



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

“INHIBICIÓN DE AGREGADOS DE BETA AMILOIDE MEDIANTE VÓRTICES DE CAMPOS MAGNÉTICOS EN MODELOS *IN VITRO*”

TESIS

Que para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PRESENTA

Martín Alejandro Maldonado Moreles

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Herlinda Bonilla Jaime

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Gustavo Basurto Islas

ASESOR DE TESIS:

Dr. Teodoro Córdova Fraga

JURADO:

Presidente:

Dra. Herlinda Bonilla Jaime

Secretario:

Dr. Gustavo Basurto Islas

Vocal:

Dr. Teodoro Córdova Fraga

Vocal:

Dr. Francisco García Sierra

Vocal:

Dra. Perla Yolanda López Camacho

Iztapalapa, Ciudad de México
a 3 de diciembre del 2021

xandro_k@hotmail.com

Dedicado a la familia Moreles, mi familia.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a CONACYT por el apoyo recibido a esta tesis a través del proyecto Ciencia Básica número: A1-S-29906. También se agradece al Dr. Daniel Chávez Valenzuela por su apoyo técnico.

El autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para sus estudios de doctorado, con el número de registro 466587, que comprendió del periodo de enero 2017 al diciembre del 2020. El doctorado de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de excelencia del CONACyT y además, cuenta con apoyo del mismo Consejo con el convenio PFP-20-93.

El presente trabajo fue realizado en los Laboratorios de “Biomagnetismo” e “Ingeniería Biomédica” del Departamento de Ingeniería Física y del Departamento de Ingenierías Química, Electrónica y Biomédica respectivamente, ambos de la Universidad de Guanajuato, bajo la dirección del Dr. Teodoro Córdova Fraga y el Dr. Gustavo Basurto Islas; y el Departamento de Biología de la Reproducción, Laboratorio de Psicobiología de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, bajo la dirección de la Dra. Herlinda Bonilla Jaime



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa

Fecha : 01/12/2021
Página : 1/1

CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO

La Universidad Autónoma Metropolitana extiende la presente CONSTANCIA DE PRESENTACION DE DISERTACIÓN PÚBLICA de DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD del alumno MARTIN ALEJANDRO MALDONADO MORELES, matrícula 2171801275, quien cumplió con los 290 créditos correspondientes a las unidades de enseñanza aprendizaje del plan de estudio, 60 créditos de TRABAJO ACEPTADO PARA SU PUBLICACION SOBRE LA MISMA TESIS y 30 créditos de PREEXAMEN DOCTORAL. Con fecha tres de diciembre del 2021 presentó la DEFENSA de su DISERTACIÓN PÚBLICA cuya denominación es:

Inhibición de agregados de beta amiloide mediante vórtices de campos magnéticos en modelos in vitro.

Cabe mencionar que la aprobación tiene un valor de 90 créditos y el programa consta de 360 créditos.

El jurado del examen ha tenido a bien otorgarle la calificación de:

APROBADO

JURADO

Presidenta

DRA. HERLINDA BONILLA JAIME

Secretario

DR. GUSTAVO BASURTO ISLAS

Vocal

DRA. PERLA YOLANDA LOPEZ CAMACHO

Vocal

DR. FRANCISCO GARCIA SIERRA

Vocal

DR. TEODORO CORDOVA FRAGA

ÍNDICE GENERAL

TABLAS Y FIGURAS.....	9
ABREVIATURAS.....	13
RESUMEN:	15
INTRODUCCIÓN	17
Enfermedad de Alzheimer (EA)	17
Fisiopatología de la EA	18
Cinética de agregación del P β A.....	20
Estructura del P β A.....	23
Importancia de las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas.	25
Fundamentos de electromagnetismo	27
Campos magnéticos de una corriente.....	27
Campos magnéticos vorticiales.....	29
Modelos de estudio de la EA.....	31
ANTECEDENTES DIRECTOS	32
Efectos de CEM en humanos y en modelos celulares.....	32
JUSTIFICACIÓN.....	39
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	39
HIPÓTESIS.....	39
OBJETIVOS	40
General.....	40
Específicos	40
MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
Diseño y caracterización de la bobina.....	41
Osciladores.....	44
Preparación del P β A ₄₂	45
Identificación de agregados mediante espectroscopía de fluorescencia y ensayo de tioflavina-T.....	46
Identificación de agregados mediante la técnica de electroforesis y Western blot.....	47
Modelo de agregación del P β A en cultivo celular.....	48
Cultivo celular.....	48
Exposición del P β A a CMV en cultivos celulares.	49

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	51
RESULTADOS.....	53
Sistema de estimulación para CMV	53
Evaluación cuantitativa	54
Inhibición de la agregación del P β A mediante la estimulación por CMV, evaluación cualitativa.....	55
Los CMV no inducen toxicidad e inhiben la agregación del β A.....	57
DISCUSIÓN	59
PERSPECTIVAS.....	69
REFERENCIAS	71

TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Interacción de CM con sistemas biológicos.....	30
Tabla 2. Estudios realizados con CEM en cultivos celulares.....	35
Figura 1. Fases de agregación del P β A [41]: i) fase de nucleación y ii) fase de crecimiento (curva verde). La adición de semillas o iniciadores reduce el tiempo de nucleación e induce la formación de agregados más rápidamente (curva roja).	20
Figura 2. Curva cinética idealizada para la formación de fibras de amiloide [35]. Por encima de la CR, toda la proteína añadida se incorporará en las fibras de modo que la concentración de monómero nunca exceda CR (izquierda). Este comportamiento se ve en equilibrio. Durante el tiempo de nucleación/retraso, la solución sobresaturada permanece cinéticamente soluble en una concentración que apenas excede la CR (derecha).	21
Figura 3. Cuatro rutas diferentes de agregación diferentes [40]. a) Las proteínas nativas se pliegan mal y experimentan cambios conformacionales para formar protofibrillas y fibrillas maduras, b) monómeros mal formados forman oligómeros fuera de ruta que no terminan en fibrillas, c) las fibrillas maduras se fragmentan para formar oligómeros fibrilares (originados a partir de fibrillas) que nuevamente se agregan para formar fibras maduras. d) Las fibrillas maduras actúan como una plantilla para la oligomerización y catalizan la reacción de nucleación secundaria formando oligómeros difusibles a partir de los monómeros.	22
Figura 4. Secuencia de aminoácidos del β A ₄₂ . Se muestran residuos hidrófobos en verde, polares en amarillo y con carga en rojo; así como las regiones de giros β y conformación α de estructura secundaria y regiones de hidrofobicidad.....	24
Figura 5. Modelo estructural para las fibrillas A β 40 [47] (a) Representación esquemática de una sola capa molecular cruzada- β ; Los residuos 1 a 8 se consideran desordenados y se omiten. La flecha amarilla indica la dirección del eje longitudinal de la fibrilla. La unidad β cruzada es una estructura de doble capa, con hojas β paralelas, formadas por los residuos 12–24 (cintas naranjas) y 30–40 (cintas azules). (b) Molécula A β ₄₀ vista desde el eje longitudinal. Los residuos están codificados por colores según sus cadenas laterales como hidrofóbicos (verde), polares (magenta), positivos (azul) o negativos (rojo).....	25
Figura 6. Interacciones hidrofílicas y electrostáticas en la formación de fibrillas [47] (a) Sección transversal de una fibrilla A β ₄₀ formada al yuxtaponer las caras hidrofóbicas de dos unidades cruzadas β . (b) Posible modo de asociación lateral para generar fibrillas con mayor masa por longitud y mayores dimensiones transversales.	26
Figura 7. Líneas de campo eléctrico de partículas cargadas y la interacción del campo entre partículas. Las líneas de campo eléctrico de una carga positiva “salen” de la carga, mientras que, en una carga negativa, las líneas de campo “entran” a la partícula.	27
Figura 8. Fuentes de campo magnético. Las líneas del CM salen del polo “norte” y entran al polo “sur”. ..	28
Figura 9. Líneas de campo inducidas. a) Líneas del CM inducidas por una espira de corriente y b) líneas del campo eléctrico inducido (líneas rojas) por un CM variable (líneas azules).....	28
Figura 10: Diferentes tipos de bobinas y su CM generado	28
Figura 11. Configuración numérica y geométrica de la bobina de Rodin [53].	29
Figura 12. Dimensiones de los toroides para la construcción de las bobinas.	41

Figura 13. Impresión 3D del toroide. Imperfecciones de impresión y toroide resanado.	42
Figura 14. Toroide en impresión 3D con devanado y guías para 36 puntos en la bobina toroidal.	42
Figura 15. Patrón de pines y embobinado. Toroide (radio interno ~ 7 cm) y su patrón de embobinado.	42
Figura 16. Diagrama de conexiones para la bobina de Rodin. Consta de dos hilos (negro y naranja) conectados en a) paralelo, b) serie y c) antiparalelo. La dirección de la corriente se indica con las flechas azules.	43
Figura 17. Inductancia de la bobina de Rodin. La inductancia obtenida fue de 1.28 mH (mili Henrios) donde los hilos fueron conectados en paralelo.	43
Figura 18. Caracterización de los valores del CM de la bobina toroidal. El modelo de prueba se alimenta a pasos en voltaje y amperaje con una fuente de poder.	44
Figura 19. Determinación de la señal sinusoidal a la salida del amplificador.	44
Figura 20. Montaje experimental del sistema de estimulación.	45
Figura 21. Esquema de estimulación magnética del P β A: Incubación de β A control y con estimulación magnética a 75 Hz en bobina de Rodin en incubadoras separadas.	46
Figura 22. Espectrofotómetro TCAN: Equipo empleado para el análisis de espectroscopía con microplacas de 96 pozos (costar).	47
Figura 23. Cultivo celular. Células SH-SY5Y al 90% de confluencia.	49
Figura 24. Corte de microplaca de 96 pozos. Una caja de 96 pozos que se cortó en cuatro sub-cajas en una matriz de 4x5 pozos. La sub-placa se coloca dentro de la bobina para posterior estimulación.	49
Figura 25. Disposición del experimento de estimulación magnética en el modelo celular. Localización de las microplacas control (parrilla superior) y experimental dentro de la bobina (parrilla inferior). La bobina se coloca en la parrilla inferior, sobre la tina de agua de la incubadora de CO ₂	50
Figura 26. Ubicación de la microplaca dentro de la bobina. La placa con cultivo celular se coloca en medio de la bobina (vista de corte lateral).	50
Figura 27. Diagrama del modelo de estimulación magnética en el modelo celular. Grupos de estudio de cultivo celular SH-SY5Y expuestos y no expuestos a los CMV con los subgrupos: WT y P β A. Los tiempos de tratamiento son: 24 h de estimulación a CM en el día 1 y 24 h de P β A también en el día 1 (flecha roja). ...	51
Figura 28. Prueba del CMV: a) colocación de la limadura de hierro en el centro de la bobina, b) fotografía instantánea del movimiento de las partículas c) ilustración del movimiento aleatorio de las partículas.	53
Figura 29. Densidad de flujo magnético. Simulación computacional del CM (b) generado por la bobina (a).	54
Figura 30. Análisis de la formación de fibrillas de β A mediante ensayo tioflavina-T. (a) Se polimerizó β A ₄₂ y se expuso a CMV durante 24 h, se analizó la intensidad de fluorescencia de diferentes alícuotas en el tiempo indicado. (b) Representación gráfica del análisis cuantitativo de la intensidad de la fluorescencia a las 24 h, se detectó ~ 86% de inhibición de la agregación. Los valores mostrados son medias \pm DE de tres experimentos independientes por triplicado. Prueba t de Student ** p < 0.01. β A: ensayo de polimerización de β A, E: expuesto a CMV.	55
Figura 31. Análisis cualitativo de la formación de oligómeros β A en muestras estimuladas con CMV. (a) WB. Resultado de la polimerización del β A ₄₂ y su exposición a CMV durante 24 h, seguido de su separación en un gel Bis-Tris SDS / PAGE al 16%, se transfirió y se detectó con el anticuerpo monoclonal 4G8. El tiempo y los tratamientos están indicados en la figura. (b) Representación gráfica correspondiente a la densitometría de los oligómeros agregados en diferentes puntos de tiempo de una única transferencia del WB, normalizada a	

un control de 24 h (polimerización completa). El peso molecular se indica en kDa. C: control, E: expuesto a CMV.	57
Figura 32. Inhibición de la toxicidad inducida por el β A mediante la estimulación con CMV. Después de 24 h de incubación del cultivo celular SH-SY5Y, el β A ₄₂ se resuspendió en el medio de cultivo hasta una concentración final de 16.6 μ M (en la placa de cultivo celular) durante 24 h en ausencia o presencia de CMV. Los valores mostrados son medias \pm DE de tres experimentos independientes por cuadruplicado. Prueba t de Student * p < 0.05, ** p < 0.01. Viabilidad celular. Se encontró diferencia significativa en los subgrupos WT y β A (* P = 0.0454 y ** P = 0.0175 respectivamente) entre el grupo expuesto y el no expuesto a CMV.	58
Figura 33. Interacciones de cargas eléctricas en campos a) magnético y b) eléctrico.	60
Figura 34. Diagrama simplificado de la interacción de las cadenas laterales de los residuos con carga en a) una molécula de β A y b) en la formación de fibrillas entre dos moléculas. Código de colores para cargas rojo (+), azul (-) y verde (hidrofóbico).	64
Figura 35. Sistema de estimulación propuesto para futuros estudios. a) Sistema de estimulación múltiple para ratones sanos y transgénicos en movimiento restringido. b) Partes del sistema de estimulación individual de ratones.	69

ABREVIATURAS

β A	Beta amiloide
β A ₄₀	β A constituido por 40 aminoácidos
β A ₄₂	β A constituido por 42 aminoácidos
CEM	Campos electromagnéticos
CM	Campo magnético
CMV	Campo magnético vorticial
CR	Concentración crítica
EA	Enfermedad de Alzheimer
Hz	Hertz
kDa	Kilo Dalton
mA	Mili Amperes
MNFs	Marañas neurofibrilares
mT	Mili Tesla
ms	Mili segundos
mV	Mili Volts
P β A	Péptido Beta amiloide
P β A ₄₂	P β A constituido por 42 aminoácidos
PPA	Proteína precursora de amiloide
ROS	Especies reactivas de oxígeno
WT	<i>Wild type</i>
WB	<i>Western blot</i>

RESUMEN:

La enfermedad de Alzheimer (EA) se asocia con la acumulación anormal de dos proteínas en el cerebro formando lesiones microscópicas: marañas neurofibrilares y placas amiloides, constituidas por agregados de la proteína tau y del péptido beta amiloide (P β A) respectivamente. Debido a que el establecimiento de la EA comienza con la acumulación del P β A alrededor de las neuronas interrumpiendo las vías de señalización sináptica, se cree que la inhibición de la agregación podría ser la clave para detener el avance de la enfermedad. Los campos magnéticos (CM) han sido utilizados en experimentos *in vitro* e *in vivo* con fines diversos de investigación y terapias. Esta tesis se basa en el estudio del efecto inhibitorio de los campos magnéticos vorticiales (CMV) sobre la agregación del P β A. Dichos campos no son homogéneos ni paralelos como los que se usan comúnmente en la mayoría de los estudios reportados empleando bobinas de Helmholtz o solenoides; lo que representa una estimulación diferente, con gradientes (dirección y magnitud) en el CM. En el presente estudio se diseñó, elaboró y construyó una bobina tipo Rodin para generar CMV y se evaluó su capacidad para inhibir la agregación del P β A en dos modelos: i) en un modelo de polimerización *in vitro* utilizando únicamente el P β A recombinante que consistió en la agregación del P β A expuesto a CMV de ~ 1.5 mT por 24 h. ii) En el segundo modelo se sometieron células SH-SY5Y a la citotoxicidad del P β A en presencia de CMV por 24 h con una intensidad de ~ 1.5 mT. El efecto inhibitorio se analizó mediante espectroscopia de fluorescencia y la técnica de Western blot, donde se identificó una inhibición del ~ 86 % en la agregación del P β A bajo la estimulación de CMV con respecto al control sin exposición. En el modelo celular, los CMV promovieron un incremento de la viabilidad celular, inhibieron la agregación del P β A y rescataron a las células de la toxicidad inducida por el péptido. De esta manera demostramos la efectividad del CM en la inhibición de la agregación del P β A, estableciendo las bases para próximos experimentos que involucren CMV y la inhibición de otras proteínas con capacidad de auto agregación anormal, como tau, también implicada en la EA. Bajo los alcances de nuestra metodología, los datos sugieren que los CMV podrían utilizarse en modelos *in vivo* y posteriormente proponerse como una posible estrategia terapéutica una vez descartado que no tengan algún efecto adverso en un sistema orgánico complejo como lo es el cerebro humano.

Palabras clave: beta amiloide, campos magnéticos, célula SH-SY5Y, enfermedad de Alzheimer, campo magnético vorticial

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is associated with abnormal accumulation of two proteins in the brain, forming microscopic lesions: neurofibrillary tangles and amyloid plaques, formed by tau protein and amyloid beta peptide (A β P) aggregates respectively. Since AD onset is triggered by amyloid beta accumulation around neurons disrupting synaptic signaling pathways, a proposed hypothesis suggests that the inhibition of its aggregation could be the mechanistic key to reduce the progression of the disease. Magnetic fields (MF) have been used in *in vitro* and *in vivo* experiments for different research and therapeutic purposes. Moreover, vortex magnetic fields (VMF) are not homogeneous nor parallel like those commonly reported employing Helmholtz or solenoids coils. By contrast, VMF represent a different stimulation forming gradients (direction and magnitude) along with the MF. In the present study, we aimed to evaluate whether VMF can inhibit *in vitro* A β P aggregation. This study was carried out in two models: i) employing a recombinant A β A *in vitro* polymerization assay, in which its fibrillation was evaluated after \sim 1.5 mT exposure to VMF for 24 h. and ii) a human neuroblastoma cell line model incubated with A β P, in which SH-SY5Y cells were subjected to A β P cytotoxicity in the presence of \sim 1.5 mT VMF stimulation for 24 h. For the first model, the inhibition of A β P aggregates was analyzed using fluorescence spectroscopy and Western blotting. Inhibition of \sim 86% of A β P fibril formation was obtained when samples were subjected to VMF, compared to those control samples with without exposure. In the cell model increase of cell viability was observed after exposure to VMF, and the lack of A β P induced cell toxicity, associated with the inhibition of A β P aggregation. This data demonstrated the efficacy of VMF in interfering with *in vitro* A β P aggregation, which may set the basis for future application on several other prone proteins to aggregate such those involved in distinct neurological disorders.

Keywords: beta amyloid, magnetic fields, SH-SY5Y cell, Alzheimer's disease, vortex magnetic field

INTRODUCCIÓN

Enfermedad de Alzheimer (EA)

La demencia es considerada un síndrome caracterizado por una disminución en las habilidades cognitivas y funcionales suficientemente significativa para interferir con la vida cotidiana del paciente; y existen dos clasificaciones: las demencias neurodegenerativas que son más comunes en los ancianos, mientras que las no degenerativas, como las lesiones cerebrales traumáticas y los tumores cerebrales, son casos comunes en los adultos más jóvenes [1, 2]. La forma más común de demencia degenerativa es la EA; se conoce desde 1906 cuando Alois Alzheimer estableció una correlación entre la demencia de una mujer de 51 años con lesiones cerebrales de tipo agregados proteínicos y pérdida neuronal [3]. La EA se caracteriza por la pérdida progresiva de la memoria y de las funciones cognitivas en un periodo de entre 5 a 10 años o más, afectando la calidad de vida del paciente [4], y sumergiéndolo en un deterioro físico, emocional y de comportamiento; repercutiendo negativamente su participación en el ámbito familiar, social y económico [3, 5]. Es difícil determinar quién padecerá la EA puesto que se trata de una alteración compleja de causa desconocida, en la que intervienen múltiples factores, donde la edad avanzada y los estilos de vida son el principal factor de riesgo [6-8]. Menos del 7 % de los casos de EA son de origen genético causados por mutaciones en los genes que afectan el procesamiento del amiloide (PPA, PSEN1, PSEN2 y APOE) [9]. La distinción de prevalencia de la demencia entre países de bajos, medianos y altos recursos no es estática, puesto que la expectativa de vida por encima de los 60 años sigue aumentando en todas las regiones del mundo [8]. Desde su descubrimiento se han desarrollado múltiples medicamentos y tratamientos, principalmente paliativos, cuyos objetivos se han dirigido a disminuir el progreso de la enfermedad y manejo de los síntomas; sin embargo, hasta el momento no existe tratamiento preventivo ni cura para la EA.

La EA se ha asociado con la acumulación anormal de dos proteínas en el cerebro en forma de lesiones microscópicas: las placas amiloideas y las marañas neurofibrilares (MNFs) [10]. Las placas

de amiloide son estructuras esféricas constituidas principalmente de P β A y están localizadas en el espacio extracelular; progresan anatómicamente en la zona límbica y en la corteza asociativa [11]. Por otro lado, las MNFs están constituidas principalmente por proteína tau (hioerfosforilada), y se encuentran fundamentalmente en los cuerpos neuronales. Las placas amiloide aparecen primero en la corteza frontal y luego se extienden por toda la región cortical, mientras que tau hiperfosforilada y las marañas aparecen inicialmente en el sistema límbico (corteza entorrinal, hipocampo y circunvolución dentada) y después se extienden a la región cortical. Aunque las MNFs están más asociadas con la severidad de la EA [12], existe evidencia de que la sobreproducción y acumulación de β A en el cerebro es principal factor que promueve la patogénesis de la EA; de ahí el resto del proceso de la enfermedad, incluidas las MNFs, pérdida celular, daño vascular y la demencia que sigue como resultado de esta deposición [13, 14].

Fisiopatología de la EA

Molecularmente, el P β A se origina como resultado de un proceso enzimático de corte de la proteína precursora de amiloide (PPA). La PPA es una proteína transmembrana presente en diversos tejidos y órganos humanos; principalmente en el sistema nervioso central donde bajo condiciones fisiológicas normales es proteolizada, y sus residuos interviene en diversos procesos fisiológicos de la neurona como la modulación de la formación y la función sináptica, el desarrollo y crecimiento celular, la comunicación intracelular, la transducción de señales, la señalización nuclear y la plasticidad estructural y funcional [15, 16].

En general, se sabe que la PPA se metaboliza mediante dos vías diferentes: La vía no amiloidogénica, donde la PPA se fragmenta por acción de la α -secretasa seguida de la γ -secretasa, liberando fragmentos solubles de PPA que intervienen en las funciones metabólicas normales [16]; y la vía amiloidogénica, que en contraste, la enzima que actúa en primer lugar sobre la PPA es la β -secretasa seguida de la γ -secretasa [17], liberando principalmente los péptidos monoméricos de β A de 40 y 42 aminoácidos (β A₄₀ y β A₄₂ respectivamente) que tienen actividad tóxica [18-21]. En el cerebro de pacientes con la EA, estos monómeros se agregan progresivamente en oligómeros, protofibrillas, fibrillas y finalmente forman las placas β A.

Se ha considerado que las formas oligoméricas y más solubles de β A dentro de cierto grado, son las entidades más citotóxicas y se ha evidenciado que al acumularse alrededor de las neuronas en las primeras etapas de la EA podrían ejercer daños iniciales en el funcionamiento neuronal y cognitivo, como son alteración de la sinapsis e interrupción de sus vías de señalización, ya sea bloqueando la potenciación a largo plazo o modificando la densidad y estabilidad de las espinas dendríticas [22]. Las alteraciones de las sinapsis y espinas dendríticas en el hipocampo preceden la degeneración neural y la más tardía formación de placas de β A; sugiriendo que este efecto inicial incide en el deterioro notable de la memoria [23, 24].

