



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE UN TETRAPÉPTIDO QUELANTE DE IONES
COBRE Y MODULADOR DE LA AGREGACIÓN DE β -AMILOIDE SOBRE LA
MEMORIA ESPACIAL Y LOS AGREGADOS AMILOIDES EN UN MODELO DE RATÓN
PARA LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
BIOL. JESÚS MANCILLA PÉREZ

TUTORAS PRINCIPALES:
DRA. SOFÍA YOLANDA DÍAZ MIRANDA (INB-UNAM)
DRA. CLAUDIA PÉREZ CRUZ (CINVESTAV-IPN)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
DR. FERNANDO PEÑA ORTEGA (INB-UNAM)
DRA. LILIANA QUINTANAR VERA (CINVESTAV-IPN)

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. NOVIEMBRE 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

RESUMEN

La interacción del péptido β -amiloide (β A) con iones metálicos como el cobre (Cu) ha sido implicada en eventos patológicos de la enfermedad de Alzheimer (EA), donde la principal manifestación clínica es el déficit cognitivo. En este estudio, evaluamos el efecto de un tetrapéptido bifuncional (TP), capaz de modular la agregación de β A y quelar iones Cu, en la neuropatología y la disfunción cognitiva de un modelo de ratón triple transgénico para la EA (3xTg-AD). Ratones machos 3xTg-AD de 12 meses de edad fueron tratados con el TP vía intracerebroventricular durante dos semanas (TG-TP). Asimismo, como grupo control vehículo se administró solución salina a animales 3xTg-AD (TG-VHCL) y ambos grupos fueron comparados con un grupo de animales no-transgénicos control (NoTG-CTRL). Para evaluar el efecto del TP sobre el aprendizaje y la memoria espacial dependiente de hipocampo, los sujetos se sometieron a la prueba del laberinto acuático de Morris cinco días antes del sacrificio. Se observó que los sujetos TG-TP se comportaron de manera similar a los ratones NoTG-CTRL y mostraron mejoras significativas en comparación a animales TG-VHCL en los parámetros de adquisición y retención. Para poder relacionar estos cambios conductuales con la agregación de β A en el hipocampo, se analizó la presencia del péptido mediante inmunohistoquímica. Los resultados indican que la mejora cognitiva en los ratones TG-TP está acompañada de un aumento en la agregación de oligómeros β A, revelando un incremento en el tamaño de estos agregados en relación al grupo TG-VHCL. Estos datos sugieren que un cambio en la agregación y en el tamaño de los oligómeros β A producido por el TP puede disminuir las propiedades tóxicas de β A sobre el aprendizaje y la memoria de referencia espacial dependiente de hipocampo. Por lo anterior, el diseño de compuestos quelantes de iones metales y que interfieren con la agregación de β A puede no sólo ofrece una aproximación terapéutica sino aporta información relevante para entender los mecanismos subyacentes a la patología de la EA.

ABSTRACT

The interaction of amyloid- β ($A\beta$) with metal ions such as copper (Cu) has been implicated in pathological events of Alzheimer's disease (AD), where the main hallmark is cognitive decline. In this study, we evaluated the effect of a bifunctional tetrapeptide (*TP*), which is capable of modulating $A\beta$ aggregation and chelating Cu ions, on neuropathology and cognitive dysfunction in a triple transgenic mouse model (3xTg-AD) that develops many of the features observed in AD. In 3xTg-AD male mice 12 month-old, *TP* was infused via intracerebroventricular (icv) over 2 weeks, as well as in a vehicle control group and compared with non-transgenic control mice (NoTG-CTRL). To validate *TP*'s effect on behavior, all groups were subjected to Morris water maze (MWM) test, which evaluates spatial reference learning and memory. 3xTg-AD subjects infused with *TP* (TG-TP) performed similar to non-transgenic control animals (NoTG-CTRL) and better to transgenic mice treated with vehicle (TG-VHCL). Moreover, it was shown by optical density that cognitive improvement in TG-TP was accompanied by an increase in the aggregation of $A\beta$ oligomers and revealed an increment in the size of these aggregates. The results suggest that a change in the aggregation and size of $A\beta$ oligomers may diminish their toxic properties, reflected on analyzed neuroanatomical and behavioral levels. Therefore, the design of chemical compounds may not only offer a therapeutic approach but it also helps understanding the underlying mechanisms of AD pathology.

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

El actual trabajo representa el inicio y fin de un ciclo en mi formación académica, científica y personal, por lo que es importante agradecer a las personas e instituciones que fueron parte de este esfuerzo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), que desde mis estudios de licenciatura ha sido mi *alma máter* y me ha forjado no sólo en lo académico sino en pensamiento crítico y propositivo. Gracias por permitirme portar el azul y oro en mi corazón.

Al Instituto de Neurobiología (INB) de la UNAM, por ser mi segunda casa de estudios y brindarme la oportunidad de ampliar mis fronteras. Ha sido un honor pertenecer a esta gran comunidad de nivel internacional.

A los académicos del INB que formaron parte de mis estudios de posgrado por su dedicación y tiempo en la transmisión de sus conocimientos enriqueciendo mi visión científica.

A la Dra. Sofía Y. Díaz Miranda, por su asesoría y apoyo académico desde mi llegada al laboratorio. Por ver lo mejor de mí y recordarme que la humildad es un valor que te hace mejor ser humano.

A la Dra. Claudia Pérez Cruz, por su apoyo y asesoría académica. Por ser mi contacto a este programa de posgrado y darme el desafío del presente trabajo. Asimismo, agradezco a los miembros de su laboratorio que me ayudaron en uno o varios aspectos del proyecto, en especial a: Daniel Cuervo Zanatta, Luis Adolfo Leonhardt Avalos, Yanahí Posadas Torrentera y a su técnico de laboratorio Lic. Eduardo García Osornio.

A la Dra. Liliana Quintanar Vera, por su apoyo y asesoría académica. Por proveer no sólo del tetrapéptido sino del material para que el proyecto continuara, así como por creer en mí. De igual forma, gracias a los miembros de su laboratorio que me apoyaron en el transcurso del trabajo, en especial a: Maripaz Márquez y a su técnico de laboratorio Ma. Eugenia Cruces Ángeles.

Al Dr. Fernando Peña Ortega, por su apoyo y asesoría académica. Por representar un reto en mi formación académica y por sus siempre objetivos comentarios permitiendo la consolidación de este trabajo.

A la M. en C. Azucena Ruth Aguilar Vázquez, por su asesoría y apoyo técnico en las actividades relacionadas del proyecto.

A Jorge Servín de la Cruz, por su apoyo técnico.

A la Dra. Erika Orta Salazar, por su asesoría y apoyo en cada una de las etapas del proyecto y de mi formación académica.

Al Dr. Jean Pascal Morin, por su asesoría académica en la realización y análisis inmunohistoquímico del trabajo.

A los integrantes del Laboratorio de Neuromorfometría y Desarrollo, por el apoyo y los comentarios dados mejorando mi preparación y el proyecto en todos los aspectos.

A la Unidad de Posgrado del INB, en especial a la M. en C. Leonor Casanova Rico y Guadalupe Amador Uribe por el apoyo administrativo durante mis estudios de la maestría.

A la Unidad de Bioterio del INB, en especial al M.V.Z. José Martín García Servín y la Dra. Alejandra Castilla León por su asesoría y por el cuidado y mantenimiento de los ratones requeridos para la realización de los experimentos.

A la Unidad de Microscopía del INB, en especial a la Ing. Elsa Nydia Hernández Ríos por su asesoría y apoyo técnico en la facilitación del equipo y la captura de imágenes.

A la Unidad de Proteogenómica del INB, en especial a la M. en C. Adriana González Gallardo por su asesoría y apoyo técnico.

A la Unidad de Videoconferencia del INB, por el apoyo técnico de la Lic. Lourdes Lara Ayala.

A la Unidad de Cómputo del INB, en especial a la Ing. Sandra Hernández García y al Ing. Omar González Hernández por su asesoría y apoyo técnico.

A la Biblioteca del campus Juriquilla de la UNAM, en especial al Dr. Francisco Javier Valles Valenzuela, a la Lic. Teresa Soledad Medina Malagón y a la Lic. Teresita de Jesús Pérez Cruz por su apoyo técnico y la facilitación del material bibliográfico.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo otorgado a través de la beca número 2099459 del Programa Nacional de Posgrados de Calidad y del proyecto CB-2012-178841 del Fondo Sectorial de Investigación para la Educación.

A la Dirección General de Apoyo al Personal Académico de la UNAM, por el apoyo otorgado a través de los proyectos IN-201613 e IN-203616.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES	9
<i>Sobre el modelo de ratón triple transgénico para la enfermedad de Alzheimer (3xTg-AD)</i>	<i>9</i>
<i>Sobre mecanismos de interacción entre βA y tau en 3xTg-AD</i>	<i>10</i>
<i>Sobre péptidos interruptores de hojas-β, quelantes de iones metales y bifuncionales</i>	<i>11</i>
<i>Sobre clasificación estructural de oligómeros βA y sus características y propiedades</i>	<i>12</i>
JUSTIFICACIÓN	15
HIPÓTESIS	16
OBJETIVOS	16
<i>Objetivo general.....</i>	<i>16</i>
<i>Objetivos particulares</i>	<i>16</i>
MÉTODOS	17
<i>Animales.....</i>	<i>17</i>
<i>Grupos experimentales y procedimiento quirúrgico</i>	<i>17</i>
<i>Prueba de referencia espacial: Laberinto acuático de Morris (LAM)</i>	<i>18</i>
<i>Preparación de tejido.....</i>	<i>20</i>
<i>Anticuerpos y fluorocromos.....</i>	<i>21</i>
<i>Procedimiento inmunohistoquímico de fluorescencia.....</i>	<i>21</i>
<i>Microscopía confocal y análisis de imágenes</i>	<i>22</i>
<i>Análisis estadístico</i>	<i>23</i>
RESULTADOS	24
<i>El péptido bifuncional TP mejora el aprendizaje y la memoria espacial de ratones 3xTg-AD .</i>	<i>24</i>
<i>Los niveles de βA total y βA42 no muestran cambios significativos en sujetos TG-TP</i>	<i>27</i>
<i>Aumento no significativo en los niveles de fibrillas amiloides y oligómeros fibrilares marcados por OC pero sí en su tamaño relativo en animales TG-TP</i>	<i>28</i>
DISCUSIÓN.....	30

CONCLUSIONES..... 34

PERSPECTIVAS..... 34

REFERENCIAS..... 35

LISTA DE FIGURAS 45

APÉNDICE 1. Ubicación estereotóxica de infusión intracerebroventricular 46

INTRODUCCIÓN

En 1906, el médico alemán Alois Alzheimer describió por primera vez los síntomas e histopatología de su paciente Auguste Deter, una mujer de 51 años de edad con una historia de 5 años de deficiencia cognitiva progresiva, alucinaciones, delirios y conducta social severamente disfuncional (Alzheimer, 2006). La patología que ahora lleva el nombre de enfermedad de Alzheimer (EA), es la causa principal del síndrome de demencia en la vejez alrededor del mundo (Ferri *et al.*, 2005).

De acuerdo a estudios epidemiológicos, la EA representa entre el 50 y 75% de los casos de demencia (Alzheimer's Disease International, 2014). Actualmente, se estima que el número de personas en el mundo con este síndrome corresponde a 44.35 millones y que podría llegar a más de 135 millones en el 2050. Sin embargo, se calcula que para este último año referido, el 71% de las personas que la padezcan vivirán en países de ingresos bajo y mediano como es el caso de México (Alzheimer's Disease International, 2013). Según datos de la Secretaría de Salud (SS) y del Instituto Nacional de Geriátrica (ING), en México existen 800,000 personas con algún tipo de demencia (ING/SS, 2014), de los cuales más de 350,000 padecen la EA y 2,030 mueren a causa de ella anualmente (Reséndiz, 2010).

La histopatología de la EA está caracterizada por la progresión temporal y espacial de depósitos o placas derivados principalmente de la agregación del péptido β -amiloide (β A; ver Figura 1A), así como de marañas neurofibrilares (MNFs) causadas por modificaciones anormales de *tau*, proteína encargada de la estabilización de los microtúbulos en las células (Brettschneider *et al.*, 2015; Gendron y Petrucelli, 2009; Heppner *et al.*, 2015; Masters *et al.*, 2015; ver Figura 1B). Esta enfermedad también está asociada a una disfunción sináptica y a la muerte neuronal en regiones corticales, la región hipocampal, el estriado ventral y el cerebro anterior basal (Siu *et al.*, 2007); además, se han observado angiopatía amiloide en arteriolas, neuroinflamación y gliosis reactiva (Small y Barrow, 2007; Weiner y Frenkel, 2006).

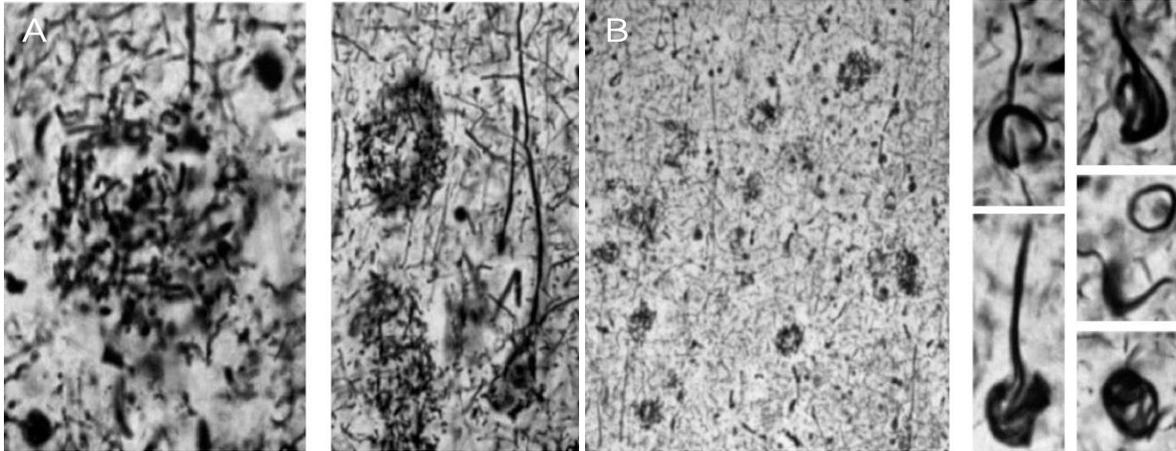


Figura 1. Observación histopatológica del cerebro de Auguste Deter, mostrando en (A), las placas amiloides a mayor y menor aumento respectivamente y en (B), las marañas neurofibrilares a menor y mayor aumento respectivamente. Modificado de Maurer (2006).

