



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

Caracterización de los exosomas de células precursoras del epitelio olfatorio de pacientes con Alzheimer familiar y su efecto sobre los precursores neurales de hipocampo.

TESIS

Que presenta:

C.D. NADIA ESTEFANÍA GUTIÉRREZ CASTAÑEDA

Que para obtener el grado de:

Maestra en Ciencias

en la Especialidad de:

Biomedicina Molecular

Director de tesis:

DR. MARCO ANTONIO MERAZ RÍOS

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi tutor de tesis el **Dr. Marco Antonio Meraz Ríos** por todo su apoyo, asesoría, paciencia, orientación y motivación a lo largo de toda mi maestría.

A mis asesores de tesis, la **Dra. María del Carmen Sánchez Torres** y el **Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda** por su tiempo, sus observaciones y sus atinados comentarios para el proyecto.

A la **Q.F.B. Sirenia Gómez Pozos** por toda su ayuda, tiempo, dedicación y su excelente trabajo en la toma de fotografías de Microscopia electrónica de Transmisión.

A **Julio Cesar Ramírez Gómez** por su importante apoyo en el trabajo de laboratorio.

También quiero agradecer a la **M.en C. Rosalía Santo Mandujano**, a la **M. en C. Berenice Jiménez Ramos** y a **José Manuel Viveros Bartolomé** por su amistad, sus asesorías y apoyo en el trabajo teórico y experimental a lo largo de este trabajo experimental.

“A mis papas y a mi hermana por seguir llenando mi vida, los amo”

INDICE

INDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	1
1.2 ENFERMEDAD DE ALZHEIMER FAMILIAR	4
1.2.1 Proteína Precursora del β -amiloide	4
1.2.2 Presenilina 1 y Presenilina 2	5
1.2.3 Presenilinas en el complejo γ -Secretasa	8
1.2.4 Procesamiento de APP	9
1.2.5 Presenilina 1 y sus sustratos	11
1.2.5 Presenilina 1 y los defectos endolisosomales	12
1.3 CUERPOS MULTIVESICULARES Y EXOSOMAS	13
1.3.1 Cuerpos Multivesículaes	13
1.3.2 Exosomas	14
1.3.3 Exosomas en enfermedades neurodegenerativas	16
II ANTECEDENTES	19
III JUSTIFICACIÓN	22
IV HIPÓTESIS	22
V OBJETIVO GENERAL	22
VI OBJETIVOS ESPECIFICOS	23
VII METODOLOGIA	23
7.1 Obtención y cultivo de precursores neuronales de epitelio olfatorio	23
7.2 Aislamiento de exosomas	24
7.3 Proteínas celulares y Western Blot	25
7.4 Microscopía electrónica de exosomas y cuerpos multivesiculares	25
7.5 Cultivo de células precursoras neurales de hipocampo fetal humano	26
7.6 Evaluación del cambio morfológico	27
7.7 Ensayo de viabilidad	27
7.8 Citometría de flujo	27
VIII RESULTADOS	28
8.1 Estandarización del aislamiento de exosomas con células HeLa	28

8.2 Optimización del protocolo de aislamiento de exosomas para las células de epitelio olfatorio	29
8.3 Caracterización de exosomas derivados de epitelio olfatorio por Microscopía electrónica de transmisión	29
8.4 Tinción con azul Coomassie de SDS-PAGE	31
8.5 Caracterización por Western Blot de los marcadores de exosomas	31
8.6 Los exosomas derivados de las células de PM37 tienen un efecto citotóxico en comparación con los exosomas derivados de las células de CM31 sobre las precursoras neurales de hipocampo fetal humano	32
8.7 Las células de los pacientes portadores de la mutación Ala431Glu presentan cambios en el tamaño y en la cantidad de vesículas intraluminales	35
8.8 Las células precursoras neurales derivadas del epitelio olfatorio son una población homogénea y presentan un perfil característico de células mesenquimales	37
IX CONCLUSIÓN	43
X PERSPECTIVAS:	44
XI BIBLIOGRAFIA	45

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Lesiones características en los cerebros de los pacientes con Enfermedad de Alzheimer.....	2
Figura 2. Localización cromosómica del gen <i>APP</i> en la región 21q21.1.....	4
Figura 3. Ubicación del gen <i>PSEN1</i> y <i>PSEN2</i>	6
Figura 4. Topología de Presenilina.....	7
Figura 5. Papel del TMD9 en la función catalítica de <i>PSEN1</i>	8
Figura 6. Complejo γ -Secretasa.....	9
Figura 7. Procesamiento de <i>APP</i>	11
Figura 8. Formación de MVBs, a través de la maduración del endosoma tardío.....	14
Figura 9. Biogénesis y composición de los exosomas.....	15
Figura 10.Exosomas en enfermedades Neurodegenerativas.....	18
Figura 11. Diagrama esquemático de <i>PSEN1</i> , marcando la mutación Ala431Glu.....	20
Figura 12.Diagrama esquemático de la principal comunicación entre el bulbo olfatorio y el giro dentado del hipocampo.....	21
Figura 13. Esquema del protocolo de aislamiento de exosomas.....	23
Figura 14. Microscopía electrónica de transmisión de exosomas derivados de células HeLa.....	26
Figura 15. Cuantificación de proteína exosomas derivados de células de epitelio olfatorio.....	27
Figura 16. Caracterización por microscopía electrónica de transmisión de los exosomas derivados de epitelio olfatorio.....	29
Figura 17. Tinción con azul Coomassie de los exosomas provenientes de las células de epitelio olfatorio.....	30
Figura 18. Western Blot de exosomas derivados de epitelio olfatorio.....	31
Figura 19. Fotografías por microscopía óptica de hipocampo fetal humano, después de ser tratadas con exosomas.....	32
Figura 20. Graficas del porcentaje de viabilidad entre las células de hipocampo fetal que fueron tratadas con los exosomas derivados de PM37 YCM31.....	33
Figura 21. Análisis por Citometría de flujo de los marcadores de membrana.....	37
Figura 22. Ubicación espacial de la mutación A431E. y análisis con el programa <i>PolyPhen-2</i> ...38	

RESUMEN

Los exosomas son vesículas extracelulares que tienen un diámetro 10 a 100 nm, transportan moléculas específicas y participan en múltiples procesos celulares a través de la comunicación intercelular y pueden modificar el fenotipo y la fisiología de una célula receptora. Considerando que los exosomas tienen su origen en los cuerpos multivesiculares, los cuales se forman a partir del endosoma, es posible que cambios en los eventos intracelulares se vean reflejados en el contenido de estas vesículas. En las enfermedades neurodegenerativas, los exosomas se han asociado a la propagación de proteínas mal plegadas, participando así en la fisiopatología de la enfermedad. El objetivo de este estudio fue caracterizar y evaluar el efecto de los exosomas derivados de las células de epitelio olfatorio de los portadores de la mutación Ala431Glu sobre las células de hipocampo fetal humano. Los exosomas derivados de las células del paciente portador de la mutación y de su control etario fueron caracterizados por microscopía electrónica y por ensayos de Western Blot. Observamos que la apariencia de los exosomas del portador de la mutación, eran notablemente más grandes al compararse con los del control. Ergo decidimos evaluar los cuerpos multivesiculares por microscopía electrónica, confirmando nuestros resultados previos. A continuación, evaluamos el efecto de estos exosomas sobre las células de hipocampo fetal humano *in vitro*. Las células que fueron tratadas con los exosomas derivados de las células del portador con la mutación Ala431Glu, en términos de viabilidad mostraron, una mayor susceptibilidad citotóxica, comparadas con las células tratadas con los exosomas derivados de las células del individuo control. Al parecer, el contenido que estas vesículas transportan es citotóxico para los precursores neurales de hipocampo fetal humano, sugiriendo que la mutación puede producir alteraciones endolisosomales en las células de estos pacientes, que pueden estar afectando la biogénesis de los exosomas y su contenido. Los resultados sugieren que estos cambios pueden afectar de temprana en el curso de la enfermedad.

ABSTRACT

Exosomes are extracellular vesicles that have a diameter between 10 and 100 nm, they transport specific molecules and participate in multiple cellular processes through intercellular communication, being able to modify the phenotype and the physiology of the recipient cell. Considering that the exosomes are originated from the multivesicular bodies, which are formed from the endosome, it is possible that the intercellular events are reflected in the cargo of these vesicles. In neurodegenerative diseases, exosomes have been associated to the propagation of prionic proteins, participating in this way in the physiology of the disease. The aim of this study was to characterize and evaluate the effect of the exosomes produced by olfactory cells of Ala431Glu mutation carriers on human fetal hippocampal cells. The exosomes from the carrier and his control were characterized by electron microscopy and Western Blot assays. We observed that the apparent size of the exosomes of the mutation carrier was notably larger compared to the exosomes of the control subject. Ergo, we decided to evaluate the multivesicular bodies by electron microscopy, confirming our previous observations. Then, we evaluated the neurotoxicity of the exosomes on human fetal hippocampal cells *in vitro*. Cells treated with the exosomes derived from cells of the mutation Ala431Glu carrier were more susceptible than the cells treated with the control, as seen in terms of viability. Apparently, the content of these exosomes are cytotoxic to the human hippocampal neural precursors cells, suggesting that the mutation is producing endolysosomal changes in the cells of these patients, which could be affecting the biogenesis of the exosomes and their content. Our results suggest that A431E mutation produce cellular changes that may affect the course of the disease at early stages.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La Enfermedad de Alzheimer es un padecimiento neurodegenerativo y crónico que ha sido definido por la presencia de múltiples déficits cognitivos y progresivos, que se manifiestan por el deterioro de la memoria y al menos una de las siguientes alteraciones: afasia, apraxia, agnosia y alteración en la ejecución, provocando un deterioro significativo en la actividad social y laboral [1].

Fue descrita por primera vez en 1906 por el doctor Alois Alzheimer quien describió una forma de demencia en una mujer de 51 años, llamada Auguste D, originaria de Frankfurt, Alemania, que había mostrado deterioro cognitivo progresivo, síntomas focales, alucinaciones, delirios e incompetencia psicosocial. Además de sus descripciones sobre el estado de salud de la paciente, el doctor Alzheimer realizó un estudio post-mortem en el cerebro de August, en la que se encontraron placas y marañas de neurofibrillas. A esta enfermedad se le nombró posteriormente como Enfermedad de Alzheimer, en honor al doctor que la describió por primera vez [2].

Clínicamente la Enfermedad de Alzheimer se manifiesta como una demencia que generalmente se presenta con un trastorno amnésico progresivo con la subsecuente aparición de déficits cognitivos y neuropsiquiátricos que impiden la función social y las actividades de la vida diaria [3]. En las primeras etapas, las áreas críticas para la memoria episódica se ven afectadas en las regiones temporales mediales, el deterioro de la memoria de acontecimientos recientes, omisiones inusuales y la dificultad para aprender nueva información son los signos clínicos iniciales [4]. A medida que la enfermedad progresa es frecuente la afectación visuoespacial, lo que dificulta que el paciente ubique su domicilio, se afecta el lenguaje, y hay anomia que es la dificultad para encontrar la palabra adecuada o el nombre de los objetos [5]. Progresivamente el paciente va perdiendo capacidades funcionales, la autonomía para realizar actividades complejas, llegando un

momento en el que solo es capaz de realizar actividades poco significativas y finalmente ser absolutamente dependiente para realizar actividades básicas de la vida diaria[3].

La característica general en el cerebro con Enfermedad de Alzheimer es la atrofia cortical, en muchos casos se encuentra mayormente en la porción medial del lóbulo temporal con respecto a otras áreas de la corteza. Al diseccionar el cerebro, los ventrículos laterales se encuentran generalmente dilatados, el hipocampo y amígdala se encuentran atrofiados [6]. Las lesiones características en cerebros con esta enfermedad son las placas amiloides y las marañas neurofibrilares (Fig. 1).

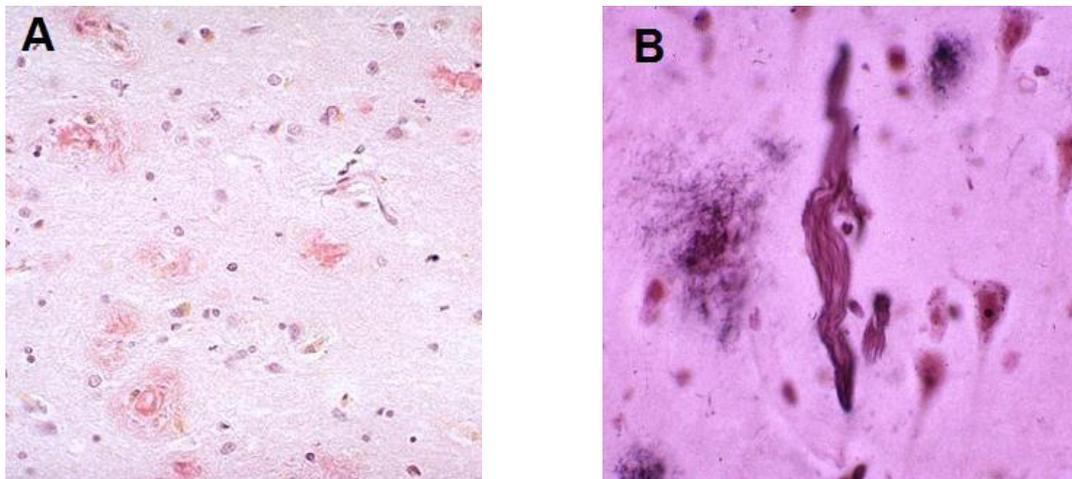


Fig. 1. Lesiones características en los cerebros de los pacientes con EA. En A se muestran las placas amiloides y en B las marañas de neurofibrillas. Tomado y modificado de Mott, R *et al.*[7]

Las placas amiloides son depósitos esféricos extracelulares que van de 10 a 160 nm de diámetro compuestos de filamentos de péptido β -amiloide ($A\beta$) insoluble. Dos tipos principales de placas se aprecian en el cerebro con EA, las placas neuríticas (de núcleo denso) que contienen un núcleo central de material amiloide con bandas de fibrillas orientadas radialmente. En el perímetro del núcleo se encuentran procesos neuronales distróficos que contienen axones dilatados con abundantes cuerpos densos y filamentos helicoidales pareados. Las placas neuríticas están asociadas con astrocitos y microglía. El segundo tipo de placa es la difusa, que es un conjunto amorfo no fibrilar de péptidos $A\beta$ que carecen de núcleo denso, neuritas distróficas o una reacción glial [6, 8, 9] .

Las marañas neurofibrilares son depósitos intracelulares fibrilares, se componen de la proteína Tau hiperfosforilada en forma de filamentos helicoidales pareados aproximadamente de 15 nm de diámetro y filamentos rectos, contribuyendo a la formación de inclusiones de enredo en los cuerpos celulares, así como estructuras neuríticas y neuritas distróficas asociadas con placas. Los filamentos anormales que comprenden la patología neurofibrilar son altamente insolubles, de tal manera que las marañas neurofibrilares permanecen en el espacio extracelular tras la degeneración completa de la neurona afectada [6, 8, 9].

Aunque las causas de La Enfermedad de Alzheimer aún no han sido descubiertas en su totalidad, se sabe que es una enfermedad multifactorial. El péptido β -amiloide ($A\beta$) y la proteína Tau juegan un papel esencial en el desarrollo de la Enfermedad de Alzheimer sin embargo, se han propuesto varias hipótesis sobre los diversos factores causales de esta enfermedad, tales como la hipótesis colinérgica, la hipótesis inflamatorias, la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo, los factores genéticos y los factores ambientales.[10]

Genéticamente la Enfermedad de Alzheimer se clasifica en dos formas:

- Formas poligénicas o multifactoriales o también llamada “esporádicas” con una agregación familiar menos aparente o sin ella y por lo general de inicio tardío [11, 12].
- Formas familiares o monogénicas (FAD) que corresponde al 5% de los casos, con un patrón de herencia autosómico dominante, de inicio temprano causada por mutaciones poco frecuentes de alta penetrancia en tres genes: gen de la Proteína Precursora del β -amiloide (APP), de Presenilina 1 (PSEN1) y de Presenilina 2 (PSEN2) [11, 12].

1.2 ENFERMEDAD DE ALZHEIMER FAMILIAR

La Enfermedad de Alzheimer Familiar de Inicio temprano representa menos del 5% de los casos de la enfermedad. Se caracteriza por un inicio antes de los 60 años, de transmisión mendeliana y principalmente autosómico dominante, donde hay un riesgo del 50% de heredar el gen mutado. La Enfermedad de Alzheimer Familiar es causada por mutaciones en los genes codificantes de la Proteína Precursora del β -amiloide (APP), Presenilina 1 (PSEN1) y Presenilina 2 (PSEN2), implicados en la generación del péptido β A [11].

1.2.1 Proteína Precursora del β -amiloide

El gen codificante de la Proteína Precursora del β -Amiloide, se localiza en la región 21q21.1 del cromosoma 21 en humanos y comprende 19 exones, de los que se obtienen tres transcritos principales mediante splicing alternativo, resultando en tres proteínas principales de 695, 751 y 770 aminoácidos (Fig. 2). A pesar de que APP ha sido objeto de numerosos estudios, su función fisiológica sigue siendo desconocida; se ha sugerido que juega un papel en el crecimiento de las neuritas y en la sinaptogénesis, el tráfico de proteínas a lo largo del axón neuronal, transducción de señal de la membrana al núcleo, en la adhesión celular y en el metabolismo del calcio [13, 14].

