o

duplicaciones de la población) en el que este tipo de eventos de transformación comienzan a producirse (Seaberg, 2003).

Las neuronas de la zona subventricular (ZSV) migran a larga distancia a través de la corriente migratoria rostral y se convierten en las neuronas granulares y neuronas periglomerulares en el bulbo olfatorio. Las neuronas nacidas en la zona subgranular (ZSG) migran dentro de la capa de células granulares del giro dentado y se convierten en células granulares dentadas.

#### 4.2.1. CÉLULAS MADRE HIPOCAMPALES DE HUMANO

Durante la madurez hay un constante nacimiento de nuevas neuronas mayormente en dos regiones del cerebro:

- La zona subventricular (ZSV), recubriendo los ventrículos laterales, donde las células madre y las células progenitoras generan nuevas neuronas (neuroblastos) que migran al bulbo olfatorio por medio de la corriente migratoria rostral. No obstante, estudios recientes han demostrado que estas células migran al cuerpo estriado en humanos y no al bulbo olfatorio (Ernst, 2014).
- La zona subgranular (ZSG), la cual es parte del giro dentado del hipocampo.

Muchas de las células nuevas mueren poco después de haber nacido, aunque una cierta cantidad de ellas se vuelve funcional dentro del tejido cerebral circundante.

En el giro dentado del hipocampo, concretamente en la capa subgranular, se originan las células precursoras neurales (NPCs), que darán lugar, como se ha visto, a las células de la glía y a las neuronas. Se han realizado diversos estudios en los que se afirma que estos precursores migran hacia la capa granular para formar neuronas maduras, enviando sus axones a la zona CA3 del hipocampo y emitiendo dendritas hacia la capa molecular hasta contactar con las células granulares residentes allí con anterioridad, aproximadamente dos semanas después de la mitosis que las origina. Después de un corto período de tiempo, las neuronas son funcionales y ya han establecido contacto con otras neuronas, por lo que no pueden diferenciarse de las que residían allí con anterioridad. Aproximadamente un cuarto de millón de neuronas se acumula en esta zona al mes en un cerebro sano (Balu, 2009).

Las neuronas inmaduras migran desde la ZSG hasta la capa granular. Esta incorporación se produce durante el desarrollo de manera ordenada, es decir, las células más jóvenes ocupan regiones más profundas de esta capa mientras que neuronas más maduras ocupan los estratos más superficiales. La diferenciación ocurre al mismo tiempo que la migración. Las células migratorias, aproximadamente 7 días después de la mitosis, emiten su axón hacia la zona CA3 situada en el cuerno de Ammón. Las dendritas crecen en dirección opuesta a los axones creciendo en un período de tiempo que abarca algunos meses.

4.2.2. NICHOS NEUROGÉNICOS

Los nichos se definen como microambientes anatómicos y funcionales que controlan el desarrollo in vivo de las células madre precursoras siendo sugeridos por primera vez a partir de estudios de trasplantes de progenitores hematopoyéticos (Schofiel, 1978).

La neurogénesis adulta activa está restringida espacialmente en condiciones normales a dos **regiones cerebrales específicas “neurógenicas”**, la **zona subgranular (SGZ) en el giro dentado del hipocampo**, donde se generan nuevas células granulares dentadas; y la **zona subventricular de los ventrículos laterales**, donde se generan nuevas neuronas y luego migran a través de la corriente migratoria rostral (RMS) hacia el bulbo olfatorio para convertirse en interneuronas (Gage, 2000).

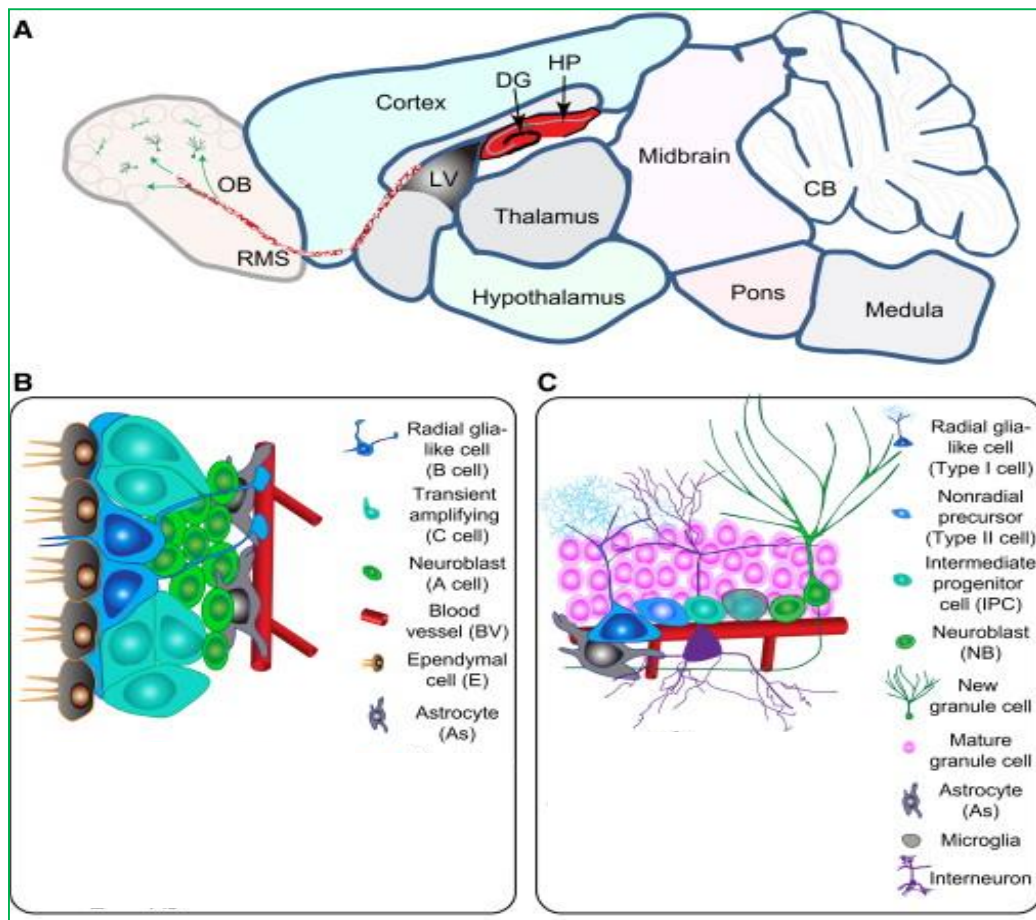


Figura 6. Modelos de las células madre neurales y relación de linaje en la circunvolución dentada y zona subventricular adulta. (A) Vista en sección sagital de un cerebro adulto de roedor destacando las dos regiones restringidas que exhiben la neurogénesis adulta activa: giro dentado (DG) en la formación hipocámpica (HP); el ventrículo lateral (LV) a la corriente migratoria rostral (RMS) hacia el bulbo olfatorio (OB). (B) Ilustración esquemática del nicho de células madre neuronales en la zona subventricular (SVZ) y un modelo de relación potencial entre el linaje basal (flechas sólidas) y condiciones de lesiones (flechas azules). N: neuronas inmaduras. (C) Ilustración esquemática del nicho de células madre neuronales en la zona subgranular (SGZ) en el giro dentado y un modelo de relación potencial de linaje (Ming, 2011).

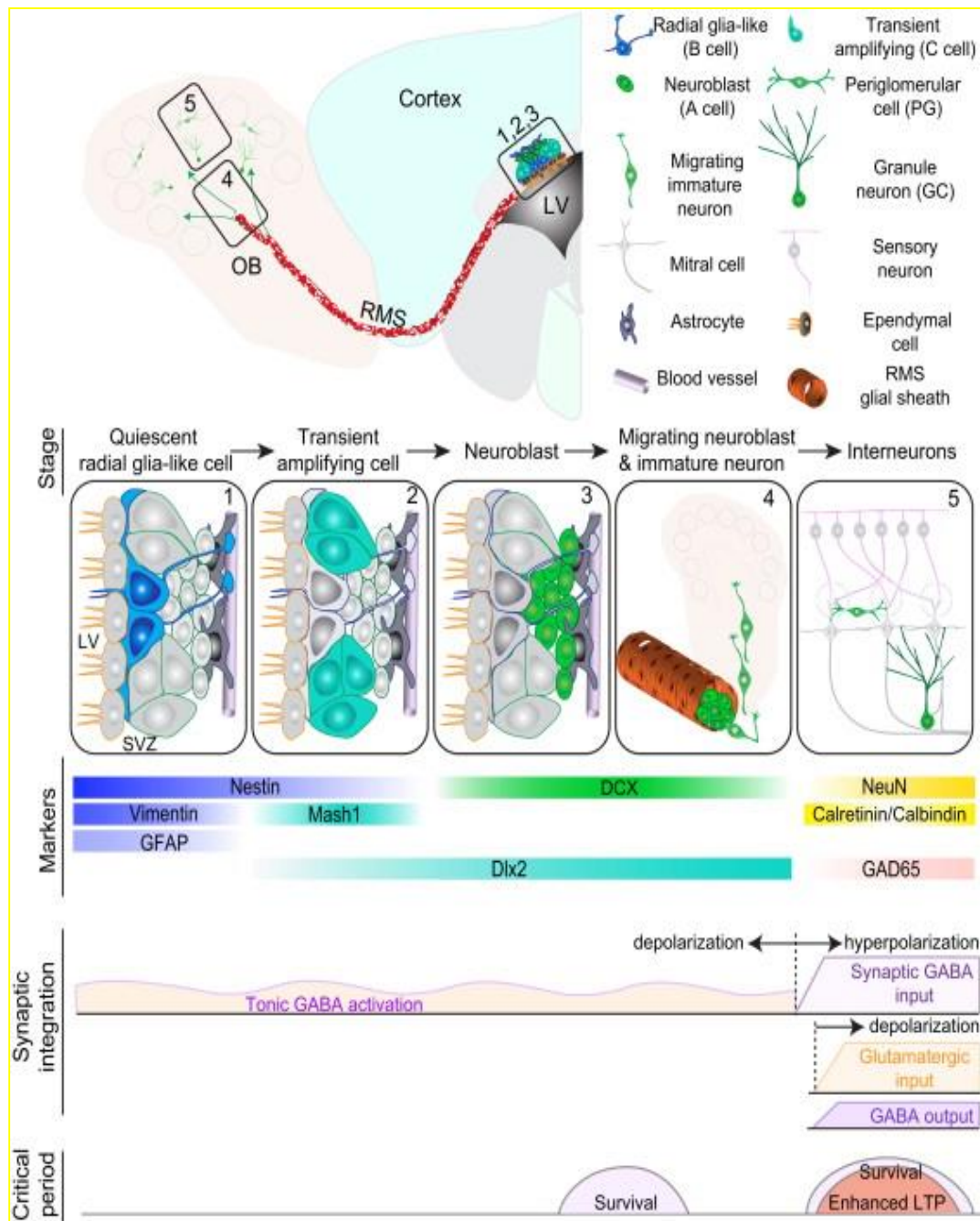


Figura 7. Neurogénesis adulta en la zona subventricular del ventrículo lateral y el bulbo olfatorio. Resumen de cinco etapas de desarrollo durante la neurogénesis ZSV adultos: (1) la activación de células de la glía como radiales en la zona subventricular del ventrículo lateral (LV); (2) la proliferación de las células de amplificación transitorias; (3) la generación de neuroblastos; (4) migración en cadena de neuroblastos dentro de la corriente migratoria rostral (RMS) y la migración radial de las neuronas inmaduras en el bulbo olfativo (OB); (5) la integración Sináptica y la maduración de células granulares (GC) y las neuronas periglomerular (PG) en el bulbo olfativo. También se muestra la expresión de marcadores específicos de la etapa, el proceso secuencial de integración sináptica, y los períodos críticos que regulan la supervivencia y la plasticidad de las neuronas recién nacidas. GFAP: proteína ácida glial fibrilar; DCX: doble cortina; NeuN: núcleos neuronales; LTP: potenciación a largo plazo (Ming, 2011).

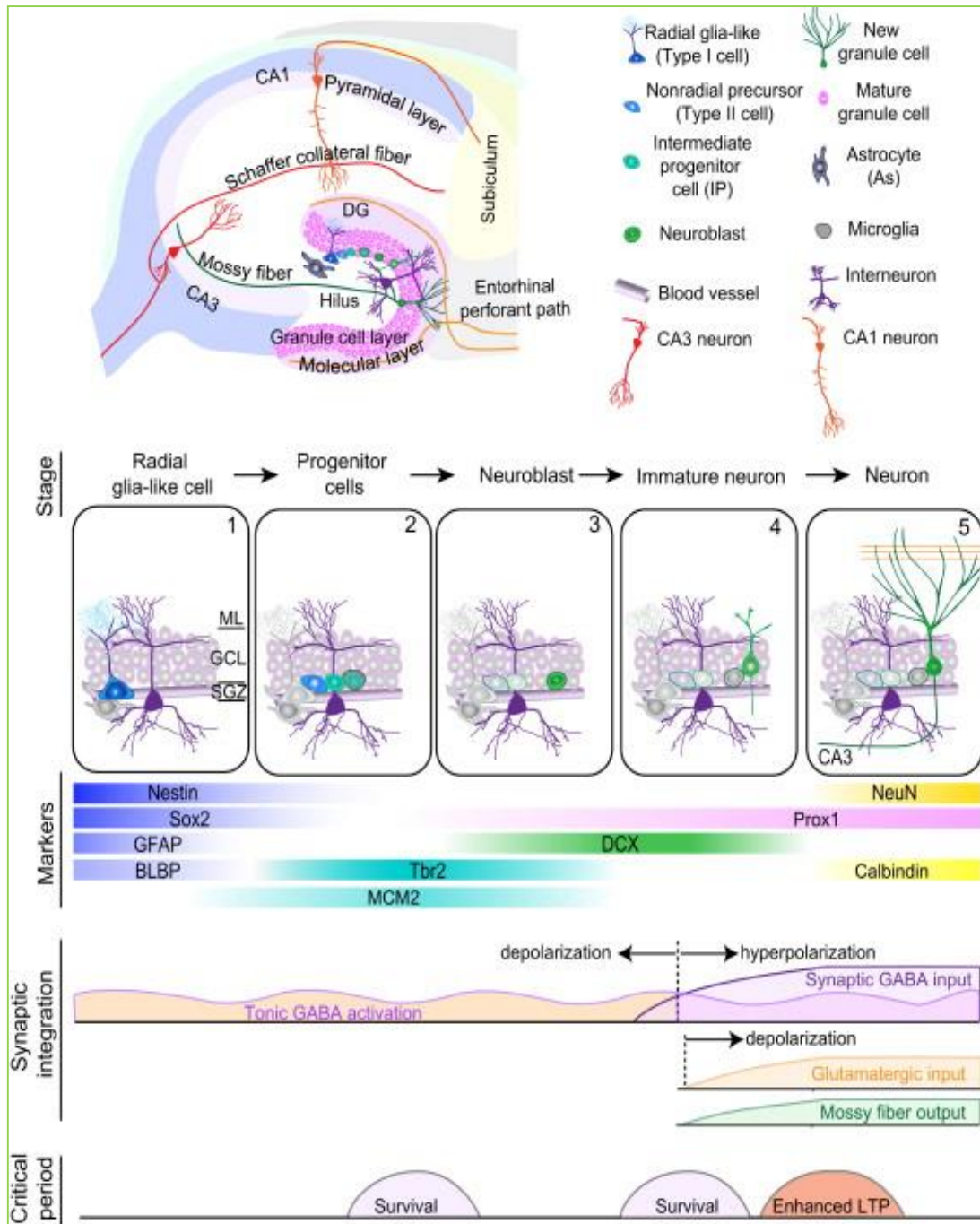


Figura 8. Neurogénesis en el giro dentado de hipocampo adulto. Resumen de las cinco etapas de desarrollo durante la neurogénesis en el hipocampo adulto: (1) la activación de células glía como en reposo radial en la zona subgranular (SGZ); (2) proliferación de precursor no radial y progenitores intermedios; (3) la generación de neuroblastos; (4) la integración de las neuronas inmaduras; (5) la maduración de las células granulares dentadas adultos nacidas. También se muestra la expresión de marcadores específicos de la etapa, el proceso secuencial de integración sináptica, y los períodos críticos que regulan la supervivencia y plasticidad. ML: capa molecular; GCL: capa de células granulares; SGZ: zona subgranular; GFAP: proteína ácida glial fibrilar; BLBP: proteína cerebral de unión a lípidos; DCX: doble cortina; NeuN: Antígeno neuronal nuclear; LTP: potenciación a largo plazo (Ming, 2011).

### 4.2.3. NEUROGÉNESIS

La Neurogénesis es definida como el proceso de generación de nuevas neuronas a partir de Células Precursoras Neurales (NPCs) la cual consiste en la proliferación y determinación, con la migración y sobrevivencia de estas jóvenes neuronas, así como, su maduración e integración con las neuronas maduras (Ming, 2005).

El descubrimiento de la neurogénesis adulta ha cambiado completamente nuestra opinión del potencial del cerebro adulto. La presencia del proceso neurogénico en esas dos regiones ha sido demostrado en muchas especies incluyendo los primates y los humanos (Pencea, 2001).

La neurogénesis adulta es generalmente considerada como una proliferación activa la especificación del destino de los progenitores neurales adultos, su posterior diferenciación, maduración, la migración y la integración funcional en los circuitos neurales existentes (Ming, 2005).

La evidencia acumulada sugiere papeles esenciales de estas nuevas neuronas en las funciones específicas del cerebro, como el aprendizaje, la memoria, el olfato, el estado de ánimo y la modulación (Zhao, 2008).

### 4.2.4. CÉLULAS hHIP

Las neuronas del hipocampo desempeñan papeles críticos en las funciones de aprendizaje y memoria en el sistema nervioso central (SNC). La potenciación a largo plazo se cree que es el mecanismo detrás de la formación de memoria y está mediada a través de la activación de receptores de glutamato. La generación de células madre embrionarias humanas (ES) y células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) y el desarrollo de los métodos de diferenciación neural mediante el uso de estas células han ampliado las oportunidades para generar células neurales humanas. Sin embargo, existen numerosos métodos reportados para la diferenciación de las ES humanas y las células iPS en neuronas funcionales, y los métodos de diferenciación difieren de un laboratorio a otro.

En consecuencia, aún no ha habido un consenso en los métodos estandarizados por el cual se puedan obtener datos reproducibles. Estas cuestiones son obstáculos críticos si estos métodos se deben aplicar a la detección de drogas. Además, los métodos de la diferenciación neuronal cerebral específica de la región de la CES/CMPI no han sido plenamente establecida, y los métodos para la diferenciación dirigida de las neuronas del hipocampo de los CES humanos/CMPI están en desarrollo. El hipocampo es una región del cerebro importante implicado en los trastornos neurológicos tales como la EA, la esquizofrenia y la epilepsia. Por lo tanto, es necesario desarrollar sistemas alternativos de ensayo, como por ejemplo las neuronas del hipocampo humano, con las que podemos obtener una comprensión detallada de los mecanismos moleculares que subyacen a



las enfermedades Neurodegenerativas por ejemplo el Alzheimer y descubrir nuevos fármacos para su tratamiento.

Un modelo de estudio prometedor es el uso de células precursoras/progenitoras neuronales del hipocampo humano. Se ha demostrado la capacidad de las células hHIP-009, caracterizadas como células precursoras neurales/progenitoras de hipocampo derivados de feto humano, de diferenciarse en células neuronales del hipocampo, así como la expresión funcional de NMDAR, AMPAR, y Kars en dichas células (hHIP-009). Por lo que las células neuronales del hipocampo humano específicamente células hHIP-009 son una herramienta novedosa para su uso en los sistemas in vitro de cerebro región específica y fisiológicamente relevantes para el estudio de receptores de glutamato inotrópicos humanos (Fukushima, 2014).

### 4.3. DEMENCIA

La demencia es un síndrome generalmente de naturaleza crónica o progresiva caracterizado por el deterioro de la función cognitiva (es decir, la capacidad para procesar el pensamiento) más allá de lo que podría considerarse una consecuencia del envejecimiento normal. La demencia afecta a la memoria, el pensamiento, la orientación, la comprensión, el cálculo, la capacidad de aprendizaje, el lenguaje y el juicio. La conciencia no se ve afectada. El deterioro de la función cognitiva suele ir acompañado, y en ocasiones es precedido, por el deterioro del control emocional, el comportamiento social o la motivación. Es un síndrome que implica el deterioro de la memoria, el intelecto, el comportamiento y la capacidad para realizar actividades de la vida diaria. Aunque afecta principalmente a las personas de la tercera edad (mayor a 65 años de edad), la demencia no constituye una consecuencia normal del envejecimiento. En el mundo entero hay unos 35,6 millones de personas que padecen demencia, y cada año se registran 7,7 millones de nuevos casos (OMS, 2015).

La enfermedad de Alzheimer, que es la causa de demencia más común, comprende entre un 60% y un 70% de los casos. La demencia es una de las principales causas de discapacidad y dependencia entre las personas mayores en el mundo entero. La demencia tiene un impacto físico, psicológico, social y económico en los cuidadores, las familias y la sociedad. Las formas, o causas, de la demencia son múltiples y diversas. La enfermedad de Alzheimer, como ya se mencionó, es la forma más común de demencia. Otras formas frecuentes son la demencia vascular, la demencia por cuerpos de Lewy (agregados anormales de proteínas en el interior de las células nerviosas) y un grupo de enfermedades que pueden contribuir a la demencia frontotemporal (degeneración del lóbulo frontal del cerebro). Los límites entre las distintas formas de demencia son difusos y frecuentemente coexisten formas mixtas. La enfermedad de Alzheimer representa un importante problema de salud pública y se ha identificado como una prioridad de investigación, se considera que se triplicarán el número de casos para el año 2050 (Cardenas-Aguayo, 2016).

#### 4.3.1. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER LA MÁS COMÚN DE LAS DEMENCIAS

La EA es una enfermedad neurodegenerativa que se caracteriza por el deterioro cognitivo progresivo que lleva a una completa necesidad de atención y cuidados dentro de varios años después del diagnóstico clínico. Es una causa importante de demencia en personas mayores de 60. La prevalencia global de la demencia en este grupo de edad se estima tan alta como 24 millones en 2001, y se prevé que se duplique cada 20 años, afectando a más de 80 millones de personas en todo el mundo en 2040. El aumento previsto en los casos de EA es claramente atribuible al creciente número de personas mayores, principalmente en los países de bajos y de mediano ingreso. En consecuencia, se espera que el número de personas con demencia aumentará 2001-2040 de 80 a 190% en Europa, América del Norte y la región del Pacífico occidental, mientras que en América Latina, India, China, África del Norte y Oriente Medio un fuerte aumento de más del 300% está pronosticado. (Hampel, 2011).



Figura 9. Cambios en el cerebro de una persona con Alzheimer. La ilustración muestra un "corte" transversal por la mitad del cerebro entre los oídos. La corteza se encoge, dañando las áreas del cerebro usadas para pensar, planear y recordar. El encogimiento es especialmente severo en el hipocampo, un área de la corteza que juega un papel clave en la formación de nuevos recuerdos. Los ventrículos (espacios llenos de líquido dentro del cerebro) se vuelven más grandes (Alzheimer's-Association, 2016).

### 4.3.2. SIGNOS Y SÍNTOMAS DEL ALZHEIMER

La demencia afecta a cada persona de manera diferente, dependiendo del impacto de la enfermedad y de la personalidad del sujeto antes de empezar a padecerla. Los signos y síntomas relacionados con la demencia se pueden entender en tres etapas.

Etapa temprana: a menudo pasa desapercibida, ya que el inicio es paulatino. Los síntomas más comunes incluyen:

- Tendencia al olvido;
- Pérdida de la noción del tiempo;
- Desubicación espacial, incluso en lugares conocidos.

Etapa intermedia: a medida que la demencia evoluciona hacia la etapa intermedia, los signos y síntomas se vuelven más evidentes y más limitadores. En esta etapa las personas afectadas:

- Empiezan a olvidar acontecimientos recientes, así como los nombres de las personas;
- Se encuentran desubicadas en su propio hogar;
- Tienen cada vez más dificultades para comunicarse;
- Empiezan a necesitar ayuda con el aseo y cuidado personal;
- Sufren cambios de comportamiento, por ejemplo, dan vueltas por la casa o repiten las mismas preguntas.

Etapa tardía: en la última etapa de la enfermedad, la dependencia y la inactividad son casi totales. Las alteraciones de la memoria son graves y los síntomas y signos físicos se hacen más evidentes. Los síntomas incluyen:

- Una creciente desubicación en el tiempo y en el espacio;
- Dificultades para reconocer a familiares y amigos;
- Una necesidad cada vez mayor de ayuda para el cuidado personal;
- Dificultades para caminar;
- Alteraciones del comportamiento que pueden exacerbarse y desembocar en agresiones.



Figura 10. Signos y síntomas de un paciente con Alzheimer. Se resumen los diferentes tipos de signos y síntomas por los que atraviesa un paciente con la patología de Alzheimer (Fundación-pasqual-maragall, 2016).

### 4.3.3. CLASIFICACIÓN

La EA "esporádica" es una enfermedad neurodegenerativa compleja lenta y crónica progresiva, en última instancia, debilitante de las personas y desafiando el funcionamiento independiente después de décadas de declive fisiopatológico. Aunque los síntomas clínicos de la EA se diagnostican comúnmente en las personas mayores, hay evidencia sustancial que indica que los procesos relacionados con la fisiopatología EA y mecanismos (por ejemplo, adaptación, mal adaptación, compensatorios, no compensatorios) iniciará varias décadas antes de la aparición clínica (etapa avanzada) de la enfermedad. (HAMPEL, 2011). Después de tres décadas de la producción de resultados en su mayoría irreplicables utilizando el llamado "enfoque de genes candidatos", la investigación genética ha adquirido un impulso considerable en la aplicación del genotipo en el contexto de los estudios de asociación amplia del genoma (GWAS).

De los 10 loci de manera inequívoca actualmente asociados con el riesgo de EA (ABCA7, APOE, BIN1, CD2AP, CD33, CLU, CR1, MS4A4E, MS4A6A, y PICALM) sugieren que ciertas vías y sus sistemas funcionales pueden estar implicados más a menudo que otros en la etiología de la EA. Algunas de estas vías moleculares, tales como el sistema inmunológico, también pueden ser relevantes en otras enfermedades neurodegenerativas u otras enfermedades neuropsiquiátricas (Hampel, 2011).



Figura 11. Clasificación del Enfermedad del Alzheimer. Basados en la Edad o la Causa. En la Edad: Presenil o temprana o de inicio precoz, generalmente con clara relación familiar. Comienza antes de los 65 años, es de curso más rápido y no supera el 1% de los casos en la mayoría de las estadísticas. Senil o tardía, de inicio tardío, aparece después de los 65 años, en su mayor parte es esporádica y lenta representado el 98 de casos. Familiar: La causa es la alteración en algunos genes que se heredan de forma dominante produciendo alteraciones similares en los descendientes que van a provocar EA. Coinciden en la mayoría de los casos con la EA presenil. Este tipo se debe principalmente a alteraciones (mutaciones) en tres genes principalmente: el gen de la Proteína Precursora Amiloide (APP) situado en el cromosoma 21; el gen de la Presenilina 1 (PS1), en el cromosoma 14; y el gen de la Presenilina 2 (PS2); en el cromosoma 1. Esporádica: Coincide generalmente con los casos de EA senil, comienza en personas mayores de 65 años y es el tipo más común. Su causa es aún desconocida, aunque se han descrito distintos factores genéticos que aumentan el riesgo de padecer la enfermedad, como es la presencia del alelo 4 de la apolipoproteína E (ApoE), localizado en el cromosoma 19 (Hampel, 2001).

#### 4.3.4. ETIOPATOGENIA DEL ALZHEIMER

La fisiopatología de la EA está relacionada con la lesión y muerte de las neuronas, iniciando en la región cerebral de la corteza entorinal y pasando al hipocampo que está involucrado con la memoria y el aprendizaje. Las dos características patológicas principales de la enfermedad de Alzheimer son las placas amiloideas y las marañas neurofibrilares. La hipótesis de la cascada amiloide **sugiere que la deposición de A $\beta$**  provoca disfunción y muerte neuronal en el cerebro.

El A $\beta$ , es un péptido corto que es un subproducto proteolítico de la proteína precursora de amiloide una proteína transmembranal (APP), cuya función no está clara, pero se cree que participan en el desarrollo neuronal. Los monómeros de amiloide beta son solubles y contienen regiones cortas de hoja beta, una concentración suficientemente alta se someten a un cambio conformacional dramático para formar una hoja beta una estructura que se agrega para formar fibrillas de amiloide. Estas fibrillas se depositan fuera de las neuronas en densas formaciones conocidas como placas seniles o placas neuríticas o en agregados menos densos placas difusas, y a veces en las paredes de los pequeños vasos sanguíneos en el cerebro en un proceso llamado angiopatía amiloide (Masters, 2012).

En la enfermedad de Alzheimer también ocurre la agregación anormal de la proteína tau, una proteína asociada a microtúbulos que también se expresa en las neuronas. La proteína Tau estabiliza los microtúbulos en el citoesqueleto celular. Como la mayoría de las proteínas asociadas a los microtúbulos, tau está normalmente regulada por la fosforilación. En los pacientes con EA, tau hiperfosforilada p-tau se acumula como filamentos helicoidales apareados que forman agregados en masas dentro de los cuerpos de las células nerviosas conocidas como las marañas neurofibrilares.

El mecanismo que impulsa la formación de placas seniles y marañas neurofibrilares aún se desconoce en la actualidad. Estos impulsan la lesión y la muerte de las neuronas, y como consecuencia la pérdida de memoria y cambios sintomáticos de comportamiento. Liberación anormal de neurotransmisores tales como el glutamato contribuye a la muerte neuronal e inflamación. La neuroinflamación también está involucrada en la compleja cascada que conduce a la patología de la EA y a sus síntomas. La respuesta inmunológica producida por la patología reportado en estudios clínicos por el aumento de las concentraciones de citocinas proinflamatorias en los fluidos como la sangre y cefalorraquídeo pueden ser a causa o consecuencia de la EA, pero aún no se entiende completamente la inflamación dentro del cerebro donde se incluye aumento de la reactividad de la microglia residente hacia los depósitos de amiloide, se ha implicado en la patogénesis y progresión de la EA.

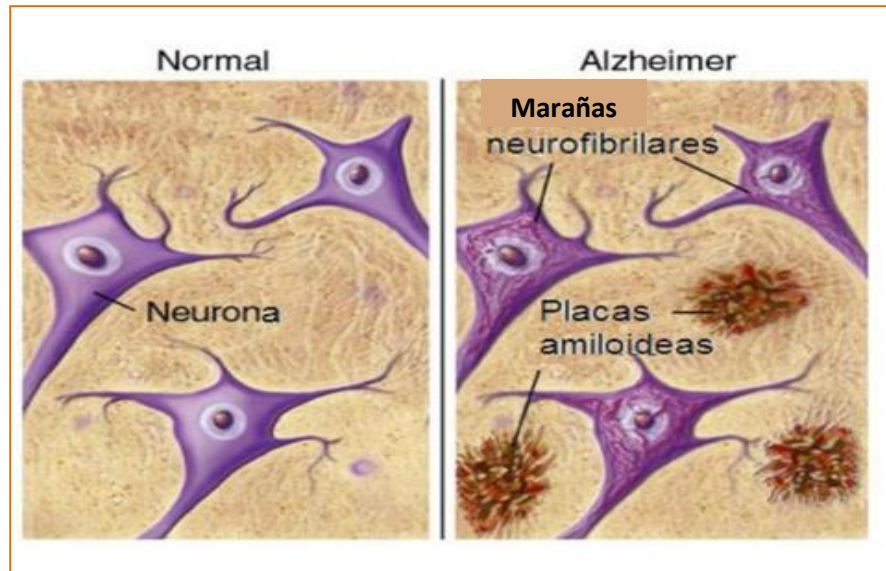


Figura 12. Esquema de la etiología del Alzheimer. Durante la EA la histología neuronal muestra que se presentan ovillos neurofibrilares intracelulares (Proteína Tau) y agregados de Amiloide beta (Placas amiloideas) (Murphy, 2010).

#### 4.3.5. BIOMARCADORES

Hasta la fecha la mayor parte del trabajo se ha dirigido hacia la validación y calificación de biomarcadores en las fases prodrómicas de la enfermedad. Estos biomarcadores deben facilitar una predicción temprana, diagnóstico y tratamiento, así como el seguimiento de la progresión de la enfermedad y la respuesta al tratamiento. Con este fin, los biomarcadores deben combinar principalmente; alta sensibilidad (y especificidad) con alto valor predictivo, e idealmente deben ser validados contra algún estándar de oro (**estudio patológico "postmortem"**) de la neuropatología confirmado antes de la integración clínica. La detección de la enfermedad en una etapa sin síntomas debe ser cuantificable y no probabilístico, lo que eleva los requisitos para la generalización y estandarización como la alta fiabilidad de la detección, la reproducibilidad y validez. Intuitivamente, cualquier nuevo biomarcador para ser útil debe correlacionar con el estadio de la enfermedad y/o progresión de la enfermedad (Hampel, 2011).

El diagnóstico clínico de EA probable en base a criterios de diagnóstico estándar no tiene en cuenta el curso preclínico y prodrómico largo de la EA, mientras que los cambios fisiopatológicos pueden ocurrir décadas antes de la aparición del síndrome de demencia clínica. Los biomarcadores relacionados con la fisiopatología EA mejorarán la detección temprana, la predicción y clasificación (Hampel, 2011).

Recientemente, ensayos de alto rendimiento para el análisis de proteínas séricas han revelado diferencias en los perfiles de proteínas pro-inflamatorias entre la EA y los individuos sanos con alta precisión diagnóstica. Este enfoque integrador más global (integración de los indicadores de

los diversos sistemas fisiopatológicamente afectados) se está volviendo muy prometedor en los esfuerzos crecientes para detectar la EA prodrómica (Hampel, 2011).

Tabla 2. Biomarcadores empleados para el diagnóstico de la Enfermedad de Alzheimer y sus avances en los últimos 10 años.

