



**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**  
**BACTERIOLOGIA Y LABORATORIO CLINICO**  
**BOGOTA D.C**  
**2020**

**IMPLEMENTACIÓN DE TECNOLOGÍA CRISPR/CAS9 APLICADA EN**  
***CAENORHABDITIS ELEGANS* COMO POSIBLE OPCIÓN TERAPÉUTICA PARA**  
**LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**  
**REVISIÓN DOCUMENTAL**

**JURADOS**

Nelson Arturo Salazar Buitrago

Mauricio Humberto Rodríguez Panduro

**ASESOR**

Ruth Mélida Sánchez Mora. MSc, PhD



**IMPLEMENTACIÓN DE TECNOLOGÍA CRISPR/CAS9 APLICADA EN  
*CAENORHABDITIS ELEGANS* COMO POSIBLE OPCIÓN TERAPÉUTICA PARA  
LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER  
REVISIÓN DOCUMENTAL**

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO  
BOGOTÁ D.C  
2020



**IMPLEMENTACIÓN DE TECNOLOGÍA CRISPR/CAS9 APLICADA EN  
*CAENORHABDITIS ELEGANS* COMO POSIBLE OPCIÓN TERAPÉUTICA PARA  
LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER  
REVISIÓN DOCUMENTAL**

DANIEL GUSTAVO NEIRA MORA

Trabajo presentado como requisito para optar por el título de Bacteriólogo y  
Laboratorista Clínico

ASESORA INTERNA

Ruth Mélida Sánchez Mora. MSc, PhD.

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

BOGOTA D.C

2020

*“Se puede pensar que la mente es el reflejo del estado y presencia del alma en una persona. En mi búsqueda de teorías, al parecer, el fin de la vida no es la única vía para que la mente se apague y el alma pueda volar libremente. Algunos al parecer son “elegidos” para alcanzar ese fin de manera gradual; Su mente se va apagando y su alma progresivamente va liberándose de las cadenas y adquiriendo la capacidad de volar. Al final, solo queda ese “cascaron” biológico hecho de átomos formados alguna vez en el corazón de una estrella agonizante. Dichos átomos quizá, pasaran a conformar otro organismo, con nuevas cadenas que encarcelaran otra alma durante el transcurso de un nuevo ciclo biológico”.*

*Daniel Neira*

### **DEDICATORIA**

*Dedico este trabajo principalmente a mi madre: Isabel Mora, fuente de inspiración y fuerza durante mi carrera y durante mi vida. Su espíritu y mente nobles me enseñaron a ser un humano sabio, un humano feliz y a soñar siempre, sin importar cuan adversa pueda ser la vida. Aunque su mente deje de soñar, la mía soñara por los dos, hasta el día en que estemos juntos para siempre*

*A mis hermanas, cuyo apoyo y consejo apropiados guiaron mis pensamientos tristes a ser transformados en pensamientos felices y positivos.*

*A mi tía: Stella Piñeros, quien es y será mi regalo de vida más valioso. Su apoyo y maternal arrullo, me han guiado a tener valentía y astucia en cada paso que he dado en mi vida.*

*A mi asesora de grado: Ruth Sánchez, por ser una docente enfocada en no solo transmitir conocimientos, sino también en enseñar a sus estudiantes a pensar de manera constructiva e inteligente ante cualquier situación de la vida. Me enseñó a ser un profesional integro y a actuar con ética y prudencia en cada paso.*

*Por último, a la Ciencia misma. Fuente de conocimiento y mi más anhelado camino a seguir durante cada día de mi vida.*

## RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la demencia más común, caracterizada por la disminución gradual y progresiva de la memoria y la cognición, una raíz de distintos mecanismos, siendo la formación de proteína  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) el proceso más conocido. En Colombia no existen datos epidemiológicos actualizados, por lo que resulta imposible acceder a un dato preciso de esta enfermedad. Tras 25 años no se ha obtenido un tratamiento eficaz y dilucidar los mecanismos de la enfermedad, ha sido una tarea difícil dada la complejidad del cerebro humano, por esta razón, el modelado de la EA en animales con estructuras nerviosas conocidas ofrece grandes avances. *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) es un nematodo de vida libre ampliamente utilizado como modelo neurobiológico, dado que su genoma contiene un 60% de similitud con el genoma humano. CRISPR/Cas9 ha sido la herramienta de edición genética más revolucionaria desde su descubrimiento en Arqueas. El sistema CRISPR tipo II (Cas9) es por mucho, la tecnología mejor desarrollada para editar cualquier gen, esto lo convierte en una alternativa con potencial terapéutico en EA. Conociendo las hipótesis de la cascada amiloide, Presenilinas y enfoque de matriz APP como principales hipótesis de EA, es posible determinar el papel en la progresión de EA que tiene genes como APP, PSEN, ApoE, SORL1, ABCA7 entre otros. Esto permite modelar  $A\beta$ , APP y Tau en cepas de *C. elegans*, para identificar estrategias terapéuticas de CRISPR/Cas9; Ya sea en el aclaramiento de  $A\beta$  o corrigiendo mutaciones ya conocidas implicadas en EA.

**Palabras claves:** CRISPR/Cas9, *Caenorhabditis elegans*, Alzheimer,  $A\beta$ , Tau

## ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is the most common dementia, characterized by the gradual and progressive decrease in memory and cognition, a root of the loss of neurons due to the action of different mechanisms, the formation of  $\beta$ -amyloid protein ( $A\beta$ ) being the mechanism better known. In Colombia there are no updated epidemiological data, making it impossible to access accurate data on this disease. After 25 years, an effective treatment has not been obtained and elucidating the mechanisms of the disease, it has been a difficult task, due to the complexity of the human brain, for this reason, the modeling of AD in animals with known nerve structures offers great advances. *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) is a nematode widely used as a neurobiological model, since its genome contains 60% similarity to the human genome. CRISPR / Cas9 has been the most revolutionary genetic editing tool since its discovery in Archaeas. The CRISPR type II system (Cas9) is by far the best developed technology to edit any gene, this makes it an alternative with therapeutic potential in AD. Knowing the hypotheses of the amyloid cascade, Presenilins and APP matrix approach as the main hypotheses of EA, it is possible to determine the role in the progression of EA that has genes such as APP, PSEN, ApoE, SORL1, ABCA7 among others. This allows to model  $A\beta$ , APP and Tau in strains of *C. elegans*, to identify therapeutic strategies of CRISPR / Cas9; Either in  $A\beta$  clearance or by correcting known mutations involved in EA.

**Key Word:** CRISPR/Cas9, *Caenorhabditis elegans*, Alzheimer,  $A\beta$ , Tau

## CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	13
2. ANTECEDENTES	15
3. MARCO TEÓRICO	18
3.1 <i>Caenorhabditis elegans</i>	18
3.1.1 Ciclo de vida y desarrollo	19
3.1.2 Utilidad de <i>C. elegans</i> en investigación	21
3.2 Demencias y Enfermedad de Alzheimer	23
3.2.1 Etiología de las demencias	23
3.2.2 Clasificación de las demencias	24
3.3 Enfermedad de Alzheimer	25
3.3.1 Fisiopatología de la EA	27
3.3.2 Fase bioquímica de la EA	28
3.3.3 Fase celular de EA	35
3.4 Edición genética	38
5.1 CRISPR/Cas9	44
5.1.1 Estructura del Operón Cas y la matriz CRISPR	46
5.1.2 CRISPR TIPO II (Cas9)	47
5.2 Potencial de CRISPR/Cas9 en tratamiento de EA.	48
5.3 Hipótesis de EA	50
5.3.1 Hipótesis de la cascada amiloide	50
5.3.2 Hipótesis de la presenilina	51
5.3.3 Enfoque de la matriz APP	51
5.4 Genes implicados en la EA	52
5.5 Modelado de la EA en <i>C. elegans</i> y genes implicados	54
5.5.1 Modelado de A $\beta$ en musculo	55
5.5.2 Modelado de Tau	56
5.6 Terapéutica usando CRISPR/CAS9 en EA Y <i>C. elegans</i>	60
5.6.1 Aclaramiento de proteínas responsables de EA en <i>C. elegans</i>	60
5.6.2 Corrección de mutaciones responsables de EA en <i>C. elegans</i>	62
6. DISCUSIÓN	64
7. CONCLUSIONES	68
8. BIBLIOGRAFÍA	69

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Estructura anatómica del hermafrodita y el macho adultos de <i>C. elegans</i> . .....	20
Figura 2. Ciclo de vida de <i>C. elegans</i> .....	21
Figura 3. Esquema de transgénesis por inyección de línea germinal en <i>C. elegans</i> . .....	22
Figura 4. Ovillos neurofibrilares (NFTs) dibujados por Alois Alzheimer.....	26
Figura 5. Tinción con carbonato de plata amoniacal de una zona de la corteza cerebral en un paciente post-mortem con EA. ....	27
Figura 6. Esquema de vías de procesamiento proteolítico de la proteína precursora amiloide APP. ....	29
Figura 7. Esquema estructural y funcional de la proteína Tau. ....	31
Figura 8. Estructura del microtúbulo su asociación con Tau. ....	32
Figura 9. Estructura de ApoE humana y sus diferentes isoformas.....	34
Figura 10. Tres principales sistemas de edición genética. ....	40
Figura 11. Clasificación de referencias usadas en todo el trabajo. ....	42
Figura 12. Distribución de referencias en porcentaje respecto a cada tema expuesto en los resultados .....	43
Figura 13. Distribución de referencias en porcentaje respecto a cada tema expuesto en CRISPR.....	43
Figura 14. Distribución de referencias en porcentaje respecto a cada tema expuesto en EA. ....	43
Figura 15. Distribución de referencias en porcentaje respecto a cada tema expuesto en <i>C. elegans</i> . ....	44
Figura 16. Organización del operón Cas y la matriz CRISPR, componentes de un sistema CRISPR tipo I presente en <i>Escherichia coli</i> . ....	46
Figura 17. Esquema estructural del sistema CRISPR tipo II (CRISPR/Cas9).....	48
Figura 18. Diagrama de hipótesis de EA.....	50
Figura 19. Características fisiológicas medibles en modelos de <i>C. elegans</i> para EA. .....	55



Figura 20. Visualización de los mecanismos de aclaramiento neuronal y toxicidad mediada por A $\beta$ .....	56
Figura 21. Visualización de los efectos de expresión de Tau en neuronas Gabaérgicas y mecanosensoriales de C. elegans usando como marcador GFP. ...	57
Figura 22. Gráfico de porcentaje de genes de C. elegans ortólogos a genes de EA. ....	58
Figura 23. Ensayo de quimiotaxis en cepas de C. elegans que expresan los genes AQP4 y LRP1 de manera independiente y conjunta .....	62
Figura 24. Ensayo de velocidad promedio de cepas de C. elegans que expresan los genes AQP4 y LRP1 de manera independiente y conjunta .....	62
Figura 25. Implementación de CRISPR/Cas9 en la edición de la mutación PSEN2-N141I presente en neuronas colinérgicas derivadas de iPSC .....	63
Figura 26. Diagrama de enlace entre cada uno de los campos abordados en esta revisión.....	67

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las demencias adoptada a partir de la CIE-10 OMS. ....	25
Tabla 2. Clasificación de genes relacionados con EA en base a su rol y método de descubrimiento. ....	54
Tabla 3. Genes representativos en EA con su respectivo ortólogo de <i>C. elegans</i> y la posible función genética asociada a este. ....	59
Tabla 4. Cepas representativas de los diferentes tipos de modelado de EA en <i>C. elegans</i> . ....	60

## 1. INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es la forma de demencia más común presente a nivel mundial, caracterizada por ser una patología de tipo neurodegenerativa que afecta diferentes áreas de la memoria y la conciencia, a razón de la pérdida progresiva e irreversible de neuronas colinérgicas principalmente. La causa de esta enfermedad predomina en base a la hipótesis de la cascada amiloide, la cual plantea que diversas mutaciones en genes provocan la formación y posterior acumulación de proteína A $\beta$  en Placas seniles (“Senile Plaques” SP), junto con la formación de Ovillos neurofibrilares (“Neurofibrillary tangles” NFTs) en placas neuríticas. Estos factores desencadenan diferentes mecanismos celulares y moleculares que al final conllevan a la lisis o apoptosis de neuronas colinérgicas principalmente (20).

Con base a la edad de aparición, la EA fue clasificada en dos tipos: EA de inicio temprano y en EA de inicio tardío. La EA de inicio temprano a pesar de representar la menor cantidad de casos (cerca del 2%), es la más estudiada y se conoce con gran detalle sus causas y heredabilidad genética que sigue patrones mendelianos. La EA de inicio tardío es la de mayor incidencia, siendo la forma presente en cerca del 98 – 99% de los casos a nivel mundial. Diversos estudios han demostrado la importancia de diferentes genes en su aparición, por lo cual es la forma de Alzheimer más estudiada por múltiples empresas y laboratorios alrededor del mundo (22).

Después de 25 años de desarrollo farmacológico buscando frenar o revertir la enfermedad, no se ha obtenido un tratamiento efectivo, lo cual abre el debate de un nuevo enfoque terapéutico. Peor aún, esta enfermedad se ha convertido en un serio desafío para todos los sistemas de salud del mundo debido a su desproporcionada tasa de incidencia, siendo Colombia un país donde se presenta un elevado crecimiento de casos a medida que la esperanza de vida de la población aumenta (29)

Desafortunadamente, en Colombia son pocos los estudios que reportan la frecuencia o carga económica generada por la EA. Sin embargo, un estudio de la universidad ICESI informo una estimación de la enfermedad: Para el año 2005,

216380 colombianos mayores de 60 años tenían algún tipo de demencia, siendo el 70% de los casos, demencia por EA. Para el 2020 se estima en Colombia un total de 342956 personas con demencia, siendo un total de 258498, casos de EA. En este punto, la terapia génica mediante técnicas de edición genética como el sistema CRISPR/Cas9, ofrecen un nuevo camino y esperanza en la búsqueda de un tratamiento (27).

Debido a la complejidad del sistema nervioso central (SNC) mamífero, la fisiopatología y los pocos marcadores de progreso, el abordaje sistémico de esta enfermedad resulta bastante complejo. Estas razones han llevado a la búsqueda y uso de diferentes modelos animales que permitan el estudio detallado de la enfermedad. Aun en mamíferos pequeños como ratones, la complejidad y la falta de conocimientos respecto a la estructura y función cerebral limita en gran parte la investigación. *C. elegans*, es un nematodo cuyo genoma y estructura neuronal se conocen por completo, su tamaño reducido, ciclo de vida corto y genes ortólogos con los humanos brindan a este nematodo, las características de un modelo de estudio neurobiológico ideal. Gracias a la investigación en *C. elegans* se ha podido definir algunas posibles estrategias que frenen o eviten la aparición de la enfermedad, basadas en la edición genética (60). En la presente revisión se exponen algunas de las oportunidades o posibles opciones terapéuticas que nos brinda la edición genética mediante el uso de tecnología CRISPR/Cas9 aplicado en el modelo de estudio neurobiológico *C. elegans*, útiles para el tratamiento de la EA humana.

Para lograr este objetivo se realizó una revisión de artículos publicados en los últimos años en y reportados en diferentes bases de datos, se seleccionaron los que mencionaban el uso de tecnología CRISPR/Cas9 en la EA, así como su uso o aplicación en el modelo de *C. elegans*, donde se determinen las oportunidades terapéuticas que nos brinda esta herramienta y que permiten revertir, frenar o evitar el desarrollo y progreso de la EA. A partir de aquí, se describen los orígenes y estructura del sistema CRISPR, las hipótesis de la EA más estudiadas, las mutaciones genéticas y genes implicados, que representan un punto clave o una diana terapéutica con potencial aplicable. De igual forma, se identifican aquellos modelos transgénicos de *C. elegans* que permiten evidenciar in vivo la expresión

proteínas de importancia para EA, con ello, se establece la utilidad de la tecnología CRISPR en perspectivas relacionadas al desarrollo de terapias o tratamientos útiles en EA.

## 2. ANTECEDENTES

Byerly L. et al (1976) Realiza la primera descripción detallada del ciclo de vida del nematodo *C. elegans*. Aquí se exponen los estudios del como el nematodo pasa por todos sus estadios en base a diversas condiciones ambientales, entre las cuales, la temperatura y la disponibilidad de recursos son los más importantes al generar cambios en los estadios del nematodo. También se detalla el ciclo y tiempos de reproducción del nematodo a diferentes temperaturas ambientales.

Kenyon C. et al (1988) Realiza una publicación donde detalla el proceso de diferenciación celular durante las etapas larvarias de *C. elegans*. Kenyon dilucida con mayor detalle aquellos mecanismos de diferenciación celular, algunos genes importantes en el desarrollo y enfoques celulares individuales a fin de estudiar la anatomía detallada del nematodo. Gracias a esta publicación, se tiene un perfil más detallado de la anatomía de *C. elegans*.

Schafer WR. et al (2005) Publica un estudio donde expone la relación de genes y el comportamiento del nematodo, a fin de comprender el papel de cada una de las neuronas de *C. elegans* en todos los diferentes procesos de comportamiento y aprendizaje, datos que permiten desarrollar modelos predictivos para comenzar a modelar patologías humanas en modelos mamíferos más complejos y poco conocidos a la fecha.

Coghlan A. (2005) realiza una revisión detallada y bastante completa de todos aquellos conocimientos recopilados por diferentes autores e investigaciones, dando a conocer detalles poco conocidos de la anatomía, estructura y diferenciación celular, genética y modelado de enfermedades en el nematodo a partir de procesos de transgénesis, los cuales comenzaban a ganar fuerza en el campo de la investigación.

Praitis V. et al (2006) presenta en su investigación, una novedosa técnica para generar modelos transgénicos de *C. elegans* mediante el bombardeo de gónadas usando micropartículas con genes de interés. Aunque en ese momento no era una metodología muy extendida, Praitis demostró que esa técnica ofrecía resultados más eficientes, que los métodos tradicionales de transgénesis en *C. elegans*.

Gregorio. P et al (2006) brinda la entrada a un tema algo controversial y cuya definición se ha ido modelando a lo largo del tiempo en base a los descubrimientos científicos. La demencia en la actualidad abarca un número de enfermedades originadas por diferentes causas pero que conllevan casi siempre al desarrollo de una sintomatología común en quienes desarrollan este síndrome. En este aspecto es importante no solo diferenciar las principales demencias, si no también es importante realizar un correcto diagnóstico diferencial con el fin de brindar soporte o un tratamiento que ayude a mejorar la calidad de vida de quienes padecen demencia.

Lee. M et al en (2009) hace una revisión detallada de los factores de riesgo más comunes en los casos de demencias, que a diferencia de años atrás se consideraba como único factor de importancia la edad. Hoy en día se sabe que la edad, aunque es un factor de riesgo importante, no es el único y que junto a otros determinan el inicio y progreso a lo largo del tiempo de las demencias. En este contexto ya se aclara que la demencia es el concepto macro que abarca un sin número de enfermedades neurodegenerativas.

Gazes Y, et al (2012) comienza mencionando la historia de la enfermedad, descubierta hacia el año de 1906 por un médico alemán gracias al estudio de una paciente de edad con problemas de memoria, desorientación espaciotemporal y pérdida gradual de funciones mentales junto con anomalías a nivel cerebral, el cual sería el primer indicio de la proteína A $\beta$ ; Dicha enfermedad sería nombrada en honor a su descubridor.

Castellani RJ, et al (2014) publica una revisión que proporciona una ventana a la patología y patogenia conocida de la EA en los cerebros humanos respecto a características neuropatológicas determinadas por la presencia de proteína A $\beta$  en SP y Tau en NFTs provenientes de proteínas estructurales celulares con cambios

químicos y moleculares, además de mencionar un aspecto importante en la degeneración neuronal producto del de cambios importantes en la producción y metabolismo de neurotransmisores.

Merino EN, et al (2015) realiza una destacable publicación en español en la cual hace énfasis en la hipótesis de la cascada A $\beta$  con el fin de buscar o desarrollar biomarcadores capaces de adelantar el diagnóstico de la enfermedad a fases más precoces con el fin de brindar tratamiento u ofrecer una mejor esperanza a los pacientes. Bajo este concepto el autor plantea una revisión conceptual de la EA ya que no se debe considerar como un tipo de demencia sino una entidad clínica y biológica independiente que comienza en una fase asintomática y termina como demencia grave en un tiempo estimado de unos 20-30 años.

Tekeuchi Y. et al (2015) publica uno de los pocos estudios epidemiológicos que se tienen en Colombia respecto a la EA. Tekeuchi menciona datos en número de pacientes en el año 2005 y predice un aumento bastante considerable de casos de demencias para el 2020, siendo la EA, la de mayor peso en el sistema de salud.

Selkoe DJ, et al (2016) escribe y publica una revisión respecto a la hipótesis amiloide tras 25 años de investigación científica y ensayo de fármacos diseñados para tratar de frenar o evitar la formación de placas de proteína A $\beta$  ya sea enfocando su eje de acción en las proteasas encargadas de escindir la proteína precursora amiloide o en la protección de las neuronas respecto a las respuestas inflamatorias activadas producto de la acumulación de A $\beta$ .

De Strooper B, et al (2016) Brinda una importante revisión correspondiente a una mejor comprensión de la EA desde el conocimiento de la biología molecular, la fisiopatología y la bioquímica. Todo esto en base al estudio del cerebro como un complejo contexto celular. en donde las neuronas, la microglía, la astrogliá y finalmente, los oligodendrocitos contribuyen a una fase celular compleja de la enfermedad que evoluciona durante décadas, y cómo las reacciones benignas iniciales finalmente se vuelven crónicas, lo que resulta en una falla irreversible del cerebro.

