



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Efecto de la proteína Klotho sobre la microglia tratada con
beta amiloide (A β)**

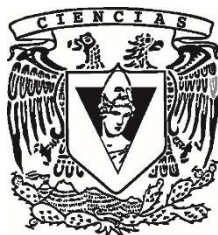
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

Jocelyn Vázquez Díaz



**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. HILDA MARTÍNEZ CORIA**

Ciudad Universitaria, CD. MX., 2020



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.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del Alumno

Vázquez
Díaz
Jocelyn
55 43 52 08 92
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
312317799

2. Datos del Tutor

Dra.
Hilda
Martínez
Coria

3. Datos del Sinodal 1

Dra.
Isabel
Arrieta
Cruz

4. Datos del Sinodal 2

Dr.
Héctor Eduardo
López
Valdés

5. Datos del Sinodal 3

Dra.
Maricela
Luna
Muñoz

6. Datos del sinodal 4

Dra.
Mónica Adriana
Torres
Ramos

7. Datos de la Tesis

Efecto de la proteína Klotho sobre la microglía tratada con beta amiloide (A β)
59 pp.
2020

Este proyecto se realizó en la Unidad de Investigaciones Cerebrales en el laboratorio Experimental de Enfermedades Neurodegenerativas del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” en conjunto con el Laboratorio de Bioquímica de Hormonas del Departamento de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla y El laboratorio de Neuroendocrinología en la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Ciencias por brindarme todas las herramientas y valores para formarme como científica.

A la Dra. Hilda Martínez Coria por su asesoramiento en este proyecto y gran paciencia para enseñarme como se debe trabajar correctamente. Así mismo por su comprensión y aprecio más allá del trato laboral.

A todo el equipo de Doctores del laboratorio experimental de enfermedades neurodegenerativas, por su ayuda, comentarios y enseñanzas en las técnicas de laboratorio, así como también, a mis compañeros por siempre hacer los ratos más a menos.

Al Dr. Carlos Arámburo de la Hoz por darme la oportunidad de poder trabajar con su equipo en el laboratorio de bioquímica de hormonas en el INB.

A la Dra. Maricela Luna Muñoz por su asesoramiento, ayuda y paciencia para poder llevar a cabo este proyecto, de igual manera por su apoyo fuera del instituto durante mi estancia en Juriquilla.

A la Dra. Isabel Arrieta Cruz y a la Dra. María Esther Cruz Beltrán por brindarme la oportunidad de trabajar con su equipo en el laboratorio de Endocrinología en la Fes Zaragoza. Igualmente a mi amigo Gil y al resto de mis compañeros que forman parte de este laboratorio por instruirme en nuevas técnicas aprendidas.

A la Dra. Mónica Adriana Torres Ramos y a la Dra. Marisol Orozco Ibarra, por brindarme sus conocimientos y ayudarme en mi formación profesional, por resolver todas mis dudas, apoyo con material, por su paciencia y tiempo.

A la Dra. Teresa Morales Guzmán por contribuir a este proyecto con la línea celular utilizada.

A la M en C. María del Rosario Baltazar Lara por su gran ayuda con este proyecto, por tener la paciencia y tiempo de resolver mis dudas en el laboratorio y por su gran amistad.

A mi compañero de laboratorio y mejor amigo Pablo Alberto Peña Castillo, porque si no hubiéramos recorrido este camino juntos, jamás lo hubiera logrado, gracias por formar parte de mi vida y hacerla más amena

A mi amiga Jerusa Elienai Balderas Márquez porque sin su ayuda, enseñanza y paciencia nada hubiera sido tan sencillo. Asimismo a todos mis compañeros y Doctores que forman parte del laboratorio de bioquímica de hormonas por compartir sus conocimientos conmigo.

A mis amigos del taller de comunicación entre las células del sistema nervioso y su implicación en enfermedades neurodegenerativas, por compartirme sus conocimientos, ayudarme en todo lo que podían y por las risas en las clases.

Dedicatorias

A mis padres Xóchitl Díaz Jaimes y Enrique Vázquez Patatuchi, quienes han sido una guía en el camino, porque gracias a ellos he podido llegar tan lejos, tanto en mi vida personal como en mi formación académica. Gracias porque con sus consejos, amor, regaños, confianza, apoyo y dedicación se han convertido en mi ejemplo a seguir y sin ustedes no sería la persona que soy ahora.

A mi hermana Odeth Vázquez Díaz por ser mi cómplice en cada etapa de mi vida, por ser mi mejor amiga y por ayudarme sin dudar en todo momento.

A mis abuelos Gustavo y María por ser unos segundos padres para mí, por llenarme de amor, sabiduría, consejos y enseñanzas para la vida que solo ellos pueden brindar.

Con mucho amor y cariño les dedico mi esfuerzo y les doy mi reconocimiento porque gracias a todo su sacrificio tengo la oportunidad de convertirme en una gran bióloga.

Índice

Resumen	7
Introducción	8
<u>Clasificación de la EA</u>	
<u>Neuropatología</u>	
Beta amiloide (A β)	
Tau	
<u>Etiología</u>	
Hipótesis de la cascada amiloide	
Hipótesis Tau	
Neuroinflamación y Alzheimer	
Antecedentes	19
<u>Factores neurotróficos</u>	
Justificación	22
Hipótesis	23
Objetivo General	23
<u>Objetivos particulares</u>	
Materiales y Métodos	23
<u>Línea Celular</u>	
<u>Cultivo celular de SIM-A9</u>	
<u>Levantamiento de microglia A9</u>	
<u>Identificación de Klotho en microglía A9 por inmunofluorescencia</u>	
<u>Tratamiento</u>	
<u>Identificación de proteína Klotho en Línea celular A9 por SDS-PAGE e</u>	
<u>inmunoelectrotransferencia (WB)</u>	
<u>Extracción de RNA</u>	
<u>Síntesis de ADN complementario (cDNA)</u>	
<u>PCR cuantitativo (qPCR)</u>	
Resultados	27
<u>Identificación de Klotho sobre la microglía SIM-A9 por inmunofluorescencia</u>	
<u>Proporción relativa de klotho en cultivos celulares de microglia SIM-A9</u>	
<u>Proporción relativa de TNF-α de cultivos celulares de microglia SIM-A9</u>	
<u>Proporción relativa de NFκB de cultivos celulares de microglia SIM-A9</u>	
Discusión	33
Conclusiones	36
Bibliografía	36
Anexos	40
<u>Anexo 1. Cultivo primario de microglia</u>	
<u>Anexo 2. Cultivo de línea celular microglía A9</u>	
<u>Anexo 3. Electroforesis desnaturizante SDS-PAGE</u>	
<u>Anexo 4. Inmunoelectrotransferencia (Western-Blot)</u>	
<u>Anexo 5. Stripping para membranas WB</u>	
<u>Anexo 6. Extracción de RNA por columna</u>	
<u>Anexo 7. Extracción manual RNA para tejidos</u>	
<u>Anexo 8. Síntesis de ADN complementario (cDNA)</u>	
<u>Anexo 9. PCR en tiempo real (qPCR)</u>	
<u>Anexo 11. Fijación e Inmunofluorescencia para células</u>	

Índice de Figuras y Tablas

Figura A: Vías proteolíticas de la APP humana.....	10
Figura B. La hipótesis de la cascada amiloide.	12
Figura C: Conexión neurona-astrocito.	14
Figura D: Cajas de cultivo.....	25
Tabla 1: Secuencia de oligonucleótidos de Klotho, TNF- α y 18s ribosomal de ratón	27
Figura 1: Identificación de Klotho sobre la microglía SIM-A9 por inmunofluorescencia.	28
Figura 2: Proporción relativa de klotho en cultivos celulares de microglia SIM- A9.....	29
Figura 3: Proporción relativa de TNF- α de cultivos celulares de microglia SIM- A9.....	31
Figura 4: Proporción relativa de NF κ B de cultivos celulares de microglia SIM- A9.....	32

Abreviaturas

KL	Klotho
EA	Enfermedad de Alzheimer
A β	Beta Amiloide
NFT	Ovillo Neurofibrilares Intracelulares
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
AICD	Dominio APP intracelular
APP	Proteína Precursora Amiloide
NGF	Factor de crecimiento nervioso
IGF-1	Factor de crecimiento tipo insulina 1
GDNF	Factor neurotrófico derivado de la glía
VEGF	Factor de crecimiento derivado del endotelio vascular)
RE	Retículo Endoplásmico
NF κ B	Factor Nuclear potenciador de las cadenas ligeras Kappa de las células Beta
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral alpha
TREM 2	Receptor transmembranal expresado en células mieloides 2
PSN1 y 2	Presenilina 1 y 2

Resumen

La enfermedad de Alzheimer es un trastorno progresivo que está asociado con el deterioro cognitivo, pérdida neuronal y diferentes niveles de daño sináptico, alrededor del 50 a 70% de la población presentan este padecimiento, se ha revelado que esta enfermedad está asociada con una acumulación de formas insolubles de la proteína beta amiloide que forman placas en espacios extracelulares, así como en paredes de vasos sanguíneos, además de la agregación de ovillos neurofibrilares intracelulares de la proteína Tau.

Se ha observado que la microglía está fuertemente afectada en los cerebros que presentan la enfermedad de Alzheimer. Se ha encontrado microglía distrófica productora de factores proinflamatorios que promueven la muerte neuronal. Sin embargo algunos factores de crecimiento como el BDNF, IGF-1 y el Klotho han mostrado un efecto neuroprotector y algunos de ellos promueven efectos antiinflamatorios sobre la microglía.

En este trabajo se analizó el papel de la proteína Klotho en el desarrollo de la patogenia de la enfermedad de Alzheimer, en particular su relación con la microglía y su capacidad para disminuir el beta amiloide.

Palabras clave: Klotho, Alzheimer, A β , microglía.

Introducción

La demencia es un trastorno progresivo que se asocia con el deterioro cognitivo, pérdida neuronal y diferentes niveles de daño sináptico. El tipo más común que se presenta en alrededor de 50 a 70% de personas con demencia es la Enfermedad de Alzheimer (EA) (Ahmed *et. al.* 2018).

Esta enfermedad fue descrita por el Dr. Alois Alzheimer en el año de 1906 (Hippius, H., Neundörfer, G. 2003). Se caracteriza por la pérdida de la memoria, deterioro cognitivo, del juicio y problemas de lenguaje. Afecta amplias áreas de la corteza cerebral y del hipocampo, las lesiones son inicialmente detectadas en los lóbulos frontal y temporal y progresivamente se extiende a otras áreas de la neocorteza.

El análisis post-mortem de pacientes con EA revela que la enfermedad está asociada con una acumulación de formas insolubles de beta amiloide (A β) en espacios extracelulares, así como en paredes de vasos sanguíneos, además de la agregación de ovillos neurofibrilares intracelulares de la proteína asociada a microtúbulos (Tau) (Colin L. Masters *et. al.* 2015). Recientemente también se ha asociado con pérdida de células colinérgicas, neuroinflamación y sinaptólisis (Kenney, K., *et. al.*; Heneka, M., *et. al.* 2015). Macroscópicamente esta enfermedad se caracteriza por un crecimiento de los ventrículos y atrofia cerebral (Hippius, H., Neundörfer, G. 2003).

Clasificación de la EA

Existen dos tipos de la EA, la primera se conoce como de inicio temprano o familiar. Los pacientes en su etapa inicial presentan pérdida de la memoria de corto plazo, confusión y cambios de humor. Es un tipo muy raro de la enfermedad que afecta a las personas que se encuentran entre las edades de 30 a 60 años y es hereditaria. El segundo tipo de EA es el más común y se conoce como de inicio tardío o esporádico y se desarrolla usualmente después de los 60 años de edad y parece ser multifactorial (Ahmed *et. al.* 2018).

Neuropatología

Como se describió anteriormente, la EA se caracteriza principalmente por la presencia en el tejido cerebral de ovillos neurofibrilares formados por la proteína tau (NFT), por la acumulación extracelular de placas amiloides comúnmente llamadas placas seniles o placas neuríticas formadas por agregados del péptido A β , neuroinflamación y muerte neuronal (Cyril Laurent, *et. al.* 2018).

Beta amiloide (A β)

El A β es un péptido de aproximadamente 40-43 aminoácidos, que se produce por la escisión proteolítica de una glicoproteína de membrana tipo 1 llamada proteína precursora de amiloide (APP), esta es una proteína de 695 aminoácidos con su dominio encontrado en el brazo largo del cromosoma 21. Juega un papel muy importante en una variedad de actividades biológicas incluyendo el desarrollo neuronal, señalización, transporte intracelular y otros aspectos de la homeostasis neuronal, así como en el transporte neuronal anterógrado y exportación de hierro (Guo-fang C., *et. al.* 2017).

El A β también tiene otras importantes funciones fisiológicas en nuestro cuerpo dependiendo de las concentraciones en las que se presente. Las funciones fisiológicamente relevantes del A β en el cerebro sano, ocurren con concentraciones picomolares, mientras el efecto tóxico ocurre a concentraciones micromolares. El A β ejerce una función autocrina, estimula la proliferación celular, promueve la adhesión celular y protege a las neuronas contra el daño oxidante. Además participa en procesos de señalización, vía proteínas G incrementando la actividad de la MAP cinasa. También, puede actuar como factor neurotrófico y neuroprotector; por un lado como regulador fisiológico de canales iónicos de K⁺ y Ca²⁺ en neuronas y por otro atrapando algunos iones metálicos potencialmente peligrosos. Además se ha observado que en concentraciones fisiológicas, el A β mejora la memoria y el aprendizaje, debido a que facilita la potenciación a largo plazo (LTP), mientras que en dosis altas la inhibe (Marek Luczkowski. 2016; Natalia Manzano-León, Jaime Mas-Oliva. 2006).

La APP es sintetizada en el retículo endoplásmico y posteriormente es transportada al complejo de Golgi, en donde completa su maduración y finalmente es transportada a la membrana plasmática, en donde puede ser cortada por la acción de algunas enzimas (Haass C., *et. al.* 1992).

El procesamiento de la APP a sus fragmentos A β 1-40 o A β 1-42 involucra la escisión en los dominios N- y C-terminal del A β por la acción de las enzimas β - y γ -secretasa respectivamente, este procesamiento de la APP está modulado por la subunidad catalítica de la γ -secretasa, la presenilina 1. El corte de la APP por la α -secretasa impide la formación del A β y conduce a la liberación de fragmentos solubles de la APP (sAPP α) (figura A). Se sabe que el A β es un producto de las células neuronales y que normalmente es encontrado en el líquido cefalorraquídeo y en el plasma. Sin embargo, cuando se agrega forma depósitos fibrilares insolubles dentro del parénquima y la vasculatura de regiones específicas vulnerables del cerebro (D.R Howlett *et. al.*; Claude M. *et. al.* 2001). Por tanto se cree que la neurodegeneración es consecuencia de la toxicidad de las formas solubles agregadas de A β .

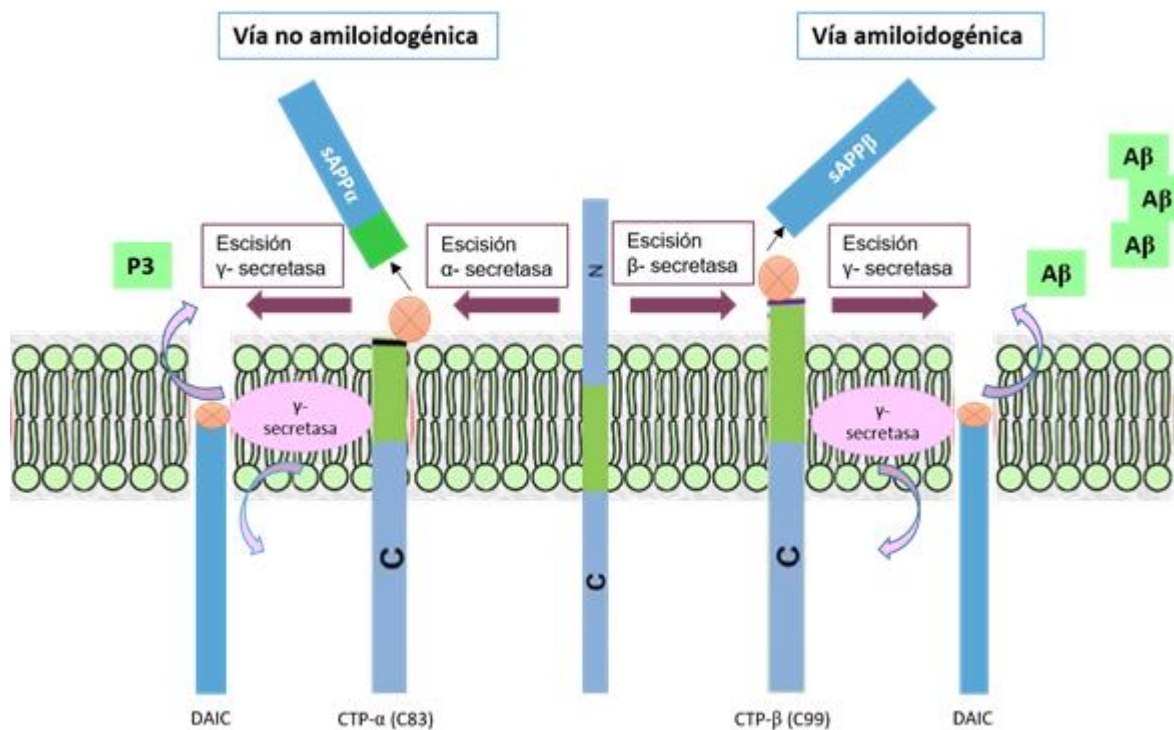


Figura A: Vías proteolíticas de la APP humana.

