



**EVALUACIÓN DEL GRADO DE TOXICIDAD DE OLIGÓMEROS DE  $\beta$ -  
AMILOIDE DE COMPOSICIÓN VARIABLE, EN SUBREGIONES DEL  
HIPOCAMPO DE RATA RELACIONADAS CON LA ENFERMEDAD DE  
ALZHEIMER**

**MAIRA ALEJANDRA ANDRADE ASTUDILLO**

**UNIVERSIDAD ICESI  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
PROGRAMAS QUÍMICA FARMACÉUTICA-BIOLOGÍA  
SANTIAGO DE CALI  
2017**

**EVALUACIÓN DEL GRADO DE TOXICIDAD DE OLIGÓMEROS DE  $\beta$ -  
AMILOIDE DE COMPOSICIÓN VARIABLE, EN SUBREGIONES DEL  
HIPOCAMPO DE RATA RELACIONADAS CON LA ENFERMEDAD DE  
ALZHEIMER**

**MAIRA ALEJANDRA ANDRADE ASTUDILLO**

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TITULO DE PREGRADO EN  
QUÍMICA FARMACÉUTICA Y BIOLOGÍA**

**TUTORES**

**ÁLVARO ANDRÉS BARRERA OCAMPO, Ph. D  
CONSTAIN SALAMANCA, Ph. D  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS**

**UNIVERSIDAD ICESI  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
PROGRAMAS QUÍMICA FARMACÉUTICA-BIOLOGÍA  
SANTIAGO DE CALI  
2017**



**Aprobado por:**

---

**Nombre correspondiente**

**Evaluador**

---

**Nombre correspondiente**

**Evaluador**

---

**Álvaro Andrés Barrera Ocampo**

**Director del proyecto**

---

**Constain Salamanca**

**Director del proyecto**

**Santiago de Cali, 10 de enero de 2017**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco sinceramente a la universidad Icesi por la formación integral brindada durante estos años de estudio y compromiso. A mi familia que siempre estuvo ahí ofreciéndome su apoyo económico y emocional para culminar esta nueva etapa, son el motor de mi camino. Mi agradecimiento es enorme por mis tutores, los profesores Álvaro Andrés Barrera Ocampo y Constain Salamanca por su continuo acompañamiento, apoyo, confianza y dedicación brindada a lo largo de esta investigación, que me enriqueció como profesional y persona. A mis amigos más queridos, Lorena, Geraldine, Diana, Jhan Carlos y Jordy, a mi grupo de trabajo de neurociencias, por sus consejos y palabras de aliento, principalmente a Steven, él se convirtió en mi mano derecha durante todo este proyecto, su paciencia y dedicación me permitieron comprender muchas cosas. Y finalmente y no menos importante, a mi bonito y gran amor, Nathaly Arias Castrillón, porque fue la persona que más de cerca siguió todo este proceso, con su cariño, comprensión y apoyo, me dio aliento para cada esfuerzo que debí hacer y culminar con éxito este periodo de mi vida.

## CONTENIDO

RESUMEN DEL PROYECTO .....	10
ABSTRACT .....	11
1. INTRODUCCIÓN .....	12
2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO .....	13
2.1 Planteamiento del problema de investigación .....	13
2.2 Marco teórico y estado del arte .....	16
2.2.1 Descripción y epidemiología de la EA.....	16
2.2.2 Fisiopatología de la EA y el péptido A $\beta$ .....	17
2.2.3 Acumulación del péptido A $\beta$ .....	19
2.2.4 Formación hipocampal y la EA .....	22
2.2.5 Caracterización fisicoquímica de los oligómeros .....	23
2.3 Objetivos .....	26
2.3.1 Objetivo General .....	26
2.3.2 Objetivos Específicos.....	26
2.4 Metodología.....	27
2.4.1 Preparación de los oligómeros A $\beta$ 1-40 .....	27
2.4.2 Preparación de los oligómeros A $\beta$ 1-42 .....	27
2.4.3 Análisis de oligómeros solubles por Western Blotting .....	28
2.4.4 Identificación de oligómeros por Zetasizer.....	29
2.5 Resultados .....	30
2.6 Discusión.....	36
2.7 Conclusiones.....	40
2.8 Recomendaciones.....	41
3. REFERENCIAS .....	42
ANEXOS.....	49

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Siembra de las muestras de oligómeros solubles de A $\beta$ 1-40 y A $\beta$ 1-42 en el gel de Tricina.....	28
<b>Tabla 2.</b> Promedios de las variables Zaverage, intensidad (%) y Pdl para la muestra de péptido A $\beta$ 1-42 10 $\mu$ M a 37°C.....	31
<b>Tabla 3.</b> Promedios de las variables Zaverage, intensidad (%) y Pdl para la muestra de péptido A $\beta$ 1-42 Scrb 10 $\mu$ M a 37°C. ....	31
<b>Tabla 4.</b> Promedios de las variables Zaverage, intensidad (%) y Pdl para el medio PBS a 37°C.....	32
<b>Tabla 5.</b> Promedios de las variables Zaverage, intensidad (%) y Pdl para el medio PBS a 37°C.....	32
<b>Tabla 6.</b> Promedios de las variables Zaverage, intensidad (%) y Pdl para agua destilada tipo I a 37°C.....	32
<b>Tabla 7.</b> Promedios de las variables Zaverage, intensidad (%) y Pdl para el medio PBS a 25°C.....	33
<b>Tabla 8.</b> Promedios de las variables Zaverage, intensidad (%) y Pdl para agua destilada tipo I a 25°C.....	33

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tráfico intracelular de APP. ....	18
Figura 2. Procesamiento de APP y formación de péptido beta-amiloide. ....	18
Figura 3. Mecanismo de disfunción sináptica inducida por oligómeros A $\beta$ . .	21
Figura 4. Deterioro mitocondrial inducido por A $\beta$ . ....	21
Figura 5. Anatomía del hipocampo y flujo de la información. ....	23
Figura 6. Relación entre el tamaño de partícula y el patrón de dispersión de la luz. ....	24
Figura 7. Principio físico de la funcionalidad del Zetasizer. ....	24
Figura 8. Ejemplo de un correlograma ideal generado por el software. ....	25
Figura 9. Celda con muestra de péptido A $\beta$ 1-42 (agregado) a 3 h. ....	30
Figura 10. Celda con muestra de péptido A $\beta$ 1-42 Scrb (sin agregar). ....	30
Figura 11. Correlograma para la muestra de péptido A $\beta$ 1-42 10 $\mu$ M a 37°C. .	34
Figura 12. Correlograma para la muestra de péptido A $\beta$ 1-42 Scrb 10 $\mu$ M a 37°C. ....	34
Figura 13. Correlograma para la muestra de PBS a 37°C. ....	35
Figura 14. Correlograma para la muestra de agua a 37°C. ....	35

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Cálculo de la fuerza iónica del medio PBS. ....	49
<b>Anexo 2.</b> Matriz de Marco Lógico.....	50
<b>Anexo 3.</b> Carta de aval de comité de ética.....	52

## GLOSARIO

**A $\beta$** : Péptido Beta Amiloide

**AD**: Alzheimer's Disease

**ADNI**: (Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative) – Iniciativa de Neuroimagen de la Enfermedad de Alzheimer

**APP**: (Amyloid Precursor Protein) – Proteína precursora Amiloide

**BACE1**: ( $\beta$ -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1) – Enzima de Escisión de la Proteína Precursora Amiloide en el sitio  $\beta$ )

**CA1**: (Cornu Ammonis) – Cuerno de Amón 1

**CA3**: (Cornu Ammonis) – Cuerno de Amón 3

**CE**: Corteza Entorrinal

**DG**: (Dentate Gyrus) – Giro Dentado

**DLS**: (Dynamic Light Scattering) – Dispersión de Luz Dinámica

**EA**: Enfermedad de Alzheimer

**LTP**: (Long – Term Potentiation) – Potenciación a Largo Plazo

**LTD**: (Long – Term Depression) – Depresión a Largo Plazo

**MCI**: (Mild Cognitive Impairment) – Deterioro cognitivo leve

**MVB**: Multivesicular Bodies – Cuerpos multivesicularres

**NMDA**: N-Metil-D-Aspartato

**PBS**: (Phosphate Buffered Saline) – Buffer Fosfato Salino

**PI**: (Propidium Iodide) – Yoduro de Propidio

**ROS**: (Reactive Oxygen Species) – Especies Reactivas del Oxígeno.

**SDS-PAGE**: Sodium Dodecyl Sulfate- PolyAcrylamide Gel Electrophoresis– Electroforesis en Gel de Poliacrilamida- Duodecil Sulfato de Sodio

**SOP**: (Standard Operating Protocol) – Protocolo de Operación Estándar

## RESUMEN DEL PROYECTO

Los oligómeros solubles del péptido  $\beta$ -Amiloide ( $A\beta$ ) son formas tóxicas que, se incluyen dentro de los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad de Alzheimer (EA). Una de sus consecuencias es la falla sináptica en el espacio extracelular ocasionando muerte neuronal. La toxicidad de estos oligómeros puede medirse en cultivos de hipocampo de rata mediante el marcador yoduro de propidio (PI). Estudios han demostrado que el hipocampo es una de las regiones más afectadas por dicha enfermedad. En este estudio se evaluaron las características fisicoquímicas de oligómeros de péptido  $A\beta_{42}$  utilizando dispersión de luz dinámica (DLS) medida a través del equipo Z-sizer nano-ZSP. De acuerdo con los resultados obtenidos, se tiene que el uso de la técnica de DLS debe ser estandarizada de manera previa antes de proceder a la preparación de mezclas de oligómeros y posterior uso de estas en los cultivos celulares. La información aquí recolectada, se convierte en una herramienta para realizar estudios a mayor profundidad que permitan determinar las condiciones adecuadas para producir los oligómeros solubles requeridos y posteriormente realizar su caracterización fisicoquímica. Con esto se recomienda seguir con la línea de investigación para ampliar los conocimientos generados y producir nueva información que permita comprender la fisiopatología de la EA.

**PALABRAS CLAVES:** Enfermedad de Alzheimer, Oligómeros  $A\beta$ , falla sináptica, DLS, tamaño.

## ABSTRACT

Soluble oligomers of peptide-amyloid ( $A\beta$ ) are toxic forms that are included within the pathophysiological mechanisms of Alzheimer's disease (AD). One of its consequences is synaptic failure in the extracellular space causing neuronal death. The toxicity of these oligomers can be measured in rat hippocampal cultures by the marker Propidium Iodide (PI). Studies have shown that the hippocampus is one of the regions most affected by the disease. In this study we evaluated the physicochemical characteristics of  $A\beta_{42}$  peptide oligomers using the dynamic light scattering (DLS) measured through the equipment Z-sizer nano-ZSP. According to the results obtained, it is assumed that the use of the DLS technique must be standardized previously before proceeding to the preparation of mixtures of oligomers and subsequent use of these in the cell cultures. The information collected here, becomes a tool to carry out studies to a greater depth that allows to determine the suitable conditions to produce the required soluble oligomers and to carry out its physicochemical characterization. With this, it is recommended to continue with the line of research to expand the knowledge generated and produce new information to understand the pathophysiology of AD.

**Keywords:** Alzheimer's disease,  $A\beta$  oligomers, synaptic failure, DLS, size.

## 1. INTRODUCCIÓN

La EA es una enfermedad neurodegenerativa, considerada una de las formas más comunes de demencia en población de edad avanzada principalmente caracterizada por la pérdida progresiva de las habilidades cognitivas (Barghorn et al., 2005) que alteran el comportamiento y la función motora (Barten, Meredith, Zaczek, Houston, & Albright, 2006). Según estudios, su prevalencia en el mundo tiende a aumentar y se predice que sea cuatro veces mayor para el 2050 (Reitz & Mayeux, 2014). Por esta razón, se considera una patología base para posteriores proyectos de investigación de gran impacto.

La fisiopatología de la EA es compleja y multifactorial, pero los principales cambios patológicos observados en el tejido cerebral de pacientes con EA son la acumulación extracelular de placas de péptidos  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) y a nivel intracelular ovillos neurofibrilares de la proteína tau hiperfosforilada (Reitz & Mayeux, 2014). Además, se presenta pérdida generalizada de neuronas, materia blanca y sinapsis. El proyecto se enfoca en el primer mecanismo y pretende determinar su contribución en el desarrollo de la enfermedad.

El hipocampo, región del cerebro que se ve más afectada en la enfermedad, cumple funciones importantes para la formación y consolidación de la memoria, por tanto es esencial para el aprendizaje, razón por la cual los síntomas asociados a la enfermedad son por daños en esta área (Bartsch & Wulff, 2015). Por otra parte, los péptidos  $A\beta$  son productos naturales del metabolismo neuronal que se generan por la proteólisis de la proteína precursora de amiloide, cuyas especies más frecuentes son las de 40, 42 y 43 aminoácidos. Un desbalance entre la producción y la degradación de estos péptidos, favorece la formación de agregados oligoméricos que se acumulan en las neuronas hipocampales y establece un factor de riesgo para la EA (Querfurth & LaFerla, 2010), razón por la cual este proyecto pretende, evaluar diferentes proporciones de los péptidos que puedan inducir a la formación de agregados tóxicos y determinar cuáles de estos generan una mayor mortalidad de las neuronas del hipocampo de rata en cultivo celular *in vitro*, observada a través de marcaje con yoduro de propidio (PI). Los agregados se identificarán mediante la técnica Western Blotting y sus características fisicoquímicas con el equipo Z-sizer nano-ZSP.