Hooli, B. et al (2016) Publica uno de los estudios más completos respecto a la base genética de la EA, teniendo en cuenta los genes que ya se conocían, junto con los nuevos genes de riesgo que se han descubierto a través de estudios de secuenciación de genoma completo GWAS, realizados por diferentes instituciones a nivel mundial. También deja en tela de juicio, como el factor genético es lo que debe representar los nuevos enfoques investigativos.

Por último: Kanchiswamy, CN. et al (2016) expone las técnicas de la nueva generación en el campo de la edición genética, y como la edición genética representa una verdadera revolución no solo en el tratamiento de enfermedades incurables, sino también en la investigación con microorganismos y otros organismos vivientes, para obtener recursos o mejorar los procesos a nivel ecológico e incluso industrial. Las técnicas de edición genética conocidas hasta la fecha, son desglosadas, dando entrada al campo de CRISPR/Cas9, objetivo de este trabajo.

### **3. MARCO TEÓRICO**

#### **3.1 *Caenorhabditis elegans***

De todos los modelos de estudio animal con especial enfoque hacia el campo de las neurociencias y otras enfermedades de tipo genético, *C. elegans* representa uno de los mejores modelos debido a las múltiples ventajas que ofrece respecto a su fácil cultivo, ciclo de vida corto y reproducción hermafrodita (1). La investigación con *C. elegans* recae mayoritariamente a los estudios realizados por Sydney Brenner en 1974. El doctor Brenner y otros investigadores aislaron una gran cantidad de cepas mutantes de *C. elegans* las cuales muestran diversas modificaciones morfológicas en comparación con el nematodo de tipo salvaje (1).

*C. elegans* fue inicialmente seleccionado como modelo de estudio gracias a la búsqueda de un organismo multicelular que permitiera su análisis con facilidad y resolución amplia, características que hasta un tiempo fueron exclusivas de los microorganismos. Todo este proceso llevó a obtener un mapa genético detallado, así como el desarrollo de métodos para su análisis genético, descripción completa



de sus células durante el desarrollo embrionario y un detallado conocimiento de su anatomía (1,2).

Existen varias razones por las cuales *C. elegans* es sin duda un excelente modelo de estudios genéticos. Primero: toma alrededor de 3 días poder realizar un cruce genético en *C. elegans*. Segundo: Su producción es mayoritariamente por autofecundación, lo que permite obtener cepas con mutaciones homocigotas. Tercero: Este modelo puede ser congelado, permitiendo mantener cepas mutadas de manera indefinida. Cuarto: El cuerpo del nematodo es transparente a durante todas las etapas de su desarrollo, lo que permite visualizar en microscopía óptica muchos de los eventos y cambios que ocurren en tiempo real. Por último: *C. elegans* involucra mecanismos bioquímicos y moleculares conservados en todo el reino animal (1,2).

Desde el punto de vista ecológico, los nematodos son los organismos más abundantes del reino animal. Se estima que los nematodos podrían oscilar entre 40000 y 10000000 especies. Son los organismos del reino animal mejor adaptados, variando desde zonas árticas, hábitats marinos hasta parasitando tejidos de animales y plantas (3). *C. elegans* pertenece a la familia *Rhabditidae*, siendo un nematodo de vida libre no parasitario que vive en ambientes cálidos y generalmente ricos en materia orgánica y fuentes de agua. Su alimentación está basada en el consumo de bacterias (3,4).

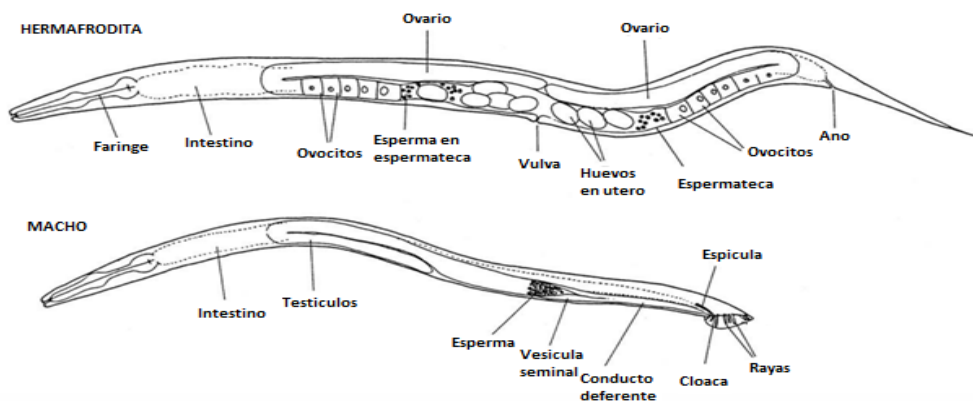
### **3.1.1 Ciclo de vida y desarrollo**

Al ser un organismo de vida libre, *C. elegans* existe como parte de la microfauna del suelo, alimentándose de las bacterias que prosperan producto de la descomposición de materia orgánica. En el laboratorio, su dieta basada en cultivos de *Escherichia coli* le permiten desarrollarse y pasar cada una de sus etapas en apenas 3 días a una temperatura de 25°C (4,5).

Existen dos sexos en *C. elegans*; El hermafrodita autofertilizante con dos cromosomas X (XX) y el macho con un solo cromosoma X (X0). Los hermafroditas son básicamente hembras modificadas que, a lo largo de la evolución, lograron adaptarse para generar un crecimiento rápido de la población. Generalmente la

mayor cantidad de individuos son hermafroditas, ya que los machos surgen a partir de una deleción de un cromosoma X, caso que se da en 1 de cada 500 individuos nuevos (5).

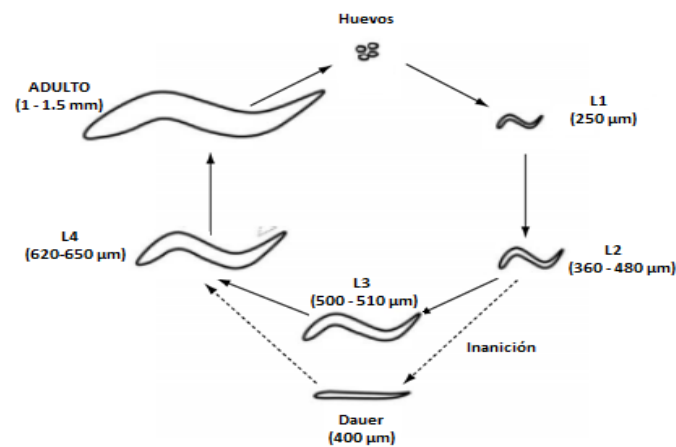
El ciclo de vida de *C. elegans* es simple. Comienza en los hermafroditas adultos autofértiles, los cuales contienen espermatozoides ameboides y ovocitos. Los ovocitos fecundados se desarrollan algunas horas en el útero. Cada hermafrodita coloca aproximadamente 330 huevos los cuales eclosionan 9 horas después completar su desarrollo embrionario a 25°C larvas de primera etapa o larvas L1. Las larvas L1 son larvas de 0,15 mm de largo conformadas por 558 células somáticas (554 machos). En esta etapa las larvas tienen la mayoría de órganos y sistemas presentes en adultos, excepto por los órganos reproductivos. Tras alimentarse, la larva comienza a crecer y desarrollar sus órganos sexuales.



**Figura 1.** Estructura anatómica del hermafrodita y el macho adultos de *C. elegans*. Los hermafroditas miden entre 1 y 1.5 mm, teniendo sus estructuras reproductivas completamente desarrolladas. Los machos son más pequeños. Recuperado de *C. elegans*. Encyclopedia of Genetics. 2001

El paso de larva L1 a L2, L3, L4 y adulto se realiza en un tiempo de 10 horas aproximadamente entre cada etapa, finalizando en un organismo adulto, con una vida de entre 14 y 21 días aproximadamente. Existe una etapa alterna en el ciclo de vida denominada larva Dauer (del alemán dauer = duraderas) (Figura 2). Las larvas dauer son larvas alternas a las larvas L3 y L2 que se desarrollan a causa de condiciones medioambientales adversas como hacinamiento o privación de nutrientes (5,6). Son una adaptación evolutiva de resistencia ya que, en esta etapa, las larvas pueden permanecer viables incluso varios meses hasta que las condiciones mejoren, madurando directamente a la etapa L4 (5).

Las larvas adultas miden un máximo de 1.5 mm (hermafroditas) con un total de 959 células somáticas distribuidas en tejidos y sistemas bien diferenciados, son sexualmente funcionales, siendo los hermafroditas los únicos capaces de autofecundarse y por ende la mayor cantidad de individuos de la población. Su genoma ha sido secuenciado, teniendo un tamaño de 97 megabases (5-8).



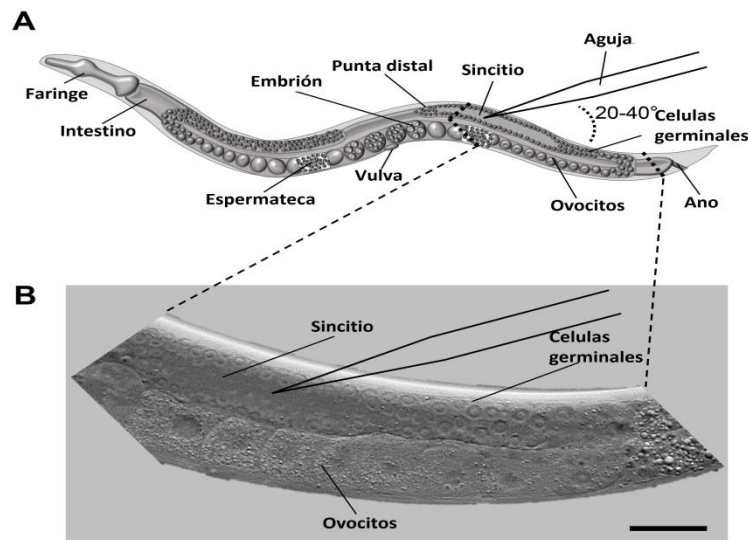
**Figura 2.** Ciclo de vida de *C. elegans*. Su desarrollo desde su etapa de huevo hasta el gusano adulto transcurre en apenas 3 semanas. Recuperado y modificado de: *C. elegans*. Encyclopedia of Genetics. 2001

### 3.1.2 Utilidad de *C. elegans* en investigación

El abordaje de enfermedades requiere imitar los cambios o alteraciones genéticas bases de cada enfermedad o reproducir los patrones moleculares y proteicos conocidos durante el transcurso y desarrollo de una patología. Una de las ventajas más importantes que ofrece *C. elegans* como modelo animal de investigación, es permitir la reproducción de estos fenotipos ya sea mediante la mutación de genes conservados a través de la evolución en el nematodo o mediante la inserción y expresión de DNA exógeno mediante transgénesis a fin de expresar proteínas humanas o animales que no se encuentran en el nematodo (9,10).

La inducción de mutaciones en *C. elegans* es una de las primeras formas de obtener cambios a nivel genético para estudiar algunas patologías. Aunque hay varios métodos, el más común y generalizado es la inducción de mutaciones por métodos químicos que producen rupturas en las hebras de DNA y aprovechando los mecanismos de reparación celular, obtener mutaciones, generalmente a partir de la aparición de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP). Sin embargo, muchas

veces no se conoce el fenotipo producto de la expresión génica e incluso algunas mutaciones parecen no tener un impacto fenotípico significativo en las cepas estudiadas. La inserción de DNA exógeno en *C. elegans* se realiza mediante procesos de transgénesis (10,11). La transgénesis en *C. elegans* se popularizó mediante el método de inyección de línea germinal, en el cual se micro inyecta el DNA exógeno directamente en los hermafroditas adultos (Figura 3).



**Figura 3.** Esquema de transgénesis por inyección de línea germinal en *C. elegans*. En la imagen se observan los órganos principales y el sitio de microinyección del DNA exógeno donde son visibles los núcleos de las células germinales. Recuperado de: Generation of *C. elegans* Transgenic Animals by DNA Microinjection. Bio-protocol. 2017

El DNA micro inyectado se incorpora al genoma de los ovocitos en desarrollo y una vez obtenida la progenie F1, esta se estudia para determinar la expresión de los genes inducidos. A pesar de esto, el genoma incorporado muchas veces no se transmite a las progenes con un 100% de fidelidad, por lo que se puede dificultar la interpretación de los patrones de expresión génica. (10-12). A raíz de esto se han ido perfeccionando este método mediante diversas modificaciones que aumentan el porcentaje de transmisión de la matriz génica inducida. No obstante, métodos mucho más avanzados y eficientes han ido apareciendo a lo largo del tiempo. Uno de los más estudiados es el método de transgénesis mediante el bombardeo de micropartículas gracias a su facilidad técnica y eficacia en comparación con los métodos tradicionales. (12-14)

### **3.2 Demencias y Enfermedad de Alzheimer**

La palabra demencia proviene del latín “*demens*” o “*dementiae*” (mens= mente - ia= cualidad) lo cual se traduce como “cualidad de salirse de su mente”. Es un término que ha sido implementado desde la antigüedad y se ha ido moldeando a lo largo del tiempo. Cuando se habló por primera vez del término “demencia senil”, este buscaba abarcar todas aquellas personas que desarrollaban alteraciones cognitivas y conductuales en edades avanzadas lo cual fue considerado como una consecuencia directa e incluso normal del proceso de envejecimiento del SNC (15). Sin embargo, existen casos en los cuales dicha sintomatología aparece en edades tempranas y no se podía explicar la razón dentro del concepto de demencia, eso llevó a los investigadores a reformular las bases del concepto de demencia y a investigar mejor su causa. Para comienzo del siglo XXI la demencia ya representaba un serio problema de salud a nivel mundial, cuyo efecto recaía con más peso sobre los países desarrollados debido a un aumento explosivo en la cantidad de casos cada año (15).

Actualmente, la demencia se entiende como un síndrome cuyo síntoma central es la pérdida de un nivel de conciencia normal y cuya base puede abarcar diferentes patologías que pueden estar relacionadas entre sí. Una característica importante es que casi todas las enfermedades de tipo neurodegenerativo conllevan al desarrollo demencia. Muchos de estos procesos neurodegenerativos tienen algo importante en común, la polimerización aberrante de proteínas importantes para el normal funcionamiento SNC (15,16).

#### **3.2.1 Etiología de las demencias**

Las diferentes enfermedades que conllevan al desarrollo de demencia tienen etiologías distintas entre cada una de ellas, sin embargo, hay ejes en común y que se sabe, son claves en la aparición de demencia en personas de edad avanzada. La causa indiscutiblemente radica en la polimerización u otra alteración aberrante en diferentes proteínas, cuya causa radica en cambios, polimorfismos o mutaciones genéticas, pero sin excluir totalmente otras causas como lo son enfermedades infecciosas de tipo viral o priónica, factores ambientales y otras enfermedades subyacentes (15,16).

### 3.2.2 Clasificación de las demencias

La clasificación de demencias más aceptada por la comunidad médica y científica se basa en la publicación CIE-10 (clasificación internacional de enfermedades, 10.<sup>a</sup> edición) realizada por la organización mundial de la salud y que se encuentra vigente hasta el año 2022. En esta clasificación, las demencias son divididas en tres clases dependiendo de su enfermedad de base, las zonas del cerebro comprometidas y/o el origen del daño celular (Tabla 1). (15-17).

Las demencias primarias corresponden al mayor número de enfermedades de base en todos los casos de demencia, entre ellas la demencia cortical conocida como EA es la más representativa seguida de la demencia subcortical, enfermedad de Parkinson. Estas demencias generalmente son provocadas por una serie de factores entre los cuales destacan cambios o alteraciones de tipo genético, la mayoría de veces hereditarios. Las demencias primarias por lo general suelen ser bastante agresivas con el deterioro cognitivo, cognoscitivo y psicosocial de quien la padece, llevando a la persona a un punto de dependencia total con consecuencias fisiológicas que deterioran rápidamente el estado del cuerpo hasta llegar finalmente a la muerte (16).

Las demencias vasculares, aunque son una causa menor de los casos de demencia, suelen tener mejor pronóstico debido a que algunas de ellas incluso pueden llegar a tratarse sin consecuencias importantes para el paciente. Su base radica en la muerte neuronal derivada de procesos isquémicos o hemorrágicos y su pronóstico depende del tiempo de atención médica o tratamiento suministrado a fin de frenar la necrosis celular.

Las demencias secundarias, aunque son menos comunes, normalmente son producto de otras enfermedades de base ya existentes, infecciones adquiridas o hábitos que pueden detectarse a tiempo con el fin de mejorar la calidad de vida de la persona y prevenir la aparición temprana de la demencia (16-18).

DEMENCIAS PRIMARIAS	DEMENCIAS VASCULARES	DEMENCIAS SECUNDARIAS
Predominio Cortical	- Demencia Multiinfarto	- Metabólica: encefalopatía urémica, hepática.
- Enfermedad de Alzheimer	- Demencia por infarto único	- Carencial: tiamina, ácido nicotínico, ácido fólico y vitamina B12.
- Demencia frontotemporal		
- Otras degeneraciones focales corticales	- Enfermedad de	

Predominio Subcortical	pequeños vasos	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Degeneración Corticobasal</li> <li>- Demencia con cuerpos de Lewy</li> <li>- Parálisis supranuclear progresiva.</li> <li>- Enfermedad de Parkinson</li> <li>- Enfermedad de Huntington</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Demencia por hipoperfusión</li> <li>- Demencia hemorrágica</li> <li>- Otros Mecanismos vasculares.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Endocrina: insuficiencia hipofisaria, hipo e hiperparatiroidismo, hipotiroidismo, insuficiencia suprarrenal y síndrome de Cushing.</li> <li>- Infecciosas: bacterias, micosis, vírica y priones.</li> <li>- Mecanismo expansivo cerebral: tumor cerebral e hidrocefalia normotensiva.</li> <li>- Fármacos,</li> <li>- Tóxicos: alcohol, toxinas orgánicas, metales pesados.</li> <li>- Postraumática.</li> <li>- Enfermedades del colágeno: sarcoidosis, bechet, lupus eritematoso sistémico y esclerodermia.</li> <li>- Enfermedades por depósito: porfiria, leucodistrofias, enfermedad por depósito de lípidos.</li> </ul>

**Tabla 1.** Clasificación de las demencias adoptada a partir de la CIE-10 OMS. Recuperado de DEMENCIA. Sociedad Española de Geriatria y Gerontología. Madrid: International Marketing & Communication, S.A.; 2006

### 3.3 Enfermedad de Alzheimer

El nombre de EA hace honor a quien actualmente es reconocido por consenso como su descubridor, el médico neuropatólogo alemán, Alois Alzheimer. Alzheimer identificó la enfermedad por primera vez en el año de 1906 tras el estudio post-mortem del cerebro de una mujer de 51 años llamada Auguste, quien había presentado síntomas de demencia en sus últimos años de vida. Tras el estudio de muestras del tejido cerebral, Alzheimer describió por primera vez la presencia de (SP) y (NFTs) (Figura 4) formadas por una sustancia que no se identificó hasta años después gracias al desarrollo de la genómica y la proteómica (19).



**Figura 4.** Ovillos neurofibrilares (NFTs) dibujados por Alois Alzheimer. Recuperado de Alzheimer's Disease: Critical Notes on the History of a Medical Concept. Archives of Medical Research 2012

Años tras la descripción inicial del doctor Alzheimer, la EA no fue considerada como una enfermedad grave ya que, para aquel tiempo, la demencia era considerada como parte del envejecimiento normal. Solo hasta la década de los setenta, la EA fue reconocida como una enfermedad específica con bases patológicas en el cerebro (19). En 1983, se aisló el núcleo de la proteína que conforma las SP y se determinó su composición de aminoácidos. Poco después, George Glenner y Caine Wong aislaron el principal componente proteico de la SP, primero del cerebro de una persona con EA y luego del cerebro de una persona con síndrome de Down. Así, determinaron la secuencia de aminoácidos de los primeros 24 residuos. La secuencia parcial que Glenner y Caine obtuvieron no coincidía con ninguna proteína conocida, razón por la cual ellos llamaron esta "nueva proteína" como proteína  $\beta$  (20).

Actualmente la EA es la demencia humana más común constituyendo un 60-80% de todos los casos de demencia a nivel mundial, afectando a más de 25 millones de personas, incluyendo casi la mitad de las personas mayores de 85 años. (20,21). La EA es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por el deterioro de la cognición y la memoria con una pérdida gradual de la capacidad de realizar actividades de la vida diaria (21). Los primeros síntomas de la enfermedad generalmente son déficits sutiles en la memoria de tipo episódica, pero después de transcurrido un tiempo, el deterioro progresivo termina afectando la memoria declarativa y no declarativa.

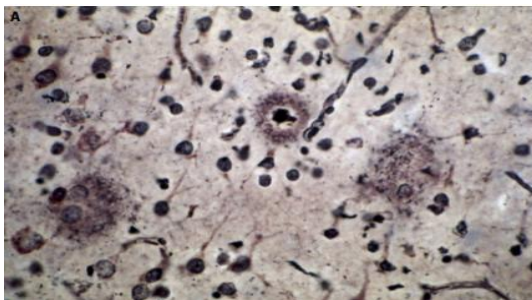


La EA actualmente se ha clasificado de dos maneras en base a su edad de aparición. la EA de inicio temprano, la cual aparece a una edad anterior a los 65 años y corresponde a sólo un 1-2% de todos los casos a nivel mundial, y la EA de inicio tardío, la cual aparece después de los 65 años y representa la forma más común de la enfermedad. La falta de un tratamiento efectivo y los altos costos de atención médica han convertido a esta enfermedad en uno de los mayores desafíos para todos los sistemas de salud del mundo (21).

