



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR**

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS OLIGÓMEROS A β EN CÉLULAS
PRECURSORAS NEURONALES DERIVADAS DEL HIPOCAMPO DE ROEDORES
ADULTOS”**

TESIS QUE PRESENTA

M. EN C. MARIA DEL CARMEN SILVA LUCERO

PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE

BIOMEDICINA MOLECULAR

DIRECTORES DE TESIS

DR. MARCO ANTONIO MERAZ RÍOS

DR. GERARDO BERNABÉ RAMÍREZ RODRÍGUEZ

MÉXICO, DF.

AGOSTO DE 2015

COMITÉ TUTORAL

DIRECTORES

Dr. Marco Antonio Meraz Ríos

Profesor titular del departamento de Biomedicina Molecular
Cinvestav-IPN

Dr. Gerardo Bernabé Ramírez Rodríguez

Investigador en Ciencias Médicas “D”
Jefe del laboratorio de Neurogénesis
Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz

ASESORES

Dra. Rosaura Hernández Rivas

Profesor titular del departamento de Biomedicina Molecular
Cinvestav-IPN

Dra. Leticia Cedillo Barrón

Profesor titular del departamento de Biomedicina Molecular
Cinvestav-IPN

Dra. María del Carmen Vivar Estudillo

Profesor titular del departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias
Cinvestav-IPN

Dr. José Manuel Hernández Hernández

Profesor titular del departamento de Biología Celular
Cinvestav-IPN

DURANTE LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO SE CONTO CON EL
APOYO DE UNA BECA DE DOCTORADO OTORGADA POR EL
CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT),
PERÍODO 2011-2015



AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer sinceramente en primer lugar a mis tutores de tesis, el **Dr. Marco Antonio Meraz Ríos** y el **Dr. Gerardo B. Ramírez Rodríguez**, por su esfuerzo y dedicación. Sus conocimientos, orientación, su paciencia y motivación han sido fundamentales para mi formación. A su manera, han sido capaces de ganarse mi lealtad y admiración, así como sentirme en deuda con ellos por todo el apoyo recibido durante el tiempo que ha durado este trabajo.

A mis asesores de tesis, **Dra. Rosaura Hernández**, **Dra. Leticia Cedillo**, **Dra. Carmen Vivar** y **Dr. José Manuel Hernández** por su valioso apoyo en la realización del proyecto, compartiendo sus conocimientos y experiencia; así como por sus atinadas correcciones y comentarios.

A la **Dra. María del Carmen Cárdenas Aguayo** por compartir sus conocimientos, por su valioso apoyo y su constante motivación para seguir adelante en este camino y llegar a la conclusión del mismo.

A la **M. en C. Pilar Figueroa Corona** y **C. Julio Cesar Ramírez Gómez** por su apoyo en el trabajo de laboratorio, así como al **QFB. Leonardo Ortíz López** y **Ariadna Gómez Sánchez**, quienes en todo momento tuvieron la mejor disposición de apoyar técnicamente para la realización de este trabajo.

Gracias también a mis compañeros del laboratorio, **Laura**, **Moni**, **Berenice**, **Kori**, **Rosalía**, **Perla** y **Gustavo** del Cinvestav y a mis compañeros del Instituto Nacional de Psiquiatría, **Betty**, **Gerardo** y **Fernando**, a todos ellos por brindarme su calidez y compañerismo.

DEDICATORIAS

A **Dios**, por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A la bendición más grande que Dios me ha dado, a mi hijo **Mateo**, quien es la alegría de mi vida, lo que más quiero en este mundo y quien con su luz ha iluminado mi vida.

A **Manuel A. Martínez Aparicio**, mi esposo y compañero de vida, quien en todo momento me apoyo y alentó a seguir adelante, cuando parecía que me iba a rendir. Solo quiero darte las gracias, recordarte que eres muy importante para mí y que te amo.

A **mis padres** por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo.

A **mis hermanos** por los ejemplos de perseverancia y constancia que los caracterizan y que me ha infundado siempre, por el valor mostrado para salir adelante y por su amor.

A **mis sobrinos** por que llenan de alegría cada día de mi vida, por estar conmigo, los quiero mucho.

ÍNDICE GENERAL

	PÁGINA
ÍNDICE DE FIGURAS	I
ABREVIATURAS	II
RESUMEN	IV
ABSTRACT	V
I. INTRODUCCIÓN	
1.1. Neurogénesis en el cerebro adulto.....	1
1.2. Regiones neurogénicas.....	1
1.2.1. Zona subventricular.....	3
1.2.2. Zona subgranular.....	3
1.3. Etapas de la neurogénesis.....	5
1.4. Papel funcional de la neurogénesis adulta.....	7
1.5. Factores que modulan la neurogénesis.....	7
1.5.1. Factores internos.....	8
1.5.2. Factores externos.....	10
1.6. Células precursoras neuronales (NPCs).....	10
1.7. Neurogénesis en la Enfermedad de Alzheimer.....	11
1.7.1. Enfermedad de Alzheimer.....	12
1.8. Amiloide beta.....	13
1.8.1. Proteína precursora del amiloide y producción de A β	13
1.8.2. Estructura de los péptidos de A β	15
1.8.3. Función de los péptidos de A β	19
1.8.3.1. Papel positivo de A β	19
1.8.3.2. Papel negativo de A β	20
1.9. A β y su relación con neurogénesis y la Enfermedad de Alzheimer.....	22
1.10. Vía de la PI3-K.....	24
II. ANTECEDENTES	27
III. JUSTIFICACIÓN	28
IV. HIPÓTESIS	28

V. OBJETIVOS	29
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	
VI. 1. Aislamiento de NPCs de hipocampo de ratón adulto.....	30
VI. 2. Cultivo de NPCs.....	30
VI. 3. Pase del cultivo de NPCs.....	30
VI. 4. Diferenciación celular.....	31
VI. 5. Tratamiento celular.....	31
VI.6. Preparación de oligómeros de A β	31
VI. 7. Microscopía de fuerza atómica para el análisis oligómeros de A β	32
VI. 8. Western Blot y Cinética de oligomerización.....	32
VI. 9. Ensayo de viabilidad celular (Liberación de Lactato Deshidrogenasa, LDH Assay).....	32
VI. 10. Ensayo de BrdU por inmunofluorescencia (Kit BrdU Roche).....	33
VI. 11. Obtención y preparación de las muestras de proteína.....	34
VI. 12. Electroforesis, transferencia e inmunodetección (Western Blot).....	34
VI. 13. Inmunofluorescencia.....	35
VI. 14. Análisis de la participación de la vía de señalización Akt (PathScan Akt Signaling Antibody Array Kit).....	35
VI. 15. Análisis de los factores solubles contenidos en el medio condicionado (Mouse Antibody Array-L308 Membrane Kit).....	36
VI. 16. Análisis estadístico.....	37
VI. 17. Diagrama de flujo.....	38
VII. RESULTADOS	
VII. 1. Caracterización de NPCs en condiciones de proliferación.....	38
VII. 2. Caracterización de NPCs en condiciones de diferenciación.....	39
VII. 3. Obtención y caracterización de los oligómeros de A β	41
VII. 4. Cinética de oligomerización.....	43
VII. 5. Efecto de los oligómeros de A β sobre viabilidad celular.....	44
VII. 6. Efecto de los oligómeros de A β sobre proliferación celular.....	45
VII. 7. Efecto de los oligómeros de A β sobre diferenciación celular.....	47
VII. 8. La vía de señalización de PI3-K y su participación en el efecto de	

oligómeros de A β 40 sobre el proceso de supervivencia.....	48
VII. 9. Determinación de los factores solubles secretados por las NPCs estimuladas con oligómeros de A β 40.....	51
VIII. DISCUSIÓN	53
IX. CONCLUSIÓN	57
X. PERSPECTIVAS	57
XI. REFERENCIAS	58
XII. ANEXOS	

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Formas de neurogénesis adulta	2
2	Neurogénesis en el cerebro adulto	4
3	Neurogénesis en el giro dentado del hipocampo	6
4	Procesamiento de la proteína precursora del amiloide	14
5	Secuencia y agregación de los péptidos A β	16
6	Caracterización de NPCs en condiciones de proliferación	40
7	Caracterización de NPCs en condiciones de diferenciación	41
8	Caracterización de oligómeros de A β	42
9	Caracterización de oligomerización de A β	44
10	Efecto de oligómeros de A β sobre viabilidad celular	46
11	Efecto de oligómeros de A β sobre proliferación celular	47
12	Efecto de oligómeros de A β sobre diferenciación celular	48
13	Análisis de la vía de señalización PI3-K, después del tratamiento con oligómeros A β 40	49
14	Activación de la proteína Akt por oligómeros de A β 40	50
15	Inhibición de la vía la activación de Akt, dado por la inhibición de la actividad de cina de PI3-K.	50
16	Identificación de los factores solubles liberados por NPCs mediante un arreglo de anticuerpos	52

ABREVIATURAS

A β	Amiloide beta
ADAM	Desintegrina- metaloproteinasa
Akt	Proteína cinasa B
AMPA	Receptor del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
APH-1	Anterior pharynx-defective 1
APOE	Apolipoproteína E
APP	Proteína precursora del amiloide
BACE	Enzima de corte del sitio beta de PPA
BDNF	Factor neurotrófico derivado de cerebro
BLBP	Proteína de unión a lípidos del cerebro
BrdU	5-bromo-2'-deoxiuridina
CA (1,2,3)	Cuerno de Ammon
CREB	Elementos de respuesta a AMPc
NPCs	Células precursoras neuronales
DCX	Doblecortina
DMSO	Dimetil sulfóxido
EA	Enfermedad de Alzheimer
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
FGF-2	Factor de crecimiento de fibroblastos
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GD	Giro dentado
GFAP	Proteína acídica fibrilar glial
GSK-3 β	Glycogen synthase kinase 3
IGF	Factor de crecimiento tipo insulina
LTP	Potenciación a largo plazo
MAP2	Proteína asociada a microtúbulos 2
NCAM	Molécula de adhesión neuronal
NMDA	N-metil-D-aspartato
NeuN	Nucleína neuronal
NT-3	Neurotrofina
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
PI3-k	Fosfoinositol 3-cinasa
PSA-NCAM	Proteína polisialilada de adhesión neuronal
PSEN1	Presenilina 1
PSEN2	Presenilina 2
p75NTR	Receptor neurotrófico p75

ZSG	Zona subgranular
ZSV	Zona subventricular

RESUMEN

El péptido Amiloide beta ($A\beta$) es un producto del procesamiento de la proteína precursora amiloide (APP), que está en baja abundancia y se produce durante toda la vida en el cerebro sano. Se produce por la acción secuencial de una β y un γ secretasa en APP, generando una secuencia de 39 a 43 aminoácidos. $A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$ se componen de 40 y 42 aminoácidos, respectivamente. Las propiedades funcionales de los péptidos $A\beta$ hasta la fecha no han sido completamente aclaradas, aunque varios estudios sugieren que los péptidos tienen una serie de propiedades neurotróficos y neurotóxicos. Fisiológicamente bajas concentraciones de $A\beta$ podrían desempeñar un papel clave en la regulación de la plasticidad sináptica y el mejoramiento de las funciones cognitivas. La neurogénesis es un proceso activo y dinámico que implica la proliferación, la migración y la maduración de nuevas neuronas. Este proceso está estrechamente regulado por varios factores tales como el nicho, neurotransmisores, factores de crecimiento y hormonas. Varios estudios sugieren que los péptidos $A\beta$ están involucrados en el proceso de neurogénesis, sin embargo los resultados son controvertidos. Todos los datos existentes indican una relación directa entre las características fisicoquímicas de los péptidos y sus efectos. En este trabajo se evaluó el efecto de oligómeros de $A\beta$ en la neurogénesis del hipocampo. Para ello, los cultivos de NPCs fueron tratados con oligómeros $A\beta_{42}$ y 40 . Se evaluó el efecto sobre la viabilidad, la proliferación y la expresión de marcadores de diferenciación. Se observó un aumento significativo en la viabilidad celular en NPCs tratadas con oligómeros $A\beta_{40}$ (en 0,5, 1 y 5 μM) a las 72 horas, sin embargo no hubo ningún efecto sobre la proliferación en NPCs tratados con $A\beta_{40}$ ni $A\beta_{42}$ oligómeros. En cuanto a los marcadores de diferenciación, encontramos un aumento de la expresión de marcadores de GFAP y β III-Tubulina en las células que fueron tratados con $A\beta_{40}$. Llegamos a la conclusión de que $A\beta_{40}$ tiene un efecto sobre la sobrevivencia celular y la vía de señalización responsable es la de PI3K. Además $A\beta_{40}$ podría estar favoreciendo la diferenciación neuronal.

ABSTRACT

Amyloid beta ($A\beta$) peptide is a product of Amyloid Precursor Protein (APP) processing, that is in low abundance and it is produced lifelong in the healthy brain. It is produced by sequential action of a β and a γ secretase on APP, generating a sequence of 39 to 43 amino acids. $A\beta_{40}$ and $A\beta_{42}$ are composed for 40 and 42 amino acids, respectively. The functional properties of $A\beta$ peptides to date have not been completely elucidated, although a number of studies suggest that the peptides have a number of neurotrophic and neurotoxic properties. Physiologically low concentrations of $A\beta$ could play a key role in regulating synaptic plasticity and improving cognitive functions. Neurogenesis is an active and dynamic process that involves the proliferation, migration and maturation of new neurons. This process is tightly regulated by several factors such as the niche, neurotransmitters, growth factors and hormones. Several studies suggest that $A\beta$ peptides are involved in the process of neurogenesis, however the results are controversial. All existing data indicate a direct relationship between the physicochemical characteristics of the peptides and their effects. Here we evaluated the effect of $A\beta$ oligomers on hippocampal neurogenesis. NPCs isolated from the hippocampal dentate gyrus of adult rodents, were treated for 24, 48 and 72 hours with different concentrations of oligomeric forms ($A\beta$ 1-40 and 1-42), then evaluate the effect on viability, proliferation and the expression of differentiation markers. We found significant increase on cell viability in NPCs treated with oligomers $A\beta_{40}$ (at 0.5, 1 and 5 μ M) at 72 hours, however there was no effect on proliferation in NPCs treated neither with $A\beta_{40}$ nor $A\beta_{42}$ oligomers. Regarding differentiation markers, we found an increased expression of GFAP and β III Tubulin markers for cells that were treated with $A\beta_{40}$. We conclude that $A\beta$ have an effect on NPCs survival, and signaling pathway responsible is PI3K. Furthermore $A\beta_{40}$ might be favoring neuronal differentiation.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. NEUROGÉNESIS EN EL CEREBRO ADULTO

La neurogénesis es un proceso dinámico para la generación de nuevas neuronas que comprende varios eventos: proliferación, migración, diferenciación, integración, maduración y supervivencia celular. La formación de neuronas nuevas obedece a un mecanismo integrado y modulado finamente. Contrario a lo que se pensaba acerca de la naturaleza estática del cerebro adulto, se ha descrito que éste es capaz de generar neuronas nuevas que pueden integrarse a los circuitos neuronales existentes. El sistema nervioso tiene una capacidad de regeneración y reparación limitada en comparación con otros tejidos o sistemas. El dogma clásico determinaba que la neurogénesis se limitaba al desarrollo embrionario y postnatal temprano y que la población neuronal del individuo adulto no podía ser reemplazada (Ramón y Cajal, 1914). En la década de 1960, la introducción del uso de la timidina tritiada y las técnicas autorradiográficas permitieron la detección de células en fase de síntesis de ADN en tejido nervioso de animales adultos. Los trabajos pioneros de Altman indicaron la existencia de neurogénesis en el bulbo olfatorio, formación del hipocampo y neocorteza cerebral (Altman, 1962, 1963; Altman y Das, 1965; Altman, 1969). Estas observaciones fueron corroboradas más tarde por Kaplan, combinando la autorradiografía con la microscopía electrónica (Kaplan y Hinds, 1977; Kaplan, 1985). Sin embargo, todos estos estudios fueron recibidos con gran escepticismo por la comunidad científica. El conocimiento de la neurogénesis en el adulto recibió un gran impulso con los estudios del grupo de Fernando Nottebohm sobre el recambio neuronal estacional en el centro vocal de los canarios (Goldman y Nottebohm, 1983; Paton y Nottebohm, 1984). Sin embargo, a partir de la década de los noventa se empezó a aceptar la existencia de neurogénesis en el cerebro de mamíferos adultos (Cameron 1993; Lois y Alvarez-Buylla, 1993; Luskin, 1993; Kuhn, 1996), incluido el hombre (Eriksson, 1998; Sanai, 2004). Lo anterior basado en que el cerebro adulto contiene poblaciones de células madre o precursores neurales con capacidad para proliferar y generar neuronas y células gliales.

1. 2. REGIONES NEUROGÉNICAS

Son aquellas regiones del cerebro adulto donde, debido a sus características particulares, se produce la generación de nuevas neuronas. Las regiones neurogénicas se caracterizan por: (1) la presencia de células precursoras neurales (NPCs), (2) la presencia de un microambiente

permisivo para que se produzca la neurogénesis, que consiste en contactos célula-célula y factores difusibles que promueven el desarrollo neural de las células precursoras y (3) un potencial neurogénico, que puede ser probado por la implantación de las células precursoras neurales en esta región. En el cerebro de los mamíferos adultos, hay dos regiones neurogénicas conocidas: la **zona subventricular (ZSV)** adyacente a los ventrículos laterales, y la **zona subgranular (ZSG)** del giro dentado del hipocampo (Alvarez-Buylla y Lim, 2004). Figura 1. La presencia de estos precursores neurales se ha descrito también en varias zonas del cerebro maduro, incluyendo el estriado, la corteza y el cuerpo calloso (Palmer, 1995) e incluso en la médula espinal (Weiss, 1996). Sin embargo, en estas zonas, las células madre sólo generan células gliales, aunque in vitro y en un entorno neurogénico apropiado también son capaces de generar neuronas (Herrera, 1999; Shihabuddin, 2000). Esto indica que el ambiente local es muy importante en la determinación del destino de los precursores neurales (Suhonen, 1996). También se ha demostrado que estas regiones solo se lleva a cabo neurogenesis en respuesta a un daño celular. Figura1.

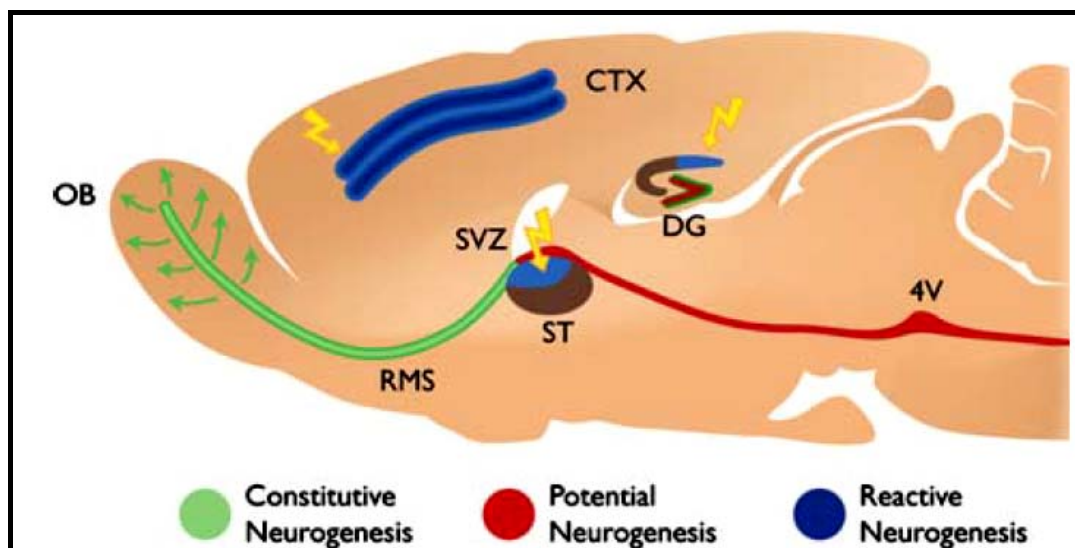


Figura 1. Formas de neurogenesis adulta. Diagrama esquemático que muestra las dos regiones neurogénicas constitutivas en el SNC adulto de mamíferos (verde; ZSV/bulbo olfatorio y giro dentado de hipocampo), y algunas de las principales regiones donde se han identificado poblaciones de precursores neurales (rojo; neurogénesis potencial) que incluyen la ZSG del giro dentado, y rostro-caudal de la zona subventricular anterior a lo largo del neuroeje, a través del canal central de la médula espinal. También se indican las regiones en las que la neurogenesis puede ser inducida experimentalmente (azul; neurogénesis reactiva) después de un daño celular (flechas amarillas).

Existen reportes de neurogénesis en otras regiones, estas son omitidas en la figura por simplicidad. CTX: corteza; DG: giro dentado del hipocampo; OB: bulbo olfatorio; RMS: vía rostral migratoria; ST: cuerpo estriado; SVZ: zona subventricular; 4V: cuarto ventrículo. Tomado de Ortega-Perez, 2007

1.2.1. Zona subventricular

En esta región, también llamada zona subependimal, tiene lugar la producción de nuevas neuronas que están implicadas en el funcionamiento del sistema olfativo. La ZSV se encuentra en la pared lateral de los ventrículos laterales y es el remanente de la zona de proliferación embrionaria. Una vez finalizado el desarrollo embrionario, aquí se siguen produciendo nuevas neuronas que pasarán a madurar y ser funcionales en el bulbo olfatorio. En este caso se trata de varios tipos de interneuronas: un tipo de la zona granular y dos tipos de interneuronas de la zona periglomerular. Una característica de las neuronas que se generan en la ZSV, es que tienen su destino funcional a una gran distancia de donde son generadas. Estas neuronas inmaduras tendrán que migrar hasta llegar a su ubicación final en el bulbo olfatorio. El camino que siguen recibe el nombre de vía rostral migratoria (RMS) y se produce migración de los neuroblastos en modo cadena (Figura 2). Los trabajos de Fiona Doetsch en el laboratorio de Alvarez-Buylla, caracterizaron los distintos tipos celulares presentes en la ZSV. Existen tres tipos de intermediarios neurogénicos. Las células tipo B son astrocitos y son los encargados de generar las nuevas neuronas, son los precursores neurales. Las células tipo C son células de amplificación transitoria y son las que más activamente se dividen. Por último, las células tipo A son los neuroblastos inmaduros que migran hasta su localización final en el bulbo olfatorio (Doetsch, Garcia-Verdugo et al. 1997). Esta región neurogénica tiene una gran producción de neuronas en roedores mientras que en humanos parece desaparecer a los pocas semanas tras el nacimiento (Sanai, Nguyen et al. 2011). El sistema olfatorio tiene otra zona de producción de nuevas neuronas durante toda la vida del organismo, como es el epitelio olfativo. En este caso se encuentra fuera del sistema nervioso central y su función es regenerar las neuronas receptoras del sistema olfativo.