## 2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

### 2.1 Planteamiento del problema de investigación

Más de 35 millones de personas en el mundo padecen EA, después de su diagnóstico la persona puede morir 3 a 9 años más tarde dependiendo de la edad y otras condiciones de salud. El principal factor de riesgo es la edad (Querfurth & LaFerla, 2010). De acuerdo con la Alzheimer's Association (<http://www.alz.org>), más de 5 millones de estadounidenses la padecen y es la sexta causa de muerte en este país. Su incidencia y prevalencia actualmente la han catalogado como uno de los problemas médicos y sociales más importantes de población de edad avanzada en países industrializados y en vía de desarrollo (Yiannopoulou & Papageorgiou, 2013). Afecta al 2% de la población de países industrializados y un poco más del 10% de la población mayor de 65 años, y el 50% de aquella que posee más de 85 años. Por todo lo descrito se considera un problema de salud pública grave, porque afecta no sólo al paciente sino también la familia y la sociedad que debe invertir recursos en su tratamiento (Cabrera et al., 2014).

La EA ha ido ganando en los últimos tiempos más atención en lo que se refiere a su diagnóstico, mecanismos patológicos y agentes terapéuticos. Además de la edad, existen otros factores de riesgo que predisponen al desarrollo de la enfermedad como el género femenino, historia familiar, lesiones previas en la cabeza y factores de riesgo vasculares como la diabetes, la hipertensión, la obesidad, la hipercolesterolemia y síndrome metabólico (Cabrera et al., 2014) (Reitz & Mayeux, 2014).

Intervenciones terapéuticas que se consideren eficaces para detener la progresión de la enfermedad o que reviertan el deterioro neuronal presentado en estos pacientes no se han establecido (Cabrera et al., 2014), por su parte los tratamientos para esta patología van enfocados a minimizar los síntomas y contrarrestar los efectos de la falla sináptica puesto que es una enfermedad que no se puede prevenir con facilidad, no tiene cura y tampoco puede desacelerarse, además en muchos casos, el diagnóstico no es específico (Yiannopoulou & Papageorgiou, 2013). La FDA (Food and Drug Administration, EE.UU) ha aprobado el uso de donepezilo, rivastigmina y galantamina, inhibidores de la enzima colinesterasa cuyo mecanismo de acción es incrementar las concentraciones de acetilcolina, para el tratamiento de casos de EA en estadios leve y moderado (Kaduszkiewicz, Zimmermann, Beck-Bornholdt, & van den Bussche, 2005).

Para tratar a pacientes de casos moderados a severos, se utiliza el antagonista del receptor NMDA, llamado memantina, potencialmente inhibe la formación de ROS en neuronas hipocámpales inducidas por oligómeros A $\beta$  (Decker et al., 2010). La efectividad y seguridad de la memantina ha sido demostrada para casos de

monoterapia, sin embargo, estudios recientes han presentado resultados significativamente mejores en medidas de cognición, lenguaje y actividades de la vida diaria, para pacientes que recibieron memantina de manera concomitante con donepezilo (Tariot et al., 2004).

Otros tratamientos están enfocados en controlar los mecanismos patogénicos de la enfermedad, entre estos están los compuestos que inhiben la  $\beta$ -secretasa conocida como BACE1, la cual inicia la producción de los péptidos A $\beta$ , tal como el MK-8931 o el LY2886721 (Yan & Vassar, 2014) y los que inhiben la  $\gamma$ -secretasa, como el LY-450139 también son potenciales terapéuticos. Sin embargo, estos compuestos, en los modelos animales, tienden a causar anomalías a nivel gastrointestinal, del timo y el bazo, puesto que esta enzima participa en la proteólisis de otras proteínas transmembranas y citoplasmáticas. Se presentan incluso, algunos casos mortales como consecuencia secundaria de los daños gastrointestinales (Barten et al., 2006). Estudios recientes han demostrado que la inhibición de BACE1 reduce directamente la generación de A $\beta$  y, por lo tanto, disminuye los niveles de A $\beta$  en el líquido cefalorraquídeo, pero a su vez atenúa la deposición de estos y se conduce a la reducción del secuestro de A $\beta$  en placas amiloides, lo que mantiene niveles elevados A $\beta$ 42 en el líquido cefalorraquídeo (Malkki, 2016).

Todos estos tratamientos como ya se ha planteado, van enfocados a controlar síntomas cuando ya se presenta la enfermedad, por ello es de valiosa importancia hacer investigaciones para determinar las zonas más afectadas en el desarrollo de la enfermedad y cuál de los mecanismos se encuentra más implicado en determinados casos, permitiendo así encontrar un tratamiento más apropiado para la EA. El desarrollo de fármacos modificadores de la EA se reconoce como una necesidad mundial, que permitan modificar, ya sea estabilizando o ralentizando, los pasos patológicos moleculares que conducen a la neurodegeneración y finalmente la demencia (Yiannopoulou & Papageorgiou, 2013).

Las neuronas del hipocampo son de las primeras en morir en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, razón por la cual, continuando con estudios previos, se trabajará con cultivos organotípicos, que tengan una mayor proximidad a la fisiología normal en el modelo *in vitro*, de hipocampo de ratas para evaluar el efecto de los péptidos A $\beta$  como causa más estudiada en el desarrollo de la enfermedad. Este proyecto busca establecer un modelo *in vivo*, que permita determinar el efecto que tiene los diferentes péptidos A $\beta$  en la mortalidad de las neuronas hipocampales, y a futuro, poder hacer estudios moleculares para elucidar mecanismos que permitan comprender porque estos agregados tienen un efecto diferencial en esta zona durante la EA.

Finalmente, es necesario mencionar que esta línea de investigación es relevante en el ámbito nacional, puesto que estudios realizados indican que esta enfermedad se ha convertido en un problema de salud que genera grandes costos al sistema de salud. Los costos del cuidado de los pacientes con EA están directamente

relacionados con el grado de severidad de la enfermedad. En los estadios iniciales tiene mayor autonomía, pero los costos están relacionados con el adecuado diagnóstico de la enfermedad y exclusión de otros tipos de demencia. Los estadios moderados ya incluyen la medicación para los síntomas neuropsiquiátricos, mientras que los estadios severos ya requieren una mayor carga financiera por los cuidadores permanentes. El costo mínimo directo promedio por paciente/año por estado de severidad estimado es: \$1.5 millones (leve), \$4 millones (moderado) y \$8.5 millones (severo) (Prada, Takeuchi, & Ariza, 2014). Toda la información obtenida a través de esta investigación puede servir como base para estudios posteriores, relacionados con la comprensión del mecanismo del desarrollo de la enfermedad y, en nuestro campo de acción, con la implementación de estrategias adecuadas para el desarrollo de fármacos seguros, efectivos y económicos para el tratamiento de la enfermedad.

## **2.2 Marco teórico y estado del arte**

### ***2.2.1 Descripción y epidemiología de la EA***

La EA contribuye al 60%-70% de los casos de demencia en el mundo, entendiéndose demencia como un proceso de evolución crónica donde hay pérdida de la cognición y otras habilidades intelectuales (Jessen et al., 2014). Se estima que afecta a más de 35 millones de personas y se caracteriza por la muerte progresiva de neuronas que se refleja en la pérdida de la memoria y evoluciona hasta la muerte del individuo (Querfurth & LaFerla, 2010). Se pierde la capacidad de codificar nueva memoria, primero de cosas triviales y luego de detalles importantes de la vida (Selkoe, 2002). Los trastornos del lenguaje son unas de las primeras manifestaciones de la EA, apareciendo en el 40 % de los casos en las primeras fases de la enfermedad y en el 100% de los casos en demencia severa (Nieto-alcaraz, Arcos-garcía, & Rubio-hernández, 2016). No sólo los marcadores histológicos como las placas seniles de agregados extracelulares del péptido A $\beta$  y los ovillos neurofibrilares (NFT) de agregados intracelulares de la proteína tau hiperfosforilada (Querfurth & LaFerla, 2010), son característicos de esta enfermedad, también se presentan lesiones visibles macroscópicamente que confirman la EA tales como: pérdida del tejido cerebral que generalmente conduce a una dilatación simétrica del sistema ventricular, atrofia del hipocampo y de lóbulos frontal, parietal y temporal (Perl, 2010). La secuencia patológica inicia preferentemente en las estructuras del lóbulo temporal medio y procede a las áreas frontales, temporal y parietal pero se conserva las regiones motoras, corticales sensoriales y subcorticales (Cabrera et al., 2014).

El deterioro cognitivo es una las características que más se encuentra relacionada con la pérdida de la transmisión sináptica la corteza y el sistema límbico. Estudios multicéntricos a gran escala y la ADNI han demostrado que individuos con MCI (deterioro cognitivo leve) están en riesgo de desarrollar EA. Durante esta etapa, que puede considerarse previa a la demencia, los pacientes presentan deterioro de la memoria en pruebas estándar y manifiestan déficits cognitivos sutiles, sin que haya un deterioro significativo para desarrollar las actividades de la vida diaria (Jessen et al., 2014).

El hipocampo y CE son las primeras áreas afectadas por la acumulación de proteínas (A $\beta$  y Tau) en la EA (Perl, 2010). Estas estructuras y sus respectivas poblaciones neuronales forman circuitos implicados en el procesamiento espacial, la dinámica temporal, y varios tipos de memoria (episódica, espacial, temporal, entre otras) (Bartsch & Wulff, 2015) (Daumas, Halley, Francés, & Lassalle, 2005). El hipocampo tiene un papel central en el aprendizaje, el procesamiento de la información, la formación, consolidación y recuperación de la memoria, y está

críticamente involucrado en la regulación de la emoción, el miedo, la ansiedad, y el estrés (Bannerman et al., 2004).

El principal riesgo es la edad. La incidencia se duplica después de cumplir los 65 años. No es una enfermedad producto del envejecimiento, pero se tiene que la mayoría de los casos corresponde a personas mayores y prevalece en esta población (Querfurth & LaFerla, 2010), debido a que se presenta un progresivo deterioro de las funciones mentales, resultado de los cambios neurobiológicos en el SNC durante el envejecimiento normal; la edad o el estrés afectan la comunicación normal entre neuronas y microglías que es esencial para el mantenimiento de la homeostasis en el SNC tanto en procesos fisiológicos como inflamatorios (Jurgens & Johnson, 2012). Además, se conoce que una parte del deterioro de la memoria relacionado con la edad, está asociada con el compromiso de la función del hipocampo, principalmente alteraciones en la actividad sináptica y circuitos neuronales en esta zona (Adams et al., 2008).

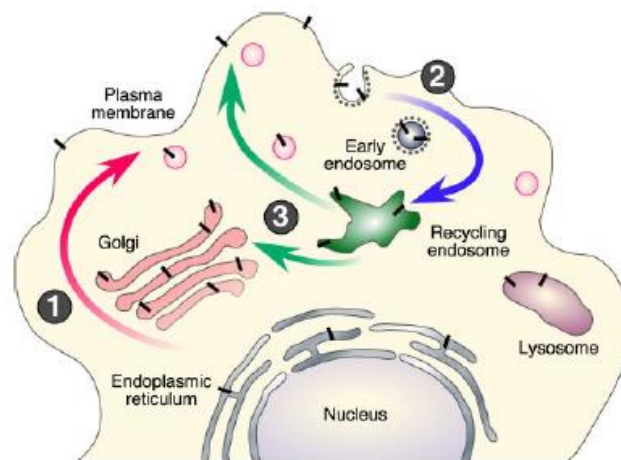
### ***2.2.2 Fisiopatología de la EA y el péptido A $\beta$***

La fisiopatología de la EA es compleja y está asociada a mecanismos como la hiperfosforilación de la proteína Tau y la acumulación en placas de péptido A $\beta$ . Dentro de las características fisiológicas de la EA se incluye placas cerebrales con abundante contenido de péptido A $\beta$ , neuritas distróficas en los campos terminales neocorticales, prominentes ovillos neurofibrilares en la estructura del lóbulo temporal medial y pérdida de neuronas y materia blanca, junto con inflamación y daño oxidativo (Querfurth & LaFerla, 2010).

En esta investigación nos enfocaremos en los daños causados por el péptido A $\beta$ . El péptido A $\beta$  es producido a partir del procesamiento enzimático de la proteína precursora de amiloide (APP) (Chow, Mattson, Wong, & Gleichmann, 2010). Esta proteína antes de ser procesada, es transportada a nivel intracelular (Figura 1) para ser llevada a los sitios donde opera cada una de las vías (Thinakaran & Koo, 2008). En la vía No-Amiloidogénica, la APP llega a la superficie de la membrana plasmática, a través de la red trans-Golgi, y es ahí donde puede ser digerida por  $\alpha$ -secretasas y luego por el complejo  $\gamma$ -secretasa (Zhang, Ma, Zhang, & Xu, 2012). La otra alternativa es que APP sea internalizada en endosomas que contienen  $\beta$ -secretasas y el complejo  $\gamma$ -secretasa, resultando en la producción del péptido A $\beta$ , el cual es liberado al espacio extracelular donde forma monómeros, dímeros, tetrámeros y fibrillas que se depositan a manera de agregados en un proceso que se conoce como Vía Amiloidogénica (Koo et al., 1990) (Thinakaran & Koo, 2008) (Figura 2).