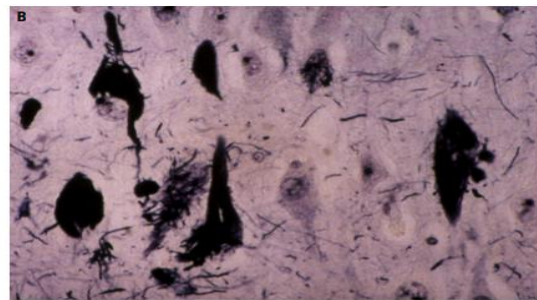
### 3.3.1 Fisiopatología de la EA

A lo largo del tiempo no se ha desarrollado un método analítico clínicamente extendido para diagnosticar EA a partir de marcadores serológicos o en LCR, a pesar de que se conocen algunos posibles marcadores. Todos los diagnósticos se basan mayoritariamente en pruebas neuropsicológicas, entrevistas y algunas imágenes diagnósticas del cerebro donde se evidencia atrofia cortical y de otras zonas cerebrales (21,22).

A.



B.



**Figura 5.** Tinción con carbonato de plata amoniacal de una zona de la corteza cerebral en un paciente post-mortem con EA. A la izquierda (A) se observan placas amiloides (SP) a poco aumento. A la derecha (B) se observan Ovillos neurofibrilares (NFTs) ocupando el citoplasma de numerosas neuronas. Recuperado de. EA. Programa de Formación Médica Continua Acreditado 2015

El diagnóstico patológico completo de EA requiere un análisis Post-mortem del tejido cerebral donde se puede observar dos eventos confirmatorios. El primero es la presencia de NFTs, los cuales son enredos o marañas conformadas de filamentos helicoidales de 20 nm junto con filamentos rectos de 15 nm hechos a partir de una proteína anormalmente insoluble ubicada a nivel intracelular conocida como proteína Tau en un alto estado de hiperfosforilación (Figura 4B). El segundo es la presencia de estructuras proteicas extracelulares en forma de placa denominadas

SP (Figura 4A). Estas placas están formadas por agregados de una proteína insoluble de 4 kDa conocida como proteína A $\beta$  (A $\beta$ ) (21,22).

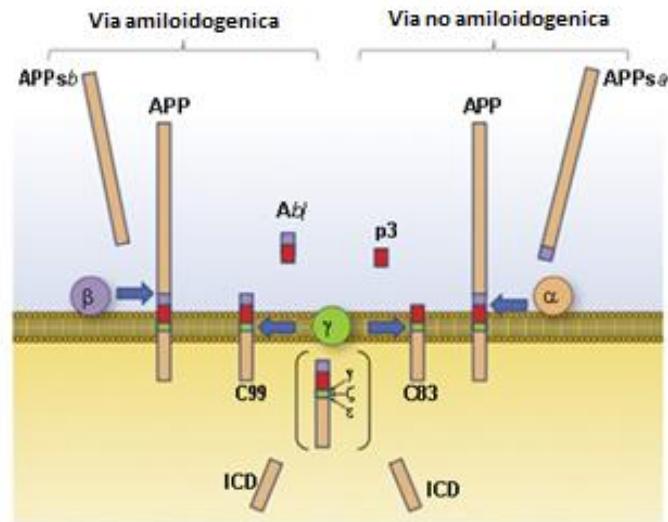
Los pacientes con EA presentan enormes cantidades de NFTs a lo largo de la corteza entorrinal, el hipocampo y la amígdala, así como la presencia de SP a lo largo de varias zonas del cerebro y las cuales son más abundantes en etapas más terminales de la EA. La EA de inicio temprano a pesar de representar la menor cantidad de casos, es la forma de EA más conocida en base a que se han identificado diferentes mutaciones genéticas hereditarias de forma autosómica dominante en distintas familias del mundo. Por el contrario, la EA de inicio tardío o esporádico no tiene una base sólida de factores genéticos. (21- 23).

### **3.3.2 Fase bioquímica de la EA**

- **Proteína A $\beta$  y las Placas seniles SP**

Un paso crucial en la comprensión de la EA fue la determinación de la secuencia de aminoácidos C-Terminal y N-Terminal de la proteína A $\beta$ . Gracias a esto se logró clonar el gen que codifica la proteína A $\beta$  e identificar que A $\beta$  es solo un fragmento de una proteína precursora mucho más grande denominada proteína precursora Amiloide (APP) (21-24). La aparición de la EA es invariable en las personas con trisomía del cromosoma 21 o Síndrome de Down, la razón de esto es que el gen que codifica para la APP se encuentra localizado en el cromosoma 21 y al tener una copia adicional, las personas con Síndrome de Down inevitablemente desarrollan la enfermedad, razón que validó los estudios de Glenner respecto al papel que juega la sobreproducción de APP en el desarrollo de EA. (21-24).

En los humanos, la traducción del gen APP y el posterior empalme alternativo de los fragmentos proteicos da lugar a la formación de tres transcripciones principales, que dan como resultado proteínas de 695, 751 o 770 aminoácidos. Las tres isoformas son glicoproteínas transmembranales unipaso o tipo 1 que luego son sometidas a un procesamiento proteolítico postraducciona mediante dos vías distintas, la vía amiloidogénica y la vía no amiloidogénica (Figura 5) (21-24).



**Figura 6.** Esquema de vías de procesamiento proteolítico de la proteína precursora amiloide APP. Recuperado de: Alzheimer's Disease and the Amyloid  $\beta$ -Protein. Progress in Molecular Biology and Translational Science 2012

- **Vía amiloidogénica (BACE)**

La vía amiloidogénica es la que conduce al desarrollo de la EA. La producción de  $A\beta$  es iniciado mediante una enzima aspartil proteasa conocida como  $\beta$ -secretasa (BACE). Esta enzima escinde la APP en el dominio  $A\beta$  de la proteína generando dos fragmentos diferentes. Un fragmento N-terminal conocido como  $APPs\beta$  y un fragmento C-Terminal transmembranal denominado C99 (99 hace referencia a la cantidad de residuos). C99 posteriormente sirve como sustrato para una enzima aspartil-proteasa denominada  $\gamma$ -secretasa con capacidad de escindir enlaces peptídicos al interior de una membrana celular, algo que no se tenía del todo claro. La  $\gamma$ -secretasa realiza una segunda escisión en C99 la cual no es del todo precisa, generando dos isoformas de  $A\beta$  con diferente cantidad de residuos  $A\beta_{40}$  y  $A\beta_{42}$ . (21-24) La única diferencia entre  $Ab_{42}$  y  $Ab_{40}$  son los dos residuos C-terminales adicionales en  $Ab_{42}$ , generando una mayor capacidad de formación de placas amiloides (22-24).

- **Vía no amiloidogénica**

Al igual que a vía amiloidogénica, la vía no amiloidogénica comienza con la escisión de un fragmento N-Terminal de la APP, dicho corte a diferencia de la vía amiloidogénica, es realizado por una enzima perteneciente a la familia de las desintegrinas y metaloproteinasas; La  $\alpha$ -secretasa realiza un corte en APP

generando un fragmento N-Terminal de menor tamaño (APP $\alpha$ ), y un C-Terminal C83, que es 16 aminoácidos más corto comparado con C99 de la vía amiloidogénica. Este fragmento C-Terminal sufre un segundo tratamiento proteolítico transmembranal por la  $\gamma$ -secretasa generando un fragmento P3 (3 en base a su peso molecular) el cual no tiene la capacidad de formar agregados y puede eliminarse ya sea por fagocitosis o por transporte activo a través de la Barrera hematoencefálica BHE y su disposición finalmente en circulación sanguínea (22-24).

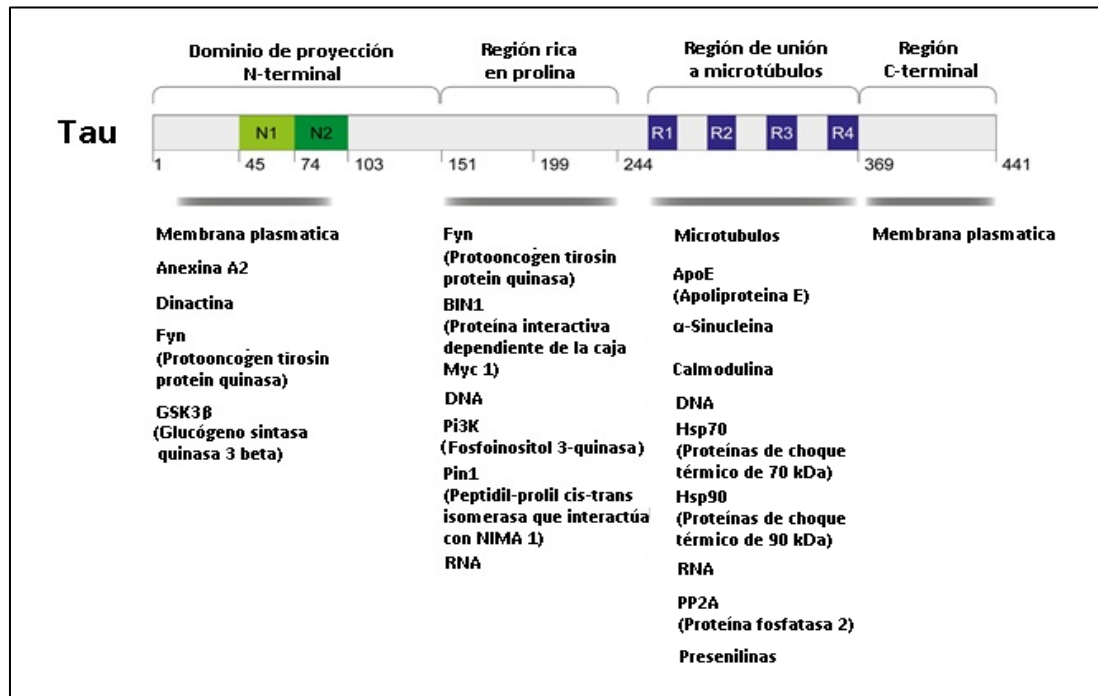
- **Tau y los NFTs**

Al igual que las SP, la presencia de NFTs es una característica conservada en todos los cerebros de pacientes que sufren EA. Tau hiperfosforilada es el principal componente molecular de los NFTs. Tau es una proteína altamente conservada en animales, codificada en humanos por el gen MAPT se presenta en 6 isoformas debido a su transcripción y traducción a partir de 16 exones. Los exones 2, 3 y 10 se empalman de forma alternativa dando lugar a cada isoforma conocida, donde difieren entre ellas por la presencia de 3 o cuatro dominios repetitivos de unión a microtúbulos en la parte C-terminal de la proteína. Las seis isoformas se presentan en el cerebro humano adulto, siendo las isoformas 3R y 4R las más dominantes y en menor cantidad se encuentran expresadas las isoformas 1N, 0N y 2N. (22-24).

Tau es expresada predominantemente en las neuronas, siendo los axones el sitio de mayor presencia, sin embargo, el soma también contiene una cantidad de esta proteína cumpliendo diferentes funciones. La ubicación y el control axonal de la proteína Tau está dirigida por diferentes mecanismos, entre los cuales la traducción local de mRNA y el transporte por kinesinas son los más importantes. La expresión de las diferentes isoformas coincide con la formación de sinapsis y la plasticidad neuronal durante el desarrollo del SNC a lo largo de la vida (23,24).

Tau es una proteína soluble compuesta de 4 dominios estructurales y funcionales a lo largo de la secuencia de aminoácidos. El dominio de proyección N-terminal sobresale de la superficie de los microtúbulos y actúa como espaciador, la región rica en prolina involucrada en señalización celular y de unirse a diferentes quinasas,

la región de unión a microtúbulos cuya función es flanquear y dar soporte a la estructura de los microtúbulos y por último la región C-terminal, importante en la regulación de la polimerización de los microtúbulos y en la unión a la membrana plasmática. Cuando Tau se une a los microtúbulos, el dominio de proyección N-terminal se ramifica lejos de la superficie de los microtúbulos debido a un efecto de repulsión electrostática, actuando como un espaciador entre los microtúbulos y brindando soporte o conexión a otros elementos proteicos (Figura 6). (24,25)



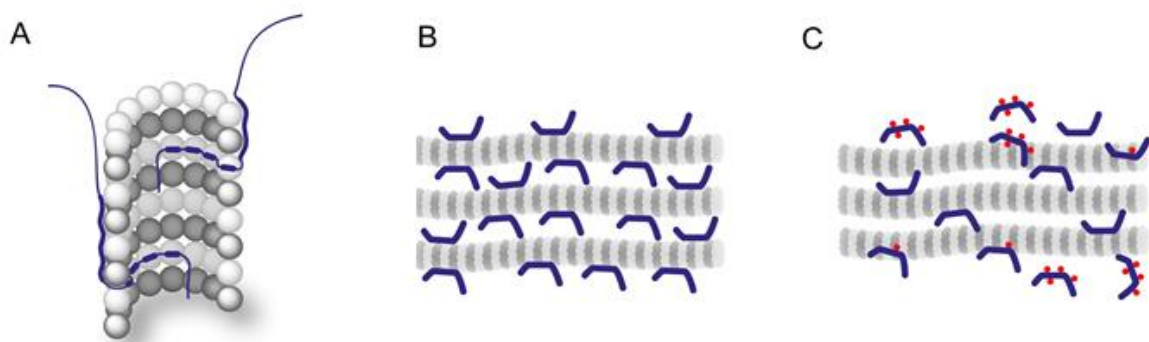
**Figura 7.** Esquema estructural y funcional de la proteína Tau. En la parte superior se muestra la isoforma de Tau más larga presente en el SNC humano dividida en sus cuatro dominios correspondientes; Recuperado de: Tau and tauopathies. Brain Research Bulletin 2016.

- **Formación de NFTs**

Tau es una proteína que sufre un proceso de fosforilación postraduccional debido a la presencia de 85 residuos aceptores de fosfato distribuidos en 45 serinas, 35 treoninas y 5 tirosinas distribuidos a lo largo de la estructura proteica. Esta fosforilación es un proceso altamente regulado que en determina la actividad estabilizadora de los microtúbulos, así como también su interacción con la membrana y con otras moléculas de transporte axonal, sin embargo, muchas veces de manera negativa. En el cerebro humano adulto normal, este proceso ocurre a una cantidad de entre 2 y 4 moles de fosfato por molécula de Tau. La fosforilación

de Tau es llevada a cabo por una serie de enzimas Protein quinasas, ya que Tau al poseer una gran cantidad de serinas y treoninas, representa un sustrato altamente eficiente para estas enzimas (25,26).

En muchos estudios se ha intentado determinar el proceso de fosforilación anormal de Tau, a lo cual se han identificado más de 20 tipos de quinasas diferentes con actividad más o menos regulada dependiendo la isoforma de Tau presente; La glucógeno sintasa quinasa 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), la quinasa dependiente de ciclina 5 (cdk5) y la proteína quinasa activada por mitógeno p38MAPK son algunas de las quinasas más representativas en este proceso (25-28). La formación de NFTs comienza con la insolubilización de Tau a causa de la hiperfosforilación. Estos cambios provocan que Tau se desprenda de los microtúbulos, aumentando su cantidad y a su vez se cree que este efecto provoca una mayor fosforilación al ejercer cambios en la función de las Protein Quinasas, así como también se suman los efectos tóxicos de los agregados de A $\beta$ , estrés oxidativo, el plegamiento incorrecto de Tau, entre otros. Esta falta de soporte y estabilización en los microtúbulos conlleva a la alteración del citoesqueleto, provocando deterioro en el transporte axonal y muerte celular (Figura 7) (28).



**Figura 8.** Estructura del microtúbulo su asociación con Tau. La imagen B muestra la estabilización de los microtúbulos en condiciones normales por parte de Tau. La imagen C muestra el aumento de la fosforilación de Tau, lo que produce el desprendimiento y dislocación de las moléculas de Tau afectando la estabilidad del microtúbulo. Recuperado de: Tau and tauopathies. Brain Research

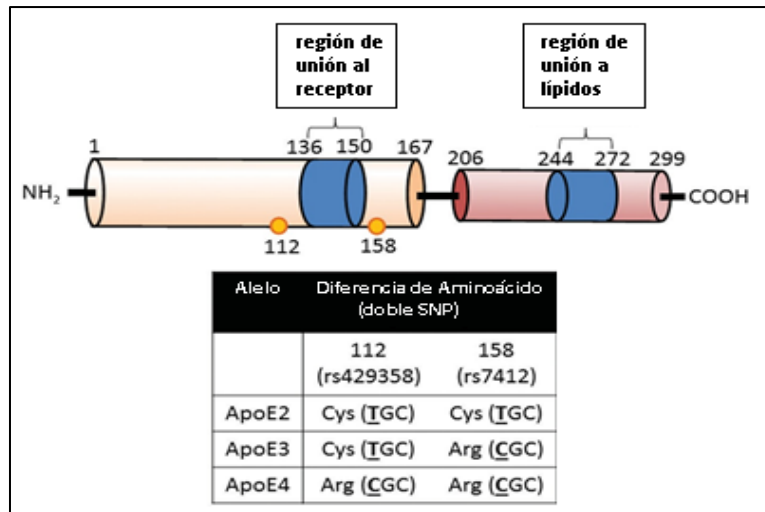
- **Apolipoproteína E (ApoE)**

Solo la presencia de SP y Tau en la patología de la EA no parecen ser suficientes para explicar todos o la mayoría de los mecanismos bioquímicos conocidos. Numerosos estudios indican que existen mecanismos independientes de A $\beta$  que

conducen a la aparición o al empeoramiento de la enfermedad. En la EA de inicio tardío se conoce el factor de riesgo que representa la alteración en un gen denominado ApoE (29)

La Apolipoproteína E (ApoE) es una lipoproteína codificada por el gen APOE, compuesta de 299 aminoácidos cuya función es unirse a los lípidos y transportarlos hasta los receptores celulares para ApoE. Es producida principalmente por astrocitos a nivel del SNC debido a que esta lipoproteína es el principal transporte de lípidos y colesterol hacia las neuronas. ApoE está constituida por dos dominios estructurales: Un dominio N-Terminal de 136 a 150 residuos aminoacídicos en donde se localiza la región de unión al receptor y un dominio C-Terminal de 227 a 244 residuos aminoacídicos donde se localiza la región de unión a lípidos. El colesterol es un componente crítico en todas las células ya que hace parte de la membrana celular, sin embargo, en el SNC el colesterol es componente esencial de la mielina. algunas hormonas esteroideas, los astrocitos, entre otros (29,30).

A nivel del SNC el colesterol debe sintetizarse de Novo ya que la barrera hematoencefálica impide la entrada de colesterol sanguíneo al líquido cefalorraquídeo de manera libre. Cierta cantidad de colesterol es transportada activamente a través de transcitosis por las células de la barrera hematoencefálica, sin embargo, la mayoría del colesterol proviene de los astrocitos, los oligodendrocitos y en menor proporción, de las mismas neuronas. Para que el colesterol libre pueda ser usado por las células del SNC, debe ser transportado hasta los receptores transmembrana de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) entre ellos ApoE, LDLR, LRP1, VLDLR y ApoER2. Dicho transporte es mediado por la ApoE y sus isoformas. (29,30). La ApoE humana se presenta en tres isoformas, distinguidas por dos sustituciones de aminoácidos (Arginina / Cisteína) en el dominio N-Terminal, en las posiciones 112 y 158 a causa de dos SNPS (polimorfismos de un solo nucleótido) localizados en el Gen APOE (rs429358 y rs7412). (Figura 8) (30).



**Figura 9.** Estructura de ApoE humana y sus diferentes isoformas. Compuesta de 299 aminoácidos distribuidos a lo largo de dos dominios N-terminal y C-terminal donde se ubican las regiones de unión al receptor y a lípidos respectivamente. Las tres isoformas se distinguen por la sustitución de Arginina por Cisteína a causa de dos SNPs correspondientes (rs429358 y rs7412). Recuperado de Apolipoprotein E and Amyloid- $\beta$ -Independent Mechanisms in Alzheimer's Disease. Genes, Environment and Alzheimer's Disease. 2016

- **Papel de ApoE en EA**

Se sabe que de los tres alelos (ApoE2, ApoE3 y ApoE4), ApoE 4 representa el alelo de mayor asociación de riesgo a desarrollar EA a raíz de su papel en la hipercolesterolemia, mientras que ApoE2 juega un papel protector frente a la EA (30,31). La hipercolesterolemia ligada a ApoE4 es quizás el desencadenante de daño celular más significativo. La barrera hematoencefálica limita el paso de sustancias, entre ellas el colesterol dado que la única manera de que ingresen ciertos ácidos grasos y esteroides es a través de transcitosis. Al aumentar los niveles de colesterol en circulación sanguínea, aumenta el transporte a través de la barrera hematoencefálica y por ende aumentan las concentraciones de colesterol en LCR, a su vez la producción in situ de colesterol por los astrocitos es dependiente de la concentración de colesterol en LCR, por lo que se incrementa la actividad de los astrocitos. Este aumento excesivo de colesterol endógeno en el SNC conlleva al daño de la estructura y al aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, lo que permite el ingreso de sustancias neurotóxicas al LCR, incrementando el daño celular en la EA. Un marcador importante de daño a la barrera hematoencefálica es el nivel de albúmina en LCR (30,31).