La acumulación de los diferentes oligómeros y polímeros del P β A promueven entre muchas acciones: disfunción mitocondrial, inducción a la muerte neuronal [25], formación de canales iónicos que resultan en pérdida de la homeostasis de calcio, sobre inducción de la vía JNK/SAPK, activación de microglía y genes proinflamatorios, formación de ROS, etc. [26]. Se ha observado que el daño que causan los agregados del P β A en las neuronas, en parte se asocia al incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS) en el encéfalo, disminuyendo la viabilidad celular e induciendo neurodegeneración progresiva por el incremento de placas de P β A [27].

Por otra parte, cuando se acumula el P β A puede formar depósitos muy insolubles que adquieren una conformación de hoja- β -plegada, con diversos grados de fibrilación [11], llegando a encontrarse algunas acumulaciones de este péptido en el espacio intraneuronal e intrasináptico [28, 29], lo que conlleva a una desconexión neuronal propia de la EA [30, 31].

A nivel histopatológico, las MNFs provocan trastornos en la actividad de la neurona que la llevan a una pérdida de su capacidad de transmitir impulsos nerviosos. La proteína tau en condiciones normales está asociada al ensamblaje de tubulina en los microtúbulos que forman el citoesqueleto celular, estructura que proporciona soporte en la morfología celular y está implicada en la dinámica del citoplasma en los procesos de transporte interior en la neurona [32-34]. En la EA, la proteína tau se hiperfosforila y deja de cumplir su papel en el mantenimiento de la estabilidad del citoesqueleto y en los procesos de transporte, autoagregándose anormalmente en forma de filamentos helicoidales apareados que constituyen las MNFs y que durante su formación producen toxicidad en las neuronas [35, 36].

Cinética de agregación del P β A

In situ, los monómeros de P β A se agregan progresivamente en forma de oligómeros de bajo y alto peso molecular, protofibrillas, fibrillas y finalmente placas de β A. Existe un modelo mecanicista simple para este proceso que implica una polimerización dependiente de una etapa de nucleación, en el cual, la agregación depende de ciertos parámetros como la concentración de proteínas y el tiempo de progresión [37]. Además, los agregados de amiloide pueden formarse y acelerarse mediante la incubación de pequeños oligómeros iniciadores y de fibrillas preformadas [38]. Así mismo, un mal plegamiento del P β A en ambientes solubles e insolubles inducen la agregación y la toxicidad en la EA [39]; y aunque son varios los factores implicados en este mal plegamiento de las proteínas (incluidas aumento de la temperatura, estrés mecánico, pH extremo, estrés oxidante, glicación o mutación), el mecanismo básico de formación de fibrillas parece tener similitudes entre las diversas enfermedades de tipo amiloidogénico [40].

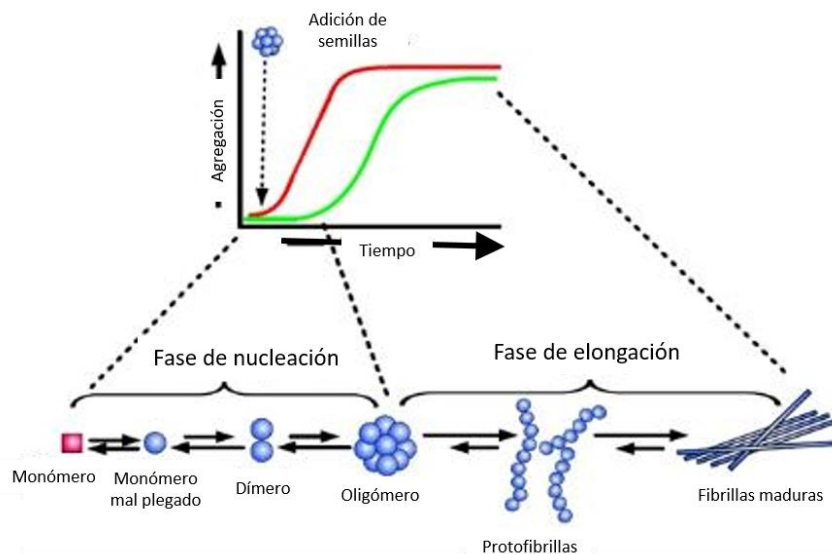


Figura 1. Fases de agregación del P β A [41]: i) fase de nucleación y ii) fase de crecimiento (curva verde). La adición de semillas o iniciadores reduce el tiempo de nucleación e induce la formación de agregados más rápidamente (curva roja).

El proceso de agregación se caracteriza por presentarse secuencialmente como: i) una fase lenta de nucleación/retraso en la que los monómeros experimentan cambio conformacional/plegamiento incorrecto y se asocian para formar núcleos oligoméricos (Figura 1) [41]. ii) En la segunda etapa se tiene una fase de crecimiento, en la que los núcleos crecen rápidamente y forman

polímeros/fibrillas más grandes. Finalmente, iii) una fase estable o de saturación, donde hay un equilibrio entre polímeros formados y monómeros del péptido (Figura 2).

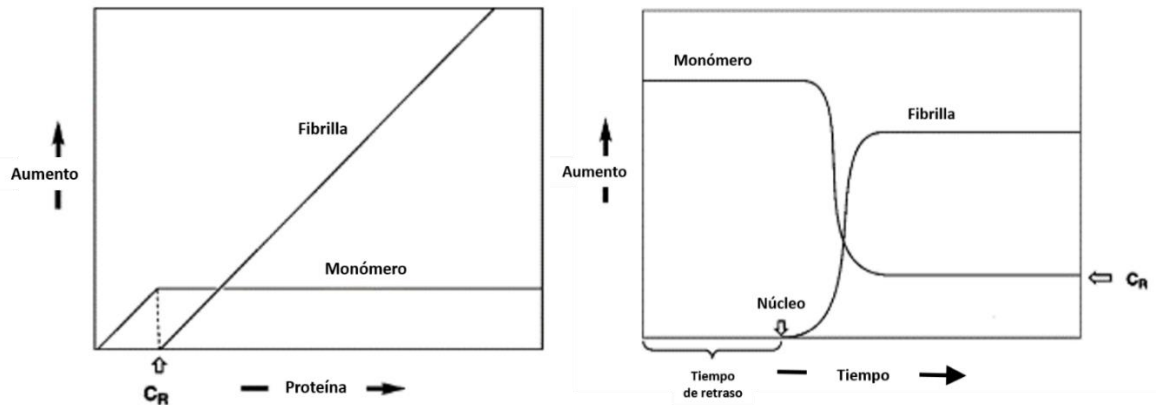


Figura 2. Curva cinética idealizada para la formación de fibras de amiloide [35]. Por encima de la CR, toda la proteína añadida se incorporará en las fibras de modo que la concentración de monómero nunca exceda CR (izquierda). Este comportamiento se ve en equilibrio. Durante el tiempo de nucleación/retraso, la solución sobresaturada permanece cinéticamente soluble en una concentración que apenas excede la CR (derecha).

A diferencia, una polimerización simple se caracteriza por lo siguiente: (i) no se produce agregación (fibrillas) a una concentración de proteína por debajo de la concentración crítica (CR), los monómeros son la especie predominante (Figura 2) [37]. La CR es equivalente a una constante de equilibrio de crecimiento y describe la solubilidad de la proteína bajo condiciones de estado estacionario. (ii) A concentraciones proteicas que superan la CR en una pequeña cantidad, hay un tiempo de retraso antes de que ocurra la polimerización. Después de este tiempo de retraso la concentración de polímero continúa aumentando, pero la concentración de monómero permanece igual; (iii) durante el tiempo de retraso, la adición de una semilla da como resultado la polimerización inmediata (Figura 1, curva roja).

La CR se puede medir mediante la concentración de βA que permanece en solución después de la formación de fibrillas una vez que se haya alcanzado el equilibrio; sin embargo, determinar la CR de βA es difícil debido a la variación en los componentes del buffer usado y los métodos para cuantificar monómeros y fibrillas. En condiciones "fisiológicas" (pH 7-8, 5-100 mM de sales, y 25-37° C) hay un consenso cualitativo de los experimentos realizados. Los monómeros de βA_{40} tienen una CR ligeramente mayor que los monómeros βA_{42} . El péptido βA_{40} forma fibrillas de amiloide

rápida a concentraciones mayores a 100 μM . Sin embargo, se ha observado agregación espontánea a concentraciones entre 20 μM y 80 μM debido muy posiblemente a la presencia de una pequeña cantidad de semillas de fibrillas no disueltas en el stock de solución. En concentraciones bajas de βA_{42} 20-25 μM , se ha observado agregación dentro del tiempo requerido para realizar la medición inicial (minutos). En 8 μM de βA_{42} , se observó una agregación significativa dentro de las 12 h [37].

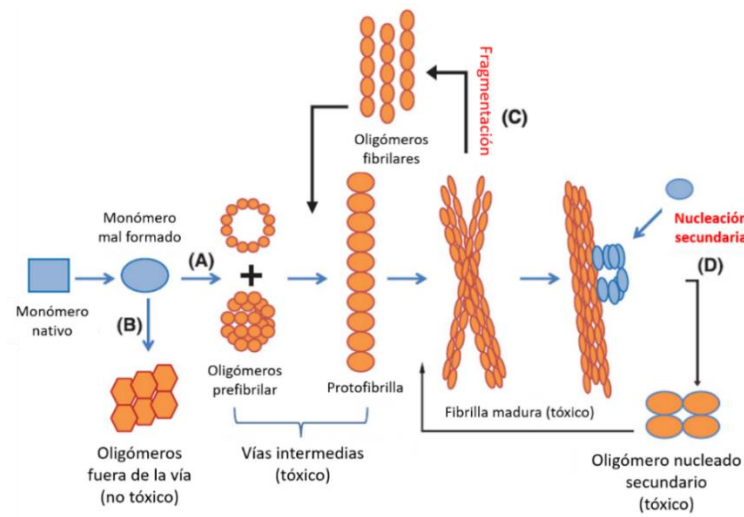


Figura 3. Cuatro rutas diferentes de agregación diferentes [40]. a) Las proteínas nativas se pliegan mal y experimentan cambios conformacionales para formar protofibrillas y fibrillas maduras, b) monómeros mal formados forman oligómeros fuera de ruta que no terminan en fibrillas, c) las fibrillas maduras se fragmentan para formar oligómeros fibrilares (originados a partir de fibrillas) que nuevamente se agregan para formar fibras maduras. d) Las fibrillas maduras actúan como una plantilla para la oligomerización y catalizan la reacción de nucleación secundaria formando oligómeros difusibles a partir de los monómeros.

En la ruta de agregación del βA las fibrillas maduras pueden fragmentarse para formar oligómeros fibrilares (originados a partir de fibrillas) que pueden agregarse nuevamente para formar fibrillas maduras (Figura 3 c). Cohen et al., 2013 agregó una nueva dimensión al modelo de fibrilación ya existente, demostrado *in vitro* un modelo de nucleación secundaria para la formación de fibrillas utilizando el péptido βA_{42} [40]. Este modelo sugiere que las fibrillas maduras catalizan la reacción de nucleación secundaria formando oligómeros difusibles a partir de los monómeros (Figura 3 d). Esta reacción depende de la concentración de proteína nativa (monómeros) y fibrillas a diferencia de la reacción de nucleación primaria, que depende únicamente de la concentración de monómero de

proteína [38]. Existe una longitud de secuencia de aproximadamente 100 residuos en la que se predice que las fibrillas de amiloide tendrán su máxima estabilidad en relación con el estado soluble correspondiente; y la estabilidad relativa para la formación de amiloide en estados nativos, al menos para proteínas pequeñas, es consecuencia de factores cinéticos que termodinámicos, que están asociados con el proceso de agregación [42]

Como ya se mencionó, estudios recientes sugieren que los oligómeros intermedios formados durante la fibrilación son especies más tóxicas que las fibrillas maduras [22-24, 43]. Por otro lado, en algunos casos, se ha propuesto que la formación de fibrillas maduras es quizás un mecanismo que evita la permanencia y acción de los oligómeros tóxicos [40].

In vitro, para preparar consistentemente formas oligoméricas y fibrilares de βA_{42} , se requiere un conocimiento detallado de cómo los parámetros de la solución influyen en la estructura de los polímeros. Al utilizar inicialmente un material bioquímico estructuralmente homogéneo y no agregado, se puede demostrar que la formación de oligómeros, fibrillas y agregados fibrilares está determinada por el tiempo, la concentración, la temperatura, el pH, la fuerza iónica y la especie βA en la mezcla de la reacción. A 10 nM de βA_{42} , se induce neurotoxicidad significativa. Los oligómeros reducen la viabilidad neuronal 10 veces más que las fibrillas y aproximadamente 40 veces más que el péptido no agregado [44].

Estructura del P βA

En relación con las estructuras de los aminoácidos, en última instancia, las cadenas laterales ayudan a determinar la forma tridimensional de una proteína, así como de su reactividad química. Los monómeros del P βA con un peso molecular de 4 kDa contienen en el amino (N-)terminal regiones hidrofílicas (residuos 1-28, excepto 17-21), mientras que residuos hidrofóbicos, que en una molécula común tienden a encontrarse en el interior de la misma, se encuentran en el extremo carboxilo (C-)terminal (residuos 17-21 y 30-42) con alta probabilidad de hojas β (Figura 4 y Figura 5) [45-47]. El aspartato (D) y glutamato (E) con grupos carboxilo que tienen carga negativa; así como la lisina (K) y arginina (R) con carga positiva, siempre están cargadas en condiciones fisiológicas y suelen situarse en la superficie de la proteína con la facilidad de rodearse de agua o interactuar con otras sustancias iónicas o polares [48]. Se considera que la fibrilación de amiloide está impulsada por

interacciones principalmente hidrofóbicas [49], sin embargo las interacciones eléctricas también tienen un papel importante [47].

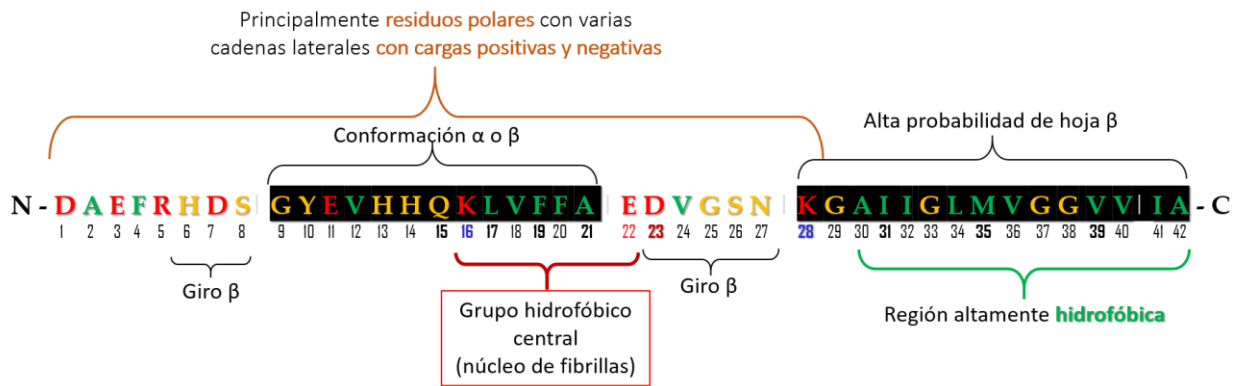


Figura 4. Secuencia de aminoácidos del βA_{42} . Se muestran residuos hidrófobos en verde, polares en amarillo y con carga en rojo; así como las regiones de giros β y conformación α de estructura secundaria y regiones de hidrofobicidad.

Petkova, et al, 2002 [47], en un estudio de espectroscopia de RMN de estado sólido, describieron un modelo estructural para las fibrillas amiloides formadas por el péptido βA_{40} : Aproximadamente los primeros 10 residuos están desordenados estructuralmente en las fibrillas. Los residuos 12–24 y 30–40 adoptan conformaciones de cadena β y forman láminas β paralelas a través de enlaces de hidrógeno intermoleculares (Figura 5a). Los residuos 25–29 contienen una curvatura del esqueleto peptídico que pone en contacto las dos láminas β a través de interacciones de cadena lateral a cadena lateral. Una sola unidad cruzada β es entonces una estructura de hoja β de doble capa con un núcleo neutro e hidrofóbico (Q15, L17, F19, A21, I31, M35 y V39) y una cara hidrofóbica (A30, I32, L34, V36 y V40). Las únicas cadenas laterales cargadas en el núcleo son las de D23 y K28, que forman puentes salinos (Figura 5b). Otras cadenas laterales cargadas y polares se distribuyen en la cara opuesta, en el lado convexo de la curva y en el segmento N-terminal. Las fibrillas con masa mínima por longitud y diámetro consisten en dos unidades β cruzadas con sus caras hidrofóbicas yuxtapuestas (Figura 6a).

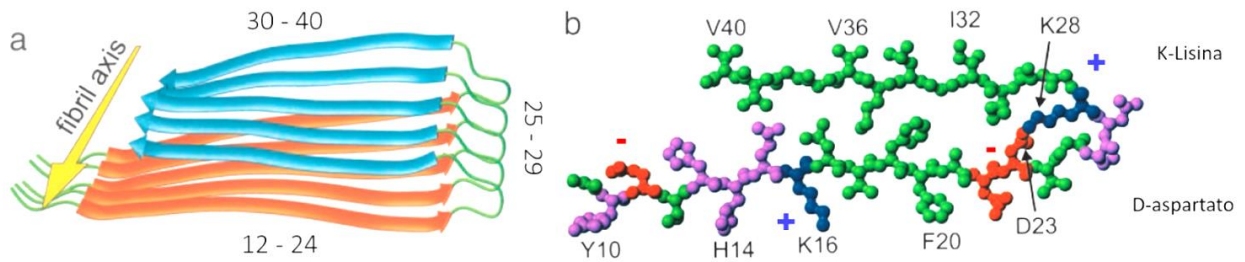


Figura 5. Modelo estructural para las fibrillas A β ₄₀ [47] (a) Representación esquemática de una sola capa molecular cruzada- β ; Los residuos 1 a 8 se consideran desordenados y se omiten. La flecha amarilla indica la dirección del eje longitudinal de la fibrilla. La unidad β cruzada es una estructura de doble capa, con hojas β paralelas, formadas por los residuos 12–24 (cintas naranjas) y 30–40 (cintas azules). (b) Molécula A β ₄₀ vista desde el eje longitudinal. Los residuos están codificados por colores según sus cadenas laterales como hidrofóbicos (verde), polares (magenta), positivos (azul) o negativos (rojo).

Importancia de las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas.

En una alineación paralela, en interior de una fibrilla β A, donde se dan distancias cortas (~ 5 Å) entre cargas de moléculas peptídicas vecinas, puede existir entre ellas interacción electrostática que supere la energía hidrofóbica favorable, y tenga la capacidad de desestabilizar la estructura de hoja β . Una posible asociación, en el núcleo, entre las cadenas laterales con carga que estabiliza la estructura y maximiza las interacciones hidrofóbicas es el puente salino entre D23 y K28 como muestra la Figura 5b. Así, a medida que crecen las fibrillas, todas las demás cadenas laterales cargadas o potencialmente cargadas están en posiciones en las que podrían solvatare. Si los protofilamentos se asocian lateralmente de esta forma, los puentes salinos intermoleculares entre K16 y E22 también evitarían la desestabilización electrostática (Figura 6b) [47].

Una comprobación indirecta de la estabilidad de las estructuras dependientes del arreglo de los aminoácidos en un péptido fue el estudio en el que Takahashi, et al, 2000 [50], diseñaron péptidos con una secuencia de aminoácidos (ALEQKLA) que experimentan transiciones estructurales $\alpha \rightarrow \beta$ y fibrillogénesis amiloide, y con el fin de examinar las contribuciones de dos residuos de glutamina en la transición estructural $\alpha \rightarrow \beta$ y la fibrillogénesis amiloide, utilizando péptidos mutantes con sustituciones simples o dobles Gln \rightarrow Ala. Encontraron que, aunque había poca diferencia en la estructura secundaria α o β , los estados agregados de los péptidos después de la transición fueron bastante diferentes según la secuencia; por lo que el autoensamblaje en la fibrilla bien organizada puede depender estrictamente de la estructura primaria, que determina la estabilidad del

empaquetamiento de la hoja beta en lo que llamaron ensamblaje auto-complementario; una interacción específica entre las caras hidrofóbicas de las cadenas β que puede ser crucial para un ensamblaje bien organizado en la fibrilla de amiloide.

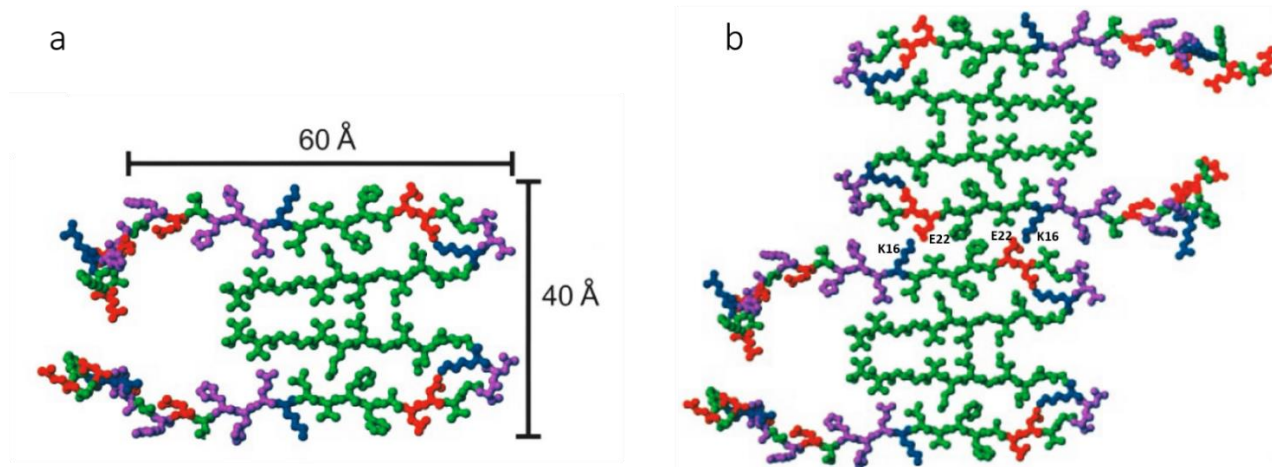


Figura 6. Interacciones hidrofílicas y electrostáticas en la formación de fibrillas [47] (a) Sección transversal de una fibrilla A β_{40} formada al yuxtaponer las caras hidrofóbicas de dos unidades cruzadas β . (b) Posible modo de asociación lateral para generar fibrillas con mayor masa por longitud y mayores dimensiones transversales.

Obtención de monómeros del P β A

Si bien hay múltiples variantes del P β A, la forma de 42 aminoácidos es la de mayor interés debido a su asociación genética y patológica con la EA. Investigaciones previas sobre la EA han destacado el efecto entre la reacción patológica del β A₄₂ con su particular estado de ensamblaje estructural. Los estudios bioquímicos en sistemas celulares e *in situ* donde se ha estudiado el β A₄₂ generalmente utilizan péptidos purificados obtenidos por síntesis química o expresión recombinante en sistemas bacterianos. Los pasos iniciales para solubilizar y preparar los stocks de péptidos deshidratados son críticos para controlar el ensamblaje estructural a un estado polimérico exitoso. Para desarrollar agregados homogéneos de β A₄₂, inicialmente el péptido es monomerizado para eliminar cualquier traza de agregación usando un disolvente fuerte. Usualmente altas concentraciones de alcoholes fluorados como el HFIP (hexafluoroisopropanol) son capaces de romper las estructuras de hojas- β , por lo que es usado ampliamente en protocolos de monomerización [44, 51, 52]. Es este material de partida es el que ha permitido definir y optimizar las condiciones que producen consistentemente soluciones homogéneas de grupos de oligómeros y fibras solubles de β A₄₂. Estas preparaciones se han desarrollado y caracterizado mediante el uso de

microscopía de fuerza atómica (AFM) para identificar las especies estructuralmente discretas formadas por el βA_{42} bajo condiciones de las soluciones; así como para evaluar diversas propiedades entre βA_{42} oligomérico y fibrilar. Una propiedad bien establecida es que el βA_{42} se agrega más rápido y en mayor extensión comparado al βA_{40} y a otras formas más cortas del péptido [52].