ÁREA	Principales temas de investigación actuales	Principales temas de investigación en 10 años	Principales referencias
Epidemiología	Tasas de incidencia y prevalencia por grupos de edad y por país, según la gravedad de la enfermedad	Datos sólidos sobre la epidemiología y los costos de EA en todas las regiones geográficas	Reitz et al. (2011)
Concepto de enfermedad AD y fisiopatología	La normalización de biomarcadores para las etapas prodrómicas de la EA, el descubrimiento y desarrollo de biomarcadores para la etapa asintomática de la EA que reflejan la progresión de la relación los mecanismos moleculares y neuropatología	Normalización de los principales multimodales factibles de imagen y biomarcadores de Fluido cefalorraquídeo. El desarrollo global, la estandarización y validación de muestras biológicas, incluyendo el plasma / suero utilizando la proteómica, transcriptómica, lipidómica, y la genómica. La aplicación de la biología de sistemas y sistemas fisiológicos, así como la caracterización de biomarcadores de la fase asintomática de la EA. Integración del paradigma de red en el concepto fisiopatológico general utilizando algoritmos matemáticos avanzados para modelar el proceso de la enfermedad EA	Bertram y Hampel (2011) Noorbakhsh et al. (2009) Herrup (2010) Frautschy y Cole (2010)
Genética	Actualmente, un área clave de investigación en el año es el impacto de alelos	Comprensión avanzada de la etiología genética de la EA, incluidos los perfiles genéticos de las formas de aparición tardía EA. Otros estudios de alto rendimiento, multimodal	Bertram et al. (2010) Bertram y Hampel (2011) Naj et al.(2011)

	de susceptibilidad en el riesgo de EA	estratificado de riesgo personalizado y/o predicción de secuenciación de próxima generación (NGS)	Hollingworth et al. (2011)
Neuroimagen	Aumento del número de tecnologías poderosas de imagen	Identificación de imágenes tempranas adecuando biomarcadores. Desarrollo de un conjunto de marcadores de neuroimagen para EA prodrómica y asintomática. Evaluar el uso de marcadores de imagen en una muestra de atención primaria y evaluar el efecto de imágenes basado en el diagnóstico precoz en el sistema de atención primaria	Hampel et al. (2011) Teipel et al., en prensa y Teipel et al., 2011
Criterios diagnósticos internacionales	Conjunto actual de criterios (NIA/AA) para distinguir entre los síntomas e indicadores de biomarcadores de EA, pero aún restringido a la investigación	La validación de los marcos teóricos en una variedad de entornos, mediante estudios clínicos. Actualizado DSM-5, el CIE-11 criterio diagnóstico liberado. Traducción de nuevos criterios en la práctica clínica en todo el mundo	Dubois et al., 2007 y Dubois et al., 2010 Sperling et al. (2011) Albert et al. (2011) McKhann et al. (2011)
El diagnóstico precoz	Combinaciones sistemáticas de biomarcadores actualmente mejor calificados por ordenamiento temporal de biomarcadores dinámicos para la estadificación de la enfermedad. Definición de patrón oro accesible para la validación del diagnóstico por medio de biomarcadores tempranos	Personalización de algoritmos de biomarcadores de diagnóstico incluido los perfiles individuales y moduladores de riesgo genético. Optimización de principios, de biomarcadores basados en algoritmos de diagnóstico para la detección de poblaciones asintomáticas de mediana edad pronóstico personalizado y terapias adaptadas con base en información de biomarcadores de diagnóstico sobre las vías biológicas implicadas individualmente que afectan la patogénesis, la preservación y la	Jack et al. (2010) Mattsson et al. (2011) Urbanelli et al. (2009) Zetsche et al. (2011)



		indemnización	
Desarrollo de nuevos criterios de terapia / monitoreo de la eficiencia terapia	Se usa un número de escalas clínicas de la cognición y el comportamiento, pero la interacción entre la gravedad de la enfermedad y los posibles efectos techo y suelo debe ser considerado escalas de calidad de vida de utilidad limitada	Desarrollo de las variables de resultado con clara bases biológicas y neuropsiquiátricas. Desarrollo de un marcador sustituto como un resultado.	Riepe et al. (2011)
Prevención	La evidencia reciente sobre la prevención de EA y el deterioro cognitivo está limitada	Puesto en marcha de estudios aleatorizados y controlados basados en la población para investigar factores de riesgo putativos	Plassman et al. (2010)
La atención comunitaria y las estructuras regionales de atención de la salud	Marcadas diferencias regionales en la atención comunitaria de los pacientes con demencia	La transición de los modelos regionales exitosos en el cuidado regulado de desarrollo de planes de estudio adaptados a calificar enfermeras y asistentes médicos para asumir tareas médicas seleccionadas	Van den Berg et al.(2010) Dreier et al., 2010 y Dreier et al., 2011

#### 4.4. PÉPTIDO AMILOIDE BETA

##### 4.4.1. CONCENTRACIONES TÓXICAS Y FISIOLÓGICAS DE AMILOIDE BETA

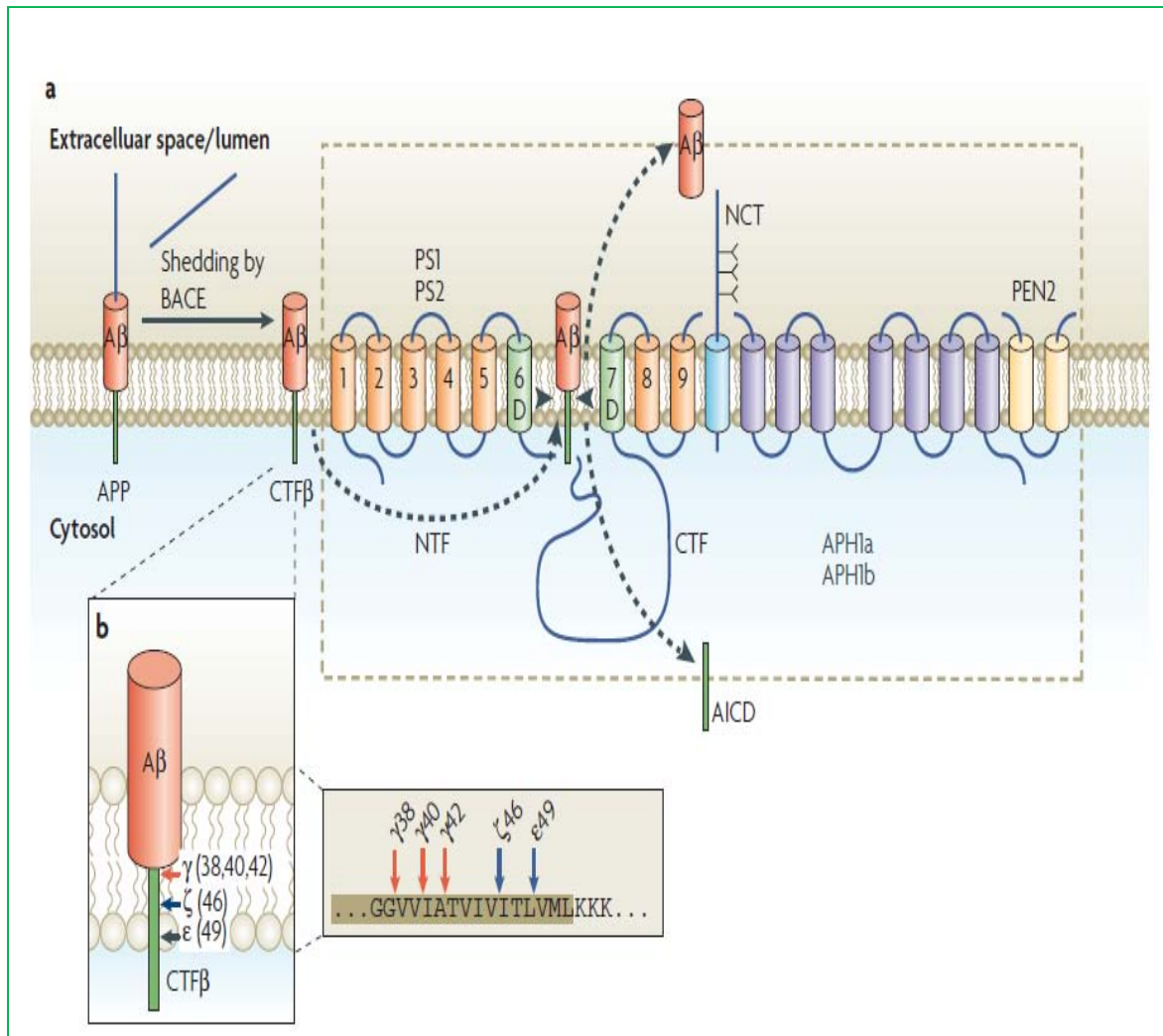
Inicialmente, el mecanismo por el cual la región del **Aβ** parcialmente intramembranal podría ser liberado como un péptido libre de su precursor era enigmático y se consideró que requería alguna lesión de la membrana pre-existente. Se asumió que necesitaría el interior hidrofóbico de la bicapa de membrana para sufrir el daño y permitir el acceso de una proteasa y agua para efectuar la escisión. Pero este concepto fue refutado cuando se descubrió inesperadamente que el **Aβ** se produce normalmente por la proteólisis de APP intramembranal a lo largo de la vida y la APP se encontró circulante en los fluidos extracelulares, incluyendo líquido cefalorraquídeo (CSF) y el plasma. Este descubrimiento abrió el estudio dinámico de **Aβ**, que hasta ahora sólo se había obtenido a través del aislamiento minucioso del cerebro humano post-mortem. Como se predijo por la hipótesis amiloide, todas las mutaciones de APP que han sido identificados causan EA hasta el

momento, ya sea dentro o que **flanquean la región A $\beta$**  de este polipéptido grande. En consecuencia, las **mutaciones que flanquean la región A $\beta$**  aumentan la producción de la isoforma **A $\beta$  1-42** altamente amiloidogénica, mientras que **las mutaciones en la región A $\beta$**  mejoran la oligomerización del péptido. Debido a que la generación de **especies A $\beta$**  con C terminal variable hidrofóbica tienen diferentes propensiones a oligomerizar, este aspecto, es directamente relevante para el desarrollo de la EA (Kumar-Singh, 2008).

La **generación de A $\beta$**  ha resultado ser sólo un ejemplo de un mecanismo fisiológico general, ahora conocida como la proteólisis intramembranal regulada (RIP). En una versión principal de este proceso, las proteínas de membrana primero se someten a cortes regulados, de sus ectodominios conocidos como secretasas, con la liberación de grandes dominios luminales en los fluidos extracelulares. Los fragmentos retenidos en la membrana pueden entonces ser escindidos dentro de sus dominios transmembrana (TMDs) para liberar pequeños péptidos **hidrófobos (por ejemplo, A $\beta$**  en el caso de APP) en el espacio extracelular y dominios intracelulares (CDI) en el citoplasma.

Los Dominios intracelulares libres podrían tener funciones específicas, incluyendo la activación de vías de señalización nucleares, como en el caso de la CIE Notch, que se libera por la secretasa de Notch unida a la membrana. En el caso de APP y otros sustratos RIP, los ectodominios escindidos puede estar mediados por una de dos proteasas ancladas a la membrana,  **$\alpha$ -secretasa** (se cree que consta **de uno o más miembros de la familia ADAM de metaloproteasas**) o  **$\beta$ -secretasa** (también llamado  **$\beta$ -site APP cleaving enzyme (BACE)**). El fragmento asociado a la membrana, que se crea por la escisión BACE, a continuación, puede someterse a una escisión intramembranal que **está mediada por el complejo  $\gamma$ -secretasa**, un tipo especial de aspartil proteasa con un sitio activo único y mecanismo de escisión. El complejo se compone de presenilina-1 (PS1) o PS2, nicastrina, APH1 y PEN2. Las **cuatro proteínas son necesarias para reconstituir la actividad de  $\gamma$ -secretasa** en la levadura cuando se carece de esta enzima (Haapasalo, 2011).

Al menos en el caso de sus dos sustratos mejor **estudiados, APP y Notch,  $\gamma$ -secretasa** lleva a cabo múltiples divisiones intramembranales. La evidencia actual indica que el complejo **PS- $\gamma$ -secretasa puede escindir en sitios diferentes (conocidas como  $\gamma$ ,  $\epsilon$  y  $\zeta$ ) en el TMD**. A partir de entonces, **A $\beta$  se libera en fluidos biológicos por los cortes finales en el sitio  $\gamma$** . El corte de  **$\gamma$ -secretasa** es variable y se produce después de los **aminoácidos 38, 40 o 42 del A $\beta$** . Los sitios precisos de corte **de esta  $\gamma$ -secretasa** tienen una influencia importante en el potencial de patogenicidad de **autoagregación con la resultante producción del péptido A $\beta$  1-42** altamente amiloidogénico (Haapasalo, 2011).



**Figura 13. La generación de la proteína Aβ por el procesamiento proteolítico normal de la proteína precursora de β-amiloide.** El procesamiento amiloidogénico de la proteína precursora de Amiloide –B (APP) por BACE y el complejo γ-secretasa. En esta vía, la forma completa de la APP es primero procesada por BACE, y el gran ectodominio es secretado. El fragmento restante de la membrana (CTFβ) se une a un sitio de acoplamiento en la superficie del complejo γ-secretasa y se transfiere entonces al sitio activo que incluye dominios transmembranales 6 y 7 de la presenilina 1 o 2 (PS1/PS2). La Presenilina es activada por presuntas divisiones autoproteolíticas, que crean sus fragmentos N y C terminal (NTF Y CTF). Estos se unen entre sí y también a otros tres componentes de la γ-secretasa esenciales APOH1a (o APOH1b), PEN2 y nicastrina (NCT). Las cuatro proteínas forman el núcleo complejo requerido para la actividad de la γ-secretasa). Los dos residuos de aspartato intramembranales en el NTF y CTF de la presenilina (marcados con una D) son una parte crucial del sitio catalítico inusual de la proteasa. La escisión de γ-secretasa se produce en la parte intermedia de la membrana y libera la proteína Amiloide Beta (Aβ) y el dominio intracelular de APP (AICD), la función del AICD aún no está del todo clara. Varios sitios propuestos de proteólisis intramembranales por γ-secretasa. Se muestra la secuencia de aminoácidos alrededor de los sitios de escisión de APP (los números se refieren a la secuencia de Aβ; los aminoácidos sombreados están en el dominio transmembranal). γ-secretasa corta sus sustratos varias veces. Los sitios de escisión se denominan ε, ζ y γ (desde el extremo C al N-terminal). El sitio γ es variable y puede ocurrir al menos después de los aminoácidos 38, 40 y 42. Esta escisión es de gran relevancia para la posterior propensión de agregación de Aβ (Haass, 2012).

4.4.2. TIPOS DE AMILOIDE

El Comité de Nomenclatura de la Sociedad Internacional de Amiloidosis (ISA) se reunió durante el Simposio Internacional XIII, 6-10 de mayo de 2012, Groningen, Países Bajos, para formular recomendaciones sobre la nomenclatura de proteínas fibrilares de amiloide. La necesidad de promover la utilización de la constante y actualizada terminología para la química de fibrillas y clasificación clínica del síndrome de la enfermedad resultante se enfatizó. La Nomenclatura de fibras amiloides se basa en la identidad química de la formación de fibrillas de la proteína amiloide. Aunque la importancia de la química de fibrillas en el proceso de la enfermedad ha sido reconocida por más de 40 años, hasta el día, la literatura contiene designaciones clínicas e histoquímicas que se utilizaron cuando la diversidad química de las enfermedades amiloides fue poco conocida. Por lo tanto, el uso continuado de las clasificaciones de enfermedades tales como la neuropatía amiloide familiar y cardiomiopatía amiloide familiar genera confusión. Una proteína de fibrillas de amiloide se define como sigue: la proteína debe ocurrir en depósitos de tejido del cuerpo y exhiben afinidad por tanto Congo birrefringencia rojo y verde cuando Congo depósitos teñidas de rojo se vieron por microscopía de polarización. Además, la identidad química de la proteína debe haber sido caracterizado sin ambigüedad por análisis de secuencia de la proteína cuando así sea prácticamente posible. Así, en casi todos los casos, es insuficiente para demostrar mutación en el gen de una proteína amiloide candidato; la propia proteína debe ser identificada como una proteína de fibrillas de amiloide. La lista de la nomenclatura de proteínas fibrilares humanos y animales se proporcionan junto con una lista de cuerpos de inclusión intracelular, que exhiben todas o algunas de las propiedades de las fibras amiloides principalmente extracelulares (Sipe, 2012).

Table 1. Amyloid fibril proteins and their precursors in human.

Fibril protein	Precursor protein	Systemic and/or localized	Acquired or hereditary	Target organs
AL	Immunoglobulin light chain	S, L	A	All organs except CNS
AH	Immunoglobulin heavy chain	S, L	A	All organs except CNS
Aβ2M	β2-microglobulin, wild type	L	A	Musculoskeletal system
	β2-microglobulin, variant	S	H	ANS
AApoAII	Apolipoprotein A II, variants	S	H	Kidney
AApoAIV	Apolipoprotein A IV, wild type	S	A	Kidney medulla and systemic
AGel	Gelsolin, variants	S	H	PNS, cornea
ALys	Lysozyme, variants	S	H	Kidney
ALect2	Leukocyte chemotactic factor-2	S	A	Kidney, primarily
AFib	Fibrinogen α, variants	S	H	Kidney, primarily
ACys	Cystatin C, variants	S	H	PNS, skin
ABri	ABriPP, variants	S	H	CNS
ADan <sup>a</sup>	ADanPP, variants	L	H	CNS
Aβ	Aβ protein precursor, wild type	L	A	CNS
	Aβ protein precursor, variant	L	H	CNS
APrP	Prion protein, wild type	L	A	CJD, fatal insomnia
	Prion protein variants	L	H	CJD, GSS syndrome, Fatal insomnia

Figura 14. Nomenclatura de los diferentes tipos de amiloide y su ubicación en los órganos (Sipe, 2012).

4.4.3. VIA AMILOIDOGÉNICA Y NO AMILOIDOGÉNICA

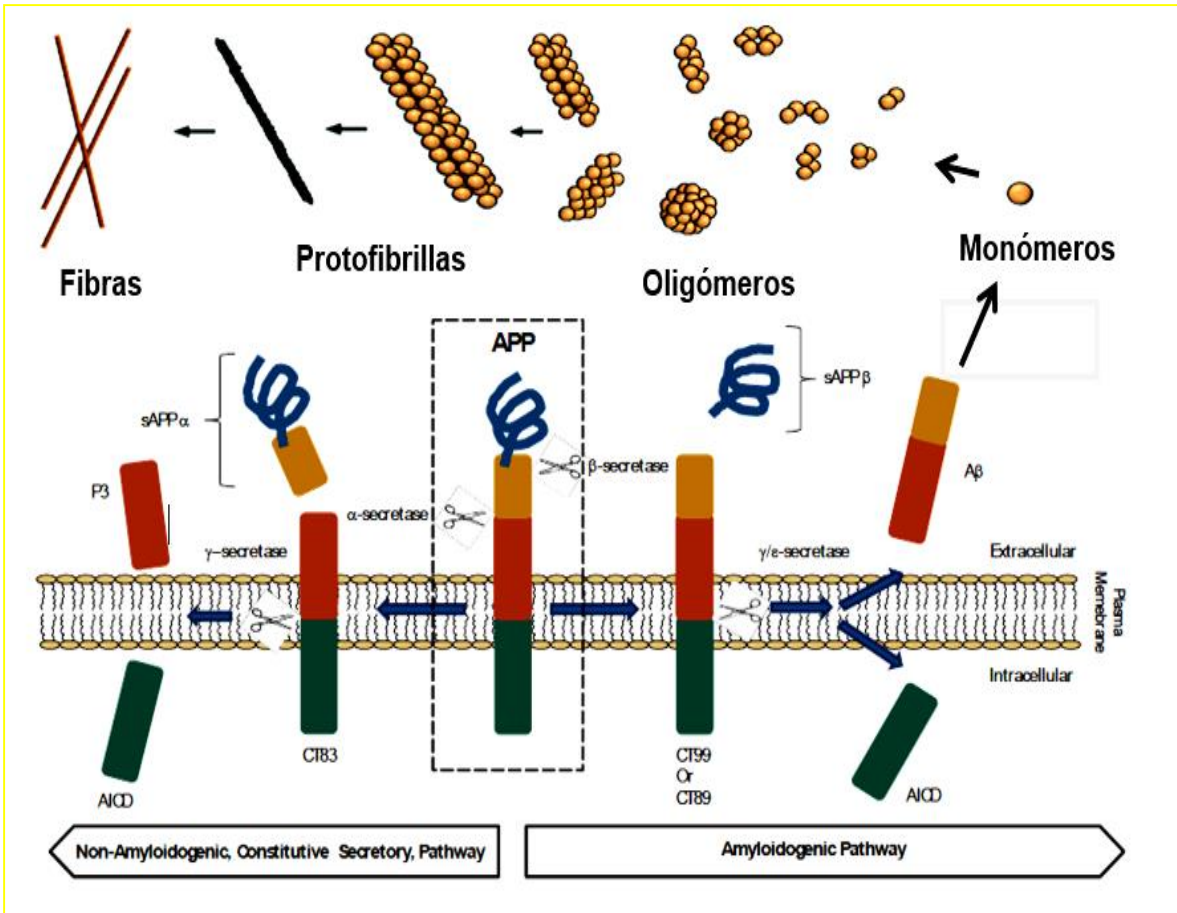


Figura 15. Vías de procesamiento de APP y proceso de oligomerización de la vía amiloídica. Del lado izquierdo se encuentra el procesamiento de la APP por la  $\alpha$ -secretasa y la  $\gamma$ -secretasa constituyendo la vía no amiloídica, mientras que el lado derecho se muestra el procesamiento amiloídico por  $\beta$ -secretasa y  $\gamma$ -secretasa con la respectiva generación de amiloide mostrando además la formación de estructuras de mayor peso a los monómeros de amiloide beta, pasando por oligómeros, protofibrillas y fibras (modificado de Cárdenas-Aguayo, 2014).

4.4.4. VÍA NO AMILOIDOGÉNICA

Al ser una proteína transmembrana, el procesamiento proteolítico de la APP tiene lugar en la membrana plasmática. La primera vía de procesamiento se conoce también como no amiloídica, ya que no produce depósitos amiloides. Esta vía comienza con la acción de la alfa-secretasa, la cual realiza un corte en la parte extracelular de la APP a nivel del aminoácido 687. Este corte libera casi todo ese extremo extracelular de la APP, el cual es soluble y se denomina sAPP $\alpha$  (la s es de soluble). El fraccionamiento no amiloídico de la APP, junto con la consiguiente generación de sAPP $\alpha$ , puede ser tanto constitutivo como regulado. La alfa-secretasa procesa la APP y no ha sido caracterizada completamente. Sin embargo, se sabe que la  $\alpha$ -secretasa es una metaloproteasa. Existe una familia de metaloproteasas llamadas ADAM (del inglés "A Disintegrin and

Metalloproteínase”), que al igual que la APP son proteínas transmembranales tipo I. Tres miembros de esta familia han sido propuestos como los responsables de la actividad  $\alpha$ -secretasa que procesan la APP. De ellos, ADAM10 es actualmente considerada como la actividad alfa-secretasa constitutiva, mientras que ADAM17 parece intervenir más en el procesamiento regulado de la APP (Haass, 2012).

#### 4.4.5. VÍA AMILOIDOGÉNICA

Los fragmentos liberados por la actividad alfa-secretasa no son patogénicos. Pero hay otra vía de procesamiento de la APP menos común, aunque también fisiológica (Müller, 2012). En la que es la beta-secretasa la encargada de realizar el primer corte. La beta-secretasa realiza el corte en la APP algo antes en la secuencia de aminoácidos, concretamente a nivel del aminoácido 671, liberando de esta forma una porción extracelular 16 aminoácidos más corta que la sAPP $\alpha$ , llamada sAPP $\beta$ . Hace relativamente poco tiempo que los investigadores han puesto nombre propio a la actividad  $\beta$ -secretasa: las principales responsables son las proteasas BACE (del inglés Beta-site APP Cleaving Enzyme). BACE1 parece ser la más importante y es una proteasa anclada a la membrana mediante un dominio transmembrana. Posee un dominio aspartil-proteasa (utiliza un aspartato para la reacción de catálisis) en su porción extracelular, que es la que realiza el corte. Los estudios in vitro con APP sintética confirman este procesamiento por BACE1. Actualmente, se asume que la actividad de BACE1 es el factor **limitante a la hora de generar A $\beta$**  y por lo tanto, no es de extrañar el interés suscitado por esta proteasa como diana terapéutica para tratar la enfermedad de Alzheimer. Varios trabajos muestran que los niveles de esta proteína y su actividad están incrementados en los cerebros afectados por la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, a pesar de que en un principio parecía seguro inactivar la actividad de BACE1, han sido caracterizados otros sustratos fisiológicos naturales de esta proteasa además de la APP, que podrían generar efectos colaterales no deseados si no fueran procesados por haber inhibido la actividad de BACE1. Además, el estudio profundo de los ratones deficientes en BACE1 muestra diversas anomalías en la neurofisiología de estos animales, incluyendo fallos en el desarrollo de los nervios periféricos, comportamientos alterados y mayor sensibilidad al dolor. El procesamiento proteolítico de la APP por BACE genera también un fragmento soluble, el sAPP $\beta$ , más corto que sAPP $\alpha$  (Vassar, 2009).

#### 4.4.6. LA ACTIVIDAD DE $\gamma$ -SECRETASA

El segundo evento proteolítico es común a ambas vías y es llevado a cabo por una actividad  $\gamma$ -secretasa, la cual procesa el fragmento que queda anclado en la membrana a la altura de los aminoácidos 712, 714 o 715. En el caso de la vía no amiloidogénica, se libera el péptido p83, el cual es soluble y no parece tener una función importante. Pero en la vía amiloidogénica, el fragmento que queda anclado a la membrana es algo más pequeño y como resultado de la acción de la gamma-secretasa, se libera un péptido de 40, 42 o 43 aminoácidos, dependiendo del corte de esta enzima. Ese péptido es el  **$\beta$ -amiloide (A $\beta$ )**, el cual es insoluble y forma agregados, siendo el componente

mayoritario de las placas amiloides. Esto hace de la actividad  $\gamma$ -secretasa otro candidato para diseñar terapias que inhiban o reduzcan su función (Churcher, 2005). Hasta ahora se han identificado tres presenilinas (PS, PS1 y PS2). Las presenilinas son proteínas transmembranales, aunque en este caso no se conoce todavía el número de dominios transmembranales que tienen. Actualmente se consideran los principales componentes catalíticos del complejo. Los otros componentes del complejo  $\gamma$ -secretasa son necesarios para la actividad enzimática, ya sea proporcionando un armazón o actuando como agentes encargados de la maduración y ensamblaje de las presenilinas. En su conjunto, las mutaciones en presenilinas son responsables de entre un 20 y un 60% de los casos de Alzheimer familiar. La gamma-secretasa también procesa otras proteínas transmembranales importantes, como Notch, cadherina, ErbB4, CD44, etc. Se ha observado que la elección de sustrato depende de la localización del mismo, por lo que se ha propuesto que una localización errónea de la  $\gamma$ -secretasa podría ser responsable de ciertos procesamientos erróneos de la APP. La actividad  $\gamma$ -secretasa puede liberar también dominios intracelulares de sus sustratos. En el caso de la APP se puede liberar AICD (del inglés, APP Intra Cellular Domain) (FIBAO, 2011).

#### 4.4.7. SIGNIFICADO BIOLÓGICO DEL PROCESAMIENTO DE LA APP

Obviamente, la pregunta fundamental es ¿por qué la APP ha de ser procesada para ejercer sus funciones? Una respuesta puede estar en los productos derivados de ese procesamiento. De los estudios con ratones deficientes en el gen APP se deriva que el sAPP $\alpha$  parece tener un importante papel en la supervivencia y plasticidad neuronal, y parece proteger a las neuronas de la excitotoxicidad. También parece ser fundamental en el desarrollo temprano del sistema nervioso central y en la regulación de la proliferación de las células madre neuronales. Por otra parte, la expresión de sAPP $\alpha$  parece revertir o rescatar a los ratones deficientes en APP de las anomalías derivadas de la falta de este gen, sugiriendo que la mayor parte de las funciones fisiológicas de la APP están mediadas por este fragmento soluble. El fragmento sAPP $\beta$  liberado tras la acción de BACE parece funcionar como ligando del DR6 (del inglés, Death Receptor 6), un receptor de la familia del TNFR. Estos receptores de la superficie celular transmiten señales de apoptosis (muerte celular programada) al unirse a ligandos específicos, mediando la destrucción axonal y la muerte de las neuronas. Los dominios intracelulares que pueden liberarse como consecuencia del procesamiento de la APP también pueden tener importantes funciones. Una función importante del AICD en la APP es facilitar la interacción de la proteína con distintos factores citosólicos que regulan el tráfico intracelular de la APP o la transducción de señales, por lo que el procesamiento de la APP para liberar este fragmento podría ser una forma de regular estas funciones. El fragmento AICD ha mostrado actividad transactivadora y puede regular la transcripción de muchos genes. En su forma libre, puede inducir apoptosis y jugar un papel importante en la sensibilización de neuronas a estímulos tóxicos. La **neurotoxicidad inducida por el péptido A $\beta$**  produce la activación de la vía proteolítica de las caspasas, las cuales fragmentan la APP y liberan C31 y Jcasp. Estos dos péptidos son también neurotóxicos, por lo que se inicia de esta forma una cascada degradativa que lleva a la muerte neuronal. Parece ser que es C31 el principal agente de

esta vía neurotóxica. Este procesamiento de la APP por las caspasas parece ser crucial en la neurotoxicidad promovida por A $\beta$  (FIBAO, 2011).

#### 4.4.8. PRODUCCIÓN DE AMILOIDE BETA FISIOLÓGICO

Como vemos, son muchos los posibles procesos que tienen lugar a raíz del procesamiento de la APP. Sin embargo, quizá lo más interesante es la existencia de una vía fisiológica natural que **produce A $\beta$** . Si este péptido es tan dañino ¿cómo es que no sólo lo producimos, sino que poseemos mecanismos específicos para ello? Hay muchísimos estudios que muestran que la sobreproducción de A $\beta$  resulta en una cascada neurodegenerativa que lleva a la pérdida de función en las sinapsis, la formación de marañas neurofibrilares y eventualmente la pérdida neuronal característica de la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, el descubrimiento de formas solubles de A $\beta$  en los fluidos corporales de diferentes especies, así como en el medio condicionado de células cultivadas, parece apuntar **a una función fisiológica de A $\beta$** . La respuesta parece estar en los niveles de producción. Una cantidad excesiva produce en efecto la pérdida neuronal, pero también se ha descrito que niveles bajos de A $\beta$  aumentan la potenciación a largo plazo del hipocampo y mejoran la memoria, indicando un **papel positivo y regulador de A $\beta$**  en la neurotransmisión y la memoria (Cardenas-Aguayo, 2014). Según este razonamiento, la enfermedad de Alzheimer podría ser el resultado de un cambio en los eventos de procesamiento de la APP que llevaría **a la producción excesiva de A $\beta$** , su agregación en placas insolubles y la inducción de la muerte de las neuronas en las áreas afectadas (FIBAO, 2011).

### 4.5. OLIGOMERIZACIÓN

Los oligómeros de A $\beta$  solubles se han denominado como agregados amorfos, micelas, protofibrillas, agregados prefibrilar, LDDA, A $\beta$ \*56, globulomeros, amilosferoides, "tA $\beta$ " (A $\beta$  soluble tóxico), y protofibrillas anulares. Un espectro similar de oligómeros solubles se ha observado para **muchos tipos de amiloides tales como  $\alpha$ -sinucleína**, el amiloide de los islotes, y neoamiloides asociado con enfermedades. Aunque estos oligómeros se han formado en diferentes condiciones y muestran diferentes actividades tóxicas, tamaños y morfologías, todavía no está claro si representan las mismas o distintas estructuras (Murphy, 2010).

La vía de la agregación comienza con un monómero amiloidogénico mal plegado y puede divergir en dos vías dependiendo de la conformación que adopta. Los monómeros pueden agregarse para formar oligómeros que son prefibrilar A11-positivos y OC-negativo. Estos oligómeros prefibrilares pueden entonces alinear para formar protofibrillas y someterse a un cambio de conformación concertada "en bloque" para formar fibrillas. Se denominan oligómeros prefibrilares porque son intermedios transitorios que en última instancia se convierten en fibrillas. En la otra vía, monómeros amiloidogénicos se agregan para formar una conformación fibrilar o enrejado que es OC-positivo y A11-negativo. Estos oligómeros fibrilares pueden representar núcleos de fibrillas o semillas que son agregados capaces de alargarse mediante la adición de monómeros en sus



extremos. La adición de monómeros induce el alargamiento de las fibrillas a un tamaño que satisface una definición arbitraria de insolubilidad y sería reconocido como fibrilar bajo el microscopio de electrones o de fuerza atómica, aunque ninguna diferencia conformacional es evidente por la reactividad de anticuerpos. Las fibrillas pueden ser distintas de los oligómeros fibrilares en función de su contenido en múltiples protofilamentos, pero esto no implica que un cambio fundamental en la conformación de sus bloques de construcción de péptido integral es necesaria para oligómeros fibrilares para convertir a fibrillas. Ellos simplemente pueden unirse o crecer mediante la adición de monómeros para formar fibrillas (Glabe, 2008).

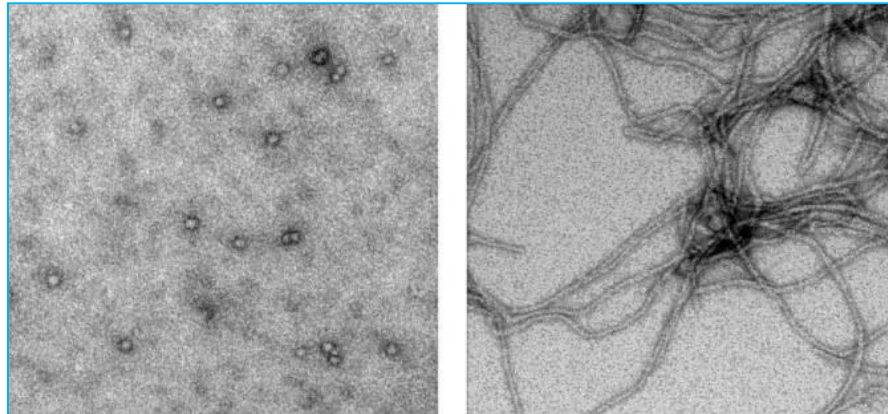
Oligómeros A $\beta$ Fibras A $\beta$ 

Figura 16. Oligómeros y Fibras de amiloide Beta observados en microscopía electrónica de transmisión (Glabe, 2008).

#### 4.5.1. ENZIMAS DE DEGRADACIÓN DE OLIGÓMEROS

La acción de las secretasas beta y gamma determina la producción del A $\beta$  monomérico a partir de la APP. Las proteasas son **importantes en la eliminación del A $\beta$** . La enzima que degrada insulina (IDE), la enzima convertidora de endotelina (ECE) y la neprilisina (NEP) son algunas de las proteasas más importantes en la degradación del A $\beta$  (Saïdo, 2012).

La IDE es un dímero de alrededor de 250 KDa que requiere un átomo de cinc por monómero; su actividad parece estar relacionada con la conformación. La IDE se expresa ampliamente en el cerebro; su localización predominante es en el citoplasma, cerca del retículo endoplásmico rugoso; también se expresa en los peroxisomas y en las mitocondrias. No obstante, la IDE de la membrana plasmática, de los endosomas y del medio extracelular sería más importante que la que está en los peroxisomas para la degradación del A $\beta$ . Los resultados de diversos estudios han sugerido que existen dos isoformas de IDE, atribuibles al empalme (splicing) alternativo del gen. La expresión de ambas isoformas es semejante; la formación de homodímeros o heterodímeros se asocia con una actividad catalítica muy diferente (Wang, 2006)

Los datos en conjunto indican que la acción de las principales proteasas que degradan el A $\beta$  es muy inferior en los cerebros de los pacientes con EA esporádica en comparación con controles sanos. La IDE cerebral se expresa sobre todo en las neuronas, en la astrogliía y en los pequeños vasos (pericitos, células endoteliales y musculares lisas). La microvasculatura cerebral, recuerdan los autores, está expuesta a **concentraciones locales elevadas de A $\beta$**  porque el pasaje del péptido a través de la barrera hematoencefálica representa una de las principales vías de depuración de la IDE (Farris, 2003).

Los estudios de hibridación in situ mostraron una disminución sustancial del RNA mensajero de la IDE en las células granulares del giro dentado y del hipocampo en los pacientes con EA, en comparación con los cerebros de los sujetos de la misma edad, sin demencia. La disminución de los transcritos de IDE y de los niveles de proteína en los enfermos con EA podría estar determinada por la presencia del alelo E4 de la APOE. Aunque en los microvasos de la corteza cerebral con depósitos de A $\beta$  hay una mayor concentración de IDE, la actividad es menor; los mecanismos que participan en la inhibición o inactivación enzimática todavía no se conocen. Sin embargo, es posible que estén involucrados el estrés oxidativo o los cambios conformacionales en la enzima; los resultados de los estudios de inmunohistoquímica avalan esta última teoría. La IDE es capaz de formar complejos muy estables con el A $\beta$ ; estos complejos son resistentes a la degradación por detergentes y ácidos (Wang, 2006).

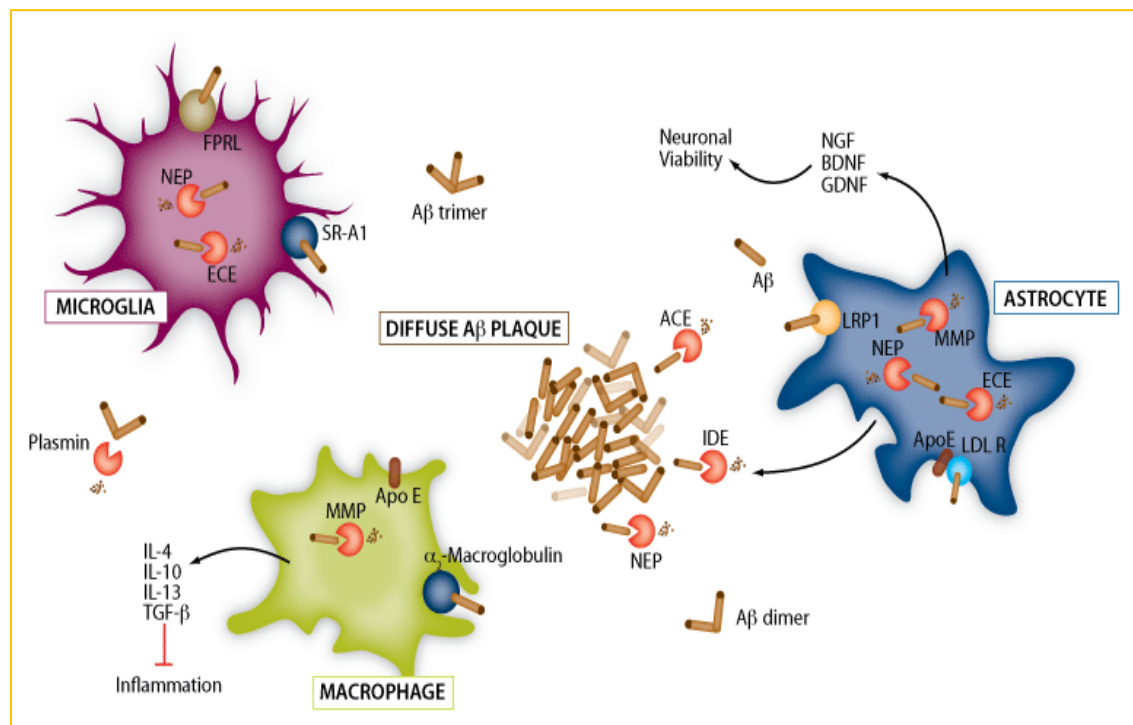


Figura 17. Degradación extracelular de amiloide beta por células microgliales y gliales previene la formación de placas amiloideas. En un cerebro no enfermo saludable la pequeña cantidad extracelular de amiloide beta es degradado por la microglía y astrocitos que expresan encefalina, neprelisina y la enzima degradadora de insulina (systems, 2015).