A partir de estudios genéticos y bioquímicos y del desarrollo de modelos animales, se ha sugerido que la proteína βA es el agente causativo de la patogénesis de la EA y que el resto de los rasgos patológicos son resultado directo de su acumulación; a esta teoría se le ha denominado como “hipótesis de la cascada amiloide” (Hardy y Higgins, 1992; Hardy y Selkoe, 2002).

La proteína βA es un grupo de polipéptidos anfipáticos residuales de aproximadamente 4 kDa que se expresa constitutivamente en todos los tejidos y fluidos biológicos. Se produce por la proteólisis de la proteína precursora amiloide (PPA), a causa de la escisión secuencial de ésta por los complejos de enzimas denominadas β - y γ -secretasas, en la ruta amiloidogénica. En el cerebro, la mayoría de βA producida es de 40 residuos aminoácidos de longitud (βA_{40}), mientras que una pequeña proporción (15% aproximadamente) es una variante de 42 residuos (βA_{42}) (Glabe y Bush, 2007; Otvos, 2007). En condiciones patológicas como la del Alzheimer, la cantidad relativa de βA_{42} es particularmente elevada debido a que esta forma es más propensa a agregarse y formar fibrillas amiloides que βA_{40} (Walsh y Selkoe, 2007).

La agregación amiloide es un proceso cooperativo que se podría definir como un modelo de polimerización dependiente de nucleación que involucra dos fases: una *lag* o de nucleación y una de elongación o crecimiento. De acuerdo a este modelo, βA transitoriamente se puede auto-asociar en especies oligoméricas pequeñas durante el

período *lag*; cerca de terminar esta fase, se forma un núcleo y es usado como un molde para el crecimiento fibrilar en la fase de elongación (DeToma *et al.*, 2012; ver Figura 2). La variedad de especies amiloides además de los monómeros y las placas, incluyen los dímeros, los trímeros, los oligómeros solubles, los ligandos difusibles derivados de β A (LDD β As), las protofibrillas y las fibrillas insolubles (Finder y Glockshuber, 2007; Mohamed *et al.*, 2011).

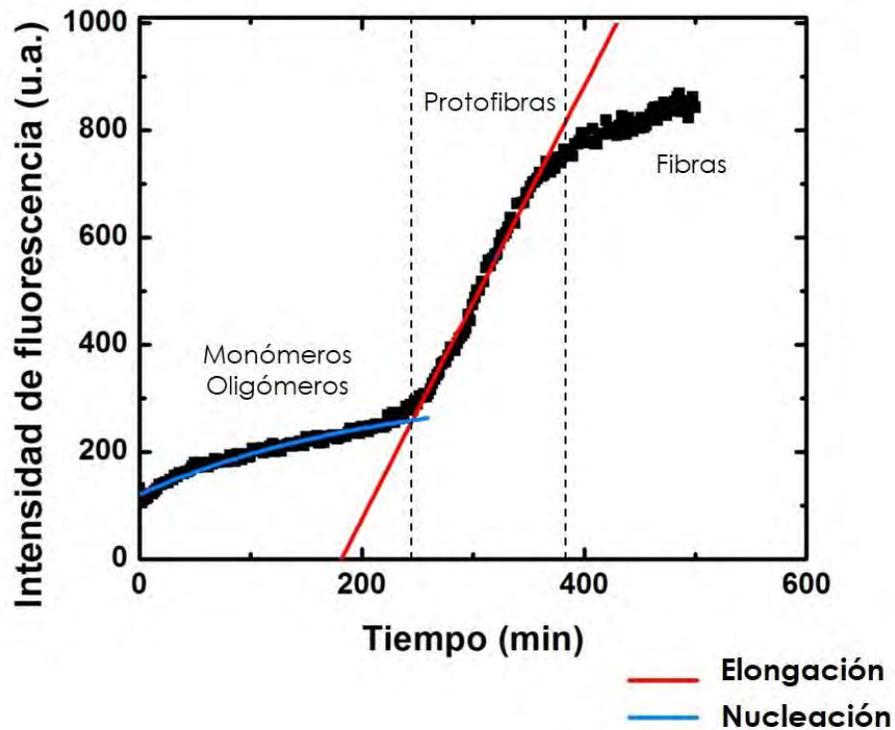


Figura 2. Proceso de agregación de β A en sus dos fases: de nucleación (línea azul) y de elongación (línea roja). Detectado por incremento en la intensidad de fluorescencia por tioflavina T.

Se ha sugerido que las especies neurotóxicas más potentes son los oligómeros en lugar de las placas amiloides, dando lugar a la “hipótesis de la cascada oligomérica” (Glabe, 2008; Kirkitadze *et al.*, 2002; Ono *et al.*, 2009).

Por otra parte, diferentes estudios han mostrado la existencia de tres clases generales de oligómeros amiloide estructuralmente distintas entre sí: oligómeros prefibrilares (OPFs), protofibras anulares (PFAs) y oligómeros fibrilares (OFs). Los OPFs se forman en tiempos tempranos de agregación, son reconocidos por el anticuerpo policlonal A11 y se piensa son precursores de la formación de las PFAs. Los OFs parecen

ser pequeños fragmentos de protofilamentos fibrilares que son reconocidos por el suero policlonal OC (Kayed *et al.*, 2009, 2010). De hecho, se ha propuesto que los monómeros β A pueden asociarse a largo de dos rutas divergentes teniendo como productos intermedios OPFs y OFs para generar la formación de fibrillas amiloides (Kayed *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2010). Es importante señalar que en modelos de ratón transgénicos la presencia de OPFs se ha relacionado con disfunción cognitiva, mientras que los OFs con una cognición intacta (Billings *et al.*, 2007; Cheng *et al.*, 2007; Lesné *et al.*, 2006, 2008; Liu *et al.*, 2015), siendo corroborada esta relación en tejido cerebral humano (Lesné *et al.*, 2013).

Además de la deposición amiloide, se ha observado en cerebros de pacientes con EA una alteración en la homeostasis de diversos iones metálicos. Específicamente, se han detectado altas concentraciones de cobre (Cu), zinc (Zn) y hierro (Fe) en las placas amiloides (Lovell *et al.*, 1998; Zatta *et al.*, 2009). Más aun, se ha demostrado que los iones de Cu pueden acoplarse a β A y que esta unión cataliza la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs), lo que incrementa la neurotoxicidad de β A (Roychaudhuri *et al.*, 2009; ver Figura 3). Lo anterior, sugiere un rol esencial de estos iones metálicos en la agregación amiloide, y por lo tanto en la patogénesis de la EA (Tiiman *et al.*, 2013; ver Figura 3).

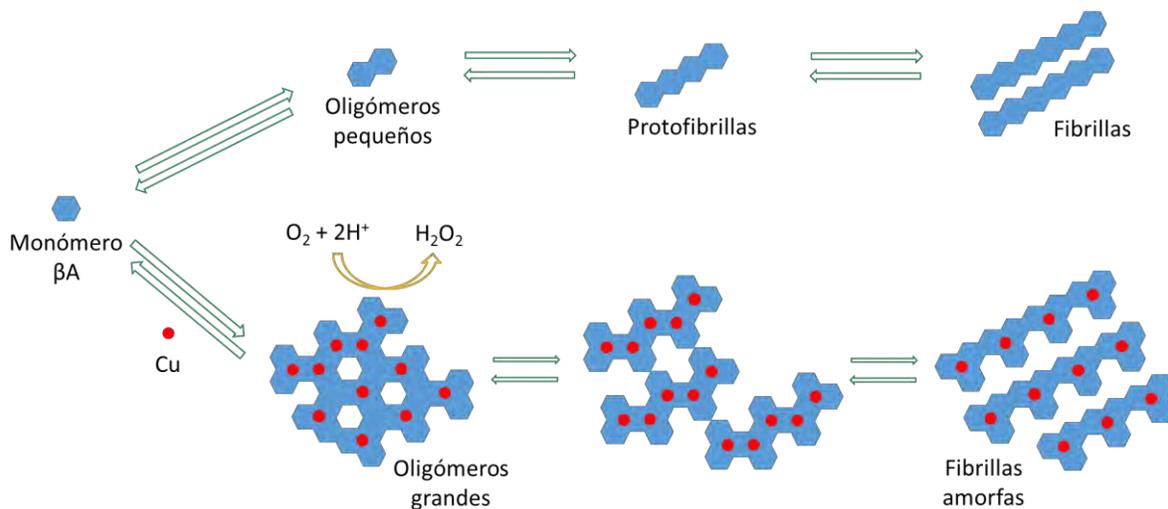


Figura 3. Estados de agregación de β A y su asociación a iones Cu, incluyendo el mecanismo de generación de EROs (p. ej. peróxido de hidrógeno) como resultado de la interacción β A-metal. Basado en el modelo propuesto por Márquez *et al.* (2014).

El desarrollo de estrategias farmacéuticas contra la EA ha sido guiado principalmente por la hipótesis de la cascada amiloide, siendo la mayoría de los estudios dirigidos contra β A, ya sea reduciendo su producción, promoviendo su aclaramiento o interfiriendo en su agregación (Mangialasche *et al.*, 2010; National Institute on Aging (NIA), 2015; Selkoe, 2013). Es por esto que, el diseño de péptidos bifuncionales capaces de modular el proceso de agregación de β A, así como de formar complejos (quelatos) con los iones metálicos interrumpiendo su unión con β A (ver Figura 4A), ha sido considerado una estrategia prometedora para evitar la progresión de la EA (Jensen *et al.*, 2012). El diseño de éstas moléculas funcionales también ha permitido elucidar la participación de los factores involucrados en las rutas patológicas asociadas a esta enfermedad (Braymer *et al.*, 2010; Choi *et al.*, 2010).

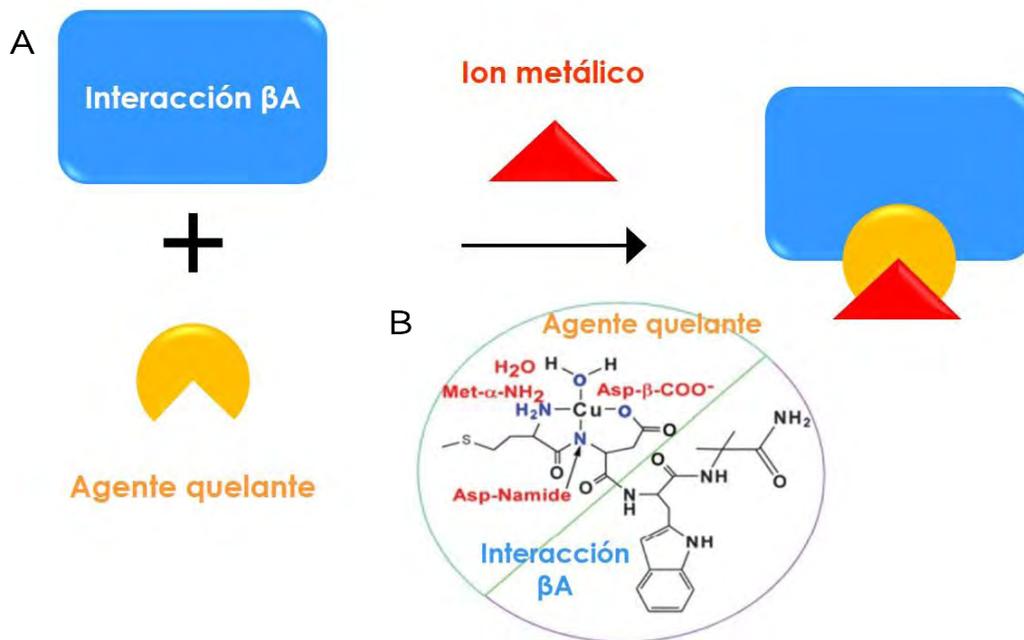


Figura 4. Concepto estructural básico para el diseño de moléculas bifuncionales (A) como el TP (B).

Recientemente, el grupo de la Dra. Liliana Quintanar del Departamento de Química del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav) reportó el diseño y caracterización en estudios *in vitro* de un tetrapéptido no-natural bifuncional denominado TP (ver Figura 4B). Éste péptido consta de una parte no-natural aromática que provee de resistencia metabólica y de reconocimiento a β A, D-Trp-

Aib, y otra parte con alta afinidad por Cu(II), Met-Asp. De acuerdo a los resultados obtenidos, en ausencia de iones Cu, el TP afecta el tamaño y la morfología de oligómeros β A además retarda el proceso de nucleación amiloide (ver Figura 5A y 5C). Más aún, mostraron que Cu lleva a β A por una vía de agregación diferente que involucra la formación rápida de oligómeros grandes, incrementando el tiempo lag y generando a fibrillas amiloides de morfología diferente (ver Figura). No obstante, en presencia del TP, se recupera la curva sigmoide de fibrilización, distintiva de la agregación de β A en ausencia de Cu, además se promueve la formación de fibrillas más largas y menos fragmentadas (Márquez et al., 2014; ver Figura 5B y 5C). Sin embargo y dicho anteriormente, estos estudios fueron llevados a cabo *in vitro*, por lo que realizar pruebas

de su eficacia en modelos *in vivo* resulta necesario, particularmente en modelos animales para la EA.

