



UNIVERSIDAD POPULAR AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE PUEBLA

FACULTAD DE BIOTECNOLOGÍA

“Efecto de TFF1_Spike sobre la proliferación de la línea celular SH-SH5Y: un enfoque de terapia celular para la enfermedad de Parkinson.”

Trabajo de investigación para obtener el Título en
Maestría en Biotecnología

Presenta:

IBT Aguirre Alarcón Héctor Alberto

Director/a:

Dra. Bautista Rodríguez Elizabeth

Codirectores:

Dr. Ortiz Alvarez Jossue Mizael

M.S.P. Rojas Quintana Mayra Esther

Asesores:

Dr. Cortez Sánchez José Luis



Puebla, Pue., México

Otoño 2022



UPAEP – Secretaría General

Dirección General de Apoyos Académicos

Dirección del Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación.

Biblioteca Central - **Karol Wojtyła**

Tesis Digitales Restricciones de uso:

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de textos, imágenes, gráficas, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente de donde la obtuvo mencionando el autor o autores involucrados en el documento.

Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Agradecimientos

Mi profundo agradecimiento a todas las autoridades y personal que forman parte del Posgrado en Biotecnología en la Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla por confiar en mí, abrirme las puertas y permitirme realizar todo el proceso de investigación dentro de su centro educativo.

Especial agradecimiento al CONACYT por el apoyo económico otorgado para la realización de la Maestría en Biotecnología como parte del programa PNCP, así como los fondos otorgados para la realización de los experimentos.

Agradezco la dirección, el conocimiento, enseñanza, oportunidades y colaboración que permitió el desarrollo de este trabajo por la Dra. Bautista Rodríguez Elizabeth, Dr. Ortiz Álvarez Jossue Mizael, Dr. Cortez Sánchez José Luis y la Dra. Rojas Quintana Mayra Esther.

A mi familia, por haberme dado la oportunidad de formarme en esta prestigiosa universidad y haber sido mi apoyo durante todo este tiempo.

De manera especial a mi tutora de tesis, por haberme guiado, no solo en la elaboración de este trabajo de titulación, sino a lo largo de mi Maestría por haberme brindado el apoyo para desarrollarme profesionalmente y seguir cultivando mis valores.

ÍNDICE

Capítulo I	6
Antecedentes	6
Planteamiento del problema	8
Preguntas de investigación	9
Justificación	9
Alcances y limitaciones	10
Capítulo 2 Marco teórico.....	11
2.1.- Enfermedad de Parkinson	11
2.1.1.- Etiología	12
2.1.2.- <i>Substantia nigra pars compacta</i>	13
2.1.3.- Neuronas dopaminérgicas y asociación a Parkinson	14
2.2.- Tratamientos.....	14
2.2.1.- Fármacos.....	15
2.2.2.- Terapia génica (neuroprotectora)	16
2.2.3.- Terapia celular.....	16
2.3.- Proteína TFF1	17
2.3.2.- Efecto de TFF1 sobre el Sistema Nervioso Central	19
2.4.- SARS-CoV-2 y la capacidad de infección a células neurales	19
2.4.1.- Proteína <i>Spike</i>	20
2.4.2.- Expresión de ACE2 en iPSCs y neuronas dopaminérgicas	21
Capítulo 3 Objetivos.....	22
Objetivo general	22
Objetivos específicos.....	22
Capítulo 4 Materiales y métodos.....	23
Cepas bacterianas y manipulación de DNA.....	23
Expresión de las proteínas recombinantes en línea celular C6	23
Ensayos de viabilidad celular	24
Tinción de cristal violeta.	25
Análisis estadístico	26
<i>Molecular docking</i> de TFF1_ <i>Spike</i>	26
Capítulo 4 Resultados	27

4.1.- Purificación del plásmido pTFF1_His8x y el plásmido pcDNA3_SARS-CoV-2_S_RBD_His8x de bacterias DH5α transformadas.	27
4.2.- Caracterización de la proteína recombinante TFF1	29
4.3.- Efecto de la transfección de la línea celular SH-SH5Y con los plásmidos pcDNA3_SARS-CoV-2_S_RBD_His8x y pTFF1_His8x por tinción de cristal violeta.....	30
4.4.- Efecto de la Transfección de la línea celular SH-SH5Y con los plásmidos pcDNA3_SARS-CoV-2_S_RBD_His8x y pTFF1_His8x en la proliferación celular por la técnica MTT	32
4.5.- <i>Molecular Docking</i> de la proteína TFF1_Spike, así como posibles interacciones obtenidas por bioinformática.	35
Capítulo 5 Discusión de resultados.....	39
5.1.- Caracterización de la proteína TFF1 en la línea celular C6.....	39
5.3.- Efecto de TFF1 en la proliferación celular de la línea celular SH-SH5Y.....	39
5.2.- La expresión de TFF1 reduce el daño por 6-OHDA en la línea celular SH-SH5Y.	41
5.4.- Inducción de apoptosis e inflamación por la proteína <i>Spike</i>	42
5.5.- Análisis de la estabilidad de la proteína fusión TFF1_Spike	42
Capítulo 6 Conclusiones	45
Perspectivas	46
Anexos	47
1.- Cotejo de distinciones y méritos académicos.	47
2.- Constancias.....	49
II.- Artículos	53
Glosario	56
Bibliografía.....	59

Capítulo I

Antecedentes

La enfermedad de Parkinson (PD) es una enfermedad neurodegenerativa causada por la muerte de las neuronas dopaminérgicas (DA) de la *substantia nigra* y ha sido tratada por medio de terapias enfocadas en la administración de neuroprotectores basadas principalmente en el uso de terapia génica (Axelsen & Woldbye, 2018). En la terapia neuroprotectora se administran o expresan proteínas que retrasen la degeneración y la muerte de las células dopaminérgicas ejemplo de estas son las neurotrofinas como el factor neurotrófico derivado de la glia (GDNF), NRTN y Nurr (Axelsen & Woldbye, 2018; Björklund et al., 2009).

El principal inconveniente es que logren atravesar la barrera hematoencefálica en este aspecto se sigue investigando sobre el uso de otras formas de envío de genes o proteínas hacia las DA por ejemplo proteínas acarreadoras (Gessler & Gao, 2016).

Una de las terapias neuroprotectoras con potencial es Factor de Trefoil 1 (TFF1) el cuál es un péptido separable de 85 aminoácidos con 6 residuos de cisteína y con capacidad antioxidante, se expresa principalmente en el tracto gastrointestinal donde inhibe la apoptosis de células gastrointestinales (Soutto et al., 2015). Ha sido reportada también la expresión de TFF1 durante el desarrollo de DA específicamente en posnatal 7 y posnatal 14 (Pia Jensen et al., 2013). Otro dato importante es que Forskolina y GDNF inducen la expresión de TFF1 en células dopaminérgicas, por lo tanto, podría tener efectos neuroprotectores y sobre el proceso de diferenciación a DA, por lo cual podría ser un candidato para terapia celular (Beitz, 2014; Björklund & Lindvall, 2017).

En la terapia celular se busca estimular la proliferación y diferenciación de los progenitores neuronales a DA maduras, en la cual no se ha dilucidado el efecto de TFF1 para diferenciarlas (Yasuhara et al., 2017).

Las estrategias utilizadas en terapia celular son:

- La transferencia *in vivo* en la que se obtienen células del mismo paciente, ejemplo fibroblastos, para reprogramarlos en células pluripotentes inducidas y diferenciarlas en DA, pero el componente genético de las células del individuo que incluye las mutaciones puede ser que produzca de nuevo la neurodegeneración una vez ya trasplantadas (Doi et al., 2020).
- La segunda opción es la transferencia *ex vivo* con células madre cultivadas, diferenciarlas en DA y finalmente trasplantarlas al paciente, proceso conocido como transferencia *ex vivo*, por lo cual esta es la terapia celular más utilizada y propuesta (Politis & Lindvall, 2012; Rivetti di Val Cervo et al., 2017).

El trasplante celular de diversas fuentes (embrionarias o adultas) ha sido propuesto como terapia para los daños producidos en el sistema nervioso central (SNC), con resultados prometedores en ensayos preclínicos y clínicos, pero se busca aumentar la proliferación en cultivo celular, promover su diferenciación y mantener su viabilidad.

Planteamiento del problema

La enfermedad de Parkinson es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada principalmente por síntomas motores, signos de demencia, trastornos del sueño y disfunción autonómica (Beitz, 2014). La edad promedio de la aparición del Parkinson es aproximadamente a los 57 años, sin embargo, conforme aumenta la edad, aumenta la probabilidad de presentarlo, incluso se ha reportado un aumento de hasta 10% después de los 80 años (Politis & Lindvall, 2012).

La etiología no es del todo conocida, pero involucra factores genéticos y ambientales que conducen a la muerte de DA de la *substantia nigra pars compacta*, por lo que se produce una disminución de los niveles de dopamina en el cuerpo estriado resultando en un déficit de control motor (Samii et al., 2004). En los factores ambientales se ve afectada la termorregulación de las neuronas por el aumento de temperatura contribuyendo a los procesos de excitotoxicidad, estrés oxidativo y neuroinflamación (Bongioanni et al., 2021). Adicionalmente a la temperatura, la etiología del Parkinson se asocia a contaminantes representados por NO₂ presentes en el aire con un porcentaje de relación de un 9% de riesgo debido a estos contaminantes, generando cuerpos de Lewis y aumento de las especies reactivas de nitrógeno (Ritz et al., 2016).

Los tratamientos farmacológicos actuales, como los agonistas del receptor de dopamina y la Levodopa, así como la estimulación cerebral profunda, reducen los síntomas de forma transitoria pero no producen una reversión de la neurodegeneración, incluso el uso crónico de Levodopa agrava el proceso neurodegenerativo (Tarakad & Jankovic, 2017). En consecuencia, se ha propuesto el trasplante de células madre neurales (NSC), ya que tienen la capacidad de autorrenovarse y diferenciarse en DA, de este modo se busca reemplazar las DA perdidas y revertir el proceso neurodegenerativo (Björklund & Lindvall, 2017; Gonzalez et al., 2013; Wu et al., 2019).

El inconveniente que se afronta en la manipulación de las NSC es que los métodos que permiten incorporar ácidos nucleicos o genes a células progenitoras neurales tienen baja eficiencia (Yang et al., 2003).

Preguntas de investigación

Las preguntas de investigación establecidas son las siguientes:

- ¿TFF1 al estar en mayor expresión en la célula induce proliferación de la línea celular SH-SH5Y?
- ¿La proteína fusión TFF1_*Spike* tendrá mayor efecto en la proliferación de la línea celular SH-SH5Y que la proteína TFF1 sola?

Justificación

Un potencial candidato para ser usado como tratamiento en lugar de la terapia celular o para su complementación es TFF1, ya que desencadena una neuroprotección (Pia Jensen et al., 2013). Por otro lado, se ha reportado que la expresión de ACE2 en NSC permite las células puedan ser infectadas por SARS-CoV-2, debido a que ACE2 interactúa con la proteína *Spike* de este virus para mediar su entrada a la célula (H. Zhang et al., 2020). Diversos autores mencionan que ACE2 se expresa abundantemente en la *substantia nigra pars compacta* de individuos con enfermedad de Parkinson (Baig et al., 2020; Radzikowska et al., 2020).

El propósito de la investigación es mejorar la eficacia en la manipulación de los cultivos celulares de progenitoras neurales mediante el uso de proteínas fusión como *Spike* y TFF1 (Dai et al., 2016). La intención es imitar el mecanismo de entrada del virus a la célula hospedero, de esta forma TFF1 podría ejercer un efecto neuroprotector dentro de la célula y desencadenar la diferenciación de la célula a DA. Para realizar lo anterior se propone como modelo de estudio a la línea celular SH-SH5Y, con lo cual resultados satisfactorios de aumento de la proliferación

celular ante 6-OHDA por la expresión de TFF1 demostraría su efecto como un neuroprotector con el objetivo de migrar los experimentos en líneas posteriores a la línea celular ReNCell.

Por lo tanto, se busca determinar el efecto de la proteína TFF1, así como de la proteína fusión TFF1_*Spike* en la línea celular SH-SH5Y por ensayos de viabilidad celular MTT y cristal violeta para evaluar la respuesta de la proliferación celular.

Alcances y limitaciones

Dentro de los alcances se establece el posible rol de TFF1 con los resultados obtenidos, dilucidando su papel y estableciendo la parte básica para fundamentar el mecanismo molecular por el cual actúa. Un segundo alcance es que se abre un mayor campo en el uso de proteínas quiméricas o de fusión mejorando los sistemas de entrega de fármacos en las células.

Capítulo 2 Marco teórico

2.1.- Enfermedad de Parkinson

Una de las enfermedades neurodegenerativas complejas es la enfermedad de Parkinson (PD) la cual es progresiva y causa síntomas asociados a principalmente alteraciones del movimiento, tornándose lento, temblor de extremidades, pérdida de equilibrio y rigidez (Antony et al., 2013). En etapas avanzadas de PD ocurren alteraciones cognitivas, del sueño y de la memoria, con lo cual la enfermedad no tiene sólo síntomas físicos.

La PD es más frecuente en la población masculina, la incidencia que se ha reportado es de 200 casos por cada 100000 habitantes y 15 casos por cada 100000 habitantes con respecto a la incidencia anual (Tysnes & Storstein, 2017).

Durante las manifestaciones clínicas de la PD, ocurre una disminución de la densidad de la *substantia nigra pars compacta* (SNpc) con respecto a pacientes sanos, esta despigmentación se ha relacionado con la pérdida de las DA (Balestrino & Schapira, 2020).