1.2.2. Zona subgranular del giro dentado del hipocampo

En la ZSG del giro dentado es donde hay una continua producción de neuronas, en este caso las NPCs radican específicamente en esta zona, quedando delimitada por los somas de las células granulares del GD y el hilus (Figura 2). Una gran diferencia con el caso de la

neurogénesis en la ZSV, es que las nuevas neuronas de la capa granular del GD no migran grandes distancias, sino que inician su proceso en la ZSG para alcanzar su diferenciación terminal en la capa granular del GD. Las nuevas neuronas formadas establecen sinapsis de tipo GABAérgico durante las primeras etapas de su maduración, pasando posteriormente a establecer contactos sinápticos de tipo glutamatérgico (Esposito, Piatti et al. 2005; Ge, Goh et al. 2006; Overstreet-Wadiche, Bromberg et al. 2006). En los primeros estadios, estas nuevas neuronas son hiperexcitables y con mayor plasticidad sináptica en comparación con las células granulares maduras (Schmidt-Hieber, Jonas et al. 2004; Ge, Sailor et al. 2008). Al final de todo este proceso, se generan neuronas granulares maduras que terminan formando parte de la red sináptica preexistente del GD. Se integran en el primer punto del circuito trisináptico del hipocampo, donde recibirán información de la vía perforante procedente de la corteza entorrinal. Estas nuevas neuronas mandan sus axones a CA3 formando las fibras musgosas.

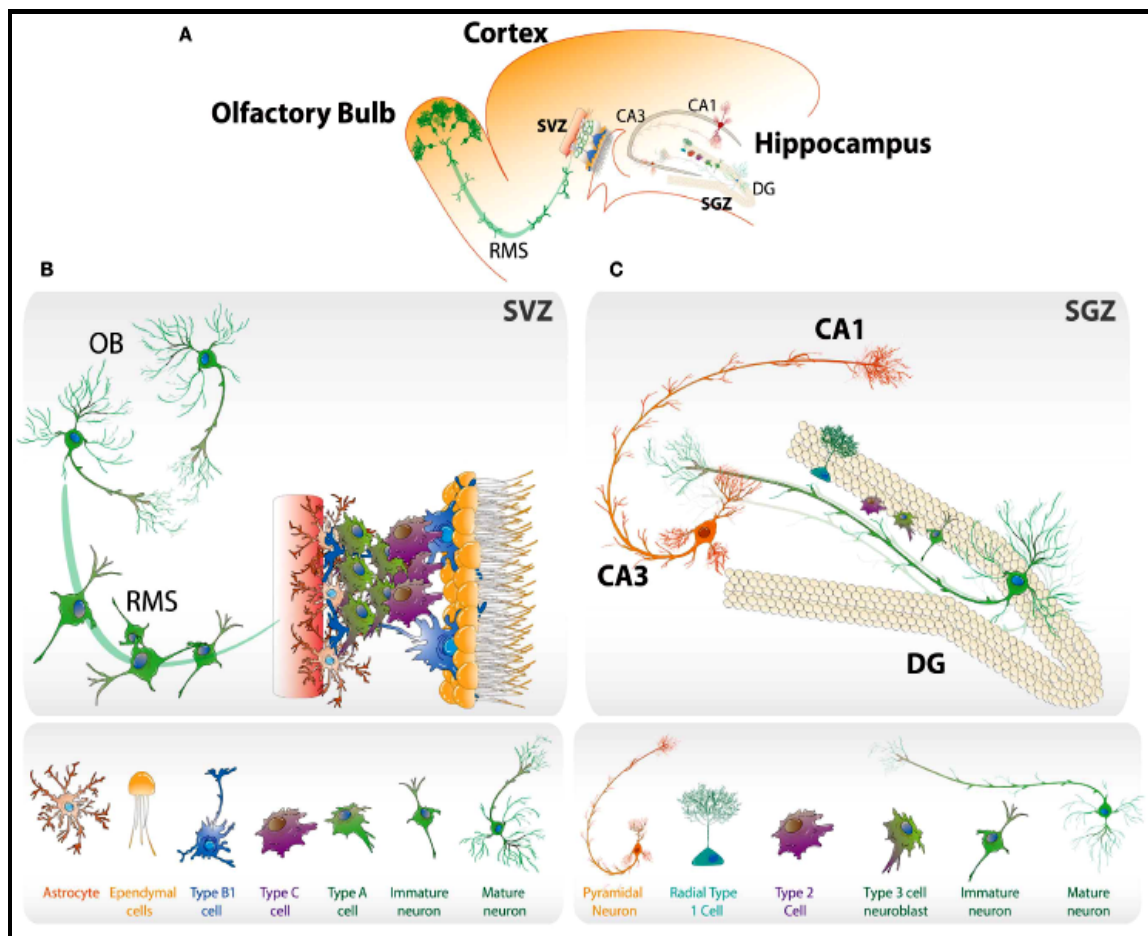


Figura 2. Neurogenesis en el cerebro adulto. A) Representación esquemática de las regiones neurogénicas en el cerebro adulto: zona subgranular (SGZ) en el giro dentado (DG) del hipocampo, la zona subventricular (SVZ) de los ventrículos laterales. B) Nicho de SVZ compuesto por células de tipo B1, que corresponden a las células madre neurales, células de tipo C que proliferan rápidamente y neuroblastos tipo A, que migran a través de la vía rostral migratoria (RMS) para el bulbo olfatorio (OB) donde maduran en interneuronas. (C) Neurogénesis en la ZSG. Células tipo radial 1 que dan lugar al tipo 2, estas tipo 2 se diferencian en neuroblastos tipo 3 y posteriormente se convierten en neuronas inmaduras, luego maduran en neuronas granulares y migran hacia la capa de células granulares. Varela-Nallar, 2013.

1.3. ETAPAS DE LA NEUROGÉNESIS

El proceso de la neurogénesis se puede dividir en varias etapas para su estudio, cada una de las cuales se caracteriza por distintos marcadores que permiten identificar los distintos tipos celulares y estudiar las distintas fases y eventos que tienen lugar en este proceso. De forma esquemática se pueden reconocer las siguientes etapas (Halbach, 2007) Figura 3:

1. Proliferación: los precursores neurales residentes en la ZSG se dividen para dar lugar a dos células hijas. Estos precursores se caracterizan por la expresión de GFAP (Proteína ácida fibrilar glial) y nestina. La división puede ser simétrica o asimétrica, existiendo cierta controversia en este punto. Hay estudios que in vitro muestran la posibilidad de aislar precursores que se dividen indefinidamente. En este caso los precursores neurales darían lugar a una célula hija que acabaría diferenciando a neurona y otra que continuaría siendo célula madre. Otros autores no consiguen obtener neuroesferas secundarias a partir de una única célula por lo que postulan que el tipo celular residente en la ZSG son células de linaje restringido (Seaberg and van der Kooy 2002; Seaberg and van der Kooy 2003; Bull and Bartlett 2005).

2. Diferenciación: en esta etapa las células de amplificación transitoria se dividen y dan lugar a células hijas que son neuronas inmaduras. En esta fase las células ya no expresan GFAP, pero continúan expresando nestina. En los puntos más tardíos de la fase, las células paran su expresión de nestina y comienzan a expresar doblecortina (DCX) y la forma modificada postraduccionalmente con ácido polisiálico de la molécula de adhesión neural (PSA-NCAM).

3. Migración: en esta fase los neuroblastos inmaduros migran dentro de la capa granular del GD. Siguen expresando DCX y PSA-NCAM. En esta fase las nuevas células generadas siguen siendo mitóticas, es decir, todavía pueden dividirse.

4. Contacto dendrítico y axonal: a partir de esta fase las nuevas neuronas ya son postmitóticas. Extienden sus dendritas dentro de la capa molecular del GD y envían su axón

hacia CA3, donde contactarán con las neuronas piramidales. En esta etapa las neuronas inmaduras siguen expresando DCX y PSA-NCAM. Además, comienzan a expresar la proteína de unión a calcio calretinina y el marcador neuronal NeuN, propio de neurona postmitótica.

5. Integración sináptica: en esta última fase, las nuevas neuronas pasan a estar totalmente maduras y a establecer sus contactos sinápticos. Reciben entradas aferentes procedentes de la corteza entorrinal en las dendritas localizadas en la capa molecular. Al mismo tiempo, establecen contacto con las neuronas de CA3 para enviar los eferentes. En esta fase, las neuronas ya maduras dejan de expresar calretinina y comienzan a expresar calbindina. Estas neuronas maduras continuaran expresando NeuN.

Además de los marcadores antes mencionados, GFAP y nestina, otros marcadores ampliamente utilizados que son característicos de los precursores neurales, son BLBP y Sox2. En las fases de diferenciación y migración, donde encontramos células de amplificación transitoria y neuroblastos inmaduros, podemos también encontrar marcadores como TUC4, Tuj1 o NeuroD, que colocalizarían con DCX y PSA-NCAM. Por otro lado Prox1, que es un marcador que aparece al final de la fase mitótica y perdura en las neuronas granulares maduras e integradas en el cerebro postnatal (Halbach 2007; Ming and Song 2011).

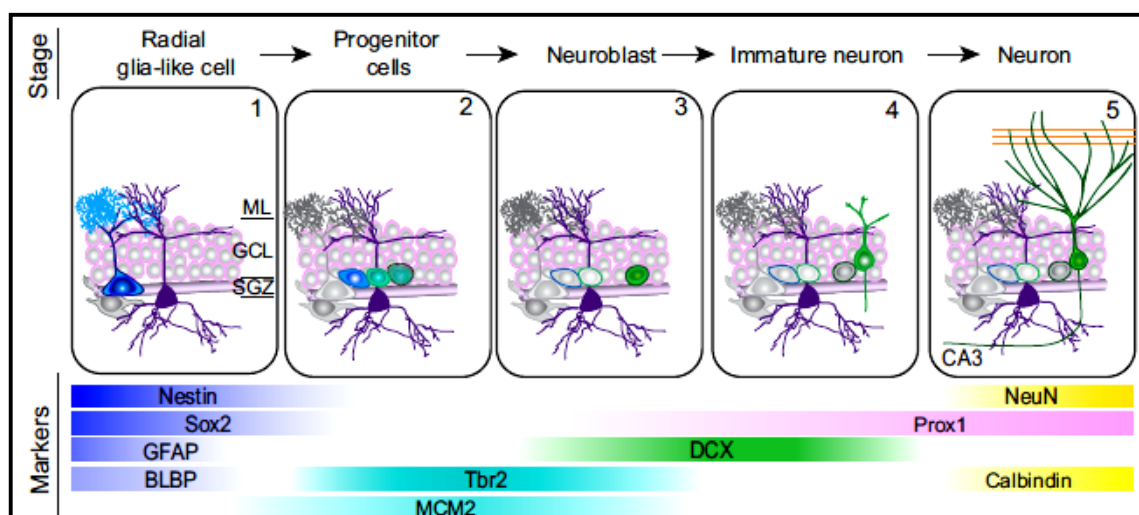


Figura 3. Neurogénesis en el giro dentado del hipocampo. Resumen de los 5 pasos del proceso de neurogénesis adulto: (1) activación de células tipo glia radial quiescentes en la zona subgranular, (2) proliferación de progenitores intermedios y precursores no radiales, (3) generación de neuroblastos, (4) integración de neuronas inmaduras y (5) maduración de las células recién nacida. También se muestra la expresión de marcadores específicos para cada etapa del proceso. Modificada de Ming G, 2001.

1.4. Papel funcional de la neurogénesis adulta

En el caso de la neurogénesis adulta hipocampal, se ha descrito ampliamente como ocurre el proceso en la ZSG, una subregión ubicada dentro del giro dentado y se ha demostrado que contribuye a los procesos de aprendizaje y memoria. Esta función se conoce como función cognitiva de la neurogénesis hipocampal adulta, un efecto atribuido principalmente al hipocampo dorsal (SGZ dorsal del GD). En contraste el hipocampo ventral (SGZ ventral del GD) está relacionado con las funciones emocionales y está implicado en procesos como el estrés, la depresión o ansiedad. Se ha asociado la generación de nuevas neuronas con un mejoramiento en la memoria, estudios demuestran que condiciones como ambientes enriquecidos y la actividad física aumentan la neurogénesis así como los procesos de aprendizaje y memoria dependientes de hipocampo (Kempermann 1999). Contrariamente, factores como el estrés y el envejecimiento muestran una disminución en los niveles de neurogénesis lo cual correlaciona con una disminución en la memoria (Drapeau 2003). Además esta correlación entre disminución de neurogenesis y memoria también fue demostrada a través del uso de drogas citostáticas e irradiación (Synder 2005, Saxe 2006). Datos electrofisiológicos y computacionales también han demostrado que las nuevas neuronas que se forman en el giro dentado del hipocampo parecen ser importantes en las funciones cognitivas llamadas patrón de separación. A través de estudios donde se ha modificado la tasa de neurogénesis, varios grupos han reportado que las nuevas neuronas son importantes y críticas para realizar la discriminación fina entre las ubicaciones espaciales cercanas o en ambientes altamente similares a través de pruebas de memoria de trabajo y memoria de largo plazo (Sahay 2011, Nakashiba 2012).

1.5. Factores que modulan la neurogénesis

Como se mencionó previamente, la neurogénesis no es un evento estático sino dinámico y por lo tanto, está modulado y regulado por diversos factores para responder a las demandas del cerebro. Entre los factores involucrados en la modulación y regulación de la neurogénesis se encuentran el nicho, los factores internos y externos que pueden ser neurotransmisores, factores de crecimiento, factores neurotróficos, hormonas, la actividad física y el aprendizaje. Las dos áreas neurogénicas del cerebro adulto en que residen las Células Precursoras Neurales (NPCs) ocupan un nicho formado por los astrocitos y por las células endoteliales. Estas

últimas cubren a las NPCs para favorecer su renovación y los astrocitos favorecen el direccionamiento de las células progenitoras para formar neuronas. Es sorprendente que las NPCs también puedan formar células endoteliales dependiendo de las necesidades y de las condiciones, lo cual sugiere que las células son capaces de volver a poblar su nicho (Álvarez 2004, Wurmser 2004).

1.5.1. Factores internos

La neurogénesis es un proceso regulado de forma fina para poder dar lugar a la proliferación y a la formación de las neuronas nuevas, de tal modo que existen factores internos que controlan la proliferación de las células pluripotenciales y de las células derivadas de éstas. Entre los factores internos se encuentra la expresión de genes, moléculas, factores de crecimiento, hormonas y neurotransmisores; la edad es otro factor interno involucrado en la neurogénesis. Entre los sistemas de señalización celular que regulan la neurogénesis está la proteína que controla la transcripción y que es importante durante el desarrollo, conocida como *Sonic-hedgehog*, y que está involucrada en el mantenimiento de las NPCs (Laik 2003), así como varias moléculas de señalización, incluyendo Wnt, Noggin/BMP, Shh y Notch, las cuales regulan el auto-mantenimiento de las células precursoras, proliferación y diferenciación (Álvarez 2004, Doe 2008). Se ha demostrado que Wnt también es importante para la comunicación celular y que es capaz de aumentar la proliferación en el GD de animales adultos. Por otro lado, la vía de señalización de Notch también se ha propuesto como candidata para regular y realimentar el mecanismo durante la neurogénesis adulta (Alvarez 2004). También se ha demostrado que la expresión de Prox1 en progenitores intermedios es necesaria para el auto-mantenimiento de NPCs en la ZSG y que su expresión ectópica induce una diferenciación prematura de las NPCs (Lavado 2010). Además de los sistemas de señalización celular, se ha demostrado la participación de algunas moléculas de adhesión que modulan la proliferación de NPCs. Una de éstas es la molécula de adhesión neuronal (NCAM) que facilita la neurogénesis en el hipocampo, al regular la proliferación y diferenciación de las células progenitoras a través de la regulación de factores de transcripción como Prox1 (Crossin 2000). Asimismo, la señalización ejercida entre los astrocitos y los neuroblastos por el neurotransmisor GABA, amplifica la producción y la migración de las células progenitoras a partir del sitio donde se localizan las células pluripotenciales (Bolteus 2004). Sin embargo,

los factores internos no sólo regulan la proliferación celular sino también la decisión de las células progenitoras para formar nuevas neuronas, de tal modo que se han identificado factores neurogénicos asociados a las poblaciones de astrocitos. Estos se localizan en la ZSV y en la ZSG del GD, lo que indica que éstos tienen un efecto en el direccionamiento de las células para formar neuronas (Lim 2000). La expresión de diversos factores de crecimiento (como BDNF, IGF-I, FGF-2, EGF) implicados en la regulación del destino celular puede determinar el tamaño de la población neuronal o glial, tanto en cerebros en desarrollo como en el cerebro adulto (Kuhn 1997, Pencea 2001). Se ha demostrado que la administración intracerebroventricular del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) incrementa la neurogénesis en el bulbo olfatorio. Además, se sabe que el BDNF es necesario para mantener la tasa de neurogénesis en el hipocampo de ratones adultos (Lee 2002). Por otro lado, la inyección por vía periférica del factor de crecimiento tipo insulina (IGF-I) incrementa la neurogénesis en el hipocampo de ratas adultas (Kuhn 2001). También se ha demostrado que el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-2) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) tienen efectos específicos sobre las NPCs *in vivo*. La administración intracerebroventricular de FGF-2 incrementa el número de nuevas neuronas en el bulbo olfatorio, mientras que la administración de EGF reduce el número de neuronas que llegan al bulbo olfatorio, pero incrementa el número de astrocitos en éste (Kuhn 1996). Además algunos estudios indican que los esteroides ováricos, así como los estrógenos endógenos, tienen un efecto estimulante en la proliferación celular de las NPCs (Ormerod 2001). Un estudio en ratas gestantes demuestra que la tasa de neurogénesis se incrementa un 65% y alcanza su pico máximo justo antes del parto, el cual coincide con los niveles de prolactina (Shingo 2003;). Se sabe que la edad es uno de los factores más importantes en la regulación de la neurogénesis en el cerebro. El número de células BrdU+ se reduce en el giro dentado conforme las ratas y los primates envejecen (Kuhn 1996). Sin embargo, esta disminución no se observa en la ZSV de ratas adultas, pero se ha reportado una disminución en el número de NPCs en la ZSV de ratones envejecidos (Klempin 2007).

1.5.2. Factores externos

La neurogénesis no constituye un proceso biológico estático, ya que su tasa es variable y depende del microambiente. Se sabe que la actividad física, los ambientes enriquecidos, la restricción energética y la modulación de la actividad neuronal, entre otros factores, actúan como reguladores positivos de la neurogénesis. Los animales que viven en un ambiente enriquecido, como por ejemplo mantenerlos en una caja con juguetes y túneles, presentan un incremento en la neurogénesis de la capa subgranular del GD (Mirescu 2004 Kempermann et al. 1997). Sin embargo, en los animales que viven en condiciones de estrés, la neurogénesis en esta zona disminuye o se inhibe totalmente (Tanapat 2001). Además, las alteraciones en el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, inducidas por situaciones persistentes de estrés durante el desarrollo, disminuyen la generación de nuevas células en el GD. Así, se conoce que la proliferación celular en el GD disminuye por el efecto de los glucocorticoides, los cuales se liberan en respuesta al estrés (Lennington 2003).

1.6. Células Precursoras Neuronales (NPCs, por sus siglas en inglés))

La neurogénesis adulta tiene lugar gracias a la existencia de células madre neurales o células precursoras neurales, que tienen la capacidad de dividirse generando neuronas nuevas. Las NPCs tienen la capacidad de mantener su población celular al continuar proliferando cuando son cultivadas en presencia de factores de crecimiento, tales como el factor de crecimiento epidérmico (EGF; por sus siglas en Inglés) o FGF básico (bFGF, por sus siglas en Inglés). Además, de su potencial de autorenovación, las NPCs presentan multipotencialidad al diferenciarse en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. Estas células han sido aisladas de varias regiones del SNC embrionario y adulto, incluyendo la zona subventricular (ZSV), corteza, médula espinal o cerebro medio. Distintos estudios parecen señalar que no sólo en la ZSV y ZSG existen células madre, ya que células aisladas de otras regiones como el estriado o el septum, bajo determinadas condiciones de cultivo, también producen neuronas y astrocitos (Reynolds and Weiss 1992; Palmer, Ray et al. 1995). En cuanto a la igualdad en la identidad de las células madre, trasplantes de precursores aislados de la ZSG y trasplantados de nuevo en la ZSG y ZSV, producen el tipo de progenie propia de la región receptora del implante (Suhonen, Peterson et al. 1996). Mientras que estas mismas células implantadas en regiones no neurogénicas, como el cerebelo, no producen diferenciación neuronal. De la misma forma,

precursores aislados de ZSG, sólo se integran y diferencian en la ZSV y no en el estriado o corteza (Herrera, Garcia-Verdugo et al. 1999). Estos experimentos sugieren que el microambiente neurogénico es muy importante y que no depende tanto del precursor, sino del tipo de ambiente que le rodea, el que dé lugar a una descendencia de un tipo u otro. Este fenómeno podría explicar los hallazgos de neurogénesis en zonas no neurogénicas tras una lesión como muerte celular inducida en la corteza (Magavi, Leavitt et al. 2000) o tras una isquemia (Arvidsson, Collin et al. 2002; Parent, Vexler et al. 2002). En estas situaciones se podría producir un cambio de las condiciones microambientales de la región que favorezcan la neurogénesis regenerativa, en una zona no neurogénica. Las características que definen a una célula madre son la capacidad de autorenovación y la multipotencia. La autorenovación se consigue a través de la división celular. Para ello, la célula madre se dividirá dando lugar a una célula hija con las mismas características que la célula madre y otra que estará más diferenciada, que se le llama célula progenitora. Este progenitor tiene un destino celular más restringido y, por tanto, se diferenciará y generará nuevas neuronas. En este caso hablamos de división asimétrica. En el modelo propuesto, las células progenitoras también se dividen y con una tasa mayor que la de las células precursoras, por eso también se les llama células progenitoras de amplificación transitoria. La segunda característica que identifica a una célula madre es la multipotencia. Por multipotencia se entiende la capacidad de generar diferentes tipos celulares. El grado de potencial de diferenciación puede ser variable, y así hay células totipotentes, pluripotentes, multipotentes, bipotentes o unipotentes.

