



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FISIOPATOLOGÍA

LABORATORIO DE ESTRÉS CELULAR Y BIOMEDICINA

**ROL DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN XBP1s EN LA
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

Memoria de título para optar al Título Profesional de Bioquímica

JAVIERA FERNANDA ACEVEDO VALDIVIESO

DIRECTORES DE TESIS

Dr. Claudio Hetz Flores

Dra. Claudia Durán-Aniotz

PROFESOR PATROCINANTE

Prof. Dante Miranda Wilson

Santiago, Chile 2017

AGRADECIMIENTOS

El haber podido llegar a este punto de mi vida no puedo decir que es sólo mi mérito, ya que durante todo mi proceso universitario tuve el apoyo enorme de mi familia y amigos, quienes fueron imprescindibles para llegar hasta acá.

En primero lugar quiero agradecer a mi familia, el pilar de apoyo más grande de mi vida. A mi mamá sobre todos, por apoyarme siempre en las decisiones que me llevaron hasta acá sin dudarlo ni criticarme, sólo buscando que mis decisiones me llevaran a hacer lo que me apasiona y me hace feliz. A mi abuela, quien junto a mi mamá le dieron el cuidado, amor y protección a mi hijo cuando tuve que estar fuera de casa estudiando, trabajando o en el laboratorio, y por lo cual les estoy eternamente agradecida ya que sin ellas no podría haber cumplir esta meta. A mi hermana Karla por ser un enorme soporte durante toda mi vida, por ser la mejor madrina y tía con mi hijo, y una de las mejores amigas que tengo, y siempre ayudarme en la medida que pudo para que pudiera desarrollarme como estudiante, y llegar a finalizar este proceso. A mi hermano Janzen por acompañarme toda mi vida también, por siempre levantarme cuando quise rendirme, y apoyarme durante toda la vida de Ale. A mi hijo Alexander por ser tan comprensivo conmigo, por siempre entender que no pudiera estar con él ya que debía trabajar por un bien mayor, por ayudarme dentro de lo que puede siendo tan pequeño, y por llenarme de felicidad y amor cuando he sentido ganas de rendirme. Es sin duda el mayor motor para conseguir este logro.

Quiero también darle las gracias a las personas que he ido conociendo en mi vida, y que han estado cada segundo otorgándome el valor, la energía, la felicidad y el apoyo para cumplir mis metas. A mis amigos de la UV, Cony y Diego, a mis amigos de Bachillerato, en especial a Arroz, Jose, Bastián y Pazi, por ser más que amigos, una red enorme de apoyo, una familia en la universidad, en la vida. A mis amigos de la infancia y de toda una vida, que nunca me dejaron caer

aun cuando quise hacerlo, Vico, Naty, Carol. A los K mayormente, Kerry y Kevyn por ser grandes amigos, estar constantemente pendientes en este proceso, con la mejor disposición a ayudarme, por su constante feedback en lo académico y por ayudarme a ver las cosas en perspectiva cuando ha sido difícil. A la tía Jessica y Marisol, una segunda familia que gané en la vida, por su amor y apoyo infinito. A mis amigas pasta pura, la flaca, Andrea y Nico (y Ariel siempre presente en el team) porque sin ellos no habría sido posible llegar al final, compartiendo los malos y peores momentos del pregrado y la tesis, estudiando juntos, celebrando las pequeñas y grandes victorias, y desahogando las frustraciones que se generan en cualquier proceso. A mis compañeros y amigos de Bioquímica, María Paz, Juan, Criskun, Hector, Rena, Gonzalo, Rodri, y a los chiquillos farmacéuticos, con quienes estuve codo a codo estudiando, sacando adelante los ramos, y además compartiendo fuera de la U, generando lazos de amistad sincera. Al profesor Dante, quien durante todo el pregrado estuvo presente y disponible para conversar, para orientarme, para darme una palabra de aliento cuando la necesité. Fue una importante figura en mi formación. A la gente del laboratorio que me dio guía y apoyo cuando me encontré perdida, que aportaron a mi formación, que además de enseñar, compartieron conmigo, volviéndose personas a las que les tengo mucho afecto y respeto, y les estoy muy agradecida porque hicieron de mi estancia durante el proceso de la tesis una excelente experiencia a nivel personal. Al team bodega/team rata/team ustedes, Luchin, Sandra, Dani, Rod y Clau, por hacer cada día en el laboratorio un lugar más entretenido y un ambiente familiar. A Hery, Philippe y Gaby por ayudarme y aportar a mi enseñanza con su guía y su ayuda, su apoyo y amistad. A la Moni y a la Señora María, porque sin ellas nada podría llevarse a cabo, y siempre estuvieron con una palabra amable, una sonrisa, y con la mejor disposición a ayudar. Al staff de administración, a la Javi, Max y Susy.

Para finalizar, quisiera agradecer enormemente a Claudio, por darme la oportunidad de realizar mi tesis en un gran laboratorio, permitiéndome

adentrarme en un área de la investigación que amo, y que es una de las principales razones que me llevaron a estudiar esta carrera. A Claudia, mi tutora, por aceptarme como su tesista, y empujarme siempre a dar más, por ser parte importante de mi formación como investigadora, por los conocimientos que me otorgó en áreas que nunca imaginé y por guiarme para así poder explotar mis habilidades al máximo. Sin ellos no hubiera logrado esto, sin la oportunidad y sin las herramientas que me dieron durante todo este camino.

Por todo esto, muchas gracias a todos ellos.

1. INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	ii
1. INDICE GENERAL.....	v
2. INDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	vii
3. ABREVIACIONES	x
4. RESUMEN	xiii
5. ABSTRACT.....	xiv
6. INTRODUCCIÓN	1
6.1 La enfermedad de Alzheimer.....	1
6.2 Mecanismos de procesamiento y degradación de la proteína precursora de amiloide (PPA).....	4
6.3 Estrés de retículo endoplásmico (RE) y la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR)	8
6.4 El rol de la UPR en la enfermedad de Alzheimer	12
6.5 XBP1 y las enfermedades neurodegenerativas	18
HIPÓTESIS	23
OBJETIVO GENERAL.....	23
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
7.1 Animales	24
7.2 Extracción de ADN genómico.....	27
7.3 Genotipificación animales	28
7.4 Análisis de comportamiento.....	28
7.5 Preparación de virus adeno-asociados (AAVs).....	30
7.6 Análisis histológico de los animales.	31
7.6.1 Fluorescencia.....	33
7.6.2 Inmunohistoquímica (IHQ).....	34
7.7 Inyección intracraneal de AAVs para entrega de XBP1s en hipocampo.....	35
7.8 Análisis estadístico.....	35

8. RESULTADOS	38
8.1 Generación de animales transgénicos.....	38
8.2. Análisis histológico del péptido β -amiloide y su agregación en animales 5xFAD y Tg ^{XBP1s} /5xFAD.....	38
8.3 Caracterización y análisis conductual de animales 5xFAD y Tg ^{XBP1s} /5xFAD.	46
8.4 Evaluar el posible efecto neuroprotector de la sobreexpresión de XBP1s, por medio de terapia génica con virus adeno-asociados (AAV) en ratones 5xFAD.	57
9. CONCLUSIÓN	74
10. PROYECCIONES FUTURAS.....	76
11. BIBLIOGRAFÍA	77

2. INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Procesamiento de Proteína precursora amiloidea (PPA)	5
Figura 2. La respuesta a proteínas mal plegadas (UPR).....	13
Figura 3. Participación de la UPR en la enfermedad de Alzheimer	14
Figura 4. Esquema de los constructos utilizados.....	25
Figura 5. Laberinto acuático de Morris	29
Figura 6. Desarrollo de AAVs para expresar XBP1s.....	32
Figura 7. Esquema de inyección intracraneal de AAVs.....	37
Figura 8. Animales experimentales.....	40
Figura 9. Análisis con Tioflavina S (ThS) en cerebros de animales 5xFAD de 6 meses.	42
Figura 10. Análisis con Tioflavina S (ThS) en cerebros de animales 5xFAD de 8 meses.	43
Figura 11. Cuantificación de placas amiloides con el anticuerpo 4G8 en corteza de cerebros de animales 5xFAD de 6 meses	44
Figura 12. Cuantificación de placas amiloides con el anticuerpo 4G8 en hipocampo y subículo de cerebro de animales 5xFAD de 6 meses.....	45
Figura 13. Cuantificación de placas amiloides con el anticuerpo 4G8 en corteza de cerebros de animales 5xFAD de 8 meses	47

Figura 14. Cuantificación de placas amiloides con el anticuerpo 4G8 en hipocampo y subículo de cerebros de animales 5xFAD de 8 meses.....	48
Figura 15. Caracterización conductual de animales 5xFAD de 6 meses en laberinto Acuático de Morris en animales WT y 5xFAD	50
Figura 16. Análisis del 5° día de animales 5xFAD y WT de 6 meses en laberinto Acuático de Morris.....	51
Figura 17. Caracterización conductual de animales 5xFAD de 8 meses en laberinto Acuático de Morris en animales WT y 5xFAD	53
Figura 18. Análisis del 5° día de animales 5xFAD y WT de 8 meses en laberinto Acuático de Morris.....	54
Figura 19. Caracterización conductual de animales 5xFAD y TgXBP1s/5xFAD de 6 meses utilizando el laberinto Acuático de Morris en animales WT y 5xFAD.....	55
Figura 20. Análisis del 5° día de animales 5xFAD y TgXBP1s/5xFAD de 6 meses en laberinto Acuático de Morris.....	56
Figura 21. Caracterización conductual de animales 5xFAD y TgXBP1s/5xFAD de 8 meses en laberinto Acuático de Morris.....	58
Figura 22. Análisis del 5° día de animales 5xFAD y TgXBP1s/5xFAD de 8 meses en laberinto Acuático de Morris.....	59
Figura 23. Transducción de virus AAV en el hipocampo de animales 5xFAD inyectados	62

Figura 24. Análisis conductual de animales 5xFAD de 6 meses inyectados con AAV2-XBP1s y AAV2-EGFP utilizando el laberinto Acuático de Morris.....	63
Figura 25. Cuantificación de placas amiloides de cerebros de animales 5xFAD de 6 meses inyectados con AAVs teñidas con el anticuerpo 4G8.....	65
Figura 26. Cuantificación de placas amiloides en cerebros de animales 5xFAD de 8 meses inyectados con AAVs teñidos con el anticuerpo 4G8.....	66
Tabla 1. Tasa de nacimiento de los ratones transgénicos TgXBP1s/5xFAD	39

3. ABREVIACIONES

5xFAD	: modelo de ratón para la enfermedad de Alzheimer
AAV	: adenovirus asociados, del inglés adeno-associated virus
AAV2	: adenovirus asociados serotipo 2
ADN	: ácido desoxirribonucleico
ADNg	: ácido desoxirribonucleico genómico
AICD	: dominio intracelular de PPA, del inglés APP intracellular domain
AP	: coordenada estereotáctica en el eje antero-posterior
APH	: del inglés anterior pharynx defective 1
APP	: proteína precursora del amiloide, del inglés amyloid precursor protein
ARNm	: ácido ribonucleico mensajero
ATF4	: del inglés activating transcription factor 4
ATF6	: del inglés activating transcription factor 6
ATF6f	: fragmento de ATF6 que actúa como factor transcripcional
ASK1	: del inglés apoptosis signal-regulating kinase 1
BACE1	: del inglés β -site APP cleaving enzyme-1
Bcl-2	: del inglés B-cell lymphoma 2
BDNF	: del inglés brain derived neurotrophic factor
BGH	: del inglés bovine growth factor
BiP	: del inglés binding immunoglobulin protein
CHOP	: del inglés CCAAT/-enhancer-binding protein homologous protein
CO₂	: dióxido de carbono
CREB	: del inglés cAMP response element binding protein
DCP	: desórdenes de conformación proteica

DV	: coordenada estereotóxica en el eje dorsoventral
EA	: enfermedad de Alzheimer
EET	: enfermedades espongiformes transmisibles
EGFP	: del inglés enhanced green fluorescent protein
EH	: enfermedad de Huntington
eIF2α	: del inglés eukaryotic initiation factor 2 α
ELA	: esclerosis lateral amiotrófica
EP	: enfermedad de Parkinson
ERAD	: degradación asociada al retículo endoplasmático, del inglés endoplasmic reticulum-associated degradation
ERp72	: del inglés endoplasmic reticulum resident protein 72
GCN2	: del inglés general control non-derepressible-2
GRP78	: del inglés 78 kDA glucose-regulated protein
IHQ	: inmunohistoquímica
IL-2	: interleuquina 2
iPSC	: células madres pluripotenciales inducidas
IRE1α	: del inglés inositol requiring kinase 1 alpha
ISRIB	: del inglés integrated stress response inhibitor
ITR	: del inglés inverted terminal repeat
JNK	: del inglés c-jun-N-terminal kinase
ML	: coordenada estereotóxica en el eje mediolateral
MWM	: Morris Water Maze
OCT	: del inglés optimal cutting temperature
ONF	: ovillo neurofibrilar
PBS	: del inglés phosphate buffer saline
PCR	: reacción de polimerasa en cadena, del inglés polymerase chain reaction

PERK	: del inglés double-stranded RNA-activated protein kinase (PRK) like endoplasmic reticulum kinase
PFA	: paraformaldehído
PSEN1	: presenilina 1
PSEENEN	: del inglés presenilin enhancer gamma-secretase subunit
RyR	: receptores de rianodina
S1/2P	: del inglés site-1/2 protease
SD	: Síndrome de Down
SNC	: sistema nervioso central
SNpc	: sustancia negra pars compacta
SOD1	: del inglés superoxide dismutase-1
Tg^{XBP1s}	: ratón transgénico para XBP1s en el SNC
ThS	: tioflavina S
TRAF2	: del inglés tumor necrosis factor receptor-associated factor 2
uORF	: del inglés upstream open reading frames
UPR	: respuesta a proteínas mal plegadas, del inglés Unfolded protein response
VG	: genomas virales, del inglés viral genome
WB	: western blot
WT	: animal silvestre, del inglés wild-type
XBP1	: del inglés X-Box Binding Protein 1
XBP1^{Nes-/-}	: ratón deficiente para XBP1 en el SNC
XBP1s	: forma procesada de la proteína XBP1, del inglés X-Box Binding Protein 1 spliced
XBP1u	: forma no procesada de la proteína XBP1, del inglés X-Box Binding Protein 1 unspliced

4. RESUMEN

La pérdida de homeostasis proteica (proteostasis) es una de las características principales de la enfermedad de Alzheimer (EA), asociada con la generación de estrés del retículo endoplásmico (RE) y la agregación anormal de proteínas. El estrés de RE activa una vía de señalización conocida como la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR), la cual disminuye el estrés de RE mediante programas adaptativos, que restauran la proteostasis, o pro-apoptóticos, que eliminan las células dañadas permanentemente. IRE1 α es un sensor de estrés de RE que media estos programas bajo condiciones de estrés de RE activando a XBP1, un factor de transcripción descrito como relevante en la patología de la EA. Para definir su importancia en la EA, investigamos el impacto de la expresión de XBP1s en un modelo murino transgénico de la EA conocido como 5xFAD, evaluando las principales características de la enfermedad: el deterioro cognitivo y la agregación proteica de depósitos de péptido β -amiloide (β A). Observamos que la sobreexpresión de XBP1 en el cerebro reduce el deterioro cognitivo y la agregación proteica de β A. Por otro lado, al entregar localmente XBP1s en el cerebro a través de virus adeno-asociados (AAVs), observamos también una mejora cognitiva pero no una reducción en la carga de β A, sugiriendo que la expresión ectópica de este factor tiene efectos neuroprotectores a través de mecanismos independientes de la UPR. Nuestros resultados sugieren un rol importante de XBP1s en la patogénesis de la EA, ofreciendo un posible nuevo blanco terapéutico para la intervención de la enfermedad.

5. ABSTRACT

Role of the transcription factor XBP1s factor in Alzheimer's Disease

The loss of protein homeostasis (proteostasis) is a salient feature of Alzheimer's disease (AD), associated with the generation of endoplasmic reticulum (ER) stress and the abnormal protein aggregation. ER stress activates a signaling pathway known as the unfolded protein response (UPR), which alleviates ER stress through adaptive programs, that restore proteostasis, or pro-apoptotic programs, which eliminate terminally damaged cells. IRE1 α is an ER stress sensor mediating both programs under ER stress conditions activating XBP1, a transcription factor described as relevant in the AD's pathology. To define its importance in AD, we investigated the impact of XBP1 expression in a transgenic mouse model of AD known as 5xFAD, evaluating the salient features of the disease: the cognitive impairment and the protein aggregation of amyloid- β ($A\beta$) peptide deposits. We observed that the overexpression of XBP1s in the brain reduces the cognitive impairment and the $A\beta$ protein aggregation. The local delivery of XBP1s in the brain through adeno-associated viruses (AAVs) also shows a cognitive improvement, but not a reduction in $A\beta$ protein load, suggesting that the ectopic expression of this factor has neuroprotective effects through UPR independent mechanisms. Our results suggest an important role of XBP1 in the pathogenesis of AD, offering a possible novel therapeutic target for disease intervention.

6. INTRODUCCIÓN

6.1 La enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo, progresivo e irreversible relacionado con la edad; constituyendo la forma más común de demencia en el mundo (Lobo, Launer et al. 2000). Actualmente, la EA afecta alrededor de un 10% de la población mayor de 65 años, y su frecuencia aumenta a un 30% en personas de 85 años o más (Ritchie and Lovestone 2002, Ballard, Gauthier et al. 2011) Debido a que la población de edad avanzada está aumentando en la actualidad y que el riesgo a desarrollar la EA escala exponencialmente con los años, se predice que su prevalencia mundial será el doble para el año 2040 (Ballard, Gauthier et al. 2011).

Las manifestaciones clínicas de la EA son causadas por la pérdida neuronal y disfunción sináptica. A nivel histológico, la EA presenta dos características neuropatológicas principales: (i) los depósitos extracelulares, conocidos como placas amiloides o *seniles*, compuestos por agregados extracelulares de péptido β -amiloide (β A) mal plegados, y (ii) los ovillos neurofibrilares (ONFs), compuestos por agregados intracelulares de la proteína tau hiperfosforilada (Lee, Goedert et al. 2001). Las placas seniles son depósitos de oligómeros y agregados del péptido β A, el cual es el producto proteolítico de una proteína transmembrana conocida como la proteína precursora amiloidea (PPA). Estas placas contienen

un núcleo central denso rodeado por neuritas distróficas e inflamación severa. Por otro lado, los ONFs son inclusiones filamentosas anormales, compuestas por proteína tau mal plegada. Tau, una proteína asociada a microtúbulos y presente en axones, forma filamentos helicoidales como consecuencia de su hiperfosforilación, lo que lleva a un transporte axonal defectuoso y finalmente a la muerte celular (Brandt, Hundelt et al. 2005, Vossel, Zhang et al. 2010). Otras lesiones asociadas a la EA incluyen la pérdida neuronal, anormalidades sinápticas, estrés oxidativo y activación de respuestas neuroinmunes (McGeer and McGeer 2007, Krstic and Knuesel 2013). Se ha observado que la acumulación en el cerebro de oligómeros y agregados amiloideos mal plegados están involucrados en la patogénesis de la EA (Turner, O'Connor et al. 2003). Los estudios recientes señalan que los oligómeros de β A son la especie más neurotóxica en las vías de agregación y mal plegamiento, y son conocidos por inducir pérdida y disfunción neuronal además de disfunción de la plasticidad sináptica y de la memoria en modelos animales de la EA (Cleary, Walsh et al. 2005, Shankar, Li et al. 2008, Mucke and Selkoe 2012). De hecho, bajas concentraciones de oligómeros, tanto sintéticos como naturales, inducen apoptosis en cultivos neuronales y perjudican la plasticidad sináptica y la memoria en modelos animales (Bucciantini, Calloni et al. 2004, Shankar, Li et al. 2008, Ferreira, Lourenco et al. 2015). Muchos genes han sido identificados como causantes de la EA, incluyendo genes que codifican para las proteínas PPA, presenilina-1 (PSEN1) y PSEN2 entre otros, lo que contribuye a la producción y

la deposición anormal del péptido β A en el cerebro (Goate, Chartier-Harlin et al. 1991, Schellenberg, Bird et al. 1992, Levy-Lahad, Wasco et al. 1995). Aun así, y pese a toda la evidencia propuesta, los mecanismos moleculares involucrados en la disfunción y muerte neuronal durante la progresión de la EA no se encuentran totalmente descritos.

La mayor parte de los pacientes con la EA son casos esporádicos donde no existe una relación genética o de herencia en particular, mientras que aproximadamente un 5% de los casos son familiares (conocido como enfermedad de Alzheimer familiar, FAD por el inglés *Familial Alzheimer's Disease*). Los casos de la EA esporádica representan entre un 95 y 99% de todos los casos y los eventos específicos que los desencadenan aún son desconocidos (Ballard, Gauthier et al. 2011, Stefanova, Muraleva et al. 2015). Pese a esto, se ha descubierto un gran número de factores de riesgo que incrementan la probabilidad de desarrollar la neuropatología de EA, incluyendo el envejecimiento, el cual es el mayor factor de riesgo para desarrollar la EA; las enfermedades cardiovasculares, las que también representan un factor de riesgo para otros tipos de demencia tales como la demencia vascular, la cual es la segunda causa de demencia después de la EA (Regan, Katona et al. 2006); el género, donde las mujeres presentan un mayor riesgo que los hombres de desarrollar la EA (Reiman and Caselli 1999), y otras enfermedades relacionadas a la EA como la diabetes mellitus tipo II, ya que se ha propuesto que la insulina

regula la plasticidad sináptica, el aprendizaje, la memoria y que también controla el metabolismo de Tau y β A (Biessels, Kappelle et al. 2005, Haan 2006). Otra condición asociada a la aparición de la EA es el síndrome de Down (SD), el cual involucra un envejecimiento prematuro y que se caracteriza por la trisomía en el cromosoma 21, en el cual se encuentra el gen PPA, lo que aumenta las probabilidades de acumulación de péptido β A (Ryoo, Cho et al. 2008).

6.2 Mecanismos de procesamiento y degradación de la proteína precursora de amiloide (PPA).

La proteína precursora de amiloide (PPA) es sintetizada en el retículo endoplasmático (RE) y es N- y O-glicosilada antes de llegar a la membrana plasmática a través del aparato de Golgi y la vía secretora (Reinhard, Hébert et al. 2005). La PPA es una proteína que se localiza en la gran mayoría de las membranas intracelulares y en la membrana plasmática, donde participa en los procesos de movimiento y adhesión celular (LaFerla, Green et al. 2007). El procesamiento de la PPA es altamente complejo y regulado, existiendo dos posibles vías por las que ocurra: la vía *no amiloidogénica* y la vía *amiloidogénica* (Figura 1). En la vía *no-amiloidogénica* la PPA es proteolizada por la α -secretasa en una posición que se encuentra a 83 residuos del extremo C-terminal, produciendo un largo ectodominio N-terminal (sPPA α), el cual es posteriormente secretado al medio extracelular (Kojro and Fahrenholz 2005). Es

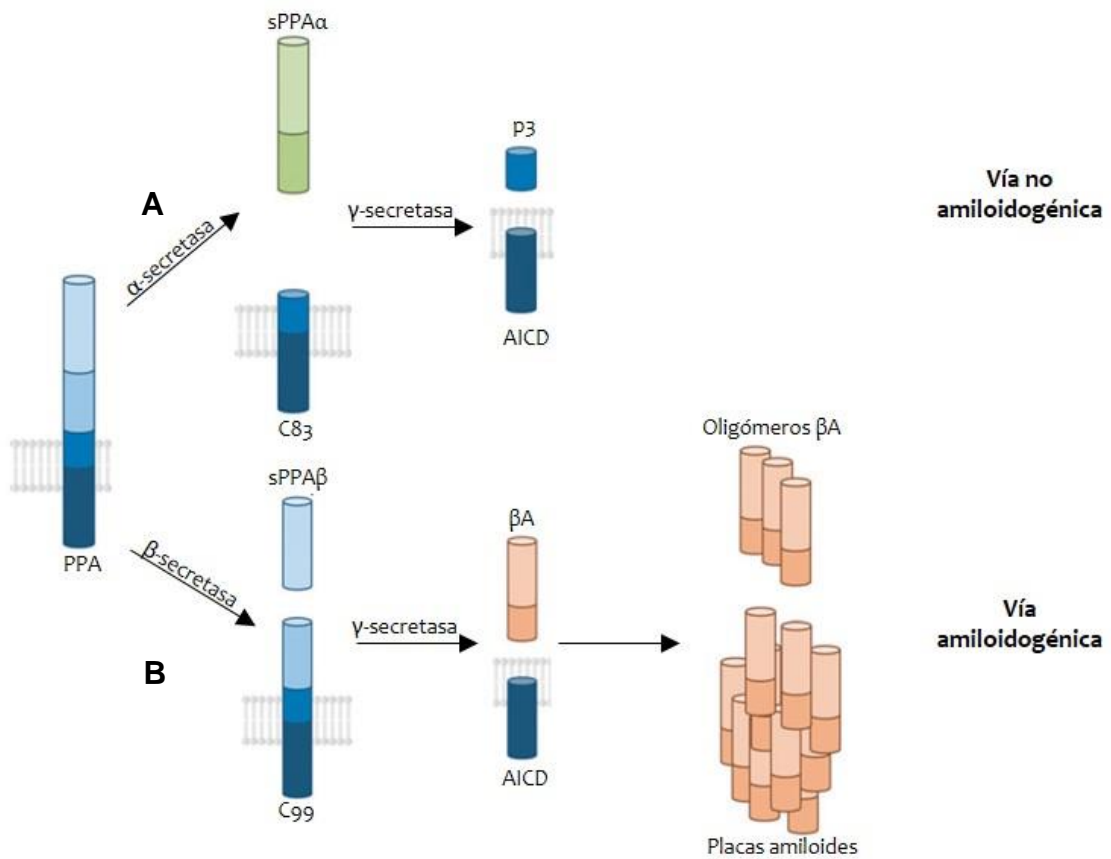


Figura 1. Procesamiento de Proteína precursora amiloidea (PPA). La PPA es una proteína de endomembrana que puede ser procesada proteolíticamente por dos vías. **(A)** La vía no amiloidogénica involucra la proteólisis por la α -secretasa, generando sPPA α y el fragmento C-terminal C83. Este último es procesado luego por la γ -secretasa liberando el péptido p3 y a AICD. **(B)** En la vía amiloidogénica, la PPA es proteolizada por la β -secretasa, induciendo la liberación de sPPA β y el fragmento C-terminal C99. Este péptido es luego procesado por la γ -secretasa, generando AICD y al β -amiloide (β A), principal péptido presente en la enfermedad de Alzheimer. (Modificado de Alves, Fol & Cartier, 2016).

importante destacar que la proteólisis mediada por la α -secretasa ocurre dentro de la región que contiene al péptido β A, impidiendo su formación. Por otro lado, el dominio C-terminal, denominado C83, es retenido en la membrana y sometido a una segunda proteólisis mediada por la γ -secretasa, la cual es una proteasa compuesta por al menos cuatro subunidades: PSEN1, nicastrina (NCSTN), APH1 (del inglés, *anterior pharynx defective 1*) y el potenciador de presenilina-2 (PSENEN) (Kimberly, LaVoie et al. 2003). Esta proteólisis produce un fragmento corto de 3 kDa denominado p3 y otro fragmento de proteína llamado dominio intracelular de PPA (AICD) (Haass, Hung et al. 1993).