Los modelos transgénicos para la EA han tenido un importante papel en el entendimiento de la patogénesis de esta enfermedad. Ciertamente, hasta la fecha no se ha desarrollado un modelo que recapitule todos los aspectos de la patología (Lee y Han, 2013; Webster *et al.*, 2014). Sin embargo, existe uno considerado con mayor validez histopatológica y de constructo (similitud de mecanismos patológicos): el ratón triple transgénico para la EA (3xTg-AD) (Bilkei-Gorzo, 2014). Este modelo murino expresa los transgenes humanos PS1M146V, APPSwe y tauP301L, teniendo como resultado la

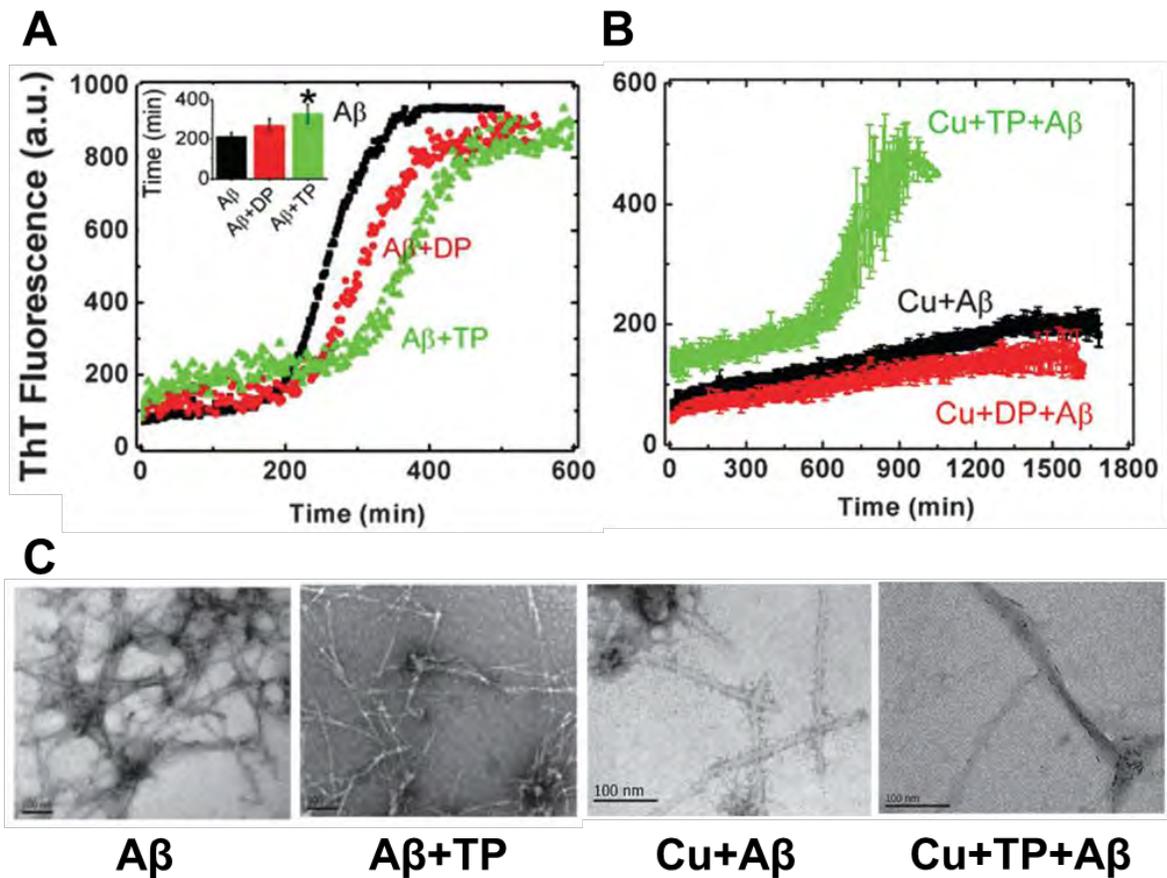


Figura 5. Agregación de β A modulada por TP en presencia y ausencia de Cu (A) El TP incrementa significativamente el tiempo lag del crecimiento amiloide en ausencia de Cu detectado por ensayo de fluorescencia de tioflavina T. (B) En el mismo tipo de ensayo, el TP recupera la curva sigmoide de formación fibrilar de β A en presencia de Cu. (C) Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de la morfología de agregados β A bajo diferentes condiciones. Modificado de Márquez *et al.* (2014).

presencia progresiva de placas amiloides y marañas neurofibrilares así como de otros marcadores patológicos en regiones afectadas por la EA (Oddo *et al.*, 2003; Mastrangelo y Bowers, 2008). Aunado a esto, este modelo animal desarrolla un déficit cognitivo paralelo al progreso de la neuropatología (Clinton *et al.*, 2007). Asimismo, se ha mostrado que al afectar el proceso de agregación amiloide en estos animales se puede influir en el desarrollo de la patología de tau, sugiriendo una relación directa entre ésta última y β A (Oddo *et al.*, 2004).

Para el presente proyecto se propuso el uso del modelo animal transgénico para la EA 3xTg-AD con el fin de evaluar el efecto del péptido TP sobre la agregación de β A en regiones del hipocampo dorsal usando técnicas inmunohistoquímicas y a nivel conductual mediante una prueba de aprendizaje y memoria espacial.

ANTECEDENTES

Sobre el modelo de ratón triple transgénico para la enfermedad de Alzheimer (3xTg-AD)

- En 2003, Oddo y colaboradores desarrollaron y caracterizaron el ratón 3xTg-AD. Mediante la inyección de transgenes humanos (APP^{Swe} y tauP301L) en embriones de ratones *knockin* PS1M146V se logró generar este animal genéticamente modificado. Además, usando técnicas inmunohistoquímicas describieron que la presencia de β A se podía detectar desde los 3 meses de edad (mde) de manera intracelular en la neocorteza y a los 6 mde. en la región CA1 del hipocampo de estos animales; es hasta los 12 mde que los depósitos extracelulares β A son notorios en la corteza frontal y otras regiones corticales, así como en el hipocampo. De forma paralela, alteraciones en la proteína tau son evidentes en las neuronas piramidales de CA1 a partir de los 12 mde. pero no antes. Ambas patologías se desarrollan progresivamente de una manera dependiente de la región cerebral y de la edad. Asimismo, observan la aparición de astrocitos reactivos que colocalizan con depósitos amiloides en sujetos viejos. El trabajo concluye que este modelo transgénico es el primero en presentar ambas patologías y ser consistente con la hipótesis de la cascada amiloide, lo que lo hace útil en pruebas de intervención terapéutica.
- Clinton y colaboradores (2007) evaluaron en diferentes pruebas conductuales a ratones 3xTg-AD machos y hembras de diferentes edades. En la prueba del laberinto acuático de Morris (LAM), encontraron que a los 6 mde las hembras transgénicas poseen un déficit cognitivo en comparación a los machos, los cuales se comportan de igual forma que sujetos no-transgénicos de la misma edad durante el aprendizaje de la tarea. Sin embargo, se observan diferencias entre ambos genotipos en las pruebas de retención de 24 horas. Es hasta los 15 mde en que se distingue una desigualdad significativa en las pruebas de adquisición entre ambos genotipos y sin diferencias entre sexos en la condición transgénica. Los autores concluyen que el dimorfismo sexual es atribuible a niveles elevados de corticoesterona en las hembras, mientras que el déficit cognitivo propio del genotipo corresponde al establecimiento progresivo de la patología.

Sobre mecanismos de interacción entre β A y tau en 3xTg-AD

- En un trabajo de Oddo y colaboradores (2004) se expone que la inmunoterapia de β A reduce los niveles de esta proteína en el 3xTg-AD. Mediante la administración intrahipocampal de anticuerpos contra β A en estos ratones a los 6 y 12 mde, se observa una reducción en los niveles intracelulares, así como en los depósitos extracelulares amiloides. Además, reportan que esta reducción conlleva una disminución en los agregados de tau, sin embargo, dicho efecto depende del estado de fosforilación de la proteína, principalmente mediado por el proteosoma. El estudio concluye que la estrategia por inmunoterapia puede resultar efectiva para el tratamiento de la EA y de otras enfermedades neurodegenerativas.
- Oddo y colaboradores en 2006a mostraron que tanto β A como tau son factores clave en el déficit cognitivo en la EA. Usando ratones 3xTg-AD de edad avanzada e inmunización contra β A, valoraron cambios conductuales en el paradigma del laberinto de T (que evalúa la alternancia espontánea reflejando memoria de trabajo) y analizaron por la técnica de ELISA los niveles solubles e insolubles de β A y tau. Encontraron que al reducir ambas proteínas en su forma soluble existía una conducta de alternancia similar a sujetos no transgénicos de la misma edad y mejor con respecto a ratones transgénicos sin inmunizar. Por el lado contrario, al someterlos a un tratamiento agudo, solamente disminuían los niveles solubles de β A mas no de tau lo que resultó en ninguna mejora cognitiva. Los autores concluyen que los compuestos diseñados para reducir la deficiencia cognitiva en la EA deberán buscar disminuir los niveles de tau soluble.
- En 2016, Ontiveros-Torres y colaboradores encontraron un vínculo entre la producción de β A y las modificaciones en tau. Mediante inmunohistoquímica e inmunoblot caracterizaron la deposición amiloide en relación a patrones de fosforilación de tau y analizaron la expresión de cinasas y mediadores de inflamación en la formación hipocampal de ratones 3xTg-AD de diferentes edades. Encontraron que la presencia de depósitos fibrilares β A viene acompañada de la activación de poblaciones astrocíticas y de microglía, así como de la expresión de citocinas inflamatorias como TNF- α y IL-18. Además, encontraron un incremento en la expresión de las cinasas, SAPK/JNK y Cdk5, que son capaces de fosforilar

residuos de tau. Los resultados sugieren que β A es capaz de inducir un ambiente inflamatorio activando células gliales y expresando citosinas como TNF- α y IL-18, que puedan estar involucradas en la activación de cinasas de estrés que a su vez pueden fosforilar secuencialmente a tau en función de la edad, apoyando la hipótesis de la cascada amiloide de la EA.

Sobre péptidos interruptores de hojas- β , quelantes de iones metales y bifuncionales

- El diseño y caracterización del péptido TP fue reportado por Márquez y colaboradores en 2014. Por medio de técnicas tales como dispersión dinámica de luz, ensayos de fluorescencia de tioflavina T y microscopía electrónica de transmisión se demostró la capacidad de asociación de este péptido con Cu^{2+} compitiendo con β A por un sitio de unión específico, así como de interruptor de hojas- β inhibiendo el proceso de oligomerización. Específicamente, observaron que el TP afecta el proceso de nucleación de β A40, manteniendo el tamaño y alterando la forma de los oligómeros amiloides en las etapas tempranas de esta fase. Además, las fibras maduras de β A40 muestran cambios morfológicos y son menos abundantes al ser tratadas con el péptido. Por último, en presencia de Cu observan que el TP disminuye la formación temprana de oligómeros grandes β A promovidos por el mismo metal (ver Figura 5B y 5C). El estudio resalta que el TP, así como otras moléculas bifuncionales, prueba ser una herramienta útil para investigar el rol de iones Cu en la agregación β A y para el diseño de compuestos con potencial terapéutico para la EA.
- Adlard y colaboradores (2008) usaron ratones transgénicos que presentan depósitos amiloides pero no MNFs para demostrar la actividad como interruptor de la agregación de β A inducida por metales del PBT2, un análogo de la hidroxiquinolina, así como su capacidad de transportar iones Zn y Cu a través de la membrana celular (ionóforo). Lo anterior lo observan no solamente en un decremento en las concentraciones de β A en el cerebro de estos animales sino en la rápida mejora cognitiva de estos, mediante el paradigma del laberinto acuático de Morris (LAM). El estudio muestra a este compuesto como una posible estrategia terapéutica sino también manifiesta la importancia de los metales que participan en la sinapsis y su papel en la oligomerización de β A y su toxicidad.

- Permanne y colaboradores (2002) mediante la infusión intracerebroventricular (i.c.v.) del péptido interruptor de hojas- β $iA\beta 5$ usando bombas osmóticas en un modelo de ratón transgénico para EA que expresa APPV717I y PS1A246E, encontraron por medio de análisis inmunohistoquímico que además de inducir una reducción en la deposición amiloide en hipocampo y corteza cerebral también se observaba un mayor número de neuronas (anticuerpo NeuN) y una disminución en marcadores como microglia (lectina de tomate biotinilada) y astrocitos (anticuerpo GFAP) como indicadores de inflamación cerebral. Estos resultados demuestran que el proceso de deposición amiloide es una de las causas de la neurodegeneración en la EA. Sin embargo, este péptido carece de la propiedad quelante del *TP* y el *PBT2*.
- Choi y colaboradores (2010), usando el compuesto bifuncional *L2-b* en pruebas *in vitro* así como en cultivos celulares de neuroblastomas humanos observaron que la agregación de βA y la neurotoxicidad inducidas por Zn^{2+} y Cu^{2+} fueron moduladas en presencia de este compuesto. Asimismo, en homogeneizados de tejido cerebral de pacientes con Alzheimer que contenían iones metálicos y distintas especies de βA , se les trató con *L2-b* mostrando un desacoplamiento de los agregados amiloides. Los datos obtenidos indican una relación entre los eventos inducidos por metales y βA en el desarrollo de la EA, resaltando la importancia del uso de moléculas bifuncionales como agentes terapéuticos y herramientas químicas para entender la patología de la EA.

Sobre clasificación estructural de oligómeros βA y sus características y propiedades

- En un trabajo de 2003, Kaye y colaboradores reportaron la producción de un anticuerpo que reconoce específicamente oligómeros amiloides solubles y no de bajo peso molecular solubles o fibrillas amiloides. Usando un imitador molecular sintetizado de oligómeros solubles vacunaron conejos de los cuales se obtuvo un suero policlonal específico (A11). Mediante microscopía electrónica y cromatografía de exclusión de tamaño, encontraron que la morfología de estos oligómeros es predominantemente esférica y corresponden a un tamaño mínimo de ~ 40 kDa. También, mostraron que la neurotoxicidad de βA en un cultivo celular podía ser inhibida en la presencia del anticuerpo producido. Finalmente,

examinaron la inmunoreactividad del A11 en tejido de cerebros humanos con EA y de controles, observando que estos agregados se distribuyen en las regiones de deposición amiloide en cerebros con EA pero esta distribución es espacialmente distinta y separada de depósitos fibrilares marcados con tioflavina S. Los autores concluyen que estos oligómeros son no-fibrilares y pueden preceder el desarrollo de placas densas, y que su epítoto dependiente de conformación permite su distinción de otros agregados amiloides.

- Kaye y colaboradores (2007) reportaron la producción de otro anticuerpo que reconoce un epítoto genérico asociado a fibrillas amiloides y oligómeros fibrilares solubles. Inmunizando conejos con fibrillas β A homogéneas se obtuvo un suero policlonal (OC) que reconoce fibrillas, pero no monómeros u oligómeros prefibrilares positivos a A11. Por cromatografía de exclusión de tamaño se mostró que los oligómeros reconocidos por OC tienen una distribución amplia en tamaños, desde ~8 a 200 kDa. Asimismo, por inmunohistoquímica investigaron la distribución de estos agregados en el hipocampo y corteza temporal de tejido cerebral de EA encontrando que la marca positiva de OC incluía depósitos amiloides difusos pero negativos a tioflavina S. El hecho de que epítotos reconocidos por OC y A11 sean genéricos y mutuamente exclusivos indican que la diferencia conformacional entre oligómeros fibrilares y prefibrilares es una distinción fundamental que permite reconocer los agregados que se acumulan en enfermedad y su significancia patológica.
- En 2015, Liu y colaboradores demostraron las diferencias espaciales, temporales y estructurales entre oligómeros OC y A11 y su relación a las placas amiloides. Empleando cuatro líneas de ratones transgénicos que expresan variantes de la PPA vinculadas a la EA, mediante técnicas inmunohistoquímicas y de western blot los autores encontraron que los oligómeros reconocidos por A11 pueden ser detectados antes de la formación de las placas, asimismo aquellos reconocidos por OC se observan solamente después de la aparición de éstas. Además, hallaron que los oligómeros OC están concentrados alrededor de las placas amiloides densas y ocupan una pequeña fracción de la corteza mientras que los A11 están distribuidos por toda la región cortical. De manera opuesta, los niveles

de los oligómeros fibrilares exceden los prefibrilares. Por último, usando pruebas conductuales incluyendo el LAM, mostraron que ratones transgénicos que solamente producen oligómeros del tipo fibrilar están cognitivamente intactos. Los datos indican que, aunque la mayoría de β A soluble en cerebros que poseen placas densas son oligómeros fibrilares, son funcionalmente inocuos por su contención en las mismas placas; por otro lado, que los oligómeros prefibrilares tienen mayor relevancia patogénica en muchas regiones debido a su distribución espacial en el cerebro.