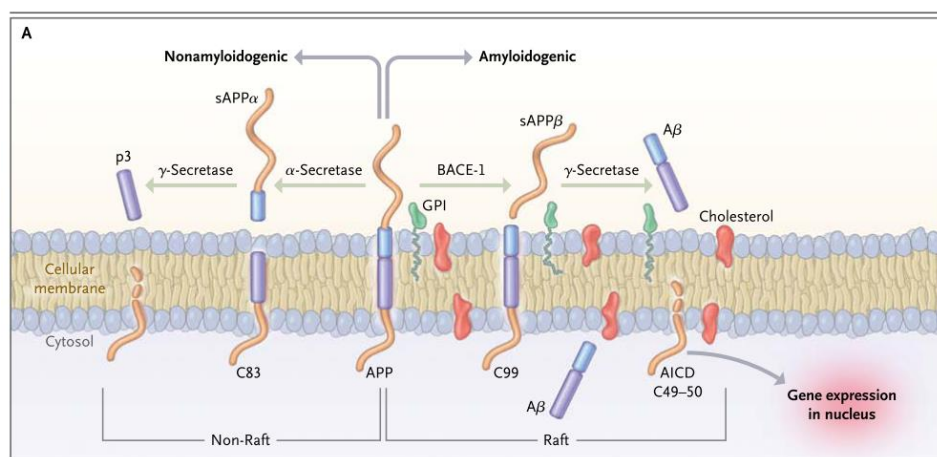
Es por esto que la APP es un factor crítico en la patogénesis de la EA, puesto que su procesamiento permite generar los péptidos hidrófobos A $\beta$  (Chow et al., 2010).

La deposición de estos en el cerebro, es decir, la formación de oligómeros y placas de dichos péptidos, se considera como uno de los principales marcadores patológicos de la EA. Esta acumulación de péptidos A $\beta$  desencadena toxicidad, que puede conducir a la disfunción sináptica, muerte celular neuronal, deterioro en el aprendizaje y la memoria, incluso alteraciones en modelos de EA tanto *in vitro* como *in vivo* (Zhang et al., 2012).



**Figura 1. Tráfico intracelular de APP.**

Las moléculas de APP nacientes (barras negras) en la fase 1 maduran a través de la vía de secreción constitutiva. En la fase 2 se da la internalización rápida de la APP luego de haber alcanzado la superficie celular para posteriormente, mediante la fase 3 hacer el tráfico a través de los compartimentos endocíticos y de reciclaje que regresa a la superficie celular o se degrada en el lisosoma. Tomada de (Thinakaran & Koo, 2008).



**Figura 2. Procesamiento de APP y formación de péptido beta-amiloide.**

Tomada de: (Querfurth & LaFerla, 2010).

### **2.2.3 Acumulación del péptido A $\beta$**

Las fibrillas amiloides son agregados de polipéptidos fibrilares que consisten en una estructura  $\beta$  cruzada. En la EA su formación se da a partir del péptido A $\beta$ , el cual se produce en regiones ricas en colesterol de membranas neuronales y se secreta en el espacio extracelular. El péptido A $\beta$  puede variar en longitud, el A $\beta$  1-40 representa la especie A $\beta$  más abundante en cerebros normales y AD, seguido por el A $\beta$  de 42 residuos (1-42). Pueden adoptar formas no agregadas (oligómeros) o fibrilares. Se ha demostrado que el mecanismo de la formación de placas A $\beta$  implica que el péptido A $\beta$  inicialmente soluble y extracelular se interioriza y se acumula dentro de vesículas como MVB. Luego se da una nucleación espontánea o en presencia de semillas fibrilares adecuadas y se da la formación de las fibrillas y las placas. Esto ocasiona que se alteren las funciones vesiculares y penetren la membrana vesicular. Estos acontecimientos conducen a la muerte de las células afectadas y la acumulación extracelular de estructuras intracelulares previamente amiloides (Friedrich et al., 2010).

Muchos estudios morfológicos que han empleado variedad de técnicas han demostrado una significativa disminución de conectividad sináptica en regiones neocorticales y del hipocampo en pacientes con EA (Scheff & Price, 2003), además los niveles de reducción sináptica está estrechamente relacionados con el grado de deterioro cognitivo pre-mortem de las personas (Tu, Okamoto, Lipton, & Xu, 2014). La evidencia plantea que A $\beta$  induce a una respuesta inflamatoria mediada por glías que contribuye significativamente al daño cognitivo y neurodegeneración; al tiempo que potencia el estrés oxidativo y las moléculas pro-inflamatorias e inflamatorias en los astrocitos (Carrero et al., 2012).

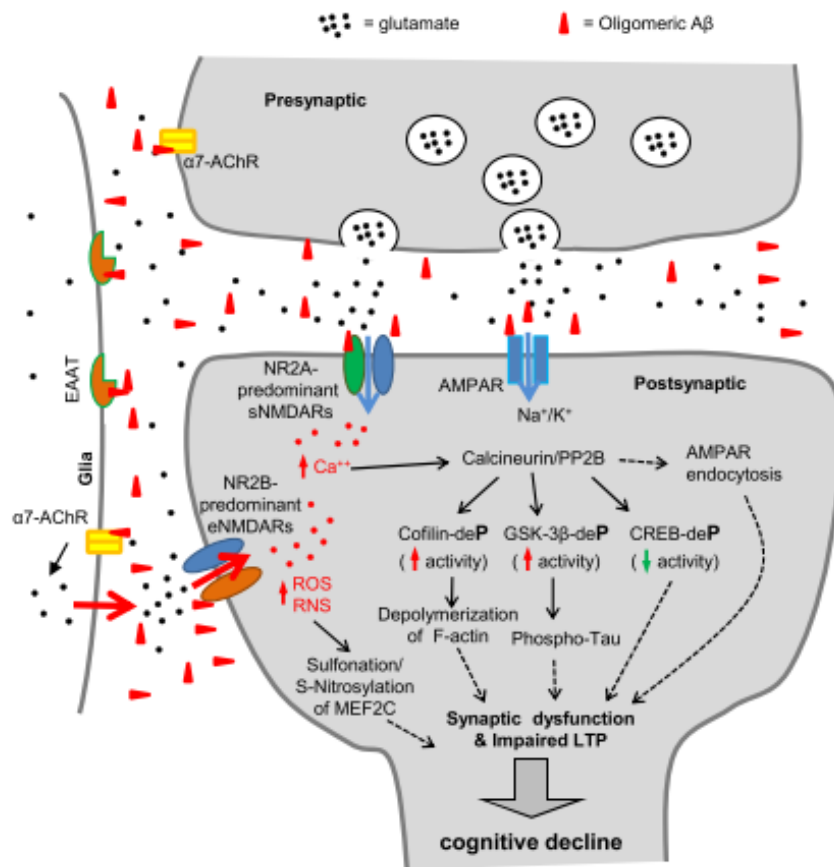
Por otra parte, estudios sugieren que oligómeros solubles de A $\beta$  y los agregados amiloides intermedios son las formas más neurotóxicas y que inducen a esta falla sináptica (medida por NMDA) en la EA (Selkoe, 2002) (Scheff & Price, 2003)(Tu et al., 2014), interrumpen la homeostasis del calcio, generan estrés oxidativo neuronal (Decker et al., 2010) y la degeneración de neuronas (Chow et al., 2010). Los niveles de formas solubles de A $\beta$ 42 tiene una fuerte relación con la severidad de la enfermedad (Cizas et al., 2011).

La disfunción sináptica inducida por A $\beta$  depende en parte de la estimulación excesiva de los receptores de NMDA, lo cual produce una elevación anormal de los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular (Billings, Oddo, Green, McGaugh, & LaFerla, 2005) (Tu et al., 2014). Esta disfunción en la sinapsis se debe a la alteración en la transmisión basal de los impulsos individuales y a la potenciación a largo plazo (LTP), que en conjunto con la depresión a largo plazo (LTD), se consideran mecanismos de plasticidad sináptica, relacionados con el almacenamiento del aprendizaje y la memoria en el cerebro, formación y modificación de los mapas cognitivos (Blaise & Bronzino, 2003). La presencia de oligómeros de A $\beta$ , tiene múltiples efectos tales

como el deterioro de la plasticidad sináptica alterando el equilibrio entre la LTP y LTD puesto que LTP es deteriorado (Ahmed et al., 2010) y se potencia LTD por depresión sináptica (Fa et al., 2010) (Tu et al., 2014), además de la reducción del número de espinas dendríticas (Querfurth & LaFerla, 2010). Este desequilibrio puede conducir a endocitosis de receptores sinápticos AMPA y esto es lo que conlleva a la pérdida de las espinas dendríticas (Hsieh et al., 2006).

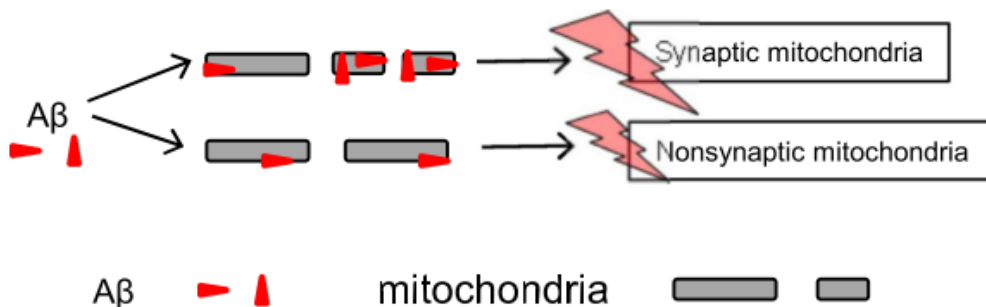
A $\beta$  también puede inducir a la remoción y endocitosis de receptores sinápticos NMDA (Snyder et al., 2005), los que están en el hipocampo son importantes mediadores tanto de la formación de la memoria como la excitotoxicidad (Rameau, Akaneya, Chiu, & Ziff, 2000) y su expresión es diferencial en las subregiones hipocampales (Coultrap, Nixon, Alvestad, Fernando Valenzuela, & Browning, 2005); también incluye los receptores NMDA dependientes de LTD (X. Liu, Gu, Duan, & Li, 2014). A $\beta$  también induce a la acumulación de excesivo glutamato en el espacio extra-sináptico que ocurre ya sea por la interrupción de la captación de dicho neurotransmisor o por una liberación aberrante en los astrocitos, lo cual induce a la disfunción sináptica (Figura 3) (Tu et al., 2014). A $\beta$  también afecta la señalización del receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR) y la liberación de dicho neurotransmisor en las terminales presinápticas (Querfurth & LaFerla, 2010).

Estudios han reportado que la acumulación de A $\beta$  puede influir en la morfogénesis de la mitocondria y a su vez conducir a un deterioro mitocondrial (Hirai et al., 2001) (Caspersen et al., 2005) (Manczak et al., 2006). Hay evidencia que el daño mitocondrial inducido por A $\beta$  es debido a la interacción anormal de los oligómeros A $\beta$  y proteínas de las mitocondrias que conducen al daño sináptico en EA, además las mitocondrias que residen en las sinapsis, son más vulnerables al ataque por A $\beta$ , puesto que se ha encontrado una mayor acumulación de estos en las mitocondrias sinápticas que en las no sinápticas (Figura 4) (Tu et al., 2014).



**Figura 3. Mecanismo de disfunción sináptica inducida por oligómeros Aβ.**

Concentraciones patológicas de oligómeros Aβ pueden interactuar con múltiples proteínas sinápticas de astrocitos, microglia y neuronas, desencadenando una serie de eventos sinápticos tóxicos. Tomado de: (Tu et al., 2014).



**Figura 4. Deterioro mitocondrial inducido por Aβ.**

Tomada de: (Tu et al., 2014).

Los péptidos A $\beta$  40,42 y 43 son las especies más tóxicas en la generación de las placas amiloides. En condiciones fisiológicas, los oligómeros y las placas amiloides están conformados por estos péptidos en composiciones variables, razón por la cual es valioso establecer si estas combinaciones afectan diferencialmente las subregiones del hipocampo.

#### **2.2.4 Formación hipocampal y la EA**

Estudios han referido que la primera región afectada en los inicios de la EA es el núcleo colinérgico basal de Meynert (nbM), puesto que es ahí donde se da la pérdida de las primeras neuronas y su relación con el deterioro cognitivo (Gratwicke et al., 2013), sin embargo, se presenta una gran confusión sobre su localización anatómica exacta en el cerebro humano puesto que su estructura es amplia y difusa (García et al., 2009). En humanos no se han hecho correlaciones directas clínico-patológicas entre esta subregión (nbM) y la disminución cognitiva específica, así como se ha hecho con primates (A. K. L. Liu, Chang, Pearce, & Gentleman, 2015); es por eso que esta investigación se centrará en el hipocampo, puesto que como se ha mencionado anteriormente, es una región muy afectada en la EA debido al alto grado de neuroplasticidad, es decir, la capacidad que tiene el SNC para reorganizar su estructura, función y conexiones nerviosas en respuesta a estímulos internos y externos (Bartsch & Wulff, 2015).

