

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



Evaluación del efecto de la capacidad inhibitoria de la agregación de las mutantes A30W, K28A y M35C del péptido β -amiloide en un modelo in vivo de *C. elegans*

TESIS

PRESENTADO POR:

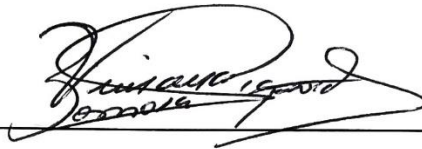
L.B.G DIANA PATRICIA QUIJANO GUERRERO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA
EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR E
INGENIERÍA GENÉTICA**

Monterrey, N.L. Julio 2021

“Evaluación del efecto de la capacidad inhibitoria de la agregación de las mutantes A30W, K28A y M35C del péptido β -amiloide en un modelo in vivo de *C. elegans*”

Aprobación de tesis:



Dra. C. Viviana Chantal Zomosa Signoret
Director de Tesis



Dr. C. Carlos Córdova Fletes
Co-director de Tesis



Dr. C. Kame Alberto Galán Huerta
Miembro de la comisión



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

Dedicatoria y agradecimientos

A mi familia y a Joan, por ser mi principal apoyo y motivación.

A mis compañerxs de maestría, por su amistad.

Gracias a la Dra. Viviana Zomosa por permitirme entrar a su laboratorio y por su apoyo y confianza.

Y a todos los demás que forman parte del departamento con los que tuve la fortuna de coincidir y conocer.

A CONACYT por el apoyo económico proporcionado durante la maestría.

Lugar de trabajo

Esta tesis fue realizada en el laboratorio de Biología Estructural perteneciente al Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina, en la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. C. Viviana Chantal Zomosa Signoret.

Este trabajo contó con apoyo de CONACYT a través de la convocatoria de Ciencia Básica.

Índice

| | | |
|-------|---|----|
| 1. | Resumen..... | 9 |
| 2. | Introducción..... | 10 |
| 2.1 | Generalidades de la enfermedad de Alzheimer..... | 10 |
| 2.2 | Histopatología del Alzheimer..... | 11 |
| 2.3 | Hipótesis de la cascada amiloide..... | 13 |
| 2.4 | Biogénesis del péptido β -amiloide..... | 14 |
| 2.5 | Funciones y disfunciones de $A\beta$ | 17 |
| 2.6 | Estructura y mecanismo de agregación de $A\beta$ | 19 |
| 2.7 | Péptidos como inhibidores de la agregación de $A\beta$ | 21 |
| 2.8 | <i>Caenorhabditis elegans</i> como modelo de AD..... | 23 |
| 2.9 | <i>C. elegans</i> para el estudio de inhibidores de la agregación de $A\beta$ | 25 |
| 3. | Justificación..... | 27 |
| 4. | Hipótesis..... | 28 |
| 5. | Objetivos..... | 29 |
| 5.1 | Objetivo general..... | 29 |
| 5.2 | Objetivos específicos..... | 29 |
| 6. | Materiales y Equipos..... | 30 |
| 6.1 | Reactivos..... | 30 |
| 6.1.1 | Tratamiento con péptidos y microscopía de fluorescencia..... | 30 |
| 6.1.2 | Mantenimiento de nemátodos y ensayos de viabilidad y parálisis..... | 30 |
| 6.1.3 | Ensayos de quimiotaxis..... | 30 |
| 6.2 | Materiales..... | 31 |
| 6.2.1 | Material de uso general..... | 31 |
| 6.2.2 | Tratamiento con péptidos y microscopía de fluorescencia..... | 31 |
| 6.2.3 | Mantenimiento de nemátodos y ensayos..... | 31 |

| | | |
|-------|---|----|
| 6.2.4 | Material biológico..... | 31 |
| 6.3 | Equipo..... | 32 |
| 6.3.1 | Equipo de uso general..... | 32 |
| 6.3.2 | Microscopía de fluorescencia..... | 32 |
| 6.3.3 | Mantenimiento de nemátodos..... | 32 |
| 7. | Metodología..... | 33 |
| 7.1 | Estrategia experimental..... | 33 |
| 7.2 | Péptidos y cepas de <i>C. elegans</i> | 33 |
| 7.3 | Cultivo y sincronización de nemátodos..... | 34 |
| 7.4 | Estandarización del método de entrega de péptidos a <i>C. elegans</i> | 35 |
| 7.4.1 | Protocolo de fijación de nemátodos..... | 35 |
| 7.4.2 | Estandarización del tiempo de incubación..... | 36 |
| 7.4.3 | Estandarización del volumen de tratamiento..... | 37 |
| 7.4.4 | Transporte de los péptidos a <i>C. elegans</i> | 37 |
| 7.5 | Ensayos de viabilidad..... | 38 |
| 7.6 | Ensayos de parálisis..... | 39 |
| 7.7 | Ensayos de quimiotaxis..... | 40 |
| 8. | Resultados..... | 43 |
| 8.1 | Transporte de péptidos a <i>C. elegans</i> | 43 |
| 8.1.1 | Estandarización del reactivo BioPORTER..... | 43 |
| 8.1.2 | Transporte y visualización de los péptidos..... | 45 |
| 8.2 | Efecto de las mutantes en la viabilidad..... | 46 |
| 8.3 | Efecto de las mutantes en el fenotipo de parálisis..... | 48 |
| 8.4 | Efecto de las mutantes en la memoria asociativa..... | 50 |
| 9. | Discusión..... | 53 |
| 10. | Conclusiones..... | 58 |
| 11. | Referencias..... | 59 |

Lista de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Sintomatología del Alzheimer. | 11 |
| Figura 2. Neuropatología del Alzheimer..... | 13 |
| Figura 3. Estructura de APP..... | 15 |
| Figura 4. Procesamiento de APP..... | 17 |
| Figura 5. Agregación de A β | 19 |
| Figura 6. Estructura del monómero de A β | 20 |
| Figura 7. Efectos in vitro de las mutantes del péptido A β | 23 |
| Figura 8. Acumulación de A β de la cepa CL2006 de <i>C. elegans</i> | 24 |
| Figura 9. Estrategia experimental. | 33 |
| Figura 10. Descripción esquemática del protocolo de transducción..... | 38 |
| Figura 11. Esquema de placas para quimiotaxis. | 42 |
| Figura 12. Visualización de nemátodos por microscopía de fluorescencia. | 43 |
| Figura 13. Evaluación del tiempo de incubación del kit de transducción BioPORTER con el marcador fluorescente FITC-IgG. | 44 |
| Figura 14. Evaluación del volumen del reactivo BioPORTER con el marcador fluorescente FITC-IgG..... | 45 |
| Figura 15. Transporte de los péptidos a <i>C. elegans</i> con el kit de transducción BioPORTER..... | 46 |
| Figura 16. Efecto del tratamiento con los péptidos en la viabilidad de nemátodos N2. .. | 47 |
| Figura 17. Efecto del tratamiento con los péptidos en el fenotipo de parálisis de la cepa CL2006..... | 49 |
| Figura 18. Efecto del tratamiento con los péptidos en la formación de depósitos amiloides de la cepa CL2006. | 50 |
| Figura 19. Efecto del tratamiento con los péptidos en la quimiotaxis de nemátodos CL2355..... | 51 |

Lista de tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Variantes del péptido A β | 34 |
| Tabla 2. Cepas de <i>Caenorhabditis elegans</i> | 34 |
| Tabla 3. Grupos experimentales de ensayos de viabilidad. | 39 |
| Tabla 4. Grupos experimentales de ensayos de parálisis. | 40 |
| Tabla 5. Grupos experimentales de ensayos de quimiotaxis..... | 41 |
| Tabla 6. Efecto del tratamiento con los péptidos en la viabilidad de nemátodos N2. | 48 |
| Tabla 7. Efecto del tratamiento con los péptidos en el fenotipo de parálisis de la cepa CL2006..... | 49 |
| Tabla 8. Efecto del tratamiento con los péptidos en índice de quimiotaxis de la cepa CL355..... | 51 |

1. Resumen

De acuerdo con la hipótesis de la cascada amiloide, la agregación del péptido beta amiloide ($A\beta$) es el proceso causal de la patología de la Enfermedad de Alzheimer (AD) y, por lo tanto, un blanco para el desarrollo de tratamientos. Debido a que la secuencia de aminoácidos de $A\beta$ es esencial para su propiedad de autoagregación, es posible diseñar péptidos inhibidores de la agregación mediante la modificación de $A\beta$. Previamente, se generaron tres péptidos derivados de $A\beta$ -42 con mutaciones puntuales M35C, A30W y K28A, las cuales se localizan en regiones clave para la agregación e inducción de toxicidad. Los ensayos en cultivo celular mostraron una reducción en la citotoxicidad de las mutantes en comparación con el péptido silvestre o *wildtype* (WT) y la capacidad de desorganizar agregados WT preformados e impedir su agregación *de novo*. Por lo anterior, en este trabajo se utilizó al nemátodo *Caenorabdhitis elegans* para evaluar los efectos de los péptidos A30W, K28A y M35C en un modelo *in vivo* de la AD. Para esto, se estandarizó el protocolo del kit BioPorter para el tratamiento de los nemátodos. Se realizaron ensayos de viabilidad para determinar la toxicidad de los péptidos en una cepa de nemátodos WT, se monitoreó un fenotipo de parálisis progresiva en nemátodos de la cepa transgénica CL2006 que expresa $A\beta$ -42 en tejido muscular, y se evaluó la memoria asociativa mediante ensayos de quimiotaxis en nemátodos de la cepa transgénica CL2355 que expresa $A\beta$ -42 en neuronas. Ninguno de los péptidos afectó la viabilidad de los nemátodos y, por el contrario, indujeron una extensión de la vida media. A su vez, los tres péptidos retrasaron ligeramente el fenotipo de parálisis y generaron una disminución aparente en el número y tamaño de agregados amiloides en los nemátodos CL2006, mientras que en la cepa CL2355 mostraron una tendencia a la recuperación del índice de quimiotaxis. En general, los resultados obtenidos sugieren que los péptidos mutantes mejoran los fenotipos asociados a la toxicidad de $A\beta$ -42 en *C. elegans*. Estos efectos positivos observados parecen asociarse no solo a la inhibición de la agregación de $A\beta$ -42, si no, también a posibles propiedades antioxidantes y neuroprotectoras de los péptidos mutantes. Aunque es necesario realizar más estudios, las mutantes A30W, K28A y M35C presentan un uso potencial para el desarrollo de tratamientos contra la AD.

2. Introducción

2.1 Generalidades de la enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (AD) es un desorden neurodegenerativo progresivo e irreversible identificado como la principal causa de demencia senil. Se describió por primera vez en 1907 por Alois Alzheimer en una mujer de 51 años que presentaba una afectación seria a la memoria y un deterioro cognitivo y del comportamiento en general. Mediante el análisis *post-mortem* del cerebro se reportó la presencia de neurofibrillas y focos de acumulación de alguna sustancia (Stelzmann, Norman Schnitzlein, y Reed Murtagh, 1995). Actualmente, estas características han sido ampliamente estudiadas y se consideran distintivas de la enfermedad que lleva su nombre.

La prevalencia de la AD va en aumento a nivel mundial. De acuerdo con datos de la Organización Mundial de la Salud, en el año 2019 había 50 millones de personas con demencia y 10 millones de casos nuevos cada año, de los cuales la AD representa del 60 al 70% (OMS, 2019). De igual forma, se ha estimado que para el año 2050 el número de personas que sufren de demencia alcance los 131.5 millones. En México, 86,000 personas padecían demencia en el 2014 y se estima un número de 3.5 millones de personas para el año 2050 (Gutiérrez-Robledo y Arrieta-Cruz, 2015). La edad es el principal factor de riesgo en su desarrollo afectando al 5% de las personas con 65 años y al 20% de las personas con 80 años, siendo entre los 80 y 89 años la edad con mayor incidencia en el continente americano (dos Santos Picanco et al., 2018). Otros factores de riesgo incluyen el género con una mayor prevalencia en mujeres, la población con un aumento en la incidencia en individuos afroamericanos e hispanoamericanos, la herencia genética con asociación a ciertos alelos y mutaciones, así como la ocurrencia de depresión, trauma cerebral, enfermedades vasculares, síndrome de Down, baja reserva cognitiva y poca actividad física (Atri, 2019).

De forma general, la sintomatología de la AD se presenta como una pérdida progresiva en la memoria con la aparición gradual de deficiencias cognitivas de lenguaje y visoespaciales (figura 1). Los primeros síntomas incluyen dificultad para recordar nombres y eventos recientes, cambios en el estado de ánimo, ansiedad y apatía que progresan hacia síntomas tardíos como desorientación, confusión, alteración del juicio, cambios en el comportamiento como agresión y agitación, síntomas neuropsiquiátricos como delirios y alucinaciones, y dificultad para caminar, deglutir y hablar (Atri, 2019). De acuerdo con su neuropatología, la presentación de los síntomas está asociada a la neurodegeneración en partes específicas en el cerebro, por lo que aparecen en etapas avanzadas de la enfermedad. Al respecto, se suele clasificar el progreso de la enfermedad en tres etapas: preclínica, deterioro cognitivo leve (MCI) y demencia. En la etapa preclínica, ocurren cambios medibles en el cerebro y en biomarcadores asociados al comienzo de la enfermedad, sin embargo, es asintomática presentándose hasta más de 20 años antes que el desarrollo de los síntomas. En la etapa de deterioro cognitivo leve ocurren alteraciones cognitivas y en la memoria mínimas pero notables que no interfieren con las actividades de la persona, mientras que en la etapa de demencia los síntomas son tan graves que afectan significativamente la calidad de vida (Thies y Bleiler, 2013).



Figura 1. Sintomatología del Alzheimer. Tomado de: Humannacare

2.2 Histopatología del Alzheimer

En el cerebro con Alzheimer (figura 2), macroscópicamente se suele presentar una atrofia cortical moderada principalmente en áreas de asociación multimodal y estructuras del

sistema límbico, típicamente con atrofia temporal medial que afecta la amígdala y el hipocampo, además del agrandamiento de los cuernos frontales y temporales de los ventrículos laterales y la disminución en el peso del cerebro asociados. Sin embargo, ninguna de estas características es específica de la AD, pudiéndose presentar en personas clínicamente normales o con enfermedades neurodegenerativas distintas (Deture y Dickson, 2019).

En una evaluación microscópica del cerebro se detecta la presencia de placas amiloides extracelulares y de ovillos neurofibrilares intracelulares, ambos considerados como los biomarcadores y las lesiones más características de la AD y cuya presencia es necesaria para el diagnóstico definitivo de la enfermedad. Los ovillos neurofibrilares están compuestos por proteína tau anormalmente hiperfosforilada, la cual ha perdido su función normal de unión y estabilización de microtúbulos, y presenta un incremento en su capacidad de agregación. Los agregados filamentosos de tau se presentan como filamentos helicoidales pareados (PHFs) o filamentos rectos (SFs) y se forman en el interior de la neurona desplazando al núcleo y otros componentes neuronales vitales hacia la periferia del soma. Por su parte, las placas amiloides están formadas por agregados fibrilares del péptido β -amiloide ($A\beta$) y en la AD se detectan principalmente como placas densas o placas difusas. Las placas difusas se forman en el neuropilo y presentan poca o ninguna señal de colorantes de unión a fibras amiloides, como tioflavina S y rojo Congo, lo que podría deberse a una baja concentración del péptido $A\beta$ o a que adopta estructuras distintas a las de lámina- β . Por el contrario, las placas densas cuentan con un centro rico en péptido $A\beta$ altamente agregado en estructuras de lámina- β y, por lo tanto, presentan una tinción intensa con tioflavina S y rojo Congo. Un subgrupo de placas densas es denominado placas neuríticas (NPs) debido a su asociación a neuritis distróficas o inmunoreactivas para tau y a la presencia de neurodegeneración, microglía activa y astrocitos reactivos. (Deture y Dickson, 2019; Rak, et al., 2007). Adicionalmente a los ovillos neurofibrilares y las placas amiloides, se suele presentar microglía activa, astrocitos reactivos, cuerpos de Hirano, degeneración granulovacuolar y angiopatía amiloide cerebral. Todas estas lesiones resultan en la pérdida de sinapsis y la muerte neuronal en regiones vulnerables del cerebro, llevando al desarrollo de los síntomas asociados a la enfermedad (Deture y Dickson, 2019).

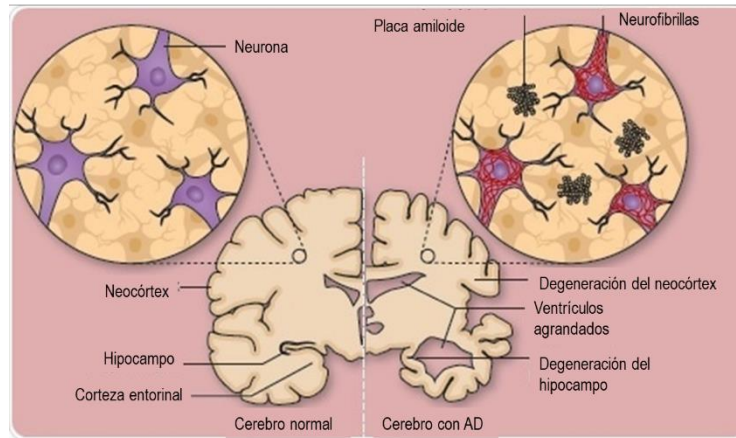


Figura 2. Neuropatología del Alzheimer. El cerebro con AD se caracteriza principalmente por presentar neurodegeneración, placas amiloides extracelulares y ovillos neurofibrilares intracelulares. Modificado de: Tocris Bioscience.

2.3 Hipótesis de la cascada amiloide

Hasta el momento no se ha podido esclarecer la etiología y patogénesis de la AD, lo que ha llevado al establecimiento de distintas hipótesis que buscan explicar el mecanismo molecular de la enfermedad. La hipótesis de la cascada amiloide, propuesta en 1992, establece que la acumulación de $A\beta$ es el evento inicial de la enfermedad que induce los demás procesos patológicos incluyendo la hiperfosforilación y agregación de tau y la disfunción y muerte neuronal (Hardy y Higgins, 1992).

Las principales evidencias que llevaron al desarrollo de esta hipótesis provienen de análisis genéticos asociados al desarrollo de la enfermedad. La forma de inicio temprano de la AD suele heredarse de forma autosómica dominante presentándose antes de los 65 años y se asocia principalmente a mutaciones en los genes *PSEN1*, *PSEN2* y *APP*. El gen *APP* codifica para la proteína precursora de β -amiloide (APP) cuyo procesamiento da lugar a la producción de péptido $A\beta$. Por su parte, los genes *PSEN1* y *PSEN2* codifican para las presinilinas 1 y 2, respectivamente, las cuales forman parte del complejo γ -secretasa involucrado en el procesamiento de APP a $A\beta$. Una variante de la AD asociada a estos genes se presenta en el síndrome de Down, donde, debido a la presencia del gen *APP* en el cromosoma 21, la copia extra genera un aumento patológico en la cantidad de

la proteína. Por otro lado, en el desarrollo de la AD de inicio tardío se ha reportado un riesgo genético asociado al alelo $\epsilon 4$ del gen *APOE*, el cual codifica para una lipoproteína que actúa como principal acarreador de colesterol en el cerebro y tiene la capacidad de unir proteínas amiloides (Bertram, Lill, y Tanzi, 2010; Piaceri, 2013). Adicionalmente, se demostró que las altas concentraciones de agregados de $A\beta$ ejercen un efecto neurotóxico *in vitro* (Yankner, Duffy, y Kirschner, 1990) y que la sobreexpresión de $A\beta$ humano en ratones llevaba al desarrollo de la neuropatología típica de AD (Quon et al., 1991).