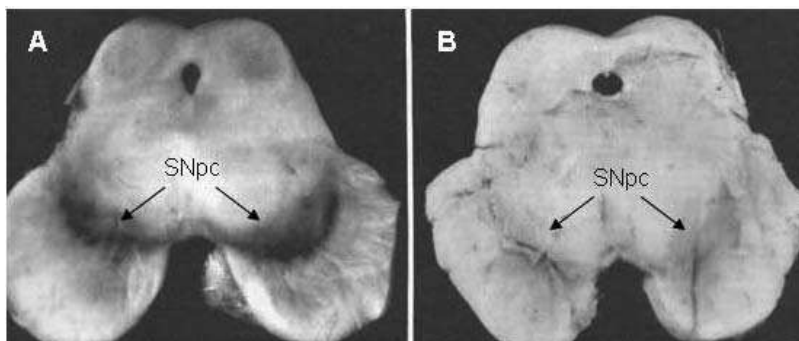


Imagen 2.1.- Corte post-mortem del mesencéfalo de un paciente sano y de un paciente enfermo de PD.

A) Se observa una mayor densidad de SNpc por la gran población de DA y concentración de

neuromelanina en paciente sano. B) Se observa una disminución de la densidad de SNpc por la pérdida de las DA y por lo tanto disminución de la neuromelanina (Imagen tomada de Lima et al., 2012).

2.1.1.- Etiología

La etiología de la PD es desconocida, pero se asocia principalmente a la inducción de apoptosis de las DA de la SNpc por procesos de estrés oxidativo (ROS/RNS), acumulación de hierro, activación de la microglía, entre otros que son el resultado de combinación de ciertos factores (Capriotti & Terzakis, 2016).

El riesgo de padecer PD aumenta con la presencia de algunos factores genéticos relacionados con mutaciones, y factores ambientales asociados al cambio climático, así como la exposición a compuestos tóxicos, que contribuye al aumento del riesgo de padecer la enfermedad (Simon et al., 2020).

Dentro del factor genético se ha reportado que menos del 10% de los casos de PD es causado por mutaciones de genes asociados a esta enfermedad, ejemplos son α -sinucleína, *LRRK2*, *PARK2*, *PINK1*, *PARK7*, *ATP13A2* (Antony et al., 2013). Las mutaciones mencionadas anteriormente se presentan de forma Mendeliana, pueden ser dominantes (*LRRK2*) o recesivas (*PARK2*).

Se ha reportado que la exposición a largo plazo de compuestos tóxicos afecta principalmente la actividad mitocondrial, en específico alterando la cadena transportadora de electrones, lo cual puede ocasionar PD, aunque falta mayor información sobre cómo los compuestos tóxicos inducen PD (Antony et al., 2013). Algunos ejemplos de compuestos tóxicos vinculados al aumento de riesgo de PD son los

pesticidas, solventes clorados y Partículas suspendidas totales en el ambiente (TSP) causadas por el tráfico (Goldman et al., 2012; Simon et al., 2020).

2.1.2.- *Substantia nigra pars compacta*

La SNpc es una región que contiene poblaciones de DA, las cuales al generar dopamina puede autooxidarse y generar un producto denominado neuromelanina que confiere el aspecto distinguible de la región (Smith & Masilamoni, 2010). La concentración de la neuromelanina es dependiente de la edad, alcanzando un punto máximo a una edad promedio de 60 años a la cual le sigue una disminución en la concentración. Una parte controversial es que la acumulación de la neuromelanina, a pesar de que este producto aumente conforme a la edad, contribuye a la pérdida de DA en SNpc (Vila 2019). Adicionalmente se puede encontrar una población pequeña pero significativa de interneuronas GABAérgicas.

Las vías nigrostriatal y mesostriatal del mesencéfalo están conformadas por las regiones SNpc y *ventral tegmental* (VTA), a pesar de ser regiones vecinas se ha reportado que las DA de VTA tienen una mayor supervivencia y por lo tanto no se ve afectada dicha región, al contrario de la SNpc (Masi et al., 2015).

La razón de que se vea más afectada la SNpc es por la actividad de los cuerpos de Lewys que ejercen un efecto patogénico por la electrofisiología de la región afectando a su vez las actividades post-sinápticas de las DA de la SNpc, puesto que en otros aspectos comparten características bioquímicas, biofísicas, metabólicas y moleculares (Urban et al., 2020).

2.1.3.- Neuronas dopaminérgicas y asociación a Parkinson

Las DA de SNpc, se pueden clasificar de acuerdo con los grupos dorsal α , dorsocelular β y el ventral γ . Los grupos anteriormente mencionados conforman un complejo de neuronas ventrales de las cuales las dendritas son las encargadas de liberar la dopamina para suministrar la SNpc (Smith & Masilamoni, 2010). En el caso de las DA de la región VTA pueden coexpresar neuropéptidos como neurotensina y colecistoquinina (Perez-Bonilla et al., 2020).

Los cuerpos de Lewis son las proteínas se han estudiado ampliamente en el desarrollo de PD, las cuáles se depositan en las DA de las personas que padecen la enfermedad, encontrándose tanto en neuritas, así como en otras células neuronales en otros procesos neurodegenerativo (Khan et al., 2018). Los cuerpos de Lewis están conformados por α -sinucleína, la cual al presentar mutaciones puede aumentar el riesgo de que se acumule en las DA afectando la función de la mitocondria, retículo endoplasmático y autofagia, por lo cual se puede inducir la PD (Gonzalez-Rodriguez et al., 2020).

2.2.- Tratamientos

La PD es un desafío con respecto al tratamiento, debido al error en el diagnóstico de la enfermedad o por sintomatología similar causada por algunos fármacos, por lo cual, según las estadísticas 10 a 20% de las personas sufren de PD (Jagadeesan et al., 2017). Algunos tratamientos van desde tratar sólo los síntomas, hasta aquellos que buscan ejercer una neuroregeneración, por lo que los enfoques utilizados para tratar la enfermedad deben ser personalizados (Armstrong & Okun, 2020).

La farmacoterapia es un abordaje que funciona en tiempos cortos de tratamiento, debido a que su efecto a largo plazo puede causar mayores fluctuaciones en los movimientos, por lo que no hay un tratamiento permanente contra PD y la única forma para disminuir los síntomas son la medicación y la cirugía, pero la respuesta a la enfermedad mejora cuando se trata en etapas tempranas (Zesiewicz et al., 2020).

2.2.1.- Fármacos

Dentro de los fármacos utilizados para el tratamiento de PD, el abordaje inicial fue con el uso de Levodopa, ya que permite que el paciente produzca su propia dopamina, aunque a largo plazo tiene efectos negativos resultando en movimientos descontrolados por PD (Olanow et al., 2009). Los fármacos utilizados para PD se pueden dividir en las siguientes categorías:

- Control y disminución de los síntomas de PD.
- Incremento directo o indirecto de los niveles de dopamina.
- Tratamiento de los síntomas no motores de PD.

Los agentes anticolinérgicos son un ejemplo de fármaco utilizado para disminuir el síntoma de la rigidez, ya que actúa interfiriendo en la producción de acetilcolina (Uitti, 2012). La Levodopa actúa cruzando la barrera hematoencefálica para inducir la secreción de dopamina por lo cual es un ejemplo de fármaco utilizado para aumentar directamente la producción de dopamina (Paoletti et al., 2020). Incluso hay fármacos administrados que no se tiene un conocimiento de su mecanismo molecular como la amantadina, pero ayudan a aliviar los síntomas y se puede recetar junto con Levodopa (Tönges et al., 2018).

2.2.2.- Terapia génica (neuroprotectora)

Un tipo de tratamiento diferente para PD es la terapia génica, la cual puede ser por vectores virales o sistemas no virales, los primeros introducen material genético a las células blanco y el segundo tipo lo hace mediante métodos químicos físicos o químicos, un ejemplo es mediante liposomas (Hitti et al., 2019; Singh et al., 2007). Adicionalmente a este tipo de terapia se le denomina neuroprotectora cuando tiene como objetivo aumentar la supervivencia de las DA.

Un ejemplo de terapia neuroprotectora es el uso de neurterina (NRTN) que busca proteger las DA del mesencéfalo activando la vía de Nurr-1 pero en las fases clínica el efecto se observa a largo plazo y sólo en una pequeña diferencia a causa de que las células tienen un poco eficiencia de transfección (Singh et al., 2007; Sudhakar & Richardson, 2018).

Incluso la terapia génica se puede combinar con la terapia celular, buscando mejorar la diferenciación de progenitores neurales a DA, así como incrementar la funcionalidad de éstas neuronas. Un modo de hacerlo es por ejemplo con el uso del factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) que induce el brote de neuritas y reduce el comportamiento parkinsoniano (Axelsen & Woldbye, 2018; Hitti et al., 2019).

2.2.3.- Terapia celular

La terapia celular se centra en modificar genéticamente las células progenitoras para producir dopamina o incluso generar células como las DA para tratar PD. El reemplazar las DA dañadas por aquellas DA funcionales, promete ser una forma de mejor abordaje para la enfermedad debido a que puede alcanzar una completa restauración de la

capacidad funcional (Singh et al., 2007). La forma de tratamiento para reemplazamiento de DA funcionales puede ser:

- *in vivo*: Consiste en la reprogramación de células pluripotentes inducidas obtenidas del paciente con el objetivo de diferenciarlas en DA.
- *ex vivo*: La estrategia está basada en cultivo de células madre diferenciadas a DA para ser trasplantadas.

En la terapia celular se trabaja con células madre embrionarias (ESCs) y las células madre-pluripotentes inducidas (IPSCs) con enfoques de trasplante alogénico (飛鳥, 2019). Las células más prometedoras son las IPSCs por sus aplicaciones biotecnológicas, pero se busca aumentar experimentalmente la eficiencia de manipulación génica de dichas células (Yasuhara et al., 2017).

2.3.- Proteína TFF1

Trefoil Factor 1 (TFF1) es una proteína perteneciente a la familia de factores trefoil de las cuáles se continúa investigando sus funciones en diferentes tipos de células (Yamaguchi et al., 2018). TFF1 se considera una proteína pequeña de 84 aminoácidos, principalmente se le ha asociado a ejercer un efecto de protección gastrointestinal, por otro lado, en caso de una sobre expresión en el seno puede aumentar el riesgo de cáncer de mama, ya que se ha observa su alta expresión en esta patología (Soutto et al., 2014). Lo anterior dificulta un poco establecer un papel de TFF1, ya que puede funcionar como proteína supresora de tumores o como una oncoproteína dependiendo de la población celular, además de que los mecanismos por los cuales tiene estos efectos siguen sin ser elucidados.

Tabla 2.1.- Metaanálisis del efecto de TFF1 en diferentes tipos de enfermedades y modelos de estudio. En la tabla se está remarcando que en modelos de líneas celulares gástricas TFF1 tiene un efecto apoptótico, el cual, en líneas celulares neurales, el efecto es inverso inhibiendo la apoptosis.

ENFERMEDAD	MODELO DE ESTUDIO	NIVEL DE EXPRESIÓN DE TFF1	TÉCNICA UTILIZADA	EFFECTO DE EXPRESIÓN DE TFF1	REFERENCIAS
Enfermedad de Parkinson	Ratas Wistar	Alta expresión en <i>substantia nigra</i>	Inmunohistoquímica Inmunofluorescencia Análisis semi-cuantitativo	Diferenciación de IPSCs a DA	(Pia Jensen et al., 2013)
Neurodegeneración	Ratas 129S2/SvHsd C57BL/6J0laHsd	Alta expresión	qRT-PCR	Reduce proliferación celular y la apoptosis.	(Hinz et al., 2004)
Neurodegeneración	Fetos de ratas Wistar	Alta expresión	Inmunohistoquímica	Supervivencia de neuronas DA	(Jensen et al., 2015a)
Cáncer gástrico	Línea celular AGS humana	Alta expresión	Western Blot	Inducción de apoptosis por TP53	(Soutto et al., 2014)
Cáncer gastrointestinal	Línea celular AGS	Alta expresión	Western Blot	Promueve cambios tipo Transición Epitelio-Mesénquima (EMT).	(Romano et al., 2018)
Cáncer de mama	MCF-7 MDA-MB-231	Alta expresión	Western Blot	Estimulación de la migración	(Prest et al., 2002a)

El efecto de TFF1 es variable de acuerdo con el tipo celular, por ejemplo, en células gástricas el efecto de TFF1 es apoptótico en células cancerígenas, es decir funciona como proteína supresora de tumores, en cambio en células neurales aumenta la supervivencia de las células, esto también ocurre en células de cáncer de seno, por lo

cual tiene un efecto de oncoproteína (Hinz et al., 2004; Prest et al., 2002b; Romano et al., 2018; Soutto et al., 2014).

2.3.2.- Efecto de TFF1 sobre el Sistema Nervioso Central

En el Sistema Nervioso Central (SNC) se ha reportado que TFF1 funciona como un neuropéptido, un ejemplo es que genera un efecto positivo en la diferenciación de células progenitoras neurales a DA (Jensen et al., 2015). Las células que expresan una mayor cantidad de TFF1 son los astrocitos, de hecho, se plantea que son las encargadas de sintetizarlos para las progenitoras neurales y desencadenar la diferenciación (Pia Jensen et al., 2013).

En cerebros de ratas adultas la expresión de TFF1 se vuelve uniforme, pero se ha reportado una mayor expresión cuando en los embriones se empieza a desarrollar el SNC, y se regula conforme avanza el proceso, estabilizándose su expresión en la etapa adulta, la concentración máxima del mRNA de TFF1 en el hipocampo se alcanza después de nacer (Belovari et al., 2015). En los experimentos reportados se ha evaluado e investigado el efecto de TFF1, pero falta entender el papel que desempeña y las vías en las que participa (Hoffmann & Jagla, 2002; Pia Jensen et al., 2013).