En la vía no amiloidogénica el APP es cortado por la α-secretasa generando fragmentos α (CTF-α) en la C-terminal de 83 aa (C83) y libera a la superficie de la célula fragmentos solubles de APP (sAPPα) en la N-terminal, estos sAPPα tienen efectos neurotróficos y neuroprotectores. Los CTFα son cortados por la γ-secretasa para generar P3 extracelular (que impide la generación de fragmentos Aβ) y el dominio APP intracelular (AICD). En la vía amiloidogénica la APP es cortada por β-secretasa en la C-terminal formando un péptido de 99 aa (C99) y libera fragmentos sAPPβ. El CTFβ se internaliza y es procesado por la γ-secretasa produciendo fragmentos Aβ40 y Aβ42 extracelular y el dominio APP intracelular (AICD). Modificada de Guo-fang CHEN (Guo-fang C. *et. al.* 2017).

Tau

Tau es otra molécula que también juega un papel muy importante en la EA, pertenece a la familia de proteínas asociada a los microtúbulos (MAP) y es expresada principalmente en las neuronas con una localización preferentemente axonal (Cyril Laurent *et. al.* 2018).

Su función principal es promover el ensamblaje de los microtúbulos regulando su estabilidad y dinámica, ayudando al mantenimiento del citoesqueleto, el transporte axonal de organelos, el crecimiento de neuritas y la morfología neuronal en general, cabe destacar que tau tiene funciones adicionales en el núcleo donde protege la integridad del ADN y la estabilidad genómica (Jembrek MJ. *et. al.* 2010).

En las enfermedades llamadas taupatías como la EA, tau deja de funcionar de forma adecuada y se agrega en forma de ovillos fibrilares intracelulares (NFT), estos ovillos están compuestos por filamentos helicoidales pareados que contienen esta forma aberrante de Tau fibrilar hiperfosforilada (Ahmed *et. al.* 2018). Los ovillos están presentes en el citoplasma de las neuronas que están principalmente localizadas en la corteza cerebral, específicamente en la corteza entorrinal y también en las células piramidales del hipocampo, amígdala, núcleos basales del prosencéfalo y del rafe (Kelleher, R. *et. al.* 2013).

Normalmente Tau se fosforila y desfosforila bajo el control de diferentes cinasas. La alteración en las funciones de estas enzimas produce la hiperfosforilación de Tau lo que provoca que sea liberada de los microtúbulos. Una vez que queda libre se va acumulando en la célula y comienza a formar agregados. Experimentos en un modelo de ratón transgénico que expresa tau mutada (rTg4510) muestran que el tau soluble provoca mayor pérdida sináptica y neuronal así como déficits en la memoria y en la potenciación a largo plazo. La estructura β -plegada permite que el tau agregado forme los filamentos helicoidales pareados y eventualmente los ovillos (NFT) (Chen Xu, *et. al.* 2016). Los ovillos en el hipocampo y en el prosencéfalo basal pueden llevar a un deterioro en el aprendizaje además de un déficit en los neurotransmisores (Ahmed *et. al.* 2018).

Etiología

Aunque desde hace tiempo se han realizado muchas investigaciones sobre la EA, los tratamientos actuales solo retrasan la progresión de los síntomas asociados con esta enfermedad, esto se debe a que no se conocen los mecanismos relacionados con el inicio de esta enfermedad. Se sabe que es una patología multifactorial y se han propuesto varias hipótesis sobre los diversos factores causales de la enfermedad, tales como la hipótesis colinérgica, la hipótesis $A\beta$, la hipótesis tau y la hipótesis de la inflamación (Kumar A, Singh A, Ekavali. 2015).

Hipótesis de la cascada amiloide

En 1992, John Hardy postuló la hipótesis de la cascada amiloide, la cual propone que la acumulación de la proteína $A\beta$ es el principal componente de las placas seniles y el principal agente causal de la enfermedad de Alzheimer, mientras que los ovillos neurofibrilares, la pérdida celular, el daño vascular y la demencia son el resultado directo de esta acumulación (Hardy J. A, Higgins G. A. 1992).

Se sabe que algunas mutaciones en el gen de la APP humana o como resultado de la trisomía del cromosoma 21 que contiene el gen de APP, se produce una sobreexpresión de APP y como consecuencia, se produce un aumento en la

formación de A β y en la deposición de éste en el parénquima cerebral en un patrón similar a la EA. Una proporción de pacientes con Síndrome de Down, comienzan a acumular el A β en el cerebro desde su infancia y un gran número de ellos llegan a la edad de 40 años o más, con una neuropatología consistente con EA desarrollada. Este grupo constituye el grupo más grande de pacientes con EA de inicio temprano y apoya la hipótesis de que el A β juega un papel crucial en el desarrollo de esta enfermedad porque además, presentan la acumulación de ovillos de Tau posteriormente. También, se sabe que la sobreexpresión de APP está asociada con otros procesos como la endocitosis, en la que se perturba el tráfico de factores neurotróficos que finalmente llevan a la degeneración de las neuronas, principalmente colinérgicas. Esta degeneración está asociada con procesos cognitivos como el aprendizaje y memoria (F.K. Wiseman *et. al.* 2018; Dean Hartley's *et. al.* 2016).

Por otro lado, las mutaciones en la γ -secretasa, también incrementan la proporción del A β ₄₂/A β ₄₀, por la vía amiloidogénica, que como se mencionó anteriormente constituyen el A β que se auto ensambla fácilmente en una mezcla heterogénea de oligómeros y protofibrillas que al final son depositadas como fibrillas en las placas seniles. Las mutaciones más comunes en estas enzimas que causan la EA, ocurren en los genes PSN1 y PSN2, estas afectan su actividad γ -secretase y aumentan la proporción de A β (Figura B) (Guo-fang C. *et. al.* 2017; Jembrek MJ *et. al.* 2010).

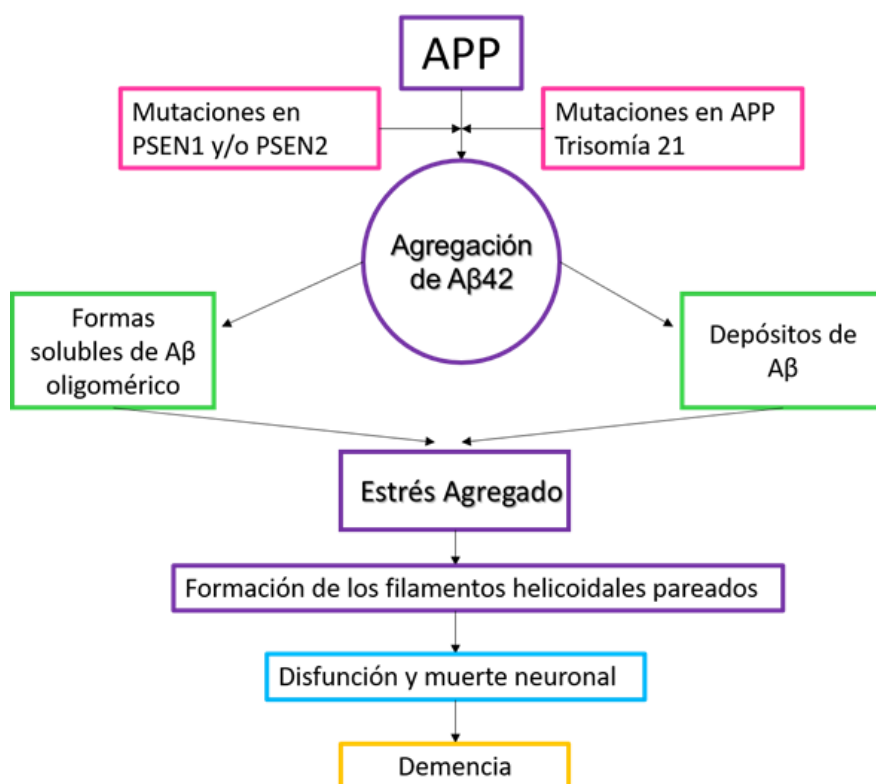


Figura B. La hipótesis de la cascada amiloide. Esta hipótesis postula que la acumulación de A β en el parénquima cerebral es un paso crucial que conduce, en última instancia, a la EA. Las mutaciones autosómicas dominantes en APP, PSEN1 y PSEN2, causan una sobreproducción del péptido A β 42 y su agregación en forma de oligómeros solubles y depósitos fibrilares. La hipótesis amiloide sugiere que la sinaptotoxicidad y la neurotoxicidad pueden estar mediadas por dichas formas moleculares de A β . El mecanismo de toxicidad aún no está bien definido por lo que se utiliza el término de “estrés agregado” para describir los posibles mecanismos que conducen a la formación de ovillos neurofibrilares intracelulares de tau (NFTs) que finalmente dan como resultado pérdida neuronal y demencia. Modificada de Karran E. et al (Karran E, Mercken M, D Strooper B. 2011).

Algo interesante es que también se ha visto que hay una falta de correlación entre A β extracelular depositado y la gravedad del deterioro cognitivo, esto llevó a una hipótesis alternativa que es “La hipótesis del oligómero de A β tóxico”. Esta hipótesis propone que la principal causa de la toxicidad neuronal son los oligómeros solubles de A β , ya que su acumulación se correlaciona mejor con los síntomas del deterioro cognitivo y de la enfermedad (Karran E, Mercken M, D Strooper B. 2011).

Se ha observado que los oligómeros de A β 42 inducen daño oxidativo, promueven la hiperfosforilación de tau y producen efectos tóxicos en las sinapsis y las mitocondrias (Chun Yan Ye. *et. al.* 2015; D.R Howlett *et. al.* 2001). Sin embargo, las placas seniles de A β 42 aparecen durante la fase tardía de la enfermedad y atraen a la microglía (D.R Howlett *et. al.* 2001). La activación microglial da como resultado la producción y liberación de citocinas proinflamatorias como: IL-1 β , TNF- α e IFN- γ , a su vez, estas citocinas estimulan la estrecha conexión neurona-astrocito y se producen cantidades adicionales de oligómeros A β 42 por parte de los astrocitos, aumentando así la dispersión del péptido (Kumar A, Singh A, Ekavali. 2015). Anteriormente se creía que las neuronas actuaban solas en la acumulación y secreción del A β 42 y sus oligómeros, mientras que los astrocitos participaban en la depuración de los desechos neuronales y de las fibrillas de A β (Dal Prà, I., *et. al.* 2014). Posteriormente se observó que una vez que los astrocitos son expuestos a preparaciones fibrilares o formas solubles de A β 25-35 exógenas, se convierten en productores, acumuladores y secretores de A β 42 y por lo tanto contribuyen a la neuropatología de la EA. Cada astrocito envuelve terminales sinápticas de conjuntos de neuronas y una neurona puede estar en contacto con varios astrocitos, produciendo extensos patrones interconectados a través de uniones comunicantes, formando una relación neurona-astrocito (Dal Prà, I., *et. al.* 2014). Sin embargo, este vital trabajo en equipo puede volverse peligrosamente perjudicial, cuando las neuronas producen A β 42 en exceso y libera oligómeros tóxicos de A β 42 que entran en contacto con los astrocitos envolventes. Estos oligómeros se unen a diferentes tipos de receptores en ambos tipos celulares. Pueden unirse a los receptores nicotínicos alpha 7 de los astrocitos y provocar la liberación de glutamato. Este

glutamato actúa en los NMDAR extra sinápticos de las neuronas asociadas a los astrocitos lo cual desencadena oleadas de Ca^{2+} que provoca una serie de eventos como son la disfunción mitocondrial bombeando ROS el cual causa daño oxidativo destruyendo así la sinapsis neuronal y muchas comunicaciones dentro de este grupo neurona-astrocito (Figura C) (Kumar A, Singh A, Ekavali. 2015; Dal Prà, I., *et. al.* 2014).

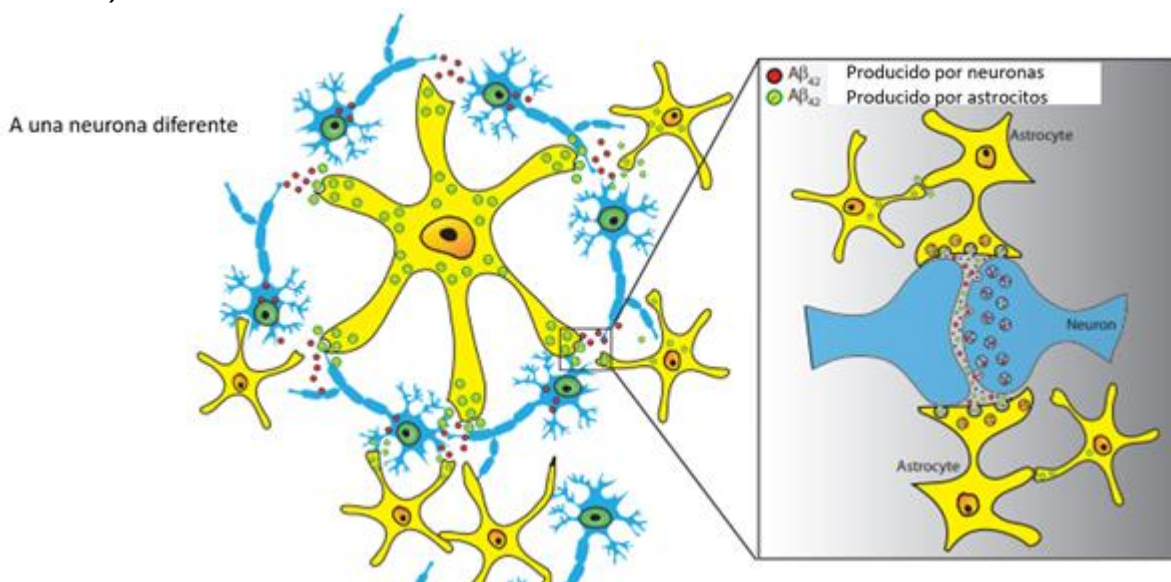


Figura C: Conexión neurona-astrocito. En la imagen se puede observar un astrocito humano (amarillo), envolviendo la sinapsis tripartita de las neuronas vecinas (azul). Los astrocitos se encuentran conectados a otros astrocitos por uniones comunicantes, estos también pueden entrar en contacto con otras neuronas que forman parte de otro grupo de neuronas que se encuentran interconectadas por sus propios axones, estableciendo sinapsis con neuronas adyacentes. El $\text{A}\beta_{42}$ es liberado tanto por la terminal de axón como por los procesos de los astrocitos, la liberación excedente del $\text{A}\beta_{42}$ endógeno de un astrocito expuesto a $\text{A}\beta$ s exógenos afectará no solo a su grupo de neuronas sino que también afectará a otros astrocitos que se encuentran unidos por las uniones comunicantes en una red y al grupo de neuronas que se encuentran envueltas por estos astrocitos. Modificada de Ilaria Dal Prà *et al.* (Dal Prà, I., *et. al.* 2014).

En resumen, de la amplia literatura sobre el tema se han descrito importantes observaciones que apoyan a la hipótesis de la cascada amiloide y algunas de ellas son que (Hardy J, Selkoe D. J. 2002; F.K. Wiseman *et. al.* 2018):

- Las mutaciones en el gen que codifica la proteína tau causan demencia frontotemporal con parkinsonismo, esto quiere decir que las alteraciones de tau por más graves que sean (formación de NFTs) no son suficientes para inducir las placas amiloides características de la EA.
- Los ratones transgénicos que sobreexpresan APP y Tau humanas, presentan una mayor formación de ovillos tau positivos (comparándolos con los que solo expresan tau), mientras que el número de sus placas amiloide

son inalteradas, lo que sugiere que el procesamiento de APP alterado se produce antes de las alteraciones de tau en la EA

- Los pacientes que presentan Síndrome de Down al tener tres copias del cromosoma 21 muestran una sobreproducción de la APP y por tanto el desarrollo de la EA.