Sin embargo, objeciones a esta hipótesis surgieron debido principalmente a la baja correlación entre el deterioro cognitivo y la carga de depósitos de $A\beta$, los cuales en un primer momento eran considerados directamente responsables de los procesos de neurodegeneración (Arriagada, Growdon, Hedley-Whyte, y Hyman, 1992). El descubrimiento de pequeños agregados solubles no fibrilares de $A\beta$ encontrados en cerebros de pacientes (Gong et al., 2003), que presentaban una alta actividad neurotóxica (Lambert et al., 1998) y sí correlacionaban con el nivel de neurodegeneración (Lue et al., 1999); generó un cambio en el paradigma llevando a que, actualmente, se considere a los oligómeros como los principales agentes neurotóxicos.

2.4 Biogénesis del péptido β -amiloide

En 1984, el péptido $A\beta$ fue identificado como el componente de los depósitos de fibrillas amiloides mediante su purificación a partir de cerebros humanos (Glenner y Wong, 1984). Posteriormente, la clonación y expresión recombinante del péptido en líneas celulares neuronales confirmó sus efectos neurotóxicos (Yankner et al., 1989) y permitió la secuenciación del gen de la proteína precursora de $A\beta$ (*APP*). *APP* pertenece a una familia génica que, en mamíferos, incluye también a las proteínas similares a APP 1 y 2 (APLP1 y APLP2). Todas consisten en proteínas integrales de membrana con un sólo paso transmembranal, un gran dominio extracelular y una cola citoplasmática pequeña (figura 3). A pesar de sufrir un procesamiento similar, únicamente APP es capaz de producir el péptido $A\beta$ debido a una divergencia en la secuencia (Bayer, Cappai, Masters, Beyreuther, y Multhaup, 1999; Kang et al., 1987; O'Brien, R. J., y Wong, 2011). El gen de APP se

localiza en el cromosoma 21 en la posición 21q21.3 y consta de 19 exones. Un proceso de empalme alternativo de los exones 7, 8 y 15 da lugar a 8 isoformas, de las cuales, la isoforma de 695 aminoácidos es una de las más abundantes, se expresa de forma específica en el sistema nervioso y es la más susceptible a producir el péptido A β (Belyaev et al., 2010; J. Chen, Wang, y Turko, 2013; Kang et al., 1987; O'Brien, R. J., y Wong, 2011).

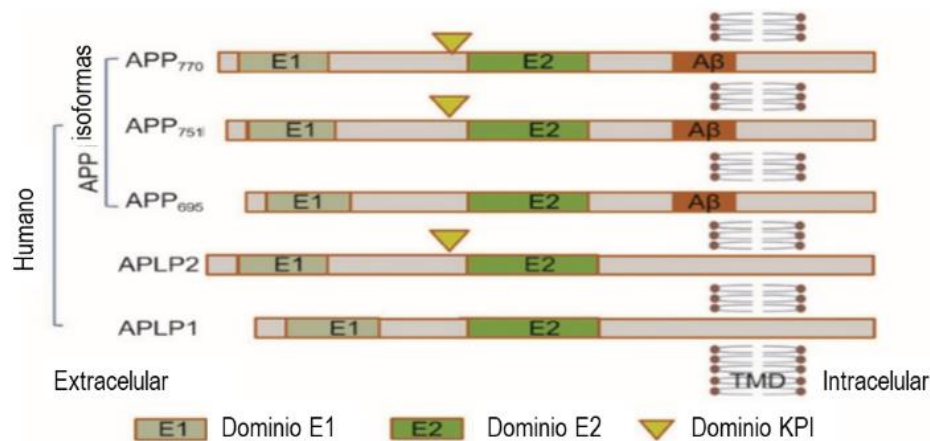


Figura 3. Estructura de APP. Las proteínas de la familia de APP presentan un dominio transmembranal, un gran dominio extracelular y un dominio citoplasmático pequeño. Únicamente APP presenta la secuencia A β . Modificado de: Chen, et al., 2017.

Se ha encontrado que APP cumple con funciones fisiológicas estando involucrada en la función y formación de sinapsis, así como en actividades neuroprotectoras, sin embargo, su rol en la generación de A β es el más estudiado (Müller, Deller, y Korte, 2017). APP es producida en grandes cantidades y metabolizada rápidamente siguiendo al menos dos distintas vías de procesamiento proteolítico, lo cual depende en gran parte de su localización celular (figura 4). Inicialmente, su síntesis ocurre en el retículo endoplasmático y, siguiendo la vía secretora, es procesada en la red trans del aparato de Golgi (TGN) desde donde puede ser transportada a la superficie celular o a endosomas (Greenfield et al., 1999). La vía de procesamiento no amiloidogénica ocurre en la superficie celular y en la TGN, donde la endoproteasa de membrana, α -secretasa, corta a APP generando el fragmento N-terminal soluble sAPP α y el fragmento C-terminal CTF83 unido a membrana. CTF83 posteriormente produce los fragmentos p3 y el dominio intracelular de APP AICD mediante el corte por la γ -secretasa, un complejo multiproteico que incluye las presenilinas 1 y 2 (PSEN1 y PSEN2), la nicastrina y APH-1, y que es esencial para la proteólisis de varias proteínas transmembranales (Kojro y Fahrenholz,

2005; O'Brien y Wong, 2011). Esta vía no produce péptido A β y, por el contrario, se le han asociado efectos protectores al fragmento sAPP α el cual es secretado, mientras que AICD es transportado al núcleo donde lleva a cabo funciones regulatorias (Chow, Mattson, Wong, y Gleichmann, 2010).

Las moléculas de APP no procesadas pueden ser reinternalizadas a la célula en endosomas que contienen a la enzima β -secretasa responsable de la vía amiloidogénica, la cual tiene lugar principalmente en TGN y endosomas (Das et al., 2015). La β -secretasa o BACE1 es una aspartil-proteasa de membrana que corta a APP en la posición +1 del dominio A β generando los fragmentos sAPP- β y CTF99 (Cai et al., 2001; Cole y Vassar, 2007). El fragmento sAPP- β , al igual que el fragmento sAPP α , es liberado al espacio extracelular, mientras que CTF99 es cortado por el complejo γ -secretasa produciendo el fragmento AICD y péptidos A β de tamaños variables que son transportados a la superficie celular y secretados por vesículas de reciclaje (O'Brien, R. J., y Wong, 2011). La isoforma de A β más común es la de 40 aminoácidos (A β -40) que representa del 50 al 70% de A β encontrando en líquido cefalorraquídeo, el 10% corresponde a la isoforma de 42 aminoácidos (A β -42) y el resto a isoformas de 37, 38, 39 y 43 aminoácidos. A pesar que A β -40 es capaz de agregarse e inducir citotoxicidad, se ha encontrado que A β -42 presenta mayor toxicidad y se relaciona de manera más directa con la patología de la AD (Qiu, Liu, Chen, Zhao, y Li, 2015).

Después de su síntesis, distintas vías median la eliminación del exceso de A β del cerebro a través del flujo de drenaje de líquido intersticial, fagocitosis por astrocitos o microglía, por transporte a través de la barrera hematoencefálica hacia la circulación sanguínea, mediante un proceso de autofagia y/o debido a la acción de enzimas de degradación como la neprilisina, la enzima degradadora de insulina, la metaloproteinasa de matriz 9 y la carboxipeptidasa de glutamato II (Bates et al., 2009; Yoon y Jo, 2012).

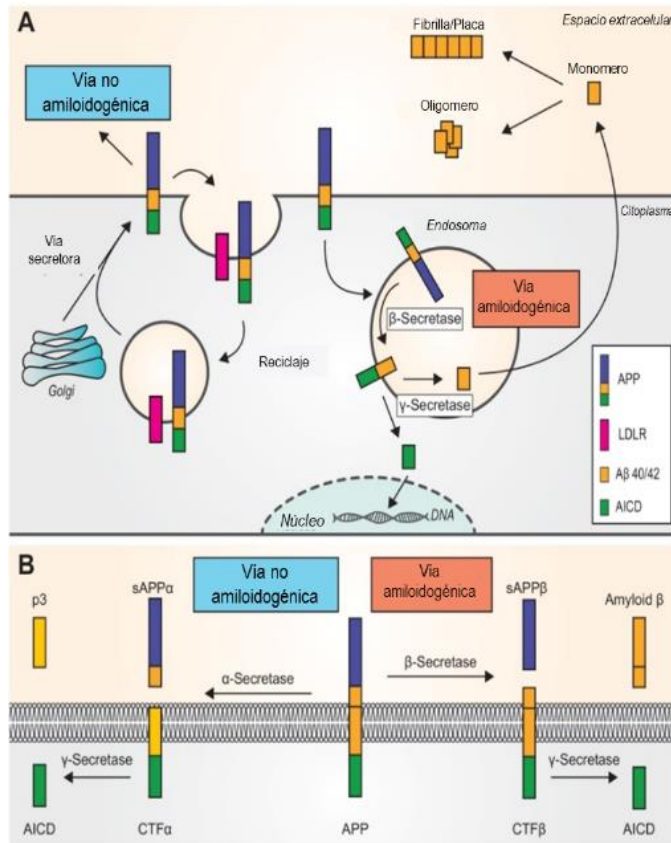


Figura 4. Procesamiento de APP. APP puede ser procesada por al menos dos vías: la vía amiloidogénica y la no amiloidogénica (A). La vía no amiloidogénica implica el corte consecutivo por la α-secretasa y γ-secretasa, mientras que la amiloidogénica por la β-secretasa y γ-secretasa (B). Modificado de: Zhou, et al., 2018.

2.5 Funciones y disfunciones de Aβ

La detección de Aβ en líquido cefalorraquídeo (LCR) de personas sin demencia llevó a la consideración de la producción del péptido como un proceso fisiológico, promoviendo la investigación de sus posibles funciones biológicas (Plant, Boyle, Smith, Peers, y Pearson, 2003; Tamaoka et al., 1997). Al respecto, se ha encontrado que el tratamiento con bajas concentraciones de Aβ monomérico disminuye la oxidación de lipoproteínas de LCR y plasma (Kontush et al., 2001), y previene la muerte neuronal relacionada a daño oxidativo (Zou, Gong, Yanagisawa, y Michikawa, 2002). Esta propiedad se asocia a la capacidad quelante del péptido, donde por medio de dos regiones que actúan como sitios de unión de metales de transición, una región en el N-terminal formada por las histidinas 6, 13 y

14, y la tirosina 10, y la segunda en el C-terminal formada por la metionina 35, inhiben la oxidación catalizada por metales (Kontush, 2001). En esta forma monomérica, A β también parece proteger a las neuronas de muerte por excitotoxicidad mediante la activación de la vía de señalización de la fosfatidilinositol- 3-kinasa (PI3K) (Giuffrida et al., 2009), e incrementa la potenciación a largo plazo (LTP) mediante su interacción con receptores de acetilcolina y glutamatérgicos (Carrillo-Mora, Luna, y Colín-Barenque, 2014). A su vez, se ha encontrado que el depósito de A β actúa sellando fugas en la barrera hematoencefálica, fomentando la recuperación después de una lesión cerebral traumática (Brothers, Gosztyla, y Robinson, 2018), y neutralizando bacterias como *Candida albicans* (Soscia et al., 2010) y virus como el virus del herpes simple (HSV1) (Bourgade et al., 2015).

Lo anterior sugiere que la patogenicidad de A β surge de una “ganancia de función tóxica” donde los monómeros del péptido con actividad antioxidante y neuroprotectora forman agregados que pierden estas funciones fisiológicas y generan toxicidad. En este contexto, se ha encontrado que los oligómeros solubles actúan como los principales agentes patológicos, mientras que los agregados insolubles podrían estar participando como reservorios de oligómeros bioactivos, o disminuyendo su toxicidad al secuestrarlos y mantenerlos inertes (Bi y Daggett, 2018; Reiss, et al., 2018). En general, la toxicidad debida a amiloide involucra su interacción con membranas celulares. Estos mecanismos incluyen la desestabilización de membranas mediante la remoción de moléculas lipídicas y la formación de poros que llevan a la pérdida de la homeostasis del calcio. También tienen efectos sinaptotóxicos ya que son capaces de actuar como ligandos de receptores postsinápticos provocando la pérdida de inhibición de las sinapsis. A su vez, A β es capaz de ingresar a la mitocondria donde interviene con la cadena transportadora de electrones, interrumpe el metabolismo, interfiere directamente con la fusión y fisión, desestabiliza la homeostasis del calcio e induce la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Reiss et al., 2018).

Se conoce poco de los factores que desencadenan la agregación patológica de A β , pero se cree que se asocian principalmente a un incremento en la producción de APP, un aumento en la proporción A β -42/A β -40 y/o a una desregulación en la eliminación de A β .

Mutaciones en el gen *APP* relacionadas al AD de inicio temprano pueden provocar un incremento en la cantidad total de A β , un incremento en la proporción de A β -42 o una aceleración en el proceso de agregación. De forma similar, las mutaciones en los genes *PS1* y *PS2* llevan al aumento de la proporción de A β -42. APOE está involucrado en la eliminación de A β , sin embargo, el alelo ϵ 4 presenta una baja eficiencia de eliminación, además de ser capaz de formar complejos estables con A β modulando su acumulación. Por otro lado, productos del estrés oxidativo que aumentan con el envejecimiento pueden incrementar la actividad de la γ -secretasa y la producción de A β . El estrés oxidativo también se ha asociado a cambios conformacionales patogénicos de PS1. A su vez, la inflamación crónica sistémica puede llevar al incremento en la acumulación de A β . La resistencia a insulina, hiperglicemia y la microbiota, también han sido asociadas a la inducción de la agregación de A β . Adicionalmente, se ha observado que, debido a las características similares a priones, pueden ocurrir eventos de nucleación cruzada donde la acumulación de otra proteína promueve la polimerización de A β (Finder y Glockshuber, 2007; Zhang, Fu, Meng, He, y Zhang, 2018).

2.6 Estructura y mecanismo de agregación de A β

El péptido A β , al igual que otras proteínas amiloidogénicas, forma estructuras insolubles ricas en láminas β mediante un proceso complejo de auto agregación. Se cree que los principales eventos en el proceso consisten en una nucleación primaria, donde monómeros de la proteína forman dímeros y oligómeros solubles; un proceso de elongación, donde la

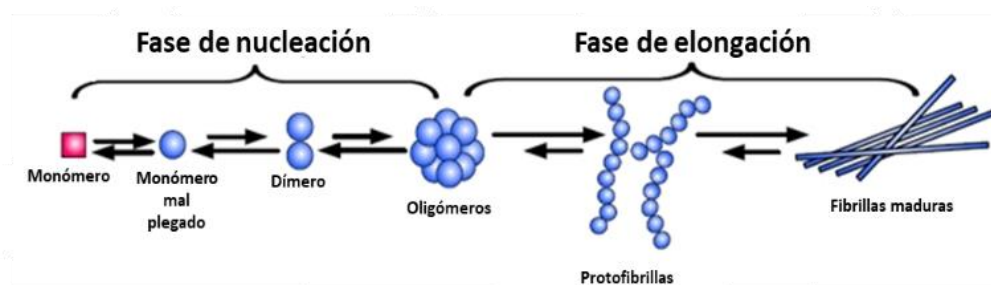


Figura 5. Agregación de A β . El proceso de agregación involucra una fase de agregación, donde los monómeros forman oligómeros de distintos tamaños, y una fase de elongación que lleva a la formación de estructuras fibrilares. Modificado de: Kumar et al., 2011.

adición de monómeros lleva al crecimiento de estructuras fibrilares; y una nucleación secundaria, donde los agregados existentes catalizan la formación de nuevos agregados (figura 5) (Giorgetti, Greco, Tortora, y Aprile, 2018).

Análisis de resonancia magnética nuclear (RMN) y dinámica molecular sugieren que los monómeros de A β presentan una estructura parcialmente plegada con una hélice α entre los residuos 13 y 23 y dos regiones hidrofóbicas que tienden a tomar una estructura de lámina- β formadas por los residuos 17 a 21 y 31 a 36. Se ha reportado que la porción más pequeña capaz de formar fibrillas es el undecapéptido HHQKLVFFAED que corresponde a los residuos 13 a 23. Los residuos intermedios 21 a 30 forman un giro altamente estable que parece servir como sitio de nucleación al permitir el contacto entre el extremo carboxilo terminal y las regiones hidrofóbicas del péptido, una interacción clave en la formación de fibrillas (figura 6) (Vivekanandan, Brender, Lee, y Ramamoorthy, 2011; Yang y Teplow, 2008). Se ha propuesto que la cinética del proceso de agregación está asociada a la longitud del extremo C-terminal (Jarrett, Berger, y Lansbury, 1993) y a la estabilidad de la estructura del monómero (Ni, Shi, Yu, Chang, y Chen, 2011). En la variante A β -42, los dos residuos hidrofóbicos extra son capaces de inducir un cambio hacia una estructura lámina β más estable, lo que resulta en una tendencia mayor a la agregación. (Jarrett et al., 1993).

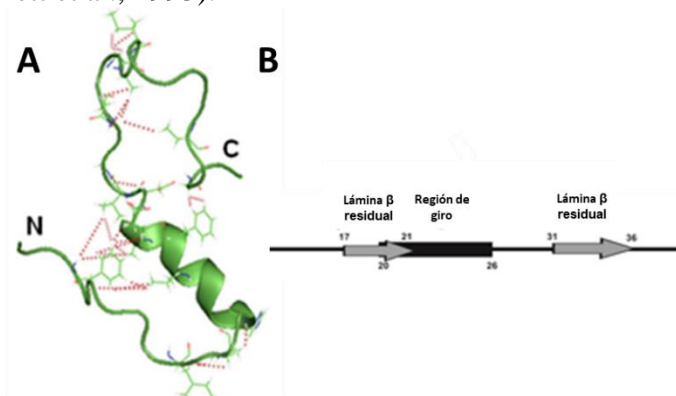


Figura 6. Estructura del monómero de A β . A β presenta una hélice α central (A), dos regiones hidrofóbicas y un giro altamente estable (B). Modificado de: Vivekanandan, et al., 2011 y Ni, et al., 2011

Después de la alteración de la conformación de los monómeros que inicia la nucleación primaria, se da la formación de oligómeros solubles de A β (ADDLs) (Mroczko, et al., 2018). El estudio de la conformación de los oligómeros de A β es limitado debido a su naturaleza transitoria, dinámica y heterogénea, encontrando variaciones en tamaño desde

trímeros y tetrámeros hasta dodecámeros. Imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica y de fuerza atómica muestran partículas esféricas de aproximadamente 3 a 10nm, las cuales desaparecen con la aparición de fibrillas maduras. Estos oligómeros prefibrilares, pueden ser identificados mediante la unión del anticuerpo dependiente de conformación A11 (Glabe, 2008). De acuerdo con datos recientes, tanto el anticuerpo A11 como los oligómeros adoptan una estructura de lámina α , la cual se distingue debido a que los grupos amino y carbonilo del enlace peptídico se acomodan en lados opuestos, mientras que en las láminas β se alternan (Bi y Daggett, 2018; Shea et al., 2019).

El proceso de agregación termina en la formación de las placas amiloides insolubles. Las fibrillas de $A\beta$ presentan una estructura de “cross β ”, donde las cadenas de lámina β corren de manera perpendicular al eje de la fibra, y los puentes de hidrógeno intramoleculares de las láminas β se acomodan de manera paralela. Las interacciones de aminoácidos específicos tienen relevancia en la estructura y estabilidad de las placas. Dentro de la estructura de las fibras, los péptidos $A\beta$ presentan una estructura de β -giro- β , con el extremo C-terminal plegado hacia el N-terminal en los residuos 37-38. La variante $A\beta$ -42 es la más abundante en las placas amiloides con pequeñas variaciones en la estructura con respecto a $A\beta$ -40, principalmente presentando una máxima protección de grupos hidrofóbicos (Ahmed et al., 2010; Chen et al., 2017; Sunde y Blake, 1998).