2.4.- SARS-CoV-2 y la capacidad de infección a células neurales

El coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2) es un virus de RNA monocatenario de sentido positivo, perteneciente a la familia de los Coronavirus y causante de la enfermedad COVID-19 (Ludwig & Zarbock, 2020). COVID-19 es una

enfermedad de alta importancia debido a los estragos ocasionados en los años 2020 a 2021, puesto que escalo a pandemia.

COVID-19 es una enfermedad caracterizada por síntomas respiratorios como dificultad para respirar, pero también síntomas asociados al SNC, destacando dolor de cabeza, anosmia, confusión, encefalopatías y ageusia (B.-Z. Zhang et al., 2020). Debido a lo anterior, se realizó investigación sobre la capacidad de infección a células del SNC centrada en la interacción de la proteína *Spike* (S) y la enzima convertidora de angiotensina 2, ya que es la proteína de unión que permite la entrada al virus (H. Zhang et al., 2020).

No sólo las células de sistema respiratorio expresan ACE2, también lo hacen las células del SNC como organoides cerebrales, incluso las DA (Baig et al., 2020). La diferencia radica en el efecto que tiene en cada grupo celular siendo por ejemplos las IPSC permisivas a la entrada del virus SARS-CoV-2 (B.-Z. Zhang et al., 2020)

2.4.1.- Proteína *Spike*

La proteína S es una glicoproteína debido a que presenta 22 sitios de glicosilación asociados al fragmento N-terminal y mide alrededor de 1273 aminoácidos (J. Zhang et al., 2021). Es considerada una proteína fusión de clase I y está conformada por dos subunidades S1 la cual se encarga de hacer eficiente la unión al receptor ACE2 y S2 facilitar la unión de la membrana viral con la de la célula hospedero (Satarker & Nampoothiri, 2020). Adicionalmente, la proteína S funciona como parte estructural de la envoltura de SARS-CoV-2

La proteína S es exitosa debido a la capacidad que tiene para unirse a ACE2 y posteriormente reclutar una proteína de corte TMPRSS2 para entrar vía endocitosis a la célula pasando por varios cambios conformacionales que facilitan la unión de la membrana viral y la membrana de la célula hospedero (Bosch et al., 2003) Además contiene diferentes dominios como el dominio de unión al receptor (RBD), dominio de unión a motivos (RBM), repetición háptica 1 y 2, dominio transmembranal y citoplasmático (Satarker & Nampoothiri, 2020).

2.4.2.- Expresión de ACE2 en iPSCs y neuronas dopaminérgicas

SARS-CoV-2 tiene la capacidad de infectar diferentes órganos a causa del tropismo que tiene, pero se está investigando su neurotropismo por la expresión de ACE2 en células del SNC (B.-Z. Zhang et al., 2020). En modelos experimentales se ha reportado que el virus tiene la capacidad de infectar cultivos monocapa de neuronas y astrocitos (J. Zhang et al., 2021).

Las iPSCs son utilizadas para el tratamiento de PD expresan ACE2, por lo tanto, también son permisivas a la entrada de SARS-CoV-2 (Ohnuki & Takahashi, 2015). Por su parte las DA son afectadas por SARS-CoV-2 al grado de entrar en un grado de senescencia por la infección, aunque las vías y modelos faltan por ser elucidados (Han et al., 2021). Un último estudio ha reportado que la infección por SARS-CoV-2 establece el efecto de senescencia e inducir PD mediante el papel de Receptor *Toll-Like 4* (TLR) los cuales regulan la actividad inmune innata y la respuesta inflamatoria mediante la síntesis de citocinas (Conte, 2021).

Capítulo 3 Objetivos

Objetivo general

Determinar el efecto de TFF1 sobre la proliferación de la línea celular SH-SH5Y por las técnicas de tinción de cristal violeta y MTT para analizar su efecto neuroprotector para mejorar la eficacia de manipulación génica en tratamientos *ex vivo* de la enfermedad de Parkinson.

Objetivos específicos

- Caracterizar los vectores de expresión pCMV3_TFF1_His8x y pcDNA3_SARS-CoV-2_S_RBD_His8x.
- Evaluar el efecto de las proteínas recombinantes TFF1 y *Spike* sobre la viabilidad celular (MTT).
- Determinar por análisis bioinformáticos posibles blancos de la proteína TFF1.
- Modelar molecularmente a la proteína fusión TFF1_*Spike* y realizar el docking molecular correspondiente.

Capítulo 4 Materiales y métodos

Cepas bacterianas y manipulación de DNA

Las bacterias competentes usadas fueron de la cepa DH5 α de *E. coli* cultivadas en medio Luria-Bertani (LB) a 37°C. El crecimiento bacteriano fue detectado por espectrofotometría a una densidad óptica de 600 (OD₆₀₀). Las bacterias competentes se transformaron con los plásmidos de pCMV3_TFF1_His8x (Sino Biological Inc., Chesterbrook, Pensilvania), pcDNA3_SARS-CoV-2_S_RBD_His8x (Addgene, Watertown, Massachusetts), se utilizaron 50 μ g/ml de kanamicina para el primer plásmido y 100 μ g/ml de ampicilina para el segundo plásmido (Aune & Aachmann, 2009). Posteriormente se realizó el aislamiento de las colonias de bacterias transformadas en placas de agar LB con los antibióticos de selección de cada plásmido. Los plásmidos recombinantes se extrajeron por ZR-Plasmid Miniprep-Classic (400 RX ZYMO RESEARCH, USA, Luisiana) y se incubaron con las enzimas de restricción BamHI, SpeI, EcoRV e HindI para la obtención de un perfil de restricción en un gel de agarosa al 0.8%.

Expresión de las proteínas recombinantes en línea celular C6

La línea celular C6 fue cultivada en medio DMEM-F12 (Gibco Invitrogen Corp, Gran Island, Nueva York) suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB) al 10%, antibiótico antimicótico 1X (Thermo Scientific, San José, California) y L-glutamina 1x (Thermo Scientific, San José, California) en placas 100x21 mm de cultivo celular (Gibco Invitrogen Corp, Gran Island, Nueva York), se consideró el crecimiento de una placa por cada grupo establecido a transfectar con los plásmidos con lipofectamina 3000 (Thermo Scientific, San José, California), los cuáles fueron: control; sólo lipofectamina; lipofectamina y pCMV3_TFF1_His8x (Sino Biological Inc., Chesterbrook, Pensilvania); lipofectamina y

pcDNA3_SARS-CoV-2_S_RBD_His8x (Addgene, Watertown, Massachusetts); lipofectamina. La transfección fue realizada de acuerdo con el protocolo marcado por el proveedor utilizando 10 ng del plásmido respectivo por placa, 20 μ l del reactivo p3000™ y 10 μ l del reactivo de la lipofectamina 3000™ el medio de mantenimiento durante la transfección será Opti-MEM (Gibco Invitrogen Corp, Gran Island, Nueva York) y cambiado a las 5 horas por medio DMEM-F12 de mantenimiento por 72 horas, los medios durante este proceso no se desecharon, se almacenaron debido a que pueden tener cierta concentración de las proteínas recombinantes. Las células cultivadas posteriores a las 72 horas se recolectaron utilizando Buffer de lisis de células animales (Bio Basic Inc., Markham, Canadá) con 1 ml del buffer para cada placa siguiendo el protocolo de preparación de la extracción (Shen et al., 2008). Una vez recolectados los medios de transfección y de mantenimiento, así como las células, se corrió un SDS-PAGE con un *stacking gel* del 5% y un gel de separación al 15% para visualizar las bandas de las proteínas recombinantes esperadas con tinción de azul de Coomassie, seguida de desteñimiento por ácido acético al 10% para su caracterización.

Ensayos de viabilidad celular

El ensayo utiliza el reactivo *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetra-zolium bromide* (MTT), el cual está basado en la determinación de la actividad redox celular por la transformación de MTT a su forma soluble formazán lo cual puede reflejar el número de células viables (Y. Li et al., 2021). Las células se cultivaron en placas de 24 pozos sembrando 10000 células por pozo durante 2 días hasta alcanzar una confluencia mayor al 80%, contemplando los grupos de transfección por lipofectamina 3000 (Thermo Scientific, San Jose, California) de manera transitoria de los plásmidos

pCMV3_TFF1_His8x (Sino Biological Inc., Chesterbrook, Pensilvania), pcDNA3_SARS-CoV-2_S_RBD_His8x (Addgene, Watertown, Massachusetts). La transfección fue realizada utilizando 2 µg de plásmido por pozo, 2 µl del reactivo p3000™ y 7.5 µl del reactivo de la lipofectamina 3000™ siguiendo el protocolo marcado por el proveedor, utilizando medio Opti-MEM (Gibco Invitrogen Corp, Gran Island, Nueva York). Se cultivó por 3 días con medio de mantenimiento y se añadió al medio MTT. Las células se incubarán con 125 µg/ml (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) por 2 horas a 37°C. El medio fue desechado y el formazan producto de la actividad celular, se disolvió en dimetil sulfóxido (DMSO) y fue cuantificado por espectrofotometría a 570 nm.

Tinción de cristal violeta.

La tinción de cristal violeta es útil realizar ensayos de viabilidad celular debido a la unión del violeta de metilo con el ADN (Feoktistova et al., 2016). Las células se cultivaron en placas de 96 pozos sembrando 1000 células por pozo durante 2 días hasta alcanzar una confluencia mayor al 80%, contemplando los grupos de transfección por lipofectamina 3000 (Thermo Scientific, San Jose, California) de manera transitoria de los plásmidos pCMV3_TFF1_His8x (Sino Biological Inc., Chesterbrook, Pensilvania), pcDNA3_SARS-CoV-2_S_RBD_His8x (Addgene, Watertown, Massachusetts). La transfección fue realizada utilizando 100 ng de plásmido por pozo, 0.2 µl del reactivo p3000™ y 0.75 µl del reactivo de la lipofectamina 3000™ siguiendo el protocolo marcado por el proveedor, utilizando medio Opti-MEM (Gibco Invitrogen Corp, Gran Island, Nueva York). Se cultivaron por 3 días con medio de mantenimiento y se realizó la tinción por cristal violeta. Las células se fijaron con paraformaldehído al 10% incubando de 10-20 minutos, se lavaron con agua corriente en el grifo evitando que el agua cayera directamente en las

células, se eliminó el agua. Se añadieron 50 ul de cristal violeta al 0.5% y se incubaron 2 minutos, se realizaron 3 lavados con agua como en el procedimiento anterior. Se dejó secar y se realizaron toma de fotografías en microscopio invertido a un objetivo de 40x.

Análisis estadístico

Se utilizó el software GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, Inc., San Diego, California) para todos los análisis estadísticos y diseño de gráficas. Los datos de variables de un grupo fueron analizados siguiendo un ANOVA de una vía utilizando comparaciones múltiples de Tukey y para aquellos con variables de dos grupos se utilizará comparaciones múltiples de Bonferroni. El factor de varianza en el ANOVA de una vía fue realizado por la comparación de grupos y para aquellos de dos vías se realizó con las concentraciones y la comparación de los grupos. El nivel de significancia utilizado se dejó en $p < 0.001$.

Molecular docking de TFF1_Spike

Se realizó la selección de las secuencias de las proteínas TFF1 con 83 aminoácidos y parte parcial de *Spike* que comprende al dominio RBD de 212 aminoácidos para la fusión y modelamiento se utilizó Modeller (Ben Webb, USA, California). La dinámica molecular fue realizada por comandos de Python en Modeller (Ben Webb, USA, California) en un supercomputador de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla capaz de soportar la cantidad de datos generados. El análisis del Docking Molecular se hizo en el servidor de ZDOCK (ZDOCK Team Bioinformatics, USA, Boston), adicionalmente se analizó la interacción de la proteína fusión recombinante en *The Eukaryotic Linear Motif resource for Functional Sites in Proteins* (Oxford University, USA, Oxford) (Jin Li et al., 2019).

Capítulo 4 Resultados

4.1.- Purificación del plásmido pTFF1_His8x y el plásmido pcDNA3_SARS-CoV-2_S_RBD_His8x de bacterias DH5α transformadas.

Se realizaron los perfiles de restricción de los plásmidos pTFF1_His8x y pcDNA3_SARS-CoV-2_S_RBD_His8x para corroborar que se hubiera realizado una transformación exitosa de las bacterias DH5α por choque térmico, para esto se realizó extracción de los plásmidos por lisis alcalina, los cortes de restricción de los plásmidos respectivos se observan en la Imagen 4.1.1 y 4.1.2. En los perfiles de restricción realizados en gel de agarosa al 1% se tienen las bandas de tamaño deseado confirmando la transformación de las bacterias para proceder a cultivarlas para Maxiprep.

En el plásmido pTFF1_His8x se generan dos bandas una de 1641 pb y la segunda de 4632 con cortes de las enzimas SpeI y ClaI que al sumarse genera el tamaño total de 6273 pb correspondiente al plásmido utilizado.