La ApoE4 intracelular es más susceptible a la escisión proteolítica comparada con las otras isoformas, estos fragmentos escindidos causan disfunción mitocondrial llevando a la célula a un proceso de toxicidad. Los fragmentos de ApoE4 tienen la capacidad de exacerbar la fosforilación de Tau, sin embargo, ApoE4 extracelular tiene efectos en Tau mediante la activación de Quinasas reguladas por señales extracelulares (31). La respuesta inflamatoria en el SNC es un factor clave en el daño neuronal presente en EA. ApoE4 tiene la capacidad de aumentar la respuesta inmune innata mediante la interacción con TLR (Toll Like Receptor), lo que desencadena la producción de diferentes citoquinas proinflamatorias. Este mecanismo, aunque poco estudiado, podría evidenciar una fuerte relación entre la EA y ApoE4 dependiente de inmunidad (31,32).

ApoE tiene un rol importante en los mecanismos de aclaramiento de los productos de escisión de APP y la acumulación de A $\beta$  en el SNC. El alelo ApoE4 al conducir el aumento de colesterol en LCR, conlleva a un aumento intracelular de colesterol, el cual es acumulado en microdominios de membrana ricos en colesterol y en esfingomielina, formando balsas lipídicas de membrana. Estas balsas contienen una mayor cantidad de  $\beta$ -secretasa y  $\gamma$ -secretasa; Las balsas a su vez promueven la unión de receptores APP, facilitando así su tratamiento proteolítico y con ello aumentando la producción de péptido A $\beta$  lo que conlleva a la formación de SP (31,32).

### **3.3.3 Fase celular de EA**

El planteamiento de la fase celular durante la EA es un concepto clave en el intento de dilucidar cada uno de los procesos que conllevan al desarrollo de la enfermedad. Es bien conocido que por sí solos, las SP formadas por A $\beta$ 42 consecuencia de Tau son procesos insuficientes en el desarrollo y cronicidad de la enfermedad, razón de esto radica en la presencia de A $\beta$ 40 o incluso A $\beta$ 42 en etapas tempranas de la vida o en etapas de avanzada edad sin que desarrollen alguna sintomatología demencial. Otra razón también es la formación de NFTs en cerebros de edades muy tempranas sin que se evidencie algún síntoma demencial o pérdida neuronal considerable. Estos y otros aspectos muestran que existe un umbral durante la fase

bioquímica, en la cual la formación de SP Y NFTs alcanzan cierto nivel en el cual se da inicio a la fase celular de la EA de una manera crónica y agresiva. (33,34)

El inicio de la fase celular de la EA tiene un punto central el cual radica en la disminución y/o falla de los mecanismos de depuración de A $\beta$  y Tau. Durante la etapa bioquímica diferentes proteasas tienen la capacidad de escindir A $\beta$  y Tau, sin embargo, es conocido que el mecanismo de depuración más importante radica en la eliminación vascular activa a través de la barrera hematoencefálica, proceso llevado a cabo por diferentes interacciones entre receptores como LDL y proteínas transportadoras como  $\alpha$ -2 Macroglobulina o ApoE. La integridad de la barrera hematoencefálica empieza a verse comprometida por la acumulación excesiva de A $\beta$  y Tau, sin embargo, a esto se suman factores genéticos que desencadenan un mal funcionamiento de los pericitos. Dichos factores genéticos se han correlacionado con alteraciones en genes como ApoE o PICALM. Una vez comprometida la función depuradora de la barrera hematoencefálica, la acumulación de proteínas aberrantes, junto con otros procesos adyacentes son los que marcan la aparición de los síntomas demenciales (33,34)

El factor vascular está relacionado con la funcionalidad e integridad de la barrera hematoencefálica. Se plantea que el daño vascular inicial es lo que precipita los síntomas y el daño celular en la EA. La hipoperfusión y la hipoxia a nivel tisular produce daños irreversibles en la estructura de la barrera hematoencefálica. Se conoce que ApoE es un factor de riesgo para las células endoteliales ya que genera daño a partir de mecanismos dependientes de NF $\kappa$ B. La hipoperfusión al mismo tiempo conlleva a un deficiente aclaramiento de A $\beta$  y Tau, limitando la eliminación de estos por vía vascular (33-35).

- **Neuronas, oligodendrocitos y gliosis reactiva**

Se sabe que predominantemente la disfunción de la función cerebral característica en la EA se debe a la disminución o pérdida de la plasticidad sináptica. Las numerosas alteraciones en la homeostasis y la conectividad neuronal han sido estudiadas y se ha demostrado que estos cambios conllevan al desarrollo de una actividad de hiperexcitabilidad neuronal, generando convulsiones epilépticas,

característica común en pacientes con EA. Estos cambios se saben que son provocados mayoritariamente por los efectos neurotóxicos de A $\beta$  y Tau junto con las alteraciones de células en diferentes regiones con grados distintos de susceptibilidad, tal como se ha comprobado en modelos murinos transgénicos para EA. Los cambios en la excitabilidad neuronal dependen enormemente de las alteraciones de los Oligodendrocitos (33,34).

Los oligodendrocitos son el tipo de célula más abundante en el SNC ya que constituyen alrededor del 75% de todas las células de la neuroglia. Su función más importante radica en su papel durante la producción de mielina, sustancia aislante de los axones de las neuronas y que permite la conductividad de impulsos excitatorios de una neurona a otra, adicionalmente también juegan un papel importante dando soporte metabólico y amortiguación bioquímica a los axones. El envejecimiento produce un importante descenso en la cantidad de oligodendrocitos, lo que conlleva a estudiar su rol en la EA, ya que se ha demostrado que en cerebros con EA y en presencia de ApoE4, su cantidad disminuye de manera dramática (33-35).

Esta característica fue identificada por el mismo Alois Alzheimer, describiéndola como una proliferación de astrocitos en zonas lesionadas del SNC, lo cual conlleva a considerarla como una respuesta protectora ante el daño, sin embargo, durante la EA parece jugar un papel contrario a lo que se consideraba. La gliosis reactiva durante la EA produce un aclaramiento defectuoso de A $\beta$  y otros compuestos debido a su regulación negativa en la expresión de Acuaporina4. La gliosis reactiva es una respuesta temprana al daño, aparece incluso mucho antes que la formación de SP (33,35).

- **Inflamación por Microglía**

Las células microgliales son las principales células fagocíticas del SNC y por eso es reconocido su papel en la fase celular de la EA. Su rol fagocítico es íntimo con la presencia de SP, así como también de los procesos de inflamación, junto a monocitos y astrocitos. Las células microgliales tienen la capacidad de fagocitar neuronas e inducir su apoptosis de manera directa, interactúan en la formación del

complejo de ataque a la membrana del sistema de complemento, la producción de citocinas proinflamatorias, estrés oxidativo, entre otros. La fagocitosis es quizá el mecanismo de aclaramiento de A $\beta$  más importante, una alteración en este mecanismo desencadena la mayoría de los cambios ya conocidos en la fase bioquímica y celular de la enfermedad. El receptor activador expresado en células mieloides 2 (TREM2) es quizá el componente del proceso de fagocitosis e inflamación más conocido actualmente (33-36,39).

El receptor TREM2 es una proteína transmembrana tipo 1 expresada en macrófagos, monocitos y células microgliales, que junto con TYROBP tiene la función de activar los procesos fagocíticos y de producir citoquinas proinflamatorias, cruciales en la protección del SNC durante procesos infecciosos o neurodegenerativos. Se conoce que mutaciones en TREM2 aumentan el riesgo en la aparición de EA y otras enfermedades neurodegenerativas (35,36-39). En la EA, las alteraciones de TREM2 tienen efectos directos sobre el aclaramiento de A $\beta$  y la escasa producción de citocinas, a su vez la formación de SP genera un aumento en IL-10, citocina que inhibe la inflamación, empeorando la patología (39,40).

### **3.4 Edición genética**

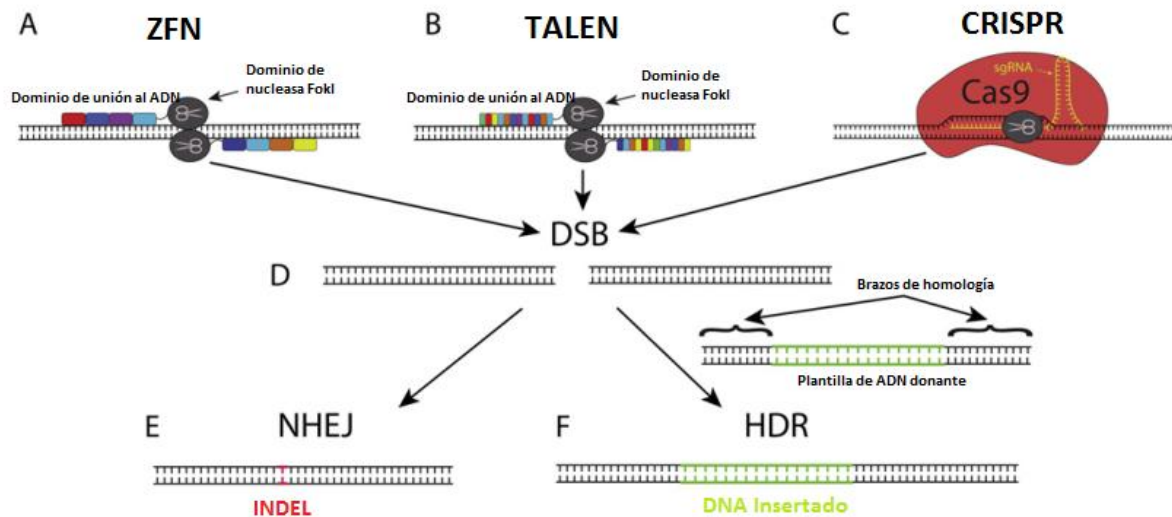
Desde la secuenciación del primer organismo, hasta la creación de animales transgénicos, la edición genética ha pasado por numerosos avances en cuanto al descubrimiento y perfeccionamiento de técnicas utilizadas para editar el código de la vida (39). La edición genética es entonces, un proceso en el cual se modifica de una manera precisa el DNA genómico utilizando proteínas denominadas nucleasas, las cuales producen inserciones, deleciones o cambios en las secuencias de pares de bases al interior de una célula perteneciente a cualquiera de los tres dominios de la vida, sea eukarya, archaea o bacteria (41,42).

Una de las primeras técnicas de edición genética utilizadas es la recombinación homóloga, implementada para la generación de ratones Knockout. Sin embargo, este proceso requiere demasiados recursos y tiene varias desventajas, por lo cual no resulta viable y a razón de esto, se han desarrollado nuevas y mejores técnicas de edición genética, las cuales han permitido con el paso del tiempo, estudiar las

funciones de los genes, regular la expresión de proteínas, obtener modelos de enfermedades de origen genético, transferir rasgos fenotípicos, corregir genes defectuosos, entre otros (42).

El eje central del desarrollo de la edición genética fue el descubrimiento de las rupturas de doble cadena de DNA, DSB (Double strand DNA breaks) las cuales, dirigidas específicamente, pueden usarse para estimular la maquinaria de reparación de DNA y con ello, conseguir la aparición de distintas modificaciones genéticas. El primer paso en la edición genética es generar un DSB mediante un mecanismo de direccionamiento de DNA obtenido a través de un dominio de unión al DNA junto con la actividad de corte de una nucleasa. Una vez posicionada la nucleasa en la secuencia específica, esta realiza el DSB en la doble hebra de DNA, a lo cual se inicia la respuesta de los mecanismos de reparación celular. Las diferentes vías de reparación que puede tomar el DNA son: la vía de recombinación no homóloga (NHEJ) y la vía de reparación directa por homología (HDR) (42,43).

La NHEJ es una vía de reparación en la cual los dos extremos cortados de DNA son ligados o unidos nuevamente, dando cabida a la aparición de pequeñas inserciones o deleciones (INDELS) de pares de bases en el sitio de reparación, lo que produce mutaciones que afectan la expresión de genes, formando proteínas truncadas al añadir codones de parada anticipados o silenciando genes por completo. La HDR es una vía de reparación dependiente de una plantilla de DNA exógeno, en la cual se inserta adicionalmente de la nucleasa, un fragmento de DNA exógeno el cual servirá como plantilla molde para que los mecanismos de reparación celular reparen el DSB basados en la secuencia de nucleótidos del DNA exógeno, permitiendo la inserción precisa de cualquier secuencia deseada de DNA, ofreciendo así la posibilidad de reparar genes alterados; Por ejemplo, cuando se requiera reparar proteínas incompletas o truncadas (43).



**Figura 10.** Se muestran los tres principales sistemas de edición genética. (A) las nucleasas de dedos de zinc, (B) las nucleasas tipo activadoras de la transcripción y (C) las repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas. Los tres sistemas se basan en la capacidad de realizar DSB's (D) en la hebra bicentenaria de DNA, activando la maquinaria de reparación celular la cual puede tomar dos vías diferentes. La NHEJ (E) generando INDEL's y la HDR (F), dependiente de una plantilla de DNA.

En la actualidad, los sistemas para editar genes en organismos vivos más utilizados son las nucleasas de dedos de zinc (ZFN), las nucleasas tipo activadoras de la transcripción (TALEN), sin embargo, las repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas (CRISPR), están siendo muy estudiadas en los últimos estudios en investigación por sus múltiples aplicaciones (43).

#### 4. METODOLOGÍA

En esta revisión se consultó información en diferentes bases de datos, se seleccionaron artículos con cuartil Q1 según Scimago y con un factor de impacto mayor de 4, los temas fueron abordados desde neurociencia y genética principalmente. La búsqueda bibliográfica se abordó a través de las bases de datos con como "ScienceDirect", "PMC" y "WormBase" entre otras, donde se exploraron artículos de revisión y de investigación los cuales implementaban el sistema de edición genética CRISPR/CAS9 como posible alternativa terapéutica de la EA, teniendo en cuenta estudios de esta enfermedad llevados a cabo en el modelo de *C. elegans*. Para ello se realizó una búsqueda de términos como "Alzheimer disease" "CRISPR-CAS" y "*C. elegans*. Se tuvieron en cuenta artículos de investigación y

revisión no mayores a 4 años, los cuales se muestran en los resultados de este trabajo.

Criterios de inclusión:

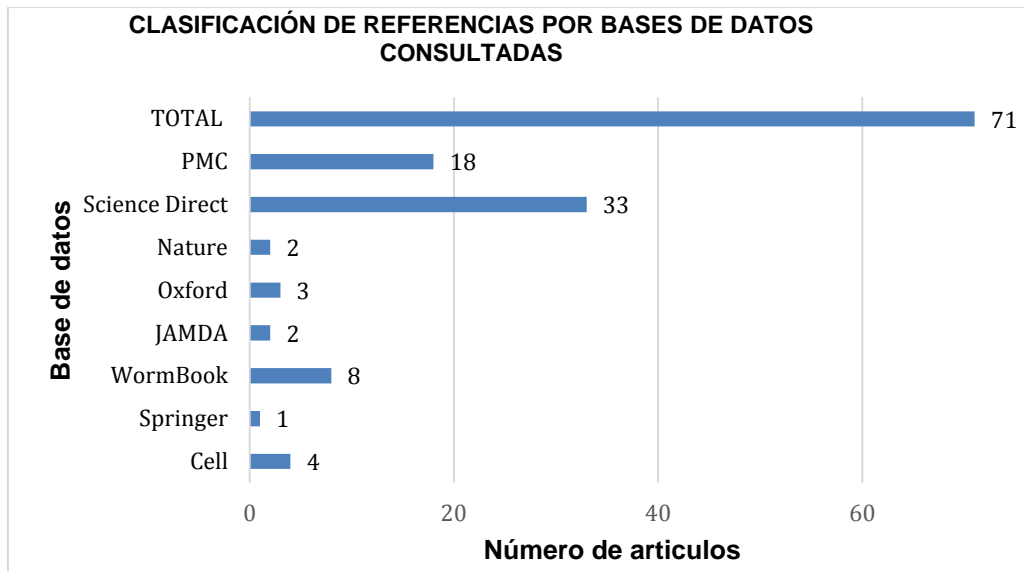
- Alzheimer disease relacionados hipótesis y genes
- CRISPR-CAS-9
- *C. elegans*
- 2016 en adelante

Criterios de exclusión:

- Alzheimer y farmacología, patología, epidemiológicos, diagnóstico.
- CRISPR-CAS aplicado a enfermedades diferentes Alzheimer y otros tipos de sistemas diferentes al tipo II
- *C. elegans* todos los estudios realizados en otras patologías
- Anteriores la 2016

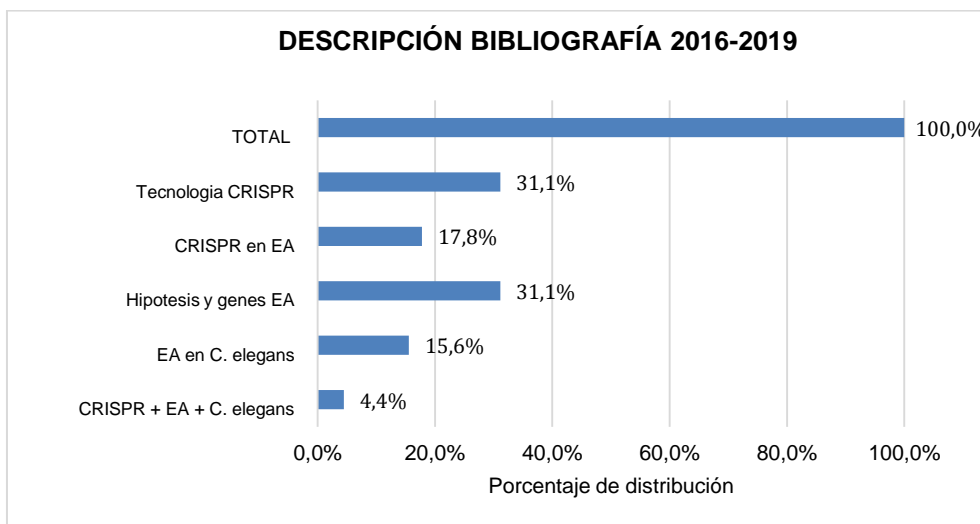
## **5. RESULTADOS**

Durante los procesos de búsqueda bibliográfica para esta revisión, se utilizaron palabras clave como: “*C. elegans*” “Alzheimer disease” “CRISPR” “genetic edition” “CRISPR in Alzheimer's disease” reuniendo un total 71 artículos clasificados según la revista o base de datos de origen (Figura 11). La búsqueda en las bases de datos arrojó una gran cantidad de información, por lo que se llevó a cabo un tamizaje y selección de artículos teniendo en cuenta los criterios de exclusión.



**Figura 11.** Clasificación de referencias usadas en todo el trabajo.

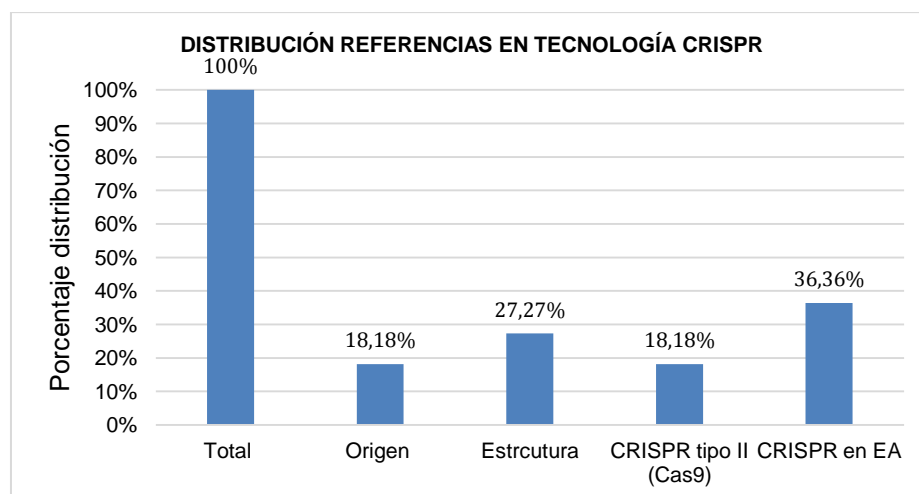
Los resultados que se muestran fueron estructurados a partir de 45 referencias. La figura 12 muestra el porcentaje de distribución de las referencias que conforman los datos descritos en la siguiente forma: En primer lugar, se describe el sistema CRISPR/Cas9. A continuación, los mecanismos en los que CRISPR/Cas9 se puede implementar en la EA, luego se abordan las hipótesis más destacadas y los genes representativos de EA, para relacionarlos y postular como la EA se puede modelar en *C. elegans* junto con los genes ortólogos de EA en el nematodo y por último se expone CRISPR/Cas como terapia de EA aplicado en *C. elegans*. Para el tamizaje de la bibliografía usada en los resultados de este trabajo, se utilizó como base, la selección de artículos del año 2016 a 2019, al igual que la relevancia de su contenido.