JUSTIFICACIÓN

Hasta la fecha se desconocen las causas de la enfermedad de Alzheimer, no obstante, diversas líneas de investigación proponen un rol central de β A en la patogénesis de esta enfermedad. El papel patológico de este péptido debe ser todavía esclarecido, ya sea como disparador de los procesos subsecuentes, desde las marañas neurofibrilares hasta la muerte neuronal, o como conductor continuo de estos mismos (Hardy y Selkoe, 2002). Adicionalmente, la asociación de β A con diversos iones metales ha permitido dilucidar la influencia de estos en el proceso de agregación amiloide así como en la neurotoxicidad mediante la generación de EROs (Pithadia y Lim, 2012; Greenough *et al.*, 2013; Tiiman *et al.*, 2013). Por lo anterior, el diseño de moléculas bifuncionales capaces de quelar iones metálicos y de modular la agregación de β A, ofrecen el desarrollo de herramientas químicas que puedan ayudar a entender mejor el papel de los iones metálicos en la patogénesis de la EA y finalmente, sentar las bases en la elaboración de estrategias terapéuticas para tratar esta enfermedad neurodegenerativa (Márquez *et al.*, 2014).

HIPÓTESIS

El péptido TP actuará como una molécula capaz de modular el proceso de agregación de β A, disminuyendo la cantidad de agregados amiloides en regiones del hipocampo dorsal en ratones 3xTg-AD.

La disminución de los agregados β A mejorará el desempeño en una prueba de aprendizaje y memoria de referencia espacial dependiente del hipocampo en ratones 3xTg-AD.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar el efecto de la molécula bifuncional TP sobre la agregación de β A a nivel neuroanatómico y sobre el aprendizaje y la memoria espacial dependiente del hipocampo en ratones machos 3xTg-AD.

Objetivos particulares

1. Analizar el efecto del TP sobre el proceso de agregación del β A en las regiones del subículo y CA1 del hipocampo dorsal de ratones machos 3xTg-AD por medio de técnicas inmunohistoquímicas.
2. Evaluar el efecto del TP en el aprendizaje y la memoria de referencia espacial de ratones machos 3xTg-AD a través de la prueba del laberinto acuático de Morris.

MÉTODOS

Animales

El uso de los animales se realizó conforme a las normas internacionales para el cuidado y uso de animales de laboratorio establecidas por el Consejo de Investigación Nacional de las Academias Nacionales de los Estados Unidos de América (NRC, por sus siglas en inglés) (NRC, 2011). Asimismo, el protocolo fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología (INB) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

En este estudio se utilizaron ratones machos 3xTg-AD homocigotos de 12 mde generados a partir de un fondo híbrido B6129S. De igual forma, se usaron ratones no transgénicos de la misma edad y sexo mantenidos en el mismo fondo B6129S híbrido. Todos los animales fueron reproducidos y criados en el bioterio del INB UNAM, en cajas de policarbonato (12x12x25 cm) y en condiciones óptimas de alimentación (dieta para ratón del laboratorio Purina Chow formula 5001 y agua *ad libitum*) y de ambientación constante (temperatura entre 20°-25°C; humedad 40-70%) en un ciclo de luz/oscuridad de 12 h en monitoreo riguroso.

Grupos experimentales y procedimiento quirúrgico

Para evitar un sesgo en los resultados se manejó un protocolo doble ciego, asignando claves a cada sujeto y desconocidas a los experimentadores durante el procedimiento quirúrgico, las pruebas conductuales y el análisis inmunohistoquímico. Con el mismo propósito, los grupos de los diferentes tratamientos y genotipos se contrabalancearon entre sí.

El TP se obtuvo del laboratorio de la Dra. Liliana Quintanar de forma liofilizada y fue almacenado en seco hasta su uso. Para los tratamientos TP, se disolvieron 0.6 mg de péptido por 100 µl agua salina, mientras que para los tratamientos vehículo se administró solución salina.

Se emplearon tres grupos experimentales: transgénicos tratados con el TP (TG-TP, n = 4) y con solución vehículo (TG-VHCL, n = 3) y ratones no transgénicos sin tratamiento usados como control (NoTG-CTRL, n = 7). Para los dos primeros, la vía de

administración fue i.c.v. implantando bombas osmóticas de infusión continua (modelo 1002) y kits de infusión cerebral 3 (Alzet, Durect). Se utilizó un aparato estereotáxico (Stoelting) bajo las siguientes coordenadas de acuerdo al atlas del cerebro de ratón de Franklin y Paxinos (2001): se midieron a partir de bregma y de la superficie del cráneo 0.22 mm antero-posterior, -1.0 mm lateral y -2.5 mm dorso-ventral, dirigidas al ventrículo lateral derecho (ver Apéndice 1). La anestesia fue inducida y mantenida con anestésico

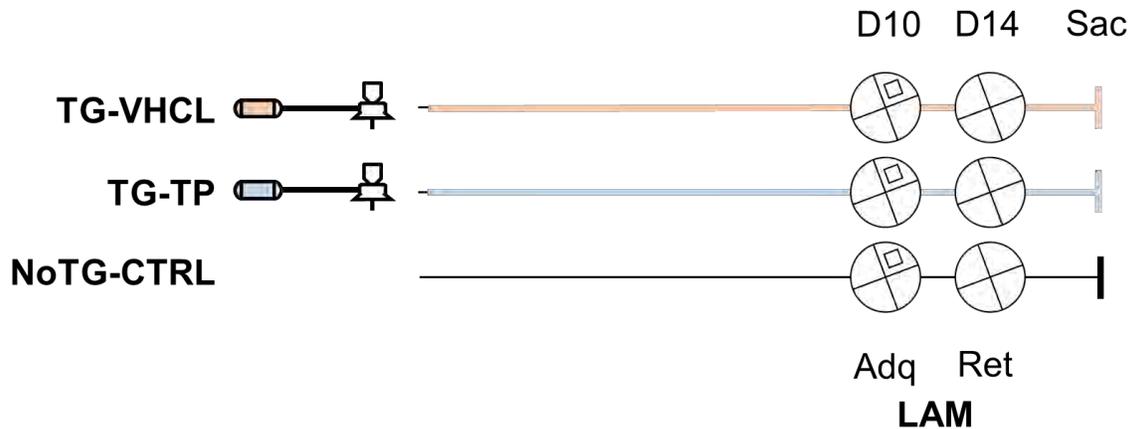


Figura 6. Línea de tiempo experimental. Ratones machos de 12 mde 3xTg-AD fueron tratados icv con 100 μ l solución salina (vehículo) o con 0.6 mg TP en 100 μ l solución salina durante 14 días usando bombas osmóticas. Como grupo control se contó con ratones no-transgénicos de la misma edad y sexo sin tratamiento alguno. Desde el día 10 al 14, los tres grupos experimentales realizaron las pruebas del LAM (Adq: adquisición; Ret: retención). Un día después de finalizadas las pruebas conductuales, se sacrificaron (Sac) a los animales para su posterior análisis inmunohistoquímico.

inhalable isoflurano. Los tratamientos tuvieron una duración de 14 días. El grupo control no fue sometido a ninguna intervención quirúrgica pero sí al manejo animal apegado al protocolo (ver Figura 6).

Prueba de referencia espacial: Laberinto acuático de Morris (LAM)

La prueba de LAM fue aplicada a partir del día 10 del inicio de los tratamientos (ver Figura 6). El método y parámetros a evaluar para ésta prueba se basaron en los protocolos de Blurton-Jones y colaboradores (2009), Billings y colaboradores (2005) y Vorhees y Williams (2006). El aparato utilizado consistió en un tanque circular (1 metro de diámetro y 40 cm de alto) blanco a una distancia de 80 cm del suelo, lleno de agua mezclada con pintura témpera del mismo color del tanque, a una temperatura entre 21 y

23° C. Se designaron 2 ejes principales perpendiculares entre sí, creando una forma de “+”. El final de cada línea demarca cuatro puntos de inicio, dividiendo el área en cuatro cuadrantes iguales. Asimismo, se colocaron claves extra-laberinto de diferentes formas y colores distribuidas en las paredes de la habitación donde se realizó la prueba, las cuales se mantuvieron en el mismo lugar durante todos los ensayos (ver Figura 7). Para

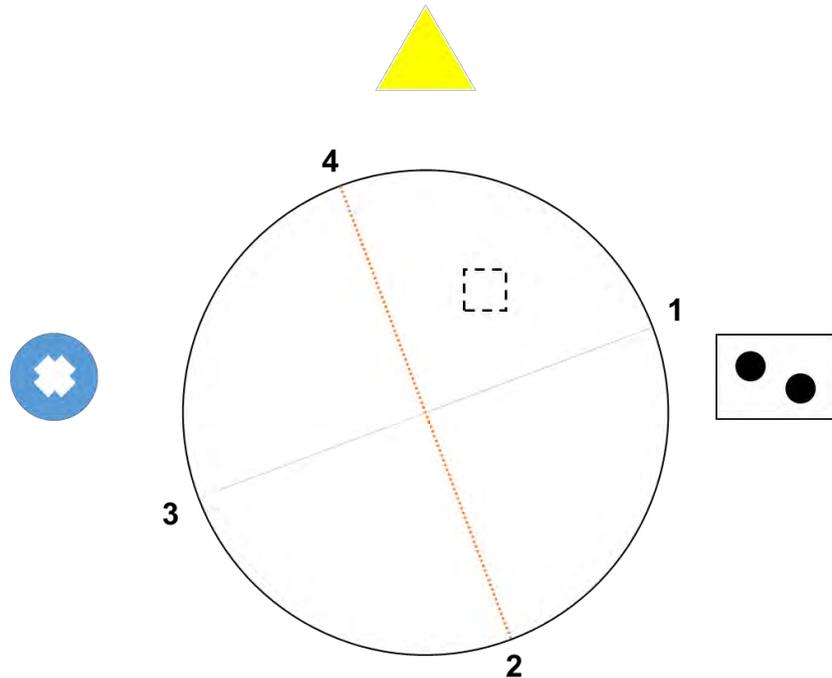


Figura 7. Plano del tanque para LAM donde se representan los cuatro cuadrantes (limitados por las líneas azul y roja) y los puntos de inicio de las pruebas (marcados por los números). Asimismo, se simboliza la ubicación de la plataforma sumergida (línea de guiones) y la forma y colores de algunas claves extra-laberinto.

evitar ser un punto de referencia espacial el experimentador quedó fuera del rango de visión de los ratones.

Los ratones fueron entrenados para nadar hacia una plataforma de acrílico transparente (8 x 8 cm de lado y 15 cm de alto) sumergida a 1.5 cm debajo de la superficie del agua e invisible para los ratones mientras nadaban. La locación de la plataforma fue seleccionada al azar para cada ratón en medio de uno de los cuatro cuadrantes, pero fue constante para cada individuo durante el entrenamiento. En cada prueba de adquisición, los ratones fueron colocados en el tanque en uno de los cuatro puntos de inicio en un orden semi-aleatorio (ver Figura 7). Se permitió encontrar y escapar a la plataforma sumergida (latencia de escape (s)). Una vez hecho esto, se dejaron por 20 segundos

sobre ésta. Si un sujeto no lograba encontrar la plataforma en 60 segundos, era manualmente guiado a ésta y se permitía se quedara sobre ella por 20 segundos. Después de esto, cada ratón fue secado y aislado de la habitación hasta el inicio de la siguiente prueba de adquisición. Cada individuo realizó 4 pruebas por día. Antes de la primera sesión de entrenamiento, se colocaron a los animales directamente sobre la plataforma durante 10 s a fin de reducir el estrés relacionado a la prueba.

Después de 4 días de entrenamiento, los sujetos fueron sometidos 24 horas después a una prueba de retención. Esta prueba consistió en nado libre por 60 segundos en el tanque sin la plataforma. El sujeto fue colocado 180° desde la posición en donde se encontraba la plataforma durante las pruebas de adquisición. Los parámetros medidos en esta prueba fueron: latencia inicial para cruzar la locación de la plataforma (s), número de cruces de la locación de la misma, la distancia promedio a la locación de ésta (cm), así como los porcentajes de tiempos de permanencia (%T) en el cuadrante opuesto al que contuviera la plataforma durante el entrenamiento y en el cuadrante donde se encontrara ésta.

Todas las pruebas fueron analizadas con el software SMART VIDEO TRACKING (Panlab Harvard Apparatus), con el cual también se definieron los perímetros, los cuadrantes y las locaciones de la plataforma.

Preparación de tejido

Transcurridos los 14 días de los diferentes tratamientos, los ratones de las tres condiciones experimentales fueron sacrificados por administración de una dosis letal de pentobarbital sódico (0.22 ml/kg) y fijados por perfusión cardiaca con una solución de paraformaldehído al 4% (PFA 4%) en solución salina amortiguada por fosfatos al 0.1 M (PBS 0.1 M) pH 7.4. Los cerebros fueron retirados inmediatamente y cortados en ambos hemisferios cerebrales, los cuales permanecieron fijados en PFA 4% por un mínimo de 24 horas.

Pasado el tiempo, los tejidos fueron cambiados a una solución de sacarosa al 30% por tres días y cortados sagitalmente a 40 µm de grosor en un aparato criostato (Leica Biosystems).