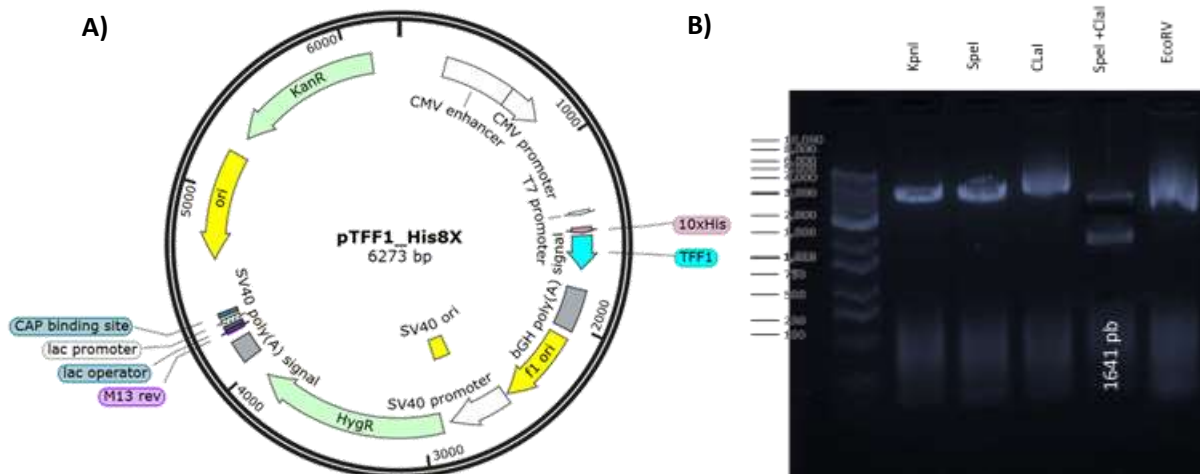


Imagen 4.1.1.- A) Representación gráfica del pTFF1_His8x con un marcador de selección de resistencia a Kanamicina, región promotora y tag de Histidina. B) Perfil de restricción del plásmido pTFF1 en el cual se genera dos bandas la primera de 4632 pb y la segunda de 1641 pb, al realizar cortes con la enzima de restricción SpeI y ClaI. Las enzimas KpnI, SpeI, ClaI y EcoRV por separado sólo linearizan el plásmido.

Las bandas del plásmido pcDNA3_SARS-CoV-2_S_RBD_His8x que se generan son de 1062 pb y 4969 pb al cortarse con NdeI y BamHI con un total de 6031 pb, al contrario de cuando se utiliza SpeI y BamHI con 1467 pb y 4564 pb que representa al plásmido de 6031 pb. La distinción anterior se realizó debido a que se tenía también el plásmido, pero en lugar de tag de His8x está unido a una proteína verde fluorescente.

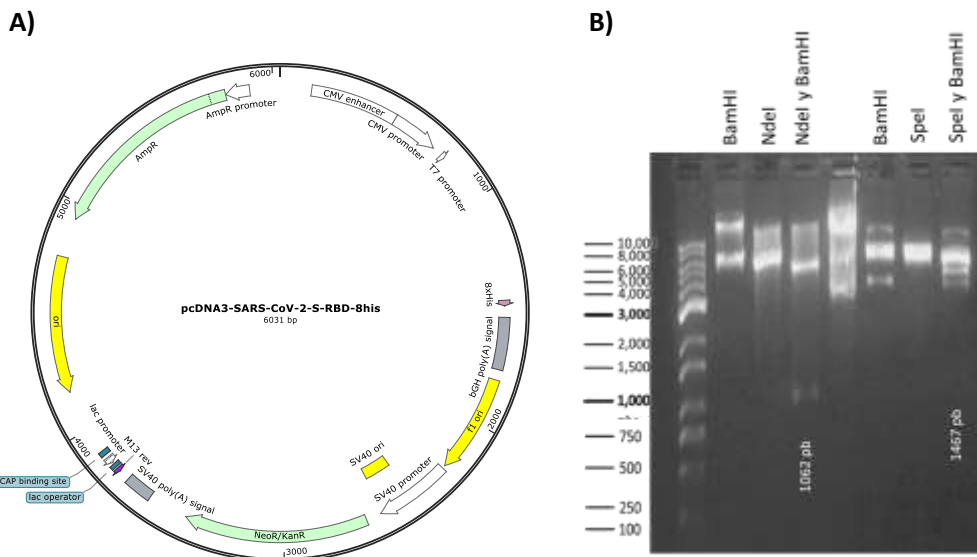


Imagen 4.1.2.- A) Representación gráfica del pcDNA3_SARS-CoV-2_S_RBD_His8x con un marcador de selección de resistencia a ampicilina, región promotora y tag de Histidina. B) Perfil de restricción del plásmido pTFF1 en el cual se genera dos bandas la primera de 1062 pb al realizar corte con NdeI y BamHI y la segunda banda de comprobación es de 1467 pb al realizar corte con SpeI y BamHI.

Las bacterias DH5 α transformadas con los plásmidos pTFF1_His8x y pcDNA3_SARS-CoV-2_S_RBD_His8x una vez crecidas en su respectivo caldo LB en matraz de 500 ml para maxiprep, se extajeron los respectivos plásmidos obteniendo una concentración de 346 ng/ul del plásmido que contiene a TFF1 y 256 ng/ul del plásmido que contiene a *Spike* en 151 ng/ ul suficiente para realizar los experimentos de transfección (Aune & Achmann, 2009).

4.2.- Caracterización de la proteína recombinante TFF1

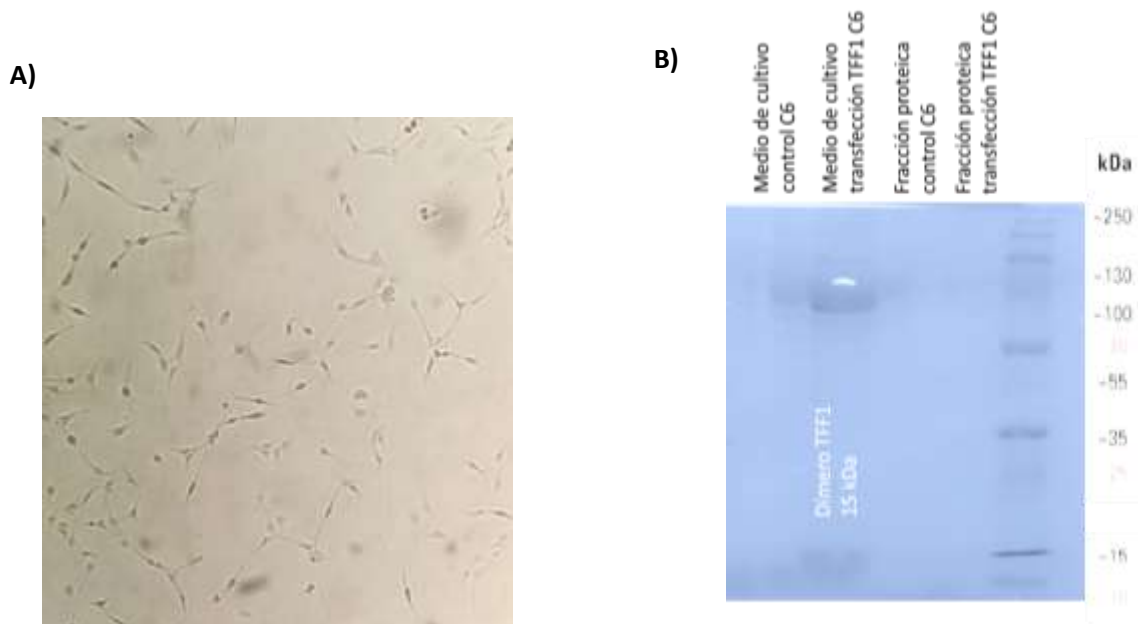


Imagen 4.2.1.- A) Toma en microscopio 40x de la línea celular C6 para la expresión de las proteínas recombinantes TFF1 y *Spike*. B) Electroforesis de SDS-PAGE para caracterización de TFF1 en la que se visualiza el dímero de TFF1 en el medio de cultivo de la línea celular transfectada C6.

Se realizó la estandarización de la técnica de transfección con las células C6 con los plásmidos que contienen a TFF1, para posteriormente realizar los experimentos con la línea celular SH-SH5Y, esto debido a que la cinética de crecimiento de las SH-SH5Y es

un 75% menor a la de C6. Para lo anterior se realizó la transfección de las células y se obtuvo el medio de cultivo, así como las células con la finalidad de extraer proteínas. Las proteínas se corrieron en un gel de SDS-PAGE al 18%, tanto del medio de cultivo, así como del producto de la lisis celular, en las condiciones de transfección con pTFF1_His8x se presenta la banda de la formación del dímero de TFF1 con 15 kDa a comparación del control (Imagen 4.2.1 sección B), de esta forma se demuestra que se esta expresando la proteína posteriormente a la transfección a comparación del control (P. Jensen et al., 2015).

4.3.- Efecto de la transfección de la línea celular SH-SH5Y con los plásmidos pcDNA3_SARS-CoV-2_S_RBD_His8x y pTFF1_His8x por tinción de cristal violeta.

La evidencia fotográfica se obtuvo con un microscopio invertido a un objetivo de 40x por la técnica de cristal violeta (Imagen 4.3.1) en la línea celular SH-SH5Y, en la cual se observa que en las condiciones de transfección con el plásmido pTFF1-His8x, así como en la ausencia de transfección con el plásmido mencionado, el número de células disminuye conforme aumenta la concentración de 6-OHDA, el cuál es un compuesto neurotóxico.

Al expresar las células TFF1 por transfección con lipofectamina el número de células observables en el microscopio es mayor un 32% entre la condición sin 6-OHDA con expresión de TFF1 a comparación del control. En las condiciones posteriores (50, 75 y 100 μ M se tiene un aumento del 24-28% de número de células con la expresión de TFF1

los valores de porcentaje se obtuvieron de ImageJ, lo cual indica que TFF1 está aumentando la proliferación celular de la línea SH-SH5Y (Offenburger et al., 2018).

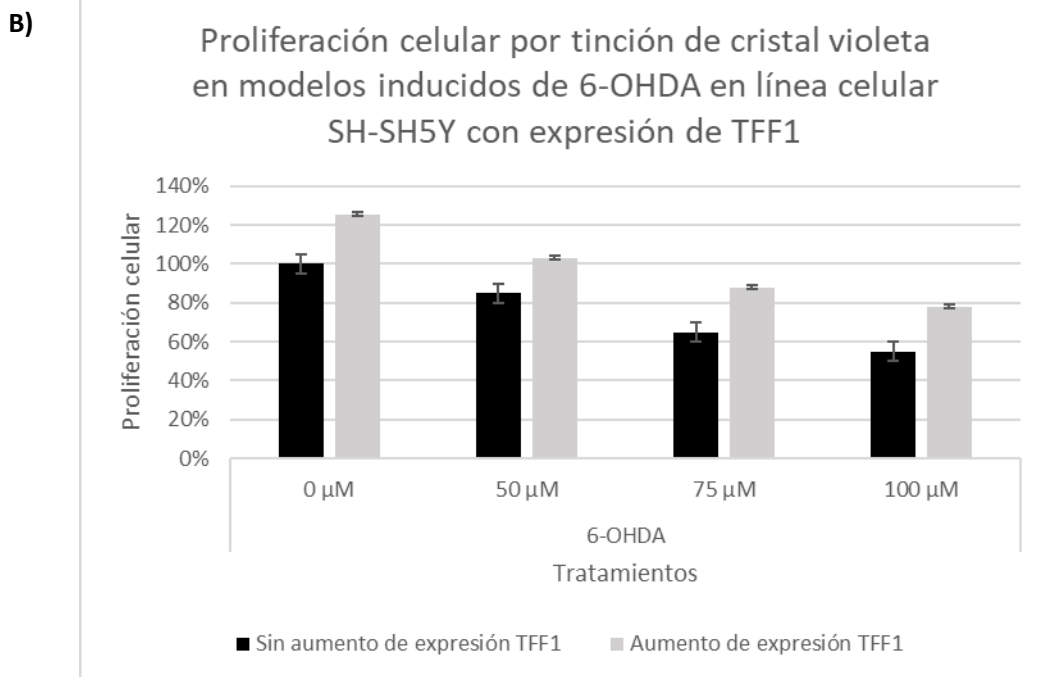
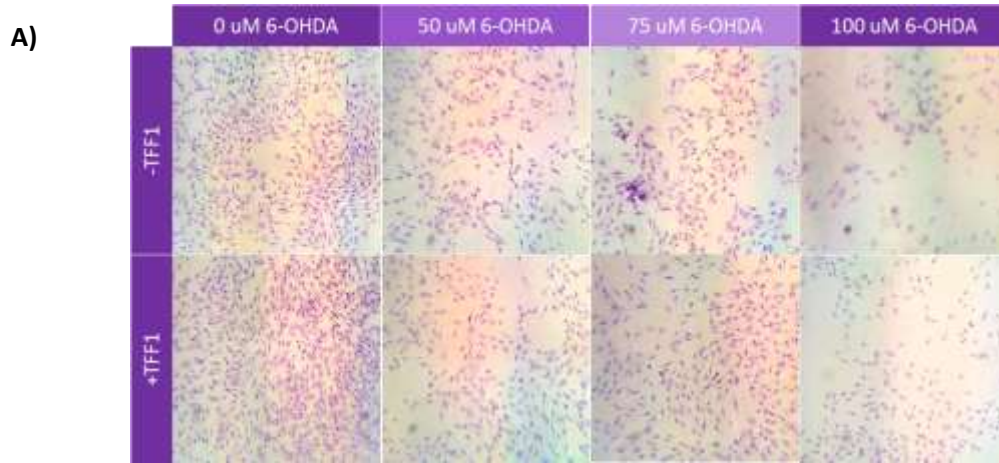


Imagen 4.3.1- A) El gradiente de concentración de 6-OHDA permite establecer un efecto de daño neurogenetico, el cuál es muy marcado al aumentar la concentración. Al expresar TFF1 en la línea celular SH-SH5Y se observa un aumento de la proliferación celular con respecto al control. Adicionalmente las células al expresar TFF1 en las condiciones con concentraciones de 6-OHDA, se observa una disminución en la muerte celular, ejerciendo TFF1 un efecto neuroprotector. B) Gráfica de barras de ensayos de

proliferación celular en las condiciones de tratamiento de modelos inducidos de 6-OHDA y aumento de la expresión de TFF1 por conteo celular.