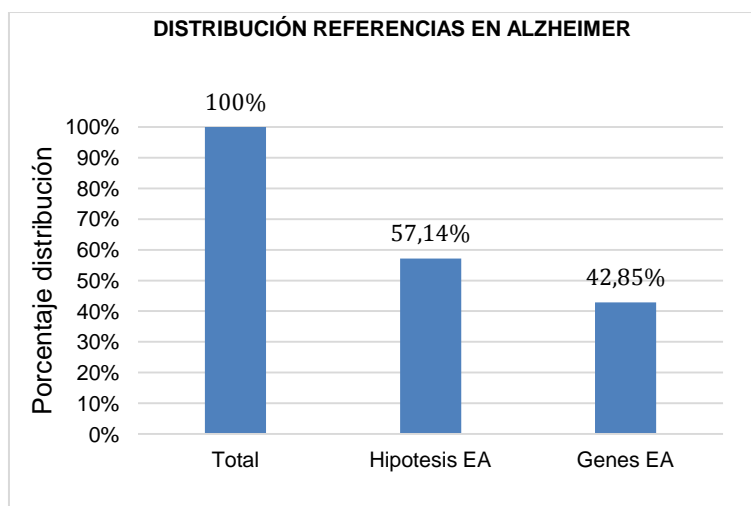
**Figura 12.** Distribución de referencias en porcentaje respecto a cada tema expuesto en los resultados

Los artículos que conforman los resultados donde se aborda el tema de la tecnología de CRISPR, son representados de acuerdo a cuatro temas tratados (origen, estructura, CRISPR tipo II y el uso de CRISPR en la EA) mostrando el porcentaje de artículos distribuidos respecto a cada tema (Figura 13)



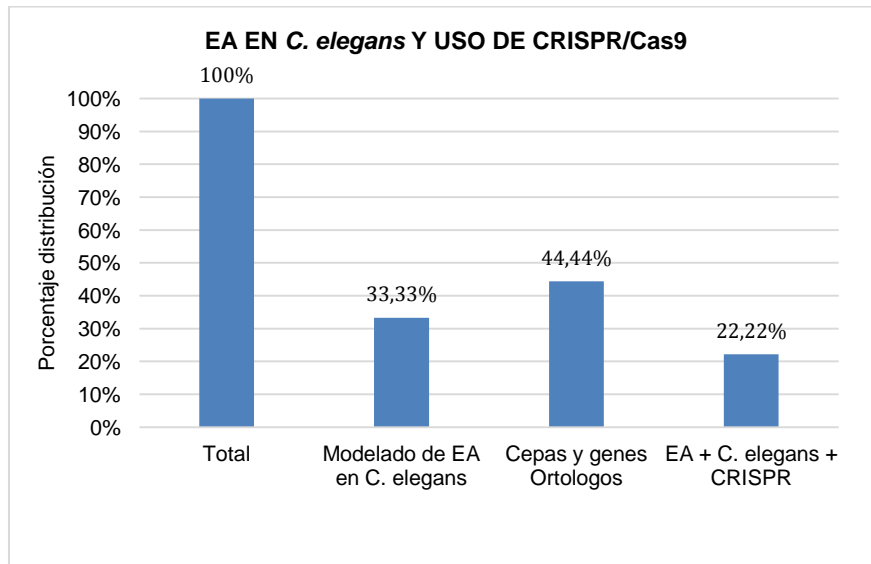
**Figura 13.** Distribución de referencias en porcentaje respecto a cada tema expuesto en CRISPR

La EA se aborda con base a las hipótesis más relevantes de esta enfermedad y los genes involucrados en la enfermedad como se muestra en la Figura 14.



**Figura 14.** Distribución de referencias en porcentaje respecto a cada tema expuesto en EA.

Los artículos de *C. elegans*, se abordaron para describir las cepas más comunes y los procesos de modelado de la EA. También se consultó la herramienta de búsqueda genética de la WormBase. Se presentan aquellos genes de *C. elegans* ortólogos de la EA y la estrategia en la que CRISPR/Cas9 que demuestran ser viable como opción terapéutica. (Figura 15)



**Figura 15.** Distribución de referencias en porcentaje respecto a cada tema expuesto en *C. elegans*.

A partir de este punto, se describe el sistema CRISPR y como su aplicación se considera una de las mejores opciones en la búsqueda de un tratamiento de la EA, llevado a cabo su uso en modelos de *C. elegans* que expresan proteínas presentes en la patología.

### 5.1 CRISPR/Cas9

CRISPR tiene su origen en 1993, en Alicante – España, donde Mojica et al. estudiaban la función de las enzimas de restricción en *Haloferax mediterranei*, un tipo de Archaea, que presenta tolerancia extrema a altas concentraciones de sal. Ellos encontraron una secuencia de 30 pares de bases de DNA con múltiples copias repetidas de forma casi perfecta y más o menos palindrómicas, e intercaladas por secuencias espaciadoras de 36 pares de bases que no concordaban con ninguna secuencia conocida hasta ahora (45,46).

Otros estudios hallaron una estructura similar, pero con una secuencia de nucleótidos diferente en los fragmentos espaciadores, solo que esta vez en la bacteria de *Escherichia coli*, lo que permitió concluir que esa secuencia tenía una función importante en estos microorganismos. Para el año 2000, Mojica había descubierto la misma secuencia en más de 20 microorganismos procariontes diferentes. Mojica llamó a esta secuencia CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats por sus siglas en inglés), por sugerencia de otros investigadores, ya que inicialmente la había denominado SRSR (Short Regularly Spaced Repeats) (45).

En 2003, Mojica descubrió mediante comparaciones con BLAST, que alguna de esas secuencias espaciadoras presentes, tenían una similitud exacta con la secuencia P1 de un fago de *Escherichia coli*, por lo que propuso que CRISPR se trataría de un sistema de defensa presente en procariontes. Por otro lado, el genetista Gilles Vergnaud, estudió muestras de *Yersinia pestis* donde encontró la secuencia CRISPR, con diferentes secuencias espaciadoras correspondientes también a DNA de fagos, que se situaban en el extremo frontal de la estructura CRISPR poniendo en evidencia nuevamente que CRISPR en efecto, se trataba de un sistema de defensa con memoria presente en Bacterias y Archeas. (45,46).

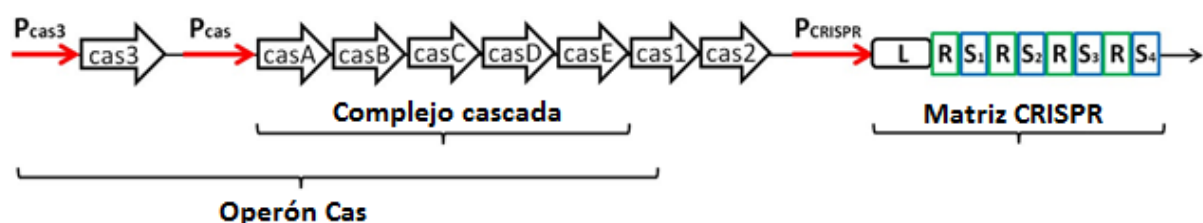
Philippe Horvath, investigador de la empresa Rhodia food, quien fabricaba bacterias iniciadoras para producción láctea, quería desarrollar procesos de fermentación mediante el uso de *Streptococcus thermophilus*, así como la introducción de métodos basados en DNA, con el fin de identificar cepas y superar las frecuentes infecciones por fagos que plagaban los cultivos usados para fermentación. Horvath realizó un ensayo de selección genética en cepas de *Streptococcus thermophilus* sensibles a fagos, empleando dos fagos diferentes. Horvath descubrió que las cepas que desarrollaron resistencia a los fagos, habían adquirido secuencias de DNA del fago insertándolas en su secuencia CRISPR. También analizó el papel de dos genes ubicados antes de la secuencia CRISPR, Cas7 y Cas9, entendiendo su papel como nucleasas en la adquisición y ejecución del complejo CRISPR (45-47).

Fue hasta el año 2008 cuando John van der Oost et al. Describieron los componentes del sistema CRISPR de manera individual. Para determinar el papel de cada componente, Van der Oost procedió a insertar la secuencia CRISPR de una cepa de *Escherichia coli* en otra cepa que carecía de su propio sistema endógeno, lo cual les permitió caracterizar un complejo de cinco proteínas CAS denominado complejo Cascada. (45,46,48).

### 5.1.1 Estructura del Operón Cas y la matriz CRISPR

El operón Cas y la matriz CRISPR están conformados esencialmente por: los genes Cas que codifican para distintas proteínas Cas, una matriz CRISPR conformada por las secuencias palindrómicas repetidas junto con las secuencias espaciadoras que corresponden al DNA de fagos y en el caso de CRISPR tipo II, una secuencia que codifica un transcrito de RNA transactivador (tracrRNA) (41- 43,47,55).

Los genes Cas son una serie de genes codificantes para proteínas Cas, que varían según el tipo de sistema. En el sistema CRISPR tipo I, los genes Cas codifican un total de ocho proteínas: El gen Cas3 codifica para una helicasa/DNAsa, cinco genes Cas designados con una letra en orden descendente (CasA, CasB, CasC, CasD, CasE) codifican para una serie de proteínas denominadas complejo Cascada, el gen Cas1, codifica una integrasa y el gen Cas2, codifica una endorribonucleasa (Figura 16) (41,47-52,59).



**Figura 16.** Organización del operón Cas y la matriz CRISPR, componentes de un sistema CRISPR tipo I presente en *Escherichia coli*. El operón Cas cuenta con 8 genes Cas y una matriz CRISPR adyacente inmediatamente. Con flechas rojas están indicados los promotores de la transcripción de los genes cas y los genes CRISPR. El complejo cascada está conformado por Cas: A, B, C, D, E, cas1 y Cas2. Recuperado y modificado de: Bacteria Immune System. Genome Stability 2016

El sistema CRISPR tipo III es el sistema menos comprendido hasta la fecha. Varía considerablemente de las especies que lo utilizan, siendo usado por lo general en archaeas, codificando genes para polimerasas y complejos cascada (47).

El sistema CRISPR tipo II, es el sistema más sencillo en términos de genes Cas, está conformado por cuatro genes: Cas1, Cas2, Csn2 y Cas9 junto con una secuencia de DNA encargada de formar el transcrito tracrRNA (47). A razón de su simplicidad, y el desarrollo que se ha realizado con el fin de convertir este mecanismo en una herramienta de edición genética, se aborda a CRISPR tipo II como la herramienta ideal para su aplicación en el modelo de *C. elegans* y la EA (47,59).

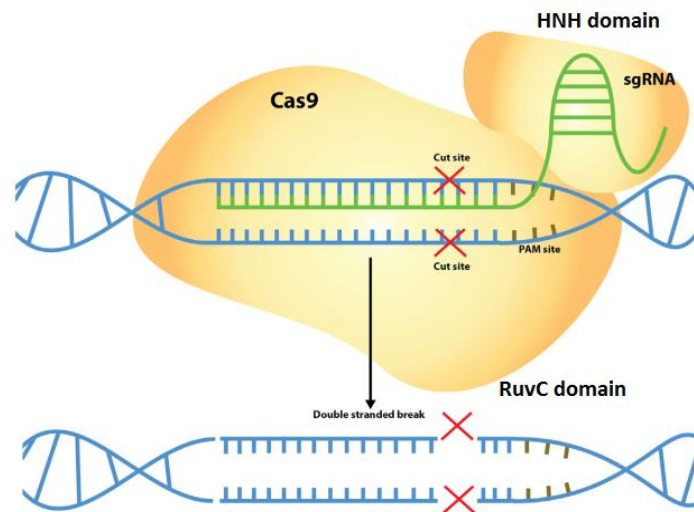
### **5.1.2 CRISPR TIPO II (Cas9)**

El sistema CRISPR/Cas9 está conformado por 4 genes Cas (Cas1, Cas2, Csn2 y Cas9), una matriz CRISPR y unas secuencias de DNA que codifican un transcrito de RNA corto llamado RNA transactivador (tracrRNA). Las proteínas Cas1, Cas2 y Csn2 están involucrados en la etapa adaptativa (etapa I) mientras que Cas9, tracrRNA y la matriz CRISPR están involucrados en las etapas de expresión, maduración e interferencia (48,50)

Durante la etapa de adaptación, las proteínas transcritas de los genes Cas1, Cas2 y Csn2 se encargan de incorporar fragmentos de DNA proveniente de bacteriófagos o plásmidos invasores en su propio genoma. Estos fragmentos llamados espaciadores se incorporan a la Matriz CRISPR, separados por secuencias repetidas en tándem. En la etapa de expresión y maduración, el tracrRNA y el transcrito de la matriz CRISPR llamado pre-crRNA se expresan. El pre-crRNA es procesado en conjunto por Cas9, tracrRNA y una RNAsa III para formar crRNA maduro con un tamaño de entre 30 a 50 nucleótidos, quien es el encargado de otorgarle la especificidad objetivo del complejo. En este punto, Cas9 se asocia con el tracrRNA y el crRNA para formar el sistema CRISPR/CAS9 (50-53).

Durante la etapa de interferencia, esta secuencia se dirige al DNA objetivo formando un híbrido DNA-RNA en un sitio denominado secuencia Protospacer o PAM, Cas9 es una endonucleasa que se une al híbrido de DNA-RNA y realiza una rotura de doble cadena o DBS (Double-Strand Breaks) en la hebra de DNA mediante la

acción de dos dominios diferentes: Un dominio RuvC, el cual corta la hebra de DNA desplazada al formarse el híbrido DNA-RNA y un dominio HNH, que realiza el corte en la hebra que forma el híbrido con el crRNA (50,52).



**Figura 17.** Esquema estructural del sistema CRISPR tipo II (CRISPR/Cas9). Cas9 es una nucleasa compuesta de dos dominios: El dominio HNH y el dominio RuvC. El sgRNA es el encargado de guiar a Cas9 al sitio donde se realiza un corte DBS en la hebra de DNA objetivo. Recuperado y modificado de (49).

Para editar genomas, el tracrRNA y el crRNA fueron fusionados en una única molécula de RNA de 96 nucleótidos llamada sgRNA (RNA guía) (Figura 17). Los primeros 20 nucleótidos corresponden al elemento espaciador, seguido por 30 nucleótidos que corresponden a la secuencia de repetición y los últimos 46 nucleótidos corresponden a la cadena que actúa como anclaje a la nucleasa Cas9. Gracias a esa modificación, solo basta cambiar la secuencia de los primeros 20 nucleótidos del sgRNA para dirigir a Cas9 y así editar cualquier gen deseado (50).

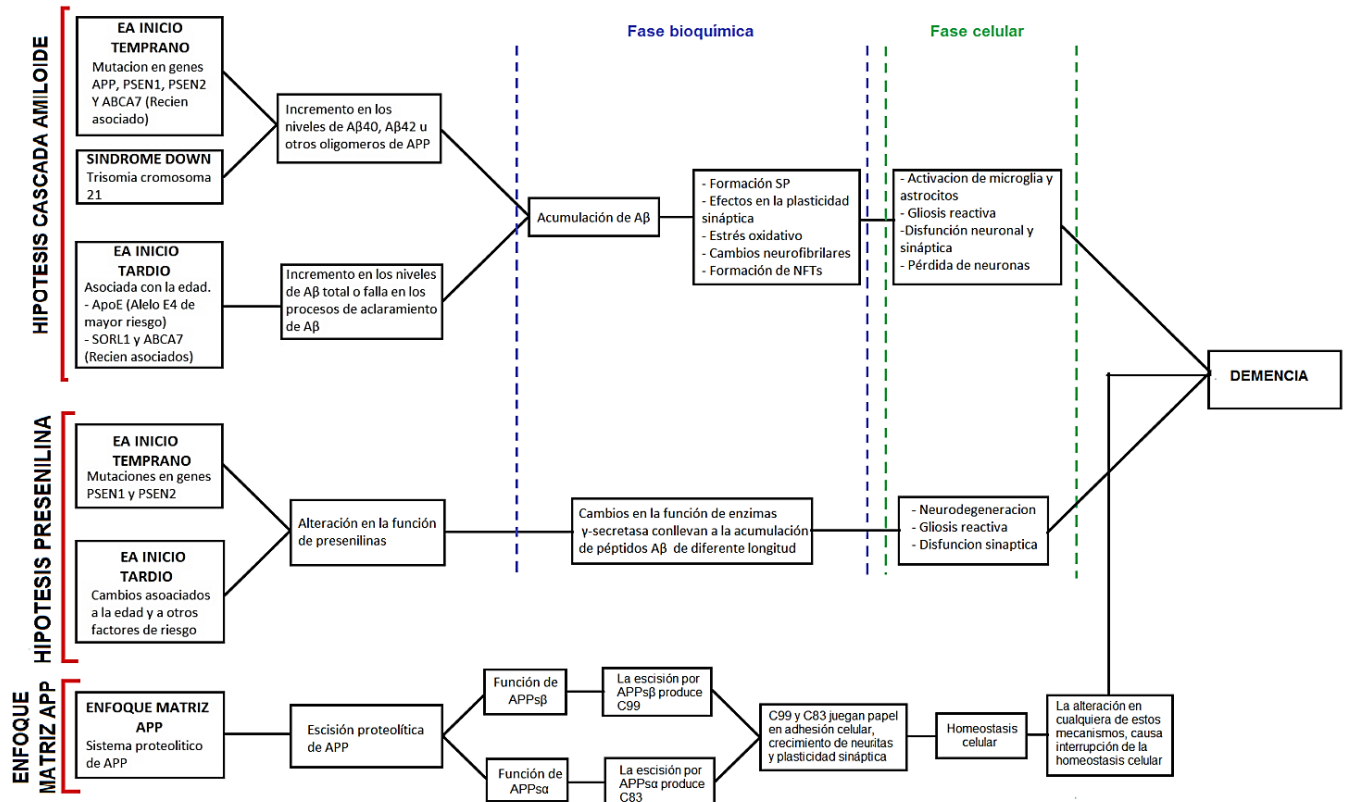
## 5.2 Potencial de CRISPR/Cas9 en tratamiento de EA.

Desde la publicación de la secuencia genómica humana en 2003, se han realizado importantes avances en enfermedades poco conocidas o consideradas intratables al tener un origen genético poco determinado. Las enfermedades neurodegenerativas fueron a partir de ahí, un centro de trabajo conjunto de múltiples empresas que buscaban comprender los mecanismos detrás de enfermedades como la EA. Aunque la EA se desencadena a raíz de diversos factores, el origen genético representa un enfoque fundamental; Por ello, la terapia génica se ha convertido en

una alternativa de tratamiento para la EA. CRISPR/Cas9 es una herramienta simple, rentable, eficiente que posee la capacidad de editar genomas de cualquier tipo de célula, lo cual abre las puertas al tratamiento de la EA (43,44,53,54).

La capacidad de producir DBS en el DNA con la posterior activación de la maquinaria de reparación del DNA celular mediante las vías NEHJ o HDR, fue lo que revolucionó el campo de la edición genética y abrió la posibilidad de reparar genes defectuosos, dejando al descubierto nuevas oportunidades terapéuticas. El sistema CRISPR/Cas9 representa un tratamiento, el cual se puede abordar a partir de dos puntos: El primero es la opción que ofrece CRISPR/Cas9 al permitir diseñar o modelar la enfermedad en diferentes animales, desde invertebrados hasta vertebrados con el objetivo de reproducir una o varias de las patologías presentes en la enfermedad y estudiar con ello el uso de fármacos y otros compuestos. Como segunda opción es el uso de CRISPR/Cas9 directamente como herramienta de edición genética que evite el desarrollo de la patología de la EA (53-56,59,68,69)

El entender las hipótesis que mejor describen la fisiopatología de la EA es una estrategia importante (Figura 18), dado que permite discriminar diferentes alternativas en las que CRISPR podría apuntarse como terapia, de manera en que los resultados puedan ser comparables a los conocimientos ya establecidos en cada hipótesis y así determinar su eficacia (68).



**Figura 18.** Diagrama de hipótesis de EA. Recuperado y modificado de: Aβ and the dementia syndrome: Simple versus complex perspectives. European Journal of Clinical Investigation 2018.

### 5.3 Hipótesis de EA

#### 5.3.1 Hipótesis de la cascada amiloide

La hipótesis amiloide sugiere que el aumento gradual y progresivo de Aβ a partir de Aβ total o del incremento en la relación de Aβ42 sobre la Aβ40 tienen un papel tóxico y son la causa del inicio y progresión de la EA. El argumento primario de esta hipótesis sostiene el hecho de que tanto la EA de inicio temprano como en la EA de inicio tardío comparten características clínicas y neuropatológicas cuyo punto central es la presencia de SP y NFTs (29,30,32-34,36-40,65).

La evidencia genética que sustenta esta hipótesis proviene de los mecanismos subyacentes a la EA de inicio temprano, dado que esta forma de la enfermedad está relacionada con mutaciones autosómicas dominantes en los genes APP y PSEN. Cada mutación está fuertemente asociada con el aumento en el tamaño de los fragmentos de Aβ, específicamente en el aumento de la relación Aβ42/Aβ40 y cuya diferencia es analizada como un biomarcador de progresión de la enfermedad (Figura 18). La evidencia neuropatológica subsecuente también apoya esta



hipótesis, dada la formación de SP y NFTs y que se evidencia en los análisis de tejidos cerebrales post mortem. Dadas estas características, la hipótesis de la cascada amiloide sugiere que la reducción de A $\beta$  es la terapéutica esencial, algo en el que al igual que el desarrollo de fármacos, la edición genética apunta (29,30,36-39,65).