Anticuerpos y fluorocromos

Para probar la eficacia del *TP* para disminuir o retrasar la aparición de marcadores patológicos presentes en el modelo de ratón 3xTg-AD, se utilizaron los siguientes anticuerpos y marcadores fluorescentes:

- Un anticuerpo monoclonal producido en ratón (BAM-10; 1:500; Sigma Aldrich #A3981) que reconoce los residuos aminoácidos 1-12 de la proteína β A humana (McGowan *et al.*, 2005), fue usado para la detección de los niveles de β A total (Kotilinek *et al.*, 2002).
- Para la localización y determinación de la presencia de péptidos β A42 se empleó un anticuerpo policlonal producido en conejo que detecta todo el péptido de 42 residuos (ABETA42; 1:500; Thermo Scientific #PA3-16761).
- Se usó un anticuerpo policlonal producido en conejo que detecta un epítipo dependiente de la conformación fibrilar presente en fibrillas amiloides y en oligómeros fibrilares (OFs) pero ausente en monómeros y oligómeros prefibrilares (OPFs) β A (OC; 1:500; donado por el Dr. Charles Glabe, University of California) (Kayed *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2010; Benilova *et al.*, 2012).
- En todos los casos, se utilizó el colorante fluorescente Hoechst (1:1000) que marca el ADN y permite la fácil visualización de los núcleos celulares (Chazotte, 2011). Lo anterior con la finalidad de reconocer anatómicamente las regiones a evaluar y visualizar los agregados β A.

Procedimiento inmunohistoquímico de fluorescencia

Se seleccionaron de 3 a 4 cortes por animal entre las coordenadas 1.92 mm y 0.96 mm laterales a la línea media de acuerdo al atlas de cerebro de ratón (Franklin y Paxinos, 2001). A continuación, fueron lavadas en flotación libre en PBS 0.1 M por 10 min, y luego incubadas en ácido fórmico al 90% por 4 min para exponer los epítipes seguido de tres lavados de 10 min cada uno en PBS 0.1 M. Las secciones fueron permeabilizadas con 0.05% de Tween-20 PBS 0.1 M (PBS-T) por 15 min. Los diferentes anticuerpos primarios fueron incubados toda la noche en agitación a 4° C. Los tejidos fueron lavados con PBS-T en tres ocasiones 10 min cada una a temperatura ambiente. Hecho esto, se aplicaron los anticuerpos secundarios (Alexa Fluor 555 y 488; 1:250; Thermo Scientific) por 2 horas

y lavados nuevamente con PBS-T tres veces 10 min cada uno. Para marcaje nuclear se incubó durante 10 min con Hoechst seguido de tres lavados en PBS-T por 10 min cada uno. Finalmente, los cortes fueron montados en PBS 0.05 M en cubreobjetos y cubiertos en medio de montaje para fluorescencia Vectashield (Vector Laboratories).

Microscopía confocal y análisis de imágenes

Las imágenes de la región del subículum en el límite con CA1 de todos los tejidos seleccionados, siendo un campo por región y por lo tanto de 3 a 4 imágenes por animal, fueron capturadas usando un microscopio confocal LSM 510 (Zeiss). Las imágenes tomadas representan cortes confocales individuales en el plano Z de un solo campo. Para el análisis semi-cuantitativo se usó el software de procesamiento de imagen Image J (National Institutes of Health). Para todos los procedimientos, se separaron los canales de los filtros de cada imagen y se obtuvo una proyección (o *stack*) de máxima intensidad del plano Z del canal deseado. Se sustrajo fondo (5 pixeles para densidad óptica y 10 pixeles para tamaño de partículas) para todas las imágenes con el fin de evitar el análisis de marca inespecífica.

Para la densidad óptica integrada, se calculó la intensidad promedio de pixeles de todo el campo. Los valores de cada corte fueron promediados por condición experimental y convertidos a porcentaje de intensidad de fluorescencia, siendo normalizados a los niveles control.

Para el tamaño de las partículas, se consideraron dos tamaños para los agregados: siendo pequeños aquellos mayores o igual a $3 \mu\text{m}^2$ y menores o igual a $20 \mu\text{m}^2$, y grandes para aquellos mayores a $20 \mu\text{m}^2$. Los valores de cada corte fueron promediados por condición experimental y convertidos a frecuencia relativa porcentual.

Todos los valores obtenidos fueron comparados estadísticamente entre grupos (no-pareados) y dentro de los mismos grupos (pareados), dependiendo el caso.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos de la prueba conductual y del análisis de imagen fueron llevados a cabo utilizando el programa StatView 4.57 (Abacus Concepts). Las comparaciones entre grupos múltiples usaron análisis de varianza (ANOVA) seguidas de pruebas *post-hoc* de Fisher (FPLSD). Mientras que las comparaciones entre dos grupos usaron la prueba de t de Student (T-test). Los resultados fueron considerados significativos cuando la $p < 0.05$ para todas las pruebas.

RESULTADOS

El péptido bifuncional TP mejora el aprendizaje y la memoria espacial de ratones 3xTg-AD

A fin de determinar si el tratamiento i.c.v. del péptido bifuncional TP mejora la conducta en ratones 3xTg-AD de 12 m.d.e., se evaluó el aprendizaje y memoria espacial por medio del paradigma del laberinto acuático de Morris.

Durante 4 días, los animales fueron entrenados para nadar hacia una plataforma sumergida guiados por claves extra-laberinto. Los ratones TG-VHCL mostraron déficits en la adquisición de la tarea en comparación a los sujetos NoTG-CTRL, observándose diferencias significativas en el día 3 ($p < 0.02$) y una tendencia similar en el día 4 ($p > 0.05$), aunque en éste caso la diferencia no fue estadísticamente significativa. Por el contrario, los animales 3xTg-AD tratados con TP mejoraron el desempeño en aprendizaje de la prueba, esto indicado por la similitud en las latencias de escape en relación al grupo NoTG-CTRL a lo largo de los días de entrenamiento (D4: $p > 0.8$), e incluso con una tendencia a ser diferente respecto a TG-VHCL en el día 4 ($p < 0.08$), sin mostrar significancia estadística (ver Figura 8).

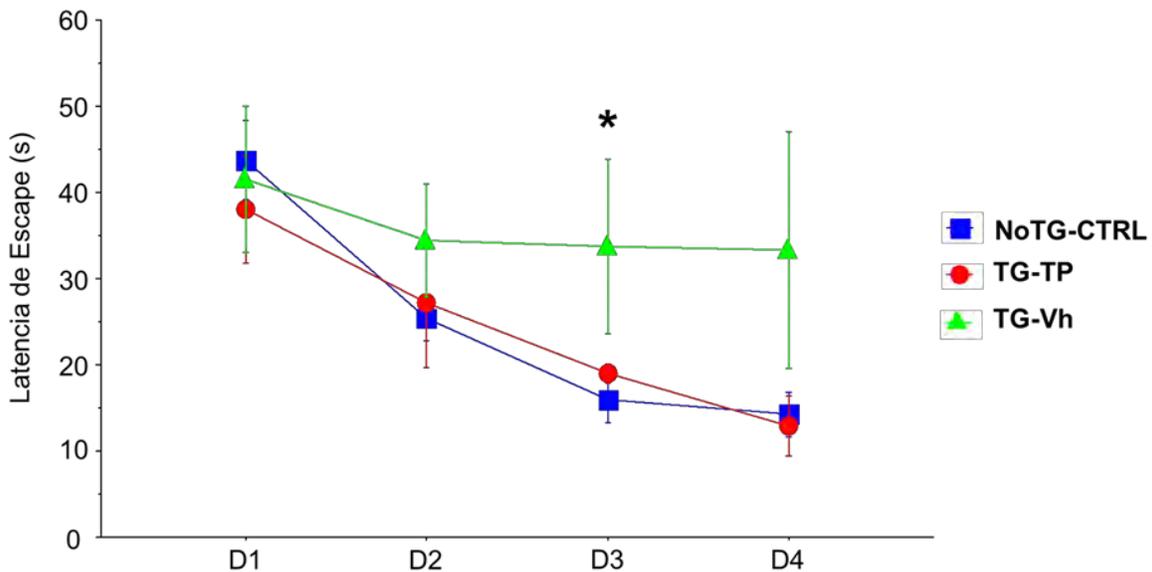


Figura 8. Curvas de adquisición de los tres grupos experimentales muestran que los ratones NoTG-CTRL alcanzaron latencias más cortas significativamente que los TG-VHCL (D3: ANOVA $P = 0.0472$, FPLSD $P = 0.0165$) y que los sujetos TG-TP tuvieron un desempeño similar (D4: ANOVA $P = 0.0791$, FPLSD $P = 0.8584$).

Al día siguiente de la última prueba de adquisición, los sujetos fueron sometidos a una prueba de retención de nado libre sin la plataforma. De manera similar, el grupo TG-VHCL se comportó de manera significativamente diferente a los grupos NoTG-CTRL y TG-TP en los parámetros de latencia a la plataforma ($p < 0.01$; ver Figura 9A), en el número de cruces a la plataforma ($p < 0.02$; datos no mostrados) y distancia promedio a la plataforma ($p < 0.02$; ver Figura 9B), mientras que los ratones TG-TP se comportaron de manera similar a los ratones NoTG-CTRL ($p > 0.9$, $p > 0.4$, $p > 0.5$ respectivamente). Sin embargo, en el parámetro de porcentaje de tiempo en los cuadrantes donde se encontraba la plataforma y en el opuesto a ésta, el grupo NoTG-CTRL fue el único que mostró un porcentaje significativamente mayor en el primero respecto al otro ($p < 0.02$). El grupo TG-TP no exhibió diferencias entre los tiempos de ambos cuadrantes ($p > 0.8$) mientras que los sujetos TG-VHCL mostraron una tendencia a pasar mayor tiempo en el cuadrante opuesto ($p > 0.05$; ver Figura 9C). La velocidad de nado fue evaluada como parámetro control, observándose que no existen diferencias entre los tres grupos (datos no mostrados).

Resumiendo lo anterior, las trayectorias representativas de nado de los tres grupos experimentales correspondientes a las pruebas de retención muestran que el grupo TG-TP exhibe una conducta similar a los NoTG-CTRL y diferente a los TG-VHCL (ver Figura 9D).

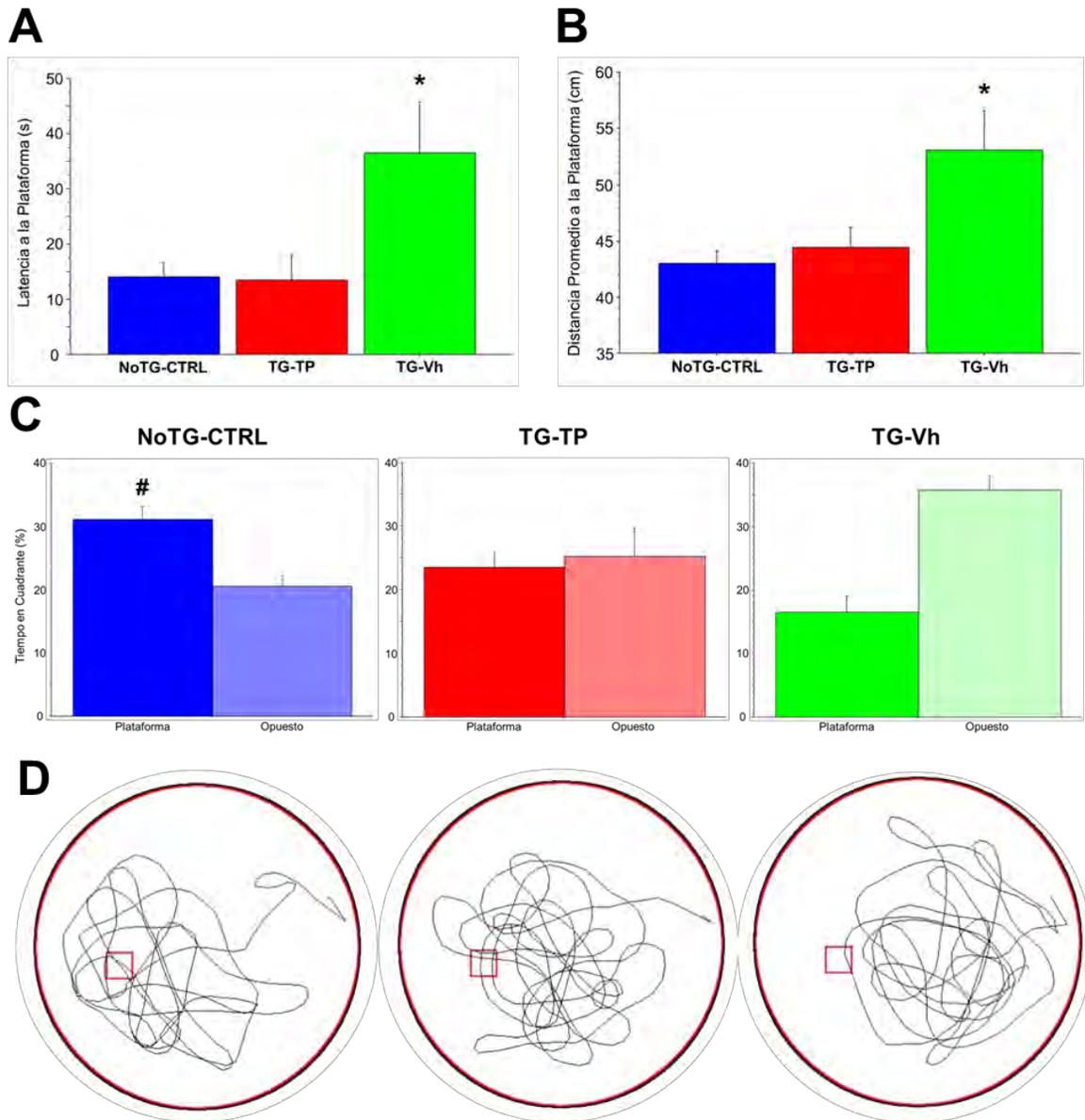


Figura 9. Parámetros analizados en las pruebas de retención. (A) Los animales TG-TP tuvieron latencias significativamente más bajas que los TG-VHCL (ANOVA $P = 0.0135$, FPLSD $P = 0.0097$) y equivalentes a los NoTG-CTRL (FPLSD $P = 0.9439$). (B) Igualmente, los ratones TG-TP nadaron más cerca de la plataforma a diferencia de los TG.VHCL (ANOVA $P = 0.0093$, FPLSD $P = 0.0135$) y de manera similar a los NoTG-CTRL (FPLSD $P = 0.5752$). (C) Solamente los sujetos NoTG-CTRL mostraron un mayor porcentaje de tiempo en el cuadrante de la plataforma en comparación al opuesto a ésta (T-test pareada $P = 0.0197$), mientras que los demás grupos no revelaron diferencias. (D) Trazos representativos de las trayectorias de nado de los tres grupos experimentales empleados. Datos presentados como promedio \pm E.E.M.

Los niveles de β A total y β A42 no muestran cambios significativos en sujetos TG-TP

A fin de determinar si la mejora conductual observada en el LAM de los sujetos transgénicos infundidos con TP se debió a un efecto sobre los niveles de β A, se evaluó por densidad óptica la marca inmunohistoquímica de β A mediante los anticuerpos BAM-10, ABETA42 y OC los cuales detectan β A total, β A42 y fibrillas amiloides y oligómeros fibrilares (OFs) respectivamente, en las regiones del subículum y CA1 de la formación hipocampal.