Las mutaciones en APP, representan aproximadamente el 15% de los casos de EA familiar de inicio temprano, con 52 mutaciones descritas hasta ahora [15].

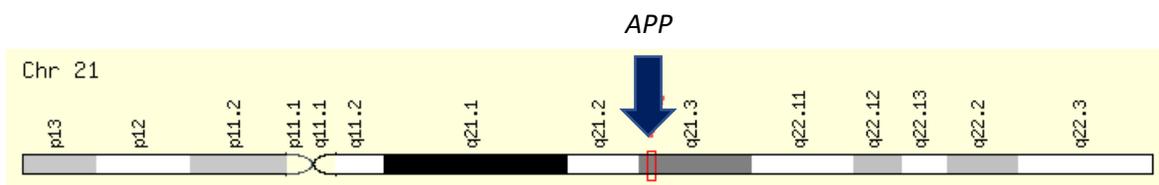


Fig. 2. Localización cromosómica del gen *APP* en la región 21q21.1.

1.2.2 Presenilina 1 y Presenilina 2

Las mutaciones reportadas en el gen de APP resultan insuficientes para explicar todas las formas de Enfermedad de Alzheimer familiar de inicio temprano ya que representan solo el 15% de los casos. Existen otros dos genes adicionales, PSEN1 y PSEN2, para los cuales se han reportado 241 mutaciones y 45 mutaciones respectivamente [15].

Las estructuras de los genes de PSEN1 y PSEN2 son muy similares. Cada gen consiste en un total de 12 exones, de los cuales, los exones 3 al 12 comprenden la secuencia codificante de la proteína. La región 5'UTR se encuentra en cuatro exones separados (1a, 1b, 2 y 3). En PSEN1, los exones 1a y 1b se excluyen mutuamente y representan los sitios de inicio de la transcripción alternativos. El promotor de PSEN1 contiene las cajas TATA y CAAT, además se observan varios elementos STAT involucrados en la activación transcripcional, en respuesta a la traducción de señal. Por el contrario, el promotor de PSEN2 carece de cajas consenso TATA y CAAT, pero contiene regiones ricas en GC río arriba en los dos sitios de inicio de la transcripción. Los límites intrón/exón en la secuencia de codificación, son prácticamente idénticos en ambos genes, consistente con la idea de que derivan de un gen ancestral común que sufrió una duplicación. Ambos genes presentan splicing alternativo; sin embargo, no se ha establecido una función específica para cada una de estas isoformas [16] [17, 18] (Fig. 3).

El gen PSEN1 se transcribe a niveles bajos en diferentes tipos celulares, tanto en el SNC como en tejidos periféricos no neurológicos. En el SNC, los transcritos de PSEN1 pueden ser detectados en la neocorteza (en neuronas corticales de las capas II y IV), en neuronas del hipocampo de los campos CA1-CA3, en neuronas de las células granulares de la circunvolución dentada, subiculum, cerebelosa de Purkinje y células granulares y núcleos profundos, así como en menores cantidades en el bulbo olfatorio, el estriado, núcleos del tronco cerebral y el tálamo. En contraste con PSEN1, que se expresa homogéneamente en el cerebro y tejidos periféricos, PSEN2 se expresa en músculo cardiaco, músculo

esquelético y páncreas, y se expresa menos homogéneamente en el SNC y tejidos periféricos [19].

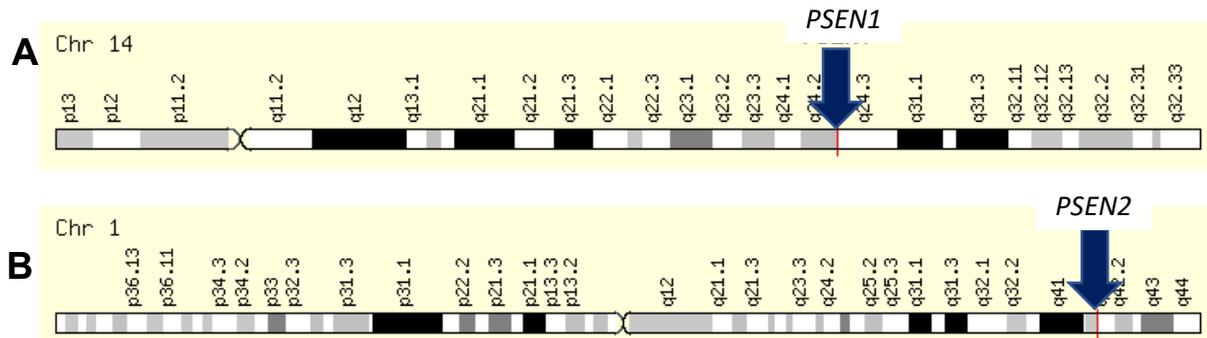


Fig.3 En la figura A se muestra la ubicación del gen *PSEN1* en el cromosoma 14q24.3. En la figura B se muestra la ubicación del gen *PSEN2* en el cromosoma 1q42.1

A nivel subcelular, se encuentran predominantemente en el retículo endoplasmático y aparato de Golgi. En el desarrollo de las neuronas, son expresadas durante las primeras etapas de diferenciación y se localizan principalmente en el cuerpo celular y vesículas citoplasmáticas. Fraccionamientos subcelulares de extractos de cerebro demostraron que fragmentos de Presenilina, pero no de las Presenilinas de longitud o tamaño completo, se encuentran en vesículas de núcleo denso y membranas de crecimiento de cono, al igual que en axones y dendritas. Alternativamente, también se han localizado en la membrana plasmática, en la envoltura nuclear interna, cinetocoros y centrosomas [16, 19]

Los genes *PSEN1* y *PSEN2*, codifican proteínas de 50-55KDa que presentan una homología del 60% en sus aminoácidos. Ambas proteínas contienen nueve dominios transmembranales, con un extremo N-terminal citosólico y un extremo C-terminal luminal, y con un largo bucle citoplasmático entre los dominios transmembranales (TMD) 6 y 7. Este bucle incluye una región hidrofóbica que es cortada entre los residuos N292 y V293 (en el exón 9) en un fragmento N-terminal (~27-30KDa) localizado en los TMD's 1-6; y un fragmento C-terminal (~16-18KDa) localizado en los TMD's 7-9, y son parte del complejo multiproteico que constituye a la γ -Secretasa. Esta endoproteólisis parece ser un evento autocatalítico que se lleva a cabo por la misma actividad de γ -Secretasa. Esto surge de la observación de que Presenilina 1 mutante en el sitio activo D257A o D385A no se someten a

endoproteólisis y no pueden cortar sustratos. La endoproteólisis de la Presenilina aparentemente elimina el impedimento estérico del bucle citoplasmático, lo que permite asumir su conformación activa (Fig. 4). El sitio catalítico de Presenilina consiste en dos residuos aspartil críticos, cada uno situado en los TMD's 6 y 7, en las posiciones D257 y D385 respectivamente. En cuanto a la disposición intramolecular de los TMD's de Presenilina, se ha demostrado mediante entrecruzamiento de uniones en disulfuro que el TMD1 está cerca del TMD8. Además, el TMD9 parece estar más cerca del poro catalítico y podría estar implicado en la unión inicial de sustratos [20-22](Fig. 5).

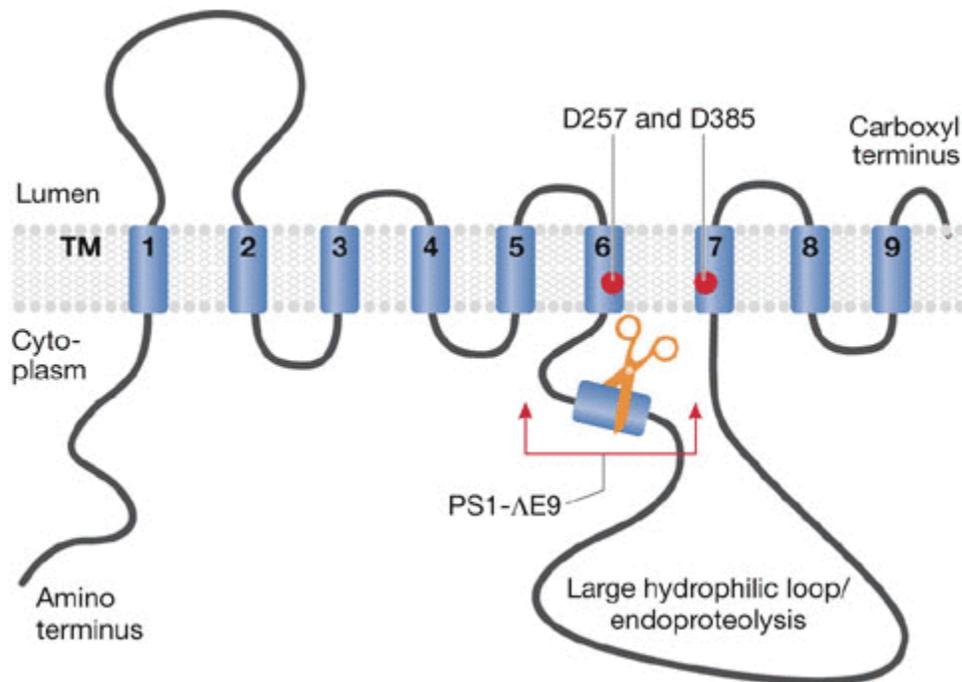


Fig. 4. Topología de las Presenilinas. Al ensamblarse con otros miembros para formar el complejo γ - Secretasa, la Presenilina lleva a cabo una autoproteólisis entre el bucle que conecta los TMD's 6 y 7, y forma un fragmento N-terminal y un fragmento C-terminal. [23]

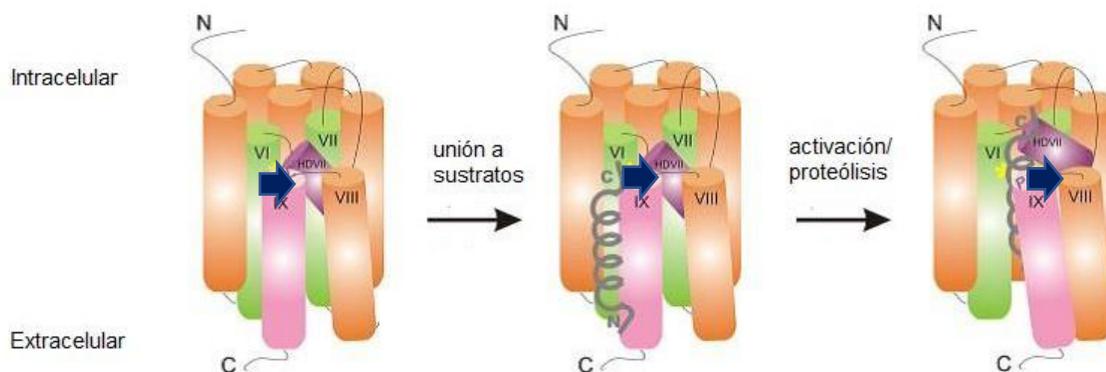


Fig 5. Papel del TMD9 en la función catalítica de PSEN1. Los TMD's 6 y 7 se muestran en verde, el sitio catalítico D257 y D385 está representado con una flecha.

1.2.3 Presenilinas en el complejo γ -Secretasa

Tanto PSEN1 como PSEN2 proveen el núcleo catalítico del complejo enzimático γ -Secretasa, el cual contiene además a Nicastrina, el potenciador de Presenilina 2 (Pen-2) y Anterior Pharynx-defective 1 Aph-1 que son las cuatro proteínas necesarias para que el complejo se active. El peso molecular mínimo para este complejo es de 250kDa, que corresponde a la suma de los pesos moleculares de las cuatro proteínas mencionadas anteriormente [20, 21].

γ -Secretasa corta, con una gran especificidad de secuencia, dominios transmembrana de proteínas transmembranales tipo I, incluyendo las moléculas de adhesión N-cadherina y E-cadherina, el receptor de neurotrofina p75, la subunidad reguladora β 2 de los canales de voltaje de sodio, neuregulina, Sortilina, APP y Notch [24].

El ensamblaje de γ -Secretasa es un proceso gradual, inicialmente Nicastrina y Aph-1 forman un subcomplejo binario. Posteriormente, la Presenilina se une al subcomplejo Nicastrina-Aph-1 para formar un complejo heterodimérico y finalmente, Pen-2 se une al subcomplejo. Se cree que Pen-2 permite la endoproteólisis de Presenilina, lo que resulta en la formación y activación de la γ -Secretasa, en ausencia de Pen-2 la escisión se lleva a cabo por el proteosoma. Solo se requiere de una molécula de Presenilina para la actividad de γ - Secretasa, lo que significa

que el complejo de proteasa contiene solo un par de aspartatos y por lo tanto solo un sitio activo [20, 22] (Fig.6).

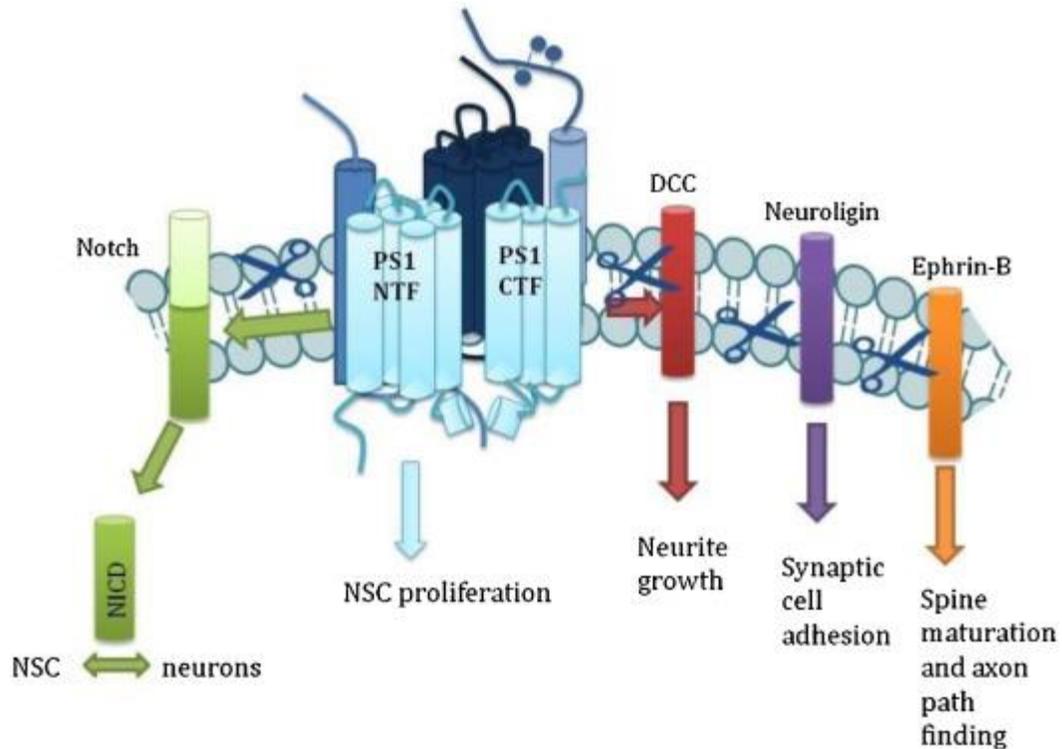


Fig. 6.El Complejo γ -Secretasa participa en múltiples procesos neuronales particularmente a través de la señalización de Notch. Éste complejo participa en el equilibrio entre los progenitores neurales y las neuronas inmaduras. También es capaz de procesa a DCC, que regula el crecimiento de las neuritas, y procesa a neuregulina, que controla la adhesión sináptica.[25]

1.2.4 Procesamiento de APP

La APP es una proteína transmembranal tipo I que se sintetiza en el retículo endoplásmico y se transfiere a través del Aparato de Golgi, desde el cual puede ser transportada en vesículas secretoras a la superficie celular donde es procesada, ya sea por α -Secretasa para producir una molécula soluble o por la β -Secretasa para producir el péptido A β de 40 o 42 aminoácidos, este último es más insoluble y se acumula en los espacios extracelulares. [13, 14, 26].

En 1992, John Hardy postuló la hipótesis de la cascada amiloide, en la que establece que mutaciones en APP, PSEN1 y PSEN2, modifican la homeostasis de A β , resultando en un acumulo y deposición del mismo, lo que provoca que se

deposite extracelularmente y forme las placas neuríticas, así como, lo que induce a su vez la formación de las marañas neurofibrilares intracelulares, y que el daño vascular, la muerte celular y la demencia, continúen como resultado directo de esta deposición [27].