### **5.3.2 Hipótesis de la presenilina**

Esta hipótesis surge en base a las evidencias estudiadas a partir de los casos de EA de inicio temprano. Las presenilinas (PSEN1 y PSEN2) son dos genes que proporcionan instrucciones para la producción de dos proteínas implicadas en el procesamiento proteolítico de la proteína precursora amiloide y cuyas mutaciones juegan un papel fundamental en la aparición y subsecuente desarrollo de la enfermedad. Estas mutaciones específicamente se encuentran relacionadas a los cambios en la actividad de la enzima  $\gamma$ -secretasa y en la alteración del sitio de escisión de la APP lo que provoca cambios en la longitud de los fragmentos de A $\beta$  (Figura 18).

Al igual que la hipótesis de la cascada amiloide, una fuerte evidencia que apoya esta hipótesis se basa en las mutaciones autosómicas dominantes en los genes PSEN que derivan en la pérdida de una función normal de las proteínas codificadas por este gen (30-32,65).

### **5.3.3 Enfoque de la matriz APP**

La hipótesis del enfoque de la matriz APP propone que todo el sistema proteolítico de la APP puede entenderse como un centro repetitivo, el cual recibe información de sistemas celulares encargados de la regulación de las escisiones proteolíticas. Más específicamente, esta plantea que las enzimas proteolíticas  $\beta$ -secretasa y  $\alpha$ -secretasa se regulan de manera dinámica alrededor de un punto homeostático asociado a la correcta función neuronal (Figura 18). Cuando cambian los parámetros alrededor de este eje homeostático, aparece la enfermedad. A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42 no son los únicos péptidos producidos por el procesamiento proteolítico de APP, por ejemplo, también se encuentra el fragmento P3 producido a partir de la actividad de  $\alpha$ -secretasa y  $\gamma$ -secretasa y del cual existe sospecha de que juega un

papel en la agregación de A $\beta$ 40 en SP mediante un papel de unión competitiva. De igual forma, P3 tiene la capacidad de agregarse en fibrillas y oligómeros asociados a la formación de SP y de la activación de vías apoptóticas mediada por caspasas (65).

Por otra parte, los péptidos producidos en las vías amiloidogénica y no amiloidogénica por las enzimas  $\beta$ -secretasa y  $\alpha$ -secretasa (APPs $\beta$  y APPs $\alpha$ ) están involucrados en funciones de adhesión celular, crecimiento de neuritas y plasticidad sináptica. Estos péptidos tienen la capacidad de unirse a otras proteínas, brindándole un papel de retroalimentación de otros sistemas celulares, al sistema proteolítico de APP. En conjunto, cualquier cambio en todos estos mecanismos van a afectar otros sistemas celulares y eso hace que la EA sea una consecuencia de una compleja alteración en diversos sistemas (65).

#### **5.4 Genes implicados en la EA**

Los factores genéticos que conducen a la aparición de EA son complejos y heterogéneos, esto demuestra que la EA se atribuye a una interacción entre factores ambientales y genéticos. Pese a que el factor ambiental representa importancia, se sabe que el 80% de los casos de EA son a raíz de factores genéticos. Los conocimientos más concretos provienen de técnicas de análisis de ligamiento, donde la EA de inicio temprano se ha analizado, determinando su origen que sigue un modelo mendeliano autosómico dominante (29,36,37,63,64,66)

Dicho modelo es originado por variantes en genes APP, PSEN1, PSEN2 y ABCA7 recientemente asociado; Estos genes son la base central que apoya la hipótesis de la cascada amiloide (Tabla 2). Por otro lado, la EA de inicio tardío no demuestra un patrón de heredabilidad familiar, sin embargo, estudios de secuenciación han determinado que el gen ApoE, representa el factor de riesgo mejor asociado a EA de inicio tardío, siendo el alelo ApoE4 un factor de riesgo hasta 14 veces más alto respecto a otros alelos. Los mismos estudios de secuenciación han asociado a TREM2 a SORL1 y a ABCA7 como factores de riesgo representativo (Tabla 2) (63). Aunque el 80% de los casos de EA están asociados a un factor hereditario, los genes mencionados solo explican entre el 40 y 50% de los casos esa cantidad. Como plantean las hipótesis, la EA se desarrolla a partir de múltiples alteraciones,

por lo que no es de sorprender que ese porcentaje restante de heredabilidad se deba a genes desconocidos. (36-38,64-66)

En este punto se han descubierto nuevos genes con una relación significativa en EA. Estos resultados han sido proporcionados por estudios de asociación de genoma completo GWAS. El GWAS asociado con EA más grande realizado hasta la fecha, fue llevado a cabo por Lambeer et al. en 2013 en el que participaron 74046 personas. Los resultados de Lambeer determinaron el descubrimiento de 20 genes con implicación en EA (Tabla 2) (66).

<b>EA DE INICIO TEMPRANO</b>			
<b>Gen</b>	<b>Ubicación cromosómica</b>	<b>Rol en EA</b>	<b>Método de descubrimiento</b>
APP	21q21.3	-Cascada amiloide -Enfoque de la matriz APP	Análisis de ligamiento
PSEN1	14q24.2	Presenilinas	Análisis de ligamiento
PSEN2	1q42.13	Presenilinas	Análisis de ligamiento
ABCA7	19p13.3	Sin asociar	GWAS Secuenciación de última generación
<b>EA DE INICIO TARDÍO</b>			
ApoE	19q13.32	Cascada Amiloide Enfoque de la matriz APP	Secuenciación de última generación
SORL1	11q24.1	Cascada Amiloide Enfoque de la matriz APP	GWAS Secuenciación de última generación
TREM2			
ABCA7	19p13.3	Sin asociar	GWAS Secuenciación de última generación
<b>ASOCIACIÓN CON EA</b>			
ABCA7	19p13.3	Relacionado con acumulación de A $\beta$ y respuesta inmune	GWAS
BIN1	2q14.3	Relacionado con NFTs	GWAS
CASS4	20q13.31	Relacionado con Respuesta inmune	GWAS
CD33	19q13.3	Relacionado con acumulación de A $\beta$ y respuesta inmune	GWAS
CD2AP	6p12.3	Relacionado con Respuesta inmune	GWAS
CELF1	11p11.2	Relacionado con acumulación de A $\beta$ y NFTs	GWAS
CLU	8p21.1	Relacionado con acumulación de A $\beta$	GWAS

CR1	1q32.2	Relacionado con Respuesta inmune	GWAS
DSG2	18q12.1	Relacionado con acumulación de A $\beta$ y NFTs	GWAS
EPHA1	7q35	Relacionado con Respuesta inmune	GWAS
FERMT2	14q22.1	Relacionado con NFTs	GWAS
HLA-DRB5 DRB1	6p21.3	Relacionado con Respuesta inmune	GWAS
INPP5D	2q37.1	Relacionado con Respuesta inmune	GWAS
MEF2C	5q14.3	Relacionado con Respuesta inmune	GWAS
MS4A6A / MS4A4E	11q12.2	Relacionado con Respuesta inmune	GWAS
NME8	7p14.1	Relacionado con Respuesta inmune	GWAS
PICALM	11q14.2	Relacionado con acumulación de A $\beta$	GWAS
PTK2	8q24.3	No definido	GWAS
SLC24A4	14q32.12	No definido	GWAS
SORL1	11q24.1	Relacionado con acumulación de A $\beta$	GWAS

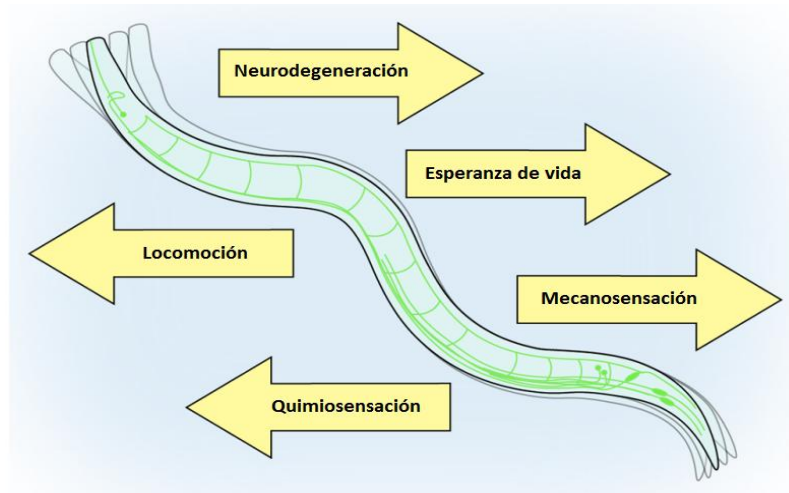
**Tabla 2.** Clasificación de genes relacionados con EA en base a su rol y método de descubrimiento. Los genes más conocidos tienen relación con alguna de las hipótesis planteadas. Por otra parte, los genes asociados a EA identificados en el GWAS realizado por Lambeer et al. juegan una posible asociación en diferentes mecanismos implicados en el desarrollo de la EA.

### 5.5 Modelado de la EA en *C. elegans* y genes implicados

Numerosas características han convertido a *C. elegans* en un nematodo útil para modelar la conectividad neuronal e investigar el desarrollo, la apoptosis y el envejecimiento celular. En base a esto, se han desarrollado modelos predictivos de enfermedades neurodegenerativas, siendo la EA una de las más estudiadas. Diferentes genes humanos asociados a EA, tienen una homología significativa con *C. elegans*. Esta importante característica permite investigar los mecanismos moleculares y celulares de la EA, mediante la creación de modelos que expresan uno, o múltiples fenotipos de la enfermedad (57,60,65).

Es importante que dichos modelos ofrezcan resultados medibles del estado de salud del nematodo (Figura 19). Estos resultados son provocados por aberraciones en la estructura o integridad de las neuronas, y cuya característica se pone en evidencia

mediante la expresión de proteínas fluorescentes en los tejidos específicos y alteraciones en las características fisiológicas del nematodo (60,61,67).



**Figura 19.** Características fisiológicas medibles en modelos de *C. elegans* para EA. La neurodegeneración, la esperanza de vida, la locomoción, la mecanosensación y la quimiosensación son el resultado de las alteraciones en la función de las neuronas y subtipos a nivel individual. Recuperado y modificado de: Genetic and Pharmacological Discovery for Alzheimer's Disease Using *C. elegans*. ACS Chem Neurosci. 2017

### 5.5.1 Modelado de A $\beta$ en musculo

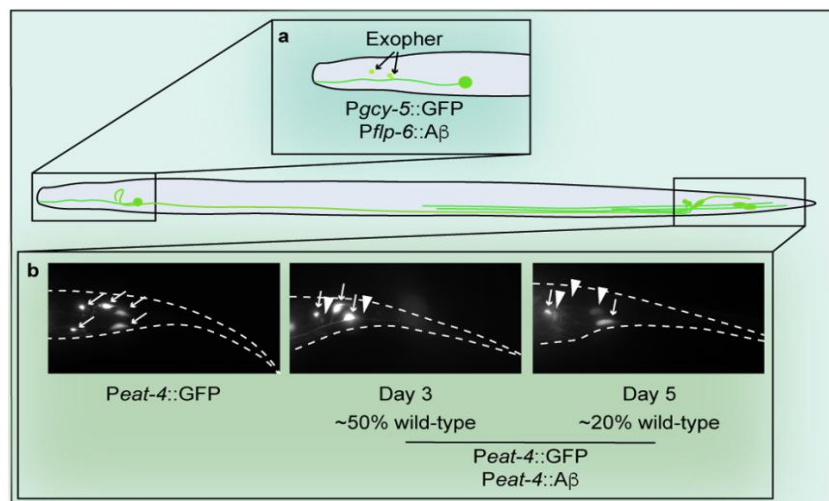
La toxicidad mediada por la formación y posterior acumulación de A $\beta$  es la base de la hipótesis más estudiada y es el patrón molecular más significativo presente en ambas presentaciones de la EA. *C. elegans* cuenta con un gen ortólogo de la APP humana, el Apl-1, cuya estructura carece de la capacidad de producir A $\beta$  por sí solo, por lo que la expresión de A $\beta$  humano debe llevarse a cabo mediante la generación de modelos transgénicos. Los primeros modelos de *C. elegans* en evaluar A $\beta$ , se basaron en el efecto de A $\beta$  en la pared muscular del nematodo (CL2006). La toxicidad del A $\beta$  induce la parálisis de los músculos a medida que el animal envejece. Con la parálisis, *C. elegans* ya no exhibe un fenotipo de movilidad circular y rodante, sino que se vuelve rígido y no responde a los estímulos (60).

### 5.5.2 Modelado de A $\beta$ y APP en neuronas

La formación de SP es un proceso producto de la acumulación de A $\beta$  a raíz de la producción de A $\beta$  y una alteración en los mecanismos fagocíticos y de remoción de

A $\beta$  por parte de las células gliales del SNC en humanos. En *C. elegans* el sistema nervioso es muy sencillo. Sin embargo, ocurre un proceso análogo, donde la expresión de A $\beta$  a nivel neuronal es empaquetada en vesículas extracelulares denominadas “Exophers” para posteriormente ser fagocitadas por celomocitos (análogos a glía). Este mecanismo ha sido modelado en *C. elegans* mediante la expresión de A $\beta$  en neuronas anfibias usando el promotor flp-6 y su posterior visualización mediante la expresión de GFP mediante el promotor gcy-5. (Figura 20a) (60).

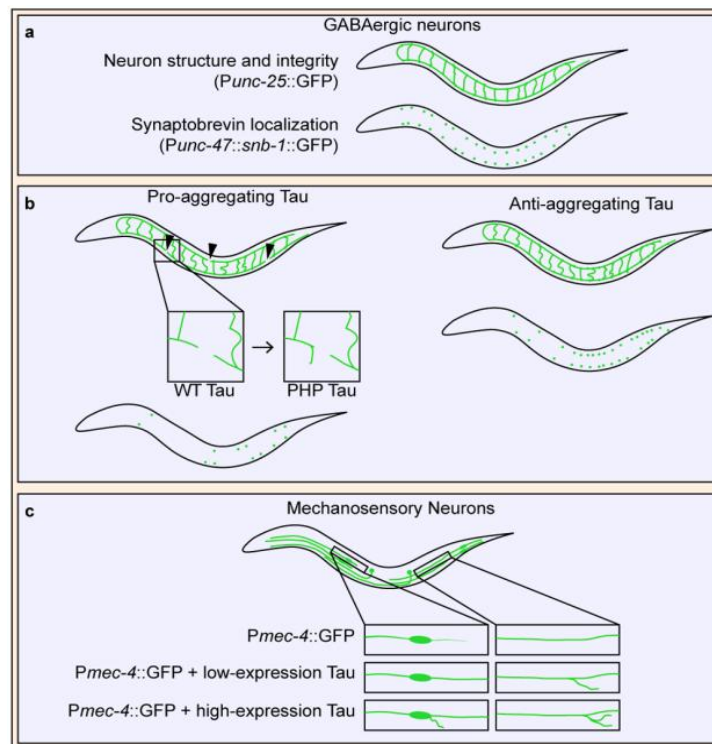
Aunque la locomoción y el comportamiento son resultados cuantificables de toxicidad, no son resultados mensurables directos del proceso de neurodegeneración. Para generar un modelo de *C. elegans* que permita medir neurodegeneración mediada por A $\beta$ , la expresión de A $\beta$  y GFP se restringe a las neuronas glutamatérgicas, las cuales corresponden a 78 de las 302 neuronas que posee el nematodo. De estas 78, 5 están ubicadas en la cola del nematodo y se degeneran de manera proporcional a la edad en respuesta a la expresión constitutiva de A $\beta$  mediante el uso del promotor eat-4 (Figura 20b).



**Figura 20.** Visualización de los mecanismos de aclaramiento neuronal y toxicidad mediada por A $\beta$  en *C. elegans*. (a) corresponde al proceso de remoción de A $\beta$  en neuronas anfibias mediante la acumulación y fagocitosis de los “Exophers” formados. (b) Neurodegeneración provocada por A $\beta$  en 5 neuronas glutamatérgicas ubicadas en la cola de *C. elegans* (señaladas con flechas) y cuya morfología se evidencia a través de la expresión de GFP. Recuperado de: Genetic and Pharmacological Discovery for Alzheimer's Disease Using *C. elegans*. ACS Chem Neurosci. 2017

### 5.5.3 Modelado de Tau

Los NFTs corresponden a otra característica patológica en las dos formas de EA. *C. elegans* permite el modelado de la patología Tau gracias al gen Ptl-1, ortólogo de Tau humana. Ptl-1 al igual que Tau también es responsable de mantener la estructura neuronal, lo que permite generar un modelado práctico para estudiar la patología inducida por Tau en EA. Sin embargo, Ptl-1 no tiene la capacidad de formar agregados o NFTs en las neuronas de *C. elegans*, por lo que reproducir este modelo, requiere expresar una isoforma Tau con mutaciones de pseudo-hiperfosforilación (PHP) para imitar la Tau hiperfosforilada humana. (28,60,61)

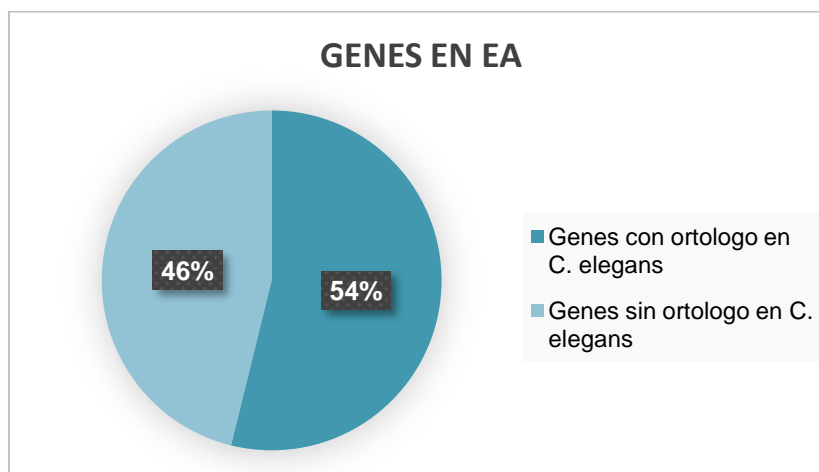


**Figura 21.** Visualización de los efectos de expresión de Tau en neuronas Gabaérgicas y mecanosensoriales de *C. elegans* usando como marcador GFP. Recuperado de: Genetic and Pharmacological Discovery for Alzheimer's Disease Using *C. elegans*. ACS Chem Neurosci. 2017

El modelado de Tau en *C. elegans* se lleva a cabo mediante la expresión de Tau junto con GFP para la determinación de la estructura e integridad de neuronas gabaérgicas usando el promotor unc-25. Por otro lado, se analiza la expresión de sinaptobrevina en neuronas gabaérgicas usando el promotor unc-47 (figura 21a). La sobreexpresión de diferentes isoformas Tau en *C. elegans* tiene como resultado fenotipos agregantes o antiagregantes de Tau. La isoforma PHP induce interrupción neuronal y crecimiento anormal, evidenciado por la reducción en la expresión de sinaptobrevina, mientras que la sobreexpresión de una isoforma Tau antiagregante (F3ΔK280), minimiza los daños inducidos por Tau (figura 21b). En otro modelado, se

analiza el crecimiento anormal de neuritas producto de una elevada expresión de Tau junto con GFP en neuronas mecanosensoriales usando el promotor mec-4 (Figura 21c) (60,61).

El modelado ideal en *C. elegans* está enfocado en cualquiera de los genes ortólogos presentes en el nematodo, sin embargo, no todos los genes representativos de EA tienen un ortólogo en *C. elegans*. De los estudios de secuenciación y GWAS realizados encontramos un total de 26 genes con un papel en EA. Una revisión a través del motor de búsqueda de genes de la WormBase, nos determina que, de esos 26 genes, 14 genes (54%) cuentan con uno o varios genes ortólogos en *C. elegans* (Figura 22) los cuales podrían ser posibles genes a los cuales modelar y dirigir CRISPR/Cas9.



**Figura 22.** Gráfico de porcentaje de genes de *C. elegans* ortólogos a genes de EA. Los datos son obtenidos mediante búsqueda en la WormBase y posteriormente comparados.

El conocimiento de la actividad o función de los genes ortólogos de *C. elegans* sirve como guía durante el proceso de modelado de la EA en *C. elegans*. (Tabla 3). El papel de cada gen indica que tan representativo al tipo de modelado puede llegar a ser el gen y con ello, determinar cómo implementar CRISPR/Cas9 para dirigirlo a uno o varios genes en específico.

GEN HUMANO	ORTOLOGO EN <i>C. elegans</i>	FUNCION DE GEN ORTOLOGO
APP	Apl-1	Está involucrado en la morfogénesis del cuerpo y desarrollo larvario
PSEN1	sel-12	Participa en varios procesos, incluida la localización de proteínas apicales; oviposición y regulación de la transducción de señales
PSEN2		
ABCA7	abt-2	Actividad transportadora transmembrana acoplada a



		ATPasa y actividad transportadora de lípidos
<b>BIN1</b>	amph-1	Tiene actividad de unión a fosfolípidos.
<b>CD2AP</b>	cdap-2	No definido
<b>CELF1</b>	etr-1 EEED8.12 R05D3.8 EEED8.4 K07H8.10	tiene actividad de unión a ARN tiene actividad de unión a ARN tiene actividad de unión a ARN tiene actividad de unión a ARN tiene actividad de unión a ARN
<b>DDR2</b>	kin-23	Receptor transmembrana con actividad de proteína tirosina quinasa.
<b>FERMT2</b>	unc-112	Tiene actividad de unión a integrina
<b>INPP5D</b>	cil-1	Tiene actividad fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 5-fosfatasa
<b>MEF2C</b>	mef-2	Participa en la regulación negativa de la transcripción por la ARN polimerasa II
<b>NME8</b>	ndk-1	Exhibe actividad de unión a proteínas. Participa en varios procesos, incluida la regulación positiva de la cascada MAPK
<b>PICALM</b>	unc-11	Tiene actividad de unión a la cadena pesada de clatrina y actividad de unión a fosfatidilinositol.
<b>PTK2</b>	kin-32	Tiene actividad de unión a ATP y actividad de proteína tirosina quinasa.