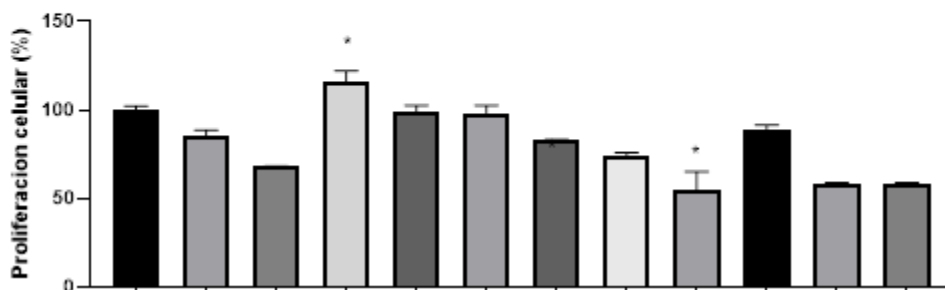
4.4.- Efecto de la Transfección de la línea celular SH-SH5Y con los plásmidos pcDNA3_SARS-CoV-2_S_RBD_His8x y pTFF1_His8x en la proliferación celular por la técnica MTT

La técnica de cristal violeta demarca que hay un mayor número de células en las condiciones en las que se expresa TFF1, por lo que se necesita corroborar con la técnica de MTT para evaluar el efecto de su expresión en la proliferación celular de la línea SH-SH5Y. El efecto de la expresión de *Spike* en la línea celular SH-SH5Y también fue evaluado para predecir la respuesta celular ante el uso de la proteína fusión TFF1_*Spike*.

En los grupos de tratamiento la adición de 6-OHDA induce una disminución de la proliferación celular de acuerdo con la concentración utilizada. El aumento de la expresión de TFF1 en la línea celular SH-SH5Y induce un aumento en la proliferación celular con una diferencia del 16% con una significancia de $p < 0.001$ por ANOVA de una vía entre grupos de tratamiento (Imagen 4.4.1). En la condición de 100 μM de 6-OHDA cuando hay un aumento en la expresión de TFF1 se contrarresta el efecto del compuesto neurotóxico por un 30.34% de diferencia contra el grupo de solo 100 μM 6-OHDA con una significancia de $p < 0.001$.

La combinación del uso de 6-OHDA y la expresión de *Spike* sin el aumento de la expresión de TFF1 disminuye la proliferación celular, por otro lado, el aumentar la expresión de TFF1 no contrarresta el efecto citotóxico generado por 6-OHDA y la expresión de *Spike* (Imagen 4.4.1) (F. Li et al., 2021; Marchbank et al., 1998).

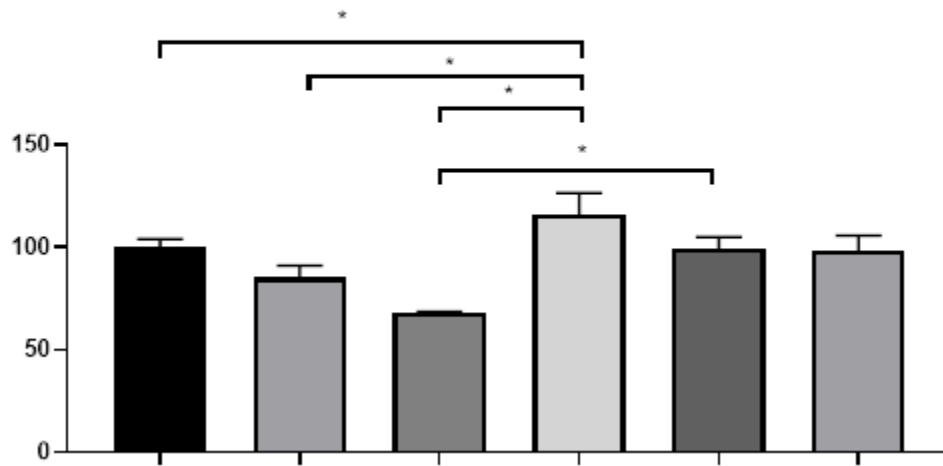
Efecto de la expresión de TFF1 y Spike en condiciones control y en gradiente de 6-OHDA con la línea celular SH-SH5Y



TFF1	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
Spike	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
6-OHDA 50 µM	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
6 OHDA 100 µM	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+

Imagen 4.4.1.- Efecto de la expresión de TFF1 y *Spike*, así como de la concentración de 6-OHDA en combinación de los tratamientos. Se observa que al aumentar la concentración de 6-OHDA disminuye la proliferación celular. La expresión de TFF1 induce un aumento en la proliferación celular en un 16% a comparación del control con una diferencia significativa de $p < 0.001$ (*). La combinación de la expresión de *Spike* y 6-OHDA induce una menor proliferación celular, aunque se esté expresando TFF1 a comparación de los demás grupos.

Efecto de la expresión de TFF1 sobre la línea celular SH-SH5Y a concentración de 50 y 100 μ M de 6-OHDA



TFF1	-	-	-	+	+	+
6-OHDA 50 μM	-	+	-	-	+	-
6 OHDA 100 μM	-	-	+	-	-	+

Imagen 4.4.2.- Efecto de la expresión de TFF1 en concentración de 50 y 100 μ M de 6-OHDA. Se observa que al aumentar la concentración de 6-OHDA disminuye la proliferación celular. La expresión de TFF1 induce un aumento en la proliferación celular en un 16% a comparación del control con una diferencia significativa de $p < 0.001$ (*). Adicionalmente se observa que, aunque se aumente la concentración de 6-OHDA, hay una neuroprotección por parte de TFF1 manteniendo la misma proliferación celular entre el grupo +TFF1 – Spike + 50 μ M de 6-OHDA y el grupo +TFF1 – Spike + 100 μ M de 6-OHDA y el grupo.

El aumento de la expresión de TFF1 en la línea celular SH-SH5Y, permite que en condiciones neurotóxicas similares a las de un Modelo de PD se restablezca la proliferación celular a un 98% a pesar de estar en una concentración de 100 μ M de 6-OHDA, a comparación de cuando no se aumenta la expresión y con una concentración

de 100 μM de 6-OHDA en la cual se tiene una proliferación celular del 68% con una diferencia significativa de $p < 0.001$.

4.5.- *Molecular Docking* de la proteína TFF1_*Spike*, así como posibles interacciones obtenidas por bioinformática.

La unión de la proteína TFF1 y *Spike* generó una proteína fusión de 295 aminoácidos en un modelo *in silico* generado por Modeller. Se realizó el modelado molecular mediante la generación de 10 posibles estructuras de la cual se seleccionó la de mayor estabilidad mediante comandos de Python enfocados en una comparativa de las estructuras. La estructura que se obtuvo se encuentra en el archivo “Proteína fusión TFF1_*Spike*” dentro de los archivos adicionales del trabajo. La estructura visualizada en el programa Modeller se encuentra en la Imagen 4.5.1, observando el extremo de la proteína TFF1 y el de la proteína *Spike*.



Imagen 4.5.1.- Estructura de la proteína fusión TFF1_*Spike* generada en el programa Modeller, de la cual se trabajó por tener una mayor estabilidad entre todas las estructuras generadas visualizada en *Discovery Studio Visualizer* (VMD).

La dinámica molecular permitió obtener el comportamiento de la estabilidad de la proteína TFF1_*Spike* en una caja de agua contemplado 4986 frames, los cuales fueron realizados en el supercomputador de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla capaz de soportar la cantidad de datos generados (Imagen 4.5.2). Los datos que se generaron de la estabilidad de la proteína se graficaron contra la desviación de la raíz cuadrada media del coeficiente de energía (RMSD) (Imagen 4.5.3). La gráfica de los valores RMSD a través del tiempo de la TFF1_*Spike* permite establecer las fluctuaciones hasta predecir un equilibrio en 5.46 Å, adicionalmente se observa que se mantiene dentro del rango de 5 a 7 Å en la simulación (Jin Li et al., 2019).

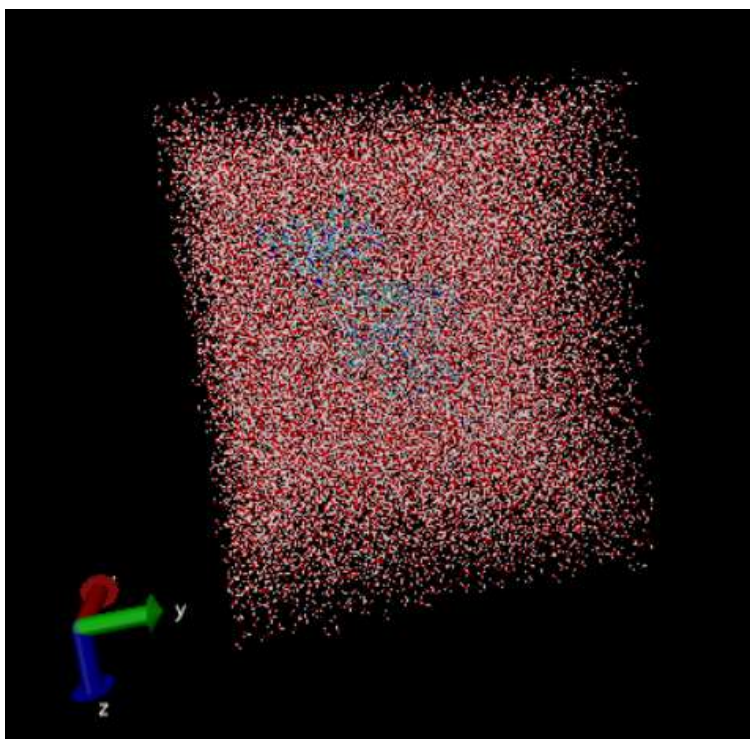


Imagen 4.5.2.- Modelo de la proteína fusión TFF1_*Spike* con mayor punto de equilibrio en una caja de agua para evaluar la estabilidad de la molécula visualizado en VMD.

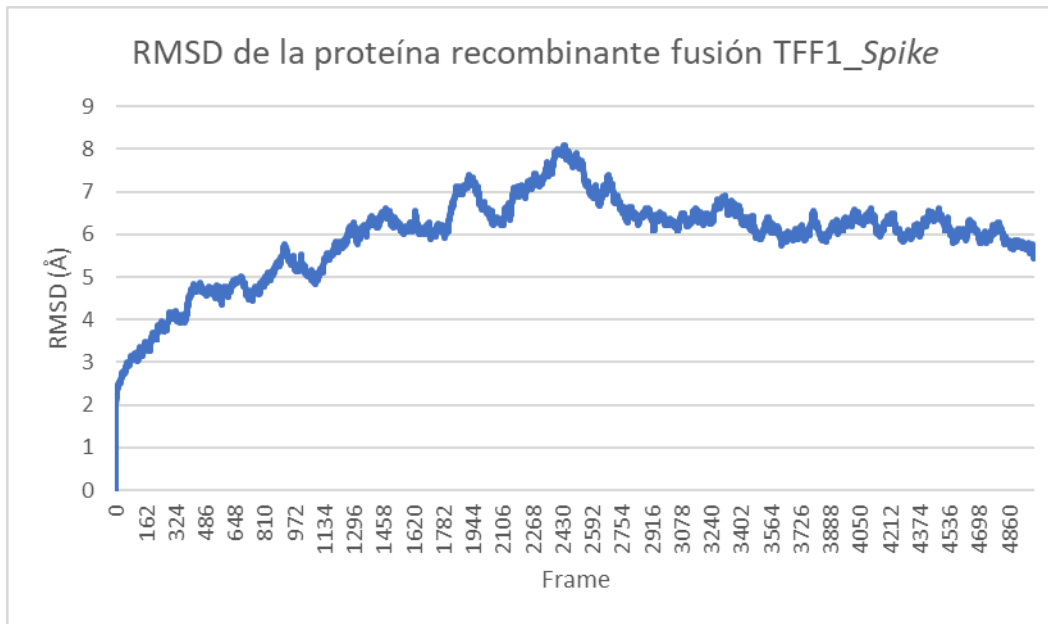


Imagen 4.5.3.- Modelo de dinámica molecular de la proteína fusión TFF1_Spike con mayor punto de equilibrio en una caja de agua para evaluar la estabilidad de la molécula.

En *The Eukaryotic Linear Motif resource for Functional Sites in Proteins* se determinó que hay una interacción con la proteína TRAF2 la cual se une debido al motivo PPEE de consenso ubicado en la proteína fusión. Una segunda interacción es con la proteína TRAF6 debido al sitio de unión VPPEEECEF que presenta TFF1_Spike. El análisis muestra que hay un sitio de fosforilación de quinasa dirigido por prolina en PGVTPSQ, lo cual es importante en la vía de las MAPK. Los motivos encontrados en la proteína TFF1_Spike, el nombre del motivo y su función se encuentran resumidos en la Tabla 4.5.1.

```
EAQTETCTVAPRERQNCGFPGVTPSQCANKGCCFDDTVRGVPWCFYPNTIDVPPEEEECF
EAQTETCTVAPRERQNCGFPGVTPSQCANKGCCFDDTVRGVPWCFYPNTIDVVPPEEEECF
EAQTETCTVAPRERQNCGPGVTPSQCANKGCCFDDTVRGVPWCFYPNTIDVVPPEEEECF
```

Imagen 4.5.4.- Representación de los motivos encontrados de interacción en *The Eukaryotic Linear Motif resource for Functional Sites in Proteins* de la proteína TFF1_Spike. PEEE Sitio de interacción TRAF2. VPPEEECEF sitio de interacción TRAF6. PGVTPSQ Sitio de fosforilación quinasa dirigido por prolina.