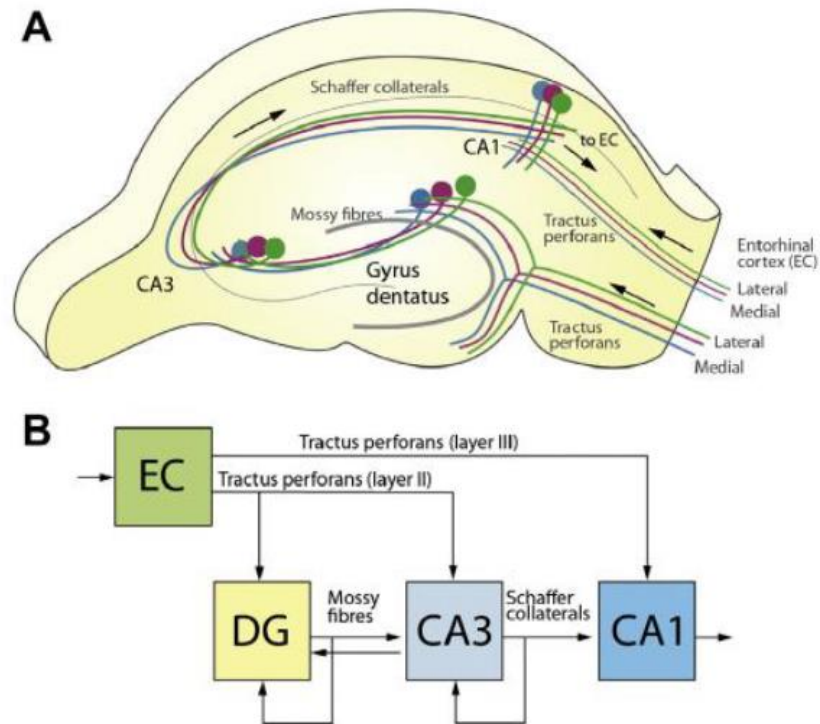
A través de esta línea de investigación dentro de la Universidad, se ha recolectado información y se ha confirmado que la formación hipocampal, específicamente el giro dentado (GD) y las subregiones del cuerno de Amón CA1 y CA3 son las más vulnerables al mecanismo fisiopatológico de la enfermedad previamente descrito por eso se continúa haciendo estudios de este tipo.

El DG, el subículo y el hipocampo propiamente dicho están comprendidos dentro de la formación hipocampal; mientras que la región parahipocampal se compone principalmente del presubículo, parasubículo y la CE. El hipocampo además de tener cuatro capas (piramidal, estrato oriens, estrato lúcido y estrato radiatum) posee cuatro subdivisiones CA1, CA2, CA3 Y CA4 (Cuerno de Amón) con características morfológicas y citoarquitectónicas diferenciales, pero la presencia de CA2 y CA4 se cuestiona (Figura 5) (Bartsch & Wulff, 2015). Estudios demuestran que las regiones CA3 y CA1 cumplen un rol importante en los procesos de codificación y consolidación de la memoria contextual (Daumas et al., 2005).

El hipocampo tiene circuitos de flujo de información con casi todas las áreas de asociación neocortical y la CE debido a las aferencias que recibe de estas. Es por esto, que se involucra en procesos de aprendizaje y daños en estos circuitos pueden relacionarse con deterioro cognitivo característico de la EA. Entender estos circuitos puede permitir comprender la vulnerabilidad de estas regiones a sufrir daños.

Además los procesos de aprendizaje y memoria dentro los circuitos hipocampales están regulados por los mecanismos de plasticidad sináptica que requieren de la activación de cascadas moleculares específicas (Bartsch & Wulff, 2015).

Se ha reportado que las subregiones hipocampales se afectan de manera diferencial en la progresión de la EA (Greene & Killiany, 2012), por eso es importante conocer la anatomía y el funcionamiento del hipocampo y de esta manera enfocar los estudios a las zonas que sean más vulnerables a la acción del mecanismo fisiopatológico en cuestión, los oligómeros de péptido A $\beta$ .



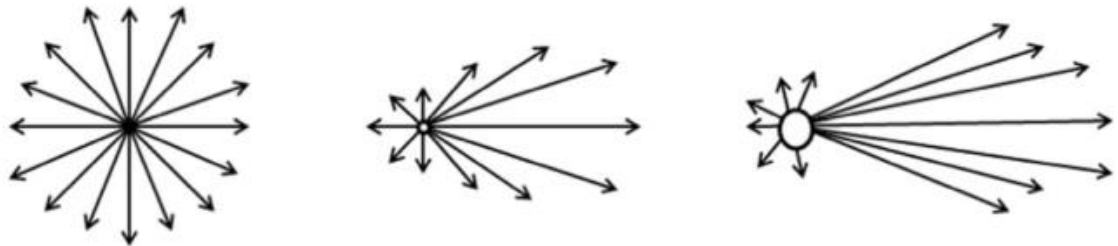
**Figura 5. Anatomía del hipocampo y flujo de la información.**

(A) Anatomía intrínseca del hipocampo y el principal circuito neural involucrado en el procesamiento de la información. (B) Información del flujo de la información a través de las subregiones del hipocampo. Tomado de : (Bartsch & Wulff, 2015).

### 2.2.5 Caracterización fisicoquímica de los oligómeros

La caracterización de los oligómeros de A $\beta$  incluye la medición de tamaño de partícula, el índice de polidispersidad y el potencial zeta. Es una técnica no invasiva, requiere una preparación mínima de la muestra y no hay calibración pre experimental (Bhattacharjee, 2016). A través de la dispersión de luz dinámica (DLS)

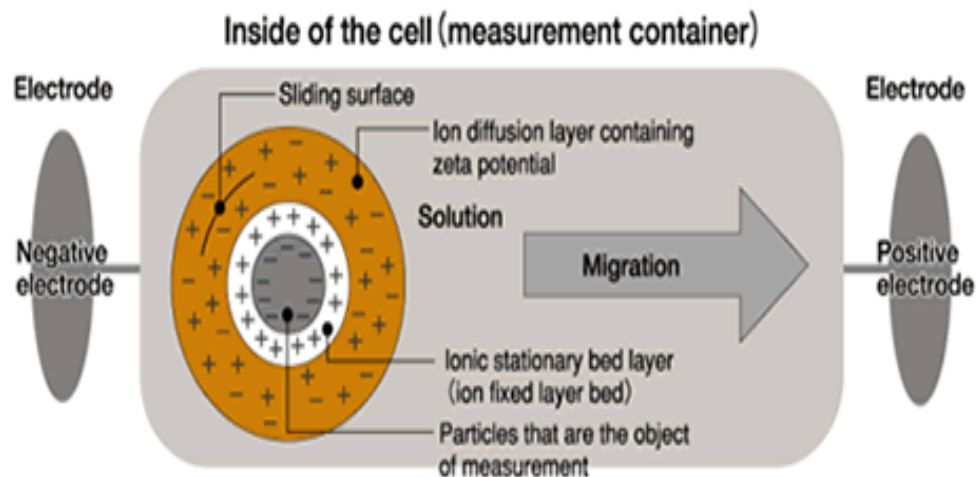
se puede medir el tamaño y el índice de polidispersidad, empleando un ángulo de detección previamente determinado. Las técnicas basadas en DLS generan una correlación entre el tamaño de la partícula, y el patrón de ángulos con los que se dispersa la luz. Dicho patrón depende del diámetro hidrodinámico de la partícula (Figura 6). La viscosidad del medio y el movimiento Browniano son factores que influyen en la correlación (Bhattacharjee, 2016).



**Figura 6. Relación entre el tamaño de partícula y el patrón de dispersión de la luz.**

Tomado de: (Bhattacharjee, 2016).

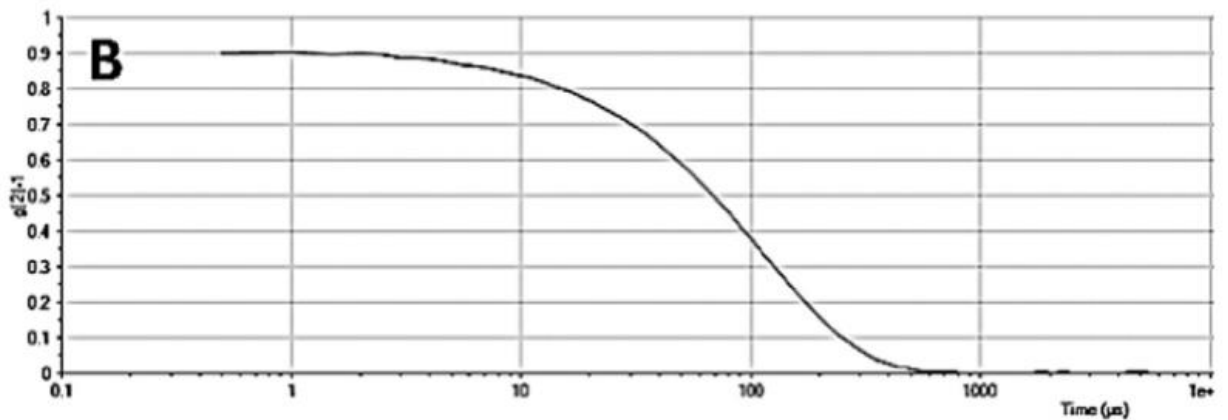
Por su parte, el potencial zeta ( $\zeta$ ) se mide mediante la movilidad electroforética ( $\mu$ ). Esta técnica se basa en la medición de la magnitud de la repulsión o atracción entre partículas cargadas por medio de una técnica de electroforesis, donde se aplica un campo magnético con un electrodo que genera la migración de partículas hacia un electrodo de carga opuesta, en contra de la viscosidad del medio (Figura 7), aplicando la ecuación de Henry (Lenntech, 2016).



**Figura 7. Principio físico de la funcionalidad del Zetasizer.**

Tomado de: (Lenntech, 2016).

El principio del DLS se basa en el movimiento Browniano, que es aleatorio e infinito, por lo que la ecuación de DLS espera que una determinada población moviéndose aleatoriamente al frente del láser en algún punto indeterminado se mueva, esto es lo que se llama el “tiempo de correlación” (tiempo que una determinada población de partículas se encuentra al frente del láser durante la medida) y que tendería a ser infinito (West & Mecartney, 2008).



**Figura 8. Ejemplo de un correlograma ideal generado por el software.**

Tomada de: (Bhattacharjee, 2016).

Para obtener resultados adecuados, es importante tener en cuenta la concentración de la muestra, porque una concentración elevada da lugar a multi-dispersión donde la luz dispersada de una partícula interactúa con otras partículas antes de alcanzar el detector y pierde la intensidad. Como resultado, el tamaño obtenido es artificialmente menor. Por el contrario, muestras demasiado diluidas puede no generar suficiente luz dispersa para analizar (Bhattacharjee, 2016).

## **2.3 Objetivos**

### ***2.3.1 Objetivo General***

Determinar el efecto de diferentes tipos de oligómeros de A $\beta$  sobre la mortalidad neuronal en un modelo de cultivo celular *in vitro* de ratas.

### ***2.3.2 Objetivos Específicos***

- Estandarizar el procedimiento para producir oligómeros a partir de péptidos A $\beta$  (40, 42 y 43) y determinar las características fisicoquímicas de estos mediante las técnicas de Western Blotting y Zetasizer.
- Determinar el efecto de los oligómeros, obtenidos de las diferentes mezclas, sobre la mortalidad de las neuronas hipocampales de rata en un modelo *in vitro*.
- Identificar si existen relación entre tipo de oligómero y grado toxicidad en las neuronas hipocampales del modelo *in vitro* de rata.

## **2.4 Metodología**

### ***2.4.1 Preparación de los oligómeros A $\beta$ 1-40***

La proteína A $\beta$ 1-40 (HFIP-Tratada) (1 mg) fue resuspendida mediante la adición de DMSO estéril (250  $\mu$ L) y se obtuvo una solución stock de concentración 1 Mm (Solución Stock A). De esta se tomó una alícuota de 55  $\mu$ L y se diluyó DMSO estéril (50  $\mu$ L) para preparar una solución de concentración 500  $\mu$ M (Solución stock B). El resto de la solución Stock A se almacenó a -80°C. A partir de la solución Stock B se preparó una solución de trabajo A 20  $\mu$ M (oligómeros) en PBS 1X estéril y se incubó a 37°C durante 24 h con agitación constante para facilitar el proceso de oligomerización. Luego de esto, la solución fue centrifugada a 13000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente para remover material insoluble. Con el sobrenadante se prepararon las soluciones de oligómeros (para tratamiento de células) con las concentraciones a evaluar (250 nM, 500 nM y 1000 nM).

### ***2.4.2 Preparación de los oligómeros A $\beta$ 1-42***

La proteína A $\beta$ 1-42 (HFIP-Tratada) (0,5 mg) fue resuspendida mediante la adición de DMSO estéril (110  $\mu$ L) y se obtuvo una solución stock de concentración 1 Mm (Solución Stock A). De esta se tomó una alícuota de 55  $\mu$ L y se diluyó en DMSO estéril (55  $\mu$ L) para preparar una solución de concentración 500  $\mu$ M (Solución stock B). El resto de la solución Stock A se almacenó a -80°C. A partir de la solución Stock B se preparó una solución de trabajo A 20  $\mu$ M (oligómeros) en PBS 1X estéril y se incubó a 37°C durante 24 h con agitación constante para facilitar el proceso de oligomerización. Luego de esto, la solución fue centrifugada a 13000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente para remover material insoluble. Con el sobrenadante se prepararon las soluciones de oligómeros (para tratamiento de células) con las concentraciones a evaluar (250 nM, 500 nM y 1000 nM).

NOTA: el mismo proceso anterior se realizó con la proteína A $\beta$  1-42 Scrambled (control).

### **2.4.3 Análisis de oligómeros solubles por Western Blotting**

La metodología aquí descrita se utilizó para determinar la presencia de oligómeros solubles de A $\beta$  1-40 y A $\beta$  1-42 en las preparaciones de los ítems 2.4.1 y 2.4.2.