La generación del péptido A β por el procesamiento de APP es un procedimiento normal en diferentes tipos celulares, este péptido puede ser detectado en el plasma y en el líquido cefalorraquídeo tanto de pacientes con la Enfermedad de Alzheimer como en individuos sanos. El péptido A β puede ser generado en diferentes tamaños (A β 39-A β 43) que son secretados desde la célula, pero la forma más abundante liberada por la actividad de β y γ -Secretasas es A β 40 (40 a.á), el cual comprende el 90% de los péptidos liberados, mientras que cerca del 10% corresponde a péptidos A β 42 (42 a.á). Aunque A β 42 difiere en solo dos aminoácidos de A β 40 los cuales son Alanina e Isoleucina, los cuales hacen a este péptido diferente en sus propiedades fisicoquímicas siendo más hidrófobo y con una mayor disposición a formar agregados. (37)

La enzima γ -Secretasa muestra tres tipos de actividades proteolíticas:

- Una función autoproteolítica, en la cual la Presenilina de longitud completa es cortada dentro del bucle que se encuentra entre el TMD6 y el TMD7 para activar el complejo para la escisión de otros sustratos.
- Una función endoproteolítica que escinde dominios transmembrana tipo I
- Una función carboxipeptidasa, mediante la cual el fragmento restante que contiene la mayor parte del dominio transmembranal es cortado aproximadamente cada tres aminoácidos hasta ser finalmente liberado. Muchos estudios sugieren que, para APP, la primera hidrólisis mediada por γ -Secretasa para liberar el AICD tiene lugar en la interfase citosólica (ϵ /sitio S3) esta escisión inicial forma un péptido A β de 48 o 49 aminoácidos. A partir de esta evidencia, se sugieren dos vías para la producción de A β dependiendo del sitio exacto del corte inicial: A β 49 \rightarrow A β 46 \rightarrow A β 43 \rightarrow A β 40 y A β 48 \rightarrow A β 45 \rightarrow A β 42 \rightarrow A β 39, esta demostración es apoyada por la detección de tri y tetra péptidos, correspondientes a los productos del corte.

(40, 43, 45) (Fig.7).

Las mutaciones en PSEN1 y PSEN2 causantes de EA pueden alterar el sitio inicial de escisión ϵ y aumentar la formación de A β 48, aumentando así la relación A β 42/A β 40, así como también alterar la función carboxipeptidasa de γ -Secretasa. (40)

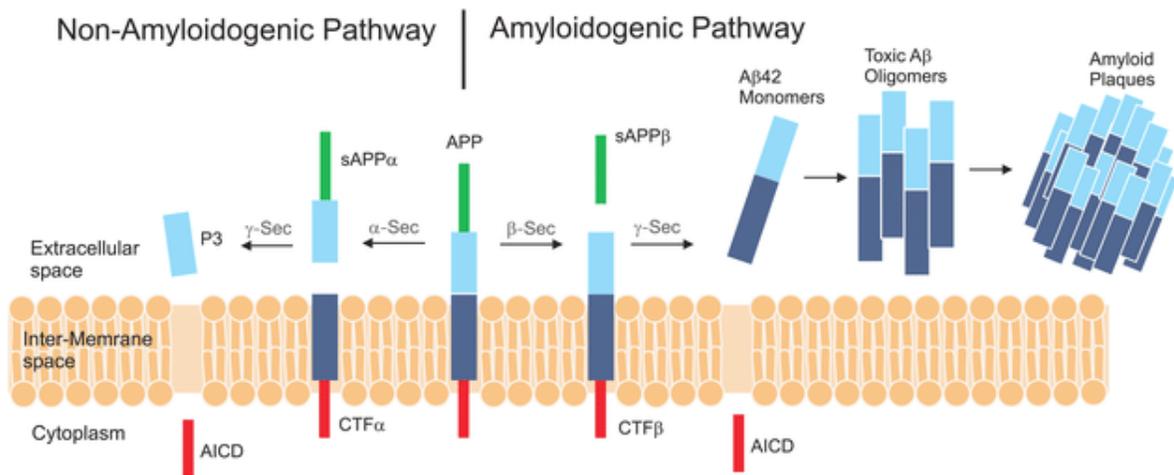


Fig.7. Procesamiento de APP. En la vía no amiloidogénica, α -Secretasa escinde a APP dentro del dominio A β entre los residuos 16 y 17, el corte de esta posición impide la formación del péptido A β . En la vía amiloidogénica, el complejo β -Secretasa, escinde en el dominio N-terminal de A β , generando fragmento C99. Al actuar γ -Secretasa sobre C99, libera los péptidos A β de 40 y 42 aminoácidos.[28]

1.2.5 Presenilina 1 y sus sustratos

A pesar de que APP ha sido el sustrato más estudiado, la lista de sustratos procesados por γ -Secretasa incluye más de 90 sustratos [29], los cuales son diversos en estructura, localización y función, sin embargo la mayoría de estas proteínas tienen características en común, una de estas características es que la mayoría de los sustratos son proteínas transmembranales tipo I, también las proteínas caracterizadas actúan como proteínas de señalización y regulan diferentes eventos celulares como la adhesión, migración, la extensión de neuritas, la dirección axonal, así como la formación, el mantenimiento de las sinapsis y el tráfico vesicular lo que es interesante ya que varios de estos mecanismos están

alterados durante el proceso de neurodegeneración, propio de la Enfermedad de Alzheimer[30].

1.2.5 Presenilina 1 y los defectos endolisosomales

Se han descrito diferentes funciones de PSEN1 que son distintas a el papel que presenta dentro del complejo de γ -Secretasa donde se encarga de la proteólisis transmembranal de distintos sustratos. Dentro de estas funciones se sabe que participa en la señalización celular, la homeostasis intracelular del Calcio, la autofagia y el tráfico endolisosomal. De manera particular resulta interesante que tanto in vivo como in vitro y usando diferentes tipos celulares y cultivos primarios neuronales, así como muestras murinas de cerebro se ha mostrado que la deficiencia de PSEN(1 y 2) provoca anormalidades endolisosomales y autofágicas [31-33]. En este contexto neuronas provenientes de cerebros adultos de modelos murinos con ambas isoformas de PSEN abatidas genéticamente, los defectos endolisosomales y autofágicos, ocurren de manera muy temprana, es decir, alrededor de los 2 o 3 meses después del nacimiento, interesantemente alrededor del mismo tiempo estos ratones empiezan a tener déficits sinápticos y cognitivos, los cuales empeoran con la edad debido a alteraciones neurodegenerativas progresivas, que van acompañados de la fosforilación aberrante de tau [34], lo cual confiere a PSEN un importante papel en este fenómeno. De manera adicional, mutaciones ligadas a la Enfermedad de Alzheimer Familiar también se han asociado a una pronunciada neuropatología lisosomal en neuronas con Enfermedad de Alzheimer [35], lo cual está basado en evidencia de fibroblastos obtenidos de pacientes con Enfermedad de Alzheimer Familiar [36], la ausencia de PSEN permite la acumulación de moléculas en organelos degradativos como lo son las vacuolas autofágicas, además está reportado que las células deficientes de PSEN presentan mayor cantidad de cuerpos multivesiculares (MVBs) [32]. A pesar de que se conoce que todo esto se debe a alteraciones endosomales y autofágicas, el porqué de estas alteraciones continúa siendo debatido.

Las disfunciones endolisosomales y autofágicas en la Enfermedad de Alzheimer también se han ligado a otra característica patomorfológica la cual ha sido poco estudiada y es propia de la Enfermedad de Alzheimer aunque también se ha relacionado al envejecimiento, esta es la degeneración de cuerpos granuvacuolares (GVD) que son organelos de doble membrana y en la Enfermedad de Alzheimer estos se diseminan en un patrón jerárquico, que interesantemente correlaciona con la distribución de los marcadores y el grado de demencia [37], los GVDs comparten marcadores con los MVBs y con los endosomas, por lo que esta característica refleja puntos en común con la disfunción endolisosomal que ocurre en la Enfermedad de Alzheimer [38].

1.3 CUERPOS MULTIVESICULARES Y EXOSOMAS

1.3.1 Cuerpos Multivesiculares

Los endosomas tienen un papel crítico en el transporte dinámico entre la membrana plasmática, y la vía secretoria y el lisosoma. Tiene la habilidad de incorporar proteínas transmembranales y lípidos en vesículas intraluminales, creando de esta forma los cuerpos multivesiculares (MVBs), los cuales aumentan las opciones de distribución de diversas proteínas, pues las secuestran en vesículas que pueden ser entregadas a los lisosomas o bien secretadas por exocitosis al exterior de la célula. Los cuerpos multivesiculares miden entre 100-600 nm y contienen vesículas de alrededor de 50 nm de diámetro, las variaciones en la morfología y distribución de estos organelos, no han sido completamente descritas. Debido a su biogénesis los MVBs comparten proteínas con otros organelos como el endosoma, el aparato de Golgi o el lisosoma. Proteínas como RAB5, RAB7, RAB27 y RAB35 se han asociado a los MVBs, mientras que las vesículas intraluminales están enriquecidas en tetraspaninas como CD9 CD63 o CD81. (Fig. 8)

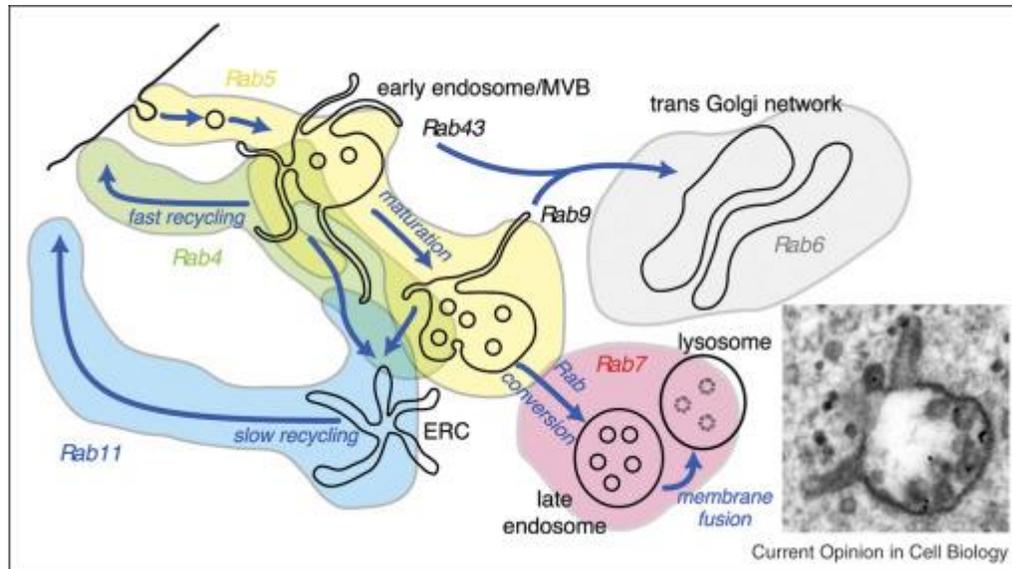


Fig.8 Formación de MVBs, a través de la maduración del endosoma tardío.[39]

1.3.2 Exosomas

Una vez que las vesículas intraluminales son liberadas al exterior de la célula reciben el nombre de exosomas, los cuales se diferencian de otras vesículas extracelulares como lo son las vesículas apoptóticas y los ectosomas (100-1000 nm). Una de las principales características de los exosomas es el proceso a través del cual se forman, este proceso está conformado por tres pasos principales: la invaginación de la membrana plasmática para la formación de vesículas endocíticas o endosomas; la invaginación reversa de la membrana endosomal que resulta en la formación de cuerpos multivesiculares; y la fusión de los cuerpos multivesiculares con la membrana plasmática para la liberación del contenido vesicular [40]. Además de su composición, los exosomas comparten otras características como: la forma redonda, la densidad de flotación que va de 1.5 – 1.9 g/ml y que son liberadas al medio por fusión entre la membrana plasmática y la membrana de los cuerpos multivesiculares que los contienen[41] (Fig 9).

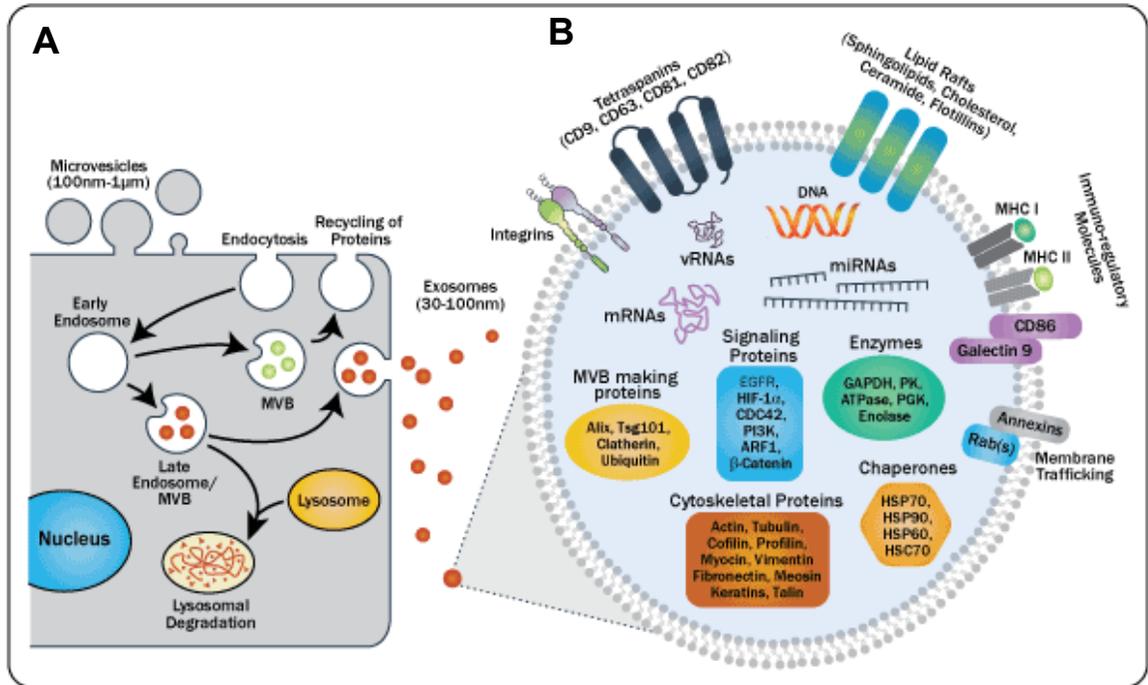


Fig.9.A) Biogénesis, de los exosomas, a través de la invaginación reversa del endosoma tardío, el cual da origen a los MVBs, que tiene en su interior vesículas intraluminales que al momento de que los MVBs se fusionan con la membrana plasmática, son liberadas al espacio extracelular, B) contenidos de los exosomas, el cual tiene moléculas características las cuales se han usado como marcadores como lo son las tetraspaninas. [42]

Aunque la composición de cada subtipo de exosomas aún no está completamente descrita, considerando los mecanismos involucrados en su biogénesis, una mezcla compleja de lípidos, proteínas y otras moléculas citosólicas es incorporada en los exosomas, por lo que presentan un conjunto específico de moléculas [43], entre las que se encuentran algunas proteínas chaperonas como HSP70 y HSP90, subunidades de proteínas G triméricas, proteínas del citoesqueleto como actina y tubulina, proteínas ESCRT, clatrina, proteínas involucradas en el transporte y fusión como Rab7, Rab2 y Anexinas, proteínas de adhesión, enzimas y factores de elongación [44]. Algunos de estos componentes se han utilizado como marcadores para distinguir a los exosomas de otras vesículas[45]. De manera adicional los exosomas contienen una composición lipídica específica [46], están enriquecidos en ceramidas, colesterol y fosfatidilserina [47], que pueden estar involucrados en la formación o en la liberación de las

vesículas. Otro aspecto importante de los exosomas es su enriquecimiento en RNAs pequeños no codificantes, como los miRNAs que pueden modificar el fenotipo y la fisiología de la célula receptora [48](Fig 9). Los exosomas circulantes enriquecidos con proteínas, lípidos y RNAs pueden ser aceptados por células cercanas o bien por células a distancia. De manera general hay tres mecanismos de interacción entre las células blanco y los exosomas. En el primer mecanismo las proteínas transmembranales de los exosomas interaccionan directamente con los receptores de la célula blanco. En el segundo los exosomas se fusionan con la membrana plasmática de la célula receptora y libera su contenido en el citosol, mientras que en el tercer mecanismo los exosomas son internalizados en las células blanco y son fusionados en endosomas, el cual puede mover los exosomas a través de la célula receptora o bien secretarlo a células cercanas a través de secreción paracrina [49]. Es importante tener en cuenta que las proteínas, lípidos y RNAs de los exosomas van a variar dependiendo de la célula de origen y del estado homeostático en el que la célula se encuentre, así como de su microambiente, de manera que al ser transferidos o interactuar con células receptoras, resulta en distintas funciones de los exosomas, dependiendo de su naturaleza [50].

1.3.3 Exosomas en enfermedades neurodegenerativas

Aparentemente varias proteínas patogénicas que están involucradas con enfermedades neurodegenerativas como la Enfermedad de Alzheimer, Parkinson y Esclerosis Lateral Amiotrófica, son contenidas en las vesículas intraluminales que se encuentran en los cuerpos multivesiculares, que van a ser secretadas como exosomas, incluso alteraciones endocíticas como anomalías en la formación de los cuerpos multivesiculares que pueden ser comunes en estas enfermedades sugieren que el deterioro en la generación de los exosomas está asociada con el desarrollo de estas enfermedades [51] (Fig.10).