Estas observaciones y en general la hipótesis de la cascada amiloide sugieren que la acumulación de A β es la principal influencia en la EA y el resto del proceso de la enfermedad sólo es resultado de un desequilibrio en la eliminación y producción de A β .

Hipótesis Tau

El papel de Tau en el desarrollo de la EA surgió como un mecanismo fundamental, a partir de los hallazgos neuropatológicos de Braak y sus colaboradores que sugieren que la patología de A β aparece muchos años después del inicio de la agregación de tau (Jembrek MJ. *et. al.* 2010).

El gen tau humano se localiza en el cromosoma 17 y se expresan seis isoformas de tau en el cerebro humano adulto como resultado del corte y empalme alternativo del mRNA, el exón 10 contiene la región de unión a microtúbulos. La inserción del exón 10 produce isoformas de tau de 4 repeticiones (4R), mientras que las isoformas de tau de 3 repeticiones (3R) se producen sin el exón 10. El cerebro humano adulto expresa estas dos isoformas, en condiciones normales y se localizan en los axones de las neuronas, mientras que en cerebros con la EA se acumulan en un estado hiperfosforilado en las inclusiones patológicas que son justamente los ovillos neurofibrilares (Kametani F., Hasegawa M. 2018).

Tau contiene 85 posibles sitios de fosforilación localizados principalmente en la región de unión de los microtúbulos y en el dominio rico en prolina de la proteína. El estado de fosforilación de tau está bajo el control de muchas serina/treonina o tirosinas cinasas así como fosfatasas, la homeostasis es interrumpida cuando se presenta una taupatía favoreciendo la hiperfosforilación de tau. En la EA la fosforilación de tau se puede ver como un proceso jerárquico, algunos sitios son fosforilados tempranamente en el curso de la enfermedad, provocando cambios estructurales promoviendo la acción de cinasas secundarias y formando epítopes conformacionales (Cyril Laurent *et. al.* 2018).

Un cierto grado de fosforilación de tau es obligatorio para preservar la red de microtúbulos y la actividad celular, por tanto las formas de tau altamente fosforiladas son menos capaces de unirse a los microtúbulos y menos eficientes en la

estabilización de la red del citoesqueleto (Jembrek MJ *et. al.* 2010). Estas perturbaciones pueden causar un transporte anterógrado y retrógrado anormal, perturbación de la señalización intraneuronal incluyendo la transmisión sináptica (Ochalek *et. al.* 2017).

Recientemente, se ha hecho énfasis sobre que la proteína tau podría presentar un comportamiento priónico de tal manera que aumenta la distribución de sus agregados en la patología de la EA. Las enfermedades priónicas ocurren por el mal plegamiento de las proteínas, la proteína priónica (PrP) se encuentra anclada a los microdominios de las membranas llamadas “balsas lipídicas”. La forma celular de la PrP^C está involucrada en ciertas funciones como son el mantenimiento de la materia blanca del cerebro y en la regulación del tejido en las células inmunes, responde al estrés oxidativo y a la formación neuronal, mientras que la forma patogénica PrP^{Sc} es una versión mal plegada de la PrP^C y muestra resistencia a la degradación enzimática, además de ser la principal causa de un grupo de desórdenes neurodegenerativos por su alta capacidad infecciosa (Cisse, M., Mucke, L. 2009).

Muchos estudios han sugerido que las proteínas que se encuentran relacionadas con las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington podrían moverse de un área del cerebro afectada a otra no afectada, por tanto se habla de un comportamiento tipo prión de estas patologías. Enfocándonos en la EA dos experimentos apoyan la idea de la “siembra de proteína”, lo que sucede es que una proteína mal plegada actúa como “semilla” iniciando la formación de agregados al ir reclutando especies de oligómeros mal plegados de la misma proteína en este caso tau, contribuyendo al desarrollo de la enfermedad (Brundin, P., Melki, R., Kopito R. 2010).

Bess y sus colegas examinaron la capacidad de los agregados de tau para entrar a la célula en cultivo. En células neuronales C17.2 y HEK293 fueron sembrados con agregados de tau, este experimento *in vitro* mostró la posibilidad de que tau pueda moverse de una célula cerebral a otra y una vez dentro, los agregados de tau pueden desencadenar la agregación de la proteína endógena de manera similar a la propagación de un prión, ya sea que los agregados fueran añadidos al medio de cultivo o cuando las células fueron co-cultivadas con células que expresan un fragmento de tau propenso a la agregación. Además, se sugiere que la forma por la cual los agregados de tau ingresan a la célula puede ser a través de una vía endocítica (Frost, B., Jacks R., Diamond M. 2009).

Cabe mencionar que para que el mecanismo tipo priónico pueda contribuir a la progresión de una enfermedad neurodegenerativa como lo es la EA, se deben cumplir cuatro requisitos básicos. El primero es que el agregado proteico debe ser

capaz de elongarse por el reclutamiento de cadenas solubles de polipéptidos y debe poder fragmentarse para generar sitios de elongación adicionales y así amplificar la agregación, el segundo es que las células que han sido infectadas por los agregados deben continuar sintetizando la forma no-agregada, el tercero menciona que el agregado que será transmitido debe ser liberado por las células, las células pueden liberar los agregados por un proceso exocítico mediado por vesículas resultantes de una autofagocitosis incompleta o por exocitosis lisosómica y finalmente, el cuarto, se refiere a que los agregados deben ser capaces de unirse y entrar a la célula receptora (Brundin, P., Melki, R., Kopito R. 2010).

Neuroinflamación y Alzheimer

La neuroinflamación implica una respuesta coordinada entre la microglia y otras células del sistema nervioso central (SNC) entre ellas se encuentran los astrocitos y células inmunes periféricas que se infiltran al SNC. Varios tipos de estímulos como las toxinas, infecciones, traumas, lesiones cerebrales, estrés o envejecimiento provocan que el sistema inmune del SNC se active y a esto se le conoce como inflamación aguda. Esta inflamación se caracteriza por una microgliosis y por la liberación de mediadores inflamatorios que pueden inducir una transducción de señales intracelulares en astrocitos produciendo su activación. Algunos de los factores liberados por los astrocitos alteran la barrera hematoencefálica produciendo el reclutamiento de células inmunes periféricas. Ambas células gliales trabajan coordinadas para asegurar la supervivencia neuronal, el crecimiento de neuritas y la neurogénesis. Cuando el estímulo dañino no se resuelve rápido este proceso se convierte en una neuroinflamación crónica. En el proceso crónico se rompe el balance entre la neuroprotección y la neurotoxicidad, la microglia en este contexto proinflamatorio disminuye su capacidad de fagocitosis, comienza a degradar el tejido y a dañar a la barrera hematoencefálica, lo cual provoca que la microglía se active liberando mayor cantidad de citocinas proinflamatorias que van actuar sobre las células inmunes periféricas, generando una respuesta inmunológica mayor, esto a su vez resulta en una neurodegeneración que subyace a varios trastornos neurológicos, entre ellos se encuentra la EA (Santa Mamma et. al.; Ashley Swanson et. al. 2018).

Hay dos pensamientos principales sobre cómo ocurre esta cascada inflamatoria, la primera es la “Hipótesis de la inflamación”, la cual indica que la neuroinflamación es causada por el exceso de las formas tóxicas de A β y tau. La segunda dice que la microglia reactiva (pro-inflamatoria) no puede fagocitar adecuadamente el A β provocando la acumulación de placas en lugar de su eliminación, contribuyendo a la neurodegeneración inducida por A β y tau (Ashley Swanson et. al. 2018).

La respuesta inflamatoria en la EA, es provocada principalmente por la microglía y está íntimamente ligada con los cambios en el tejido observados en esta patología, las fibrillas y oligómeros de A β pueden unirse a ciertos receptores expresados por la microglia, entre ellos se encuentran CD14, CD36 y CD47, esta unión a los receptores resulta en una producción de citocinas inflamatorias que incluyen TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-1, IL-2 e IL-23 y quimiocinas, que se sabe que alteran la expresión y procesamiento de APP y la hiperfosforilación de tau (Héctor E. López, Hilda M. Coria. 2016)

Durante una lesión, la microglia cambia su fisiología y morfología volviéndose activa, mostrando diferentes fenotipos, en general presenta un cuerpo celular alargado con procesos cortos y delgados y en la etapa final de activación muestra un fenotipo ameboide (fagocítico). Sin embargo, también presenta dos fenotipos similares identificados en macrófagos que son M1 y M2. El estado M1 es una activación clásica de la microglia “cebada”, lo que significa que produce y libera citocinas proinflamatorias, así como sustancias citotóxicas y se ha sugerido que este fenotipo incrementa la neurotoxicidad en enfermedades neurodegenerativas. El estado M2 es neuroprotector, muestra un fenotipo fagocítico y libera interleucinas antiinflamatorias como IL-10 y TGF- β (Héctor E. López, Hilda M. Coria. 2016). En presencia de citocinas proinflamatorias la microglia cambia de un estado M2 a M1, este cambio provoca una transformación, es decir pasando de un estado protector de reparación del tejido a un estado proinflamatorio (Ashley Swanson *et. al.* 2018).

La microglia cumple un papel muy importante en la regulación homeostática de la plasticidad sináptica y las vías neuronales, que incluyen la activación de la vía del factor nuclear-kappa β (NF-k β) y la desregulación de esta vía ocurre en trastornos neurodegenerativos (Ashley Swanson *et. al.* 2018). El NF-k β es una molécula dimérica de forma ubicua que presenta una actividad postraducciona reguladora. En el sistema nervioso cumple importantes funciones actuando como regulador transcripcional, tiene un papel importante en la inflamación, supervivencia neuronal, diferenciación, apoptosis, crecimiento neurítico y plasticidad sináptica, las cuales se ven deterioradas con la progresión de varias enfermedades neurodegenerativas especialmente la EA. Por ejemplo, el NFk β activa a los astrocitos induciendo la producción de factores que resultan dañinos para las neuronas como el C3. Por otro lado, en los trastornos neurodegenerativos la retracción e inducción de la fagocitosis provoca que la microglia deje de mantener la regulación homeostática de los procesos sinápticos (Ashley Swanson *et. al.* 2018).

La microglia activada reduce la acumulación de A β , incrementando la fagocitosis, eliminación y degradación, así como también secretando factores como el factor neurotrófico derivado de la glía útil para la supervivencia neuronal. Recientemente,

se han identificado receptores que pueden modificar la capacidad fagocítica de la microglía como un receptor transmembranal expresado en células mieloides 2 (TREM2), que algunas mutaciones provocan una disminución en la capacidad fagocítica y promueven la secreción de citocinas y quimiocinas (María Bronzuoli et. al. 2016).

Además, se ha observado, que los factores tróficos disminuyen con el envejecimiento y en enfermedades como EA sobrepasando su capacidad de reparación, por lo que los bajos niveles de los factores neurotróficos contribuyen a la agregación de A β , hiperfosforilación de tau, daño y muerte neuronal que caracteriza a la EA.

Por lo tanto, la neuroinflamación es provocada por componentes neuronales, gliales e inmunes que pueden producir tanto factores proinflamatorios como antiinflamatorios y el balance de estos es muy importante para mantener la homeostasis neuronal. Además, las células gliales junto con otros tipos celulares producen factores neurotróficos que se oponen a estímulos dañinos, mantiene y fortalecen la transmisión sináptica y por lo tanto, las funciones cognitivas.

Antecedentes

Se ha demostrado que los tratamientos no farmacológicos para la EA producen un retraso en el deterioro cognitivo, provocando un efecto aditivo que repercute en el sistema nervioso central, disminuyendo la neuroinflamación y aumentando la neurogénesis, angiogénesis y la sinaptogénesis. Estos efectos se logran a través de las neurotrofinas como son: BDNF, IGF-1, NGE, GDNF, VEGF y Klotho.

Factores neurotróficos (Neurotrofinas)

Los factores neurotróficos como BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro), NGF (factor de crecimiento nervioso), IGF-1 (factor de crecimiento tipo insulina 1), GDNF (factor neurotrófico derivado de la glía) y VEGF (factor de crecimiento derivado del endotelio vascular) juegan un papel muy importante en la neurogénesis, sinaptogénesis, el desarrollo neurítico, la sobrevivencia de las neuronas y la transmisión de señales sinápticas. Estos procesos están relacionados con los procesos cognitivos como lenguaje, memoria, razonamiento, etc. En gran variedad de estudios realizados en animales y humanos se ha observado que existe una relación estrecha entre los niveles de diferentes factores neurotróficos y la llamada reserva cognitiva. Esta última, se refiere a la capacidad del organismo para oponerse a los efectos desestabilizadores de agentes estresores (Yaakov S. 2002).

Por otro lado, se sabe que el envejecimiento se acompaña de deterioro cognitivo y un aumento en la susceptibilidad ante factores estresantes. Es uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, problemas cerebrovasculares y neuroinflamatorios (Yaakov S. 2002). Sin embargo, se sabe que entre mayor sea la reserva cognitiva mayor será la capacidad de minimizar el declive ocasionado por enfermedad o simplemente por el proceso de envejecimiento, esta reserva parece que se desarrolla por factores intrínsecos innatos y por efecto de las experiencias vividas, tales como la actividad física, social e intelectual (Redondo Flores, R. 2017).

Existe evidencia clínica y epidemiológica que sugiere que un estilo de vida activo, que implica componentes sociales, físicos y mentales pueden mejorar la función cognitiva en personas mayores sanas y son protectores contra el deterioro de la memoria y el desarrollo de la EA, atenuando los síntomas de la enfermedad y disminuyendo el avance de la misma en los pacientes que la presentan (Stephen T Yeung, Hilda Martínez-Coria. *et. al.* 2015).

Se ha establecido que el ejercicio, tiene una serie de efectos sobre el cerebro como, el mejoramiento de la memoria, estado de ánimo, funcionamiento cognitivo, plasticidad y capacidad de aprendizaje. Además, el ejercicio se ha implicado en tener efectos antidepresivos y contrarrestar la deficiencia y atrofia mental relacionada con la edad o con enfermedades como la EA (Liu PZ., Nusslock R., 2018).

Estos efectos beneficiosos involucran diferentes regiones cerebrales, particularmente al hipocampo ya que es crucial para la función cognitiva y es una de las regiones cerebrales más afectadas en la EA y la depresión. Hay evidencia que indica que el ejercicio estimula el funcionamiento del hipocampo induciendo la expresión del BDNF, que es un potente regulador de la supervivencia neuronal, la neurogénesis adulta, la sinaptogénesis y la plasticidad sináptica (Baoji Xu. 2013).

Además del BDNF, el IGF-1 y VEGF son otros de los principales factores de crecimiento conocidos que trabajan en conjunto produciendo efectos complementarios en el cerebro en respuesta al ejercicio. Se ha reportado que el ejercicio junto con el estímulo del proceso de aprendizaje tienen efectos sinérgicos sobre la angiogénesis y neurogénesis en el hipocampo regulados por el IGF-1 y BDNF, mientras que la estimulación dependiente únicamente del ejercicio sobre el hipocampo está regulada por IGF-1 y VEGF (Cotman. *et. al.* 2007).

Estudios de intervención o experimentales han demostrado que los individuos con EA que hacen ejercicio muestran una mejoría en los parámetros de vida diaria, disminución en el declive cognitivo, mejora el desempeño físico y disminución de

los síntomas depresivos, en comparación con los que no hacen (Cotman. *et. al.* 2007).

Llevar un estilo de vida activo trae consigo efectos benéficos, mejorando la reserva cognitiva y permitiendo a los pacientes con EA compensar el deterioro cognitivo. En modelos animales de EA se ha visto que la estimulación cognitiva y física utilizando el aprendizaje repetido o enriquecimiento ambiental como estímulos, mejora la ejecución de las tareas cognitivas, previene la progresión de la neuropatología y produce una reducción significativa de las placas cerebrales de A β . Se ha demostrado que el entrenamiento repetido en la prueba de reconocimiento espacial del laberinto de Morris produce mejoras en el aprendizaje y memoria espacial y de reconocimiento, además de reducir la patología de Tau y A β en ratones 3xTg-AD (Stephen T. Yeung, Hilda Martínez-Coria. 2015). Adicionalmente, nuestro grupo encontró un incremento en los niveles de mRNA de una proteína llamada klotho en respuesta al estímulo cognitivo (datos no publicados).