#### **Tratamiento de la muestra**

Se trabajó con oligómeros frescos. Los oligómeros A $\beta$  1-40 y A $\beta$  1-42 formados, con una concentración de 20  $\mu$ M, y sus respectivos controles son puestos en buffer de carga (0.15 M Tris pH 6.8, 60% Glicerol, 12% SDS, 0.3 M DTT, 0.002% Azul de Bromofenol). Se conservó la proporción 1:2 (muestra: buffer). Se calentaron a 95°C durante 5 minutos previamente a su disposición en los geles de Tricina (10%-20%).

#### **Electroforesis en gel de Tricina (10%-20%)**

Mediante esta técnica se facilita la separación de proteínas de acuerdo a su peso molecular. El gel de Tricina de gradiente (10%-20%) facilita una mejor separación de péptidos de pequeño tamaño. Se cargó 15  $\mu$ L de cada muestra en los pozos del gel y 5  $\mu$ L de marcador de peso molecular (NWM) (Broad Range Molecular Weight Marker, Santa Cruz Biotech SC-236). El orden de siembra de las muestras en el gel se resume en la Tabla 1. La electroforesis se efectuó a 90 V durante 1 hora y 40 minutos.

**Tabla 1.** Siembra de las muestras de oligómeros solubles de A $\beta$  1-40 y A $\beta$  1-42 en el gel de Tricina.

<b>POZO</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>MUESTRA</b>	NWM	A $\beta$ 1-40 DN	A $\beta$ 1-40	A $\beta$ 1-42 Scrb	A $\beta$ 1-42	NWM	A $\beta$ 1-40 DN	A $\beta$ 1-40	A $\beta$ 1- 42 Scrb	A $\beta$ 1-42

NWM: marcador de peso molecular; DN: desnaturalizado

#### **Trasferencia de los oligómeros a la membrana de PVDF**

Finalizada la electroforesis se hizo a transferencia a membranas sintéticas de PVDF (polifluoruro de vinilideno, BioRad), con tamaño de poro de 0,2  $\mu$ m. La membrana fue previamente activada con metanol. La transferencia se llevó a cabo mediante un sistema de transferencia (Electrophoretic transfer system - BioRad) a 200 mA durante 2 horas.

#### **Bloqueo de la membrana e incubación con los anticuerpos primario y secundario**

El bloqueo de la membrana se realizó mediante la incubación con una solución al

5% de leche libre en grasa durante 40 minutos, con el fin de evitar la unión inespecífica de los anticuerpos primarios y secundarios a esta. Posteriormente se lavó y se incubó con el anticuerpo primario 6E10 (Anti-A $\beta$ ) con una proporción final de 1:1000, toda la noche a 4°C. Al día siguiente, fue retirado el anticuerpo primario y se hicieron 3 lavados con TTBS 1X (TBST, en sus siglas en español Tris-Buffer Salino y Tween), durante 5 minutos cada uno y agitación constante. Luego se incubó con anticuerpo secundario (Anti-ratón IgG) con una proporción final de 1:3000, por una hora a temperatura ambiente. Con posteriores lavados de TTBS 1X y TBS 1X.

### **Revelado de la membrana (autorradiografía)**

El revelado de la membrana se llevó a cabo en el cuarto oscuro de las instalaciones de la universidad ICESI, empleando un Kit de quimioluminiscencia (Thermo Scientific). La membrana se incubó en la solución durante 5 minutos, posteriormente se expuso a una película autorradiográfica durante 5 y 10 minutos, y finalmente fue colocada en la máquina de revelado.

### **2.4.4 Identificación de oligómeros por Zetasizer**

Se utiliza el equipo Z-sizer nano-ZSP, comercializado por Malvern Instrumental UK, del Grupo de Investigación de Físicoquímica Farmacéutica (GIFF) de la Universidad Icesi para medir propiedades fisicoquímicas de los agregados oligoméricos (tamaño, potencial Z) a partir de diluciones de las muestras. Para este proceso, por disponibilidad de tiempo y recursos, sólo se realizó para los oligómeros formados a partir del péptido A $\beta$  1-42 y su respectivo control (A $\beta$  1-42 Scrb).

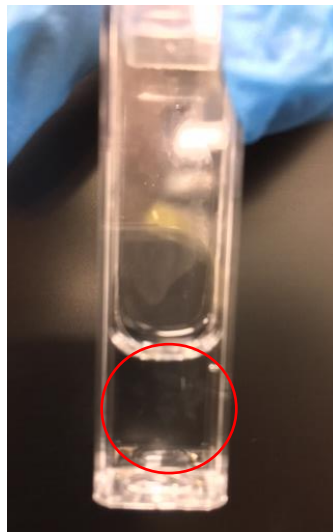
Se preparó una solución de 10  $\mu$ M de péptido A $\beta$  1-42 (en PBS) en cabina de flujo laminar, no se filtró por 0,22  $\mu$ m, sino que la muestra se colocó en las respectivas celdas con micropipetas y puntas con filtro. Las mediciones en el equipo se realizaron cada 30 minutos (0,5 h) durante 5 h a 37°C de temperatura y PBS pH 7,4 2000 mM como dispersante; para determinar la fuerza iónica del dispersante, se utilizaron los datos ofrecidos por el fabricante de medio PBS y se hicieron los cálculos manualmente (Anexo 1). Se hicieron mediciones de tamaño y de potencial zeta en sus respectivas celdas. El software se condiciona para realizar 3 mediciones para cada tiempo (3 réplicas), cada una con 10 corridas (10 runs), tomándose un tiempo aproximado de 8-10 minutos para arrojar los resultados. El mismo proceso se llevó a cabo para el péptido A $\beta$  1-42 Scrb y para el medio PBS como un posible blanco, con las mismas condiciones de temperatura y dispersante.

Adicionalmente, se realizaron mediciones de agua destilada Tipo I y medio PBS a 37°C y 25°C con el fin de corroborar la presencia de señales observadas en los anteriores procesos.

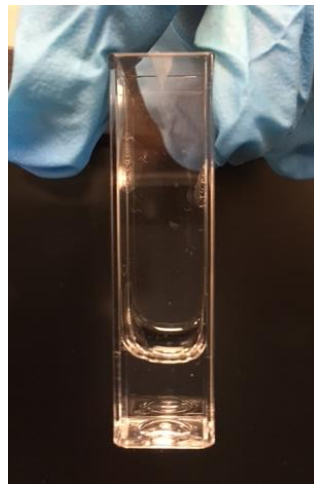
## 2.5 Resultados

Inicialmente, antes de preparar cualquier mezcla de diferentes proporciones de los péptidos A $\beta$ , se procedió a identificar la formación de oligómeros de cada uno de los péptidos en estudio: A $\beta$  1-40 y A $\beta$  1-42. A través de la metodología de Western Blotting no se identificó ninguna banda que diera evidencia de la formación de los oligómeros.

### *Caracterización fisicoquímica Z-sizer nano-ZSP*



**Figura 9. Celda con muestra de péptido A $\beta$  1-42 (agregado) a 3 h.**



**Figura 10. Celda con muestra de péptido A $\beta$  1-42 Scrb (sin agregar).**

**Tabla 2.** Promedios de las variables Zaverage, intensidad (%) y Pdl para la muestra de péptido A $\beta$  1-42 10  $\mu$ M a 37°C.

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Zaverage</b>	<b>Intensidad (%)</b>	<b>Pdl</b>
0,0	5939,0	100,0	1,00
0,5	4895,5	100,0	0,98
1,0	4076,0	93,6	1,00
1,5	5360,7	95,9	1,00
2,0	6096,0	100,0	1,00
2,5	1998,0	90,2	1,00
3,5	3411,0	95,0	1,00
4,0	5841,5	73,5	1,00
4,5	5617,0	100,0	1,00
5,0	2897,0	100,0	1,00

**Tabla 3.** Promedios de las variables Zaverage, intensidad (%) y Pdl para la muestra de péptido A $\beta$  1-42 Scrb 10  $\mu$ M a 37°C.

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Zaverage</b>	<b>Intensidad (%)</b>	<b>Pdl</b>
0,0	594,27	100,0	0,537
0,5	348,13	93,4	0,333
1,0	907,70	87,8	0,695
1,5	920,67	100,0	0,673
2,0	1147,80	100,0	0,681
2,5	2245,73	100,0	0,877
3,0	1232,93	100,0	0,737
3,5	500,73	81,7	0,448
4,0	265,77	100,0	0,305
4,5	728,10	61,9	0,635
5,0	619,17	100,0	0,539

**Tabla 4.** Promedios de las variables Zaverage, intensidad (%) y Pdl para el medio PBS a 37°C.

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Zaverage</b>	<b>Intensidad (%)</b>	<b>Pdl</b>
0,0	1413,00	69,70	1,000
0,5	4040,00	100,00	1,000
1,0	2795,50	91,55	1,000
1,5	2176,33	100,00	0,955
2,0	1221,50	91,87	0,771
2,5	10441,30	62,90	0,687
3,0	1483,53	96,43	1,000
3,5	1901,50	100,00	1,000
4,0	916,55	85,60	0,822
4,5	466,77	71,23	0,595
5,0	984,63	92,77	0,642

**Tabla 5.** Promedios de las variables Zaverage, intensidad (%) y Pdl para el medio PBS a 37°C.

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Zaverage</b>	<b>Intensidad (%)</b>	<b>Pdl</b>
0,5	4552,00	96,1	0,951
1	1225,43	100,0	0,703
1,5	933,37	100,0	0,703

**Tabla 6.** Promedios de las variables Zaverage, intensidad (%) y Pdl para agua destilada tipo I a 37°C.

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Zaverage</b>	<b>Intensidad (%)</b>	<b>Pdl</b>
0,0	422,50	53,13	0,8243
0,5	1574,33	100,00	0,8720
1,0	3298,33	100,00	0,9487

**Tabla 7.** Promedios de las variables Zaverage, intensidad (%) y Pdl para el medio PBS a 25°C.

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Zaverage</b>	<b>Intensidad (%)</b>	<b>Pdl</b>
0,0	323,37	91,6	0,377
0,5	272,37	89,5	0,467
1,5	284,33	88,7	0,325
2,0	374,17	94,8	0,377
2,5	282,63	86,1	0,421
3,0	279,57	93,5	0,356

**Tabla 8.** Promedios de las variables Zaverage, intensidad (%) y Pdl para agua destilada tipo I a 25°C.

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Zaverage</b>	<b>Intensidad (%)</b>	<b>Pdl</b>
0,0	189,40	87,4	0,396
0,5	219,20	94,5	0,370
1,0	191,70	86,5	0,513
1,5	198,20	80,1	0,387
2,0	176,93	80,5	0,464
2,5	147,97	71,8	0,625

### Análisis de correlogramas

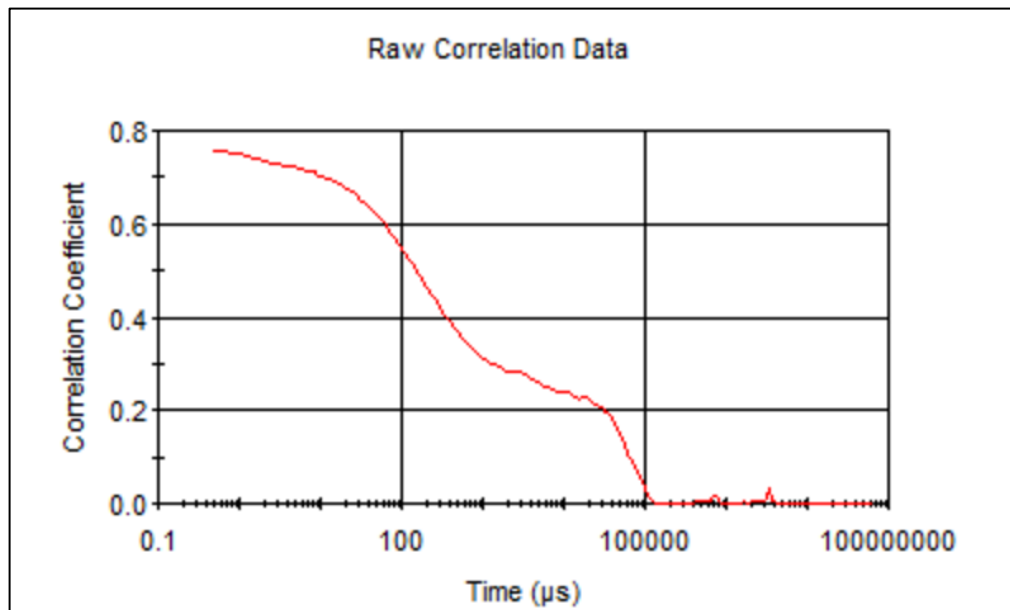


Figura 11. Correlograma para la muestra de péptido A $\beta$  1-42 10  $\mu$ M a 37°C.