1.7. Neurogénesis en la Enfermedad de Alzheimer

Respecto a las enfermedades neurodegenerativas, se ha visto que la formación de nuevas neuronas se encuentra igualmente regulada. Sin embargo, en el caso particular de la enfermedad de Alzheimer, el potencial proliferativo se encuentra disminuido, así como el nivel de los factores que ayudan a la regeneración (Brinton 2006). Sin embargo, otros estudios han revelado que existe un incremento en la expresión del marcador de células inmaduras, DCX (Jin 2006). Esto se debe a los diferentes modelos animales de la enfermedad de Alzheimer utilizados (dobles o triples transgénicos).

Recientemente, se reportó la presencia de proliferación celular sin alguna indicación de alteración en el GD (Boekhoorn 2006). Otro aspecto que ha sido explorado en la enfermedad

de Alzheimer, es la influencia del ambiente enriquecido sobre la formación de nuevas neuronas. Los estudios realizados en roedores mantenidos en un ambiente enriquecido, han demostrado que existe un aumento en los niveles de neurotrofina 3 (NT-3) y en el BDNF, así como un aumento en la formación de neuronas nuevas acompañado por un mejoramiento en la prueba de memoria (Olf 2006). En relación con la producción de A β , se reportó en roedores que sometidos a ambiente enriquecido induce una disminución en los niveles de esta proteína y genera un aumento en la expresión de los genes asociados con el aprendizaje y la memoria, así como en los genes asociados con la formación de neuronas nuevas y con el proceso de sobrevivencia celular (Lazarov 2005, Shors 2001).

1.7.1. Enfermedad de Alzheimer

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es un desorden neurodegenerativo progresivo, caracterizado por una disminución gradual en la memoria y en la ejecución de funciones corticales superiores (Caselli, Beach et al. 2006), con la aparición de marcadores histopatológicos en el cerebro, representados por depósitos extracelulares de fibrillas de A β , llamados placas seniles o neuríticas y por acumulación intraneuronal de marañas neurofibrilares formadas como resultado de la fosforilación y truncación anormal de la proteína Tau (Castellani, Rolston et al. 2010).

Es la forma más común de demencia y representa aproximadamente del 60 al 70% de todos los casos, al igual que cualquier tipo de demencia, es exclusiva de humanos. El 5-10% de los casos, generalmente aparece en una edad temprana (≤ 50 años de edad) y es de transmisión autosómica dominante, llamada EA familiar, se asocia a mutaciones en los genes que codifican para la proteína precursora del amiloide (APP), presenilina 1 (PSEN1) y presenilina 2 (PSEN2)(Selkoe 2001). La presencia de estas mutaciones conllevan a la alteración en la formación y acumulación del péptido amiloide β (A β), el principal constituyente de las placas neuríticas, uno de los marcadores neuropatológicos de esta enfermedad (Tanzi 2005). El otro tipo de EA es la de tipo esporádica también llamada de inicio tardío (≥ 65 años de edad), representa del 90 al 95% de los casos. Los principales factores de riesgo son la edad avanzada, traumatismos craneales, medio ambiente, polimorfismos que pueden aumentar la susceptibilidad de padecer la enfermedad. En este sentido, algunos autores han sugerido la presencia del alelo $\epsilon 4$ de la apolipoproteína E (APOE) como el principal factor de riesgo

genético, ya que individuos que poseen 2 copias de este alelo presentan un riesgo del 50 al 90% de sufrir la enfermedad antes de los 85 años, mientras que aquellos individuo que poseen solo una copia presentan un riesgo del 45% (Citron 2010).

1.8. Amiloide beta

Glennner y Wong fueron los primeros en identificar una proteína que era el componente principal del amiloide vascular y que tenía un peso molecular de 4 KDa, en la actualidad esta proteína es referida como péptido amiloide β (Glennner and Wong 2012). Estudios posteriores establecieron que esta misma proteína es el componente principal de las placas de amiloide presentes en la enfermedad de Alzheimer.

A β es un producto natural de baja abundancia y producido a través de la vida en el cerebro sano (Vardy, Catto et al. 2005), es liberado a través del procesamiento de la proteína precursora del amiloide por acción secuencial de una β y una γ -secretasa. A β es altamente propenso a agregarse y a medida que se acumula, forma una amplia gama de formas solubles denominados oligómeros, que varían en tamaño, morfología y conformación, puede formar desde dímeros y trímeros hasta grandes estructuras globulares de alto peso molecular, o finalmente depositarse en formas fibrilares insolubles. (Rushworth and Hooper 2010).

1.8.1. Proteína precursora del amiloide (APP) y producción de A β

APP es una proteína que se expresa de manera ubicua y tiene características de una glicoproteína transmembranal integral del tipo 1, con un largo ectodominio N-terminal y un pequeño dominio citoplasmático C-terminal (Muller and Zheng 2012). Esta proteína se localiza en numerosas estructuras celulares como son membrana celular, retículo endoplásmico, aparato de Golgi. El gen de la PPA se localiza en el brazo largo del cromosoma 21 y contiene 19 exones, a través de splicing alternativo de los exones 7, 8 y 15 se generan 8 isoformas que tienen un patrón de expresión célula-específico y que son designadas por el número de aminoácidos que contienen (Chasseigneaux and Allinquant 2012). En el sistema nervioso central solo se expresan 4 isoformas: APP₆₉₅, APP₇₁₄, APP₇₅₁ y APP₇₇₀, de las cuales la APP₆₉₅ es la isoforma más abundante en neuronas, mientras que las isoformas APP₇₅₁ y APP₇₇₀ se expresan principalmente en células gliales (Shun-Ichi 1990; Zheng 2006). APP

770:751:695 se expresan en una proporción 1:10:20 en corteza) y solo las isoformas APP₆₉₅, APP₇₅₁ y APP₇₇₀ contienen la secuencia que codifica para el péptido A β (Selkoe 2001).

Como se mencionó anteriormente, los péptidos A β se derivan del procesamiento proteolítico de APP, sin embargo existen dos vías para el procesamiento de esta proteína, la vía amiloidogénica y la no amiloidogénica. Solo la vía amiloidogénica conduce a la generación de A β , donde inicialmente participa una β -secretasa (BACE) que corta en el dominio extracelular generando el fragmento APPs β , que es liberado al espacio extracelular, y un fragmento denominado C99 o C89 que se queda en la membrana, posteriormente C99, C89 es cortado por un complejo γ -secretasa entre los residuos 38 y 43, liberando un péptido de 39-42 aminoácidos de longitud (Vetrivel and Thinakaran 2006).

La otra vía por la cual se puede procesar APP es la no amiloidogénica, donde APP es cortada primeramente por una α -secretasa, entre los aminoácido Lys-16-Leu-18 en la secuencia que corresponde a A β por lo que se inhibe la producción del péptido. Este corte, genera un ectodominio amino terminal grande y soluble (APPs α) y un fragmento de 83 aminoácidos denominado C83, el cual permanece unido a la membrana, posteriormente el fragmento C83 es cortado por una γ -secretasa, produciendo dos fragmentos, el C59 y un péptido corto denominado p3. (Zhang, Ma et al. 2012)

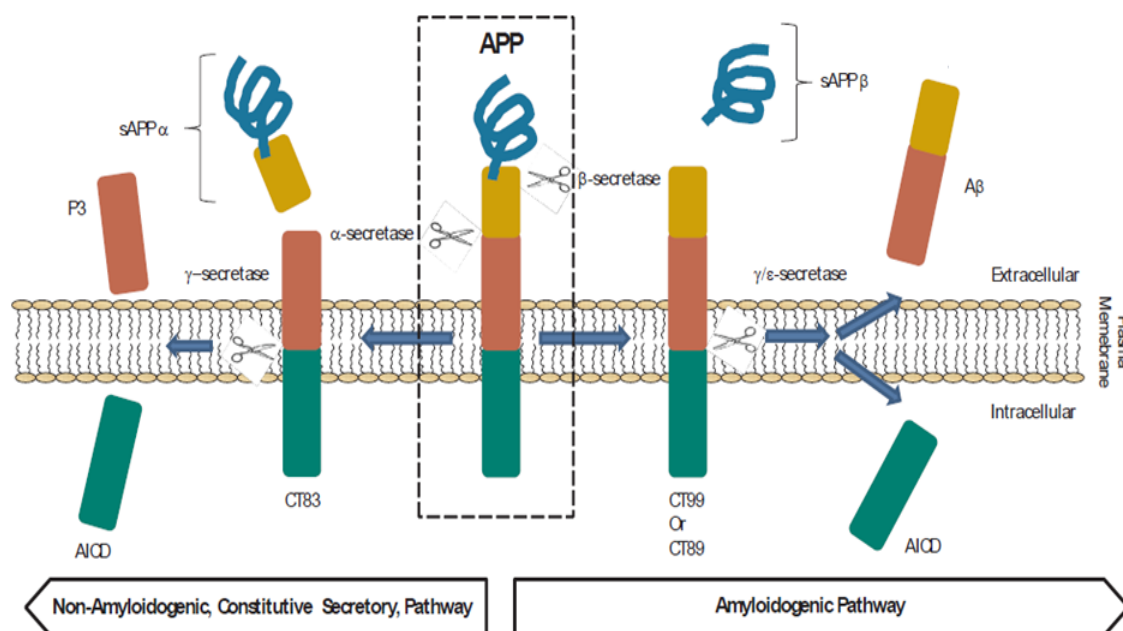


Figura 4. Procesamiento de la proteína precursora del amiloide. Cárdenas-Aguayo, 2014

1.8.2. Estructura de los péptidos de A β

Los péptidos de A β están constituidos de una secuencia de 39 a 43 aminoácidos. A β 40 y A β 42, compuestos de 40 y 42 aminoácidos respectivamente, constituyen la mayor parte de las especies de A β en plasma, líquido cefalorraquídeo y placas seniles. A β 40 es el más abundante, se produce en una proporción 1:10 con respecto a A β 42. Ambas especies de A β se agregan y son neurotóxicas, aunque A β 42 se fibriliza más rápido, forma distintos oligómeros y es significativamente más tóxico que A β 40 (Dahlgren, Manelli et al. 2002). Estas diferencias son atribuidas a la presencia de dos residuos de aminoácidos hidrofóbicos, I41 y A42 en el C-terminal de A β 42. La presencia de estos dos aminoácidos hace a A β 42 más rígido y estructurado (Urbanc, Cruz et al. 2004; Lazo, Grant et al. 2005; Yan and Wang 2006).

La agregación de los péptidos de A β juega un papel importante en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer debido a su tendencia espontánea a oligomerizarse, formando especies neurotóxicas que pueden acumularse intra y extracelularmente. Aunque es ampliamente aceptado que la agregación de A β consiste principalmente en estructuras β -plegadas, el mecanismo preciso de agregación aun no es claro. La base física de la formación de amiloide es difícil de describir debido a la sensibilidad del proceso en las condiciones experimentales, (pH, agitación, temperatura, concentración, fuerza iónica, crecimiento de fibrillas, incluso la misma preparación de la muestra), y el uso de péptidos sintéticos o los extraídos de cerebro de pacientes con Alzheimer (Bernstein, Dupuis et al. 2009; Qiang, Kelley et al. 2013).

Recientes investigaciones biofísicas tales como microscopia electrónica, resonancia magnética nuclear RMN de estado sólido, espectrometría infraroja con Transformada de Fourier (FT-IR) y espectros CD han mostrado que las fibrillas adoptan una estructura β -plegada, sin embargo el mecanismo exacto de agregación de A β aún no está claro, ya que la cristalografía de rayos-X y la solución NMR no es aplicable a agregados insolubles (Serpell 2000).

Se ha sugerido que el mecanismo por el cual los péptidos de A β 42 de secuencia DAEFRHDSGY¹⁰EVHHQKL VFF²⁰AEDVGSNKGA³⁰IIGLMVGGVV⁴⁰IA producidos como monómeros solubles, se autoensamblan hasta formar fibrillas se describe experimental y teóricamente por un proceso de polimerización de nucleación- condensación (Hellstrand, Boland et al. 2010; Schmit, Ghosh et al. 2011). A β 42 contiene dos regiones hidrofóbicas L17-A21 el cual se denomina como núcleo central hidrofóbico (CHC) y A30-A42, separados por

una región hidrofílica E22-G29. Las fibrillas maduras de A β 42 muestran conformación en forma de U con cadenas β , formadas por residuos 17-20 y 31-40 y los residuos N-terminales 16 de forma desordenada, mientras que las fibrillas maduras de A β 40 tienen cadenas β en las posiciones 10-23 y 30-38.

Recientemente, se demostró que el ensamble temprano de A β 42 involucra la formación de unidades pentaméricas y hexaméricas, llamadas paranúcleos. Después de su formación, los paranúcleos se autoasocian para generar oligómeros más grandes que finalmente darán lugar a las protofibrillas. En contraste para A β 40 se ha visto que se produce una mezcla en equilibrio de monómeros, dímeros, trímeros y tetrameros. Estas diferencias biofísicas entre A β 40 y A β 42 es probable sea la base de los comportamientos biológicos distintos de los dos péptidos (Bitan, Kirkitadze et al. 2003). Otros estudios demostraron que la oxidación de Met35 en A β 42 bloquea la formación de los paranúcleos, produciendo oligómeros indistinguibles en tamaño y morfología de los producidos por A β 40 (Bitan, Tarus et al. 2003).

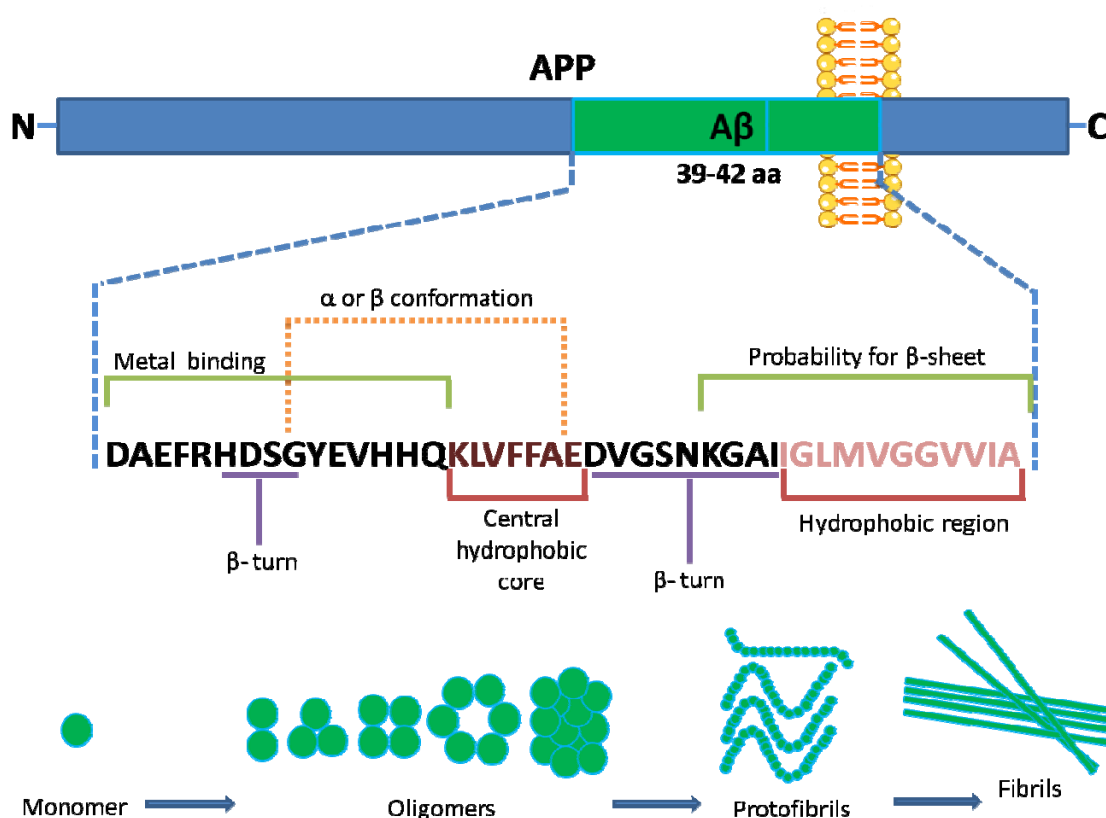


Figura 5. Secuencia y agregación de los péptidos A β .

Recientemente se reportó que ciertos fragmentos de la región C-terminal (CTFs) 29-42 y 39-42 de A β 42 tienen la capacidad de controlar la oligomerización de A β 42, además de inhibir la toxicidad inducida por estos oligómeros. Interesantemente se ha demostrado que el fragmento CTF (39-42) se puede unir directamente a monómeros de A β y a formas oligoméricas, este fragmento se une a varios sitios en la secuencia de A β 42, incluyendo las regiones hidrofóbicas y preferencialmente en la región N-terminal, interrumpiendo el ensamble temprano la secuencia completa de A β (Gessel, Wu et al. 2012).

Uno de los primeros eventos en la autoagregación de A β es la nucleación de monómeros a través de la formación de una vuelta o giro en los residuos Gly25-Lys28. Mediante estudios bioquímicos, resonancia magnética nuclear y ensayos computacionales de monómeros de A β se demostró que un residuo de 10 aminoácidos (²¹Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala30) está involucrado en formar este giro o vuelta de nucleación en el plegamiento de monómeros (Borreguero, Urbanc et al. 2005; Lazo, Grant et al. 2005; Baumketner, Bernstein et al. 2006). Además estudios computacionales han revelado que la formación de puentes de hidrógeno puede ocurrir entre los átomos de oxígeno del carboxilo de Asp23 y los hidrógenos Gly25, Ser26, Asn27, y Lys28. El puente de hidrógeno entre Asp23-Ser26 es el que ocurre con mayor frecuencia, esto sugiere que la interacción de estos dos aminoácidos podría ser particularmente importante en la organización de la estructura de A β . Además, Ser26 forma una hélice 3_{10} con Asn27 y Lys28 (Baumketner, Bernstein et al. 2006). Roychaudhuri et al a través de una estrategia desarrollada originalmente por Sohma et al. que implica la síntesis de 26-O-acyliso-A β 42 (iA β 42), cuya secuencia es idéntica al A β humano, excepto que la Gly25 y Ser26 están unidos a través de un enlace éster, demostraron que este cambio en el enlace tiene un efecto sobre la estructura del centro de giro Gly25-Ser26 (Serpell 2000), disminuyendo la formación de hojas- β , así como afectando el ensamble y dinámica conformacional de A β 42 (Sohma and Kiso 2006; Roychaudhuri, Lomakin et al. 2014).

Por otro lado, se sabe que las proteínas sintetizadas de novo usan solo L-aminoácidos. Sin embargo, con el envejecimiento, las proteínas contienen residuos de Asp D-isomerizado que progresivamente van aumentando en numerosos tejidos. La D-isomerización de aminoácidos es una de las modificaciones post-traduccionales dependientes de la edad, y es el tipo más común de daño en proteína relacionados con la edad. Varios reportes indican que los 3 residuos de ácido aspártico (Asp) en la posición 1, 7 y 23 en el A β que se encuentra en las placas de los

pacientes con EA son altamente isomerizados de la forma L a la D (Fukuda, Shimizu et al. 1999). Usando experimentos biofísicos, se demostró que la D-isomerización simultánea de los residuos de Asp en la posición 7 y 23 aumenta la oligomerización, formación fibrilar y efecto neurotóxico de A β 42. Además, la D-isomerización de Asp en la posición 1 suprime los efectos dañinos inducidos por D-Asp 7 y 23 de la secuencia A β 42 (Sugiki and Utsunomiya-Tate 2013).

Sistemáticamente el reemplazamiento con prolinas en péptidos es un método rápido y confiable para predecir la estructura secundaria, específicamente hojas- β y giro. Las prolinas raramente están presentes en hojas- β , mientras que fácilmente se acomodan en giros, por ejemplo como un Pro-X-corner (donde X es un residuo de aminoácido variable). Para identificar que residuos de aminoácidos son importantes para la formación β -plegada, una serie de sustitución de prolinas en la secuencia de A β se ha probado. Wood et al investigaron el reemplazamiento de prolinas de dos series de fragmentos de A β (15-23 y 12-26), mostrando que los residuos en la posición 17-23 constituyen el núcleo de la hoja- β de los fragmentos de A β (Wood, Wetzel et al. 1995). Por otro lado, las sustituciones en las posiciones 23-27 posiblemente pueden hacer giro- β (Serpell 2000). Miramoto y colaboradores hicieron una serie de mutantes de prolina, sustituidas en la secuencia A β 42, en las posiciones 19-26. Se encontró que los residuos en la posición 19-21 y 24-26 son importantes para la formación de hoja- β , por el contrario las prolinas en la posición 22 y 23 desempeñan un papel crucial en la agregación y neurotoxicidad de los péptidos A β 42 (Morimoto, Irie et al. 2002).

Las sustituciones de prolina en el C-terminal de la secuencia de A β 42 (A42P-, I41P- y V40P-) mostraron que estas se agregan de forma muy débil mientras que las sustituciones de treonina en el C- terminal (A42T- y I41T) se agregan potentemente con una citotoxicidad significativa alta, indicando que la hidrofobicidad de los C-terminales de los 2 residuos de A β 42 no están relacionados con su capacidad agregativa y neurotoxicidad, sino que los tres residuos del C-terminal están asociados a la formación de hoja β . Estos resultados demuestran la diferencia en la capacidad de agregación y neurotoxicidad entre A β 42 y A β 40. En contraste, los mutantes de prolina en el extremo N-terminal de 13 residuos mostraron la capacidad de agregación potente y neurotoxicidad similar a los de tipo salvaje A β 42. Recientemente, Williams et al investigaron el reemplazamiento de sistemático de prolinas en A β 40, mostrando que los residuos 15-21, 24-28 y 31-36 están probablemente involucrados en la formación hojas- β de

las fibrillas y que los residuos en la posición 22, 23, 29 y 30 están localizados entre estas hojas- β (Williams, Portelius et al. 2004).