El Klotho (KL) es una proteína transmembranal de un solo paso, que comparte una secuencia homóloga con las β -glucosidasas, se ha detectado en varios tejidos, particularmente en los túbulos contorneados distales del riñón y los plexos coroideos en el cerebro (Kurosu H. *et. al.* 2005). Experimentos realizados por Kuro y sus colegas, demostraron que los ratones que sobreexpresaban KL mostraban resistencia al estrés oxidativo, mejora en el rendimiento cognitivo y una prolongación en la vida útil en aproximadamente el 20% de ratones hembra y 30% en machos (C.R. Abraham *et. al.* 2016).

La proteína KL puede funcionar como una hormona circulante que regula el desarrollo de trastornos relacionados con la edad o los procesos naturales del envejecimiento, ya que se une a receptores que se encuentran en la superficie celular, reprimiendo señales intracelulares de la insulina y del IGF-1 (Kurosu H. *et. al.* 2005). Aunque se sabe poco sobre la función de esta proteína y su mecanismo molecular por el cual suprime el desarrollo de fenotipos de envejecimiento (Kuro-o *et. al.* 1997), si se sabe y se ha demostrado que es un gen supresor del envejecimiento, ya que tiene la capacidad de inhibir el IGF-1 que es uno de los mecanismos que prolongan la vida (Kurosu H. *et. al.* 2005).

En el cerebro KL se produce en grandes cantidades por las células ependimales de los plexos coroideos, las células de Purkinje y por las neuronas del hipocampo. Se ha visto que los ratones que no presentan el gen de KL muestran dificultades en el aprendizaje y la memoria, reducción en el número de sinapsis en el hipocampo, desórdenes en el transporte axonal y neurodegeneración en el hipocampo, mientras

que los ratones que lo sobreexpresan se caracterizan por una mejora significativa en el funcionamiento cognitivo y un mejor rendimiento en las tareas de la memoria. Es importante mencionar que KL juega un papel importante en la protección de las neuronas del hipocampo contra la formación de A β y la toxicidad del glutamato, por medio de la activación del sistema enzimático antioxidante, además klotho es necesario para la maduración de los oligodendrocitos así como en la integridad de la mielina. (Torbus-Paluszczak *et. al.* 2018).

Cheng y sus colegas, reportan que la forma soluble de KL muestra características neuroprotectoras que incluyen la regulación de la inflamación, resistencia al estrés oxidativo, resistencia a estresores del RE, protección sobre la citotoxicidad que es causada por el glutamato y por la sobreproducción del A β en la EA, además de ser modulador de ciertas vías de señalización celular como son: PI3K/Akt, ASK1/p38 MAPK and PERK. Li y sus colegas han reportado una lista de factores que influyen en la expresión de α -klotho tanto positiva como negativamente, entre ellos se encuentra la APP, la cual regula la expresión de α -klotho, indicando que en condiciones patológicas como lo es la EA su expresión podría estar deteriorada, por lo que se asume que KL podría estar disminuido en sangre y en cerebro en ratones que presentan la EA (Cararo López M. *et. al.* 2017).

En otros estudios, Zeldich y su equipo demostraron también efectos neuroprotectores de la forma secretada de KL en las neuronas del hipocampo expuestas a la actividad citotóxica del glutamato y del A β , confirmando que KL es activado por la APP soluble (APPs β), la unión entre el KL y la APPs β protege al SNC contra la toxicidad del A β (Torbus-Paluszczak *et. al.* 2018).

Cuando se hizo una correlación del KL y la EA se observó que los pacientes que presentan esta patología mostraron niveles más bajos de KL en el líquido cefalorraquídeo, estos efectos fueron mayores en mujeres. Consistente con esto, un estudio reportó que los humanos que presentaban mayor nivel de KL en plasma, presentaban mejoras cognitivas, con esto se puede deducir que los niveles bajos de KL en el cerebro están relacionados con enfermedades en el SNC, mientras que mayores niveles de KL con un SNC sano (Vo, H. T., *et. al.* 2018).

Justificación

La enfermedad de Alzheimer, es una de las demencias más comunes en los adultos mayores, hasta la fecha las causas de esta enfermedad no han sido bien determinadas. A pesar de todos los estudios realizados, todavía no existe una cura para esta patología, por lo tanto, es de vital importancia conocer los mecanismos biológicos que subyacen a esta enfermedad, de tal manera que se puedan desarrollar más terapias efectivas encaminadas a aminorar este padecimiento a

través del estudio de factores involucrados en neuroprotección, y antiinflamatorios como el KL.

Se sabe que la microglía está fuertemente afectada en los cerebros con la EA. También, se conoce que la microglía distrófica produce factores proinflamatorios que promueven la muerte neuronal, y por otro lado, algunos factores de crecimiento como el BDNF, IGF-1 y el KL que tienen un efecto neuroprotector y algunos de ellos promueven efectos antiinflamatorios. Por lo tanto, en este trabajo se analizó la relación entre el KL y la microglía, a través de su efecto protector sobre la toxicidad producida por A β .

Hipótesis

La proteína klotho tiene un efecto neuroprotector, que favorece la recuperación de la microglía ante el daño inducido por el péptido β - amiloide

Objetivo general

- Determinar el efecto de klotho sobre los cambios en la microglía inducidos por β - amiloide

Objetivos Particulares

- Determinar si la proteína klotho se encuentra presente en la microglia
- Determinar el efecto de klotho sobre la microglía tratada con β - amiloide

Materiales y Métodos

Línea Celular

Se utilizó la línea celular SIM-A9 (ATCC CRL-3265) *mus musculus*, microglia de 1 día postnatal.

Cultivo celular de SIM-A9

Para descongelar y cultivar la línea celular se utilizó DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium 4.5g/L D-Glucose L-Glutamine, 110 mg/L Sodium Pyruvate con Suero Fetal Bovino 10% y Primocin.

Las células se encontraban a -80°C, se sacaron y fueron colocadas en hielo, rápidamente fueron introducidas en baño maría previamente calentado a 37°C y durante aproximadamente 1 minuto, se vaciaron en un tubo falcón de 15 ml que contenía 3 ml del medio ya preparado, se centrifugaron a 500 rpm por 3 min,

posteriormente se retiró el medio dejando el pellet de las células y se agregó 4 ml de DMEM preparado, se resuspendieron y se cultivaron en frascos de 25 ml, finalmente fueron incubadas a 37°C (Para más detalle véase anexo 2).

Siembra de la microglía SIM-A9 para procedimientos experimentales

Una vez que las células llegaron a confluencia se levantaron con 12 mg de tripsina en 6 ml de DMEM, a cada frasco se le agregó 3 ml de solución de tripsina y se dejaron reposando por 5 minutos. Posteriormente, se trasladaron a un tubo falcón que contenía 3 ml de DMEM y se llevaron a centrifugar a 500 rpm por 3 min, posteriormente la pastilla fue resuspendida en 1 ml de DMEM con SFB 10% y 500 µl de primocin.

Una vez resuspendidas las células, estas fueron contabilizadas mediante la técnica de azul de tripano. Se tomó una alícuota de 10 µl (80 µl de DMEM, 10 µl de células y 10 µl de azul de tripano al 0.05%), la cuantificación se realizó en una cámara de Neubauer utilizando un microscopio de luz invertido (Olympus IX50). Las células teñidas de azul se consideran células muertas y las células no teñidas se cuantificaron como células vivas. Finalmente se sembraron 1×10^6 células por cada pozo en placas de 6 pozos y cajas Fluorodish. Las células se cosecharon en 1 ml de DMEM y el cultivo se dejó estabilizar por 48h en una incubadora a 37°C.

Identificación de Klotho en microglía SIM-A9 por inmunofluorescencia

Para la identificación de Klotho, los cultivos de microglía sembrados en fluorodish fueron fijados con paraformaldehído 4% y se incubaron por 30 minutos. Posteriormente fueron lavados por 10 min, 3 veces con TBS 1x (TRIS 10mM, NaCl 234 mM, pH 7.6). Para permeabilizar las células se hicieron 5 lavados de 15 min con TTBS. Para el bloqueo de sitios inespecíficos se incubaron con leche descremada (Bio-Rad) al 5% en TBS 1x por 2 horas, terminando este periodo las células fueron lavadas con TTBS 1x por 30 min y se incubaron toda la noche a temperatura ambiente con el anticuerpo Anti-klotho (policlonal de conejo Abcam) dilución 1:250 en TTBS 1x con leche al 1%.

Posteriormente se hicieron 3 lavados de 10 min con TTBS 1x y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo hecho en cabra (Alexa Fluor 594) a una dilución de 1:1000 por 2 horas en TTBS 1x con leche 1%. Para finalizar se lavaron por 30 min con TTBS y se contra-tiñeron los núcleos con DAPI (4.6-diamidino-2-fenilidole, 300 nM, Invitrogen). Las muestras fueron observadas al microscopio invertido y se analizaron con el software ImageJ.

Tratamiento

Las células fueron sometidas a los tratamientos por 6h y 24h a temperatura controlada de 37°C y una mezcla de gases con 95% N₂ y 5% CO₂ en medio DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium con 4.5g/L D-Glucose L-Glutamine y 110 mg/L Sodium Pyruvate.

Preparación del Klotho y tratamientos. El KL recombinante de 50 µg se disolvió en 1250 µl de H₂O y para los tratamientos se utilizó Klotho 10 µl/ml de medio y el Aβ (25-35) de 1 mg se disolvió en 1 ml de agua, para los grupos tratados se utilizó 1 µg/ml de medio. Las condiciones fueron control, klotho, Aβ y klotho + Aβ.



Figura D: Cajas de cultivo de 6 pozos, se aplicaron los siguientes tratamientos a las células de la microglia SIM-A9 para cada grupo en el orden correspondiente.

Inmunodetección de la proteína Klotho en la Línea celular SIM-A9 por la técnica de western blot.

Se realizó SDS-PAGE en condiciones reductoras (con β-mercaptoetanol) utilizando el equipo de Bio-Rad miniProtean. Los geles resolventor y concentrador se prepararon al 12% de poliacrilamida. El amortiguador de corrida fue Tris-base 0.025 M, Gly 0.19 M, SDS 0.1%, pH 8.3. Durante la electroforesis se aplicaron 150V constantes.

Para la inmunoelectrotransferencia los geles se equilibraron en un amortiguador con Tris 25mM, Gly 192 mM, Metanol 20% y pH 8.3. Las bandas de proteína se transfirieron a membranas de nitrocelulosa a 200 mA por 1h (kit Bio-Rad), para posteriormente ser inmunoteñidas y analizadas por quimoluminiscencia. Después de la transferencia las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% (Bio-Rad) en TBS por 1h a 37°C, luego de ser lavadas con TBS, las membranas se incubaron con el primer anticuerpo.

Anticuerpos primarios utilizados: Klotho policlonal (1:500), TNF-α monoclonal (1:500), PNF kappaβ (1:1000), todos los anticuerpos se prepararon en 1% de leche

descremada en 0.05% tween-20 en TBS. Se dejaron incubando toda la noche a 4°C.

Posteriormente las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) o anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano. (1:5000 en 1% de leche descremada en TTBS) durante 2h. Se incubaron en la solución de sustrato quimioluminiscente por 2 min (1 ml de sol A y 1 ml de sol B, ECL). Los luminogramas de las bandas inmunteñidas se obtuvieron exponiendo placas de rayos-X (Kodak Biomax) a las membranas durante diferentes tiempos dependiendo de los anticuerpos.

Una vez reveladas las placas, se realizó un stripping a las membranas para determinar actina como control de carga. Se lavaron con TBS1X 30 min y fueron incubadas con amortiguador para stripping (TRIS-HCL/SDS/Mercaptoetanol) por 20 min entre 70°C y 80°C en baño maría en constante agitación.

Extracción de RNA

La extracción de RNA total se realizó a partir de 3×10^6 células mediante el método de Trizol (Invitrogen) y el kit Direct-zol RNA MiniPrep (Zymo research R2050). Las células se homogeneizaron en 450 µl de Trizol y se les añadió 450 µl de etanol (95-100%), se homogeneizaron con vortex. Posteriormente se transfirieron a columnas Zymo-Spin IIC dentro de un tubo colector, se centrifugaron a 14,000 x g por 30s (centrífuga Sorvall). Se descartó el sobrenadante y se adicionó 400µl del RNA Wash Buffer a la columna y se centrifugó a 14,000 x g por 30s. Después se realizó un tratamiento con 5µl de DNAsal en 75µl de Digestion Buffer que fue añadido a la columna y se incubó por 15 min a temperatura ambiente. Al finalizar la incubación se adicionaron 400µl de Direct-zol RNA PreWash a la columna y se centrifugó a 14,000 x g por 30s. Posteriormente se añadieron 700µl de RNA Wash Buffer a la columna y se centrifugó a 14,000 x g por 2 min para asegurar la eliminación completa del RNA Wash buffer. Finalmente la columna se transfirió a un tubo libre de RNAsa y se resuspendió el RNA adicionado 50µl de agua libre de RNAsa directamente a la columna por centrifugación a 14,000 x g por 30s.

Por último la concentración se cuantificó leyendo 2 µl del ARN eluído a 260 y 280 nm en el Nanodrop (Thermo Scientific).

Síntesis de DNA complementario (cDNA)

Para la síntesis se utilizó 1µg del RNA total en un volumen final de 23 µl.

Se siguió una serie de dos mezclas: en la primera mezcla se añadieron 1 µl de hexámeros, 1 µl de Oligo d (T) (100 pM), 1 µl dNTPs (10mM) y 8 µl de buffer. En la segunda mezcla se añadieron 0.25 µl de RNAsa out y 1 µl de transcriptasa reversa

Superscript II. La reacción para la transcripción se llevó a cabo a una temperatura de 42°C durante 50 min. Una vez finalizada la retrotranscripción, las muestras fueron almacenadas a 4°C.

PCR cuantitativo (qPCR)

Para cuantificar la expresión de los mensajeros de Klotho y TNF- α se utilizó el equipo StepOne™ Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific), el kit LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche, 12 239 264 001) y oligonucleótidos para Klotho, TNF- α y para la fracción 18s ribosomal como gen control (Tabla 1). La mezcla de reacción contenía 1 μ l de la Mezcla 1 (dNTPs, SYBR Green I, buffer), 1 μ l de MgCl₂, 1 μ l de cada uno de los oligos (5' - 3' y 3' - 5'), 3 μ l de cDNA y 3 μ l de H₂O.

Se llevaron a cabo 40 ciclos de amplificación a 95°C por 10s, 65°C por 10s y 72°C por 20s en cada ciclo. Finalmente se obtuvo la cuantificación del producto de qPCR a partir de la determinación de CT comparativo, utilizando como gen de referencia la fracción 18s ribosomal.

Tabla 1: secuencia de oligonucleótidos de Klotho, TNF- α y 18s ribosomal de ratón (*mus musculus*).

Nombre	Secuencia 5' - 3'	Secuencia 3' - 5'
Klotho	G TAGACGGGGTTGTAGCCAA	GGTTATCTGAGGCCGGATGG
TNF- α	GCCTCTTCTCATTCTGCTTG	CTGATGAGAGGGAGGCCATT
18s	ACCCGTTGAACCCCATTCGTGA	GCCTCACTAAACCATCCAATCGG

Resultados

Identificación de la expresión de Klotho sobre la microglía de ratón de la línea celular SIM-A9

Dado que no se encontraron reportes en la literatura que identificaran a KL en las células de la microglía, se estandarizó la técnica de inmunofluorescencia, utilizando el anticuerpo contra KL para saber si la proteína KL se encontraba en este tipo celular específico. Se observó un marcaje positivo de la proteína KL sobre la microglía en cultivo *in vitro*, en particular la inmunoreactividad se puede observar en todo el citoplasma de la célula (Figura 1).