## 4.6. PAPEL FISIOLÓGICO DEL A $\beta$

Se ha propuesto que concentraciones bajas (de picomolar a nanomolar) de A $\beta$  podrían actuar como señal trófica y como modulador de la actividad sináptica, con implicaciones en la memoria y el aprendizaje. Además, los niveles picomolares de A $\beta$  se han determinado en el líquido intersticial del cerebro normal por microdiálisis. **Los niveles de péptidos A $\beta$**  en el cerebro se ven influidos de forma dinámica y directamente por la actividad sináptica. Además, bajas cantidades de A $\beta$ , podrían funcionar como antioxidantes, debido a su capacidad para capturar los metales redox, tales como  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  y, por lo tanto, impidiendo su participación en el ciclo redox con otros ligandos; por lo tanto, A $\beta$  tiene la capacidad de funcionar como un agente quelante de la molécula antioxidante.

El A $\beta$  ha sido ampliamente estudiado debido a su asociación con placas neuríticas en cerebros con EA. Sin embargo, en condiciones no patológicas También se ha detectado la **existencia de A $\beta$ , lo que apoya los trabajos en los que han evaluado la función fisiológica del A $\beta$**  en el cerebro, en particular su papel en la plasticidad sináptica y la supervivencia neuronal. Los niveles fisiológicos de A $\beta$  son esenciales para la plasticidad sináptica en individuos normales. Teniendo en cuenta los efectos positivos o negativos de A $\beta$ , se propone que el péptido exhibe efectos duales: neurotróficos o neurotóxicos. Estos efectos se pueden atribuir a diferentes aspectos tales como su concentración relativa, el entorno celular y también se relaciona con la edad de los individuos (a **edad avanzada existen problemas de depuración del A $\beta$** ). Las concentraciones fisiológicas bajas de A $\beta$  podrían desempeñar un papel clave para la regulación de la plasticidad sináptica y mejorar las funciones cognitivas, mientras que la acumulación de **altas concentraciones de A $\beta$** , junto con los efectos de la edad, causa la desregulación y la pérdida de la función sináptica, como se muestra en la EA (Cardenas-Aguayo, 2014).

Las propiedades funcionales del A $\beta$  no se han aclarado por completo; Sin embargo, numerosos estudios han sugerido que el péptido posee propiedades neurotróficas (Chasseigneaux, 2012). Recientemente, se sugirió que A $\beta$  soluble juega un papel importante en la facilitación del crecimiento neuronal, la supervivencia celular, en la modulación de la función sináptica y la defensa contra el estrés oxidativo. Además, las concentraciones fisiológicas de A $\beta$  favorecen los procesos de aprendizaje y memoria. Además, se ha sugerido que los **monómeros de A $\beta$  40**, que es la especie más abundante en el cerebro **con respecto al A $\beta$  1-42**, podrían funcionar como una molécula antioxidante mediante la prevención de la muerte neuronal causada por el daño oxidativo inducido por metales (Cardenas-Aguayo, 2014).

Además, se sabe que las bajas concentraciones (picomolares) de una preparación que contiene **ambos monómeros y oligómeros de A $\beta$  42** causa un marcado incremento de los LTP del hipocampo, mientras que altas concentraciones (nanomolares) conducen a la reducción de la

potenciación. Los niveles picomolares de A $\beta$  42 también producen un aumento pronunciado de la memoria de referencia y de la memoria contextual al miedo (Salgado-Puga, 2015).



Figura 18. Papel patológico VS fisiológico del amiloide beta. Niveles altos de A $\beta$  generan neurotoxicidad, pérdida de sinapsis, lipoperoxidación y la homeostasis neuronal se ve afectada, mientras que a concentraciones bajas del orden de picomolar presenta propiedades neurotróficas, modula la plasticidad, es antioxidantes y regula la homeostasis neuronal.

#### 4.6.1. PLASTICIDAD SINÁPTICA

La plasticidad neuronal, también llamada neuroplasticidad, plasticidad neural o plasticidad sináptica, es la propiedad que emerge de la naturaleza y funcionamiento de las neuronas cuando éstas establecen comunicación, y que modula la percepción de los estímulos del medio, tanto los que entran como los que salen de la célula (Morris, 2003). Esta dinámica deja una huella al tiempo que modifica la eficacia de la transferencia de la información a nivel de los elementos más finos del sistema (Kandel, 2001). Toda célula posee propiedades electrolíticas, reguladas por iones comunes al ambiente y la zona de su localización dentro del sistema homeostático. La diferencia de potencial que aparece entre el medio y el interior celular se compensa por la precipitación de ciertas moléculas que se acoplan en la membrana plasmática. La interacción entre estas moléculas y la membrana tiene como efecto la emergencia de la propiedad denominada permeabilidad selectiva, creando una apertura llamada canal. Dependiendo de la molécula que se acople a ese receptor, junto con otras variables del medio, la célula recibirá un tipo de información concreta que le indicará el tipo de proteína a codificar. Este tipo de información se denomina señal de supervivencia. Sin estas señales, un programa genético sano codificará la información que provocará la muerte celular. Es el proceso en cuya virtud las neuronas, gracias a las propiedades intrínsecas a su membrana, se hallan capacitadas para sumar distintas entradas excitadoras e inhibitoras y elaborar una respuesta en función de ellas (Araque, 2001). Una sola neurona puede integrar entre 10.000 y 15.000

conexiones, todas procedentes de otras neuronas y/o células gliales. Si todo el cerebro cuenta con 100.000 millones de neuronas promedio, el promedio de sinapsis existente en un cerebro humano es de una simple regla de tres, cuyo número deja de tener significado en la escala humana. Un total de: 1.000 billones de sinapsis (100.000 millones de neuronas promedio por 10.000 conexiones). Según cuanto dure un impulso y cuanto se repita, en ciertos periodos de tiempo, las acciones combinadas de los primeros y segundos mensajeros tenderán a cambiar la estructura y facilidad de apertura de canales e inducirán (o no) cambios en el metabolismo y la estructura de la membrana celular. La proximidad entre dendritas y axones también depende de la frecuencia con la que la sinápsis se realice. Las sinapsis que forman las dendritas y los axones no tienen una programación genética predeterminada, de hecho, el nivel de expresión de un gen dado puede estar determinado por las particularidades de la experiencia (Cheung, 2002). La disposición genética predispone ciertas tendencias a la interconexión. Se puede decir que la genética nos predispone para adaptarnos a la dinámica determinista del medio (Ansermet, 2005).

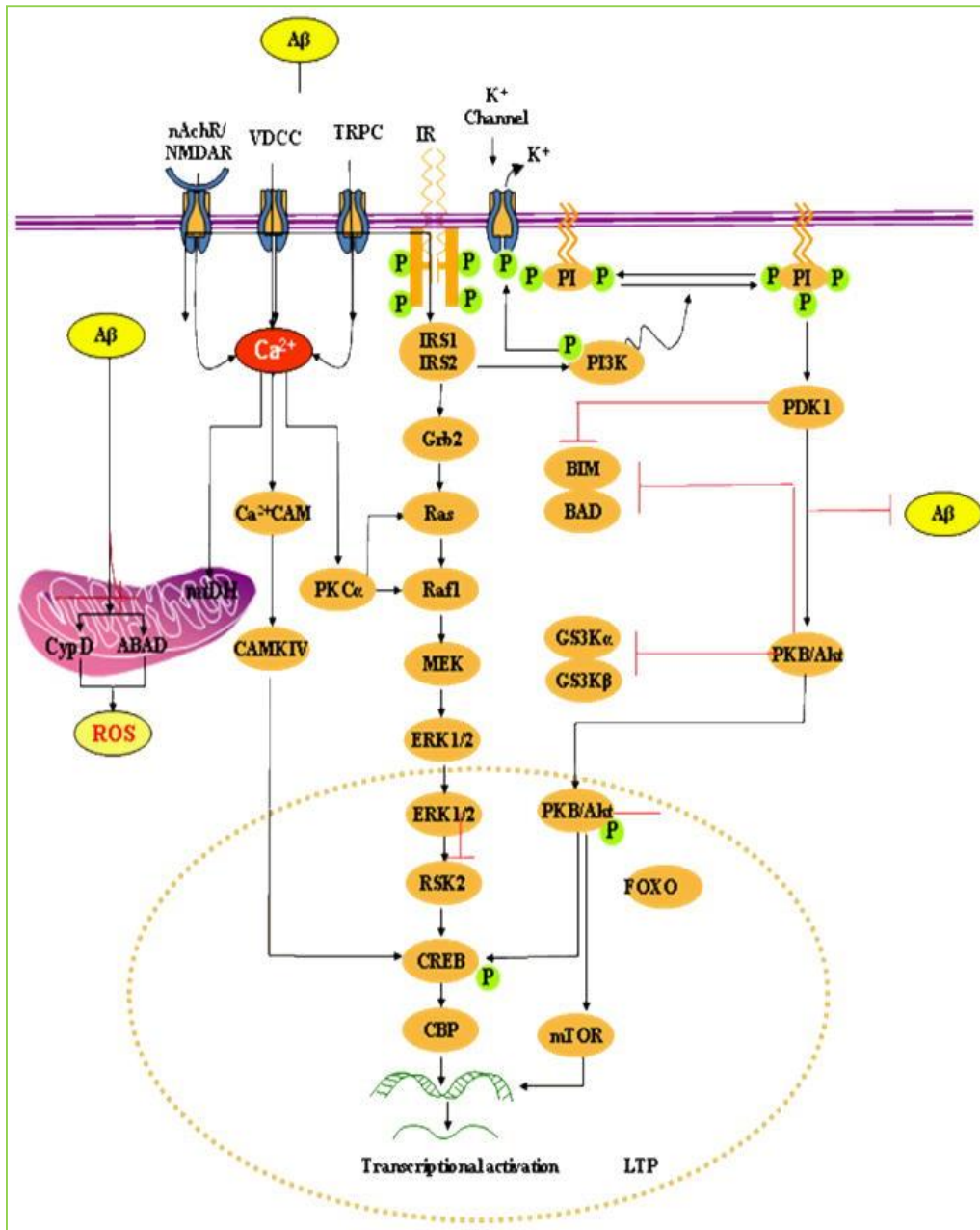
Durante la maduración del feto, las células nerviosas experimentan la misma dinámica plástica basada en la neurotransmisión primaria y secundaria ya descrita, no obstante, al ir madurando aquellas partes de la red que dependen de factores internos principalmente repetitivos (latidos del corazón, respiración, temperatura del cuerpo, etc.) estas redes establecen enlaces desde el feto, conectando los órganos según van estimulando la red nerviosa de la cual dependen, haciendo perdurable dicha conexión por estos ciclos.

Los potenciales sinápticos duran entre milisegundos y segundos (el tiempo suficiente para ejercer un efecto transitorio sobre la excitabilidad de las células postsinápticas) pero en realidad son efímeros. Si las sinapsis están comprometidas en los cambios de conductas a largo plazo relacionados con el aprendizaje y la memoria las neuronas deben demostrar modificaciones en la eficacia sináptica (plasticidad sináptica) que deben durar varios minutos, días o semanas. La eficacia sináptica suele reflejarse en un cambio en la amplitud del potencial postsináptico en respuesta a un potencial de acción presináptico. En muchas sinapsis, las amplitudes de los potenciales postsinápticos individuales no son constantes. La facilitación sináptica es un aumento de la amplitud de los potenciales postsinápticos en respuesta a impulsos presinápticos sucesivos. La disminución de la amplitud de los potenciales postsinápticos en respuesta a impulsos presinápticos sucesivos se denomina antifacilitación sináptica o depresión sináptica. Tanto la facilitación como la antifacilitación sinápticas se producen como resultado de cambios en la cantidad de neurotransmisor liberado por cada impulso presináptico.

#### 4.7. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DEL A $\beta$

Dos modelos han surgido para explicar el papel de A $\beta$  en el estado normal y patológico EA. De acuerdo con el modelo más popular, los oligómeros y los depósitos fibrilares A $\beta$  son responsables de la degeneración neuronal que implica una eventual interrupción de la función sináptica glutamatérgica que lleva a los déficits cognitivos característicos. El segundo modelo dicta

que  $A\beta$  normalmente puede servir como una señal de retroalimentación negativa que mantiene la actividad neuronal dentro de un rango dinámico normal. Estudios *In vivo* sobre animales de tipo silvestres (wt) y estudios *in vitro* con animales de tipo silvestre (wt) y knock-out demuestran que la **producción de  $A\beta$**  aumenta significativamente con el aumento de la comunicación entre las células del cerebro y este mayor nivel deprime sinapsis excitadoras y reduce la actividad neuronal.  $A\beta$  se propuso como un regulador de la función del canal de iones y como esenciales para la salud neuronal.  $A\beta$  se secreta de las neuronas en respuesta a la actividad sináptica y que, a su vez, regula la transmisión sináptica. Este bucle de realimentación negativa podría funcionar como un mecanismo homeostático fisiológico para limitar los niveles de actividad neuronal (Parihar, 2010).



**Figura 19. Modelo picomolar de señalización inducido por A $\beta$  a través de la vía Insulina-PI3K-Akt-ERK** además de señalización intracelular mediante la activación mitocondrial. El A $\beta$  Extracelular a una concentración picomolar se une al receptor de insulina (IR) y activa PKB/Akt mediante PDK-1. PKB/Akt se transloca en el núcleo y fosforila CREB. Por otro lado la activación de la cinasa de lípidos PI3K es crítica para la activación de la PKB por PDK. PDK1 fosforila el bucle de activación de un número de proteína serina/treonina quinasas de la superfamilia de la quinasa AGC, incluyendo la proteína quinasa B (PKB  $\alpha$ ; también llamado Akt1). Akt también puede mantener la integridad de la mitocondria por un mecanismo desconocido o por un mecanismo específico mediante la fosforilación de Bad, así mismo puede inhibir la apoptosis mediante la fosforilación e inactivación de la caspasa-9. ERK1/2 son activados por MAPKK río arriba, tales como MEK1/2, y MAPKKK, tales como c-Raf. MEK1/2 induce la activación de ERK1/2 a través de la doble fosforilación de los residuos de treonina y tirosina 202 y 204. La fosforilación de ERK conduce a la activación de un número de factores de transcripción, importantes en el control de la diferenciación, la supervivencia neuronal, aprendizaje y la plasticidad de memoria. Por ejemplo, ERK activa al factor de transcripción CREB involucrado en la supervivencia neuronal. **Picomolar extracelular A $\beta$  también se une nAChR, los receptores de glutamato (NMDAR) y Ca<sup>2+</sup> canales iónicos (por ejemplo, VDCCs, TRPC) y causa Ca<sup>2+</sup> afluencia a velocidades controladas en el citoplasma y mitocondrias. El aumento de las concentraciones de calcio citosólico inician la activación de varias cascadas de señalización de la quinasa dependiente incluyendo activación de la PKC conduce a la activación de CREB y la fosforilación en Ser133, un proceso crítico para la proteína de la plasticidad sináptica dependiente de síntesis y LTP. PKC- $\alpha$  también activa ERK mediante la interacción con Ras o Raf-1. Las mitocondrias son los objetivos fundamentales del A $\beta$  intracelular. A $\beta$  interactúa con CypD, un componente de proteína del poro de transición de permeabilidad de membrana (MPTP). La interacción de CypD con A $\beta$  causa la modificación funcional de esta proteína que conduce a la apertura de MPTP. A $\beta$  también se une con otra proteína mitocondrial denominada ABAD para distorsionar la estructura de la enzima inactivándola. Esto provoca un aumento de especies reactivas del oxígeno y el estrés oxidativo que conduce a la iniciación de la apoptosis (Parihar, 2010).**

#### 4.8. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE GSK3 EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Las dos características neuropatológicas clásicas de la enfermedad de Alzheimer son las marañas neurofibrilares, agregados filamentosos intraneuronales compuestos principalmente de tau hiperfosforilada, y las placas amiloides, que son depósitos extracelulares compuestas principalmente de A $\beta$ . GSK3 podría contribuir a la formación de ambas de estas lesiones neuropatológicas. Por ejemplo, la inhibición de GSK3 atenúa la neurotoxicidad inducida por A $\beta$ . Además, GSK3 promueve la producción de A $\beta$ , y, en un nuevo giro, se encontró que esto es causado solamente por GSK3 $\alpha$  y no GSK3 $\beta$ . Presenilina 1, una proteína que contribuye a la producción de A $\beta$ , está mutada en una forma de la enfermedad de Alzheimer familiar. Presenilina 1 se une y pueden regular tanto GSK3 y  $\beta$ -catenina, pero los resultados funcionales y los efectos de las mutaciones de la presenilina 1 siguen siendo poco claros. Estudios recientes han sugerido que en la enfermedad de Alzheimer familiar mutaciones de la presenilina-1 pueden comprometer la función neuronal mediante el aumento de la actividad de GSK3, además de su promoción de la apoptosis, por lo que estas interacciones proporcionan una fuerte evidencia de que GSK3 está íntimamente implicado en la disfunción neuronal asociada con la enfermedad de Alzheimer (Jope, 2004).

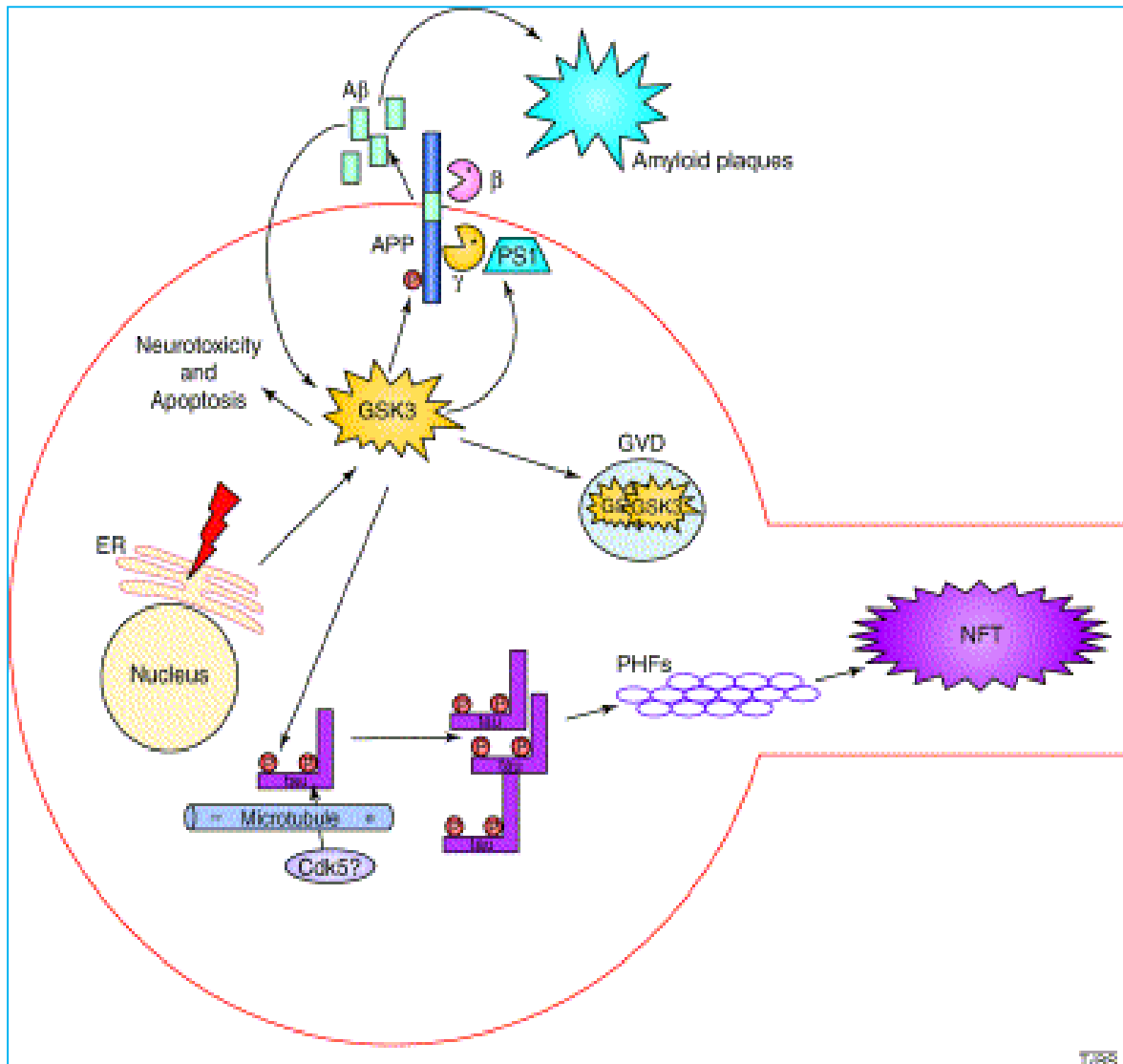


Figura 20. La glucógeno sintasa cinasa-3 (GSK3) se asocia con la neuropatología de la enfermedad de Alzheimer. Tau es un sustrato de GSK3 ampliamente reconocida, y GSK3 contribuye a la hiperfosforilación de tau asociada a la enfermedad de Alzheimer (posiblemente tras la fosforilación de tau por Cdk5). En modelos de Ratones transgénicos en los que aumentan la expresión de GSK3 se presenta aumento de la fosforilación de tau y los déficits en el aprendizaje espacial. GSK3 está muy involucrado en los Procesos Asociados a depósitos de A $\beta$ . El núcleo de las placas amiloides se compone de A $\beta$ , GSK3 facilita la producción de A $\beta$  (como se indica por la reducción de la producción de A $\beta$  por la inhibición de GSK3). Además, GSK3 fosforila también a APP, contribuyendo a la neurotoxicidad y la producción de A $\beta$ , que potencialmente puede influir en la producción de placas amiloides. Presenilina 1 (PS1), que es fundamental para el Procesamiento proteolítico de la proteína precursora de amiloide, se une directamente a GSK3. Esta asociación se ve alterada por mutaciones de presenilina 1 (PS1) que están asociados con la enfermedad de Alzheimer familiar, las mutaciones de GSK3 alteran la interacción de las quinesinas, dando lugar a alteración de transporte axonal. La evidencia existente considera que el retículo endoplásmico (ER) y la acumulación de proteínas mal plegadas contribuye a la neurotoxicidad evidente en la enfermedad de Alzheimer, y el estrés del Reticulo endoplásmico provoca la activación de GSK3 (Jope, 2004).



## 4.9. NEUROTROFINAS Y SUS PROPIEDADES

Las neurotrofinas, también llamadas factores neurotróficos, son una familia de proteínas que favorecen la supervivencia de las neuronas. Estas sustancias pertenecen a una familia de factores de crecimiento que son un tipo de proteínas que se vierten al torrente sanguíneo y son capaces de unirse a receptores de determinadas células para estimular su supervivencia, crecimiento o diferenciación. Factores descubiertos por Rita Levi-Montalcini (Turín, 22 de abril de 1909 - Roma, 30 de diciembre de 2012) Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1986 compartido con Stanley Cohen, su trabajo con Cohen sirvió para descubrir que las células sólo comienzan a reproducirse cuando reciben la orden de hacerlo, orden que es transmitida por las sustancias llamadas factores de crecimiento en donde se incluyen a los factores neurotróficos.

Los factores neurotróficos son secretados por determinados tejidos, siendo una de sus funciones impedir a las neuronas diana que inicien la muerte celular programada (apoptosis), permitiendo así que las neuronas sobrevivan. Las neurotrofinas también inducen la diferenciación celular de células progenitoras para formar neuronas (Hempstead, 2015).

La familia de las neurotrofinas está formada por el factor de crecimiento neural (NGF, del inglés, nerve growth factor), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, del inglés brain derived neurotrophic factor), la neurotrofina-1 (NT-1), la neurotrofina-3 (NT-3), y la neurotrofina-4 (NT-4). Pertenecen a una clase de factores de crecimiento, proteínas secretadas, que son capaces de enviar señales a algunas células para que sobrevivan, se diferencien, o crezcan. Los factores de crecimiento como las neurotrofinas que promueven la supervivencia, el desarrollo y la función de las neuronas se conocen como factores neurotróficos, que son capaces de señalar células para que sobrevivan, se diferencien o crezcan (Reichardt, 2006).

Aunque la gran mayoría de las neuronas en el cerebro de los mamíferos se forman antes de nacer, las partes del cerebro adulto (por ejemplo, el hipocampo) mantienen la capacidad de sintetizar nuevas neuronas a partir de células madre; un proceso llamado neurogénesis. Las neurotrofinas son sustancias químicas que ayudan a estimular y controlar la neurogénesis.

Algunos científicos emplean el término "neurotrofinas" como sinónimo de "factor neurotrófico", mientras que la mayoría reservan el término "neurotrofinas" para cuatro factores relacionados estructuralmente: el factor de crecimiento neural (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), las neurotrofinas-3 (NT-3), y las neurotrofinas-4 (NT-4). Otro factor neurotrófico, conocido como nueva neurotrofina-1 (NNT1) está estructuralmente relacionada con el NGF, el BDNF, las NT-3 y las NT-4. Se conocen dos clases de receptores de neurotrofinas: el p75 (Receptor de Baja Afinidad para las neurotrofinas) y receptores "TRK" de la familia de receptores tirosina cinasa.

#### 4.9.1.FACTOR DE CRECIMIENTO NEURAL

El factor de crecimiento neural (NGF), el factor de crecimiento del prototipo, es una proteína secretada por las células diana de una neurona. El NGF es crítico para la supervivencia y el mantenimiento de las neuronas simpáticas y sensoriales. El NGF se libera de las células diana, se une y activa su receptor de alta afinidad TrkA en la neurona, y se internaliza en la neurona sensible. El complejo NGF/TrkA posteriormente se transporta de nuevo al cuerpo celular de la neurona. Este movimiento del NGF de la punta del axón al soma se cree que participa en la larga distancia de señalización de las neuronas. Los niveles de NGF han demostrado ser significativamente elevados durante el primer año de una relación romántica (Arévalo, 2006).

#### 4.9.2.FACTOR NEUROTRÓFICO DERIVADO DEL CEREBRO

El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) es un factor neurotrófico que inicialmente se encontró en el cerebro, pero también se encuentra en la periferia. Más concretamente, es una proteína que tiene la actividad en ciertas neuronas del sistema nervioso central y el sistema nervioso periférico, ayuda a la supervivencia de las neuronas existentes, y potenciar el crecimiento y la diferenciación de nuevas neuronas y la sinapsis a través de axones y dendritas de germinación. El BDNF es el segundo factor neurotrófico que se caracterizó, después del NGF y antes de la neurotrofina-3. El BDNF es una de las sustancias más activas para estimular la neurogénesis. Los ratones que nacen sin la capacidad de sintetizar BDNF sufren defectos en el desarrollo del cerebro y del sistema nervioso sensorial, y suelen morir poco después del nacimiento, lo que sugiere que el BDNF juega un papel importante en el desarrollo neurológico normal. A pesar de su nombre, el BDNF se encuentra realmente en una amplia gama de tejidos y tipos de células, no sólo el cerebro. Su expresión puede ser vista en la retina, el SNC, las neuronas motoras, los riñones y la próstata (Arévalo, 2006).

#### 4.9.3.NEUROTROFINA-3

La neurotrofina-3, o NT-3, es un factor neurotrófico de la familia de las neurotrofinas NGF. Es un factor de crecimiento que tiene la actividad en ciertas neuronas del sistema nervioso periférico y central, que ayuda a la supervivencia y la diferenciación de las neuronas existentes, y potenciar el crecimiento y la diferenciación de nuevas neuronas y la sinapsis. La NT-3 fue el tercer factor neurotrófico que se caracterizó, después del NGF y del BDNF. La NT-3 es único entre las neurotrofinas que potencialmente pueden estimular un gran número de neuronas, dada su capacidad de activar dos de los receptores de neurotrofinas tirosina quinasa (TrkC y TrkB). Los ratones nacidos sin la capacidad de sintetizar NT-3 tienen pérdida de la propiocepción y de subconjuntos de neuronas sensoriales mecanorreceptoras (Arévalo, 2006).

#### 4.9.4.NEUROTROFINA-4

Neurotrofina-4 (NT-4) es un factor neurotrófico que señala preferentemente a través del receptor de la tirosina quinasa TrkB. También es conocido como NT4, NT5, NTF4, y NT-4/5.

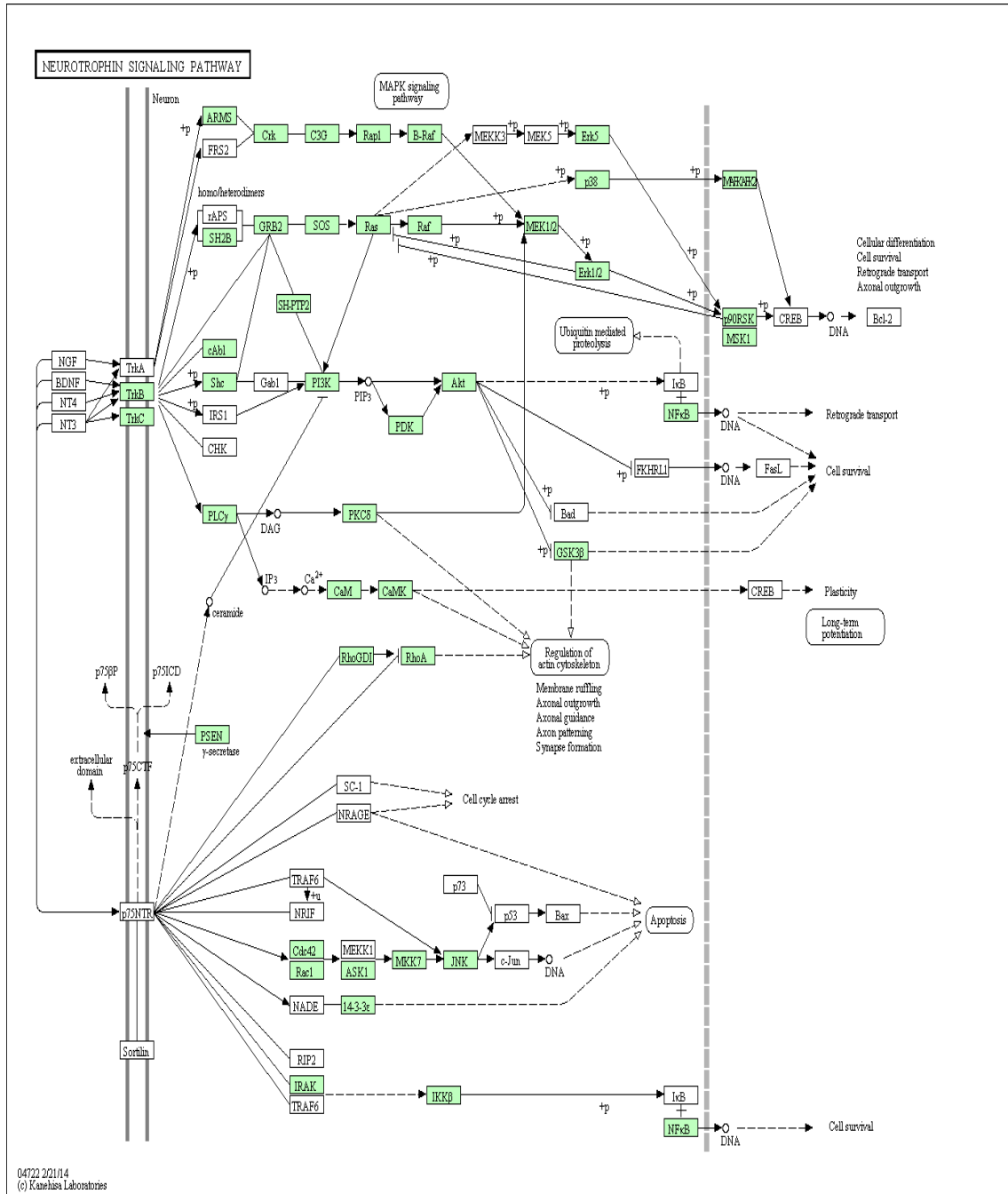


Figura 21. Vía de señalización de las neurotrofinas. Las neurotrofinas son una familia de factores tróficos implicados en la diferenciación y supervivencia de las células neuronales. La familia de las neurotrofinas consta del factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la neurotrofina 3 (NT-3), y neurotrofina 4 (NT-4). Las neurotrofinas ejercen sus funciones a través de la participación de los receptores de tirosina cinasa Trk o receptor de neurotrofina p75 (p75). La señalización de las neurotrofinas/TRK se regula mediante la conexión de una variedad de cascadas de señalización intracelulares, que incluyen la vía MAPK, PI-3 cinasa, y la vía PLC, la transmisión de señales positivas como la supervivencia y la proliferación. Por otro lado, p75NTR transmite dos señales una positiva y otra negativa. Estas señales tienen un papel importante para el desarrollo neural y las actividades de orden superior, como el aprendizaje y la memoria, así como la apoptosis (david database pathway).

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1. RESUSPENSIÓN Y MONOMERIZACIÓN DE PÉPTIDO **SINTÉTICO DE A $\beta$** POR HFIP (1, 1, 1, 3, 3, 3-hexafluoro-2-propanol) Y ALMACENAMIENTO DEL PÉPTIDO (Protocolo de Klein)

El péptido **A $\beta$**  sólido (1-40 y 1-42) se almacena a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Colocar en hielo cuando se vayan a preparar los monómeros **de A $\beta$** . En la campana de extracción, colocar el 1, 1, 1, 3, 3, 3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) en hielo y permitir que se enfríe. EL HFIP es altamente corrosivo y muy volátil. **Agregar suficiente HFIP al A $\beta$**  sólido para que la concentración final sea 1 mM, enjuagar perfectamente el vial. Con el volumen de HFIP enjuagar perfectamente el tapón del vial del péptido para evitar perder material. Dar vortex para homogenizar y enjuagar las paredes del vial. Incubar a temperatura ambiente por 60 minutos manteniendo el vial cerrado, la solución debe ser clara e incolora. Cualquier matiz amarillento o turbio indica poca calidad del péptido y no debe usarse. **Colocar la solución A $\beta$ -HFIP** en hielo por 5-10 minutos. Alícuotar la solución en tubos de centrifuga no siliconados. No cerrar los tubos. Permitir que se evapore el HFIP toda la noche a temperatura ambiente. (Esto se hace en la campana de extracción). Transferir los tubos al SpeedVac y secar por 10 minutos, todo el HFIP debe ser removido. El péptido debe verse como una película clara y delgada en el **fondo del tubo (Monómeros de A $\beta$ )**. No debe verse blanco o amarillo. Almacenar el péptido seco a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Esto debe mantenerse estable por varios meses (Klein, 2005).

### 5.2. PREPARACIÓN DE LOS OLIGÓMEROS DE **A $\beta$**

El péptido almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  colocarlo en hielo. Realizar un stock de **A $\beta$**  5 mM en DMSO 100% añadiendo 22.22  $\mu\text{l}$  de DMSO Anhídrido fresco a 0.5 mg del péptido. Pipetear vigorosamente lavando toda la pared del tubo para asegurar la resuspensión completa del péptido la solución debe ser clara e incolora. Diluir el stock 5 mM del péptido con DMSO en PBS estéril. Para un mejor rendimiento, la solución de oligómeros no debe ser mayor de 100  $\mu\text{M}$ . Incubar a  $4^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Posteriormente a la incubación, centrifugar a 14000 g por 10 minutos en frío ( $4^{\circ}\text{C}$ ). Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo, el sobrenadante contiene los oligómeros. Dar vortex para homogenizar la muestra, alícuotar y guardar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 5.3. CULTIVO CELULAR DE HIP-009 (Células precursoras de hipocampo humano)

Preparar cajas T25 con laminina (Sigma L-2020 1 mg/ml) a una concentración final de 10  $\mu\text{g/ml}$  en GBS (glucose buffer saline), filtrar por membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  con jeringa. Incubar mínimo

2 horas a 37 °C y si no se usa hay que guardar a -20 °C. (No hay problema si la laminina se queda hasta 24 horas a 37 °C antes de usarla o congelarla). Sacar el tubo de células del nitrógeno líquido, descongelar a 37 °C en baño de agua procurando que este procedimiento no sea gradual para no matar un mayor número de células sino de forma inmediata sosteniéndolo con una sanita de la tapa para no contaminar. Posterior en tubo falcon agregar 3 ml de medio de crecimiento y añadir el mililitro de células suspendidas suspender con la micropipeta de manera suave sin generar burbujas, posterior centrifugar a 1000 rpm a temperatura ambiente. Absorber el líquido con la pipeta Pasteur y resuspender la pastilla con micropipeta en el medio de crecimiento sin los factores de crecimiento, transferir el volumen a la caja T-25 previamente con laminina, posterior agregar los factores de crecimiento. Distribuir todo el volumen de la solución de la caja T-25 a lo largo de esta de forma horizontal procurando que tenga contacto con toda la superficie inferior.