1.8.3. Función de los péptidos de A β

Las propiedades funcionales de los péptidos de A β no han sido completamente aclaradas hasta la fecha, aunque numerosos estudios sugieren que los péptidos tienen una serie de propiedades neurotróficas y neurotóxicas. Se sugiere que el A β soluble juega un papel importante en el crecimiento neuronal, supervivencia, y modulación sináptica, mientras los oligómeros y fibrillas tienen propiedades tóxicas (Kamenetz, Tomita et al. 2003; Plant, Boyle et al. 2003; Puzzo, Privitera et al. 2008). Los estudios han demostrado que los oligómeros de A β son capaces de inducir una mayor muerte celular y apoptosis que las formas solubles o fibrilares, lo que sugiere que la conformación estructural del péptido es importante para determinar su acción fisiológica (Small, Mok et al. 2001).

1.8.3.1. Papel positivo de A β

A β ha sido ampliamente estudiado debido a su asociación con las placas neuríticas en los cerebros con la EA, por la interferencia con la actividad sináptica y su posible patogénesis en la EA (Walsh, Klyubin et al. 2002). Sin embargo, existe A β en las personas normales sin ninguna patología conocida. Por lo tanto, la búsqueda de su función fisiológica normal en el cerebro ha ganado interés, particularmente su posible implicación en la plasticidad sináptica y en la supervivencia neuronal. Los niveles fisiológicos de A β son esenciales para la plasticidad sináptica en individuos normales (Pearson and Peers 2006). Las funciones fisiológicas de A β , así como los mecanismos principales que son regulados por A β para mediar la plasticidad sináptica están siendo tema de estudio actualmente. Se propone que el efecto protector o destructivo de A β es determinado por su concentración relativa en adición al medio ambiente celular relacionado con la edad. Concentraciones fisiológicamente bajas, del orden pico y nanomolar de A β podrían jugar una función fundamental en la regulación de la plasticidad sináptica y en el mejoramiento de las funciones cognitivas, mientras que, la acumulación de altas concentraciones de A β , aunado a los efectos de la edad, podrían causar una desregulación en la función sináptica y una pérdida de esta, como se presenta en la EA (Shankar, Bloodgood et al. 2007). La gran cantidad de evidencias para las actividades dependientes de la

producción de A β sugieren una función normal de este péptido. Las funciones propuestas de A β incluyen el control de la actividad sináptica y la consolidación de la memoria, supervivencia neuronal, transporte de colesterol y funciones antioxidantes. A β 42 es normalmente producido y secretado por las células en cantidades mucho más bajas que A β 40, representa ~ 90% del total secretada A β (Pawlik, Sastre et al. 2004). Sin embargo ambas especies de A β son necesarias para la supervivencia neuronal y se ha demostrado también que pueden ser protectores. Tanto A β 40 y A β 42 en concentraciones fisiológicas son importantes en la supervivencia neuronal y EN la memoria. Muchos estudios han descrito que A β tiene un papel fisiológico en la función sináptica normal, en la plasticidad homeostática (Kamenetz, Tomita et al. 2003). Los monómeros sintéticos de A β 42 a concentraciones de [30-100 nM] aumentan la supervivencia de neuronas en desarrollo en condiciones de privación trófica y protegen a las neuronas maduras contra la muerte excitotóxica (Giuffrida, Caraci et al. 2009). La función neurotrófica de A β 40 también se demostró en cultivo neuronal primarios tratados con niveles picomolares de A β 40, las células tratadas con A β 40 revierten la toxicidad causada por la inhibición de β - o γ -secretasas, estos resultados proporcionan la evidencia convincente para el papel de A β en la supervivencia neuronal (Plant, Boyle et al. 2003). También se ha demostrado que los oligómeros de A β promueven la activación y proliferación de astrocitos (Lingling 2011).

1.8.3.2. Papel negativo de A β

Los estudios han demostrado que los oligómeros de A β tienen capacidad neurotóxica, que inducen una mayor muerte celular y apoptosis que las formas monoméricas o fibrilares, lo que sugiere que la conformación estructural del péptido es importante para determinar su acción fisiológica (Small and Cappai 2006). Diversos estudios han demostrado que la toxicidad de A β puede ser mediada por varios mecanismos, como disfunción sináptica, excitotoxicidad a través de interacción con receptores de neurotransmisores, estrés oxidativo, alteración en la permeabilidad de la membrana, procesos de inflamación, disfunción mitocondrial, entre otros. Otros estudios han reportado que el grado de pérdida sináptica correlaciona mejor con el deterioro cognitivo de pacientes con EA, más que con el número de placas neuríticas. Algunos estudios han reportado que en pacientes con EA existe una reducción en los niveles de proteínas involucradas en la sinapsis como son sinaptofisina, sinaptopodina y PSD-95 (Reddy

and Beal 2008). Además, en ensayos *in vivo* e *in vitro* se ha demostrado que oligómeros de A β , tanto los sintéticos como los endógenos, pueden reducir la potenciación a largo plazo (LPT)(Walsh, Klyubin et al. 2002). Por otro lado, se sabe que A β puede interactuar con varios receptores, canales y proteínas de membrana, esta interacción con receptores de neurotransmisores conlleva a la disfunción sináptica que está asociada al deterioro cognitivo así como a daño o muerte neuronal (Verdier and Penke 2004). Se ha reportado que A β puede interaccionar con receptores NMDA, AMPA y colinérgicos. También se ha descrito que la proteína priónica celular (PrPC) actúa como un receptor de oligómeros A β , con afinidad nanomolar y media la disfunción sináptica. Se ha descrito que la unión de estos oligómeros receptores Frizzled (Fz) puede inhibir la señalización de Wnt, conduciendo a disfunciones celulares, tales como la fosforilación de tau y por ende a la formación de marañas neurofibrilares. Además, los oligómeros A β pueden inducir la pérdida del receptor de insulina de la superficie neuronal y alterar la actividad cinasa relacionada con potenciación a largo plazo (Sakono and Zako 2010). También se ha visto que altas dosis de A β tienen un efecto pro-oxidante, debido a que la secuencia del péptido posee algunos sitios de unión a metales, en sus primeros 15 aminoácidos está constituido por histidinas en la posición 6, 13, 14 y una tirosina en la posición 10, todos ellos son poderosos sitios de unión a metales, particularmente para Cu $^{2+}$. (Kontush, Berndt et al. 2001). El A β posee la habilidad de reducir Cu $^{2+}$ y Fe $^{3+}$ a Cu $^{+}$ y Fe $^{2+}$, respectivamente. También se sabe que la reducción de estos metales está mediada por una metionina en la posición 35, cuyo grupo sulfuro tiene la capacidad de óxido y, por lo tanto, fácilmente donar electrones. En este sentido, varios estudios han puesto de manifiesto que cuando se sustituye este aminoácido, las propiedades oxidativas de A β se eliminan completamente (Butterfield and Boyd-Kimball 2005). Por otro lado, también se ha visto que la acumulación de A β intracelular está asociada con daño neuronal en la EA. Los estudios *in vitro* han demostrado que la exposición de las mitocondrias a A β induce una disminución en los estados respiratorios 3 y 4, así como una disminución en la actividad de la citocromo C oxidasa y enzimas del ciclo de Krebs (Casley, Canevari et al. 2002). Además se ha establecido que la exposición de las células a A β puede generar un incremento en el calcio intracelular, lo cual está estrechamente relacionado con varios procesos de daño y muerte celular. También se ha descrito que estos oligómeros son capaces de formar poros en la membrana y estos

permiten el flujo anormal de iones, tales como Ca^{2+} , que finalmente causan la disfunción celular (Arispe, Diaz et al. 2007).

1.9. A β y su relación con Neurogénesis y la Enfermedad de Alzheimer

La neurodegeneración inicial en la EA aparece en la corteza transentorrinal y posteriormente se propaga hacia la corteza entorrinal y al hipocampo. Después, la neurodegeneración se disemina a través de los lóbulos temporal, parietal y frontal (Thompson, Hayashi et al. 2003; Thompson, Hayashi et al. 2007). En los estados más tardíos también se afecta la materia gris presentando una pérdida neuronal y de actividad sináptica importante (Scheff, Price et al. 2006). El hipocampo como ya se mencionó, es afectado en la fase temprana de la EA (Taupin 2006). Esta región es uno de los dos nichos neurogénicos que se han descrito en el cerebro adulto. Por lo tanto, el proceso patológico asociado con la EA está íntimamente relacionado con el proceso de neurogénesis. Además la alteración en la neurogénesis podría ser relevante para explicar la progresión de la enfermedad, la cual involucra problemas de memoria y una disminución de las funciones cognitivas. Sin embargo, existe controversia acerca de la alteración del proceso de neurogénesis respecto a su aumento o su disminución (Haughey, Liu et al. 2002; Lopez-Toledano and Shelanski 2007; Rodriguez, Jones et al. 2008; Rodriguez, Jones et al. 2009)

Actualmente no existe un modelo estándar con todas las alteraciones que se observan en la EA, por lo tanto siguen sin entenderse diversos aspectos y mecanismos sobre la misma. Las investigaciones para estudiar la EA se han centrado en la generación de diversos modelos animales en los que se puedan reproducir algunas de las alteraciones neuropatológicas, los cambios en el comportamiento y desregulaciones bioquímicas, tales como las que se presentan en el humano (Gotz, Streffer et al. 2004). Sin embargo, en cuanto a la evaluación del proceso de neurogenesis los resultados han sido controversiales, estos se han evaluado en cerebros post-mortem de pacientes con así como en diversos modelos de ratones transgénicos (Haughey, Nath et al. 2002; Jin, Peel et al. 2004).

Muchas de las moléculas que se alteran en la EA también pueden ser moduladoras del proceso de neurogenesis. . Los más destacados son presenilina-1 (PSEN1) y la forma soluble α de la APP (sAPP). Las mutaciones en PSEN1 y APP causan EA familiar. PS1 regula NPC

diferenciación mientras sAPP regula proliferación de NPCs (Demars, Bartholomew et al. 2011) (Lazarov, Demars et al. 2012). PS1 es el núcleo catalítico de la proteasa aspartil γ -secretasa que escinde numerosos sustratos neurogénicos entre ellos Notch-1, al respecto se ha encontrado que mutaciones en EA familiar relacionados con PS1 suprimen la neurogénesis. Además, ciertos miembros de la familia ADAM son expresados en la ZSV y las mutaciones de estas enzimas están asociadas con la EA debido a que alteran la producción de sus metabolitos o modifican su actividad de procesamiento, dichas enzimas también podrían alterar la neurogenesis (Winner, Kohl et al. 2011).

Estudios previos realizados en animales transgénicos de la EA, han mostrado alteraciones significativas en el proceso de neurogénesis en el hipocampo adulto, ciertos modelos de ratones presentan una disminución en el proceso mientras que otros muestran un aumento ((Wen, Hof et al. 2004; Donovan, Yazdani et al. 2006). La mayoría de los estudios realizados en animales transgénicos expresan la APP mutante, demostrando una disminución en el proceso de neurogenesis en el GD del hipocampo, así como en la ZSV. Sin embargo, en otro estudio realizado en ratones transgénicos con la mutante APP^{swe}, el aumento en la neurogenesis está ligado a la presencia de oligómeros A β (Jin, Galvan et al. 2004; Lopez-Toledano and Shelanski 2007). En ratones transgénicos que expresan varias mutantes de presenilinas, se han observado resultados contradictorios, tanto aumento como disminución en la neurogenesis (Chevallier, Soriano et al. 2005). Por ejemplo, Zhang et al utilizo mutantes de APP, PS1 y la combinación de ambos, es decir, mutantes APP-PS1 y solo observo disminución de neurogenesis en el ratón doble Knock-in.

También se ha observado un incremento en la neurogenesis tanto *in vivo* como *in vitro* después de una exposición a A β 42 (Sotthibundhu, Li et al. 2009). La microinyección de A β 1-42 o 25-35 (1 mM) en los ventrículos laterales provoca una disminución en la proliferación celular de la ZSV después de 5 días (Haughey, Liu et al. 2002). En un estudio diferente, en ensayos *in vitro* los oligómeros de A β 1-42 favorecen la diferenciación neuronal de NPCs tanto embrionarias como postnatales (Lopez-Toledano and Shelanski 2004)

Estudios recientes han demostrado, que existe un incremento aparente en la expresión de marcadores de neurogénesis en el cerebro de pacientes con la EA; y que quizás pudieran estar asociados a la glia o a cambios en la vasculatura (Boekhoorn, Joels et al. 2006). Análisis de

tejido de cerebros post-mortem de pacientes diagnosticados con EA muestran una disminución en las células progenitoras en la ZSV pero un aumento de estas células en el GD del hipocampo (Jin, Peel et al. 2004).

Recientemente, en el modelo del triple transgénico (3xTg-AD), el cual presenta tres genes mutados para APP_{swe}, PS1_{M146V} y para tauP301L, se encontró alteración en el proceso de neurogenesis en ambas regiones neurogénicas, ZSV Y ZSG del hipocampo. En ambas regiones se encontraron nuevas células generadas las cuales se detectaron con marcadores de proliferación como BrdU, Ki67, PCNA y HH3 (Oddo, Caccamo et al. 2003; Oddo, Caccamo et al. 2003).

1.10. Vía de la PI3-K

La PI3-K está implicada en la vía de supervivencia que permite hacer frente a varios estímulos apoptóticos. Se han caracterizado tres clases de PI3-K con base en la estructura proteica y a la preferencia hacia sus sustratos (Vanhaesebroeck y Waterfield, 1999; Cantrell 2001). La clase I es la que mejor se ha estudiado y la que ha sido relacionada con fenómenos de supervivencia; en cambio, la función de la clase II todavía no se conoce exactamente, y por último, se cree que la PI3-K clase III participa en el tráfico vesicular. La PI3-K de clase I está constituida por una subunidad reguladora (p85) y una subunidad catalítica (p110), las cuales están asociadas de manera constitutiva.

Cuando el factor trófico se une específicamente a su receptor, la PI3-K es reclutada de las proximidades de la membrana plasmática. La subunidad catalítica de la PI3-K genera los fosfoinosítoles fosfatos (fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato (PIP2) fosfatidilinositol (3,4,5) trifosfato (PIP3) en la membrana citoplasmática interna, los cuales presentan una afinidad diferencial para varias proteínas diana, entre las que destaca la serina/treonina quinasa Akt/PKB (Kaplan y Miller, 2000; Brunet, 2001). Se ha descrito también que la estimulación de la PI3-K a través del receptor Trk puede estar afectada por la localización intracelular del receptor. Cuando la endocitosis de los Trk está inhibida, el NGF incrementa aún más la actividad de la PI3-K, sugiriendo que la estimulación de la PI3-K tiene lugar en la membrana plasmática más que en los endosomas (York, 2000; Zhang, 2000; MacInnis y Campenot, 2002). La activación de la PI3-K a través de los receptores Trk se puede dar de dos maneras distintas: (1) la subunidad reguladora de la PI3-K se une a proteínas que sirven de enlace,

como son el factor de crecimiento de unión al receptor de proteína 2 (Grb-2) y/o la proteína de unión a Grb2 (Gab1/2) (Liu y Rohrschneider, 2002), y (2) la subunidad catalítica de la PI3-K se une directamente a proteínas de la familia Ras (Holgado-Madruga, 1997; Downward 1998; Vaillant, 1999). Es importante destacar que en ausencia de estas proteínas adaptadoras la PI3-K no se puede activar (Mazzoni, 1999; Kaplan y Miller, 2000; Huang y Reichardt, 2001). Además, se ha descrito que los factores tróficos necesitan la presencia de calmodulina, una proteína quelante de calcio, para la activación de la PI3-K en motoneuronas, lo que sugiere que existen otros componentes reguladores (Soler, 1998).

La cinasa Akt es una de las dianas de PI3-K más estudiada, observándose que es necesaria y suficiente para promover la supervivencia neuronal. Existen varios sustratos de esta cinasa que están implicados en diferentes pasos de las vías de muerte celular (Datta, 1999; Yuan y Yankner, 2000), entre los que destacan las proteínas pro-apoptóticas Bad (Datta) y la caspasa 9 (Cardone, 1998), la proteína cinasa GSK-3 β (del inglés, *glycogen synthase kinase 3- β* ; Pap y Cooper, 1998; van Weeren, 1998; Hetman, 2000), y factores de transcripción como los de la familia forkhead (Brunet, 1999; Kops, 1999), CREB (Walton y Dragunow, 2000) y la cinasa I κ B, proteína que regula de forma negativa a NF κ B (Foehr, 2000). Trabajos en los cuales se ha utilizado el dominante negativo de Akt han demostrado que éste bloquea la supervivencia neuronal en presencia de factores tróficos, lo que sugiere que la expresión de Akt activada es suficiente para promover la supervivencia aún en ausencia de factores tróficos (Datta, 1999). Akt puede inducir la supervivencia neuronal mediante otros mecanismos, como por ejemplo, bloqueando la acción pro-apoptótica de p75NTR (Miller y Kaplan, 2001). La activación de la vía de la PI3-K por factores tróficos y sus efectos sobre la supervivencia se han demostrado en varias poblaciones neuronales, como las neuronas estriatales (Stroppolo, 2001; Perkinson, 2002), neuronas corticales (Hetman, 1999; Yamada, 1997, 2001), células granulares de cerebelo (Nonomura, 1996), neuronas simpáticas (Creedon, 1997; Vaillant, 1999; Tsui-Pierchala, 2000), neuronas hipocámpales (Righi, 2000), y motoneuronas (Dolcet, 1999; Soler, 1999; Nishimune, 2000). Se han observado además, cambios en la actividad o en los niveles de PI3-K tras una isquemia cerebral, después de una lesión axonal en las motoneuronas (Jin, 2000; Sakurai, 2001), así como en la esclerosis lateral amiotrófica (Wagey, 1998), en la corea de Huntington (Humbert, 2002; Gines, 2003), y en la enfermedad de Alzheimer (Zubenko., 1999). Además de la implicación de la vía de señalización PI3-K en la supervivencia neuronal,

también se ha demostrado que puede tener un papel importante en fenómenos de diferenciación como la extensión neurítica, o la elongación y ramificación axonal (Atwal, 2000; Sanchez, 2001, Markus, 2002; Dijkhuizen y Ghosh, 2005).

II. ANTECEDENTES

Como se mencionó anteriormente, a los péptidos de A β se les ha atribuido un efecto neuroprotector. En relación a ello, se ha demostrado que los monómeros A β inducen la supervivencia de las neuronas en desarrollo en virtud de privación de factores tróficos y protegen las neuronas maduras contra la muerte celular causada por excitotoxicidad (Giuffrida, 2009). También se ha demostrado que el péptido A β es neurotrófico cuando se añade en concentraciones bajas en cultivos de células neuronales del hipocampo (Yankner, 1990). Además, el A β 1-40 y A β 1-42 estimulan la proliferación de las células progenitoras neuronales aisladas de la corteza cerebral de la rata en estado embrionario E18 (Chen, 2009). Además, el A β 1-40 induce la diferenciación neuronal de las células progenitoras, mientras que A β 1-42 promueve la diferenciación glial (Chen y Dong 2009).

Un estudio llevado a cabo por López Toledano en el 2004 demostró que los péptidos de A β no afectan la tasa de proliferación celular de las NPCs aisladas de rata en estado embrionario E15 y en NPCs aisladas de ratón al día posnatal (P0). Sin embargo, estos péptidos aumentan el número total de neuronas *in vitro* de una manera dosis-dependiente. También se ha demostrado que el efecto neurogénico de A β no es dependiente de factores solubles liberados de la progenie de NPCs. Sin embargo, el efecto sobre la neurogénesis *in vitro* sólo fue observado por el A β 1-42, pero no por los péptidos A β 1-40 o el A β 25-35, destacando que el efecto benéfico parece ser una propiedad de oligómeros y no de las fibrillas.

Recientemente, Chaejeong en el 2007, realizó un estudio con péptidos de A β en forma monomérica, oligomérica y fibrilar, donde evaluó los efectos sobre la proliferación y diferenciación de NPCs adultas aisladas de la ZSV. Respecto al grado de agregación o concentración de los péptidos se encontró que una concentración micromolar (1 μ mol/L) de oligómeros A β 42 aumenta notablemente la proliferación de CPNs adultas en un ensayo basado en la formación de neuroesferas. También, el péptido aumentó la diferenciación neuronal y la migración de estas células.

III. JUSTIFICACIÓN

Diversos estudios han sugerido que los péptidos de A β poseen tanto propiedades neurotóxicas, como neurotróficas. Dentro de las propiedades neurotróficas se ha sugerido que el A β soluble juega un papel importante en la plasticidad sináptica y en los procesos de aprendizaje y memoria, así como en la neurogénesis de la zona subventricular. Sin embargo, se desconoce el efecto del A β sobre la neurogénesis hipocámpica y los mecanismos moleculares involucrados. Por tal motivo, este trabajo busca conocer y comprender los mecanismos que subyacen al efecto del A β sobre el proceso neurogénico utilizando un sistema controlado in vitro de NPCs aisladas del giro dentado del hipocampo de roedores adultos.

IV. HIPÓTESIS

Los oligómeros de A β pueden activar los mecanismos celulares que promueven los eventos de proliferación y diferenciación en las CPNs aisladas del giro dentado del hipocampo de roedores adultos.

V. OBJETIVOS

A) GENERAL

Estudiar el efecto de los oligómeros A β sobre el proceso neurogénico *In vitro* y los mecanismos moleculares implicados en dicho proceso.

B) PARTICULARES

Obtener y caracterizar las formas solubles de A β (monómeros y oligómeros).

Evaluar el efecto de monómeros y oligómeros A β sobre la viabilidad, proliferación y sobrevivencia celular.

Evaluar el efecto de los péptidos A β en el evento de diferenciación celular (fenotipos celulares).