Por otro lado, la *vía amiloidogénica* es una vía alternativa de proteólisis de la PPA que promueve la generación del péptido β A. En esta vía, el corte inicial es mediado por la β -secretasa, la cual es una proteasa de transmembrana conocida también como BACE1 (del inglés, *β -site APP cleaving enzyme-1*). Su actividad es óptima a un pH bajo, y los mayores niveles de expresión de ésta son encontrados en las neuronas del cerebro. (Vassar, Kovacs et al. 2009). Este corte es realizado en una posición localizada a 99 residuos de distancia del extremo C-terminal de la PPA, y resulta en la liberación de sPPA β al espacio extracelular, dejando al fragmento C99 en la membrana. Una proteólisis subsecuente de este fragmento (entre los residuos 38 y 43) por la γ -secretasa libera al péptido β A y a AICD (Figura 1) (Selkoe 2001). El corte de la β -secretasa no es preciso, por lo que genera fragmentos de β A que van desde los 38 a los 43 aminoácidos

(LaFerla, Green et al. 2007). La mayor parte de los péptidos β A generados tiene 40 residuos de largo (β A₄₀), mientras que una pequeña proporción (alrededor del 10%) corresponde a la variante de 42 residuos (β A₄₂) (Jarrett, Berger et al. 1993), y la principal diferencia entre ambas es que la última posee dos residuos C-terminales adicionales. Si bien se ha encontrado que la concentración de β A₄₀ es mucho mayor que la de β A₄₂ en fluido cerebroespinal, es esta última variante el mayor componente de las placas seniles en los cerebros con la EA (Iwatsubo, Odaka et al. 1994). Esto parece deberse a que la variante β A₄₂ es más hidrofóbica y propensa a generar fibrillas, además de ser la isoforma predominante encontrada en placas cerebrales (Jarrett, Berger et al. 1993, Younkin 1998). El péptido β A no es solo producido en la membrana plasmática, sino que también en el sistema de endomembranas con una subsecuente liberación al espacio extracelular (Busciglio, Gabuzda et al. 1993).

El procesamiento de la PPA es más eficiente en endosomas tardíos, lisosomas, y compartimientos post-Golgi en general, debido al bajo pH intraluminal de estos organelos, lo cual provee el ambiente óptimo para la actividad de la β - y γ -secretasas, enzimas clave en el procesamiento y maduración de la PPA (Takasugi, Tomita et al. 2003).

6.3 Estrés de retículo endoplásmico (RE) y la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR)

El retículo endoplásmico (RE) es el organelo celular responsable de un gran número de funciones, entre las cuales se encuentran la síntesis de lípidos y esteroides, metabolismo de carbohidratos, almacenamiento de calcio intracelular, además de la síntesis y el transporte de proteínas (Schwarz and Blower 2016). Dentro de esta última función, el RE media la síntesis, modificación y la entrega de proteínas a sus correspondientes localizaciones, tanto dentro de la vía secretora como al espacio extracelular. En el RE, las proteínas se pliegan a su conformación nativa y sufren modificaciones post-traduccionales, incluyendo glicosilaciones (Kornfeld and Kornfeld 1985) y la formación de enlaces disulfidos intra- e intermoleculares (Fewell, Travers et al. 2001). Un gran número de condiciones de estrés celular puede provocar alteraciones en la homeostasis del RE, interfiriendo así con el funcionamiento normal de este organelo y llevando a una condición celular conocida como “estrés de RE”, condición que puede conllevar a que proteínas mal plegadas se acumulen en el lumen del RE, producto de una pérdida de la homeostasis proteica (Walter and Ron 2011, Hetz and Mollereau 2014, Hetz, Chevet et al. 2015). De esta manera, el mal manejo del estrés de RE constituye una amenaza para la vida de la célula, ya que, si las proteínas no están correctamente plegadas, su función se ve comprometida. Para aliviar el estrés, las células gatillan una red de eventos de señalización intracelular conocidos en conjunto como la respuesta a las proteínas mal

plegadas o UPR (por sus siglas en inglés, *Unfolded Protein Response*). La UPR tiene como objetivo el restablecimiento de la homeostasis del RE, a través de la disminución de la carga de proteínas mal plegadas en su interior (Walter and Ron 2011). La UPR modula casi cada aspecto en la vía secretora promoviendo la adaptación de las células al estrés de RE, incluyendo plegamiento, control de calidad, entrada de las proteínas al RE y su degradación, entre otros. Si el estrés de RE es irreversible o crónico, la UPR gatilla muerte celular por apoptosis (Urrea, Dufey et al. 2013).

La UPR en células de mamíferos es mediada al menos por tres vías de señalización. En cada una de éstas una proteína de transmembrana, IRE1 α (del inglés *inositol requiring enzyme 1 α*), PERK (del inglés *protein kinase RNA [PKR]-like endoplasmic reticulum kinase*) o ATF6 (del inglés *activating transcription factor 6*) sensan condiciones anormales en el lumen del RE y transmite la información a través de la membrana hacia el citosol, donde una serie de factores de transcripción concerta una respuesta pro-apoptótica o pro-adaptativa mediante la regulación de proteínas específicas (Walter and Ron 2011). En condiciones fisiológicas, el extremo N-terminal de los sensores de la UPR se encuentra unido a una chaperona conocida como GRP78/BiP (del inglés *78 kDa glucose-regulated protein/Binding immunoglobulin protein*), inhibiendo así su activación. Sin embargo, cuando las proteínas mal plegadas se acumulan en el interior del RE, GRP78/BiP es liberada, lo que permite la activación de las vías

de señalización de estas proteínas transmembrana, dando así inicio a la señalización de la UPR (Viana, Nunes et al. 2012).

La vía de IRE1 α es la más conservada de la UPR. En la actualidad se propone que la liberación de GRP78/BiP del dominio N-terminal de IRE1 α induce su dimerización, lo que activa su dominio quinasa, induciendo su autotransfosforilación, y su actividad ribonucleasa. El dímero de IRE1 se une a TRAF2 (del inglés *tumor necrosis factor receptor-associated factor 2*), activando ASK1 (del inglés *apoptosis signal-regulating kinase*) y quinasas río abajo que activan a JNK (del inglés *c-Jun N-terminal kinase*) (Viana, Nunes et al. 2012). Además, a través de su actividad de ribonucleasa, IRE1 α cataliza el procesamiento no convencional del ARN mensajero (ARNm) que codifica para el factor de transcripción XBP1 (del inglés *X box-binding protein 1*). XBP1 es sintetizado como una proteína de 267 aminoácidos en su forma no procesada, o XBP1_u (del inglés *unspliced*). Una vez activado, IRE1 α promueve el procesamiento no convencional del ARNm de *xbp1*, escindiendo un intrón de 26 nucleótidos y generando la forma “procesada”, conocida como XBP1_s (del inglés *spliced*) (Yoshida, Matsui et al. 2001, Lee, Tirasophon et al. 2002), un potente factor de transcripción que activa un conjunto de genes blancos de la UPR relacionados con el restablecimiento del plegamiento de las proteínas o su degradación (Lee, Iwakoshi et al. 2003, Acosta-Alvear, Zhou et al. 2007).

La liberación de GRP78/BiP también resulta en la activación de PERK, el cual dimeriza y se autotransfosforila, provocando la fosforilación de eIF2 α (del inglés *eukaryotic initiator factor 2 α*), lo cual tiene como consecuencia la inhibición global de la síntesis de proteínas, reduciendo la sobrecarga proteica dentro del RE (Harding, Novoa et al. 2000). Sin embargo, bajo estas condiciones, se favorece la expresión del factor de transcripción ATF4 a través de la traducción alternativa de uORFs (del inglés *upstream open reading frames*) de su ARNm. ATF4 activa la transcripción de genes involucrados en la biosíntesis de aminoácidos, respuestas antioxidativas al estrés y autofagia (Viana, Nunes et al. 2012). Por otro lado, ATF4 induce la expresión de la proteína CHOP (del inglés *CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein*), la cual promueve la apoptosis a través de la regulación de varias proteínas de la familia BCL-2 (del inglés *B-cell lymphoma 2*) (Zinszner, Kuroda et al. 1998, McCullough, Martindale et al. 2001, Shore, Papa et al. 2011, Han, Back et al. 2013, Li, Guo et al. 2014). Además, ATF4 reprime la transcripción de CREB (del inglés *cAMP response element-binding protein*), factor de transcripción que regula genes involucrados en la consolidación de la memoria (Chen, Muzzio et al. 2003). Estos resultados sugieren una relación entre el estrés de RE y la activación de la UPR, los cuales participan en la regulación de procesos cognitivos.

Finalmente, en condiciones de estrés de RE, ATF6 es translocado al aparato de Golgi dónde es procesado por S1P y S2P (del inglés *site-1 protease, site-2*

protease) (Ron and Walter 2007). Este proceso produce la liberación de un fragmento citosólico activo conocido como ATF6f, el cual transloca al núcleo donde, en conjunto con XBP1s, induce la activación de una serie de genes blanco de la UPR involucrados en el control de calidad proteico y la degradación de proteínas mediada por el proteosoma asociado al RE, un mecanismo conocido como ERAD (del inglés *Endoplasmic Reticulum-associated degradation*) (Walter and Ron 2011). Un esquema de estas tres vías se puede observar en la Figura 2.

6.4 El rol de la UPR en la enfermedad de Alzheimer

La EA es una condición multifactorial y heterogénea en la cual la etiología subyacente aún es poco conocida. Muchos factores se han propuesto como iniciadores de la cascada degenerativa, siendo el envejecimiento el mayor factor de riesgo. Una de las causas destacadas de la EA es la falla en la capacidad adaptativa de la red de homeostasis proteica, conocida como “proteostasis” y que es el equilibrio presente entre la síntesis, plegamiento, conformación y degradación de las proteínas. Este equilibrio se pierde a medida que se envejece, influyendo así en el desarrollo de la enfermedad (Douglas and Dillin 2010, Mardones, Martinez et al. 2014).

Existe una gran cantidad de evidencia que sugiere que la UPR está involucrada en la progresión de la EA (Figura 3). Marcadores específicos para la

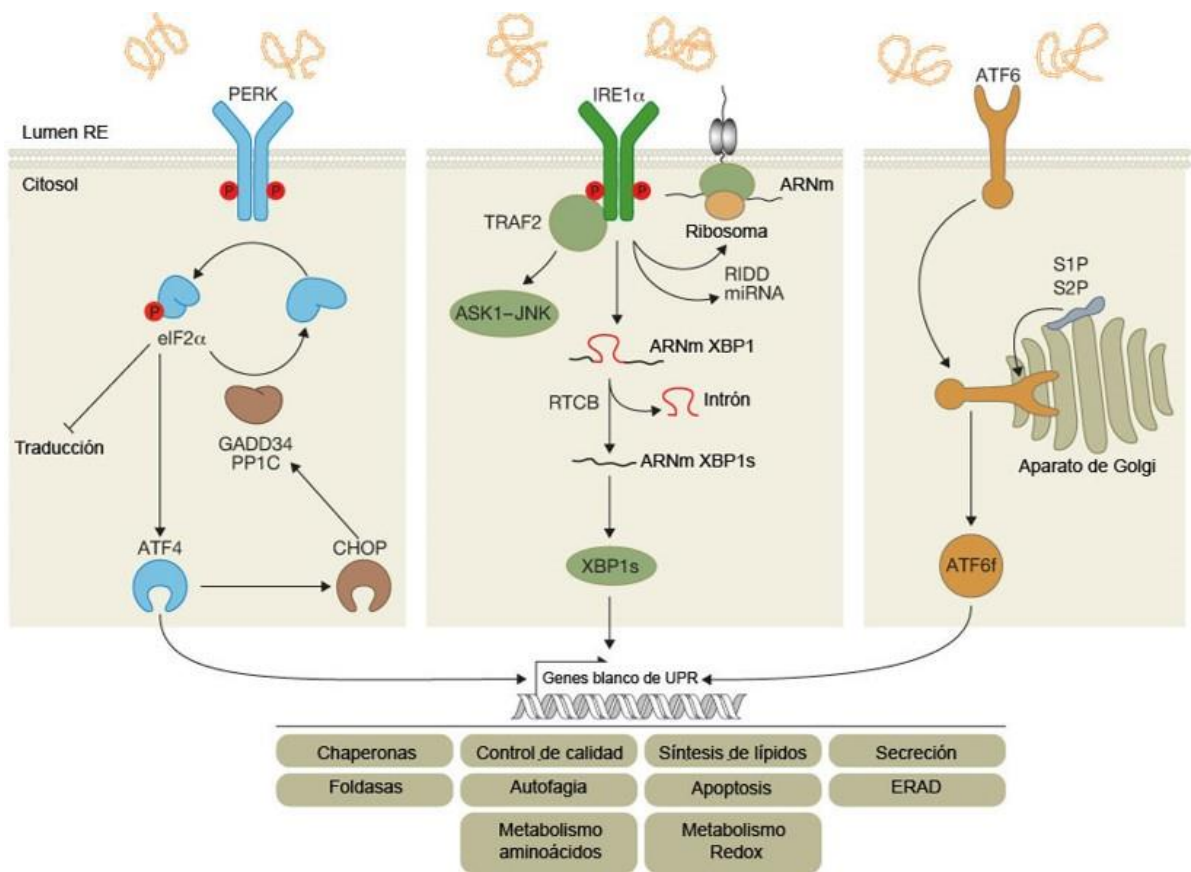


Figura 2. La respuesta a proteínas mal plegadas (UPR). Los tres sensores de estrés de retículo endoplasmático (RE) PERK, IRE1 α y ATF6 están presente en la membrana e inicialmente activan eventos de señalización para reducir el estrés de RE. IRE1 α señala a través de (i) el reclutamiento de TRAF2, llevando a la activación de la cascada JNK-ASK1 (ii) a través del procesamiento del ARNm de *xbp1*, liberando así un intrón de 26 nucleótidos, lo que se traduce en la expresión de la proteína XBP1s, la cual actúa sobre genes relacionados con UPR. PERK fosforila al factor de iniciación eIF2 α , el cual detiene el proceso de traducción proteica, disminuyendo así la carga. A su vez, aumenta la expresión del factor de transcripción ATF4, el cual induce la transcripción de genes involucrados con el metabolismo de aminoácidos, respuestas antioxidantes, autofagia y apoptosis, entre otros. Finalmente, ATF6 es exportado desde el RE al Aparato de Golgi donde es proteolizado, liberando su dominio citoplasmático, el cual es un potente factor de transcripción (Modificado de Hetz, Chevet & Oakes, 2015).

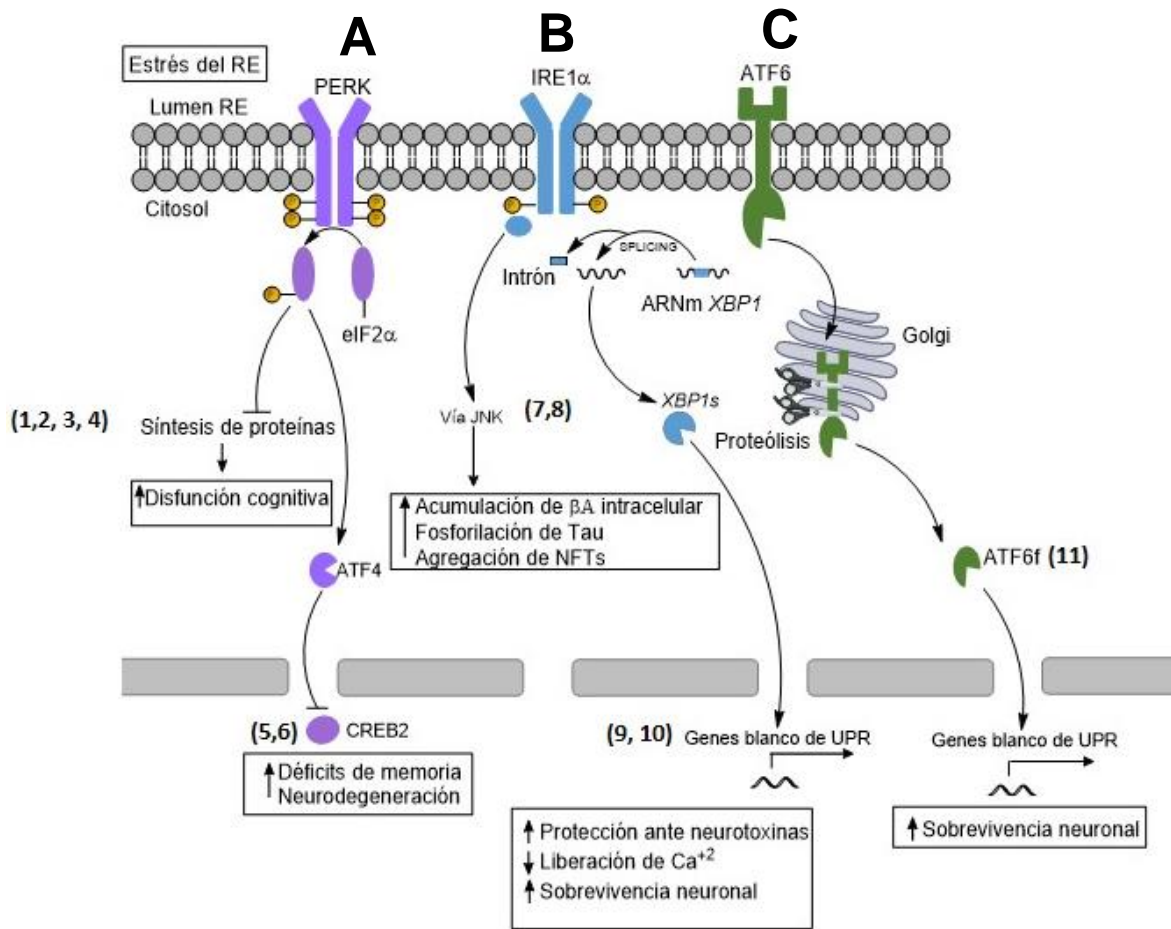


Figura 3. Participación de la UPR en la enfermedad de Alzheimer. (A) PERK fosforila a eIF2 α deteniendo la síntesis de proteínas, y además aumenta la expresión del factor de transcripción ATF4, el cual reprime a CREB2, relacionado con la consolidación de la memoria. (B) IRE1 α señala a través del procesamiento del ARNm de XBP1, el cual actúa sobre genes relacionados con UPR promoviendo la supervivencia celular. (C) Finalmente, ATF6 es exportado desde el RE al Aparato de Golgi donde es proteolizado, liberando su dominio citosólico, ATF6f, el cual actúa sobre genes pro-adaptativos. 1 (Costa-Mattioli, Gobert et al. 2005); 2 (Duran-Aniotz, Martinez et al. 2014); 3 (Ma, Trinh et al. 2013); 4 (Maartens, Celum et al.); 5 (Chen, Muzzio et al. 2003); 6 (Viana, Nunes et al. 2012); 7 (Shoji, Iwakami et al. 2000); 8 (Vogel, Anand et al. 2009); 9 (Zalk, Lehnart et al. 2007); 10 (Casas-Tinto et al., 2011a); 11 (Yoshida, Matsui et al. 2001).

activación de la UPR están aumentados en tejidos cerebrales de pacientes con la EA en comparación con tejidos cerebrales de controles, así como en modelos celulares y animales de la enfermedad (Yu, Suen et al. 2006, O'Connor, Sadleir et al. 2008, Lee, Won et al. 2010, Casas-Tinto, Zhang et al. 2011, Scheper and Hoozemans 2015).

En estudios en tejido *post-mortem* de cerebros de pacientes con la EA se observó que las áreas hipocampales exhiben un aumento significativo en los niveles de XBP1s (Lee, Won et al. 2010). Sin embargo, otro estudio indicó que los niveles de ARNm de XBP1s se encuentran reducidos en comparación a controles emparejados por edad, sugiriendo una disminución de este factor en los cerebros de pacientes afectados por la EA (Reinhardt, Schuck et al. 2014). Además de esto, se observó que en las neuronas corticales de estos tejidos se exhibía una correlación positiva entre la presencia de tau hiperfosforilado y algunos marcadores de estrés de RE (Hoozemans, van Haastert et al. 2009, Hoozemans and Scheper 2012).

Diferentes reportes han sugerido que el estrés de RE es un mecanismo de muerte celular activado por péptido β A y proteína Tau, lo que estaría asociado a la alteración de la homeostasis de calcio en el RE (Viana, Nunes et al. 2012) y disfunción de ERAD (Duarte, Paneque et al. 2015). Por ejemplo, cultivos neuronales de células madres pluripotenciales inducidas (iPSC) derivadas de pacientes con la EA revelaron que el estrés de RE es una característica

predominante en estos modelos (Kondo, Asai et al. 2013). Finalmente, los efectos de la inhibición global de la síntesis proteica inducida por la activación de la vía PERK/eIF2 α durante estrés de RE han sido funcionalmente relacionados con la disfunción cognitiva observada en diferentes modelos de la EA a través de la inhibición de la síntesis de proteínas sinápticas (Ma, Trinh et al. 2013). En estos trabajos se demostró que la disminución de la expresión de dos de las quinasas de eIF2 α , PERK y GCN2 (del inglés *general control non-derepressible-2*), induce una mejora en la función cognitiva y en la plasticidad sináptica de un modelo murino transgénico de la EA (Maartens, Celum et al. , Costa-Mattioli, Sossin et al. 2009, Ma, Trinh et al. 2013, Duran-Aniotz, Martinez et al. 2014).

La activación de la vía de señalización de JNK ha sido identificada como un evento clave en la apoptosis asociada a la EA. La vía de IRE1 α /TRAF2 activa quinasas de estrés como ASK1 y JNK (Colombo, Bastone et al. 2009). La vía de JNK puede inducir acumulación de β A intracelular (Shoji, Iwakami et al. 2000), fosforilar a la proteína tau y gatillar la agregación de ONFs (Vogel, Anand et al. 2009). La inhibición de JNK, y por ende de la fosforilación de la PPA, induce la degradación proteosomal de PPA, además de producir un cambio en su procesamiento y favoreciendo así la vía de procesamiento no amiloidogénica sobre la amiloidogénica. Estos eventos reducen los niveles de la PPA y el péptido β A, y por tanto, la formación de agregados (Colombo, Repici et al. 2007, Colombo, Bastone et al. 2009).