Para realizar el pase de estas células, absorber el medio de cultivo con pipeta Pasteur estéril conectada al vacío, agregar la tripsina 0.05 % 2 ml para cada caja de T25 e incubar a 37 °C por 3 min, inactivar la tripsina con el inhibidor de Tripsina de frijol de Soya con un volumen igual (2ml). Transferir a falcon de 15 ml y centrifugar a 1000 rpm 4 min a temperatura ambiente. Absorber el líquido con la pipeta Pasteur y resuspender la pastilla con micropipeta en el medio de crecimiento sin los factores de crecimiento, y transferir en el volumen adecuado a la caja T-25 y agregar los factores de crecimiento (se emplean 5 ml de medio suplementado para un T-25). Para los pases hacer dilución 1:3, mínimo sembrar 500 000 – a 1 millón de células por caja T25.

Para congelar, después del centrifugado similar al de la técnica de pase en vez de resuspender con medio de crecimiento utilizar el medio de congelación Phoenix-Songs Biol., ó 8% de DMSO en medio de crecimiento directamente para resuspender la pastilla. Transferir las células al criovial y dejar a -80 °C envuelto en papel y aluminio, mínimo una noche y pasar a nitrógeno líquido.

Para los experimentos de viabilidad celular se emplearon cultivos en Plato de 96 pozos usando 100 µl de medio por pozo, para los experimentos de evaluación del efecto de los péptidos Amiloide beta usar Medio definido sin factores de crecimiento, para los experimentos sembrar en medio de crecimiento las células por 2 días previos a los tratamientos y lavar 2 veces en Medio D-MEM/F-12 a 37 °C y agregar el medio definido y los tratamientos. El tiempo de duplicación es de 72 horas para estas células.

Medio de crecimiento:

Para 500 ml:

- Neurobasal 500 ml (Invitrogen)
- B-27 50x 10 ml (Invitrogen)
- 1.250 ml Glutamax (Invitrogen)
- 5 ml Solución Antibiótico, Antimicótico (AAS 100x) (Cellgro, Corning)

- 100  $\mu$ l de Glucosa al 50% (SIGMA)
- Filtrar por 0.22  $\mu$ m con unidad de filtración desechable
- Alicuotar en tubo falcon estéril de 50 ml y almacenar a 4 °C
- Suplementar con los factores de crecimiento:
  - EGF 20 ng/ml (Stock 1 ng/ $\mu$ l) (Preprotech)
  - bFGF 20 ng/ml (Stock 1 ng/ $\mu$ l) (Preprotech)
  - LIF 10 Unidades/ml (Stock 10 U/ $\mu$ l) (usar 1  $\mu$ l por ml de medio) (Roche)

#### 5.4. VIABILIDAD CELULAR

A una placa de 96 pozos con cultivo de células hHIPP tomar del medio 50  $\mu$ l de cada pozo y transferir a una nueva placa de 96 pozos rotular con la fecha y el nombre de células muertas, colocar parafilm a la placa y guardar a -4 °C para su posterior uso. De forma inmediata a la placa de 96 pozos con células cultivadas retirar todo el medio de cada uno de los pozos, realizar 2 lavados con D-MEN/F12 con 100  $\mu$ l cada pozo, en el segundo lavado no retirar el medio de estos para agregar el buffer de lisis 10  $\mu$ l por pozo, dejar de incubar 1 hora en incubadora a 37 °C con 5% de  $CO_2$ . En el transcurso de la hora alicuotar la solución de paro (10 ml para las 2 placas de trabajo), preparar el sustrato resuspendiéndolo con 12.5 ml de solución de buffer. Pasando el tiempo de incubación de la placa con células, rotular una nueva placa de 96 pozos con la fecha y el nombre de células vivas y con el tipo de células la que corresponden, transferir 50  $\mu$ l de la placa con células lisadas a la nueva placa rotulada pozo por pozo. Posteriormente añadir 50  $\mu$ l de sustrato resuspendido a cada pocillo de ambas placas, posteriormente incubar por 30 minutos protegido de la luz y con agitación a temperatura ambiente. Pasado el tiempo añadir 50 ml de la solución de paso a cada pocillo y leer la absorbancia a 490 nm. En la placa de células vivas el número de células presentes corresponderá directamente a la absorbancia, contrario a la placa de células muertas donde la absorbancia corresponderá al número de células muertas.

#### 5.5. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

Extracción del medio de cultivo de las células hHIPP con vacío, lavar la placa 1 vez con GBS (Buffer de Glucosa Salino) frío (a 4 °C) o PBS 1X (Solución Bufferada de Fosfatos) a pH de 7.4. Añadir RIPA 1X frío directamente a la placa (para una placa de 6 pozos, añadir 100-150  $\mu$ l por pozo, para una T-25 usar 200  $\mu$ l. Incubar 5 minutos en hielo, agitar manualmente la placa para desprender completamente la monocapa, recuperar de la placa el Buffer RIPA con la muestra de Proteínas usando una micropipeta de 1 mL transferir a un tubo de 1.5 ml. Congelar a -20 °C por una noche. Al siguiente día descongelar la muestra y resuspendirla con la micropipeta de 1 ml (5 veces), y centrifugar a 14000 rpm por 10 min a 4 °C en la microcentrifuga. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio. Tomar de 1 a 3  $\mu$ l para realizar el ensayo de proteína (BCA).

## 5.6. ENSAYO DE CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA (BCA-PIERCE)

Generar la siguiente curva de cuantificación en una placa de 96 pozos la curva se hace por cuadruplicado, mientras que la cuantificación de la muestra se hace por triplicado.

Stock [BSA] PIERCE $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	BSA $\mu\text{g}$	BSA $\mu\text{l}$	$\mu\text{l}$ H <sub>2</sub> O Milli Q estéril	$\mu\text{l}$ de RIPA 1x
2	0	0	17	3
2	1	0.5	16.5	3
2	2.5	1.25	15.75	3
2	5	2.5	14.5	3
2	10	5	12	3
2	25	12.5	4.5	3
2	50	25	0	3
-	Añadir de nuestra muestra (3 $\mu\text{l}$ )	0	17	0

Añadir 3  $\mu\text{l}$  de la muestra de homogenizado de células hHipp, añadir 200  $\mu\text{l}$  de solución BCA (25 ml de reactivo A + 0.5 ml de reactivo B, estableciendo una relación 50:1), incubar 1 hora a 37 °C, preferentemente en cámara húmeda y agitación. Leer a 563 nm, en luz visible una vez cuantificada la proteína, hacer la dilución apropiada (por ejemplo 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) en Buffer de carga 1X (1M Tris pH 6.8, SDS 4%, Glicerol, Azul de Bromofenol, B-Mercaptoetanol y Agua Milli Q Estéril).

## 5.7. WESTERN BLOT

Correr de 3 a 10  $\mu\text{g}$  de proteína del extracto total de células lisadas hHipp o en su caso Amiloide Beta en un gel tris glicina, 100 volts voltaje constante por 30 minutos y 1 hora 25 minutos por 115 volts para una buena separación y migración. Transferir a membrana de nitrocelulosa, el buffer de transferencia (25 mM Tris, 192 mM de glicina y 20% de metanol a pH 8.4). Correr la transferencia a 500 mA (corriente constante) por 1 hora 30 minutos. Para el amiloide beta solo correr 45 minutos a 500 mA porque son fragmentos de 3.5-4 kDa y si están trabajando con proteínas cerca de los 200-250 kDa entonces transferir por 3 horas a 500 mA. El protocolo estándar de transferencia es toda la noche a 100 mA corriente constante por 6-8 horas. Después de la transferencia, dejar que la membrana seque a temperatura ambiente, y con un lápiz de número 2HB escribir la información

experimental de cada membrana. Teñir la membrana con solución de Rojo de Ponceau (SIGMA P7170-1L) durante 1 minuto, extraer y recuperar la solución de Ponceau, posteriormente enjuagar la membrana con agua Milli-Q doble destilada, hasta que las bandas son visibles y hay menos fondo para confirmar la transferencia de proteínas. Analiza las membranas para obtener las imágenes como una evaluación de la calidad y una estimación de la cantidad de las muestras.

Lavar 2 veces con TBST para retirar el rojo de Ponceau, bloquear 1 hora y 30 minutos a temperatura ambiente en agitación con 5% de leche en polvo sin grasa (BIO-RAD 170-6404) en TBST, retirar la leche de bloqueo y añadir el anticuerpo primario (preparar una dilución estándar 1:1000) diluyendo en 5% de leche en TBST con 0.02% de Azida de sodio. Colocar en agitación por 2 horas en cuarto a temperatura de 4 °C o toda la noche. (El anticuerpo primario puede ser reutilizado si es almacenado a 4 °C con Azida de sodio 0.02%).

Lavar la membrana en TBST 3 veces por 10 minutos, añadir el anticuerpo secundario que corresponda al anticuerpo primario de acuerdo a especie y a isotipo. Ejemplo si usaste un anticuerpo primario ratón usar un cabra anti ratón conjugado IgG HRP en una dilución 1:5000 a 1:10000 (Jackson Immunoresearch 115-035-146). Para la dilución del anticuerpo secundario estos pueden ser diluidos en TBST sin leche y sin Azida de sodio porque esta última inhibe la reacción de la peroxidasa para la reacción de quimioluminiscencia.

Posterior incubar el anticuerpo secundario por 1 hora a temperatura ambiente y no más de tres horas porque se genera fondo inespecífico. Lavar la membrana en TBST 3 veces por 10 minutos. Revelar usando ECL (PIERCE o Inmobilon of Millipore) empleando el sistema ChemiDoc (BIORAD) exponer según la proteína de interés y almacenar la información de cada fotografía obtenida. Posterior realizar el análisis densitométrico de cada fotografía con el software Image Lab versión 5.2.1.

## 5.8. INMUNOCITOFUORESCENCIA

Cultivar las células en cubreobjetos de vidrio (pre-tratados con 20 a 100 µg/ml de poli-D-Lys al menos 1h o una noche a temperatura ambiente (TA)). Después del tratamiento con poli-D-Lys, es necesario lavar dos veces con agua destilada estéril. Si los cubreobjetos tratados con poli-D-Lys no van a utilizarse inmediatamente, deben almacenarse a 4 °C). Fijar las células en 4% PFH (en PBS 1x a pH 7,4 para líneas celulares o en una solución salina con glucosa para las células precursoras neuronales (NPCs)). Retirar con cuidado el medio y añadir el PHF a 4% al plato, y se incuba durante 20 minutos a temperatura ambiente. Lavar el plato dos veces con solución salina glucosada o PBS. Dejar el último lavado en el plato. Guardar en el refrigerador a 4 °C protegido de la luz hasta utilizarlo. Permeabilizar las células con PBS 1x pH 7,4 con 0.2% de Triton (200 µl de Triton X-100 en 100 ml de PBS 1x a pH 7,4), ya sea para líneas celulares o NPCCS) por 30 min a TA. Bloquear con BSA (Fracción V IgG libre SIGMA A2058) 10 mg/ml en PBS 1x pH 7,4 y 0.2% de Triton durante 1 hora a TA. Retirar la solución de bloqueo, sin enjuague, y luego añadir el anticuerpo primario a la



concentración apropiada diluida en PBS 1x pH 7,4 y 0,2% de Tritón. Incubar toda la noche hasta la siguiente mañana el anticuerpo primario a 4 °C. Lavar 3 veces por 10 min con PBS 1x pH 7,4 y 0,2% de Triton. Añadir el anticuerpo secundario a la dilución apropiada e incubar a TA en la oscuridad durante 1 h. Lavar nuevamente 3 veces por 10 min con PBS 1x pH 7,4 y 0,2% de Triton. Posterior teñir con DAPI a una concentración final de 10 µg/ml para 10 min a temperatura ambiente. (La solución principal de DAPI debe ser 1 mg/ml en Agua Milli Q. Y la dilución final de 10 µg/ml, y debe realizarse en fresco). Lavar 2 veces con PBS 1x pH 7,4 sin Triton. Montar el cubreobjetos hacia abajo sobre un portaobjetos, usando medio de montaje Fluorogel o Vectashield. En caso de utilizar Fluorogel, no es necesario sellarlos con esmalte de uñas, sólo se emplea con Vectashield, ya que este medio de montaje es líquido. Espere 1h a TA protegido de la luz. Mantener los portaobjetos a -20 °C protegido de la luz, de esta manera la fluorescencia puede ser estable durante un máximo de 5 años.

## 5.9. MICROSCOPIA CONFOCAL

Las laminillas teñidas con anticuerpos fluoresceïnados se montan en la platina del microscopio confocal (Leica TCS SP8) posterior ajustar los parámetros de los espectros de excitación de cada fluorocromo y sus rangos de emisión, así como el número de cortes en Z, la intensidad y el fondo de fluorescencia, finalmente suavizar las imágenes promediando el número de pixeles de cada fluorocromo mediante el software Leica Application Suite X Versión 2.0.

## 5.10. MICROCOPIA DE FUERZA ATÓMICA

Los oligómeros de amiloide beta se agregan a soluciones de medio de crecimiento Neurobasal completo, ITS 0.001% y PBS 1X se dejan incubar durante los periodos de tratamiento similares a las células pasado el tiempo son resuspendido con micropipeta y goteados en cubreobjetos circulares de plástico dejándolos secar y cuidando de no formar cristales, posterior se analizan con un microscopio de fuerza atómica JSPM-5200, los datos obtenidos son analizados con el software SPIP 6.3.4 para ver el tamaño y tipo de partícula, el equipo utilizado se encuentra en los laboratorios LaNSE del CINVESTAV.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. CARACTERIZACIÓN IMUNOCITOQUÍMICA DE LAS CÉLULAS hHIP-009

Las células HIP-009 son crecidas de manera normal en medio de crecimiento compuesto por Neurobasal + B27 + EGF + bFGF en el que presentan una proliferación normal y morfología típica de precursora neural (Figura 22) soma central con prolongaciones bipolares y formas estrelladas. Para verificar que las células HIP-009 tuvieran las mismas características en medio de crecimiento Normal y el medio definido ITS 0.001 %, las células HIP-009 fueron examinadas con marcadores de células precursoras neurales de hipocampo y de inmunoproliferación. En ambos medios de crecimiento la mayoría de las células fueron positivas para el marcador de precursora neural como Nestina, así como para el marcador de proliferación Ki67 (Figura 24). Así mismo se evaluó el compromiso de diferenciación de las células HIP-009 mediante marcadores neuronales y de glía. En ambos medios de crecimiento tanto en el Neurobasal + B27 + EGF + bFGF y el medio de crecimiento definido ITS 0.001% existe compromiso neuronal por la expresión positiva del marcador BIII Tubulina de formar mayoritaria y también del marcador de astrocitos GFAP en menor proporción (Figura 23).

### 6.2. VIABILIDAD CELULAR DE LAS hHIP-009 EN DIFERENTES MEDIOS DE CRECIMIENTO

El ensayo LDH se utilizó para cuantificar la viabilidad relativa de las precursoras neurales hipocampales de humano después del tratamiento a tiempo largos con peróxido de hidrogeno en los diferentes medios de cultivo. El medio de proliferación normal para las células hipocampales de humano es un medio conformado por Neurobasal, B27, Factor de Crecimiento básico de fibroblastos (bFGF) y Factor de Crecimiento Epidermal (EGF), otro medio utilizado ampliamente para mantener células precursoras neurales es el medio definido ITS (Insulina-Transferrina-Selenio). Cuando se compararon los dos componentes tanto del medio de crecimiento normal de proliferación completo con respecto al medio definido se encontró que el constituyente principal que los diferencia es la Insulina-Selenio-Transferrina. La insulina y Transferrina se sabe que son los suplementos necesarios para la supervivencia de las células neuronales cultivadas, y se encontraba contenida en ambos medios en el medio completo como parte del B27 mientras que en el medio definido en el componente ITS. Por lo tanto, un tratamiento de 24 horas con peróxido de hidrogeno no disminuyó la viabilidad de las células precursoras neurales de hipocampo en el medio completo con todos los factores (Neurobasal B27, bFGF, EGF), que fue de aproximadamente un 80% sino hasta concentraciones exacerbadas de peróxido de 200 uM, conforme se eliminaban componentes del medio como los factores y el B27 la viabilidad se disminuía, mismo evento se observa en las células que fueron tratadas con el medio definido con concentraciones altas de ITS y conforme disminuye la concentración del ITS la viabilidad de las células precursoras hipocampales disminuye (Figura 25).

Por lo que en el medio completo (Neurobasal + b27 + bFGF + EGF) y el ITS la concentración de insulina juega un papel importante al mejorar la viabilidad celular. Y, en consecuencia, al variar la concentración se observa muerte celular en las hHIPP-009 cultivadas en ITS con porcentajes depletados y con la eliminación del B27 en el medio de Neurobasal.

### 6.3. CARACTERIZACIÓN DE OLIGÓMEROS DE A $\beta$ MEDIANTE AFM Y WESTERN BLOT

De acuerdo con la hipótesis de la cascada amiloide, la deposición de A $\beta$  1-42 en placas difusas es un paso inicial que puede estar asociada con la patogénesis de la EA. En este estudio, a 0, 12, 24 Y 48 horas **se preincubaron oligómeros de A $\beta$  1-42** los cuales se inmovilizaron sobre una superficie sólida, para imitar el proceso de agregación de A $\beta$  1-42 a través del tiempo. Los **oligómeros de A $\beta$  1-42** fueron producidos por la **incubación de monómeros A $\beta$  1-42** en los medios de crecimiento celular y en el medio de preparación oligomérico para confirmar la presencia de oligómeros productos de la preparación y el proceso de cinética de agregación en los distintos medios (Neurobasal Completo, Medio definido ITS 0.001% y DMSO). Un análisis de Fuerza Atómica a las 0, horas tomadas del stock de preparación de oligómeros preparado con DMSO y HFIP muestra la presencia de oligómeros A $\beta$  1-42 con 19.51 nM de altura (Figura 26). La evolución temporal de crecimiento de amiloide beta 1-42 en los 2 tipos de cultivo celular para neuronas se observó visualmente con AFM. En el medio de crecimiento de Neurobasal completo a 0, 24 y 48 h se muestra **la presencia de oligómeros de A $\beta$  1-42** que con el tiempo mantiene dichas estructuras, así mismo se puede observar la formación de estructuras hexaméricas que corresponden a formaciones oligoméricas (Figura 27). Según el análisis de distribución de la altura, el espesor de la mayoría de **los oligómeros de A $\beta$  1-42** estaba en el intervalo de ~ 11-30 nM (Figura 27, 28 y 29). En el medio definido con ITS 0.001% la incubación de oligómeros de Amiloide Beta 1-42 a los tiempos de 24 y 48 horas muestra que este medio no es un precursor de la formación de agregados alto peso molecular (fibras) puesto se **conservan como oligómeros de A $\beta$**  y no se observan la presencia de estructuras protofibrilares, ni fibrilares, estructuras que oscilan en un intervalo de 2-100 nM. (figura 30 y 31).

El estudio de la cinética de oligomerización mediante Western Blot de SDS-PAGE muestra **las formas que adopta el A $\beta$  1-40 y 1-42** en distintos medios de incubación como el Neurobasal Completo, Neurobasal + B27, Neurobasal, Medio definido con ITS 1%, Medio definido con ITS 0.001%, Medio definido sin ITS, Agua y PBS, se incubaron durante 0, 24, 48 y 72 horas, a partir de un proceso electroforético para **separar las formas que adoptó el A $\beta$**  en un gel bis-acrilamida-tris al 15%, y se sondearon con el anticuerpo monoclonal 4G8 (que reconoce los residuos 17-24 del A $\beta$ ). Se prepararon oligómeros basados en las preparaciones de Klein *et. al* para el A $\beta$  1-40 y 1-42. Las muestras se visualizaron por medio de quimioluminiscencia. Las figuras 32, 33 y 34 muestran que **los oligómeros preparados de A $\beta$  1-40** e incubados en los medios de crecimiento no presentan procesos de agregación para ninguno de los medios mencionados aun cuando transcurre el tiempo desde 0, 24 y 48 horas solo se observan formas monoméricas que presentan peso

molecular de 3.5 KDa y formas oligoméricas que tienen peso molecular de 7.5 KDa, mientras que 72 horas (Figura 35) se observa la presencia de bandas de alto peso molecular que corresponde a agregados moleculares fibrilares de gran tamaño con peso molecular por arriba de los 50 KDa. Mientras que **la cinética de agregación de A $\beta$  1-42** muestra que a 0 Hrs las formas oligoméricas generadas por protocolo de Klein generan al contacto con los distintos medios solo formas monoméricas (Figura 36) y al transcurrir 24 Horas (Figura 37) ya existe la presencia de formas fibrilares y se mantienen al tiempo de 48 Horas (Figura 38), y a las 72 horas (Figura 39) donde desaparece el componente monomérico de 3.5 KDa así como las formas oligoméricas esto muestra **que el A $\beta$  1-42 es más agregativo con respecto al 1-40** lo que ocasiona que no ingrese al gel de corrimiento por la formación de estructuras de alto peso molecular pero los estudios de Fuerza Atómica demuestran que existe la presencia de formas oligoméricas a los tiempos de 24 y 48 horas **para el A $\beta$  1-42**.

#### 6.4. EFECTO DEL AMILOIDE BETA EN LA VIABILIDAD CELULAR

El efecto fisiológico del **péptido A $\beta$**  depende de su estado de agregación. Para probar el efecto de los **oligómeros del A $\beta$**  en la viabilidad celular, las células hHIPP-009 fueron tratadas con concentraciones **crecientes de oligómeros de A $\beta$  1-40 y 1-42** que van de los 0.5, 1, 5, 10 y 30  $\mu$ M a tiempos de 24, 48 72 y 96. Los oligómeros de **A $\beta$  1-40** presentan efecto a 24 horas a una concentración alta de 30  $\mu$ M con respecto al control de sobrevivencia en el que se presenta un proceso negativo al disminuir el número de células viables (Figura 40) posterior a dicho tiempo a 48, 72 y 96 horas no se observa efecto por parte de los **oligómeros de A $\beta$  1-40** (Figuras 41, 42, 43). Por otro lado no hay efecto por parte de los oligómeros de amiloide beta 1-42 a 24 horas (Figura 44), la modulación positiva en la viabilidad se presenta a partir de las 48 horas a una concentración de 5  $\mu$ M respecto del control de sobrevivencia (Figura 45) y este es sostenido hasta las 96 horas, durante las 48 horas el efecto de los 5  $\mu$ M se ve igualado por las concentraciones de 0, 1, 5 y 10  $\mu$ M (Figura 46), a las 96 horas el efecto de los oligómeros 1-42 con respecto a la sobrevivencia es mantenido por las concentraciones bajas de **0.5 y 1  $\mu$ M de A $\beta$  1-42** (Figura 47) mostrando que la forma menos **predominante del A $\beta$  1-42** afecta la viabilidad de las células hipocampales con respecto al control de sobrevivencia celular (Neurobasal + B27) de manera positiva el numero viable de células. El amiloide beta 42-1 reverso no presento efecto alguno en la viabilidad celular a las 48 Hrs la cual representa una forma oligomérica no existen en los cerebros humanos (Figura 48). Los gráficos representan la media  $\pm$  SEM de ocho diferentes experimentos para cada condición de tiempo 0, 24, 48 y 92 horas realizados por cuadruplicado. ANOVA seguido de Bonferroni post-test; \* p <0,05.

#### 6.5. TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES POR EL **A $\beta$ 1-42**

Para investigar los procesos moleculares involucrados por el cual los oligómeros de amiloide beta promueven mecanismos fisiológicos de tipo neurotrófico se decidió evaluar en las células precursoras de hipocampo humano el efecto del BDNF como control de activación de la vía de las

neurotrofinas a través del receptor TrkB durante una cinética de activación creciente de concentración en comparación con células tratadas con medio control. Los resultados (Figura 49) muestran que el BDNF induce la activación de los receptores TrkB (Tyr706) a 3 diferentes concentraciones de BDNF 20 ng/mL, 50 ng/mL y 100 ng/mL donde la modulación en el tiempo es diferente para cada concentración y el pico de activación máxima para el receptor TrkB está dada por la concentración de 50 ng/mL de BDNF a tiempo de 5 minutos siendo este el punto control de activación para los receptores y de comparación con los oligómeros de amiloide beta.

Dado los resultados de la viabilidad celular posteriormente se decidió evaluar las concentraciones de los efectos tróficos de los oligómeros de amiloide beta 1-42 a concentraciones de 0.5 y 5  $\mu$ M en la modulación los receptores TrkB con respecto al BDNF (Figura 50), obteniendo que la inducción de activación por parte de las dos concentraciones de oligómeros de amiloide beta 1-42 es mayor con respecto a la activación dada por el BDNF a una concentración de 50 ng/mL, observando que la concentración más baja de 0.5  $\mu$ M presenta un pico de activación de los receptores TrkB al tiempo de 1 minuto mientras que a la concentración de 5  $\mu$ M lo hace a los 5 minutos esto pone de manifiesto que el amiloide beta podría ser capaz de modular la vía de las neurotrofinas a través del receptor TrkB.

Continuando con los mecanismos moleculares río abajo se evaluó el efecto del amiloide Beta 1-42 sobre la activación de AKT y la posible inhibición de GSK-3B (Figura 51 y 52) a través de la fosforilación de sitios específicos mostrando que las concentraciones de 0.5 y 5  $\mu$ M de A $\beta$ 1-42 modulan la fosforilación de AKT desde el minuto 1 hasta 1 hora y ambas concentraciones presentan el pico de activación al primer minuto de inducción con oligómeros 1-42 además de que observar una diferencia con el control de activación BDNF mientras que la GSK-3B presenta punto máximo de inhibición a diferente concentración con una concentración de 5  $\mu$ M la inhibición máxima está dada a los 5 minutos mientras que 0.5  $\mu$ M presentó una modulación de la GSK-3 $\beta$  a los 15 minutos.

Finalmente se evaluó el efecto de los oligómeros de amiloide beta en el factor transcripcional CREB encargado de la transcripción de factores neurotróficos como BDNF del cual se obtuvo que la presencia de los oligómeros de amiloide beta a concentraciones viables es capaz de modular al factor CREB desde el minuto 1 de inducción por las dos concentraciones de amiloide de 0.5 y 5  $\mu$ M (Figura 53).

## 6.6. PROCESAMIENTO INTRACELULAR DEL AMILOIDE BETA

Creciendo a las células precursoras de hipocampo en medio de crecimiento ITS 0.001% se decidió evaluar la presencia de los oligómeros de A $\beta$  1-40, 1-42 y 1-42s en el medio después de un periodo largo de incubación de 24 y 48 horas para ver el proceso de manteamiento de oligomerización en el medio frente a las células, del cual se recuperó el amiloide beta del medio de crecimiento en presencia de células hipocampales humanas, a un periodo de 24 horas las formas oligoméricas desaparecen manteniéndose las formas monoméricas en las concentraciones de 0.5,

1, 5 y 10  $\mu\text{M}$  de amiloide beta, mientras que el amiloide beta 1-40 adquiere formas oligoméricas de alto peso molecular y el scramble del amiloide beta 1-42 no es detectado por el anticuerpo 4G8 el cual sirve como control negativo de dicho anticuerpo. Mientras que a 48 horas no se detectó la presencia del oligómero de amiloide beta 1-42 a las diferentes concentraciones sugiriendo su degradación, y el amiloide 1-40 continúa presentado formas oligoméricas **a 1, 5, y 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{A}\beta$** , esto muestra que las células presentan prioridad por la forma más tóxica del amiloide beta para su procesamiento o degradación intracelular con respecto al amiloide beta 1-40 (Figura 54 y 55).

## 6.7. INMUNOCITOQUÍMICA DE CÉLULAS hHIPP PARA MARCADORES DE AUTOFAGIA Y LISOSOMA

Para evaluar el procesamiento o degradación **intracelular del  $\text{A}\beta$**  se evaluaron marcadores relacionados a endocitosis, autofagia y lisosoma a tiempos de 0, 1 y 6 horas, a tiempo 0 se carece de la presencia de amiloide beta pero existen basales de marcadores de endosoma Rab5, de autofagia LC3 y LAMP2 de tipo lisosomal (color rojo) se empleó Tau 5 como marcador de estructura celular (color cian) mientras que a tiempo de 1 hora y 6 horas en presencia de amiloide beta 1-42 fluoresceína (color verde) la presencia de los marcadores endosomales (Rab5-Color Verde), de autofagia (LC3-Color Rojo) y lisosomales (Lamp2-Color Rojo) colocalizan con el péptido  **$\text{A}\beta$**  1-42 mostrando que las neuronas responden con el procesamiento del amiloide beta por la vía autofágica para degradar el péptido (Figura 62).

## 6.8. PROCESAMIENTO AUTOFÁGICO Y PROTEOSOMAL DE AMILOIDE BETA 1-42

A través de los resultados de inmunocitofluorescencia se evaluó el marcador proteico LC3 para autofagia por WB se observa que el amiloide beta 1-42 genera el aumento del marcador LC3 a las 6 horas (Figura 56 y 57), posteriormente se activa la vía proteosomal a las 24 horas mostrado por el aumento del marcador PSMB5 (Figura 56 y 58) esto pone en evidencia que las células intentan mantener un estado homeostático **capturando el  $\text{A}\beta$**  y procesándolo por la vía autofágica y posterior se da la activación de la vía proteosomal.

## 6.9. POSIBLE MODULACIÓN DE LA FOSFORILACIÓN DE TAU INDUCIDA POR AMILOIDE BETA 1-42

La evaluación de la expresión de la proteína tau en dos de sus formas fosforiladas T181 y T231 en presencia de concentraciones fisiológicas **de  $\text{A}\beta$**  1-42 mostró que existe una disminución de las formas fosforiladas de tau (Figura 59, 60 y 61) mostrando una regulación fisiológica para las células **lo cual sugiere que el  $\text{A}\beta$**  podría modular la fosforilación de tau a concentraciones fisiológicas muy posiblemente a través de la vía de AKT/GSK3B.

## CARACTERIZACIÓN INMUCITOQUÍMICA DE LAS hHIP-009 Y VIABILIDAD CELULAR EN DIFERENTES MEDIOS DE CRECIMIENTO

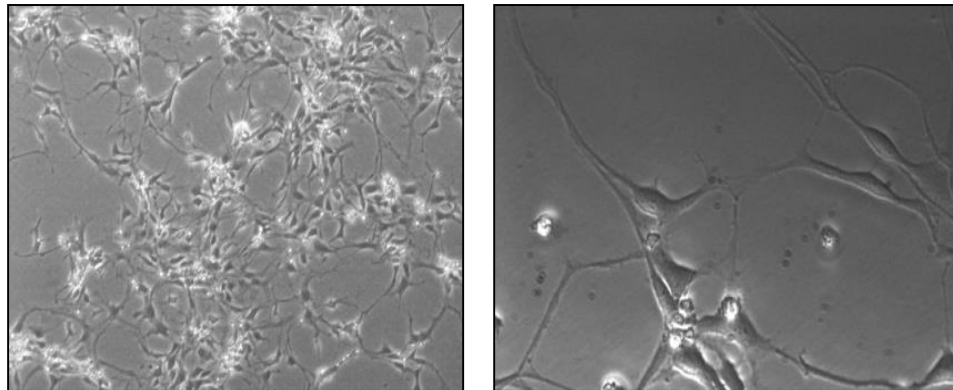


Figura 22. Crecimiento de células precursoras neurales de hipocampo humano (HIP-009) pase 13 en Neurobasal + EGF + bFGF + LIF observadas en microscopía de contraste de fases. Células con soma céntrico y prolongaciones bipolares además de células con prolongaciones que dan formas estrelladas.

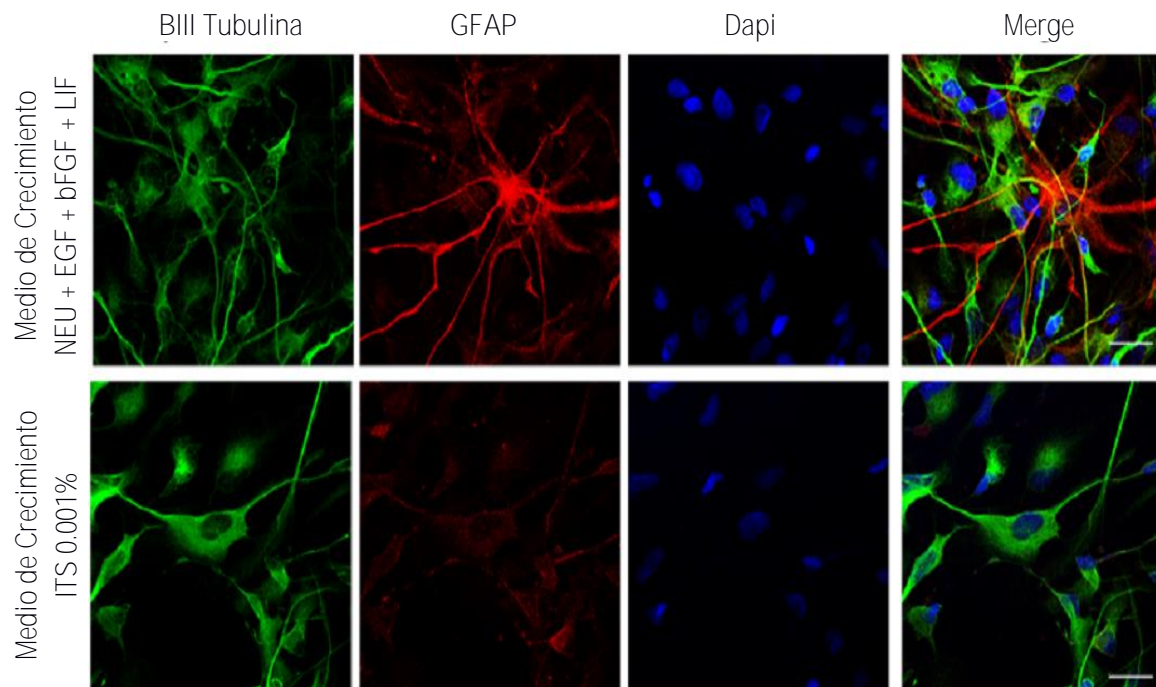


Figura 23. Imágenes de microscopía confocal de marcadores inmucitoquímicos Neuronal y marcador Glial de las células precursoras neurales de hipocampo humano en dos medios de crecimiento diferentes Neurobasal +EGF+ bFGF + LIF y Medio definido de ITS 0.001% a 24 horas. En ambos medios de crecimiento se mantienen las dos poblaciones a las que se encuentran comprometidas las células precursoras de hipocampo humano tanto neuronal como glía (mayoritariamente neuronal) así mismo pareciera existir una disminución en la relación de glía en el medio de crecimiento con ITS 0.001% con respecto al Neurobasal completo.

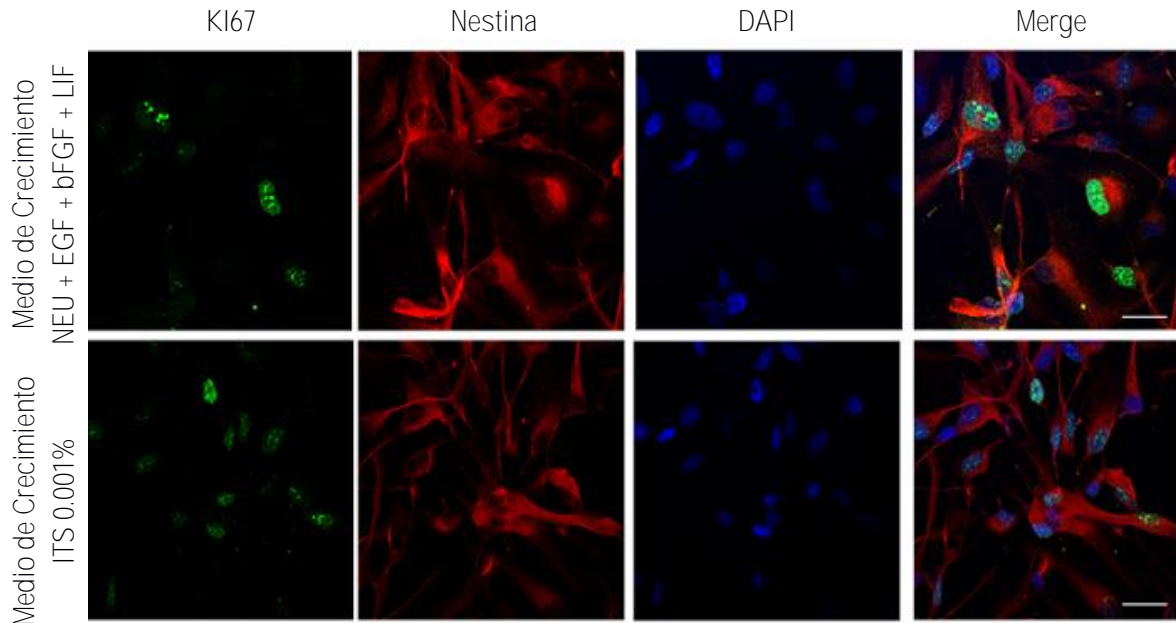


Figura 24. Imágenes de microscopía confocal de marcadores inmucitoquímicos de proliferación celular y marcador de Precursor neuronal de las células precursoras neurales de hipocampo humano en dos medios de crecimiento diferentes Neurobasal +EGF+ bFGF + LIF y Medio definido de ITS 0.001% a 24 horas. Ambos medios de crecimiento permiten la proliferación de las células precursoras de hipocampo observados por el marcador Ki67 y mantienen a las células en su estado de precursor neural indiferenciado mostrado por el marcador Nestina.