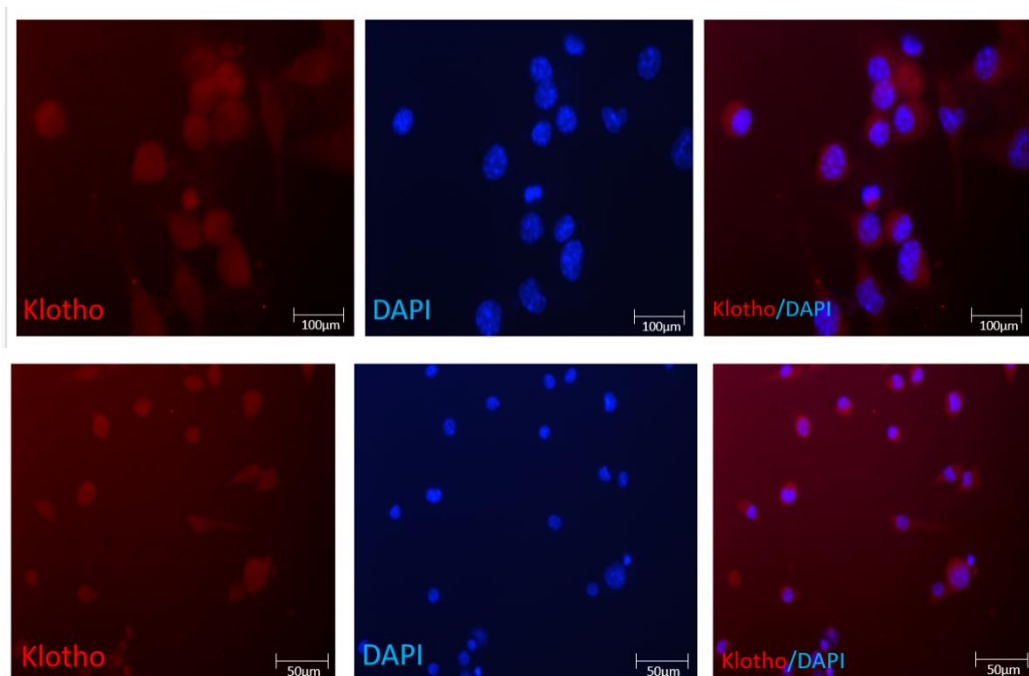


Figura 1: Identificación de Klotho sobre la microglía SIM-A9 por inmunofluorescencia. En esta figura se observa las células de la microglía SIM-A9 marcadas positivamente para Klotho 1:250 (rojo) y DAPI (azul). Las fotos fueron tomadas en un aumento de 20x y 40x respectivamente.

El tratamiento con A β y KL modificó la expresión del RNAm y la proteína KL en la microglía de ratón SIM-A9

Después de conocer que efectivamente KL se expresa en la microglía, decidimos evaluar su respuesta ante la presencia de A β y KL. Los cultivos celulares de microglía fueron expuestos al tratamiento con A β y KL por 6h y 24h. La expresión de KL fue evaluada por medio de SDS-Western-Blot y por qPCR.

Como se observa en la figura 2, a las 6 y 24 h de tratamiento con KL, éste produce un incremento en la expresión de su propio RNAm, que se inhibe en presencia de A β , tanto a la 6 h como a las 24 h (B y D). Además, se observó que el tratamiento con A β produce un incremento leve del RNAm de KL a las 6 h (B) y ninguna modificación a las 24 h (D). Cuando se analizaron los niveles de la proteína KL en estas células, no se observó ninguna modificación a las 6 h (A). Sin embargo, a las 24 h se muestra un incremento en la expresión de esta proteína por efecto del mismo KL, del A β y por la combinación de ambos. Se sugiere con estos resultados que el KL estimula la síntesis del mismo KL, el A β inhibe la transcripción de KL estimulado por el tratamiento con KL pero no inhibe la traducción del KL. Además, el tratamiento con A β estimula por sí misma la traducción de KL (C y D)

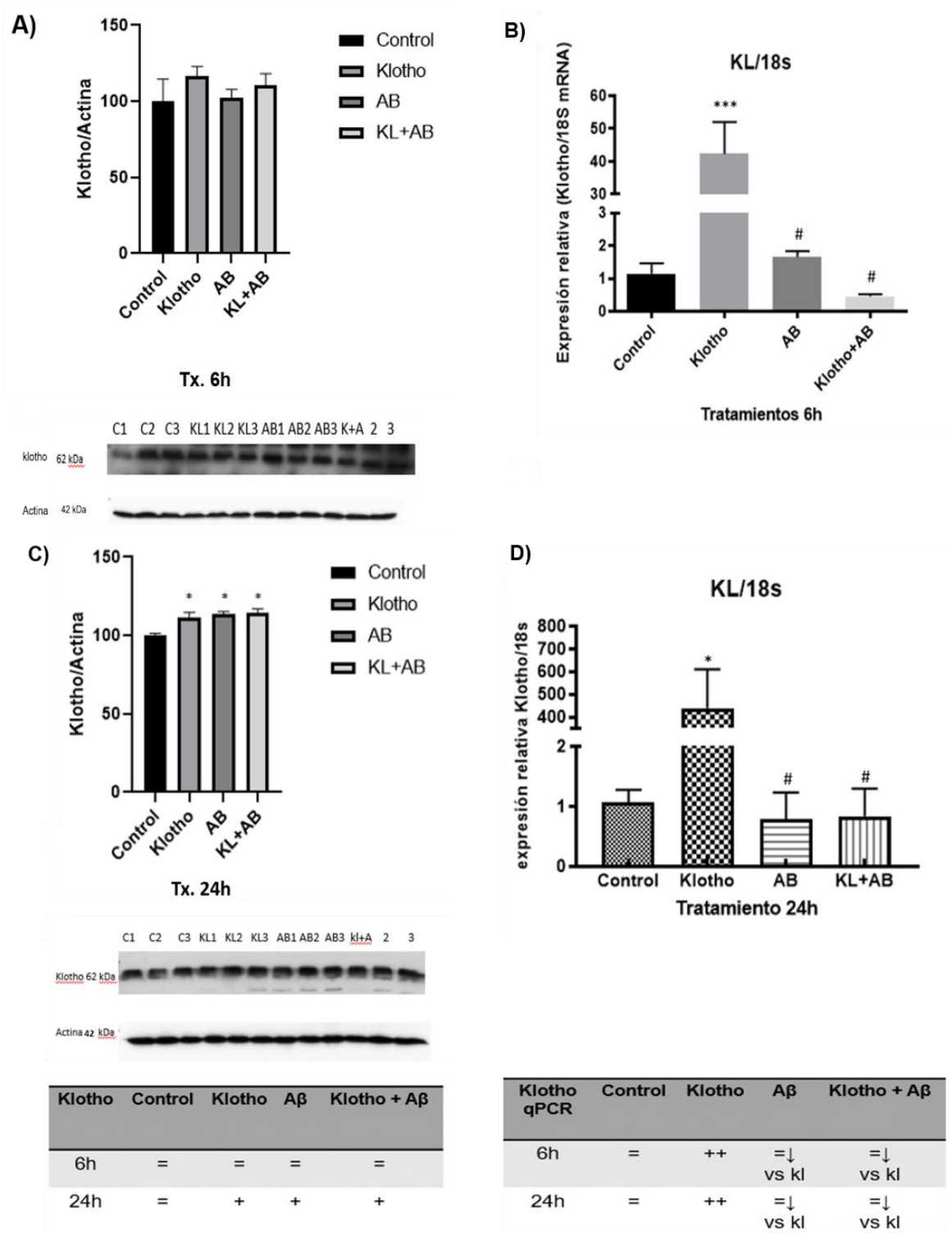


Figura 2: Proporción relativa de klotho en cultivos celulares de microglía SIM-A9 tratados con KL y Aβ por 6h y 24h. **A y C)** Inmunoblot de klotho y actina: se obtuvieron bandas cercanas a los 62 kDa para klotho y 42 kDa para actina. Se analizó la Expresión de RNAm de klotho en cultivos de microglía, ante un daño con Aβ por 6h y 24h. **B y D)** Expresión del RNAm de klotho en las células por qPCR. Cada barra representa la media ± error estándar, n=3 experimentos independientes. Prueba ANOVA

1 vía. **A)** no se encontraron diferencias significativas en los niveles de proteína KL entre los tratamientos a las 6h. **B)** Se encontraron diferencias significativas entre control vs klotho *** $p < 0.001$ y se encontraron diferencias significativas entre klotho vs A β y klotho vs KL+A β # $p < 0.001$. **C)** Se encontraron diferencias significativas entre todos los grupos tratados y el control * $p < 0.05$ **D)** Se encontraron diferencias significativas entre control vs klotho * $p < 0.05$, se encontraron diferencias significativas entre klotho vs A β y klotho vs KL+A β # $p < 0.05$.

El klotho modula los niveles de TNF- α en la microglía de ratón SIM-A9 en respuesta al daño con A β .

Se sabe que cuando la microglía se encuentra bajo un estímulo dañino como lo es el A β libera factores proinflamatorios, cuando los cultivos de microglía fueron sometidos a un tratamiento de KL y A β por 6h y 24h y se evaluó la expresión de TNF- α mediante SDS-Western-Blot y por qPCR.

Estos resultados muestran que los niveles de TNF- α disminuyen en la microglía por el efecto de A β tanto a las 6 h como a las 24 h y cuando se combinaron KL+ A β se observó que los niveles de TNF- α se reestablecen a las 24 h (ver figura 3; A y C). Por otro lado, el tratamiento con A β no produce cambios en los niveles del RNAm de TNF- α por qPCR con respecto al control. Sin embargo, el KL produce un incremento significativo de este mensajero a las 6 y 24 h, pero este efecto se inhibe en presencia de A β , como se observa en B y D de la figura 3.

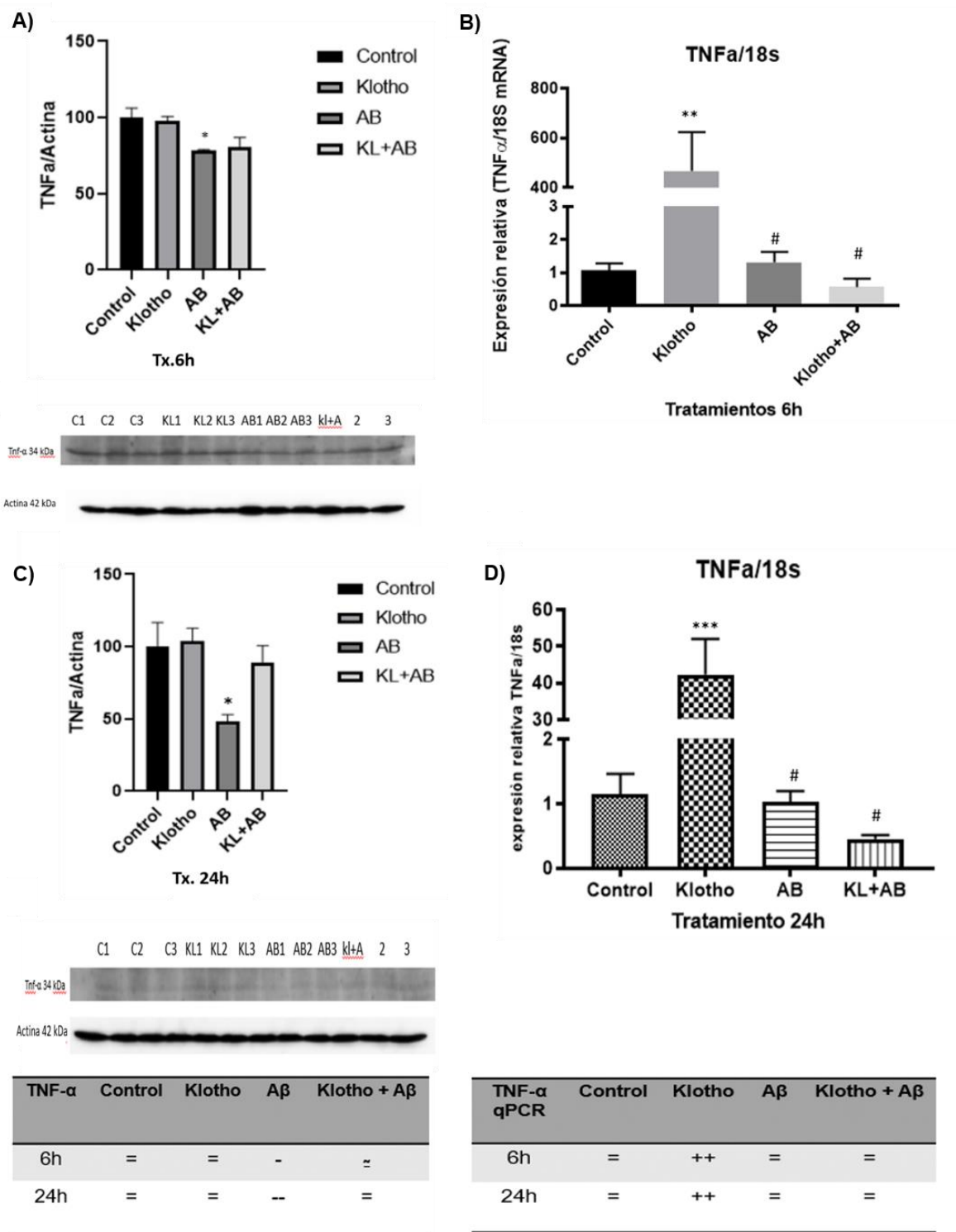


Figura 3: Proporción relativa de TNF-α de cultivos celulares de microglia SIM-A9 tratados con KL y Aβ durante 6 y 24 h. **(A y C)** Inmunoblot de TNF-α y actina; se obtuvieron bandas cercanas a los 35 kDa para TNF-α y 42 kDa para actina. **(B y D)** Expresión del RNAm de TNF-α por qPCR; cada barra representa la media ± error estándar, n=3 experimentos independientes. Prueba ANOVA 1 vía. **A)** Se encontraron diferencias significativas entre el control vs AB *p<0.05. **C)** Se encontraron

diferencias significativas entre klotho vs AB $*p<0.05$. **B)** Se encontraron diferencias significativas entre control vs klotho $**p<0.01$ y se encontraron diferencias significativas entre klotho vs A β y klotho vs KL+A β $\#p<0.01$. **D)** Se encontraron diferencias significativas entre control vs klotho $***p<0.001$ y, se encontraron diferencias significativas entre klotho vs A β y klotho vs KL+A β $\#p<0.001$.

Expresión del NF κ B sobre cultivos de microglía SIM-A9 tratada con KL y A β por SDS-Western-Blot.

Se evaluó la activación del NF κ B sobre cultivos celulares de microglía ante un tratamiento con un estímulo dañino como lo es el A β , aunque no se muestren diferencias significativas, los resultados muestran una tendencia a que el tratamiento con A β y el A β en combinación con KL producen una disminución del NF κ B a las 6h (A), a las 24h no se observa ninguna diferencia, aunque los niveles presentan una tendencia a incrementar (B).

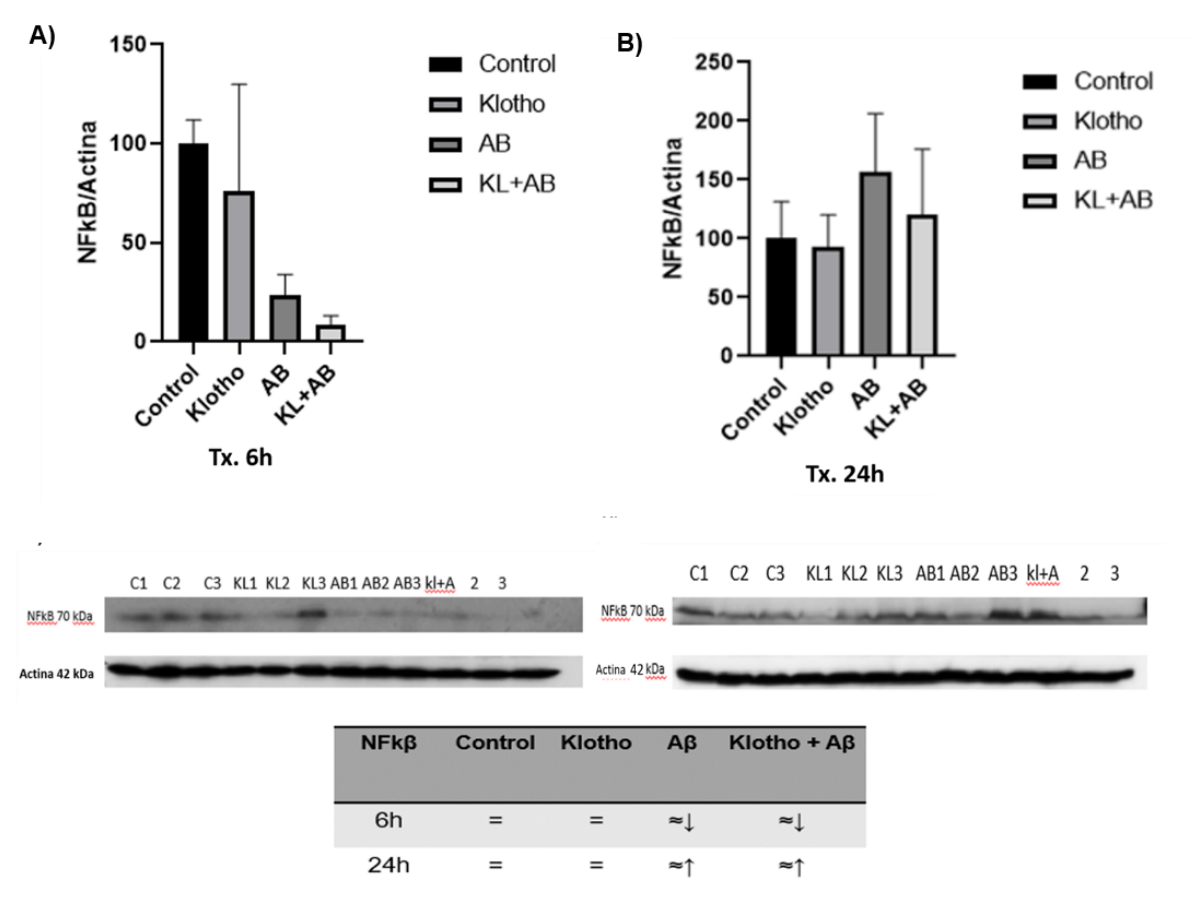


Figura 4: Proporción relativa de NF κ B de cultivos celulares de microglía SIM-A9 tratados con klotho y A β por 6 y 24 h. (A y B) Inmunoblot de NF κ B y actina; se obtuvieron bandas cercanas a los 70 kDa para NF κ B y 42 kDa para actina. Cada barra representa la media $\pm$ error estándar, $n=3$ experimentos independientes. Prueba ANOVA 1 vía. No se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los grupos.