2.7 Péptidos como inhibidores de la agregación de $A\beta$

Ya que la neurotoxicidad de $A\beta$ está asociada a la formación de oligómeros y placas amiloides, el desarrollo de inhibidores de la agregación del péptido $A\beta$ presenta la posibilidad de tratar y prevenir la neurodegeneración debida a AD. En 1976 se reportó que la unión del colorante rojo Congo era capaz de inhibir la agregación de $A\beta$ en fibrillas y la neurotoxicidad de fibrillas ya formadas (Lorenzo y Yankner, 1994), y otros compuestos como polifenoles (Porat, Abramowitz, y Gazit, 2006) y melatonina (Pappolla et al., 1998) han demostrado ser capaces de interferir con el cambio de conformación de $A\beta$ hacia estructuras de láminas β evitando su efecto neurotóxico. Sin embargo, el uso de

estas moléculas se ha visto limitado debido a su falta de especificidad y al poco conocimiento que se tiene sobre su mecanismo de acción (Barage y Sonawane, 2015).

Con base en la habilidad de auto reconocimiento y auto agregación de A β , la modificación de residuos específicos puede generar cambios conformacionales y estéricos que interfieran con las interacciones necesarias para su agregación (Matharu, El-Agnaf, Razvi, y Austen, 2010). Al respecto, se ha reportado que la sustitución de residuos básicos por residuos hidrofóbicos, por ejemplo las mutaciones puntuales R5A, K16A y K28A, disminuyen la agregación y citotoxicidad del péptido al alterar las regiones de carga positiva que se forman en la superficie de los agregados de A β (Yoshiike, Akagi, y Takashima, 2007). Específicamente, la mutación K28A parece estabilizar la conformación nativa del monómero de A β -42 incrementando el contenido de estructuras de hélice- α (Shuaib, Saini, Goyal, & Goyal, 2020). A su vez, la sustitución del residuo metionina 35 por cisteína, que está involucrado en la inducción de estrés oxidativo debido a una alta susceptibilidad a la oxidación, ha demostrado una reducción en la toxicidad del péptido sin alterar su capacidad de agregación (Dai, Sun, y Jiang, 2007).

Anteriormente en el grupo de trabajo, mediante análisis de dinámica molecular se observó que la alanina 30 del péptido A β se localiza en el núcleo hidrofóbico de una estructura de lámina β necesaria para la formación y estabilización de las fibrillas; por lo tanto, la sustitución de este residuo por triptófano introducía un impedimento estérico que desestabilizaba su estructura. Posteriormente, se evaluaron las características *in vitro* de esta mutante A30W, y de las ya reportadas, K28A y M35C en la variante de 42 aminoácidos (A β -42). Se encontró que las mutantes mediaron la desorganización y previnieron la agregación *de novo* del péptido A β -42 WT y, específicamente, las mutantes K28A y M35C perdieron su actividad citotóxica. Sin embargo, las mutantes presentaron la formación de estructuras fibrilares de forma similar a los péptidos WT, mostrando una ausencia de correlación entre la citotoxicidad y la capacidad de agregación (figura 7) (Estrada-Rodríguez et al., 2019).

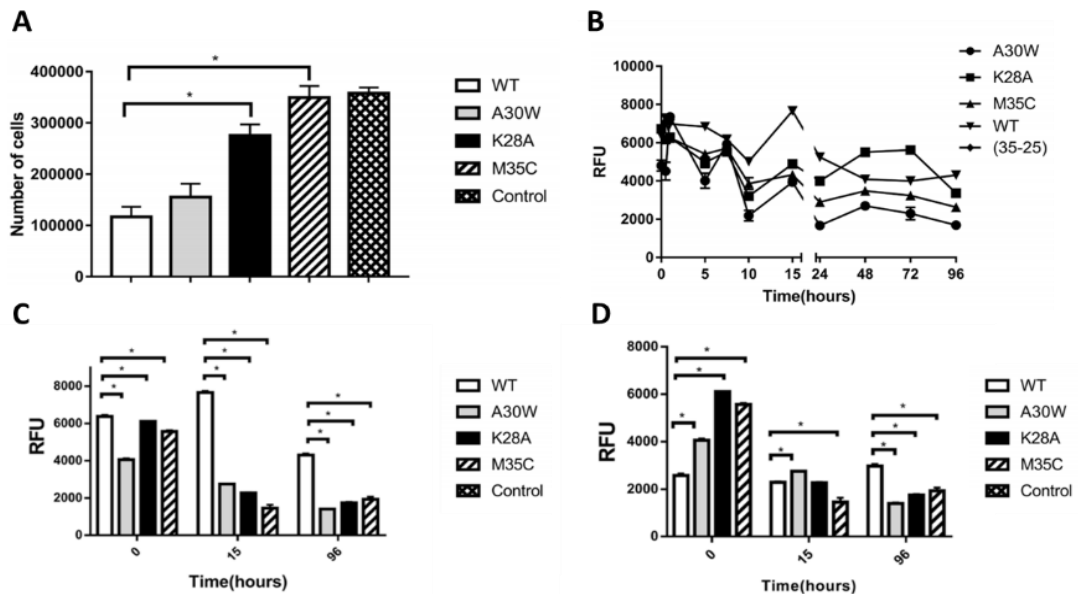


Figura 7. Efectos in vitro de las mutantes del péptido A β . (A) Se observa la agregación de las mutantes mediante tinción con tioflavina S donde todas muestran un comportamiento similar al péptido WT. (B) Ensayo de viabilidad celular. A excepción de A30W de A β -42, todas las variantes perdieron su actividad citotóxica. (C) Incubación con agregados preformados de A β WT, las mutantes fueron capaces de disminuir la señal de tioflavina S. (D) Incubación con monómeros A β WT, las mutantes previnieron la formación de agregados *de novo*. Modificado de: Estrada-Rodríguez, et al., 2019

2.8 *Caenorhabditis elegans* como modelo de AD

Caenorhabditis elegans (*C.elegans*), es un nemátodo de vida libre introducido como modelo por Sydney Brenner en 1963 (Brenner, 1974). Es un organismo pequeño y fácil de manipular, alcanza la etapa adulta a los 3 días a 25°C y tiene una vida de dos a tres semanas de duración. La especie presenta dos sexos distintos, macho y hermafrodita, donde los organismos hermafroditas son capaces de auto fertilizarse o aparearse con machos para producir una progenie de hasta 350 huevos (Alexander, Marfil, y Li, 2014). En 1986, se publicó la estructura del sistema nervioso con la descripción del conectoma de sus 302 neuronas (Sheppard, Turner., 1986), convirtiendo a *C. elegans* en un importante modelo en el estudio de enfermedades neurodegenerativas.

C. elegans presenta el gen relacionado a APP *apl-1* cuya proteína no contiene la secuencia de A β , además de no contar con un ortólogo de la β -secretasa, por lo que para su uso como modelo de AD se han desarrollado organismos transgénicos capaces de expresar el

péptido A β humano (Alexander et al., 2014). La cepa CL2006 fue generada mediante la microinyección del constructo pCL12 que contiene la secuencia que codifica para A β -42 humano regulada por el promotor específico de músculo *unc-54*. (Link, 1995). La expresión del péptido genera depósitos amiloides típicos de la AD (figura 8), y produce un fenotipo de parálisis progresiva en el nemátodo asociado principalmente a la inducción de estrés oxidativo. (Link, 1995; Link et al., 2003).

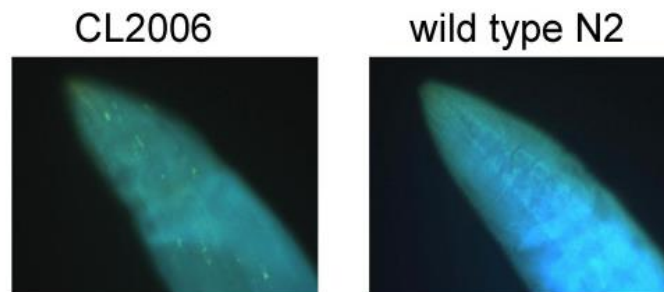


Figura 8. Acumulación de A β de la cepa CL2006 de *C. elegans*. Tinción con tioflavina S de *C. elegans* muestra en señal de agregados del péptido A β que presenta una acumulación en músculo, en comparación con una cepa WT sin expresión de A β . Tomado de: Gutierrez-Zepeda · 2005.

Además de la CL2006, otras cepas como CL4176 y CL2120 reflejan la toxicidad de A β -42 en células musculares, sin embargo, en la AD el péptido es principalmente tóxico a neuronas. Lo anterior llevó al desarrollo de la cepa CL2355, la cual contiene la secuencia de A β -42 humano bajo regulación del promotor neuronal *snb-1*, expresando el péptido de forma inducible con un aumento en la temperatura. Los nemátodos de esta cepa presentan deficiencias en las vías serotoninérgicas, las cuales pueden evaluarse mediante ensayos de quimiotaxis (Wu et al., 2006). De manera normal, la preexposición de nemátodos WT a un compuesto volátil en presencia de comida genera un aprendizaje asociativo que se refleja en un incremento del índice de quimiotaxis del nemátodo hacia el compuesto (McEwan y Rankin, 2013; Nishijima y Maruyama, 2017). Por el contrario, la cepa CL2355 presenta un índice de quimiotaxis disminuido después del entrenamiento asociativo, que corresponde a un fenotipo análogo a la pérdida de memoria en los pacientes con AD (Dosanjh, et al., 2010).

Recientemente, se logró la expresión de A β -42 únicamente en un par de neuronas sensoriales glutamatérgicas denominadas neuronas BAG. A pesar de que los nemátodos

no mostraron un efecto significativo en el comportamiento, el péptido si generó una sobreexcitación de las neuronas BAG, similar a la hiperactivación neuronal observada en pacientes con AD (Sinnige et al., 2019). A su vez, otro equipo de trabajo generó cepas que expresan A β -42 en músculo o neuronas con un marcaje fluorescente subestequiométrico para poder monitorear la agregación *in vivo*. Ambos modelos presentaron fenotipos derivados de la agregación y toxicidad del péptido similares a los ya reportados en otras cepas, incluyendo una reducción en la viabilidad, la movilidad y la quimiotaxis. Además, pudieron identificar características de la patología amiloide que han sido observadas previamente en humanos, incluyendo la acumulación de amfisomas, daño a membranas celulares por la formación de poros, y una mayor sensibilidad a la agregación y toxicidad del péptido en neuronas colinérgicas IL2 asociadas al sentido del olfato (Gallrein et al., 2021). Lo anterior confirma la relevancia del uso de cepas transgénicas de *C. elegans* para el modelado de AD.

2.9 *C. elegans* para el estudio de inhibidores de la agregación de A β

Las cepas transgénicas de *C. elegans* han sido ampliamente utilizadas para la evaluación de la posible actividad terapéutica de distintas moléculas exógenas (Chen, Barclay, Burgoyne, y Morgan, 2015). Al respecto, el tratamiento con gliciteína, una isoflavina derivada de la soya, logró disminuir los agregados amiloides en nemátodos CL2006, y retrasar el establecimiento de la parálisis en esta cepa y la CL4176 que expresan A β -42 muscular. Este efecto se asoció a la actividad antioxidante de la gliciteína al disminuir los niveles de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en los gusanos tratados (Gutierrez-Zepeda et al., 2005). El extracto EGb 761 del árbol *Ginkgo biloba* retrasó el fenotipo de parálisis, disminuyó los niveles de ROS, y redujo la formación de oligómeros y agregados insolubles en estas cepas. Además, EGb 761 demostró una actividad neuroprotectora al normalizar el índice de quimiotaxis en la cepa CL2355 que expresa A β -42 en neuronas (Wu et al., 2006). El extracto de *Ginkgo* suele utilizarse como medicina alternativa en el manejo de AD y algunos estudios han encontrado asociación a la mejora de los síntomas de la demencia (Ihl, 2012; Janßen et al., 2010). Recién se identificó un compuesto similar

derivado del pepino de mar *Cucumaria frondosa* cuya evaluación en *C. elegans* mostró una actividad terapéutica mayor a la de los compuestos de *Ginkgo* (Tangrodchanapong, Sobhon, & Meemon, 2020). De forma similar, la fluoxetina, un antidepresivo de la clase de inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (SSRIs), mostró un retraso en el fenotipo de parálisis y una reducción en la concentración de oligómeros en los nemátodos (Keowkase, Aboukhatwa, & Luo, 2010), así como una asociación con niveles bajos de A β y con la mejora en la actividad cognitiva en pacientes con AD (Liu, Xie, Meng, y Kang, 2019).

Se han identificado otras moléculas que mejoran la patología amiloide en *C. elegans* por ejemplo: cafeína, ácido tánico, bacitracina, oleuropeína, rifampicina, ácido ferúlico, tioflavina y el extracto butanólico de *Hedyotis diffusa* (X. Chen et al., 2015; DanQing et al., 2020). Recientemente, también se identificó a la metformina, litio y curcumina mediante un ensayo de alto rendimiento que facilita el tamizaje de entre varios candidatos según sus efectos en el fenotipo de los nemátodos (Teo et al., 2020).

Además, se ha evaluado el tratamiento de *C. elegans* con péptidos con posible efecto terapéutico. Específicamente, el péptido resistente al calor (SVHRP) purificado a partir de veneno del escorpión *Buthus martensii*, y el péptido 13L derivado de la cocoa, fueron capaces de disminuir la parálisis, reducir la presencia de oligómeros de A β y mantener niveles bajos de ROS, indicando su potencial uso como tratamiento contra AD (Monto et al., 2013; Xiao-gang Zhang et al., 2016). Sin embargo, hasta el momento no existen reportes de la evaluación de inhibidores de la agregación derivados del péptido A β en este modelo. Por lo tanto, en este trabajo de tesis se utilizaron las cepas transgénicas CL2006 y CL2355 para evaluar el efecto de las mutantes de A β -42 A30W, K28A y M35C en los fenotipos de parálisis y disminución del índice de quimiotaxis asociados a la expresión de A β .

3. Justificación

La enfermedad de Alzheimer representa la forma más común de demencia en la población de adultos mayores, cuya prevalencia va en aumento cada año, lo que a su vez implica un incremento en costos de servicios médicos y de cuidados a largo plazo. Sin embargo, hasta el momento no existe ningún tratamiento efectivo para la prevención o reversión del daño neurológico. De acuerdo con la hipótesis de la cascada amiloide, la acumulación de A β mediante un complejo proceso de auto agregación es el evento clave de la enfermedad, por lo que la prevención de este proceso ha emergido como un blanco en el desarrollo de estrategias terapéuticas para Alzheimer. Al respecto, se ha demostrado que mutaciones de aminoácidos específicos en la secuencia de A β pueden interferir con su capacidad de agregación y toxicidad. A su vez, *Caenorhabditis elegans* es un modelo ampliamente utilizado para el estudio de enfermedades neurodegenerativas y el descubrimiento y validación de fármacos, por lo que es ideal como modelo *in vivo* para el estudio de péptidos inhibidores de la agregación del péptido A β .

4. Hipótesis

Los péptidos mutantes A30W, K28A y M35C del péptido A β -42 ejercen un efecto inhibitorio sobre la agregación de A β , reflejándose en una alteración del fenotipo de parálisis y la memoria asociativa de un modelo in vivo de *C. elegans*.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la capacidad inhibitoria de la agregación de los péptidos mutantes A30W, K28A y M35C de A β -42 en un modelo *in vivo* de *C. elegans*.

5.2 Objetivos específicos

1. Estandarizar un método de transporte de péptidos en *C. elegans*.
2. Verificar la toxicidad de las mutantes A30W, K28A y M35C de A β -42 mediante ensayos de viabilidad en la cepa N2 de *C. elegans*.
3. Evaluar el efecto de las mutantes A30W, K28A y M35C de A β -42 en el fenotipo de parálisis en la cepa transgénica CL2006 de *C. elegans*.
4. Evaluar el efecto en la memoria asociativa de las mutantes A30W, K28A y M35C de A β -42 mediante ensayos de quimiotaxis en la cepa transgénica CL2355 de *C. elegans*.

6. Materiales y Equipos

6.1 Reactivos

6.1.1 Tratamiento con péptidos y microscopía de fluorescencia

- PBS 1X
- Etanol 100%
- DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol)
- BioPORTER QuikEase (Sigma Aldrich)
- Buffer HEPES (ácido 2-[4-(2-hidroxiethyl)piperacínil-1-yl]etanolsulfónico 1 M)
- Tioflavina S

6.1.2 Mantenimiento de nemátodos y ensayos de viabilidad y parálisis

- Medio de crecimiento para nemátodos (Nematode Growth Media NGM; NaCl 2 g/L, triptona 4 g/L, KH_2PO_4 3 g/L, K_2HPO_4 0.5 g/L, agar 20 g/L, colesterol 5.2 μM)
- Buffer M9 (Na_2HPO_4 17 mM, KH_2PO_4 23 mM, NaCl 86 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mM)
- Medio Luria-Bertani (LB; 1% triptona, 0.5% de extracto de levadura, 172 mM de cloruro de sodio, pH: 7)
- Estreptomicina
- Cloro comercial
- NaOH 5 N

6.1.3 Ensayos de quimiotaxis

- Benzaldehído 1%
- Buffer bajo en sal (KH_2PO_4 5 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mM, CaCl_2 1 mM)
- Medio para quimiotaxis (KH_2PO_4 5 mM, CaCl_2 1 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mM, agar 20 g/L)

- NaN_3 1 M

6.2 Materiales

6.2.1 Material de uso general

- Micropipetas automáticas (Bio Pet) de volumen variable: 0.5-10 μL , 20-200 μL , 100-1000 μL
- Puntillas para micropipetas
- Tubos Eppendorf de 2 mL

6.2.2 Tratamiento con péptidos y microscopía de fluorescencia

- Portaobjetos
- Cubreobjetos

6.2.3 Mantenimiento de nemátodos y ensayos

- Matraz 150 mL
- Placas Petri redondas de 30 mm, 60 mm y 100 mm
- Placas Petri cuadradas de 180 mm
- Asa microbiológica
- Pipetas estériles de 10 ml (Corning)
- Crioviales de 1.5 ml (Corning)

6.2.4 Material biológico

- Péptidos (GenScript)

- Cepas *Caenorhabditis elegans* (CGC)

6.3 Equipo

6.3.1 Equipo de uso general

- Vortex Genie (Scientific Industries)
- Microcentrifuga (Eppendorf)
- Minispin (Labnet)
- Campana de flujo laminar clase II tipo A2 (Nuair)

6.3.2 Microscopía de fluorescencia

- Microscopio Zeiss Imager.A2
- Cámara AxioCam MRc

6.3.3 Mantenimiento de nemátodos

- Incubadoras MyTemp Digital Mini (Benchmark Scientific)
- Estereoscopio (VELAB)

7. Metodología

7.1 Estrategia experimental

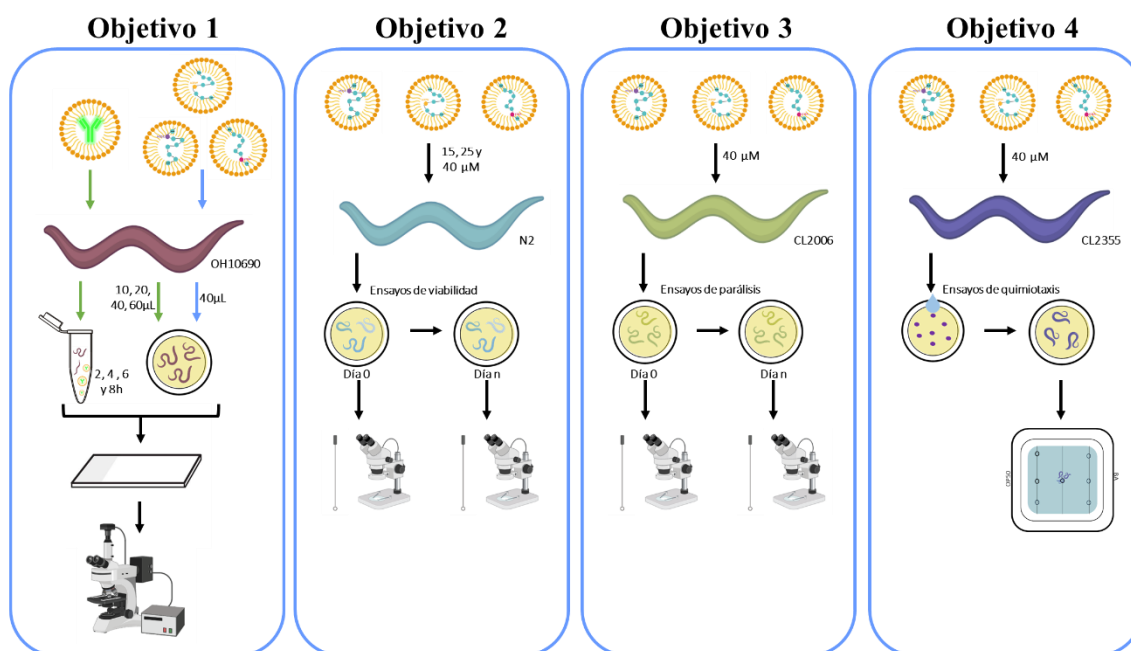


Figura 9. Estrategia experimental. Objetivo 1. Estandarizar un protocolo para la transducción de *C. elegans*, confirmando su transporte mediante microscopía de fluorescencia. Objetivo 2. Verificar la toxicidad de los péptidos mediante la evaluación diaria de la viabilidad de nemátodos N2 tratados. Objetivo 3. Evaluar el efecto de los péptidos en la parálisis mediante la observación diaria de este fenotipo en nemátodos CL2006 tratados. Objetivo 4. Analizar el efecto de los péptidos en la memoria asociativa mediante la evaluación de la quimiotaxis de nemátodos CL2355 tratados.