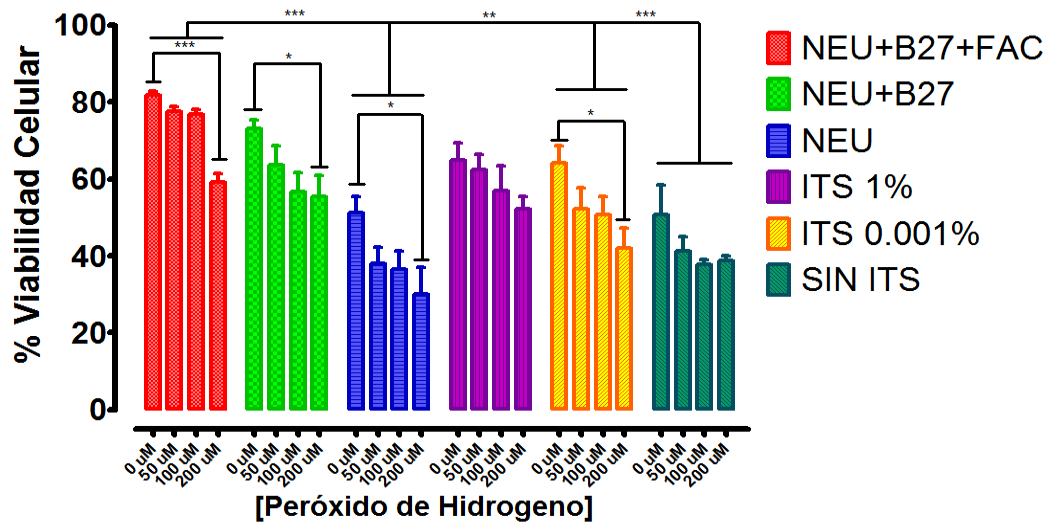


Figura 25. Viabilidad de las células precursoras neurales de hipocampo humano en diferentes medios de crecimiento. El medio de crecimiento Neurobasal completo + Factores es un buen protector contra agentes tóxico como el peróxido de hidrogeno, mientras que el Neurobasal solo, y los medios definidos con ITS al 0.001% y sin ITS con respecto al Neurobasal completo generan una susceptibilidad en la célula frente al peróxido de hidrogeno. Los gráficos representan la media ± error estándar de seis diferentes experimentos a concentraciones de 0, 50, 100 y 200 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> realizados por cuadruplicado. One-way ANOVA seguido de Dunnet \* p < 0,05, para columnas dentro de un grupo, control 0 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vs [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>], para comparación entre grupo se empleó Two-way ANOVA \* p < 0,05 control Neu+B27+FAC vs [Medios de crecimiento]. La viabilidad se evaluó por la técnica de LDH (PIERCE, Thermo Scientific).



## CARACTERIZACIÓN DE LOS OLIGOMEROS DE A $\beta$ 1-42

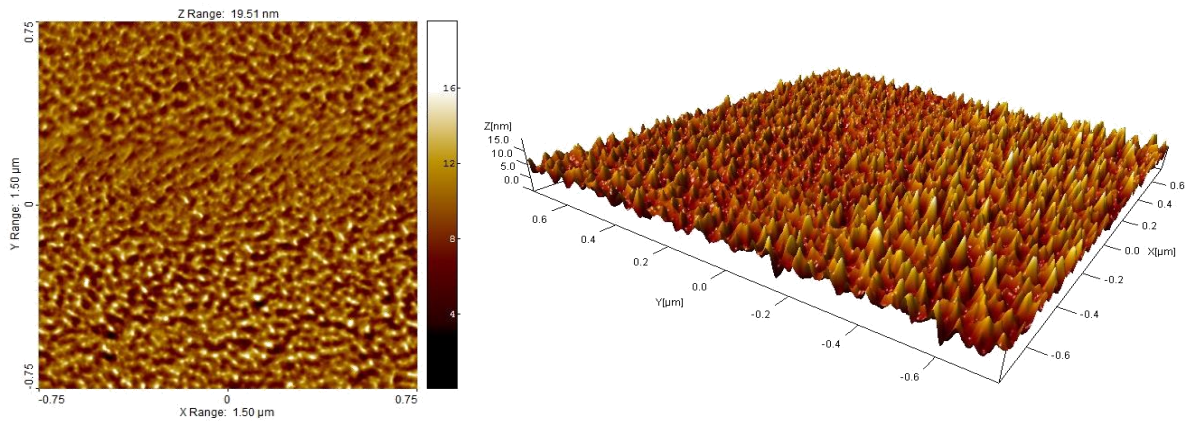


Figura 26. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM, tapping) de Amiloide Beta 1-42 diluido en DMSO + PBS (Stock 100  $\mu$ M). Estructuras de formas circulares individuales y aglomeradas de 19.51 nm que representan las formas monoméricas y oligoméricas.

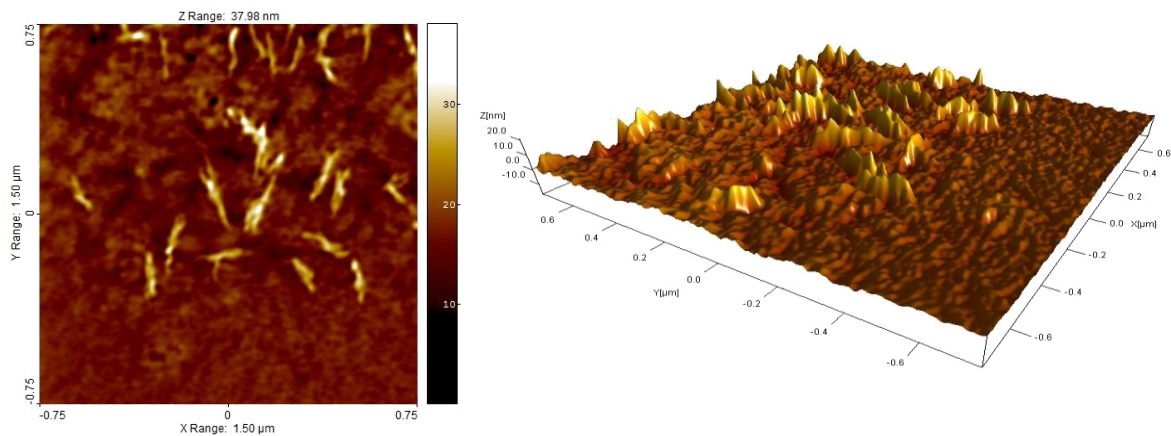


Figura 27. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM, tapping) de Amiloide Beta 1-42 en medio de crecimiento Neurobasal + B27 + EGF + bFGF + LIF A 0 Horas. Estructuras de formas circulares aglomeradas de 11.71 nm que representan las formas oligoméricas.

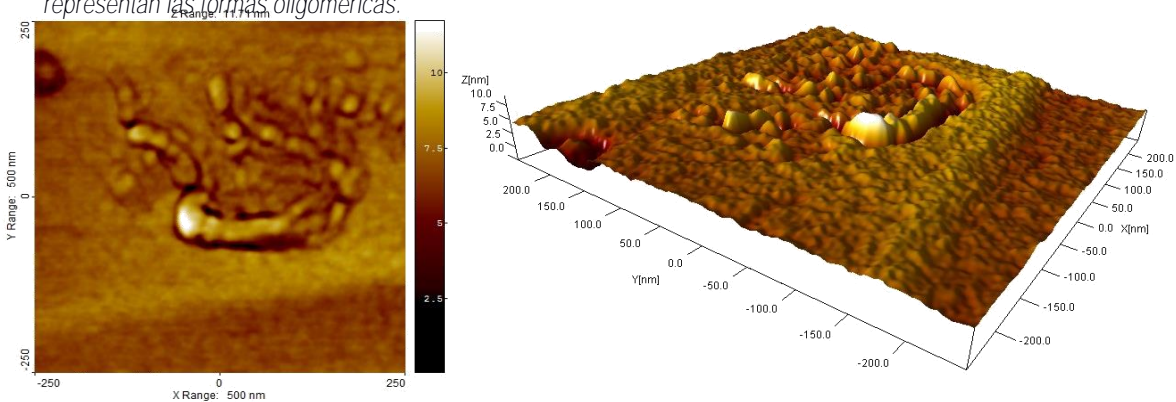


Figura 28. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM, tapping) de Amiloide Beta 1-42 en medio de crecimiento Neurobasal + B27 + EGF + bFGF + LIF a 24 Horas. Estructuras de formas fibrilares de corta longitud de 37.98 nm que representan protofibrillas.

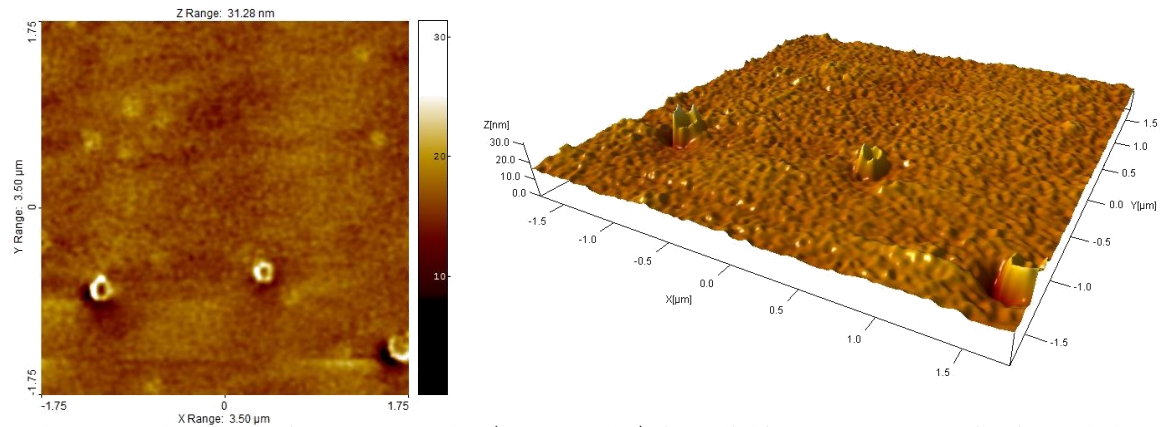


Figura 29. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM, tapping) de Amiloide Beta 1-42 en medio de crecimiento Neurobasal + B27 + EGF + bFGF + LIF a 48 Horas. Estructuras de formas oligoméricas de 31.28 nm que presentan formas hexaméricas típicas de los anillos oligómeros.

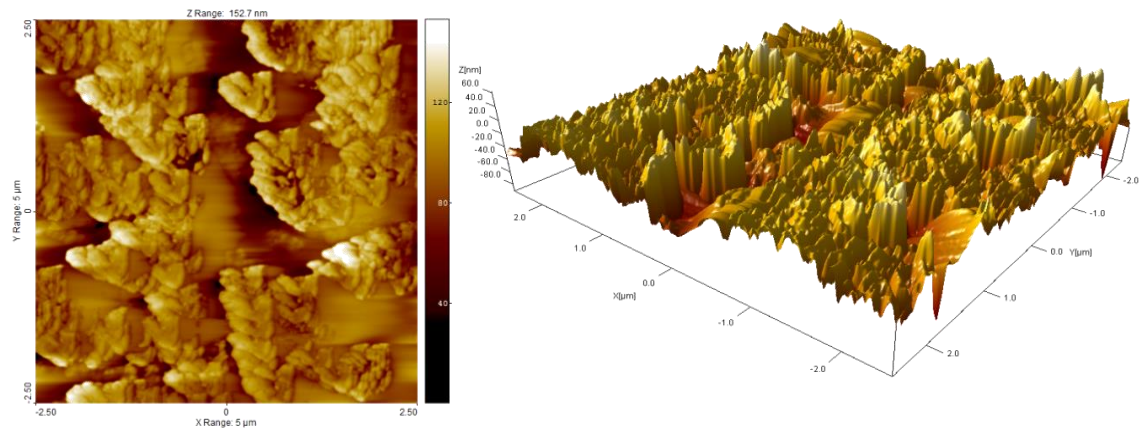


Figura 30. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM, tapping) de Amiloide Beta 1-42 en medio de crecimiento definido ITS 0.001% a 24 Horas. Estructuras de formas oligoméricas de 152.2 nm que representan formas agregadas.

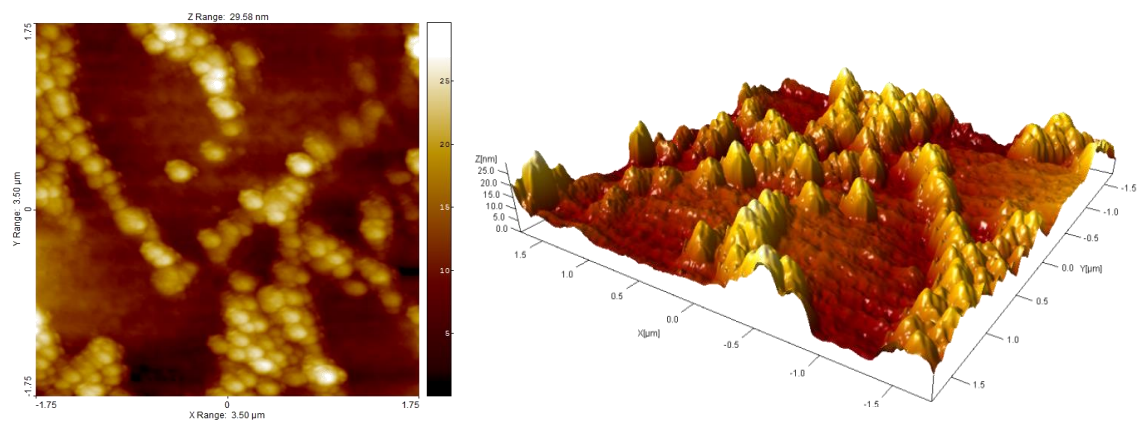


Figura 31. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM, tapping) de Amiloide Beta 1-42 en medio de crecimiento definido ITS 0.001% a 48 Horas. Estructuras de formas oligoméricas de 2.2 nm que representan formas aglomeradas circulares propias de oligómeros.

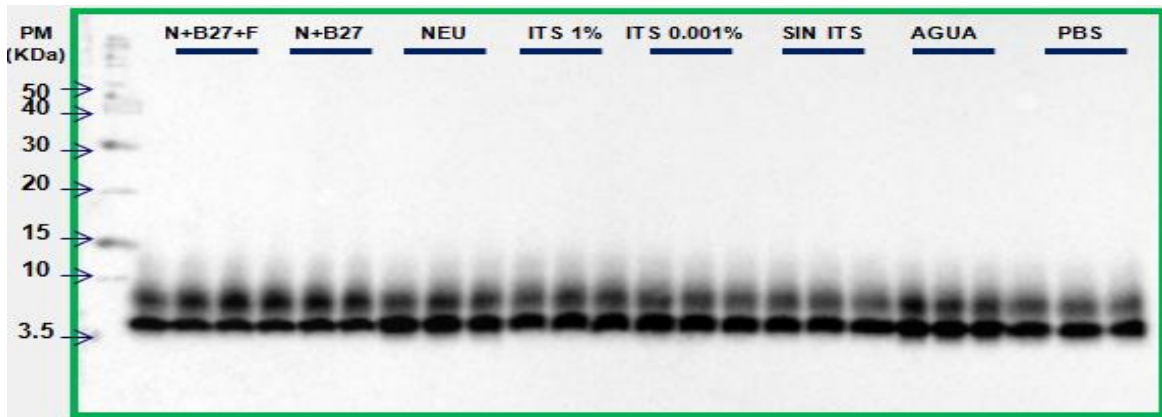


Figura 32. Western Blot de Amiloide Beta 1-40 en diferentes medios de crecimiento y soluciones a 0 horas. Las formas predominantes del A $\beta$  1-40 en los distintos medios de crecimiento y soluciones de agua y PBS presenta un comportamiento de tipo monomérico y oligomérico.

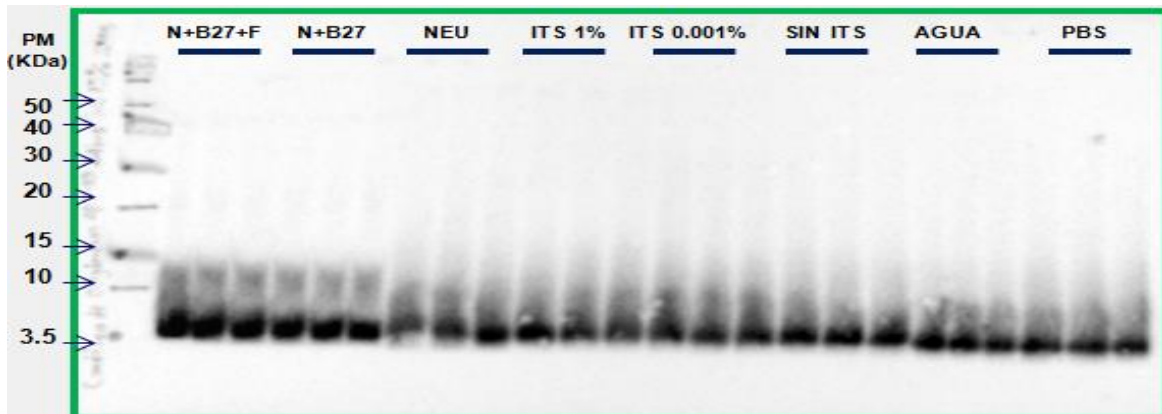


Figura 33. Western Blot de Amiloide Beta 1-40 en diferentes medios de crecimiento y soluciones a 24 horas. Las formas predominantes del A $\beta$  1-40 en los distintos medios de crecimiento y soluciones de agua y PBS presenta un comportamiento de tipo monomérico y oligomérico.

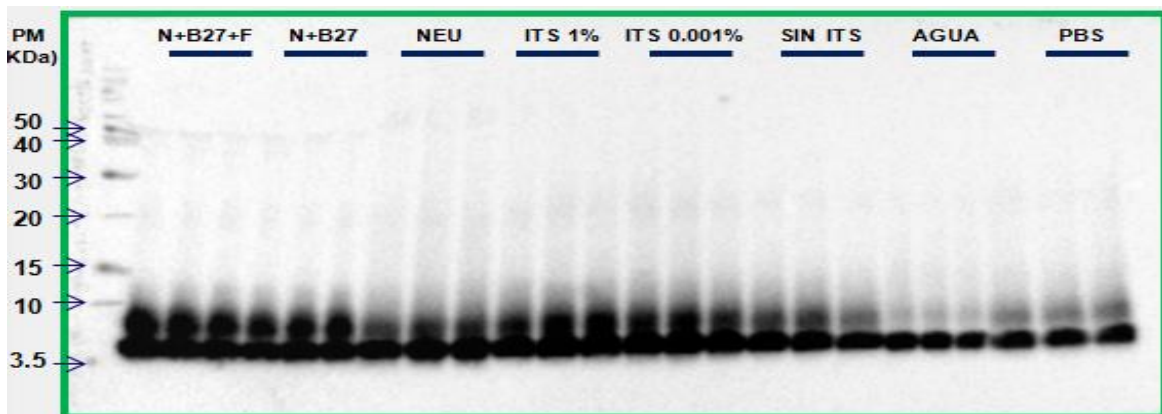


Figura 34. Western Blot de Amiloide Beta 1-40 en diferentes medios de crecimiento y soluciones a 48 horas. Las formas predominantes del A $\beta$  1-40 en los distintos medios de crecimiento y soluciones de agua y PBS presenta un comportamiento de tipo monomérico y oligomérico.

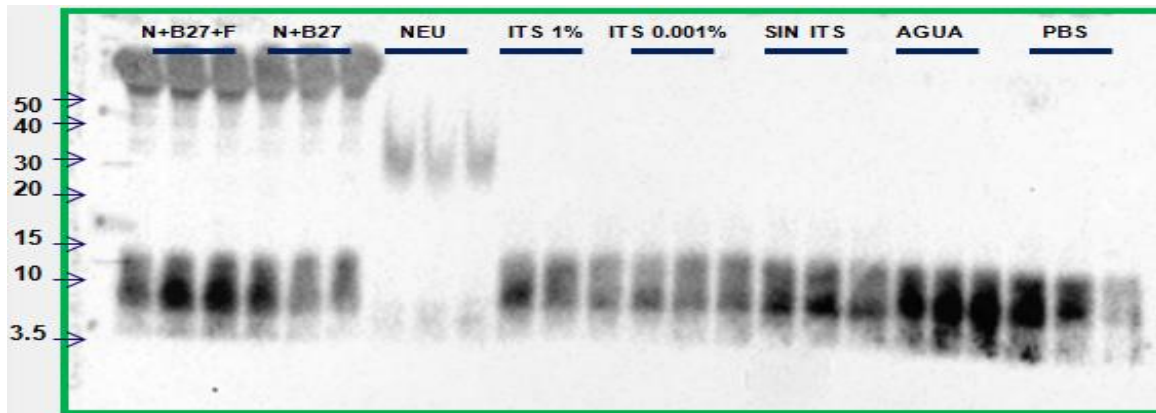


Figura 35. Western Blot de Amiloide Beta 1-40 en diferentes medios de crecimiento y soluciones a 72 horas. Las formas predominantes del A $\beta$  1-40 en los medios de crecimiento de Neurobasal completo, Neurobasal B27 y Neurobasal solo al tiempo de 72 Hrs generan formas de alto peso molecular relacionadas a formas fibrilares mientras que los medios definidos y las soluciones de agua y PBS presenta un comportamiento de tipo monomérico y oligomérico.

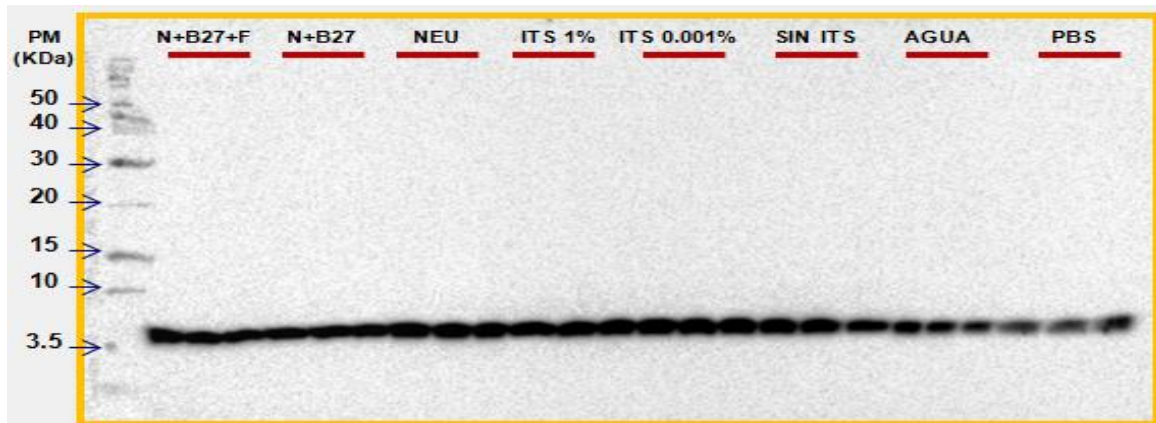


Figura 36. Western Blot de Amiloide Beta 1-42 en diferentes medios de crecimiento y soluciones a 0 horas. Las formas predominantes del A $\beta$  1-42 en los distintos medios de crecimiento y soluciones de agua y PBS presenta un comportamiento de tipo monomérico.

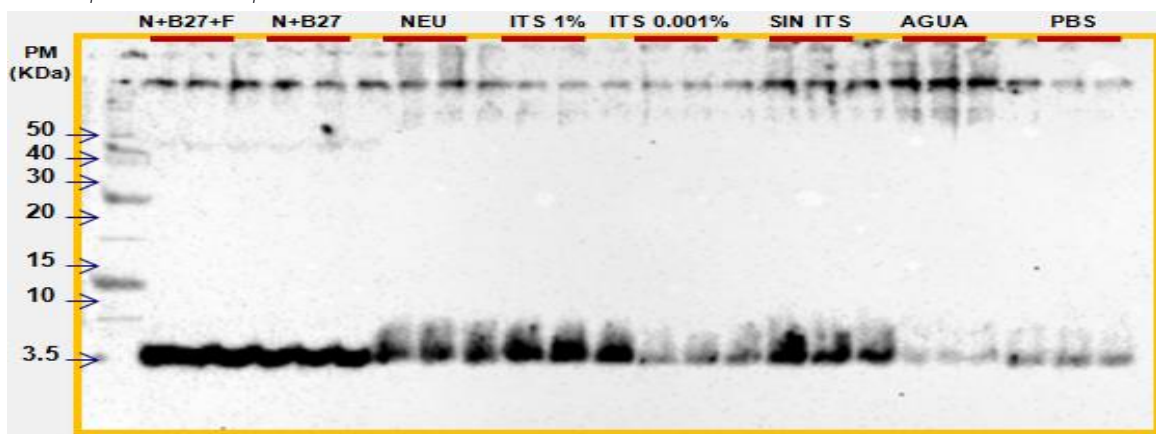


Figura 37. Western Blot de Amiloide Beta 1-42 en diferentes medios de crecimiento y soluciones a 24 horas. Las formas predominantes del A $\beta$  1-42 en los distintos medios de crecimiento y soluciones de agua y PBS presenta un comportamiento de tipo monoméricas, oligoméricas y fibrilares.

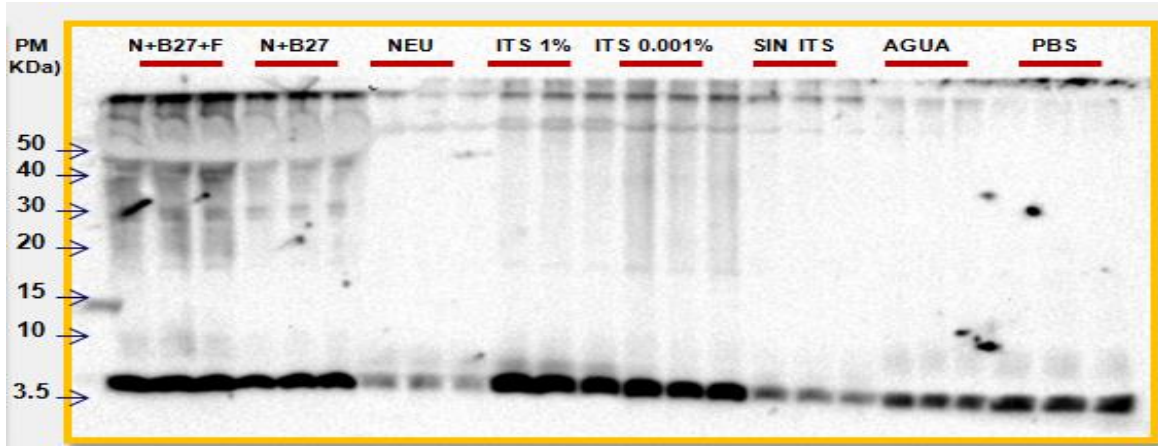


Figura 38. Western Blot de Amiloide Beta 1-42 en diferentes medios de crecimiento y soluciones a 48 horas. Las formas predominantes del  $A\beta$  1-42 en los distintos medios de crecimiento y soluciones de agua y PBS presenta un comportamiento de tipo monoméricas, oligoméricas y fibrilares.

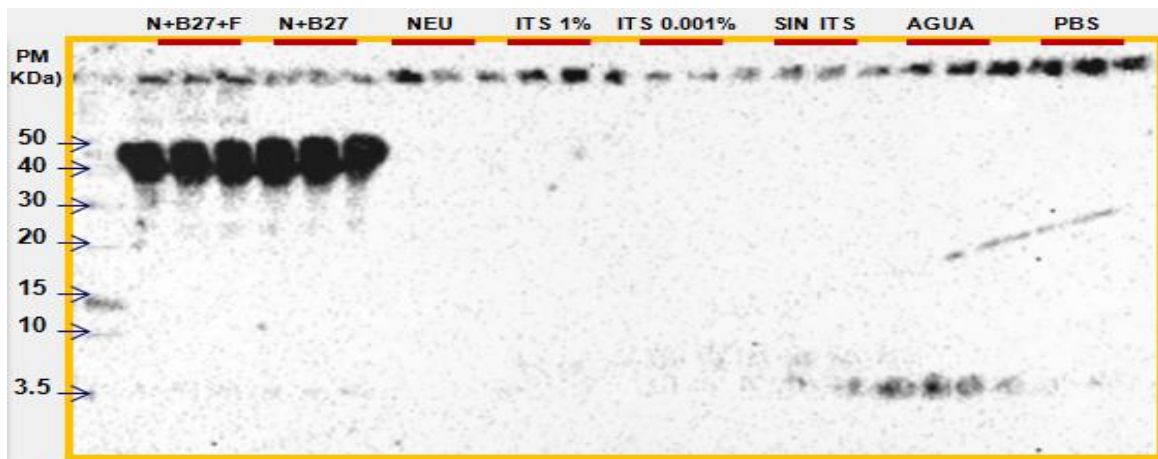


Figura 39. Western Blot de Amiloide Beta 1-42 en diferentes medios de crecimiento y soluciones a 72 horas. Las formas predominantes del  $A\beta$  1-42 en los distintos medios de crecimiento y soluciones de agua y PBS presentan un comportamiento predominantemente de tipo fibrilar.

VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS PRECURSORAS NEURALES DE HIPOCAMPO HUMANO (HIP-009) EN MEDIO DEFINIDO ITS 0.001% EN PRESENCIA DE AMILOIDE 1-40 Y 1-42 A 24, 48, 72 Y 96 HRS.

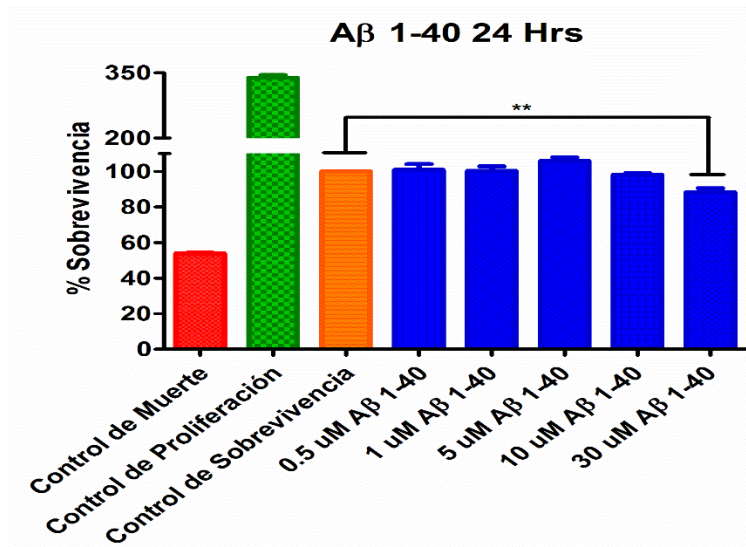


Figura 40. Efecto de distintas **concentraciones de los oligómeros de Aβ 1-40** en la viabilidad de las células hHIPP a 24 Hrs. Los resultados se expresan como el  $\bar{x}$  de los datos  $\pm$  error estándar. One-way ANOVA Dunnet \* $p < 0.05$ . Control de sobrevivencia (Neurobasal + B27) vs Tratamiento con oligómeros de Aβ 1-40 a 30 uM, utilizando una  $n=4$  para todos los grupos. Control de muerte:  $H_2O_2$  400  $\mu M$ , Control de proliferación: Neurobasal + B27+ bFGF 20 ng/ml, EGF 20 ng/ml, LIF 10  $\mu g/ml$ .

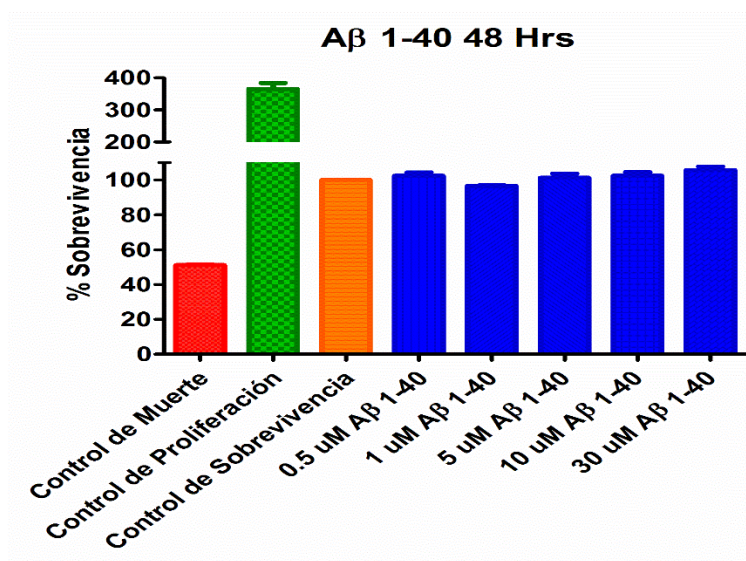


Figura 41. Efecto de distintas concentraciones de **los oligómeros de Aβ 1-40** en la viabilidad de las células hHIPP a 48 Hrs. Los resultados se expresan como el  $\bar{x}$  de los datos  $\pm$  error estándar. One-way ANOVA Dunnet \* $p < 0.05$ . No existe diferencia significativa entre el control de sobrevivencia vs los tratamientos con oligómeros de amiloide beta, utilizando una  $n=4$  para todos los grupos. Control de muerte:  $H_2O_2$  400  $\mu M$ , Control de proliferación: Neurobasal + B27+ bFGF 20 ng/ml, EGF 20 ng/ml, LIF 10  $\mu g/ml$ .

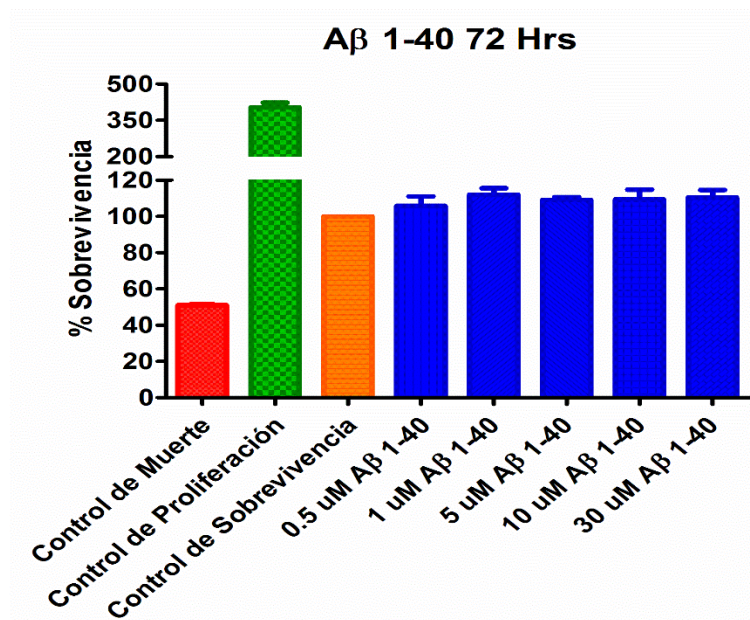


Figura 42. Efecto de distintas **concentraciones de los oligómeros de Aβ 1-40** en la viabilidad de las células hHIPP a 72 Hrs. Los resultados se expresan como el  $\bar{x}$  de los datos  $\pm$  erros estándar. One-way ANOVA Dunnet \* $p < 0.05$ . No existe diferencia significativa entre el control de sobrevivencia vs los tratamientos con oligómeros de amiloide beta, utilizando una  $n=4$  para todos los grupos. Control de muerte:  $H_2O_2$  400  $\mu M$ , Control de proliferación: Neurobasal + B27+ bFGF 20 ng/ml, EGF 20 ng/ml, LIF 10  $\mu g/ml$ .