Motivo	Nombre	Función
PEEE PPEE	LIG_TRAF2_1	Motivo principal de consenso de unión a TRAF2.
VPPEEECEF	LIG_TRAF6	Sitio de unión de TRAF6.
PGVTPSCQ	MOD_ProDkin_1	Sitio de fosforilación de quinasa dirigida por prolina (por ejemplo, MAPK) en eucariotas superiores.

Tabla 4.5.1.- Tabla de los motivos LIG_TRAF2_1, LIG_TRAF6 y MOD_ProDkin_1 encontrados en la proteína fusión TFF1_Spike, así como la función correspondiente a cada secuencia de aminoácidos.

Capítulo 5 Discusión de resultados

5.1.- Caracterización de la proteína TFF1 en la línea celular C6.

En un primer abordaje realizamos la expresión de TFF1 en la línea celular de glioma C6 a fin de usar a dichas células como productoras de dicha proteína recombinante y para su caracterización, ya que en otras líneas celulares de cáncer se ha observado que la expresión de TFF1 induce muerte celular, siendo las C6 resistentes a múltiples tratamientos y con una elevada tasa de proliferación llegamos a la conclusión que quizás dicho efecto no sería tan drástico. TFF1 es una proteína que se puede encontrar en forma monomérica de 9.15 kDa o dimerizado de 19.3 kDa observada en la Imagen 4.2.1 (Cys58), la forma dimérica ha sido reportada por Marchbank T., et. al (1998) en un en la línea celular HT29 (Cheng et al., 2015; Marchbank et al., 1998). En el presente trabajo realizamos un SDS-PAGE del medio condicionado es decir del medio de células productoras de TFF1 e identificamos la forma dimerizada siendo necesario en experimentos posteriores su cuantificación de TFF por ensayo de ELISA a fin de determinar la cantidad presente en el medio de cultivo. De manera interesante encontramos que TFF1 disminuye la viabilidad de las células de glioma C6 siendo congruente con los reportado por Weise A. y Dunker N. (2013) en las líneas celulares RBL-13, RBL-30, RB383.

5.3.- Efecto de TFF1 en la proliferación celular de la línea celular SH-SH5Y.

El ensayo de MTT que la sola sobreexpresión de TFF1 induce un aumento en la proliferación celular de SH-SH5Y (Imagen 4.4.1). En estudios de células de carcinoma de mama realizado por Amiry N., et al., (2009) se ha reportado el aumento de la

oncogenicidad del tumor, es decir un aumento en la proliferación celular, así como un aumento en la capacidad de migración e invasión, el silenciamiento de TFF1 genera una regresión del carcinoma mamario (Amiry et al., 2009). Por otro lado, las células de retinoblastoma al sobreexpresar TFF1 tienen una menor tasa de proliferación debido al aumento de inhibidores de las ciclinas dependientes de cinasa (CDK), esto indica que dependiendo del tipo de célula, TFF1 puede inducir la proliferación celular o disminuirla (Weise & Dünker, 2012).

Bossenmeyer P., et al (2002) han asociado a TFF1 con la diferenciación de las células gastrointestinales por afectar la transición de la fase G1-S y reducir la apoptosis, por lo tanto, las expectativas de que TFF1 aumenta la eficiencia de diferenciación de neuronas progenitoras a DA es prometedora, sumado al efecto de inducción de la proliferación (Bossenmeyer-Pourié et al., 2002). Ante ello hay que indagar a profundidad el efecto sobre las células neuronales en diferentes contextos ya que se ha reportado que la ausencia de la expresión de TFF1 contribuye a desarrollar cáncer de estómago, lo cual sugiere que su expresión podría estar asociada con contrarrestar el desarrollo de cáncer gastrointestinal por inflamación crónica persistente (Kato, 2003). Adicionalmente encontramos que en la línea celular C6 se observa una disminución de la proliferación celular al ser transfectada con el plásmido pTFF1_His8x, esto está en congruencia con los resultados reportados por Busch M., et al (2017) en el que la sobreexpresión de TFF1 disminuye el potencial tumoral de líneas celulares de retinoblastoma por la regulación la señalización p53/caspasa y mir-18a (Busch et al., 2017; Feoktistova et al., 2016). La línea celular C6 es un tipo de línea celular de un glioblastoma multiforme muy agresivo y con mal pronóstico, por lo que la expresión de TFF1 disminuye la agresividad del tumor, así

mismo la línea celular C6 es un estándar de oro para el estudio de neuro-oncología (Giakoumettis et al., 2018).

5.2.- La expresión de TFF1 reduce el daño por 6-OHDA en la línea celular SH-SH5Y.

El uso de la técnica de cristal violeta en la línea celular SH-SH5Y permite observar una disminución en el daño por 6-OHDA al inducir una alta expresión de TFF1 por la transfección de dichas células. El gradiente de 0 μM , 50 μM , 75 μM y 100 μM de 6-OHDA muestra un efecto citotóxico mayor conforme aumenta la concentración del fármaco, esto debido a que es una neurotoxina capaz de inducir estrés oxidativo en las células del SNC (Offenburger et al., 2018). Tingting L., et al (2022) reporta que TFF1 promueve la neuroprotección mediante la regulación de la expresión de FOXA1 ante un modelo inducido por 6-OHDA. FOXA1 es una proteína que promueve la supervivencia de neuronas dopaminérgicas (Pristerà et al., 2015).

En la imagen 4.4.2 en el experimento de MTT se observa que hay un efecto en la proliferación celular sin 6-OHDA y un aumento de expresión de TFF1, por lo que habría que discernir si tiene un efecto neuroprotector al disminuir la apoptosis, inducción de la proliferación celular o los ambos procesos mencionados (Amiry et al., 2009; Weise & Dünker, 2012). El mecanismo por el cual actúa TFF1 no ha sido descrito sin embargo se ha reportado que es *scavenger* de ROS (Znalesniak et al., 2016). Por lo tanto quizás dicho efecto podría ser el mecanismo por el cual actúa para contrarrestar los niveles de ROS inducidos por la 6-OHDA. Por otro lado, si el contexto celular es fundamental para la acción de TFF1 sería fundamental realizar experimentos con células neuronales

diferenciadas por ejemplo con cAMP puesto se ha reportado que la expresión de TFF1 puede ser inducida por la actividad de la forskolina, un fármaco que activa la enzima adenil ciclasa e incrementa los niveles de cAMP, lo cuál sería interesante para evaluar como tratamiento coadyuvante o un elemento adicional en la manipulación de modelos *ex vivo* de terapia celular para PD puesto que las DA expresan una mayor cantidad de TFF1 para neuroprotección (P. Jensen et al., 2015).

5.4.- Inducción de apoptosis e inflamación por la proteína *Spike*

El efecto de *Spike* en la Imagen 4.4.1 sobre la disminución de la proliferación celular puede estar asociado a que la proteína promueve la inflamación y apoptosis a través de la autofagia por inhibición de la señalización PI3K/AKT/mTOR encargada de regular el ciclo celular y asociada a procesos de quiescencia y proliferación, por lo que habría que evaluar si es un buen candidato a estar fusionado con la proteína TFF1, ya que en las condiciones de transfección realizadas se observa que TFF1 no logra contrarrestar el efecto combinado de *Spike* y 6-OHDA (F. Li et al., 2021). Con este último resultado debemos evaluar en futuros experimentos los mecanismos implicados con profundidad.

5.5.- Análisis de la estabilidad de la proteína fusión TFF1_*Spike*

Siguiendo en la propuesta de realizar una proteína fusión se realizó el diseño *in-silico* de TFF1_*Spike* y no centramos en determinar la estructura con mayor estabilidad en una caja de agua (Imagen 4.5.2). El desarrollo fue *in silico*, por lo que los resultados *in vitro* ayudarían a proponer si la unión de *Spike* a TFF1 permite su entrada de manera

endosomal y posteriormente le permite llevar a cabo su función neuroprotectora, o por lo contrario *Spike* ejerce la inducción de la apoptosis y la inflamación como se observó en los experimentos de MTT de la imagen 4.4.1, en los que la combinación de la expresión de *Spike* y TFF1 no contrarresta el efecto de 6-OHDA (Y. Zhang et al., 2019).

Los valores RMSD determinados en la Imagen 4.5.3 no fueron los esperados, a pesar de tener un punto de equilibrio, se busca que tengan un menor valor y sean constantes, es decir que la proteína fusión alcance el equilibrio en un menor tiempo (Lohning et al., 2017).

Las proteínas TRAF2 y TRAF6 tienen interacción molecular con la proteína TFF1_ *Spike* de acuerdo con los dominios encontrados en *The Eukaryotic Linear Motif resource for Functional Sites in Proteins* (Tabla 4.5.1). Los factores asociados a los receptores del factor de necrosis tumoral (TRAF) participan en la ubiquitinización de proteínas, un paso importante en el marcaje de proteínas para degradación del proteosoma, pero se ha reportado que tienen influencia en vías de señalización por los cambios dinámicos que tienen dichas proteínas (Jie Li et al., 2019). Por otro lado, el tener el dominio de unión a TRAF2 puede asociarse al efecto neuroprotector de TFF1, puesto que TRAF2 es una proteína que ejerce protección contra la necroptosis un tipo de muerte celular programada que presenta características de apoptosis y morfología de necrosis (Jie Li et al., 2019). Por su parte TRAF6, se ha asociado a enfermedades del SNC por lo que dilucidar el mecanismo de interacción de TRAF6 y TFF1 sería importante para evitar procesos de neurodegeneración en las células sobreexpresadas con TFF1, así como la competencia entre TRAF2 y TRAF6 para unirse con TFF1, ya que TRAF2 tiene un efecto positivo en las células del SNC (Dou et al., 2018). La interacción con TRAF6 explicaría

la regresión tumoral de líneas celulares de cáncer gástrico, ya que TRAF6 funciona como un supresor de tumores por tener como blanco a la proteína c-Myc un factor de transcripción que regula positivamente genes asociados a la proliferación celular (Dou et al., 2018).

El sitio de fosforilación de quinasa dirigida por prolina encontrado en TFF1 distingue su participación en los mecanismos de señalización, ya que indica que en algún punto, TFF1 sufre un cambio conformacional y de esta forma su actividad puede ser regulada (Lu et al., 2002). Este dominio se ha reportado en el transportador de dopamina, permitiendo que sea blanco de múltiples cinasas para su regulación (Gorentla et al., 2009).

Capítulo 6 Conclusiones

Los resultados de MTT y cristal violeta en la línea celular SH-SH5Y permiten determinar que TFF1 induce la proliferación celular y en modelos inducidos por 6-OHDA un efecto neuroprotector, lo que da pie a que en líneas futuras de investigación se mejore la eficacia de la manipulación génica en tratamientos ex vivo de PD.

El estudio de TFF1 es amplio, ya que en líneas celulares de Retinoblastoma disminuye la tasa de proliferación mientras que en SH-SH5Y las aumenta, evaluar qué proteínas están silenciadas o aumentadas en cada línea celular permitiría entender la ruta de TFF1 para poder utilizarla de la mejor manera en la terapia génica (Romano et al., 2018; Soutto et al., 2015). Una forma en la que disminuye la tasa de proliferación es debido a que afecta la transición de la fase G1-S, pero la interacción que realiza para regularlo positiva o negativamente aún no está claro (Bossenmeyer-Pourié et al., 2002).

La proteína *Spike* induce inflamación y apoptosis en la línea celular SH-SH5Y, posteriormente convendría evaluar el efecto que tiene en líneas celulares progenitoras para determinar si puede ser utilizado en el diseño de la proteína TFF1_*Spike* o se debe cambiar de enfoque, ya que TFF1 no logra contrarrestar el efecto de 6-OHDA en conjunto con *Spike* (Y. Zhang et al., 2019).

El diseño de la proteína fusión se mejorará para obtener modelos conformacionales con menor valor de RMSD y por lo tanto mayor estabilidad. Por otro lado, cada modelo obtenido debe ser estudiado en cuestión de las interacciones que tiene, es decir si tiene actividad con las proteínas TRAF2 y TRAF6, ya que al modificar el modelo podría obstruirse el acceso a estos dominios (Dou et al., 2018; Jie Li et al., 2019).

Perspectivas

TFF1 es una proteína que participa en la protección de daño inducido por 6-OHDA, y también participa en la inducción de la proliferación, un análisis proteómico y de *microarrays* permitiría analizar las interacciones que hay de TFF1, es decir proteínas que están en alta y baja concentración en el modelo de inducción de 6-OHDA, así como en controles debido a que induce proliferación en modelos sólo con tratamiento de TFF1 (Belovari et al., 2015; Cuevas-Fernández et al., 2019; Harel & Lupski, 2018).

En los microarreglos que podrían realizarse en futuras investigaciones, la expresión de FOXA1 debería ser analizada para confirmar las propiedades dopaminérgicas y de supervivencia neuronal en modelos inducidos por 6-OHDA (Offenburger et al., 2018; Wang et al., 2020; Yang et al., 2003). Adicionalmente, se debería estudiar cual es el efecto directo de TFF1, así como la actividad que ejerce en mayor proporción: neuroprotección o inducción de la proliferación celular.

En líneas posteriores se evaluará el efecto de TRAF2 solo o en conjunto con TFF1 como neuroprotector. Posteriormente realizar el estudio de TRAF6 serviría para saber si funciona como un tratamiento que evite la neurodegeneración en combinación con TFF1 y TRAF6 en modelos de neuronas dopaminérgicas diferenciadas a partir de células progenitoras neurales (Dou et al., 2018; Jie Li et al., 2019; Wang et al., 2020).