Un análisis del perfil de expresión genético global para identificar blancos regulados por XBP1s reveló que este factor transcripcional regula directamente la expresión de un grupo de genes relacionados a EA, ya que se une a los promotores de dos componentes del complejo de la γ -secretasa (*Ncstn* y *Psen1*), de reguladores adicionales del transporte y procesamiento de la PPA (*Ubqln1*, *Apba3* y *Apbb3*) y al promotor de una proteína asociada a la UPR y a ERAD, entre otros (Acosta-Alvear, Zhou et al. 2007). Por otra parte, recientemente se describió un polimorfismo en el promotor XBP1 como un factor de riesgo para desarrollar la EA en una población de pacientes chinos (Liu, Wang et al. 2013); polimorfismo previamente asociado con trastorno bipolar y esquizofrenia (Kakiuchi, Iwamoto et al. 2003, Du, Duan et al. 2008, Kim, Kim et al. 2009).

En estudios en modelos *in vivo* de la EA se ha encontrado una relación entre el estrés de RE y la patología. En *Drosophila melanogaster* se demostró que la expresión ectópica de XBP1s protege contra la neurotoxicidad del péptido β A a través de la regulación directa de la homeostasis de calcio del RE y de la regulación negativa de la expresión de receptores de rianodina (RyRs), los cuales median la liberación de calcio desde el RE (Zalk, Lehnart et al. 2007, Casas-Tinto, Zhang et al. 2011). En una publicación reciente se investigó el rol de IRE1 α en la patogénesis de la EA utilizando un modelo murino de la EA en el cual se realizó una delección condicional del dominio ARNasa de IRE1 en el sistema nervioso, reduciendo así su expresión. Contrario a lo esperado, la deficiencia de IRE1

restauró significativamente la capacidad de memoria y aprendizaje de los ratones con la EA, además de reducir los niveles de PPA en las áreas corticales e hipocampales en el cerebro (Duran-Aniotz, Cornejo et al. 2017). Por otro lado, en un modelo murino de la EA se demostró que la administración local de XBP1s en el cerebro de estos ratones reduce el deterioro en los procesos cognitivos asociado a esta patología de manera independiente a la vía de la UPR, activando a nivel transcripcional a Kalirina-7, una proteína importante la formación de la sinapsis y en los procesos de plasticidad sináptica (Mandela and Ma 2012, Cissé, Duplan et al. 2016).. Estos resultados en conjunto sugieren una relación directa entre la vía IRE1 α de la UPR y la patogénesis de la EA.

6.5 XBP1 y las enfermedades neurodegenerativas

La EA es parte de un grupo de enfermedades clasificadas como desórdenes de conformación proteica (DCP). Los DCP se caracterizan por la formación y acumulación anormal de agregados proteicos (Hetz and Mollereau 2014) que poseen una estructura de hoja β -plegada, estabilizada por interacciones intermoleculares que llevan a la conformación de oligómeros, protofibrillas y fibrillas que se acumulan como depósitos amiloides en los tejidos afectados (Soto and Estrada 2008). Enfermedades que pertenecen a este grupo incluyen la enfermedad de Parkinson (EP), la enfermedad de Huntington (EH), la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y las encefalopatías espongiiformes transmisibles (EET) o enfermedades producidas por priones, entre otras (Moreno-Gonzalez and Soto 2011).

En el caso de la EP se encontró que en muestras *post mortem* de tejido cerebral de pacientes existía una sobreexpresión de PERK y de eIF2 α , indicando una activación de la UPR (Stutzbach, Xie et al. 2013). Se observó que la deficiencia de XBP1 gatilla estrés del RE en la zona de la sustancia negra *pars compact* (SNpc) de cerebros de un modelo murino que presenta una delección condicional del gen *xbp1*, modelo conocido como XBP1^{Nes^{-/-}}. En estos modelos se observó una regulación positiva de las chaperonas calreticulina y la disulfuroisomerasa ERp72, las cuales participan en la respuesta de la UPR. Además, al silenciar el ARNm de XBP1 endógeno en la SNpc se produjo una dramática disminución y atrofia de las neuronas dopaminérgicas, dendritas y axones (Valdes, Mercado et al. 2014).

En el caso de la ELA, la deficiencia del factor de transcripción XBP1 reduce la severidad de la patogénesis, como se ha visto en un modelo experimental en el cual se sobreexpresa la proteína mutante SOD1, la cual forma agregados proteicos que resultan en disfunción motoneuronal (Pasinelli and Brown 2006). Aquellos modelos mutantes SOD1 a los cuales se les hizo una delección de XBP1 en el sistema nervioso desarrollaron la enfermedad de forma más tardía debido a efectos compensatorios que restauran la proteostasis a través de un aumento en la autofagia, reduciendo así la carga de agregados proteicos de SOD1 mutante (Hetz, Thielen et al. 2009). Resultados similares se obtuvieron en la EH, donde la deficiencia de XBP1s en un modelo transgénico de la enfermedad tuvo

un efecto protector asociado a un aumento de la macrofagia (Vidal, Figueroa et al. 2012).

Además de participar en enfermedades neurodegenerativas, la vía de la UPR participa en otros procesos neuronales. En un trabajo publicado recientemente se estudió la participación de la UPR en el proceso de daño axonal. Se observó que en animales $XBP1^{Nes-/-}$ el tiempo de recuperación motora luego de una lesión en el nervio periférico fue mayor, y hubo un menor número de axones regenerados en comparación con animales control sin la delección de XBP1. Para evaluar el efecto de una sobreexpresión de XBP1s, se utilizó un modelo murino generado en el laboratorio que sobreexpresa XBP1s bajo el control del promotor de la proteína priónica (Tg^{XBP1s}) (Martínez, Vidal et al. 2016). En estos animales se observó un tiempo menor en la regeneración axonal y recuperación motora comparado con los animales WT utilizados como control (Oñate, Catenaccio et al. 2016).

Con el fin de estudiar la contribución de la vía de la UPR en la fisiología del sistema nervioso central, se realizaron experimentos *in vivo* del efecto de la expresión de XBP1s a nivel cognitivo. En el modelo murino que sobreexpresa XBP1s, Tg^{XBP1s} , se produjo una mejora en el rendimiento basal en tareas de aprendizaje y memoria, mientras que en animales $XBP1^{Nes-/-}$ se observó una reducción en las capacidades cognitivas, las cuales se pudieron revertir mediante

la inyección de un virus adeno-asociado utilizado para la entrega de XBP1s de forma exógena (Martínez, Vidal et al. 2016).

Es importante hacer notar que muchos estudios recientes han identificado moléculas pequeñas y desarrollado estrategias de terapia génica para reducir los niveles de estrés de RE, lo cual ofrece interesantes aplicaciones futuras para el desarrollo de ensayos clínicos en pacientes afectados con la EA y otras patologías (Hetz, Chevet et al. 2013, Maly and Papa 2014). En un reporte se identificó una molécula pequeña llamada ISRIB, la cual reduce eficientemente las consecuencias de la fosforilación de eIF2 α , mejorando así el aprendizaje y la memoria en ratas WT (Sidrauski, Acosta-Alvear et al. 2013). Este potente inhibidor presenta propiedades farmacocinéticas prometedoras ya que cruza la barrera hematoencefálica sin efectos adversos en el animal. Además de esto, existe evidencia de que el fragmento proteolítico de ATF6 puede inducir un aumento en los niveles de ARNm de XBP1, el cual será después procesado por IRE1 α , colaborando así a su efecto neuroprotector (Yoshida, Matsui et al. 2001).

Estos resultados posicionan a XBP1 como un interesante candidato para terapia génica en las DCP ya que una sobreexpresión o una deficiencia de éste puede regular los niveles de estrés de RE y tener un rol neuroprotector promoviendo la regeneración axonal, reduciendo la acumulación de inclusiones proteica y mejorando la función sináptica. Se ha investigado el posible rol de XBP1s como un blanco terapéutico para el tratamiento de algunas patologías,

obteniendo interesantes resultados. En el caso de la EP, la entrega local de XBP1s en el SNpc de un modelo de la enfermedad resultó en una disminución de la denervación del estriado y en un aumento en la viabilidad de neuronas dopaminérgicas (Valdes, Mercado et al. 2014). En la EH, la entrega de la forma activa de XBP1 en el estriado del cerebro de ratones adultos de un modelo de la enfermedad redujo significativamente el número de inclusiones de la proteína huntingtina en comparación a los animales control (Zuleta, Vidal et al. 2012). En cuanto al rol de XBP1s en condiciones de daño axonal, se estudió el efecto de la entrega local de XBP1s de manera selectiva en neuronas de animales adultos. Los animales inyectados con el virus para expresar XBP1s mostraron un aumento de 1,5 veces el número de axones regenerados en comparación a los animales inyectados con el vector control. Estos resultados permiten concluir que la expresión de XBP1s promueve la regeneración axonal luego de una lesión en el nervio periférico (Oñate, Catenaccio et al. 2016).

En conjunto, estos estudios sugieren que XBP1s reestablece un deterioro en el proceso de proteostasis, por lo cual este factor de transcripción puede contribuir a la etiología de la EA. Esta memoria de título tiene por objetivo dilucidar el impacto de XBP1s en la progresión de la EA. Para esto, se evaluará el efecto de sobreexpresión de XBP1s en modelos murinos de la EA y medir su impacto a nivel cognitivo e histopatológico.

HIPÓTESIS

El factor de transcripción de la respuesta a proteínas mal plegadas, XBP1s, reduce la severidad neuropatológica en un modelo murino de la enfermedad de Alzheimer.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la sobreexpresión de XBP1s en la progresión de la Enfermedad de Alzheimer utilizando el modelo de ratón transgénico 5xFAD, el cual recapitula varios aspectos de esta neuropatología a nivel histológico y de comportamiento.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivo Específico 1. Analizar el efecto de sobreexpresar XBP1s sobre la capacidad de memoria y aprendizaje en animales transgénicos 5xFAD.

Objetivo Específico 2. Determinar el efecto de la sobreexpresión de XBP1s en la formación de agregados de péptido β A y proteínas relacionadas a la enfermedad de Alzheimer en hipocampo y corteza de animales transgénicos 5xFAD.

Objetivo Específico 3. Evaluar el posible efecto neuroprotector de la sobreexpresión de XBP1s, en ratones 5xFAD, por medio de la entrega local utilizando virus adeno-asociados (AAV).

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Animales

Los experimentos se realizaron en animales 5xFAD, Tg^{XBP1s}, Tg^{XBP1s}/5xFAD y silvestres con edad entre 6 y 8 meses, pertenecientes a la cepa C57BL/6J. Los animales fueron mantenidos en ciclos de 12:12 horas de luz/oscuridad y con acceso libre a comida y agua. El cuidado animal y la mantención de las colonias, incluyendo la genotipificación y los experimentos fueron realizados de acuerdo a procedimientos aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (protocolo aprobado CBA # 0582 FMUCH).

Generación de modelos de animales experimentales

Para la obtención de los grupos experimentales de animales se utilizó un modelo murino de la EA conocido como 5xFAD (The Jackson Laboratory, Stock No 34840-JAX), cuya generación ha sido descrita previamente (Oakley, Cole et al. 2006). El ratón 5xFAD presenta 5 mutaciones: cuenta con 3 mutaciones para la PPA; *Swedish* (K670N/M671L), *London* (V717I), *Florida* (I716V), y 2 mutaciones para la PSEN1 (M146L y L286V). La expresión de ambos transgenes es regulada por el promotor murino *Thy1* (Figura 4A). Estos animales comienzan a generar agregados de péptido β A a los 2 meses de edad, y a partir de los 4 a 5 meses se evidencia gran pérdida de neuronas, degeneración sináptica,

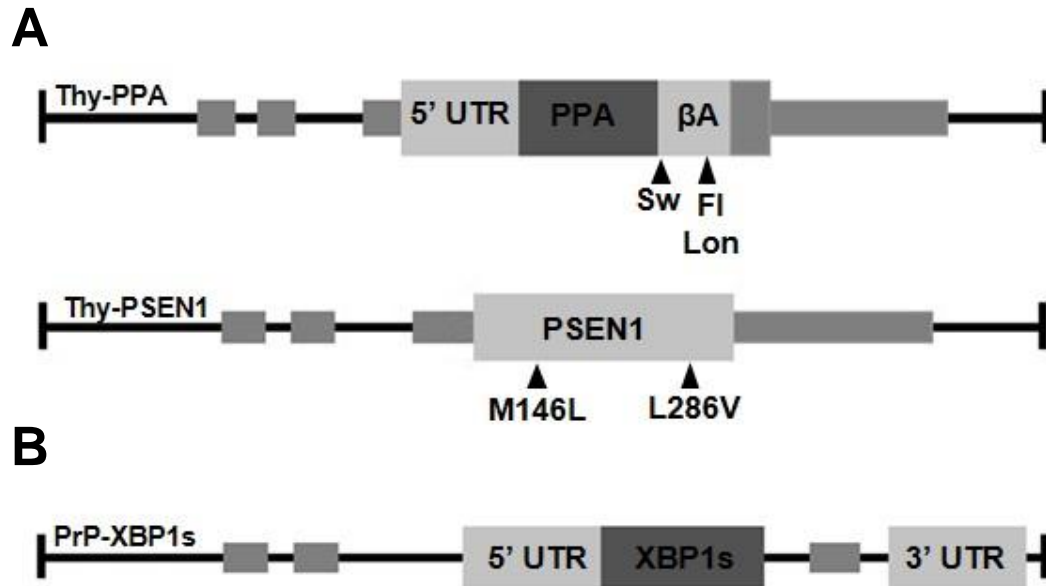


Figura 4. Esquema de los constructos utilizados. (A) Las mutaciones FAD en los transgenes Thy1-PPA (arriba) y Thy1-PSEN1 (abajo) se indican con flechas. Sw, mutación *Swedish*; Lon, mutación *London*; FI, mutación *Florida* (Modificado de Oakley et al 2006). (B) Esquema del vector de expresión de XBP1s. Se utilizó el vector de expresión MoPrP.XhoI que contiene el gen XBP1s murino bajo el control del promotor de la proteína prion (P-PrP). Los rectángulos grises pequeños representan los exones de Thy1 y PrP.

presencia de placas amiloides, inflamación y problemas cognitivos (Oakley, Cole et al. 2006). Por otra parte, se utilizó un modelo murino presente en las instalaciones animales del laboratorio, el cual sobreexpresa la forma activa de XBP1 en el sistema nervioso usando el promotor de la proteína del prion (Figura 4B) (Martinez, Vidal et al. 2016). El modelo 5xFAD empieza a generar agregados amiloides a los 2 meses de edad, y a partir de los 4 a 5 meses se evidencia degeneración sináptica. Es por esto que se utilizaron animales de 6 meses y 8 meses de edad, donde los animales expresaban más avanzadas las características de la EA.

Ambos modelos de animales fueron cruzados, y las crías fueron destetadas a los 21 días para su genotipificación. Para la genotipificación de los animales se utilizaron partidores generados en el laboratorio previamente. En el caso de XBP1s, se generaron los partidores XBP1s-407-S (5'-ACACGCTGGGGAATGGACAC-3'), partidor complementario a la secuencia sentido (S) de XBP1s, y XBP1s-551-AS (5'-CCATGGAGGATGTTCTGGG-3'), complementario a la secuencia anti-sentido (AS) de XBP1s, esperando detectar un producto de 100 pares de bases (pb) en el caso de un animal Tg^{XBP1s} y un producto de 1000 pb en el caso de un animal WT. Además de esto se utilizaron como control de la reacción los partidores de interleuquina 2 (IL-2): IL-2-S (5'-CTAGGCCACAGAATT GAAAGATCT-3') e IL-2-AS (5'-GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC-3'), esperando encontrarse un producto de 324 pb. Para el transgen PSEN se generaron los partidores PSEN1 directo

(en inglés *Forward*, Fw) (5'-AATAGAGAACGGCAGGAGCA-3') y PSEN1 reverso (en inglés *Reverse*, Rv) (5'-GCCATGAGGGGCACTAATCAT-3'), detectándose un producto de ~608 pb. Finalmente, para el transgen PPA se utilizaron los partidores PPA-Fw (5'-AGGACTGACCACTCGACCAG-3') y PPA-Rv (5'-CGGGGGTCTAGTTCTGCAT-3'), detectándose un producto de ~377 pb.

7.2 Extracción de ADN genómico

Para la extracción del ADN genómico (ADNg) utilizado para realizar el PCR, se cortaron aproximadamente 5 mm de la cola del animal y se incubó con 600 µl de tampón de lisis (50 mM Tris pH 8.0, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl y 1% SDS) y 15 µl de 10 mg/mL de proteinasa K por toda la noche a 55°C. Al día siguiente se centrifugaron por 5 minutos a 13000g. El sobrenadante resultante fue transferido a otro tubo y mezclado con 450 µL de isopropanol 100%, y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones anteriores. En este punto ya es posible vislumbrar el ADNg como un precipitado blanco. Se descarta el sobrenadante, y el precipitado blanco se lava con 1 ml de etanol 70% y se vuelve a centrifugar. El sobrenadante resultante se descarta con cuidado y el precipitado se resuspende en 300 µL de tampón TE (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA) para luego dejar incubando durante toda la noche a 55°C, o 5 minutos a 95°C.

7.3 Genotipificación animales

Para cada reacción de polimerasa en cadena (PCR del inglés *polymerase chain reaction*) se incubó 1 μL de ADNg con 12.5 μL de *Go Taq Master Mix* (Promega, Estados Unidos), 1 μL del partidador y 10.5 μL de agua libre de nucleasa, para alcanzar un volumen final de 25 μL . Los programas de PCR utilizados fueron realizados de acuerdo a las instrucciones del proveedor (The Jackson Laboratory, Estados Unidos). Los productos de la PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2% con 3,3 μL de Syber Safe (Invitrogen, Estados Unidos) por cada 100 mL de agarosa, a 100 voltios (V).

7.4 Análisis de comportamiento

Laberinto acuático de Morris.

Esta prueba conductual permite evaluar la memoria espacial y el aprendizaje, y consta de dos fases, la de adquisición de memoria, y la fase de retención o “ensayo de prueba” (Morris 1984). La prueba se realiza en un contenedor plástico circular de 120 cm de diámetro y 30 cm de alto que contiene agua teñida con pintura blanca no tóxica y una plataforma plástica sumergida a 1 cm de la superficie del agua, la cual se encuentra en una posición no céntrica del laberinto (Figura 5A). La habitación del experimento consiste en una sala bien iluminada sin perturbaciones externas. Se colocan diferentes pistas visuales en las distintas murallas que permitan al ratón recordar donde está la plataforma que le permitirá mantenerse en la superficie. Durante la fase de adquisición de memoria, los

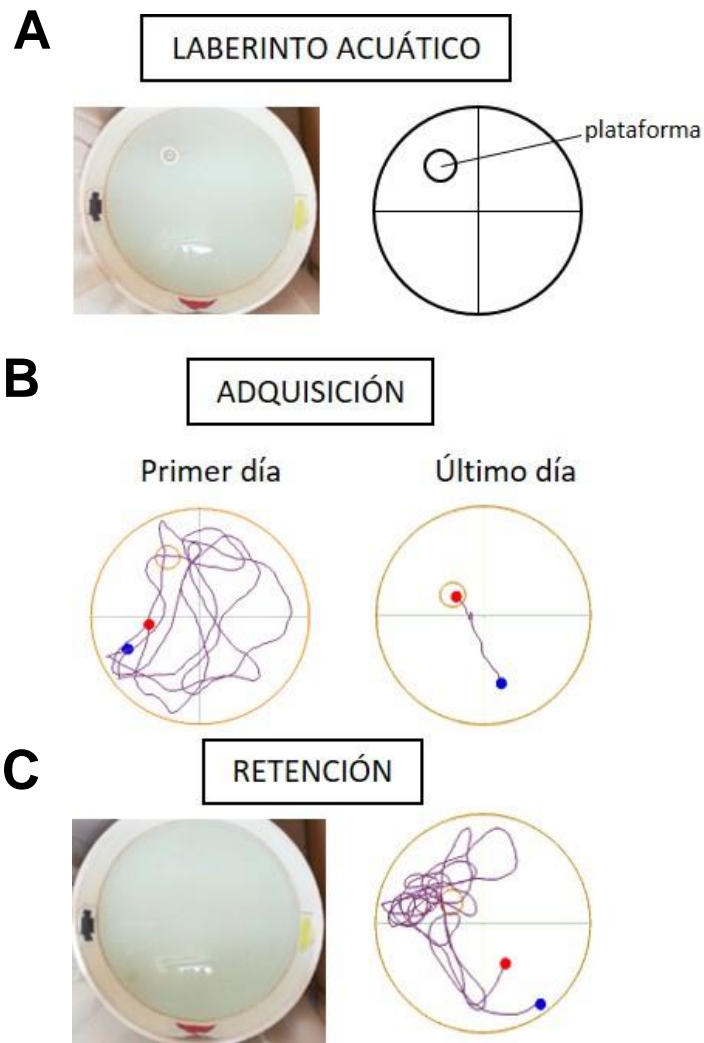


Figura 5. Laberinto acuático de Morris. (A) Representación del Laberinto de Morris. El contenedor se divide en 4 cuadrantes, y se sitúa la plataforma en uno de ellos. (B) Esquema general del trayecto del animal el primer y último día en la fase de adquisición de memoria. El primer día de entrenamiento suele tener un patrón errático de búsqueda mientras que el último día su trayectoria es directa hacia la plataforma. (C) “Sondeo de prueba”, donde se remueve la plataforma y se deja nadar 60s al animal. En esta prueba de retención se espera que, si el animal aprendió, nade más tiempo en el cuadrante donde estaba situada la plataforma.

animales son entrenados colocándolos en el agua con cuidado en una posición al azar. Los experimentos se efectúan diariamente por 4 días, 6 veces por cada día. En cada entrenamiento se permite a los ratones nadar por un máximo de 60 segundos y que se queden en la plataforma por 10 segundos, para luego ser removidos y devueltos a sus cajas. Si el animal no encuentra la plataforma en 60 segundos se le guía manualmente (Figura 5B). Al finalizar la fase de adquisición o aprendizaje, se realiza la prueba final de retención o “ensayo de prueba” (Vicens, Redolat et al. 2003) para determinar la adquisición de memoria espacial, en la cual en el quinto día se remueve la plataforma y el animal nada libremente por 60 segundos (Figura 5C). Ésta es una prueba de preferencia espacial en la que el animal que ha aprendido nadará más tiempo en el cuadrante objetivo, es decir, donde previamente estaba situada la plataforma. Todo esto se graba con una cámara de video que se encuentra montada en el techo, permitiendo tener una visual completa del laberinto. Estos videos fueron analizados utilizando el programa Any-maze (Stoelting Co, Estados Unidos), y los datos obtenidos fueron graficados con GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Estados Unidos).

7.5 Preparación de virus adeno-asociados (AAVs)

La generación de los vectores AAV ha sido descrita anteriormente (Haass, Hung et al. 1993, Näslund, Schierhorn et al. 1994, Castillo, Valenzuela et al. 2013). Los virus adeno-asociados de serotipo 2 (AAV2) fueron desarrollados y

provistos por la Corporación Genzyme en Boston, EE.UU. El serotipo 2 presenta tropismo para neuronas en la entrega al SNC (Fewell, Travers et al. 2001). El casete completo de expresión de *Xbp1* murino fue escindido del vector pcDNA3-XBP-1s como un fragmento MfeI/SphI, e insertado en un plásmido previral pAAVsp70 que contiene repeticiones terminales invertidas conocidas como ITRs (del inglés *Inverted terminal repeat*). El vector contiene un casete de expresión de la proteína fluorescente verde mejorada, EFGP (del inglés *enhanced Green fluorescent protein*) que sirve como un marcador fluorescente para reportar las células transducidas. Este vector fue referido como AAV2-XBP1s. Como control, un AAV que expresa sólo EGFP fue utilizado (AAV2-EGFP). Las titulaciones virales fueron determinadas a través de un ensayo de PCR en tiempo real con partidores específicos para la secuencia de poli-adenilación de la hormona de crecimiento bovino, BGH (del inglés *bovine growth hormone*), la cual está incluida en ambos plásmidos.

Las titulaciones virales fueron determinadas por Genzyme y confirmadas en el laboratorio del Dr. Hetz por medición directa del contenido de ADN (Kornfeld and Kornfeld 1985, Valenzuela, Collyer et al. 2012) a su llegada (Figura 6).