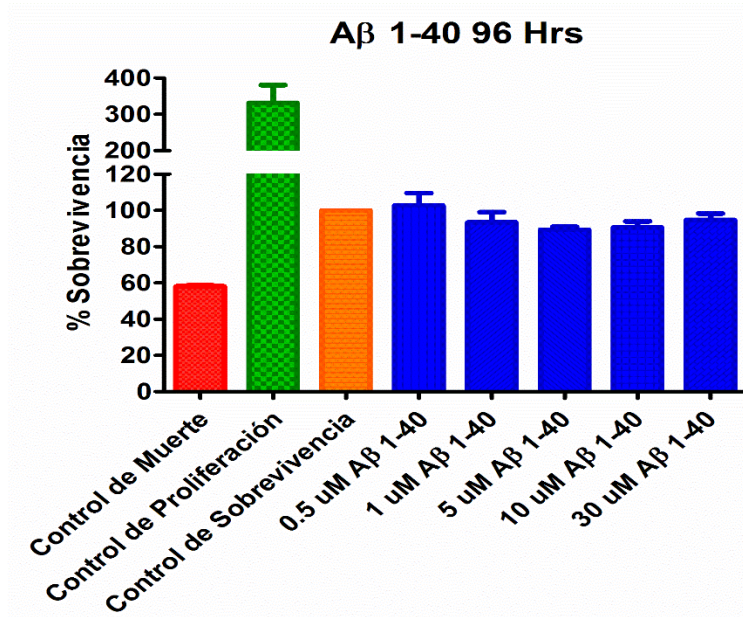
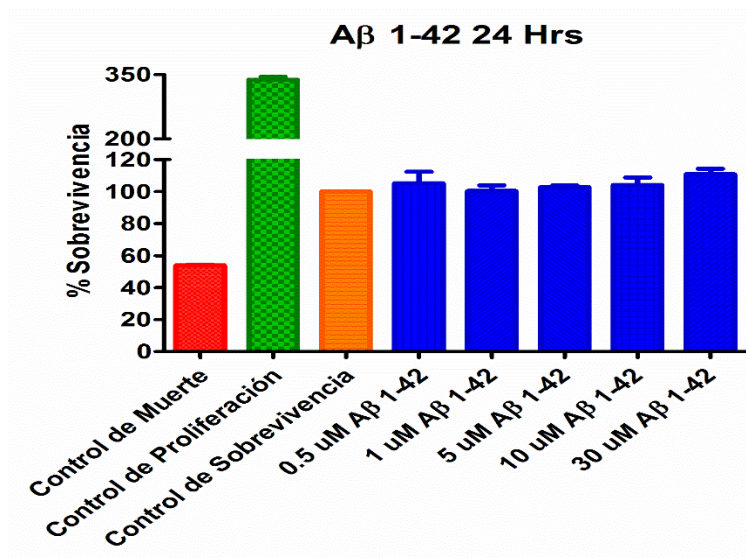
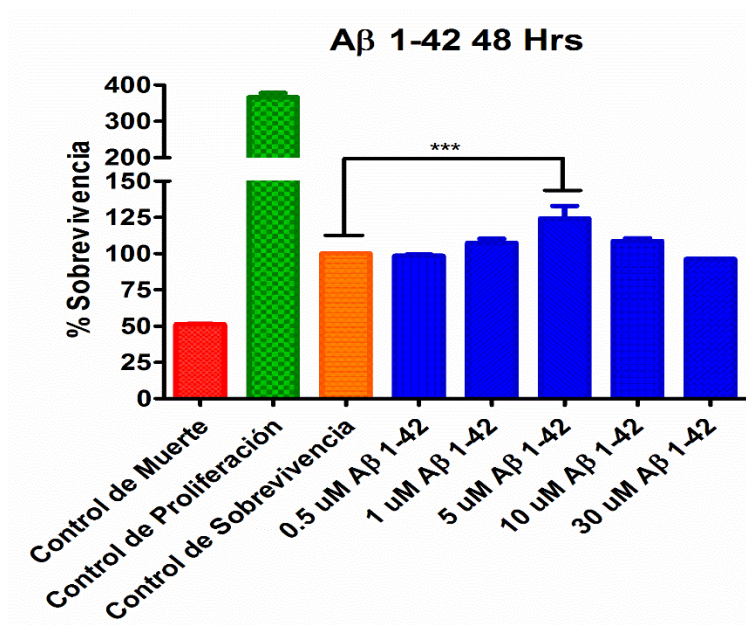


Figura 43. Efecto de **distintas concentraciones de los oligómeros de Aβ 1-40** en la viabilidad de las células hHIPP a 96 Hrs. Los resultados se expresan como el  $\bar{x}$  de los datos  $\pm$  erros estándar. One-Way ANOVA Dunnet \* $p < 0.05$ . No existe diferencia significativa entre el control de sobrevivencia vs los tratamientos con oligómeros de amiloide beta, utilizando una  $n=4$  para todos los grupos. Control de muerte:  $H_2O_2$  400  $\mu M$ , Control de proliferación: Neurobasal + B27+ bFGF 20 ng/ml, EGF 20 ng/ml, LIF 10  $\mu g/ml$ .

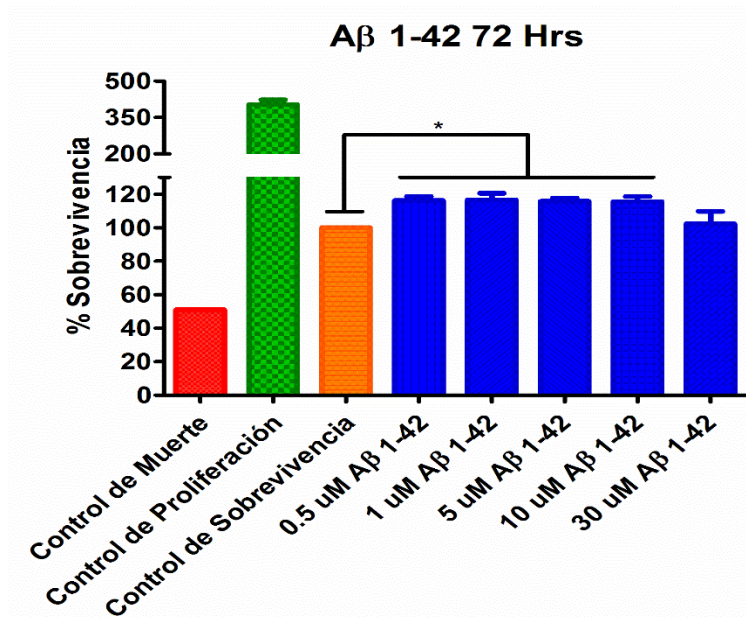


**Figura 44. Efecto de distintas concentraciones de los oligómeros de Aβ 1-42 en la viabilidad de las células hHIPP a 24 Hrs.** Los resultados se expresan como el  $\bar{x}$  de los datos  $\pm$  erros estándar. One-way ANOVA Dunnet \* $p < 0.05$ . No existe diferencia significativa entre el control de sobrevivencia vs los tratamientos con oligómeros de amiloide beta, utilizando una  $n=4$  para todos los grupos. Control de muerte:  $H_2O_2$  400  $\mu M$ , Control de proliferación: Neurobasal + B27+ bFGF 20 ng/ml, EGF 20 ng/ml, LIF 10  $\mu g/ml$ .

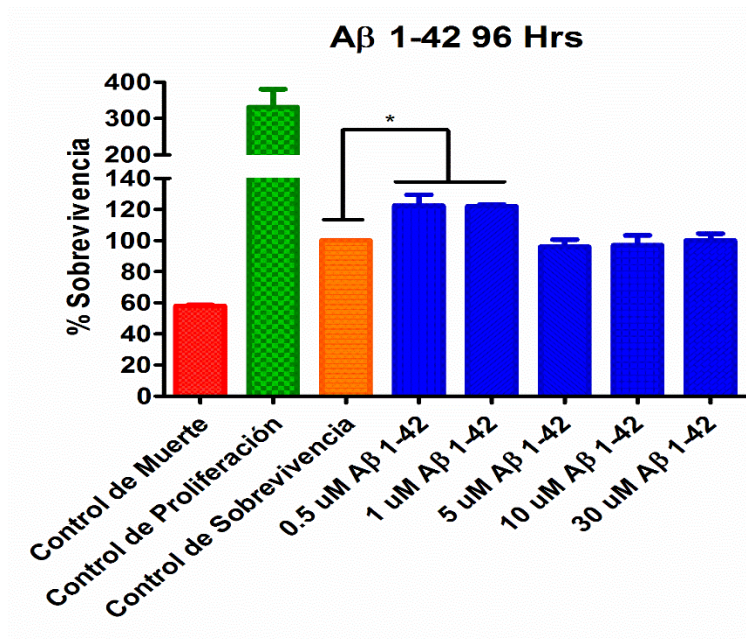


**Figura 45. Efecto de distintas concentraciones de los oligómeros de Aβ 1-42 en la viabilidad de las células hHIPP a 48 Hrs.** Los resultados se expresan como el  $\bar{x}$  de los datos  $\pm$  erros estándar. One-way ANOVA Dunnet \* $p < 0.05$ . Control de sobrevivencia (Neurobasal + B27) vs Tratamiento con oligómeros de Aβ 1-42 a 5 uM, utilizando una  $n=4$  para todos los grupos. Control de muerte:  $H_2O_2$  400  $\mu M$ , Control de proliferación: Neurobasal + B27+ bFGF 20 ng/ml, EGF 20 ng/ml, LIF 10  $\mu g/ml$ .





**Figura 46. Efecto de distintas concentraciones de los oligómeros de Aβ 1-42 en la viabilidad de las células hHIPP a 72 Hrs.** Los resultados se expresan como el  $\bar{x}$  de los datos  $\pm$  erros estándar. One-way ANOVA Dunnet  $*p < 0.05$ . Control de sobrevivencia (Neurobasal + B27) vs Tratamiento con oligómeros de Aβ 1-42 a 0.5, 1, 5 y 10  $\mu\text{M}$ , utilizando una  $n=4$  para todos los grupos. Control de muerte:  $\text{H}_2\text{O}_2$  400  $\mu\text{M}$ , Control de proliferación: Neurobasal + B27+ bFGF 20 ng/ml, EGF 20 ng/ml, LIF 10  $\mu\text{g/ml}$ .



**Figura 47. Efecto de distintas concentraciones de los oligómeros de Aβ 1-42 en la viabilidad de las células hHIPP a 96 Hrs.** Los resultados se expresan como el  $\bar{x}$  de los datos  $\pm$  erros estándar. One-way ANOVA Dunnet  $*p < 0.05$ . Control de sobrevivencia (Neurobasal + B27) vs Tratamiento con oligómeros de Aβ 1-42 a 0.5 y 1  $\mu\text{M}$ , utilizando una  $n=4$  para todos los grupos. Control de muerte:  $\text{H}_2\text{O}_2$  400  $\mu\text{M}$ , Control de proliferación: Neurobasal + B27+ bFGF 20 ng/ml, EGF 20 ng/ml, LIF 10  $\mu\text{g/ml}$ .

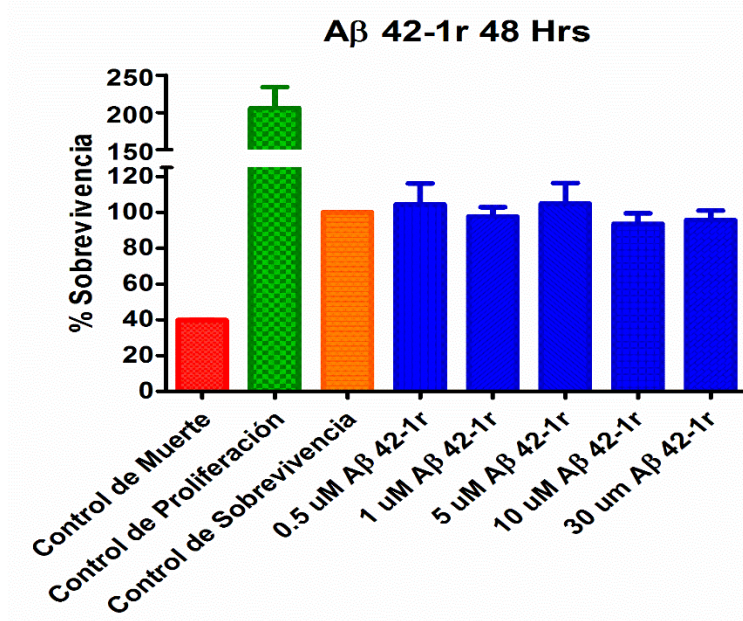


Figura 48. Efecto de distintas concentraciones de los oligómeros de Aβ 42-1 reverso en la viabilidad de las células hHIPP a 48 Hrs. Los resultados se expresan como el  $\bar{x}$  de los datos  $\pm$  errores estándar. One-way ANOVA Dunnet \* $p < 0.05$ . Control de sobrevivencia (Neurobasal + B27) vs Tratamiento con oligómeros de Aβ 1-42 a 0.5 y 1  $\mu$ M, utilizando una  $n=4$  para todos los grupos. Control de muerte:  $H_2O_2$  400  $\mu$ M, Control de proliferación: Neurobasal + B27+ bFGF 20 ng/ml, EGF 20 ng/ml, LIF 10  $\mu$ g/ml.

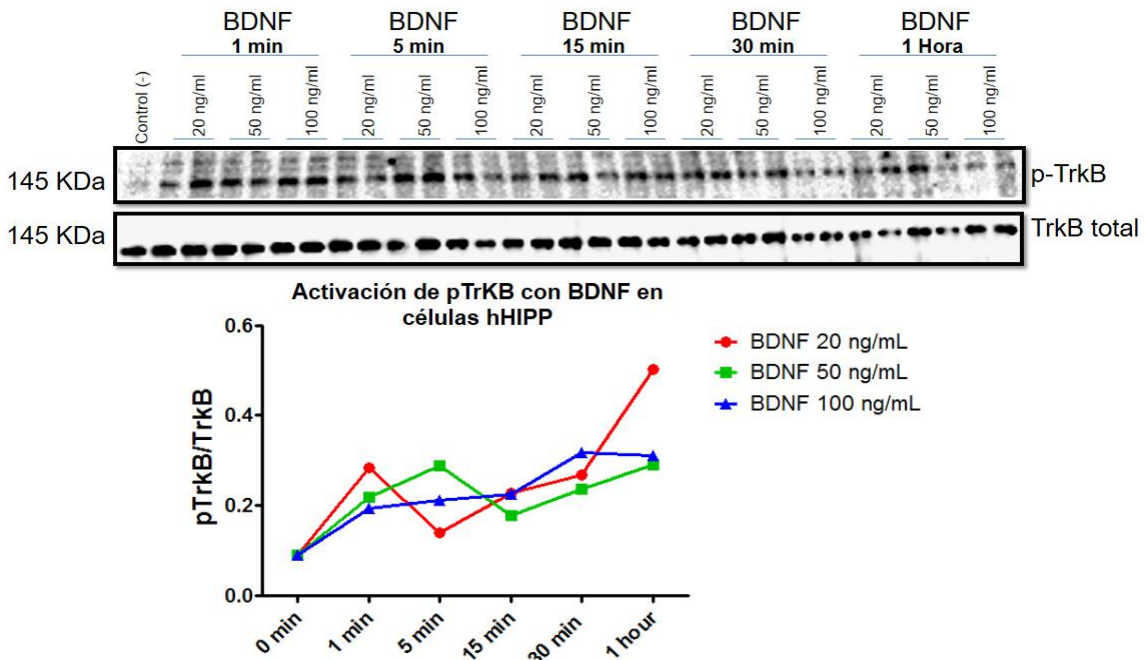


Figura 49. Modulación de TrkB por concentraciones crecientes de BDNF en células precursoras neurales de hipocampo humano fetal. La activación de TrkB (Tyr706) por BDNF sucede en los primeros minutos y posteriormente desciende, siendo la concentración de 50 ng/ml de BDNF alcanzó el pico máximo de activación de TrkB a corto tiempo (5 minutos), en células hHIPP009,  $n=$ único ensayo.

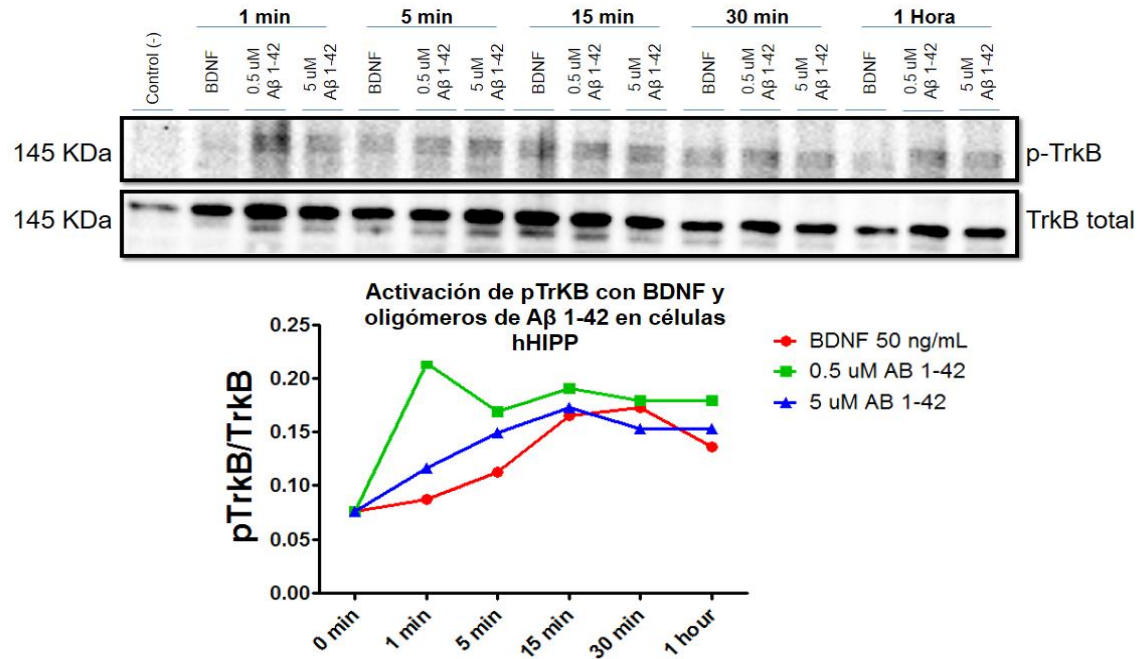


Figura 50. **Modulación de TrkB por oligómeros de Aβ en células precursoras neurales de hipocampo humano fetal.** La activación marcada de TrkB (Tyr 706) por oligómeros de Aβ 1-42 sucede en el minuto 1 de la cinética de activación a concentración de 0.5 μM, BDNF 50 ng/ml se utilizó como control de la activación de TrkB, n=único ensayo.

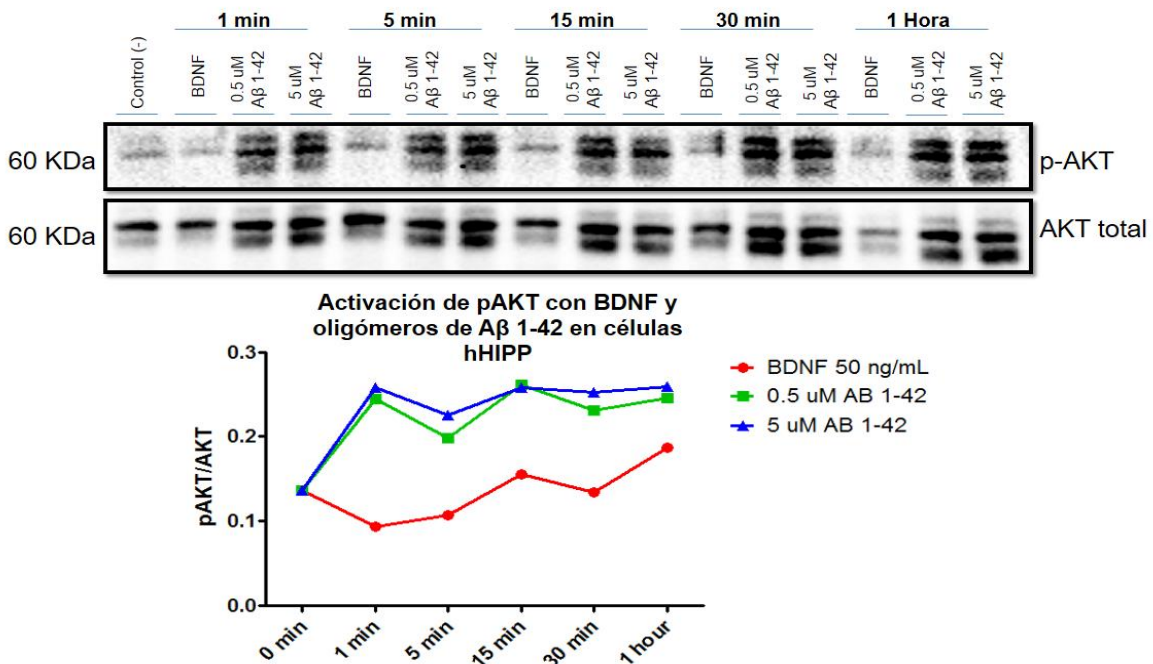


Figura 51. **Modulación de AKT por oligómeros de Aβ 1-42 en células precursoras neurales de hipocampo humano fetal.** La activación marcada de AKT (Thr 308) por oligómeros de Aβ presenta al minuto 1 el pico de activación con ambas concentraciones de oligómeros de 0.5 y 5 μM y parece ser sostenida a lo largo de la cinética, además de presentar diferencia en la activación con respecto al BDNF, n=único ensayo.

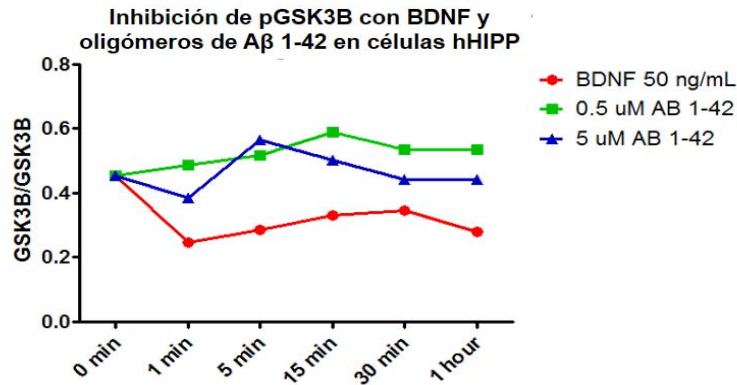
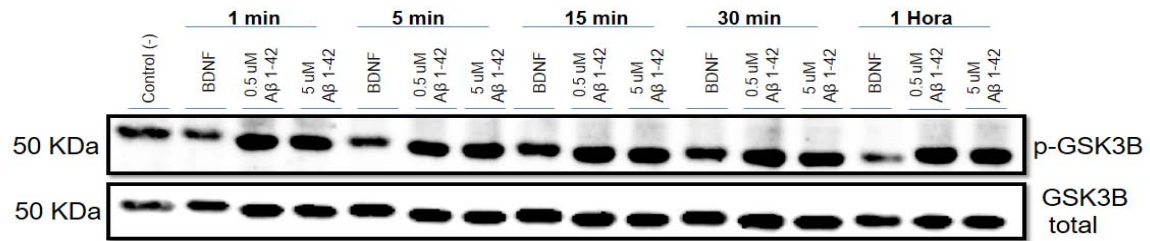


Figura 52. Modulación de GSK3 por oligómeros de Aβ 1-42 en células precursoras neurales de hipocampo humano fetal. La inhibición marcada de GSK3B (Ser 9) por oligómeros de Aβ presenta al minuto 5 el pico de inhibición a la concentración de 5 μM mientras que con BDNF no existe una inhibición marcada del sustrato, n=único ensayo.

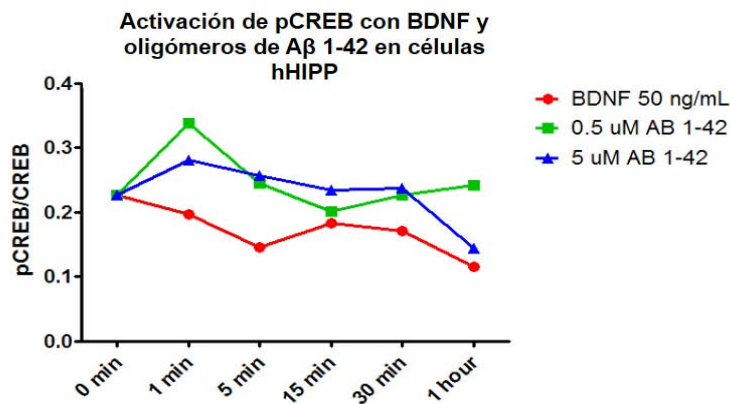
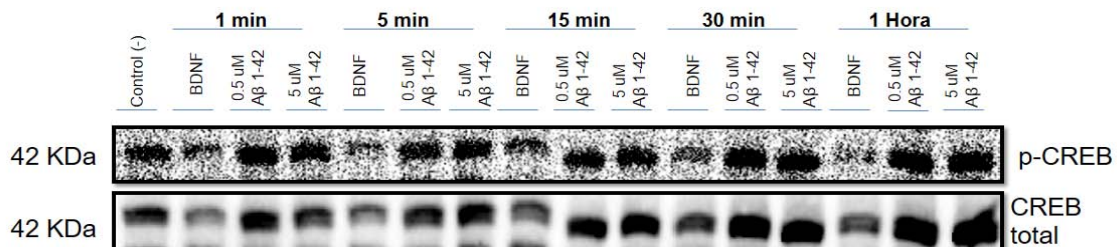


Figura 53. Modulación de CREB por oligómero de Aβ en células precursoras neurales de hipocampo humano fetal. La activación marcada de CREB (Ser 133) por oligómeros de Aβ presenta al minuto 1 el pico de activación a la concentración de 0.5 y 5 μM mientras que con BDNF no existe una activación marcada del sustrato, n=único ensayo.

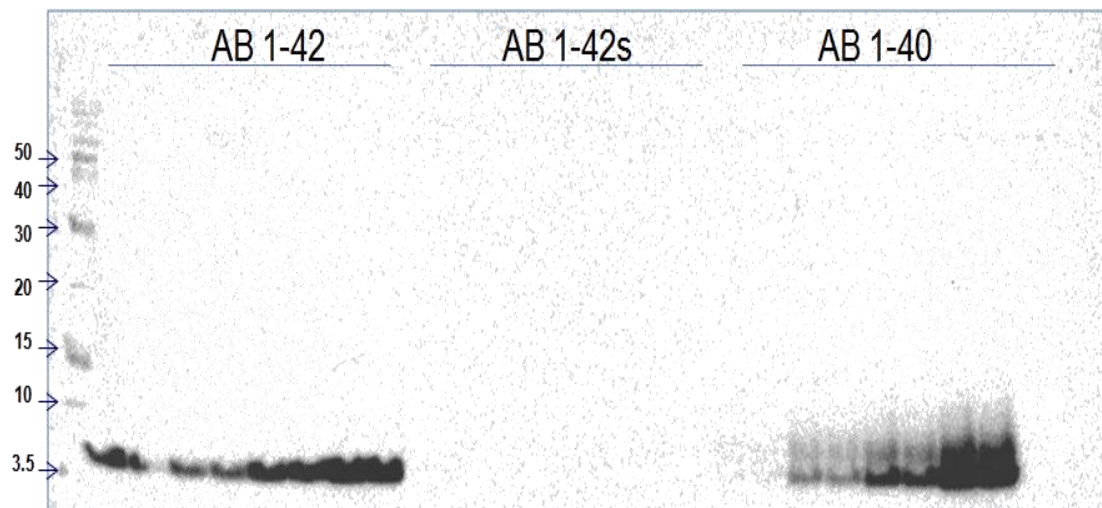


Figura 54. **Recuperación de oligómeros de A $\beta$  en medio de ITS 0.001% con células precursoras neurales en medio de crecimiento a 24 Hrs.** Existe presencia de los oligómeros de A $\beta$  1-40 y 1-42 a concentraciones de 0.5, 1, 5 y 10  $\mu$ M en el cultivo de crecimiento de las hHIPP a 24 Hrs mientras que el péptido scramble funciona como control negativo de detección de las formas monoméricas y oligoméricas de A $\beta$  por el anticuerpo.

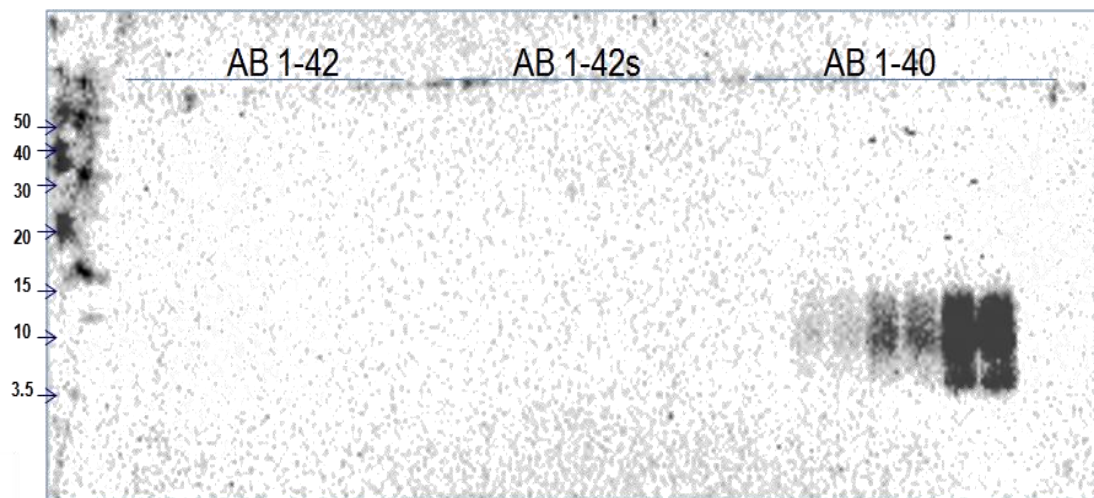


Figura 55. **Recuperación de oligómeros de A $\beta$  en medio de ITS 0.001% con células precursoras neurales en crecimiento a 48 Hrs.** Existe presencia de los oligómeros de A $\beta$  1-40 a concentraciones de 0.5, 1, 5 y 10  $\mu$ M en el cultivo de crecimiento de las hHIPP a 48 Hrs, los oligómeros de A $\beta$  1-42 no son detectables a ninguna de las concentraciones, mientras que el scramble funciona como control negativo de detección de las formas monoméricas y oligoméricas de A $\beta$ .

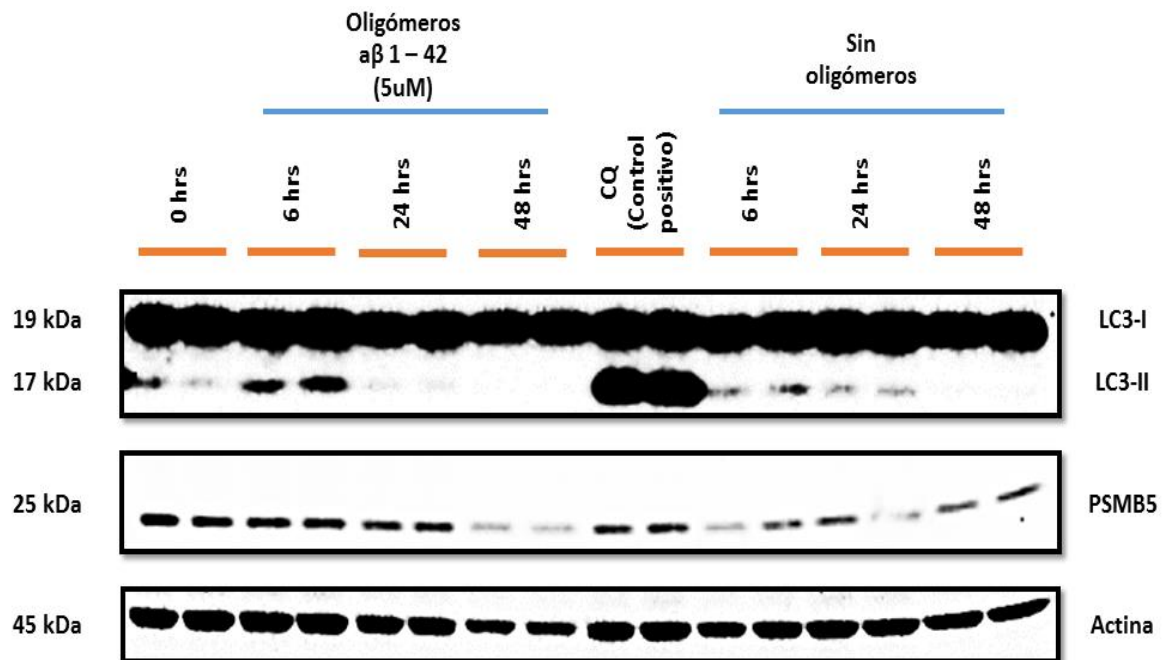


Figura 56. Cinética de **la vía autofágica, lisosomal y del proteosoma por oligómeros de Aβ 1-42, o sin oligómeros de Aβ**. La activación de la vía autofágica-lisosomal se detectó con el anticuerpo LC3, observándose un pico de activación a las 6 Hrs, en presencia de los oligómeros de AB 1-42 (se utilizó como control de la activación de autofagia la cloroquina (CQ)). La vía proteosomal se detectó con el anticuerpo PSMB5, observándose activación a 0, 6 y 4 Hrs, en presencia de los oligómeros de Aβ 1-42. n = 2.

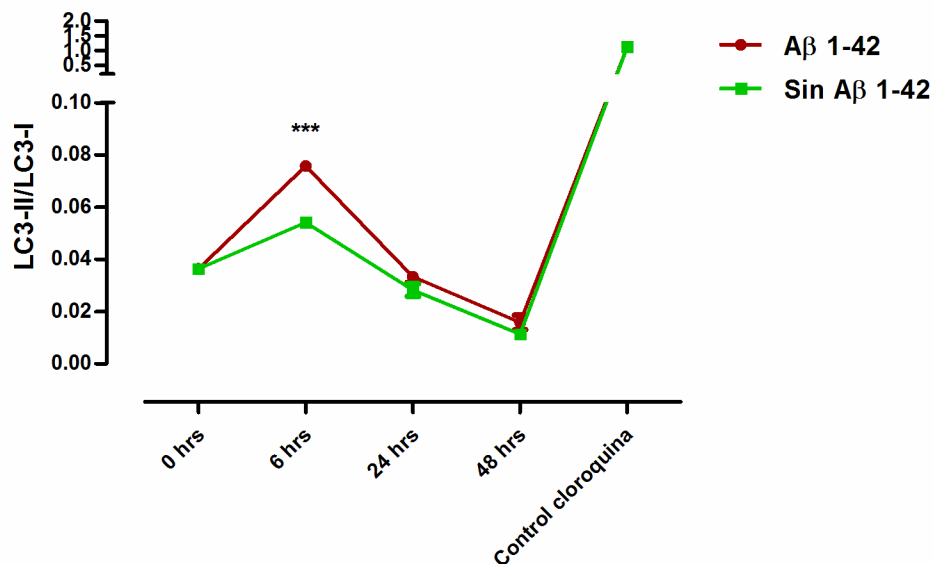


Figura 57. **Gráfico de la cinética de modulación del LC3 por el Aβ 1-42** en células hHIPP durante un periodo crónico. A 6 Hrs el efecto del Aβ 1-42 presenta la mayor actividad de autofagia detectado con el anticuerpo LC3 observado como una diferencia significativa con respecto al control sin oligómeros de Aβ, con un posterior descenso de dicha actividad, One-way ANOVA Bonferroni \*P<0.05 n=2.

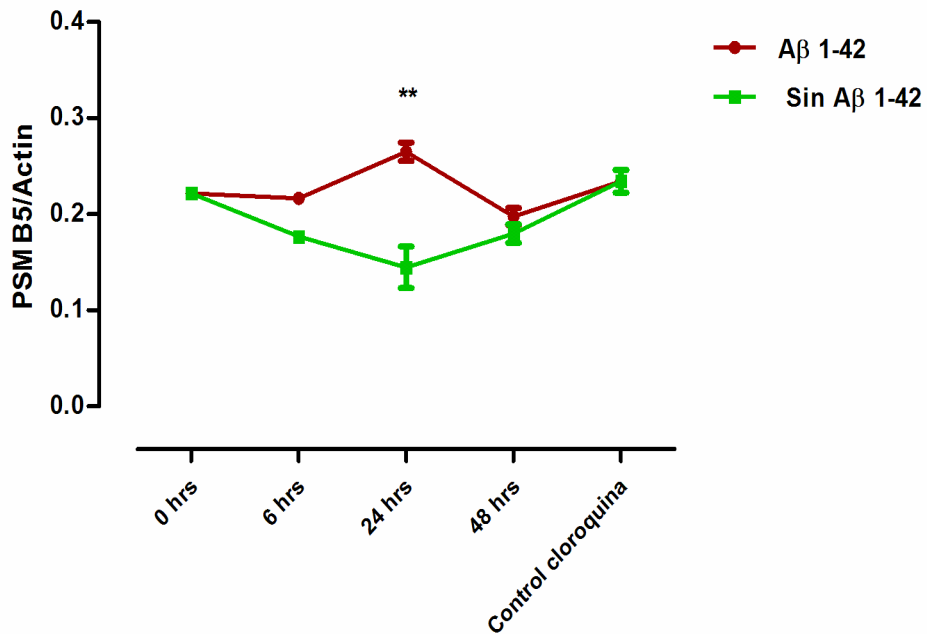


Figura 58. **Gráfico de la cinética de modulación de PSMB5 por el Aβ 1-42 en células hHIPP durante un periodo crónico.** A 24 Hrs el efecto del Aβ presenta la mayor actividad del proteosoma, detectado por el marcador PSMB5 observado como una diferencia significativa con respecto al control sin oligómeros de Aβ, con un posterior descenso de dicha actividad, One-way ANOVA Bonferroni \*P<0.05 n=2.