7.2 Péptidos y cepas de *C. elegans*

Los péptidos WT A β -42, 42-1 y las mutantes A30W, K28A y M35C (tabla 1) se mandaron sintetizar comercialmente a la empresa GenScript (Piscataway, NJ, EE. UU.). Para generar diluciones stock a 250 mM, se pesó 1 mg de cada péptido y se disolvió en 1 mL de PBS para almacenarse a -20°C. Las cepas de *C. elegans* se adquirieron del *Caenorhabditis Genetics Center* de la Universidad de Minnesota (Minneapolis, MN, EE. UU.) incluyendo la cepa N2 Bristol de fenotipo *wildtype* (WT), la cepa transgénica OH10690 que expresa RFP nuclear en neuronas, la cepa transgénica CL2006 que expresa el péptido A β -42

humano en tejido muscular junto con su cepa control CL802 de fenotipo WT, así como la cepa transgénica CL2355 que expresa A β -42 humano en neuronas y su cepa control CL2122 de fenotipo WT (tabla 2).

Tabla 1. Variantes del péptido A β .

| Péptido | Secuencia de aminoácidos |
|--------------------|---|
| A β -42 WT | DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA |
| A β -42-1 | AIVVGGVMLGHIAGKNSGVDEAFFVLKQHHVEYGSDFRFEAD |
| A β -42 A30W | DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGWIIIGLMVGGVVIA |
| A β -42 K28A | DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNAGAIIGLMVGGVVIA |
| A β -42 M35C | DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLCVGGVVIA |

Tabla 2. Cepas de *Caenorhabditis elegans*.

| Cepa | Genotipo | Descripción |
|---------|---|---|
| N2 | <i>wildtype</i> (WT) | Cepa silvestre de la variante Bristol |
| OH10690 | otIs356 [rab-3p(prom1)::2xNLS::TagRFP] V | Expresión neuronal de la proteína fluorescente roja RFP. |
| CL2006 | dvIs2 [pCL12(unc-54/human A-Beta(1-42) minigene) + rol-6(su1006)] | Expresión constitutiva del péptido A β -42 humano en células musculares. Desarrolla un fenotipo progresivo de parálisis. |
| CL802 | smg-1(cc546) I; rol-6(su1006) II | Control para las cepas CL2006 y CL4176. Presenta fenotipo silvestre. |
| CL2355 | smg-1(cc546) dvIs50 [pCL45 (snb-1::A β 1-42::3' UTR(long) + mtl-2::GFP] I | Expresión neuronal del péptido A β -42 humano inducida por aumento de temperatura de 15 a 20°C. Presenta déficits en quimiotaxis y aprendizaje asociativo. Expresión constitutiva intestinal de la proteína fluorescente verde GFP. |
| CL2122 | dvIs15 [(pPD30.38) unc-54(vector) + (pCL26) mtl-2::GFP] | Control para la cepa CL2355 y CL4176. Expresión constitutiva intestinal de la proteína fluorescente verde GFP. |

7.3 Cultivo y sincronización de nemátodos

Se utilizaron condiciones estándar para el manejo y mantenimiento de las cepas (Stiernagle, 1999). En un matraz con 50 mL de medio Luria-Bertani (LB; 1% triptona, 0.5% de extracto de levadura, 172 mM de cloruro de sodio, pH: 7) y 250 μ L de estreptomycin, se creció un inóculo de *Escherichia coli* OP50 a 37°C en agitación hasta por 16 horas aproximadamente hasta alcanzar una densidad óptica igual a uno. Con el cultivo obtenido se inocularon placas Petri preparadas con medio de crecimiento de

nemátodos (Nematode Growth Media NGM; NaCl 2 g/L, triptona 4 g/L, KH₂PO₄ 3 g/L, K₂HPO₄ 0.5 g/L, agar 20 g/L, colesterol 5.2 µM) y se dejaron secar por al menos dos horas. Los nemátodos se crecieron colocando las placas en incubadoras MyTemp Digital Mini (Benchmark Scientific, Sayreville, NJ, EE. UU.) a una temperatura de 15°C, en el caso de la cepa CL2355, y de 20°C para el resto de las cepas.

Las placas con una mayoría de nemátodos adultos se utilizaron para obtener organismos en la misma etapa de desarrollo mediante una metodología de sincronización ya establecida (Porta-de-la-Riva, Fontrodona, Villanueva, y Cerón, 2012). Se colectaron los nemátodos con 1 mL de buffer M9 (Na₂HPO₄ 17 mM, KH₂PO₄ 23 mM, NaCl 86 mM, MgSO₄·7H₂O 1 mM) pasándolos a un tubo estéril de 1.5 mL, y se trataron con 400 µL de hipoclorito de sodio comercial y 200 µL de NaOH 5 N mezclando mediante vórtex por cinco minutos. Posteriormente, se centrifugó por un minuto a 200 rpm y se removió el sobrenadante. Se añadió 1 mL de M9 y se volvió a centrifugar y decantar, repitiendo estos pasos de cinco a siete veces. En el último paso de centrifugación se decantó la mayoría del sobrenadante, resuspendiendo los huevos de los nemátodos en un volumen mínimo para colocarlos en una placa nueva.

7.4 Estandarización del método de entrega de péptidos a *C. elegans*

7.4.1 Protocolo de fijación de nemátodos

Las larvas y nemátodos adultos de *C. elegans* poseen una cutícula relativamente impermeable que los rodea, proporcionándoles protección y manteniendo su forma característica. Para asegurar la correcta tinción de los nemátodos, se probó una metodología de fijación en tubo que permite la permeabilización de las cutículas conservando la morfología de los gusanos (Duerr, 2006). Se recuperaron nemátodos adultos de la cepa OH10690 añadiendo 1 mL de buffer M9 en tres placas, resuspendiendo con pipeteo y pasando el buffer con los nemátodos a un tubo Eppendorf por cada placa. Los tubos se centrifugaron a 2000 rpm por 1.5 min y se eliminó el sobrenadante;

posteriormente, se añadió 1 mL de buffer M9 y se repitieron los pasos para eliminar el exceso de bacteria. Después de decantar, se añadió 1 mL de etanol 100% y se congelaron los tubos colocándolos a -80°C por 30 min. Después de la incubación, los tubos se descongelaron en un vaso con agua tibia, los nemátodos se lavaron en dos ocasiones con buffer M9 y se dejaron en un volumen mínimo. Se colocaron los nemátodos en gotas en un portaobjetos y se añadió una gota de medio de montaje con el marcador fluorescente DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol). Finalmente, se colocó un cubreobjetos y se observó utilizando el microscopio de fluorescencia Zeiss Imager.A2 acoplado con una cámara AxioCam MRc. Las imágenes fueron obtenidas mediante el programa Zenlite y se analizaron utilizando ImageJ.

7.4.2 Estandarización del tiempo de incubación

El kit comercial de transducción para cultivo celular BioPORTER QuikEase Protein Delivery Kit (Sigma Aldrich) fue adaptado para su uso en *C. elegans* con base en reportes anteriores (Perni et al., 2017; Shea et al., 2019) (figura 10). Para la estandarización del tiempo de incubación, se siguió el protocolo establecido por el proveedor para el tratamiento de cultivo celular en placas de 96 pozos. Se hidrató un tubo que contiene el reactivo BioPORTER con 40 µL de una dilución de anticuerpo marcado con fluoresceína (FITC-IgG) incluido como control positivo del kit, mezclando de 3 a 5 veces mediante pipeteo. Se incubó a temperatura ambiente por 3 a 5 minutos y se mezcló mediante vórtex a velocidad baja por 3 a 5 segundos y, posteriormente, la solución BioPORTER/FITC-IgG se aforó a 500 µL con buffer HEPES (ácido 2-[4-(2-hidroxietil)piperacínil-1-yl]etanolsulfónico 1M). Como control negativo, se hidrató un tubo con el reactivo BioPORTER con 500 µL de buffer HEPES. Para el tratamiento de *C. elegans*, se utilizaron 10 placas con nemátodos de la cepa OH10690 previamente sincronizados en el estadio larvario 4 (L4). Los nemátodos de cada placa se recuperaron con 1 mL de buffer M9 a un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se realizaron dos lavados. Una vez eliminado el sobrenadante, se añadieron 50 µL de BioPORTER/FITC-IgG a ocho tubos y 50 µL del control BioPORTER a los dos tubos restantes. Los tubos tratados con BioPORTER/FITC-IgG se incubaron a 20°C a los distintos tiempos de incubación de 2, 4, 6 y 8 horas por duplicado.

Los tubos tratados con el control BioPORTER se incubaron por dos horas. Después de la incubación, se realizaron dos lavados sucesivos con buffer M9 y se descartó el sobrenadante. Para la fijación de los nemátodos, se añadió 1 mL de etanol al 70%, se mezcló por inversión y se incubó a -80°C por 30 minutos y, posteriormente, se descongelaron los tubos en agua tibia. Nuevamente se realizaron dos lavados con buffer M9 y se descartó el sobrenadante. Los nemátodos se colocaron en gotas en un portaobjetos, se añadió medio de montaje con DAPI y se colocó un cubreobjetos. Las muestras se observaron mediante un microscopio de fluorescencia a 40x para analizar la distribución de la fluorescencia de FITC en el nemátodo.

7.4.3 Estandarización del volumen de tratamiento

Debido a que la mayoría de los análisis con *C. elegans* se realizan directamente en placas, se buscó la estandarización de un volumen que permita el tratamiento de la mayoría de los nemátodos en medio sólido. Para esto, se utilizaron 10 placas de 30 mm con nemátodos de la cepa OH10690 previamente sincronizados en el estadio L4. Ocho placas se trataron con la solución BioPORTER/FITC-IgG con los distintos volúmenes de 10 μL , 20 μL , 40 μL y 60 μL por duplicado, las dos placas restantes fueron tratadas con 60 μL del control BioPORTER. Las placas se incubaron durante 4 horas a 20°C . Posteriormente, los nemátodos de cada placa se recuperaron con 1 mL de buffer M9 para fijarse mediante la metodología ya descrita anteriormente y se montaron para observarse al microscopio de fluorescencia.

7.4.4 Transporte de los péptidos a C. elegans

Se tomaron 80 μL de un stock de 250 mM de cada péptido y se colocó en un tubo que contiene el reactivo BioPORTER, obteniendo en un volumen de tratamiento de 40 μM . Se utilizaron 21 placas con nemátodos de la cepa OH10690 previamente sincronizados en

el estadio L4. Doce placas fueron tratadas con 40 μL de la solución del péptido correspondiente por triplicado, y las cuatro placas restantes fueron tratadas con 40 μL del control BioPORTER. Las placas se incubaron durante 4 horas a 20°C, posteriormente, los nemátodos de cada placa se recuperaron con 1 mL de buffer M9 para fijarse mediante la metodología ya descrita. Para la visualización de los péptidos, los nemátodos se tiñeron añadiendo 200 μL de tioflavina S a 0.125% diluida en etanol al 50%, e incubando a 4° C en agitación durante 10min. Posteriormente, los nemátodos se lavaron con etanol al 50% para eliminar el exceso de tioflavina y se montaron para observarse al microscopio de fluorescencia.

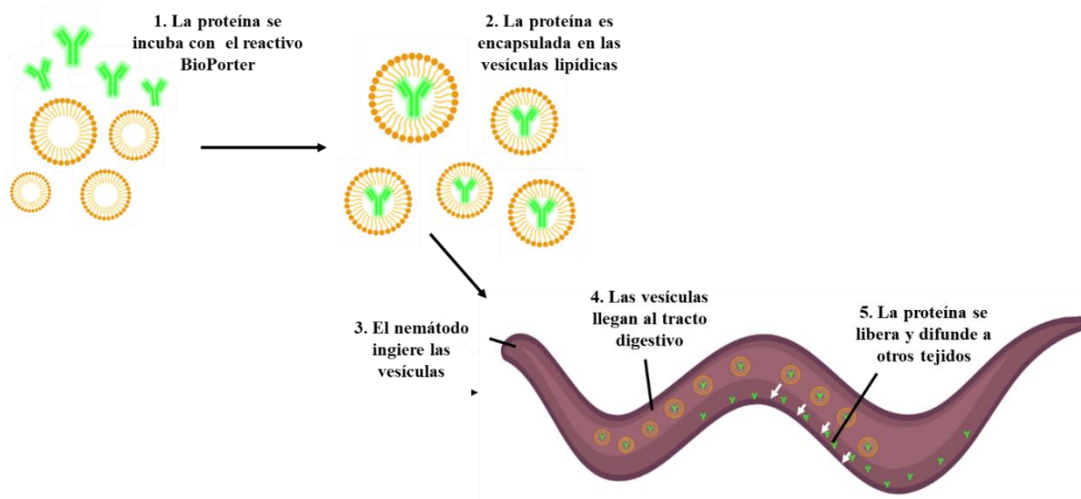



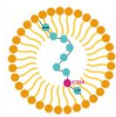
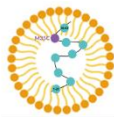













































Figura 10. Descripción esquemática del protocolo de transducción. El reactivo BioPORTER es una formulación lipídica que permite la encapsulación de proteínas. Al mezclarse, los nemátodos ingieren las vesículas y éstas llegan a su sistema digestivo donde se fusionan con membranas celulares permitiendo la liberación y difusión a otros tejidos.

7.5 Ensayos de viabilidad

Para evaluar los posibles efectos tóxicos de los péptidos en *C. elegans*, se realizaron ensayos de viabilidad a distintas concentraciones de acuerdo con la metodología ya establecida (Park, Jung, y Lee, 2017). A partir de las soluciones stock de 250 μM de los péptidos WT, A30W, K28A y M35C, se tomaron 80, 50 y 30 μL , y se mezclaron con el reactivo BioPORTER para obtener concentraciones de tratamiento de 40, 25 y 15 μM para cada péptido. Se prepararon 54 placas cada una con 30 nemátodos de la cepa N2

previamente sincronizados en el estadio larvario 3 (L3). Para cada concentración de cada péptido se trataron tres placas, y como control, tres placas se administraron únicamente con el reactivo BioPORTER y tres placas se mantuvieron sin ningún tratamiento (tabla 4). Los nemátodos se mantuvieron a 25°C y eran transferidos cada dos días a una placa nueva y tratados con el péptido correspondiente hasta que dejaron de tener descendencia. A su vez, diariamente, cada placa era examinada bajo estereoscopio para contabilizar el número de nemátodos vivos y muertos. Con los datos recolectados se generaron gráficos de viabilidad con el estimador Kaplan Meier y se realizaron análisis estadísticos mediante la prueba log-rank en el programa OASIS 2 (Han et al., 2016).

Tabla 3. Grupos experimentales de ensayos de viabilidad.


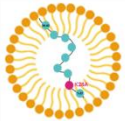
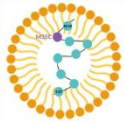
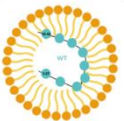
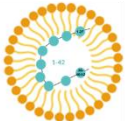

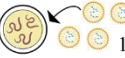
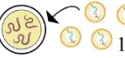

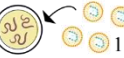
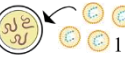


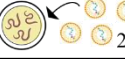

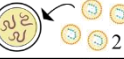
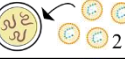

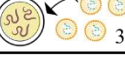









| | | A30W | | | K28A | | | M35C | | | WT | | | BioPORTER | Control |
|--|---|---|---|---|---|---|---|---|---|--|---|---|---|---|---|
| | |  | | |  | | |  | | |  | | |  | Sin tratamiento |
| | | 15µM | 25µM | 40µM | 15µM | 25µM | 40µM | 15µM | 25µM | 40µM | 15µM | 25µM | 40µM | - | - |
|  | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| | 3 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

7.6 Ensayos de parálisis

Para evaluar un posible efecto de la mutantes en el fenotipo de parálisis de la cepa CL2006, se realizaron ensayos de parálisis siguiendo la metodología reportada (J. Yang et al., 2017). Se utilizaron 18 placas con 30 nemátodos de la cepa CL2006 y 3 placas con 30 nemátodos de la cepa control CL802, todos previamente sincronizados en el estadio L3. A los nemátodos CL2006 se les trató con los péptidos A30W, K28A, M35C, WT y 42-1 de la forma ya descrita, contando con tres repeticiones por grupo experimental (tabla 4). Como control, se mantuvieron tres placas de la cepa CL2006 y las tres placas de la cepa CL802 sin ningún tratamiento. Todas las placas se incubaron a 25°C y cada dos días los nemátodos eran transferidos a una placa nueva y tratados con el péptido correspondiente. Diariamente, cada placa se examinó bajo estereoscopio para contabilizar el número de

nemátodos paralizados identificados como aquellos que presentaban un movimiento mínimo y no huían en respuesta al estímulo con un asa de platino. Con los datos recolectados se generaron gráficos con el estimador Kaplan Meier y se realizaron análisis estadísticos por la prueba de log-rank en el programa OASIS 2.

Tabla 4. Grupos experimentales de ensayos de parálisis.

| | A30W | K28A | M35C | WT | 42-1 | Control |
|---|---|---|---|--|---|---|
| |  |  |  |  |  | Sin tratamiento |
| Cepa CL2006 Aβ muscular  |  1 |  1 |  1 |  1 |  1 |  1 |
| |  2 |  2 |  2 |  2 |  2 |  2 |
| |  3 |  3 |  3 |  3 |  3 |  3 |
| Cepa CL802 Control  | - | - | - | - | - |  1 |
| | - | - | - | - | - |  2 |
| | - | - | - | - | - |  3 |

7.7 Ensayos de quimiotaxis

Para evaluar el efecto de los péptidos mutantes sobre la disminución del aprendizaje asociativo en la cepa CL2355, se realizaron ensayos de quimiotaxis siguiendo la metodología establecida (Wu et al., 2006). Se prepararon 36 placas, colocando en cada una aproximadamente 30 huevos de la cepa CL2355, y 6 placas, cada una con 30 huevos de la cepa control CL2122. A la mitad de las placas (18 de la cepa CL2355 y 3 de la cepa CL2122), se les añadió 1 µl de benzaldehído al 1% por dentro de la tapa para llevar a cabo el entrenamiento asociativo de los nemátodos; y se incubaron, junto con el resto de las placas sin estímulo, de forma invertida a 16°C por aproximadamente 24 horas, hasta que los nemátodos eclosionaron a la etapa larvaria 1 (L1). Posteriormente, la tapa de las placas fue sustituida para eliminar el estímulo, en el caso de los grupos expuestos al benzaldehído, y se realizó el tratamiento con los péptidos como se describió previamente.