Fundamentos de electromagnetismo

Electricidad y magnetismo son aspectos diferentes de un mismo fenómeno denominado “electromagnetismo”. La materia es esencialmente eléctrica, y su origen reside en las partículas que forman el átomo. La electricidad se manifiesta como carga estacionaria o en movimiento; el magnetismo por otro lado se hace evidente en interacciones con imanes y materiales con propiedades magnéticas, cuyas cualidades tienen un origen eléctrico.

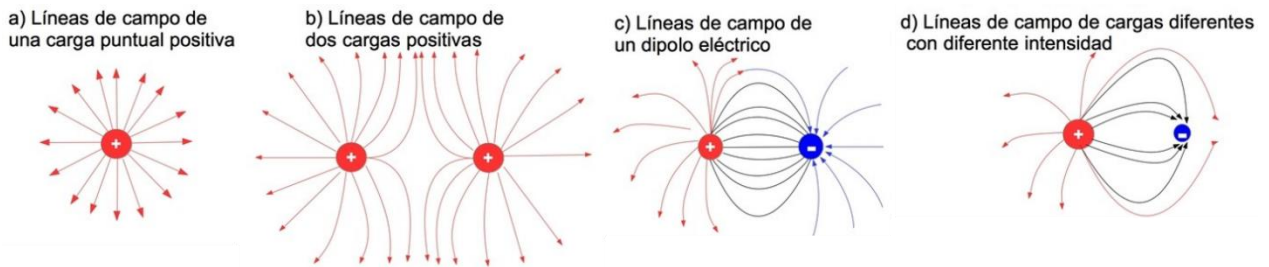


Figura 7. Líneas de campo eléctrico de partículas cargadas y la interacción del campo entre partículas. Las líneas de campo eléctrico de una carga positiva “salen” de la carga, mientras que, en una carga negativa, las líneas de campo “entran” a la partícula.

A su alrededor, las cargas tienen asociadas un campo eléctrico \vec{E} , así como los dipolos magnéticos poseen un campo magnético (CM) \vec{B} (Figura 7 y Figura 8). Clásicamente, es mediante estos campos (cuya intensidad disminuye al alejarse al cuadrado de la distancia en una carga y en un dipolo al cubo de la distancia) que es posible la interacción entre cargas eléctricas y dipolos magnéticos entre sí y con otros campos, las cuales experimentarán fuerzas de atracción o repulsión. Como se explicará más adelante, una carga en movimiento con velocidad constante crea un patrón de líneas de CM además del campo eléctrico propio.

Campos magnéticos de una corriente

Una corriente eléctrica estacionaria produce un CM estacionario y en cualquier punto, la dirección del CM \vec{B} es tangente a la línea del campo en ese punto. El campo es grande donde las

líneas están más cerca una de otra y pequeño donde están más separadas. En contraste con las líneas de campo eléctrico producidas por la carga, que comienzan en las positivas y terminan en las negativas, las líneas del CM provenientes de las corrientes forman espiras continuas, cerradas (Figura 8, Figura 9 a). Así; dependiendo de la geometría del embobinado del alambre por donde circula la corriente eléctrica, se pueden crear bobinas con líneas de CM idealmente uniformes, homogéneos y paralelos en su interior (eje de simetría de la bobina) como los solenoides y las bobinas de Helmholtz; o por el contrario, con un patrón no homogéneo como la bobina de Rodin (Figura 10).

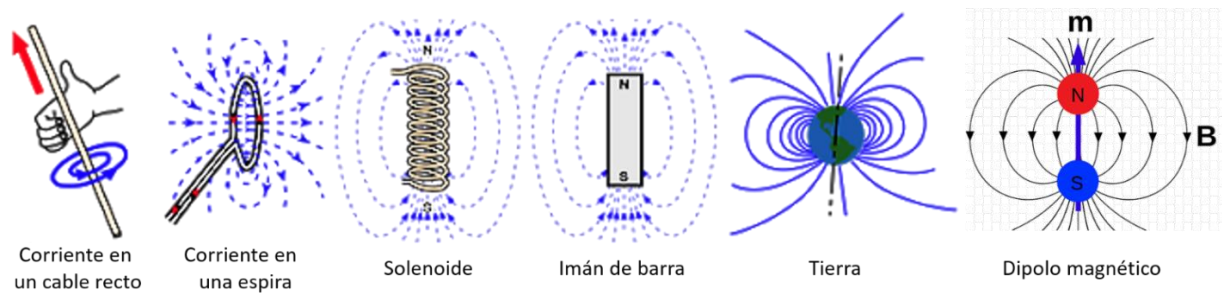


Figura 8. Fuentes de campo magnético. Las líneas del CM salen del polo “norte” y entran al polo “sur”.

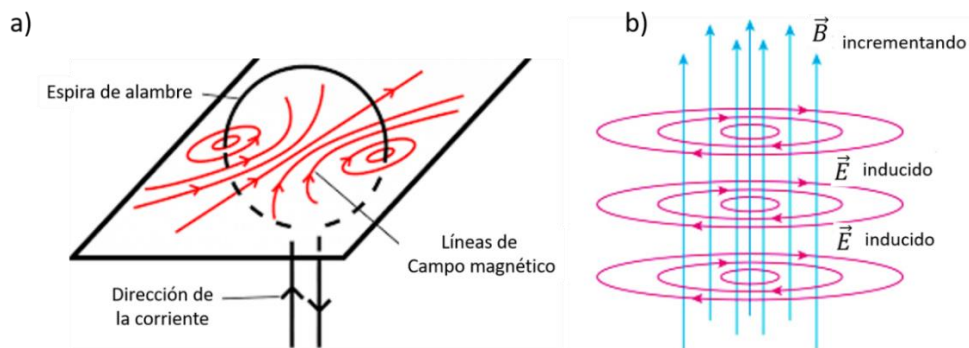


Figura 9. Líneas de campo inducidas. a) Líneas del CM inducidas por una espira de corriente y b) líneas del campo eléctrico inducido (líneas rojas) por un CM variable (líneas azules).

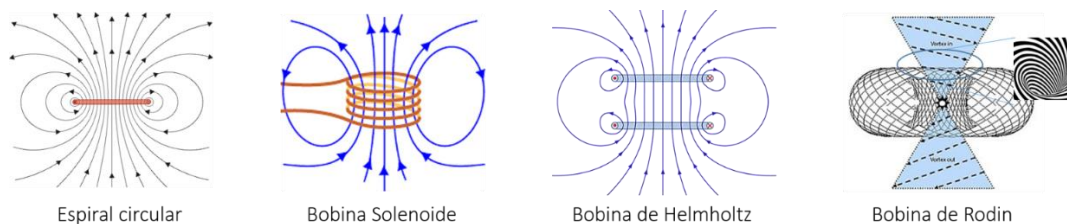


Figura 10: Diferentes tipos de bobinas y su CM generado

Campos magnéticos vorticiales

La bobina de Rodin consiste en dos alambres eléctricos envueltos a lo largo de las trayectorias ‘dobladas’ del circuito en un toroide no conductor en un patrón numérico definido por Rodin como una topología matemática llamada Matemáticas Vorticiales (*Vortex-Based Mathematics*) [53]. La bobina construida con esta geometría proporcionará un campo magnético vorticial con gradientes de campo magnético dentro del *área de trabajo* (Figura 10). Se enrollan dos hilos adyacentes para transportar corrientes en direcciones opuestas, pero con espacios vacíos entre pares, representados por el patrón 396693 en el mapa y toroide (Figura 11). La envoltura recomendada atraviesa 12 veces alrededor de la sección transversal, pero sólo 5 veces alrededor de la circunferencia del toroide.

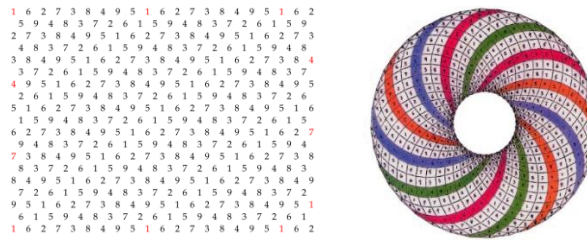


Figura 11. Configuración numérica y geométrica de la bobina de Rodin [53].

El embobinado consiste en pasar por puntos definidos a lo largo de la circunferencia (cada 160°) y al completar una vuelta (regreso al punto de inicio) se añaden las siguientes en contra de sentido de las manecillas del reloj.

EFFECTOS BIOLÓGICOS DE LA ESTIMULACIÓN MAGNÉTICA Y ELÉCTRICA

Recientemente, los CEM¹ se han aplicado en experimentos con cultivos celulares, animales y en humanos con fines de investigación y/o terapia. Este principio de interacción se basa en las propiedades eléctricas de los diferentes tejidos y los componentes celulares y moleculares involucrados, así como su respuesta en presencia de campos eléctricos o magnéticos externos, donde la frecuencia de estimulación toma un papel importante [54-56].

¹ Nota: cuando en este documento se menciona CEM se habla de: campo eléctrico, CM, ondas o radiación electromagnética con el fin de englobarlos en un mismo fenómeno, a menos que se especifique de qué se está hablando.

Aunque las bases biológicas de los efectos de los CEM sobre sistemas biológicos son poco claras se ha encontrado, por ejemplo, que CM homogéneos-unidireccionales y variables en el tiempo favorecen diversos cambios metabólicos (Tabla 1).

Tabla 1. Interacción de CM con sistemas biológicos			
Autor	Campo	Frecuencia	Efectos
Chen, <i>et al.</i> , 2016 [57]	CMs rotativos 6 T	0.02 Hz	Regeneración neural en <i>Planaria girardia</i>
Dogru, <i>et al.</i> , 2013 [58]	CM de 1.5 mT	50 Hz	Proliferación de células epiteliales.
Pérez, <i>et al.</i> , 2013 [59]	Vórtices de CM de 1.13 mT a 4.13 mT	100-2500 Hz	Proliferación y supervivencia en linfocitos humanos estimuladas por mitógenos.
Ferroni, <i>et al.</i> , 2016 [60]	CM Pulsado < 40 μ T	2.89-25.9 Hz, 0.2-2.8 Hz, 0.1-0.3 Hz	Diferenciación osteogénica en células madre mesenquimales.
Ikeda, <i>et al.</i> , 2013 [61]	Estimulación Magnética Transcraneal repetitiva 0.75 T	20 Hz	Modulación diferencial de genes en cerebro de ratones.
Mizukawa, <i>et al.</i> , 2013 [62]	CM fijo de 5 T y variables de 6 mT	50 Hz	Modificación en la oxidación de células formadoras de hueso.
Hernandez-Pavón, <i>et al.</i> , 2010 [63]	CM 19 mT	8 Hz	Agregación de proteínas en neuroblastomas humanos.

En el estudio de Pérez, *et al.*, [59] se demostró que los CMV no afectan la viabilidad celular, por el contrario, se ha encontrado que existe una prevención de la muerte celular dando un efecto que retarda el envejecimiento de alguna manera, lo cual permite utilizar los CMV como un tratamiento para enfermedades neurodegenerativas como la EA que se presenta principalmente en la etapa de la vejez. En otro estudio, empleando células madre de médula ósea-mesenquimatosa (hBM-MSc) humana expuestas a CM sinusoidales de 1 mT a diferentes frecuencias (0 Hz, 50 Hz, 100 Hz, 200 Hz) durante 8 días con una bobina de Helmholtz, encontraron que la exposición a 50 Hz conduce a una diferenciación neuronal eficiente tanto en células madre BM-MSc humanas como en

células madre neurales de ratón; generando neuronas funcionales incluyendo las neuronas dopaminérgicas y colinérgicas [64]. En otro reporte, cultivos de neuronas corticales primarias de rata se expusieron durante 7 días a pulsos de CM de 50 Hz con bobinas de Helmholtz, variando tan sólo la intensidad del campo en bloques (de 0 μ T a 1000 μ T), para evaluar los efectos sobre la viabilidad celular, la homeostasis del calcio, la proliferación de neuritas y la actividad neuronal espontánea. Se encontró que la viabilidad celular no se ve afectada, los incrementos evocados por la depolarización y el glutamato en la concentración intracelular de calcio aumentaron ligeramente a 1 μ T, mientras que la estimulación evocada y la basal mostraron una moderada inhibición a los 1000 μ T. El análisis morfológico posterior indicó que la longitud de las neuritas no se ve afectada hasta los 100 μ T, pero aumenta a los 1000 μ T. Sin embargo, la actividad neuronal permaneció en gran parte inalterada después de la exposición crónica a CM hasta los 1000 μ T [65].

Modelos de estudio de la EA

Debido a la importancia del β A en la patogénesis de la EA se han desarrollado modelos *in vitro* e *in vivo* que permiten simular y estudiar la patología, simplificando las interacciones moleculares y permitiendo, en un ambiente controlado, reducir las posibles variables que afectan la actividad de una molécula sobre su blanco, para conocer cómo se expresan las proteínas bajo determinados estímulos. Para esto es necesario que las células utilizadas en ensayos *in vitro* imiten el fenotipo de células dentro del tejido *in vivo* para adquirir un conocimiento mecanicista de los eventos toxicológicos que tienen relevancia *in vivo*. Si bien los métodos de ensayo alternativos no están lo suficientemente desarrollados como para reemplazar completamente las pruebas estándar de animales debido a algunos efectos adversos para la salud; utilizando sistemas *in vitro*, las respuestas celulares tempranas detectadas pueden ayudar a predecir respuestas tóxicas *in vivo* [66]. En este sentido, uno de los modelos celulares utilizados en el estudio de la EA es la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y, cuyos cultivos incluyen células adherentes y flotantes; las cuales son viables como células indiferenciadas o diferenciadas dependiendo del propósito específico que se requiera; además, expresan varias proteínas e isoformas de proteínas específicas para humanos que no estarían inherentemente presentes en cultivos primarios de roedores [67]. La línea celular SH-SY5Y se ha usado como modelo estándar en el estudio en la EA; por ejemplo, para analizar el efecto del P β A en combinación con otros compuestos como el ácido carnósico como inhibidor de

apoptosis [68], el efecto de las células microgliales reactivas como estimulantes de producción de PPA, P β A y tau [69], la captación de P β A extracelular de las células SH-SY5Y [70, 71] entre los que se mencionan más adelante. Así mismo, el modelo de la proteína recombinante de P β A ha sido usado como estándar en estudios de agregación; por ejemplo, en la inhibición de la agregación mediante la fosforilación de la proteína Hsp20 en asociación con el P β A [72] se mostró que las células diferenciadas de la línea celular SHSY-5Y son más sensibles que las indiferenciadas y que esto se relaciona con el proceso de fibrilización [73]. Mediante microscopia de fuerza atómica se pudo corroborar el efecto de diferentes moléculas sobre la agregación del P β A y la especificidad del epítipo de anticuerpos como inhibidores de agregación [74], y por supuesto, se demostró que el P β A induce muerte celular actuando como ligando de su propio precursor para mejorar la formación del complejo PPA [75].

ANTECEDENTES DIRECTOS

Efectos de CEM en humanos y en modelos celulares

Los CEM en humanos se han aplicado como tratamiento en pacientes que presentan enfermedades neurodegenerativas pero siendo acompañado de un fármaco [76]. En el caso de los modelos *in vitro*, como las células SH-SY5Y han ayudado a determinar los efectos de los CM sin la variabilidad de respuestas que ofrecen los modelos *in vivo*. Los diversos estudios indican que los CM afectan la proliferación celular, la expresión génica, la expresión de proteínas y otros fenómenos como se muestra en la Tabla 2.

Los efectos sobre la proliferación en células SH-SY5Y sometidas a un campo hipomagnético con intensidades de 200 nT durante 48 h, muestra que este campo puede estimular la proliferación de estas células mediante la promoción de la progresión del ciclo celular en la fase G1 [77]. Mientras que su exposición a CM de 1 mT a 50 Hz no afectó la supervivencia celular y el metabolismo, pero alteró significativamente el equilibrio del estrés oxidante y la transcripción de genes de citocinas inflamatorias selectas. La exposición a este CM elevó la expresión de óxido nítrico sintasa y O₂, que fueron contrarrestados por cambios compensatorios en la actividad antioxidante de la catalasa y parámetros cinéticos enzimáticos relacionados con actividad del citocromo P450. Sin embargo, este mecanismo adaptativo fue superado por la susceptibilidad de las células a los radicales libres

induciendo neurodegeneración [78]. Por otro lado, Benassi, *et al.*, 2015 [79] encontraron que la exposición de células SH-SY5Y a CM (50 Hz, 1 mT) altera la respuesta celular a 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP⁺); se demostró que el CM sensibiliza a las células sin afectar *per se* la supervivencia, la forma y la morfología tanto de células proliferativas como de las diferenciadas, pero desencadena un aumento en la carbonilación de proteínas por deterioro significativo de la homeostasis redox y el contenido de tioles. Como resultado, la toxicidad de MPP⁺, incluso a dosis bajas, se acentuó en células expuestas a CM de frecuencia extremadamente baja debido a un aumento significativo en los niveles de ROS.

Una de las características patológicas de la EA es la modulación de la autofagia. Se identificó que, dependiendo de la dosis y de la duración del tratamiento, los CEM de baja frecuencia (75 Hz, 2 mT, 5 mV y pulsos de 1.3 ms durante 1, 3, 6, 12, 24 y 48 h) pueden modular la expresión de microRNA (miR-30a) en células SH-SY5Y expuestas a β A, lo que conlleva a un efecto citoprotector a través de la expresión de Beclin1. Además, no afectaron las tasas de viabilidad a corto plazo; sin embargo, después de 48 h de exposición continua a CEM, la expresión de miR-30a fue comparable a los niveles basales de muestras no tratadas [80]. Por otro lado, los CM (2 mT a 75 Hz durante 18, 36, 54 y 72 h. y pulsos de 1.3 ms) afectan la actividad mitocondrial y la tasa de proliferación celular, reduciéndose en las líneas celulares SH-SY5Y con sobreexpresión de PPA. Sin embargo, después de 72 h de estimulación la actividad mitocondrial y la tasa de proliferación celular disminuyeron en todos los tratamientos. Se detectó un aumento general de respuestas citoprotectoras mediante dos proteínas fundamentales en la vía oxidativa, la proteína de choque térmico HSP70 y la enzima superóxido dismutasa-1. De igual forma, se encontró que la estimulación electromagnética promueve el procesamiento no amiloidogénico de la PPA a través de una expresión aumentada de la α -secretasa ADAM10 y una liberación mejorada del factor neurotrófico soluble sPPA α (un producto de la escisión de APP mediada por ADAM10) [81].

CEM en la expresión génica y de proteínas

Si bien, los CEM afectan la proliferación celular, las evidencias indican también que inciden en los componentes lipídicos de la membrana celular y en la flexión de enlaces peptídicos en el plano del N-H y en las vibraciones de estiramiento C-N, cuando las células son expuestas a CM de baja

intensidad (50 μ T a 1.4 mT a 50 Hz) modificando las estructuras secundarias de los contenidos de α -hélice y β plegada produciendo desdoblamiento en proteínas de la membrana celular. Los cambios observados con un CM superior a 0.8 mT se asociaron con una reducción significativa de la viabilidad celular y la reducción del potencial mitocondrial transmembranal [82]. En este sentido, se ha encontrado que la exposición a CEM a baja frecuencia (2 mT, 50 Hz, 3 h) cambia la expresión de 189 proteínas [83], mientras que en células de neuroblastoma SH-SY5Y expuestas a un CM sinusoidal (50 Hz, 1 mT durante, 5, 10 y 15 días) altera los niveles de expresión de las proteínas involucradas en los mecanismos de defensa celular (PRDX2, PRDX3, PRDX6 y THTM), la organización estructural y la biogénesis (ACTG, TCPB, ROPN1, PROF2 y SPIN1). Esta perturbación inducida por CM en la expresión de proteínas de comportamiento proliferativo mostró un perfil dependiente del tiempo; además en los ensayos basados en BrdU y MTT, mostraron un efecto meseta después de 10 días de exposición al CM. De igual forma, esta investigación reveló que varias funciones de comportamiento y algunos procesos relacionados con la biología celular fueron afectados por el CM antes de que se manifestaran cambios significativos en la expresión del proteoma, posiblemente por alteración de las propiedades funcionales de las proteínas y enzimas celulares. Por otro lado, el tratamiento prolongado con el CM causó cambios dramáticos en el perfil proteómico, y estas modificaciones moleculares podrían estar relacionadas con cambios funcionales y de comportamiento. De acuerdo con el autor, estos hallazgos parecen reforzar la hipótesis de una asociación entre la exposición a CEM y enfermedades malignas [84].

Los hallazgos en células de neuroglioma H4 (H4/APP^{swe}) que sobreexpresan de forma estable la PPA mutante humana, muestran que la exposición a CM (3.1 mT a 50 Hz) estimula la secreción del P β A, incluyendo la isoforma β A₄₂, sin afectar a la viabilidad y morfología celular ni cambios morfológicos macroscópicos [85]. A diferencia, Rao *et al.*, [86] no encontraron relación entre CM (50, 100 y 200 μ T a 60 Hz, 4 h durante 2, 10 y 16 días después de la incubación) y las características patológicas de la EA en células de neuroblastoma IMR-32. Así mismo, no encontraron efectos estadísticamente significativos en los niveles de transcripción de la isoforma de la proteína APP₆₉₅ (una de las tres principales de la PPA que se expresa predominantemente en el tejido nervioso) en ninguna de las condiciones experimentales. De manera similar, la exposición de células

SH-SY5Y a CM de 2 mT a 50 Hz a diversas densidades de flujo y de tiempos que van desde 1 mT a 2 mT de 16 h no indujo cambios en la expresión de los genes PHOX2A, PHOX2B o D β [87].

Calabrò, *et al.* 2016 [88] investigaron el papel de los enlaces de hidrógeno y el desdoblamiento de proteínas de células SH-SY5Y ante un CM de 1 mT a 50 Hz. Mediante un estudio de espectroscopia encontraron que 4 h de exposición produjeron un aumento relevante en la intensidad de las bandas de vibración del grupo metileno; obteniendo un cambio significativo a energías bajas de la banda de amida I, aunque la frecuencia de amida II no cambió significativamente. Además, se encontró un aumento en la intensidad de las estructuras de hoja β paralelas y antiparalelas con respecto al componente de α -hélice. Sus resultados indican cambios en el estado conformacional total de la proteína dentro de la célula, pérdida del enlace C=O, despliegue de proteínas y daño celular por la formación de agregados, pues la frecuencia de banda de amida I es predominantemente sensible al enlace de hidrógeno en el grupo C = O, mientras que la vibración de amida II es igualmente sensible al estado de enlace de hidrógeno en los enlaces C = O y N-H. Todo esto condujo a un aumento de los canales de membrana y un aumento del transporte de iones de conductancia dando lugar a una disminución del potencial transmembrana mitocondrial en la célula.

Tabla 2. Estudios realizados con CEM en cultivos celulares.