Discusión

Se sabe que KL tiene una función importante en el cerebro y no se conocen todas sus funciones ni su exacta distribución en el SNC, por esto, en el presente estudio se examinó la presencia de KL en una línea celular SIM-A9 de microglia de ratón. Una de las contribuciones más importantes de este estudio es que se encontró que KL está presente en la microglia. Para identificar la proteína en estas células se realizó una inmunocitoquímica (Fig.1), para corroborar esta información se realizó un Western-Blot y se observó la presencia de una banda inmunoreactiva de aproximadamente 70 kDa correspondiente a KL. Con el propósito de saber si estas células sintetizan su propio KL se extrajo el RNAm y se identificó la presencia del mensajero de KL en la microglia de ratón (Fig. 2).

No existen reportes previos de la presencia de KL en la microglia. Se ha publicado que la expresión de KL varía dependiendo de la edad, especie y tipo celular, su expresión en el cerebro está extendida a lo largo del desarrollo.

Kuro-o y col., en el 97 determinaron la expresión del RNAm de KL por RT-PCR en ratón en diferentes órganos como riñón, plexos coroideos, glándula pituitaria, músculos esqueléticos, vejiga y órganos reproductores (C.R. Abraham *et. al.* 2016).

Estudios realizados por Li y col., en el 2004, mostraron por medio de hibridación *in situ* e IHC en ratones y ratas que la expresión de KL en el SNC es mayor en los plexos coroideos, específicamente localizada en la membrana apical de las células endodiales. Aunque, también se ha encontrado, en menor cantidad, en la membrana plasmática y en la envoltura nuclear de las células de Purkinje en ratón. La IHC en ratas demostró que KL está presente en la membrana de las neuronas corticales del hipocampo, lo cual podría explicar la influencia del KL en los procesos cognitivos. El mRNA de KL fue detectado en la corteza e hipocampo, así como en otras áreas límbicas que incluyen la amígdala, tálamo y núcleo hipotalámico (Li, S. *et. al.* 2004). También en el 2013 Clinton y su equipo determinaron la expresión de KL en células gliales *in vivo*, evidenciando que KL se encuentra presente en los oligodendrocitos, lo cual es importante en el proceso de mielinización de las fibras nerviosas y la velocidad de los estímulos nerviosos que envía el cerebro a través de las neuronas. Sin embargo la inmunoreactividad de KL parece no estar presente en los procesos de mielinización, ya que no se observó una co-localización de KL con la MBP (proteína básica de mielina) (Clinton, S. M., *et. al.* 2013).

Nuestros resultados sugieren un papel funcional importante para KL en el cerebro, involucrado en la regulación de las funciones de la microglía y por lo tanto podría estar implicado en procesos neurodegenerativos e inflamatorios.

Se sabe que tanto el TNF- α como el NF κ B, son activados por la microglia en respuesta a niveles altos de A β . Se ha reportado que el TNF- α es una citocina que se encuentra involucrado en la inflamación sistémica, el TNF- α y su receptor tipo 1 (TNFR1), no sólo están involucrados en la neuroinflamación cerebral relacionada con la EA sino que también contribuyen a la amiloidogénesis a través de la regulación de la β -secretasa. El TNF- α o el complejo TNF α -TNFR, es una molécula que puede tener regulación de supervivencia o de muerte celular en trastornos cerebrales como lo es la EA (Cheng, X., *et. al.* 2014). De igual forma, se sabe que el NF κ B es un factor de transcripción que se une a sitios de la región promotora de genes involucrados en la amiloidogénesis y pro-inflamatorios (Ju Hwang, C., *et. al.* 2019).

En este trabajo se analizó el efecto del A β y KL sobre los niveles del TNF- α y del NF κ B. Se encontró que los niveles del TNF- α disminuyen en la microglia por efecto del A β , tanto a las 6h como a las 24h, mientras que cuando se le agregó KL, se mantienen los niveles de TNF- α a las 24h (Fig.3). Estos resultados sugieren que el A β produce la liberación TNF- α y que el tratamiento con KL disminuye la liberación de TNF- α por efecto del A β . Interesantemente, cuando se analizaron los niveles del mRNA de TNF- α por efecto de A β , se observó que no cambiaron con respecto al control (Fig.3). Esto sugiere que el A β produce su liberación pero no su síntesis. Sin embargo, se encontró que el tratamiento únicamente con KL, produce un incremento en la síntesis de TNF- α y la presencia de A β lo inhibe.

Aunado a esto, se encontró que el tratamiento con A β produce una disminución del NF κ B en la microglia a las 6h y cuando se agregó el tratamiento con el KL (A β + KL) no se observó ningún efecto. Además, a las 24h no se observa ninguna diferencia significativa aunque los niveles presentan una tendencia a incrementar (Fig.4). Estos resultados sugieren que el A β incrementa la activación de NF κ B y que el KL no tiene ningún efecto sobre esta liberación. Como no tenemos los niveles de NF κ B en el medio de cultivo, no sabemos si el incremento a las 24 horas puede significar que la respuesta al tratamiento con A β es solamente agudo o que con el tiempo se inicia la síntesis de NF κ B.

Además de sus efectos sobre el TNF- α y NF κ B en presencia de A β y KL, se pudo observar que el tratamiento de la microglia con KL produce un importante incremento del mRNA de KL a las 6 y 24h aunado a un incremento en la proteína KL a las 24h. Los resultados fueron medidos por western blot y PCR en tiempo real (ver figura 2) a partir de los cultivos de la línea celular SIM-A9 de microglía tratados con KL por 6 h y 24 h, con la finalidad de observar su efecto sobre éstas células. Estos resultados sugieren que el KL presenta una retroalimentación positiva en la microglia y se autorregula quizá por receptores presentes en la misma célula. Es interesante mencionar que este efecto desaparece en presencia de A β . Del mismo

modo se observó un incremento importante del mRNA del TNF- α pero no afecta su liberación.

En conjunto los resultados hablan de la participación de KL en la regulación de los efectos proinflamatorios de la microglia. Al menos nos indican que regula marcadores importantes como el TNF- α donde estimula a la microglia a estar preparada para responder ante un posible daño incrementando la síntesis de KL y TNF- α y al mismo tiempo regulando su liberación para evitar sus efectos citotóxicos.

Se sabe que el TNF- α juega un papel importante en la inmunidad del huésped, previniendo infecciones y la formación de tumores malignos y se ha demostrado que TNF- α no solo induce efectos citotóxicos y apoptosis, sino que también tiene actividad antiviral. En el cerebro la microglia activada libera TNF- α con efectos tróficos o tóxicos dependiendo de la etapa del desarrollo neuronal, las células blanco y los subtipos de receptores. En un estudio se observó que TNF- α protege las neuronas fetales y postnatales después de la privación de glucosa y en neuronas envejecidas, se observó que son más susceptibles a la toxicidad por A β 42 que las neuronas de mediana edad y la adición de TNF- α tuvo un efecto neuroprotector en neuronas de mediana edad. Es decir, las mismas dosis de TNF- α que ayudan al desarrollo de las neuronas del hipocampo fetal de rata, pueden matar las neuronas corticales humanas y a los oligodendrocitos, lo que sugiere que TNF- α presenta un efecto específico dependiendo del estado de las células (Cheng, X., *et. al.* 2014). Por lo que se puede decir que cuando el sistema inmune funciona correctamente, el TNF- α trabaja protegiendo al organismo. Sin embargo, alteraciones en los niveles de TNF- α pueden dar lugar a la muerte neuronal, por lo que su regulación resulta muy importante para evitar el desarrollo de una gran diversidad de patologías.

Se sabe que las células gliales funcionan como neuromoduladores clave en cada etapa del desarrollo y de la vida adulta, por tanto poseen múltiples mecanismos de comunicación con varios tipos de células neuronales, uno de los métodos por el cual se cree que las neuronas y las microglia se comunican entre sí, es a través de la fractalkina expresada neuronalmente, ésta, induce a la microglia a liberar neuromoduladores los cuales actúan sobre la misma neurona y otras cercanas (Sheridan G. K., Murphy K. J. 2013) Esto podría estar ocurriendo con el KL ya que sabemos que también es producido por las neuronas y células gliales, las microglia podrían presentar receptores para KL y así responder ante un daño con factores proinflamatorios y neuroprotectores como el mismo KL que a su vez regula la liberación excesiva de factores como el TNF- α .

Conclusiones

Con este trabajo se puede concluir que la microglia produce KL. Además, la síntesis y liberación del KL responden a los tratamientos con A β y con el mismo KL, por lo que parece autorregularse. Finalmente, el KL tiene efectos sobre los niveles de TNF- α . Este estudio sienta las bases para estudiar los efectos del KL en los mecanismos involucrados en la respuesta inmunológica.

Bibliografía

1. Ahmed et al., «Pathology and Management of Alzheimer's disease». International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences, 2018, 7(2):30-42 (Ahmed et. al. 2018).
2. Ashley Swanson, Tovah Wolf. et. al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Pleiotropic roles for cytokines and neuronal pentraxins. Behavioural Brain Research 347 (2018) 49–56.
3. Baoji Xu. BDNF (I)rising from Exercise. Cell Metabolism 18, November 5, 2013 Elsevier Inc.
4. Brundin, P., Melki, R., & Kopito, R. (2010). *Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases. Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(4), 301–307. doi:10.1038/nrm2873
5. C.R. Abraham, P.C. Mullen, T. et. al. Klotho Is a Neuroprotective and Cognition-Enhancing Protein. Vitamins and Hormones, Chp 9. Volume 101. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.vh.2016.02.004>
6. Cararo López M, Yokoyama H. et al. The relevance of α -klotho to the central nervous system: Some key questions. Ageing Research Reviews 36 (2017) 137–148.
7. Chen Xu, C. Meredith, Reichert and Li Gan. (2016). Molecular pathways in Alzheimer's disease and cognitive function: New insights into pathobiology of tau. En *Genes, Environment and Alzheimer's disease*. (135-168). Elsevier inc.
8. Cheng, X., Shen, Y., & Li, R. (2014). Targeting TNF: a therapeutic strategy for Alzheimer's disease. *Drug discovery today*, 19(11), 1822-1827.
9. Chun Yan Ye. et. al. Donepezil attenuates A β -associated mitochondrial dysfunction and reduces mitochondrial A β accumulation in vivo and in vitro. Neuropharmacology 95 (2015) 29-36
10. Cisse, M., & Mucke, L. (2009). *A prion protein connection. Nature*, 457(7233), 1090–1091. doi:10.1038/4571090a
11. Claude M. Wischik, Franz Theuring, Charles R. Harrington. (2001). The molecular basis of tau protein pathology in AD and related neurodegenerative

- dementias. En *Neurobiology of Alzheimer's disease*. (103-206). United States by Oxford University press inc.
12. Clinton, S. M., Glover, M. E., Maltare, A., Laszczyk, A. M., Mehi, S. J., Simmons, R. K., & King, G. D. (2013). Expression of klotho mRNA and protein in rat brain parenchyma from early postnatal development into adulthood. *Brain Research*, 1527, 1–14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2013.06.044>.
 13. Colin L. Masters, Randall Bateman, Kaj Blennow, Christopher C. Rowe, et. al. (2015). Alzheimer's Disease. *Nature, Disease Primers, Vol. 1, 1-18 pp.* (Colin L. Masters et. al. 2015)
 14. Cotman, C. W., Berchtold, N. C., & Christie, L. A. (2007). Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends in neurosciences*, 30(9), 464-472.
 15. Cyril Laurent, Luc Buee, David Blum. Tau and neuroinflammation: What impact for Alzheimer's Disease and Tauopathies?. *Biomedical journal* 41 (2018) 21-33
 16. D.R Howlett, D.Allsop, E.H. Karran. (2001). The biology and molecular neuropathology of β -amyloid protein. En *Neurobiology of Alzheimer's disease*. (75-102). United States by Oxford University press inc.
 17. Dal Prà, I., Chiarini, A., Gui, L., Chakravarthy, B., Pacchiana, R., Gardenal, E., Whitfield J.F., Armato U. (2014). *Do Astrocytes Collaborate with Neurons in Spreading the "Infectious" A β and Tau Drivers of Alzheimer's Disease? The Neuroscientist*, 21(1), 9–29. doi:10.1177/1073858414529828
 18. Dean Hartley's,* Thomas Blumenthal B,c, Maria Carrillo, Gilbert DiPaolo, Lucille Esralew, Katheleen Gardiner Bf, Ann-Charlotte Granholm, Khalid Iqbalh, Michael Kramsi, Cynthia Lemerej, Ira Lottk, William Mobley, Seth Nessi, Ralph Nixonm, Huntington Potterb,n, Roger Reeveso, Marwan Sabbagh, Wayne Silvermanq, Benjamin Tyckod, Michelle Whittens, and Thomas Wisniewski. *Down syndrome and Alzheimer's disease: Common pathways, common goals. Alzheimers Dement.* Author manuscript; available in PMC 2016 April 01.
 19. F. K. Wiseman et al. Trisomy of human chromosome 21 enhances amyloid- β deposition independently of an extra copy of APP. *BRAIN* 2018; 141; 2457–2474.
 20. Frost, B., Jacks, R. & Diamond, M. Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *J. Biol. Chem.* 284, 12845–12852 (2009).
 21. Guo-fang CHEN, Ting-hai XU, Yan YAN. et. al. (2017). Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacologica Sinica* 38: 1205–1235
 22. Haass C, Koo EH, Mellon A, Hung AY, Selkoe DJ. Targeting of cell surface beta-amyloid precursor protein to lysosomes—alternative processing into amyloid-bearing fragments. *Nature* 1992; 357:500–3.