7.6 Análisis histológico de los animales.

Los ratones fueron sacrificados por inhalación de dióxido de carbono (CO₂) y perfundidos transcardialmente con PBS (del inglés *phosphate buffered saline*) a

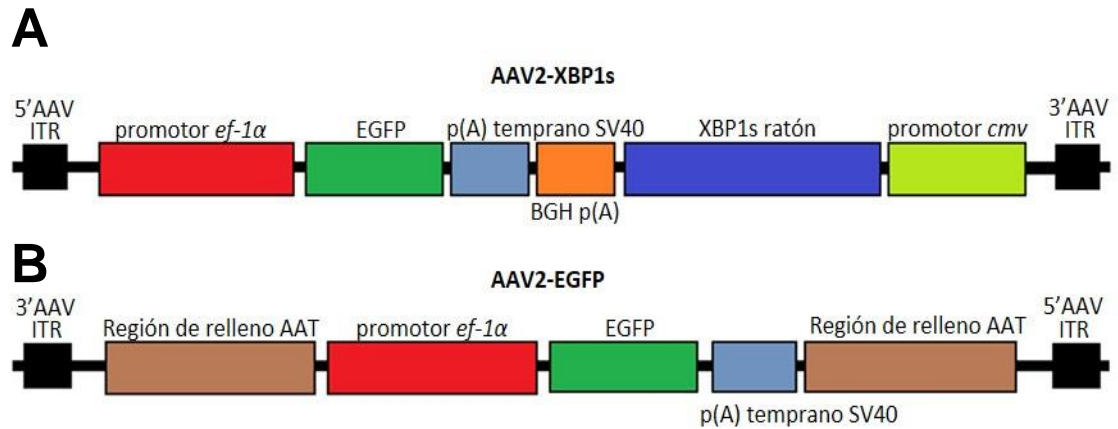


Figura 6. Desarrollo de AAVs para expresar XBP1s. Diagrama de los vectores utilizados: AAV2-GFP y AAV2-XBP1s. AAV2-XBP1s **(A)** está compuesto por un casete completo de expresión de Xbp1 murino insertado en un plásmido previral pAAVsp70, el cual contiene además un casete de expresión de la proteína fluorescente verde mejorada (EGFP), el cual tiene la función de un marcador fluorescente para reportar las células transducidas con el virus. **(B)** AAV2-EGFP no posee el casete de expresión de XBP1s, en su lugar tiene regiones de relleno con secuencias AAT.

una concentración de 1X. El cerebro fue extraído y almacenado. Una mitad se almacenó a -80°C para estudios bioquímicos, mientras que la mitad destinada a estudios histológicos se guardó en paraformaldehído (PFA) al 4% para 24 h después tras pasarlo a un tubo con sacarosa 30% azida 0.02%, almacenándolo a 4°C hasta su uso.

Para realizar los análisis histológicos se incluyó la mitad de cerebro en OCT (del inglés *Optimal Cutting Temperature*, Tissue Tek, Estados Unidos) y se realizaron cortes coronales seriados en láminas de 25 µm de ancho con un criostato (Leica, Nussloch, Alemania), los cuales se guardaron en placas de 12 pocillos que contenían PBS 1X con azida 0.02%. Al momento de realizar las tinciones, los cortes se montaron en portaobjetos Superfrost (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos), ordenándolos desde la zona anterior del cerebro hasta la posterior para poder observar así la progresión del hipocampo. El estado de agregación de los 5xFAD y los Tg^{XB^{P1}S}/5xFAD se visualizó con fluorescencia e inmunohistoquímica.

7.6.1 Fluorescencia

Se realizó una tinción fluorescente con Tioflavina S (ThS) y para visualizar placas amiloides.

Los cortes cerebrales montados en el portaobjeto fueron incubados en una solución de alcohol al 50% con Tioflavina S al 0.025% por 10 minutos. Luego de esto, pasaron por una batería de alcoholes al 70%, 80%, 95% y 100% por 5

minutos, y xileno por 20 minutos. Finalmente fueron montados con medio de montaje DPX.

7.6.2 Inmunohistoquímica (IHQ)

Para el análisis del péptido β A se realizó una inmunohistoquímica con el anticuerpo 4G8 (Covance) siguiendo un protocolo estándar descrito anteriormente (Duran-Aniotz, Morales et al. 2014). Los cortes montados en portaobjetos fueron lavados 3 veces con PBS 1X por 5 minutos, y luego fueron sumergidos en ácido fórmico al 85% por 5 minutos para la exposición de epítopes. Luego de esto los cortes fueron lavados y se procedió a realizar el bloqueo de peroxidasa endógena con una solución H₂O₂ 3% metanol (MetOH) 10%, compuesta por 10 mL de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 30% (Merck, Alemania), 10 ml de Metanol 100%, llevado a un total de 100 ml con PBS 1X. Se volvió a lavar 3 veces, y se dejó incubando por toda la noche con el anticuerpo 4G8 (1:1000). Al siguiente día los cortes fueron lavados e incubados con el kit de sustrato de peroxidasa VECTASTAIN ABC (1:500) siguiendo las instrucciones del proveedor.

En ambas tinciones, los cortes fueron visualizados en el microscopio invertido Olympus IX71. Todos los análisis de las imágenes se realizaron utilizando el programa ImageJ (NIH, Bethesda, Estados Unidos).

7.7 Inyección intracraneal de AAVs para entrega de XBP1s en hipocampo

Animales 5xFAD de 45-55 días de vida fueron inyectados vía cirugía estereotáxica según los métodos de cirugía publicados en trabajos anteriores (Zuleta, Vidal et al. 2012, Valdes, Mercado et al. 2014). Los animales fueron anestesiados con Ketamina/xilazina (ketamina 100 mg/kg, xilazina 10 mg/kg; Vetcom, Chile) y ubicados en un marco estereotáxico con barras para la nariz y orejas (David Kopf Instruments, Estados Unidos) (Cetin, Komai et al. 2006) (Figura 7A). Inyecciones bilaterales de partículas de AAV2 fueron administradas en el hipocampo, inyectando en un punto único 2 μ L en cada hemisferio utilizando una jeringa Hamilton de 5 μ L en las siguientes coordenadas: anteroposterior (AP): -1.8 mm, mediolateral (ML): 1.8 mm y dorsoventral (DV): 1.8 mm. El punto de partida se considera el lugar donde se sitúa el bregma, punto donde las suturas sagital y coronal se encuentran (Figura 7B). La inyección fue realizada a una velocidad de 0.5 μ l/min, y la jeringa fue dejada en el lugar por 5 min antes de ser extraída (Figura 7C). Posteriormente, la aguja fue retirada a una velocidad de 1 mm/minuto.

7.8 Análisis estadístico.

Los resultados se presentaron como promedio \pm error estándar del número de animales (SEM). La significancia estadística de los datos fue calculada mediante el análisis de la prueba *t-student*. Se utilizó el análisis de ANOVA de dos vías cuando más de dos grupos experimentales fueron comparados, seguido de la

prueba *post-hoc* de comparación múltiple de Bonferroni. Las diferencias estadísticas se consideraron significativas para valores de $p < 0.05$. Los valores p son mostrados como se indica a continuación: * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$. El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism 5.0.

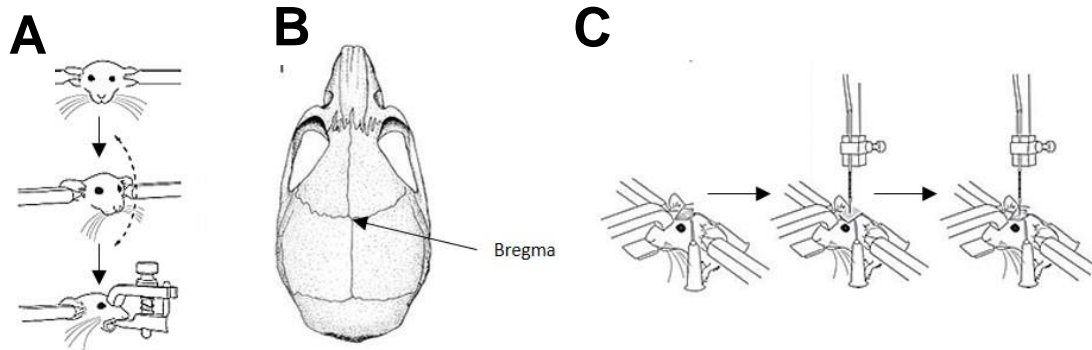


Figura 7. Esquema de inyección intracraneal de AAVs. (A) Fijación de animal en el marco estereotáxico. Para esto, se pasan un par de barras en las orejas del animal hasta acomodar el cráneo del animal de forma que no se mueva de forma horizontal ni vertical. Luego de acomodar esto, se afirma el hocico del animal para evitar que la cabeza se pueda mover hacia adelante o atrás. **(B)** Ubicación del bregma, punto de partida de las coordenadas de inyección. Este punto es el lugar considerado el punto de inicio para comenzar el desplazamiento hacia las coordenadas de inyección previamente establecidas. **(C)** Procedimiento de entrega del virus con la jeringa del estereotáxico. Se comienza a bajar lentamente la jeringa donde está contenido el virus, descendiendo hasta llegar a la coordenada dorso-ventral establecida. Luego de esto, se comienza a administrar el virus lentamente, a una velocidad de 0.5 μ l/min. Luego de administrar todo el contenido de la jeringa, se deja en el mismo lugar por cinco minutos, para luego subirla lentamente (Modificado de Cetin, Komai, Eliava, Seeburg, & Osten, 2006).

8. RESULTADOS

8.1 Generación de animales transgénicos.

Para determinar el rol de XBP1s en la EA, se generó un modelo de la EA que sobreexpresa XBP1s en las neuronas mediante cruces entre animales 5xFAD y animales Tg^{XBP1s} (Figura 8A). Los ratones $Tg^{XBP1s}/5xFAD$ nacieron con una distribución Mendeliana normal (Tabla 1). Para la genotipificación de estos animales se les realizó PCR semicuantitativo a los 21 días de vida, utilizando partidores específicos para la secuencia de XBP1s y para los transgenes PPA y PSEN1. Se detectaron productos de 100 pb para XBP1s, de 608 y 377 pb para PSEN para PPA, respectivamente (Figura 8B), confirmando así los animales doble transgénicos necesarios para la investigación. Estas líneas se mantuvieron en el bioterio de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile, realizando cruces con ratones de fondo genético C57BL/6 para llevar a un fondo genético puro.

8.2. Análisis histológico del péptido β -amiloide y su agregación en animales 5xFAD y $Tg^{XBP1s}/5xFAD$.

La EA se caracteriza por una acumulación anormal de péptido β A, la cual se agrega formando placas amiloides en el hipocampo (Soto and Estrada 2008). Con el fin de evaluar el estado de agregación de péptido β A en el cerebro de animales 5xFAD y $Tg^{XBP1s}/5xFAD$ utilizamos métodos de detección por

Tabla 1. Tasa de nacimiento de los ratones transgénicos TgXBP1s/5xFAD. La distribución genotípica de la colonia obtenida de las cruces de los ratones 5xFAD y Tg^{XBP1s}. La distribución Mendeliana fue corroborada por la prueba de Chi-cuadrado (χ^2).

Genotipo	Observado	Esperado (%)	Observado (%)	Valor χ^2
Control	171	25	30.1	5.81
TgXBP1s	128	25	22.5	1.43
5xFAD	178	25	31.3	8.98
TgXBP1s/5xFAD	92	25	16.2	17.75
TOTAL	569	100%	100%	34.0

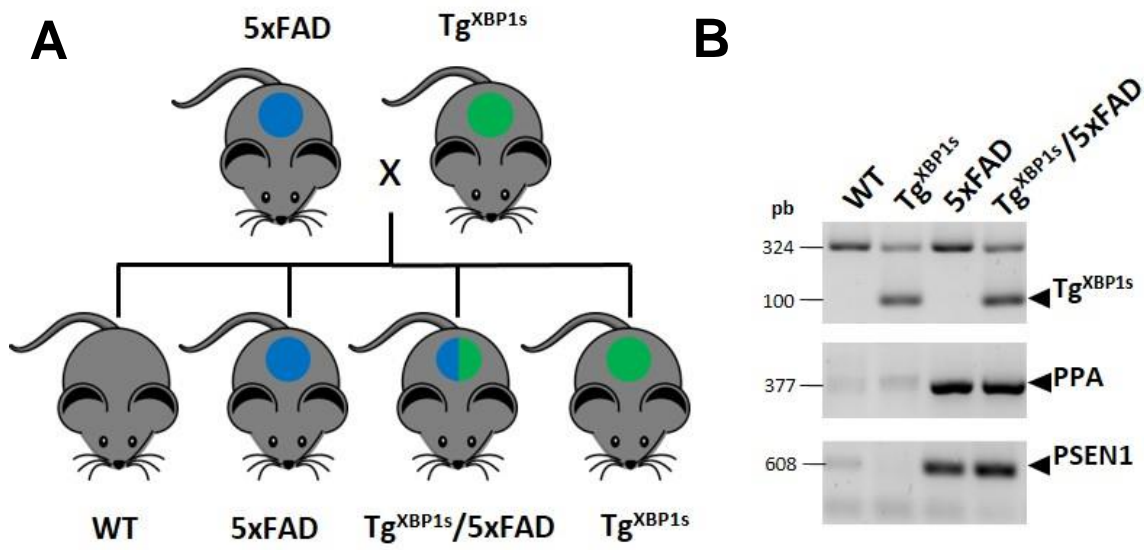


Figura 8. Animales experimentales. (A) Esquema de la estrategia utilizada para la generación de los ratones transgénicos utilizados. Se realizaron cruzas entre animales 5xFAD y Tg^{XBP1s}, obteniéndose cuatro modelos animales distintos. (B) Confirmación de líneas transgénicas mediante análisis de PCR en gel de agarosa al 2,0% a partir de ADNg de animales WT, Tg^{XBP1s}, 5xFAD y Tg^{XBP1s}/5xFAD. Partidores específicos para XBP1s y los transgenes PSEN1 y PPA fueron utilizados.

inmunofluorescencia e inmunohistoquímica, tales como la Tioflavina S (ThS) y el anticuerpo 4G8 en cerebros de animales de 6 y 8 meses de edad.

La ThS se une a estructuras ricas en láminas β , pudiendo detectar agregados amiloides. En las figuras 9A y 10A se pueden observar imágenes representativas de esta tinción amiloidogénica tanto en corteza como en hipocampo de los animales experimentales a los 6 y 8 meses de edad, observándose, como se espera, mayor acumulación de placas amiloides en el estadio más avanzado de 8 meses. Al analizar la intensidad de fluorescencia en la corteza e hipocampo de ratones 5xFAD y Tg^{XBP1s}/5xFAD, se observa una disminución en la carga de ThS en el hipocampo en los ratones 5xFAD de 6 y 8 meses de edad que sobreexpresan de manera genética el factor de transcripción XBP1s en comparación con los animales 5xFAD, aunque no de manera significativa (Figuras 9C y 10C). Sin embargo, no observamos diferencias en la carga total de ThS en la corteza entre estos animales (Figuras 9B y 10B). Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de XBP1s reduce la carga de placas amiloides en el hipocampo, una zona del cerebro implicada directamente con la memoria y aprendizaje.

Posteriormente, analizamos directamente la extensión de la deposición de péptido β A por IHQ comparando el nivel de carga del anticuerpo 4G8 y el número de placas presentes en la corteza, hipocampo y subículo de los animales 5xFAD y Tg^{XBP1s}/5xFAD de 6 y 8 meses de edad. Observamos una disminución

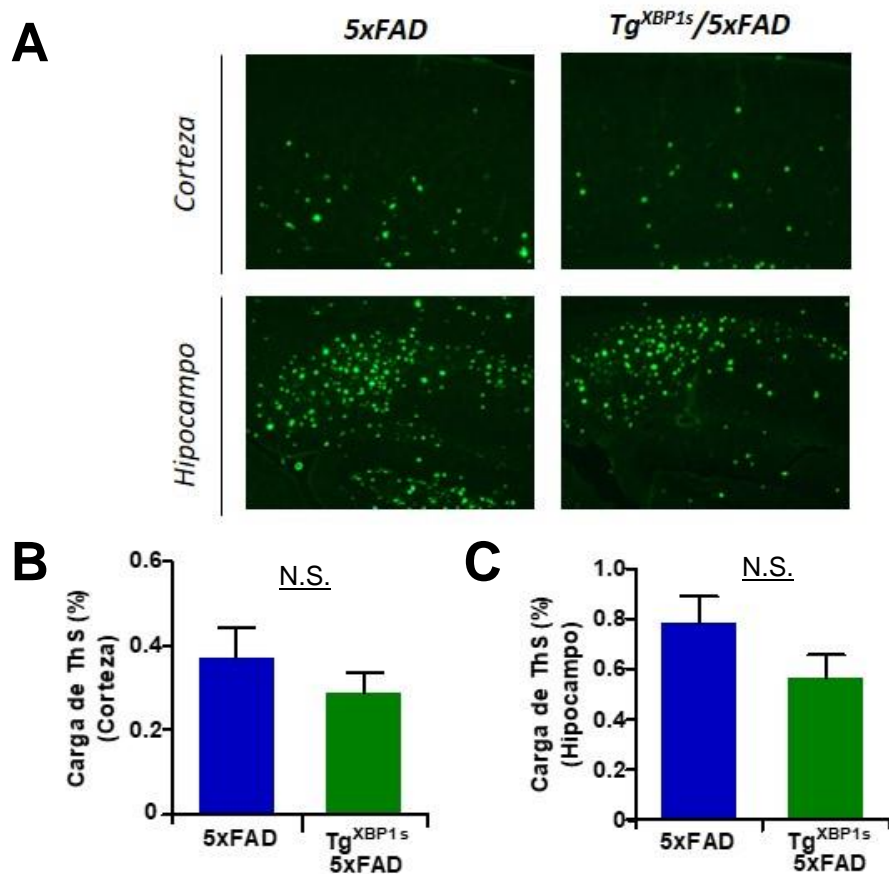


Figura 9. Análisis con Tioflavina S (ThS) en cerebros de animales 5xFAD de 6 meses. (A) Cerebros de animales 5xFAD y Tg^{XBP1s}/5xFAD fueron teñidos con Tioflavina S para observar placas amiloides. Imágenes representativas de depósitos amiloides en áreas corticales (arriba) e hipocampales (abajo). **(B)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de depósitos amiloides en la corteza. **(C)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia en el hipocampo. Los datos corresponden al promedio \pm SEM de los distintos animales utilizados en cada grupo (5xFAD, n = 17; Tg^{XBP1s}5xFAD, n = 18). Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de t-Student, pero no observamos diferencias estadísticamente significativas. N.S., no significativo.

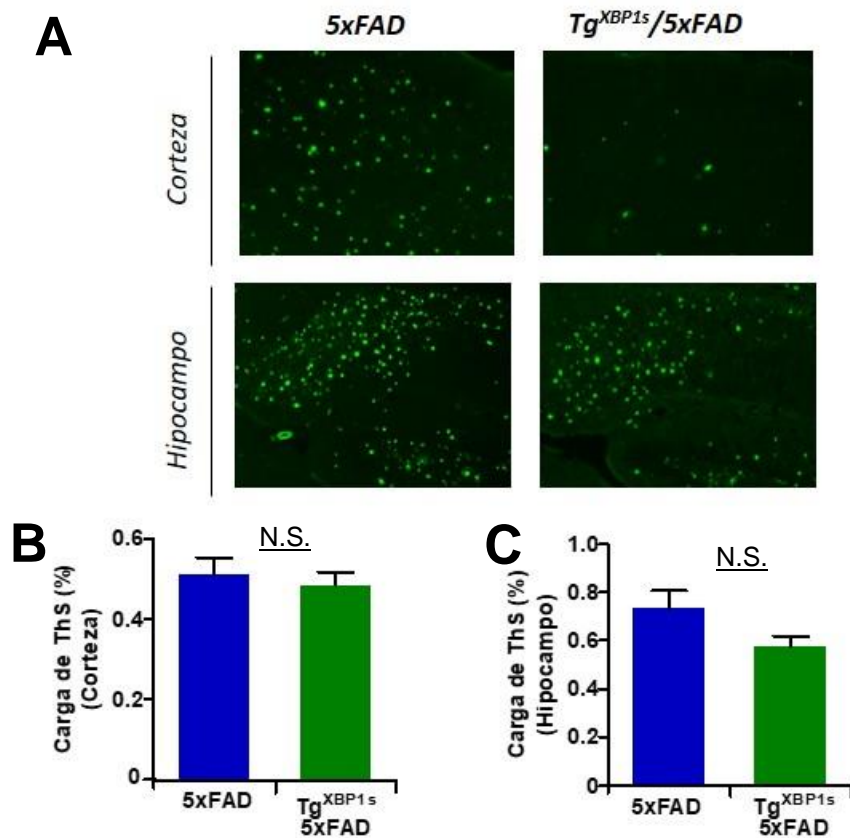


Figura 10. Análisis con Tioflavina S (ThS) en cerebros de animales 5xFAD de 8 meses. (A) Cerebros de animales 5xFAD y Tg^{XBP1s}/5xFAD de 8 meses de edad fueron teñidos con Tioflavina S para observar placas amiloides. Imágenes representativas de depósitos amiloides en áreas corticales (arriba) e hipocampales (abajo). (B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de depósitos amiloides en la corteza. (C) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia en el hipocampo. Los datos corresponden al promedio \pm SEM de los distintos animales utilizados en cada grupo (5xFAD, n = 9; TgXBP1s/5xFAD, n = 9). Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de t-Student, pero no observamos diferencias estadísticamente significativas. N.S., no significativo.

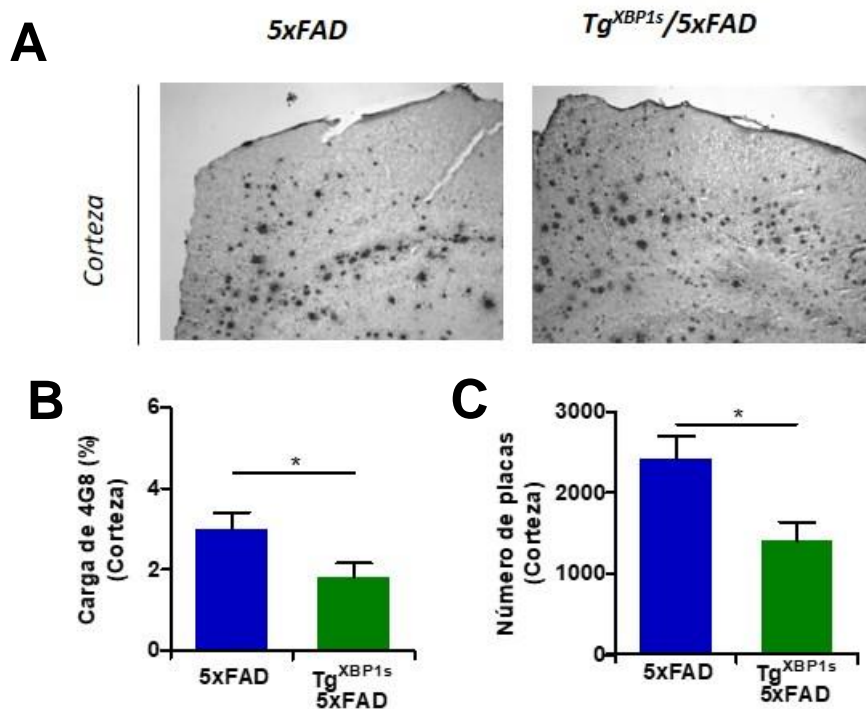


Figura 11. Cuantificación de placas amiloides con el anticuerpo 4G8 en corteza de cerebros de animales 5xFAD de 6 meses. (A) Cortes de corteza de cerebro de animales 5xFAD y $Tg^{XBP1s}/5xFAD$ de 6 meses de edad teñidos con el anticuerpo 4G8 para cuantificar carga y número de placas amiloides. Imágenes representativas de depósitos amiloides en áreas corticales. (B) Cuantificación de la carga de 4G8. (C) Cuantificación del número de placas. Los datos corresponden al promedio \pm SEM de los distintos animales utilizados en cada grupo (5xFAD, n = 9; $Tg^{XBP1s}/5xFAD$, n = 12). Se detectaron diferencias estadísticamente significativas utilizando la prueba de t-Student ($*p < 0.05$).