ESTUDIOS	PARÁMETROS	RESULTADOS OBTENIDOS
Nicoletta Marchesi, <i>et al.</i> , [89]	75 Hz 2 mT 5 mV	Regulación de la autofagia dando un efecto citoprotector al destruir los agregados proteicos dentro de la célula.
Cecilia Osera, <i>et al.</i> , [90]	75 Hz 2 mT 5 mV	Aumento de proteínas fundamentales para el procesamiento proteolítico de la APP.
Emanuele Calabrò, <i>et al.</i> , [91]	50 Hz 0.8 – 1.4 mT	Cambios conformacionales de las proteínas, como la alteración en la región amida I; es decir, que se modifican proteínas que interactúan con la célula.
Hadi Hasanzadeh, <i>et al.</i> , [92]	50 Hz 2 mT	Alteración la expresión de 189 proteínas, entre ellas la expresión de la APP, por lo que se podría utilizar como tratamiento contra la EA.
Elda Del Giudice, <i>et al.</i> , [85]	50 Hz 3.1 mT 12 V, 0.8 A	Incremento considerable de la secreción de la β A <i>in vitro</i> , y por consiguiente el desencadenamiento de la EA.

Raj R. Rao, <i>et al.</i> , [86]	60 Hz 50, 100 y 200 mT	Asociación directa entre la exposición a los CEM y manifestaciones de EA a nivel celular.
Consales, <i>et al.</i> , [93]	50 Hz 1 mT 3.4 A	Reducción significativa del daño oxidante (CEM y antioxidantes) sin afectar la supervivencia, morfología y proliferación de estas células SOD1(G93A).
Cecilia Osera, <i>et al.</i> , [94]	75 Hz 1 mT	Mejoramiento de las defensas celulares contra los agentes oxidativos.
Cinzia Calcabrini, <i>et al.</i> , [95]	50 Hz 0.25 – 2 G ($2,5 \times 10^{-5}$ – 0.0002 T)	Aumento ligero en el estrés oxidante de las células, sin desbordamiento de la capacidad metabólica de las células que pueda llegar a tener un efecto citotóxico.
Soonho Lim, <i>et al.</i> , [96]	10 Hz 1 mT	Aumento considerable de la supervivencia celular y reducción del nivel de ROS intracelular.
Marcella Reale, <i>et al.</i> , [97]	50 Hz 1 mT	Disminución de la actividad antioxidante catalasa y un aumento en los niveles de O_2 , causantes de enfermedades neurodegenerativas.
Kavindra Kumar Kesari, <i>et al.</i> , [98]	50 Hz 1000 μ T	Incremento de los niveles de ROS después de 45 días.

Efecto de los CEM en el estrés oxidante

Las ROS también tienen influencia sobre las enfermedades neurodegenerativas, por lo que se han mostrado estudios donde los CEM tienen efectos contrarios, algunos han logrado reducir sus niveles, mientras que otros parecen inducir la formación de ROS. Algunos grupos de investigadores han demostrado en células SH-SY5Y que los CEM no afectan la supervivencia, morfología y proliferación de estas células, pero se podría tener un aumento considerable en los niveles de ROS. Sin embargo, se ha observado que con una pre-incubación con los antioxidantes tiol N-acetil-L-cisteína y GSH etil-éster se logra reducir significativamente la magnitud del daño oxidante y proteger a las células de la muerte inducida por el tratamiento de CEM (1 mT, 50 Hz) y la adición de 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP+) [93]. De igual manera se observó una disminución de ROS en células SH-SY5Y tratadas con H_2O_2 durante 30 minutos y posteriormente expuestas a CEM (2 mT, 75 Hz, y pulsos de 3 ms) en comparación con células no expuestas, sugiriendo que esta estimulación mejora las defensas celulares contra los agentes oxidantes [94]. En el caso de la línea celular de queratinocitos

humanos NCTC 2544 la incidencia de los CEM (0,25 - 2 G, 50 Hz, durante 1 h) provoca un ligero aumento en el estrés oxidante de las células, aunque no excede la capacidad metabólica de las mismas para que pueda llegar a tener un efecto citotóxico [95]. La exposición a un CM fijo y uniforme de 2.2 mT [99] mostró una ligera disminución del potencial transmembrana mitocondrial dependiente del tiempo de exposición de hasta 7 h, y esta disminución aumentó después de 24 h de exposición hasta un 30%, la cual podría estar asociada al aumento en la producción de ROS.

Osera, *et al.* 2015 [100], evaluaron si un CM pulsado, corto y repetido (CMP) de 1 mT a 75 Hz podrían desencadenar respuestas adaptativas contra un daño oxidante en un modelo neuronal celular, y encontraron que se mejoran las defensas celulares contra daños oxidantes. La exposición continua de 30 y 15 min a los CMP redujo significativamente la actividad mitocondrial con respecto a las células no expuestas. Su ensayo de citotoxicidad no detectó ningún efecto inducido por la exposición a 10 min del CMP (40 minutos en total; cuatro veces a la semana, de 10 min). A pesar de que se observó una reducción significativa de la actividad mitocondrial después de la incubación de células a H₂O₂ por 30 minutos, el pretratamiento con CMP evitó la disminución del número de células que se producía por este agente oxidante. Así mismo, se observó una sobreexpresión de proteínas PKCa, HuR y HSP70 (procesos intracelulares, incluyendo el estrés y las respuestas oxidativas) inducida por H₂O₂ y registraron un aumento en la actividad de la enzima superóxido dismutasa que contiene manganeso, lo que condujo a la reducción de los niveles de ROS después de 30 min de incubación con H₂O₂ con respecto a las células no pre-expuestas.

Finalmente, en la línea celular SH-SY5Y la exposición de CEM (1 mT y 50 Hz) indujo estrés oxidante, pues disminuyó la actividad de la enzima antioxidante catalasa y aumentó los niveles de O₂, un efecto que se observa durante el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como la EA [97]. La exposición a CEM (100 µT, 50 Hz, 24 h) en la misma línea celular logra reducir los niveles de la pre oxidación lipídica; sin embargo, se ven incrementados los niveles de ROS después de 45 días, pero esto se considera como un efecto retardado y que es inductor de la inestabilidad genómica [98].

JUSTIFICACIÓN

Considerando que el envejecimiento de las sociedades se está acentuando en todo el mundo (en particular, México será en mediano plazo un país de mayores de 60 años) lo cual está asociado al establecimiento de la EA, la cual representa casi la mitad de los casos de demencia generando los mayores costos sociosanitarios de las enfermedades neuropsiquiátricas. Resulta necesario establecer metodologías relevantes que permitan identificar y analizar de forma no invasiva causas, tratamientos, prevención y posible cura de la EA.

El uso de CM variables en el tiempo, aplicados a sistemas biológicos están aportando importantes conocimientos sobre la fisiología y también innovando metodologías de tratamiento para diferentes patologías en las neurociencias y otros campos de estudio celular. Estos CM, usados de forma convencional, tienen un patrón de líneas de campo paralelos, homogéneos y han mostrado tener un efecto en el cambio de estructura en las proteínas. En particular, la propuesta del presente proyecto es desarrollar un sistema físico de estimulación magnética mediante CMV, cuya característica es ser un campo multidireccional y heterogéneo, con posible capacidad inhibitoria de la agregación del P β A (clave en el desencadenamiento de la EA) si dicho alcance es obtenido, este trabajo contribuirá a la investigación básica para el tratamiento de la EA.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

¿Cómo afectan los campos magnéticos en vórtice a los agregados proteicos del péptido beta amiloide, que causan la enfermedad de Alzheimer?

HIPÓTESIS.

Lo campos magnéticos en vórtice inhibirán la agregación de los P β A por interacción de sus moléculas con las líneas de fuerzas aleatorias del campo; lo cual se verá reflejado en un incremento en la supervivencia de las células neuronales sometidos a la toxicidad de estos agregados.

OBJETIVOS

General

Crear un dispositivo para estimular muestras de P β A *in vitro* capaz de interactuar magnéticamente con los agregados del P β A con el fin de inhibir su formación.

Específicos

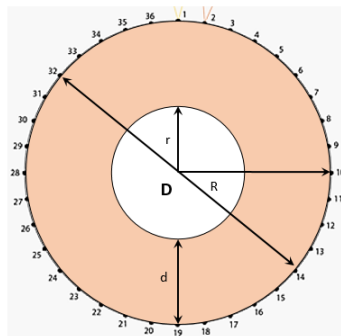
- Diseñar, implementar y caracterizar una bobina que genere CMV a bajas frecuencias.
- Estandarizar un sistema de polimerización *in vitro* del P β A.
- Evaluar cualitativa y cuantitativamente la capacidad inhibitoria de los campos magnéticos sobre la agregación del P β A *in vitro*.
- Establecer un protocolo de estimulación magnética y analizar la biocompatibilidad de los campos magnéticos con cultivos celulares de tipo neuronal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño y caracterización de la bobina

Se construyó una bobina de Rodin, la cual consiste en un embobinado de alambre de cobre esmaltado, de calibre 19 AGW, a lo largo de trayectorias “dobladas” en un toroide no conductor (27 cm diámetro externo y 13 cm de diámetro interno). El sistema consiste en dos bobinas idénticas, de 19 devanados, separadas por un espacio en el devanado de cada una y conectadas en paralelo. Una bobina con esta geometría genera un CMV [53]. Se imprimió en 3D en 4 partes; dicho toroide fue resanado para evitar fracturas entre las uniones e imperfecciones de impresión (*Figura 13*).

La bobina tiene las siguientes dimensiones



Referencia	Cm
D	27.0
R	13.5
r	6.5
d	7.0

Figura 12. Dimensiones de los toroides para la construcción de las bobinas.

Una vez que se tuvo la base del embobinado (toroide plástico y cilindro plástico) se procedió a montar las guías (clavos) de acuerdo con el patrón mostrado en la *Figura 15* y *Figura 12*, los cuales sirvieron de guía para el devanado del alambre de cobre, también mostrados en dicha figura.



Figura 13. Impresión 3D del toroide. Imperfecciones de impresión y toroide resanado.

Se embobinó de acuerdo con el patrón de Rodin siguiendo los puntos 36 guías (perforaciones con clavos en el diámetro externo de la dona, ver *Figura 12* y *Figura 14*). El número de bobinas para los modelos a utilizar serán dos, los cuales podrán ser conectados en paralelo, en serie o antiparalelo para su caracterización. La conexión final de trabajo se hizo en paralelo (*Figura 16*).

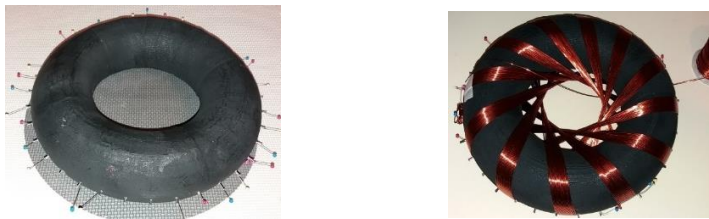


Figura 14. Toroide en impresión 3D con devanado y guías para 36 puntos en la bobina toroidal.

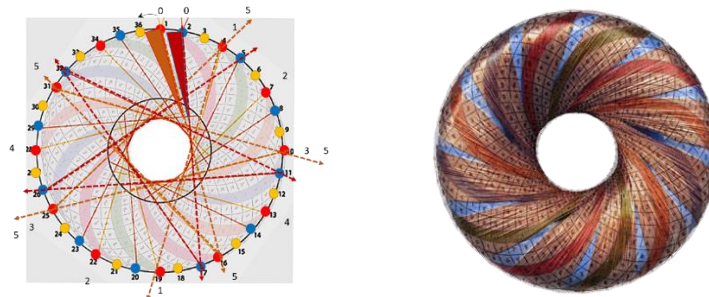


Figura 15. Patrón de pines y embobinado. Toroide (radio interno ~ 7 cm) y su patrón de embobinado.

Alimentación en CD para la bobina en su análisis de potencia: debido a que son dos entradas (hilos o bobinas) en la bobina de Rodin (dona o toroide), se etiquetó la “entrada” de cada hilo para posteriormente hacer las conexiones como se indica en la *Figura 16*, paralelo, antiparalelo y en serie:

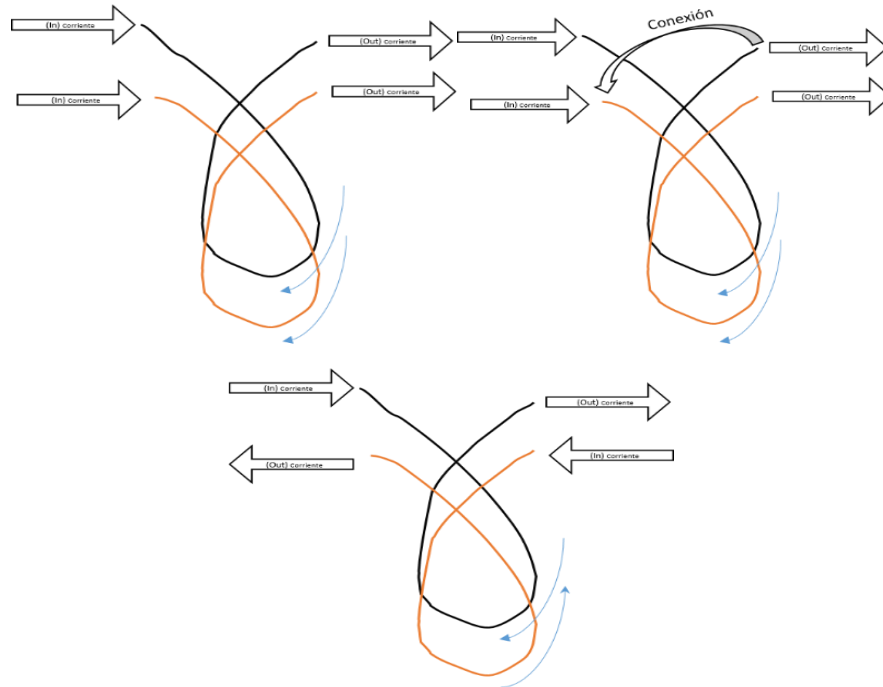


Figura 16. Diagrama de conexiones para la bobina de Rodin. Consta de dos hilos (negro y naranja) conectados en a) paralelo, b) serie y c) antiparalelo. La dirección de la corriente se indica con las flechas azules.

La *Figura 17* muestra la inductancia eléctrica con un LRC meter (BK PRECISION 878B)



Figura 17. Inductancia de la bobina de Rodin. La inductancia obtenida fue de 1.28 mH (mili Henrios) donde los hilos fueron conectados en paralelo.

Se midió el CM en un solo punto, en el centro del eje de simetría (*Figura 18*). Para caracterizarla en potencia, se conectó en corriente directa y se intercaló la conexión paralelo y antiparalelo (*Figura 16*), se alimentó a “pasos” con voltaje-amperaje desde un mínimo hasta un máximo permitido por la fuente de poder. Se midió el campo magnético con un gaussmetro 5100 Series OECO. El campo eléctrico inducido no se midió por limitaciones tecnológicas.

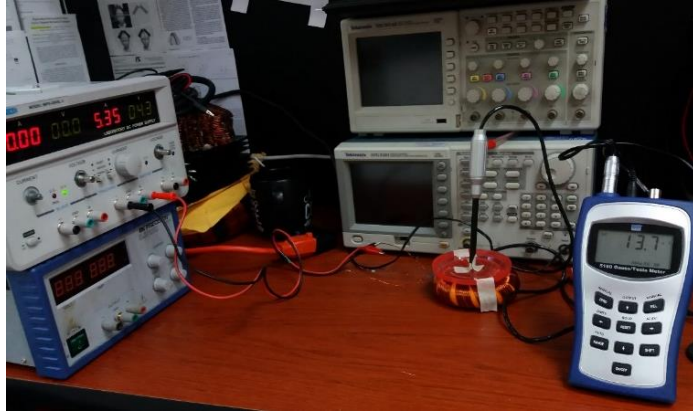


Figura 18. Caracterización de los valores del CM de la bobina toroidal. El modelo de prueba se alimenta a pasos en voltaje y amperaje con una fuente de poder.

Osciladores

Para baja frecuencia (75 Hz) se utilizó el software GoldWave creando un archivo de audio con la función $\text{sen}(2\pi ft)$ con $f = 75$ Hz y $t = 24$ h. La señal de salida se mandó al amplificador para incrementar la señal que alimenta la bobina (*Figura 19*).



Figura 19. Determinación de la señal sinusoidal a la salida del amplificador.

La señal sinusoidal de salida se conectó a un amplificador acústico (RV - 2002. UNIC) de 12 V y 100 W + 100 W *max power* que alimentó directamente la bobina (la señal osciló entre voltaje positivo y negativo). La intensidad del CM generado fue de $B = \sim 1.5$ mT. El CM se midió con una sonda axial del gaussmetro de efecto Hall (5100 Series). Todas las muestras tratadas se colocaron en el plano perpendicular al eje de rotación, en el centro del diámetro interior de la bobina.

Las muestras experimentales se colocaron en el centro de la bobina dentro de la incubadora de CO₂ durante el tratamiento (*Figura 20*).

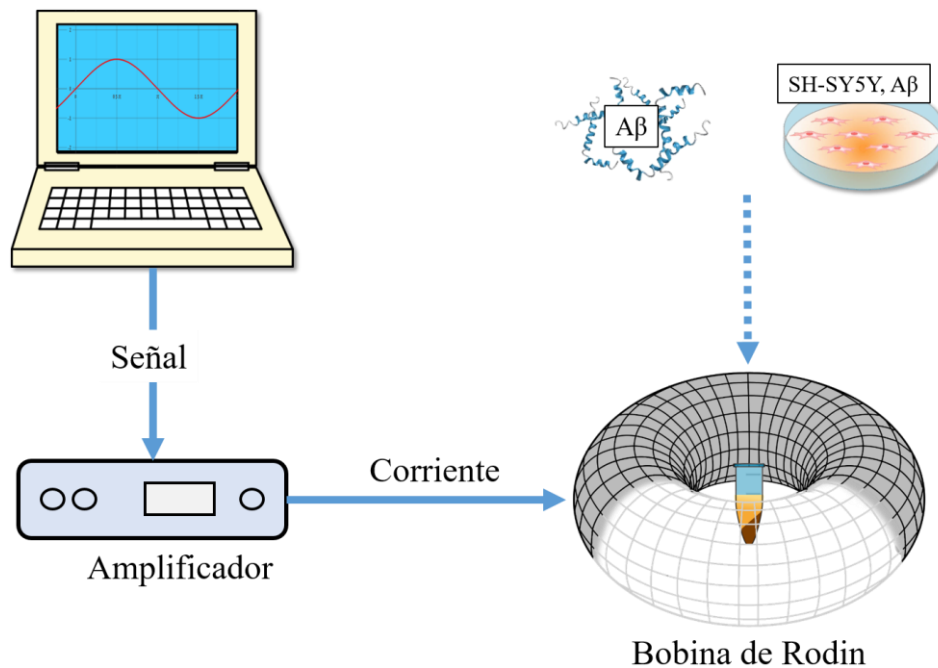


Figura 20. Montaje experimental del sistema de estimulación.

Preparación del P β A₄₂

Se utilizó el péptido comercial Beta-Amyloid (1-42) Human (AnaSpec, Inc.) de Bio Research Importaciones S.A de C.V. El β A₄₂ fue pre-tratado con hexafluoruro-2-propanol 1.1.1.3.3.3. (HFIP; Sigma Aldrich) directamente en una relación 1:1 (1 mg/1 ml), se separó en alícuotas en tubos de microcentrífuga estériles y se incubó en oscuridad a 4° C durante 30 minutos, obteniendo una solución clara e incolora. Para eliminar el solvente se utilizó el secador Speed Vac durante 25 min, obteniendo una película clara y transparente. Se guardaron los stocks del péptido a -80 °C hasta su uso posterior en los diferentes ensayos.

Para promover la agregación, se diluyó el β A₄₂ a una concentración de 20 μ M en buffer de polimerización (PBS 1X al 1% de DMSO) como se ha realizado en el grupo de investigación [101] y basado en la metodología de Stine, *et al.*, [52]. Se incubó 24 h a 37 °C y se tomaron muestras en diferentes tiempos de agregación dependiente del ensayo.

Para cada ensayo se prepararon dos muestras: una muestra control y una muestra experimental (estimulada magnéticamente) (Figura 21).

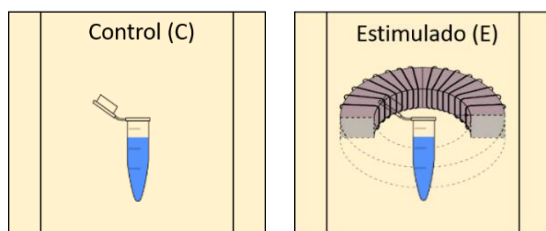


Figura 21. Esquema de estimulación magnética del P β A: Incubación de β A control y con estimulación magnética a 75 Hz en bobina de Rodin en incubadoras separadas.

Identificación de agregados mediante espectroscopía de fluorescencia y ensayo de tioflavina-T

La espectrometría de fluorescencia o fluorimetría es un tipo de espectroscopía que permite analizar y medir la fluorescencia de una muestra. Los fluorímetros o espectrofluorómetros son los dispositivos que permiten medir los parámetros de la fluorescencia de una muestra como su intensidad y la distribución de longitudes de onda del espectro de emisión después de la excitación por una fuente de luz monocromática de alta energía.

El ensayo de tioflavina-T es una técnica de espectroscopía de fluorescencia que permite identificar agregados amiloides presentes en una muestra *in vitro* debido a la afinidad de la tioflavina-T por dichos agregados [102]. Por tal motivo, mientras más agregados estén presentes en la muestra, la intensidad de la fluorescencia de la tioflavina-T aumentará, pues se correlaciona linealmente con la concentración de amiloide sobre las concentraciones de tioflavina-T que van desde 0.2 a 500 μ M (mayores concentraciones podrían afectar la forma de las curvas de agregación, pero este efecto depende de la proteína y no es universal) [103]. En el experimento se realizó una mezcla en la que se diluye el β A₄₂ a una concentración de 20 μ M en buffer de polimerización (PBS al 1% de DMSO 1X) y buffer de tioflavina-T a 10 μ M en PBS, además de un buffer solo con tioflavina-T y PBS que sirvió como fondo de contraste. Los volúmenes de la mezcla fueron ajustados según los requerimientos. Las muestras tratadas se estimularon a 75 Hz, 1.0 mT. Tanto la muestra control como tratamiento se incubaron por 24 h a 37 °C (en incubadoras separadas) y se tomaron alícuotas, en diferentes tiempos de agregación, para lecturas de fluorescencia relativa de tioflavina-T a una excitación y emisión de 450 nm y 490 nm respectivamente.

Para cuantificar la agregación de los polímeros del β A₄₂ se utilizó un espectrofluorómetro TECAN Infinite (M1000PRO) (Figura 22) y se cuantificó la fluorescencia relativa de la tioflavina-T.

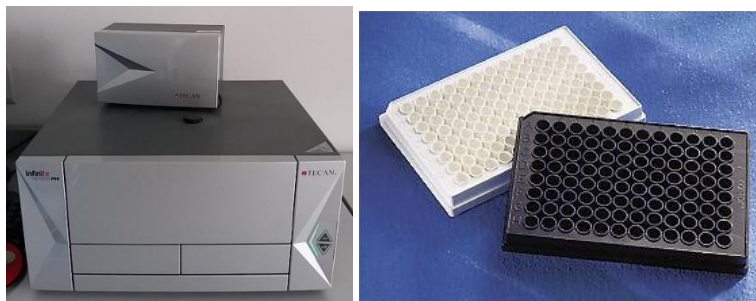


Figura 22. Espectrofotómetro TCAN: Equipo empleado para el análisis de espectroscopía con microplacas de 96 pozos (costar).

Identificación de agregados mediante la técnica de electroforesis y Western blot

La técnica de Western blot (WB) es una técnica de laboratorio utilizado para detectar proteínas específicas con base a su peso molecular. El método implica el uso de electroforesis en gel para separar las proteínas de la muestra. Las proteínas separadas se transfieren del gel a la superficie de una membrana. La membrana se expone a un anticuerpo específico para la proteína en estudio. La unión del anticuerpo se detecta usando un marcador químico; el resultado final es una placa con franjas de diferentes intensidades monocromáticas con la que se puede tener una referencia principalmente de la presencia, concentración, y tamaño de esa proteína.