Para cada péptido, se trataron por triplicado placas de nemátodos CL2355 entrenados y placas sin entrenamiento; como control se mantuvieron sin tratamiento placas entrenadas y no entrenadas de las cepas CL2355 y CL2122 (tabla 5). Todas las placas fueron incubados a 25°C hasta alcanzar la etapa adulta. Para realizar la prueba de quimiotaxis, se prepararon placas de ensayo cuadradas de 180 mm con medio para quimiotaxis (KH₂PO₄ 5 mM, CaCl₂ 1 mM, MgSO₄·7H₂O 1 mM, agar 20 g/L). En el exterior de las placas se marcaron líneas verticales para formar diez secciones (figura 11). Sobre la línea de un extremo se colocaron 3 gotas distribuidas de 1 µl de cultivo OP50 mezclado con NaN₃ 1 M, mientras que en el extremo opuesto se colocaron 3 gotas de 1 µl de benzaldehído 1% mezclado con NaN₃. Los nemátodos se recuperaron con buffer bajo en sal (KH₂PO₄ 5mM, MgSO₄·7H₂O 1 mM, CaCl₂ 1 mM), se colocaron en el centro de cada placa y se incubaron por una hora a 25°C para permitir su desplazamiento hacia alguno de los extremos. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las placas se almacenaron a 4°C hasta su análisis para detener el movimiento de los nemátodos. Se contabilizó el número de nemátodos en cada sección mediante su observación bajo estereoscopio, y se calculó el índice de quimiotaxis de acuerdo con la siguiente fórmula: (número de nemátodos en el área del benzaldehído – número de nemátodos en el área de OP50) / total de nemátodos. Con los datos obtenidos se generaron gráficos del índice de quimiotaxis para cada grupo y se realizaron análisis estadísticos mediante la prueba de U de Mann Whitney en el programa SPSS.

Tabla 5. Grupos experimentales de ensayos de quimiotaxis.

| | A30W | | K28A | | M35C | | WT | | 42-1 | | Control | |
|----------------------------|-----------|--------------|-----------|--------------|-----------|--------------|-----------|--------------|-----------|--------------|-----------|--------------|
| | Entrenado | No Entrenado | Entrenado | No Entrenado | Entrenado | No Entrenado | Entrenado | No Entrenado | Entrenado | No Entrenado | Entrenado | No Entrenado |
| Cepa CL2355 Aβ neuronal | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| Cepa CL2122 Control | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |

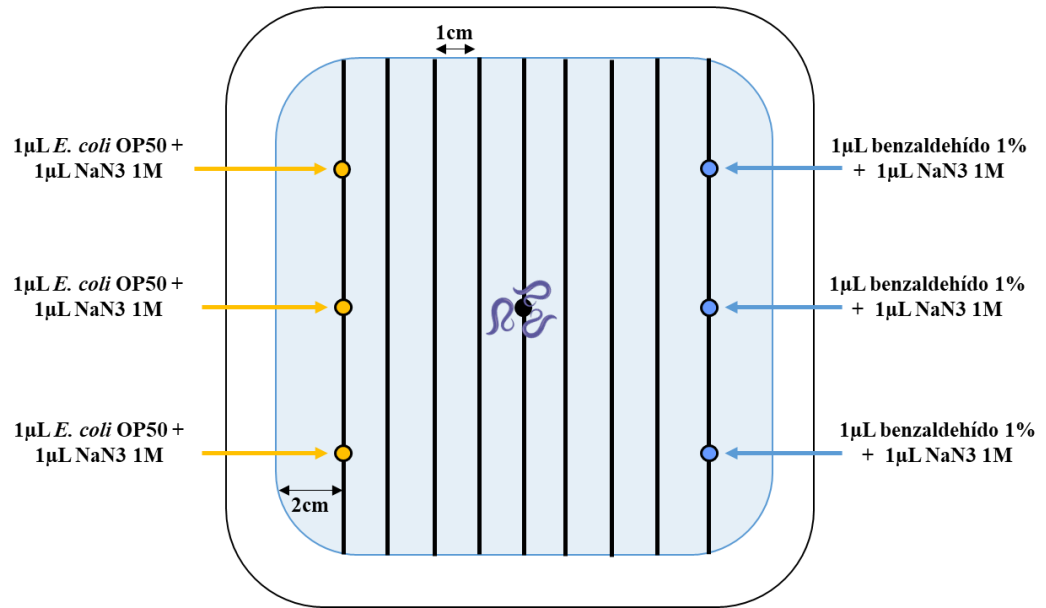


Figura 11. Esquema de placas para quimiotaxis. Las placas cuadradas fueron divididas en diez secciones., colocando en un extremo benzaldehído y cultivo de *E. coli* OP50 en el otro extremo.

8. Resultados

8.1 Transporte de péptidos a *C. elegans*

8.1.1 Estandarización del reactivo BioPORTER

El procesamiento de nemátodos OH10690 mediante la metodología de fijación en tubo permitió la visualización de la expresión neuronal de RFP y de la señal de DAPI en todo el cuerpo de los nemátodos (figura 12), confirmando la correcta permeabilización de las cutículas de los nemátodos.

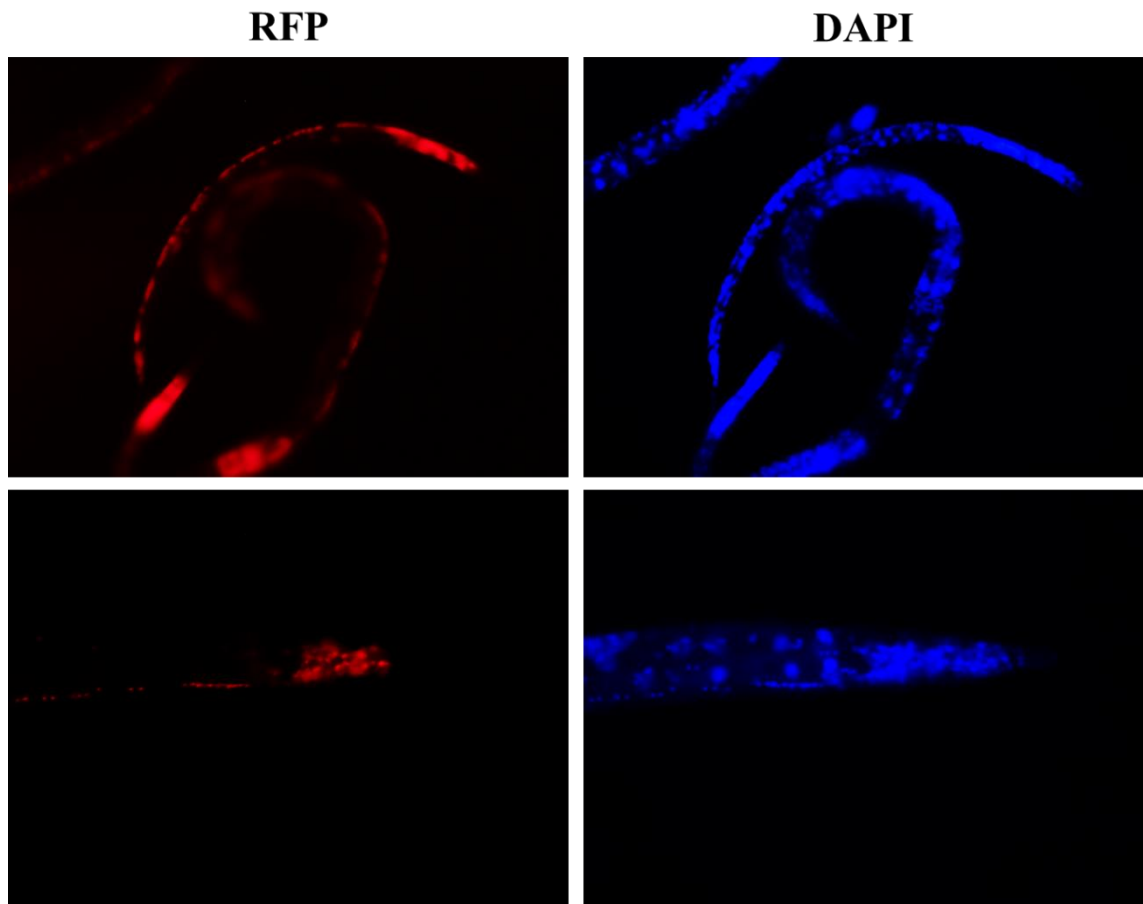


Figura 12. Visualización de nemátodos por microscopía de fluorescencia. Imágenes de microscopía de fluorescencia de nemátodos OH10690 fijados en tubo y teñidos con DAPI, en los canales de RFP (izquierda) y DAPI (derecha). Todas las imágenes se obtuvieron con un objetivo de 40X.

Para el establecimiento de las condiciones óptimas de transducción de *C. elegans* con el reactivo BioPORTER, se trataron nemátodos OH10690 con las vesículas cargadas con un anticuerpo marcado con fluoresceína (IgG-FITC). A las 2 horas de incubación de los nemátodos con la mezcla BioPORTER-IgG-FITC en solución, fue posible visualizar la señal de FITC alrededor del sistema digestivo de los nemátodos y difundiéndose a otros tejidos; mientras que, a las 4 horas, la señal fluorescente se detectó a lo largo de todo el cuerpo de los gusanos (figura 13A). En comparación, nemátodos del grupo control no mostraron ninguna señal fluorescente a las 4 horas de incubación con el vehículo. Para las 6 y 8 horas de incubación, la fluorescencia disminuyó notablemente, indicando, probablemente, la degradación de la proteína. La cuantificación de la señal demostró el aumento con significancia estadística, confirmando que la mayor intensidad de fluorescencia se obtiene a las 4 horas de incubación (figura 13B).

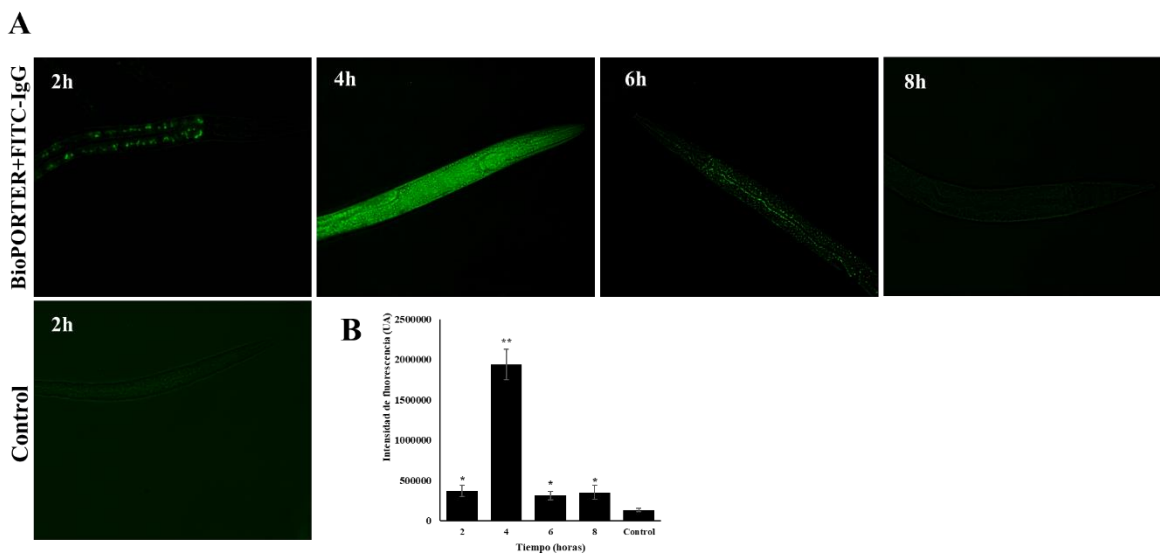


Figura 13. Evaluación del tiempo de incubación del kit de transducción BioPORTER con el marcador fluorescente FITC-IgG. (A) Imágenes de microscopía de fluorescencia de nemátodos representativos tratados con vesículas cargadas con el marcador fluorescente FITC-IgG a distintos tiempos de incubación, y nemátodos sin tratamiento a las 2 horas de incubación. Todas las imágenes se obtuvieron con un objetivo de 40X. (B) Gráfica de barras que muestra la intensidad de fluorescencia para los distintos tiempos de incubación y el control considerando aprox. 30 nemátodos. Las barras de error representan el error estándar de la media. Un asterisco (*) indica $p < 0.05$ con respecto al control, dos asteriscos (**) indican $p < 0.05$ con respecto a todos los grupos, calculado mediante la prueba t de Student.

Posteriormente, se utilizaron distintos volúmenes de la mezcla BioPORTER-IgG-FITC para el tratamiento de los nemátodos en medio sólido. Para todos los volúmenes de

tratamiento evaluados, se obtuvieron nemátodos con señal fluorescente indicando el correcto transporte del marcador (figura 14A), lo que se confirmó mediante la cuantificación de la señal obteniendo una intensidad de fluorescencia significativamente mayor a la del control sin tratamiento (figura 14B). De aproximadamente 100 nemátodos para cada grupo experimental, el 42.7% de los nemátodos tratados con 10 μ L mostraron señal de FITC, el 45.7% con 20 μ L, el 68.5% con 40 μ L, y el 66.7% con 60 μ L. Por lo tanto, se concluyó que un volumen de 40 μ L permite la obtención del mayor porcentaje de nemátodos positivos, facilitando la realización de los ensayos de fenotipo mediante el tratamiento de los gusanos directamente en medio sólido.

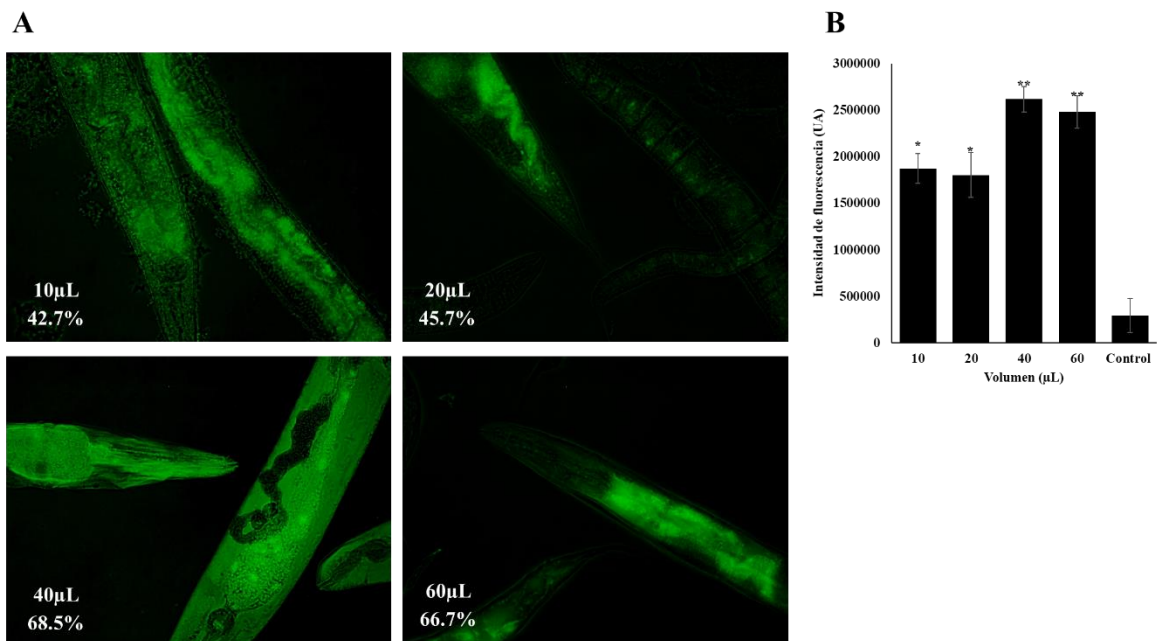


Figura 14. Evaluación del volumen del reactivo BioPORTER con el marcador fluorescente FITC-IgG. (A) Imágenes de microscopía de fluorescencia de nemátodos representativos tratados en medio sólido con distintos volúmenes de tratamiento vesículas cargadas con el marcador fluorescente FITC-IgG. Todas las imágenes se obtuvieron con un objetivo de 40X. (B) Gráfica de barras que muestra la intensidad de fluorescencia para los volúmenes y el control sin tratamiento considerando aprox. 100 nemátodos. Las barras de error representan el error estándar de la media. Un asterisco (*) indica $p < 0.05$ con respecto al control, dos asteriscos (**) indican $p < 0.05$ con respecto al resto de los grupos, calculado mediante la prueba t de Student.

8.1.2 Transporte y visualización de los péptidos

Se realizó la mezcla del péptido A β -42 WT y de los péptidos mutantes A30W, K28A y M35C con el reactivo BioPORTER para la transducción de los nemátodos. En todos los grupos se observó una señal intensa por todo el cuerpo de los gusanos que corresponde a la tinción con ThS utilizada para la visualización de los péptidos (figura 15A). En

comparación, el grupo teñido sin tratamiento mostró únicamente una ligera señal residual de ThS, mientras que, el grupo sin tratamiento ni tinción únicamente exhibió una señal correspondiente a la autofluorescencia de la faringe de los gusanos. La cuantificación de la intensidad de la fluorescencia demostró el aumento significativo de la señal de los grupos tratados en comparación con los grupos controles (figura 15B), confirmando el transporte exitoso de los péptidos a los nemátodos.

A

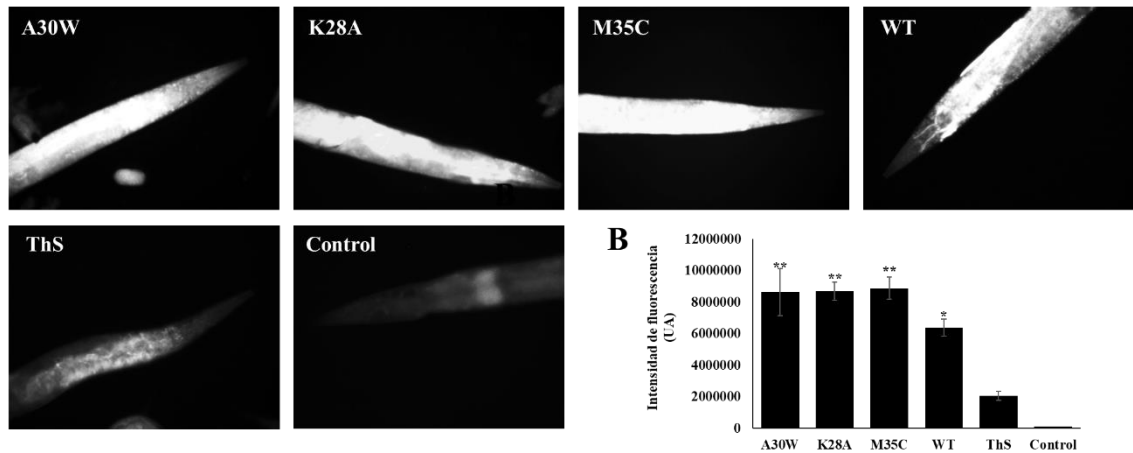


Figura 15. Transporte de los péptidos a *C. elegans* con el kit de transducción BioPORTER. (A) Imágenes de microscopía de fluorescencia de nemátodos representativos tratados con vesículas cargadas con cada uno de los péptidos y teñidos con tioflavina S, nemátodos sin tratamiento teñidos con tioflavina (ThS) y nemátodos sin tratamiento ni tinción (Control). Todas las imágenes se obtuvieron con un objetivo de 40X a las 4 horas de incubación. (B) Gráfica de barras que muestra la intensidad de fluorescencia para los distintos grupos y los controles considerando aprox. 30 nemátodos. Las barras de error representan el error estándar de la media. Un asterisco (*) indica $p < 0.05$ con respecto al control teñido y dos asteriscos (**) indican $p < 0.05$ con respecto al resto de los grupos, calculado mediante la prueba t de Student.