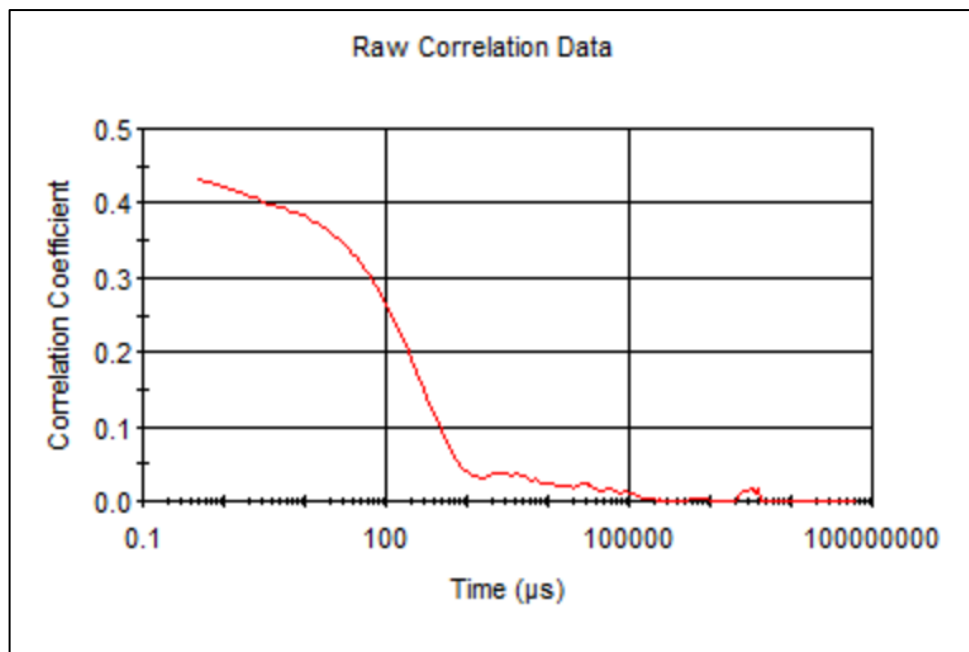


Figura 12. Correlograma para la muestra de péptido A $\beta$  1-42 Scrb 10  $\mu$ M a 37°C.

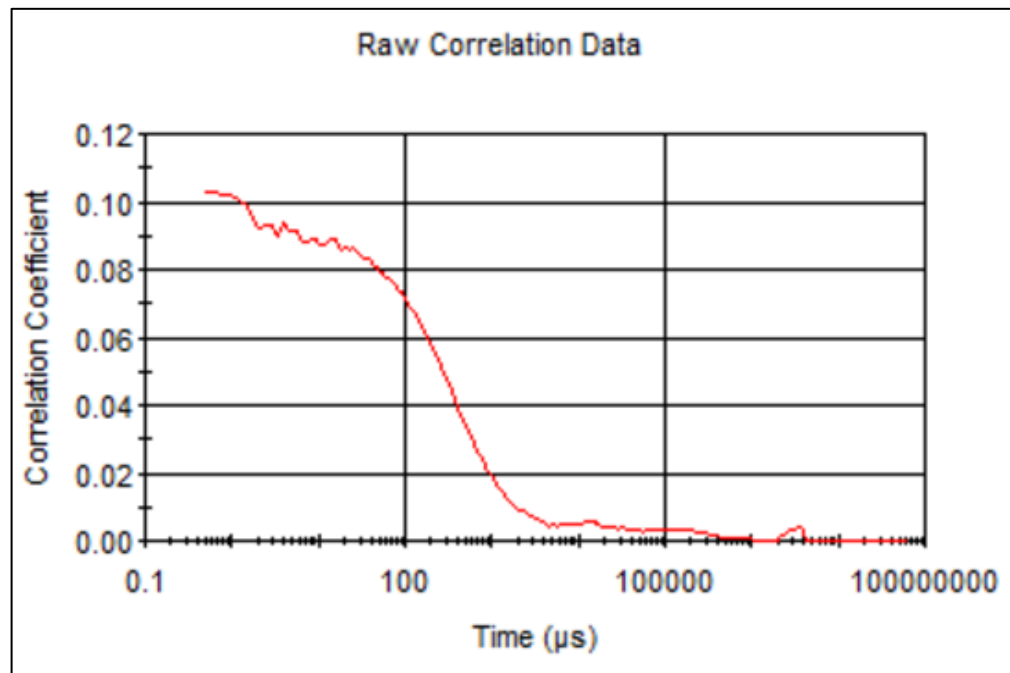


Figura 13. Correlograma para la muestra de PBS a 37°C.

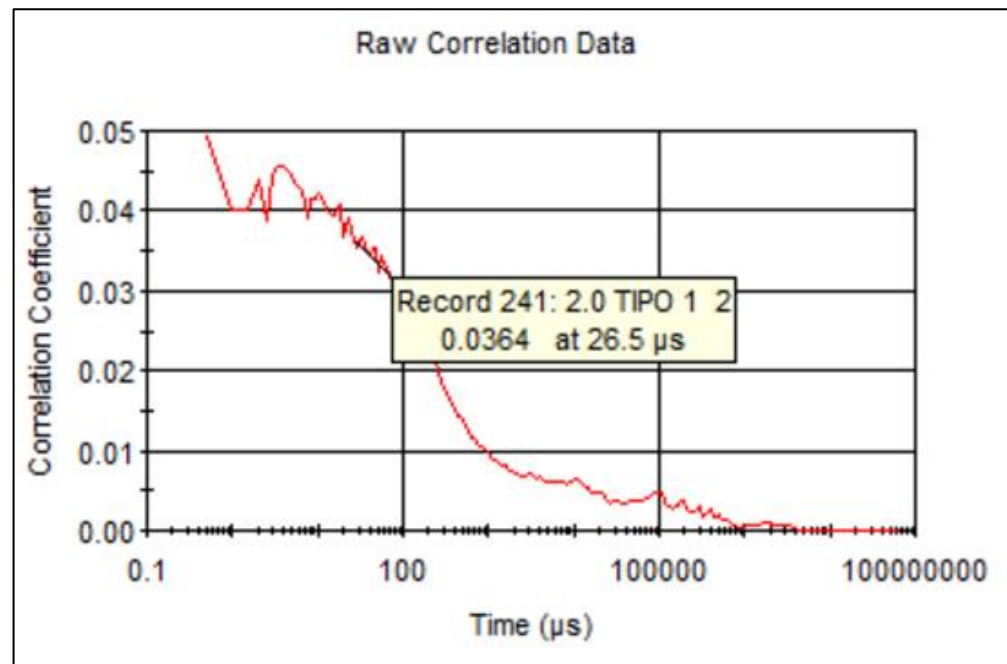


Figura 14. Correlograma para la muestra de agua a 37°C.

## 2.6 Discusión

Esta investigación buscaba determinar el efecto de diferentes tipos de oligómeros A $\beta$  en la mortalidad neuronal en un modelo de cultivo celular in vitro de hipocampo de ratas y de esta manera, generar nuevo conocimiento para entender un mecanismo implicado en la fisiopatología de la EA. Sin embargo, no fue posible cumplir con este objetivo general, puesto que los objetivos específicos no se desarrollaron a cabalidad.

El primer objetivo era estandarizar el procedimiento para producir oligómero a partir de péptidos A $\beta$  (1-40, 1-42 y 1-43) y a estos determinarle sus características fisicoquímicas mediante las técnicas de Western Blotting y Zetasizer. Cabe recalcar que sólo se trabajó con los péptido A $\beta$  1-40 y A $\beta$  1-42. No se hicieron mezclas, porque se buscó primero determinar que cada uno de los péptidos por separados generaran oligómeros siguiendo las condiciones registradas en la literatura.

En este proceso se hizo la preparación de los oligómeros solubles a partir de los péptidos sintéticos A $\beta$  1-40 y A $\beta$  1-42 y se buscó verificar su obtención a través de la técnica de Western Blotting. La razón por la cual se prepararon oligómeros, fue porque basados en otros estudios previamente mencionados (Kim et al., 2002) (Haass & Selkoe, 2007) (Sakono, Zako, Ueda, Yohda, & Maeda, 2008) (Sakono et al., 2008) (Fa et al., 2010) (Tu et al., 2014), estos son especies intermedias mucho más tóxicas para las neuronas en comparación con las protofibrillas, fibrillas e incluso las placas beta y que están implicadas en el desarrollo de la EA (Barghorn et al., 2005) (Querfurth & LaFerla, 2010). Esto se ha evidenciado en estudios en ratones transgénicos, en los cuales el déficit cognitivo, la neurodegeneración y la pérdida de sinapsis se puede detectar histológicamente antes de la formación de las placas seniles (Perez et al., 2010). A concentración de 10nM, los oligómeros de A $\beta$  1-42 inhiben la viabilidad neuronal 10 veces más que las fibrillas y 40 veces más que el péptido no agregado (Dahlgren et al., 2002).

En el Western Blotting realizado, a pesar de que se realizaron varias réplicas, no se obtuvo ninguna banda en ninguno de los péptidos, y mucho menos se verificó la presencia de monómeros. En estudios previos realizados, se había utilizado una concentración 5  $\mu$ M, y la literatura recomienda hacer una oligomerización con una concentración 10  $\mu$ M del respectivo péptido a temperatura ambiente, para asegurar la presencia de la banda, se procedió con un protocolo (ítem 2.4.1 y 2.4.2) y hacer las muestras con una concentración final de 20  $\mu$ M del péptido y las condiciones de oligomerización fueron 37°C de incubación por 24h con agitación constante. Según la literatura, se habla de oligómeros solubles si son solubles en medio acuoso y se mantienen en solución después de un proceso de centrifugación (Sakono & Zako, 2010).

A pesar de que se utilizaron las condiciones sugeridas en otras investigaciones (Gal Bitan, Lomakin, & Teplow, 2001) (Pujol-Pina et al., 2015) no hubo evidencia de oligómeros (banda) ya sea por condiciones de los reactivos como la potencia de los anticuerpos o del kit luminiscente, incluso que no se hizo revelado con tinción de plata o por el proceso de transferencia de la proteína desde el gel hacia la membrana.

También es importante tener en cuenta que estudios recientes, revelan que el uso de SDS en la preparación de la muestra para la SDS-PAGE afecta el estado de oligomerización de A $\beta$  1-42 (Pujol-Pina et al., 2015). El SDS puede facilitar la disociación de complejos proteicos y la desnaturalización de monómeros resultantes, es decir, que alteran los oligómeros en tamaños aparentes más pequeños, por eso, es poco probable que las distribuciones de oligómeros definidos mediante SDS-PAGE con precisión reflejen las distribuciones existentes antes de la electroforesis (Ahmed et al., 2010). Sin embargo hay estudios que indican que puede existir un proceso de oligomerización inducida por SDS-PAGE, es decir que el SDS puede facilitar la agregación (Gal Bitan et al., 2001).

A pesar de esto, se procedió a realizar la caracterización fisicoquímica mediante el equipo Z-sizer nano-ZSP. Hay que tener en cuenta que la caracterización de los oligómeros A $\beta$  es compleja porque estos tienen estados de agregación heterogéneos y que varían en función del tiempo, es decir, son sistemas dinámicos (Pujol-Pina et al., 2015). Para este proceso, se utilizó el péptido A $\beta$  1-42, porque se contaba con mayor cantidad de este que de A $\beta$  1-40. En ensayos *in vitro* se ha observado que estos son más propensos a agregarse y formar las fibrillas amiloides (Ahmed et al., 2010).

Los péptidos A $\beta$  1-42 se agregan rápidamente y forman oligómeros, protofibrillas y fibrillas. Se ha evidenciado que a condiciones de 37°C y durante una incubación de 6h de los oligómeros A $\beta$  1-42 se formaron protofibrillas estrechas y alargadas que podrían tener un tamaño cerca de 40nm (Ahmed et al., 2010) y es probable que durante las mediciones, se hayan formado estas protofibrillas.

Es importante determinar que se están formando oligómeros y no otras especies, porque de esta conformación depende la toxicidad de estos sobre los cultivos que vayan a ser tratados, puesto que se sabe que las oligómeros interactúan de manera más rápida con las membranas celulares para causar muerte en comparación con agregados de mayor tamaño y esto se ha observado porque la toxicidad disminuye a medida que se forman fibrillas maduras a partir del péptido A $\beta$  1-42 (Ahmed et al., 2010).

Estudios muestran que oligómeros pequeños de A $\beta$  1-42 con un tamaño de partícula de 1-2 nm son más propensos a unirse con las vesículas de fosfolípidos y ser especies más tóxicas que inducen a una rápida necrosis neuronal en comparación

con agregados con un tamaño entre 4-5 nm; la neurotoxicidad depende del tamaño del oligómero (Cizas et al., 2011).

Hay que resaltar que los péptidos sintéticos A $\beta$  en muchos estudios se han aplicado generalmente en concentraciones micromolares, que son mayores en comparación con los niveles bajos (nanomolares) de los A $\beta$  naturales encontrados en el líquido cefalorraquídeo y el cerebro, y ellos pueden agregarse y ensamblarse en formas que, incluso pueden tener propiedades biofísicas diferentes a los que se encuentren *in vivo* (Selkoe, 2002). Sin embargo, reportes indican que concentraciones de 10 nM de A $\beta$  1-42 producen muerte neuronal (Dahlgren et al., 2002), esto contrarresta estudios en donde se requiere concentraciones micromolares del péptido para garantizar su oligomerización (G Bitan et al., 2003).

Según los resultados proporcionados por el software del equipo, el valor Zaverage indica el tamaño promedio de las partículas en el momento que el haz de luz incide sobre la muestra, la intensidad indica que tan fuerte es la señal de ese tamaño y Pdl es la polidispersidad de los tamaños de las partículas.

La literatura ha registrado que los oligómeros A $\beta$  están distribuidos en un rango de peso molecular desde <10 kDa hasta > 100 kDa. Los oligómeros de bajo peso molecular podrían ser los bloques que conforman los oligómeros de alto pesos molecular o las fibrillas amiloides insolubles (Sakono & Zako, 2010). También, estudios revelan que partículas de 1-2 nm de tamaño observadas por DLS corresponden a monómeros, dímeros, trímeros y tetrámeros en equilibrio. Además, que la manera en que se oligomeriza A $\beta$  1-42 es distinta a la de A $\beta$  1-40, pues los oligómeros de A $\beta$  1-42 de gran peso se forman a partir de unidades de pentámeros y hexámeros (G Bitan et al., 2003).