Ensayo de polimerización de proteínas

Para promover la agregación del amiloide, se realizó una mezcla en la que se diluye el βA_{42} a una concentración de 20 μM en buffer de polimerización (PBS al 1% de DMSO 1X). Los volúmenes de la mezcla fueron ajustados según los requerimientos. Las muestras tratadas se estimularon a 75 Hz, ~ 1.5 mT. Tanto la muestra control, sin estimular, como las tratadas se incubaron por 24 h a 37 °C (en incubadoras separadas) y se tomaron alícuotas en diferentes tiempos de agregación desde el tiempo cero. Cada muestra recolectada se congeló a $-80^{\circ}C$ hasta la electroforesis.

Electroforesis en gel: Las muestras de βA_{42} se resuspendieron en una relación 1:1 en buffer carga 2X (0.125 M Tris-CL, 2% β -mercaptoetanol, 4% SDS, 20% glicerol y 0.005% azul de bromo fenol); posteriormente, las muestras (4 μg /carril) se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 16% utilizando una cámara Mini-PROTEAN Treta Cell System (BIO RAD) durante 90 min a 105 V. Se utilizó un marcador de bajo peso molecular (Dual Xtra Standard 2-250 kDa) para identificar el péptido.

Inmunoblot: Posteriormente las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa en la transferencia que se realizó a 4°C durante 60 min a 300 mA en una cámara de transferencia Mini Trans-Blot cell (BIO RAD). Posteriormente, la membrana se lavó con agua destilada para quitar restos de acrilamida y se bloqueó durante 60 minutos a temperatura ambiente con leche en polvo sin grasa al 10 % en TBS/Tween 20. La membrana se incubó con el anticuerpo primario monoclonal anti-amiloide 4G8 (Donación del Dr. Khalid Iqbal) diluido 1:3000 en TBS/Tween 20 con leche descremada al 5% durante 12 h a 4 °C en agitación. Posteriormente se lavó tres veces con TBS/Tween 20 y se incubó con el anticuerpo secundario Goat anti-mouse Ig-G peroxidado HRP (Millipore), diluido 1:10000 en TBS/Tween 20 con leche descremada al 5% en agitación durante 60 minutos a temperatura ambiente. En la detección, la membrana se volvió a lavar y la inmunoreactividad fue visualizada mediante un sistema de quimioluminiscencia ECL (Thermo Fisher, enhanced chemiluminescence detection system). Finalmente, el negativo (Kodak) se reveló en un cuarto oscuro, de forma tradicional, para visualizar el resultado.

Modelo de agregación del P β A en cultivo celular

Cultivo celular

Se emplearon células de neuroblastoma Humano SH-SY5Y (*Figura 23*). Estas células proceden de un tumor óseo metastásico; son una línea secundaria de la línea parental SK-N-SH. Las células SK-N-SH fueron subclonados tres veces; primero a SH-SY, luego a SH-SY5, y finalmente a SH-SY5Y [104]. Los cultivos incluyen células adherentes y células flotantes, aunque ambos tipos de las cuales son viables, sólo se usaron células adherentes. Las células SH-SY5Y se utilizan a menudo como modelos *in vitro* de función y diferenciación neuronal. Son adrenérgicos en fenotipo, pero también expresan marcadores dopaminérgicos; y como tales, se han utilizado para estudiar la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, la neurogénesis y otras características de las células cerebrales.

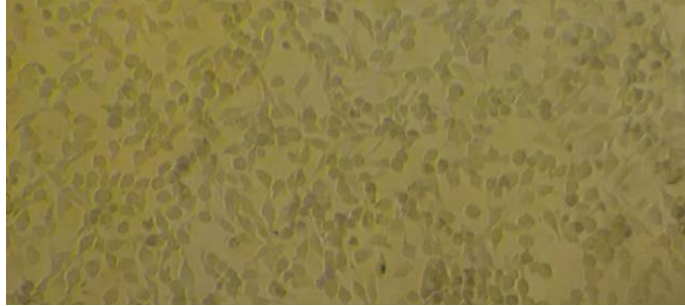


Figura 23. Cultivo celular. Células SH-SY5Y al 90% de confluencia.

Las células se cultivaron en Medio Esencial Mínimo de Dulbecco - F2 (D-MEM/F12) con 10% de suero fetal bovino y 1% de antibiótico-antimicótico (estreptomina, penicilina) a 37 ° C en 5% de atmósfera de CO₂. Se sembraron 6000 células/pozo y se incubó por 24 h en una microplaca de 96 pozos para su fijación.

Exposición del PβA a CMV en cultivos celulares.

Para evaluar el tratamiento de exposición a CMV en las células se crearon dos grupos (estimulados y no estimulados) con dos subgrupos cada uno: células silvestres o wild type (WT) y células expuestas a PβA₄₂ monomérico, solubilizado en DMEM/F12 suplementado con SFB al 10%, a una concentración de 16.61 μM/pozo. Se sembraron 6 mil células por pozo en microplaca de 96 pozos cortadas especialmente para ubicarlas dentro de la bobina (*Figura 24*). Los subgrupos se sembraron por cuadruplicado y todos tuvieron las mismas condiciones de cultivo durante 48 h, hasta el ensayo de citotoxicidad. El medio de cultivo no se cambió durante todo el experimento.

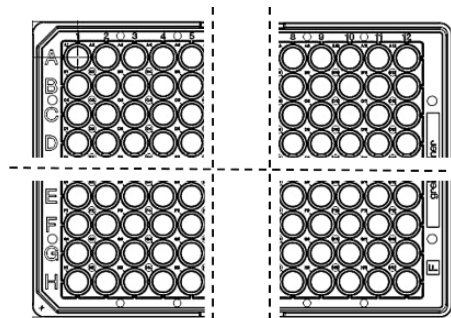


Figura 24. Corte de microplaca de 96 pozos. Una caja de 96 pozos que se cortó en cuatro sub-cajas en una matriz de 4x5 pozos. La sub-placa se coloca dentro de la bobina para posterior estimulación.

Tanto el grupo expuesto a estimulación magnético como el grupo no expuesto se colocaron en la misma incubadora, separados por una altura de 50 cm (*Figura 25*). La bobina se colocó en el

interior de la incubadora, en la parte inferior, y dentro del diámetro interno de la misma se colocaron los cultivos del grupo expuesto a la estimulación magnética (*Figura 26*).

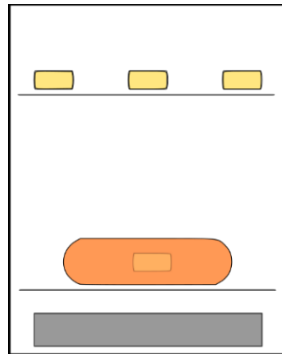


Figura 25. Disposición del experimento de estimulación magnética en el modelo celular. Localización de las microplacas control (parrilla superior) y experimental dentro de la bobina (parrilla inferior). La bobina se coloca en la parrilla inferior, sobre la tina de agua de la incubadora de CO₂.

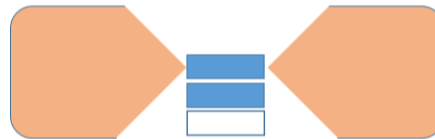


Figura 26. Ubicación de la microplaca dentro de la bobina. La placa con cultivo celular se coloca en medio de la bobina (vista de corte lateral).

Una vez que las células se fijaron a la microplaca (día 0), el grupo expuesto a los CMV se estimuló durante 24 h a 75 Hz, 1.0 mT (día 1). Después de las 24 h de exposición a CMV y P β A₄₂ se procedió a realizar el ensayo de citotoxicidad WST-1 (día 2) como lo muestra la *Figura 27*.

Análisis de la viabilidad celular

La viabilidad celular se define como el número de células sanas en una muestra, determina la cantidad de células que están vivas o muertas basándose en la muestra total de células inicial. La técnica de citotoxicidad mediante el reactivo WST-1 (sales de tetrazolium / formazan) nos permite medir de una forma directa la viabilidad celular frente a diferentes estímulos químicos (citotoxicidad) y físicos (fototoxicidad). También nos permite, pero de una manera indirecta, medir la proliferación celular. Se trata de un ensayo colorimétrico, no radiactivo, de cuantificación espectrofotométrica que se basa en la degradación de las sales de tetrazolium (WST-1) a sales de formazan, mediante la acción de las deshidrogenasas mitocondriales, que se producen de forma natural cuando las células

son viables. La sal de tetrazolio estable WST-1 se escinde en un formazán soluble mediante un mecanismo celular complejo que se produce principalmente en la superficie celular. Esta biorreducción depende en gran medida de la producción glucolítica de NAD (P) H en células viables. Por lo tanto, la cantidad de colorante formazán formada se correlaciona directamente con el número de células metabólicamente activas en el cultivo.

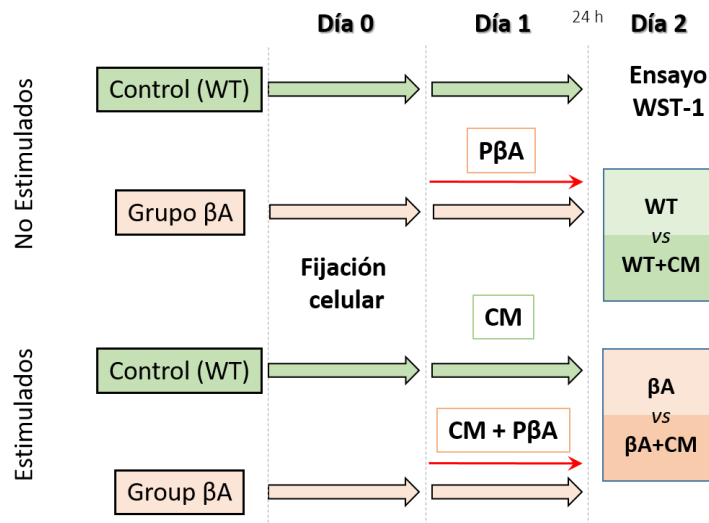


Figura 27. Diagrama del modelo de estimulación magnética en el modelo celular. Grupos de estudio de cultivo celular SH-SY5Y expuestos y no expuestos a los CMV con los subgrupos: WT y PβA. Los tiempos de tratamiento son: 24 h de estimulación a CM en el día 1 y 24 h de PβA también en el día 1 (flecha roja).

Para el ensayo de citotoxicidad, se agregó 10 μl de reactivo WST-1 en todos los pozos con las células cultivadas (tratamientos y controles) en medio de cultivo 100 μl/pozo (relación 1:10) y se siguieron incubando por 4 h en condiciones de cultivo estándar. Finalmente se llevó al espectrofotómetro después de este período de incubación, el colorante formazán formado se cuantifica con un espectrofotómetro de barrido de múltiples pocillos, se agitó por 1 min y se midió la absorbancia de todos los grupos a 439 nm. La absorbancia medida se correlaciona directamente con el número de células viables.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para comparar el efecto tanto del CM como del PβA en la línea celular SH-SY5Y se utilizó ANOVA seguido de la prueba New Man Keuls post hoc. Para analizar y comparar el efecto de la estimulación del CM sobre la inhibición de la formación de fibrillas βA se utilizó la prueba t de Student

entre los dos grupos experimentales. Todos los datos se analizaron empleando el software estadístico Prisma 7 (GraphPad Software, Inc.). Todos los datos se expresaron como medias \pm DE. Se consideró que las diferencias eran estadísticamente significativas en $p < 0.05$. Se realizaron tres experimentos independientes por triplicado para el ensayo tioflavina-T y por cuádruplicado para los ensayos de cultivo celular.

RESULTADOS

Sistema de estimulación para CMV

Para identificar el efecto de los CMV en la agregación del P β A se utilizó como fuente del CM una bobina de Rodin. Se diseñó y construyó un sistema de estimulación magnética no invasivo, de baja frecuencia e intensidad, la cual es alimentada con una función sinusoidal de 75 Hz para generar una intensidad de campo de ~ 1.5 mT. La frecuencia de trabajo óptima fue de un rango de frecuencias continuas o pulsadas entre 20 Hz y 20 kHz. El campo eléctrico inducido no se midió, ni se tuvo algún registro indirecto de la intensidad de este, sin embargo, se toma en cuenta para poder entender posibles efectos. La bobina no requirió sistema de enfriamiento, a pesar de trabajar por hasta 72 h continuas, no así la etapa de amplificación que contaba con su disipador de calor propio.

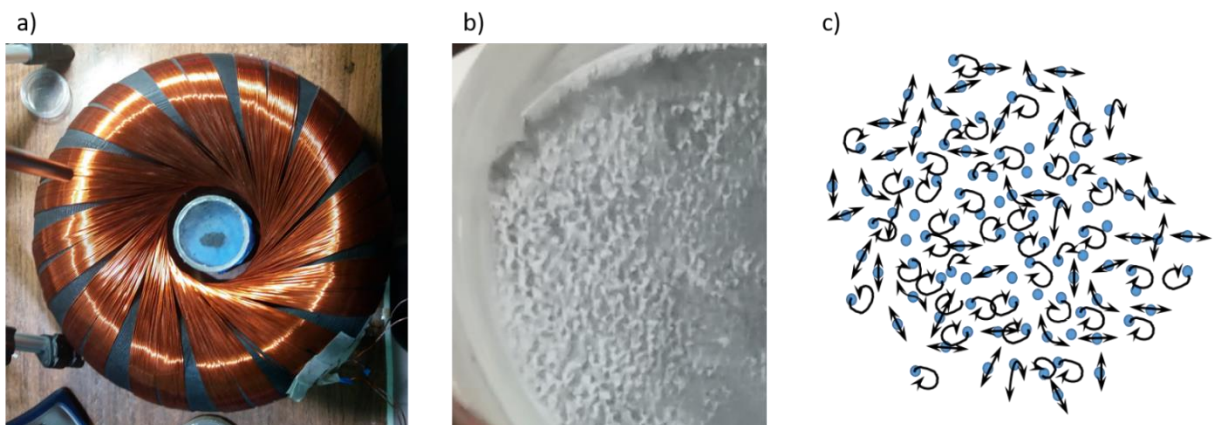


Figura 28. Prueba del CMV: a) colocación de la limadura de hierro en el centro de la bobina, b) fotografía instantánea del movimiento de las partículas c) ilustración del movimiento aleatorio de las partículas.

Las dimensiones de la bobina se crearon para poder trabajar con muestras de cultivos celulares y proteínas recombinantes dentro de una incubadora comercial. Dentro de la incubadora se registraron cambios en la intensidad del CM hasta de 0.5 mT debido a la contribución de las paredes; de tal modo que, el CM de trabajo fue de ~ 1.5 mT. Aunque también se registró un aumento

de la temperatura en el interior del diámetro de la circunferencia directriz de hasta 5 °C, esto no interfirió en la temperatura global de la incubadora (37 °C), pues el sistema de control de la temperatura de la incubadora se encargó de equilibrar el ambiente interno en todo momento; y esto se pudo comprobar con los cultivos celulares de hasta 72 h donde no hubo efectos adversos asociados a la temperatura.

Para comprobar el comportamiento vorticial del CM sobre partículas ferromagnéticas, se colocó limadura de hierro en un polvo grueso dentro de una caja de Petri (*Figura 28 a*); el comportamiento del CMV sobre la limadura fue tal que las partículas más pequeñas se movieron de forma aleatoria y en forma circular, cambiando de posición constantemente (*Figura 28 b y c*). Un resultado adicional, para observar el comportamiento de las líneas de campo, fue la simulación gráfica del CM generado por la bobina, donde se visualizaron las líneas de campo (*Figura 29*). Estos datos son determinantes para demostrar que la bobina genera CMV.

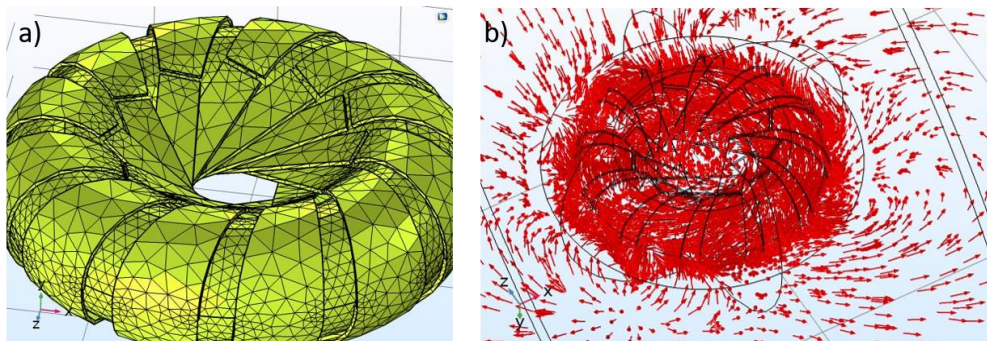


Figura 29. Densidad de flujo magnético. Simulación computacional del CM (b) generado por la bobina (a).

Evaluación cuantitativa

Mediante los ensayos de agregación de P β A y tioflavina-T, se determinó el efecto del CMV en la agregación del péptido. En la *Figura 30* se muestran los valores normalizados de la señal de fluorescencia que representa la agregación del β A. El ensayo de polimerización se realizó en tres experimentos independientes durante 24 h, tomando muestras en cinco diferentes tiempos (*Figura 30 a*, cuadros) correspondientes a la fase de crecimiento y la fase de saturación. Por otro lado, se muestran también en la *Figura 30 a* (triángulos) los cinco tiempos correspondientes al P β A₄₂ sometidos al CMV. El resultado del ensayo muestra la inhibición de la agregación del β A en un $\sim 86\%$ con respecto al control, en las muestras estimuladas con CMV (*Figura 30 b*).

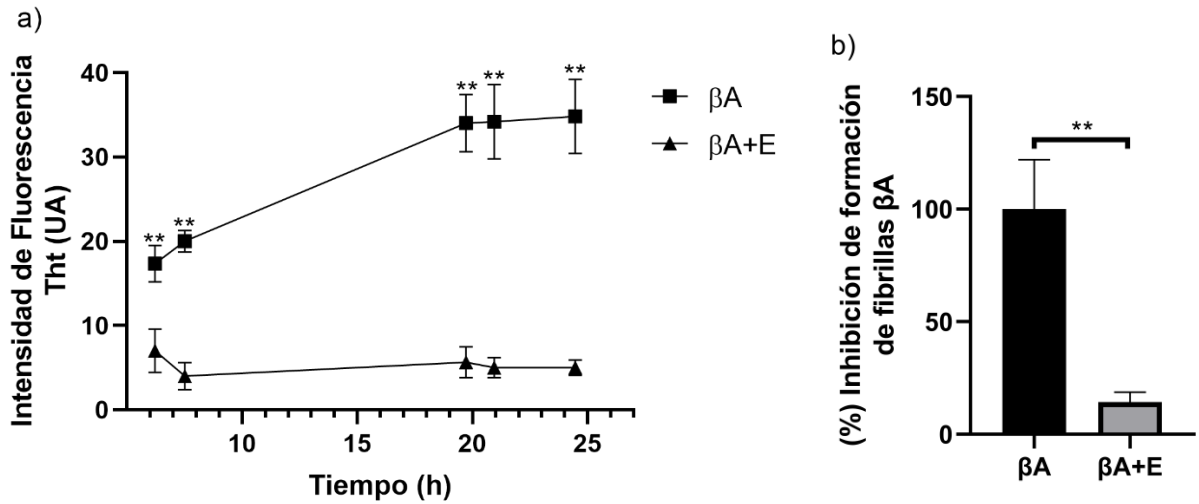


Figura 30. Análisis de la formación de fibrillas de βA mediante ensayo tioflavina-T. (a) Se polimerizó βA_{42} y se expuso a CMV durante 24 h, se analizó la intensidad de fluorescencia de diferentes alícuotas en el tiempo indicado. (b) Representación gráfica del análisis cuantitativo de la intensidad de la fluorescencia a las 24 h, se detectó ~ 86% de inhibición de la agregación. Los valores mostrados son medias \pm DE de tres experimentos independientes por triplicado. Prueba t de Student ** $p < 0.01$. βA : ensayo de polimerización de βA , E: expuesto a CMV.

En la gráfica de la evolución de agregación se aprecia que la tendencia de agregación se mantiene en los monómeros y posiblemente algunas estructuras secundarias u otros agregados donde la tioflavina-T pudo haberse adherido y que, sin embargo, por la metodología del experimento no se puede apreciar qué estructuras son las que se han podido formar. Estos datos indican que los CMV bloquean o retrasan la formación de fibrillas βA .

Inhibición de la agregación del $P\beta A$ mediante la estimulación por CMV, evaluación cualitativa.

Para determinar las diferentes estructuras fibrilares formadas durante la agregación del βA , las muestras control y las tratadas expuestas a CMV se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 16 %.

Durante 24 h de ensayo de agregación, se tomó una muestra a las 0 h y, posteriormente se tomaron 4 muestras del control y del estimulado con CMV a diferentes tiempos. En el gel se colocaron las muestras control (C1, C2, C3 y C4) seguidas de las muestras estimuladas (E1, E2, E3 y E4), precedidas ambas por el tiempo cero (T_0) de agregación como control sin agregación. Todas se uniformaron a una concentración de 0.4 $\mu g/\mu l$ de $P\beta A_{42}$.

En el Western blot de la *Figura 31* se observan las bandas correspondientes a la evolución típica de la agregación del $P\beta A$ (muestras control C_n , donde n es el número de muestra); por otro

lado, en las muestras estimuladas por CMV se puede apreciar que las bandas correspondientes a los agregados son similares en cada uno de los tiempos evaluados (E_n). A las 0 h observamos monómeros y trímeros-tetrámeros en ~ 4 kDa a ~ 15 kDa respectivamente, donde se esperaría que sólo hubiera monómeros, y cuya aparición se mantiene a lo largo del tiempo. La presencia de estas bandas se discutirá en la siguiente sección. Sin embargo, se observó una disminución de especies monoméricas y dímeros en las muestras control en comparación con respecto a las expuestas a CMV, lo que indica que los monómeros se han agregado y migrado a un peso molecular más alto, tomando posiciones superiores en la región de oligómeros, fibrillas y placas. Estos agregados no fueron observados en las muestras expuestas a CMV, lo que indica que los CMV bloquean o retrasan la agregación del P β A (*Figura 27 a*). La siguiente característica importante es que a medida que pasa el tiempo, en cada par de bandas ($C_n - E_n$), es notoria la disminución de agregados en la banda de la muestra estimulada (E_n) en comparación con la muestra control (C_n) (*Figura 31 a*): A partir de las 2 h, en las bandas de la muestra control (C_1, C_2, C_3 y C_4), se observa la aparición de oligómeros de bajo y alto peso molecular en la región de 15 kDa a 100 kDa, y se hace más evidente en bandas posteriores. Mientras que, en las muestras estimuladas, en los mismos tiempos, dicha región no tiene la misma intensidad, y sólo se aprecian agregados de alto peso molecular en la región de los 250 kDa, que se hacen más evidente al pasar del tiempo (E_1, E_2, E_3 y E_4). Esto nos indica una inhibición parcial y concuerda con el ensayo de tioflavina-T (*Figura 30*). Previamente a este resultado, no se encontró evidencia en la literatura de inhibición de la agregación del β A amiloide exclusivamente con CM o CMV.

En la *Figura 31 b* se muestra la cuantificación representativa en la intensidad de las bandas correspondiente al WB. Esto muestra que, en condiciones de agregación, las bandas correspondientes a oligómeros más grandes disminuyen ~ 80 % en las muestras expuestas a CMV en comparación con las muestras control a las 24 h. Es probable que la cuantificación esté subestimada porque las fibrillas se quedan acumuladas en el gel concentrador.