8.2 Efecto de las mutantes en la viabilidad

Se monitoreó el tiempo de vida de nemátodos de la cepa N2 (WT) tratados con distintas concentraciones del péptido A β -42 WT y las mutantes A30W, K28A y M35C, para evaluar la toxicidad *in vivo* de los péptidos. De acuerdo con las curvas de viabilidad obtenidas (figura 16, tabla 6), el tratamiento con el vehículo no mostró diferencia significativa en comparación con el grupo sin tratamiento, indicando que el reactivo BioPORTER por sí solo no induce ningún efecto en los nemátodos. Los grupos tratados

con el péptido A β -42 WT a las concentraciones de 25 y 40 μ M tuvieron una disminución estadísticamente significativa en la viabilidad con una reducción de hasta cuatro días en la vida media y de hasta ocho días en el tiempo de vida máximo, evidenciando la capacidad tóxica del péptido A β -42. En cambio, ni el tratamiento con el péptido A β -42 WT a 15 μ M, ni el tratamiento con las mutantes redujo la viabilidad de los gusanos en comparación con el grupo control. Por el contrario, A30W a las tres concentraciones, produjo un aumento estadísticamente significativo en la vida media de los nemátodos tratados al igual que M35C a 15 μ M, aunque se observó un aumento en la vida media a las tres concentraciones. Por lo tanto, los péptidos mutantes A30W, K28A y M35C no son tóxicos para *C. elegans* a las concentraciones de 15, 25 y 40 μ M, y específicamente, el péptido M35C a 15 μ M y el péptido A30W a las tres concentraciones, generan una extensión en la vida media de los nemátodos de hasta 3 días. Debido a que no se observó ningún efecto asociado a la concentración, se continuó utilizando 40 μ M para los siguientes ensayos.

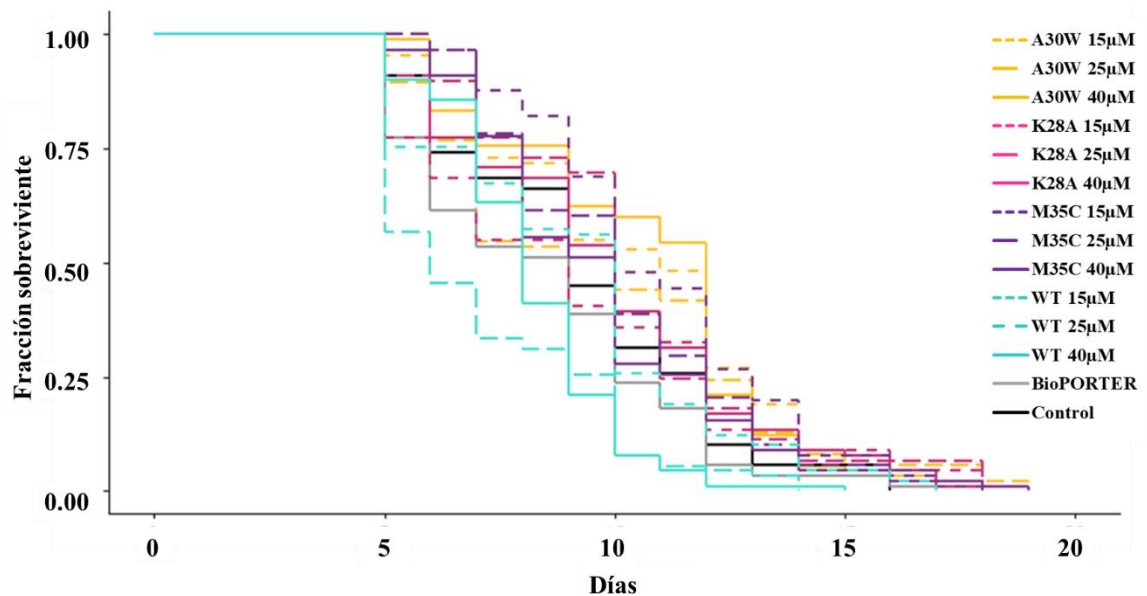


Figura 16. Efecto del tratamiento con los péptidos en la viabilidad de nemátodos N2. Curvas de supervivencia de nemátodos WT sin tratamiento, tratados con vehículo BioPORTER, y tratados con los distintos péptidos a concentraciones de 15, 25 y 40 μ M. Los datos corresponden al promedio de tres repeticiones para cada tratamiento de un ensayo con 30 nemátodos por repetición.

Tabla 6. Efecto del tratamiento con los péptidos en la viabilidad de nemátodos N2.

| Tratamiento | N* | Viabilidad en días | | Valor <i>P</i> vs control** |
|-------------|----|--------------------|--------|-----------------------------|
| | | Media | Máxima | |
| A30W 15μM | 90 | 11±0.38 | 22 | 0.021 |
| A30W 25μM | 90 | 10±0.45 | 22 | 0.047 |
| A30W 40μM | 90 | 12±0.32 | 18 | 0.010 |
| K28A 15μM | 90 | 9±0.41 | 22 | 0.802 |
| K28A 25μM | 90 | 10±0.36 | 22 | 0.066 |
| K28A 40μM | 90 | 10±0.36 | 22 | 0.200 |
| M35C 15μM | 90 | 10±0.30 | 18 | 0.004 |
| M35C 25μM | 90 | 10±0.35 | 22 | 0.065 |
| M35C 40μM | 90 | 10±0.30 | 19 | 0.820 |
| WT 15μM | 90 | 10±0.35 | 20 | 0.908 |
| WT 25μM | 90 | 6±0.27 | 14 | 0.0000017 |
| WT 40μM | 90 | 8±0.19 | 15 | 0.000041 |
| BioPorter | 90 | 9±0.37 | 22 | 0.193 |
| Control | 90 | 9±0.33 | 22 | - |

* Los datos corresponden al promedio de tres repeticiones con 30 nemátodos por repetición, dando un total de 90 nemátodos.

**Diferencias significativas determinadas mediante la prueba log-rank.

8.3 Efecto de las mutantes en el fenotipo de parálisis

La cepa CL2006 de *C. elegans* presenta una parálisis progresiva derivada de la expresión del péptido Aβ-42 en células musculares (Link, 1995). Para evaluar un posible efecto en este fenotipo, se monitoreó la progresión de la parálisis en nemátodos tratados con el péptido Aβ-42 WT, su inverso 42-1, y las mutantes A30W, K28A y M35C. Debido a que en los ensayos de viabilidad no se observó un efecto asociado a las distintas concentraciones de los péptidos, se continuó utilizando una concentración de 40 μM. Las tres mutantes A30W, K28A y M35C indujeron un retraso estadísticamente significativo en el desarrollo de parálisis, incrementando de 24 a 48 horas el tiempo en el que el 50% de la población se encontraba paralizada (figura 17, tabla 7). Por su parte, el tratamiento con el péptido Aβ-42 WT y el péptido inverso 42-1 no mostraron ninguna diferencia en la progresión de la parálisis en comparación con el control sin tratamiento, confirmando que el efecto de las mutantes se asocia a la secuencia aminoacídica específica. Estos resultados demuestran que el tratamiento de la cepa transgénica CL2006 con los péptidos mutantes A30W, K28A y M35C induce un retraso en el tiempo medio de desarrollo del fenotipo de parálisis.

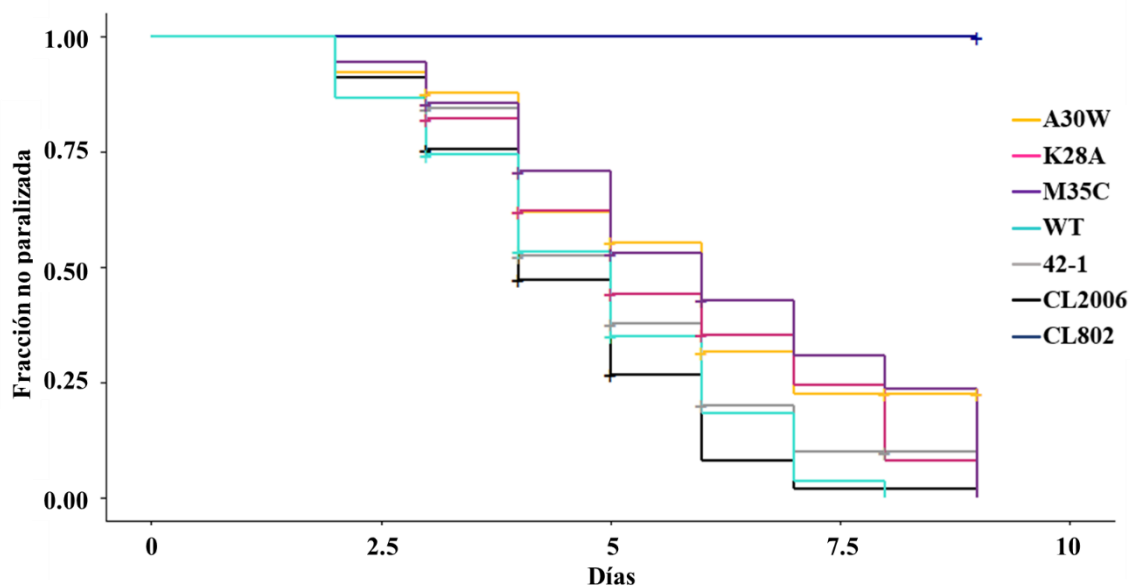


Figura 17. Efecto del tratamiento con los péptidos en el fenotipo de parálisis de la cepa CL2006. Gráfico que representa la progresión de la parálisis en la cepa CL2006 sin tratamiento, tratada con los distintos péptidos y la cepa CL802 sin tratamiento. Los datos corresponden al promedio de tres repeticiones para cada tratamiento de un ensayo con 30 nemátodos por repetición.

Tabla 7. Efecto del tratamiento con los péptidos en el fenotipo de parálisis de la cepa CL2006.

| Tratamiento | N* | Progresión de parálisis en días | | Valor <i>P</i> vs CL2006** |
|-------------|----|---------------------------------|--------|----------------------------|
| | | Media | Máxima | |
| A30W | 90 | 5±0.24 | 9 | 0.0002 |
| K28A | 90 | 5±0.24 | 9 | 0.0014 |
| M35C | 90 | 6±0.27 | 9 | 0.000013 |
| WT | 90 | 4±0.19 | 8 | 0.3512 |
| 42-1 | 90 | 4±0.21 | 9 | 0.0727 |
| CL2006 | 90 | 4±0.17 | 9 | - |

*Los datos corresponden al promedio de tres repeticiones con 30 nemátodos por repetición, dando un total de 90 nemátodos.

**Diferencias significativas determinadas mediante la prueba log-rank.

Adicionalmente, para verificar si existía una disminución en la agregación de A β -42, una muestra pequeña de nemátodos a los dos días de tratamiento fue teñida con tioflavina S y observada al microscopio de fluorescencia (figura 18). Se detectó la presencia de los depósitos en nemátodos CL2006 sin tratamiento, y una ausencia de éstos en nemátodos N2. En general, se observó un menor número de agregados principalmente con las mutantes K28A y M35C, y una reducción más notable en el caso de la mutante A30W en

comparación al control. Por el contrario, el tratamiento con el péptido WT mostró un aumento tanto en el número como en el tamaño de los depósitos amiloides.

A

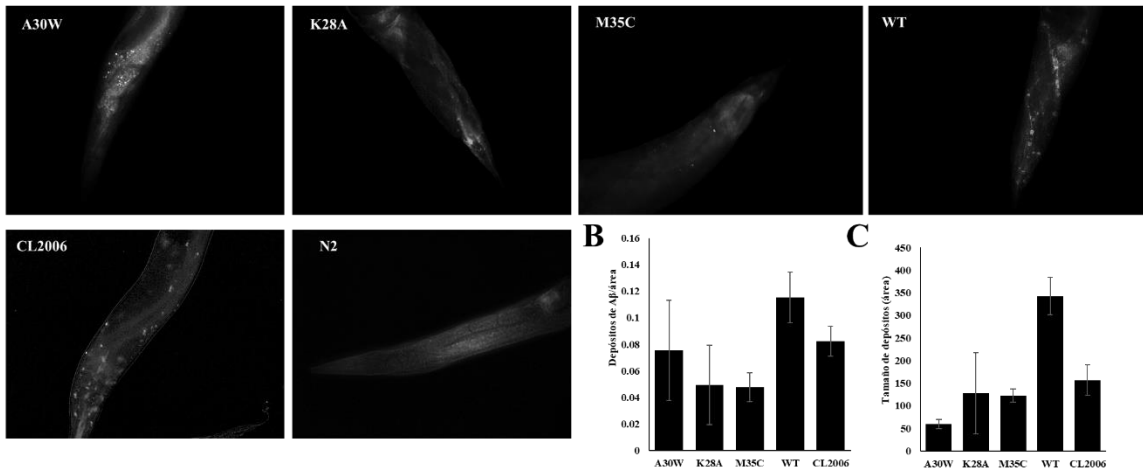


Figura 18. Efecto del tratamiento con los péptidos en la formación de depósitos amiloides de la cepa CL2006. (A) Imágenes de microscopía de fluorescencia de nemátodos representativos tratados con cada uno de los péptidos y teñidos con tioflavina S, nemátodos CL2006 sin tratamiento teñidos con tioflavina y nemátodos N2 sin tratamiento ni tinción. Todas las imágenes se obtuvieron con un objetivo de 40X a los 2 días de incubación. (B) Gráfica de barras que muestra el promedio del número de depósitos por unidad de área del nemátodo considerando aprox. 5 nemátodos. Las barras de error representan el error estándar de la media. (C) Gráfica de barras que muestra el promedio del área de los depósitos. Las barras de error representan el error estándar de la media.

8.4 Efecto de las mutantes en la memoria asociativa

La cepa CL2355 de *C. elegans*, que expresa el péptido A β -42 en células neuronales, presenta una disfunción en el aprendizaje asociativo que se refleja en una disminución en la quimiotaxis (Wu et al., 2006). Para evaluar un posible efecto en este fenotipo, se preexpuso a los nematodos a benzaldehído 1% en presencia de comida para que establecieran la relación entre ambas variables, y posteriormente se calculó el índice de quimiotaxis que representa la medida de los nemátodos atraídos hacia el compuesto. La cepa control CL2122, la cual no expresa el péptido A β , mostró un índice de quimiotaxis (IQ) de 0.357 tras entrenar a los nemátodos con una preexposición al benzaldehído, mientras que los nemátodos no entrenados mantuvieron un IQ bajo de -0.4, de acuerdo con lo esperado (figura 19, tabla 8). Por el contrario, los nemátodos CL2355 sin tratamiento mostraron un IQ reducido aún con el entrenamiento, reflejando la disfunción causada por la expresión de A β . Los grupos tratados con las tres mutantes A30W, K28A

y M35C demostraron una tendencia a la recuperación del IQ en los grupos entrenados obteniendo valores de 0.41, 0.45 y 0.26, respectivamente. Sin embargo, debido a una alta variabilidad, únicamente las mutantes K28A y M25C tuvieron cambios significativos en comparación al control. Por otro lado, el tratamiento con el A β -42 WT resultó en un comportamiento similar al control, mientras que el péptido 42-1 mostró un IQ ligeramente mayor de 0.08. De estos resultados se concluye que el tratamiento de la cepa transgénica CL2355 con los péptidos mutantes K28A y M35C logra una recuperación del índice de quimiotaxis, y en el caso del péptido A30W, una tendencia a la mejora del fenotipo. Lo anterior indica un restablecimiento de la formación de la memoria al ser capaces de recordar la asociación entre la comida y el benzaldehído, reflejándose en una preferencia por dirigirse hacia el atrayente.

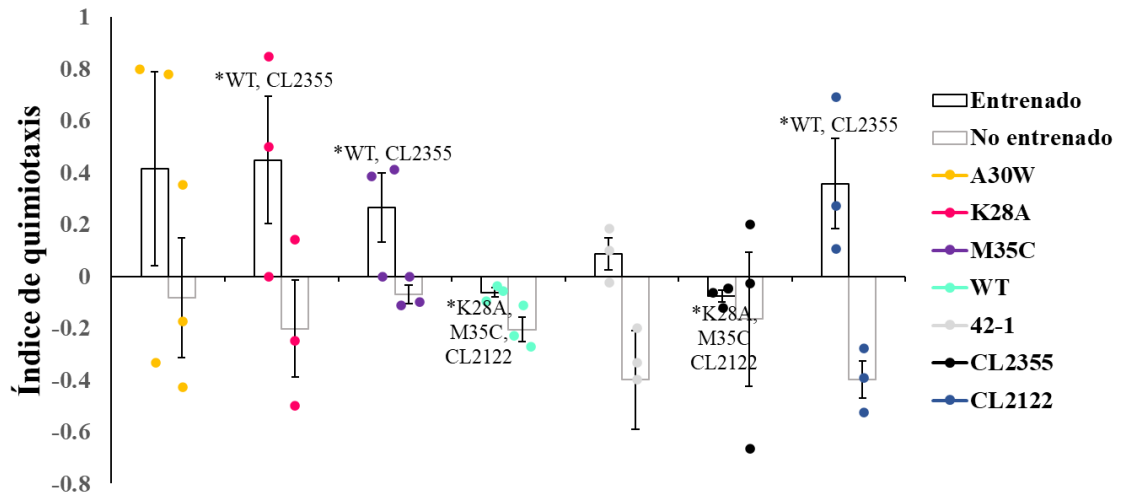


Figura 19. Efecto del tratamiento con los péptidos en la quimiotaxis de nemátodos CL2355. Gráfico de dispersión del índice de quimiotaxis de nemátodos CL2355 sin tratamiento, tratados con los distintos péptidos, y nemátodos de la cepa control CL2122 sin tratamiento. Para cada grupo, se evaluaron nemátodos entrenados con benzaldehído al 1% y nemátodos sin entrenamiento. Los datos corresponden a un ensayo con tres repeticiones para cada tratamiento. Las barras de error representan el error estándar de la media. Un asterisco (*) indica $p < 0.05$ respecto a los grupos señalados calculado mediante la prueba U de Mann Whitney.

Tabla 8. Efecto del tratamiento con los péptidos en índice de quimiotaxis de la cepa CL23355. Se resaltan los valores $P < 0.05$ correspondientes al tratamiento con K28A y M35C

| Tratamiento | | R | N | CI | Promedio de CI | Error estándar de la media | Valor P vs CL2355 |
|-------------|-----------|---|----|--------|----------------|----------------------------|-------------------|
| A30W | Entrenado | 1 | 42 | -0.333 | 0.415 | 0.648 | 0.513 |
| | | 2 | 20 | 0.800 | | | |

| | | | | | | | |
|---------------|---------------------|---|-----|--------|--------|-------|-------------|
| | | 3 | 27 | 0.778 | | | |
| | No entrenado | 1 | 29 | -0.172 | | | |
| | | 2 | 34 | 0.353 | -0.083 | 0.398 | - |
| | | 3 | 28 | -0.429 | | | |
| K28A | Entrenado | 1 | 26 | 0.846 | | | |
| | | 2 | 12 | 0.500 | 0.449 | 0.425 | 0.05 |
| | | 3 | 18 | 0.000 | | | |
| | No entrenado | 1 | 28 | 0.143 | | | |
| | | 2 | 32 | -0.250 | -0.202 | 0.324 | - |
| | | 3 | 16 | -0.500 | | | |
| M35C | Entrenado | 1 | 32 | 0.000 | | | |
| | | 2 | 26 | 0.385 | 0.265 | 0.230 | 0.05 |
| | | 3 | 17 | 0.412 | | | |
| | No entrenado | 1 | 20 | -0.100 | | | |
| | | 2 | 18 | -0.111 | -0.070 | 0.061 | - |
| | | 3 | 10 | 0.000 | | | |
| WT | Entrenado | 1 | 53 | -0.094 | | | |
| | | 2 | 36 | -0.056 | -0.062 | 0.029 | 0.513 |
| | | 3 | 54 | -0.037 | | | |
| | No entrenado | 1 | 18 | -0.111 | | | |
| | | 2 | 22 | -0.273 | -0.205 | 0.084 | - |
| | | 3 | 26 | -0.231 | | | |
| 42-1 | Entrenado | 1 | 20 | 0.100 | | | |
| | | 2 | 27 | 0.185 | 0.087 | 0.106 | 0.074 |
| | | 3 | 39 | -0.026 | | | |
| | No entrenado | 1 | 18 | -0.667 | | | |
| | | 2 | 20 | -0.200 | -0.400 | 0.330 | - |
| | | 3 | 21 | -0.333 | | | |
| CL2355 | Entrenado | 1 | 64 | -0.063 | | | |
| | | 2 | 42 | -0.048 | -0.077 | 0.039 | - |
| | | 3 | 91 | -0.121 | | | |
| | No entrenado | 1 | 18 | -0.667 | | | |
| | | 2 | 35 | -0.029 | -0.165 | 0.449 | - |
| | | 3 | 20 | 0.200 | | | |
| CL2122 | Entrenado | 1 | 26 | 0.692 | | | |
| | | 2 | 33 | 0.273 | 0.357 | 0.302 | 0.05 |
| | | 3 | 56 | 0.107 | | | |
| | No entrenado | 1 | 105 | -0.390 | | | |
| | | 2 | 93 | -0.527 | -0.398 | 0.125 | - |
| | | 3 | 83 | -0.277 | | | |

*Se realizaron tres repeticiones para cada tratamiento.