Analizar algunas de las vías de señalización celular a través de las cuales los péptidos A β podrían modular la neurogénesis a partir de CPNs del giro dentado del hipocampo de roedores adultos.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

VI. 1. Aislamiento de NPCs de hipocampo de ratón adulto

Las NPCs fueron aisladas de hipocampo de ratones adultos de la cepa C57BL6, como ha sido reportado a detalle por Babu, 2007, 2011.

VI. 2. Cultivo de NPCs

Los cultivos celulares se mantuvieron en una incubadora a una temperatura de 37°C, concentración de CO₂ del 5% y una humedad relativa del 95%. Toda la manipulación y tratamiento de los cultivos se realizó en condiciones de esterilidad y dentro de campanas de flujo laminar.

Las placas donde se sembraron las CPNs, fueron tratadas con poli-D-lisina (10µg/ml, Sigma) diluida en H₂O milliQ durante toda una noche. Al día siguiente se lavaron con H₂O milliQ 2 veces y se trataron con laminina (10µg/ml, Sigma) diluida en NB durante 2-3 horas a 37°C. Después se removió el exceso de la placa y las células fueron sembradas directamente en la superficie.

Los cultivos fueron mantenidos en medio de proliferación que consistió en medio Neurobasal Completo (NBC: neurobasal (NB) 2% suplemento B27, 1% de Glutamax, 1% Pen-Strep,) adicionando factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF, 20 ng/mL), factor de crecimiento epidermal (EGF, 20 ng/mL). A los cultivos celulares se les realizó cambio de medio cada tercer día.

VI. 3. Pase del cultivo de NPCs

Los precursores neuronales pueden ser pasados a nuevas placas y conservados a lo largo del tiempo. Para ello se retira el medio de cultivo y se realiza un lavado de 1 minuto con NB atemperado. Añadimos Tripsina-EDTA (0.05%) durante 3 minutos a 37°C para despegar las células de la placa. La acción de la tripsina se diluyó con el doble de volumen de neurobasal complementado (NBC). Se centrifugó la suspensión celular 5 minutos a 1000 rpm. Se descartó el sobrenadante, se añadió medio de proliferación fresco y se volvieron a sembrar sobre placas tratadas como se explicó anteriormente.

VI. 4. Diferenciación celular

Para inducir diferenciación de las NPCs, a las células se les retiro el medio de proliferación y este fue sustituido con neurobasal complementado, al cual se le adicionó 5ng/mL de bFGF por dos días, transcurridos estos días el medio fue remplazado por neurobasal complementado libre de mitógenos, es decir, sin bFGF y sin EGF, este mismo medio fue utilizado para mantener la diferenciación de las células durante 2, 4 y 6 días.

VI. 5. Tratamiento celular

Las NPCs fueron cultivadas durante 24 o 48 horas en medio de proliferación, posteriormente para los tratamientos se les removió el medio y se cambio por medio neurosabal solo o neurobasal complementado, según el objetivo de cada experimento.

Bajo las condiciones anteriores, se administraron los tratamientos con oligómeros de A β 42 y A β 40 a diferentes concentraciones y tiempos.

VI.6. Preparación de oligómeros de A β

Los oligómeros son preparados de acuerdo al protocolo estándar reportado por Klein (2002). Brevemente, los péptidos liofilizados A β 40 y A β 42 (Anaspec) fueron resuspendidos en 100% de 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) (Sigma-Aldrich) para obtener una concentración final de 1mM. La solución A β -HFIP fue incubada a temperatura ambiente por 60 minutos, posteriormente colocada en hielo por 5-10 minutos y se prepararon alícuotas. Esta solución se dejó evaporar toda la noche en campana de extracción, al día siguiente se transfirieron los tubos al SpeedVac y se secaron por 10 minutos para remover todo el HFIP, la película clara y delgada obtenida en el fondo del tubo fue almacenada a -80°C. Para preparar los oligómeros, primero la película clara de A β fue resuspendida en DMSO para obtener una concentración de 5mM, después se hizo una segunda dilución en medio F12 sin rojo de fenol, obteniendo un stock de 100 μ M. Esta preparación se incubó por 24 horas a 4°C. Transcurrido el tiempo, se centrífugo a 14,000 g por 10 minutos, a 4°C. El sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo y se realizaron alícuotas.

VI. 7. Microscopía de fuerza atómica para el análisis oligómeros de A β

Las muestras de A β 40 y A β 42 se colocaron en forma de gota sobre un cubreobjetos de vidrio previamente estéril. Se dejó secar la gota por 2-3 días a temperatura ambiente. En el microscopio de fuerza atómica (JSPM-5200), se usaron cantilevers limpios con punta de cromo dopada con silicio y con punta de aluminio recubierta con oro, con resonancia 82.965 kHz y 340.353 kHz respectivamente. Utilizamos el modo de tapping a una velocidad de 667.6 μ s y 333. μ s en campos de 2 μ m, 1 μ m, 540 nm y 347 nm.

VI. 8. Western Blot y Cinética de oligomerización

Se tomo una alícuota de 3 μ L de la preparación de los oligómeros de A β 40 y A β 42 recién preparados y se corrieron en un gel de acrilamida (15%) en condiciones desnaturalizantes, el cual se corrió a 110 Volts durante 90 minutos. Posteriormente se hizo la transferencia del gel a membrana de nitrocelulosa, la cual se transfirió durante 45 minutos a 500 mA. Después se realizó el bloqueo de la membrana durante 90 minutos con TBS-Tween20 0.05% más 5% de leche baja en grasa y transcurrido el tiempo de incubación se realizó la incubación de los anticuerpos primarios (6E10 dilución 1:1500, monoclonal de ratón y 4G8 dilución 1:1000, monoclonal de ratón), estos se incubaron durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se colocó el anticuerpo secundario (HRP anti-mouse, 1:5000) durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente, los oligómeros fueron visualizados utilizando el sistema ECL (Enhanced Chemiluminescence Detection System, Inmobilon). Este mismo procedimiento se realizó para caracterizar la cinética de oligomerización de los péptidos A β 40 y A β 42, estos péptidos se incubaron en medio NBC a 37°C y después de 24, 48 y 72 horas se tomaron 3 μ L de las diferentes concentraciones [10, 100 y 500 pM, 1, 100 y 500 nM, 1 y 5 μ M] y se corrieron bajo las condiciones anteriores.

VI. 9. Ensayo de viabilidad celular (liberación de lactato deshidrogenasa, LDH Assay)

Las NPCs fueron cultivadas durante 48 horas en condiciones de proliferación, que ya se mencionaron anteriormente, al llegar a una confluencia entre 70 y 80% se realizaron los ensayos. Se realizó el cambio de medio a neurobasal, enseguida se colocaron las diferentes concentraciones de A β 40 y A β 42 [10, 100 y 500 pM, 1, 100 y 500 nM, 1 y 5 μ M]. Los

tratamientos se siguieron por 24, 48 y 72 horas. Los ensayos se realizaron en placas de 96 pozos, al transcurrir cada uno de los tiempos, se tomaron 50 μ L del medio de cada uno de los tratamientos (células muertas) y se transfirió a otra placa y esta fue incubada a 4°C. Posteriormente, se retiró el medio restante de los tratamientos y se realizaron 2 lavados con medio neurobasal, para remover el permanente de LDH, después se adicionaron 100 μ L de medio fresco y se le agregó 10 μ L de solución de lisis 10X a cada pozo, se incubó por 45-60 minutos a 37°C. Transcurrido el tiempo se transfirieron 50 μ L de este medio a una placa nueva (células vivas). Se tomó la placa que se había guardado a 4°C y junto con esta última placa, a ambas se les adicionó 50 μ L de sustrato mix a cada pozo, se incubaron las placas a temperatura ambiente durante 30 minutos en agitación, protegidas de la luz. Se adicionó a cada pozo 50 μ L de la solución de paro y se leyeron las placas a 490 nm de absorbancia. Los ensayos se realizaron por tetraplicado y cada experimento se repitió 3 veces. Los valores se promediaron (\pm SE) como un porcentaje de la liberación de control.

VI. 10. Ensayo de BrdU por inmunofluorescencia (Kit BrdU Roche)

Las NPCs fueron cultivadas durante 48 horas en condiciones de proliferación, al llegar a una confluencia entre 70 y 80% se realizaron los ensayos. Se realizó el cambio de medio a neurobasal, enseguida se colocaron las diferentes concentraciones de A β 40 y A β 42 [0.1, 1 y 5 μ M] y se mantuvieron por 24, 48 o 72 horas. Dos horas antes de que concluyera cada uno de los tratamientos, se aspiró el medio de cultivo y se adicionó medio neurobasal-BrdU (1:500) en cada pozo, se incubaron las células a 37°C durante una hora. Terminado el tiempo de incubación, se retiró el medio con BrdU, se realizaron tres lavados con el buffer de lavado y las células fueron fijadas con 100 μ L de etanol acidificado durante 20 minutos a -20 °C. Se retiró el fijador, se realizaron 3 lavados y se adicionaron 50 μ L de solución del anticuerpo anti-BrdU (1:20), se incubó durante 1 hora a 37°C. Finalizado el tiempo de incubación, se realizaron 3 lavados, se adicionó 50 μ L del anticuerpo anti-mouseIg-fluoresceinado (1:20) y se incubó por 1 hora a 37°C, protegiéndose de la luz. Posteriormente se realizaron tres lavados, se adicionó 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI, 10 μ g/mL) durante cinco minutos, se realizaron dos lavados y finalmente se montaron las preparaciones con 5 μ L de fluoregel. Las preparaciones fueron observadas en un microscopio Leica, y se realizaron las cuantificaciones de células por campo BrdU positivas con respecto al número total de células positivas a DAPI.

VI. 11. Obtención y preparación de las muestras de proteína

Después de los tratamientos correspondientes para cada experimento, se retiró el medio con vacío, se lavaron las células con PBS1X pH 7.4, y se adicionó buffer RIPA 1X directamente en la placa, se incubó en hielo por 5 minutos y se procedió a recuperar el RIPA con proteína, se guardó la muestra a -20°C toda la noche y al día siguiente la muestra fue resuspendida y centrifugada a 14,000 rpm por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo. Posteriormente, la concentración proteica de cada uno de los extractos se determinó por triplicado mediante el método de BCA (Pierce BCA Protein Assay kit), utilizando BSA como patrón. A los extractos proteicos se les adicionó buffer de carga (LB4X) de acuerdo a la cantidad de proteína y se hirvieron a 85°C durante 5 minutos y se les dio un pulso de centrifugación.

VI. 12. Electroforesis, transferencia e inmunodetección (Western Blot)

De cada extracto se cargaron 20 µg de proteína por pozo. Las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes, a voltaje constante (110 Volts), durante una hora y media. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, a 500 mA durante una hora y media. Para comprobar la eficiencia del proceso de transferencia, las membranas se tiñeron con Rojo Ponceau. Tras la comprobación, se retiró el colorante mediante lavados con TBS-Tween-20 0.05%. A continuación, se bloquearon las membranas utilizando leche en polvo 5% en TBS-Tween-20 0.05% durante una hora en agitación. El siguiente paso fue la incubación con los anticuerpos primarios diluidos en medio de bloqueo a 4°C durante toda la noche y en agitación. Posteriormente, las membranas fueron lavadas 3 veces durante 10 minutos con TBS-Tween-20 0.05%. Para la inmunodetección, las membranas se incubaron durante 1 hora con anticuerpos secundarios, conjugados con HRP, diluidos en medio de bloqueo (1/5000). Por último, se lavaron utilizando TBS-Tween-20 0.05% 3 veces durante 10 minutos cada una. Las proteínas inmunoreactivas fueron visualizadas utilizando el sistema ECL (Enhanced Chemiluminescence Detection System, Immobilon), en el ChemiDoc XRS de BioRad.

VI. 13. Inmunofluorescencia

Las células fueron fijadas con formaldehído al 4% por 20 minutos a temperatura ambiente, seguida de 2 lavados con PBS 1X. Posteriormente las células fueron permeabilizadas con PBS 1X-Tritón X-100 0.5% por 30 minutos, después se bloquearon los sitios inespecíficos de interacción con buffer de bloqueo (1% BSA en PBS 1X-Tritón X-100 0.5%) durante una hora a temperatura ambiente. En seguida se adicionaron los anticuerpos primarios los cuales fueron diluidos en el buffer de bloqueo e incubados durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las células fueron lavadas 3 veces con PBS 1X-Tritón X-100 0.5%, enseguida se realizó la incubación de los anticuerpos secundarios (1:500, Alexa-Fluor), incubados durante 1 hora a temperatura ambiente. Después se realizaron nuevamente 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS 1X-Tritón X-100 0.5%, seguida de la tinción con DAPI (10 µg/mL) por 5 minutos. Finalmente, las células se lavaron dos veces con PBS1X y fueron montadas con 5 µL de fluorogel. Las preparaciones fueron visualizadas con los objetivos de 10X y 20X de un microscopio Nikon Eclipse de fluorescencia, equipado con una cámara.

VI. 14. Análisis de la participación de la vía de señalización Akt (PathScan Akt Signaling Antibody Array Kit)

Las NPC fueron tratadas con concentraciones de 0.5, 1 y 5 µM de Aβ40 durante 72 horas, transcurrido este tiempo, se removió el medio de las células, se lavaron una vez con PBS1X frío, se removió el PBS1X y se adicionó el buffer de lisis celular y se incubó por 2 minutos en frío. La placa fue inclinada y se recolectó el lisado celular en un tubo nuevo. Inmediatamente antes de realizar el ensayo, el lisado fue diluido a 0.2 – 1.0 mg/ml de proteína en el buffer diluyente del arreglo, para esto, la proteína fue cuantificada previamente por el método de BCA. Por otro lado, el arreglo de anticuerpos fue ensamblado, posteriormente a cada pozo se le adicionaron 100 µL de buffer de bloqueo del arreglo y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente, en un agitador orbital. Después se decantó el contenido de los pozos, y se adicionaron 50 -75 µL del lisado celular diluido y se incubó toda la noche a 4°C en un agitador orbital. Al día siguiente se decantó la solución y se adicionaron 100 µL de buffer de lavado a cada pozo y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente, este paso se repitió 3 veces más. Posteriormente se adicionaron 75 µL del cocktail de anticuerpos de detección a

cada pozo y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente en un agitador orbital. Seguido a esto, se realizaron 4 lavados de 5 minutos cada uno con el buffer de lavado, se adicionaron 75 µL de streptavidina-ligada a HRP y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente, se volvieron a realizar 4 lavados de 5 minutos con buffer de lavado. Finalmente, la membrana fue revelada con reactivo LumiGlo/Peroxidasa en el ChemiDoc XRS de BioRad.

VI. 15. Análisis de los factores solubles contenidos en el medio condicionado (Mouse Antibody Array-L308 Membrane Kit)

Las células precursoras se cultivaron bajo las condiciones de proliferación mencionadas anteriormente a una densidad inicial de 1×10^5 células/cm²; cuando tuvieron una confluencia de aproximadamente 80-90% (a las 48 horas) el medio de cultivo fue cambiado por medio neurobasal complementado y tratado con Aβ40 durante 72 hora y después el medio fue recolectado. Las células flotantes y los desechos celulares se removieron por centrifugación (1000 rpm, 5 minutos). El medio se alicuotó y almacenó a -70°C. El medio de cultivo obtenido bajo esta condición se denominó medio condicionado Aβ40. De igual manera se obtuvo un medio de cultivo de células solo con medio neurobasal complementado, que se trató bajo las mismas condiciones de centrifugado y almacenamiento que el medio condicionado Aβ40. Dicho medio fue designado como medio condicionado control. Ambos medios de cultivo fueron utilizados para determinar las proteínas o factores solubles presentes en cada uno de ellos.

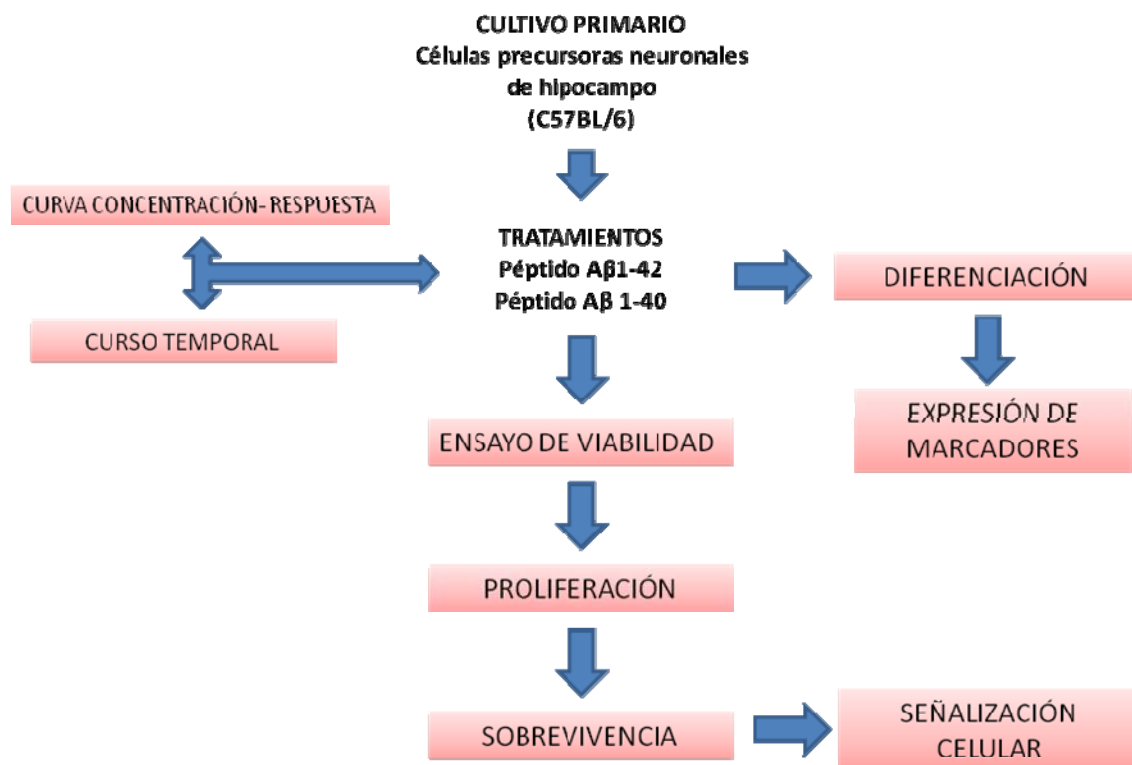
Tres mililitros del medio condicionado se dializaron con 2 litros de PBS 1X a 4°C durante 3 horas, los 2 litros de PBS 1X se retiraron y se colocaron otros 2 litros de solución amortiguadora para continuar dializando durante 3 horas adicionales. Terminada la diálisis, 2ml de la muestra se transfirieron a un tubo nuevo y se le agregaron 40µl del control interno. Una vez realizada la mezcla se adicionó el reactivo de marcaje y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos con agitación suave. Finalizada la incubación, se agregaron 5µl de la solución de paro y los 2ml de la muestra se colocaron en una columna para remover la biotina libre. Posteriormente, se agregaron 8ml de la muestra, previamente diluida con solución amortiguadora de bloqueo, a la membrana con los anticuerpos, la cual fue previamente bloqueada durante una hora a temperatura ambiente con una solución amortiguadora de bloqueo. La membrana se incubó toda la noche a 4°C con agitación suave.

Una vez concluida la incubación, la muestra se decantó y se hicieron tres lavados a la membrana con 20ml de solución de lavado I 1X a temperatura ambiente y agitación durante 5 minutos. Terminados los lavados se hizo un lavado con la solución de lavado II. Una vez que se decantó la solución de lavado II durante el último lavado, se agregaron 8 ml de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (HRP) diluida 500 veces. Se incubó a temperatura ambiente con agitación suave durante 2 horas. Se volvió a lavar tanto con el buffer de lavado I como con el II. Finalmente, se agregó el buffer de detección, se incubó durante 2 minutos en agitación y se expuso durante 300 segundos al ChemiDoc XRS de BioRad. Para el análisis de los resultados obtenidos a partir de la membrana, se procedió a normalizar la intensidad de todos los puntos con respecto al control interno presente en el arreglo. Para la obtención de las intensidades de cada punto se utilizó el programa Imagelab.

VI. 16. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo utilizando el programa GraphPad Prism 5. Los gráficos representan los valores medios \pm S.E.M. (error estándar de la media)). La mayoría de los datos se ajustaron a los criterios de normalidad y se aplicó el análisis de la varianza (ANOVA) de una vía seguido de la prueba post hoc apropiada.

VI. 17. Diagrama de flujo



VII. RESULTADOS

VII. 1. Caracterización de NPCs en condiciones de proliferación

Para la realización de este trabajo, lo primero que se hizo fue la caracterización del modelo experimental, es este caso, las CPNs derivadas de la zona subgranular del giro dentado de hipocampo de roedores adultos. Para este estudio utilizamos cultivos en pasajes del 25 al 30. En la figura 6 se muestran imágenes representativas de las NPCs, primero se corroboró que estas células fueran capaces de formar neuroesferas cuando son cultivadas en suspensión, esta es una de las particularidades de este modelo y cuando son cultivadas en condiciones de adherencia presentaron una morfología ahusada y bipolar, Figura 6A. Para comprobar si aún están en estado no diferenciado, se realizó la evaluación de la expresión del marcador nestina, una proteína de filamentos intermedios, específico para NPCs no diferenciadas, obteniendo en nuestros cultivos un 97% de células positivas a este marcador, Figura 6C. Además,

observamos que estas células presentan capacidad proliferativa al incorporar 5-bromo-2-deoxyuridina (BrdU), un análogo de la timidina; y expresar a la histona 3 en estado fosforilado (pH3). El análisis refleja que el 11% de las NPCs se encontraba en mitosis, (células positivas a pH3) y que un poco más del 50% se encontraban en fase S, (células positivas a BrdU), Figura 6B, C.