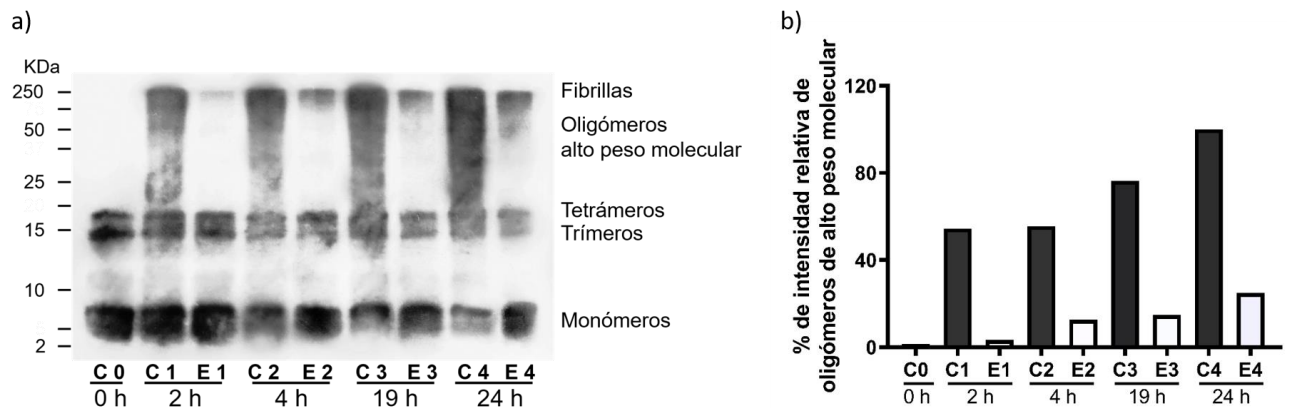


Figura 31. Análisis cualitativo de la formación de oligómeros βA en muestras estimuladas con CMV. (a) WB. Resultado de la polimerización del βA_{42} y su exposición a CMV durante 24 h, seguido de su separación en un gel Bis-Tris SDS / PAGE al 16%, se transfirió y se detectó con el anticuerpo monoclonal 4G8. El tiempo y los tratamientos están indicados en la figura. (b) Representación gráfica correspondiente a la densitometría de los oligómeros agregados en diferentes puntos de tiempo de una única transferencia del WB, normalizada a un control de 24 h (polimerización completa). El peso molecular se indica en kDa. C: control, E: expuesto a CMV.

Los CMV no inducen toxicidad e inhiben la agregación del βA

Una vez identificada la inhibición del βA por efecto de los CMV, se analizó esta misma capacidad, en cultivos celulares de la línea celular SH-SY5Y, incubadas con βA_{42} , mediante un ensayo de viabilidad celular (WST-1) para determinar el efecto de CMV en la toxicidad inducida por agregación del βA . Como se describe en la *Figura 27*, las células SH-SY5Y se incubaron durante 24 h sólo con medio de cultivo DMEM/F-12 seguido de incubación durante 24 h con βA_{42} ya sea en presencia o ausencia de CMV de acuerdo al grupo experimental. Durante el experimento, no se detectó CM significativo en el espacio del grupo no expuesto a CMV.

Se analizaron cuatro grupos experimentales de células (*Figura 32*); en los dos primeros grupos, las células WT expuestas a CMV mostraron un aumento significativo ($F(3,28) = 54.786$, $p < 0.0001$) en la viabilidad celular en comparación con las células WT no expuestas, lo que indica que los CMV no son tóxicos para las células SH-SY5Y a 75 Hz, ~ 1.0 mT durante 24 h (*Figura 16* WT, prueba de Newman Keuls $p < 0.05$). Los siguientes dos grupos de células consistieron en células WT incubadas con βA_{42} en presencia o ausencia de CMV. Las células tratadas con βA_{42} disminuyeron significativamente la viabilidad celular en comparación con las células WT. Sin embargo, la exposición

a CMV previene la citotoxicidad inducida por el β A y aumenta significativamente la viabilidad celular de las células tratadas con β A₄₂ (Figura 32 a, prueba de Newman Keuls $p < 0.01$). En general, este estudio mostró que la exposición de células SH-SY5Y a CMV i) bloquea parcialmente o retrasa la formación de fibrillas β A en cultivo celular, ii) previene la toxicidad de β A, e iii) induce la proliferación celular.

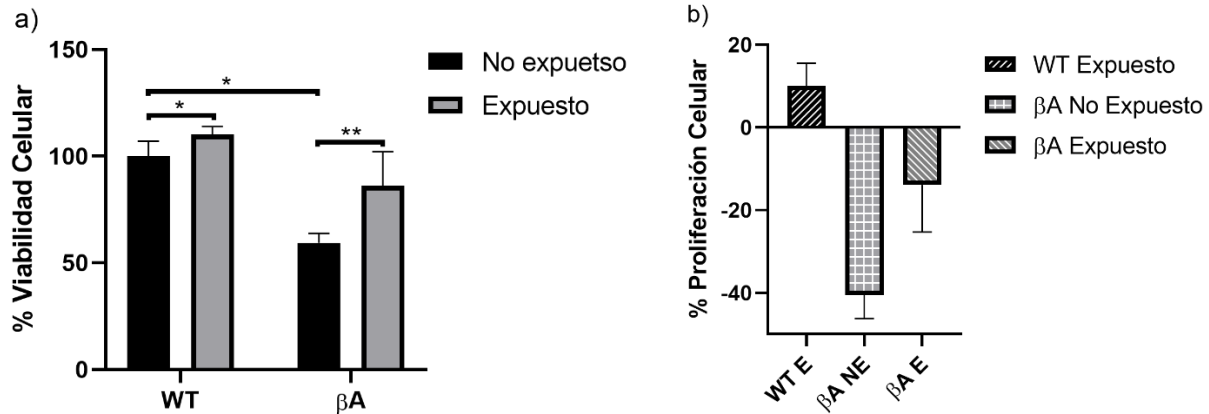


Figura 32. Inhibición de la toxicidad inducida por el β A mediante la estimulación con CMV. Después de 24 h de incubación del cultivo celular SH-SY5Y, el β A₄₂ se resuspendió en el medio de cultivo hasta una concentración final de 16.6 μ M (en la placa de cultivo celular) durante 24 h en ausencia o presencia de CMV. Los valores mostrados son medias \pm DE de tres experimentos independientes por cuadruplicado. Prueba t de Student * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Viabilidad celular. Se encontró diferencia significativa en los subgrupos WT y β A (* $P = 0.0454$ y ** $P = 0.0175$ respectivamente) entre el grupo expuesto y el no expuesto a CMV.

Reordenando los datos anteriores, en la Figura 32-b se observa que la viabilidad celular del subgrupo WT expuesto a los CMV fue superior en un 10.10 % \pm 5.44 %, el subgrupo β A no expuesto fue de - 40.55 % \pm 5.67 % y el subgrupo β A expuesto fue de -13.83 % \pm 11.44 %, todos ellos normalizados con respecto al subgrupo WT no expuesto.

DISCUSIÓN

Los seres vivos son generalmente conductores eléctricos debido a las interacciones iónicas que se dan dentro y fuera de la célula; además, los sistemas biológicos tienen estructuras magnéticamente influenciadas como los radicales libres que presentan propiedades paramagnéticas [105]. Por ejemplo, la incidencia de un campo estático solo produce una rotación de los dipolos magnéticos orientándolos a la dirección del campo e inmovilizándolos; por el contrario, un campo oscilante presenta variaciones, lo cual puede afectar a la velocidad de reacciones químicas que podrían condicionar la respuesta celular [105]. Si bien las interacciones entre los campos magnéticos con el material biológico son altamente específicas y tienen poca influencia en las propiedades eléctricas globales debido a su permeabilidad magnética, similar a la del vacío [55], los campos eléctricos inducidos por los campos externos, ya sea magnéticos variables o puramente eléctricos, tienen capacidad de interacción suficiente con dichas propiedades eléctricas [106].

En este estudio se empleó como fuente de estimulación el CMV, para crear un sistema no invasivo e inhibir la agregación de βA , empleando una bobina de Rodin con una disposición de devanado no convencional; modelo utilizado previamente en nuestra área de investigación [59]. Las bobinas convencionales usadas en la mayoría de las investigaciones tienen una configuración de bobina de Helmholtz [79, 83, 86, 87, 99, 107-110] o de solenoide [78, 84, 85, 111], las cuales crean campos idealmente uniformes y paralelos en el área de interés (*Figura 10*); por el contrario, los CMV generados por las bobinas de Rodin son heterogéneos y están dirigidos a direcciones variables en el área de interés, lo que se logra incluso sin cambiar la dirección de la corriente que activa la bobina [53]. Con las variaciones del CM aparece un campo eléctrico inducido (*Figura 9*) [56], cuya interacción puede expresarse mediante la ecuación de la ley de Faraday en forma vectorial como [112]: $\vec{\nabla} \times \vec{E} = -\partial \vec{B} / \partial t$, donde \vec{E} es el campo eléctrico, \vec{B} es el campo magnético y t es el tiempo; y describen líneas de campo perpendiculares entre sí. Ahora bien, una partícula cargada, sumergida en un CM o eléctrico experimentará una fuerza que cambiará su estado de movimiento, cuya dirección y velocidad serán consecuentes a líneas de campo en donde se encuentra inmersa [56]. Una partícula eléctrica cargada q dentro de un campo eléctrico experimentará una fuerza \vec{F}_E de acuerdo con la ecuación: $\vec{F}_E = q\vec{E}$; este campo actuará sobre partículas con carga ya sea que estén en reposo o

movimiento. De modo similar, una partícula cargada q moviéndose a una velocidad \vec{v} dentro y con respecto a un CM, experimentará una fuerza \vec{F}_B de acuerdo con la ecuación: $\vec{F}_B = q\vec{v} \times \vec{B}$ (Figura 33), este campo actuará en partículas con carga siempre y cuando estén en movimiento [56].

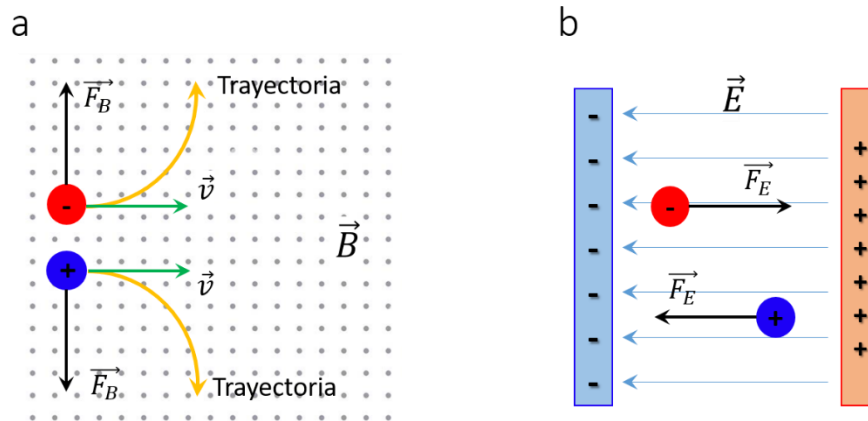


Figura 33. Interacciones de cargas eléctricas en campos a) magnético y b) eléctrico.

Cuando el campo eléctrico y el CM actúan al mismo tiempo sobre una partícula cargada q a una velocidad \vec{v} , la fuerza total en ella puede expresarse como la fuerza de Lorentz: $\vec{F}_L = q(\vec{E} + \vec{v} \times \vec{B})$. Puesto que el CM puede atravesar un sistema biológico a diferentes profundidades sin un contacto directo y sin atenuaciones de intensidad considerables y generar en ese punto corrientes eléctricas; tal propiedad se puede usar en aplicaciones médicas que requieran estimulación eléctrica profunda como la estimulación magnética transcraneal [113], en contraste con lo que se lograría con campos o corrientes eléctricas directas. De esta forma, los CMV generados por la bobina de Rodin escapan de la “rigidez” de los CM convencionales; pues tendrán campos variables (magnitud, dirección y sentido), y podrían aplicarse en casos donde se busque minimizar la dependencia de la orientación y de la posición de un CM (bobina) tradicional; por ejemplo, la respuesta ante el estímulo magnético en un grupo de neuronas respecto al ángulo de inclinación de la bobina [114-117]; En éste tipo de bobinas, los cortes entre corrientes adyacentes crean un CM global complejo, un CMV, de acuerdo con Rodin, *et al.*, 2012 [53] diferente al convencional lineal y homogéneo. Hasta donde se sabe, la única investigación previa con evidencia científica que compara la parte experimental y teórica, del uso de bobina de Rodin, en aplicaciones de cultivos celulares es el trabajo realizado por Pérez, *et al.*, 2013 [59]. Estas diferencias en la geometría de las bobinas generan campos diferentes y proporcionan un estímulo distinto en el objeto de estudio a nivel

celular; incluso, los diferentes tipos de la función geométrica que se elijan para alimentar de corriente a la bobina, también podrían influir en la respuesta celular, aún bajo las mismas condiciones de intensidad del CM o campo eléctrico inducido [118].

En el sistema de estimulación diseñado en esta tesis, la variación espacial de CM estimula la muestra bajo un comportamiento de gradiente vectorial [119]; es decir, la intensidad y dirección magnética del vórtice (~ 1.0 mT) no es uniforme en un plano paralelo a la bobina y cambiará en cada punto del espacio. La frecuencia elegida de 75 Hz se fundamentó en trabajos previos donde se encontró un efecto citoprotector [80] y un proceso no amiloidogénico en la línea celular SH-SY5Y [81].

Para determinar cualquier interferencia entre el CM y el material de la incubadora se aplicó el método de simulación computacional de análisis de elementos finitos [120-123]. Se simuló una incubadora con diferentes materiales en interacción con el CMV, y cada uno provocó variaciones de apantallamiento en el CM. El apantallamiento o relajación del CM dentro de la incubadora depende del material en las paredes de la cámara, el espacio libre entre la bobina, las paredes, y la magnitud del CM. Se analizó la distribución de CM dentro de la incubadora y su interacción con las paredes dentro de la cámara. Particularmente, en relación con la incubadora empleada en el experimento, se analizó la distribución de CM con una aleación de acero inoxidable en la cámara; como resultado, se obtuvo un apantallamiento que aumenta el CM dentro de la bobina Rodin de 1 mT a 1.35 mT.

No se encontró información relacionada con el efecto de CMV en el mecanismo molecular biológico; sin embargo, las publicaciones revisadas sugieren que variaciones en el CM pueden inducir actividad biológica diversa (Tabla 1), ya que se estimulan las propiedades eléctricas de las biomoléculas [124] y el campo eléctrico pulsado afecta directamente la electrofisiología celular, interrumpiendo transitoriamente su potencial de membrana [125]. Asimismo, se ha confirmado una reorientación magnética de las células del neuroblastoma inducida por CM estático [126]. Desafortunadamente, el uso de CMV no está involucrado en la gran mayoría de las investigaciones relacionadas con la estimulación con CM; sólo se identificaron dos estudios que aplicaron CMV en sistemas biológicos, aunque el efecto reportado fue inducido principalmente por potenciadores externos al CM [59, 127]. Además, estos estudios no formularon algún mecanismo molecular que

explique el efecto de la exposición a la CMV. Se sabe que los CEM uniformes promueven la proliferación de células humanas al disminuir los niveles de especies de oxígeno reactivo intracelular y aumentar la expresión de marcadores del ciclo celular [128]. En el presente trabajo se encontró un resultado similar en el incremento de la proliferación de la línea celular de neuroblastoma y se identificó un aumento en la viabilidad celular después de la estimulación con CMV.

Las publicaciones revisadas sugieren un efecto regulatorio de los CEM en términos de dosis, tiempo, frecuencia y tipo de bobina utilizada, con respecto a inducir un efecto citoprotector o un efecto citotóxico (Tabla 1 y Tabla 2). En esta tesis se encontró un aumento en la viabilidad celular después de que las células de neuroblastoma fueron expuestas a CMV. En este caso sólo se analizó indirectamente la agregación de β A por la citotoxicidad [129] y estrés oxidativo en las células SH-SY5Y [130] relacionándolo con la muerte celular. Se sabe que las especies reactivas de oxígeno pueden modular los niveles de expresión de diversos grupos de genes (enzimas antioxidantes, citoprotectoras), donde algunos factores de transcripción están regulados por un estrés oxidativo que no es citotóxico y puede servir a las células para adaptarse al estrés [131]. Por lo tanto, se demuestra que los CMV previenen la citotoxicidad inducida por β A, y la inhibición de la agregación de β A podría ser el mecanismo responsable de este resultado, tal como se esperaba.

La cinética de agregación del P β A es un proceso bien definido, el cual depende de la concentración de la proteína y el tiempo principalmente [37], cuya secuencia (Figura 1) puede diferenciarse claramente en tres etapas en una curva de crecimiento [41], donde cada una revela la presencia de tamaños y pesos moleculares diferentes (Figura 3). Este proceso mecanicista se caracteriza secuencialmente por: i) una fase lenta de nucleación en la que los monómeros llevan un cambio conformacional o plegamiento incorrecto y se autoagrupan para formar núcleos oligoméricos. En la segunda etapa, ii) una fase de crecimiento donde los núcleos crecen rápidamente y forman polímeros y fibras más grandes. Finalmente, iii) una fase estable o de saturación con un equilibrio entre los polímeros formados y los monómeros peptídicos. Los resultados del análisis cuantitativo de esta tesis sugieren que el CMV afecta la etapa de nucleación de la agregación del β A. Mostramos mediante el ensayo tioflavina-T una disminución significativa de los agregados de β A estimulados con CMV, en comparación con las muestras no expuestas y cuyo comportamiento

concuera con un trabajo previo [101] en tiempo y etapas de dicha secuencia. En cada punto de tiempo probado del ensayo de polimerización (*Figura 26*), la línea correspondiente a la muestra expuesta a CMV no muestra un aumento significativo, se observa una tendencia del β A a permanecer en estado no agregado en comparación con las fases normales de agregación. Sin embargo, la señal de baja fluorescencia en las muestras expuestas puede atribuirse a agregados de bajo peso molecular que permanecen con cambios conformacionales de la fase de nucleación durante el experimento de las 0 a 24 h. Si bien se sabe poco de los mecanismos moleculares de interacción, estas variaciones del CM podían contribuir con fuerzas (eléctricas/magnéticas) en diferentes direcciones que superen la energía hidrofóbica favorable intramolecular e intermoleculares que interactúan con residuos polares de las cadenas laterales del P β A, sin contar las interacciones solvente-proteína. Una de las interacción intramolecular más importantes podría ubicarse en el núcleo de una molécula al desestabilizar la unión de D23 con K28 y promover uniones con otros residuos o cadenas laterales con carga (como E11, K16, E22) en una flexión del esqueleto polipeptídico, cambiando su estructura secundaria característica y dejando al monómero con una zona hidrofóbica reducida, desestabilizando la formación de fibrillas entre las moléculas [47, 133, 134]. Esta descripción se puede comparar con la que obtuvo el grupo de investigación de Todorova N, 2016 [132] al usar dinámica molecular para simular la interacción de un péptido amiloidogénico con campos eléctricos y electromagnéticos externos de diferentes intensidades y direcciones. Encontraron que el CEM puede tener la capacidad de mantener el péptido en ciertas conformaciones proporcional a la intensidad, una de las cuales corresponde a conformaciones inhibitoras de fibrillas. Así como sucede en interacciones con estructuras de las células bajo un CM [126], recordando que un CM variable en el tiempo induce un campo eléctrico [56, 135].

Los efectos reportados en este trabajo se deben únicamente al CM (y eléctrico inducido) y no hay algún otro elemento químico, biológico o físico extra que aporte una nueva variable a la respuesta de agregación, en comparación con investigaciones previas con CMV [59, 127]. Todos los ensayos de polimerización parten de β A monomerizada; y si bien es una técnica ya definida [101], se deben de cuidar todas las variables en el proceso, pues se puede incurrir en errores sistemáticos que no dependan exclusivamente del experimentador (reactivos en malas condiciones o equipo en mal estado). Este resultado se confirmó cualitativamente mediante la técnica de SDS/PAGE al 16% y

WB, caracterizado también en un trabajo previo [101], donde se observaron diferentes tipos de agregados (Figura 31 a). Tal resultado se puede explicar asumiendo que el CMV inhibe la unión de β A- β A, al menos durante el tiempo de exposición, deteniendo el proceso secuencial de agregación de β A en la fase de nucleación, lo cual se identificó por los oligómeros de bajo peso molecular mostrados en las bandas de la placa de WB.

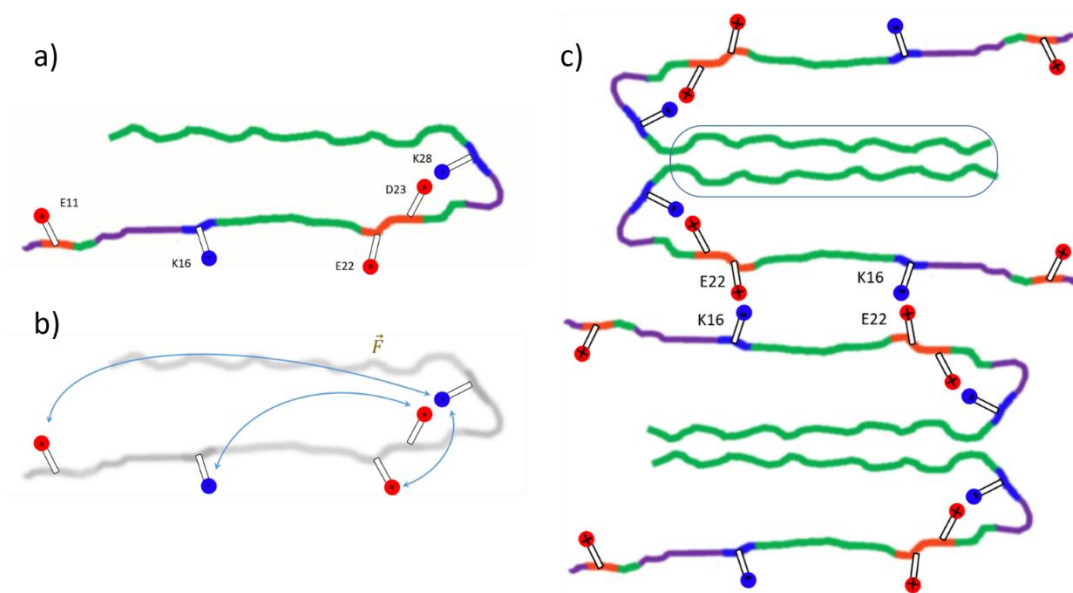


Figura 34. Diagrama simplificado de la interacción de las cadenas laterales de los residuos con carga en a) una molécula de β A y b) en la formación de fibrillas entre dos moléculas. Código de colores para cargas rojo (+), azul (-) y verde (hidrofóbico).