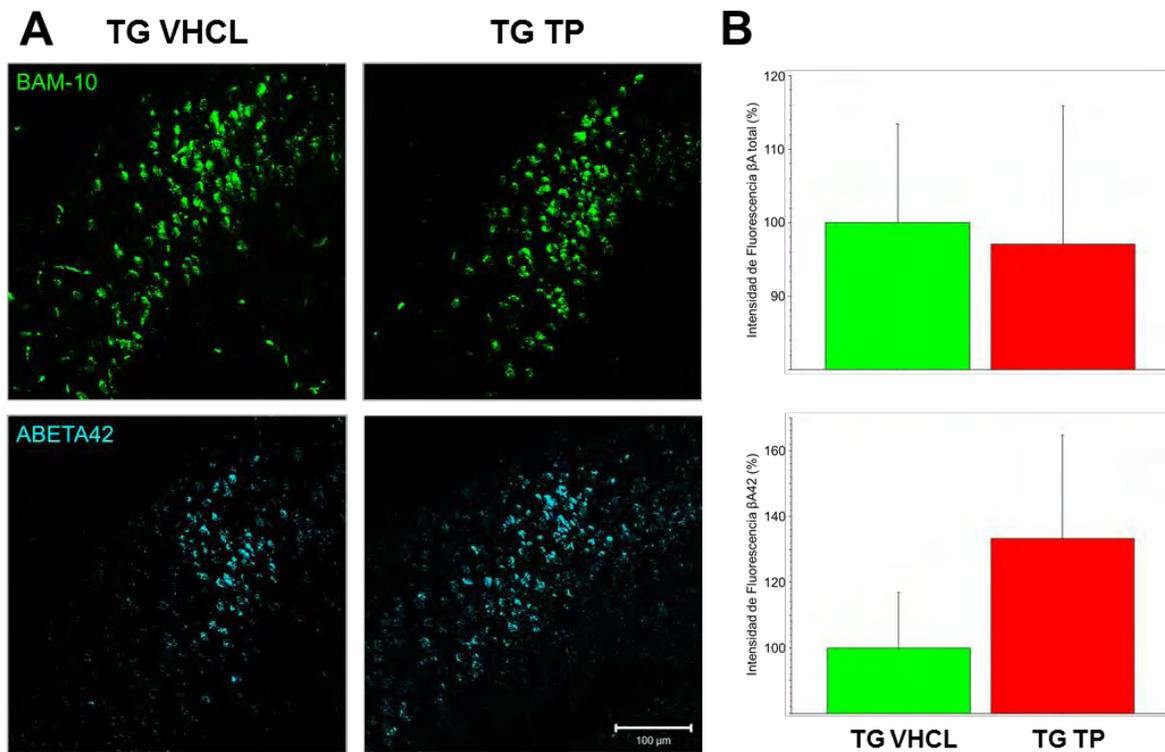


Figura 10. Niveles de β A detectados por inmunohistoquímica usando anticuerpos para diferentes estados de agregación y evaluados por densidad óptica. (A) Fotomicrografías representativas de cortes cerebrales de ratones tratados con solución vehículo y con el péptido TP para β A total usando BAM-10 (superior, verde) y ABETA42 para β A42 (inferior, azul). Escala de barra: 100 μ m. (B) El análisis de la intensidad de fluorescencia de ambos grupos muestra que no existen diferencias entre ellos en ambos marcadores (β A total: T-test no-pareada P = 0.9035; β A42 T-test no-pareada P = 0.3938). Datos presentados como promedio \pm E.E.M.

En la figura 10 se muestra la inmunoreactividad para β A total (BAM-10) y para β A42 (ABETA42) (Figuras 10A y 10B). El análisis de la intensidad de la señal para cada anticuerpo en el subículum de cada grupo experimental se puede observar un cambio en la proporción de la señal entre los anticuerpos. Mientras que para BAM-10 el porcentaje

de inmunoreactividad es similar entre los grupos, para ABETA42 se detecta un aumento en el grupo TG-TP, sin embargo este no fue significativo.

Aumento no significativo en los niveles de fibrillas amiloides y oligómeros fibrilares marcados por OC pero sí en su tamaño relativo en animales TG-TP

La presencia de fibrillas amiloides y oligómeros fibrilares fue detectada mediante el anticuerpo OC. El análisis de densidad óptica muestra que existe un aumento en la marca correspondiente a fibrillas amiloides y OFs tanto en la región del subículum como de CA1 en los ratones TG-TP (ver Figura 11A y 11B), sin embargo, esta tendencia no alcanzó la significancia estadística.

De acuerdo a los reportes que indican que el TP modula el proceso de agregación del β A (Márquez et al., 2014), los presentes resultados pudieran indicar una posible acción del TP en el proceso de agregación amiloide en los ratones 3xTg-AD. Por lo anterior, por medio de análisis de separación por tamaño de las partículas detectadas, se observó que en los ratones TG-TP el tamaño promedio de los agregados fibrilares es significativamente mayor al de los TG-VHCL (ver Figura 11C). Asimismo, se encontró una menor proporción de agregados entre 3 y 20 μm^2 y un mayor porcentaje de agregados superiores a 20 μm^2 en los 3xTg-AD tratados con TP en relación a los ratones TG-VHCL (ver Figura 11D).

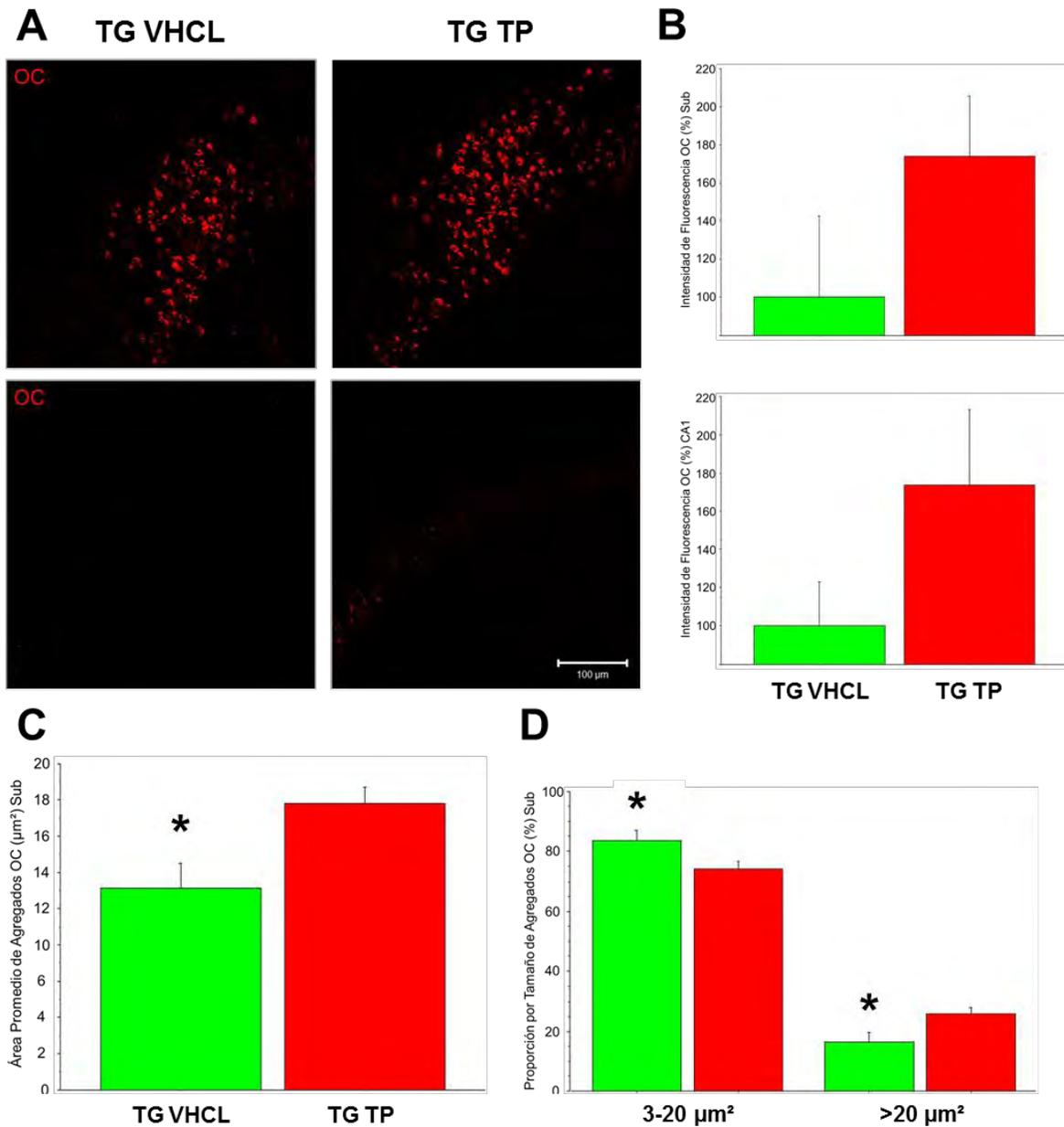


Figura 11. Niveles de fibrillas amiloides y oligómeros fibrilares detectados por inmunohistoquímica usando el anticuerpo OC, evaluados por densidad óptica y tamaño de los agregados. (A) Fotomicrografías representativas de cortes cerebrales de ratones tratados con solución vehículo y con el péptido TP de las regiones del subículo (superior) y CA1 (inferior). Escala de barra: 100 μm. (B) El análisis de la intensidad de fluorescencia de ambos grupos muestra que existe una tendencia en el aumento de los niveles en los TG-TP, especialmente en subículo (T-test no-pareada $P = 0.0805$). (C) Incremento en el tamaño de los agregados en sujetos TG-TP (T-test no-pareada $P = 0.0105$). (D) Cambio en la proporción de agregados OC por tamaño entre tratamientos (T-test no-pareada $P = 0.0386$ para ambos tamaños). Datos presentados como promedio \pm E.E.M.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo evaluamos el efecto de la infusión intracerebroventricular de un tetrapéptido no-natural bifuncional (TP) durante 14 días sobre el aprendizaje y la memoria de referencia espacial de ratones 3xTg-AD de 12 meses de edad.

De acuerdo a la hipótesis planteada, los animales 3xTg-AD tratados con TP mostraron una mejora en el desempeño en la prueba de aprendizaje y memoria espacial en los animales 3xTg-AD tratados con TP. En este estudio evaluamos la conducta de referencia espacial de los sujetos experimentales utilizando el paradigma del LAM el cual depende de la región hipocampal dorsal (Vorhees y Williams, 2006, Sharma et al., 2010) y que se ve afectada de manera importante durante la patología en el modelo 3xTg-AD (Billings et al., 2005; Clinton et al., 2007). Encontramos que los ratones transgénicos infundidos con solución salina (TG-VHCL) muestran un déficit cognitivo tanto en la adquisición como en la retención de la tarea en comparación a los sujetos no-transgénicos (NoTG-CTRL; ver Figuras 8 y 9). De acuerdo a lo previamente reportado por otros autores, a los 12 m.d.e. ya es notable un desempeño conductual pobre en los 3xTg-AD, tanto en el aprendizaje como en la memoria de largo plazo (Billings et al., 2007; Peng et al., 2012), y antes de la deposición de las placas amiloides (Mastrangelo y Bowers, 2008). Además, hallamos que los animales transgénicos tratados con el TP se comportaron de manera similar a los no-transgénicos en la mayoría de los parámetros de adquisición y retención (ver Figuras 8 y 9). Un efecto similar de rápido fue observado tras un tratamiento oral de 11 días con PBT2, un ionóforo de Zn y Cu con habilidad de disminuir la agregación β A, en ratones transgénicos para la PPA mostrando una mejora en el aprendizaje (latencia de escape) y la memoria (tiempo en cuadrante) en la prueba del laberinto acuático de Morris (Adlard et al., 2008). Lo anterior indicaría que tratamientos enfocados a modular la agregación de β A mediada por iones metales pueden resultar efectivos a tiempos cortos en el fenotipo conductual de animales transgénicos.

Por otra parte, varios estudios en modelos animales para la EA reportan una disminución en la acumulación de β A bajo el tratamiento de diversos compuestos (Cherny et al., 2001; Permanne et al., 2002; Dedeoglu et al., 2004; Lee et al., 2004; Mamikonyan et al., 2007; McKee et al., 2008; Martinez-Coria et al., 2010; Oulès et al., 2012). De

manera interesante, y contrario a lo establecido en la hipótesis, los niveles de β A total y β A42 no se vieron alterados en los sujetos tratados con el TP (ver Figura 10), sin embargo, se observó una mejora en el aprendizaje y la memoria en el LAM. Otros grupos de investigación han demostrado que se puede observar una mejora cognitiva independientemente de una reducción en los niveles de β A total, sugiriendo la participación de una o varias especies tóxicas de β A en el desarrollo de la patología (Dodart *et al.*, 2002; Kotilinek *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2006), como los oligómeros (Benilova *et al.*, 2012). Esto nos lleva a sugerir que la presencia de cierto tipo oligómeros solubles pudiera estar relacionada con el daño cognitivo, y el tratamiento farmacológico con TP propicia una vía de oligomerización no-tóxica.

Aunado a esto, la marca de fibrillas amiloides y OFs se observó en aumento, aunque no significativo, así como un incremento en el tamaño de los mismos en los sujetos 3xTg-AD en relación a los tratados con vehículo (ver Figura 11). Por tanto, los datos actuales aportan datos importantes para entender el mecanismo de acción del TP sobre la agregación de β A y por ende en la mejora conductual observada en la prueba de aprendizaje y memoria espacial. Pensamos que el TP favorece la vía de agregación fibrilar detectada por el anticuerpo OC observándose un aumento en los niveles y tamaño de conglomerados de éste. Sin embargo, también queda la posibilidad que el efecto del TP sobre la agregación de β A no fuera específico a cierto tipo conformacional de oligómeros; para esto se sugiere realizar pruebas inmunohistoquímicas usando el anticuerpo A11, el cual detecta la presencia de oligómeros prefibrilares solubles.