VII. 2. Caracterización de NPCs en condiciones de diferenciación

La segunda característica que identifica a estas NPCs es su multipotencia, la cual se entiende por la capacidad de generar diferentes tipos celulares, de linaje neuronal y glial. La determinación de las diferentes poblaciones celulares surgidas a partir de la diferenciación de las CPNs después de 6 días se analizó por inmunofluorescencia. Para esto se cuantificó el número de astrocitos que expresaron a la proteína GFAP (proteína ácida fibrilar glial) que es un marcador característico de astrocitos maduros de cerebro. Las neuronas generadas en vitro se identificaron con la expresión de la proteína MAP2 (Microtubule-associated protein 2) o bien con la proteína nuclear NeuN (nucleo neuronal). El resultado mostró que el 63% de las células fueron positivas a GFAP, el 27% a MAP2 y el 10% aún expresaron la proteína nestina (Figura 7). Además del marcador neuronal MAP2, se utilizó la proteína nuclear neuronal NeuN, cuya proporción fue del 23%. De acuerdo a lo anterior, se identificaron tres tipos de poblaciones celulares a partir de la diferenciación de las células precursoras neuronales: neuronas, astrocitos y células precursoras.

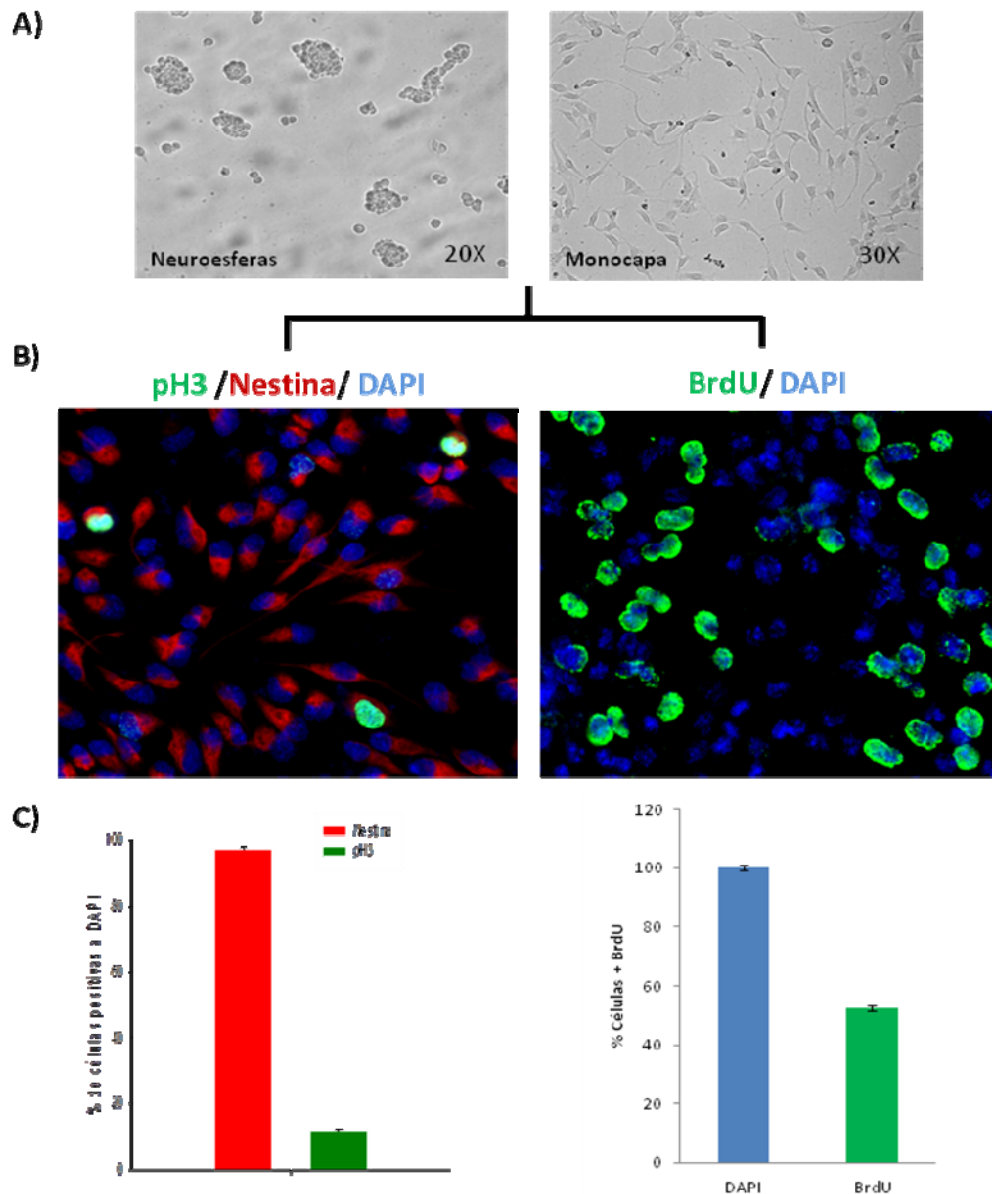


Figura 6. Caracterización de NPCs en condiciones de proliferación. A) Imágenes de campo claro de NPC en suspensión (neurosferas) y cultivadas en adherencia (monocapa). B) Imágenes representativas de inmunofluorescencias del marcador Nestina (rojo), proliferación con pH3 y BrdU (verde) y núcleos teñidos con DAPI (azul). C) Gráficas que muestran los porcentajes de células positivas al marcador de células no diferenciadas Nestina, así como el marcador de células en proliferación pH3 y BrdU, respectivamente. Los datos se presentan como el promedio \pm error estándar.

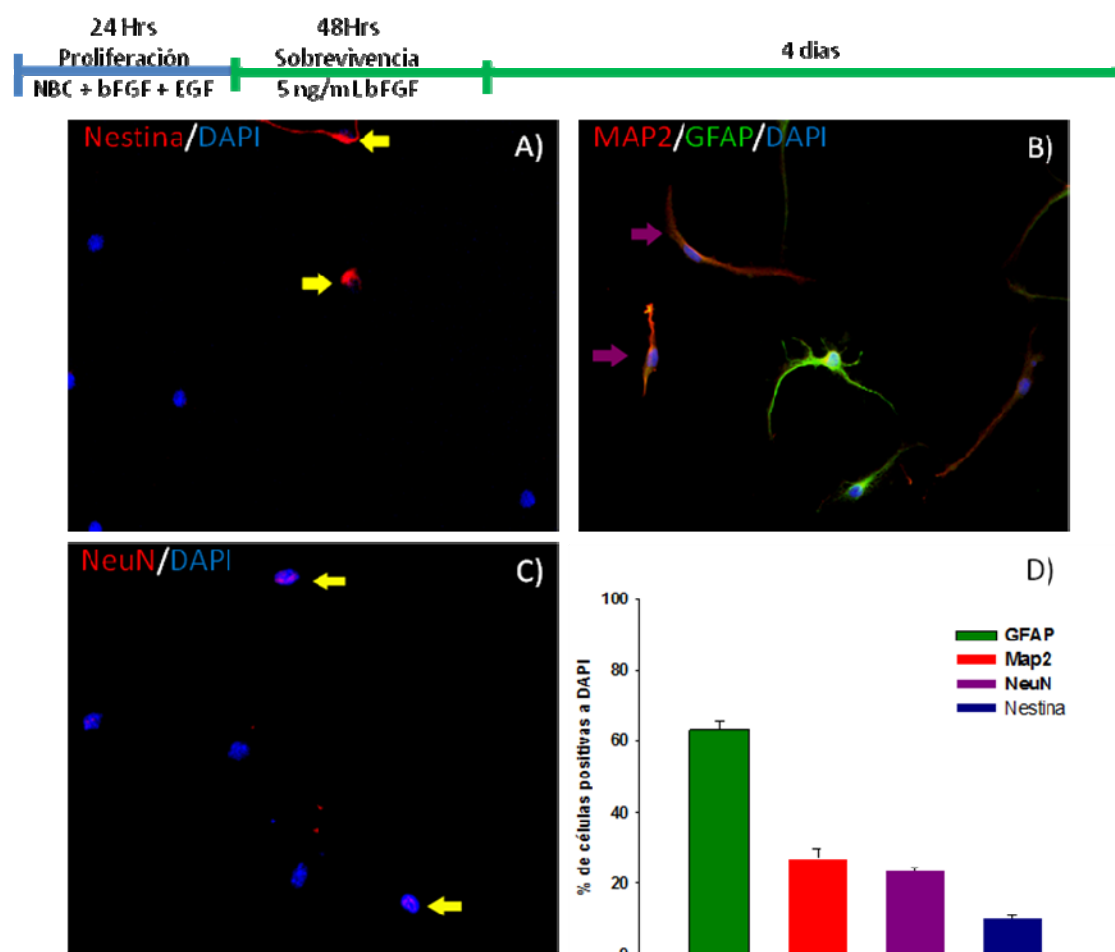


Figura 7. Caracterización de NPCs en condiciones de diferenciación. Diseño experimental en donde se indican los días en donde se realizan los cambios de medio y las condiciones correspondientes durante 6 días y así obtener células diferenciadas a partir de NPCs. A) Células Nestina + (rojo), B) células GFAP + (verde), MAP2 + (rojo), C) Células NeuN + rojo), y en todas DAPI + en azul. D) Gráfica en donde se muestran los porcentajes de las diferentes poblaciones obtenidas después de 6 días de diferenciación *in vitro*. Los datos se presentan como el promedio \pm error estándar.

VII. 3. Obtención y caracterización de los oligómeros de A β

Los oligómeros de A β 40 y A β 42 se prepararon siguiendo lo reportado por Klein en 2002. Microscopía de fuerza atómica se utilizó para analizar la morfología y observamos en ambas preparaciones formas esféricas, que en el caso de los oligómeros de A β 42 son más grandes que las de A β 40, Figura 8.

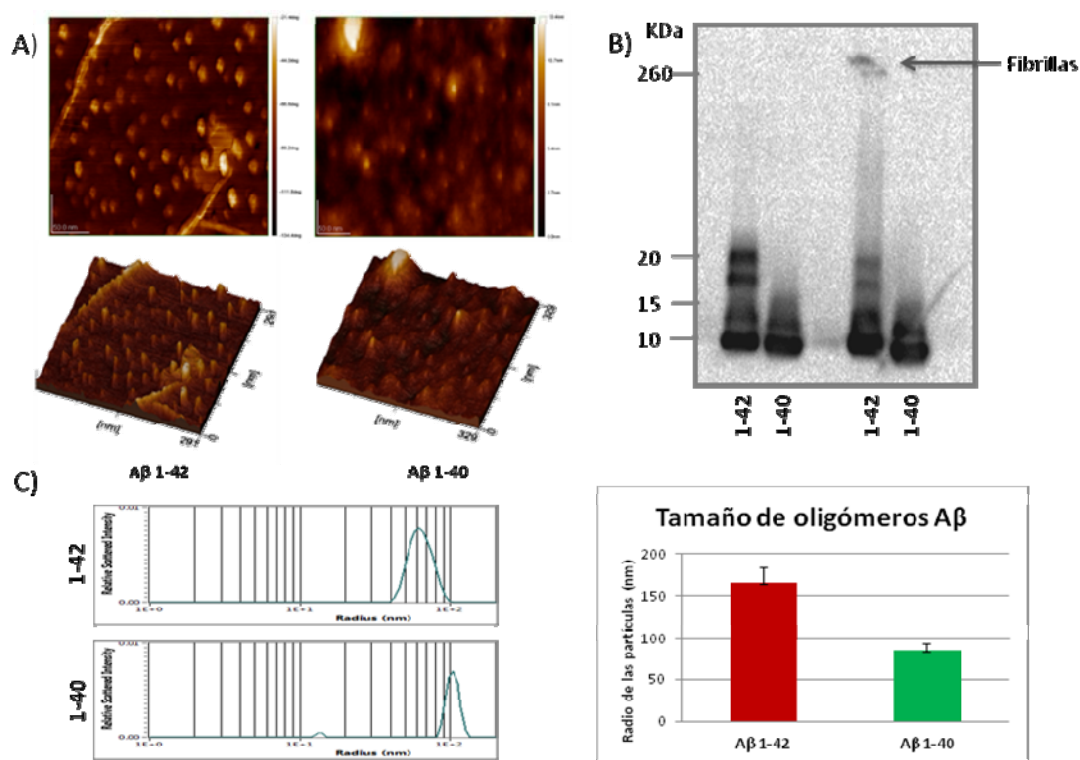


Figura 8. Caracterización de oligómeros de Aβ. A) Imágenes representativas de microscopia de fuerza atómica ambos péptidos Aβ42 y Aβ40, que muestra la superficie de las pequeñas formas oligoméricas esféricas. B) Western blot con el anticuerpo 6E10, (aa 1-16) para ambos péptidos de amiloide. C) Gráficas representativas de la distribución de los oligómeros en los ensayos de DLS.

También se hizo una caracterización de los oligómeros a través de western blot, utilizando el anticuerpo 6E10, que reconoce la secuencia del aminoácido 1 al 16 de Aβ. Los resultados muestran que se obtuvieron oligómeros Aβ42 con un peso molecular aproximado de 10, 12, 18 y 20 kDa, mientras que para los oligómeros de Aβ40 solo se observaron oligómeros con peso de 10 y 12 kDa aproximadamente, Figura 8B. Aunado a lo anterior, se hizo una técnica llamada DLS (por sus siglas en inglés *Dynamic light scattering*), la cual es utilizada para medir el tamaño y distribución de partículas en solución. Se observó que las partículas de Aβ42 medían aproximadamente 160 nm de diámetro, mientras que los oligómeros de Aβ40 miden casi la mitad de tamaño, es decir casi 80 nm de diámetro, Figura 8C. Todas las técnicas utilizadas nos ayudaron a corroborar la presencia de oligómeros de Aβ42 en la preparación, esto fue muy importante antes de empezar los tratamientos, tener la certeza de que los efectos

vistos en cualquiera de los ensayos eran específicamente por oligómeros y no por otra forma de agregación.

VII. 4. Cinética de oligomerización.

Una vez obtenidos y caracterizados los oligómeros de A β 40 y A β 42, se planteo la siguiente cuestión basándonos en que está bien descrito y reportado que uno de los factores que promueven la agregación de los péptidos de A β , es la temperatura, aunado a otros factores como pH, fuerza iónica, tiempo de incubación, etc., por tal motivo, se hizo una cinética de oligomerización de estos péptidos, incubándolos a 37°C solo con el medio de cultivo donde se iban a realizar los tratamientos, para determinar que tanto se agregan durante los ensayos. Ambos péptidos A β 42 y A β 40, se incubaron a diferentes concentraciones en medio neurobasal complementado, durante 24, 48 y 72 horas, mismos tiempos de incubación que se habían considerado para realizar ensayo más adelante, pero en presencia de NPCs. La agregación de los oligómeros se evaluó por Western blot. Para el caso de los oligómeros de A β 42 a las 24 horas observamos solo formas oligoméricas de un poco más de 10 Kda de peso, sin embargo a las 48 horas se empezaron a ver agregados más grandes y finalmente a las 72 horas de incubación si observaron agregados de aproximadamente 260 KDa, lo que quizás podría indicar la formación de protofibrillas o fibrillas, Figura 9A Mientras que para los oligómeros de A β 40, la agregación es casi la misma para los tres tiempos de incubación, solo de observaron oligómeros de bajo peso molecular. Figura 9B.

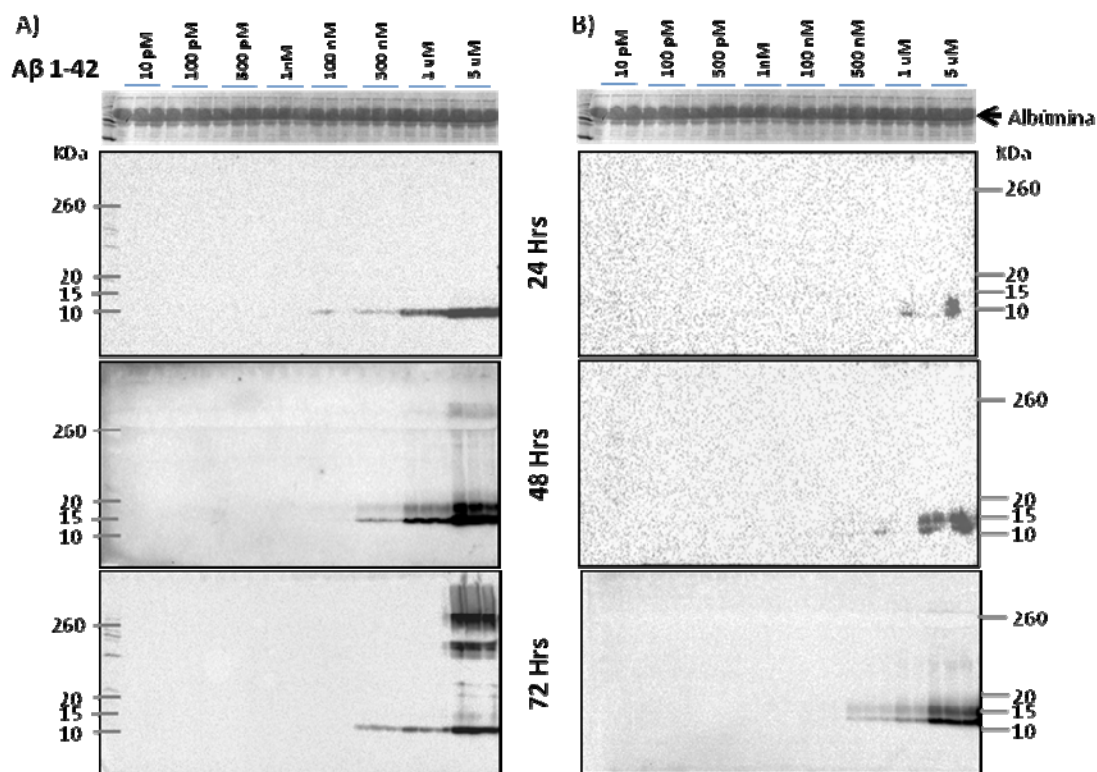


Figura 9. Caracterización de oligomerización de Aβ. A) Western blot representativo de formación de oligómeros a 24, 48 y 72 horas, a diferentes concentraciones de Aβ42. B) Western blot representativo de formación de oligómeros a 24, 48 y 72 horas, a diferentes concentraciones de Aβ40. Ambos incubados a 37°C.

VII. 5. Efecto de los oligómeros de Aβ sobre la viabilidad celular

Para investigar los efectos de los oligómeros de Aβ sobre viabilidad celular, se utilizaron diferentes concentraciones de los oligómeros Aβ42 y Aβ40, [10, 100 y 500 pM, 1, 100 y 500 nM, 1 y 5 μM], y como controles, utilizamos NPCs que se mantuvieron durante los tratamientos con NB (control de muerte), NBC que fueron las condiciones en las que se aplicaron los tratamientos, NPCs mantenidas en NBC más 5 ng de bFGF (control sobrevivencia), y NPCs en condiciones de proliferación, es decir, con ambos factores de crecimiento, bFGF y EGF. Todos los tratamientos y controles fueron evaluados a las 24, 48 y 72 horas, aún ensayo de LDH (lactato deshidrogenasa), que permite de manera indirecta evaluar el porcentaje de células vivas y muertas en el mismo ensayo, Figura 10.

Los resultados a las 24 horas de tratamiento mostraron que no hay ningún cambio significativo en el porcentaje de células vivas y muertas, ni en las NPCs tratadas con Aβ42 ni con Aβ40. A

las 48 horas de tratamiento tampoco se observaron cambios significativos en la viabilidad celular con los oligómeros de A β ni en los controles. Solamente se observaron diferencias con el control de proliferación, lo cual es predecible, ya que aumentan el número de NPCs vivas debido a que este medio mantiene los factores de crecimiento necesarios para que las células sigan proliferando. A las 72 horas los resultados para los tratamientos con A β 42 no muestran ningún cambio significativo en el porcentaje de células muertas y vivas; encontrando que para las NPCs que fueron tratadas con A β 40 a concentraciones de 0.5, 1 y 5 μ M, hubo un aumento significativo en el porcentaje de células vivas y una disminución también significativa en el porcentaje de células muertas. Estos resultados son evidentes al comparar estos tratamientos de 0.5, 1 y 5 μ M con los controles de NBC y el control de sobrevivencia, muy por arriba de forma evidente de los valores de células vivas. Sin embargo, este porcentaje tampoco alcanza los valores del control de proliferación, sugiriendo así un efecto sobre la sobrevivencia, Figura 10.

VII. 6. Efecto de los oligómeros de A β sobre proliferación celular

Los resultados obtenidos en los ensayos de viabilidad celular, en donde solo se observaron cambios significativos con los tratamientos con oligómeros de A β 40 en las concentraciones de 0.5, 1 y 5 μ M, se evaluaron estas tres concentraciones y los oligómeros y sus efectos sobre el proceso de proliferación. Para ello, las NPCs fueron tratadas con las concentraciones correspondientes de oligómeros de A β 40 durante 72 horas, y 2 horas antes de terminar el tratamiento, se aplicó un pulso de BrdU para marcar las células que en ese momento estuvieran en fase de síntesis del ciclo celular. Utilizando inmunofluorescencia para BrdU realizamos el conteo del número total de células que incorporaron este análogo de la timidina y se analizaron con respecto al número total de células positivas a DAPI en los campos. El resultado obtenido fue que no hay cambio en los conteos de células BrdU+ que fueran tratados con oligómeros de A β 40 comparando con el control NBC y NBC + 5ng bFGF y haciendo la comparación con el control de proliferación, demostramos que las concentraciones de 0.5, 1 y 5 μ M no tienen efecto sobre proliferación, Figura 11.