La enfermedad de Parkinson es una enfermedad neurológica progresiva que está caracterizada por la pérdida de neuronas dopaminérgicas y la presencia de cuerpos de Lewy en el cerebro medio. Estos cuerpos están formados por agregados

mal plegados de α -sinucleína [52], esta proteína puede ser secretada extracelularmente y transportada a células cercanas transmitiendo así su toxicidad [53], mecanismo que podría estarse llevando a cabo con la ayuda de los exosomas, Además los oligómeros de α -sinucleína que están asociados a los exosomas son más fáciles de ser tomados por las células blanco, en comparación con los oligómeros de α -sinucleína que se encuentran libres en el espacio extracelular, producto de la muerte neuronal [53]. Los exosomas también pueden estar jugando un papel importante en la formación de los oligómeros de α -sinucleína y no solo en el transporte de ellos [54] y esto podría deberse a los glucolípidos presentes en la superficie de los exosomas, los cuales pueden tener la capacidad de convertir los monómeros de α -sinucleína en oligómeros tóxicos [55]. Los niveles elevados de α -sinucleína exosomal en sangre pueden estar reflejando el incremento de la generación de α -sinucleína unida a exosomas en los cerebros de pacientes con enfermedad de Parkinson, de esta manera los exosomas tienen un papel importante en el desarrollo de la enfermedad de Parkinson.[56, 57]

La Esclerosis Lateral Amiotrófica es una enfermedad neurodegenerativa, que empieza en la edad adulta y está caracterizada por la pérdida de neuronas motoras principalmente en la medula espinal y el tronco encefálico y se ha asociado a mutaciones en el gen de Superóxido dismutasa (SOD1)[58]. Esta proteína mal plegada se ha observado en neuronas tanto de pacientes con Esclerosis Lateral Amiotrófica esporádica como familiar [59]. La secreción de SOD1 asociada a exosomas provenientes de astrocitos incrementa la muerte neuronal, sugiriendo así que los exosomas transportan las moléculas tóxicas a las células cercanas, lo cual puede contribuir a la propagación de la enfermedad [60].

Los exosomas en la Enfermedad de Alzheimer al igual que en las otras enfermedades mencionadas anteriormente, ayudan a la propagación de la enfermedad, pues el péptido A β y la proteína tau hiperfosforilada que están acumuladas en los cuerpos multivesiculares, es secretada en los exosomas [61], de manera adicional algunas proteínas abundantes en los exosomas como Alix y flotilina-1 son abundantes en las placas del péptido A β en los cerebros de los

pacientes con Enfermedad de Alzheimer [62], lo cual sugiere que los exosomas son importantes en la formación de estos depósitos.

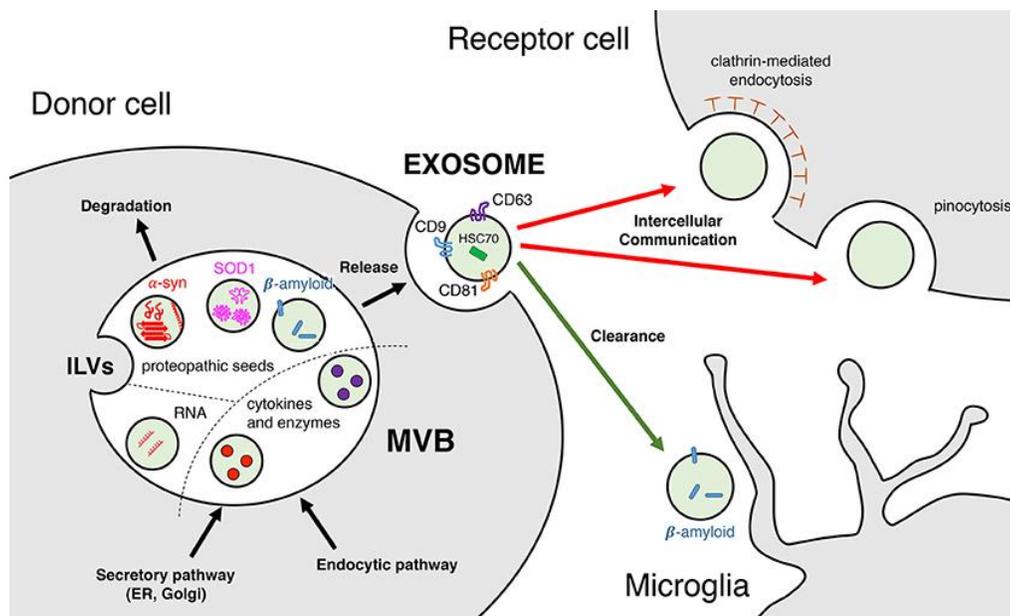


Fig.10. Acumulación de las proteínas mal plegadas en los cuerpos multivesiculares y transporte de ellas por medio de los exosomas

También se ha sugerido que algunos esfingolípidos, principalmente los glicoesfingolípidos que contienen ácido siálico sirven como un sitio de anclaje para el péptido A β y estos son abundantes en la membrana de los exosomas, incluso en niveles mayores a los encontrados en las células parentales [63]. De hecho, cuando la producción de exosomas fue inhibida, en un modelo de ratón con Enfermedad de Alzheimer, mediante la disminución de la síntesis de ceramida que, como se mencionó anteriormente, es un lípido abundante en los exosomas, el total de placas del péptido A β disminuyó también [64]. Sin embargo, los exosomas también podrían estar teniendo un efecto positivo, pues diversos estudios demuestran que los exosomas provenientes de neuronas y de glía son internalizados de manera preferencial por la microglía, de esta manera el A β es captado por la microglía y degradado por medio del sistema lisosomal, esto sugiere que los exosomas podrían participar en la eliminación del péptido A β transportándolo hacia la microglía [64]. Por otro lado la proteína Tau, que también ha sido asociada a la Enfermedad de Alzheimer y a otras patologías denominadas taupatías al formar marañas fibrilares,

también ha sido asociada a los exosomas y el nivel de tau fosforilada contenida en los exosomas incrementa en el líquido cefalorraquídeo en etapas tempranas de la enfermedad, el mecanismo por el cual tau es incorporada a los exosomas aún no ha sido descrito completamente, sin embargo es posible que esta proteína pueda anclarse a la superficie de los exosomas, de la misma manera que ocurría con el péptido A β , la liberación de exosomas que contienen tau fosforilada puede estar contribuyendo a la propagación y al desarrollo de la Enfermedad de Alzheimer.

II ANTECEDENTES

En el 2006, Yescas y colaboradores reportaron una mutación en nueve familias mexicanas no relacionadas entre ellas que eran residentes de varios municipios del estado de Jalisco. Esta mutación es la Ala431Glu y se encuentra en el exón 12 del gen *PSEN1*. La mutación tiene una penetrancia del 100% y la edad promedio de inicio sintomatológico es de 45 años. Además de presentar datos clínicos de demencia, varios miembros portadores presentaban un cuadro de paraparesis espástica (inmovilidad de las extremidades inferiores) correspondiente a un síndrome piramidal. Cinco de estos sujetos recibieron diagnóstico histopatológico post-mortem de Enfermedad de Alzheimer. [65]

En el año 2015, nuestro laboratorio se encontró la misma mutación en cuatro miembros de una familia residente de la Ciudad de México. Dos de estos pacientes presentaban paraparesis espástica y afasia transcortical motora. Así mismo, se sabe que en las personas con enfermedades neurodegenerativas, el porcentaje que presenta un déficit olfativo que, con frecuencia supera el 90%. Se ha reportado que estos déficits aparecen de manera temprana, a veces precediendo a los clásicos síntomas cognitivos y motores [66], al realizar las pruebas olfativas a los sujetos portadores de la mutación Ala431Glu, se observó que en general presentan una capacidad olfatoria disminuida en comparación con el grupo control y en el caso de los pacientes sintomáticos esta disminución es severa [67].

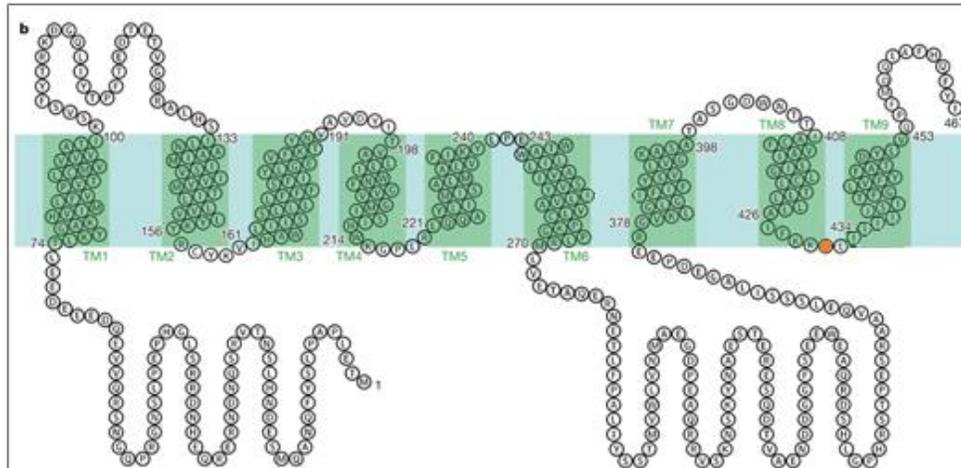


Fig.11. Diagrama esquemático de la topología de la membrana en donde se encuentra PSEN1, marcando la mutación Ala431Glu de color naranja.[68]

El epitelio olfatorio contiene células sensoriales bipolares que funcionan como receptores olfativos. Los axones de dichas neuronas se agrupan para formar el nervio olfativo. Ellos convergen en los glomérulos del bulbo olfatorio para hacer sinapsis con las dendritas de las células mitrales y en penacho [69]. El conjunto de los axones de estas últimas células se agrupa para formar el tracto olfatorio, vía responsable de transmitir la información procedente del bulbo olfatorio hacia la corteza olfativa primaria. El tubérculo olfatorio, el núcleo olfativo anterior, la corteza piriforme, la amígdala y la corteza entorrinal se conocen con el nombre de corteza olfativa primaria; estas estructuras reciben proyecciones directas del bulbo olfatorio. Cada una de estas estructuras a su vez, envía sus aferencias hacia otras partes del cerebro, que en conjunto dan lugar a la corteza olfativa secundaria. De las regiones cerebrales que se presume forman la corteza olfativa secundaria, la corteza entorrinal envía proyecciones hacia el cuerno de Ammon 3 (CA3) hipocampal, estableciendo una vía de comunicación entre el epitelio olfativo y el hipocampo.

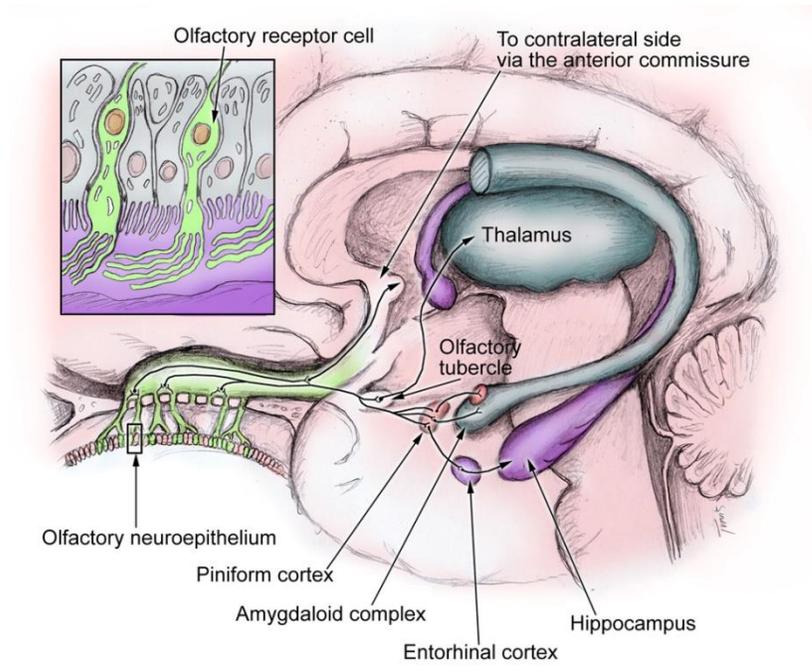
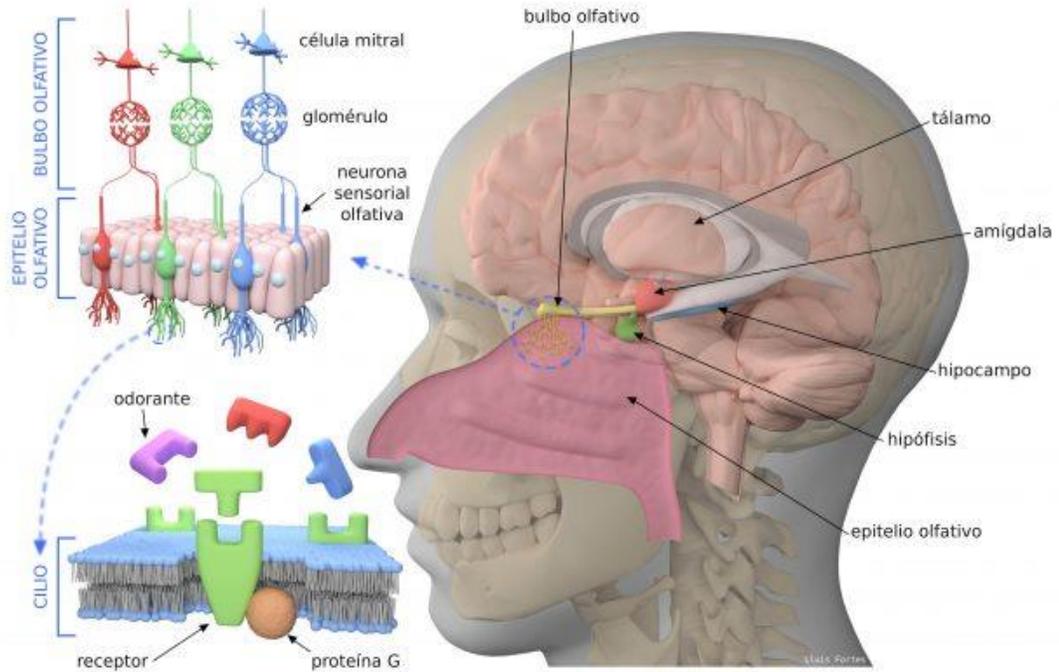


Fig 12. Diagrama esquemático de la principal comunicación entre el bulbo olfatorio y el giro dentado del hipocampo. Las flechas rojas indican las fibras de comunicación.[70]

III JUSTIFICACIÓN

La Enfermedad de Alzheimer familiar es un padecimiento causado por mutaciones en los genes de *APP*, *PSEN1*, *PSEN2*, siendo las mutaciones en *PSEN1* las más comunes. Éstas producen diversos defectos endolisosomales que conllevan a una alteración en la liberación de vesículas extracelulares como los exosomas. Los exosomas transportan moléculas específicas, como ácidos nucleicos lípidos y proteínas como el β -Amiloide y la proteína Tau hiperfosforilada. Debido a que existe una comunicación sináptica entre el bulbo olfatorio y el hipocampo a través de la vía olfatoria, es importante conocer el efecto que pudieran tener los exosomas liberados por las células precursoras neurales del epitelio olfatorio de pacientes con Enfermedad de Alzheimer Familiar en las células precursoras neurales del hipocampo fetal humano.

IV HIPÓTESIS

Los exosomas de las células precursoras neurales del epitelio olfatorio de pacientes con Enfermedad de Alzheimer Familiar portadores de la mutación Ala431Glu, tienen elementos que pueden afectar la fisiología de las células precursoras neurales de hipocampo fetal humano.

V OBJETIVO GENERAL

Caracterizar los exosomas derivados de las células precursoras neurales de epitelio olfatorio de controles y pacientes con la Enfermedad de Alzheimer familiar, y evaluar el efecto que puedan ejercer sobre las células precursoras neurales del hipocampo fetal humano.

VI OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Aislar los exosomas derivados de las células precursoras neuronales del epitelio olfatorio de pacientes con Enfermedad de Alzheimer familiar y de individuos control sin la mutación.
2. Caracterizar por Microscopía electrónica los exosomas aislados del epitelio olfatorio de pacientes con Enfermedad de Alzheimer familiar y de individuos control sin la mutación.
3. Caracterizar por Microscopía electrónica los exosomas aislados del epitelio olfatorio de pacientes con Enfermedad de Alzheimer familiar y de individuos control sin la mutación..
4. Evaluar la presencia del péptido β Amiloide en los exosomas tanto de pacientes con Alzheimer familiar como de individuos control sin la mutación.
5. Evaluar el efecto de los exosomas en las células precursoras de hipocampo mediante un análisis morfológico, ensayo de viabilidad y cambios en la proliferación de las células precursoras neurales de hipocampo humano.

VII METODOLOGIA

7.1 Obtención y cultivo de precursores neuronales de epitelio olfatorio

Los precursores neuronales del epitelio olfatorio se obtuvieron con base a lo reportado por Benitez King et al, el protocolo de obtención consiste en un exfoliado de la región anterior de los turbinados mediales laterales mediante el uso de un cepillo especial de 2.4 cm de largo y 3 mm de diámetro. El exfoliado se coloca en DMEM/F12 suplementado con 10% de suero fetal bovino, 4mM L-glutamina, 100 μ g/ml de estreptomicina y 100 IU/ml de penicilina. Una vez que las células alcanzan el 80% de confluencia se desprenden con tripsina al 0.25%. Las células se cultivan

a 37° C, en DMEM/F12 suplementado con 10% de suero fetal bovino, 4 mM L-glutamina, 100 µg/ml de estreptomycin y 100 IU/ ml de penicilina.