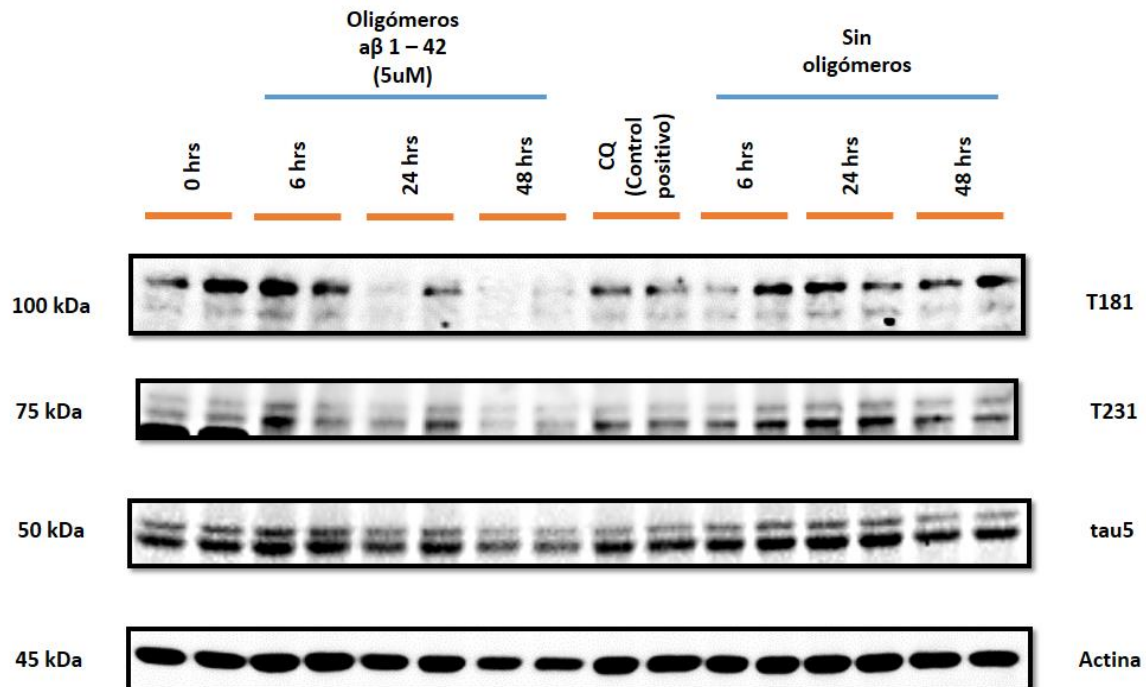


Figura 59. **Cinética de modulación de tau fosforilada en presencia o ausencia de los oligómeros de Aβ 1-42.** Fosforilaciones en treonina 181 y 231 de tau a las 0, 6, 24 y 48 Hrs con oligómeros de Aβ 1-42 en las células hHIPP-009.

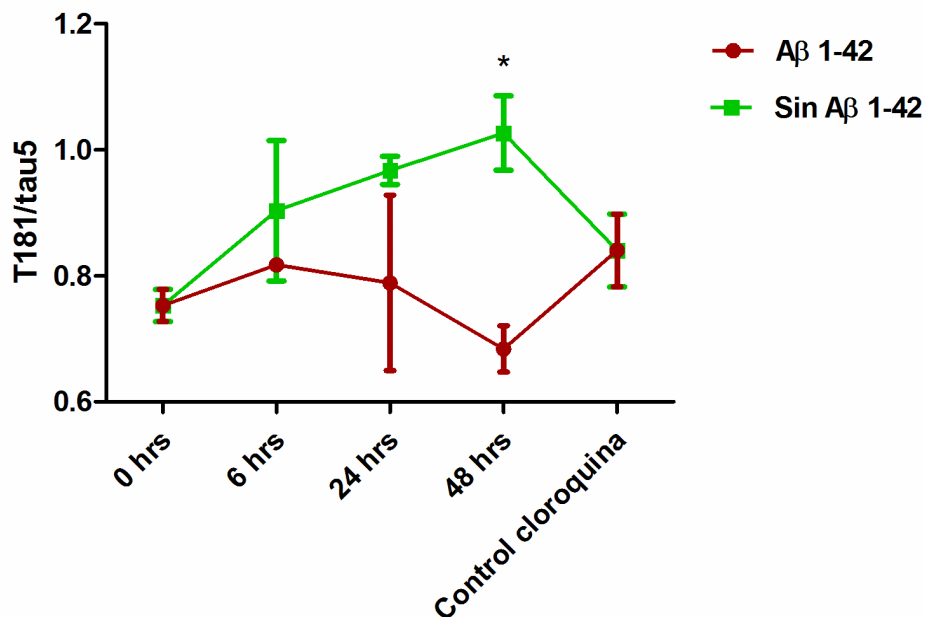


Figura 60. Gráfico de la cinética de modulación de la fosforilación de tau (T181) en presencia o ausencia del **Aβ 1-42** en células hHIPP-009. Fosforilación en treonina 181 de tau a las 6, 24 y 48 Hrs con oligómeros de Aβ 1-42 en las células hHIPP presenta una diferencia significativa con respecto al control sin oligómeros de Aβ, One-way ANOVA Bonferroni \*P<0.05 n=2.

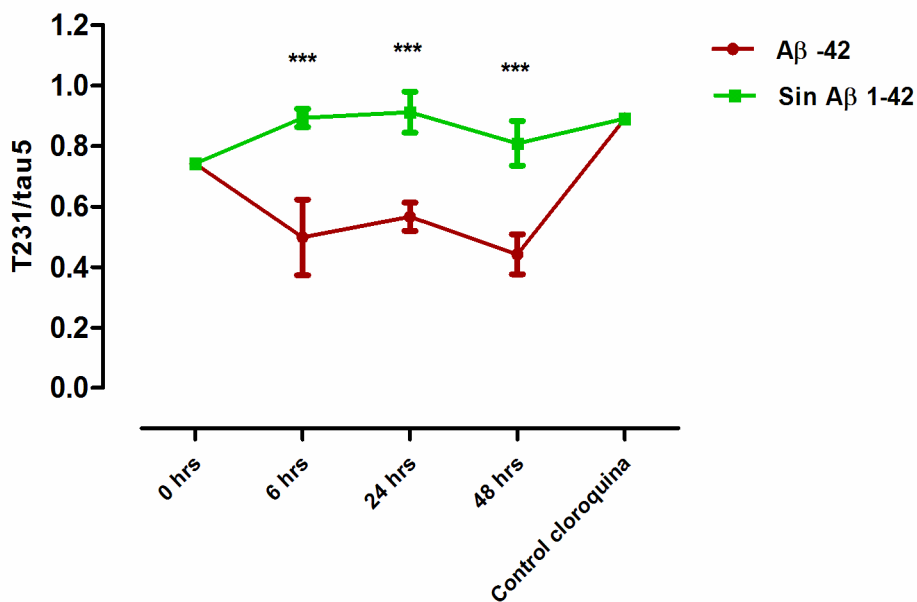
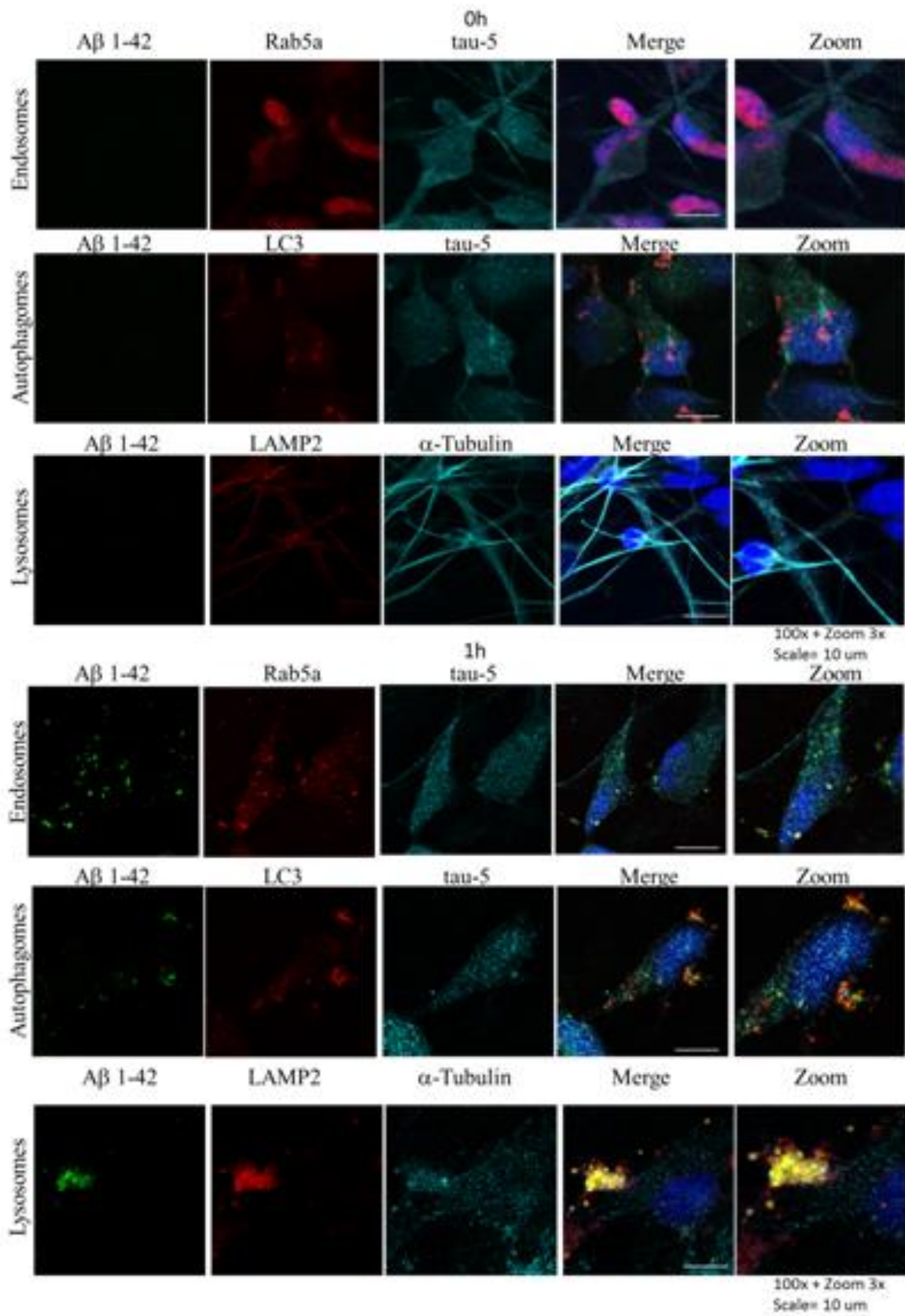


Figura 61. Gráfico de la cinética de modulación de la fosforilación de tau (T231) en presencia o ausencia del **Aβ 1-42** en células hHIPP-009. Fosforilación en treonina 231 de tau a las 6, 24 y 48 Hrs con oligómeros de Aβ 1-42 en las células hHIPP presenta una diferencia significativa con respecto al control sin oligómeros de Aβ, One-way ANOVA Bonferroni \*P<0.05 n=2.





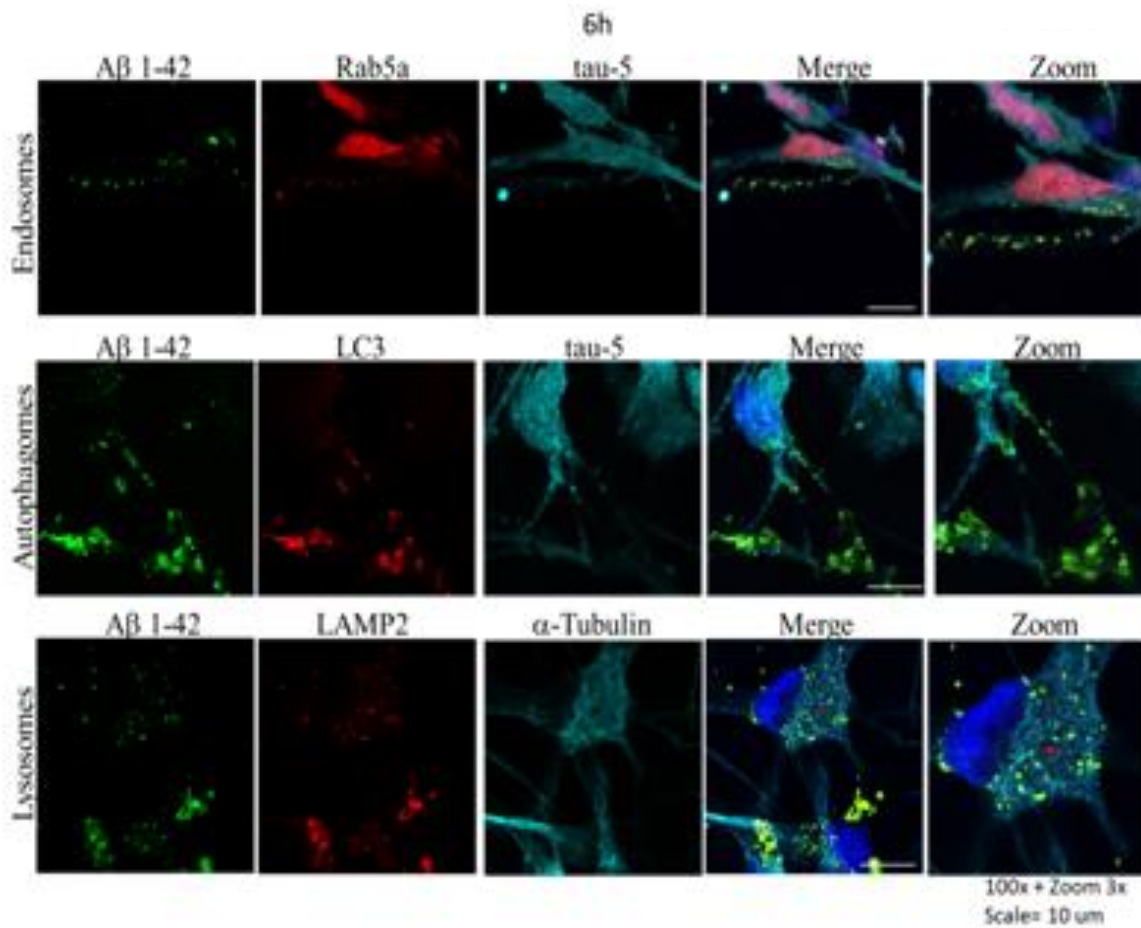


Figura 62. Cinética de localización subcelular de los oligómeros de Amiloide Beta marcados con fluoresceína (AB 1-42) en las células precursoras de hipocampo humano. La presencia de los oligómeros en las células genera la activación de procesos de endocitosis, autofágico y lisosomales como procesos de degradación del amiloide beta.

## 7. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los estudios de inmunocitofluorescencia mostraron que las células hHIPP-009 no diferenciadas presentan características de células madres/precursoras neurales dado los marcadores de Nestina y Ki67 que se presentaron en los medios de crecimiento Neurobasal Completo así como el cambio de medio para la sensibilización de las células ITS 0.001% no afecta dicho patrón de marcadores de células precursoras (Figura 24) y en presencia de ambos medios de crecimiento el fenotipo comprometido a diferenciación es en su mayoría Neuronal por la alta expresión de BIII Tubulina y en menor cantidad de GFAP referenciado hacia glía así mismo el medio de sensibilización (ITS 0.001%) muestra una disminución en el marcador GFAP (Figura 23) representando un modelo adecuado de células que presentan patrones de expresión similares a las células del hipocampo, confiriéndoles importancia y gran ventaja a las células hHIPP-009 que se comienzan a utilizar en la actualidad con respecto a los métodos para la diferenciación dirigida de células iPS humanas en neuronas del hipocampo que no están completamente desarrollados (Lancaster, 2013). Por lo que el hipocampo desempeña un papel importante en la consolidación de la información de la memoria a corto plazo para luego transformarse a memoria a largo plazo y en el aprendizaje espacial; también es una región central del cerebro donde se desarrollan trastornos neurológicos tales como la esquizofrenia, la epilepsia y la Enfermedad de Alzheimer (Kravitz, 2013), aquí radica el grado de importancia del presente estudio pues a partir de este modelo de células neurales hipocampales se pretende entender el comportamiento fisiológico de dichas células en presencia de amiloide beta.

A continuación, se presentan pruebas de las células HIP-009 y el efecto fisiológico de los oligómeros de amiloide beta a concentraciones fisiológicas. Es ampliamente aceptado que los sistemas de cultivo de células humanas son más relevantes que los sistemas no humanos en la obtención de información directamente aplicable a la fisiología humana y la patología. Sin embargo, los cultivos derivados a partir de tejidos sólidos humanos son limitados. Los recientes avances en la biología de células madre ha permitido el establecimiento de células madre embrionarias con la derivación de células madre neurales a partir de estas células madre pluripotentes. Las células madre neurales y neuronas específicas de enfermedad también pueden ser cultivadas de células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) derivadas de pacientes con enfermedades neurológicas, y estos cultivos celulares de tejidos específicos de la enfermedad ofrecen ahora nuevos modelos in vitro de enfermedades humanas. A pesar de la importancia de los cultivos de células madre neurales existen problemas técnicos en el mantenimiento de las poblaciones de células sanas limitando su uso generalizado.

Sin ensayos sistemáticos para la optimización de las condiciones de cultivo de hNSC, las condiciones más favorables para los cultivos de roedores se han aplicado en cultivos de hNSCs, con resultados decepcionantes e inconsistentes. Parte de este estudio demuestra una clara diferencia en las condiciones de cultivo óptimas entre los medios de crecimiento químicamente definidos para las

células precursoras neurales (Rhee, 2013). La diferencia radica en la sensibilidad a las concentraciones de insulina, un suplemento esencial conocido por ser necesario en cultivos de células neuronales, el cultivo de hHIPP en medios distintos de crecimiento en los cuales se retiró la presencia del suplemento B27 caracterizado por la presencia de insulina transferrina y selenio (ITS), y el medio definido con presencia de insulina con variaciones de 1, 0.01 y 0.001% de ITS muestra que la viabilidad celular varía dentro de un rango estrecho de concentraciones relativamente bajas de insulina (Figura 25), donde la tasa de muerte celular inducida por la ausencia o concentraciones bajas de insulina se encuentra solo a concentraciones bajas mostrando un efecto protector por parte de la insulina a concentraciones muy altas. Es evidente que muchos de los últimos fracasos experimentales e inconsistencias en el cultivo de células precursoras neurales es probablemente debido a la comprensión insuficiente de la sensibilidad a la insulina para las células neuronales de humanos.

Derivado de los aspectos prácticos, los resultados de este estudio proporcionan reflejo de las posibles implicaciones fisiológicas. El cerebro ha sido considerado como un órgano insensible a la insulina, pero este concepto ha sido abandonado (Rulifson, 2002). La insulina y su receptor están altamente expresados en el desarrollo y en cerebros adultos. La progresión del desarrollo neuronal a través de la proliferación, diferenciación, maduración y la supervivencia es estimulada, por lo menos en los cultivos, por la insulina y la proinsulina precursor de insulina (Schulingkamp, 2000). Como resultado, estas moléculas pueden ahora ser considerados altamente importantes en varias etapas de señalización del desarrollo del SNC. Por otro lado, en el cerebro adulto, la elevación de la insulina circulante altera las funciones cerebrales como la memoria (Greenwood, 2001), cognición (Leibson, 1997), el comportamiento de alimentación, y la modulación del auditiva (Kern, 1994).

Por otra parte, los estudios epidemiológicos han establecido la asociación clínica entre hiperinsulinemia (diabetes tipo II) y las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson (Watson, 2004), por lo que la activación de Akt intracelular en células neuronales humanas genera respuesta a la exposición de altas concentraciones de insulina a través de la activación IRS-1. Estos resultados indican que la activación de Akt es un paso crucial en la vía de señalización intracelular regulación de la supervivencia de NSCs y células neuronales (Zhao, 2007). Proceso que debía ser reducido en cuanto a la activación de vías de señalización para poder observar los efectos de los oligómeros de Amilode beta a través de la vía AKT involucrada en procesos de sobrevivencia celular por lo que la reducción de la insulina involucrada en dichos procesos fue un mecanismo adecuado para sensibilizar a las células precursoras neurales de hipocampo humano. Otros estudios deben llevarse a cabo para confirmar los efectos de la dosis de insulina y la duración del tratamiento en las células neuronales hipocampales humanas observadas en este estudio en los sistemas experimentales más relevantes de la fisiología. Teniendo en cuenta la diferencia observada dependiente del medio en la respuesta a la insulina, será importante que cualquier estudio de seguimiento que utilicen sistemas experimentales derivados de seres humanos, que sean compensados con su respectivo sistema de cultivo y crecimiento óptimo.

La **caracterización oligomérica de A $\beta$**  en los distintos medios de crecimiento permitió asegurar la presencia de formas solubles de dicho péptido para iniciar la evaluación del posible papel **biológico que el A $\beta$**  juega en las células hipocampales de seres humanos normales y que podrían estar afectados en los pacientes que sufren de Alzheimer que aún siguen sin ser esclarecidos. Estudios genéticos, así como un gran número de experimentos *in vitro* e *in vivo*, proporcionan una evidencia convincente de que **el A $\beta$  1-42** es un agente causal directo para la EA. Lo que queda claro es el conjunto relevante de **conformaciones que el A $\beta$  1-40 y 1-42** adoptan y los cuales se encuentran asociados a la patología de la enfermedad. Los primeros estudios **proporcionan pruebas de que A $\beta$**  adquiere una conformación fibrilar e induce niveles significativos de neurotoxicidad *in vitro* (Pike, 1993), o la fosforilación de tau inducida por **el A $\beta$**  (Busciglio, 1995). Recientemente, varios estudios han descubierto tanto *in vitro* e *in vivo* actividades biológicas asociadas con las formas oligoméricas solubles y **conformaciones protofibrilares de A $\beta$** , desafiando la idea de que el amiloide fibrilar es el agente patógeno causante de la AD. Los primeros estudios que caracterizaron formas oligoméricas solubles de **A $\beta$**  (Oda, 1995), dieron la introducción al concepto en el que las fibrillas de amiloide no son la única conformación biológicamente relevante **A $\beta$** , se sabe que en pacientes sanos existe la presencia de formas **oligoimerizadas solubles de A $\beta$**  pero muy poco se sabe respecto de su participación en los procesos de regulación fisiológica a nivel molecular. Por lo cual parte de este trabajo pretende dilucidar dicho papel a partir de las formas **oligoméricas del A $\beta$**  amiloidogénico 1-40 y la 1-42 las que fueron previamente solubilizadas en HFIP para la formación de soluciones de péptidos producidos de manera uniforme y monomérica que estaban libres de otras formas estructurales presente en las poblaciones de liofilizados comercialmente disponibles, sentando las bases fundamentales para los estudios de agregación controlados.

A partir de este material de partida estructuralmente y químicamente idénticos, las poblaciones conformacionalmente distintas de oligómeros y formas fibrilares se produjeron mediante la variación del tipo de medio de cultivo y el tiempo de incubación. El tiempo de incubación tenía un efecto marcado sobre la conformación del **A $\beta$  1-42** pero muy bajo para el **A $\beta$  1-40** en la que la mayoría de las estructuras que se formaron dentro de las 24 horas se mantuvieron hasta las 72 horas, mientras que para el 1-42 fue marcada la variación de las distintas especies de **A $\beta$** . La concentración y la temperatura se mantuvieron constantes para las incubaciones de **A $\beta$**  en particular la formación de fibrillas se observa predominantemente en el **A $\beta$**  más fibrologénico que corresponde al 1-42 con respecto al 1-40 y aún más marcado en el tipo de medio en el que se incubaba la muestra los medios que contienen Neurobasal propician la formación de fibras y protofibrillas mientras que los medios de definidos de ITS en menor cantidad manteniendo las formas monoméricas y oligoméricas formas que fueron demostradas en la técnica de AFM donde el medio de ITS 0.001% a tiempos de 24, 48 y 72 horas muestra solo la presencia de oligómeros de amiloide beta, mientras que en el medio de Neurobasal completo se observa presencia de formas protofibrilares a partir de las 24 horas probablemente para la observación de formas fibrilares en AFM se requirieron períodos de incubación más largos. En conjunto, estos resultados definen condiciones específicas para

controlar de forma reproducible la formación de agregados, oligoméricos, y fibrilares de 1-42 en los medios para los ensayos biológicos.

Las conformaciones estructurales  $A\beta$  que se formaron en las condiciones utilizadas en este estudio fueron discriminados fácilmente por AFM, mientras que el análisis de transferencia por Western SDS-PAGE confirmó parcialmente los hallazgos de AFM. A la luz de las diferencias estructurales detectadas por AFM, está claro que algunos de los conjuntos de  $A\beta$  1-40 y 1-42 que se forman bajo el proceso de oligomerización desarrollados en este estudio se disocian en SDS-PAGE (Figura 32, 33, 34, 35, 36, 37 y 38). En particular, las morfologías estructurales distintas del 1-42 resultantes de los cambios de medio no podrían diferenciarse claramente por el análisis de Western SDS-PAGE. Además, el proceso electroforético, la combinación de glicerol, y el detergente presente en el buffer de corrida SDS en realidad pueden inducir la formación de oligómeros de SDS-estables ya reportados (Levine, 1995). Esto puede generar formas oligoméricas-SDS, trímeros, tetrámeros e incluso fibrilares detectados en preparaciones de  $A\beta$  1-40 y 1-42 que no aparecieron en forma de agregadas por la AFM (Figuras 26, 27, 28, 29, 30, 31).

A pesar de estas limitaciones, se observaron algunas tendencias generales entre el análisis por Western SDS-PAGE de las preparaciones incubadas con  $A\beta$  1-42 para la formación de oligómeros y fibrillas (Figuras 28, 31, 37, 39).

Otra prueba de que el SDS-PAGE por sí sola no puede detectar la distribución de **monómeros y oligómeros de  $A\beta$**  tal como existe en solución proviene de estudios utilizando ultracentrifugación analítica (Levine, 1995) y espectrometría de masas (Palmlblad, 2002). Estos estudios, como el estudio de reticulación covalente, revelaron un complejo equilibrio y una dinámica entre monómeros y oligómeros. Por lo tanto, no parece posible equiparar una conformación de agregados de  $A\beta$  1-40 o 1-42 visualizados por AFM a una banda de peso molecular particular del análisis por Western SDS-PAGE.

La presencia física de las placas de amiloide in vivo demuestra que, en algún momento, existen condiciones favorables para su formación. Sin embargo, in vitro la formación de fibrillas se produce en condiciones en las que las concentraciones  $A\beta$  son decididamente no fisiológicas. Las tendencias observadas en este estudio sugieren que a concentraciones más bajas y en condiciones de solución fisiológica de  $A\beta$  1-42 adopta una conformación oligomérica favorable estable. La evidencia en la literatura sigue construyendo el apoyo a **un papel central causante al  $A\beta$**  en la neuropatología de la EA (Murphy, 2010). Es necesario una mejor comprensión de cómo funcionan las estructuras del  $A\beta$ . Los experimentos in vitro reportados en este estudio proporcionan una visión única de las condiciones que controlan el complejo proceso de **montaje de  $A\beta$**  mediante la utilización de un único material de partida homogéneo para producir múltiples especies con distinta conformación, mediante la variación de las condiciones de incubación. La comprensión del ensamblaje y la actividad biológica de las formas monoméricas, **oligoméricas y fibrilares de  $A\beta$**  es importante porque influye en las estrategias terapéuticas para enfermedades como el Alzheimer las

cuales son mejor dirigidas a la eliminación de conjuntos  $A\beta$  o deposición de la placa. Los experimentos que tengan en cuenta las **diferencias conformacionales  $A\beta$**  lograrán resultados más consistentes e interpretables, proporcionando la infraestructura biológica para el desarrollo de terapias exitosas para el tratamiento de la EA.

Para investigar más a fondo la relación entre el estado de agregación del péptido y la viabilidad de las células precursoras neurales, se aplicaron **oligómeros de  $A\beta$  1-40 y 1-42** al medio de crecimiento (ITS 0.001%) de las células precursoras neurales hipocampales humanas a distintos tiempos 24, 48, 72 y 96 horas variando la concentración de los péptidos. El aumento de la concentración de oligómeros de amiloide beta favorecerían la formación de protofibrillas y fibrillas y por lo tanto un cambio consistente negativo en la **viabilidad neuronal tanto del  $A\beta$  1-40 y 1-42**, efecto que solo se observa a las 24 horas con el  **$A\beta$  1-40** a concentración de 30  $\mu$ M (Figura 40), dicho péptido no presenta otro efecto (Figura 41, 42 y 43), **a diferencia del  $A\beta$  1-42** que a las 24 horas no existe efecto negativo o positivo en la viabilidad (Figura 44) pero a partir de las 48 horas a concentración de 5  $\mu$ M se presenta un efecto favorable en la viabilidad de las células precursoras **neurales con el  $A\beta$  1-42** efecto que se mantiene hasta las 96 con concentraciones bajas (Figuras 45,46,47), una posible interpretación de estos datos es que en las primeras etapas de la vida y antes del desarrollo de la enfermedad de Alzheimer y, **cuando el exceso de  $A\beta$**  es suficiente para formar oligómeros y mantener formas monoméricas pero no agregados fibrilares, estos podrían activar una mecanismo compensatorio para reemplazar las neuronas perdidas o dañadas por el aumento de la diferenciación de los progenitores neuronales en nuevas neuronas (Dahlgren, 2002). A medida que pasa el tiempo y se forman las placas seniles, el equilibrio podría cambiar a  **$A\beta$  fibrilar** que podría ser más neurotóxico.

Los mecanismos de viabilidad celular incluyen a los receptores de neurotrofinas clásicos que son esenciales en el desarrollo del sistema nervioso. Los experimentos evaluando un efecto directo del **péptido  $A\beta$**  en las hHIPP-009 podría generar la liberación de un factor neurotrófico que luego actuara sobre estos receptores. Por lo que es posible que **la participación fisiológica de  $A\beta$**  esté dada por la interacción con los receptores TrK y su correspondiente activación o con otras proteínas tirosina cinasas de la superficie que podría activar TrK y producir el efecto favorable de la viabilidad e incluso de neurogénesis (Gong, 2002). Hemos examinado la activación del receptor TrkB a través de su ligando específico BDNF en las células hHIPP-009 las cuales mostraron activación del receptor TrkB (Tyr706) (Figura 49) **así mismo los oligómeros de  $A\beta$  1-42** son capaces de modular la activación del receptor a BDNF (Figura 50) lo que ocasionó la evaluación de las vías de señalización río debajo de dicho receptor donde se incluyen la vía AKT/GSK3B y el factor de transcripción CREB. Los resultados **muestran que los oligómeros de  $A\beta$  1-42** son capaces de señalar la vía Akt mediante la fosforilación de la treonina 308 (Figura 51) se sabe AKT juega un papel importante en la sobrevivencia celular y su activación es capaz de modular la inhibición GSK3B involucrada en los estados de fosforilación de la proteína tau en la EA, la señalización río debajo de AKT muestra que la activación de dicha cinasa genera la fosforilación de la Ser9 de AKT inhibiendo a la GSK3B

(Figura 52) que probablemente presente una actividad disminuida hacia los procesos de fosforilación de Tau. Otra vía involucrada en la activación del receptor TrkB es la señalización las Cinasas Activadas por Mitógenos involucrando a la molécula ERK que ha sido implicado en la regulación del crecimiento celular y la proliferación, la diferenciación y su ultimo efector es el factor de transcripción CREB el cual es capaz de generar la transcripción de factores neurotróficos que repiten el ciclo de activación y mantienen viables a las células precursoras neurales, se carece de información respecto de la modulación de ERK pero se presentan la señalización río abajo que corresponde a CREB la cual mostró una activación por la inducción de oligómeros de A $\beta$  1-42 dada la fosforilación de la Serina 133 (Figura 53) la que podría estar generando la transcripción de factores neurotróficos que estimularían la sobrevivencia neuronal de las hHIPP-009 (Figura 63). Se necesita un examen adicional de la liberación de factores por dicha activación llevada a cabo por el A $\beta$  1-42 para corroborar el circuito del péptido. Una mejor comprensión de estas vías desencadenadas por el A $\beta$  tendrían el potencial de proporcionar blancos moleculares para intervenciones terapéuticas e incluso prevenir la pérdida neuronal inducida por el A $\beta$  a concentraciones no fisiológicas y fomentan la protección neuronal.

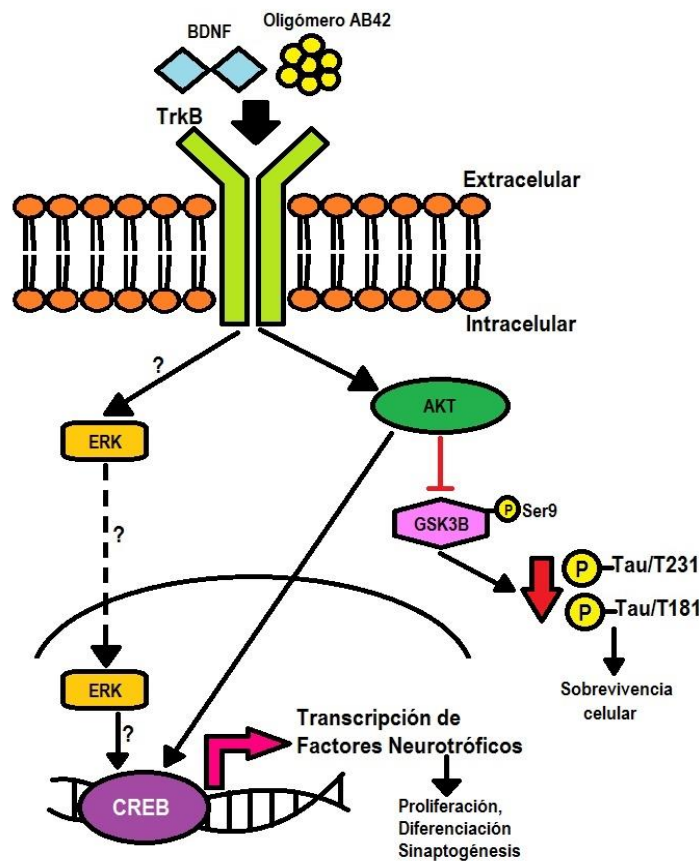


Figura 63. Vía de señalización generada por activación de los receptores TrkB a través de los oligómeros de A $\beta$  1-42. Río abajo se observa la modulación por AKT/GSK3 $\beta$ , así como la activación del factor de transcripción CREB, probablemente por la vía de ERK o través de la señalización por AKT.



La noción de que parte de la toxicidad es el resultado de la inhibición de la producción fisiológica de  $A\beta$  da peso adicional hacia la evidencia de que el remplazo de  $A\beta$  endógeno con concentraciones picomolares de  $A\beta$  exógeno recuperan la viabilidad celular. Es importante destacar que, el rescate de la muerte celular por  $A\beta$  depende de las especies de este péptido utilizado. Los efectos más pronunciados en este experimento muestran que **cuando se utiliza la especie  $A\beta$  1-42** menos predominante pero más amiloidogénica, demostró modular la viabilidad una manera dependiente de concentraciones bajas. Notablemente, **el  $A\beta$  1-42**, que está presente en concentraciones mucho más bajas en Fluido Cefalorraquídeo humano **que el  $A\beta$  1-40**, el cual resultó ser más eficiente en el mantenimiento de la viabilidad celular neural en el presente trabajo. Esto puede representar un requisito fisiológico importante del  $A\beta$  1-42 ya que pequeñas concentraciones modulan la respuesta fisiológica neuronal. Una posibilidad adicional es que los niveles de  $A\beta$  1-42 tendrían mayor facilidad de oligomerización modulando respuestas celulares favorables y que dichas concentraciones podrían ser reducidos rápidamente por los sistemas de eliminación o depuración, con respecto a las altas concentraciones del  $A\beta$  1-40 que presentaría dificultad a la hora de ser eliminado dada sus concentraciones.