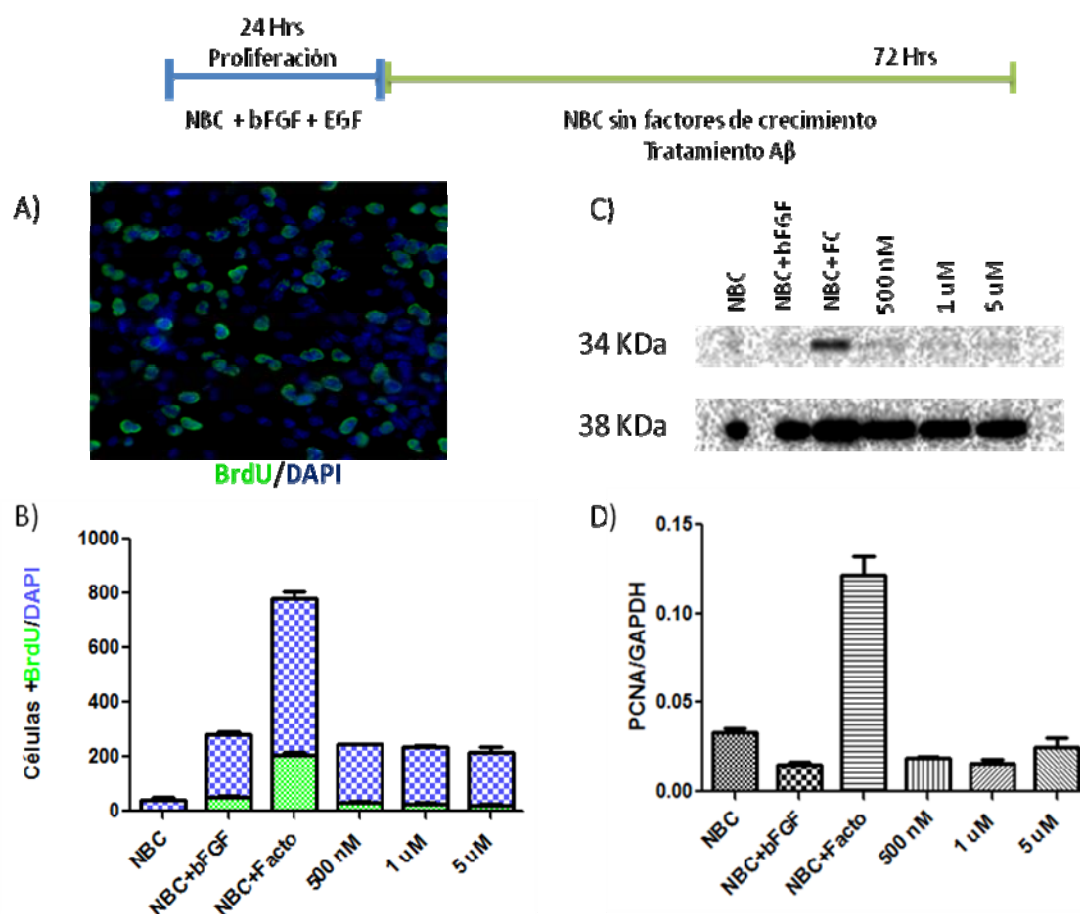


Figura 11. Efecto de oligómeros de A β sobre proliferación celular. A) Micrografía representativa de una inmunofluorescencia marcando Brdu (verde), DAPI (azul). B) Gráfica que muestra la cuantificación del número de NPCs BrdU+ con respecto al número total de NPCs DAPI+, C) Western blot que muestra que los oligómeros de A β 40 no tienen efecto en la expresión de PCNA, D) Análisis densitométrico de la expresión de PCNA. Las estadísticas y gráficas fueron elaboradas a partir de tres experimentos independientes.

VII. 7. Efecto de los oligómeros de A β sobre la diferenciación celular

Para evaluar el efecto de los oligómeros de A β 40 sobre el proceso de diferenciación celular nosotros tratamos a las NPCs con concentraciones de 0.5, 1 y 5 μ M del péptido y evaluamos la expresión de marcadores de linaje neuronal con β -III tubulina y el linaje glial con la expresión de GFAP, a través de western blot e inmunofluorescencia.

Los resultados demuestran que las concentraciones de 1 y 5 μ M promueven un aumento en la expresión del marcador β -III tubulina. Mientras que las NPCs tratadas con concentraciones de 500 nM y 1 μ M de oligómeros de A β 40 aumentan la expresión de GFAP de las células que se diferenciaron por 72 horas, Figura 12. Los resultados obtenidos con estos experimentos nos

demuestran que diferentes concentraciones de oligómeros de A β 40 tienen efecto sobre la capacidad de diferenciación de las NPCs en cultivo.

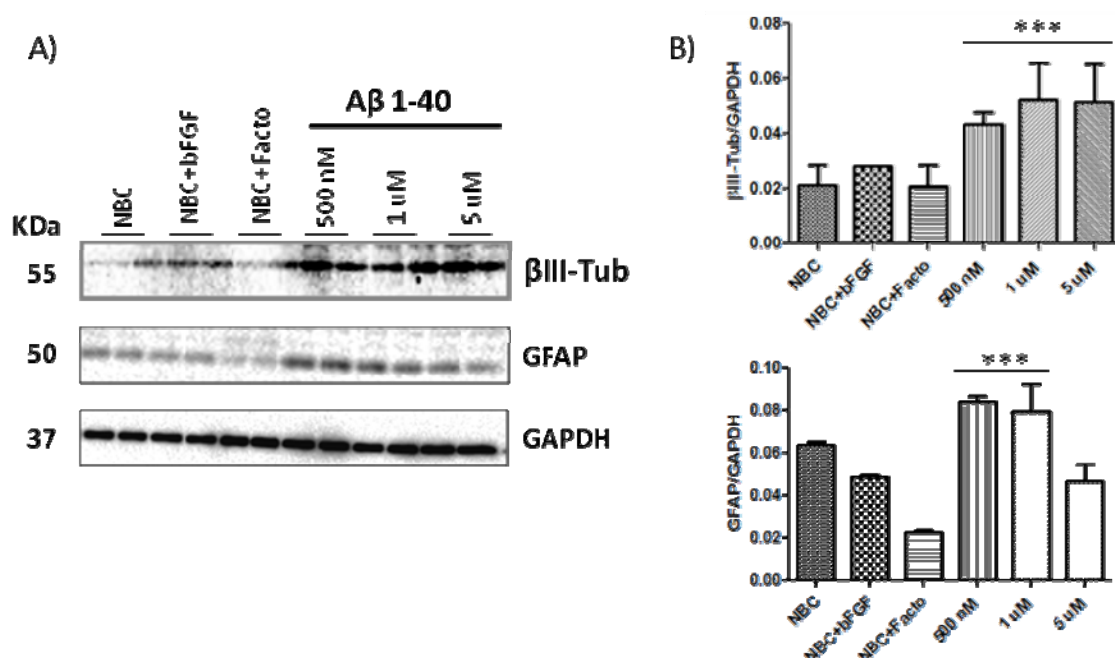


Figura 12. Efecto de oligómeros de A β sobre diferenciación celular. A) Western blots que muestran el patrón de expresión de los marcadores β -III Tubulina y GFAP. B) Gráficas que muestran el análisis densitométrico de la expresión de β -III Tubulina y GFAP con respecto al control de carga GAPDH. Las estadísticas y gráficas fueron elaboradas a partir de tres experimentos independientes.

VII. 8. La vía de señalización de PI3-K y su participación en el efecto de oligómeros de A β 40 sobre el proceso de sobrevivencia

Como se mostró en resultados anteriores, los oligómeros de A β 40 a una concentración de 0.5, 1 y 5 μ M, tienen un efecto sobre el proceso de sobrevivencia celular, aumentando el porcentaje de células vivas, comparadas ambas contra los controles. Por lo anterior, nosotros quisimos abordar una posible vía de señalización que se estuviera activando ante el estímulo de las células tratadas con los oligómeros de A β 40. La vía a evaluar FUE de PI3-K, debido a que actualmente es por excelencia la vía de supervivencia que utilizan muchos modelos celulares para hacer frente a varios estímulos. Para un primer acercamiento se utilizó un arreglo que permite identificar 18 proteínas fosforiladas, todas pertenecientes a la vía de señalización de Akt. Nuestro arreglo es específico para ratón. Nuestros resultados muestran que las concentraciones de 0.5, 1 y 5 μ M promueven una mayor expresión de las proteínas

fosforiladas Erk1/2 y PTEN. Sin embargo solo la expresión de Erk1/2 tiene diferencia significativa cuando es comparada contra el control, Figura 13. Por otro lado, la concentración de 1 μM es capaz de aumentar la Los niveles de la proteína fosforilada Akt de manera significativa con respecto al control. También tuvimos diferencias en el patrón de expresión de proteínas como AMPKa, GSK-3 α Y GSK-3 β , sin embargo no mostraron diferencias significativas al hacer el análisis estadístico.

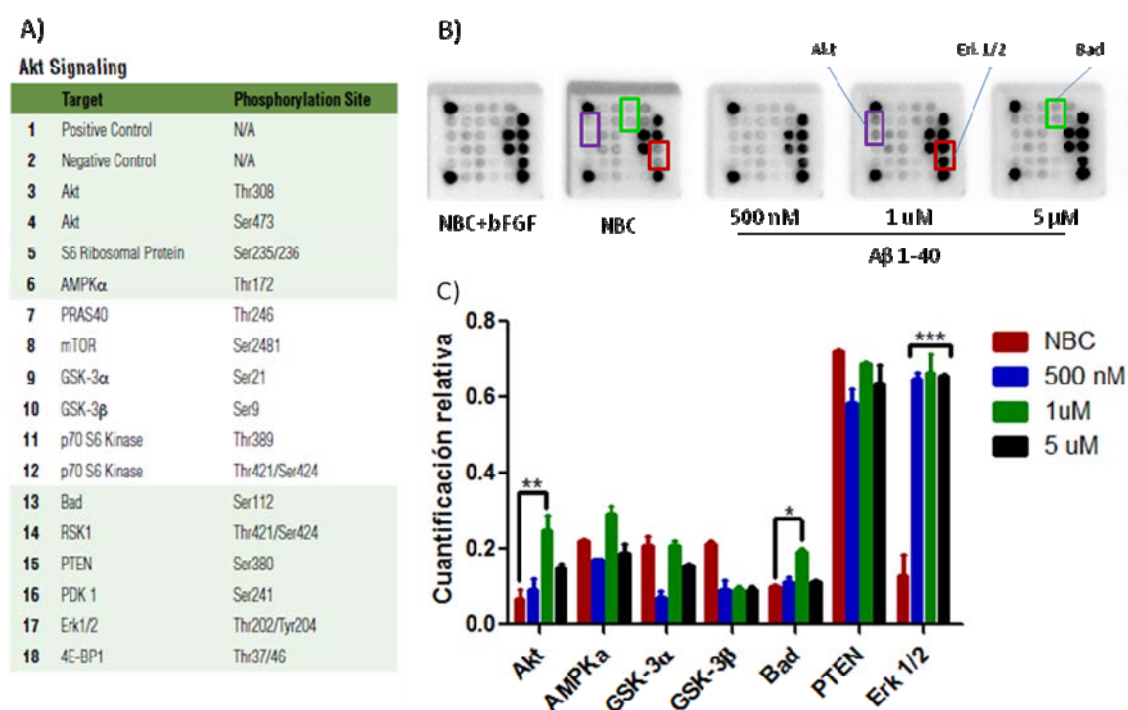


Figura 13. Análisis de la vía de señalización PI3-K, después del tratamiento con oligómeros A β 40. A) Listado de las 18 proteínas fosforiladas que contiene el arreglo. B) Expresión de proteínas en el arreglo, se muestran controles y tratamientos con oligómeros de A β 40 a las 72 horas. C) Gráfica que muestra el análisis densitométrico de las proteínas, expresadas en relación a la intensidad del control.

De acuerdo a lo obtenido en nuestros resultados anteriores, en los que se observa que la concentración de 1 μM de A β 40 aumenta la expresión de la proteína fosforilada Akt, nosotros quisimos corroborar la activación de esta proteína a tiempos más cortos, debido a que se sabe que estas vías de señalización se activan en cuestión de segundos o minutos. Para ello, nosotros estimulamos las NPCs con oligómeros de A β 40 a 1 μM durante tiempos muy cortos que iban de 1 a 60 minutos, con el objetivo de ver la fosforilación de Akt. Como control de activación se utilizó una concentración conocida de bFGF (20ng/mL). Nuestros resultados

muestran que A β 40 a 1 μ M es capaz de activar Akt desde el minuto 1 de estimulación, sin embargo la activación es sostenida y se mantiene durante los 60 minutos que se evaluaron, Figura 14.

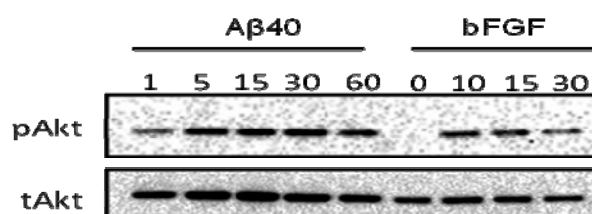


Figura 14. Activación de la proteína Akt por oligómeros de A β 40. Se muestra el tratamiento con 1 μ M en diferentes tiempos de estimulación, de 1 a 60 minutos.

Para demostrar que la activación de Akt es específica por el estímulo con los oligómeros de A β 40, se bloquea la activación de la vía, con un inhibidor específico para PI3-K denominado LY294002, el cual bloquea completamente la actividad de cinasa de PI3-K. Para los experimentos con el inhibidor, este se agregó a una concentración de 50 μ M una hora antes de los tratamientos con los oligómeros de A β 40 y el bFGF. Nuestros resultados muestran que la activación de fosfo-Akt si está dada por el tratamiento con los oligómeros de A β 40 a una concentración de 1 μ M, debido a que cuando se agrega el inhibidor de PI3-K también se bloquea la activación dada por A β 40, Figura 15.

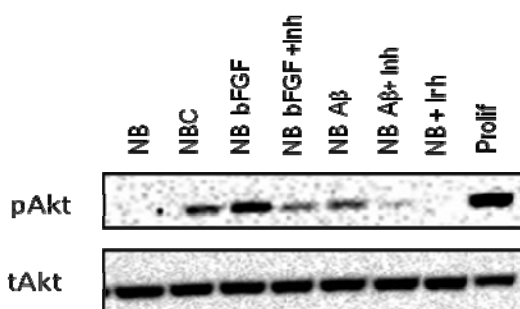


Figura 15. Inhibición de la vía la activación de Akt, dado por la inhibición de la actividad de cinasa de PI3-K.

VII. 9. Determinación de los factores solubles secretados por las NPCs estimuladas con oligómeros de A β 40.

Para determinar los factores liberados por las células precursoras neurales del hipocampo al medio de cultivo bajo condiciones de tratamiento con 1 μ M de oligómeros de A β 40, después de 72 horas. Se utilizó un arreglo con 308 anticuerpos. Los resultados obtenidos no muestran diferencias significativas en cuanto al patrón de expresión de los factores de las células estimuladas con los oligómeros comparadas con el control, correspondiente a células no tratadas, Figura 16. La presencia de cada proteína fue determinada con base a la intensidad mostrada en la membrana, dicha intensidad fue normalizada con respecto al control interno presente en el arreglo, esta normalización permitió agrupar a las proteínas de acuerdo a su intensidad como proteínas de mayor expresión (arriba de 1), mediana expresión (entre 1 y 0.5) y menor expresión (debajo de 0.5). En la figura 16 se muestran las proteínas de mayor intensidad o expresión que estuvieron presentes en una u otra condición o en ambas. Solo se observaron diferencias significativas en la expresión de las proteínas de unión al factor de crecimiento insulínico 2,3 y 5. (IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-5), comparadas con el control.

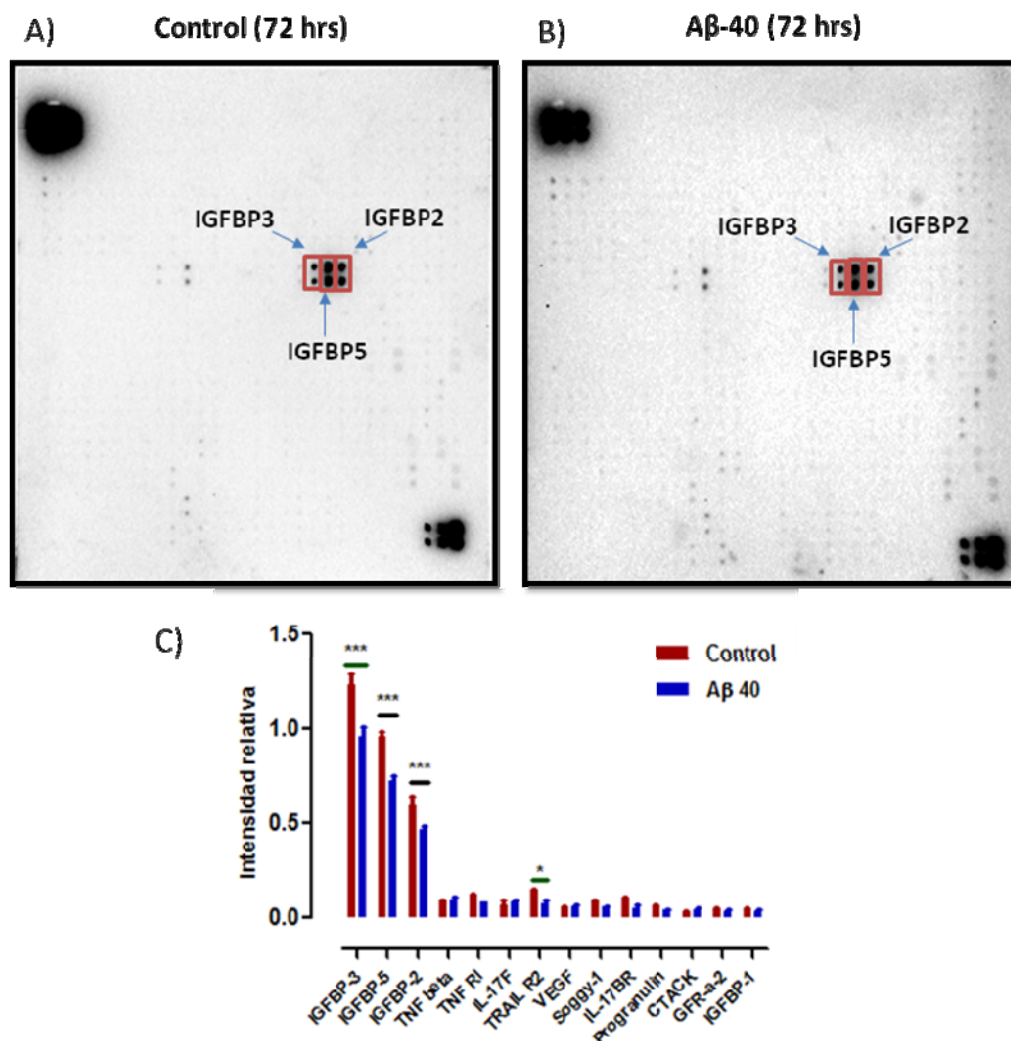


Figura 16. Identificación de los factores solubles liberados por NPCs mediante un arreglo de anticuerpos. A) NPCs sin tratamiento, control. B) NPCs estimuladas con oligómeros de A β 40 1 μ M. C) Gráfica de la media de la intensidad de los puntos de las proteínas presentes tanto en el control como en tratamiento con A β 40. Los datos se presentan como el promedio \pm error estándar.

VIII. DISCUSIÓN

En esta tesis hemos estudiado el efecto que tienen los oligómeros de A β sobre el proceso de generación de neuronas en un sistema controlado in vitro de células precursoras aisladas del giro dentado del hipocampo. Trabajos previamente reportados por Babu, 2007 ya habían demostrado las características morfológicas y expresión de marcadores de estas NPCs, que conservan las características primordiales de autorenovación y pluripotencia.

El objetivo de esta tesis consistió en profundizar en el conocimiento del efecto de los oligómeros de A β en la neurogénesis adulta al evaluar los procesos de proliferación, sobrevivencia y diferenciación, y la posible vía de señalización implicada.

Primero, respecto a la caracterización de nuestro cultivo de NPCs, nosotros corroboramos que más del 90% de las células fueron positivas a nestina, marcador que nos indicó que las NPCs son no diferenciadas, además estas células nestina positivas también fueron positivas a marcadores de proliferación como pH3 y BrdU, lo que nos indicó que mantienen su capacidad de autorenovación. Además estas células conservan su multipotencialidad, lo cual lo comprobamos al diferenciarlas durante 6 días y obtener células positivas a marcadores de linaje neuronal como MAP2 y NeuN, así como también células positivas a GFAP, correspondientes al linaje glial. Respecto al porcentaje en los fenotipos, difieren un poco con respecto a lo reportado por Babu y colaboradores, sin embargo esto quizás se deba a los días en que estuvieron en proceso de diferenciación. En el caso de Babu, reporta células diferenciadas a los 9 días, mientras que nosotros solo diferenciamos 6 días, de los cuales 2 fueron en presencia de 5ng/mL de bFGF, que promueve sobrevivencia.

En cuanto a la obtención de formas oligoméricas de A β , nosotros seguimos al pie de la letra el protocolo reportado por Klein en el 2002. Además caracterizamos las formas oligoméricas de A β 42 y A β 40, a través de diferentes técnicas, como son microscopía de fuerza atómica, western blot y DLS; sin embargo todos los resultados apuntan hacia que los oligómeros de A β 42 son más grandes que los oligómeros de A β 40, esto se demostró por las imágenes esféricas mucho más grandes de A β 42, así como peso molecular y diámetro de los oligómeros, con respecto a los oligómeros de A β 40. Nuestros resultados confirman lo reportado por varios autores, A β 42 es más hidrofóbico y que tiende a formar estructuras más agregadas (protofibrillas y fibrillas). Esto lo observamos al realizar la cinética de oligomerización,

incubando los oligómeros a 37°C durante 24, 48 y 72 horas y obteniendo estructuras de alto peso molecular solo para A β 40, no así para A β 42.

Una vez teniendo la caracterización completa de nuestro sistema y nuestras herramientas, proseguimos a evaluar el efecto de los oligómeros de A β 42 y A β 40 sobre viabilidad celular. Estudios recientes han demostrado que los oligómeros de A β pueden ser vitales para el desarrollo neuronal, la plasticidad y la sobrevivencia, debido a su interacción con la membrana celular, Plant 2003. Además varios estudios han evaluado en NPCs el efecto de A β en los diferentes eventos del proceso neurogénico. Nuestros resultados indican que los oligómeros de A β 42, en concentraciones que van desde 10 pM hasta 5 μ M, no tienen ningún efecto sobre viabilidad celular, de manera que no tienen acción tóxica pero tampoco ningún efecto neurotrófico. Sin embargo las concentraciones 0.5, 1 y 5 μ M de A β 40 si mostró un efecto significativo en la viabilidad celular, aumentando el porcentaje de células vivas y disminuyendo el porcentaje de células muertas. Estos resultados coinciden con lo reportado por Giuffrida 2009 donde indican que A β 40 induce sobrevivencia y protege a las neuronas maduras contra muerte excitotóxica.