Como se observa en la las Figuras 11-14 de los resultados obtenidos y se compara con la Figura 8 que corresponde un resultado de un comportamiento ideal en un estudio realizado (Bhattacharjee, 2016), no se tiene una medida donde ese valor del tiempo de correlación tiende al infinito (gráfico similar a un “S” perfecta), indicando que la medida puede descartarse ya sea porque las partículas no se mueven fuera del láser o porque las partículas ya están lo suficientemente grandes y la ecuación de correlación ya no tiene más efecto.

El software trata de ajustar los valores de correlación a un “valor de tamaño” (Zaverage registrado para cada muestra en las Tablas 2-8 los valores reportados no necesariamente son reales. Esto es porque al tener un correlograma de las medidas por debajo de 0,7 el sistema DLS nos indica que la muestra no es adecuada, porque el haz de luz (láser) es incapaz de detectar partículas, es decir, antes de hacer una primera determinación, la primera población de partículas ya no está al alcance del láser, ya sea porque se da una sedimentación muy rápida del agregado formado o porque no hay partículas en la muestra. Para el caso de la

Figura 14, en el agua, un correlograma iniciando en valores de 0,005 es un indicativo de la ausencia de partículas en la muestra.

Podría estandarizarse este proceso y tener en cuenta que encontrar la concentración óptima de la muestra es esencial. En la literatura es difícil encontrar una guía general sobre la concentración ideal para DLS, ya que varía y depende de factores relacionados con el equipo (el volumen de dispersión, el ángulo de dispersión, la potencia del láser, la sensibilidad del detector) y propiedades de los materiales (peso molecular, por ejemplo) (Bhattacharjee, 2016). se recomienda hacer mediciones con una muestra de oligómeros más diluida y ejecutar un SOP en modo automático, puesto que la presencia de turbidez en la celda como se observa en la Figura 8, puede indicar que ya hubiese agregación en los primeros tiempos de medición.

El segundo objetivo no pudo llevarse a cabo, porque al no tener una metodología estandarizada para identificar los oligómeros de A $\beta$  1-40 y A $\beta$  1-42, no se procedió a realizar las mezclas sugeridas por la literatura (Johnson et al., 2013) y su posterior identificación. Como este objetivo estaba centrado en el efecto de las mezclas de oligómeros, no se pudieron hacer siembras sobre las neuronas hipocampales de rata.

Finalmente, al no desarrollarse el anterior objetivo, no pudo llevarse a cabalidad el último objetivo planteado de identificar la relación entre el tipo de oligómero y el grado de toxicidad en las neuronas hipocampales de rata, porque para esto, se requerían resultados de las respuestas de los cultivos a la toxicidad de las mezclas de oligómeros.

Sin embargo, es necesario tener en cuenta que evaluar el efecto de estos agregados sintéticos es complicado porque estos se presentan en mezclas complejas que pueden estar bajo rápidas transiciones entre formas menos y más neurotóxicas en los cultivos celulares (Selkoe, 2002). Es importante hacer un estudio integrado de diferentes tipos de péptidos A $\beta$  porque se ha demostrado que las placas amiloides encontradas en cerebros de pacientes con EA, están compuestas por una mezcla heterogénea de estos péptidos, y entender su respectivo rol y toxicidad es crucial para el desarrollo de tratamientos más eficientes. Estudios recientes han confirmado que A $\beta$  1-43 puede estar incluido en la patogénesis de la enfermedad, ya que tiene la capacidad de auto-agregarse y de conducir a la agregación y toxicidad de otras especies A $\beta$  (Burnouf, Gorsky, Dols, Grönke, & Partridge, 2015).

## 2.7 Conclusiones

- A pesar de que no se lograron los objetivos planteados inicialmente, el proceso investigativo permitió recolectar información sobre las condiciones más adecuadas para la caracterización fisicoquímica de los oligómeros A $\beta$  a través del equipo Z-sizer nano-ZSP, que es de gran importancia para establecer futuros estudios en esta línea de investigación, y convertirse en una base de estos mismos.

## 2.8 Recomendaciones

- Continuar con el proceso de estandarización de la metodología para la caracterización fisicoquímica de cada uno de los péptidos a trabajar y posteriormente la de los oligómeros formados y de esta manera, plantear una metodología para preparar mezclas de estos.
- Estandarizar la técnica de Western Blotting para determinar las condiciones adecuadas para la visualización de los oligómeros a través de esta metodología.
- Considerar la posibilidad de trabajar de manera independiente cada uno de los objetivos planteados al inicio de la investigación, puesto que, por la disponibilidad de tiempo y recursos, es importante iniciar los procesos con anterioridad.
- Continuar con las investigaciones en esta misma línea y poder incluir ensayos completos con los oligómeros A $\beta$  1-40, A $\beta$  1-42 y A $\beta$  1-43.

### 3. REFERENCIAS

- Adams, M. M., Shi, L., Linville, M. C., Forbes, M. E., Long, A. B., Bennett, C., ... Brunso-Bechtold, J. K. (2008). Caloric restriction and age affect synaptic proteins in hippocampal CA3 and spatial learning ability. *Experimental Neurology*, *211*(1), 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2008.01.016>
- Ahmed, M., Davis, J., Aucoin, D., Sato, T., Ahuja, S., Aimoto, S., ... Smith, S. O. (2010). Structural conversion of neurotoxic amyloid- $\beta$  1–42 oligomers to fibrils. *Nature Publishing Group*, *17*(5), 561–567. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1799>
- Bannerman, D. M., Rawlins, J. N. P., McHugh, S. B., Deacon, R. M. J., Yee, B. K., Bast, T., ... Feldon, J. (2004). Regional dissociations within the hippocampus—memory and anxiety. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *28*(3), 273–283. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.03.004>
- Barghorn, S., Nimmrich, V., Striebinger, A., Krantz, G., Keller, P., Janson, B., ... Hillen, H. (2005). Globular amyloid  $\beta$ -peptide1-42 oligomer - a homogenous and stable neuropathological protein in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, *95*(3), 834–847. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03407.x>
- Barten, D. M., Meredith, J. E., Zaczek, R., Houston, J. G., & Albright, C. F. (2006).  $\gamma$ -secretase inhibitors for Alzheimer's disease: Balancing efficacy and toxicity. *Drugs in R and D*, *7*(2), 87–97. <https://doi.org/10.2165/00126839-200607020-00003>
- Bartsch, T., & Wulff, P. (2015). The hippocampus in aging and disease: from plasticity to vulnerability. *Neuroscience*, *309*, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.07.084>
- Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, *235*, 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>
- Billings, L. M., Oddo, S., Green, K. N., McGaugh, J. L., & LaFerla, F. M. (2005). Intraneuronal A $\beta$  causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron*, *45*(5), 675–688. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.01.040>
- Bitan, G., Kirkitadze, M. D., Lomakin, A., Vollers, S. S., Benedek, G. B., & Teplow, D. B. (2003). Amyloid  $\beta$ -protein (A $\beta$ ) assembly: A $\beta$  40 and A $\beta$  42 oligomerize through distinct pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(1), 330–335. <https://doi.org/10.1073/pnas.222681699>

- Bitan, G., Lomakin, A., & Teplow, D. B. (2001). Amyloid  $\beta$ -protein oligomerization: Prenucleation interactions revealed by photo-induced cross-linking of unmodified proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 276(37), 35176–35184. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102223200>
- Blaise, J. H., & Bronzino, J. D. (2003). Effects of stimulus frequency and age on bidirectional synaptic plasticity in the dentate gyrus of freely moving rats. *Experimental Neurology*, 182(2), 497–506. [https://doi.org/10.1016/S0014-4886\(03\)00136-5](https://doi.org/10.1016/S0014-4886(03)00136-5)
- Burnouf, S., Gorsky, M. K., Dols, J., Grönke, S., & Partridge, L. (2015). A $\beta$  43 is neurotoxic and primes aggregation of A $\beta$  40 in vivo. *Acta Neuropathol*, 130, 35–47. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1419-y>
- Cabrera, M. J. A., Rocío, I., Pérez, M., Ravelo, A. G., Dayleen, I., & Rodríguez, H. (2014). Patogenia y tratamientos actuales de la enfermedad de Alzheimer Pathogenesis and current treatment of Alzheimer's disease. *Revista Cubana de Farmacia*, 48(2), 508–518. Retrieved from <http://scielo.sld.cu>
- Carrero, I., Gonzalo, M. R., Martin, B., Sanz-Anquela, J. M., Arévalo-Serrano, J., & Gonzalo-Ruiz, A. (2012). Oligomers of beta-amyloid protein (A $\beta$ 1-42) induce the activation of cyclooxygenase-2 in astrocytes via an interaction with interleukin-1beta, tumour necrosis factor-alpha, and a nuclear factor kappa-B mechanism in the rat brain. *Experimental Neurology*, 236(2), 215–227. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.05.004>
- Caspersen, C., Wang, N., Yao, J., Sosunov, A., Chen, X., Lustbader, J. W., ... Yan, S. Du. (2005). Mitochondrial A $\beta$ : a potential focal point for neuronal metabolic dysfunction in Alzheimer's disease. *The FASEB Journal*, 19, 2040–2045. <https://doi.org/10.1096/fj.05-3735fje>
- Chow, V. W., Mattson, M. P., Wong, P. C., & Gleichmann, M. (2010). An overview of APP processing enzymes and products. *Neuromolecular Medicine*, 12(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s12017-009-8104-z>
- Cizas, P., Budvytyte, R., Morkuniene, R., Moldovan, R., Broccio, M., Lösche, M., ... Borutaite, V. (2011). Size-dependent neurotoxicity of  $\beta$ -amyloid oligomers. *Arch Biochem Biophys*, 496(2), 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.02.001>.Size-dependent
- Coultrap, S. J., Nixon, K. M., Alvestad, R. M., Fernando Valenzuela, C., & Browning, M. D. (2005). Differential expression of NMDA receptor subunits and splice variants among the CA1, CA3 and dentate gyrus of the adult rat. *Molecular Brain Research*, 135(1–2), 104–111. <https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2004.12.005>

- Dahlgren, K. N., Manelli, A. M., Blaine Stine, W., Baker, L. K., Krafft, G. A., & Ladu, M. J. (2002). Oligomeric and fibrillar species of amyloid- $\beta$  peptides differentially affect neuronal viability. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(35), 32046–32053. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201750200>
- Daumas, S., Halley, H., Francés, B., & Lassalle, J.-M. (2005). Encoding, consolidation, and retrieval of contextual memory: Differential involvement of dorsal CA3 and CA1 hippocampal subregions. *Learning & Memory*, *12*(4), 375–382. <https://doi.org/10.1101/lm.81905>
- Decker, H., Jürgensen, S., Adrover, M. F., Brito-Moreira, J., Bomfim, T. R., Klein, W. L., ... Ferreira, S. T. (2010). N-Methyl-d-aspartate receptors are required for synaptic targeting of Alzheimer's toxic amyloid- $\beta$  peptide oligomers. *Journal of Neurochemistry*, *115*(6), 1520–1529. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.07058.x>
- Fa, M., Orozco, I. J., Francis, Y. I., Saeed, F., Gong, Y., & Arancio, O. (2010). Preparation of oligomeric  $\beta$ -amyloid 1-42 and induction of synaptic plasticity impairment on hippocampal slices. *Journal of Visualized Experiments*, (41), 3–5. <https://doi.org/10.3791/1884>
- Friedrich, R. P., Tepper, K., Röncke, R., Soom, M., Westermann, M., & Reymann, K. (2010). Mechanism of amyloid plaque formation suggests an intracellular basis of A  $\beta$  pathogenicity. *PNAS*, *107*(5), 1942–1947. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904532106>
- García, S., Coral Vázquez, R. M., Dávalos, E. M., Castillo, J. L., Silva, B. M., & Ortiz, A. D. J. V. (2009). Enfermedad de Alzheimer: Una panorámica desde su primera descripción hacia una perspectiva molecular. *Medicina Interna de Mexico*, *25*(4), 300–312.
- Gratwicke, J., Kahan, J., Zrinzo, L., Hariz, M., Limousin, P., Foltynie, T., & Jahanshahi, M. (2013). The nucleus basalis of Meynert: A new target for deep brain stimulation in dementia? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *37*(10), 2676–2688. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.09.003>
- Greene, S. J., & Killiany, R. J. (2012). Hippocampal subregions are differentially affected in the progression to Alzheimer's disease. *Anatomical Record*, *295*(1), 132–140. <https://doi.org/10.1002/ar.21493>
- Haass, C., & Selkoe, D. J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid  $\beta$ -peptide. *Molecular Cell Biology*, *8*(2), 101–112. <https://doi.org/10.1038/nrm2101>
- Hirai, K., Aliev, G., Nunomura, A., Fujioka, H., Russell, R. L., Atwood, C. S., ... Smith, M. A. (2001). Mitochondrial Abnormalities in Alzheimer's Disease. *The Journal*

of *Neuroscience*, 21(9), 3017–3023.