7.2 Aislamiento de exosomas

El aislamiento de exosomas de las células precursoras neurales de epitelio olfatorio se realizó mediante precipitación basada en polímeros con el reactivo polietilenglicol, modificando el protocolo propuesto por Weng et al en el 2016. Se recolectó el medio condicionado sin suero de las células precursoras de epitelio olfatorio de una caja p100 el cual se centrifugó a 500 g por 10 min para remover células y debris celular, el sobrenadante se transfiere a un tubo estéril y se centrifugó a 3000 g por 10 minutos, el sobrenadante se transfirió a un tubo estéril y se filtró por un filtro Milipore de .22µ, se añadió el volumen apropiado de polietilenglicol, el cual debe corresponder al 10% de la solución final, se mezcla por inversión, se incubó toda la noche a 4°C, una vez pasado el tiempo de incubación, se centrifuga a temperatura ambiente a 3000 g por 10 minutos, se resuspendió en 5 ml de PBS estéril y se le agrego polietilenglicol, se incubó a 4°C por dos horas y se centrifugó a 300g por 10 minutos, los exosomas se ven como un pellet beige, se quita el sobrenadante, se retiran los remanentes de fluidos y finalmente el pellet es resuspendido en 500 µl de PBS1X.

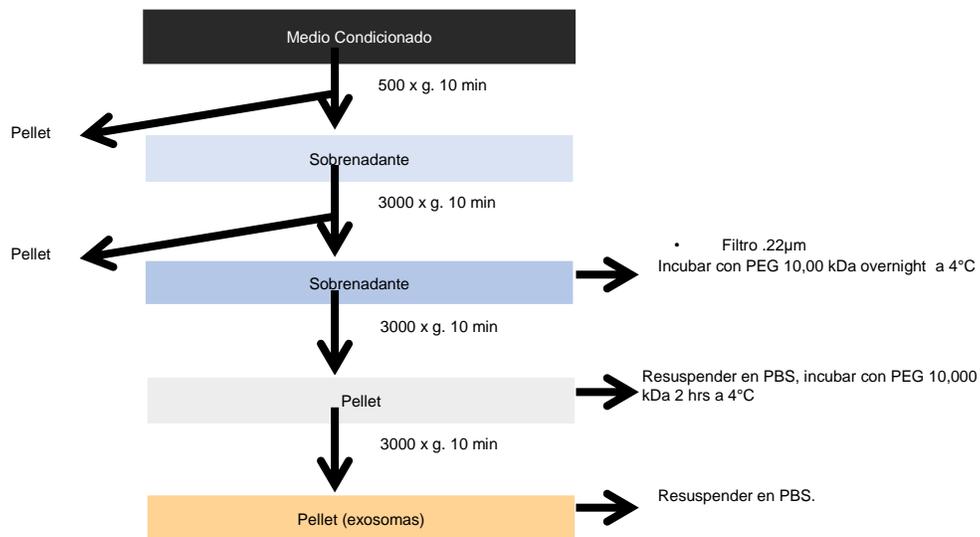


Fig.13. Esquema del protocolo modificado, seguido con polietilenglicol de 10, 000 para aislar exosomas derivados de células de epitelio olfatorio.

7.3 Proteínas celulares y Western Blot

Se determinó la cantidad proteica de CD63, CD9 y Alix presente en los exosomas mediante la técnica de Western Blot. Para ello se realizó la extracción de proteínas de los exosomas, previamente aislados, se adicionó buffer RIPA 1X con inhibidores de proteasas y fueron incubado por 5 minutos en hielo. Las muestras fueron guardadas a -20°C toda la noche, al día siguiente las muestras se resuspendieron y centrifugaron durante 10 minutos a 14,000 rpm a una temperatura de 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo para determinar la concentración de proteínas mediante el método de BCA (ThermoScientific 23225), a las muestras se les adicionó buffer de carga y se pusieron en baño de agua a 100°C durante 5 minutos. Al finalizar las muestras fueron guardadas a -20 °C.

Se cargaron 30ug de proteína por pozo; Las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes durante 120 minutos, a voltaje constante (110 Volts). Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, en condiciones de corriente constante (500 mA), durante una hora y media; al término de la transferencia, las membranas se tiñeron durante 1 minuto con Rojo de Ponceau. Las membranas se lavaron con TBS-Tween-20 al 0.05% y se bloquearon con leche libre de grasas al 5%, en TBS-Tween-20 al 0.05%, durante una hora y media, en agitación. Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios (CD9, CD63 y Alix), en una dilución 1:1000, en leche libre de grasas al 5%, en TBS-Tween-20 al 0.05%, durante toda la noche, en agitación, a 4°C; Al día siguiente se recuperó el anticuerpo y las membranas se lavaron 3 veces, durante 10 minutos, con TBS-Tween-20 al 0.05%; Al finalizar, se incubaron 1 hora con sus respectivos anticuerpos secundarios, conjugados con HRP.

7.4 Microscopía electrónica de exosomas y cuerpos multivesiculares

Las rejillas de microscopia electrónica fueron preparadas con 1.2 gr de polivinil formal y 100mL de cloroformo, para crear una membrana de polivinilformal sobre la rejilla, la cual fue contrastada con acetato de uranilo. Una vez aislados los exosomas el pellet fue resuspendido en 100 μ l de PBS1X, se le añadió glutaraldehído al 1% y se cargaron 20 μ l de la muestra por 10 minutos, pasado este tiempo se retiró con papel absorbente, y se colocaron 20 μ l de agua por 1 minuto, se retiró con papel absorbente y se contrastó 3 veces con uranilo por 1 minuto. Para observar los cuerpos multivesiculares se partió de 6 millones de células de cada muestra, se les retiró el medio y las células fueron lavadas 2 veces con PBS a 37°, se fijaron con paraformaldehído al 2% por 10 minutos, se levantaron con un gendarme y se centrifugaron a 2000 rpm por 5 minutos para obtener una pastilla, a la cual se le agregó 500 μ l de PBS1X solo para despegarlo del fondo del tubo, sin resuspender y se deshidrató con etanol en forma secuencial al 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, y 100% dejándolo 15 minutos en cada una de las concentraciones de etanol anteriores, se le añadió Osmio por 2 horas, se lavó con PBS 1X y se fijó en resina Spurr, durante 8 horas, se dejó a 70° durante 12 horas y se procedió a hacer los cortes con ultramicrotomo para colocarlos en la membrana, para fijarlos con acetato de uranilo durante 5 minutos y lavarlos en agua bidestilada por 2 minutos.

7.5 Cultivo de células precursoras neurales de hipocampo fetal humano

Las células precursoras de hipocampo fetal se obtuvieron de la compañía PhoenixSongs Biologicals Inc. Estas células crecen en una incubadora a una temperatura de 37°C, concentración de CO₂ al 6% y una humedad relativa de 95%. Las botellas en las que se siembran son tratadas previamente con Laminina (10 μ g/ml, Sigma L-2020) durante 2 horas a 37°C, transcurrido el tiempo de incubación se retira el exceso de Laminina de la botella y las células se siembran directamente en la superficie. Dichas células se cultivan en medio Neurobasal Completo, que contiene: medio de cultivo Neurobasal, 2% de B-27, 0.25% de Glutamax, 10% de penicilina-estreptomina y 0.02% de glucosa, suplementado con el factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF, 20ng/ml), factor de crecimiento epidérmico (EGF, 20ng/ml) y el factor inhibidor de la leucemia (LIF, 1 μ g/ml).

7.6 Evaluación del cambio morfológico

Después del tratamiento de las células de hipocampo fetal, con los exosomas derivados de las células de epitelio olfatorio tanto de pacientes como de controles, se evaluó por microscopía óptica el cambio morfológico durante 48 horas.

7.7 Ensayo de viabilidad

Las células precursoras de hipocampo fetal se sembraron en una placa de 96 pozos, y se incubaron a 37°C por 24 horas. Al término de este tiempo se llevó a cabo el tratamiento con exosomas derivados de células precursoras neurales de epitelio olfatorio y a las 12, 24 y 48 horas después del tratamiento se realizó el ensayo de viabilidad para el que se añadieron 10µl de WST-1. Para ello se debe mezclar gentilmente por 1 min, se incubó por 3 horas a 37°C. Una vez concurrido el tiempo se mezcló gentilmente por 1 min y se leyó la placa en el lector de ELISA a una longitud de onda de 450 nm.

7.8 Citometría de flujo

Para los ensayos de citometría, se utilizaron de 200 mil a 300 mil células por tubo, Para retirar el medio, los tubos se centrifugaron por 5 min a 1500 rpm, después de decantar el medio, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 2% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Para las tinciones citoplasmáticas las células fueron permeabilizadas durante 15 minutos con PBS-Tween-20 al 0.7%, se adicionaron los anticuerpos CD34, CD45, CD71, CD75, CD105, CD90 conjugados, en una dilución 1:1000 en 100 µl de buffer de bloqueo, y se incubaron 30 min en agitación y obscuridad. Finalmente se colocó una solución de PBA (2% de SFB y 0.1% de azida de sodio en PBS), y las muestras se guardaron a 4°C protegidas de la luz hasta su lectura. Los datos se capturaron en un citómetro de flujo Fortessa (BD) y se analizaron en el programa Flowjo versión 7.6.

VIII RESULTADOS

8.1 Estandarización del aislamiento de exosomas con células HeLa

Con la finalidad de reproducir y estandarizar el protocolo de precipitación basada en polímeros el cual fue propuesto por Weng en el 2016, se realizó el aislamiento de exosomas provenientes de dos líneas celulares, HeLa y SiHa, las cuales fueron usadas por los autores en su reporte. Los exosomas fueron observados por medio de microscopía electrónica de transmisión la cual es una herramienta útil para verificar tanto el resultado del aislamiento de las vesículas, así como el estado en las que estas se encuentran. De igual manera, esta técnica da un primer acercamiento al contenido de los exosomas que se están observando, al revisarse diferentes campos las vesículas aisladas tenían un tamaño de entre 40 y 80 nm, con la típica forma de “dona” reportada anteriormente (Fig. 14).

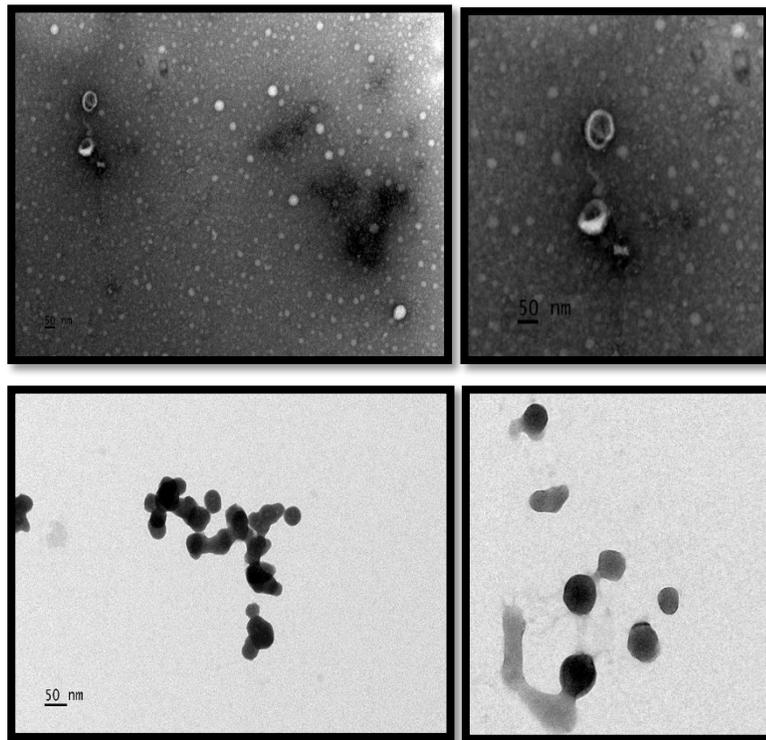


Fig 14. Microscopía electrónica de transmisión de exosomas derivados de células HeLa. Del lado izquierdo se muestran las vesículas extracelulares, en las que se puede observar la forma de dona característica de los exosomas y el tamaño aproximado de 60 nm.

8.2 Optimización del protocolo de aislamiento de exosomas para las células de epitelio olfatorio

Debido a que en el protocolo descrito por Weng, se habían utilizado células HeLa, al momento de reproducirlo en las células de epitelio olfatorio, este protocolo fue poco efectivo, por lo que fue necesario optimizarlo, para esto decidimos modificarlo, sustituyendo el Agua destilada con la que se preparaba originalmente la solución de polietilenglicol por PBS 1X y aumentar el tiempo de incubación de 2 horas a toda la noche (12 horas), de esta manera se tuvo un incremento del 35% de proteína de exosomas derivados de epitelio olfatorio, cuantificados por BSA (Fig. 15).

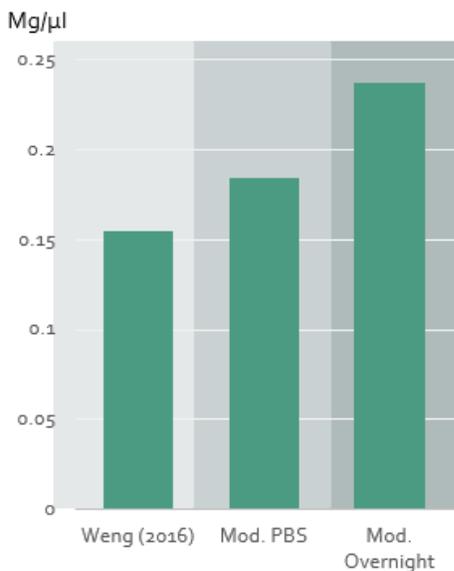


Fig 15. Cuantificación de proteína exosomas derivados de células de epitelio olfatorio, por el método de BCA en tres diferentes condiciones.

8.3 Caracterización de exosomas derivados de epitelio olfatorio por Microscopía electrónica de transmisión

Los exosomas derivados del epitelio olfatorio del paciente masculino de 37 años (PM37) y del control masculino de 31 años (CM31), fueron aislados siguiendo

el protocolo previamente descrito, y fueron observados por microscopía electrónica de transmisión, en la cual al observar diferentes campos, los exosomas derivados de las células del paciente portador de la mutación tenían un diámetro aproximado de 40 a 60 nm, mientras que los exosomas derivados de las células del control tenían un diámetro aproximado de 10 a 20 nm (Fig. 16), lo cual podría sugerir la existencia de un cambio en la formación de las vesículas intraluminales, que podría estar asociado a un fenómeno patomorfológico en los MVBs que consiste en un alargamiento de ellos, el cual ha sido reportado con anterioridad en otras mutaciones de FAD.

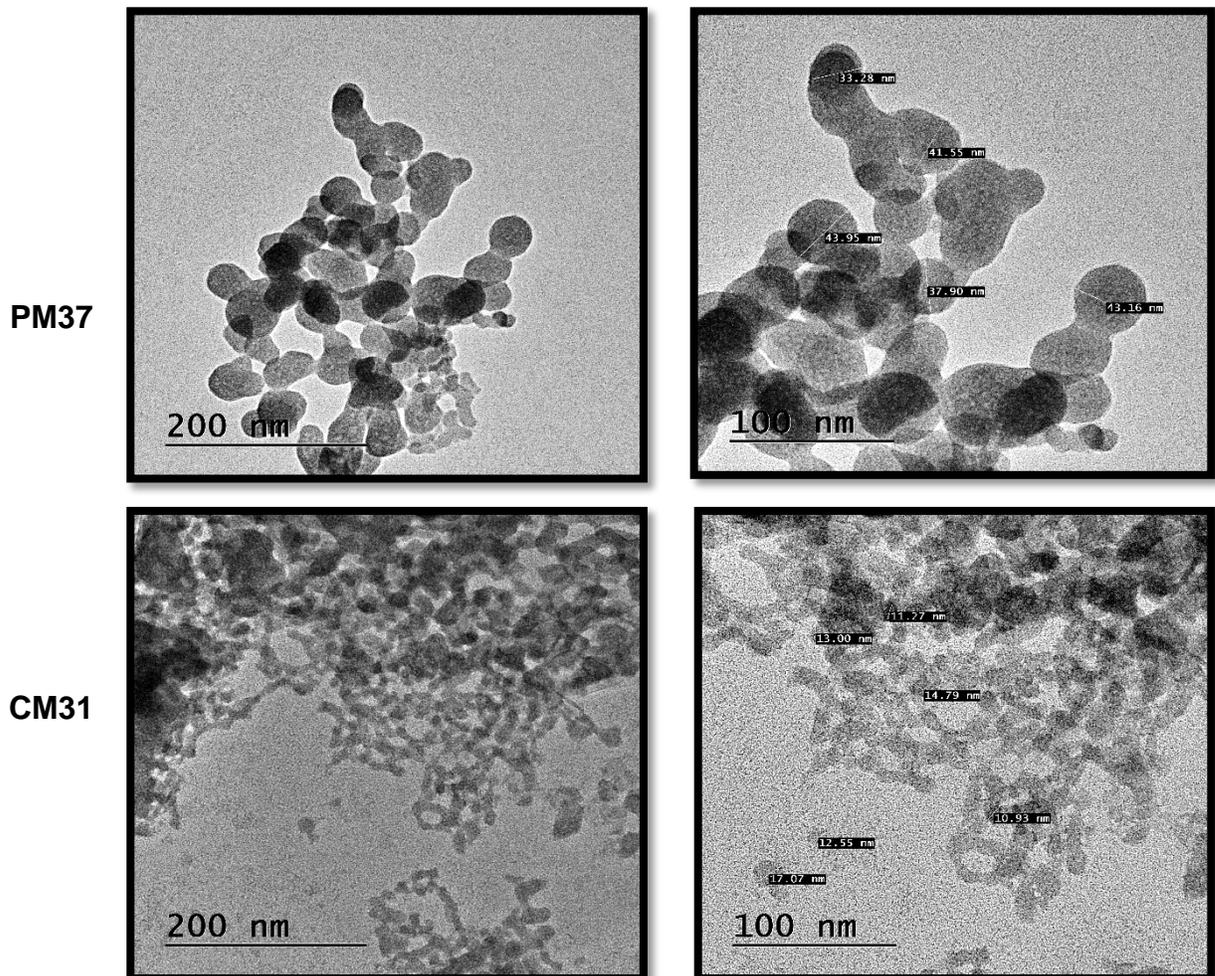


Fig 16. Caracterización por microscopía electrónica de transmisión de los exosomas derivados de epitelio olfatorio, tanto del PM37 como del CM31, en los cuales se puede observar la diferencia de tamaños entre ambos exosomas.