Los oligómeros, trímeros y tetrámeros de baja masa molecular existen desde el comienzo del experimento (tiempo = 0). Esta evidencia de agregados al inicio del proceso dependerá de las condiciones de preparación como el tipo de anticuerpo, pH y temperatura [136], y podrían no representar una proporción significativa de las especies formadas [137]. Asimismo, en las muestras estimuladas, se observaron algunas fibrillas en la parte superior de las bandas en la placa del WB. Esta intensidad en la banda aumenta de forma directa con el tiempo, sugiriendo que el CMV retrasa la agregación del β A. Es necesario realizar más estudios incrementando el tiempo de observación y estímulo para aclarar esta afirmación. El punto clave de esta tesis se fundamenta en la alta capacidad del CMV para reducir la formación de fibrillas del β A; algunos otros grupos de investigación han demostrado el efecto de los CEM en modelos animales reduciendo la carga del β A en el cerebro de ratones [138-140], y en contraste con eso, en este trabajo de investigación se informa por primera

vez la reducción de aproximadamente el 86% de la agregación del βA_{42} mediante condiciones experimentales *in vitro*. Recientemente, Saikia, *et al.* 2019, mostraron una reducción en la agregación del βA en un 27 % en βA_{16-22} y ninguna reducción en βA_{42} cuando las muestras fueron expuestas a 0.8 T de CM [141]. Estos datos muestran una diferencia drástica en comparación con nuestros resultados que puede atribuirse a las distintas geometrías (campo vectorial) de CM, ya que ellos expusieron las muestras a CM homogéneos, mientras que en esta investigación se emplearon CMV. Otra diferencia sustancial es la intensidad de CM empleada, de 0.8 T en comparación con ~ 1.0 mT en nuestro estudio. Según Saikia, *et al.* 2019, la fuerza de CM aplicada en su estudio, fue ineficiente para modular la estructura secundaria de βA_{42} , y esta afirmación respalda otro estudio previo, que indica que para inducir cambios conformacionales en péptidos, se requiere de un CM de intensidad muy alto, en un rango de 10 - 15 T [142]. A pesar de estas afirmaciones, aquí se demostró que un CM de baja frecuencia e intensidad (75 Hz, 1.0 mT) reduce en gran medida la agregación de βA ; a su vez, Darwish, *et al.* 2020, recientemente demostraron que un CM uniforme de frecuencia extremadamente baja (50 Hz, 2.4 mT) puede afectar a otra conformación proteica, CREB, involucrada en actividades neuronales [143]. Al realizar el análisis de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier, el mismo grupo de investigación sugiere que el efecto en CREB está asociado con el cambio de enlaces de hidrógeno en la estructura secundaria de la proteína, alterando la frecuencia de vibraciones de estiramiento o flexión, y estas condiciones hacen que estas vibraciones sean susceptibles a la influencia del CM. Presumimos que la susceptibilidad mencionada también puede influir en la conformación del P βA , alterando el mecanismo clave de formación de las fibrillas βA ; que implica la transición conformacional de βA α -hélice a hoja- β . Puesto que la fuerza del CMV afecta directamente las cargas de aminoácidos y perturba la naturaleza del péptido, ésta puede promover la exposición de residuos hidrófobos evitando la autoagregación.

El CMV podría influir en la estructura secundaria de βA y mantener monómeros y oligómeros de bajo peso molecular en la conformación α -hélice o impedir el acople de monómeros en la conformación de hoja- β , como se muestra en el βA expuesto a CMV observado con la técnica de WB en la Figura 31-a. Saika J, *et al.* 2019, [141], en su estudio, describen que el posible efecto de un campo eléctrico sobre el βA es el alineamiento de macromoléculas a lo largo del eje del campo aplicado. En el caso de CMV se propone que las macromoléculas de βA , permanecen en constante

movimiento, con la tendencia a alinearse al campo durante cada cambio de éste; es decir, ya que se ha demostrado un movimiento disperso y heterogéneo de campo, debido a la aleatoriedad de las líneas de fuerza, tanto del campo eléctrico inducido como del CM mismo, promoverán movimientos aleatorios del β A correspondiente con la intensidad específica del CM aplicado. Budi, *et al.* 2005, [144] compararon la influencia de los campos eléctricos estáticos y oscilantes en la cadena B de insulina; encontraron que los campos eléctricos oscilantes, con cambios variables y rápidos en diferentes direcciones, son más desfavorables para mantener la estructura de la proteína que los campos estáticos de fuerza efectiva similar, también demostraron que el campo estático estabiliza la estructura secundaria; este efecto puede explicar la alta variación encontrada en la agregación de β A en nuestro estudio en comparación con Saika, *et al.*, 2019. El reporte de Todorova, *et al.* 2016, [132] demostró que los cambios estructurales y dinámicos en los péptidos amiloidogénicos, debido a la alineación del dipolo a lo largo de la dirección del campo aplicado, están regulados por la intensidad del campo eléctrico. Asimismo, las variaciones en las frecuencias están relacionadas con efectos en el mecanismo de resonancia estocástica [145], asociado a factores que conducen y mueven iones celulares libres internos y externos orientados a la dirección del CEM y que promueven el movimiento de transición en las membranas celulares. Por ejemplo, al activar los mecanismos de resonancia en función de la frecuencia de activación específica en las redes neuronales, se induce un efecto cooperativo entre los mecanismos internos y las señales periódicas externas [146, 147]. Toschi, *et al.* 2009, [148] simularon computacionalmente el efecto de un campo eléctrico externo estático aplicado al P β A, encontrando que dicho campo tensa las hélices (con centro de carga terminal N positivo, terminal C negativo) y tienden a orientarse paralelamente al campo eléctrico, desencadenando así, la conversión del P β A₄₂ en hélice alfa a una espira al azar y/o a la hoja beta típica en las placas β A. Otra explicación del fenómeno lo revelan los trabajos de Ilivea, *et al.* 2019, [134] que estudió la estabilidad conformacional de los péptidos helicoidales alfa, mediante una simulación computacional de teoría funcional de densidad, sumergidos en campos eléctricos de diferente intensidad y dirección. Se encontró que el campo eléctrico a lo largo del eje longitudinal de la hélice tiene un efecto perturbador y es el de mayor intensidad, cuya pérdida de estabilidad es reversible, aunque podría deberse al método computacional utilizado para el cálculo. De forma similar, Dutta, *et al.* 2015, [106] analizó el efecto de los campos eléctricos en diferentes tipos de

interacciones no covalentes y encontró que este tipo de interacciones pueden ser alteradas por presencia de campos eléctricos externos y cuyo efecto energético variará dependiendo del eje particular en el que se aplica dicho campo.

Actualmente, las aplicaciones médicas de los CM se centran en la estimulación transcraneal con intensidades de CM de hasta 2.5 T o se aplican repetidamente a intensidades de campo más bajas, modulando la actividad cerebral en la región cortical afectada más allá de la duración de la estimulación [113, 149]. La permeabilidad es otra ventaja del CM, atravesando diferentes capas celulares hasta el área de estimulación, esta capacidad no es aplicable al campo eléctrico. Entre las aplicaciones y capacidades del CM, se está investigando el tratamiento con estimulación magnética transcraneal en la EA, propuesto como una herramienta prometedora en la clínica como diagnóstico y rehabilitación; y en la investigación, diversos aspectos fisiológicos relacionados con la EA [150, 151].

CONCLUSIÓN

En este trabajo se estudió el efecto de los CMV sobre el proceso de agregación del β A mediante una investigación multidisciplinaria que ayude a proponer un protocolo adecuado de estimulación magnética, que sea terapéuticamente potencial para el tratamiento de la EA. Los CMV inhibieron la agregación del P β A, demostrado por resultados cualitativos y cuantitativos, asumiendo que el CM y el campo eléctrico inducido inhiben la unión de β A- β A al menos durante el tiempo de exposición, deteniendo el proceso secuencial de agregación de β A en la fase de nucleación. Los resultados de la línea celular SH-SY5Y demostraron que los CMV inhibieron la agregación y retrasaron la formación de fibrillas del P β A, así como la acción de prevenir la toxicidad de tales agregados en la línea celular de neuroblastoma humano aumentando su viabilidad. El mecanismo molecular implicado en el aumento de la viabilidad celular se desconoce, sin embargo, el CMV podría promover la proliferación a través de disminuir los niveles de especies reactivas y aumentar la expresión de marcadores del ciclo celular, similar al efecto que tienen los CM uniformes. Queda mucho por investigar acerca de los efectos del CMV sobre el β A y es necesario ahora estudiarlo en un sistema más complejo, como los modelos *in vivo*, además de añadir más pruebas que nos permitan comprender los mecanismos moleculares implicados en la estimulación con CMV.

PERSPECTIVAS

Unas de las pruebas pendientes con los procedimientos realizados, en esta tesis, es comprobar si los CMV son capaces de revertir o detener la agregación de βA recombinante tanto en la fase de crecimiento como la de saturación; además, queda por comprobar si el efecto del CMV es permanente o tiene un límite temporal, cuyo efecto será más interesante observarlo en el cultivo celular.

Asimismo, será interesante el estudio *in vivo* con modelos que reproducen los principales marcadores neuropatológicos de la EA: las placas extracelulares de βA y las MNFs de proteína tau; en particular, ratones transgénicos de tipo 3xTg-AD [152] serán un buen modelo. El estudio con ratones llevará a crear un nuevo sistema de estimulación (Figura 35) donde se analizará el tipo de frecuencia e intensidad del campo a estudiar para diseñar el generador de señales correspondiente. En este estudio se podrán realizar pruebas cognitivas a los ratones como el laberinto acuático de Morris para su evaluación en tareas de aprendizaje y memoria [153-155], el test de campo abierto y reconocimiento de objetos nuevos para evaluar la reactividad emocional en una situación de novedad, a través de la conducta exploratoria vertical y horizontal [156], o la tabla de 16 o 4 agujeros de Boissier para medir la conducta exploratoria y “curiosidad” de los animales [157, 158].

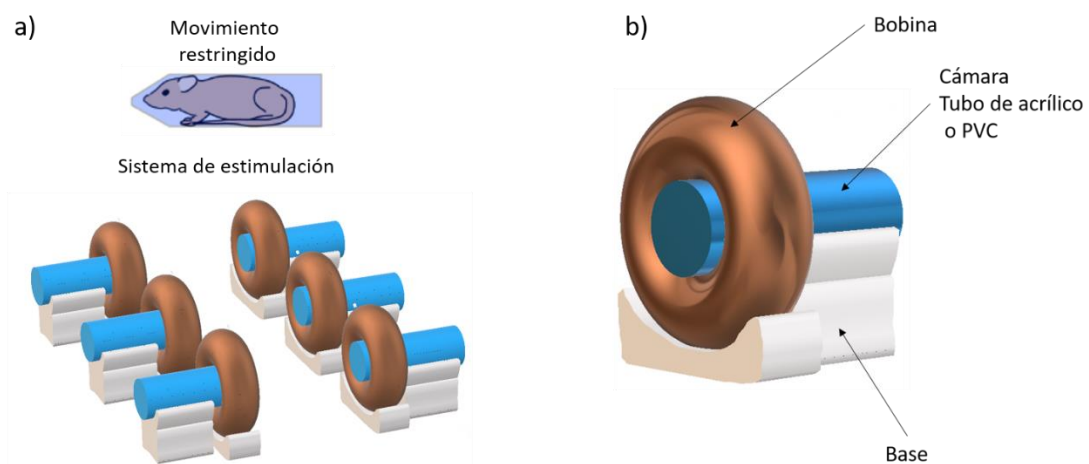


Figura 35. Sistema de estimulación propuesto para futuros estudios. a) Sistema de estimulación múltiple para ratones sanos y transgénicos en movimiento restringido. b) Partes del sistema de estimulación individual de ratones.

Finalmente, el cerebro de los ratones se estudiaría mediante: a) técnicas histoquímicas para identificar estructuras cerebrales y su relación con el efecto del β A, así como cualquier otra de interés (como tau) y, b) un análisis bioquímico para el reconocimiento de agregados del β A. Se esperaría que con estas pruebas se obtenga información más completa respecto a los efectos positivos o negativos de los CMV por sí mismos sobre un ser vivo y el efecto conjunto sobre la evolución de la patología neurofibrilar en la EA.

REFERENCIAS

1. Association As. *What Is Dementia?* 2021. Available from: <https://www.alz.org/alzheimer-demencia/que-es-la-demencia>.
2. Gale SA, Acar D, Daffner KR. *Dementia*. Am J Med. 2018;131(10):1161-9.
3. Gaugler J, James B, Johnson T, Scholz K, Weuve J. *2016 Alzheimer's Disease Facts and Figures*. Alzheimer's Disease. 2016;12(4).
4. Perry RJ, Hodges JR. *Attention and executive deficits in Alzheimer's disease. A critical review*. Brain : a journal of neurology. 1999;122 (Pt 3):383-404.
5. Tan LL, Wong HB, Allen H. *The impact of neuropsychiatric symptoms of dementia on distress in family and professional caregivers in Singapore*. International psychogeriatrics / IPA. 2005;17(2):253-63.
6. Pope SK, Shue VM, Beck C. *Will a healthy lifestyle help prevent Alzheimer's disease?* Annual review of public health. 2003;24:111-32.
7. Reitz C, Brayne C, Mayeux R. *Epidemiology of Alzheimer disease*. Nature reviews Neurology. 2011;7(3):137-52.
8. Prince M, Wimo A, Guerchet M, Ali G-C, Wu Y-T, Prina M. *World Alzheimer Report 2015: The Global Impact of Dementia*. 2015.
9. van der Flier WM, Scheltens P. *Epidemiology and risk factors of dementia*. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2005;76 Suppl 5(Suppl 5):v2-7.
10. Tiraboschi P, Hansen LA, Thal LJ, Corey-Bloom J. *The importance of neuritic plaques and tangles to the development and evolution of AD*. Neurology. 2004;62(11):1984-9.
11. Cappai R, White AR. *Amyloid beta*. The international journal of biochemistry & cell biology. 1999;31(9):885-9.
12. Josephs KA, Whitwell JL, Ahmed Z, Shiung MM, Weigand SD, Knopman DS, et al. *Beta-amyloid burden is not associated with rates of brain atrophy*. Ann Neurol. 2008;63(2):204-12.
13. Hardy JA, Higgins GA. *Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis*. Science (New York, NY). 1992;256(5054):184-5.
14. Hardy J, Selkoe DJ. *The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics*. Science (New York, NY). 2002;297(5580):353-6.
15. Priller C, Bauer T, Mitteregger G, Krebs B, Kretschmar HA, Herms J. *Synapse Formation and Function Is Modulated by the Amyloid Precursor Protein*. The Journal of Neuroscience. 2006;26(27):7212-21.
16. Turner PR, O'Connor K, Tate WP, Abraham WC. *Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory*. Progress in Neurobiology. 2003;70(1):1-32.
17. Yankner BA. *Mechanisms of Neuronal Degeneration in Alzheimer's Disease*. Neuron. 16(5):921-32.
18. Jurado Luque MA, Mataró Serrat M, Pueyo Benito R. *Enfermedad de Alzheimer*. Neuropsicología de las enfermedades neurodegenerativas. DL ed. Madrid España: Síntesis; 2013. p. 35 de 237.
19. Sun N, Funke SA, Willbold D. *A survey of peptides with effective therapeutic potential in Alzheimer's disease rodent models or in human clinical studies*. Mini reviews in medicinal chemistry. 2012;12(5):388-98.
20. Yankner BA, Dawes LR, Fisher S, Villa-Komaroff L, Oster-Granite ML, Neve RL. *Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease*. Science (New York, NY). 1989;245(4916):417-20.
21. Kowall NW, Beal MF, Busciglio J, Duffy LK, Yankner BA. *An in vivo model for the neurodegenerative effects of beta amyloid and protection by substance P*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1991;88(16):7247-51.
22. Pozueta J, Lefort R, Shelanski ML. *Synaptic changes in Alzheimer's disease and its models*. Neuroscience. 2013;251:51-65.
23. Selkoe DJ. *Alzheimer's disease is a synaptic failure*. Science (New York, NY). 2002;298(5594):789-91.

24. Sala C, Segal M. *Dendritic spines: the locus of structural and functional plasticity*. *Physiological reviews*. 2014;94(1):141-88.
25. Gamblin TC, Chen F, Zambrano A, Abraha A, Lagalwar S, Guillozet AL, et al. *Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(17):10032-7.
26. Feldman H. *Atlas of Alzheimer's disease*. London: Informa Healthcare; 2008.
27. Zhang N, Song X, Bartha R, Beyea S, D'Arcy R, Zhang Y, et al. *Advances in high-field magnetic resonance spectroscopy in Alzheimer's disease*. *Curr Alzheimer Res*.11(4):367-88.
28. Capetillo-Zarate E, Gracia L, Tampellini D, Gouras GK. *Intraneuronal Abeta accumulation, amyloid plaques, and synapse pathology in Alzheimer's disease*. *Neuro-degenerative diseases*. 2012;10(1-4):56-9.
29. Capetillo-Zarate E, Gracia L, Yu F, Banfelder JR, Lin MT, Tampellini D, et al. *High-resolution 3D reconstruction reveals intra-synaptic amyloid fibrils*. *The American journal of pathology*. 2011;179(5):2551-8.
30. Tomiyama T. [*Involvement of beta-amyloid in the etiology of Alzheimer's disease*]. *Brain and nerve = Shinkei kenkyu no shinpo*. 2010;62(7):691-9.
31. Gouras GK, Willen K, Faideau M. *The inside-out amyloid hypothesis and synapse pathology in Alzheimer's disease*. *Neuro-degenerative diseases*. 2014;13(2-3):142-6.
32. Kosik KS. *The molecular and cellular biology of tau*. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*. 1993;3(1):39-43.
33. Goodson HV, Valetti C, Kreis TE. *Motors and membrane traffic*. *Current opinion in cell biology*. 1997;9(1):18-28.
34. Drubin DG, Kirschner MW. *Tau protein function in living cells*. *The Journal of cell biology*. 1986;103(6 Pt 2):2739-46.
35. Ebnet A, Godemann R, Stamer K, Illenberger S, Trinczek B, Mandelkow E. *Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: implications for Alzheimer's disease*. *The Journal of cell biology*. 1998;143(3):777-94.
36. Buerger K, Ewers M, Pirttila T, Zinkowski R, Alafuzoff I, Teipel SJ, et al. *CSF phosphorylated tau protein correlates with neocortical neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease*. *Brain : a journal of neurology*. 2006;129(Pt 11):3035-41.
37. Harper JD, Lansbury PT, Jr. *Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins*. *Annual review of biochemistry*. 1997;66:385-407.
38. Cohen SI, Linse S, Luheshi LM, Hellstrand E, White DA, Rajah L, et al. *Proliferation of amyloid-beta42 aggregates occurs through a secondary nucleation mechanism*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(24):9758-63.
39. Yoshiike Y, Minai R, Matsuo Y, Chen YR, Kimura T, Takashima A. *Amyloid oligomer conformation in a group of natively folded proteins*. *PloS one*. 2008;3(9):e3235.
40. Verma M, Vats A, Taneja V. *Toxic species in amyloid disorders: Oligomers or mature fibrils*. *Annals of Indian Academy of Neurology*. 2015;18(2):138-45.
41. Kumar S, Walter J. *Phosphorylation of amyloid beta (Aβ) peptides – A trigger for formation of toxic aggregates in Alzheimer's disease* 2011. 803-12 p.
42. Baldwin AJ, Knowles TP, Tartaglia GG, Fitzpatrick AW, Devlin GL, Shammass SL, et al. *Metastability of native proteins and the phenomenon of amyloid formation*. *J Am Chem Soc*. 2011;133(36):14160-3.
43. Marshall KE, Marchante R, Xue WF, Serpell LC. *The relationship between amyloid structure and cytotoxicity*. *Prion*. 2014;8(2).

44. Stine WB, Jr., Dahlgren KN, Krafft GA, LaDu MJ. *In vitro characterization of conditions for amyloid-beta peptide oligomerization and fibrillogenesis*. The Journal of biological chemistry. 2003;278(13):11612-22.
45. Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K. *Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1985;82(12):4245-9.
46. Serpell LC. *Alzheimer's amyloid fibrils: structure and assembly*. Biochim Biophys Acta. 2000;1502(1):16-30.
47. Petkova AT, Ishii Y, Balbach JJ, Antzutkin ON, Leapman RD, Delaglio F, et al. *A structural model for Alzheimer's beta -amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2002;99(26):16742-7.
48. Pratt CW, Kathleen C. *Bioquímica: Manual Moderno*; 2012.
49. Hilbich C, Kisters-Woike B, Reed J, Masters CL, Beyreuther K. *Substitutions of hydrophobic amino acids reduce the amyloidogenicity of Alzheimer's disease beta A4 peptides*. J Mol Biol. 1992;228(2):460-73.
50. Takahashi Y, Ueno A, Mihara H. *Mutational analysis of designed peptides that undergo structural transition from alpha helix to beta sheet and amyloid fibril formation*. Structure (London, England : 1993). 2000;8(9):915-25.
51. Wei G, Su Z, Reynolds NP, Arosio P, Hamley IW, Gazit E, et al. *Self-assembling peptide and protein amyloids: from structure to tailored function in nanotechnology*. Chem Soc Rev. 2017;46(15):4661-708.
52. Stine WB, Jungbauer L, Yu C, LaDu MJ. *Preparing synthetic Abeta in different aggregation states*. Methods in molecular biology (Clifton, NJ). 2011;670:13-32.
53. Rodin M, Volk G. *The Rodin Number Map and Rodin Coil*. Proceedings of the Natural Philosophy Alliance. 2010;7(1).
54. Gabriel C, Gabriel S, Corthout E. *The dielectric properties of biological tissues: I. Literature survey*. Physics in Medicine and Biology. 1996;41(11):2231.
55. Pethig R, Kell DB. *The passive electrical properties of biological systems: their significance in physiology, biophysics and biotechnology*. Phys Med Biol. 1987;32(8):933-70.
56. Resnick R, Halliday D, Krane KS. *Física 2*. 5a ed. Continental, editor. México, D.F.2003. 1198 p.
57. Chen Q, Lin GM, Wu N, Tang SW, Zheng ZJ, Lin MC, et al. *Early exposure of rotating magnetic fields promotes central nervous regeneration in planarian Girardia sinensis*. Bioelectromagnetics. 2016;37(4):244-55.
58. Dogru AG, Tunik S, Akpolat V, Dogru M, Saribas EE, Kaya FA, et al. *The effects of pulsed and sinusoidal electromagnetic fields on E-cadherin and type IV collagen in gingiva: a histopathological and immunohistochemical study*. Advances in clinical and experimental medicine : official organ Wroclaw Medical University. 2013;22(2):245-52.
59. Pérez H, Cordova-Fraga T, López-Briones S, Martínez-Espinosa JC, Rosas EF, Espinoza A, et al. *Portable device for magnetic stimulation: Assessment survival and proliferation in human lymphocytes*. Review of Scientific Instruments. 2013;84(9):094701.
60. Ferroni L, Tocco I, De Pieri A, Menarin M, Fermi E, Piattelli A, et al. *Pulsed magnetic therapy increases osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells only if they are pre-committed*. Life sciences. 2016;152:44-51.
61. Ikeda T, Kurosawa M, Morimoto C, Kitayama S, Nukina N. *Multiple effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on neuropsychiatric disorders*. Biochemical and biophysical research communications. 2013;436(2):121-7.
62. Mizukawa Y, Iwasaka M. *Magnetic field effects on mitochondrion-activity-related optical properties in slime mold and bone forming cells*. Conference proceedings : Annual International Conference of the