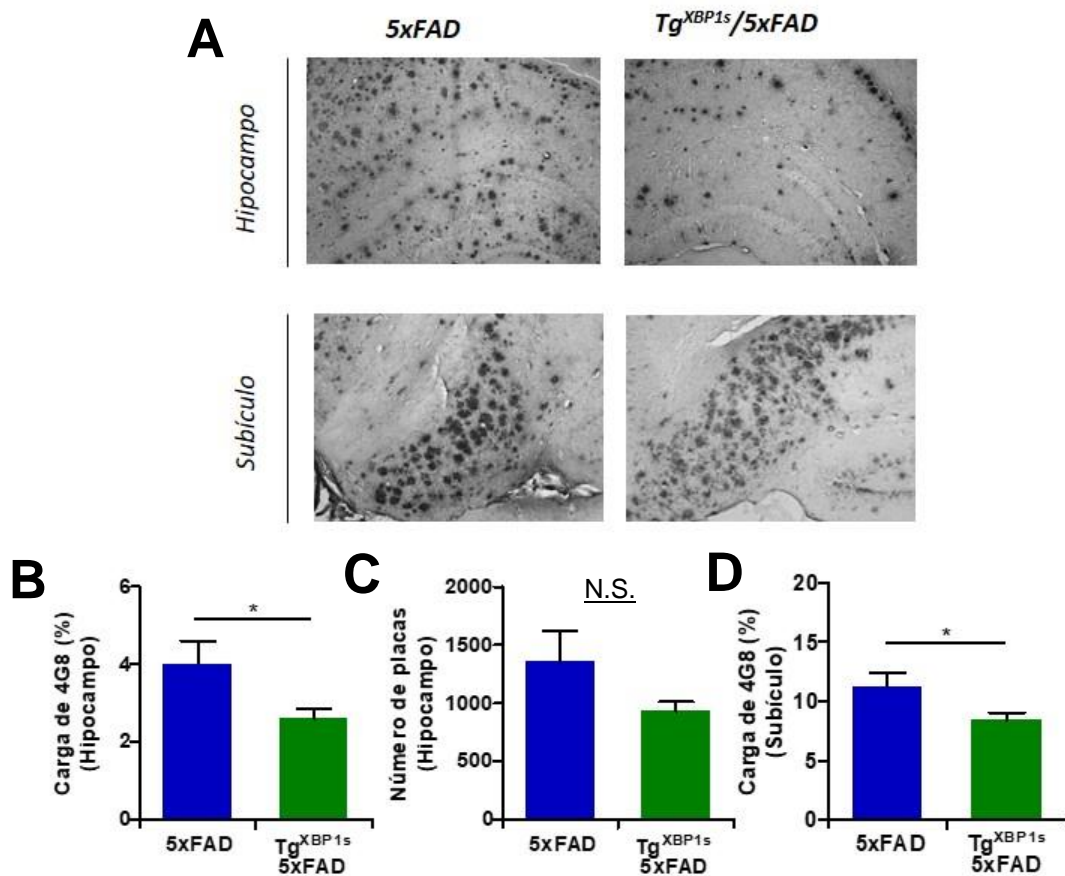


Figura 12. Cuantificación de placas amiloides con el anticuerpo 4G8 en hipocampo y subículo de cerebro de animales 5xFAD de 6 meses. (A) Cortes de cerebro de animales 5xFAD y Tg^{XBP1s}/5xFAD de 6 meses de edad teñidos con el anticuerpo 4G8 para cuantificar carga y número de placas amiloides. Imágenes representativas de depósitos amiloides en áreas hipocámpales (arriba) y subiculares (abajo). **(B)** Cuantificación de la carga de 4G8 en hipocampo. **(C)** Cuantificación del número de placas en hipocampo. **(D)** Cuantificación de la carga de 4G8 en subículo. Los datos corresponden al promedio \pm SEM de los distintos animales utilizados en cada grupo (5xFAD, n=9; TgXBP1s/5xFAD, n = 12). Se detectaron diferencias estadísticamente significativas utilizando la prueba de t-Student (N.S., no significativo; * $p < 0.05$).

significativa en la carga de 4G8 en la corteza (Figura 11B), hipocampo (Figura 12B) y subículo (Figura 12D) de los animales $Tg^{XBP1s}/5xFAD$ de 6 meses, y en la corteza (Figura 13B) e hipocampo (Figura 14B) de animales $Tg^{XBP1s}/5xFAD$ de 8 meses de edad. Para poder realizar un análisis más profundo en nuestra investigación, también realizamos un conteo del número de placas de péptido βA por unidad de área. Consistente con los resultados anteriores, encontramos una cantidad significativamente menor de placas en la corteza de los animales 5xFAD que sobreexpresan XBP1s en comparación con los animales 5xFAD a los 6 (Figura 11C) y 8 (Figura 13C) meses de edad. En conjunto, estos resultados indican que la sobreexpresión de XBP1s en el cerebro de los animales reduce los niveles de depósitos de βA en el modelo 5xFAD de la EA tanto a los 6 como a los 8 meses de edad.

8.3 Caracterización y análisis conductual de animales 5xFAD y $Tg^{XBP1s}/5xFAD$.

Dado que la EA se caracteriza a nivel conductual en una pérdida gradual de la memoria, evaluamos el comportamiento de los animales transgénicos que sobreexpresan XBP1s en comparación con los animales 5xFAD para medir posibles efectos cognitivos de este potente factor de transcripción. Para evaluar la participación de XBP1s en los procesos de memoria y aprendizaje en la EA, los animales 5xFAD, Tg^{XBP1s} , $Tg^{XBP1s}/5xFAD$ y WT de 6 y 8 meses de edad fueron sometidos a un test conductual conocido como laberinto acuático de Morris (en

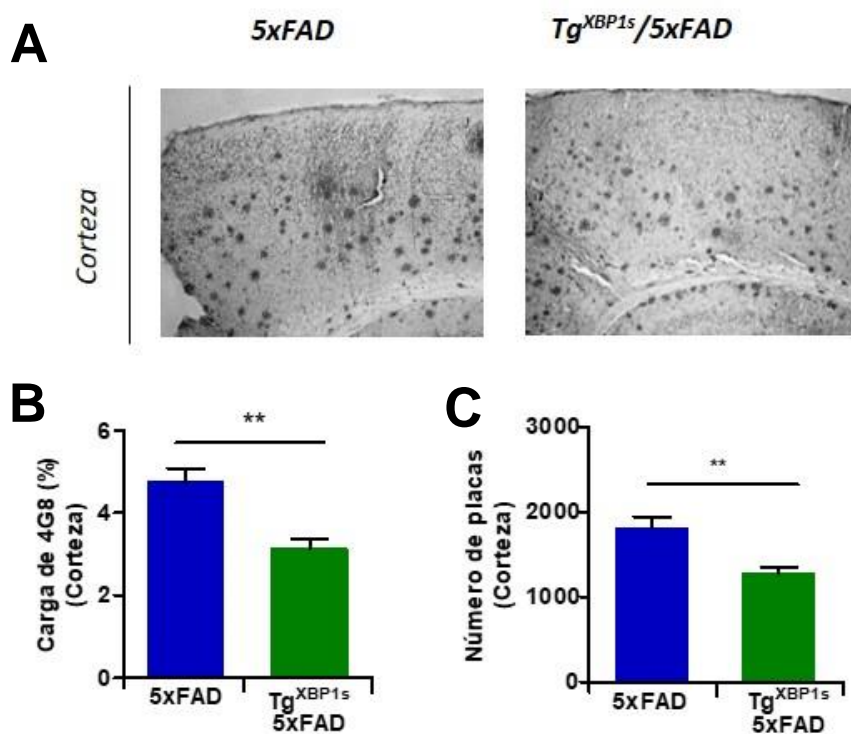


Figura 13. Cuantificación de placas amiloides con el anticuerpo 4G8 en corteza de cerebros de animales 5xFAD de 8 meses. (A) Cortes de corteza de cerebro de animales 5xFAD y Tg^{XBP1s}/5xFAD de 8 meses de edad fueron teñidos con el anticuerpo 4G8 para cuantificar carga y número de placas amiloides. Imágenes representativas de depósitos amiloides en áreas corticales. (B) Cuantificación de la carga de 4G8. (C) Cuantificación del número de placas. Los datos corresponden al promedio \pm SEM de los distintos animales utilizados en cada grupo (5xFAD, n = 7; TgXBP1s/5xFAD, n = 6). Se detectaron diferencias estadísticamente significativas utilizando la prueba de t-Student (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

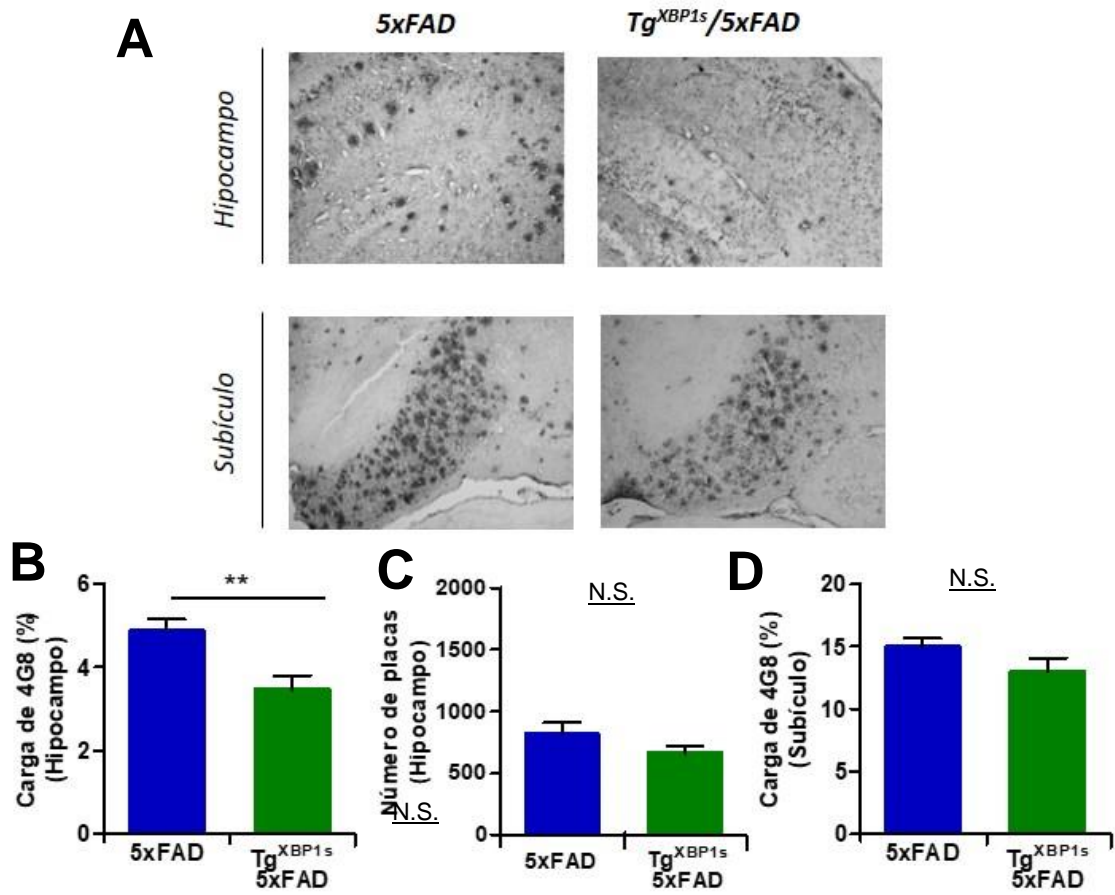


Figura 14. Cuantificación de placas amiloides con el anticuerpo 4G8 en hipocampo y subículo de cerebros de animales 5xFAD de 8 meses. (A) Cortes de cerebro de animales 5xFAD y Tg^{XBP1s}/5xFAD de 8 meses de edad teñidos con el anticuerpo 4G8 para cuantificar carga y número de placas amiloides. Imágenes representativas de depósitos amiloides en áreas hipocámpales (arriba) y subiculares (abajo). **(B)** Cuantificación de la carga de 4G8 en hipocampo. **(C)** Cuantificación del número de placas en hipocampo. **(D)** Cuantificación de la carga de 4G8 en subículo. Los datos corresponden al promedio \pm SEM de los distintos animales utilizados en cada grupo (5xFAD, $n = 7$; Tg^{XBP1s}/5xFAD, $n = 6$). Se detectaron diferencias estadísticamente significativas utilizando la prueba de t-Student (N.S., no significativo, $**p < 0.01$).

inglés *Morris water maze*, MWM). Este test es ampliamente utilizado para evaluar el aprendizaje espacial y la memoria de animales (Vorhees and Williams 2006). Para poder validar este test conductual en nuestros animales transgénicos como herramienta para medir memoria y aprendizaje, primero caracterizamos el fenotipo conductual del animal 5xFAD en comparación con animales silvestres. Realizamos 6 ensayos por día durante 4 días, para determinar la curva de aprendizaje del animal. Luego de realizada la curva de aprendizaje, evaluamos la retención de memoria del animal en una prueba conocida como “sondeo de prueba”, la cual se realiza al 5° día. En esta prueba se retira la plataforma, y se les permite a los animales nadar libremente durante 60 segundos. Evaluamos diversos parámetros: el tiempo que el animal estuvo en el cuadrante objetivo (cuadrante donde se encontraba anteriormente la plataforma), distancia promedio entre el animal y el lugar donde estaba la plataforma, tiempo que el animal demoró en llegar por primera vez al lugar donde se encontraba la plataforma, y el número de entradas que realizó el animal al cuadrante donde se encontraba la plataforma oculta. A los 6 meses de edad no encontramos una diferencia entre las curvas de aprendizaje de los animales WT y 5xFAD (Figura 15B). Al quinto día, si bien no obtuvimos resultados estadísticamente significativos, podemos observar que los animales 5xFAD demoraron mayor tiempo en llegar al lugar donde se encontraba la plataforma oculta, y además estuvieron a una mayor distancia promedio de esa zona (Figuras 16 B y C), lo que sugiere que tuvieron mayores complicaciones para recordar dónde se

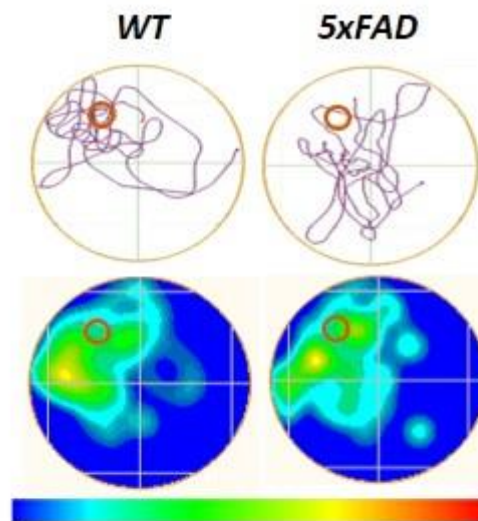
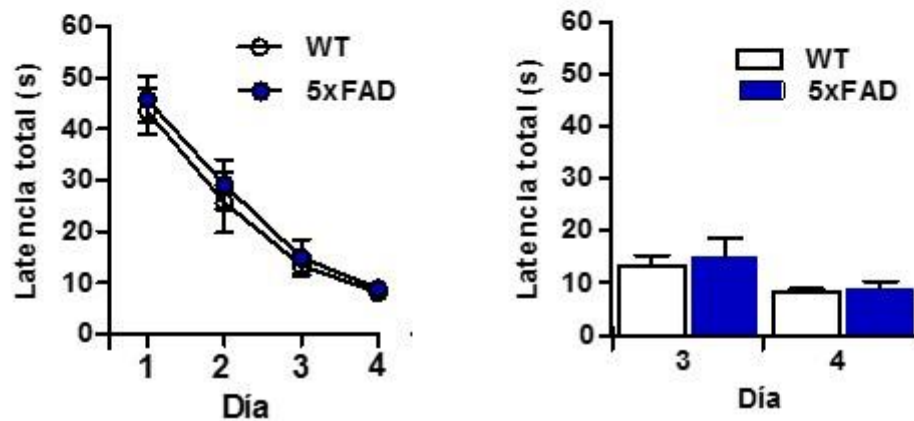
A**B**

Figura 15. Caracterización conductual de animales 5xFAD de 6 meses en laberinto Acuático de Morris en animales WT y 5xFAD. (A) Trayectoria y mapa de calor representativo de un animal del grupo WT y uno del grupo 5xFAD. **(B)** Curva de aprendizaje de los grupos experimentales durante los 4 días de entrenamiento. (WT, n = 10; 5xFAD, n = 9). Se utilizó la prueba ANOVA de una y dos vías, según se requiriera, pero no se observaron diferencias significativas.

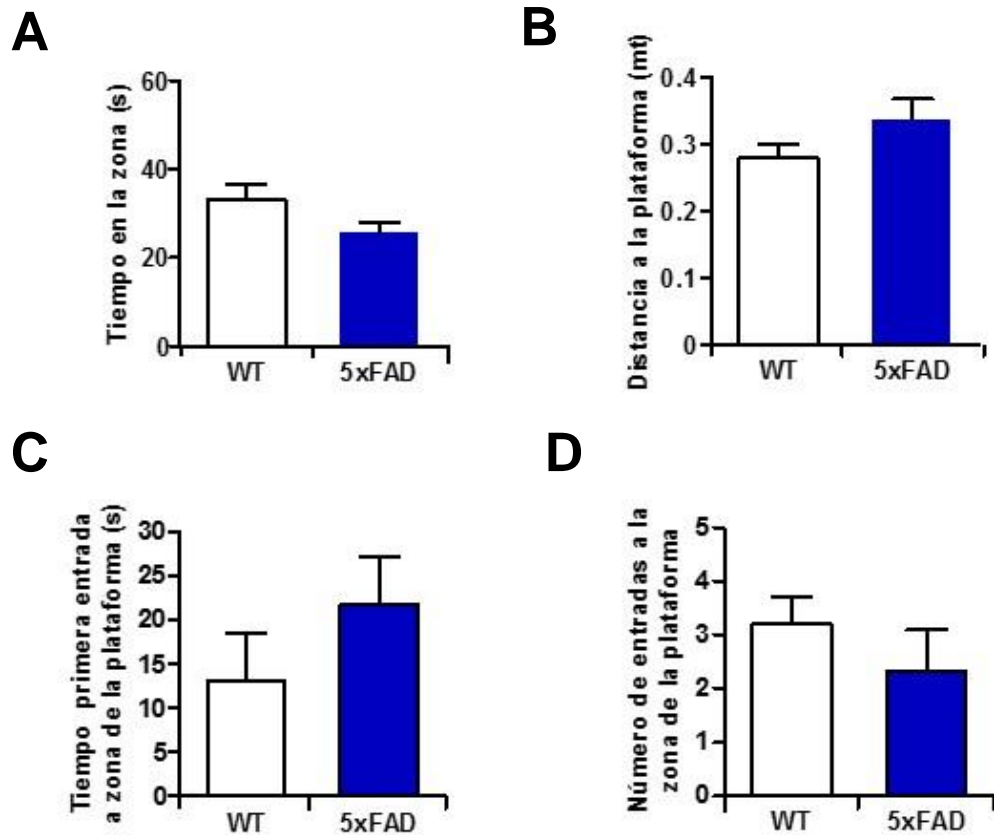


Figura 16. Análisis del 5° día de animales 5xFAD y WT de 6 meses en laberinto Acuático de Morris. (A) Tiempo total del animal en el cuadrante objetivo. (B) Distancia promedio del animal hasta el lugar donde estaba la plataforma. (C) Tiempo que el animal demora en llegar por primera vez a la zona de la plataforma. (D) Número de entradas del animal a la zona donde se encontraba la plataforma. (WT, n = 10; 5xFAD, n = 9). Se utilizó la prueba ANOVA de una y dos vías, según se requiriera, pero no se observaron diferencias significativas.

encontraba. A los 8 meses de edad se encontró una diferencia significativa entre las curvas de aprendizaje durante los primeros 3 días (Figura 17B), observándose que el grupo 5xFAD requirió una mayor cantidad de tiempo para encontrar la plataforma en comparación al grupo WT. En el 5° día no obtuvimos resultados significativos pero los datos generados muestran una tendencia de los animales 5xFAD a tener problemas en recordar el lugar donde se encontraba la plataforma previamente ya que su tiempo de llegada a la zona de la plataforma fue mayor al de los animales WT (Figura 18C).

Luego de realizarse esta caracterización, investigamos el rol de XBP1s en la memoria y el aprendizaje comparando el desempeño de los animales 5xFAD con los $Tg^{XBP1s}/5xFAD$ y los grupos controles (WT y Tg^{XBP1s} , respectivamente). En el grupo de animales de 6 meses de edad no encontramos una diferencia entre los grupos en las curvas de aprendizaje, presentando todos los grupos experimentales un tiempo similar para encontrar la plataforma (Figura 19). En el 5° día tampoco encontramos diferencias entre los animales 5xFAD y $Tg^{XBP1s}/5xFAD$ en ninguno de los parámetros evaluados (Figura 20), aunque al compararlos con los resultados obtenidos por los animales WT y Tg^{XBP1s} se puede ver un aumento del tiempo que les toma a los animales llegar al lugar donde se encontraba la plataforma, siendo este tiempo mayor que el obtenido por los animales WT y Tg^{XBP1s} (Figura 20C). Por otro lado, en el grupo de animales de 8 meses de edad se observó que los modelos animales en un contexto de la EA, 5xFAD y $Tg^{XBP1s}/5xFAD$, requieren un tiempo mayor para

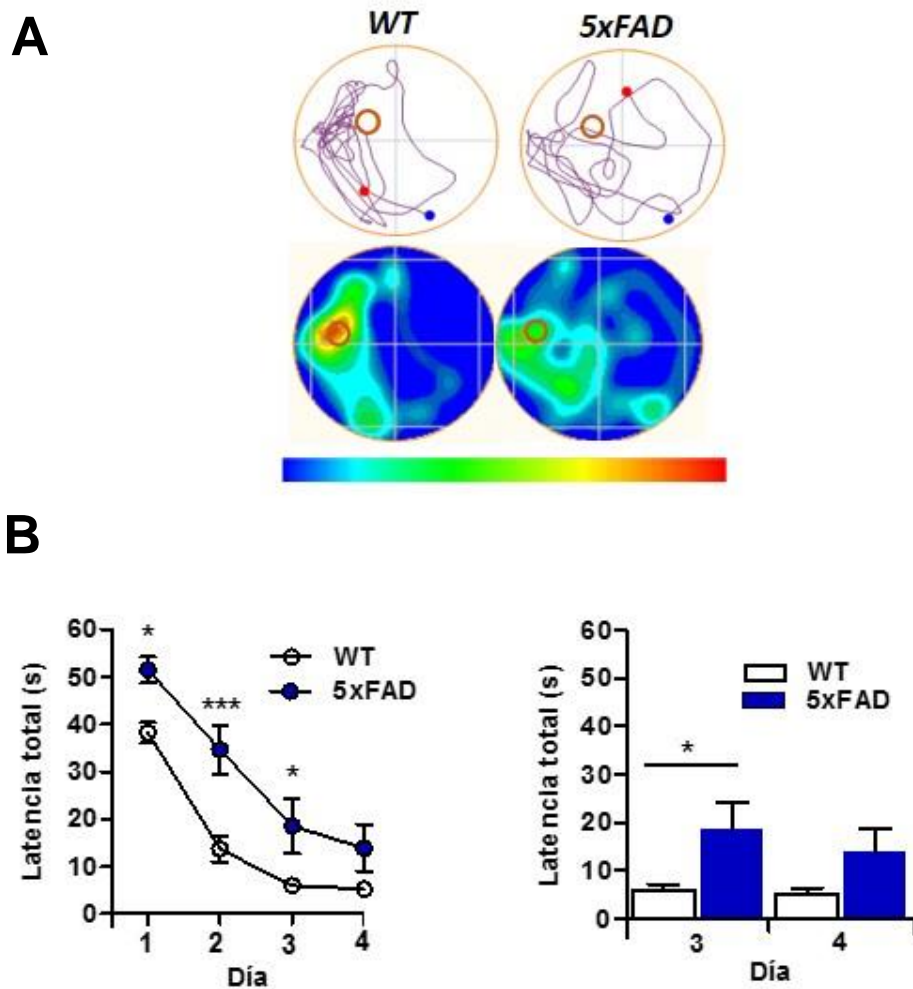


Figura 17. Caracterización conductual de animales 5xFAD de 8 meses en laberinto Acuático de Morris en animales WT y 5xFAD. (A) Trayectoria y mapa de calor representativo de un animal del grupo WT y uno del grupo 5xFAD. **(B)** Curva de aprendizaje de los grupos experimentales durante los 4 días de entrenamiento. (WT, n = 11; 5xFAD, n = 10). Se detectaron diferencias estadísticamente significativas utilizando la prueba ANOVA de una y dos vías, según se requiriera (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$).

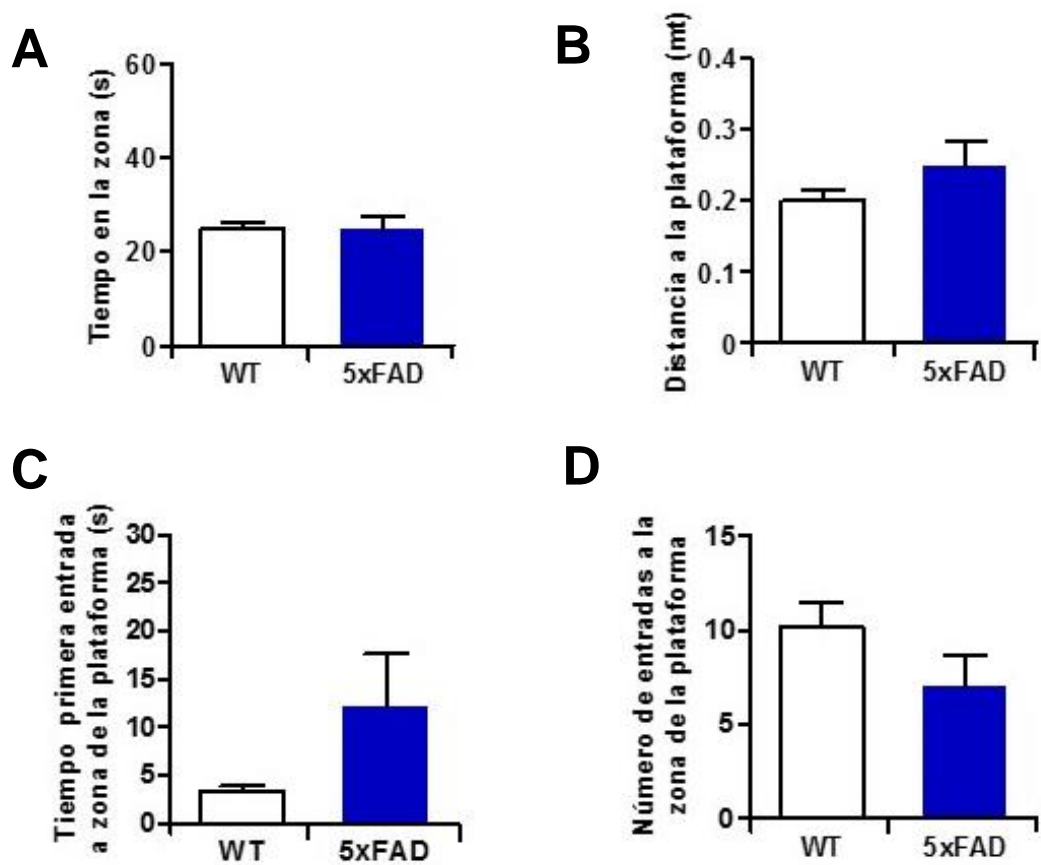


Figura 18. Análisis del 5° día de animales 5xFAD y WT de 8 meses en laberinto Acuático de Morris. (A) Tiempo total del animal en el cuadrante objetivo. (B) Distancia promedio del animal hasta el lugar donde estaba la plataforma. (C) Tiempo que el animal demora en llegar por primera vez a la zona de la plataforma. (D) Número de entradas del animal a la zona donde se encontraba la plataforma. (WT, n = 11; 5xFAD, n = 10). Se utilizó la prueba de t-Student, no encontrándose diferencias significativas.