Evidencia experimental ha mostrado que es posible modificar las vías de agregación amiloide mediante diversos compuestos. El polifenol epigallocatequina galato (EGCG) se demostró puede modular la ruta de agregación amiloide promoviendo la formación de oligómeros no- tóxicos estables y negativos al anticuerpo A11 *in vitro* (Ehrnhoefer *et al.*, 2008). Por otra parte, McLaurin *et al.* (2006) administrando ciclohexanehexol, un compuesto fosfolipídico, por vía oral a ratones transgénicos reportaron una disminución en la agregación de oligómeros tóxicos con un perfil equivalente a los OPFs estabilizando conformeros no-dañinos. Con resultados similares, se reveló que las hidroxiquinoleínas quelantes de Cu-Zn, clioquinol y PBT2, pueden

inducir la formación de agregados no-deletéreos (Ryan *et al.*, 2015). En otro trabajo, el anticuerpo anti- β A humano *gantenerumab* que posee alta afinidad a fibrillas amiloides, fue administrado en animales transgénicos mostrando una redistribución de β A reduciendo los agregados pequeños y aumentando los agregados grandes (Bohrmann *et al.*, 2012; Goure *et al.*, 2014), tal como nuestros resultados del grupo TG-TP lo exhiben.

De acuerdo a Oddo y colaboradores (2006a), es necesario un cambio en los niveles de tau para observar mejoras cognitivas en el ratón 3xTg-AD. Por lo anterior, los resultados hasta ahora obtenidos no permiten excluir que el efecto observado en la conducta en los sujetos TG-TP se deba en parte a cambios conformacionales o en los niveles de tau, de forma directa o indirecta. Directamente, ya que Cu puede inducir la fosforilación y agregación de tau y participar en el desarrollo de la patología (Ayton *et al.*, 2013; Kitazawa *et al.*, 2009; Su *et al.*, 2007), lo que podría dar la posibilidad de una interacción moduladora del TP sobre tau. Indirectamente, pues al afectar la agregación de β A en estos ratones se ha mostrado que la patología de tau también se puede ver perjudicada (Oddo *et al.*, 2006b); es decir, al modificar el proceso de agregación amiloide por el tratamiento del TP se podrían ver influenciadas las formas patológicas de tau mediadas por diferentes vías y mecanismos (Blurton-Jones y LaFerla, 2006), tales como GSK-3 (Caccamo *et al.*, 2007), el proteosoma (Oddo *et al.*, 2004) o eventos inflamatorios (Ontiveros-Torres *et al.*, 2016).

Según datos de varios estudios, β A se asocia a Cu con gran afinidad, funcionando como metaloenzima productora de especies reactivas de oxígeno (EROs), contribuyendo a la neurotoxicidad del péptido (Opazo *et al.*, 2002; Puglielli *et al.*, 2009). Cabe destacar que siendo el TP una molécula bifuncional, cuyo mecanismo de acción no sólo involucra la modulación de la agregación amiloide sino también es un quelante de iones metales Cu. Aunque en este estudio no se evaluó la presencia de Cu o bien, de EROs en el cerebro de los ratones 3xTgAD. Sin embargo, dado la actividad bifuncional del TP se pudiera esperar que las mejoras conductuales observadas pudieran estar también relacionadas a una disminución en marcadores de daño por estrés oxidativo, tales como la nitrotirosina o peroxidación de lípidos (Inestrosa *et al.*, 2015), en el cerebro de los ratones TG-TP mediada por la acción quelante del TP.

Finalmente, es preciso realizar estudios adicionales para entender de mejor manera el mecanismo de acción del *TP* en las reservas intracelulares/extracelulares β A, mostrándose una relación directa entre ellas en el ratón 3xTg-AD (Oddo *et al.*, 2006c). Una herramienta metodológica que se ha demostrado es útil en la visualización de estas reservas amiloides *in vivo*, es la microscopía de super-resolución, que permitiría la evaluación del proceso de agregación y la morfología de los agregados en resolución nanométrica (Kaminski Schierle *et al.*, 2011). Además, también es importante llevar a cabo estudios *in vivo* que determinen las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas del *TP*, que incluyen su absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad (Dedeoglu *et al.*, 2004), que permitan mejorar la acción bifuncional del péptido y, por lo tanto, su viabilidad farmacológica. Esto es necesario debido a la rápida degradación de péptidos y su baja penetración en el tejido cerebral (Jensen *et al.*, 2012), además de lograr satisfacer las 5 reglas de solubilidad y permeabilidad de Lipinski (Lipinski *et al.*, 2001).

Desde hace tiempo, se ha discutido sobre la participación de β A en la patogénesis de la EA. Diversos estudios proponen que la producción de esta proteína y su deposición son el evento causante del daño neuronal y síntomas clínicos (Hardy y Selkoe, 2002; Karran *et al.*, 2011). Por esto, el desarrollo y evaluación de moléculas que modulen su agregación en modelos *in vivo* permiten un mejor entendimiento de los mecanismos ocurridos durante la patología. Aunque existen una variedad de publicaciones en las que han reportado diversos compuestos y otras estrategias, desde inhibidores amiloides hasta inmunización (Chacón *et al.*, 2004, Lee *et al.*, 2006, McKee *et al.*, 2008, Frydman-Marom *et al.*, 2009), este es el primer trabajo en usar un péptido bifuncional en este modelo de ratón transgénico para la EA.

CONCLUSIONES

- El tratamiento icv con el *TP* es capaz de recuperar las funciones cognitivas de regiones anatómicas afectadas por la patología en ratones 3xTg-AD.
- El *TP* es capaz de modular *in vivo* la agregación de especies β A afectando sus propiedades tóxicas.
- El diseño de compuestos químicos no sólo ofrece una posible estrategia terapéutica sino ayudan a entender mecanismos subyacentes en la patología de la EA.

PERSPECTIVAS

- Llevar a cabo las mismas pruebas experimentales en ratones no-transgénicos tratados con solución vehículo a fin de excluir el efecto del procedimiento quirúrgico.
- Realizar pruebas inmunohistoquímicas usando el anticuerpo A11 y analizarlas por los mismos métodos usados en el trabajo presente.
- Se recomienda realizar estudios *in vivo* sobre las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas del péptido TP que permitan establecer su viabilidad farmacológica.
- El uso de otras técnicas como microscopía de super-resolución permitiría observar si la morfología de los agregados β A se vio afectada, así como mostrar una posible dinámica de los agregados β A en los espacios intra-extracelulares en ratones 3xTg-AD tratados con TP.

REFERENCIAS

- Adlard PA, Cherny RA, Finkelstein DI, Gautier E, Robb E, Cortes M, Volitakis I, Liu X, Smith JP, Perez K, Laughton K, Li Q, Charman SA, Nicolazzo JA, Wilkins S, Deleva K, Lynch T, Kok G, Ritchie CW, Tanzi RE, Cappai R, Masters CL, Barnham KJ y Bush AI (2008) Rapid restoration of cognition in Alzheimer's transgenic mice with 8-hydroxy quinoline analogs is associated with decreased interstitial A β . *Neuron* 59: 43–55.
- Alzheimer A (2006) "Concerning a unique disease of the cerebral cortex" en Jucker M, Beyreuther K, Haass C, Nitsch R y Christen Y (eds.), *Alzheimer: 100 Years and Beyond*. Alemania, Springer.
- Alzheimer's Disease International (2013) *Policy Brief for Heads of Government. The Global Impact of Dementia 2013-2050*. Londres, Alzheimer's Disease International.
- Alzheimer's Disease International (2014) *World Alzheimer Report 2014. Dementia and Risk Reduction, An Analysis of Protective and Modifiable Factors*. Londres, Alzheimer's Disease International.
- Ayton S, Lei P y Bush AI (2013) Metallostasis in Alzheimer's disease. *Free Radic. Biol. Med.* 62: 76-89.
- Benilova I, Karran E y De Strooper B (2012) The toxic A β oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nat. Neurosci.* 15 (3): 349-357.
- Bilkei-Gorzo A (2014) Genetic mouse models of brain ageing and Alzheimer's disease. *Pharmacol. Ther.* 142 (2): 244-257.
- Billings LM, Oddo S, Green KN, McGaugh JL y LaFerla FM (2005) Intraneuronal A β Causes the Onset of Early Alzheimer's Disease-Related Cognitive Deficits in Transgenic Mice. *Neuron* 45: 675-688.
- Billings LM, Green KN, McGaugh JL y LaFerla FM (2007) Learning decreases A β *56 and tau pathology and ameliorates behavioral decline in 3xTg-AD mice. *J. Neurosci.* 27 (4): 751-761.

- Blurton-Jones M y LaFerla FM (2006) Pathways by Which A β Facilitates Tau Pathology. *Curr. Alzheimer Res.* 3 (5): 437-448.
- Blurton-Jones M, Kitazawa M, Martinez-Coria H, Castello NA, Müller F, Loring JF, Yamasaki TR, Poon WW, Green KN y LaFerla FM (2009) Neural stem cells improve cognition via BDNF in a transgenic model of Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106 (32): 13594-13599.
- Bohrmann B, Baumann K, Benz J, Gerber F, Huber W, Knoflach F, Messer J, Oroszlan K, Rauchenberger R, Richter WF, Rothe C, Urban M, Bardroff M, Winter M, Nordstedt C y Loetscher H (2012) Gantenerumab: A Novel Human Anti-A β Antibody Demonstrates Sustained Cerebral Amyloid- β Binding and Elicits Cell-Mediated Removal of Human Amyloid- β . *J. Alzheimers Dis.* 28: 49-69.
- Caccamo A, Oddo S, Tran LX y LaFerla FM (2007) Lithium Reduces Tau Phosphorylation but Not A β or Working Memory Deficits in a Transgenic Model with Both Plaques and Tangles. *Am. J. Pathol.* 170 (5): 1669-1675.
- Chacón MA, Barría MI, Soto C e Inestrosa NC (2004) β -sheet breaker peptide prevents A β -induced spatial memory impairments with partial reduction of amyloid deposits. *Mol. Psychiatry* 9 (10): 953-961.
- Chazotte B (2011) Labeling Nuclear DNA with Hoechst 33342. *Cold Spring Harb. Protoc.* doi:10.1101/pdb.prot5557.
- Cheng IH, Scearce-Levie K, Legleiter J, Palop JJ, Gerstein H, Bien-Ly N, Puoliväli J, Lesné S, Ashe KH, Muchowski PJ y Mucke L (2007) Accelerating amyloid- β fibrillization reduces oligomer levels and functional deficits in Alzheimer disease mouse models. *J. Biol. Chem.* 282 (33): 23818-23828.
- Cherny RA, Atwood CS, Xilinas ME, Gray DN, Jones WD, McLean CA, Barnham KJ, Volitakis I, Fraser FW, Kim Y-S, Huang X, Goldstein LE, Moir RD, Lim JT, Beyreuther K, Zheng H, Tanzi RE, Masters CL y Bush AI (2001) Treatment with a Copper-Zinc Chelator Markedly and Rapidly Inhibits β -Amyloid Accumulation in Alzheimer's Disease Transgenic Mice. *Neuron* 30: 665-676.

- Choi J, Braymer JJ, Nanga RPR, Ramamoorthy A y Lim MH (2010) Design of small molecules that target metal-A β species and regulate metal-induced A β aggregation and neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107 (51): 21990-21995.
- Clinton LK, Billings LM, Green KN, Caccamo A, Ngo J, Oddo S, McGaugh JL y LaFerla FM (2007) Age-dependent sexual dimorphism in cognition and stress response in the 3xTg-AD mice. *Neurobiol. Dis.* 28: 76-82.
- Dedeoglu A, Cormier K, Payton S, Tseitlin KA, Kremisky JN, Lai L, Moir RD, Tanzi RE, Bush AI, Kowall NW, Rogers JT y Huang X (2004) Preliminary studies of a novel bifunctional metal chelator targeting Alzheimer's amyloidogenesis. *Exp. Geront.* 39: 1641-1649.
- Desai MK, Sudol KL, Janelsins MC, Mastrangelo MA, Frazer ME y Bowers WJ (2009) Triple-transgenic Alzheimer's disease mice exhibit regionspecific abnormalities in brain myelination patterns prior to appearance of amyloid and tau pathology. *Glia* 57 (1): 54-65.
- DeToma AS, Salamekh S, Ramamoorthy A y Lim MH (2012) Misfolded proteins in Alzheimer's disease and type II diabetes. *Chem. Soc. Rev.* 41: 608-621.
- Dodart J-C, Bales KR, Gannon KS, Greene SJ, DeMattos RB, Mathis C, DeLong CA, Wu S, Wu X, Holtzman DM y Paul SM (2002) Immunization reverses memory deficits without reducing brain A β burden in Alzheimer's disease model. *Nat. Neurosci.* 5 (5): 452-457.
- Ehrnhoefer DE, Bieschke J, Boeddrich A, Herbst M, Masino L, Lurz R, Engemann S, Pastore A y Wanker EE (2008) EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers. *Nature Struct. Mol. Biol.* 15 (6): 558-566.
- Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menezes PR, Rimmer E y Sczufca M (2005) Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 366: 2112-2117.

- Finder VH y Glockshuber R (2007) Amyloid- β Aggregation. *Neurodegenerative Dis.* 4: 13-27.
- Franklin KBJ y Paxinos G (2001) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. 2da edición. San Diego, Academic Press.
- Frydman-Marom A, Rechter M, Shefler I, Bram Y, Shalev DE y Gazit E (2009) Cognitive-Performance Recovery of Alzheimer's Disease Model Mice by Modulation of Early Soluble Amyloidal Assemblies. *Angew. Chem.* 121 (11): 2015-2020.
- Glabe C y Bush AI (2007) "A β Structure and Aggregation" en Sisodia SS y Tanzi RE (eds.), *Alzheimer's Disease Advances in Genetics, Molecular and Cellular Biology*. Estados Unidos de América, Springer.
- Glabe CG (2008) Structural Classification of Toxic Amyloid Oligomers. *J Biol Chem* 283 (44): 29639-29643.
- Goure WF, Krafft GA, Jerecic J y Hefti F (2014) Targeting the proper amyloid-beta neuronal toxins: a path forward for Alzheimer's disease immunotherapeutics. *Alzheimers Res Ther* 6 (4): 42.
- Greenough MA, Camakaris J y Bush AI (2013) Metal dyshomeostasis and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.* 62: 540-555.
- Hardy J y Higgins GA (1992) Alzheimer's Disease: The Amyloid Cascade Hypothesis. *Science* 256 (5054): 184-185.
- Hardy J y Selkoe DJ (2002) The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science* 297: 353-356.
- Instituto Nacional de Geriátría/Secretaría de Salud (2014) *Plan de acción Alzheimer y otras demencias. México. 2014*. México.
- Jensen M, Canning A, Chiha S, Bouquerel P, Pedersen JT, Østergaard J, Cuvillier O, Sasaki I, Hureau C y Faller P (2012) Inhibition of Cu-Amyloid- β by using Bifunctional Peptides with β -Sheet Breaker and Chelator Moieties. *Chem. Eur. J.* 18: 4836-4839.