- IEEE Engineering in Medicine and Biology Society IEEE Engineering in Medicine and Biology Society Annual Conference. 2013;2013:1442-5.
63. Hernandez-Pavon JC, Cordova T, Solorio S, Barbosa-Sabanero G, Sabanero-Lopez M, Sosa M. *Effects of Magnetic Fields on Nervous Cells*. In: Supek S, Sušac A, editors. 17th International Conference on Biomagnetism Advances in Biomagnetism – Biomag2010: March 28 – April 1, 2010 Dubrovnik, Croatia. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2010. p. 450-3.
 64. Seong Y, Moon J, Kim J. *Egr1 mediated the neuronal differentiation induced by extremely low-frequency electromagnetic fields*. Life sciences. 2014;102(1):16-27.
 65. de Groot MW, van Kleef RG, de Groot A, Westerink RH. *In Vitro Developmental Neurotoxicity Following Chronic Exposure to 50 Hz Extremely Low-Frequency Electromagnetic Fields in Primary Rat Cortical Cultures*. Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology. 2016;149(2):433-40.
 66. Anadon A, Martinez MA, Castellano V, Martinez-Larranaga MR. *The role of in vitro methods as alternatives to animals in toxicity testing*. Expert opinion on drug metabolism & toxicology. 2014;10(1):67-79.
 67. Kovalevich J, Langford D. *Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology*. Methods in molecular biology (Clifton, NJ). 2013;1078:9-21.
 68. Meng P, Yoshida H, Tanji K, Matsumiya T, Xing F, Hayakari R, et al. *Carnosic acid attenuates apoptosis induced by amyloid- β 1–42 or 1–43 in SH-SY5Y human neuroblastoma cells*. Neuroscience Research. 2015;94:1-9.
 69. Lee M, McGeer E, McGeer PL. *Activated human microglia stimulate neuroblastoma cells to upregulate production of beta amyloid protein and tau: implications for Alzheimer's disease pathogenesis*. Neurobiology of aging. 2015;36(1):42-52.
 70. Yang WN, Ma KG, Chen XL, Shi LL, Bu G, Hu XD, et al. *Mitogen-activated protein kinase signaling pathways are involved in regulating α 7 nicotinic acetylcholine receptor-mediated amyloid- β uptake in SH-SY5Y cells*. Neuroscience. 2014;278:276-90.
 71. Lana E, Khanbolouki M, Degavre C, Samuelsson E-B, Åkesson E, Winblad B, et al. *Perforin Promotes Amyloid Beta Internalisation in Neurons*. Molecular neurobiology. 2017;54(2):874-87.
 72. Cameron RT, Quinn SD, Cairns LS, MacLeod R, Samuel IDW, Smith BO, et al. *The phosphorylation of Hsp20 enhances its association with amyloid- β to increase protection against neuronal cell death*. Molecular and Cellular Neuroscience. 2014;61:46-55.
 73. Krishtal J, Bragina O, Metsla K, Palumaa P, Tõugu V. *In situ fibrillizing amyloid-beta 1-42 induces neurite degeneration and apoptosis of differentiated SH-SY5Y cells*. PloS one. 2017;12(10):e0186636-e.
 74. Legleiter J, Czilli DL, Gitter B, DeMattos RB, Holtzman DM, Kowalewski T. *Effect of Different Anti-A β Antibodies on A β Fibrillogenesis as Assessed by Atomic Force Microscopy*. Journal of Molecular Biology. 2004;335(4):997-1006.
 75. Shaked GM, Kummer MP, Lu DC, Galvan V, Bredesen DE, Koo EH. *Abeta induces cell death by direct interaction with its cognate extracellular domain on APP (APP 597-624)*. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 2006;20(8):1254-6.
 76. Jorge Fernando Ortiz Paz TCF, Myrna Sabanero López, Lis Flores Villavicencio *ANÁLISIS DEL EFECTO DE CAMPOS MAGNÉTICOS Y FLUOXETINA EN CÉLULAS NEURONALES* 15 seminario de investigación, Ciencias Biomédicas - Neurología Mayo 2014; Universidad Autónoma de Aguascalientes 2014.
 77. Mo WC, Zhang ZJ, Liu Y, Bartlett PF, He RQ. *Magnetic shielding accelerates the proliferation of human neuroblastoma cell by promoting G1-phase progression*. PloS one. 2013;8(1):e54775.
 78. Reale M, Kamal MA, Patruno A, Costantini E, D'Angelo C, Pesce M, et al. *Neuronal cellular responses to extremely low frequency electromagnetic field exposure: implications regarding oxidative stress and neurodegeneration*. PloS one. 2014;9(8):e104973.

79. Benassi B, Filomeni G, Montagna C, Merla C, Lopresto V, Pinto R, et al. *Extremely Low Frequency Magnetic Field (ELF-MF) Exposure Sensitizes SH-SY5Y Cells to the Pro-Parkinson's Disease Toxin MPP(.*) *Molecular neurobiology.* 2016;53(6):4247-60.
80. Marchesi N, Osera C, Fassina L, Amadio M, Angeletti F, Morini M, et al. *Autophagy is modulated in human neuroblastoma cells through direct exposition to low frequency electromagnetic fields.* *Journal of cellular physiology.* 2014;229(11):1776-86.
81. Osera C, Fassina L, Amadio M, Venturini L, Buoso E, Magenes G, et al. *Cytoprotective response induced by electromagnetic stimulation on SH-SY5Y human neuroblastoma cell line.* *Tissue engineering Part A.* 2011;17(19-20):2573-82.
82. Calabro E, Condello S, Curro M, Ferlazzo N, Vecchio M, Caccamo D, et al. *50 Hz electromagnetic field produced changes in FTIR spectroscopy associated with mitochondrial transmembrane potential reduction in neuronal-like SH-SY5Y cells.* *Oxidative medicine and cellular longevity.* 2013;2013:414393.
83. Hasanzadeh H, Rezaie-Tavirani M, Seyyedi SS, Zali H, Heydari Keshel S, Jadidi M, et al. *Effect of ELF-EMF Exposure on Human Neuroblastoma Cell Line: a Proteomics Analysis.* *Iranian journal of cancer prevention.* 2014;7(1):22-7.
84. Sulpizio M, Falone S, Amicarelli F, Marchisio M, Di Giuseppe F, Eleuterio E, et al. *Molecular basis underlying the biological effects elicited by extremely low-frequency magnetic field (ELF-MF) on neuroblastoma cells.* *Journal of cellular biochemistry.* 2011;112(12):3797-806.
85. Del Giudice E, Facchinetti F, Nofrate V, Boccaccio P, Minelli T, Dam M, et al. *Fifty Hertz electromagnetic field exposure stimulates secretion of beta-amyloid peptide in cultured human neuroglioma.* *Neuroscience letters.* 2007;418(1):9-12.
86. Rao RR, Halper J, Kisaalita WS. *Effects of 60 Hz electromagnetic field exposure on APP695 transcription levels in differentiating human neuroblastoma cells.* *Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands).* 2002;57(1):9-15.
87. Benfante R, Antonini RA, Kuster N, Schuderer J, Maercker C, Adlkofer F, et al. *The expression of PHOX2A, PHOX2B and of their target gene dopamine-beta-hydroxylase (DbetaH) is not modified by exposure to extremely-low-frequency electromagnetic field (ELF-EMF) in a human neuronal model.* *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA.* 2008;22(6):1489-95.
88. Calabrò E. *Competition between hydrogen bonding and protein aggregation in neuronal-like cells under exposure to 50Hz magnetic field.* *International journal of radiation biology.* 2016;92(7):395-403.
89. Marchesi N, Osera C, Fassina L, Amadio M, Angeletti F, Morini M, et al. *Autophagy is modulated in human neuroblastoma cells through direct exposition to low frequency electromagnetic fields.* *J Cell Physiol.*229(11):1776-86.
90. Osera C, Fassina L, Amadio M, Venturini L, Buoso E, Magenes G, et al. *Cytoprotective response induced by electromagnetic stimulation on SH-SY5Y human neuroblastoma cell line.* *Tissue Eng Part A.*17(19-20):2573-82.
91. Calabro E, Condello S, Curro M, Ferlazzo N, Vecchio M, Caccamo D, et al. *50 Hz electromagnetic field produced changes in FTIR spectroscopy associated with mitochondrial transmembrane potential reduction in neuronal-like SH-SY5Y cells.* *Oxid Med Cell Longev.*2013:414393.
92. Hasanzadeh H, Rezaie-Tavirani M, Seyyedi SS, Zali H, Heydari Keshel S, Jadidi M, et al. *Effect of ELF-EMF Exposure on Human Neuroblastoma Cell Line: a Proteomics Analysis.* *Iran J Cancer Prev.*7(1):22-7.
93. Benassi B, Filomeni G, Montagna C, Merla C, Lopresto V, Pinto R, et al. *Extremely Low Frequency Magnetic Field (ELF-MF) Exposure Sensitizes SH-SY5Y Cells to the Pro-Parkinson's Disease Toxin MPP(.*) *Mol Neurobiol.*53(6):4247-60.

94. Osera C, Amadio M, Falone S, Fassina L, Magenes G, Amicarelli F, et al. *Pre-exposure of neuroblastoma cell line to pulsed electromagnetic field prevents H₂O₂-induced ROS production by increasing MnSOD activity.* *Bioelectromagnetics.* 36(3):219-32.
95. Calcabrini C, Mancini U, De Bellis R, Diaz AR, Martinelli M, Cucchiari L, et al. *Effect of extremely low frequency electromagnetic fields on antioxidant activity in the human keratinocyte cell line NCTC 2544.* *Biotechnol Appl Biochem.*
96. Lim S, Kim SC, Kim JY. *Protective Effect of 10-Hz, 1-mT Electromagnetic Field Exposure Against Hypoxia/Reoxygenation Injury in HK-2 Cells.* *Biomed Environ Sci.* 28(3):231-4.
97. Reale M, Kamal MA, Patruno A, Costantini E, D'Angelo C, Pesce M, et al. *Neuronal cellular responses to extremely low frequency electromagnetic field exposure: implications regarding oxidative stress and neurodegeneration.* *PLoS One.* 9(8):e104973.
98. Kesari KK, Luukkonen J, Juutilainen J, Naarala J. *Genomic instability induced by 50Hz magnetic fields is a dynamically evolving process not blocked by antioxidant treatment.* *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 794:46-51.
99. Calabro E, Condello S, Curro M, Ferlazzo N, Caccamo D, Magazu S, et al. *Effects of low intensity static magnetic field on FTIR spectra and ROS production in SH-SY5Y neuronal-like cells.* *Bioelectromagnetics.* 2013;34(8):618-29.
100. Osera C, Amadio M, Falone S, Fassina L, Magenes G, Amicarelli F, et al. *Pre-exposure of neuroblastoma cell line to pulsed electromagnetic field prevents H₂O₂-induced ROS production by increasing MnSOD activity.* *Bioelectromagnetics.* 2015;36(3):219-32.
101. Melchor M-H, Susana F-G, Francisco G-S, Hiram I B, Norma R-F, Jorge A L-R, et al. *Fullerenemalonates inhibit amyloid beta aggregation, in vitro and in silico evaluation.* *RSC Advances.* 2018;8(69):39667-77.
102. Naiki H, Higuchi K, Hosokawa M, Takeda T. *Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T1.* *Analytical biochemistry.* 1989;177(2):244-9.
103. Hudson SA, Ecroyd H, Kee TW, Carver JA. *The thioflavin T fluorescence assay for amyloid fibril detection can be biased by the presence of exogenous compounds.* *The FEBS journal.* 2009;276(20):5960-72.
104. Kovalevich J, Langford D. *Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology.* *Methods in molecular biology (Clifton, NJ).* 2013;1078:9-21.
105. J. Antonio Heredia-Rojas LR-F, Martha Santoyo-Stephano, Esperanza CastañedaGarza, Abraham Rodríguez-De la Fuente. . *LOS CAMPOS ELECTROMAGNÉTICOS: ¿UN PROBLEMA DE SALUD PÚBLICA?* . *Revista salud pública y salud.* 2003;4 No.1:9.
106. Dutta BJ, Bhattacharyya PK. *DFT studies on hydrogen-bonding, Stacking, and X⁺H⁻...π-Bonded systems in presence of external electric field.* *International Journal of Quantum Chemistry.* 2015;115(20):1459-66.
107. Schuderer J, Oesch W, Felber N, Spät D, Kuster N. *In vitro exposure apparatus for ELF magnetic fields.* *Bioelectromagnetics.* 2004;25(8):582-91.
108. Luukkonen J, Liimatainen A, Juutilainen J, Naarala J. *Induction of genomic instability, oxidative processes, and mitochondrial activity by 50Hz magnetic fields in human SH-SY5Y neuroblastoma cells.* *Mutation research.* 2014;760:33-41.
109. Falone S, Mirabilio A, Carbone MC, Zimmiti V, Di Loreto S, Mariggio MA, et al. *Chronic exposure to 50Hz magnetic fields causes a significant weakening of antioxidant defence systems in aged rat brain.* *The international journal of biochemistry & cell biology.* 2008;40(12):2762-70.
110. Fassina L, Saino E, Visai L, Silvani G, Cusella De Angelis MG, Mazzini G, et al. *Electromagnetic enhancement of a culture of human SAOS-2 osteoblasts seeded onto titanium fiber-mesh scaffolds.* *Journal of biomedical materials research Part A.* 2008;87(3):750-9.

111. Vianale G, Reale M, Amerio P, Stefanachi M, Di Luzio S, Muraro R. *Extremely low frequency electromagnetic field enhances human keratinocyte cell growth and decreases proinflammatory chemokine production*. The British journal of dermatology. 2008;158(6):1189-96.
112. Jackson JD. *Classical Electrodynamics* Third ed 1998. 832 p.
113. Pascual-Leone A, Tormos-Muñoz JM. *Estimulación magnética transcraneal: fundamentos y potencial de la modulación de redes neurales específicas*. RevNeurol.46(S01):S3-S10.
114. Roth BJ. *Mechanisms for electrical stimulation of excitable tissue*. Critical reviews in biomedical engineering. 1994;22(3-4):253-305.
115. Nagarajan SS, Durand DM. *Analysis of magnetic stimulation of a concentric axon in a nerve bundle*. IEEE transactions on bio-medical engineering. 1995;42(9):926-33.
116. Nagarajan SS, Durand DM. *A generalized cable equation for magnetic stimulation of axons*. IEEE transactions on bio-medical engineering. 1996;43(3):304-12.
117. Ueno S, Tashiro T, Harada K. *Localized stimulation of neural tissues in the brain by means of a paired configuration of time-varying magnetic fields*. Journal of Applied Physics. 1988;64(10):5862-4.
118. Wahab MA, Podd JV, Rapley BI, Rowland RE. *Elevated sister chromatid exchange frequencies in dividing human peripheral blood lymphocytes exposed to 50 Hz magnetic fields*. Bioelectromagnetics. 2007;28(4):281-8.
119. Marsden JE, Tromba AJ. *Gradientes y derivadas direccionales*. Calculo Vectorial. México 1999. p. 144-51.
120. Burman E, Oksanen L. *Data assimilation for the heat equation using stabilized finite element methods*. Numerische mathematik. 2018;139(3):505-28.
121. Semencescu A, Radu-Ioniță F, Mateș IM, Bădică P, Batalu ND, Negoita OD, et al. *Finite element analysis on a medical implant*. Romanian journal of ophthalmology. 2016;60(2):116-9.
122. Dhital S, Rokaya A, Kaizer MR, Zhang Y, Kim J. *Accurate and Efficient Thermal Stress Analyses of Functionally Graded Solids Using Incompatible Graded Finite Elements*. Composite structures. 2019;222.
123. Mukesh S, Blake DT, McKinnon BJ, Bhatti PT. *Modeling Intracochlear Magnetic Stimulation: A Finite-Element Analysis*. IEEE transactions on neural systems and rehabilitation engineering : a publication of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. 2017;25(8):1353-62.
124. Honig BH, Hubbell WL, Flewelling RF. *Electrostatic interactions in membranes and proteins*. Annu Rev Biophys Biophys Chem. 1986;15:163-93.
125. Cooper MS. *Membrane potential perturbations induced in tissue cells by pulsed electric fields*. Bioelectromagnetics. 1995;16(4):255-62.
126. Calabro E, Magazu S. *Infrared spectroscopic demonstration of magnetic orientation in SH-SY5Y neuronal-like cells induced by static or 50 Hz magnetic fields*. International journal of radiation biology. 2019;95(6):781-7.
127. Kim DH, Rozhkova EA, Ulasov IV, Bader SD, Rajh T, Lesniak MS, et al. *Biofunctionalized magnetic-vortex microdiscs for targeted cancer-cell destruction*. Nature materials. 2010;9(2):165-71.
128. Song K, Im SH, Yoon YJ, Kim HM, Lee HJ, Park GS. *A 60 Hz uniform electromagnetic field promotes human cell proliferation by decreasing intracellular reactive oxygen species levels*. PloS one. 2018;13(7):e0199753.
129. Yin F, Liu J, Ji X, Wang Y, Zidichouski J, Zhang J. *Silibinin: a novel inhibitor of Abeta aggregation*. Neurochemistry international. 2011;58(3):399-403.
130. Olivieri G, Otten U, Meier F, Baysang G, Dimitriadis-Schmutz B, Muller-Spahn F, et al. *Beta-amyloid modulates tyrosine kinase B receptor expression in SHSY5Y neuroblastoma cells: influence of the antioxidant melatonin*. Neuroscience. 2003;120(3):659-65.
131. Morel Y, Barouki R. *Repression of gene expression by oxidative stress*. The Biochemical journal. 1999;342 Pt 3(Pt 3):481-96.

132. Todorova N, Bentvelzen A, English NJ, Yarovsky I. *Electromagnetic-field effects on structure and dynamics of amyloidogenic peptides*. The Journal of chemical physics. 2016;144(8):085101.
133. Honig BH, Hubbell WL, Flewelling RF. *ELECTROSTATIC INTERACTIONS IN MEMBRANES AND PROTEINS*. Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry. 1986;15(1):163-93.
134. Ilieva S, Cheshmedzhieva D, Dudev T. *Electric field influence on the helical structure of peptides: insights from DFT/PCM computations*. Physical chemistry chemical physics : PCCP. 2019;21(29):16198-206.
135. Reitz JR, Milford FJ, Christy RW. *Foundations of Electromagnetic Theory*. 4 ed 2001. 630 p.
136. Pryor NE, Moss MA, Hestekin CN. *Unraveling the early events of amyloid-beta protein (A β) aggregation: techniques for the determination of A β aggregate size*. International journal of molecular sciences. 2012;13(3):3038-72.
137. Cerf E, Sarroukh R, Tamamizu-Kato S, Breydo L, Derclaye S, Dufrene YF, et al. *Antiparallel beta-sheet: a signature structure of the oligomeric amyloid beta-peptide*. The Biochemical journal. 2009;421(3):415-23.
138. Arendash GW, Mori T, Dorsey M, Gonzalez R, Tajiri N, Borlongan C. *Electromagnetic treatment to old Alzheimer's mice reverses beta-amyloid deposition, modifies cerebral blood flow, and provides selected cognitive benefit*. PloS one. 2012;7(4):e35751.
139. Jeong YJ, Kang GY, Kwon JH, Choi HD, Pack JK, Kim N, et al. *1950 MHz Electromagnetic Fields Ameliorate A β Pathology in Alzheimer's Disease Mice*. Current Alzheimer research. 2015;12(5):481-92.
140. Son Y, Jeong YJ, Kwon JH, Choi HD, Pack JK, Kim N, et al. *1950 MHz radiofrequency electromagnetic fields do not aggravate memory deficits in 5xFAD mice*. Bioelectromagnetics. 2016;37(6):391-9.
141. Saikia J, Pandey G, Sasidharan S, Antony F, Nemade HB, Kumar S, et al. *Electric Field Disruption of Amyloid Aggregation: Potential Noninvasive Therapy for Alzheimer's Disease*. ACS Chem Neurosci. 2019;10(5):2250-62.
142. A.Hill RJ, Sedman VL, Allen S, Williams P, Paoli M, Adler-Abramovich L, et al. *Alignment of Aromatic Peptide Tubes in Strong Magnetic Fields*. Advanced Materials. 2007;19(24):4474-9.
143. Darwish SM, Darwish AS, Darwish DS. *An extremely low-frequency magnetic field can affect CREB protein conformation which may have a role in neuronal activities including memory*. Journal of Physics Communications. 2020;4(1):015009.
144. Budi A, Legge FS, Treutlein H, Yarovsky I. *Electric field effects on insulin chain-B conformation*. The journal of physical chemistry B. 2005;109(47):22641-8.
145. Benzi R, Sutera A, Vulpiani A. *The mechanism of stochastic resonance*. Journal of Physics A: Mathematical and General. 1981;14(11):L453.
146. Gluckman BJ, Netoff TI, Neel EJ, Ditto WL, Spano ML, Schiff SJ. *Stochastic Resonance in a Neuronal Network from Mammalian Brain*. Physical Review Letters. 1996;77(19):4098-101.
147. Lopes MA, Goltsev AV, Lee K-E, Mendes JFF. *Stochastic resonance as an emergent property of neural networks*. AIP Conference Proceedings. 2013;1510(1):202-6.
148. Toschi F, Lugli F, Biscarini F, Zerbetto F. *Effects of Electric Field Stress on a β -Amyloid Peptide*. The Journal of Physical Chemistry B. 2009;113(1):369-76.
149. Fregni F, Pascual-Leone A. *Technology insight: noninvasive brain stimulation in neurology-perspectives on the therapeutic potential of rTMS and tDCS*. Nature clinical practice Neurology. 2007;3(7):383-93.
150. Guerra A, Assenza F, Bressi F, Scarscia F, Del Duca M, Ursini F, et al. *Transcranial magnetic stimulation studies in Alzheimer's disease*. International journal of Alzheimer's disease. 2011;2011:263817.
151. Pennisi G, Ferri R, Lanza G, Cantone M, Pennisi M, Puglisi V, et al. *Transcranial magnetic stimulation in Alzheimer's disease: a neurophysiological marker of cortical hyperexcitability*. Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996). 2011;118(4):587-98.

152. Morrissette DA, Parachikova A, Green KN, LaFerla FM. *Relevance of transgenic mouse models to human Alzheimer disease*. The Journal of biological chemistry. 2009;284(10):6033-7.
153. Morris RGM. *Spatial localization does not require the presence of local cues*. Learning and Motivation. 1981;12(2):239-60.
154. Morris R. *Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat*. Journal of neuroscience methods. 1984;11(1):47-60.
155. Whishaw IQ. *A comparison of rats and mice in a swimming pool place task and matching to place task: Some surprising differences*. Physiology & Behavior. 1995;58(4):687-93.
156. Ramos A, Berton O, Mormede P, Chaouloff F. *A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains*. Behavioural brain research. 1997;85(1):57-69.
157. Sopranzi N, De Feo G, Mazzanti G, Braghiroli L. *[The biological and electrophysiological parameters in the rat chronically treated with Lobelia inflata L]*. La Clinica terapeutica. 1991;137(4):265-8.
158. Gimenez-Llort L, Masino SA, Diao L, Fernandez-Teruel A, Tobena A, Halldner L, et al. *Mice lacking the adenosine A1 receptor have normal spatial learning and plasticity in the CA1 region of the hippocampus, but they habituate more slowly*. Synapse (New York, NY). 2005;57(1):8-16.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00123

Matrícula: 2171801275

Inhibición de agregados de beta amiloide mediante vórtices de campos magnéticos en modelos in vitro.

Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 9:00 horas del día 3 del mes de diciembre del año 2021 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado

- DRA. HERLINDA BONILLA JAIME
- DR. TEODORO CORDOVA FRAGA
- DRA. PERLA YOLANDA LOPEZ CAMACHO
- DR. FRANCISCO GARCIA SIERRA
- DR. GUSTAVO BASURTO ISLAS

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:


DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DE: MARTIN ALEJANDRO MALDONADO MORELES

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:


Aprobar

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



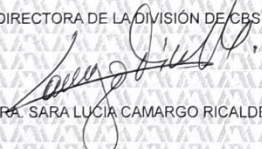
MARTIN ALEJANDRO MALDONADO MORELES
ALUMNO

REVSÓ



MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS




DRA. SARA LUCÍA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA




DRA. HERLINDA BONILLA JAIME

VOCAL



DR. TEODORO CORDOVA FRAGA

VOCAL



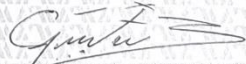
DRA. PERLA YOLANDA LOPEZ CAMACHO

VOCAL



DR. FRANCISCO GARCIA SIERRA

SECRETARIO



DR. GUSTAVO BASURTO ISLAS