Por otro lado, estas mismas concentraciones de oligómeros de A β 40 no tienen ningún efecto significativo sobre el proceso de proliferación, debido a que no hay un aumento en el número de células positivas a BrdU con los tratamientos y tampoco hay un aumento en la expresión del marcador de proliferación PCNA. Estos datos son contrarios a lo reportado por Cheng 2009, que mostro que A β 40 y A β 42 promueven el proceso de proliferación en NPCs embrionarias del día 18 (E18) aisladas de corteza cerebral de rata. Además también Chaejeong y colaboradores demostraron que solo las formas oligoméricas de A β 42, y no así las formas monoméricas ni fibrilares, tienen un efecto favorable sobre proliferación celular, aumentando el tamaño y numero de neuroesferas en cultivo, estos hallazgos fueron realizados en NPCs derivadas de la zona subventricular. Nuestros resultados también nos indicaron un efecto favorable de los oligómeros de A β 40 a concentraciones de 0.5, 1 y 5 μ M sobre el proceso de diferenciación neuronal. Nosotros observamos que cuando las NPCs son estimuladas con estos oligómeros durante el proceso de diferenciación, se favorece la formación de neuronas, y esto se ve reflejado en el aumento en la expresión de marcadores neuronales como β -III tubulina, sin embargo también obtuvimos un aumento en la expresión del marcados GFAP, que indica

diferenciación hacia linaje glial. Nuestros resultados son similares a los obtenidos por Chen en el 2009 que reportó que A β 40 induce diferenciación neuronal, mientras que A β 42 conduce a las NPCs hacia una diferenciación glial. También se ha reportado que A β 42 favorece el proceso de diferenciación en NPCs embrionarias. Interesantemente, este efecto solo se ha visto con formas oligoméricas solubles de los péptidos A β 42, no así con formas monoméricas de A β 42, A β 40 o A β 25-35, Lopez-Toledano, 2004. Se ha demostrado que además de la habilidad de aumentar la diferenciación neuronal, los oligómeros de A β tienen la capacidad de estimular a las NPCs para migrar. De manera similar, recientemente se reportó que A β aumenta la actividad de NPCs aisladas de ratones SAMP-8 de senescencia acelerada, en donde se reporta que en cultivos de NPCs de la zona subventricular, A β promueve la proliferación celular parcialmente a través de un mecanismo celular autónomo, en el que A β 42 soluble ejerce efectos autocrinos y paracrinos en las NPCs, Díaz-Moreno, 2013.

Hasta el momento hemos notado que los efectos de A β son muy variables y contradictorios, esto parece depender en gran medida del modelo celular en el que se prueben, llegando a la conclusión que en cultivos de NPCs embrionarios si tienen un efecto sobre proliferación, no así para las NPCs adultas. Por otro lado, también influye la región de donde aislaron, (corteza, zona subgranular o zona subventricular). Además de lo anterior, el efecto que los péptidos de A β , también depende de la secuencia, (42, 40, 25-35, etc.) y del estado de agregación tratándose de formas monoméricas, oligoméricas y fibrilares. Parece que de acuerdo a los estudios reportados parece solo los oligómeros ejercen efectos ya sea sobre proliferación, sobrevivencia o diferenciación.

Otro aspecto evaluado en esta tesis fue analizar la posible vía de señalización que pudiera estar implicada en los efectos de A β 40 que observamos sobre el proceso de sobrevivencia. El mecanismo que podría explicar los efectos benéficos de A β 42, involucran la participación de la vía de señalización PI3-k –Akt, Díaz-Moreno, 2013. También se ha demostrado que A β 42 actúa a través del receptor a neurotrofina p75, y que este está involucrado en los efectos neuroprotectores o neurotróficos de A β 42, Sotthibundhu, 2009. Nosotros evaluamos la vía de señalización PI3-K- Akt en relación al efecto en sobrevivencia que observamos en las NPCs tratadas con oligómeros de A β 40 (0.5, 1 y 5 μ M) a las 72 horas. Los tratamientos con oligómeros de A β 40 inducen activación de la proteína Akt. Al utilizar el inhibidor específico

de PI3-k ya no hay activación de la proteína Akt. Estos resultados sustentan nuestra hipótesis que esta es una de las vías de señalización participa en el fenómeno de sobrevivencia. Por otro lado, se ha reportado que en el proceso de diferenciación inducido por formas oligoméricas de A β , la vía de señalización asociada o responsable del fenómeno es la activación de tirosin cinasas y MEK, pero no es a través de PI3-K, Lopez-Toledano, 2004.

Aunque muchos mecanismos han sido explorados, el camino por el que el péptido ejerce un efecto sobre cualquiera de los pasos del proceso de neurogenesis, sigue abierto a la investigación.

IX. CONCLUSIÓN

Los oligómeros de A β 42 y A β 40 no tienen un efecto sobre el proceso de proliferación; sin embargo concentraciones de 0.5, 1 y 5 μ M de A β 40 tienen un efecto positivo sobre el proceso de sobrevivencia, aumentando el porcentaje de células vivas. Este mecanismo de sobrevivencia esta dado a través de la activación de la vía de señalización PI3-K- Akt. Además estas mismas concentraciones de A β 40 tienen un efecto sobre la diferenciación neuronal, aumentando la expresión del marcador β -III Tubulina en las células que fueron tratadas.

X. PERSPECTIVAS

- Evaluar el proceso de diferenciación a tiempos más largos, para poder identificar marcadores de funcionalidad sináptica.
- Evaluar el efecto de A β 40 sobre el proceso de neurogenesis *In vivo*, administrando los oligómeros a través de cirugía estereotáxica directamente sobre la región del hipocampo.
- A partir del punto anterior evaluar el proceso de neurogenesis de forma integral, evaluando los efectos de los oligómeros de A β 40 sobre proliferación, diferenciación, migración e integración a los circuitos neuronales existentes.
- En el modelo *In vivo*, analizar los procesos de aprendizaje y memoria para evaluar el efecto de los oligómeros A β 40.

XI. REFERENCIAS

1. Anderson R, Barnes JC, Bliss TVP, Cain DP, Cambon K, Davies HA, Errington ML, Fellows LA, Gray RA, Hoh T, Stewart M, Large CH, Higgins GA. 1998. Behavioural, physiological and morphological analysis of a line of apolipoprotein E knockout mouse. *Neuroscience* 85:93–110
2. Berzin T. M, Zipser B. D, Rafii M. S, Kuo-Leblanc V, Yancopoulos G. D, Glass D. J, Fallon J. R, and Stopa E. G. (2000) Agrin and microvascular damage in Alzheimer's disease. *Neurobiol.* 21:349–355
3. Bertram Lars (2005) Alzheimer's disease genetics: current status and future perspectives. *Neurobiology.* 84:167-183
4. Bird T. (2005) "Genetic Factors in Alzheimer's Disease." *N. England Journal Medical.* 352(9): 862-86
5. Castellani RJ, Rolston Raj K and Smith Mark A. (2010) Alzheimer Disease. *Dis Mon.* 56:484-546
6. Chaejeong Heo, Keun-A Chang, Hee Soon Choi, Hye-Sun Kim, Seonghan Kim, et al. Effects of the monomeric, oligomeric, and fibrillar A β 42 peptides on the proliferation and differentiation of adult neural stem cells from subventricular zone (2007). *J. Neurochemistry*, 102, 493-500.
7. Chen Y and Dong C. A β 40 promotes neuronal cell fate in neural progenitor cells (2009). *Cell Death and differentiation.* 16, 386-394
8. Citron M. (2010) "Alzheimer's disease: strategies for disease modification. *Nature Reviews.* 9:387-395
9. Corder E. H. et al. (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science.* 261:921–923
10. Davis K. L. and Samuels S. C (1998). In *Pharmacological Management of Neurological and Psychiatric Disorders.* McGraw-Hill. *New York.* 267–316
11. Duyckaerts Charles, Delatour Benoit, Portier Marie-Claude (2009) Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol.* 118:5-36
12. Glabe CG (2008) Structural classification of toxic amyloid oligomers. *J Biol Chem* 283, 29639–29643.
13. Glenner G. G. and Wong C. W. (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120: 885–890
14. Goate A, Chartier-Harlin M. C, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, et al. (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature.* 349:704 706
15. Golde TE, Estus S, Usiak M, et al. (1990) Expression of beta amyloid protein precursor mRNAs: recognition of a novel alternatively spliced form and quantitation in Alzheimer's disease using PCR. *Neuron.* 4:253-67
16. Giuffrida ML, Caraci F, Pignataro B, Cataldo S, De Bona P, Bruno V, Molinaro G, Pappalardo G, Messina A, Palmigiano A, Garozzo D, Nicoletti F, Rizzarelli E, Copani A. Beta-amyloid monomers are neuroprotective. *J Neurosci* (2009) 29:10582–10587
17. Guimerà Arantxa, Gironès Xavier, Cruz-Sánchez Félix F. (2002) Actualización sobre la patología de la enfermedad de Alzheimer. *Rev Esp Patol.* 351: 21-48
18. Hebert L.E, Scherr P.A, Bienias J.L, Bennett D.A. and Evans D.A. (2004) State specific projections through 2025 of Alzheimer disease prevalence. *Neurology.* 62:1645

19. Jalbert, J. (2008) "Dementia of the Alzheimer type." *Epidemiologic Reviews*. 30: 15-34
20. Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H, et al. (2003) APP processing and synaptic function. *Neuron*. 37:925-37. 117
21. Kang J, Muller-Hill B. (1990) Differential splicing of Alzheimer's disease amyloid A4 precursor RNA in rat tissues: PreA4(695) mRNA is predominantly produced in rat and human brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 166:1192-200
22. Keun A Chang and Yoo-Hun Suh. Possible roles of amyloid intracellular domain of amyloid precursor protein (2010). *BM reports*, 43(10):656-663
23. Klein WL, Krafft GA, Finch CE. (2001) Targeting small Abeta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum?. *Trends Neurosci*. 24: 219-24.
24. Klein. William L. Aβ toxicity in Alzheimers disease: globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drugs targets. 2002. *Neurochemistry International* 41 345-352
25. Konrad, M (2006) "The history of Alois Alzheimer's first case Auguste D." *Springer Berlen Heidelberg* 1: 13-34
26. Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH. (1996) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci*. 16: 2027-33
27. Laferla FM, Green KN & Oddo S (2007) Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 8, 499–509
28. Levy-Lahad E, Wasco, W, Poorkaj P, Romano D. M, Oshima J, Pettingell W. H, Yu C. E, Jondro P. D, Schmidt S. D, Wang K, et al. (1995) Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science*. 269:973–977
29. Lois C, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1996) Chain migration of neuronal precursors. *Science* 271:978–981.
30. López-Toledano Miguel A. and Shelanski Michael L. Neurogenic effect of β-Amyloid peptide in the development of neural stem cells (2004). *J Neurosci*. 24(23).5439-5444.5439
31. Mackic JB, Stins M, McComb JG, Calero M, Ghiso J, Kim KS et al (1998) Human blood-brain barrier receptors for Alzheimer's amyloid-beta 1- 40. Asymmetrical binding, endocytosis, and transcytosis at the apical side of brain microvascular endothelial cell monolayer. *J Clin Invest* 102:734–743.
32. Marotta C, Majocha R, Tate B. 1992. Molecular and cellular biology of Alzheimer amyloid. *J Mol Neurosci* 3:111–12
33. Martin J. B. (1999) Molecular basis of the neurodegenerative disorders. *N. Engl. J. Med*. 340: 1970–1980
34. Masters C. L, Simms G, Weinman N. A, Multhaup G, McDonald B. L. and Beyreuther K. (1985) Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc. Natl Acad. Sci*. 82: 2073–2077
35. Mattson MP, Cheng B, Culwell AR, Esch FS, Lieberburg I, Rydel RE. 1993. Evidence for excitoprotective and intraneuronal calciumregulating roles for secreted forms of the b-amyloid precursor protein. *Neuron* 10:243–254.
36. Mena R. (2003) "Histopatologia Molecular del Alzheimer." *Revista Digital Universitaria* 4(7): 20
37. Meziane H, Dodart J-C, Mathis C, Little S, Clemens J, Paul S, Ungerer A. 1998. Memory enhancing effects of secreted forms of the b-amyloid precursor protein in normal and amnesic mice. *PNAS* 95:12683–12688.

38. Mucke L, Abraham CR, Masliah E. 1996. Neurotrophic and neuroprotective effects of hAPP in transgenic Mice. *Ann N Y Acad Sci* 777:82–88.
39. Murray, M. (2009) "Amyloid β -protein: A β 40 Inhibits A β 42 Oligomerization." *Journal American Chemistry Society*. 131(18): 6316-6322
40. Nunan J. and Small D. H. (2000) Regulation of APP cleavage by alpha-, beta- and gamma-secretases. *FEBS Lett*. 483:6-10
41. Oda T, Wals P, Osterburg HH, Johnson SA, Pasinetti GM, Morgan TE, Rozovsky I, Stine WB, Snyder SW, Holzman TF et al. (1995) Clusterin (apoJ) alters the aggregation of amyloid beta-peptide (A beta 1-42) and forms slowly sedimenting A beta complexes that cause oxidative stress. *Exp Neurol* 136, 22–31.
42. Ortíz-López Leonardo, Morales-Mulia Sandra, Ramírez-Rodríguez Gerardo and Benítez-King Gloria.(2008). ROCK-regulated cytoskeletal dynamics participate in the inhibitory effect of melatonin on cancer cell migration. *J. Pineal Res* 46:15–21
43. Pastorino L. (2006) "Pathogenic mechanisms in Alzheimer's disease." *European JournalPharmacology*. 545: 29-38
44. Pawlik M, Sastre M, Calero M, Mathews PM, Schmidt SD, Nixon RA, Levy E. Overexpression of human cystatin C in transgenic mice does not affect levels of endogenous brain amyloid Beta Peptide. *J. Mol Neurosci*. 2004; 22:13–18
45. Pearson HA, Peers C. Physiological roles for amyloid beta peptides. *J.Physiol*. 2006; 575:5–10.
46. Peña Casanova J. (1999) Enfermedad de Alzheimer, del diagnóstico a la terapia: conceptos y hechos. Edit. Fundación La Caixa
47. Plant LD, Boyle JP, Smith IF, et al. (2003) The production of amyloid [beta] peptide is a critical requirement for the viability of central neurons. *J Neurosci*. 23:5531-5
48. Puzzo D, Privitera L, Leznik E, Fa M, Staniszewski A, Palmeri A, Arancio O. (2008) Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. *J Neurosci*. 28:14537–14545
49. Ramírez Rodríguez Gerardo, Klempin Friederike, Babu Harish, Benítez King Gloria and Kempermann Gerd. (2009) Melatonin Modulates Cell Survival of New Neurons in the Hippocampus of Adult Mice. *Neuropsychopharmacology*, 34, 2180–2191
50. Rohe M, Carlo A-S, Breyhan H, Sporbert A, Militz D, Schmidt V, Wozny C, Harmeier A, Erdmann B, Bales KR, Wolf S, Kempermann G, Paul SM, Scimitz D, Bayer TA, Willnow TE, Andersen OM. 2008. Sortilin-related receptor with A-type repeats (SORLA) affects the amyloid precursor protein-dependent stimulation of ERK signaling and adult neurogenesis. *J Biol Chem* 283:14826– 14834.
51. Sakono Masafumi and Zako Tamotsu. Amyloid oligómeros: formation and toxicity of A β oligómeros. 2010. *FEBS Journal*. 277, 1348-1358
52. Selkoe D. J. (2001) Alzheimer's disease: Genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev*. 81:741–766
53. Shankar GM, Bloodgood BL, Townsend M, Walsh DM, Selkoe DJ, Sabatini BL. Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J Neurosci*. 2007; 27:2866–2875
54. Sherrington R, Rogaev E. I, Liang Y, Rogaeva E. A, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, et al. (1995) Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*. 375:754–760

55. Shibata M, Yamada S, Kumar SR, Calero M, Bading J, Frangione B et al (2000) Clearance of Alzheimer's amyloid-ss(1–40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *J Clin Invest* 106:1489–1499
56. Small D. H, Mok S. S. and Bornstein J. C. (2001) Alzheimer's disease and Abeta toxicity: from top to bottom. *Nat. Rev. Neurosci.* 2:595– 598
57. Small H. David and Cappai Roberto (2006) Alois Alzheimer and Alzheimers disease: a centennial perspective. *J Neurochem.* 99:708-710
58. Sprecher C. A., Grant F. J., Grimm G., O'Hara P. J., Norris F., Norris K. and Foster D. C. (1993) Molecular cloning of the cDNA for a human amyloid precursor protein homolog: evidence for a multigene family. *Biochemistry* 32, 4481–4486.
59. Stege GJ, Renkawek K, Overkamp PS, Verschuure P, van Rijk AF, Reijnen-Aalbers A, Boelens WC, Bosman GJ & de Jong WW (1999) The molecular chaperone alphaB-crystallin enhances amyloid beta neurotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 262, 152–156
60. Strooper de Bart, Vassar Robert, Golde Todd (2010) The secretases: enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol.* 6(2): 99-107
61. Suh Y. H. and Checler F. (2002) Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-synuclein: Molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's Disease. *Pharmacol. Rev.* 54:469–525
62. Takahashi RH, Almeida CG, Kearney PF, Yu F, Lin MT, Milner TA, Gouras GK (2009) Oligomerization of Alzheimer's betaamyloid within processes and synapses of cultured neurons and 34 Acta Neuropathol. *J Neurosci.* 24:3592–3599.
63. Tanzi R. E. and Bertram L. (2005) Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: A genetic perspective. *Cell.* 120:545–555
64. Thornton E, Vink R, Blumbergs PC, Van Den Heuvel C. 2006. Soluble amyloid precursor protein a reduces neuronal injury and improves functional outcome following diffuse traumatic brain injury in rats. *Brain Res* 1094:38–46.
65. Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature.* 2002; 416:535–539.
66. Wolfe M. S., Xia W, Ostaszewski B. L, Diehl T. S, Kimberly W. T, and Selkoe D. J. (1999). Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gammasecretase activity. *Nature.* 398:513–517
67. Xu Y, Shen J, Luo X, et al. (2005) Conformational transition of amyloid beta-peptide. *Proc Natl Acad Sci.* 102:5403-7
68. Yamamoto N, Matsubara E, Maeda S, Minagawa H, Takashima A, Maruyama W, Michikawa M & Yanagisawa K (2007) A ganglioside-induced toxic soluble Abeta assembly. Its enhanced formation from Abeta bearing the Arctic mutation. *J Biol Chem* 282, 2646–2655.
69. Yanagisawa K (2007) Role of gangliosides in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1768, 1943–1951
70. Yangling Mu and Fred H. Gage. Adult hippocampal neurogenesis and its role Alzheimers disease. 2011. *Molecular Neurodegeneration*, 6:85
71. Yankner B. A., Duffy L. K. and Kirschner D. A. (1990) Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science* 250, 279–282.
72. Younkin, S. G. (1998) The role of A beta 42 in Alzheimer's disease. *J. Physiol.* 92:289–292

73. Yu G, Niashimura M, Arawaka S, Levitan D, Zhang L, Tandon A, Song Y. Q, Rogaeva E, Chen F, Kawarai T, Supala A, Levesque L, et al. (2000). Nicastrin modulates presenilin mediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing. *Nature*. 407:48–54

XII. ANEXOS

1. MARCADORES INVOLUCRADOS EN EL PROCESO DE NEUROGÉNESIS

GFAP: (glial fibrillary acidic protein) es un marcador característico de astrocitos maduros de cerebro adulto que además se expresa en las células precursoras que darán lugar a la génesis de nuevas neuronas. Aunque astrocitos y precursores neurales expresan GFAP, su morfología es distinta, es unipolar o bipolar la morfología de los precursores neuronales y es multipolar la de los astrocitos maduros.

Nestina: se trata de un filamento intermedio específico neuronal. Con el descubrimiento y aislamiento de células precursoras en el cerebro de los mamíferos, se describió que estas células expresaban como marcador característico la nestina.

Sox2: (Sex determining Region Y-box2) (Sry-related HMG box 2): es un factor de transcripción que controla el desarrollo del sistema nervioso, es un factor esencial para mantener la autorrenovación e inducir pluripotencialidad en las células madre.

BLBP: (brain lipid binding protein): pertenece a una familia de proteínas pequeñas de localización citoplasmática que unen largas cadenas de ácidos grasos, interviniendo en su captación, transporte y metabolismo. Se expresa en la glía radial durante el desarrollo por la activación de la vía de Notch.

Doblecortina: (DCX) es una proteína asociada a microtúbulos que promueve su polimerización. Está presente en neuroblastos y neuronas jóvenes en migración, sobretodo en sus proyecciones principales y en los conos de crecimiento de las neuritas.

PSA-NCAM: (polysialylated form of neural cell adhesion molecule). En el cerebro adulto se expresa en las nuevas neuronas granulares generadas y en desarrollo. Los residuos de ácido siálico reducen la adhesión celular mediada por NCAM, de ahí que sea un marcador presente en lugares de plasticidad y en nuevas neuronas migratorias.

NeuroD: (neurogenic differentiation) es un factor de transcripción que se expresa en las etapas tardías del compromiso neuronal actuando como gen de determinación y diferenciación neuronal.

TUC4: empieza a expresarse cuando la neurona comienza a migrar. Los máximos niveles se alcanzan durante el crecimiento axonal.

β -III-tubulina: también llamado Tuj1, por el nombre del anticuerpo empleado, reconoce un isotipo de tubulina específico de neuronas. En neurogénesis adulta, se usa como marcador específico de nuevas neuronas.

Calretinina: es un marcador específico de neuronas no piramidales gabaérgicas que se pueden encontrar en todas las regiones del hipocampo, CA1-CA3 y GD.

Calbindina: esta proteína se expresa en todas las neuronas maduras del GD, en la mayoría de las neuronas piramidales de CA1 y CA2, se usa como marcador de la última etapa de la neurogénesis adulta, para marcar neuronas granulares maduras.

NeuN: (neuronal nuclei) se trata de una proteína nuclear soluble específica de neuronas postmitóticas que se localiza en el núcleo y el citoplasma que rodea al núcleo, entrando en ocasiones en las neuritas.