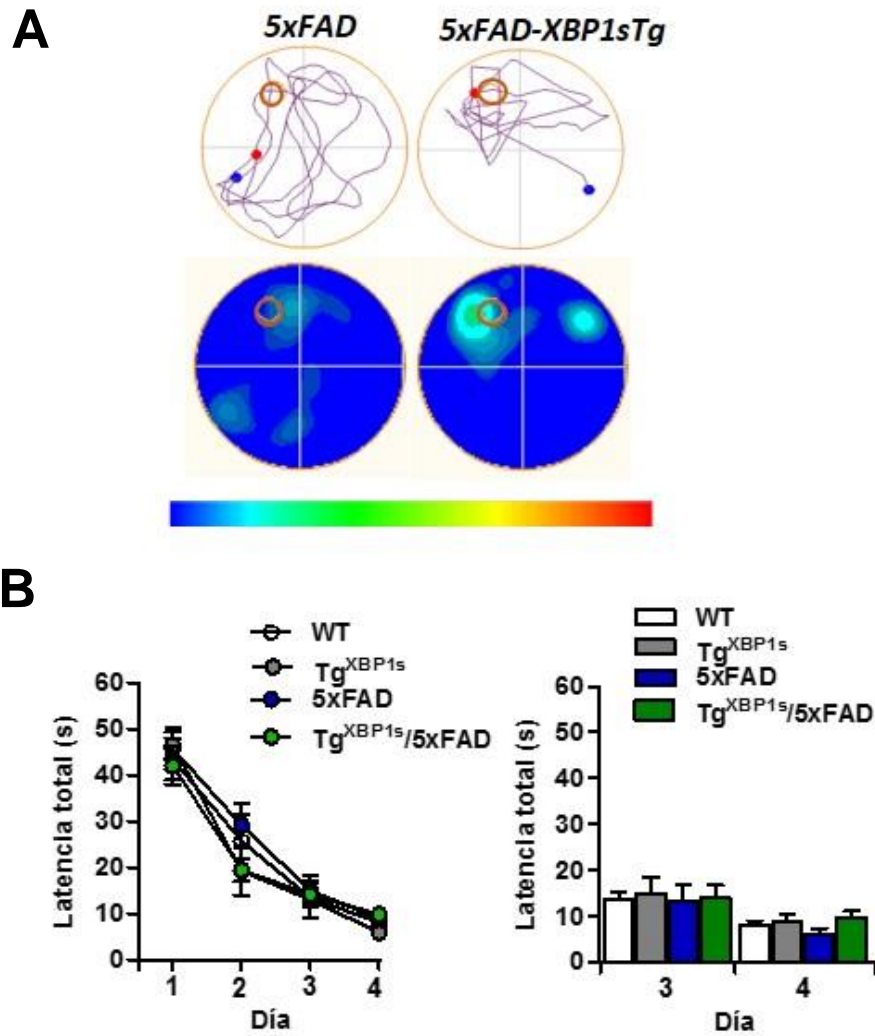


Figura 19. Caracterización conductual de animales 5xFAD y TgXBP1s/5xFAD de 6 meses utilizando el laberinto Acuático de Morris en animales WT y 5xFAD. (A) Trayectoria y mapa de calor representativo de un animal del grupo WT y uno del grupo 5xFAD. **(B)** Curva de aprendizaje de los grupos experimentales durante los 4 días de entrenamiento. (WT, n = 10; Tg^{XBP1s}, n = 8; 5xFAD, n = 9; Tg^{XBP1s}/5xFAD, n = 11). Se utilizó la prueba ANOVA de una y dos vías, según se requiriera, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas.

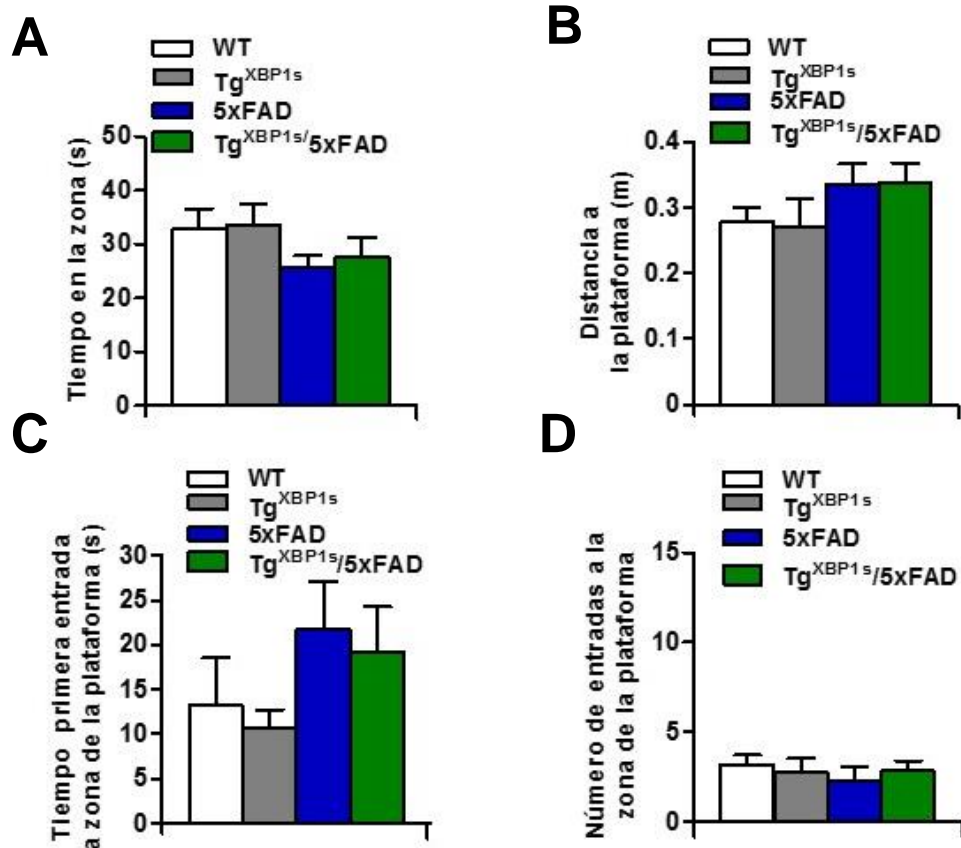


Figura 20. Análisis del 5° día de animales 5xFAD y Tg^{XBP1s}/5xFAD de 6 meses en laberinto Acuático de Morris. (A) Tiempo total del animal en el cuadrante objetivo. **(B)** Distancia promedio del animal hasta el lugar donde estaba la plataforma. **(C)** Tiempo que el animal demora en llegar por primera vez a la zona de la plataforma. **(D)** Número de entradas del animal a la zona donde se encontraba la plataforma. (WT, n = 10; Tg^{XBP1s}, n = 9; 5xFAD, n = 8; Tg^{XBP1s}/5xFAD, n = 11). Se utilizó la prueba de ANOVA de una vía, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas.

encontrar la plataforma en comparación a sus controles WT y Tg^{XBP1s} (Figura 21B). En cuanto al 5° día observamos que los animales Tg^{XBP1s}/5xFAD exhiben una conducta más similar al animal WT, mostrando diferencias notorias no significativas con los 5xFAD en la mitad de las variables analizadas: en la distancia promedio a la plataforma (Figura 22B) y en el número de entradas que realizó el animal al lugar donde se encontraba la plataforma (Figura 22D). Aun cuando estos resultados no son estadísticamente significativos podemos observar que existe un cambio conductual en los animales Tg^{XBP1s}/5xFAD, los cuales presentan una conducta más similar a la de un animal WT, sugiriendo que podría existir una recuperación de la capacidad de retención de memoria y aprendizaje en el sondeo de prueba. En estos momentos, nos encontramos aumentando el número de animales para este paradigma.

8.4 Evaluar el posible efecto neuroprotector de la sobreexpresión de XBP1s, por medio de terapia génica con virus adeno-asociados (AAV) en ratones 5xFAD.

Los resultados presentados anteriormente fueron obtenidos en animales que estaban genéticamente modificados desde su desarrollo para sobreexpresar XBP1s, dándonos un claro indicio de la posible aplicación de este factor de transcripción para una posible terapia para el tratamiento de la EA. Se ha

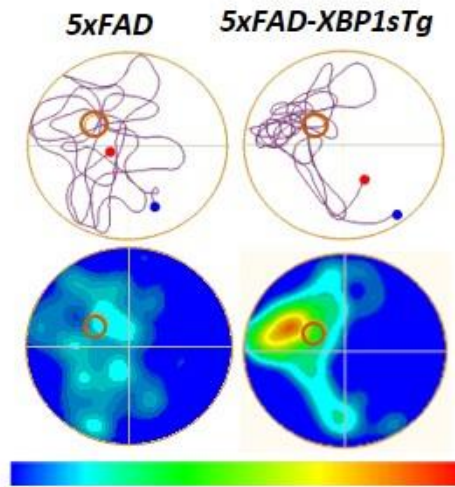
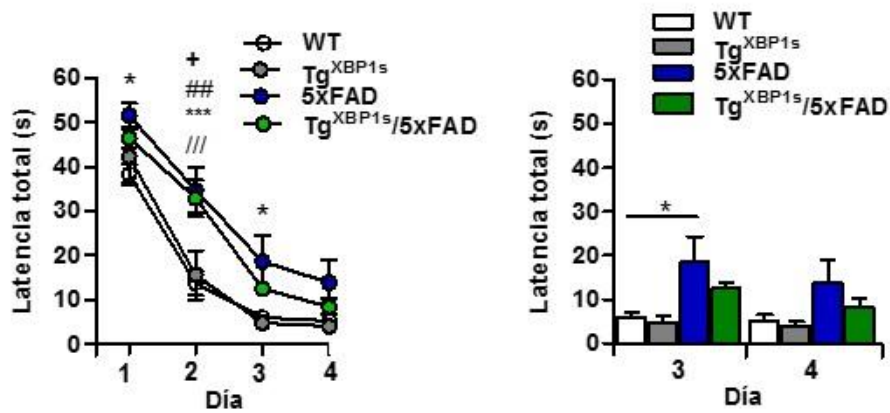
A**B**

Figura 21. Caracterización conductual de animales 5xFAD y TgXBP1s/5xFAD de 8 meses en laberinto Acuático de Morris. (A) Trayectoria y mapa de calor representativo de un animal del grupo WT y uno del grupo 5xFAD. **(B)** Curva de aprendizaje de los grupos experimentales durante los 4 días de entrenamiento. (WT, n = 11; Tg^{XBP1s}, n = 4; 5xFAD, n = 10; Tg^{XBP1s}/5xFAD, n = 7). Se detectaron diferencias estadísticamente significativas utilizando la prueba ANOVA de una y dos vías, según se requiriera (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Simbología: * = WT vs 5xFAD, # = TgXBP1s vs 5xFAD, + = TgXBP1s vs TgXBP1s/5xFAD; / = WT vs TgXBP1s/5xFAD.

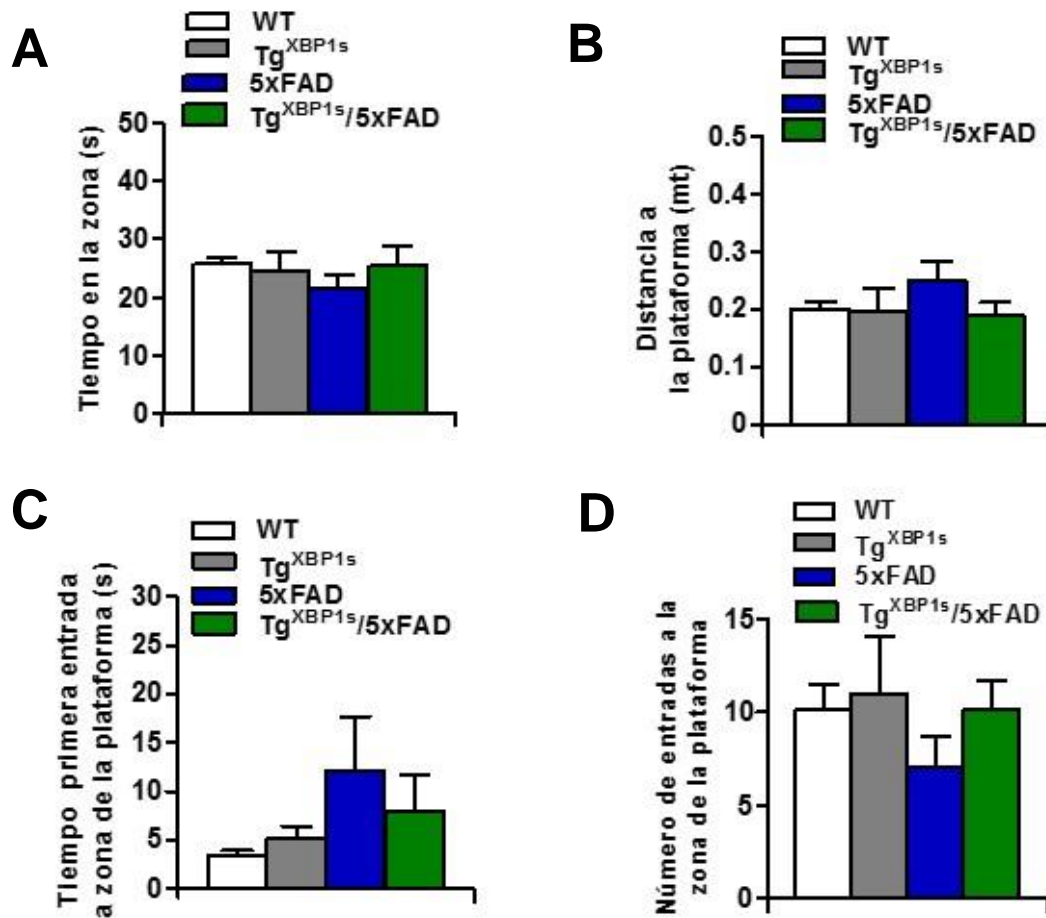


Figura 22. Análisis del 5° día de animales 5xFAD y Tg^{XBP1s}/5xFAD de 8 meses en laberinto Acuático de Morris. (A) Tiempo total del animal en el cuadrante objetivo. (B) Distancia promedio del animal hasta el lugar donde estaba la plataforma. (C) Tiempo que el animal demora en llegar por primera vez a la zona de la plataforma. (D) Número de entradas del animal a la zona donde se encontraba la plataforma. (WT, n = 11; Tg^{XBP1s}, n = 4; 5xFAD, n = 10; Tg^{XBP1s}/5xFAD, n = 7). Se utilizó la prueba de ANOVA de una vía, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas.

demostrado en trabajos anteriores, realizados en otros DCP, que la administración local de XBP1s, con una posterior expresión ectópica de los niveles de XBP1s, tiene un impacto en la modulación del curso la enfermedad (Valenzuela, Martinez et al. 2016).

Con estos antecedentes, y para evaluar el posible uso terapéutico de la sobreexpresión de XBP1s en la EA, realizamos un acercamiento preliminar, donde se administraron en el cerebro de ratones 5xFAD partículas de un virus adeno-asociado de serotipo 2 (AAV2) que contiene un casete de expresión de XBP1s, además de un casete de expresión de EGFP para poder detectar la transducción. Este virus se conoce como AAV2-XBP1s.

La entrega de este virus al cerebro de los animales la realizamos mediante inyecciones por cirugía estereotáxica, descrito anteriormente en materiales y métodos. Los animales fueron inyectados bilateralmente con 2 μ l de partículas de AAV2 en el hipocampo (región hipocampal CA1). De estos animales 5xFAD inyectamos dos grupos de animales: un grupo con el virus que contiene el casete de expresión de XBP1s (AAV2-XBP1s) y otro grupo con un virus que contiene el casete de EGFP solamente (AAV2-EGFP), el cual servirá como control. Las titulaciones virales fueron de 1.1×10^{13} y 9.33×10^{11} VG/ml, respectivamente.

Antes de inyectar a los grupos experimentales con el virus hicimos inyecciones de prueba para analizar la transducción del virus. Para esto, inyectamos un pequeño grupo de animales 5xFAD y WT de 40-57 días de vida tanto con AAV2-

XBP1s como con AAV2-EGFP en el hipocampo. Estos animales se sacrificaron al mes post-inyección, y observamos la transducción mediante la fluorescencia de EGFP. Se encontró que había transducción en las zonas hipocampales inyectadas. En la Figura 23 se muestran algunas fotos representativas del hipocampo de un animal 5xFAD y un animal $Tg^{XBP1s}/5xFAD$.

Posteriormente, y una vez verificada la transducción del virus, comenzamos con la inyección de nuestros animales experimentales 5xFAD. El esquema experimental fue el siguiente: dos grupos de animales 5xFAD fueron inyectados bilateralmente a los 50 días de vida. Uno de los grupos se inyectó con AAV2-XBP1s (titulación viral de 1.1×10^{13} Vg/ml) y el otro grupo se inyectó con AAV2-EGFP (titulación viral de 9.33×10^{11} VG/ml). Cuando los animales cumplieron 180 días de edad fueron puestos a prueba en el laberinto acuático de Morris. La línea temporal de este esquema experimental se encuentra representado en la Figura 24A. Los resultados obtenidos de la prueba del laberinto acuático no mostraron resultados relevantes en la curva de aprendizaje (Figura 24B), pero en el 5° día encontramos diferencias estadísticamente significativas. Pudimos ver que los animales 5xFAD inyectados con AAV2-XBP1s demoraron un menor tiempo en llegar al lugar donde se encontraba la plataforma en comparación con aquellos animales 5xFAD inyectados con el virus control, y que los animales 5xFAD inyectados con AAV2-XBP1s obtuvieron valores similares a los animales WT en el número de entradas a la zona de la plataforma, mientras que los

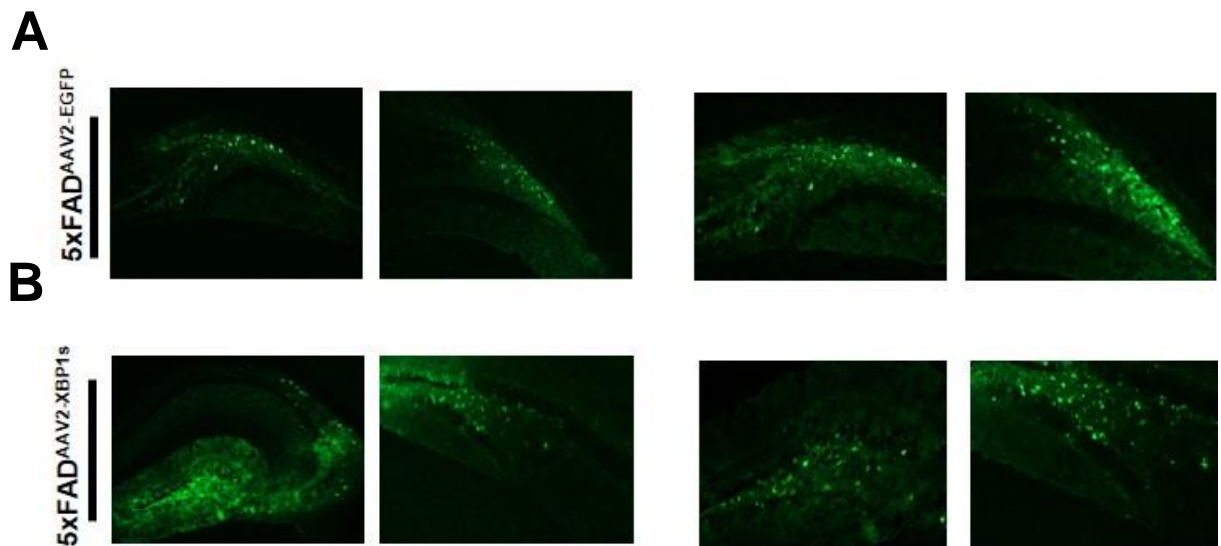


Figura 23. Transducción de virus AAV en el hipocampo de animales 5xFAD inyectados.

Nivel de transducción de los virus AAV2-XBP1s y AAV2-EGFP en animales 5xFAD de aproximadamente 3 meses, los cuales fueron inyectados a los 50 días de vida y sacrificados al mes post-inyección. **(A)** Transducción del virus AAV-XBP1s. **(B)** Transducción del virus AAV-EGFP.

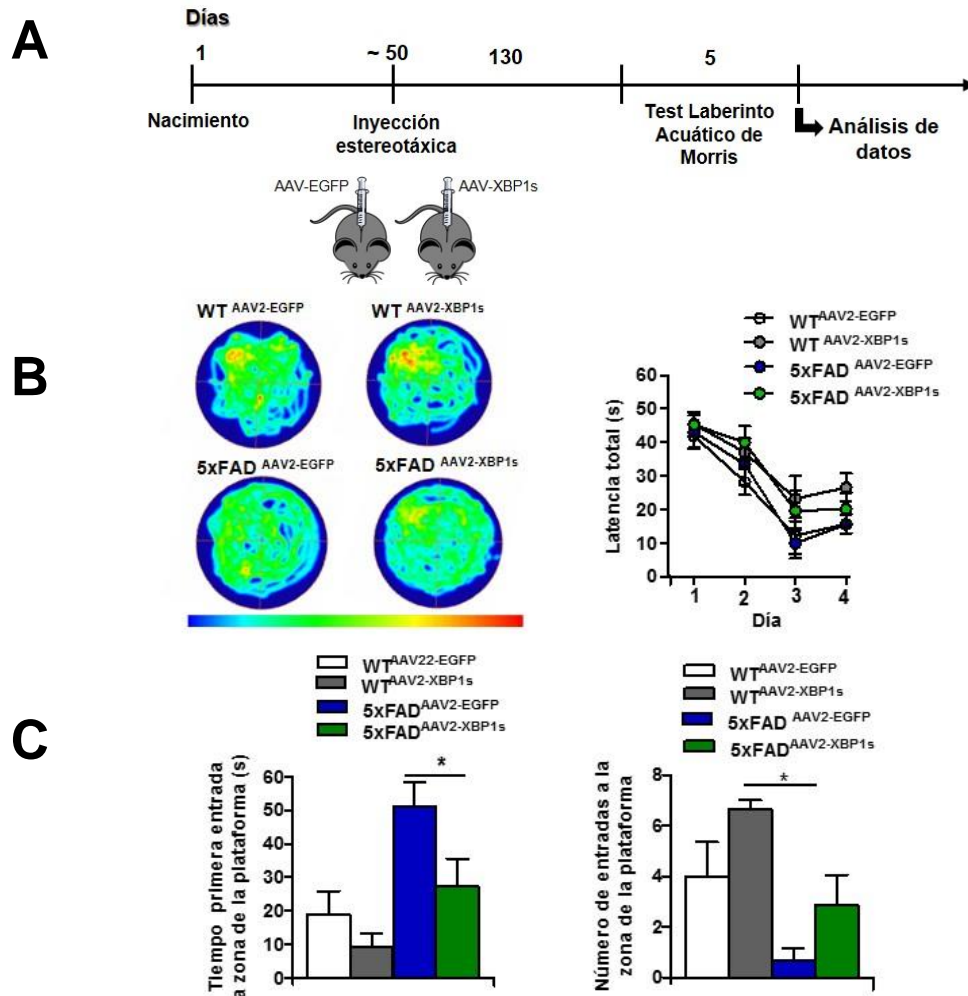


Figura 24. Análisis conductual de animales 5xFAD de 6 meses de edad inyectados con AAV2-XBP1s y AAV2-EGFP utilizando el laberinto Acuático de Morris. (A) Diseño experimental de inyecciones de AAVs. **(B)** Mapa de calor representativo de un animal de cada grupo experimental y curva de aprendizaje de los grupos experimentales durante el entrenamiento. **(C)** Gráfico del 5° día, tiempo que necesitó el animal para llegar a la zona de la plataforma y el número de entradas que hizo el animal a la zona de la plataforma (curva de aprendizaje: WT^{AAV/GFP}, n = 7; WT^{AAV/XBP1s}, n = 6; 5xFAD^{AAV/GFP}, n = 9; 5xFAD^{AAV/XBP1s}, n = 10. 5° día: WT^{AAV/GFP}, n = 4; WT^{AAV/XBP1s}, n = 3; 5xFAD^{AAV/GFP}, n = 6; 5xFAD^{AAV/XBP1s}, n = 7). Se detectaron diferencias estadísticamente significativas utilizando ANOVA de una y dos vías, según corresponda (**p* < 0.05).

animales 5xFAD inyectados con el virus control obtuvieron el menor número (Figura 24C).