8.4 Tinción con azul Coomassie de SDS-PAGE

Las proteínas obtenidas a partir de los exosomas derivados de las células del epitelio olfatorio tanto de PM37 como del CM31 fueron separadas por electroforesis SDS-PAGE usando geles de poliacrilamida al 12%, en el cual se encontró que las proteínas obtenidas, no se encontraban degradadas y correspondía con el patrón de azul de Coomassie reportado por Weng, de manera adicional se comparó el patrón de las proteínas obtenidas a partir de exosomas del epitelio olfatorio con las proteínas obtenidas a partir de exosomas del suero fetal bovino (Fig.17).

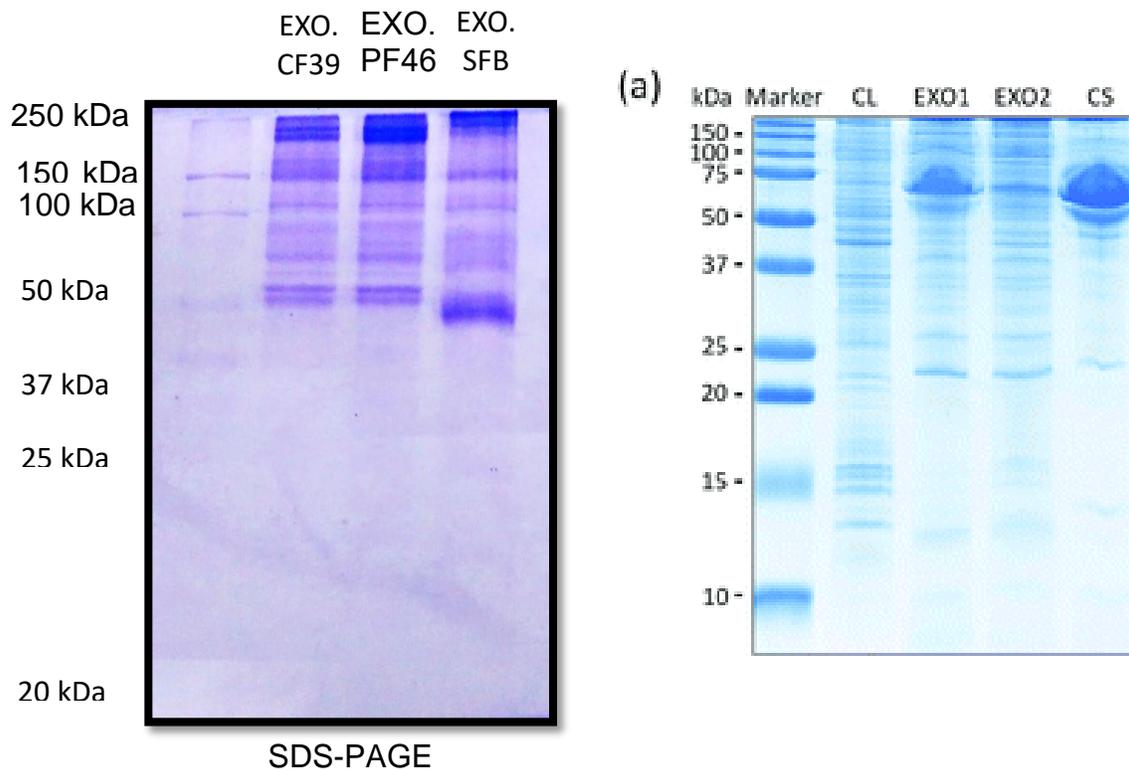


Fig 17. Tinción con azul Coomassie de los exosomas provenientes tanto de las células de epitelio olfatorio de PM37 y de CM31 como de los exosomas provenientes del Suero fetal bovino, comparados con lo reportado por Weng en 2016.

8.5 Caracterización por Western Blot de los marcadores de exosomas

Para confirmar que las vesículas aisladas de las células de epitelio olfatorio, que habían sido observadas por microscopia electrónica de transmisión, eran exosomas, fue necesario realizar un Western Blot tanto del PM37 como del CM31 para las proteínas CD9, CD63 y Alix, las cuales han sido utilizadas como marcadoras de exosomas, las dos primeras son tetraspaninas que se encuentran en la membrana endosomal y que al momento de que se genera la invaginación reversa de la membrana, se integran a la membrana de las vesículas intraluminales, mientras que Alix es una proteína asociada al complejo ESCRT, la cual ayuda en la distribución de las proteínas dentro de las vesículas intraluminales en los MVBs. Los extractos proteícos obtenidos a partir de los exosomas tanto de CM31 como de PM37 dieron positivo a los tres marcadores mencionados previamente (Fig.18), de tal manera que las tetraspaninas nos indicaban la presencia de vesículas extracelulares y Alix nos confirmaba que estas vesículas eran exosomas.

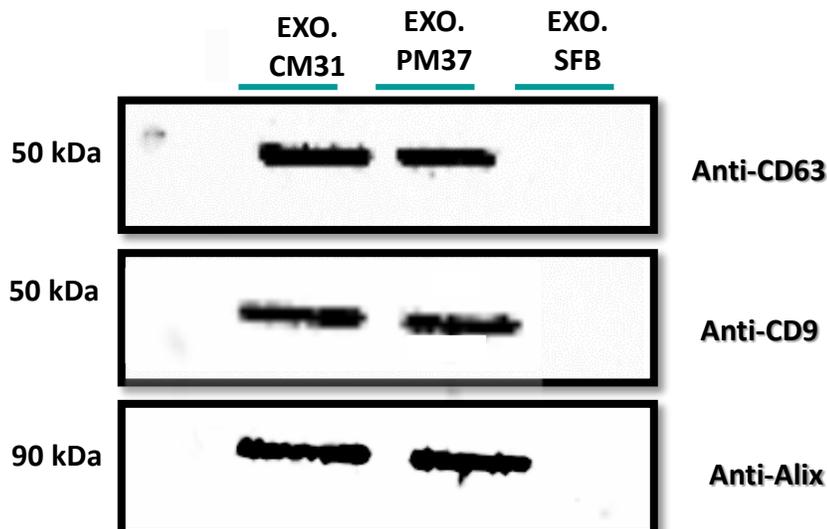


Fig 18. Western Blot de exosomas derivados de epitelio olfatorio de PM37 y CM31 que muestra la expresión de los marcadores de exosomas CD9, CD63 y Alix.

8.6 Los exosomas derivados de las células de PM37 tienen un efecto citotóxico en comparación con los exosomas derivados de las células de CM31 sobre las precursoras neurales de hipocampo fetal humano

Teniendo como antecedente que los exosomas son vesículas capaces de transportar moléculas de una célula de origen a una célula blanco, nosotros queríamos evaluar el efecto que los exosomas derivados del epitelio olfatorio, tanto del paciente masculino de 37 años como del control etario de 31, puesto que los exosomas podrían estar participando en la fisiopatología de la enfermedad transportando el péptido A β , al hipocampo el cual como sabemos es una de las principales zonas dañadas en la Enfermedad de Alzheimer, es por ello que se evaluó el efecto que estos exosomas podrían tener en células precursoras neurales de hipocampo fetal humano, en el cual evaluamos los cambios morfológicos por microscopia óptica, la viabilidad por WST-1 y la proliferación evaluando Ki67

Los cultivos celulares de epitelio olfatorio fueron privados de SFB durante 24 horas, al terminar el paso del tiempo se colectó el medio condicionado y los exosomas provenientes de epitelio olfatorio de PM37 Y CM31, así como de SFB fueron aislados por el método previamente descrito, los cuales fueron aplicados sobre células precursoras neurales de hipocampo fetal humano a las 12, 24 y 48 hrs.

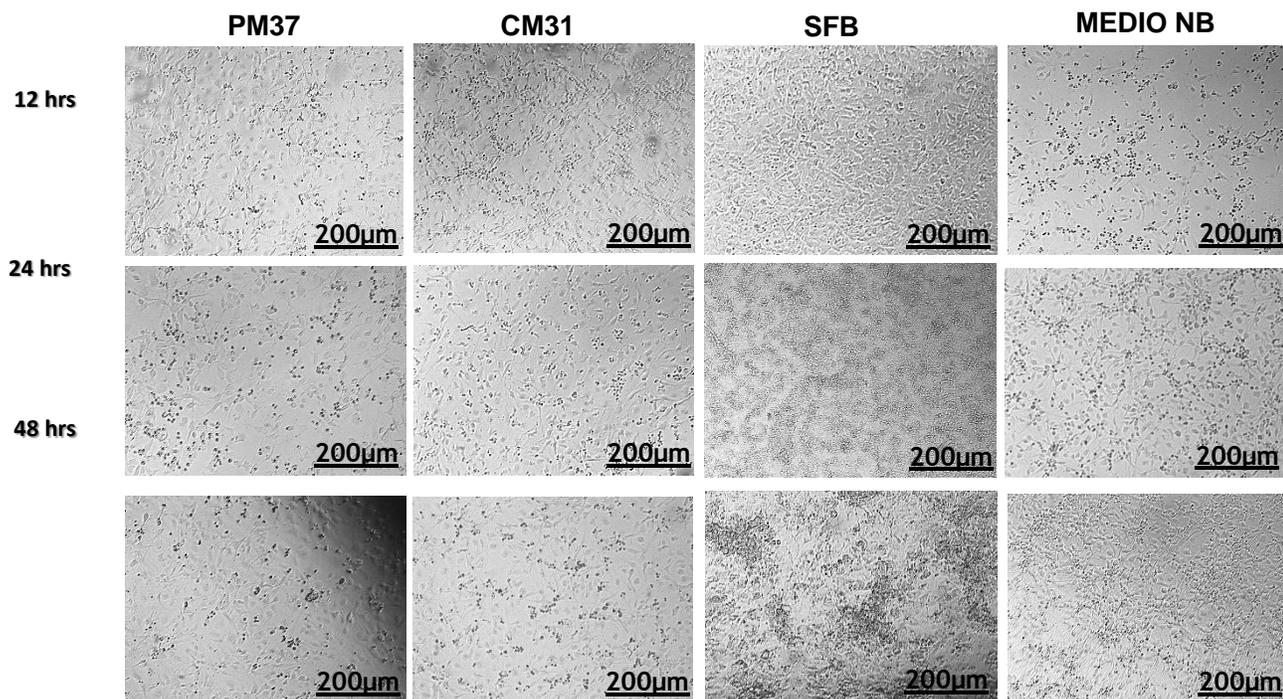


Fig 19. Fotografías por microscopía óptica de células de hipocampo fetal humano, después de ser tratadas con exosomas provenientes de PM37, CM31, SFB y las células tratadas con medio neurobasal, a las 12, 24 y 48 hrs.

El cambio morfológico fue evaluado por microscopía óptica a los tiempos señalados con anterioridad, los exosomas procedentes tanto de PM37 como de CM31 no tuvieron efectos en la morfología de estas células (Fig. 19). Sin embargo, si fue evidente la disminución de la confluencia, en especial al compararla con las células control, las cuales fueron cultivadas con el medio Neurobasal completo. De manera adicional se puede ver que las células que fueron tratadas con los exosomas procedentes del SFB tuvieron un aumento en la confluencia de las células.

Al momento de evaluar la citotoxicidad de las células con el reactivo WST-1, las diferencias que hubo entre las células tratadas con los exosomas derivados de las células de PM37 y los exosomas derivado de CM31, a los tres tiempos establecidos previamente, las cuales fueron significativas tanto a las 12 horas ($p=0.044$) y a las 24 horas ($p=0.048$) (Fig.20) , lo cual nos puede indicar que el contenido transportado por PM37 puede contener moléculas tóxicas para las células precursoras del hipocampo fetal humano, dichas moléculas características de la Enfermedad de Alzheimer como lo es el péptido A β pudieran estar contribuyendo al desarrollo de la enfermedad. A las 48 horas no hubo diferencias significativas entre ambos grupos, lo cual puede corresponder a la falta de nutrientes debido al desgaste del medio neurobasal. Los exosomas obtenidos a partir del SFB también fueron evaluados en este ensayo y debido a los nutrientes que tienen ellos, se observó un aumento del 13% en el número de células en comparación con las que fueron cultivadas con el medio neurobasal completo.

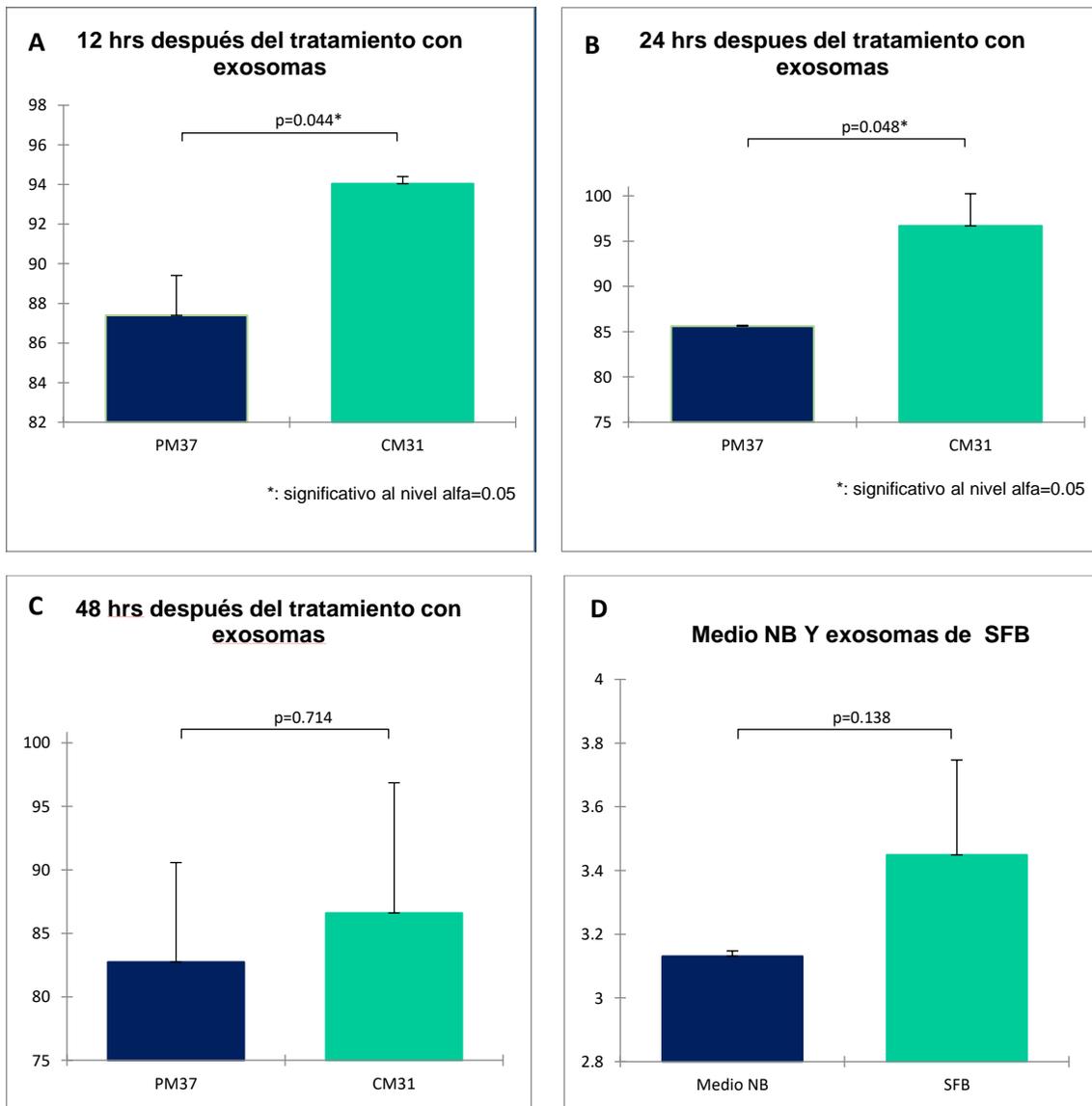


Fig 20. Graficas A, B y C representan el porcentaje de viabilidad entre las células de hipocampo fetal que fueron tratadas con los exosomas derivados de PM37 YCM31, normalizado con el control que fue cultivado con medio Neurobasal, la gráfica D muestra la comparación de los resultados del WST-1 entre el cultivo control y el que fue tratado con los exosomas de SFB.

8.7 Las células de pacientes portadores de la mutación Ala431Glu presentan cambios en el tamaño y en la cantidad de vesículas intraluminales

Debido a las diferencias de tamaño, encontradas en la microscopía electrónica de los exosomas derivados de las células de PM37 y CM31, decidimos analizar también los MVBs por Microscopía electrónica, en los cuales no solo fue

evidente que las vesículas intraluminales (ILVs) tenían diferentes tamaños los cuales correspondían a los tamaños encontrados anteriormente en los exosomas, sino también se encontró que los MVBs de PM37 tenían menor contenido de ILVs comparados con su control (Fig. 21), lo cual puede sugerir que las alteraciones endolisosomales que han sido reportadas con anterioridad ocurren de manera temprana en los portadores de la mutación Ala431Glu.