Anexos

1.- Cotejo de distinciones y méritos académicos.

Premios

2do lugar en la modalidad cartel otorgado por la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería en el X Congreso de Biotecnología y Bioingeniería del Sureste.

Congresos

X Congreso de Biotecnología y Bioingeniería del Sureste participación en modalidad cartel con el tema “Análisis de los perfiles de expresión de los miRNAs asociados al diagnóstico temprano y metástasis de cáncer de mama tipo luminal” (2021).

2do Congreso Internacional de NanoBioingeniería, participación en modalidad cartel con el tema “Análisis de los perfiles de expresión de los miRNAs asociados al diagnóstico temprano y metástasis de cáncer de mama tipo luminal” (2021).

Programa de doble grado

Se realizó un doble grado en convenio de la Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla del programa Maestría en Biotecnología, así como de la Universidad de Jaén del programa Maestría en Biotecnología y Biomedicina.

Participación en los artículos:

Chin-Chan, M., Montes, S., Blanco-Álvarez, V.M. et al. Relevance of biometals during neuronal differentiation and myelination: in vitro and in vivo studies. *Biometals* 35, 395–427 (2022). <https://doi.org/10.1007/s10534-022-00380-x>

Espinosa-Gómez FC, Bautista E, Palacios-Cruz O, TéllezRamírez A, Vázquez-Briones DB, Ángeles CFdl, Aguirre-Alarcón H, Abella-Medrano CA, Escobedo-Straffón JL, Solís-Hernández M, Navarro-López R, Aguirre A. Host traits, ownership behavior and risk factors of SARS-CoV-2 infection in domestic pets in Mexico. Authorea Preprints; 2022. DOI: 10.22541/au.164487952.22101055/v1.

Elizabeth Bautista-Rodriguez, Nadia Yanet Cortés-Álvarez, César Rubén Vuelvas-Olmos, Verónica Reyes-Meza, Thelma González-López, César Flores-delosÁngeles, Nancy Bibiana Pérez-Silva, Héctor Alberto Aguirre-Alarcón, Jose Luis Cortez-Sanchez, Valeria Magali Rocha-Rocha, Jorge Escobedo-Straffon, Laura Contreras-Mioni, Maria-Lourdes Reyes-Vergara. Stress, anxiety, depression and long-COVID symptoms. *Fatigue: Biomedicine, Health & Behavior*

2.- Constancias



2^{do} Congreso Internacional de NanoBiongenieria
Virtual Congress

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Químicas

Otorgan el presente reconocimiento a:
Héctor Alberto Aguirre Alarcón

Por su participación con la PRESENTACIÓN DEL POSTER titulado
Expression profiles of the hsa-mir-221 and hsa-mir-222 associated to metastasis in breast cancer

en el 2do Congreso Internacional de NanoBiongenieria, realizado en el Foro Virtual del Centro de Investigación en Biotecnología y Nanotecnología del 24 al 30 de Octubre 2020.



Dr. José Rubén Motones Ramírez
Coordinador Centro de Investigación en Biotecnología y Nanotecnología



Dra. Argelia Vargas Moreno
Directora Facultad de Ciencias Químicas

Centro de Investigación en Biotecnología y Nanotecnología a 30 de Octubre, 2020



Logos of UANL, FCQ, CIBYN IFCQ, CONACYT, and other institutions.



**Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Químicas**

Otorgan el presente reconocimiento a:

Héctor Alberto Aguirre Alarcón, José Luis Cortez Sánchez, Silvia Mariela Montilla Fonseca, Sergio Sánchez Sosa, Elizabeth Bautista Rodríguez, Ángel David Rodríguez Reyes

Por su participación como expositor del trabajo científico "Expression profiles of the hsa-mir-221 and hsa-mir-222 miRNAs associated to metastasis in breast cancer" en modalidad de **Poster** en el 2do Congreso Internacional de NanoBioingeniería, realizado en el Foro Virtual del Centro de Investigación en Biotecnología y Nanotecnología del 24 al 30 de Octubre 2020.



Dr. José Rubén Morones Ramírez
Coordinador Centro de Investigación
en Biotecnología y Nanotecnología



Dra. Argelia Vargas Moreno
Directora Facultad
de Ciencias Químicas

Centro de Investigación en Biotecnología y Nanotecnología a 30 de Octubre, 2020



UANL



FCQ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



CIBYN IFCQ

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA Y NANOTECNOLOGÍA



CONACYT

CONSEJO NACIONAL DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA





10 al 12 de febrero de 2021 - CICY - Mérida, Yucatán

La Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería
Delegación Yucatán
otorga la presente

Constancia

a:

Héctor Alberto Aguirre Alarcón

por haber obtenido el **2do lugar modalidad Cartel** con el trabajo titulado "*Análisis de los perfiles de expresión de los miRNAs hsa-mir-221 y hsa-mir-222 asociados a la metástasis en cáncer de mama*", presentado en el **X Congreso de Biotecnología y Bioingeniería del Sureste** realizado el 10 al 12 de febrero de 2021 a través de medios electrónicos.

Mérida, Yucatán, México, 12 de febrero de 2021

Dr. José Efraín Ramírez Benítez
Presidente del Comité Científico

Dr. Juan Sandoval Gio
Presidente de la SMBB Yucatán



La Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería
Delegación Yucatán
otorga la presente

Constancia

S M B B
DELEGACIÓN
YUCATÁN

a:

**Aguirre-Alarcón HA, Cortés Sánchez JL, Montilla
Fonseca SM, Sánchez Sosa S, Bautista Rodríguez E**

por su participación con el trabajo titulado "*Análisis de los perfiles de expresión de los miRNAs hsa-mir-221 y hsa-mir-222 asociados a la metástasis en cáncer de mama*" en la modalidad CARTEL, presentado en el **X Congreso de Biotecnología y Bioingeniería del Sureste** el 11 de Febrero de 2021 a través de medios electrónicos.

Mérida, Yucatán, México, 12 de febrero de 2021

Dr. Juan Sandoval Gio
Presidente de la SMBB Yucatán

Dr. José Efraín Ramírez Benítez
Presidente del Comité Científico X CBBS

II.- Artículos

Stress, anxiety, depression and long-COVID symptoms

Elizabeth Bautista-Rodriguez^{1*}, Nadia Yanet Cortés-Álvarez², César Rubén Vuelvas-Olmos³, Verónica Reyes-Meza⁴, Thelma González-López⁵, César Flores-delosÁngeles⁶, Nancy Bibiana Pérez-Silva⁶, Héctor Alberto Aguirre-Alarcón¹, Jose Luis Cortez-Sanchez¹, Valeria Magali Rocha-Rocha⁷, Jorge Escobedo-Straffon⁶, Laura Contreras-Mioni⁸, Maria-Lourdes Reyes-Vergara⁹.

¹Laboratory of Medical & Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of Biotechnology, Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla (UPAEP), Puebla, Mexico.

²Department of Nursing and Obstetrics, Division of Natural and Exact Sciences, Universidad de Guanajuato, Guanajuato, Mexico.

³Faculty of Medicine, Universidad de Colima, Colima, Mexico.

⁴Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, Mexico.

⁵Center for Psychological, Educational, and Family Development, Comprehensive Health Clinic, UPAEP, Puebla, Mexico.

⁶Molecular Diagnostic Laboratory, UPAEP, Puebla, México.

⁷School of Healthcare Science, UPAEP, Puebla, Mexico.

⁸Dean of Biological Sciences, UPAEP, Puebla, Mexico.

⁹Educational innovation and academic development, UPAEP, Puebla, Mexico.

*Corresponding author: Elizabeth Bautista, Ph.D., Laboratory of Medical & Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of Biotechnology, Popular and Autonomous University of Puebla State (UPAEP), 21 sur 1103, Barrio de Santiago, 72410, Puebla, Mexico. Tel: 2222299400. Email: elizabeth.bautista@upaep.mx.

Host traits, ownership behavior and risk factors of SARS-CoV-2 infection in domestic pets in Mexico

Espinosa-Gómez, Fabiola Carolina^{1*}, Bautista, Elizabeth², Palacios-Cruz, Oscar Emilio³, Téllez-Ramírez, Alejandra³, Vázquez-Briones, Daniela Belem¹, Flores de los Ángeles, César⁴, Abella-Medrano, Carlos Antonio¹, Escobedo-Straffón, Jorge Luis⁴, Aguirre-Alarcón, Héctor², Pérez-Silva, Nancy Bibiana⁴, Solís-Hernández, Mario⁵, Navarro-López, Roberto⁵, Aguirre, A. Alonso⁶

¹ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla (UPAEP), Puebla, México.

² Laboratorio de Biotecnología Médica y Farmacéutica, Facultad de Biotecnología, Universidad Popular y Autónoma del Estado de Puebla (UPAEP), Puebla, México.

³ Especialidad en Medicina y Cirugía de Perros y Gatos, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla (UPAEP), Puebla, México.

⁴ Laboratorio de Diagnóstico Molecular, Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla (UPAEP), Puebla, México.

⁵ Comisión México Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas de los Animales del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, Ciudad de México, México.

⁶ Department of Environmental Science and Policy, College of Science, George Mason University, Fairfax, VA, USA.

*Corresponding author: Fabiola Carolina Espinosa-Gómez, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla, 21 sur #1103, Barrio de Santiago, C.P. 72410, Puebla, Puebla, Mexico.

fabiolacarolina.espinosa@upaep.mx

**Relevance of biometals during neuronal differentiation and myelination: *in vitro*
and *in vivo* studies**

Miguel Chin-Chan¹, Sergio Montes², Victor Manuel Blanco-Álvarez^{3,4}, Hector Alberto Aguirre-Alarcón⁵, Ignacio Hernández-Rodríguez² and Elizabeth Bautista^{5*}

¹Faculty of Chemical and Biological Sciences, Autonomous University of Campeche. Campeche, Campeche, Mexico.

² Reynosa-Aztlan Multidisciplinary Academic Unit. Autonomous University of Tamaulipas, Calle 16 and Lago de Chapala S/N, col. Aztlan, C.P. 88740, Reynosa, Tamaulipas, Mexico.

³ Faculty of Medicine, Meritorious Autonomous University of Puebla, 13 Sur 2702, Puebla, C.P. 72420 Puebla, Mexico.

⁴ Faculty of Nursing, Meritorious Autonomous University of Puebla, Av. 25 Poniente 1304, Los Volcanes, Puebla, C.P. 72410 Puebla, Mexico.

⁵ Laboratory of Medical & Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of Biotechnology, Popular and Autonomous University of Puebla State (UPAEP), Puebla, Mexico.

*Corresponding author: Laboratory of Medical & Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of Biotechnology, Popular and Autonomous University of Puebla State (UPAEP). Av. 11 Pte. # 2316, 72410, Puebla, Mexico. E-mail address: elizabeth.bautista@upaep.mx (E. Bautista).

Glosario

A

ANOVA	Análisis de la varianza.
Azul de Comassie	Tinción utilizada en el revelado de proteínas debido a que no interfiere con la movilidad electroforética de las proteínas.

B

Bradford	Técnica colorimétrica utilizada para la cuantificación de proteínas.
-----------------	--

C

Clonación	Inserción de un gen blanco a un ADN circular.
Cristal violeta	Método simple para detectar la adherencia mantenida de las células es la tinción con colorante cristal violeta, el cual interactúa con las proteínas y el ADN.

D

Dominios	Regiones de la secuencia aminoacídica de las proteínas que son capaces de interactuar con otras moléculas.
-----------------	--

E

EGF	Factor de crecimiento epidérmico.
------------	-----------------------------------

ELISA	Técnica de enzimoanálisis de adsorción usada para la detección de antígenos o anticuerpos.
Espectrofotometría	Técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución.

F

FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos.
------------	--

I

Inmunocitoquímica	Localización microscópica de las proteínas presentes en los tejidos o células.
--------------------------	--

M

Molecular Docking	Método que predice la conformación preferida de una molécula al estar unida con otra.
MTT	Técnica utilizada para determinar la actividad redox celular, un indicador de muerte celular en un ensayo colorimétrico.

L

LB	Caldo Luria-Bertani.
-----------	----------------------

O

OD₆₀₀	Densidad Óptica a lectura de 600 nm.
-------------------------	--------------------------------------

P

Perfil de restricción	Es la obtención de bandas de tamaño conocido de un plásmido por medio de enzimas de restricción.
------------------------------	--

S

SDS-PAGE	Técnica utilizada para separación de proteínas por movilidad electroforética.
SFB	Suero fetal bovino.

T

TFF1	Trefoil Factor 1.
TNF	Factor de necrosis tumoral.
TRAF2	Factor 2 asociado al receptor de TNF.
TRAF6	Factor 6 asociado al receptor de TNF.
Transfección por lipofectamina	Inserción de material genético exógeno por medio de liposomas.
Transformación bacteriana	Alteración genética de una bacteria competente resultante de la absorción directa, incorporación y expresión del material genético exógeno.