**Diferencias significativas determinadas mediante la prueba U de Mann Whitney.

9. Discusión

En la presente tesis se evaluaron los efectos de las mutantes de A β -42: A30W, K28A y M35C en *C. elegans* como modelo *in vivo* de la enfermedad de Alzheimer. Para esto, se utilizó el kit BioPorter para la aplicación de los péptidos, confirmando su transporte a los nemátodos mediante un aumento en la señal fluorescente después de su tinción con tioflavina S. Se realizaron ensayos de viabilidad en la cepa N2 para evaluar la toxicidad de los péptidos a distintas concentraciones; y posteriormente, se monitoreo la progresión de parálisis de la cepa CL2006 y se determinó el índice de quimiotaxis en la cepa CL2355 para analizar el efecto de las mutantes en fenotipos asociados a la expresión de A β -42. El tratamiento de nemátodos de la cepa N2 demostró que los péptidos mutantes no son tóxicos para *C. elegans* a las concentraciones de 15, 25 y 40 μ M, y específicamente, el péptido M35C a 15 μ M y el péptido A30W a las tres concentraciones generaron una extensión en la vida media. De igual forma, la administración de los tres péptidos mutantes a nemátodos de la cepa CL2006 retrasó el tiempo medio de desarrollo del fenotipo de parálisis asociado a la expresión de A β -42 muscular. Por su parte, las mutantes K28A y M35C lograron una recuperación del índice de quimiotaxis de la cepa CL2355, mientras que A30W mostró únicamente una tendencia a la mejora del fenotipo.

Actualmente, no existe ningún tratamiento efectivo para la enfermedad de Alzheimer y los fármacos probados hasta el momento, cuyo mecanismo es la disminución de la producción del péptido A β , han mostrado poca mejora cognitiva y una incapacidad para alterar la progresión de la enfermedad, además de estar asociados a la aparición de efectos secundarios severos (Liu, Xie, Meng, y Kang, 2019). Por lo anterior, el diseño de mutantes de A β para su uso como inhibidores de la agregación del péptido ha surgido como alternativa debido a que ofrece la posibilidad de una acción específica, con baja toxicidad y con efectos clínicos significativos (Estrada y Soto, 2006). En específico, las mutaciones A30W, K28A y M35C se localizan en posiciones clave para la agregación e inducción de citotoxicidad del péptido demostrando estas características *in vitro* (Dai et al., 2007; Estrada-Rodríguez et al., 2019; Yoshiike et al., 2007), por lo que surgió el interés de evaluar sus efectos *in vivo*.

Además del modelado de enfermedades como el Alzheimer, *Caenorhabditis elegans* permite la aplicación de moléculas exógenas para el estudio de sus posibles efectos terapéuticos (Kaletta y Hengartner, 2006). En este trabajo la estandarización del reactivo BioPORTER para su uso en *C. elegans* permitió el transporte del anticuerpo marcado IgG-FITC y de los péptidos de A β mediante su encapsulación en vesículas que eran ingeridas resultando en señal en todo el cuerpo de los nemátodos a las 4 horas de incubación. En otros estudios el tratamiento se ha realizado mediante la colocación directa de péptidos en solución en las placas de cultivo, de forma que son ingeridos sin ninguna protección (Monto et al., 2013; Xiao-gang Zhang et al., 2016). Esta estrategia expone a las moléculas al ambiente ligeramente ácido y a las proteasas presentes en tracto digestivo (McGhee, 2007), lo que podría limitar su biodisponibilidad en los tejidos de los nemátodos. La posibilidad de utilizar reactivos basados en formulaciones lipídicas para la transducción de *C. elegans* fue comprobada anteriormente por Perni y colaboradores; quienes utilizaron el reactivo PulsIn para la encapsulación en vesículas lipídicas de la proteína fluorescente mCherry y su transporte a todo el nemátodo, obteniendo una señal máxima a las 6 horas de incubación. Adicionalmente, utilizaron la cepa OW40 que expresa la proteína α -sinucleína en tejido muscular y le administraron un anticuerpo diseñado para inhibir su agregación utilizando su protocolo de transducción. Después del tratamiento encontraron una disminución significativa en el número de agregados de α -sinucleína, demostrando la aplicabilidad de los protocolos de transducción con vesículas lipídicas para el análisis de moléculas con posible acción terapéutica (Perni et al., 2017).

En los ensayos de viabilidad, el tratamiento con el péptido A β -42 WT a 25 y 40 μ M redujo la vida media y máxima de los nemátodos hasta 4 y 8 días, respectivamente. La toxicidad de A β -42 está ampliamente descrita en cultivo celular y modelos *in vivo* (Yankner y Lu, 2009), y en *C. elegans* se ha encontrado que la administración exógena del péptido resulta en la activación de la vía de reparación de membranas de forma similar a la exposición a bacterias patógenas (Julien et al., 2018). Por el contrario, ninguno de los péptidos mutantes mostró actividad tóxica en el nemátodo a las concentraciones probadas. Ya se ha demostrado que las mutaciones K28A y M35C disminuyen la actividad citotóxica del péptido *in vitro* (Dai et al., 2007; Yoshiike et al., 2007). A su vez, la cepa CL3115 de *C. elegans*, que expresa de forma constitutiva la mutante M35C en tejido muscular, no

presenta ningún efecto asociado a la toxicidad del péptido (Fay, Fluet, Johnson, y Link, 2002). De igual forma, en el grupo de trabajo se reportó la disminución de la citotoxicidad después del tratamiento de la línea celular C6 con los péptidos mutantes, a excepción del péptido A30W cuya toxicidad fue similar a la inducida por el péptido WT (Estrada-Rodríguez et al., 2019). En cambio, la administración con todos las mutantes mostró una extensión de la vida media de los nemátodos, con significancia estadística en el caso del péptido A30W a las tres concentraciones, y del péptido M35C a la concentración de 15µM. Existen reportes *in vitro* donde el tratamiento con bajas concentraciones del péptido Aβ-42 en su forma monomérica estimula la neurogénesis (López-Toledano y Shelanski, 2004), protege de la inducción de excitotoxicidad (Giuffrida et al., 2009; Niidome et al., 2009), e inhibe la apoptosis mediante una actividad antioxidante (Chinwern Chan et al., 1999). Es posible que las mutaciones evaluadas inhiban la actividad tóxica del péptido manteniendo sus actividades protectoras, incluso a concentraciones altas, ejerciendo un efecto positivo en el nemátodo.

El tratamiento con los péptidos mutantes de la cepa CL2006, la cual expresa Aβ-42 en tejido muscular, retrasó ligeramente el establecimiento de parálisis de forma estadísticamente significativa. Este fenotipo se ha asociado a la inducción de estrés oxidativo por Aβ-42, reflejado en un porcentaje alto de carbonilación de proteínas (Yatin, Varadarajan, Link, y Butterfield, 1999), y se ha demostrado que precede a la aparición de los depósitos amiloides en el tejido muscular del nemátodo (Drake, Link, y Butterfield, 2003). Lo anterior sugiere nuevamente que los péptidos mutantes son capaces de ejercer una actividad antioxidante. Específicamente, el péptido M35C no produce estrés oxidativo ni en cultivo celular ni en la cepa CL3115 (Dai et al., 2007; Estrada-Rodríguez et al., 2019; Fay et al., 2002), debido a que el residuo 35 se asocia a la capacidad de reducir metales a su forma altamente reactiva (Kontush et al., 2001). Para los péptidos A30W y K28A no se ha reportado una disminución en el estrés oxidativo y, por el contrario, en el grupo de trabajo se encontró que producen ROS a niveles similares que los del péptido WT (Estrada-Rodríguez et al., 2019). Por otro lado, la observación al microscopio de los nemátodos CL2006 tratados con los péptidos A30W, K28A y M35C mostró, en general, una disminución en el número y el tamaño de los depósitos amiloides. Esto concuerda con lo obtenido en los análisis *in vitro* donde las mutantes deshicieron agregados previamente

formados de A β -42 e inhibieron la formación *de novo* (Estrada-Rodríguez et al., 2019). De manera similar, se reportó que el tratamiento de los nemátodos con el péptido SVHRP, proveniente del veneno del escorpión *Buthus martensii*, redujo la formación de oligómeros y depósitos de A β -42 lo que, junto con una disminución en la producción de ROS, contribuyó al retraso en el fenotipo de parálisis. Tomando en cuenta lo anterior, es necesario realizar más análisis para determinar el mecanismo por la que las mutantes logran retrasar la parálisis en el nemátodo. Aun así, la ausencia de efecto en los grupos tratados con el péptido A β -42 y el inverso 42-1, el cuál es un control biológicamente inactivo (Vadukul, Gbajumo, Marshall, y Serpell, 2017), confirma que los efectos observados se asocian a las mutaciones en la secuencia de A β -42.

Algunos autores han señalado que sustancias identificadas por tener la capacidad de mejorar el fenotipo de parálisis asociado a la expresión de A β -42 muscular en *C. elegans*, también logran extender la viabilidad de nemátodos WT (Lublin y Link, 2013). Entre estos compuestos se encuentran la cafeína y la tioflavina T, cuyos efectos se han asociado en parte con el factor de transcripción SKN-1, el cual participa en procesos de respuesta a estrés oxidativo y a la acumulación de proteínas mal plegadas (Alavez, Vantipalli, Zucker, Klang, y Lithgow, 2011; Bridi et al., 2015; Dostal, Roberts, y Link, 2010); así como la dauricina, la cual generó una protección contra la apoptosis por daño oxidativo mediante una subexpresión de Bax/Bcl-2 (Wang et al., 2020). Los resultados obtenidos con los péptidos mutantes coinciden con lo anterior al ser capaces de retrasar el fenotipo de parálisis en la cepa CL2006, y de extender la viabilidad de los nemátodos de la cepa N2.

La cepa C12355, que expresa A β -42 en sistema nervioso, mostró una recuperación estadísticamente significativa en el índice de quimiotaxis hacia el benzaldehído después del tratamiento con los péptidos K28A y M35C, mientras que A30W generó una tendencia a la mejora del fenotipo. Los ensayos de quimiotaxis son altamente sensibles a un gran número de variables ambientales, lo que podría explicar la variabilidad observada en algunos grupos experimentales (Hart, 2006; Margie, Palmer, & Chin-Sang, 2013). La disfunción en el establecimiento de la memoria asociativa en esta cepa parece surgir de la interferencia de A β -42 en las vías serotoninérgicas (Dosanjh et al., 2010), lo que nuevamente sugiere que los péptidos mutantes tienen un efecto neuroprotector en el

nemátodo. Se ha reportado que la activación crónica del receptor de serotonina 5-HT₄ disminuye la concentración de A β en ratones (Tesseur et al., 2013), mientras que la inhibición del receptor 5-HT_{6R} mejora la función cognitiva de pacientes con Alzheimer (Wilkinson, Windfeld, y Colding-Jørgensen, 2014). Sin embargo, es necesario realizar más estudios para determinar los mecanismos de interacción de A β -42 y los péptidos mutantes con el sistema de serotonina.

En conclusión, los resultados obtenidos indican que los péptidos A30W, K28A y M35C mejoran algunos de los fenotipos relacionados a la expresión y agregación de A β en *C. elegans*, lo que sugiere que podrían ser utilizados en un futuro para el desarrollo de estrategias terapéuticas.

10. Conclusiones

Se logró estandarizar el kit BioPORTER para el transporte de proteínas a *C. elegans* mostrando una distribución por todos los tejidos a las 4 horas incubación. Haciendo uso de este protocolo se encontró que el tratamiento con los péptidos mutantes A30W, K28A y M35C no son tóxicos para *C. elegans* a las concentraciones de 15, 25 y 40 μM y, por el contrario, generan una extensión en la vida media de los nemátodos. A su vez, en la cepa CL2006 las tres mutantes generaron un retraso en el desarrollo del fenotipo de parálisis y una tendencia a la disminución del número y tamaño de los agregados amiloides en la cepa transgénica; mientras que en la cepa CL2355 los péptidos K28A y M35C lograron una recuperación del índice de quimiotaxis y el péptido A30W, una tendencia a la mejora del fenotipo. Este trabajo es el primero en evaluar mutantes de A β -42 en este modelo y los resultados obtenidos indican que estos péptidos logran la mejora de comportamientos de *C. elegans* asociados a la toxicidad amiloide en células musculares y neuronales, sugiriendo su uso potencial para el desarrollo de tratamientos contra la AD.

11.Referencias

- Ahmed, M., Davis, J., Aucoin, D., Sato, T., Ahuja, S., Aimoto, S., ... Smith, S. O. (2010). Structural conversion of neurotoxic amyloid-B 1-42 oligomers to fibrils. *Nature Structural and Molecular Biology*, *17*(5), 561–567.
<https://doi.org/10.1038/nsmb.1799>
- Alavez, S., Vantipalli, M. C., Zucker, D. J. S., Klang, I. M., & Lithgow, G. J. (2011). Amyloid-binding compounds maintain protein homeostasis during ageing and extend lifespan. *Nature*, *472*(7342), 226–229. <https://doi.org/10.1038/nature09873>
- Alexander, A. G., Marfil, V., & Li, C. (2014). Use of *C. elegans* as a model to study Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *Frontiers in Genetics*, *5*(JUL), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00279>
- Arriagada, P. V., Growdon, J. H., Hedley-Whyte, E. T., & Hyman, B. T. (1992). Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology*, *42*(3), 631–639.
<https://doi.org/10.1212/wnl.42.3.631>
- Association, Alzheimer. Thies, W. and Bleiler, L. (2013). Alzheimer ' s disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, *9*, 208–245.
- Atri, A. (2019). The Alzheimer's Disease Clinical Spectrum: Diagnosis and Management. *Medical Clinics of North America*, *103*(2), 263–293.
<https://doi.org/10.1016/j.mcna.2018.10.009>
- Barage, S. H., & Sonawane, K. D. (2015). Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides*, *52*, 1–18.
<https://doi.org/10.1016/j.npep.2015.06.008>
- Bates, K. A., Verdile, G., Li, Q. X., Ames, D., Hudson, P., Masters, C. L., & Martins, R. N. (2009). Clearance mechanisms of Alzheimer's amyloid-B peptide: Implications for therapeutic design and diagnostic tests. *Molecular Psychiatry*, *14*(5), 469–486.

<https://doi.org/10.1038/mp.2008.96>

- Bayer, T. A., Cappai, R., Masters, C. L., Beyreuther, K., & Multhaup, G. (1999). It all sticks together - The APP-related family of proteins and Alzheimer's disease. *Molecular Psychiatry*, 4(6), 524–528. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4000552>
- Belyaev, N. D., Kellett, K. A. B., Beckett, C., Makova, N. Z., Revett, T. J., Nalivaeva, N. N., ... Turner, A. J. (2010). The transcriptionally active amyloid precursor protein (APP) intracellular domain is preferentially produced from the 695 isoform of APP in a β -secretase-dependent pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 285(53), 41443–41454. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.141390>
- Bertram, L., Lill, C. M., & Tanzi, R. E. (2010). The genetics of alzheimer disease: Back to the future. *Neuron*, 68(2), 270–281. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.10.013>
- Bi, T. M., & Daggett, V. (2018). The role of α -sheet in amyloid oligomer aggregation and toxicity. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 91(3), 247–255.
- Bourgade, K., Garneau, H., Giroux, G., Le Page, A. Y., Bocti, C., Dupuis, G., ... Fülöp, T. (2015). β -Amyloid peptides display protective activity against the human Alzheimer's disease-associated herpes simplex virus-1. *Biogerontology*, 16(1), 85–98. <https://doi.org/10.1007/s10522-014-9538-8>
- Brenner, S. (1974). The Genetics of CAENORHABDITIS ELEGANS. *Genetics*, 77(1), 71–94. <https://doi.org/10.1002/cbic.200300625>
- Bridi, J. C., de Almeida Barros, A. G., Sampaio, L. R., Damásio Ferreira, J. C., Antunes Soares, F. A., & Romano-Silva, M. A. (2015). Lifespan extension induced by caffeine in caenorhabditis elegans is partially dependent on adenosine signaling. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 7(DEC), 1. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2015.00220>
- Brothers, H. M., Gosztyla, M. L., & Robinson, S. R. (2018). The physiological roles of amyloid- β peptide hint at new ways to treat Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging*

- Neuroscience*, 10(APR), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00118>
- Cai, H., Wang, Y., McCarthy, D., Wen, H., Borchelt, D. R., Price, D. L., & Wong, P. C. (2001). BACE1 is the major β -secretase for generation of A β peptides by neurons. *Nature Neuroscience*, 4(3), 233–234. <https://doi.org/10.1038/85064>
- Carrillo-Mora, P., Luna, R., & Colín-Barenque, L. (2014). Amyloid beta: Multiple mechanisms of toxicity and only some protective effects? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/795375>
- Chen, G. F., Xu, T. H., Yan, Y., Zhou, Y. R., Jiang, Y., Melcher, K., & Xu, H. E. (2017). Amyloid beta: Structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacologica Sinica*, 38(9), 1205–1235. <https://doi.org/10.1038/aps.2017.28>
- Chen, J., Wang, M., & Turko, I. V. (2013). Quantification of Amyloid Precursor Protein Isoforms Using Quantification Concatamer Internal Standard. *Analytical Chemistry*, 85(1), 303–307. <https://doi.org/10.1021/ac3033239>
- Chen, X., Barclay, J. W., Burgoyne, R. D., & Morgan, A. (2015). Using *C. elegans* to discover therapeutic compounds for ageing-associated neurodegenerative diseases. *Chemistry Central Journal*, 9(65), 1–20. <https://doi.org/10.1186/s13065-015-0143-y>
- Chinwern Chan, A. D., Dharmarajan, A. A., Atwood, C. S., Huang, X., Tanzi, R. E., Bush, A. I., & Martins, R. N. (1999). Anti-apoptotic action of Alzheimer A β . *Alzheimer's Reports*, 2(2), 113–119.
- Chow, V. W., Mattson, M. P., Wong, P. C., & Gleichmann, M. (2010). An Overview of APP Processing Enzymes and Products. *NeuroMolecular Medicine*, 12(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s12017-009-8104-z>
- Cole, S. L., & Vassar, R. (2007). The Alzheimer's disease β -secretase enzyme, BACE1. *Molecular Neurodegeneration*, 2(1), 1–25. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-2-22>

- Dai, X. L., Sun, Y. X., & Jiang, Z. F. (2007). Attenuated cytotoxicity but enhanced β fibril of a mutant amyloid β -peptide with a methionine to cysteine substitution. *FEBS Letters*, *581*(7), 1269–1274. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.02.038>
- DanQing, L., YuJie, G., ChengPeng, Z., HongZhi, D., Yi, H., BiSheng, H., & Yan, C. (2020). N-butanol extract of *Hedyotis diffusa* protects transgenic *Caenorhabditis elegans* from A β -induced toxicity. *Phytotherapy Research*, (July), 1–14. <https://doi.org/10.1002/ptr.6871>
- Das, U., Wang, L., Ganguly, A., Saikia, J. M., Wagner, S. L., Koo, E. H., & Roy, S. (2015). Visualizing APP and BACE-1 approximation in neurons yields insight into the amyloidogenic pathway. *Nature Neuroscience*, *19*(1), 55–64. <https://doi.org/10.1038/nn.4188>
- Deture, M. A., & Dickson, D. W. (2019). The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, *14*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s13024-019-0333-5>
- dos Santos Picanco, L. C., Ozela, P. F., de Fatima de Brito Brito, M., Pinheiro, A. A., Padilha, E. C., Braga, F. S., ... da Silva Hage-Melim, L. I. (2018). Alzheimer's Disease: A Review from the Pathophysiology to Diagnosis, New Perspectives for Pharmacological Treatment. *Current Medicinal Chemistry*, *25*(26), 3141–3159. <https://doi.org/10.2174/0929867323666161213101126>
- Dosanjh, L. E., Brown, M. K., Rao, G., Link, C. D., & Luo, Y. (2010). Behavioral phenotyping of a transgenic *caenorhabditis elegans* expressing neuronal amyloid- β . *Journal of Alzheimer's Disease*, *19*(2), 681–690. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-1267>
- Dostal, V., Roberts, C. M., & Link, C. D. (2010). Genetic mechanisms of coffee extract protection in a *Caenorhabditis elegans* model of β -amyloid peptide toxicity. *Genetics*, *186*(3), 857–866. <https://doi.org/10.1534/genetics.110.120436>
- Drake, J., Link, C. D., & Butterfield, D. A. (2003). Oxidative stress precedes fibrillar

deposition of Alzheimer's disease amyloid β -peptide (1-42) in a transgenic *Caenorhabditis elegans* model. *Neurobiology of Aging*, 24(3), 415–420.
[https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(02\)00225-7](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(02)00225-7)

Duerr, J. S. (2006). Immunohistochemistry. *WormBook : The Online Review of C. Elegans Biology*, 1–61. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.105.1>

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

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

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

Finder, V. H., & Glockshuber, R. (2007). Amyloid- β aggregation. *Neurodegenerative Diseases*, 4(1), 13–27. <https://doi.org/10.1159/000100355>

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

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

Giuffrida, M. L., Caraci, F., Pignataro, B., Cataldo, S., De Bona, P., Bruno, V., ...