Observamos que los animales WT a los que se inyectó con el virus AAV2-XBP1s tuvieron el mejor desempeño dentro de los grupos experimentales, demorando una menor cantidad de tiempo en llegar por primera vez a la zona de la plataforma y un mayor número de entradas a la zona de la plataforma (Figura 24C). Todos estos resultados sugieren que la administración local directa en el hipocampo de XBP1s podría revertir parcialmente el deterioro cognitivo propio del modelo de la EA utilizado.

Luego de esto, evaluamos el posible efecto de la administración local de AAV2-XBP1s sobre la formación y presencia de placas seniles. Cortes cerebrales de los animales 5xFAD inyectados con AAV2-XBP1s y AAV2-EGFP se tiñeron con el anticuerpo 4G8 para ver la agregación de β A, y cuantificamos la carga de 4G8 y el número de placas presentes en corteza, hipocampo y subículo en animales de 6 y 8 meses. No encontramos diferencias en la carga de 4G8 entre los animales 5xFAD inyectados con AAV2-XBP1s o AAV2-EGFP, lo que nos sugiere que la administración local de XBP1s no tiene un efecto en la reducción del número y densidad de placas seniles (Figuras 25 y 26).

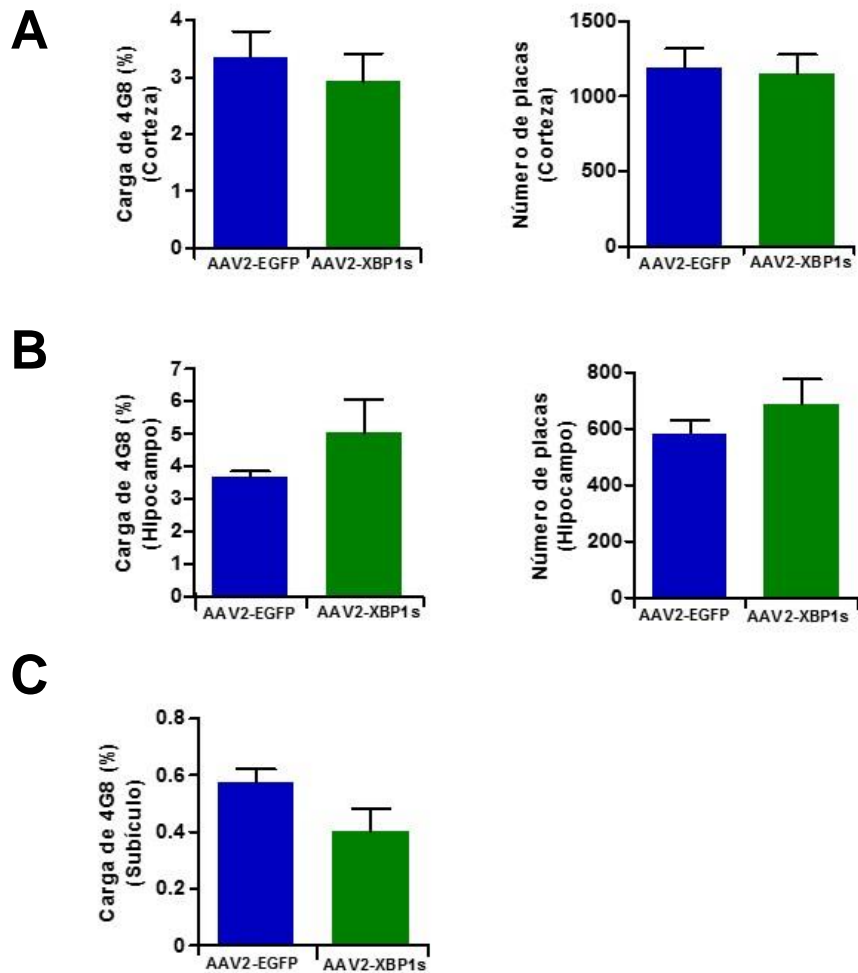


Figura 25. Cuantificación de placas amiloides de cerebros de animales 5xFAD de 6 meses inyectados con AAVs teñidas con el anticuerpo 4G8. (A) Cuantificación de la carga de 4G8 y número de placas en corteza de animales de 6 meses de edad. **(B)** Cuantificación de la carga de 4G8 y número de placas en hipocampo. **(C)** Cuantificación de la carga de 4G8 en subículo. Los datos corresponden al promedio \pm SEM de los distintos animales utilizados en cada grupo (5xFAD^{AAV/GFP}, n = 6; 5xFAD^{AAV/XBP1s}, n = 3). Se utilizó la prueba de t-Student, no detectándose diferencias estadísticamente significativas.

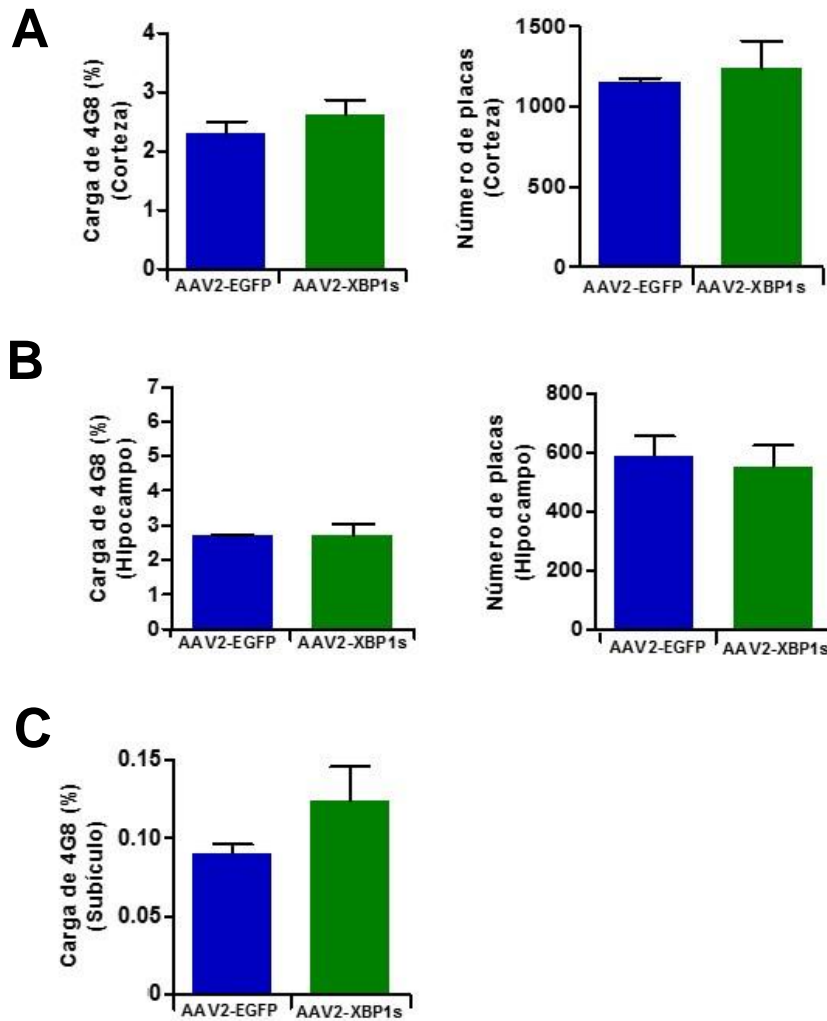


Figura 26. Cuantificación de placas amiloides en cerebros de animales 5xFAD de 8 meses inyectados con AAVs teñidos con el anticuerpo 4G8. (A) Cuantificación de la carga de 4G8 y número de placas en corteza. **(B)** Cuantificación de la carga de 4G8 y número de placas en hipocampo. **(C)** Cuantificación de la carga de 4G8 en subículo. Los datos corresponden al promedio \pm SEM de los distintos animales utilizados en cada grupo (5xFAD^{AAV/GFP}, n = 3; 5xFAD^{AAV/XBP1s}, n = 5). Se utilizó la prueba de t-Student, no detectándose diferencias estadísticamente significativas.

9. DISCUSIÓN

La EA es la enfermedad neurodegenerativa más frecuente a nivel mundial. Sin embargo, aún no existen terapias para un tratamiento efectivo. Los mecanismos responsables de esta enfermedad están comenzando a ser dilucidados, siendo el envejecimiento uno de los pilares principales de la enfermedad (López-Otín, Blasco et al. 2013, Kennedy, Berger et al. 2014). Desde hace un tiempo, la alteración de la red de proteostasis se ha posicionado como un factor relevante en las enfermedades neurodegenerativas que están relacionadas con un mal plegamiento proteico (Scheper and Hoozemans 2015, Smith and Mallucci 2016, Hetz and Saxena 2017). Al envejecer disminuye la capacidad de mantener la estabilidad y equilibrio de esta red, resultando en la aparición de estrés en el RE y agregación proteica (Labbadia and Morimoto 2015).

El estrés del RE está relacionado con un aumento en las proteínas mal plegadas y agregados proteicos. Así, una falla en la proteostasis puede contribuir a la acumulación anormal de depósitos amiloides y formación de ONFs, características de la EA (Kaushik and Cuervo 2015). A través de estudios *post mortem* de tejido cerebral humano se ha obtenido evidencia que indica una relación directa entre el estrés de RE y la EA (Scheper and Hoozemans 2015). Además de esto, se ha propuesto que XBP1s, un factor de transcripción participe

de la vía de UPR, ejerce un rol neuroprotector en modelos *in vivo* de la EA de *Drosophila melanogaster* (Zalk, Lehnart et al. 2007).

En esta memoria de título hemos investigado el posible rol de XBP1s en los niveles de placas amiloides y a nivel de disfunción cognitiva de un modelo murino de la EA conocido como 5xFAD. Nuestros resultados juntos sugieren que XBP1s participa en la patogénesis de la EA tanto a nivel neuropatológico como a nivel conductual. Pudimos evaluar el desempeño cognitivo de animales 5xFAD que sobreexpresan XBP1s, encontrando que no existen mayores diferencias en comparación a los animales 5xFAD sino hasta la edad de 8 meses, donde los animales que sobreexpresan XBP1s tuvieron un comportamiento más similar a los animales silvestres que a los animales 5xFAD. Todo esto sugiere que un aumento de la expresión de XBP1s en el área del hipocampo tiene un rol protector en el proceso de memoria en modelos experimentales de la EA.

En base a esto, y para investigar un posible rol terapéutico, administramos partículas virales que poseían un casete de expresión de XBP1s a animales 5xFAD para generar expresión ectópica de este factor de transcripción en animales adultos, evaluando su rendimiento cognitivo, además de los niveles de placas amiloides.

En relación a la administración local de XBP1s, los animales 5xFAD inyectados con el virus AAV2-XBP1s mejoraron su desempeño en el laberinto acuático de

Morris, obteniendo resultados similares a los animales silvestres, lo que indica una recuperación parcial de las capacidades de aprendizaje y memoria. Estos resultados se correlacionan con los resultados obtenidos en trabajos anteriores y, además, aportan información nueva acerca del rol de XBP1. XBP1s tiene un rol importante en la formación y consolidación de la memoria, y la presencia de este factor de transcripción mejora el desempeño en el aprendizaje y la memoria (Martinez, Vidal et al. 2016), por lo que una sobreexpresión de XBP1s permite compensar el deterioro cognitivo presente en modelos animales de Alzheimer, como se describió recientemente, utilizando otro modelo *in vivo* de la EA (Cissé, Duplan et al. 2016), tanto si es sobreexpresado por el mismo animal de forma endógena como si es inducido por inyecciones de virus adeno-asociados de manera exógena.

En cuanto al número y densidad de las placas amiloides, observamos que en aquellos animales 5xFAD que sobreexpresan XBP1s durante su desarrollo se produjo una disminución significativa en el número y la carga de placas amiloides, mientras que no se observó ningún cambio entre los animales inyectados con AAV2-XBP1s y aquellos tratados con el virus control. Esta diferencia en la disminución de placas relacionada con la manera en que se induce un aumento de la expresión de XBP1s en los animales 5xFAD se puede explicar por distintas razones. Primero que todo, es importante considerar que múltiples trabajos evidencian que no existe una correlación directa entre el nivel de

neurodegeneración y la carga de placas del péptido β A en la EA, aunque sí la hay en relación a los ONFs y pérdida sináptica (Mucke, Masliah et al. 2000, Dodart, Bales et al. 2002, De Strooper 2007, Morris, Clark et al. 2014). En base a esto, podemos concluir que el número y carga de placas amiloides y el rendimiento en pruebas de comportamiento no necesariamente presentan una relación directa, ya que XBP1s puede proteger por mecanismos no relacionados a la reducción de la agregación proteica; es decir, que una disminución en el nivel de placas amiloides no indica necesariamente que exista una mejora cognitiva y viceversa. Es importante considerar que, dentro de las posibles razones por las que no hay una reducción en el número de placas en los animales inyectados con AAV2-XBP1s y sí la haya en los animales que sobreexpresan XBP1s, el factor del error asociado a las distintas etapas de la entrega del virus: la concentración del virus inyectado, el porcentaje de transducción del mismo en el hipocampo y las coordenadas de inyección. Una ineficiente entrega del virus afectaría directamente en los niveles de XBP1s transducidos, y podrían no ser suficientes para ejercer una activación de los genes blanco de la UPR, pero suficientes para activar los genes de una vía independiente relacionada también con las capacidades cognitivas. También es posible que el método de inyección estereotáxico provocara alguna lesión en el tejido, comprometiendo la integridad del hipocampo debido al paso de la aguja de inyección. Una posible solución, y que es interesante evaluar, es realizar la administración del virus a través de otras vías. En trabajos anteriores se realizó la administración de un virus AAV en

ratones vía intraventricular, ya que a través de este método se logra un esparcimiento en la totalidad del cerebro, obteniéndose patrones de transducción neuronal mayores que los realizados por estereotaxis (Passini and Wolfe 2001, DeVos and Miller 2013).

En el trabajo realizado por Cissé, et. al. (Cissé, Duplan et al. 2016) , se demostró que la expresión exógena de XBP1s restaura las funciones cognitivas de memoria y aprendizaje en un modelo animal de la EA a través de Kalirina-7, una proteína importante en el proceso del crecimiento neuronal y desarrollo axonal que no está relacionada con la vía de la UPR (Chakrabarti, Lin et al. 2005). En este trabajo se midieron los niveles de péptido β A a través del método ELISA, encontrándose que los animales que expresaban ectópicamente XBP1s presentaban niveles menores del péptido que aquellos animales que no lo hacían. En otra investigación relacionada con el rol de XBP1s a nivel cognitivo, Martínez et. al. (Martinez, Vidal et al. 2016) descubrió recientemente que XBP1s tiene un rol en la formación de memoria mediante la regulación de BDNF, una neurotrofina que regula el desarrollo, la neuroplasticidad y la sinaptogénesis en el cerebro (Martínez, Vidal et al. 2016). Estos trabajos aportan evidencia de que XBP1s participa por más de una vía en los procesos de memoria y aprendizaje, por lo que no se puede descartar que la inyección de AAV2-XBP1s en la zona hipocampal de los animales 5xFAD active alguno de estos mecanismos independientes de UPR, y no así la vía de UPR que conlleva a la disminución de

la carga de placas amiloides. La sobreexpresión genética de XBP1s del modelo animal $Tg^{XBP1s}/5xFAD$ es un proceso que ha estado presente durante todo el desarrollo del animal, por lo que esta intervención tan temprana podría generar distintos fenotipos animales cuya regulación de la homeostasis proteica puede variar en comparación a la misma manera que lo haría un animal silvestre al cual se inyecta para expresar ectópicamente XBP1s en etapas más adultas, de 6 y 8 meses. Es por esto mismo que la forma en que XBP1s funciona como un neuroprotector en el modelo 5xFAD es distinto entre los animales $Tg^{XBP1s}/5xFAD$ y los animales 5xFAD inyectados con AAV2-XBP1s. Es posible que la acción de XBP1s de activar una u otra vía esté relacionada con la etapa en la que se induce un aumento en la expresión de XBP1s. Por ejemplo, se demostró recientemente que una deficiencia de IRE1 tiene un rol neuroprotector en los animales 5xFAD, aun cuando es la vía de IRE1 la que ante condiciones de estrés de RE genera la forma activa de XBP1, XBP1s (Duran-Aniotz, Cornejo et al. 2017). Las condiciones bajo las que XBP1s decide activar una vía o la otra no están dilucidados aún, y requieren ser investigadas a futuro, con el fin de explotar todo el potencial de este factor de transcripción como una posible terapia génica. Si se logran comprender las condiciones y estímulos en que XBP1s puede funcionar como un neuroprotector, y qué determina la vía que escogerá para realizar esto, se podría generar una terapia génica para pacientes con la EA que restaurara los déficits cognitivos en estadíos tardíos de la enfermedad, o incluso se podría detener la progresión de la enfermedad en etapas más tempranas al activar

específicamente la vía de la UPR para el restablecimiento de la proteostasis y detener así el proceso de neurodegeneración. Es por todo esto que XBP1s es un excelente candidato para ser utilizado para terapia génica

9. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en esta memoria de título nos permiten concluir las siguientes cosas:

- La sobreexpresión de XBP1s detiene el progreso del deterioro cognitivo en un modelo murino de EA que presenta disfunción cognitiva a los 8 meses de edad.
- La sobreexpresión de XBP1s en el modelo de la EA disminuye los agregados de β A en animales de 6 y 8 meses de edad.
- La expresión exógena de XBP1s a través de virus adeno-asociados detiene el progreso del deterioro cognitivo en animales de 6 meses en comparación con animales de la misma edad no inyectados con el virus, pero no disminuye la carga de agregados proteicos.

Estos resultados responden de forma positiva a nuestra tesis, indicando que una sobreexpresión de XBP1s en modelos de la EA puede detener el deterioro cognitivo característico de la enfermedad, además de reducir de manera significativa la cantidad de agregados de péptido β A. Además, los resultados sugieren que la inducción de la expresión de XBP1s en modelos adultos de 6 meses de un modelo murino de la EA mediante la administración local de XBP1s en hipocampo puede detener el deterioro

cognitivo, pero no así la cantidad de agregados, apuntando a una posible terapia génica futura, aunque requiere una mayor investigación futura.

10. PROYECCIONES FUTURAS

- Para seguir evaluando el rol de XBP1s en la EA, no sólo es importante evaluar la presencia y densidad de β A, ya que no constituyen un buen indicador del nivel de neurodegeneración, sino que es importante complementarlo con otros indicadores como por ejemplo el nivel de gliosis, muerte neuronal, sinapsis, entre otros.
- Debido a la participación como neuroprotector que tiene XBP1s en tantas vías independientes, se posiciona como un buen objetivo para terapia génica.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta-Alvear, D., Y. Zhou, A. Blais, M. Tsikitis, N. H. Lents, C. Arias, C. J. Lennon, Y. Kluger and B. D. Dynlacht (2007). "XBP1 controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks." Mol Cell **27**(1): 53-66.
- Alves, S., R. Fol and N. Cartier (2016). "Gene Therapy Strategies for Alzheimer's Disease: An Overview." Hum Gene Ther **27**(2): 100-107.
- Ballard, C., S. Gauthier, A. Corbett, C. Brayne, D. Aarsland and E. Jones (2011). "Alzheimer's disease." Lancet **377**(9770): 1019-1031.
- Biessels, G. J., L. J. Kappelle and G. Utrecht Diabetic Encephalopathy Study (2005). "Increased risk of Alzheimer's disease in Type II diabetes: insulin resistance of the brain or insulin-induced amyloid pathology?" Biochem Soc Trans **33**(Pt 5): 1041-1044.
- Brandt, R., M. Hundelt and N. Shahani (2005). "Tau alteration and neuronal degeneration in tauopathies: mechanisms and models." Biochim Biophys Acta **1739**(2-3): 331-354.
- Bucciantini, M., G. Calloni, F. Chiti, L. Formigli, D. Nosi, C. M. Dobson and M. Stefani (2004). "Prefibrillar amyloid protein aggregates share common features of cytotoxicity." J Biol Chem **279**(30): 31374-31382.
- Busciglio, J., D. H. Gabuzda, P. Matsudaira and B. A. Yankner (1993). "Generation of beta-amyloid in the secretory pathway in neuronal and nonneuronal cells." Proceedings of the National Academy of Sciences **90**(5): 2092-2096.
- Casas-Tinto, S., Y. Zhang, J. Sanchez-Garcia, M. Gomez-Velazquez, D. E. Rincon-Limas and P. Fernandez-Funez (2011). "The ER stress factor XBP1s prevents amyloid-beta neurotoxicity." Human molecular genetics **20**(11): 2144-2160.
- Castillo, K., V. Valenzuela, S. Matus, M. Nassif, M. Onate, Y. Fuentealba, G. Encina, T. Irrazabal, G. Parsons, F. A. Court, B. L. Schneider, D. Armentano and C. Hetz (2013). "Measurement of autophagy flux in the nervous system in vivo." Cell Death Dis **4**: e917.
- Cetin, A., S. Komai, M. Eliava, P. H. Seeburg and P. Osten (2006). "Stereotaxic gene delivery in the rodent brain." Nat Protoc **1**(6): 3166-3173.
- Cissé, M., E. Duplan, T. Lorivel, J. Dunys, C. Bauer, X. Meckler, Y. Gerakis, I. Lauritzen and F. Checler (2016). "The transcription factor XBP1s restores hippocampal synaptic plasticity and memory by control of the Kalirin-7 pathway in Alzheimer model." Molecular Psychiatry.
- Cleary, J. P., D. M. Walsh, J. J. Hofmeister, G. M. Shankar, M. A. Kuskowski, D. J. Selkoe and K. H. Ashe (2005). "Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function." Nature neuroscience **8**(1): 79-84.

Colombo, A., A. Bastone, C. Ploia, A. Scip, M. Salmona, G. Forloni and T. Borsello (2009). "JNK regulates APP cleavage and degradation in a model of Alzheimer's disease." Neurobiol Dis **33**(3): 518-525.

Colombo, A., M. Repici, M. Pesaresi, S. Santambrogio, G. Forloni and T. Borsello (2007). "The TAT-JNK inhibitor peptide interferes with beta amyloid protein stability." Cell Death Differ **14**(10): 1845-1848.

Costa-Mattioli, M., D. Gobert, H. Harding, B. Herdy, M. Azzi, M. Bruno, M. Bidinosti, C. Ben Mamou, E. Marcinkiewicz, M. Yoshida, H. Imataka, A. C. Cuello, N. Seidah, W. Sossin, J. C. Lacaille, D. Ron, K. Nader and N. Sonenberg (2005). "Translational control of hippocampal synaptic plasticity and memory by the eIF2alpha kinase GCN2." Nature **436**(7054): 1166-1173.

Costa-Mattioli, M., W. S. Sossin, E. Klann and N. Sonenberg (2009). "Translational control of long-lasting synaptic plasticity and memory." Neuron **61**(1): 10-26.

Chakrabarti, K., R. Lin, N. I. Schiller, Y. Wang, D. Koubi, Y.-X. Fan, B. B. Rudkin, G. R. Johnson and M. R. Schiller (2005). "Critical Role for Kalirin in Nerve Growth Factor Signaling through TrkA." Molecular and Cellular Biology **25**(12): 5106-5118.

Chen, A., I. A. Muzzio, G. Malleret, D. Bartsch, M. Verbitsky, P. Pavlidis, A. L. Yonan, S. Vronskaya, M. B. Grody, I. Cepeda, T. C. Gilliam and E. R. Kandel (2003). "Inducible enhancement of memory storage and synaptic plasticity in transgenic mice expressing an inhibitor of ATF4 (CREB-2) and C/EBP proteins." Neuron **39**(4): 655-669.

De Strooper, B. (2007). "Loss-of-function presenilin mutations in Alzheimer disease. Talking Point on the role of presenilin mutations in Alzheimer disease." EMBO Reports **8**(2): 141-146.

DeVos, S. L. and T. M. Miller (2013). "Direct Intraventricular Delivery of Drugs to the Rodent Central Nervous System." Journal of Visualized Experiments : JoVE(75): 50326.

Dodart, J. C., K. R. Bales, K. S. Gannon, S. J. Greene, R. B. DeMattos, C. Mathis, C. A. DeLong, S. Wu, X. Wu, D. M. Holtzman and S. M. Paul (2002). "Immunization reverses memory deficits without reducing brain Abeta burden in Alzheimer's disease model." Nat Neurosci **5**(5): 452-457.