Posterior se evaluaron las características **oligoméricas del  $A\beta$  1-40 y 1-42** a periodos largos en el cultivo de células precursora neurales donde se encontró que estas depuraban el amiloide beta 1-42 mientras que el 1-40 se mantenía en forma monomérica y oligomérica en el medio de crecimiento (Figura 54 y 55) aun cuando las concentraciones iniciales eran las misma esto muestra una facilidad por el modelo de estudio hacia la depuración de las concentraciones del  $A\beta$  1-42 y porque este podría modular con mayor facilidad los efectos fisiológicos sobre las células neurales, se observó que el procesamiento del amiloide beta 1-42 primeramente es capturado de forma endosomal y este posteriormente es procesado por la vía autofágica dada la colocalización del **marcador del  $A\beta$  1-42** fluoresceinado con el marcador LC3 de autofagia en la vesícula y su posterior **degradación por la vía lisosomal donde  $A\beta$  1-42** colocaliza con LAMP2 un marcador de tipo lisosomal, posteriormente se da la activación de la vía proteosomal dado el aumento de PSMB5 (Subunidad B5 del proteosoma) en el WB (Figura 56) , por lo que la autofagia es una importante vía celular asociada con la eliminación de agregados de proteínas. Unos pocos estudios han dilucidado que la autofagia juega un papel crítico en múltiples lesiones patológicas de la EA (Funderburk, 2010). La autofagia afecta a una gran variedad de vías moleculares que pueden desempeñar un **papel tanto en la generación de  $A\beta$**  y su eliminación. Sin embargo, el mecanismo exacto o el papel de la autofagia en el aclaramiento **del  $A\beta$**  sigue siendo poco claro. El presente estudio tiene cierto resultado distintivo al demostrar efectos favorables en la señalización molecular de las células precursoras neurales de hipocampo esto comparado con los trabajos llevados a cabo por Elyse Rosa y Margaret Fahnstock en los que sus trabajos previos han demostrado que **el  $A\beta$  induce la** disminución de la actividad de BDNF hacia el factor transcripción CREB. Sus trabajos de células diferenciadas de neuroblastoma humano sin estimular (SH-SY5Y) tratados con oligomérica  $A\beta$  exhibieron una reducción significativa de RNA mensajero de CREB en comparación con los controles proteínas CREB fosforilados y totales se redujeron tanto en el citoplasma y núcleo de

células tratadas con A $\beta$ . Esta disminución de la actividad de CREB es contrastada con nuestro modelo de células precursoras neurales de hipocampo humano en donde la actividad de pCREB es favorecida por las concentraciones viables de oligómeros **de A $\beta$**  estas probables diferencias marcadas por el modelo de estudio.

. El A $\beta$  funcional es abundante en la mayoría de los biofilms ambientales. Varias actividades potenciales se han descubierto para el A $\beta$ , tales como la activación de las enzimas cinasa, la protección contra el estrés oxidativo, la regulación de transporte de colesterol, que funciona como un factor de transcripción, y la actividad antimicrobiana. El A $\beta$  intracelular puede inducir una variedad de eventos celulares tales como la degradación de proteínas, el transporte axonal, la activación neuronal, la autofagia y la apoptosis, Por lo tanto, se indica que la autofagia juega un doble papel en la degradación y la **secreción de A $\beta$** . La **deposición de A $\beta$**  y la **formación de placas de A $\beta$**  se acelerarán debido a defectos en su depuración, mediada a través de una combinación de difusión a lo largo de la matriz perivascular extracelular, transporte a través de las paredes del vaso en el torrente sanguíneo, y la degradación enzimática. Varias enzimas de **degradación de A $\beta$**  como la EPN, IDE, ECE-1, y ECE-2 son críticos para la **remoción de A $\beta$** , la mayor parte son producidas por las neuronas y células gliales. La evidencia científica ha puesto de manifiesto el papel de la autofagia en el aclaramiento o depuración **de A $\beta$**  involucrando enzimas de degradación de A $\beta$ . Esto muestra que los sistemas de depuración son un sistema fisiológico que funciona en conjunto con el amiloide beta y que este es uno de los sistemas en los que se transita entre el límite de padecer la patología y presentar un proceso fisiológico adecuado por parte del amiloide beta para la señalización y su posterior depuración, donde la pérdida del balance entre depuración y producción **de A $\beta$ , este se acumula patológicamente causando toxicidad.**

Finalmente se realizó la evaluación en sitios de fosforilación de la proteína Tau, Tau se ha definido como una fosfoproteína desde 1980, esto debido a estudios en la fosforilación de la serina y treonina. Existen 79 sitios de fosforilación en la isoforma más larga de tau, dichos sitios se han dividido en 2 grupos: los que se modifican por Cinasas dirigidas por prolina (Cinasa Glucógeno Sintasa 3, GSK3) y los que pueden ser modificados por cinasa no dirigidas por prolina (Proteína Cinasa A, PKA).

Una elevación de la línea de base de p-tau 231 correlaciona con la disminución de rendimiento de la memoria. En los resultados finales hemos encontrado una disminución de p-tau 231 por la presencia **del A $\beta$  1-42** con las células precursoras neurales de hipocampo humano (Figura 60 y 61). Lo que podría asociarse con la disminución en la actividad de la GSK3B observada por la cascada de señalización de las concentraciones fisiológicas del amiloide beta 1-42 y esto podría ser benéfico para las células precursoras neurales, promoviendo su sobrevivencia (Pritchard, 2011).

## 8. CONCLUSIONES

En conclusión, encontramos en el presente trabajo de tesis que las células hHIPP-009 son una nueva herramienta fisiológicamente relevante para la evaluación **de los efectos del A $\beta$**  a concentraciones fisiológicas sobre los receptores de TrkB de BDNF los cuales se expresan en las precursoras neurales de hipocampo humano. Esto debería ayudar a desarrollar nuevos agentes terapéuticos para los trastornos relacionados con los receptores a neurotrofinas que visualicen la **señalización desencadenada por el A $\beta$**  y que tiende a fallar en los procesos de acumulación **patológica del A $\beta$** . Por otro lado, el amiloide beta 1-40 o 1-42 forma agregados de alto peso molecular (Oligómeros y fibras) en la presencia de Neurobasal + B27 + Factores de crecimiento (EGF, bFGF y LIF). Sin embargo, en presencia de Medio Químicamente Definido (ITS 0.001%) la presencia de estructuras de bajo peso molecular es predominante. Se caracterizó la preparación de **oligómeros de A $\beta$**  por AFM y Western Blot. Y las células precursoras neurales de hipocampo humano en presencia del medio químicamente definido (ITS 0.001%) expresan marcadores de células precursoras neurales (Nestina), así como marcador de proliferación (Ki67), y el marcador neuronal BIII Tubulina, y solo algunas células expresaron marcadores de astrocitos (GFAP). Los oligómeros **de A $\beta$**  1-40 y 1-42 no tuvieron efecto tóxico en las células precursoras neurales de hipocampo humano a concentraciones de 0.5  $\mu$ M a 10  $\mu$ M. **Solo A $\beta$**  1-40 a 30  $\mu$ M mostró un efecto tóxico moderado en dichas células. Los **oligómeros de A $\beta$**  1-42 a concentraciones de 0.5  $\mu$ M a 5  $\mu$ M activaron los receptores TrkB de 1 a 60 minutos durante la exposición a los oligómeros. Los **oligómeros de A $\beta$**  1-42 a concentraciones de 0.5  $\mu$ M a 5  $\mu$ M activaron AKT de 1 a 60 minutos durante la exposición a los oligómeros en las células precursoras neurales de hipocampo, los oligómeros de **A $\beta$**  1-42 a concentraciones de 0.5 y 5  $\mu$ M indujeron la fosforilación de la Serina 9 de GSK3B involucrada en su inhibición. **Los oligómeros de A $\beta$**  1-42 modulan a la baja la fosforilación de la Tirosina 231 de la proteína tau a **concentración de 5  $\mu$ M**. **El WB de A $\beta$**  mostró que los oligómeros no son detectados a partir del medio condicionado en presencia de células hHIPP-009 tratadas con **oligómeros de A $\beta$**  1-42 durante 48 horas, lo que sugiere su depuración celular, donde las imágenes de microscopía confocal de células **tratadas con péptido A $\beta$**  1-42 fluoresceinado, colocaliza con marcadores vesiculares (rab5 para endosomas, LC3 para autofagosomas y LAMP2 para lisosomas) evidenciando **la presencia del péptido A $\beta$**  en los tres compartimentos vesiculares analizados. Finalmente, **el A $\beta$**  1-42 a concentraciones fisiológicas es capaz de modular las vías de señalización de las neurotrofinas a concentraciones de 0.5 y 5  $\mu$ M presentando un papel neurotrófico en lugar de tóxico, destacando su papel fisiológico a bajas concentraciones.

## 9. APENDÍCE (Artículos y Trabajos de Congreso Internacional)

- Evaluation of the effect of amyloid beta oligomers on neurotrophins and GSK-3/creb signal transduction pathways. Lopez-Toledo, Gustavo et al. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 2015, Volume 11, Issue 7, P364.
- Growth factor removal and acidic treatment induce neuronal differentiation in human neural precursor cells (hNPCs). Gomez-Virgilio, Laura et al. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 2015, Volume 11, Issue 7, P634
- Growth factor removal and acidic changes affect the major proteolytic systems in human neural precursor cells (NPCs) and promote tau expression and oligomerization. Cardenas-Aguayo, Maria del Carmen et al. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 2015, Volume 11, Issue 7, P639
- Maria del Carmen Cardenas-Aguayo, PhD, Laura Gomez-Virgilio, M. in Sc, Gustavo Lopez-Toledo, LBD, Ubaldo García, PhD. Impact of cellular stress produced by acidic pH and growth factor withdrawal on neuronal differentiation of human hippocampal neural precursor cells (hHippNPCs): implications in neurodegenerative diseases. Para ser presentado en el Congreso Anual Neuroscience, Noviembre de 2016. San Diego, California, USA.
- Gustavo Lopez-Toledo, LBD, Laura Gomez-Virgilio, M. in Sc., Ubaldo García, PhD. Maria del Carmen Cardenas-Aguayo, PhD Regulation of neurotrophins and GSK-3/CREB signal transduction pathways by Amyloid beta oligomers in human hippocampal neural precursor cells (hHippNPCs). Para ser presentado en el Congreso Anual Neuroscience, Noviembre de 2016. San Diego, California, USA.

•P1066  
#5805



# Evaluation of the Effect of Amyloid Beta Oligomers on Neurotrophins and GSK3/CREB Signal Transduction Pathways.

Gustavo Lopez-Toledo<sup>1,3\*</sup>, María del Carmen Cárdenas-Aguayo<sup>1</sup>, Laura Gómez-Virgilio<sup>1</sup>, José Luna-Muñoz<sup>2</sup>, Marco A. Meraz-Ríos<sup>1</sup>

1- Department of Molecular Biomedicine, Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute (CINVESTAV-IPN), México City, México 07360. email: mcardenasaguayo@gmail.com  
2- Brain Bank, LaNSE, CINVESTAV, México City, México 07360  
3- National Autonomous University of Mexico (UNAM), FES Cuahuhtitlán, Diagnostic Biochemistry

## ABSTRACT

**Background:** Amyloid Beta (Aβ) is a peptide generated by the amyloidogenic pathway of APP processing. Although Aβ peptides are produced at high amounts in pathological conditions, they are also present in low levels in normal brains. It is not clear the role of Aβ in non-pathological conditions. Monomeric Aβ undergoes conformational transitions and proceeds to form low molecular oligomers (protofibrils), and then soluble high molecular aggregates and progress to form fibrillar oligomers which are composed of 12 to 24 monomers, which prolong to protofibrils and finally become insoluble fibrils. At high concentrations (nanomolar to micromolar) Aβ causes neurotoxicity and cell death. However, it has been proposed that low concentration (picomolar) of Aβ could act as trophic signal and as modulator of synaptic activity, with implications in memory and learning (Cárdenas-Aguayo et al., 2014). Aβ peptide exerts a neurotrophic role when low concentrations of the peptide are added to undifferentiated hippocampal neurons. It has been reported that Aβ42 acts through the p75 neurotrophin receptor to stimulate neurogenesis in the SVZ, in adult mice. It is possible that Aβ could act through the neurotrophins receptors, since neurotrophins such as BDNF are a family of proteins that stimulate neuronal cell survival, differentiation and synaptogenesis. Understanding the physiological functions of Aβ, could help to elucidate its role during health to disease.

**Methods:** By western blot and immunocytochemistry studies, we had investigated the role of low physiological concentrations of Aβ42 oligomers in the modulation of the neurotrophins and the GSK-3/CREB signal transduction pathways, in human fetal neural precursor cells (hNPCs). We prepared oligomeric Aβ42 following Klein's protocol and characterize the sample by AFM and Western blot.

**Results:** Our results show no toxic effects of Aβ42 oligomers in hNPCs in treatments from 6, 12, 24 and 48h. We analyzed TrkB activation by Aβ42 and compared to BDNF activation of TrkB receptor. We also analyzed the activation of CREB by Aβ42 oligomers and the possible modulation of BDNF expression by this peptide.

**Conclusions:** We conclude that Aβ42 at physiological concentrations is able to modulate the neurotrophins pathway that having a neurotrophic role rather than being toxic.

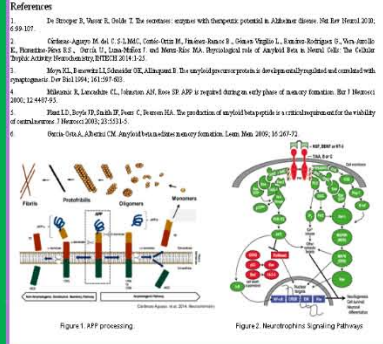
## INTRODUCTION

Amyloid Beta (Aβ) is a peptide generated by the amyloidogenic pathway of APP processing. Initially APP, a transmembrane protein, is cleaved by α- or β-secretase (Figure 1), generating large, soluble, secreted fragments (AβPPs and sAPPs) and membrane associated carboxy-terminal fragments (CTFs). Aβ peptides could vary in size, from 38 to 43 amino acids, being the predominant isoforms the Aβ 1-40, 90%, and the more fibrillogenic Aβ 1-42, 10%, and they are generated after β-secretase (also known as BACE1, β-site APP cleaving enzyme) cleavage, followed by γ-secretase cleavage [1]. Aβ peptide has the ability of auto-aggregate, so it could exist as monomers, dimers or oligomers, which in turn can generate fibrils, that have β-sheet structure, and could deposit to form extracellular plaques (senile plaques).

Amyloidosis is a condition in which normally soluble proteins become insoluble and are deposited in the extracellular space of various tissues. The extracellular deposits of Aβ are characteristic of several neurological conditions including Alzheimer's Disease, Down's syndrome, brain traumatic injuries, and ageing. Particularly Aβ is the predominant protein in the plaques, which are one of the principal histological hallmarks of Alzheimer's disease brains. Alzheimer's disease is the most common cause of dementia among older people, and is characterized by a progressive cognitive decline and loss of memory and the inability to perform common tasks.

Although Aβ peptides are produced at high amounts in pathological conditions, they are also present in low levels in normal brains, particularly during synaptic activity. For many years it has not been clear the role of APP and Aβ in non-pathological conditions, and it was thought that Aβ was an incidental product of the catabolism of APP without a physiological role. APP is an integral transmembrane protein with high affinity to copper, ubiquitously expressed and it has been reported that APP is involved in neurodevelopment and is required for neuronal growth. APP also participates in synaptogenesis<sup>3</sup> and cell adhesion. Moreover, anti-APP antibodies block memory formation<sup>4</sup>.

The functional properties of the Aβ have not been completely elucidated, however numerous studies have suggested that the peptide possesses neurotrophic properties<sup>5,6</sup>. Recently it was suggested that soluble Aβ plays important roles in the facilitation of neuronal growth, cellular survival, in the modulation of synaptic function and defense against oxidative stress. Also, the physiological concentrations of Aβ favor the learning and memory processes.



## METHODS

Cell culture: Human fetal hippocampal NPCs (hNPCs; Phoenix-Song Biologics, USA)  
Laminin (10 μg/ml) was used as substrate for growing the cells  
Growing culture conditions: Neurobasal plus 1x B27, plus 10 ng/ml EGF, 20 ng/ml LIF and 10 ng/ml CNTF  
Culture Conditions for the experiments: Chemically Defined Medium (ITS 0.001% according to [18] at 4, 2d [18], DMEM-F12, 11 nM containing 232 ng/ml glutamine, penicillin/streptomycin (0.5 mg/ml 5 U/ml), insulin 25 ng/ml, transferrin 100 ng/ml, selenium 30 nM, putrescine 60 nM, progesterone 20 nM and glucose 10.0%  
Aβ Oligomers were prepared according to Klein's protocol (Klein 2002).  
Evaluation of Cell viability in the culture conditions by LDH (Promega WST-1) (Roche) viability assay.  
Immunological detection of Aβ peptides and the phosphorylation of neurotrophins receptors, Akt, GSK3B and CREB at different time points of treated with Aβ peptides.  
409 antibody (Covance) was used to detect Aβ oligomers.  
Immunocytochemistry and Confocal imaging for detection of neural precursor cell, neuronal and glial markers, as well as vesicular markers (rafts for endosomes, LC3 for Autophagosomes and LAMP2 for Lysosomes).  
Atomic force microscopy (AFM) was used to investigate the three-dimensional structure of aggregated Aβ and characterize aggregation size, structure, and distribution. Figure 7 shows the 3D analysis of Aβ oligomers morphology using AFM. The scaling profiles correspond to the different thickness of globular aggregates along a z-axis (fiber height above the z-imaging surface).  
All results were analyzed using Image Lab from BioRAD, GraphPad Prism, LISAF file of Leica software. The statistical test used was One Way ANOVA, Posthoc, Bonferroni, ns 0.05 was considered statistically significant. All experiments were done triplicate, in at least three independent experiments.

## RESULTS

Fig. 6. Confocal images of immunostaining of Neural precursor, Neuronal and Glial markers of Hippocampal cells cultured in Defined Medium (ITS 0.001%, 24 h).

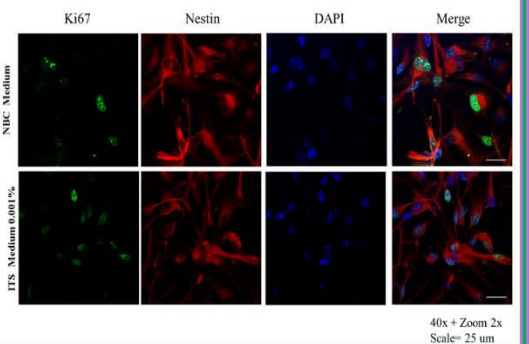
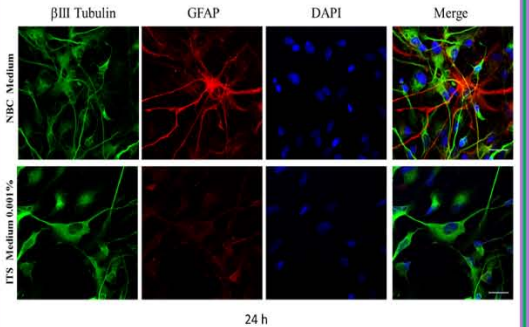


Figure 7. Atomic Force Microscopy (AFM). Tapping of Aβ oligomers and fibrils formation in different culture medium and incubation at 4°C for 24h for amyloidogenesis.

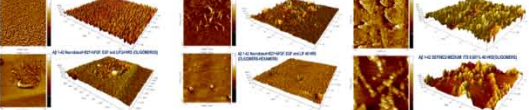


Figure 8. In vitro time course of Aβ oligomers and fibrils formation in different culture medium.

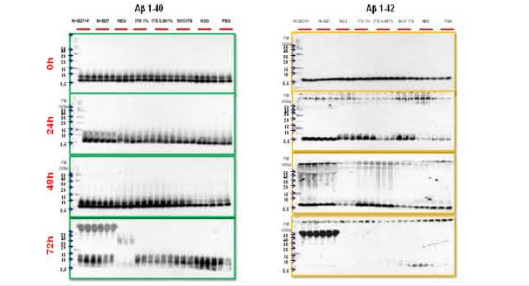


Fig. 9. Modulation of TrkB, AKT, GSK3B and CREB by Aβ oligomers 1-42 in human fetal Hippocampal Neural precursor cells.

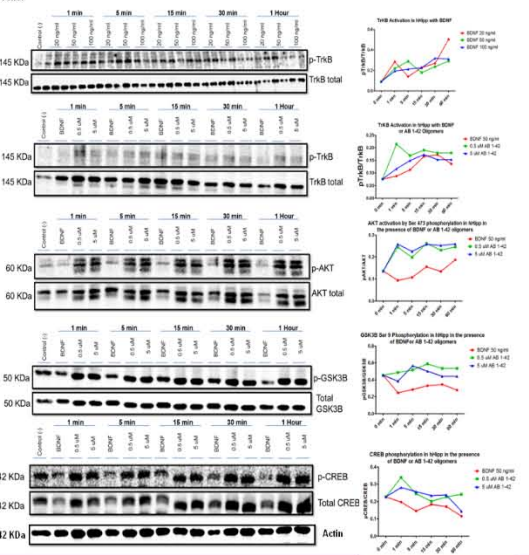


Fig. 10. Immunoblots of Aβ oligomers, detected with 4E8 antibody in Conditioned medium of cells incubated with Amyloid beta for 24 h and 48h.

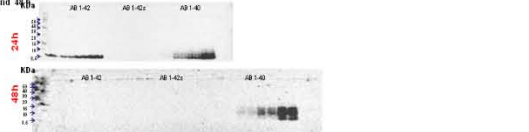


Figure 11. Time course of the tubulin localization of Aβ 1-42 oligomers in hNPCs.

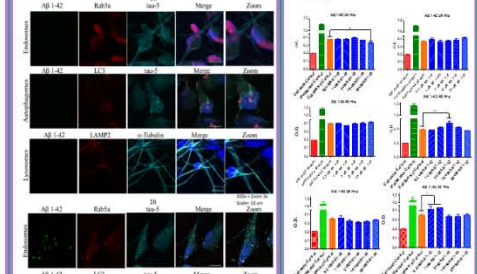
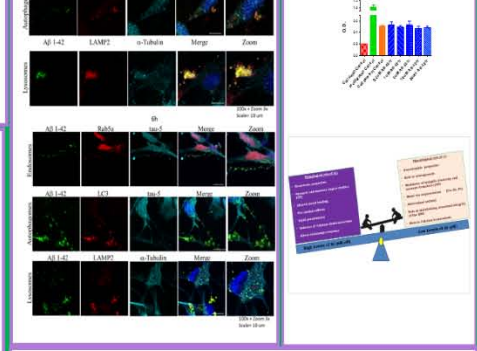


Figure 12. Time course of the effect of Aβ Oligomers in Cell Viability.



## CONCLUSIONS

- Aβ 1-40 or 1-42 form higher molecular aggregates (Oligomers and fibrils) in the presence of Neurobasal + B27 and growth factors (EGF, bFGF and LIF). However in the presence of the Chemically Defined Medium (ITS 0.001%), the low molecular weight oligomers are predominant instead of the fibrils. We characterize our Aβ oligomeric preparation by AFM.
- hNPCs cultured in the presence of the Chemically Defined Medium (ITS 0.001%) express the neural precursors cell marker (Nestin), the proliferation marker (Ki67), the neuronal marker βIII-Tubulin, and only few cells express the Astrocytes marker (GFAP).
- Aβ oligomers 1-40 and 1-42 had no toxic effect on Fetal hNPCs at concentrations from 0.5 μM to 10 μM. Only Aβ 1-40 at 30 μM had a moderate toxic effect on these cells.
- Aβ oligomers 1-42 at 0.5 μM to 5 μM activate TrkB receptor from 1 to 60 min of exposure to the oligomers in hNPCs.
- Aβ oligomers 1-42 at 0.5 μM to 5 μM activate Akt from 1 to 60 min of exposure to the oligomers in hNPCs.
- Aβ oligomers 1-42 at 0.5 μM to 5 μM induced Ser 9 phosphorylation of GSK3B from 1 to 60 min of exposure to the oligomers. Suggesting the inactivation of GSK3B by Aβ oligomers in hNPCs.
- Concomitant with TrkB activation, there is a peak of CREB phosphorylation at 1 min of treatment with Aβ oligomers 1-42 at 0.5 to 5 μM in hNPCs.
- Immunoblots of Aβ showed that oligomers were not detected from the conditioned medium of cells treated with Aβ oligomers 1-42 for 48h, suggesting its cellular uptake.
- Confocal Images of cells treated with the Fluoresceinated Aβ 1-42 peptide, co-labeled with vesicular markers (rafts, for endosomes, LC3 for Autophagosomes, and LAMP2 for Lysosomes), evidenced the presence of Aβ peptides in all three vesicular compartments analyzed.
- We conclude that Aβ42 at physiological concentrations is able to modulate the neurotrophins pathway at 0.5 μM to 5 μM concentrations, thus having a neurotrophic role rather than being toxic.

## Acknowledges

We thank the National Research Council of Mexico (CONACYT) for the grant number CB-2013-01 222193. We are grateful to the Alzheimer's Society for the Travel Fellowships.

## 10. REFERENCIAS

- 1) Alfaro, V. (2005). Fisiología Animal. Barcelona: Universidad de Barcelona.
- 2) Alzheimer's-Association. (2016). La Enfermedad de Alzheimer y el cerebro. Obtenido de <https://www.alz.org/espanol/about/cerebro/09.asp>. Consultado el 2 de Octubre de 2015.
- 3) Ansermet, F. (2005). A cada cual su cerebro. Plasticidad neuronal e inconsciente. Discusiones. México.
- 4) Araque, G. (2001). Dynamic Signaling between Astrocytes and neurons. Review of physiology.
- 5) Arévalo, J. (2006). Neurotrophin signaling: many exciting surprises! Cell. Mol. Life Sci.
- 6) **Balu, D. (2009). "Adult Hippocampal Neurogenesis: Regulation, Functional". Neurosci Biobehav Rev, 1-33.** Obtenido de <https://uvadoc.uva.es/bitstream/10324/1417/1/TFM-M%206.pdf>. Consultado el 29 de Enero de 2016.
- 7) Beecher, W. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. Journal Neurology, 1-11.
- 8) Busciglio, J. (1995).  $\beta$ -Amyloid fibrils induce tau phosphorylation and loss of microtubule binding. Neuron, 879-888.
- 9) Buzsáki, G. (1990). Chapter 19 Chapter Spatial organization of physiological activity in the hippocampal region: relevance to memory formation. Progress in Brain Research, 257-268.
- 10) Cardenas-Aguayo. (2014). Physiological Role of Amyloid Beta in Neural Cells: The Cellular Trophic Activity. Neurochemistry, 1-26.
- 11) Cardenas-Aguayo. (2016). Alzheimer's disease research in Ibero America. Alzheimer and Dementia, 749-754.
- 12) Chasseigneaux, S. (2012). Functions of A $\beta$ , sAPP $\alpha$  and sAPP $\beta$ : similarities and differences. J Neurochem, 99-108.
- 13) Cheung, V. (2002). The genetics of variation in gene expression. Nature Genetics Supplement.
- 14) Churcher, I. (2005). Gamma-secretase as a therapeutic target for the treatment. Curr Pharm Des, 3363-3382.

- 15) Dahlgren, K. N. (2002). Oligomeric and Fibrillar Species of Amyloid- $\beta$  Peptides Differentially Affect Neuronal Viability. *The Journal of biological chemistry*, 1-9.
- 16) Ernst, A. (2014). Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. *Cell*, 1072-1083.
- 17) Farris, W. (2003). Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc Natl Acad Sci* , 4162-4167.
- 18) FIBAO, M. m. (15 de 02 de 2011). medmol.es. Recuperado el 15 de 03 de 2015, de [http://medmol.es/imprimir\\_pdf.cfm](http://medmol.es/imprimir_pdf.cfm)
- 19) FitzGerald. (2012). *Clinical neuroanatomy and neuroscience*. Edinburgh: Sanders.
- 20) Fukushima, K. (2014). Characterization of Human Hippocampal Neural Stem/Progenitor Cells and Their Application to Physiologically Relevant Assays for Multiple Ionotropic Glutamate Receptors. *J Biomol Screen*, 1-15.
- 21) Fundación-pasqual-maragall. (11 de 09 de 2016). Por un futuro sin alzheimer. Obtenido de <https://fpmaragall.org/alzheimer-enfermedad/enfermedad-alzheimer/>. Consultado el 22 de Febrero de 2016.
- 22) **Funderburk, S. F. (2010). Cell "Self-Eating" (Autophagy) Mechanism in Alzheimer's Disease.** *Mt Sinai J Med*, 59–68.
- 23) Gage. (2013). Neural Stem Cells: Generating and Regenerating the Brain. *Neuron*, 588-601.
- 24) Gage, F. (2000). Mammalian neural stem cells. *Science*, 1433-1438.
- 25) GALERA, M. (2015). *Relación entre inteligencias múltiples, creatividad y rendimiento académico en matemáticas*. España: Antrophica.
- 26) Gerrig, R. (2009). *Psicología y Vida*. Mexico: Pearson education.
- 27) Glabe, C. G. (2008). Structural Classification of Toxic Amyloid Oligomers. *JBC Papers in Pres*, 20639-20643.
- 28) Gong, Y. (2002). Alzheimer's disease-affected brain: Presence of oligomeric A $\beta$  ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *PNAS*, 1-6.
- 29) Greenwood, C. E. (2001). Glucose Treatment Reduces Memory Deficits in Young Adult Rats Fed High-Fat Diets. *Neurobiology of Learning and Memory*, 179-189.
- 30) Gutiérrez, O. (2007). Adult neural stem cells, neuronal regeneration and Parkinson's disease: two years since the beginning. *BIOPS*.

- 31) Haapasalo, A. (2011). The Many Substrates of Presenilin $\gamma$ -Secretase. *J Alzheimers Dis*, 3-28.
- 32) Haass, C. (2012). Trafficking and Proteolytic Processing of APP. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 1-25.
- 33) Hampel, H. (2011). The future of Alzheimer's disease: the next 10 years. *Prog Neurobiol*, 718-728.
- 34) Hempstead, B. (2015). Dissecting the diverse actions of pro and mature neurotrophins. *Curr Alzheimer Res*.
- 35) Jope, R. (2004). The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Biochemical Sciences*, 1-8.
- 36) Kandel, E. (2001). Psychotherapy and the single synapse: the impact of psychiatric thought on neurobiological research. *J.Neuropsychiatry Clin. Neurosci*.
- 37) Kern, W. (1994). Effects of insulin and hypoglycemia on the auditory brain stem response in humans. *J Neurophysiol*, 678-683.
- 38) Klein, W. (2005). Globular amyloid  $\beta$ -peptide1-42 oligomer - a homogenous and stable neuropathological protein in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 14.
- 39) Kravitz, E. (2013). Hippocampal Glutamate NMDA Receptor Loss Tracks Progression in **Alzheimer's Disease: Quantitative Autoradiography in Postmortem Human Brain**. *Plos One*, 1-16.
- 40) Kumar-Singh, S. (2008). Cerebral amyloid angiopathy: pathogenetic mechanisms and link to dense amyloid plaques. *Genes, Brain and Behavior*, 67-82.
- 41) Lancaster, M. A. (2013). Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*, 1-38.
- 42) Leibson, C. L. (1997). Risk of Dementia among Persons with Diabetes Mellitus: A Population-based Cohort Study. *American Journal of Epidemiology*, 1-8.
- 43) Levine, H. (1995). Soluble multimeric Alzheimer A $\beta$  (1-40) pre-amyloid complexes in dilute solution. *Neurobiology of Aging*, 755-764.
- 44) Martin, V. (01 de 01 de 2012). Estructura del Hipocampo. Recuperado el 20 de 02 de 2016, de <http://www.wesapiens.org/es/class/3485018/file/26/Estructura+del+hipocampo>. Consultado el 5 de Diciembre de 2015.



- 45) Martínez, I. (2013). Participación de las neurotrofinas BDNF y NT4/5 en la modulación de la comunicación sináptica cortico-estriatal. México: Tesis Licenciatura FESI-UNAM.
- 46) Martínez, I. M. (2013). Participación de las neurotrofinas BDNF y NT4/5 en la modulación de la comunicación sináptica cortico-estriatal. México: Tesis de Licenciatura FESI-UNAM.
- 47) Masters, C. L. (2012). Biochemistry of Amyloid b-Protein and Amyloid Deposits in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 1-24.
- 48) Ming, G. (2005). Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci*, 223-250.
- 49) Ming, G. (2011). Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron*, 687-702.
- 50) Morris, R. (2003). "Elements of a neurobiological theory of the hippocampus: the role of activity dependents synaptic plasticity in memory. *Phil. Trans. R. Soc.*
- 51) Müller, U. C. (2012). Physiological Functions of APP Family Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Med*.
- 52) **Murphy. (2010). Alzheimer's Disease and the  $\beta$ -Amyloid Peptide. *J Alzheimers Dis.***
- 53) **Murphy, M. P. (2010). Alzheimer's Disease and the  $\beta$ -Amyloid Peptide. *J Alzheimers Dis*, 1-17.**
- 54) Netter, F. (1999). Atlas de Anatomía Humana. Barcelona: Masson.
- 55) Nieuwenhuys, J. (2008). El sistema nervioso central humano. Madrid: Médica Panamericana.
- 56) Oda, T. (1995). Clusterin (apoJ) Alters the Aggregation of Amyloid  $\beta$ -Peptide ( $A\beta$ 1-42) and Forms Slowly Sedimenting  $A\beta$  Complexes That Cause Oxidative Stress. *Experimental Neurology*, 22-31.
- 57) OMS. (Marzo de 2015). Demencia. Obtenido de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/es/> Consultado el 20 de Enero de 2016.
- 58) Palmblad, M. (2002). Oxidation of Methionine 35 Attenuates Formation of Amyloid  $\beta$ -Peptide 1-40 Oligomers. *The journal of biological chemistry*, 1-6.
- 59) Parihar, M. (2010). Amyloid- $\beta$  as a modulator of synaptic plasticity. *J Alzheimers Dis*, 1-34.
- 60) Pencea, V. (2001). Neurogenesis in the subventricular zone and rostral migratory stream of the neonatal and adult primate forebrain. *Exp Neurol*, 1-16.

- 61) Pike, C. (1993). Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state. *The Journal of Neuroscience*, 16667-1687.
- 62) Pritchard, S. M. (2011). The toxicity of tau in Alzheimer disease: turnover, targets and potential therapeutics. *J Cell Mol Med*, 1621–1635.
- 63) Reichardt, L. (2006). Neurotrophin regulated signalling pathways. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.*
- 64) Rhee, Y.-H. (2013). Insulin concentration is critical in culturing human neural stem cells and neurons. *Cell Death and Disease*, 1-10.
- 65) Rulifson, E. J. (2002). Ablation of Insulin-Producing Neurons in Flies: Growth and Diabetic Phenotypes. *Science*, 1118-1120.
- 66) Saido, T. (2012). Proteolytic Degradation of Amyloid b-Protein. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 1-18.
- 67) Salgado-Puga, K. (2015). Amyloid  $\beta$  Enhances Typical Rodent Behavior While It Impairs Contextual Memory Consolidation. *Behav Neurol*.
- 68) Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*, 7-25.
- 69) Schulingkamp, R. (2000). Insulin receptors and insulin action in the brain: review and clinical implications. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 855-872.
- 70) Seaberg, R. (2003). Stem and progenitor cells: the premature desertion of rigorous definitions. *Trends Neurosci*, 125-131.
- 71) Sipe, J. D. (2012). Amyloid fibril protein nomenclature: 2012 recommendations from the Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis. *Amyloid*.
- 72) Small, S. A. (2011). A pathophysiological framework of hippocampal dysfunction in ageing and disease. *Nat Rev Neurosci*, 585-601.
- 73) Snells, R. (2003). *Neuroanatomía clínica*. Buenos Aires: Paramericana.
- 74) systems, R. (2015). Equilibrio molecular en el cerebro. Obtenido de <https://www.rndsystems.com/resources/technical/molecular-balance-brain-rd-systems>. Consultado el 17 de Noviembre de 2015.
- 75) Vassar, R. (2009). The  $\beta$ -Secretase Enzyme BACE in Health and Alzheimer's Disease: Regulation, Cell Biology, Function, and Therapeutic Potential. *J Neurosci*, 127812794.

- 76) Wang, D.-S. (2006).  $\beta$ -Amyloid Degradation and Alzheimer's Disease. *J Biomed Biotechnol*, 1-12.
- 77) Watson, G. S. (2004). Modulation of memory by insulin and glucose: neuropsychological observations in Alzheimer's disease. *European Journal of Pharmacology*, 97-113.
- 78) Zhao. (2007). Insulin rescues ES cell-derived neural progenitor cells from apoptosis by differential regulation of Akt and ERK pathways. *Neuroscience Letters*, 49-54.
- 79) Zhao, C. (2008). Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell*, 645-660.