23. Hardy J, Selkoe D. J. 2002. The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science*. 297: 353-356.
24. Hardy J. A, Higgins G. A. 1992. Alzheimer's Disease: The Amyloid Cascade Hypothesis. *Science*. 256: 184-185
25. Héctor E. López, Hilda M. Coria. The role of neuroinflammation in age-related dementias. *Rev Invest Clin*. 2016; 68:40-8.
26. Heneka, M. T., Carson, M. J., Khoury, J. E., Landreth, G. E., Brosseon, F., Feinstein, D. L., ... Kummer, M. P. (2015). *Neuroinflammation in Alzheimer's disease*. *The Lancet Neurology*, 14(4), 388-405. doi: 10.1016/s1474-4422(15)70016-5
27. Hippus, H., Neundörfer, G., The discovery of Alzheimer's disease, *Dialogues Clin Neurosci*, 2003, 5(1):101 (Hippus, H., Neundörfer, G. 2003).
28. Hyo Geun Kim, Minho Moon. et. al. Donepezil inhibits the amyloid-beta oligomer-induced microglial activation in vitro and in vivo. *NeuroToxicology* 40 (2014) 23–32.
29. Jembrek MJ, Slade N, Hof PR, Simi'c G, The interactions of p53 with tau and A β represent potential therapeutic targets for Alzheimer's disease, *Progress in Neurobiology* (2010). <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.05.001>
30. Ju Hwang, C., Choi, D. Y., Park, M. H., & Hong, J. T. (2019). NF- κ B as a key mediator of brain inflammation in Alzheimer's disease. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)*, 18(1), 3-10.
31. Kametani F & Hasegawa M (2018) Reconsideration of Amyloid Hypothesis and Tau Hypothesis in Alzheimer's Disease. *Front. Neurosci*. 12:25.doi: 10.3389/fnins.2018.00025
32. Kaori Ito, Takuya Tatebe. et. al. Memantine reduces the production of amyloid- β peptides through modulation of amyloid precursor protein trafficking. *European Journal of Pharmacology* 798 (2017) 16–25.
33. Karran E, Mercken M, De Strooper B. 2011. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nature Reviews*. 10: 698-712.
34. Kelleher, R., J., Soiza, R., L., Evidence of endothelial dysfunction in the development of Alzheimer's disease: Is Alzheimer's a vascular disorder?, *Am J Cardiovasc Dis*. 2013, 1,3(4):197-226.
35. Kenney, K., Iacono, D., Edlow, B., L., Katz, D., I., Diaz-Arrastia, R., Dams-O'Connor, K., et al., Dementia After Moderate-Severe Traumatic Brain Injury: Coexistence of Multiple Proteinopathies. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2018, 1,77(1):50-63.
36. Kumar A, Singh A, Ekavali. 2015. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. *Pharmacological Reports*. 67:195-203

37. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H et al. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 1997; 390: 45–51.
38. Kurosu H, Yamamoto M, Clark JD et al. Suppression of aging in mice by the hormone klotho. *Science* 2005; 309: 1829–1833
39. Li, S.-A., Watanabe, M., Yamada, H., Nagai, A., Kinuta, M., & Takei, K. (2004). *Immunohistochemical Localization of Klotho Protein in Brain, Kidney, and Reproductive Organs of Mice. Cell Structure and Function*, 29(4), 91–99. doi:10.1247/csf.29.91
40. Liu PZ and Nusslock R (2018) Exercise-Mediated Neurogenesis in the Hippocampus via BDNF. *Front. Neurosci.* 12:52.
41. M. Inês Vicente, Pedro F. Costa, Pedro A. Lima. Galantamine inhibits slowly inactivating K⁺ currents with a dual dose–response relationship in differentiated N1E-115 cells and in CA1 neurons. *European Journal of Pharmacology* 634 (2010) 16–25.
42. Marek Luczkowski. Review “No screams and cries will convince us that white is white and black is black”, an ode to the defenders of amyloid cascade hypothesis of Alzheimer’s disease. *Coordination Chemistry Reviews.* 327–328 (2016) 35–42
43. María Bronzuoli, Aniello Iacomino et. al. Targeting neuroinflammation in Alzheimer’s disease. *Journal of Inflammation Research* 2016:9 199–208.
44. Muriel Noetzli, Chin B. Eap. Pharmacodynamic, Pharmacokinetic and Pharmacogenetic Aspects of Drugs Used in the Treatment of Alzheimer’s Disease. *Clin Pharmacokinet* (2013) 52:225–241.
45. Natalia Manzano-León y Jaime Mas-Oliva. *Estrés oxidativo, péptido β amiloide y enfermedad de Alzheimer*. *Gac Méd Méx* Vol. 142 No. 3, 2006.
46. Ochalek et al. Neurons derived from sporadic Alzheimer’s disease iPSCs reveal elevated TAU hyperphosphorylation, increased amyloid levels, and GSK3B activation. *Alzheimer’s Research & Therapy* (2017) 9:90 DOI 10.1186/s13195-017-0317-z
47. Redondo Flores, R. (2017). Memoria autobiográfica, cambios cognitivos y regulación emocional en el envejecimiento.
48. Santa Mammana, Paolo Fagone, Eugenio Cavalli. et. al. The Role of Macrophages in Neuroinflammatory and Neurodegenerative Pathways of Alzheimer’s Disease, Amyotrophic Lateral Sclerosis, and Multiple Sclerosis: Pathogenetic Cellular Effectors and Potential Therapeutic Targets. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 831; doi:10.3390/ijms19030831.
49. Sheridan, G. K., & Murphy, K. J. (2013). *Neuron-glia crosstalk in health and disease: fractalkine and CX3CR1 take centre stage. Open Biology*, 3(12), 130181–130181. doi:10.1098/rsob.130181
50. Shi, Z.-M., Han, Y.-W., Han, X.-H., Zhang, K., Chang, Y.-N., Hu, Z.-M., ... Hong, W. (2016). *Upstream regulators and downstream effectors of NF- κ B in*

Alzheimer's disease. Journal of the Neurological Sciences, 366, 127–134.
doi:10.1016/j.jns.2016.05.022

51. Stephen T. Yeung, Hilda Martinez-Coria. et. al. Repeated cognitive stimulation alleviates memory impairments in an Alzheimer's disease mouse model. *Brain Research Bulletin* 117 (2015) 10–15.
52. Torbus-Paluszczak, M., Bartman, W., & Adamczyk-Sowa, M. (2018). Klotho protein in neurodegenerative disorders. *Neurological Sciences*, 39(10), 1677-1682.
53. Vo, H. T., Laszczyk, A. M., & King, G. D. (2018). Klotho, the key to healthy brain aging?. *Brain Plasticity*, 3(2), 183-194.
54. Yaakov S., What Is Cognitive Reserve? Theory and Research Application of the Reserve Concept *J Int Neuropsychol Soc*, 8 (3), 448-60 Mar 2002.

ANEXO 1

Cultivo primario de microglia

1. Se prepara todo el material de disección previamente esterilizado.
2. Se utilizan ratas neonatas de 0 a 4 días de edad. Una vez teniendo las ratas listas, se les corta la cabeza.
3. De manera cuidadosa se les abre el cráneo para sacar el cerebro, el cerebro se coloca en cajas Petri con medio Hanks libre de calcio y magnesio.
4. Con ayuda de un microscopio estereoscópico, se retiran las meninges.
5. Se separan las cortezas del resto del cerebro y se llevan a la campana. Las cortezas se mantienen en cajas Petri con medio sin suero.
6. Una vez dentro de la campana las cortezas se pasan a otra caja Petri estéril que contiene medio sin suero, con la finalidad de que sean lavadas.
7. A un tubo Falcon de 15 ml se le agrega 1 ml de medio sin suero.
8. Con ayuda de unas pinzas estériles, se pasan las cortezas de la caja Petri al tubo Falcon.
9. Con una pipeta Pasteur se disocian las cortezas, con cuidado y sin hacer burbujas.
10. Posteriormente, se utiliza una jeringa para continuar disociando por completo las cortezas. (Solo se puede tocar la parte de arriba de la jeringa para evitar contaminación).
11. En un tubo Falcon de 50 ml, se coloca un tamiz de 40 μ m, se pasan las células con medio ya disociadas y se cuellan.
12. Las células se regresan a un tubo Falcon nuevo de 15 ml (este paso se puede hacer con ayuda de una pipeta o directo). Este paso es opcional dependiendo de la centrífuga que se vaya a utilizar.

13. Se llevan las células a centrifugar por 3 min a 1200 rpm.
14. Una vez pasado el tiempo de centrifugación, regresar a la campana y se retira el sobrenadante con cuidado y sin tocar el botón.
15. Se le agrega al tubo 2 ml de DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium 4.5g/L D-Glucose L-Glutamine, 110 mg/L Sodium Pyruvate, 10% SFB y se dispersa un poco con ayuda de una pipeta estéril.
16. Las células son sembradas en frascos de medio de cultivo de 75 ml. (Se dejan asentar por 20s). Se siembran aproximadamente dos cerebros por frasco.
17. Con ayuda de una pipeta cuidadosamente se agregan al frasco 10 ml de DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium 4.5g/L D-Glucose L-Glutamine, 110 mg/L Sodium Pyruvate, 10% SFB.
18. Las células son incubadas a 37°C.
19. Una vez dentro de la incubadora, se destapa un poco la tapa del frasco, esto para evitar que las células se asfixien, este paso puede ser evitado si los frascos para cultivo traen filtro en sus tapas.
20. Transcurridas 24 hrs de incubación, se retira el medio con SFB al 10% y se agregan 10 ml de medio con suero al 15%. (Para mantener la microglia en el cultivo)
21. Aproximadamente 5 días después (o cuando el medio se torne a un tono amarilloso) se cambia nuevamente el medio por 10 ml de medio al 15% SFB.
22. Cuando los cultivos llegan a confluencia (aprox. 7-9 días) el frasco de cultivo se pone en agitación a 180 rpm durante 24h a 37°C 5% CO₂.
23. Una vez transcurridas las 24 h el frasco es llevado a la campana, se retira el medio y es colocado en un tubo Falcon de 15 ml.
24. Se centrifuga durante 5 minutos a 2000 rpm.
25. A la caja que quedó vacía se le pueden agregar 10 ml de medio al 15% preparado, como se mencionó anteriormente y se incuban a 37°C.
26. Después de centrifugar, regresar a la campana, retirar el sobrenadante y resuspender el botón en 4 ml de medio con suero al 15%.
27. Tomar 200 µl de células (resuspender varias veces) y se colocan en la cámara de Neubauer para ser cuantificadas por el método azul de tripán.
28. Se cuentan tres cuadrantes de 4x4 en el microscopio invertido, se promedian los tres cuadrantes y se multiplican por 10,000 estas serán las células equivalentes a 1 ml.
29. El total se multiplica por el factor de dilución que generalmente es 4 ml
30. Para sembrar en cajas de 8 pozos: 100,000 células por pozo con 200 µl vol. total (Sembrar inicialmente con 100 µl, incubar 15 min y posteriormente llevar al volumen final de 200 µl).
31. Para sembrar en cajas de 6 pozos: 1 millón de células por pozo con un volumen total de 3 ml.
32. Una vez sembradas se incuban a 37°C.
33. El medio se cambia aproximadamente al tercer o quinto día de ser sembradas.

ANEXO 2

Cultivo de línea celular microglía SIM-A9

1. Las células se encuentran a -80°C , para descongelar se utiliza DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium 4.5g/L D-Glucose L-Glutamine, 110 mg/L Sodium Pyruvate, 10% SFB y 100 μl de Primocin.
2. Una vez fuera del REVCO se colocan en hielo lo más rápido posible.
3. Son colocadas en baño maría a 37°C por aproximadamente 1 minuto.
4. En un tubo Falcon de 15 ml, se agregan 3 ml del medio preparado previamente descrito.
5. Las células se pasan al tubo de 15 ml.
6. Se centrifugan a 500 rpm por 3 min.
7. Se retira el medio y se deja el pellet de las células, a este se le agregan 4 ml de DMEM preparado y se resuspenden.
8. Se cultivan en frascos de cultivo de 25 cm
9. Se incuban a 37°C 5% CO_2 por 48 h.
10. Una vez transcurridas las 48 h la microglía puede ser levantada.
11. Levantar con tripsina 12 mg de tripsina para 6 ml de DMEM, la tripsina se calientan a 37°C por 5 min.
12. Se agregan 3 ml de tripsina a los frascos de 25 cm, para despegar las células
13. Se pasan a un tubo Falcon de 15 ml.
14. Se llevan a centrifugar a 300 RFC por 3 minutos.
15. Se regresa a la campana y se procede a hacer la cuantificación de células por la técnica azul de tripano (80 μl de DMEM + 10 μl de células + 10 μl de azul de tripano) se colocan 10 μl en la cámara de Neubauer y se cuantifican en el microscopio invertido.
16. Se contabilizan 3 cuadrantes de 4x4, se obtiene el promedio y se multiplica por 10,000, el resultado se vuelve a multiplicar por 10 y ese será el número de células que hay en 1 ml.
17. Se siembran en cajas de 6 pozos aproximadamente 1 millón de células por pozo.
18. Se incuban por 48h a 37°C 5% CO_2 .
19. Si se quieren congelar células se prepara 100 μl de DMSO + 150 μl de células + 750 μl de DMEM (no preparado) en total 1 ml en tubos.

ANEXO 3

Electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE

Preparación de soluciones

Solución A. Acrilamida-Bis (30%,2.67%)

Acrilamida Bio-Rad 30g

N', N'-Bis metilen-acrilamida 0.8g

Se disuelve en aproximadamente 80 ml de agua desionizada, por 1h. Posteriormente se afora a 100 ml con agua y se filtra con papel Whatman No.1, se etiqueta y almacena a 4°C en oscuridad.

Nota: solución tóxica, siempre utilizar guantes para la preparación y manejo de esta solución.

Solución B. Amortiguador del gel inferior o separador (Tris-HCL 1.5M, pH 8.8)

Tris (hidroximetil) aminometano Bio Rad (PM 121.14) 1.5M = 18.15g

Se añade aprox. 50 ml de H₂O_{DD} y se ajusta el pH con HCL hasta 8.8, posteriormente se afora a 100ml con H₂O_{DD} y se almacena a 4°C

Solución C. Amortiguador del gel superior o concentrador (Tris-HCL 0.5M pH 6.8)

Tris (hidroximetil) aminometano Bio Rad (PM 121.14) 0.5M= 6g

Se disuelve en aprox 50 ml de H₂O_{DD}, se ajusta el pH con HCL hasta 6.8, posteriormente se afora a 100 ml con H₂O_{DD} y se almacena a 4°C

Solución D. SDS 10%

SDS Bio-Rad 5g

Se disuelve en 100 ml de H₂O_{DD}, no es necesario almacenar a 4°C

Solución E. Amortiguador de la muestra (Tris-HCL 0.5 M, pH 6.8)

Reductor

Agua 4ml (1ml)

Sol. C 1ml (0.25ml)

Glicerol 0.8 ml (0.2ml)

Sol.D 1.6 ml (0.4ml)

β-mercaptoetanol 0.4ml (0.1ml)

Azul de bromofenol 0.05% 0.2 ml (0.05 ml)

No reductor

Agua 4ml

Sol.C 1ml

Sol.D 1.6ml

Glicerol 0.8 ml

Azul de bromofenol 0.05% 0.2 ml

Solución F. Amortiguador de Corrida 5x pH 8.3

Tris-base (0.025 M) 9g

Gly (0.19M) 43.2 g

SDS 3g

Se disuelve en aprox. 500 ml de H₂O DD, al final aforar a 600 ml con H₂O DD. Se almacena a 4°C, para una corrida se diluye 5 veces el amortiguador con agua

Persulfato de amonio 10% (PSA)

Persulfato de amonio Bio-Rad 100mg en 1 ml de agua

Se mezcla y se puede almacenar por 1 día a 4°C

Procedimiento

1. Se prepara la cámara de electroforesis de Bio-Rad, utilizando los separadores de 1 mm entre los vidrios
2. Se prepara el gel inferior siguiendo la siguiente receta, dependiendo del porcentaje que se requiera utilizar.

	7.5%	9%	10%	12%	12.5%	15%
H ₂ O (ml)	4.85	4.31	4.04	3.35	3.18	2.35
Sol.B (ml)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Sol.A (ml)	2.5	3.03	3.3	4	4.16	5
Sol.D (μl)	100	100	100	100	100	100
TEMED (μl)	5	5	5	5	5	5
PSA 10% (μl)	50	50	50	50	50	50

3. Una vez que se agregan los catalizadores que son el TEMED y el PSA, se debe verter de manera inmediata la solución entre los vidrios con una pipeta Pasteur, los vidrios deben de estar previamente medidos y marcados a una altura de 5cm, ya que hasta ahí llegara la solución, posteriormente se agrega agua destilada con una jeringa Hamilton con delicadeza evitando así que el agua se mezcle con la solución del gel.

4. Se deja polimerizar y se seca el agua antes de agregar la solución del gel superior

5. Preparación del gel superior

	7.5%	9%	10%	12%	12.5%	15%
H ₂ O (ml)	3.05	3.05	3.05	3.05	3.05	3.05
Sol.C (ml)	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
Sol.A (ml)	0.65	0.65	0.65	0.65	0.65	0.65
Sol.D (μl)	50	50	50	50	50	50
TEMED (μl)	5	5	5	5	5	5
PSA 10% (μl)	25	25	25	25	25	25

6. Inmediatamente después de preparar la solución, se coloca nuevamente entre los vidrios y se pone el peine adecuado para el número de muestras que se van a cargar, teniendo cuidado de que no queden burbujas atrapadas entre los peines

7. Se deja polimerizar y con cuidado se sacan los peines, los pozos se pueden secar o no con papel filtro

8. Se rellena la cámara con amortiguador de corrida 1x, del electrodo hasta rebasar el vidrio pequeño y por fuera en la caja de plástico hasta rebasar la base de los vidrios.

9. Se cargan las muestras en los pozos correspondientes, siempre se debe agregar a un carril los marcadores de peso molecular para saber qué peso tienen nuestras bandas.

10. Se tapa y se conecta a la fuente de poder con corriente variable y voltaje constante, mientras las muestras entran al gel se corre a 50V, una vez que ya entraron, mientras corren por el gel superior se corren a 100V y cuando pasan al gel inferior a 150V

11. Se detiene el paso de corriente cuando el colorante llega a la base de los geles

12. Una vez terminada la electroforesis, se desarma la cámara con cuidado para retirar los geles e inmediatamente se colocan en amortiguador de transferencia que debe estar previamente preparado (ver en sig. anexo).