**Tabla 3.** Genes representativos en EA con su respectivo ortólogo de *C. elegans* y la posible función genética asociada a este. Tomado y modificado de Genetics of Alzheimer's Disease. Dement Neurocogn Disord 2018. Búsqueda de ortólogos realizada a través del motor de la WormBase: <https://wormbase.org/>

Modelar los 12 genes representativos de EA que no tienen naturalmente un ortólogo en *C. elegans* no representa un obstáculo, dado que es posible crear cepas transgénicas, insertando genes o secuencias codificantes deseadas dentro del genoma de *C. elegans* junto a un promotor y a un indicador. CRISPR/Cas9 es una de las herramientas recientes que tiene la capacidad de realizar estas modificaciones en el genoma de *C. elegans*. (60,65,67,71)

A la fecha, han sido modelada la EA en muchas cepas transgénicas de *C. elegans*, cada cepa diseñada para expresar una o varias proteínas involucradas en la fase bioquímica de la EA en diferentes tejidos o tipos celulares del nematodo. La tabla 4 presenta las cepas más destacadas en el modelado de EA, diferenciadas en base al modelado de A $\beta$ , el gen APP y Tau. El genotipo de cada cepa y la referencia con la cual es reconocida a nivel internacional (60).

MODELADO DE A $\beta$		
Tipo de modelado	Genotipo	Referencia de cepa
Parálisis crónica por A $\beta$	dvIs2 [pCL12 (unc-54/Péptido humano A $\beta$ 42	CL2006

minigeno) + pRF4 (Marcador de coinyeccion)]		
Apl-1 mutada	szT1 [lon-2(e678)] I; apl-1	VC1246
Aβen musculo	dvls14 [ (pCL12) unc-54::Aβ42 + (pCL26) mtl-2::GFP]	CL2120
Aβ panneuronal permisivo	dvls50 [pCL45 (snb-1::Aβ42::3' UTR (long) + mtl-2::GFP) I	CL2355
Parálisis aguda por Aβ	dvls27 [myo-3p::Aβ42::let-851 3'UTR) + rol-6 (su1006)] X	CL4176
Aβ42 en músculos	dvls100 [unc-54p::Aβ42::unc-54 3'-UTR + mtl-2p::GFP]	GMC101
Aβ glutamatérgico	[balnI32; Peat-4::ssAβ42, Peat-4::gfp, Pmyo-2::mCherry]	UA166
Aβ glutamatérgico	baln32[Peat-4::ss Aβ42, Peat-4::GFP, Pmyo-2::mCherry]	UA198
<b>MODELADO APP</b>		
pan-neuronal apl-1 overexpression	ynIs109[Psnb-1::apl-1 cDNA::GFP]	ynIs109
pan-neuronal APP overexpression	vxSi38 [Prab-3::huAPP695::unc-54 UTR, Cb unc-119(+)]	JPS67
<b>MODELADO Tau</b>		
Tau	[aex-3p::hTau V337M + myo-2p::GFP]	V337M
Tau		A152T
Pan-neuronal tau F3ΔK280	byIs193 [Prab-3::F3ΔK280; Pmyo-2::mCherry]	BR5270
Low-expression tau	byIs162; [Prab-3::F3ΔK280(I277P) (I308P); Pmyo-2::mCherry]	PIR3
High-expression tau	pirls4 [Psnb-1::htau40WT-high; Pmyo-2::gfp]	PIR4
Low-expression tau (A152T)	pirls5 [Psnb-1::htau40A152T-low; Pmyo-2::gfp]	PIR5
High-expression tau (A152T)	pirls6 [Psnb-1::htau40A152T-high; Pmyo-2::gfp]	PIR6

**Tabla 4.** Cepas representativas de los diferentes tipos de modelado de EA en *C. elegans*. Recuperado y modificado de: Recuperado de: Genetic and Pharmacological Discovery for Alzheimer's Disease Using *C. elegans*. ACS Chem Neurosci. 2017

## 5.6 Terapéutica usando CRISPR/CAS9 en EA Y *C. elegans*

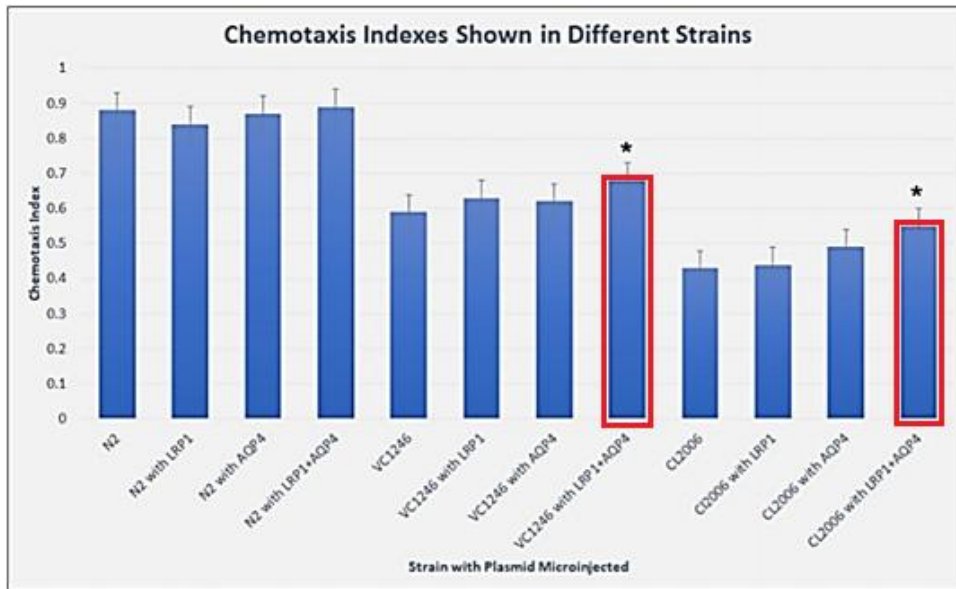
### 5.6.1 Aclaramiento de proteínas responsables de EA en *C. elegans*

El aclaramiento de proteínas aberrantes es una de las estrategias mejor establecidas para la aplicación de CRISPR/Cas9 en EA. El proceso de aclaramiento busca mediante la sobreexpresión o represión de determinados genes, mejorar la

eficiencia de los mecanismos de eliminación de A $\beta$  y Tau. Existen genes conocidos que tienen un papel en los procesos de A $\beta$  a nivel de SNC. Se ha demostrado que aquellas zonas del cerebro mayormente afectadas por la acumulación de SP y NFTs, tienen la particularidad de tener un nivel reducido de expresión en genes como LRP1 y AQP4.

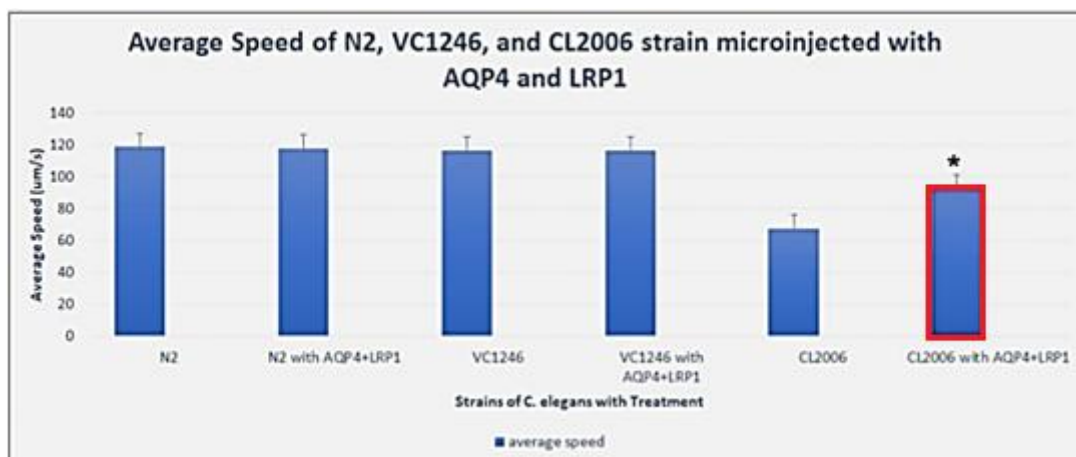
LRP1 codifica una proteína de la familia de receptores LDL, importante en los procesos de internalización y aclaramiento de sustancias. AQP4 codifica para un canal de agua en células del SNC. Este canal tiene un rol vital en el equilibrio hídrico y de iones (70).

Roshni Mishra et al. comprobó estos datos en el modelo de *C. elegans* mediante ensayos de quimiotaxis, tamaño promedio de cría (no significativo) y velocidad promedio de tres diferentes cepas. Una cepa que expresa A $\beta$  antropogénica (CL2006), una cepa con una mutación en el gen *apl-1* (VC1246) y una cepa N2 (tipo salvaje) que funciona como control del ensayo para comparar los datos. Mediante la técnica de microinyección en las gónadas de *C. elegans*. Mishra diseñó un sgRNA y mediante Cas9, insertó los genes LRP1 Y AQP4 de forma independiente y en conjunto, abajo del promotor *apl-1* junto con GFP como marcador de expresión (70). El ensayo de quimiotaxis demostró una reducción drástica de la capacidad quimiotáctica de las cepas VC1246 y CL2006 sin modificar. La cepa VC1246 en la que fue expresado LRP1 y AQP4 conjuntamente, presentan un incremento significativo de 0.5 en el índice quimiotáctico ( $p=0.0067$  valor  $p<0.05$ ). La cepa VC1246 en la que fue expresado LRP1 y AQP4 conjuntamente, presenta un incremento de 0.12 en el índice quimiotáctico ( $p=0.0075$  valor  $p<0.5$ ). A pesar de la notable recuperación, las cepas no alcanzan un nivel de quimiotaxis idéntico a la cepa N2. (61) La cepa en las LRP1 y AQP4 fueron expresados de manera independiente, arrojan resultados poco significativos (70). (Figura 23)



**Figura 23.** Ensayo de quimiotaxis en cepas de *C. elegans* que expresan los genes AQP4 y LRP1 de manera independiente y conjunta. Recuperado de: Expression of anti-neurodegeneration genes in mutant *C. elegans* using CRISPR-Cas9 improves behavior associated with Alzheimer's Disease 2019

El ensayo de velocidad promedio no arrojó un aumento significativo al expresar LRP1 y AQP4 por separado, sin embargo, en la cepa CL2006 al expresar LRP1 y AQP4 de manera conjunta, similar al anterior ensayo, se observa un aumento de 20  $\mu\text{m/s}$ , lo cual es un resultado significativo ( $p=0.0269$  valor  $p < 0.05$ ) (Figura 24)

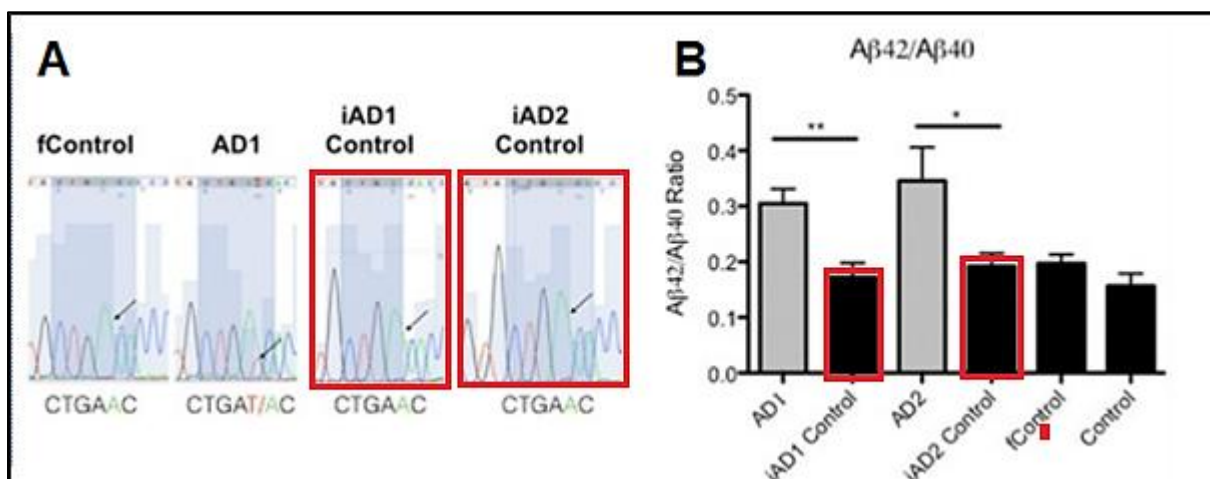


**Figura 24.** Ensayo de velocidad promedio de cepas de *C. elegans* que expresan los genes AQP4 y LRP1 de manera independiente y conjunta. Recuperado de: Expression of anti-neurodegeneration genes in mutant *C. elegans* using CRISPR-Cas9 improves behavior associated with Alzheimer's Disease 2019

## 5.6.2 Corrección de mutaciones responsables de EA en *C. elegans*

A la fecha, no se han publicado ensayos en los que se realice edición de mutaciones en genes importantes para la EA en *C. elegans* mediante el uso de CRISPR/Cas9. Sin embargo, existen estudios que nos pueden brindar aproximaciones y enfoques del cómo utilizar *C. elegans* para corregir mutaciones de EA ya conocidas y que suelen tener un impacto significativo en la EA de inicio temprano a partir del modelado en genes ortólogos o en cepas que expresan proteínas de EA.

Ortiz-Virumbrales et, al. genero neuronas colinérgicas derivadas de células iPSC. Las neuronas AD1 y AD2 portan la mutación *PSEN2-N141I* (mutación de PSEN2 + Alelo E4 ApoE). Utilizando el sistema de CRISPR/Cas9 se generó un DBS en la zona de la mutación, y mediante una plantilla de DNA donante, corrigió la mutación. Para corroborar que la corrección fue realizada exitosamente, se secuencio por método Sanger las neuronas control, neuronas AD1 con la mutación *PSEN2-N141I* y las células después de modificado el gen con CRISPR/Cas9 (iAD1 y iAD2). Por otro lado, se midió por medio de Elisa, el nivel de A $\beta$ 42 sobre A $\beta$ 40 producido por las neuronas AD1 y AD2 en comparación con las células editadas con CRISPR/Cas9. Se evidencia una significativa reducción en la relación A $\beta$ 42/A $\beta$ 40, lo que indica, que la corrección de la mutación en el gen *PSEN2*, se realizó de manera eficiente (62). (Figura 25)



**Figura 25.** Implementación de CRISPR/Cas9 en la edición de la mutación PSEN2-N141I presente en neuronas colinérgicas derivadas de iPSC. Recuperado y modificado de: CRISPR/Cas9-Correctable mutation-related molecular and physiological phenotypes in iPSC-derived Alzheimer's PSEN2 N141I neurons. Acta Neuropathol Commun 2017

## 6. DISCUSIÓN

Esta revisión presenta el sistema de edición genética CRISPR como una herramienta de edición genética con grandes opciones aplicables en terapéutica o tratamiento de la EA tanto de inicio temprano, como de inicio tardío, teniendo como eje de investigación, el modelado de la enfermedad en un animal ampliamente estudiado; *C. elegans*.

Se determino el origen del sistema CRISPR/Cas9, desde el descubrimiento de secuencias CRISPR por Mojica et, al. hasta el conocimiento completo del operón Cas y la Matriz CRISPR. Se demostró como el sistema CRISPR/Cas9 (CRISPR Tipo II) es el sistema más desarrollado a la fecha en cuanto a su capacidad de editar genomas de cualquier organismo gracias a las modificaciones realizadas a lo largo del tiempo (48,50)

CRISPR/Cas9 puede ser aplicado al tratamiento de enfermedades de tipo neurodegenerativas mediante dos estrategias fundamentales que difieren de su metodología de aplicación pero que permiten ya sea, editar mutaciones en genes conocidos durante diferentes etapas de la vida, o facilitar el aclaramiento de proteínas aberrantes al inicio o transcurso de la demencia en EA, lo que frena la perdida crónica de neuronas. Esto sin duda abre nuevos caminos a formas de tratamiento que anteriormente no se consideraban adecuadas o posibles (54).

Las hipótesis de la EA más destacadas son el punto aplicable para esclarecer genes de importancia en la patología y a los cuales se puede dirigir el sistema CRISPR/Cas9. Entender las principales hipótesis establecidas en el proceso de comprensión de la enfermedad, determina enfoques más precisos para establecer estrategias de investigación. Cada hipótesis es dominada por una serie de genes bien conocidos por su papel en la EA (68)

La hipótesis de la cascada amiloide, por lejos es la hipótesis mejor comprendida y mayormente aceptada por la comunidad científica dado que la acumulación de A $\beta$  y la posterior formación de SP y NFTs son signos patológicos característicos en ambas formas de la enfermedad. Aunque esta hipótesis enfoca el papel del gen

APP como el centro de la patología, la hipótesis de la cascada de amiloide no se ha aceptado completamente, ya que no explica bien toda la heterogeneidad y la patología mixta que se ha evidenciado en tejidos de cerebro de diversas poblaciones humanas representativas de EA. La hipótesis de las presenilinas surge en el intento de explicar la EA a partir del rol de los genes PSEN. Aunque esta hipótesis es fuertemente apoyada por el papel de diferentes mutaciones en los genes *PSEN* en la EA de inicio temprano, aun es incapaz de explicar muchos de los procesos de la fase celular en la EA (65).

En un intento por desarrollar una hipótesis que ofrezca una mejor comprensión de la EA, surge la hipótesis del enfoque de la matriz APP, la cual a partir del rol del gen APP, aborda una serie mecanismos bioquímicos activados por los distintos fragmentos generados a partir de la escisión proteolítica de APP y que son indispensables para mantener una homeóstasis celular a nivel cerebral. Una vez, se presenta alteración en alguna de estas vías, diferentes mecanismos celulares se ven afectados, llevando a la apoptosis neuronal y provocando la demencia. A pesar de su interesante planteamiento, es una hipótesis poco probada y conocida a nivel general (65).

Como ya se ha demostrado, estas hipótesis están basadas en el origen genético de la EA de inicio temprano y parte de la EA de inicio tardío. A partir de estudios de secuenciación, se han determinado mutaciones genéticas importantes, Sin embargo, estas mutaciones están lejos de explicar todos los casos de EA que se presentan a nivel mundial, por lo que ha sido sospecha de la comunidad científica, el rol de genes desconocidos en la EA. Los estudios GWAS han demostrado el papel de más de veinte genes que representan un factor de riesgo para la EA. Estos genes son el punto de partida de CRISPR/Cas9, en una enorme oportunidad de investigación a fin de dilucidar los mecanismos de cada uno de ellos y con ello, desarrollar una terapia génica efectiva.

Para poder evaluar el rol de cada gen, primero es importante comprender su papel y así modelar su función en un modelo animal. *C. elegans* es sin duda, uno de los mejores modelos por sus múltiples ventajas ya abordadas anteriormente. Para esto se determinaron los mecanismos que ofrece *C. elegans* para modelar la EA. Ya se

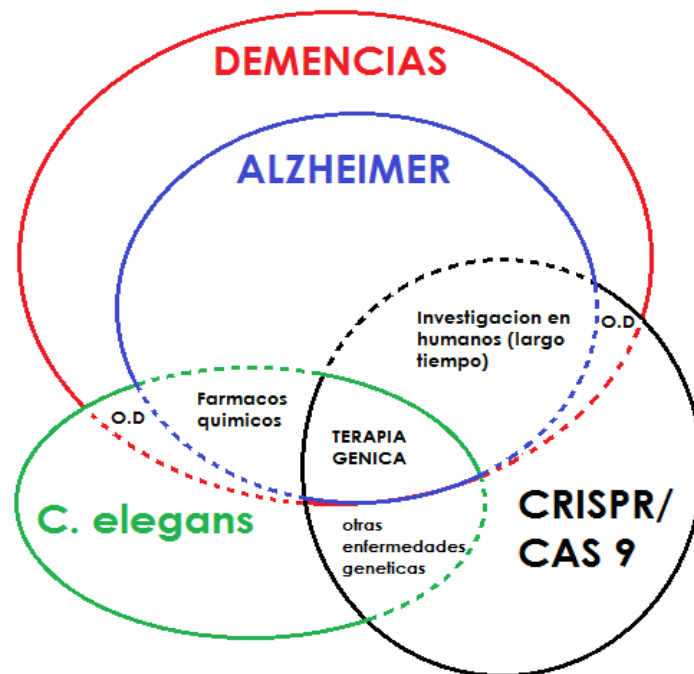
ha demostrado que es posible modelar cualquier proteína, expresándola a partir de genes ortólogos o mediante la inserción de el gen de interés junto a promotores de expresión en el genoma de *C. elegans*. De esta manera, se crean cepas transgénicas, que son identificadas con una nomenclatura internacional para su uso por distintas entidades. Se relacionaron las principales cepas desarrolladas para modelar EA, cada una, expresa un tipo distinto de proteína, lo cual es útil a la hora de diseñar una estrategia de implementación de CRISPR/Cas9

La WormBase sin duda es una de las herramientas mejor desarrolladas para la búsqueda y comparación genética de *C. elegans*. Gracias al motor de búsqueda, se identificaron 14 genes de importancia en EA, con uno o varios genes ortólogos en el nematodo. Esto es una enorme ventaja, ya que abre en muchas, las posibilidades de abordar estrategias terapéuticas (71).