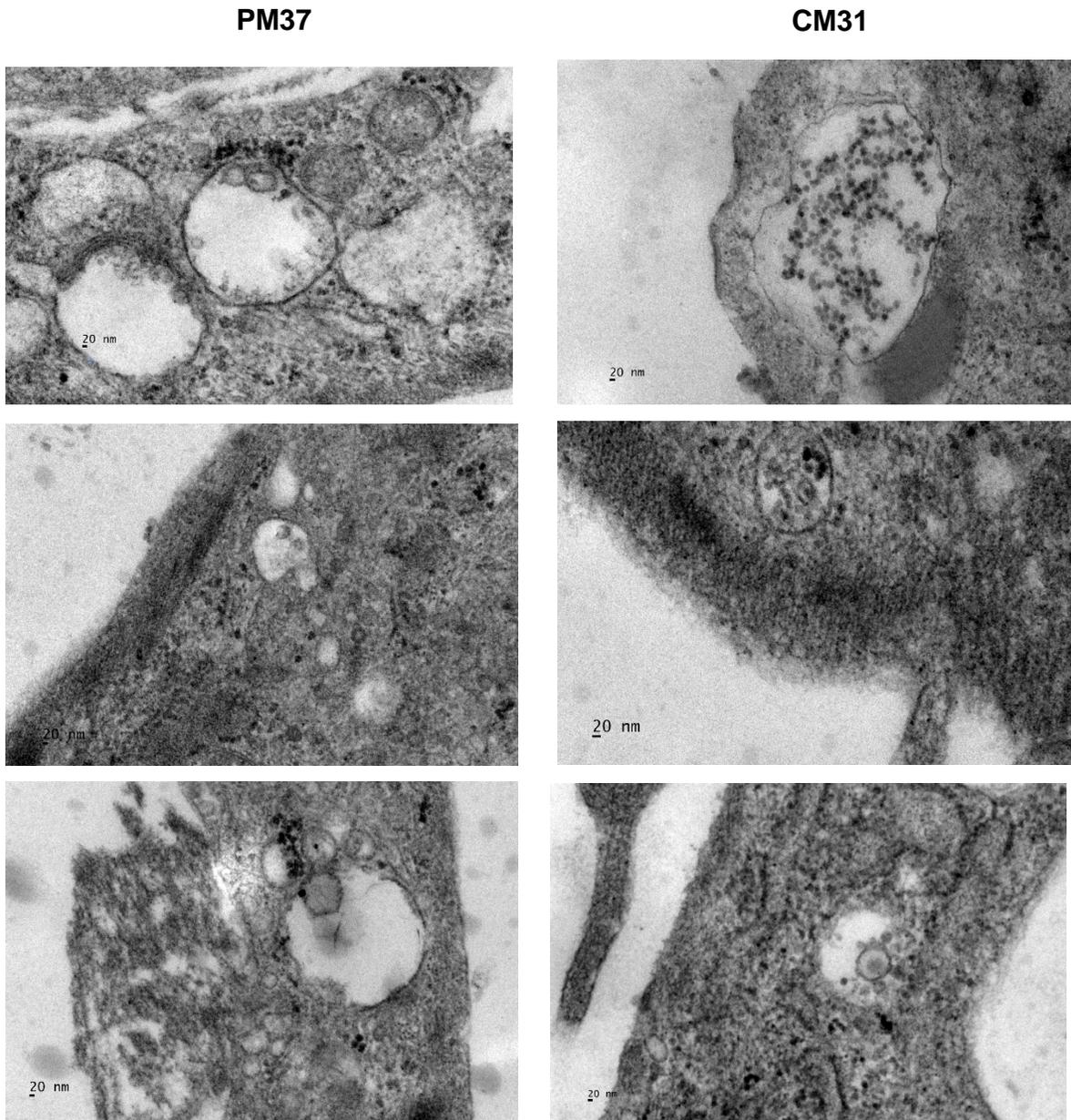
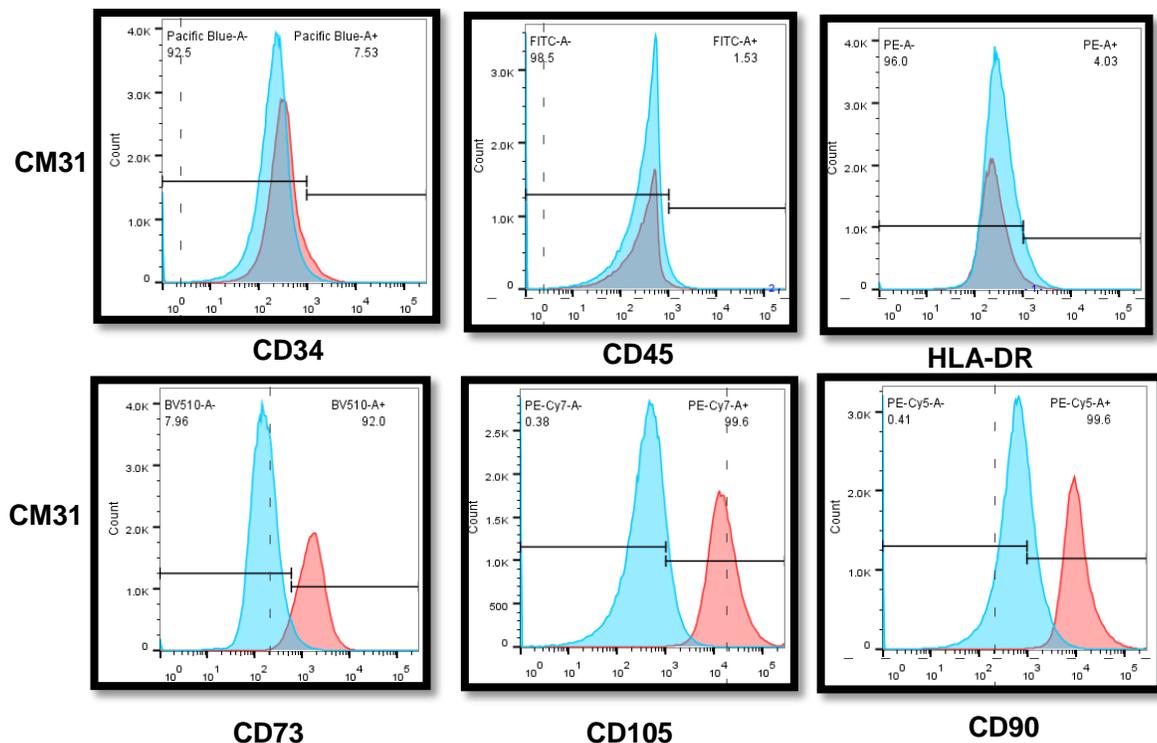


Fig 21. Fotografías de los cuerpos multivesiculares, tomadas por microscopía electrónica de PM37 y CM31, en los que se puede ver las marcadas diferencia de tamaños de las ILVs

8.8 Las células precursoras neurales derivadas del epitelio olfatorio son una población homogénea y presentan un perfil característico de células mesenquimales

Teniendo en cuenta que el epitelio olfatorio es pseudoestratificado y está formado por células epiteliales, así como por células precursoras basales que proliferan continuamente para amplificar la población de precursores neuronales, induciendo de esta forma la generación de neuronas inmaduras y las neuronas sensoriales olfativas, es posible que la población de células que se aíslan y crecen in vitro pudieran dar una población heterogénea de células. Para evitar este problema, se sabe que el medio en el cual estas células son cultivadas promueve una selección de células precursoras neurales, lo que permite que se tenga una población homogénea. Para estar seguros de lo anterior y corroborar que efectivamente se obtuvo una población homogénea de células precursoras neurales mesenquimales se realizó una caracterización de marcadores de membrana por citometría de flujo tanto para CM31 como para PM37. Como se puede ver en la Figura 22 estas células fueron positivas para los marcadores CD73, CD90 Y CD105 y negativas a los marcadores hematopoyéticos CD34, CD45 y el antígeno leucocito humano HLA-DR por lo que se trata de una población homogénea de células. Es importante resaltar que este perfil de expresión es característico de células mesenquimales.



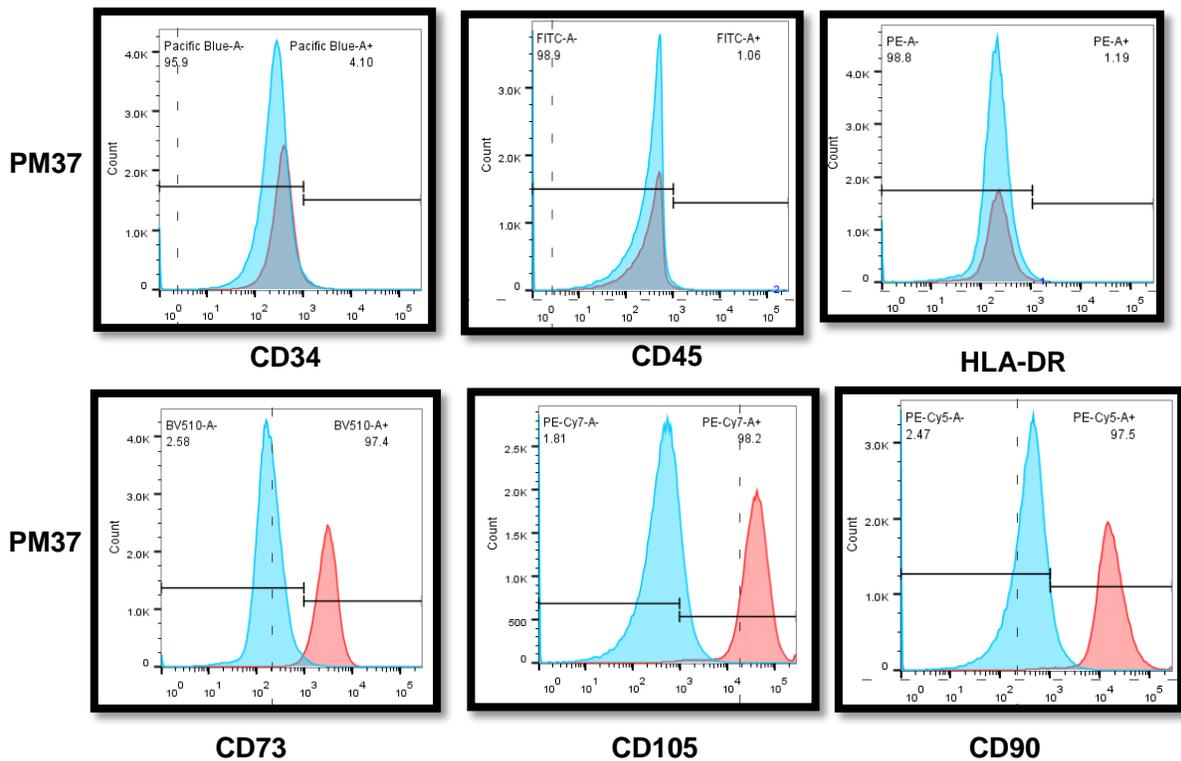
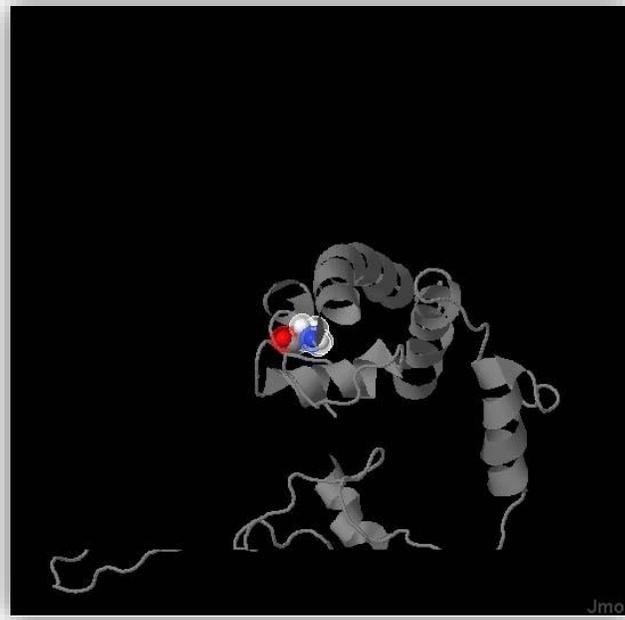


Fig 22. Análisis por Citometría de flujo de los marcadores hematopoyéticos CD-34, CD45 y HLA-DR, a los que ambos grupos resultan ser negativos, así como de los marcadores CD73, CD105 y CD90 que son marcadores de células mesenquimales, a los cuales ambos grupos resultaron ser positivos.

IX DISCUSIÓN

La mutación Ala431Glu en el gen de *PSEN1* conocida como mutación Jalisco se encuentra en el C-terminal de la proteína, entre los dominios transmembranales 8 y 9, corresponde a un aminoácido encuentra altamente conservado entre distintas especies y está localizado muy cerca del poro catalítico de la γ -Secretasa. Empleando el programa *PolyPhen-2*, en el cual se pueden predecir las consecuencias funcionales de la proteína debidas a un cambio de aminoácido, se determinó que el cambio de citosina (C) en el codón GCA por adenina (A) GAA, dando como resultado un cambio de aminoácido en el codón 431

de la secuencia de la proteína, de una alanina por un ácido glutámico (A431E) es altamente perjudicial para la función de la proteína con una puntuación de 1,000 (sensibilidad: 0,00; especificidad: 1.00).



Esta mutación se prevé que sea **PROBABLEMENTE PERJUDICIAL** con una puntuación de 1,000 (sensibilidad: 0,00; especificidad: 1.00)

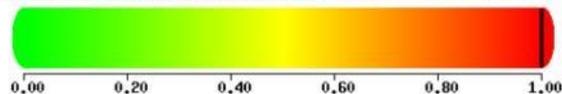


Figura 22. Ubicación espacial de la mutación A431E. y análisis con el programa *PolyPhen-2*, donde de acuerdo a la escala nos indica que este cambio es dañino

El mecanismo por el cual esta mutación ejerce un efecto perjudicial aún no está claro, sin embargo, se sabe que las mutaciones nocivas en PSEN1 pueden alterar la función carboxipeptidasa de γ -Secretasa aumentando así la relación A β 42/A β 40 (40). En un estudio realizado por Portelius [71], en el cual se midió la concentración de isoformas A β en el LCR en 7 pacientes portadores de la mutación A431E, mostró que los portadores de esta mutación manifestaron niveles

significativamente bajos de A β 37, A β 38 y A β 39, los cuales son solubles y no se agregan, comparados con los niveles de A β 40-42 aminoácidos., los cuales son insolubles y tienen la capacidad de agregarse. Estos fragmentos son liberados normalmente por la actividad del complejo γ -Secretasa, lo que sugiere que esta mutación podría modular la función de γ -Secretasa modificando el sitio normal de escisión en APP (Gly 37, Gly 38 y Val 39), sugiriendo una pérdida de efecto de función que lleva a una abundancia relativa de la agregación de A β 1-42. Sin embargo, este cambio de alanina por ácido glutámico podría también estar interviniendo en la interacción de γ -Secretasa con otros sustratos que son importantes en la regulación del tráfico de proteínas y lípidos que ocurre entre otros compartimentos subcelulares de la vía secretora y endocítica.

La acumulación de vacuolas autofágicas es una característica consistente de muchas enfermedades neurodegenerativas. La desregulación de la vía endocítica en las neuronas se considera cada vez más como uno de los eventos patológicos más tempranos en la etapa preclínica de Enfermedad de Alzheimer, la proteólisis lisosomal deficiente conduce a la extensa “distrofia neurítica” que está caracterizada por neuritas extendidas llenas de vacuolas autofágicas que contienen y otros sustratos incompletamente degradados que son potencialmente neurotóxicos [72]. Por esta razón es muy interesante el hecho de que las vesículas aislados de las células precursoras del epitelio olfatorio del paciente asintomático portador de la mutación Ala431Glu de 37 años y el control etario, presentaran importantes diferencias tanto de tamaño, como de cantidad al momento de ser observadas por microscopía electrónica de transmisión. Estas vesículas fueron

caracterizadas para 3 marcadores de exosomas CD9, CD63 y Alix, este último nos confirmaba que estas vesículas tenían un origen en los cuerpos multivesiculares por lo tanto un origen endosomal. Es por ello que decidimos analizar también los cuerpos multivesiculares por microscopía electrónica para saber si estos cambios estaban presentes desde el momento en el que los cuerpos multivesiculares se forman y en las imágenes es claro las variaciones tanto de tamaño como de cantidad, desde que se forman las vesículas intraluminales, los MVBs del portador de la mutación las vesículas intraluminales tenían un tamaño de aproximadamente de entre 60 y 80 nm , además de que se puede claramente un menor número de vesículas intraluminales en comparación con su control etario que tenía mayor número de vesículas intraluminales y de 20 nm lo que correspondía con lo que habíamos observado anteriormente en la microscopía electrónica. Estos cambios en las vesículas intraluminales habían sido reportados con anterioridad por Wilson y colaboradores[73], en los que el knockdown de Sortilina (SORL1) modificó tanto el tamaño como la cantidad de estas vesículas intraluminales. Esta observación es interesante ya que Sortilina que forma parte de la familia de las Vps10p. es un receptor de proteína de membrana de tipo 1, que se expresa en la mayoría de los tejidos, especialmente en el cerebro, en el sistema nervioso central. Esta proteína ha llamado la atención en años recientes ya que los cambios genéticos y posiblemente s ambientalmente en la expresión o función de SORL1 están relacionados causalmente con la patogénesis de la Enfermedad de Alzheimer y tienen un efecto sobre el riesgo de esta enfermedad [74], además de que desde el 2006 se reportó que SORL1 es un sustrato de γ - secretasa [75], por lo que se puede sugerir que la mutación Ala431Glu está perjudicando la interacción entre sortilina y

el complejo γ -secretasa, por lo que sería muy interesante evaluar el estado de esta proteína en las células precursoras neurales de los pacientes con Alzheimer familiar, además de ser una alteración temprana pues el portador de la mutación del cual fueron obtenidas las células tiene 37 años, cuando las primeras manifestaciones de la enfermedad ocurren a los 45 años.