- Hsieh, H., Boehm, J., Sato, C., Iwatsubo, T., Tomita, T., Sisodia, S., & Malinow, R. (2006). AMPAR Removal Underlies A $\beta$ -Induced Synaptic Depression and Dendritic Spine Loss. *Neuron*, 52(5), 831–843. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.10.035>
- Jessen, F., Wolfsgruber, S., Wiese, B., Bickel, H., Mösch, E., Kaduszkiewicz, H., ... Wagner, M. (2014). AD dementia risk in late MCI, in early MCI, and in subjective memory impairment. *Alzheimer's and Dementia*, 10(1), 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2012.09.017>
- Johnson, R. D., Schauerte, J. A., Chang, C., Wisser, K. C., Althaus, J. C., Carruthers, C. J. L., ... Gafni, A. (2013). Single-Molecule Imaging Reveals A $\beta$ 42 : A $\beta$ 40 Ratio-Dependent Oligomer Growth on Neuronal Processes. *Biophysical Journal*, 104, 894–903.
- Jurgens, H. A., & Johnson, R. W. (2012). Dysregulated neuronal-microglial cross-talk during aging, stress and inflammation. *Experimental Neurology*, 233(1), 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2010.11.014>
- Kaduszkiewicz, H., Zimmermann, T., Beck-Bornholdt, H.-P., & van den Bussche, H. (2005). Cholinesterase inhibitors for patients with Alzheimer's disease: systematic review of randomised clinical trials. *BMJ*, 331(7512), 321–327. <https://doi.org/10.1136/bmj.331.7512.321>
- Kim, H.-J., Chae, S.-C., Lee, D.-K., Chromy, B., Lee, S. C., Park, Y.-C., ... Hong, S.-T. (2002). Selective neuronal degeneration induced by soluble oligomeric amyloid beta protein. *The FASEB Journal : Federation of American Societies for Experimental Biology*, 16(13), 1805–1809. <https://doi.org/10.1096/fj.01>
- Koo, E. H., Sisodia, S. S., Archer, D. R., Martin, L. ., Weidemann, A., Beyreuther, K., ... Price, D. L. (1990). Precursor of amyloid protein in Alzheimer disease undergoes fast anterograde axonal transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(4), 1561–1565. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.4.1561>
- Lenntech. (2016). Potencial Zeta. Retrieved December 8, 2016, from <http://www.lenntech.es/potential-zeta.htm>
- Liu, A. K. L., Chang, R. C. C., Pearce, R. K. B., & Gentleman, S. M. (2015). Nucleus basalis of Meynert revisited: anatomy, history and differential involvement in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Acta Neuropathologica*, 129(4), 527–540. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1392-5>
- Liu, X., Gu, Q.-H. H., Duan, K., & Li, Z. (2014). NMDA Receptor-Dependent LTD is

- required for consolidation but not acquisition of fear memory. *The Journal of Neuroscience*, 34(26), 8741–8748. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2752-13.2014>
- Malkki, H. (2016). Alzheimer disease: BACE1 inhibition could block CSF tau increase. *Nature Reviews Neurology*, 13(6), 2016. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2016.170>
- Manczak, M., Anekonda, T. S., Henson, E., Park, B. S., Quinn, J., & Reddy, P. H. (2006). Mitochondria are a direct site of A $\beta$  accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. *Human Molecular Genetics*, 15(9), 1437–1449. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl066>
- Nieto-alcaraz, R., Arcos-garcía, C. M., & Rubio-hernández, A. (2016). Comunicación y cambios del lenguaje en personas con enfermedad de Alzheimer Communication and language changes in people with Alzheimer's disease. *Revista Española de Comunicación En Salud*, 7(2), 331–335.
- Perez, J. L., Carrero, I., Gonzalo, P., Arevalo-Serrano, J., Sanz-Anquela, J. M., Ortega, J., ... Gonzalo-Ruiz, A. (2010). Soluble oligomeric forms of beta-amyloid (A $\beta$ ) peptide stimulate A $\beta$  production via astrogliosis in the rat brain. *Experimental Neurology*, 223(2), 410–421. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.10.013>
- Perl, D. P. (2010). Neuropathology of Alzheimer's Disease. *Mt Sinai J Med*, 77(1), 32–42. <https://doi.org/10.1002/msj.20157>
- Prada, S. I., Takeuchi, Y., & Ariza, Y. (2014). Costo monetario del tratamiento de la enfermedad de Alzheimer en Colombia. *Acta Neurológica Colombiana*, 30(1), 247–255.
- Pujol-Pina, R., Vilaprinçó-Pascual, S., Mazzucato, R., Arcella, A., Vilaseca, M., Orozco, M., & Carulla, N. (2015). SDS-PAGE analysis of A $\beta$  oligomers is disserving research into Alzheimer's disease: appealing for ESI-IM-MS. *Scientific Reports*, 5(14809), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep14809>
- Querfurth, H., & LaFerla, F. (2010). Alzheimer's Disease. *The New England Journal of Medicine*, 362(4), 329–344. <https://doi.org/citeulike-article-id:6600078> <https://doi.org/10.1056/NEJMra0909142>
- Rameau, G. A., Akaneya, Y., Chiu, L. Y., & Ziff, E. B. (2000). Role of NMDA receptor functional domains in excitatory cell death. *Neuropharmacology*, 39(12), 2255–2266. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(00\)00066-6](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(00)00066-6)
- Reitz, C., & Mayeux, R. (2014). Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria,

- risk factors and biomarkers. *Biochemical Pharmacology*, 88(4), 640–651. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.12.024>
- Sakono, M., & Zako, T. (2010). Amyloid oligomers: formation and toxicity of A $\beta$  oligomers. *FEBS Journal*, 277, 1348–1358. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07568.x>
- Sakono, M., Zako, T., Ueda, H., Yohda, M., & Maeda, M. (2008). Formation of highly toxic soluble amyloid beta oligomers by the molecular chaperone prefoldin. *FEBS Journal*, 275(23), 5982–5993. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06727.x>
- Scheff, S. W., & Price, D. A. (2003). Synaptic pathology in Alzheimer's disease: a review of ultrastructural studies. *Neurobiology of Aging*, 24(8), 1029–1046. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2003.08.002>
- Selkoe, D. J. (2002). Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science*, 298(5594), 789–791. <https://doi.org/10.1126/science.1074069>
- Snyder, E. M., Nong, Y., Almeida, C. G., Paul, S., Moran, T., Choi, E. Y., ... Greengard, P. (2005). Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid- $\beta$ . *Nature Neuroscience*, 8(8), 1051–1058. <https://doi.org/10.1038/nn1503>
- Tariot, P. N., Farlow, M. R., Grossberg, G. T., Graham, S. M., McDonald, S., & Gergel, I. (2004). Memantine Treatment in Patients With Moderate to Severe Alzheimer Disease. *JAMA*, 291(3), 317–324.
- Thinakaran, G., & Koo, E. H. (2008). Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *Journal of Biological Chemistry*, 283(44), 29615–29619. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800019200>
- Tu, S., Okamoto, S., Lipton, S. A., & Xu, H. (2014). Oligomeric A  $\beta$ -induced synaptic dysfunction in Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 9(48), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-9-48>
- West, P., & Mecartney, A. E. M. L. (2008). A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions. *Journal of Nanoparticle Research*, 10, 89–96. <https://doi.org/10.1007/s11051-008-9435-7>
- Yan, R., & Vassar, R. (2014). Targeting the  $\beta$  secretase BACE1 for Alzheimer's disease therapy. *The Lancet Neurology*, 13(3), 319–329. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70276-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70276-X)
- Yiannopoulou, K. G., & Papageorgiou, S. G. (2013). Current and future treatments for Alzheimer's disease. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 6(1),

19–33. <https://doi.org/10.1177/1756285612461679>

Zhang, H., Ma, Q., Zhang, Y., & Xu, H. (2012). Proteolytic processing of Alzheimer's  $\beta$ -amyloid precursor protein. *Journal of Neurochemistry*, *120*(Suppl 1), 9–21. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07519.x>. Proteolytic

## ANEXOS

### Anexo 1. Cálculo de la fuerza iónica del medio PBS.

Buffer PBS PBL06-500mL; Calsson Labs.

Componentes

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 144 mg/L; PM: 136,086 g/mol
- NaCl: 9000 mg/L; PM: 58,44 g/mol
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ : 421,620 mg/L; PM: 141,96 g/mol

Concentración de cada componente

$$\bullet \text{KH}_2\text{PO}_4 \text{ mM} = \frac{144 \text{ mg}}{L} \times \frac{1g}{1000 \text{ mg}} \times \frac{1 \text{ mol}}{136,086 \text{ g}} \times \frac{1000 \text{ mMol}}{1 \text{ mol}} = 1,058 \text{ mM}$$

$$\bullet \text{NaCl mM} = \frac{9000 \text{ mg}}{L} \times \frac{1g}{1000 \text{ mg}} \times \frac{1 \text{ mol}}{58,44 \text{ g}} \times \frac{1000 \text{ mMol}}{1 \text{ mol}} = 154 \text{ mM}$$

$$\bullet \text{Na}_2\text{HPO}_4 \text{ mM} = \frac{421,620 \text{ mg}}{L} \times \frac{1g}{1000 \text{ mg}} \times \frac{1 \text{ mol}}{141,96 \text{ g}} \times \frac{1000 \text{ mMol}}{1 \text{ mol}} = 2,97 \text{ mM}$$

La fuerza iónica se calcula con la Ecuación 1, donde  $C_i$  es la concentración de cada sal y  $Z_i^2$  es la carga iónica de cada sal.

$$I = \frac{1}{2} \sum C_i Z_i^2 \quad (1)$$

$$I = \frac{1}{2} (0,00106 + 0,15400 + 0,00297) \times (2 + 1 + 2)^2$$

$$I = \frac{1}{2} (0,15803 \times 25)$$

$$I = 1,9175 \cong 2,000$$

**Anexo 2.** Matriz de Marco Lógico.

<b>Objetivo General</b>			
Determinar el efecto de diferentes tipos de oligómeros de A $\beta$ sobre la mortalidad neuronal en un modelo de cultivo celular <i>in vitro</i> de ratas.			
	<b>Actividades</b>	<b>Supuestos</b>	<b>Indicador</b>
<p><b>Objetivo específico 1:</b> Estandarizar el procedimiento para producir oligómeros a partir de péptidos A<math>\beta</math> (40, 42 y 43) y determinar sus características fisicoquímicas de estos mediante las técnicas de Western Blotting y Zetasizer.</p>	<p>Investigar artículos científicos y bibliografía acerca de información pertinente con las posibles proporciones de péptidos y así determinar los parámetros a medir.</p> <p>Verificación de los reactivos y materiales de trabajo.</p> <p>Diseño experimental: estandarizar el procedimiento para producir los oligómeros en diferentes mezclas preparadas.</p> <p>Realizar las proporciones previamente definidas bajo las condiciones estipuladas.</p> <p>Determinar las características fisicoquímicas de los oligómeros mediante las técnicas de Western Blotting y Zetasizer.</p>	<p>Disponibilidad y adecuada calibración de los equipos a utilizar.</p> <p>Suficiente información recolectada y de alto grado de confiabilidad.</p>	<p>Formación de oligómeros.</p>
<p><b>Objetivo específico 2:</b> Determinar el efecto de los oligómeros, obtenidos de las diferentes mezclas, sobre la</p>	<p>Capacitación en el manejo de los cultivos <i>in vitro</i> de ratas.</p> <p>Determinar diseño experimental del parámetro a medir, técnica de siembra y revisión del efecto de cada mezcla a evaluar.</p> <p>Exponer los cultivos a las diferentes mezclas y después del</p>	<p>Que haya mortalidad de las neuronas en los cultivos <i>in vitro</i>.</p>	<p>Porcentaje de neuronas hipocampales muertas por cada tratamiento</p>

<p>mortalidad de las neuronas hipocampales de rata en un modelo <i>in vitro</i>.</p>	<p>tiempo estipulado hacer la revisión de la muerte neuronal.</p> <p>Determinar la muerte neuronal en los cultivos mediante microscopía de fluorescencia con el marcador de yoduro de propidio.</p>		
<p><b>Objetivo específico 3:</b> Identificar si existen relación entre tipo de oligómero y grado toxicidad en las neuronas hipocampales del modelo <i>in vitro</i> de rata.</p>	<p>Determinar el análisis estadístico a utilizar (paramétrico o no paramétrico).</p> <p>Hacer el análisis estadístico de los resultados obtenidos para identificar la correlación.</p>	<p>Hay diferencias entre los resultados obtenidos con los diferentes sistemas.</p>	<p>Diferencia estadísticamente significativa entre los diferentes tratamientos utilizados para evaluar la asociación tipo oligómero/ muerte neuronal.</p>

**Anexo 3.** Carta de aval de comité de ética.



Santiago de Cali, 05 de marzo de 2016  
CICUAE 0011/2016

Sr(a). **Alvaro Andres Barrera Ocampo**  
Investigador Principal- Universidad Icesi

*ASUNTO: Aprobación proyecto: "Evaluación de la vulnerabilidad de poblaciones de neuronas hipocampales a compuestos patogénicos relacionados con la enfermedad de Alzheimer".*

El 18 de febrero del presente año, los miembros de CIECUAE de la Universidad Icesi revisaron y aprobaron el siguiente proyecto de investigación, dando cumplimiento a la ley 84 de 1989 y a la resolución de rectoría N° 847 (9 de Julio de 2012):

**Evaluación de la vulnerabilidad de poblaciones de neuronas hipocampales a compuestos patogénicos relacionados con la enfermedad de Alzheimer".**

La presente se firma, el día (10), mes (Marzo), del año (2016)

Cardialmente,

---

Juliana Rengifo  
Presidente -CIECUAE- Universidad Icesi