Douglas, P. M. and A. Dillin (2010). "Protein homeostasis and aging in neurodegeneration." J Cell Biol **190**(5): 719-729.

Du, J., S. Duan, H. Wang, W. Chen, X. Zhao, A. Zhang, L. Wang, J. Xuan, L. Yu, S. Wu, W. Tang, X. Li, H. Li, G. Feng, Q. Xing and L. He (2008). "Comprehensive analysis of polymorphisms throughout GAD1 gene: a family-based association study in schizophrenia." J Neural Transm **115**(3): 513-519.

Duarte, C. A., T. Paneque, A. C. Ramírez, D. Casillas and C. Fernández-Ortega (2015). "From AZT to treatment as prevention. The evolution of antiretroviral therapy for HIV/AIDS." Biotechnología Aplicada **32**: 2101-2110.

Duran-Aniotz, C., V. H. Cornejo, S. Espinoza, Á. O. Ardiles, D. B. Medinas, C. Salazar, A. Foley, I. Gajardo, P. Thielen, T. Iwawaki, W. Scheper, C. Soto, A. G. Palacios, J. J. M. Hoozemans and C. Hetz (2017). "IRE1 signaling exacerbates Alzheimer's disease pathogenesis." *Acta Neuropathologica*: 1-18.

Duran-Aniotz, C., G. Martinez and C. Hetz (2014). "Memory loss in Alzheimer's disease: are the alterations in the UPR network involved in the cognitive impairment?" *Front Aging Neurosci* **6**: 8.

Duran-Aniotz, C., R. Morales, I. Moreno-Gonzalez, P. P. Hu, J. Fedynyshyn and C. Soto (2014). "Aggregate-depleted brain fails to induce Aβ deposition in a mouse model of Alzheimer's disease." *PLoS One* **9**(2): e89014.

Ferreira, S. T., M. V. Lourenco, M. M. Oliveira and F. G. De Felice (2015). "Soluble amyloid-β oligomers as synaptotoxins leading to cognitive impairment in Alzheimer's disease." *Frontiers in Cellular Neuroscience* **9**: 191.

Fewell, S. W., K. J. Travers, J. S. Weissman and J. L. Brodsky (2001). "The action of molecular chaperones in the early secretory pathway." *Annu Rev Genet* **35**: 149-191.

Goate, A., M. C. Chartier-Harlin, M. Mullan, J. Brown, F. Crawford, L. Fidani, L. Giuffra, A. Haynes, N. Irving, L. James and et al. (1991). "Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease." *Nature* **349**(6311): 704-706.

Gomez-Isla, T., T. Spires, A. De Calignon and B. T. Hyman (2008). "Neuropathology of Alzheimer's disease." *Handb Clin Neurol* **89**: 233-243.

Haan, M. N. (2006). "Therapy Insight: type 2 diabetes mellitus and the risk of late-onset Alzheimer's disease." *Nat Clin Pract Neuro* **2**(3): 159-166.

Haass, C., A. Y. Hung, M. Schlossmacher, D. B. Teplow and D. J. Selkoe (1993). "β-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms." *Journal of Biological Chemistry* **268**(5): 3021-3024.

Han, J., S. H. Back, J. Hur, Y.-H. Lin, R. Gildersleeve, J. Shan, C. L. Yuan, D. Krokowski, S. Wang, M. Hatzoglou, M. S. Kilberg, M. A. Sartor and R. J. Kaufman (2013). "ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death." *Nature cell biology* **15**(5): 481-490.

Harding, H. P., I. Novoa, Y. Zhang, H. Zeng, R. Wek, M. Schapira and D. Ron (2000). "Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells." *Mol Cell* **6**(5): 1099-1108.

Hetz, C., E. Chevet and H. P. Harding (2013). "Targeting the unfolded protein response in disease." *Nature Reviews. Drug discovery* **12**(9): 703-719.

Hetz, C., E. Chevet and S. A. Oakes (2015). "Proteostasis control by the unfolded protein response." *Nat Cell Biol* **17**(7): 829-838.

Hetz, C. and B. Mollereau (2014). "Disturbance of endoplasmic reticulum proteostasis in neurodegenerative diseases." *Nat Rev Neurosci* **15**(4): 233-249.

Hetz, C. and S. Saxena (2017). "ER stress and the unfolded protein response in neurodegeneration." *Nat Rev Neurol* **13**(8): 477-491.

Hetz, C., P. Thielen, S. Matus, M. Nassif, F. Court, R. Kiffin, G. Martinez, A. M. Cuervo, R. H. Brown and L. H. Glimcher (2009). "XBP-1 deficiency in the nervous system protects against amyotrophic lateral sclerosis by increasing autophagy." Genes Dev **23**(19): 2294-2306.

Hoozemans, J. J. and W. Scheper (2012). "Endoplasmic reticulum: the unfolded protein response is tangled in neurodegeneration." The International Journal of Biochemistry & Cell Biology **44**(8): 1295-1298.

Hoozemans, J. J., E. S. van Haastert, D. A. Nijholt, A. J. Rozemuller, P. Eikelenboom and W. Scheper (2009). "The unfolded protein response is activated in pretangle neurons in Alzheimer's disease hippocampus." Am J Pathol **174**(4): 1241-1251.

Iwatsubo, T., A. Odaka, N. Suzuki, H. Mizusawa, N. Nukina and Y. Ihara (1994). "Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43)." Neuron **13**.

Jarrett, J. T., E. P. Berger and P. T. Lansbury (1993). "The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease." Biochemistry **32**.

Kakiuchi, C., K. Iwamoto, M. Ishiwata, M. Bundo, T. Kasahara, I. Kusumi, T. Tsujita, Y. Okazaki, S. Nanko, H. Kunugi, T. Sasaki and T. Kato (2003). "Impaired feedback regulation of XBP1 as a genetic risk factor for bipolar disorder." Nature genetics **35**(2): 171-175.

Kaushik, S. and A. M. Cuervo (2015). "Proteostasis and aging." Nat Med **21**(12): 1406-1415.

Kennedy, B. K., S. L. Berger, A. Brunet, J. Campisi, A. M. Cuervo, E. S. Epel, C. Franceschi, G. J. Lithgow, R. I. Morimoto, J. E. Pessin, T. A. Rando, A. Richardson, E. E. Schadt, T. Wyss-Coray and F. Sierra (2014). "Aging: a common driver of chronic diseases and a target for novel interventions." Cell **159**(4): 709-713.

Kim, B., C. Y. Kim, M. J. Lee and Y. H. Joo (2009). "Preliminary evidence on the association between XBP1-116C/G polymorphism and response to prophylactic treatment with valproate in bipolar disorders." Psychiatry Res **168**(3): 209-212.

Kimberly, W. T., M. J. LaVoie, B. L. Ostaszewski, W. Ye, M. S. Wolfe and D. J. Selkoe (2003). "Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2." Proc Natl Acad Sci USA **100**.

Kojro, E. and F. Fahrenholz (2005). "The non-amyloidogenic pathway: structure and function of alpha-secretases." Subcell Biochem **38**: 105-127.

Kondo, T., M. Asai, K. Tsukita, Y. Kutoku, Y. Ohsawa, Y. Sunada, K. Imamura, N. Egawa, N. Yahata, K. Okita, K. Takahashi, I. Asaka, T. Aoi, A. Watanabe, K. Watanabe, C. Kadoya, R. Nakano, D. Watanabe, K. Maruyama, O. Hori, S. Hibino, T. Choshi, T. Nakahata, H. Hioki, T. Kaneko, M. Naitoh, K. Yoshikawa, S. Yamawaki, S. Suzuki, R. Hata, S. I. Ueno, T. Seki, K. Kobayashi, T. Toda, K. Murakami, K. Irie, W. L. Klein, H. Mori, T. Asada, R. Takahashi, N. Iwata, S.

Yamanaka and H. Inoue (2013). "Modeling Alzheimer's Disease with iPSCs Reveals Stress Phenotypes Associated with Intracellular Abeta and Differential Drug Responsiveness." Cell Stem Cell.

Kornfeld, R. and S. Kornfeld (1985). "Assembly of asparagine-linked oligosaccharides." Annu Rev Biochem **54**: 631-664.

Krstic, D. and I. Knuesel (2013). "Deciphering the mechanism underlying late-onset Alzheimer disease." Nat Rev Neurol **9**(1): 25-34.

Labbadia, J. and R. I. Morimoto (2015). "The Biology of Proteostasis in Aging and Disease." Annual review of biochemistry **84**: 435-464.

LaFerla, F. M., K. N. Green and S. Oddo (2007). "Intracellular amyloid-[beta] in Alzheimer's disease." Nat Rev Neurosci **8**(7): 499-509.

LaFerla, F. M., K. N. Green and S. Oddo (2007). "Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease." Nat Rev Neurosci **8**(7): 499-509.

Lee, A. H., N. N. Iwakoshi and L. H. Glimcher (2003). "XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response." Mol Cell Biol **23**(21): 7448-7459.

Lee, J. H., S. M. Won, J. Suh, S. J. Son, G. J. Moon, U. J. Park and B. J. Gwag (2010). "Induction of the unfolded protein response and cell death pathway in Alzheimer's disease, but not in aged Tg2576 mice." Exp Mol Med **42**(5): 386-394.

Lee, K., W. Tirasophon, X. Shen, M. Michalak, R. Prywes, T. Okada, H. Yoshida, K. Mori and R. J. Kaufman (2002). "IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response." Genes Dev **16**(4): 452-466.

Lee, V. M., M. Goedert and J. Q. Trojanowski (2001). "Neurodegenerative tauopathies." Annu Rev Neurosci **24**: 1121-1159.

Levy-Lahad, E., W. Wasco, P. Poorkaj, D. M. Romano, J. Oshima, W. H. Pettingell, C. E. Yu, P. D. Jondro, S. D. Schmidt, K. Wang and et al. (1995). "Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus." Science **269**(5226): 973-977.

Li, Y., Y. Guo, J. Tang, J. Jiang and Z. Chen (2014). "New insights into the roles of CHOP-induced apoptosis in ER stress." Acta Biochimica et Biophysica Sinica **46**(8): 629-640.

Liu, S. Y., W. Wang, Z. Y. Cai, L. F. Yao, Z. W. Chen, C. Y. Wang, B. Zhao and K. S. Li (2013). "Polymorphism -116C/G of Human X-box-Binding Protein 1 Promoter is Associated with Risk of Alzheimer's Disease." CNS neuroscience & therapeutics.

Lobo, A., L. J. Launer, L. Fratiglioni, K. Andersen, A. Di Carlo, M. M. Breteler, J. R. Copeland, J. F. Dartigues, C. Jagger, J. Martinez-Lage, H. Soininen and A. Hofman (2000). "Prevalence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group." Neurology **54**(11 Suppl 5): S4-9.

López-Otín, C., M. A. Blasco, L. Partridge, M. Serrano and G. Kroemer (2013). "The Hallmarks of Aging." Cell **153**(6): 1194-1217.

Ma, T., M. A. Trinh, A. J. Wexler, C. Bourbon, E. Gatti, P. Pierre, D. R. Cavener and E. Klann (2013). "Suppression of eIF2 α kinases alleviates Alzheimer's disease-related plasticity and memory deficits." Nat Neurosci **16**(9): 1299-1305.

Ma, T., M. A. Trinh, A. J. Wexler, C. Bourbon, E. Gatti, P. Pierre, D. R. Cavener and E. Klann (2013). "Suppression of eIF2 α kinases alleviates AD-related synaptic plasticity and spatial memory deficits." Nature neuroscience **16**(9): 1299-1305.

Maartens, G., C. Celum and S. R. Lewin "HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention." The Lancet **384**(9939): 258-271.

Maly, D. J. and F. R. Papa (2014). "Druggable sensors of the unfolded protein response." Nat Chem Biol **10**(11): 892-901.

Mandela, P. and X. M. Ma (2012). "Kalirin, a key player in synapse formation, is implicated in human diseases." Neural Plast **2012**: 728161.

Mardones, P., G. Martinez and C. Hetz (2014). "Control of systemic proteostasis by the nervous system." Trends Cell Biol.

Martinez, G., R. L. Vidal, P. Mardones, F. G. Serrano, A. O. Ardiles, C. Wirth, P. Valdes, P. Thielen, B. L. Schneider, B. Kerr, J. L. Valdes, A. G. Palacios, N. C. Inestrosa, L. H. Glimcher and C. Hetz (2016). "Regulation of Memory Formation by the Transcription Factor XBP1." Cell Rep.

Martínez, G., René L. Vidal, P. Mardones, Felipe G. Serrano, Alvaro O. Ardiles, C. Wirth, P. Valdés, P. Thielen, Bernard L. Schneider, B. Kerr, Jose L. Valdés, Adrian G. Palacios, Nibaldo C. Inestrosa, Laurie H. Glimcher and C. Hetz (2016). "Regulation of Memory Formation by the Transcription Factor XBP1." Cell Reports **14**(6): 1382-1394.

McCullough, K. D., J. L. Martindale, L.-O. Klotz, T.-Y. Aw and N. J. Holbrook (2001). "Gadd153 Sensitizes Cells to Endoplasmic Reticulum Stress by Down-Regulating Bcl2 and Perturbing the Cellular Redox State." Molecular and Cellular Biology **21**(4): 1249-1259.

McGeer, P. L. and E. G. McGeer (2007). "NSAIDs and Alzheimer disease: epidemiological, animal model and clinical studies." Neurobiol Aging **28**(5): 639-647.

Moreno-Gonzalez, I. and C. Soto (2011). "Misfolded Protein Aggregates: Mechanisms, Structures and Potential for Disease Transmission." Seminars in cell & developmental biology **22**(5): 482-487.

Morris, G. P., I. A. Clark and B. Vissel (2014). "Inconsistencies and Controversies Surrounding the Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease." Acta Neuropathologica Communications **2**: 135.

Morris, R. (1984). "Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat." J Neurosci Methods **11**(1): 47-60.

Mucke, L., E. Masliah, G. Q. Yu, M. Mallory, E. M. Rockenstein, G. Tatsuno, K. Hu, D. Kholodenko, K. Johnson-Wood and L. McConlogue (2000). "High-level

neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation." J Neurosci **20**(11): 4050-4058.

Mucke, L. and D. J. Selkoe (2012). "Neurotoxicity of amyloid beta-protein: synaptic and network dysfunction." Cold Spring Harb Perspect Med **2**(7): a006338.

Näslund, J., A. Schierhorn, U. Hellman, L. Lannfelt, A. D. Roses, L. O. Tjernberg, J. Silberring, S. E. Gandy, B. Winblad and P. Greengard (1994). "Relative abundance of Alzheimer A beta amyloid peptide variants in Alzheimer disease and normal aging." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **91**(18): 8378-8382.

O'Connor, T., K. R. Sadleir, E. Maus, R. A. Velliquette, J. Zhao, S. L. Cole, W. A. Eimer, B. Hitt, L. A. Bembinster, S. Lammich, S. F. Lichtenthaler, S. S. Hebert, B. De Strooper, C. Haass, D. A. Bennett and R. Vassar (2008). "Phosphorylation of the translation initiation factor eIF2alpha increases BACE1 levels and promotes amyloidogenesis." Neuron **60**(6): 988-1009.

Oakley, H., S. L. Cole, S. Logan, E. Maus, P. Shao, J. Craft, A. Guillozet-Bongaarts, M. Ohno, J. Disterhoft and L. Van Eldik (2006). "Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation." J Neurosci **26**.

Oñate, M., A. Catenaccio, G. Martínez, D. Armentano, G. Parsons, B. Kerr, C. Hetz and F. A. Court (2016). "Activation of the unfolded protein response promotes axonal regeneration after peripheral nerve injury." Scientific Reports **6**: 21709.

Pasinelli, P. and R. H. Brown (2006). "Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics." Nat Rev Neurosci **7**(9): 710-723.

Passini, M. A. and J. H. Wolfe (2001). "Widespread Gene Delivery and Structure-Specific Patterns of Expression in the Brain after Intraventricular Injections of Neonatal Mice with an Adeno-Associated Virus Vector." Journal of Virology **75**(24): 12382-12392.

Regan, C., C. Katona, Z. Walker, J. Hooper, J. Donovan and G. Livingston (2006). "Relationship of vascular risk to the progression of Alzheimer disease." Neurology **67**(8): 1357-1362.

Reiman, E. M. and R. J. Caselli (1999). "Alzheimer's disease." Maturitas **31**(3): 185-200.

Reinhard, C., S. S. Hébert and B. De Strooper (2005). "The amyloid- β precursor protein: integrating structure with biological function." The EMBO Journal **24**(23): 3996-4006.

Reinhardt, S., F. Schuck, S. Grosgen, M. Riemenschneider, T. Hartmann, R. Postina, M. Grimm and K. Endres (2014). "Unfolded protein response signaling by transcription factor XBP-1 regulates ADAM10 and is affected in Alzheimer's disease." FASEB J **28**(2): 978-997.

Ritchie, K. and S. Lovestone (2002). "The dementias." Lancet **360**(9347): 1759-1766.

Ron, D. and P. Walter (2007). "Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(7): 519-529.

Ryoo, S. R., H. J. Cho, H. W. Lee, H. K. Jeong, C. Radnaabazar, Y. S. Kim, M. J. Kim, M. Y. Son, H. Seo, S. H. Chung and W. J. Song (2008). "Dual-specificity tyrosine(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A-mediated phosphorylation of amyloid precursor protein: evidence for a functional link between Down syndrome and Alzheimer's disease." J Neurochem **104**(5): 1333-1344.

Schellenberg, G. D., T. D. Bird, E. M. Wijsman, H. T. Orr, L. Anderson, E. Nemens, J. A. White, L. Bonnycastle, J. L. Weber, M. E. Alonso and et al. (1992). "Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14." Science **258**(5082): 668-671.

Scheper, W. and J. J. Hoozemans (2015). "The unfolded protein response in neurodegenerative diseases: a neuropathological perspective." Acta Neuropathol **130**(3): 315-331.

Schwarz, D. S. and M. D. Blower (2016). "The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling." Cellular and Molecular Life Sciences **73**: 79-94.

Selkoe, D. J. (2001). "Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy." Physiol Rev **81**(2): 741-766.

Shankar, G. M., S. Li, T. H. Mehta, A. Garcia-Munoz, N. E. Shepardson, I. Smith, F. M. Brett, M. A. Farrell, M. J. Rowan, C. A. Lemere, C. M. Regan, D. M. Walsh, B. L. Sabatini and D. J. Selkoe (2008). "Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory." Nat Med **14**(8): 837-842.

Shoji, M., N. Iwakami, S. Takeuchi, M. Waragai, M. Suzuki, I. Kanazawa, C. F. Lippa, S. Ono and H. Okazawa (2000). "JNK activation is associated with intracellular beta-amyloid accumulation." Brain Res Mol Brain Res **85**(1-2): 221-233.

Shore, G. C., F. R. Papa and S. A. Oakes (2011). "Signaling cell death from the endoplasmic reticulum stress response." Curr Opin Cell Biol **23**(2): 143-149.

Sidrauski, C., D. Acosta-Alvear, A. Khoutorsky, P. Vedantham, B. R. Hearn, H. Li, K. Gamache, C. M. Gallagher, K. K. Ang, C. Wilson, V. Okreglak, A. Ashkenazi, B. Hann, K. Nader, M. R. Arkin, A. R. Renslo, N. Sonenberg and P. Walter (2013). "Pharmacological brake-release of mRNA translation enhances cognitive memory." Elife **2**: e00498.

Smith, H. L. and G. R. Mallucci (2016). "The unfolded protein response: mechanisms and therapy of neurodegeneration." Brain **139**(Pt 8): 2113-2121.

Soto, C. and L. D. Estrada (2008). "Protein misfolding and neurodegeneration." Arch Neurol **65**(2): 184-189.

Stefanova, N. A., N. A. Muraleva, E. E. Korbolina, E. Kiseleva, K. Y. Maksimova and N. G. Kolosova (2015). "Amyloid accumulation is a late event in sporadic

Alzheimer's disease-like pathology in nontransgenic rats." Oncotarget **6**(3): 1396-1413.

Stutzbach, L. D., S. X. Xie, A. C. Naj, R. Albin, S. Gilman, V. M. Lee, J. Q. Trojanowski, B. Devlin and G. D. Schellenberg (2013). "The unfolded protein response is activated in disease-affected brain regions in progressive supranuclear palsy and Alzheimer's disease." Acta Neuropathol Commun **1**: 31.

Takasugi, N., T. Tomita, I. Hayashi, M. Tsuruoka, M. Niimura, Y. Takahashi, G. Thinakaran and T. Iwatsubo (2003). "The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex." Nature **422**.

Turner, P. R., K. O'Connor, W. P. Tate and W. C. Abraham (2003). "Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory." Prog Neurobiol **70**(1): 1-32.

Urra, H., E. Dufey, F. Lisbona, D. Rojas-Rivera and C. Hetz (2013). "When ER stress reaches a dead end." Biochim Biophys Acta **1833**(12): 3507-3517.

Valdes, P., G. Mercado, R. L. Vidal, C. Molina, G. Parsons, F. A. Court, A. Martinez, D. Galleguillos, D. Armentano, B. L. Schneider and C. Hetz (2014). "Control of dopaminergic neuron survival by the unfolded protein response transcription factor XBP1." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(18): 6804-6809.

Valenzuela, V., E. Collyer, D. Armentano, G. B. Parsons, F. A. Court and C. Hetz (2012). "Activation of the unfolded protein response enhances motor recovery after spinal cord injury." Cell Death Dis **3**: e272.

Valenzuela, V., G. Martinez, C. Duran-Aniotz and C. Hetz (2016). "Gene therapy to target ER stress in brain diseases." Brain Res **1648**(Pt B): 561-570.

Vassar, R., D. M. Kovacs, R. Yan and P. C. Wong (2009). "The beta-secretase enzyme BACE in health and Alzheimer's disease: regulation, cell biology, function, and therapeutic potential." J Neurosci **29**.

Viana, R. J., A. F. Nunes and C. M. Rodrigues (2012). "Endoplasmic Reticulum Enrollment in Alzheimer's Disease." Mol Neurobiol.

Viana, R. J., A. F. Nunes and C. M. Rodrigues (2012). "Endoplasmic reticulum enrollment in Alzheimer's disease." Mol Neurobiol **46**(2): 522-534.

Vicens, P., R. Redolat and M. D. C. Carrasco (2003). "Aprendizaje espacial y laberinto de agua: metodología y aplicaciones." Psicothema **15**(4): 539-544.

Vidal, R. L., A. Figueroa, F. A. Court, P. Thielen, C. Molina, C. Wirth, B. Caballero, R. Kiffin, J. Segura-Aguilar, A. M. Cuervo, L. H. Glimcher and C. Hetz (2012). "Targeting the UPR transcription factor XBP1 protects against Huntington's disease through the regulation of FoxO1 and autophagy." Hum Mol Genet **21**(10): 2245-2262.

Vogel, J., V. S. Anand, B. Ludwig, S. Nawoschik, J. Dunlop and S. P. Braithwaite (2009). "The JNK pathway amplifies and drives subcellular changes in tau phosphorylation." Neuropharmacology **57**(5-6): 539-550.

Vorhees, C. V. and M. T. Williams (2006). "Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory." Nat. Protocols **1**(2): 848-858.

Vossel, K. A., K. Zhang, J. Brodbeck, A. C. Daub, P. Sharma, S. Finkbeiner, B. Cui and L. Mucke (2010). "Tau reduction prevents Abeta-induced defects in axonal transport." Science **330**(6001): 198.

Walter, P. and D. Ron (2011). "The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation." Science **334**(6059): 1081-1086.

Yoshida, H., T. Matsui, A. Yamamoto, T. Okada and K. Mori (2001). "XBP1 mRNA Is Induced by ATF6 and Spliced by IRE1 in Response to ER Stress to Produce a Highly Active Transcription Factor." Cell **107**(7): 881-891.

Younkin, S. G. (1998). "The role of A β 42 in Alzheimer's disease." Journal of Physiology-Paris **92**(3): 289-292.

Yu, M.-S., K.-C. Suen, N.-S. Kwok, K.-F. So, J. Hugon and R. Chuen-Chung Chang (2006). "Beta-amyloid peptides induces neuronal apoptosis via a mechanism independent of unfolded protein responses." Apoptosis **11**(5): 687-700.

Zalk, R., S. E. Lehnart and A. R. Marks (2007). "Modulation of the ryanodine receptor and intracellular calcium." Annu Rev Biochem **76**: 367-385.

Zinszner, H., M. Kuroda, X. Wang, N. Batchvarova, R. T. Lightfoot, H. Remotti, J. L. Stevens and D. Ron (1998). "CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum." Genes & Development **12**(7): 982-995.

Zuleta, A., R. L. Vidal, D. Armentano, G. Parsons and C. Hetz (2012). "AAV-mediated delivery of the transcription factor XBP1s into the striatum reduces mutant Huntingtin aggregation in a mouse model of Huntington's disease." Biochem Biophys Res Commun **420**(3): 558-563.