Por otro lado, el estudio de las vesículas extracelulares ha tomado mayor importancia en años recientes debido, en gran medida, a la cantidad de biomoléculas de importancia biológica contenidas en ellas. En años recientes los exosomas han llamado la atención por su papel en las enfermedades neurodegenerativas, de manera particular en la Enfermedad de Alzheimer se ha reportado que los exosomas derivados de pacientes con la enfermedad son capaces de diseminar las proteínas patogénicas como lo son el péptido β -amiloide y la proteína tau hiperfosforilada o truncada y una de las áreas más afectadas en la Enfermedad de Alzheimer es el hipocampo, el cual se comunica con el bulbo olfatorio a través de la vía olfatoria, que incluye la corteza piriforme, la amígdala y la corteza entorrinal, curiosamente estas áreas son de las principales zonas afectadas en la Enfermedad de Alzheimer familiar, por lo que probar si los exosomas de los portadores de la mutación Ala431Glu tenían un efecto en las células precursoras del hipocampo fetal era muy importante, por los efectos neurotóxicos del contenido de los exosomas derivados de las células de los individuos portadores de la mutación, en donde el porcentaje de células vivas fue significativamente menor que el del control, por lo que podemos sugerir que estos exosomas transportan moléculas como el péptido β -amiloide que puede resultar tóxico para las células,

generando distrofia neurítica en las células receptoras, a pesar de que morfológicamente las células de hipocampo fetal humano no generaron cambios morfológicos evidentes, hay que tener en cuenta que estos estudios fueron hechos con las células de un paciente asintomático, probablemente si estos ensayos se repitiera con los exosomas derivados de las células de un paciente sintomático, habría mayor diferencia con el control, afectando la viabilidad ya que los exosomas deberían estar transportando mayor cantidad de proteínas patogénicas, por lo tanto tener un efecto neurotóxico más evidente y los cambios morfológicos se manifestarían lo que podría deberse a la atrofia neurítica producida por el péptido β -amiloide. De igual manera sería muy interesante repetir estos ensayos con células de oligodendrocitos, ya que estos pacientes presentan paraparesis espástica, además de que las resonancias magnéticas que se hicieron como parte de la caracterización clínica de la mutación reveló que hay un evidente daño en la sustancia blanca y mientras que el hipocampo no mostraba la atrofia que se presenta habitualmente en los pacientes con Alzheimer.

IX CONCLUSIÓN

Las células precursoras neurales del epitelio olfatorio de pacientes con Enfermedad de Alzheimer Familiar portadores de la mutación Ala431Glu, tienen alteraciones en los cuerpos multivesiculares y liberan exosomas con diferentes características que resultan tóxicas y alteran la fisiología de las células de hipocampo fetal humano.

X PERSPECTIVAS:

- Caracterizar los efectos de los exosomas derivados de las células del epitelio olfatorio de los otros portadores de la mutación, en especial con el paciente sintomático.
- Caracterizar los efectos de los exosomas derivados de las células de epitelio olfatorio de portadores de la mutación en células de oligodendrocitos.
- Evaluar los posibles defectos endolisosomales que ocurren de manera temprana en las células de los portadores de la mutación.
- Caracterizar el contenido de los exosomas aislados de portadores de la mutación por espectrometría de masas.
- Evaluar la participación de Sortilina en las alteraciones de los cuerpos multivesiculares descritas previamente.

XI BIBLIOGRAFIA

1. Alzheimer's, A., *2014 Alzheimer's disease facts and figures*. *Alzheimers Dement*, 2014. **10**(2): p. e47-92.
2. Maurer, K., S. Volk, and H. Gerbaldo, *Auguste D and Alzheimer's disease*. *Lancet*, 1997. **349**(9064): p. 1546-9.
3. Sarazin, M., et al., *Clinical and research diagnostic criteria for Alzheimer's disease*. *Neuroimaging Clin N Am*, 2012. **22**(1): p. 23-32,viii.
4. Nelson, L. and N. Tabet, *Slowing the progression of Alzheimer's disease; what works?* *Ageing Res Rev*, 2015. **23**(Pt B): p. 193-209.
5. Benke, T., *Two forms of apraxia in Alzheimer's disease*. *Cortex*, 1993. **29**(4): p. 715-25.
6. Dickson, D.W., *Neuropathology of Alzheimer's disease and other dementias*. *Clin Geriatr Med*, 2001. **17**(2): p. 209-28.
7. Mott, R.T. and C.M. Hulette, *Neuropathology of Alzheimer's disease*. *Neuroimaging Clin N Am*, 2005. **15**(4): p. 755-65, ix.
8. Vickers, J.C., et al., *The cause of neuronal degeneration in Alzheimer's disease*. *Prog Neurobiol*, 2000. **60**(2): p. 139-65.
9. Harrington, C.R., *The molecular pathology of Alzheimer's disease*. *Neuroimaging Clin N Am*, 2012. **22**(1): p. 11-22, vii.
10. Kumar, A., A. Singh, and Ekavali, *A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update*. *Pharmacol Rep*, 2015. **67**(2): p. 195-203.
11. Zou, Z., et al., *Clinical genetics of Alzheimer's disease*. *Biomed Res Int*, 2014. **2014**: p. 291862.
12. Antonell, A., et al., *A preliminary study of the whole-genome expression profile of sporadic and monogenic early-onset Alzheimer's disease*. *Neurobiol Aging*, 2013. **34**(7): p. 1772-8.
13. Zhang, Y.W., et al., *APP processing in Alzheimer's disease*. *Mol Brain*, 2011. **4**: p. 3.
14. Nalivaeva, N.N. and A.J. Turner, *The amyloid precursor protein: a biochemical enigma in brain development, function and disease*. *FEBS Lett*, 2013. **587**(13): p. 2046-54.
15. Cruts M, T.J., Van Broeckhoven C., *Locus-specific mutation databases for neurodegenerative brain diseases*. *Human Mutation* **33**: p. 1340-1344.
16. Hutton, M. and J. Hardy, *The presenilins and Alzheimer's disease*. *Hum Mol Genet*, 1997. **6**(10): p. 1639-46.
17. Czech, C., G. Tremp, and L. Pradier, *Presenilins and Alzheimer's disease: biological functions and pathogenic mechanisms*. *Prog Neurobiol*, 2000. **60**(4): p. 363-84.
18. Rogaeve, E.I., et al., *Analysis of the 5' sequence, genomic structure, and alternative splicing of the presenilin-1 gene (PSEN1) associated with early onset Alzheimer disease*. *Genomics*, 1997. **40**(3): p. 415-24.
19. Fraser, P.E., et al., *Presenilin structure, function and role in Alzheimer disease*. *Biochim Biophys Acta*, 2000. **1502**(1): p. 1-15.
20. Dickson, D.W., et al., *Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria*. *Lancet Neurol*, 2009. **8**(12): p. 1150-7.
21. Wakabayashi, T. and B. De Strooper, *Presenilins: members of the gamma-secretase quartets, but part-time soloists too*. *Physiology (Bethesda)*, 2008. **23**: p. 194-204.
22. Wolfe, M.S., *Toward the structure of presenilin/gamma-secretase and presenilin homologs*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1828**(12): p. 2886-97.
23. De Strooper, B., *Loss-of-function presenilin mutations in Alzheimer disease. Talking Point on the role of presenilin mutations in Alzheimer disease*. *EMBO Rep*, 2007. **8**(2): p. 141-6.

24. Bergmans, B.A. and B. De Strooper, *gamma-secretases: from cell biology to therapeutic strategies*. *Lancet Neurol*, 2010. **9**(2): p. 215-26.
25. Carroll, C.M. and Y.M. Li, *Physiological and pathological roles of the gamma-secretase complex*. *Brain Res Bull*, 2016. **126**(Pt 2): p. 199-206.
26. Walsh, D.M. and D.B. Teplow, *Alzheimer's disease and the amyloid beta-protein*. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2012. **107**: p. 101-24.
27. Hardy, J.A. and G.A. Higgins, *Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis*. *Science*, 1992. **256**(5054): p. 184-5.
28. Bachurin, S.O., E.V. Bovina, and A.A. Ustyugov, *Drugs in Clinical Trials for Alzheimer's Disease: The Major Trends*. *Med Res Rev*, 2017. **37**(5): p. 1186-1225.
29. Haapasalo, A. and D.M. Kovacs, *The many substrates of presenilin/gamma-secretase*. *J Alzheimers Dis*, 2011. **25**(1): p. 3-28.
30. Querfurth, H.W. and F.M. LaFerla, *Alzheimer's disease*. *N Engl J Med*, 2010. **362**(4): p. 329-44.
31. Neely, K.M., K.N. Green, and F.M. LaFerla, *Presenilin is necessary for efficient proteolysis through the autophagy-lysosome system in a gamma-secretase-independent manner*. *J Neurosci*, 2011. **31**(8): p. 2781-91.
32. Dobrowolski, R., et al., *Presenilin deficiency or lysosomal inhibition enhances Wnt signaling through relocalization of GSK3 to the late-endosomal compartment*. *Cell Rep*, 2012. **2**(5): p. 1316-28.
33. Esselens, C., et al., *Presenilin 1 mediates the turnover of telencephalin in hippocampal neurons via an autophagic degradative pathway*. *J Cell Biol*, 2004. **166**(7): p. 1041-54.
34. Saura, C.A., et al., *Loss of presenilin function causes impairments of memory and synaptic plasticity followed by age-dependent neurodegeneration*. *Neuron*, 2004. **42**(1): p. 23-36.
35. Cataldo, A.M., et al., *Presenilin mutations in familial Alzheimer disease and transgenic mouse models accelerate neuronal lysosomal pathology*. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2004. **63**(8): p. 821-30.
36. Lee, J.H., et al., *Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations*. *Cell*, 2010. **141**(7): p. 1146-58.
37. Thal, D.R., et al., *Stages of granulovacuolar degeneration: their relation to Alzheimer's disease and chronic stress response*. *Acta Neuropathol*, 2011. **122**(5): p. 577-89.
38. Raemaekers, T., et al., *ARF6-mediated endosomal transport of Telencephalin affects dendritic filopodia-to-spine maturation*. *EMBO J*, 2012. **31**(15): p. 3252-69.
39. Woodman, P.G. and C.E. Futter, *Multivesicular bodies: co-ordinated progression to maturity*. *Curr Opin Cell Biol*, 2008. **20**(4): p. 408-14.
40. Qin, J. and Q. Xu, *Functions and application of exosomes*. *Acta Pol Pharm*, 2014. **71**(4): p. 537-43.
41. Robbins, P.D. and A.E. Morelli, *Regulation of immune responses by extracellular vesicles*. *Nat Rev Immunol*, 2014. **14**(3): p. 195-208.
42. Schorey, J.S., et al., *Exosomes and other extracellular vesicles in host-pathogen interactions*. *EMBO Rep*, 2015. **16**(1): p. 24-43.
43. Colombo, M., G. Raposo, and C. Thery, *Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2014. **30**: p. 255-89.
44. Chaput, N. and C. Thery, *Exosomes: immune properties and potential clinical implementations*. *Semin Immunopathol*, 2011. **33**(5): p. 419-40.
45. van Niel, G., et al., *Exosomes: a common pathway for a specialized function*. *J Biochem*, 2006. **140**(1): p. 13-21.

46. Kowal, J., M. Tkach, and C. Thery, *Biogenesis and secretion of exosomes*. *Curr Opin Cell Biol*, 2014. **29**: p. 116-25.
47. Matsuo, H., et al., *Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization*. *Science*, 2004. **303**(5657): p. 531-4.
48. Cocucci, E. and J. Meldolesi, *Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles*. *Trends Cell Biol*, 2015. **25**(6): p. 364-72.
49. Tian, T., et al., *Dynamics of exosome internalization and trafficking*. *J Cell Physiol*, 2013. **228**(7): p. 1487-95.
50. Reiners, K.S., et al., *Role of Exosomes Released by Dendritic Cells and/or by Tumor Targets: Regulation of NK Cell Plasticity*. *Front Immunol*, 2014. **5**: p. 91.
51. Bellingham, S.A., et al., *Exosomes: vehicles for the transfer of toxic proteins associated with neurodegenerative diseases?* *Front Physiol*, 2012. **3**: p. 124.
52. Vekrellis, K., H.J. Rideout, and L. Stefanis, *Neurobiology of α -synuclein*. *Molecular Neurobiology*, 2004. **30**(1): p. 1-21.
53. Hansen, C., et al., *alpha-Synuclein propagates from mouse brain to grafted dopaminergic neurons and seeds aggregation in cultured human cells*. *J Clin Invest*, 2011. **121**(2): p. 715-25.
54. Grey, M., et al., *Acceleration of alpha-synuclein aggregation by exosomes*. *J Biol Chem*, 2015. **290**(5): p. 2969-82.
55. Yuyama, K., et al., *Sphingolipid-modulated exosome secretion promotes clearance of amyloid-beta by microglia*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(14): p. 10977-89.
56. Chutna, O., et al., *The small GTPase Rab11 co-localizes with alpha-synuclein in intracellular inclusions and modulates its aggregation, secretion and toxicity*. *Hum Mol Genet*, 2014. **23**(25): p. 6732-45.
57. Tanikawa, S., et al., *Endosomal sorting related protein CHMP2B is localized in Lewy bodies and glial cytoplasmic inclusions in alpha-synucleinopathy*. *Neurosci Lett*, 2012. **527**(1): p. 16-21.
58. Robberecht, W. and T. Philips, *The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis*. *Nat Rev Neurosci*, 2013. **14**(4): p. 248-64.
59. Arai, T., et al., *Phosphorylated and cleaved TDP-43 in ALS, FTLN and other neurodegenerative disorders and in cellular models of TDP-43 proteinopathy*. *Neuropathology*, 2010. **30**(2): p. 170-81.
60. Grad, L.I., et al., *Intercellular propagated misfolding of wild-type Cu/Zn superoxide dismutase occurs via exosome-dependent and -independent mechanisms*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(9): p. 3620-5.
61. Takahashi, R.H., et al., *Intraneuronal Alzheimer abeta42 accumulates in multivesicular bodies and is associated with synaptic pathology*. *Am J Pathol*, 2002. **161**(5): p. 1869-79.
62. Rajendran, L., et al., *Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(30): p. 11172-7.
63. Hayashi, H., et al., *A Seed for Alzheimer Amyloid in the Brain*. *The Journal of Neuroscience*, 2004. **24**(20): p. 4894-4902.
64. Dinkins, M.B., et al., *Exosome reduction in vivo is associated with lower amyloid plaque load in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease*. *Neurobiol Aging*, 2014. **35**(8): p. 1792-800.
65. Yescas, P., et al., *Founder effect for the Ala431Glu mutation of the presenilin 1 gene causing early-onset Alzheimer's disease in Mexican families*. *Neurogenetics*, 2006. **7**(3): p. 195-200.

66. Attems, J., L. Walker, and K.A. Jellinger, *Olfactory bulb involvement in neurodegenerative diseases*. Acta Neuropathol, 2014. **127**(4): p. 459-75.
67. Alejandrina, S.M.R., *Caracterización de la mutación Ala431Glu del gen PSEN1 en pacientes portadores con Enfermedad de Alzheimer Familiar y su correlación clínica.*, in CINVESTAV. 2016, Instituto Politecnico Nacional.
68. Li, X., et al., *Structure of a presenilin family intramembrane aspartate protease*. Nature, 2013. **493**(7430): p. 56-61.
69. Kosaka, T. and K. Kosaka, *Two types of tyrosine hydroxylase positive GABAergic juxtglomerular neurons in the mouse main olfactory bulb are different in their time of origin*. Neurosci Res, 2009. **64**(4): p. 436-41.
70. De La Rosa-Prieto, C., et al., *Olfactory and cortical projections to bulbar and hippocampal adult-born neurons*. Front Neuroanat, 2015. **9**: p. 4.
71. Portelius, E., et al., *Distinct cerebrospinal fluid amyloid beta peptide signatures in sporadic and PSEN1 A431E-associated familial Alzheimer's disease*. Mol Neurodegener, 2010. **5**: p. 2.
72. Nixon, R.A., et al., *Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immunoelectron microscopy study*. J Neuropathol Exp Neurol, 2005. **64**(2): p. 113-22.
73. Wilson, C.M., et al., *Sortilin mediates the release and transfer of exosomes in concert with two tyrosine kinase receptors*. J Cell Sci, 2014. **127**(Pt 18): p. 3983-97.
74. Rogaeva, E., et al., *The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease*. Nat Genet, 2007. **39**(2): p. 168-77.
75. Nyborg, A.C., et al., *Sortilin, SorCS1b, and SorLA Vps10p sorting receptors, are novel gamma-secretase substrates*. Mol Neurodegener, 2006. **1**: p. 3.