Roshni Mishra et al. aplicaron todos estos conceptos y comprobaron como CRISPR/Cas9 es útil como estrategia de aclaramiento de A $\beta$  expresado en musculo de *C. elegans*. (Cepas CL2006 Y VC1246) Mediante la inserción y expresión con CRISPR/Cas9 de genes implicados en procesos de aclaramiento de A $\beta$  como LRP1 y AQP4. Esta aplicación demostró claramente mediante ensayos de quimiotaxis y velocidad promedio, como el proceso de aclaramiento de A $\beta$  al expresar ambos genes conjuntamente es mucho más eficiente. La capacidad quimiotáctica y la velocidad promedio aumentaron significativamente después de expresar ambos genes, lo cual es un resultado directo de la reducción de la toxicidad provocada por A $\beta$  en las paredes musculares del nematodo. Esto demostró que el aclaramiento de A $\beta$  es una estrategia importante a seguir como una posible aplicación terapéutica en modelos mas complejos, como lo son Zebrafish o incluso modelos murinos (70).

Similar al experimento de edición de mutaciones genéticas mediante CRISPR/Cas9 hechos por Ortiz-Virumbrales et, al en neuronas colinérgicas procedentes de células iPSC, hace falta realizar estudios de este enfoque en cepas de *C. elegans* representativas de EA, para corroborar que CRISPR/Cas9 tiene la capacidad de corregir las mutaciones presentes y frenar o evitar el daño celular producto de la agregación de A $\beta$  y Tau. A diferencia de un modelo celular, *C. elegans* ofrece resultados cuantificables in vivo, lo que es sin duda una importante ventaja y un camino para estudiar la implementación de CRISPR/Cas9 (62).





**Figura 26.** Diagrama de enlace entre cada uno de los campos abordados en esta revisión. Aunque la terapia génica abarca un sin número de posibilidades en cuando a modelado y enfoque terapéutico de enfermedades neurodegenerativas, las ventajas de aplicarla a un modelo animal que ofrezca resultados rápidos y precisos de la EA es la propuesta central planteada.

La terapia génica tiene muchos campos de aplicación en la actualidad, siendo el sistema CRISPR/Cas9 uno de los más implementados en el mundo. En relación con la EA, CRISPR/Cas9 está por lejos, a un tiempo de aplicarse en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. *C. elegans* es un modelo por mucho, ampliamente usado ya que permite estudiar muchas otras patologías de base genética y CRISPR/Cas9 ya es usado en este nematodo a fin de investigar estas enfermedades. Por otra parte, *C. elegans* es usado en el diseño y prueba de fármacos elaborados para tratar muchas enfermedades. A pesar de todas estas oportunidades, la terapia génica es por mucho, un campo revolucionario de tratamiento. Por esta razón, utilizar CRISPR/Cas9 en un modelo como *C. elegans*, representa una gran oportunidad para determinar todas y cada una de las ventajas de este sistema, así como comprender aquellas desventajas con el fin de corregirlas o mejorarlas (Figura 21).

CRISPR/Cas9 ha demostrado que como opción terapéutica., permite alcanzar los objetivos planteados, sin embargo, es importante primero superar algunas de las barreras o limitaciones que existen antes de considerar el uso de esta herramienta. El principal y más importante obstáculo, radica en los efectos fuera del objetivo que

se pueden presentar con el uso de esta herramienta. El uso de CRISPR/Cas9 plantea la posibilidad de que se produzcan efectos en sitios diferentes al gen deseado. Debido al enorme tamaño del genoma humano, los efectos en sitios diferentes son considerablemente significativos, es por esto que actualmente se han desarrollado variantes o modificaciones en el tamaño y especificidad del sgRNA o en la función de Cas9 con el fin de disminuir al mínimo posible los efectos en sitios diferentes, obteniendo a la fecha, excelentes resultados en modelos animales pequeños (53).

Desde una perspectiva bioética, CRISPR/Cas9 aun genera especulación a nivel internacional, dado que la edición de genes es considerada como una práctica “riesgosa” ya que son desconocidas las consecuencias de la edición a largo plazo en seres humanos. Sin embargo, es comprensible que parte de estos temores provengan de prácticas poco éticas llevadas a cabo en el campo de la medicina, similares a las practicas nazis durante la segunda guerra mundial. Sin embargo, CRISPR/Cas9 usado de forma bioética y una vez resueltas las dudas y llenado los vacíos respecto a su uso, abrirá las fronteras hacia una mejor calidad de vida humana y animal (59).

## **7. CONCLUSIONES**

- El mecanismo CRISPR de tipo II (CRISPR/Cas9) es la herramienta de edición genética más desarrollada y con mayor potencial aplicable a EA, ya que desde su origen en Arqueas y por su estructura modificada de una nucleasa Cas9 y hebra de sgRNA, presenta una alta eficacia al editar genes.
- La revisión permitió identificar los genes APP, PSEN1, PSEN2 y ABCA7 con la EA de inicio temprano y los genes ApoE, SORL1, TREM2 y ABCA7 con la EA de inicio tardío. Además de otros 17 genes asociados que fueron hallados en el GWAS del 2013 y que están altamente relacionados en la acumulación de A $\beta$  y otros fallos a nivel celular.
- Se establecieron tres principales estrategias de estudio de EA en el nematodo *C. elegans*: El modelado de A $\beta$ , de APP y de TAU en neuronas y células musculares, permitiendo obtener resultados cuantificables de la

expresión de genes en proteínas, junto a GFP como el principal indicador de expresión.

- La revisión identifico las cepas transgénicas de *C. elegans*: CL2006, VC1246, ynIs109 y V337 como las cepas más destacadas en el modelado A $\beta$ , APP y TAU, junto con 17 genes ortólogos a los genes de EA identificados en el GWAS, presentes en este modelo y que permiten estudiar cada una de las principales hipótesis de EA establecidas.
- Se han registrado dos estrategias terapéuticas en donde el sistema CRISPR/Cas9 puede ser empleado: El aclaramiento de proteínas y la corrección de genes responsables en EA. Los pocos resultados basados en los experimentos, sugieren este modelo como un excelente camino a seguir para obtener mejores datos que ofrezcan la posibilidad de implementar CRISPR/Cas9 a modelos más complejos.
- Aunque se podrían considerar dos estrategias como posibles oportunidades terapéuticas en EA, la tecnología CRISPR aun se encuentra en desarrollo, a fin de garantizar procesos de edición genética con una alta precisión. Esto se suma a una serie de cuestionamientos éticos acerca de la edición genética en humanos y sus consecuencias, a lo cual, hace falta una investigación mayor que demuestre que esta tecnología representa una manera segura, de dar tratamiento a enfermedades de origen genético.

## **8. BIBLIOGRAFÍA**

- (1) Byerly L, Cassada RC, Russell RL. The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*. I. Wild-type growth and reproduction. *Dev Biol* 1976 Jul 01;51(1):23-33.
- (2) Kenyon C. The Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science* 1988;240(4858):1448-1453.
- (3) Blaxter M. *Caenorhabditis elegans* is a nematode. *Science* 1998 Dec 11;282(5396):2041-2046.

- (4) Culetto E, Sattelle DB. A role for *Caenorhabditis elegans* in understanding the function and interactions of human disease genes. *Hum Mol Genet* 2000 Apr 12;;9(6):869-877.
- (5) Hodgkin J. *Caenorhabditis Elegans*. *Encyclopedia of Genetics* 2001:251-256.
- (6) Chisholm AD, Jin Y. Neuronal differentiation in *C. elegans*. *Current Opinion in Cell Biology* 2005;17(6):682-689.
- (7) Schafer WR. Deciphering the neural and molecular mechanisms of *C. elegans* behavior. *Curr Biol* 2005 Sep 06;;15(17):723.
- (8) Miyasaka T, Ding Z, Gengyo-Ando K, Oue M, Yamaguchi H, Mitani S, et al. Progressive neurodegeneration in *C. elegans* model of tauopathy. *Neurobiology of Disease* 2005;20(2):372-383.
- (9) Coghlan A. Nematode genome evolution: *WormBook*; 2005.
- (10) Savel J, Clostre F. [A Nematode Nobel Prize: *Caenorhabditis elegans*]. *Ann Pharm Fr* 2006 Sep;64(5):291-307.
- (11) Fay D. Genetic mapping and manipulation: Chapter 1-Introduction and basics. *WormBook : the online review of C. elegans biology*; 2006:1-12.
- (12) Fay D. Genetic mapping and manipulation: chapter 9--Synthetic and enhancer mutations. *WormBook* 2006 Feb 17,:1-7.
- (13) Praitis V. Creation of transgenic lines using microparticle bombardment methods. *Methods Mol Biol* 2006;351:93-107.
- (14) Kaletta T, Hengartner MO. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nat Rev Drug Discov* 2006 05;5(5):387-398.
- (15) Gregorio. P, Sanchez. J. DEMENCIA. *Sociedad Española de Geriatria y Gerontología*, editor. *Tratado de geriatría para residentes* Madrid: International Marketing & Communication, S.A.; 2006. p. 173-188.
- (16) Holmes C. Dementia. *Medicine* 2008;36(9):467-470

- (17) Lee M, Chodosh J. Dementia and Life Expectancy: What Do We Know? Journal of the American Medical Directors Association 2009;10(7):466-471.
- (18) Chen J, Lin K, Chen Y. Risk Factors for Dementia. Journal of the Formosan Medical Association 2009;108(10):754-764.
- (19) Ramirez-Bermudez J. Alzheimer's Disease: Critical Notes on the History of a Medical Concept. Archives of Medical Research 2012;43(8):595-599.
- (20) Gazes Y, Soldan A, Stern Y. Alzheimer's Disease. Encyclopedia of Human Behavior (Second Edition) 2012:108-115.
- (21) Walsh DM, Teplow DB. Chapter 4 - Alzheimer's Disease and the Amyloid  $\beta$ -Protein. Progress in Molecular Biology and Translational Science 2012;107:101-124.
- (22) Castellani RJ, Moreira PI, Zhu X, Perry G. Alzheimer's Disease: Pathology and Pathogenesis. Reference Module in Biomedical Sciences 2014.
- (23) Peter J, Klöppel S. Alzheimer's Disease. Brain Mapping 2015:647-651.
- (24) Merino EN, Sendin MAC, Osorio JAV. Enfermedad de Alzheimer. Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado 2015;11(72):4306-4315.
- (25) Braak H, Del Tredici-Braak K. Alzheimer's Disease, Neural Basis of. International Encyclopedia of the Social & Behavioral Sciences (Second Edition) 2015:591-596.
- (26) Reitz C. Genetic diagnosis and prognosis of Alzheimer's disease: challenges and opportunities. Expert Review of Molecular Diagnostics 2015 Mar;15(3):339-348.
- (27) Tekeuchi Y. ALZHEIMER UN PROBLEMA DE SALUD PÚBLICA EN COLOMBIA. 2015; Available at: <https://www.icesi.edu.co/unicesi/todas-las->

noticias/2241-alzheimer-un-problema-de-salud-publica-en-colombia.

Accessed Mar 18, 2020.

- (28) Arendt T, Stieler JT, Holzer M. Tau and tauopathies. *Brain Research Bulletin* 2016;126:238-292.
- (29) Selkoe DJ, Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO molecular medicine* 2016 Jun;8(6):595-608.
- (30) Kanekiyo T, Bu G. Chapter 6 - Apolipoprotein E and Amyloid- $\beta$ -Independent Mechanisms in Alzheimer's Disease. *Genes, Environment and Alzheimer's Disease* 2016:171-196.
- (31) Xue-shan Z, Juan P, Qi W, Zhong R, Li-hong P, Zhi-han T, et al. Imbalanced cholesterol metabolism in Alzheimer's disease. *Clinica Chimica Acta* 2016;456:107-114.
- (32) Hung ASM, Liang Y, Chow TCH, Tang HC, Wu SLY, Wai MSM, et al. Mutated tau, amyloid and neuroinflammation in Alzheimer disease—A brief review. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry* 2016;51(1):1-8.
- (33) De Strooper B, Karran E. The Cellular Phase of Alzheimer's Disease. *Cell* 2016 Feb 11;164(4):603-615.
- (34) Luczkowski M. “No screams and cries will convince us that white is white and black is black”, an ode to the defenders of amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease. *Coordination Chemistry Reviews* 2016;327-328:35-42
- (35) Calsolaro V, Edison P. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions. *Alzheimer's & Dementia* 2016;12(6):719-732.
- (36) Hooli B, Tanzi RE. Chapter 2 - The Genetic Basis of Alzheimer's Disease. *Developing Therapeutics for Alzheimer's Disease* 2016 :23-37.
- (37) Hooli B, Tanzi RE. Chapter 34 - The Genetic Basis of Alzheimer's Disease: Findings From Genome-Wide Studies. *Genomics, Circuits, and Pathways in Clinical Neuropsychiatry* 2016:547-571

- (38)** Tosto G, Reitz C. Genomics of Alzheimer's disease: Value of high-throughput genomic technologies to dissect its etiology. *Molecular and Cellular Probes* 2016;30(6):397-403.
- (39)** Mohamed T, Shakeri A, Rao PPN. Amyloid cascade in Alzheimer's disease: Recent advances in medicinal chemistry. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2016;113:258-272.
- (40)** Sterner RM, Takahashi PY, Yu Ballard AC. Active Vaccines for Alzheimer Disease Treatment. *Journal of the American Medical Directors Association* 2016;17(9):862.e1-862.e15.
- (41)** López Casillas F, López Casillas F. CRISPR, el sueño divino hecho realidad. *Revista de la Facultad de Medicina (México)* 2016 08;/58(4):55-60.
- (42)** Kanchiswamy CN, Maffei M, Malnoy M, Velasco R, Kim J. Fine-Tuning Next-Generation Genome Editing Tools. *Trends in Biotechnology* 2016;34(7):562-574.
- (43)** Maeder ML, Gersbach CA. Genome-editing Technologies for Gene and Cell Therapy. *Molecular Therapy* 2016;24(3):430-446.
- (44)** Prabhu V, Xu H. Endonuclease mediated genome editing in drug discovery and development: promises and challenges. *Drug Discovery Today: Technologies* 2016;21-22:17-25.
- (45)** Lander E. The Heroes of CRISPR. *Cell* 2016;164(1):18-28.
- (46)** Mojica FJM, Montoliu L. On the Origin of CRISPR-Cas Technology: From Prokaryotes to Mammals. *Trends in Microbiology* 2016;24(10):811-820.
- (47)** Golubov A. Chapter 6 - CRISPR: Bacteria Immune System. *Genome Stability* 2016:87-98.
- (48)** Han W, She Q. Chapter One - CRISPR History: Discovery, Characterization, and Prosperity. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 2017;152:1-21
- (49)** Ede DR, Farhang N, Stover JD, Bowles RD. 4.32 Gene Editing Tools. *Comprehensive Biomaterials II* 2017:589-599.

- (50) Pelletier S. CRISPR–Cas9. Encyclopedia of Microbiology (Fourth Edition) 2017:772-782.
- (51) Lemay M, Horvath P, Moineau S. The CRISPR-Cas app goes viral. *Current Opinion in Microbiology* 2017;37:103-109.
- (52) Hille F, Richter H, Wong SP, Bratovič M, Ressel S, Charpentier E. The Biology of CRISPR-Cas: Backward and Forward. *Cell* 2018;172(6):1239-1259
- (53) Singh V, Braddick D, Dhar PK. Exploring the potential of genome editing CRISPR-Cas9 technology. *Gene* 2017;599:1-18.
- (54) Ramirez JC. Chapter Six - Gene Editing and CRISPR Therapeutics: Strategies Taught by Cell and Gene Therapy. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 2017;152:115-130.
- (55) Martinez-Lage M, Torres-Ruiz R, Rodriguez-Perales S. Chapter Two - CRISPR/Cas9 Technology: Applications and Human Disease Modeling. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 2017;152:23-48.
- (56) Powell SK, Gregory J, Akbarian S, Brennand KJ. Application of CRISPR/Cas9 to the study of brain development and neuropsychiatric disease. *Molecular and Cellular Neuroscience* 2017;82:157-166.
- (57) Shrock E, Güell M. Chapter Six - CRISPR in Animals and Animal Models. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 2017;152:95-114.
- (58) de Lecuona I, Casado M, Marfany G, Lopez Baroni M, Escarrabill M. Gene Editing in Humans: Towards a Global and Inclusive Debate for Responsible Research. *Yale J Biol Med* 2017 12;90(4):673-681.
- (59) Cribbs AP, Perera SMW. Science and Bioethics of CRISPR-Cas9 Gene Editing: An Analysis Towards Separating Facts and Fiction. *Yale J Biol Med* 2017 12;90(4):625-634.
- (60) Griffin EF, Caldwell KA, Caldwell GA. Genetic and Pharmacological Discovery for Alzheimer's Disease Using *Caenorhabditis elegans*. *ACS Chem Neurosci* 2017 12 20;8(12):2596-2606.



- (61) Pir GJ, Choudhary B, Mandelkow E. *Caenorhabditis elegans* models of tauopathy. *FASEB J* 2017 12;31(12):5137-5148
- (62) Ortiz-Virumbrales M, Moreno CL, Kruglikov I, Marazuela P, Sproul A, Jacob S, et al. CRISPR/Cas9-Correctable mutation-related molecular and physiological phenotypes in iPSC-derived Alzheimer's PSEN2 N141I neurons. *Acta Neuropathol Commun* 2017 10 27;;5(1):77.
- (63) Shao W, Peng D, Wang X. Genetics of Alzheimer's disease: From pathogenesis to clinical usage. *Journal of Clinical Neuroscience* 2017;45:1-8.
- (64) Carmona S, Hardy J, Guerreiro R. Chapter 26 - The genetic landscape of Alzheimer disease. *Handbook of Clinical Neurology* 2018;148:395-408.
- (65) Hunter S, Smailagic N, Brayne C. A $\beta$  and the dementia syndrome: Simple versus complex perspectives. *European Journal of Clinical Investigation* 2018;48(12):e13025.
- (66) Kim JH. Genetics of Alzheimer's Disease. *Dement Neurocogn Disord* 2018;17(4):131-136.
- (67) McDiarmid TA, Au V, Loewen AD, Liang J, Mizumoto K, Moerman DG, et al. CRISPR-Cas9 human gene replacement and phenomic characterization in *Caenorhabditis elegans* to understand the functional conservation of human genes and decipher variants of uncertain significance. *Dis Model Mech* 2018 11 26;;11(12).
- (68) Rohn TT, Kim N, Isho NF, Mack JM. The Potential of CRISPR/Cas9 Gene Editing as a Treatment Strategy for Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis Parkinsonism* 2018;8(3)
- (69) Rahman S, Datta M, Kim J, Jan AT. CRISPR/Cas: An intriguing genomic editing tool with prospects in treating neurodegenerative diseases. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2019;96:22-31.
- (70) Roshni Mishra, Leya Joykutty, Kepa Oyarbide American Heritage School, Plantation, FL. Expression of anti-neurodegeneration genes in mutant *Caenorhabditis elegans* using CRISPR-Cas9 improves behavior associated with Alzheimer's Disease 2019.

(71) Ins. Europeo de Bioinformática, Ins. Wellcome Trust Sanger, Ins. Ontario para la Investigación del Cáncer. WormBase. Available at: <https://wormbase.org>, 2020.

## 9. ANEXOS

### Participación en eventos internacionales

Esta revisión ha sido presentada en dos eventos internacionales bajo la modalidad de Poster.

**Anexo 1:** Certificado de participación en el VIII Congreso Internacional de la Asociación científica latina ASCILA llevado a cabo en la Universidad de la salud del estado de México, en la ciudad de Toluca de Lerdo – México.



UNSA  
UNIVERSIDAD DE LA SALUD  
DEL ESTADO DE MÉXICO



OTORGAN LA PRESENTE

# CONSTANCIA

Neira Mora Daniel Gustavo, González Devia Lizeth, Sánchez Mora

**A:** Ruth Melida

Por su participación en el Concurso en la Modalidad Cartel, con el trabajo "**Avances e implementación de tecnología CRISPR/CAS-9 aplicada en Caenorhabditis elegans como opción terapéutica para la enfermedad de Alzheimer**", dentro del **VIII Congreso Internacional de ASCILA**, los días 18 y 19 de Octubre de 2019.

**Dr. Javier E. Herrera Villalobos**  
Rector UNSA

**Hugo Mendieta Zerón, PhD.**  
Director ASCILA

**Anexo 2:** Certificado de participación en el Second Latin American Worm Meeting llevado a cabo en la Bolsa de Comercio de Rosario, en la ciudad de Rosario Santa Fe – Argentina.

---

**Second Latin American Worm Meeting**  
**February 19-21- 2020**  
**Rosario- Argentina**

---



Rosario, February 21, 2020

We certify that **Daniel Gustavo Neira Mora** participated in the Second Latin American *C.elegans* Meeting held in Rosario, Argentina from February 19<sup>th</sup> to 21<sup>st</sup> 2020, presenting the poster "**Review: advances and implementation of CRISPR / CAS-9 technology applied in *Caenorhabditis elegans* as a therapeutic option for Alzheimer's disease**"

Diego de Mendoza  
Scientific Committee