ANEXO 4

Inmunoelectrotransferencia (Western-Blot)

Preparación de soluciones

Amortiguador de transferencia. Tris 0.025 M, Gly 0.192 M, metanol 20%, pH 8.3 (no hay necesidad de ajustar)

Para 3L	Para 2L
Tris (Bio-Rad) 9.09g	6.06g
Gly (Bio-Rad) 43.2g	28.8g
MetOH (baker) 600 ml	400 ml

Se afora con agua desionizada

Amortiguador TBS (TRIS salino) 5x para 1L (sol. stock)

(Tris 100mM, NaCl 2.5 M, pH 7.5)

TRIS 12.11 g

NaCl 146.1 g

Se disuelve en 800 ml de H₂O de preferencia, se ajusta el pH a 7.5 con HCl y se almacena a 4°C

TBS 1X

Diluir el volumen necesario de la solución stock 5 veces con H₂O y esteril

TTBS

TBS 1X + Tween 20 0.05%

Solución Bloqueadora

TBS 1X + leche descremada (Bio-Rad) 5% =5g

Solución para la incubación de anticuerpos

TTBS 1x + leche 1% =1g

Solución de sustrato

Amersham ECL Western Blotting detection reagents and analysis system.

Detection Reagent 1 – 1ml

Detection Reagent 2 – 1ml

Para cada membrana

Procedimiento

1. Una vez terminada la electroforesis, el gel se equilibra con el amortiguador de transferencia, al mismo tiempo se equilibran de igual manera las membranas de nitrocelulosa y se ponen a remojar las fibras y filtros, todo en el mismo amortiguador.

2. Se prepara la cámara de transferencia.

En un recipiente adecuado, se vacía un poco de amortiguador de transferencia para armar el sándwich.

Se coloca el cassette con el cátodo (-) color negro en la parte inferior de dicho recipiente, sobre el cassette se colocan:

- Una fibra (Scotch Brite ®)
- Una hoja de papel filtro Bio-Rad de 7x9 cm
- El gel
- Membrana de nitrocelulosa Bio-Rad de 7x9 cm
- Una hoja de papel filtro Bio-Rad de 7x9 cm

Una vez colocado el filtro, pasar encima de este un tubo de ensayo un par de veces con cuidado esto para evitar que burbujas se queden en el sándwich

-Fibra (Scotch Brite ®)

Una vez armado, se presiona todo con la otra hoja de plástico cátodo (+) color transparente del cassette, se cierra y se sumerge en el amortiguador de transferencia en su cámara. Dentro de la cámara se coloca un agitador magnético (mosca) y un refrigerante, se tapa y se coloca a la fuente de poder

3. Se conecta a la corriente alterna estableciendo un voltaje variable y corriente constante a (200mA) durante 1h.

4. Se desarma la cámara y se recupera el gel y la membrana, antes de separarlos se marca la posición del gel en la membrana, de tal manera que nosotros sepamos que parte es arriba y cual abajo.

5. Las membranas se incuban en la solución bloqueadora durante 1h, esto para bloquear los sitios de unión específicos

6. Se lavan con TTBS 3 veces por 10 min

7. Se incuban con la solución del 1er anticuerpo durante toda la noche, de preferencia en el cuarto frío, la concentración dependerá del anticuerpo utilizado.

8. Se lavan con TTBS 3 veces por 10 min
 9. Se incuban en la solución del 2do anticuerpo (1:5000) durante 2h
 10. Se lavan con TTBS 3 veces por 10 min
 11. Se lavan con TBS 1x 2 veces por 10 min
 12. Las membranas se meten en bolsas ziploc
 13. Se agrega el sustrato para quimioluminiscencia.
Se mezclan las soluciones A y B (1ml de cada una para cada membrana) del sustrato para quimioluminiscencia de ECL, el sustrato se deja aprox. 2 min.
 14. Transcurrido el tiempo, con una sanita se seca todo el sustrato sin tocar las membranas dentro de la bolsa.
- A partir de esto todo el procedimiento faltante se lleva a cabo en un cuarto oscuro con luz roja, esto para evitar el velado de las placas.
15. La bolsa con las membranas dentro se colocan en una placa para radiografía Kodak Biomax, el tiempo de exposición es variable y dependerá de los anticuerpos utilizados.
 16. Se revela la placa, un minuto exponiéndola en revelador (Kodak), posteriormente se pasa a agua 1 min, luego se pasa al fijador (Kodak) 1 min, y finalmente se vuelve al agua durante 1 min.
 17. Se deja secar y se analiza.

ANEXO 5

Stripping para membranas WB

1. Se prepara en un vaso precipitado
 - 10.4 ml TRIS +
 - 66 ml H₂O +
 - 16.6 µl sds 10%
2. Se retiran 587 µl y se agregan 587µl de β-mercaptoetanol

3. Se calienta a baño maría a 60°C por 15-20 min
4. Las membranas se cambian a cajas limpias
5. Se lavan 3 o 4 veces con TBS por 10 min hasta que el olor desaparezca
6. Bloquear con leche 5% y TBS por 1h
7. Se lavan 3 veces con TTBS
8. Se agrega el anticuerpo 1°
9. Se incuba toda la noche en el cuarto frío
10. Se lava 3 veces por 10 min con TTBS
11. Se agrega anticuerpo 2° y se incuba por 2h
12. Se lava 1 vez con TBS y 3 con TTBS por 10 min
13. Se revela la membrana

ANEXO 6

Extracción de RNA por columna

1. Para lisar las muestras, las células o el tejido homogenizado es resuspendido en trizol, en un volumen apropiado dependiendo de la cantidad que se tenga.

Células	Tejido	Líquido
$\leq 10^5$	-	-
$\leq 10^6$	-	100µl
$\leq 10^7$	≤ 50 mg	200 µl

En este caso, las muestras fueron resuspendidas en 500 µl de Trizol

2. La muestra es centrifugada para remover restos de desechos partículas

3. El sobrenadante se transfiere a una columna **Zymo-Spin IIC Column** en un **Collection Tube** y se centrifuga.
4. Se agrega un volumen equivalente de etanol (95%-100%) al sobrenadante (se agregaron 500 µl de etanol) y se mezclan profundamente.
5. Se centrifuga a 12,000 rpm por 30s y el sobrenadante es desechado.
6. Se agregan 400 µl de RNA wash Buffer a la columna y nuevamente se centrifuga
7. En un tubo previamente esterilizado libre de RNA se agregan 5 µl DNAase I, 75 µl DNA Digestion buffer y se mezcla. Esta mezcla se añade directamente a las columnas
8. Se incuban a temperatura ambiente por 15 min.
9. Posterior a los 15 min, se añade 400 µl **Direct-zol RNA PreWash** a la columna y se centrifuga. El líquido es desechado y se vuelve a repetir este paso.
10. Se agregan 700 µl **RNA Wash Buffer** a la columna y se centrifuga por 2 minutos, esto para asegurar la eliminación completa del Wash Buffer. La columna se transfiere cuidadosamente a un tubo nuevo libre de RNA.
11. Para eluir el RNA se agregan de 50 a 30 µl para células y 100 µl para tejido de **DNAase/RNAase-Free Water** (en este caso se agregaron 50 µl) directamente a la columna y se incuban a temperatura ambiente por 10 min y se centrifuga.
12. Se determina la pureza del RNA leyendo en un espectrofotómetro 260/280 nm. Se observa la proporción 260/280 nm, que debe ser lo más cercana a 2, ya que esto representa la proporción de ácidos nucleicos en la muestra vs la de proteína.
13. El RNA se almacena a $\leq -70^{\circ}\text{C}$ o puede ser utilizado inmediatamente.

ANEXO 7

Extracción manual RNA para tejidos

Preparación de soluciones

Fenol-Cloroformo

Para 20 ml	Para 5ml
0.4 ml alcohol isoamílico	0.1 ml
9.6 ml cloroformo	2.4 ml
10 ml Fenol	2.5 ml

Sol. Etanol 75%

75 ml etanol

25 ml Agua con DEPC

Para 100 ml

NaOH 1M

40 gr de NaOH en 1L de agua destilada y desionizada, esterilizar

H₂O con DEPC

1ml de DEPC en 1L de H₂O DD, agitar toda la noche y esterilizar en autoclave.

Almacenar a temperatura ambiente.

1. Se adiciona 1 ml de trizol por cada 100 mg de tejido.
 2. El tejido se homogeniza utilizando un politrón, pistilo o sonicador dependiendo del tamaño, en tubos falcón estériles solo se homogeniza con 500 ml, posterior a la homogenización se agregan los otros 500 ml de trizol en un tubo eppendorf estéril.
 3. Se centrifuga a 12,000 rpm 3 min para tejidos más grandes ya que el trizol separa ácidos nucleicos y así queda mejor separado el sobrenadante del pellet, ya que el sobrenadante es lo que nos interesa.
 4. Se adicionan 200 µl de cloroformo y se da vortex riguroso, se incuba 3 min a temperatura ambiente.
 5. Se centrifuga a 12,000 rpm (Microcentrifuga Sorvall refrigerada) a 4°C por 15 min, el sobrenadante se transfiere a un tubo nuevo, sin tocar el pellet.
 6. Se añaden 500 µl de fenol/cloroformo y se agita en vortex 2 min
- Nota: esto se puede repetir si se observa la fase proteica (interfase) abundante

7. Se centrifuga a 12,000 rpm por 5 min a 4°C.
8. Al sobrenadante se le agregan 500 µl de isopropanol, se agita manualmente y se incuba a temperatura ambiente por 1h a -80°C (a esta temperatura precipita mejor)
9. Se centrifuga a 12,000 rpm por 15 min a 4°C.
10. Se elimina el isopropanol (solo se voltea rápidamente y se deja secar sobre una sanita).
11. Lavar con 1 ml de etanol 75%.
12. Se centrifuga 5 min a 12 rpm 4°C.
13. Se elimina el etanol y se seca sobre una sanita.
14. Se adicionan 100 µl de H₂O para re suspender.

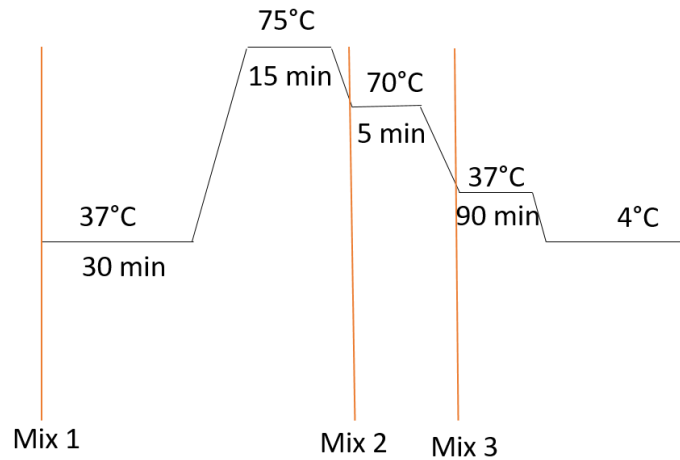
ANEXO 8

Síntesis de ADN complementario (cDNA)

1. Se calcula la cantidad de RNA (1 mg...500 mg)
2. Se prepara el Mix 1
Tratamiento con DNAsa
-DNAsa 1µl + RNA +H₂O
-Buffer DNAsa 1µl + RNA +H₂O
3. Se prepara el Mix 2. (Se empieza de este mix cuando la extracción es por columna)
Adicionar:
-1µl de Oligo dt (50mM)
-Primers random (200 ng/µl)
-H₂O 10µl
-Si no se hace el tratamiento con DNAsa se agregan 2µl de H₂O
4. Preparar y adicionar el Mix 3.
-8µl de Buffer retrotranscriptasa

- 1 μ l de DNTP's
- 1 μ l de RNAsin (.25 cuando se hace por columna)
- 1 μ l de RT (Mlv)
- 7 μ l de H₂O

5. Se calcula el orden de las temperaturas



6. Se mete al termociclador hasta mix 2, una vez que sale se coloca inmediatamente en hielo.

7. Se agrega mix 3

8. Se mete al termociclador por 50 min

9. Se almacena a 20°C

Soluciones:

- DNTP's 10 mM, 60 μ l h₂O y 10 μ l de cada DNTP's (En el kit viene a 100 mM)
- Oligo dt 50 mM (El stock viene en 100 μ l, por lo tanto solo se divide a la mitad)
- Random Primers 100 ng/ μ l (Stock 200 ng/ μ l, solo se diluye a la mitad)

ANEXO 9

PCR en tiempo real (qPCR)

Soluciones:

H

<u>Mix 1</u>	<u>1x</u>
-Buffer	8µl
-DNTP's	1µl
-Oligo dt	1µl
-Hexámeros	1µl

<u>Mix 2</u>	<u>1x</u>
-DTT	4µl
-Rnase out	0.25µl
-H ₂ O	0.75µl
-Transcriptasa	1µl

<u>qPCR</u>	<u>1x</u>
-Máxima	5µl
-Primer F	0.5µl
-Primer R	0.5µl
-H ₂ O	1µl

1. Se hace una tabla para calcular las cantidades de Mix que se agregaran de cada muestra.

Muestra	ng/µl	260/280	µg/µl	1.0 µg	H ₂ O	Mix 1	Mix 2
---------	-------	---------	-------	--------	------------------	-------	-------

2. Se hace la dilución de cDNA

-9µl de H₂O

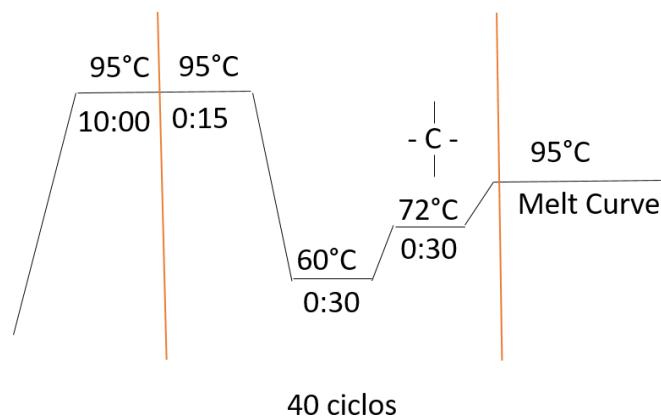
-1µl del cDNA de la muestra

3. Se limpia incubadora y se prende UV por unos minutos

4. Se coloca la placa y se carga:

7µl Mix + 3µl cDNA □ carga a placa

5. Se lleva al termociclador.



ANEXO 10

PCR punto final

Soluciones:

Los Primers se diluyen:

- 5µl de primer
- 95µl de H₂O

Gel Agarosa pequeño para máx. 10 muestras (50 min a 100 AMP)

- 25 ml de TAE 1x
- .25g Agarosa
- Se calienta en un matraz hasta que hierbe, posteriormente se agrega
- 1.5 µl de bromuro de etidio

Gel de Agarosa grande para máx. 25 muestras

- 40 ml de TAE 1x
- .4g de Agarosa
- Se calienta hasta que hierbe y luego se agregan
- 3µl de Bromuro de etidio

1. En tubos eppendorf pequeños y estériles se prepara:

	1x
Buffer (5x)	5µl
Magnesio (50nm)	4µl
DNTP's	1µl

Primers	1µl c/u
cDNA	2µl
Taq Polimerasa	.25µl
H ₂ O	10.75µl
	25 µl

2. Se carga al gel 10 µl de cada muestra por pozo
3. Se corre por 1h-1:30h aprox.
4. Se revela en

ANEXO 11

Fijación e Inmunofluorescencia para células

Fijación

1. Las células se encuentran fijadas en porta objetos o fluorodish, se sacan de la incubadora.
2. Se retira el medio.
3. Se agrega 1 ml de paraformaldehído 4%.
4. Incubar por 30 min.
5. Se lava 3 veces por 10 min con TBS o PBS.
6. Se dejan con PBS si se quieren guardar en refrigeración.

Inmunofluorescencia

1. Se permeabilizan las células con TTBS, se realizan 5 lavados por 15 min.
2. Bloquear por 1h con leche al 5% en TBS.
3. Lavar con TTBS, 3 lavados de 10 min.
4. Se prepara el anticuerpo en TTBS con leche al 1%.

5. Se incuba toda la noche.
6. Lavar 3 veces con TTBS por 10 min.
7. Se prepara y se agrega el anticuerpo 2° durante 2h.
8. Se lavan 3 veces con TTBS por 10 min.
9. Se agrega DAPI por 10-15 min.
10. Lavar 3 veces con TBS por 10 min.
11. Se observan en el microscopio.