- Kaminski Schierle GS, van de Linde S, Erdelyi M, Esbjörner EK, Klein T, Rees E, Bertoncini CW, Dobson CM, Sauer M y Kaminski CF (2011) In Situ Measurements of the Formation and Morphology of Intracellular β -Amyloid Fibrils by Super-Resolution Fluorescence Imaging. *J. Am. Chem. Soc.* 133: 12902-12905.
- Kayed R, Head E, Thompson JL, McIntire TM, Milton SC, Cotman CW y Glabe CG (2003) Common Structure of Soluble Amyloid Oligomers Implies Common Mechanism of Pathogenesis. *Science* 300: 486-489.
- Kayed R, Head E, Sarsoza F, Saing T, Cotman CW, Necula M, Margol L, Wu J, Breydo L, Thompson JL, Rasool S, Gurlo T, Butler P y Glabe CG (2007) Fibril specific, conformation dependent antibodies recognize a generic epitope common to amyloid fibrils and fibrillar oligomers that is absent in prefibrillar oligomers. *Mol. Neurodegener.* 2: 18-28.
- Kayed R, Pensalfini A, Margol L, Sokolov Y, Sarsoza F, Head E, Hall J y Glabe C (2009) Annular protofibrils are structurally and functionally distinct type of amyloid oligomer. *J. Biol. Chem.* 284 (7): 4230-4237.
- Kayed R, Canto I, Breydo L, Rasool S, Lukacsovich T, Wu J, Albay III R, Pensalfini A, Yeung S, Head E, Marsh JL y Glabe C (2010) Conformation dependent monoclonal antibodies distinguish different replicating strains or conformers of prefibrillar A β oligomers. *Mol. Neurodegener.* 5: 57.
- Kirkitadze MD, Bitan G y Teplow DB (2002) Paradigm Shifts in Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Disorders: The Emerging Role of Oligomeric Assemblies. *J. Neurosci. Res.* 69: 567-577.
- Kitazawa M, Cheng D y LaFerla FM (2009) Chronic copper exposure exacerbates both amyloid and tau pathology and selectively dysregulates cdk5 in a mouse model of AD. *J. Neurochem.* 108: 1550-1560.
- Kotilinek LA, Bacskai B, Westerman M, Kawarabayashi T, Younkin L, Hyman BT, Younkin S y Ashe KH (2002) Reversible Memory Loss in a Mouse Transgenic Model of Alzheimer's Disease. *J. Neurosci.* 22 (15): 6331-6335.

- Lee J-Y, Friedman JE, Angel I, Kozal A y Koh J-Y (2004) The lipophilic metal chelator DP-109 reduces amyloid pathology in brains of human β -amyloid precursor protein transgenic mice. *Neurobiol Aging* 25 (10): 1315-1321.
- Lee EB, Leng LZ, Zhang B, Kwong L, Trojanowski JQ, Abel T y Lee VM-Y (2006) Targeting Amyloid- β Peptide ($A\beta$) Oligomers by Passive Immunization with a Conformation-selective Monoclonal Antibody Improves Learning and Memory in $A\beta$ Precursor Protein (APP) Transgenic Mice. *J. Biol. Chem.* 281 (7): 4292-4299.
- Lee J y Han P (2013) An Update of Animal Models of Alzheimer Disease with a Reevaluation of Plaque Depositions. *Exp. Neurobiol.* 22 (2): 84-95.
- Lesné S, Koh MT, Kotilinek L, Kaye R, Glabe CG, Yang A, Gallagher M y Ashe KH (2006) A specific amyloid- β protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* 440 (7082): 352-357.
- Lesné S, Kotilinek L y Ashe KH (2008) Plaque-bearing mice with reduced levels of oligomeric amyloid- β assemblies have intact memory function. *Neuroscience* 151 (3): 745-749.
- Lesné S, Sherman MA, Grant M, Kuskowski M, Schneider JA, Bennett DA y Ashe KH (2013) Brain amyloid- β oligomers in ageing and Alzheimer's disease. *Brain* 136 (5): 1383-1398.
- Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW y Feeney PJ (2001) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 46: 3-26
- Liu P, Reed MN, Kotilinek LA, Grant MKO, Forster CL, Qiang W, Shapiro SL, Reichl JH, Chiang ACA, Jankowsky JL, Wilmot CM, Cleary JP, Zahs KR y Ashe KH (2015) Quaternary Structure Defines a Large Class of Amyloid- β Oligomers Neutralized by Sequestration. *Cell Rep.* 11 (11): 1760-1771.
- Lovell MA, Robertson JD, Teesdale WJ, Campbell JL y Markesbery WR (1998) Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J. Neurol. Sci.* 158: 47-52.

- Mamikonyan G, Necula M, Mkrtychyan M, Ghochikyan A, Petrushina I, Movsesyan N, Mina E, Kiyatkin A, Glabe CG, Cribbs DH y Agadjanyan MG (2007) Anti-A β 1-11 Antibody Binds to Different β -Amyloid Species, Inhibits Fibril Formation, and Disaggregates Preformed Fibrils but Not the Most Toxic Oligomers. *J. Biol. Chem.* 282 (31): 22376-22386.
- Márquez M, Blancas-Mejía LM, Campos A, Rojas L, Castañeda-Hernández G y Quintanar L (2014) A bifunctional non-natural tetrapeptide modulates amyloid-beta peptide aggregation in the presence of Cu(II). *Metallomics* 6: 2189-2192.
- Martinez-Coria H, Green KN, Billings LM, Kitazawa M, Albrecht M, Rammes G, Parsons CG, Gupta S, Banerjee P y LaFerla FM (2010) Memantine improves cognition and reduces Alzheimer's-like neuropathology in transgenic mice. *Am. J. Pathol.* 176 (2): 870-880.
- Mastrangelo MA y Bowers WJ (2008) Detailed immunohistochemical characterization of temporal and spatial progression of Alzheimer's disease-related pathologies in male triple-transgenic mice. *BMC Neuroscience* 9: 81-112.
- Maurer K (2006) "The history of Alois Alzheimer's first case Auguste D." en Jucker M, Beyreuther K, Haass C, Nitsch R y Christen Y (eds.), *Alzheimer: 100 Years and Beyond*. Alemania, Springer.
- McGowan E, Pickford F, Kim J, Onstead L, Eriksen J, Yu C, Skipper L, Murphy MP, Beard J, Das P, Jansen K, DeLucia M, Lin W-L, Dolios G, Wang R, Eckman CB, Dickson DW, Hutton M, Hardy J y Golde T (2005) A β 42 Is Essential for Parenchymal and Vascular Amyloid Deposition in Mice. *Neuron* 47 (2): 191-199.
- McKee AC, Carreras I, Hossain L, Ryu H, Klein WL, Oddo S, LaFerla FM, Jenkins BG, Kowall NW y Dedeoglu A (2008) Ibuprofen reduces A β , hyperphosphorylated tau and memory deficits in Alzheimer mice. *Brain Res.* 1207: 225-236.
- McLaurin J, Kierstead ME, Brown ME, Hawkes CA, Lambermon MHL, Phinney AL, Darabie AA, Cousins JE, French JE, Lan MF, Chen F, Wong SSN, Mount HTJ, Fraser PE, Westaway D y St George-Hyslop P (2006) Cyclohexanehexol inhibitors

of A β aggregation prevent and reverse Alzheimer phenotype in a mouse model. *Nature Med.* 12 (7): 801-808.

Mohamed A, Cortez L y de Chaves EP (2011) Aggregation State and Neurotoxic Properties of Alzheimer β -Amyloid Peptide. *Curr. Protein Pept. Sci.* 12: 235-257.

National Research Council of the National Academies (2011) *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 8^a edición. Washington, The National Academies Press.

Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y y LaFerla FM (2003) Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles: Intracellular A β and Synaptic Dysfunction. *Neuron* 39: 409-421.

Oddo S, Billings L, Kesslak JP, Cribbs DH y LaFerla FM (2004) A β Immunotherapy Leads to Clearance of Early, but Not Late, Hyperphosphorylated Tau Aggregates via the Proteasome. *Neuron* 43: 321-332.

Oddo S, Vasilevko V, Caccamo A, Kitazawa M, Cribbs DH y LaFerla FM (2006a) Reduction of Soluble A β and Tau, but Not Soluble A β Alone, Ameliorates Cognitive Decline in Transgenic Mice with Plaques and Tangles. *J. Biol. Chem.* 281 (51): 39413-39423.

Oddo S, Caccamo A, Tran L, Lambert MP, Glabe CG, Klein WL y LaFerla FM (2006b) Temporal Profile of Amyloid- β (A β) Oligomerization in an *in Vivo* Model of Alzheimer Disease. *J. Biol. Chem.* 281 (3): 1599-1604.

Oddo S, Caccamo A, Smith IF, Green KN y LaFerla FM (2006c) A Dynamic Relationship between Intracellular and Extracellular Pools of A β . *Am. J. Pathol.* 168: 184-194-

Ono K, Condrón MM y Teplow DB (2009) Structure–neurotoxicity relationships of amyloid β -protein oligomers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106 (35): 14745-14750.

Ontiveros-Torres MA, Labra-Barríos ML, Díaz-Cintra S, Aguilar-Vázquez AR, Moreno-Campuzano S, Flores-Rodríguez P, Luna-Herrera C, Mena R, Perry G, Florán-Garduño B, Luna-Muñoz J y Luna-Arias JP (2016) Fibrillar Amyloid- β Accumulation Triggers an Inflammatory Mechanism Leading to Hyperphosphorylation of the

Carboxyl-Terminal End of Tau Polypeptide in the Hippocampal Formation of the 3×Tg-AD Transgenic Mouse. *J. Alzheimers Dis.* 52: 243-269.

Otvos L Jr (2007) "A β Variants and Their Impact on Amyloid Formation and Alzheimer's Disease Progression" en Barrow CJ y Small DH (eds.), *Abeta Peptide and Alzheimer's Disease*. Londres, Springer.

Oulès B, Del Prete D, Greco B, Zhang X, Lauritzen I, Sevalle J, Moreno S, Paterlini-Bréchet P, Trebak M, Checler F, Benfenati F y Chami M (2012) Ryanodine Receptor Blockade Reduces Amyloid- β Load and Memory Impairments in Tg2576 Mouse Model of Alzheimer Disease. *J. Neurosci.* 32 (34): 11820-11834.

Peng J, Liang G, Inan S, Wu Z, Joseph DJ, Meng Q, Peng Y, Eckenhoff MF y Wei H (2012) Dantrolene ameliorates cognitive decline and neuropathology in Alzheimer triple transgenic mice. *Neurosci. Lett.* 516 (2): 274-279.

Permanne B, Adessi C, Saborio GP, Fraga S, Frossard M, Dorpe JV, Dewachter I, Banks WA, Leuven FV y Soto C (2002) Reduction of amyloid load and cerebral damage in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease by treatment with a β -sheet breaker peptide. *FASEB J.* 16 (8): 860-884.

Pithadia AS y Lim MH (2012) Metal-associated amyloid- β species in Alzheimer's disease. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 16: 67-73.

Reséndiz R (2010) Enfermedad de Alzheimer. Disponible en <http://www.innn.salud.gob.mx/interior/atencionapacientes/padecimientos/alzheimer.html>.

Roychaudhuri R, Yang M, Hoshi MM y Teplow DB (2009) Amyloid β -Protein Assembly and Alzheimer Disease. *J. Biol. Chem.* 284: 4749-4753.

Ryan TM, Roberts BR, McColl G, Hare DJ, Doble PA, Li Q-X, Lind M, Roberts AM, Mertens HDT, Kirby N, Pham CLL, Hinds MG, Adlard PA, Barnham KJ, Curtain CC y Masters CL (2015) Stabilization of Nontoxic A β -Oligomers: Insights into the Mechanism of Action of Hydroxyquinolines in Alzheimer's Disease. *J. Neurosci.* 35 (7): 2871-2884.

- Sharma S, Rakoczy S y Brown-Borg H (2010) Assessment of spatial memory in mice. *Life Sci.* 87: 521-536.
- Siu G, Clifford P, Kosciuk M, Venkataraman V y Nagele RG (2007) "Glial Cells and A β Peptides in Alzheimer's Disease Pathogenesis" en Barrow CJ y Small DH (eds.), *Abeta Peptide and Alzheimer's Disease*. Londres, Springer.
- Small DH y Barrow CJ (2007) "A Brief Introduction to the History of the β -Amyloid Protein (A β) of Alzheimer's Disease" en Barrow CJ y Small DH (eds.), *Abeta Peptide and Alzheimer's Disease*. Londres, Springer.
- Su X-Y, Wu W-H, Huang Z-P, Hu J, Lei P, Yu C-H, Zhao Y-F y Li Y-M (2007) Hydrogen peroxide can be generated by tau in the presence of Cu(II). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 358: 661-665.
- Tiiman A, Palumaa P y Tõugu V (2013) The missing link in the amyloid cascade of Alzheimer's disease – Metal ions. *Neurochem. Int.* 62: 367-378.
- Vorhees CV y Williams MT (2006) Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat. Protoc.* 1 (2): 848-858.
- Walsh DM y DJ Selkoe (2007) A β Oligomers – a decade of Discovery. *J. Neurochem.* 101: 1172-1184.
- Webster SJ, Bachstetter AD, Nelson PT, Schmitt FA y Van Eldik LJ (2014) Using mice to model Alzheimer's dementia: an overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models. *Frontiers in Genetics* 5: 1-23.
- Wu JW, Breydo L, Isas JM, Lee J, Kuznetsov YG, Langen R y Glabe C (2010) Fibrillar Oligomers Nucleate the Oligomerization of Monomeric Amyloid β but Do Not Seed Fibril Formation. *J. Biol. Chem.* 285: 6071-6079.
- Zatta P, Drago D, Bolognin S y Sensi SL (2009) Alzheimer's disease, metal ions and metal homeostatic therapy. *Trends Pharmacol. Sci.* 30 (7): 346-355.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Observación histopatológica del cerebro de Auguste Deter	2
Figura 2. Proceso de agregación de β A	3
Figura 3. Estados de agregación de β A y su asociación a iones Cu	4
Figura 4. Concepto estructural básico para el diseño de moléculas bifuncionales	5
Figura 5. Agregación de β A modulada por TP en presencia y ausencia de Cu	6
Figura 6. Línea de tiempo experimental	17
Figura 7. Plano del tanque para LAM	18
Figura 8. Curvas de adquisición	23
Figura 9. Parámetros analizados en las pruebas de retención.....	25
Figura 10. Niveles de β A detectados por inmunohistoquímica.....	26
Figura 11. Niveles de fibrillas amiloides y oligómeros fibrilares detectados por inmunohistoquímica.....	28

APÉNDICE 1. Ubicación estereotáxica de infusión intracerebroventricular