- Copani, A. (2009). B-Amyloid Monomers Are Neuroprotective. *Journal of Neuroscience*, 29(34), 10582–10587. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1736-09.2009>
- Glabe, C. G. (2008). Structural classification of toxic amyloid oligomers. *Journal of Biological Chemistry*, 283(44), 29639–29643. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800016200>
- Glenner, G. G., & Wong, C. W. (1984). Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 120(3), 885–890. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(84\)80190-4](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(84)80190-4)
- Gong, Y., Chang, L., Viola, K. L., Lacor, P. N., Lambert, M. P., Finch, C. E., ... Klein, W. L. (2003). Alzheimer's disease-affected brain: Presence of oligomeric A β ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(18), 10417–10422. <https://doi.org/10.1073/pnas.1834302100>
- Greenfield, J. P., Tsai, J., Gouras, G. K., Hai, B., Thinakaran, G., Checler, F., ... Xu, H. (1999). Endoplasmic reticulum and trans-Golgi network generate distinct populations of Alzheimer β -amyloid peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(2), 742–747. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.2.742>
- Gutiérrez-Robledo, L. M., & Arrieta-Cruz, I. (2015). Dementia in Mexico: The need for a National Alzheimer's Plan. *Gaceta Medica de Mexico*, 151(5), 667–673. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26526483>
- Gutierrez-Zepeda, A., Santell, R., Wu, Z., Brown, M., Wu, Y. J., Khan, I., ... Luo, Y. (2005). Soy isoflavone glycitein protects against beta amyloid-induced toxicity and oxidative stress in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *BMC Neuroscience*, 6, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-6-54>

- Hardy, J. A., & Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's Disease: The Amyloid Alzheimer's disease. *Science*, *256*, 184–185.
- Hart, A. (2006). Behavior. *WormBook*, *31*(2), 221–226.
<https://doi.org/10.1895/wormbook.1.87.1>
- Ihl, R. (2012). Ginkgo biloba extract EGb 761®: Clinical data in dementia. *International Psychogeriatrics*, *24*(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1017/S1041610212000543>
- Janßen, I. M., Sturtz, S., Skipka, G., Zentner, A., Garrido, M. V., & Busse, R. (2010). Ginkgo biloba in Alzheimer's disease: A systematic review. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, *160*(21–22), 539–546. <https://doi.org/10.1007/s10354-010-0844-8>
- Jarrett, J. T., Berger, E. P., & Lansbury, P. T. (1993). The Carboxy Terminus of the β Amyloid Protein Is Critical for the Seeding of Amyloid Formation: Implications for the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Biochemistry*, *32*(18), 4693–4697.
<https://doi.org/10.1021/bi00069a001>
- Julien, C., Tomberlin, C., Roberts, C. M., Akram, A., Stein, G. H., Silverman, M. A., & Link, C. D. (2018). In vivo induction of membrane damage by β -amyloid peptide oligomers. *Acta Neuropathologica Communications*, *6*(1), 131.
<https://doi.org/10.1186/s40478-018-0634-x>
- Kaletta, T., & Hengartner, M. O. (2006). Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nature Reviews Drug Discovery*, *5*(5), 387–399.
<https://doi.org/10.1038/nrd2031>
- Kang, J., Lemaire, H.-G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K.-H., ... Müller-Hill, B. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*, *325*(6106), 733–736.
<https://doi.org/10.1038/325733a0>
- Keowkase, R., Aboukhatwa, M., & Luo, Y. (2010). Fluoxetine protects against amyloid-beta toxicity, in part via daf-16 mediated cell signaling pathway, in *Caenorhabditis*

C. elegans. *Neuropharmacology*, 59(4–5), 358–365.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.04.008>

Kojro, E., & Fahrenholz, F. (2005). The non-amyloidogenic pathway: structure and function of alpha-secretases. *Sub-Cellular Biochemistry*, 38, 105–127.
https://doi.org/10.1007/0-387-23226-5_5

Kontush, A. (2001). Amyloid- β : An antioxidant that becomes a pro-oxidant and critically contributes to Alzheimer's disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(9), 1120–1131. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00688-8](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00688-8)

Kontush, A., Berndt, C., Weber, W., Akopyan, V., Arlt, S., Schippling, S., & Beisiegel, U. (2001). Amyloid- β is an antioxidant for lipoproteins in cerebrospinal fluid and plasma. *Free Radical Biology and Medicine*, 30(1), 119–128.
[https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00458-5](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00458-5)

Lambert, M. P., Barlow, A. K., Chromy, B. A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., ... Klein, W. L. (1998). Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β 1–42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(11), 6448–6453. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.11.6448>

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

Link, C. D., Taft, A., Kapulkin, V., Duke, K., Kim, S., Fei, Q., ... Sahagan, B. G. (2003). Gene expression analysis in a transgenic *Caenorhabditis elegans* Alzheimer's disease model. *Neurobiology of Aging*, 24(3), 397–413.
[https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(02\)00224-5](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(02)00224-5)

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

- López-Toledano, M. A., & Shelanski, M. L. (2004). Neurogenic effect of β -amyloid peptide in the development of neural stem cells. *Journal of Neuroscience*, *24*(23), 5439–5444. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0974-04.2004>
- Lorenzo, A., & Yankner, B. A. (1994). Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *91*(25), 12243–12247. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.25.12243>
- Lublin, A. L., & Link, C. D. (2013). Alzheimer's disease drug discovery: In vivo screening using *Caenorhabditis elegans* as a model for β -amyloid peptide-induced toxicity. *Drug Discovery Today: Technologies*, *10*(1), e115–e119. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2012.02.002>
- Lue, L., Kuo, Y., Roher, A. E., Brachova, L., Shen, Y., Sue, L., ... Rogers, J. (1999). Soluble Amyloid β Peptide Concentration as a Predictor of Synaptic Change in Alzheimer's Disease. *The American Journal of Pathology*, *155*(3), 853–862. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65184-X](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65184-X)
- Margie, O., Palmer, C., & Chin-Sang, I. (2013). *C. elegans* chemotaxis assay. *Journal of Visualized Experiments*, (74), 1–6. <https://doi.org/10.3791/50069>
- Matharu, B., El-Agnaf, O., Razvi, A., & Austen, B. M. (2010). Development of retro-inverso peptides as anti-aggregation drugs for β -amyloid in Alzheimer's disease. *Peptides*, *31*(10), 1866–1872. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.06.033>
- McEwan, A. H., & Rankin, C. H. (2013). Mechanosensory Learning and Memory in *Caenorhabditis elegans*. *Handbook of Behavioral Neuroscience*, *22*(604), 91–111. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415823-8.00009-5>
- McGhee, J. D. (2007). The *C. elegans* intestine. *WormBook: The Online Review of C. Elegans Biology*, 1–36. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.133.1>
- Monto, F., Beatriz, A., Martorell, P., Bataller, E., Llopis, S., Ortiz, P., & Ramo, D. (2013). A Cocoa Peptide Protects *Caenorhabditis elegans* from Oxidative Stress

and b -Amyloid Peptide Toxicity. 8(5).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063283>

Mroczo, B., Groblewska, M., Litman-Zawadzka, A., Kornhuber, J., & Lewczuk, P. (2018). Amyloid β oligomers (A β O_s) in Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission*, 125(2), 177–191. <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1820-x>

Müller, U. C., Deller, T., & Korte, M. (2017). Not just amyloid: physiological functions of the amyloid precursor protein family. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(5), 281–298. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.29>

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

Niidome, T., Goto, Y., Kato, M., Wang, P. L., Goh, S., Tanaka, N., ... Sugimoto, H. (2009). Non-fibrillar amyloid- β peptide reduces NMDA-induced neurotoxicity, but not AMPA-induced neurotoxicity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 386(4), 734–738. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.06.130>

Nishijima, S., & Maruyama, I. N. (2017). Appetitive olfactory learning and long-term associative memory in *Caenorhabditis elegans*. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 11, 654–665. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2017.00080>

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

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

Park, H. E. H., Jung, Y., & Lee, S. J. V. (2017). Survival assays using *Caenorhabditis*

- elegans. *Molecules and Cells*, 40(2), 90–99.
<https://doi.org/10.14348/molcells.2017.0017>
- Perni, M., Aprile, F. A., Casford, S., Mannini, B., Sormanni, P., Dobson, C. M., & Vendruscolo, M. (2017). Delivery of Native Proteins into C. Elegans Using a Transduction Protocol Based on Lipid Vesicles. *Scientific Reports*, 7(1), 1–8.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-13755-9>
- Piaceri, I. (2013). Genetics of familial and sporadic Alzheimer s disease. *Frontiers in Bioscience*, E5(1), E605. <https://doi.org/10.2741/E605>
- Plant, L. D., Boyle, J. P., Smith, I. F., Peers, C., & Pearson, H. A. (2003). The production of amyloid β peptide is a critical requirement for the viability of central neurons. *Journal of Neuroscience*, 23(13), 5531–5535.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-13-05531.2003>
- Porat, Y., Abramowitz, A., & Gazit, E. (2006). Inhibition of amyloid fibril formation by polyphenols: Structural similarity and aromatic interactions as a common inhibition mechanism. *Chemical Biology and Drug Design*, 67(1), 27–37.
<https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2005.00318.x>
- Porta-de-la-Riva, M., Fontrodona, L., Villanueva, A., & Cerón, J. (2012). Basic Caenorhabditis elegans methods: Synchronization and observation. *Journal of Visualized Experiments*, (64), 1–9. <https://doi.org/10.3791/4019>
- Qiu, T., Liu, Q., Chen, Y. X., Zhao, Y. F., & Li, Y. M. (2015). A β 42 and A β 40: similarities and differences. *Journal of Peptide Science*, 21(7), 522–529.
<https://doi.org/10.1002/psc.2789>
- Quon, D., Wang, Y., Catalano, R., Scardina, J. M., Murakami, K., & Cordell, B. (1991). Formation of β -amyloid protein deposits in brains of transgenic mice. *Nature*, Vol. 352, pp. 239–241. <https://doi.org/10.1038/352239a0>
- Rak, M., Del Bigio, M. R., Mai, S., Westaway, D., & Gough, K. (2007). Dense-core and

diffuse A β plaques in TgCRND8 mice studied with synchrotron FTIR microspectroscopy. *Biopolymers*, 87(4), 207–217.
<https://doi.org/10.1002/bip.20820>

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

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

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

Shuaib, S., Saini, R. K., Goyal, D., & Goyal, B. (2020). Impact of K16A and K28A mutation on the structure and dynamics of amyloid- β 42 peptide in Alzheimer's disease: key insights from molecular dynamics simulations. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 38(3), 708–721.
<https://doi.org/10.1080/07391102.2019.1586587>

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

Soscia, S. J., Kirby, J. E., Washicosky, K. J., Tucker, S. M., Ingelsson, M., Hyman, B., ... Moir, R. D. (2010). The Alzheimer's disease-associated amyloid β -protein is an antimicrobial peptide. *PLoS ONE*, 5(3), 1–10.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009505>

- Stelzmann, R. A., Norman Schnitzlein, H., & Reed Murtagh, F. (1995). An english translation of alzheimer's 1907 paper, "über eine eigenartige erkankung der hirnrinde." *Clinical Anatomy*, 8(6), 429–431. <https://doi.org/10.1002/ca.980080612>
- Sunde, M., & Blake, C. C. F. (1998). From the globular to the fibrous state: Protein structure and structural conversion in amyloid formation. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 31(1), 1–39. <https://doi.org/10.1017/S0033583598003400>
- Tamaoka, A., Sawamura, N., Fukushima, T., Shoji, S., Matsubara, E., Shoji, M., ... Mori, H. (1997). Amyloid β protein 42(43) in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Journal of the Neurological Sciences*, 148(1), 41–45. [https://doi.org/10.1016/S0022-510X\(96\)00314-0](https://doi.org/10.1016/S0022-510X(96)00314-0)
- Tangrodchanapong, T., Sobhon, P., & Meemon, K. (2020). Fronodoside A Attenuates Amyloid- β Proteotoxicity in Transgenic *Caenorhabditis elegans* by Suppressing Its Formation. *Frontiers in Pharmacology*, 11(September), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.553579>
- Teo, E., Lim, S. Y. J., Fong, S., Larbi, A., Wright, G. D., Tolwinski, N., & Gruber, J. (2020). A high throughput drug screening paradigm using transgenic *Caenorhabditis elegans* model of Alzheimer's disease. *Translational Medicine of Aging*, 4, 11–21. <https://doi.org/10.1016/j.tma.2019.12.002>
- Tesseur, I., Pimenova, A. A., Lo, A. C., Ciesielska, M., Lichtenthaler, S. F., De Maeyer, J. H., ... De Strooper, B. (2013). Chronic 5-HT₄ receptor activation decreases A β production and deposition in hAPP/PS1 mice. *Neurobiology of Aging*, 34(7), 1779–1789. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.01.020>
- Vadukul, D. M., Gbajumo, O., Marshall, K. E., & Serpell, L. C. (2017). Amyloidogenicity and toxicity of the reverse and scrambled variants of amyloid- β 1-42. *FEBS Letters*, 591(5), 822–830. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12590>

- Vivekanandan, S., Brender, J. R., Lee, S. Y., & Ramamoorthy, A. (2011). A partially folded structure of amyloid-beta(1-40) in an aqueous environment. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *411*(2), 312–316.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.06.133>
- Wang, L., Pu, Z., Li, M., Wang, K., Deng, L., & Chen, W. (2020). Antioxidative and antiapoptosis: Neuroprotective effects of dauricine in Alzheimer's disease models. *Life Sciences*, *243*(December 2019), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.117237>
- Wilkinson, D., Windfeld, K., & Colding-Jørgensen, E. (2014). Safety and efficacy of idalopirdine, a 5-HT₆ receptor antagonist, in patients with moderate Alzheimer's disease (LADDER): A randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 trial. *The Lancet Neurology*, *13*(11), 1092–1099. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70198-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70198-X)
- Wu, Y., Wu, Z., Butko, P., Christen, Y., Lambert, M. P., Klein, W. L., ... Luo, Y. (2006). Amyloid- β -induced pathological behaviors are suppressed by Ginkgo biloba extract EGB 761 and ginkgolides in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Neuroscience*, *26*(50), 13102–13113.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3448-06.2006>
- Yang, J., Huang, X. B., Wan, Q. L., Ding, A. J., Yang, Z. L., Qiu, M. H., ... Luo, H. R. (2017). Otophyllaside B Protects Against A β Toxicity in *Caenorhabditis elegans* Models of Alzheimer's Disease. *Natural Products and Bioprospecting*, *7*(2), 207–214. <https://doi.org/10.1007/s13659-017-0122-1>
- Yang, M., & Teplow, D. B. (2008). Amyloid β -Protein Monomer Folding: Free-Energy Surfaces Reveal Alloform-Specific Differences. *Journal of Molecular Biology*, *384*(2), 450–464. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.09.039>
- Yankner, B. A., & Lu, T. (2009). Amyloid β -protein toxicity and the pathogenesis of Alzheimer disease. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(8), 4755–4759.
<https://doi.org/10.1074/jbc.R800018200>

- Yankner, B., Duffy, L., & Kirschner, D. (1990). Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science*, *250*(4978), 279–282. <https://doi.org/10.1126/science.2218531>
- Yankner BA, Dawes LR, Fischer S, Villa-Komaroff L, Oster-Grant ML, & Neve RL. (1989). Neurotoxicity of a fragment of APP associated with AD. *Science*, *245*(July), 417–420.
- Yatin, S. M., Varadarajan, S., Link, C. D., & Butterfield, D. A. (1999). In vitro and in vivo oxidative stress associated with Alzheimer's amyloid β -peptide (1-42). *Neurobiology of Aging*, *20*(3), 325–330. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(99\)00056-1](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(99)00056-1)
- Yoon, S. S., & Jo, S. A. (2012). Mechanisms of amyloid- β peptide clearance: Potential therapeutic targets for Alzheimer's disease. *Biomolecules and Therapeutics*, *20*(3), 245–255. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2012.20.3.245>
- Yoshiike, Y., Akagi, T., & Takashima, A. (2007). Surface structure of amyloid- β fibrils contributes to cytotoxicity. *Biochemistry*, *46*(34), 9805–9812. <https://doi.org/10.1021/bi700455c>
- Zhang, Xiao-gang, Wang, X., Zhou, T., Wu, X., Peng, Y., & Pittaluga, A. M. (2016). *Scorpion Venom Heat-Resistant Peptide Protects Transgenic Caenorhabditis elegans from β -Amyloid Toxicity Isolation of Scorpion Venom*. *7*(July), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00227>
- Zhang, Xingyu, Fu, Z., Meng, L., He, M., & Zhang, Z. (2018). The Early Events That Initiate β -Amyloid Aggregation in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *10*(November), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00359>
- Zou, K., Gong, J. S., Yanagisawa, K., & Michikawa, M. (2002). A Novel Function of Monomeric Amyloid β -Protein Serving as an Antioxidant Molecule against Metal-Induced Oxidative Damage. *Journal of Neuroscience*, *22*(12), 4833–4841. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-12-04833.2002>