U

USA	Estados Unidos de América
------------	---------------------------

Bibliografía

- Amiry, N., Kong, X., Muniraj, N., Kannan, N., Grandison, P. M., Lin, J., Yang, Y., Vouyovitch, C. M., Borges, S., Perry, J. K., Mertani, H. C., Zhu, T., Liu, D., & Lobie, P. E. (2009). Trefoil Factor-1 (TFF1) Enhances Oncogenicity of Mammary Carcinoma Cells. *Endocrinology*, *150*(10), 4473–4483. <https://doi.org/10.1210/EN.2009-0066>
- Antony, P. M. A., Diederich, N. J., Krüger, R., & Balling, R. (2013). The hallmarks of Parkinson's disease. *The FEBS Journal*, *280*(23), 5981–5993. <https://doi.org/10.1111/FEBS.12335>
- Armstrong, M. J., & Okun, M. S. (2020). Choosing a Parkinson Disease Treatment. *JAMA*, *323*(14), 1420–1420. <https://doi.org/10.1001/JAMA.2020.1224>
- Aune, T. E. V., & Aachmann, F. L. (2009). Methodologies to increase the transformation efficiencies and the range of bacteria that can be transformed. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2009 85:5, *85*(5), 1301–1313. <https://doi.org/10.1007/S00253-009-2349-1>
- Axelsen, T. M., & Woldbye, D. P. D. (2018). Gene Therapy for Parkinson's Disease, An Update. *Journal of Parkinson's Disease*, *8*(2), 195. <https://doi.org/10.3233/JPD-181331>
- Baig, A. M., Khaleeq, A., Ali, U., & Syeda, H. (2020). Evidence of the COVID-19 Virus Targeting the CNS: Tissue Distribution, Host-Virus Interaction, and Proposed Neurotropic Mechanisms. In *ACS Chemical Neuroscience*. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.0c00122>
- Balestrino, R., & Schapira, A. H. V. (2020). Parkinson disease. *European Journal of Neurology*, *27*(1), 27–42. <https://doi.org/10.1111/ENE.14108>
- Beitz, J. M. (2014). Parkinson's disease: A review. *Frontiers in Bioscience - Scholar*, *6* S(1), 65–74. <https://doi.org/10.2741/S415>

- Belovari, T., Bijelić, N., Levak, M. T., & Lončar, M. B. (2015). Trefoil factor family peptides TFF1 and TFF3 in the nervous tissues of developing mouse embryo. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 15(1), 33–37. <https://doi.org/10.17305/bjbms.2015.251>
- Björklund, A., Björklund, T., & Kirik, D. (2009). Gene therapy for dopamine replacement in Parkinson's disease. In *Science Translational Medicine* (Vol. 1, Issue 2). American Association for the Advancement of Science. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3000350>
- Björklund, A., & Lindvall, O. (2017). Replacing Dopamine Neurons in Parkinson's Disease: How did it happen? In *Journal of Parkinson's Disease* (Vol. 7, Issue s1, pp. S23–S33). IOS Press. <https://doi.org/10.3233/JPD-179002>
- Bongioanni, P., Del Carratore, R., Corbianco, S., Diana, A., Cavallini, G., Masciandaro, S. M., Dini, M., & Buizza, R. (2021). Climate change and neurodegenerative diseases. *Environmental Research*, 201, 111511. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2021.111511>
- Bosch, B. J., Zee, R. van der, Haan, C. A. M. de, & Rottier, P. J. M. (2003). The Coronavirus Spike Protein Is a Class I Virus Fusion Protein: Structural and Functional Characterization of the Fusion Core Complex. *Journal of Virology*, 77(16), 8801. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.16.8801-8811.2003>
- Bossenmeyer-Pourié, C., Kannan, R., Ribieras, S., Wendling, C., Stoll, I., Thim, L., Tomasetto, C., & Rio, M. C. (2002). The trefoil factor 1 participates in gastrointestinal cell differentiation by delaying G1-S phase transition and reducing apoptosis. *Journal of Cell Biology*, 157(5), 761–770. <https://doi.org/10.1083/JCB200108056>
- Busch, M., Große-Kreul, J., Wirtz, J. J., Beier, M., Stephan, H., Royer-Pokora, B., Metz, K., & Dünker, N. (2017). Reduction of the tumorigenic potential of human retinoblastoma cell lines by TFF1 overexpression involves p53/caspase signaling and miR-18a regulation. *International Journal of Cancer*, 141(3), 549–560. <https://doi.org/10.1002/IJC.30768>

Capriotti, T., & Terzakis, K. (2016). Parkinson Disease. *Home Healthcare Now*, 34(6), 300–307.

<https://doi.org/10.1097/NHH.0000000000000398>

Cheng, Y. M., Lu, M. T., & Yeh, M. C. (2015). Functional expression of recombinant human trefoil factor 1 by *Escherichia coli* and *Brevibacillus choshinensis*. *BMC Biotechnology*, 15(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/S12896-015-0149-5/TABLES/2>

Conte, C. (2021). Possible Link between SARS-CoV-2 Infection and Parkinson's Disease: The Role of Toll-Like Receptor 4. *International Journal of Molecular Sciences 2021*, Vol. 22, Page 7135, 22(13), 7135. <https://doi.org/10.3390/IJMS22137135>

Cuevas-Fernández, B., Fuentes-Almagro, C., & Peragón, J. (2019). Proteomics Analysis Reveals the Implications of Cytoskeleton and Mitochondria in the Response of the Rat Brain to Starvation. *Nutrients*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/NU11020219>

Dai, H., Wang, Y., Lu, X., & Han, W. (2016). Chimeric Antigen Receptors Modified T-Cells for Cancer Therapy. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 108(7), 439. <https://doi.org/10.1093/JNCI/DJV439>

Doi, D., Magotani, H., Kikuchi, T., Ikeda, M., Hiramatsu, S., Yoshida, K., Amano, N., Nomura, M., Umekage, M., Morizane, A., & Takahashi, J. (2020). Pre-clinical study of induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic progenitor cells for Parkinson's disease. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-020-17165-W>

Dou, Y., Tian, X., Zhang, J., Wang, Z., & Chen, G. (2018). Roles of TRAF6 in Central Nervous System. *Current Neuropharmacology*, 16(9), 1306–1313. <https://doi.org/10.2174/1570159X16666180412094655>

Feoktistova, M., Geserick, P., & Leverkus, M. (2016). Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(4), pdb.prot087379.

<https://doi.org/10.1101/PDB.PROT087379>

Gessler, D. J., & Gao, G. (2016). Gene Therapy for the Treatment of Neurological Disorders: Metabolic Disorders. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1382, 429.

https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3271-9_30

Giakoumettis, D., Kritis, A., & Foroglou, N. (2018). C6 cell line: the gold standard in glioma research. *Hippokratia*, 22(3), 105. /pmc/articles/PMC6801124/

Goldman, S. M., Quinlan, P. J., Ross, G. W., Marras, C., Meng, C., Bhudhikanok, G. S., Comyns, K., Korell, M., Chade, A. R., Kasten, M., Priestley, B., Chou, K. L., Fernandez, H. H., Cambi, F., Langston, J. W., & Tanner, C. M. (2012). Solvent exposures and parkinson disease risk in twins. *Annals of Neurology*, 71(6), 776–784.

<https://doi.org/10.1002/ANA.22629>

Gonzalez-Rodriguez, P., Zampese, E., & Surmeier, D. J. (2020). Selective neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Progress in Brain Research*, 252, 61–89.

<https://doi.org/10.1016/BS.PBR.2020.02.005>

Gonzalez, R., Garitaonandia, I., Abramihina, T., Wambua, G. K., Ostrowska, A., Brock, M., Noskov, A., Boscolo, F. S., Craw, J. S., Laurent, L. C., Snyder, E. Y., & Semechkin, R. A. (2013). Deriving dopaminergic neurons for clinical use. A practical approach. *Scientific Reports*, 3(1), 1–5. <https://doi.org/10.1038/srep01463>

Gorentla, B. K., Moritz, A. E., Foster, J. D., & Vaughan, R. A. (2009). Proline-directed phosphorylation of the dopamine transporter N-terminal domain. *Biochemistry*, 48(5), 1067–1076. <https://doi.org/10.1021/BI801696N>

Han, Y., Yang, L., Kim, T. W., Nair, M. S., Harschnitz, O., Wang, P., Zhu, J., Koo, S. Y., Tang, X., Lacko, L. A., Chandar, V., Bram, Y., Zhang, T., Zhang, W., He, F., Caicedo, J., Huang,

- Y., Evans, T., Valk, P. van der, ... Chen, S. (2021). SARS-CoV-2 Infection Causes Dopaminergic Neuron Senescence. *Research Square*. <https://doi.org/10.21203/RS.3.RS-513461/V1>
- Harel, T., & Lupski, J. R. (2018). Genomic disorders 20 years on—mechanisms for clinical manifestations. *Clinical Genetics*, *93*(3), 439–449. <https://doi.org/10.1111/cge.13146>
- Hinz, M., Schwegler, H., Chwieralski, C. E., Laube, G., Linke, R., Pohle, W., & Hoffmann, W. (2004). Trefoil factor family (TFF) expression in the mouse brain and pituitary: changes in the developing cerebellum. *Peptides*, *25*(5), 827–832. <https://doi.org/10.1016/J.PEPTIDES.2004.01.020>
- Hitti, F. L., Yang, A. I., Gonzalez-Alegre, P., & Baltuch, G. H. (2019). Human gene therapy approaches for the treatment of Parkinson’s disease: An overview of current and completed clinical trials. *Parkinsonism & Related Disorders*, *66*, 16–24. <https://doi.org/10.1016/J.PARKRELDIS.2019.07.018>
- Hoffmann, W., & Jagla, W. (2002). Cell Type Specific Expression of Secretory TFF Peptides: Colocalization with Mucins and Synthesis in the Brain. *International Review of Cytology*, *213*, 147-188e. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(02\)13014-2](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(02)13014-2)
- Jagadeesan, A. J., Murugesan, R., Devi, S. V., Meera, M., Madhumala, G., Padmaja, M. V., Ramesh, A., Banerjee, A., Sushmitha, S., Khokhlov, A. N., Marotta, F., & Pathak, S. (2017). Current trends in etiology, prognosis and therapeutic aspects of Parkinson’s disease: a review. *Acta Bio Medica : Atenei Parmensis*, *88*(3), 249. <https://doi.org/10.23750/abm.v%vi%i.6063>
- Jensen, P., Ducray, A. D., Widmer, H. R., & Meyer, M. (2015). Effects of Forskolin on Trefoil factor 1 expression in cultured ventral mesencephalic dopaminergic neurons. *Neuroscience*, *310*, 699–708. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2015.10.010>

- Jensen, Pia, Heimberg, M., Ducray, A. D., Widmer, H. R., & Meyer, M. (2013). Expression of Trefoil Factor 1 in the Developing and Adult Rat Ventral Mesencephalon. *PLoS ONE*, 8(10), 76592. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0076592>
- Katoh, M. (2003). Trefoil factors and human gastric cancer (review). *International Journal of Molecular Medicine*, 12(1), 3–9. <https://doi.org/10.3892/IJMM.12.1.3/HTML>
- Khan, A. U., Akram, M., Daniyal, M., & Zainab, R. (2018). Awareness and current knowledge of Parkinson's disease: a neurodegenerative disorder. <https://doi.org/10.1080/00207454.2018.1486837>, 129(1), 55–93. <https://doi.org/10.1080/00207454.2018.1486837>
- Li, F., Li, J., Wang, P. H., Yang, N., Huang, J., Ou, J., Xu, T., Zhao, X., Liu, T., Huang, X., Wang, Q., Li, M., Yang, L., Lin, Y., Cai, Y., Chen, H., & Zhang, Q. (2021). SARS-CoV-2 spike promotes inflammation and apoptosis through autophagy by ROS-suppressed PI3K/AKT/mTOR signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1867(12), 166260. <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2021.166260>
- Li, Jie, Zhang, J., Zhang, Y., Wang, Z., Song, Y., Wei, S., He, M., You, S., Jia, J., & Cheng, J. (2019). TRAF2 protects against cerebral ischemia-induced brain injury by suppressing necroptosis. *Cell Death & Disease* 2019 10:5, 10(5), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1558-5>
- Li, Jin, Fu, A., & Zhang, L. (2019). An Overview of Scoring Functions Used for Protein–Ligand Interactions in Molecular Docking. *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences* 2019 11:2, 11(2), 320–328. <https://doi.org/10.1007/S12539-019-00327-W>
- Li, Y., Yu, Y., Xie, Z., Ye, X., Liu, X., Xu, B., & Mao, J. (2021). Serum-derived exosomes accelerate scald wound healing in mice by optimizing cellular functions and promoting Akt phosphorylation. *Biotechnology Letters* 2021 43:8, 43(8), 1675–1684.

<https://doi.org/10.1007/S10529-021-03148-4>

Lohning, A. E., Levonis, S. M., Williams-Noonan, B., & Schweiker, S. S. (2017). A Practical Guide to Molecular Docking and Homology Modelling for Medicinal Chemists. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 17(18).

<https://doi.org/10.2174/1568026617666170130110827>

Lu, K. P., Liou, Y. C., & Zhou, X. Z. (2002). Pinning down proline-directed phosphorylation signaling. *Trends in Cell Biology*, 12(4), 164–172. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(02\)02253-5](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(02)02253-5)

Ludwig, S., & Zarbock, A. (2020). Coronaviruses and SARS-CoV-2: A Brief Overview. *Anesthesia and Analgesia*, 93–96. <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000004845>

M.S. Lima, M., F. Martins, E., Marcia Delattre, A., B. Proenca, M., A. Mori, M., Carabelli, B., & C. Ferraz, A. (2012). Motor and Non-Motor Features of Parkinson's Disease – A Review of Clinical and Experimental Studies. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 11(4), 439–449. <https://doi.org/10.2174/187152712800792893>

Marchbank, T., Westley, B. R., May, F. E. B., Calnan, D. P., & Playford, R. J. (1998). Dimerization of human pS2 (TFF1) plays a key role in its protective/healing effects. *The Journal of Pathology*, 185(2), 153–158. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9896\(199806\)185:2<153::aid-path87>3.0.co;2-5](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9896(199806)185:2<153::aid-path87>3.0.co;2-5)

Masi, A., Narducci, R., Resta, F., Carbone, C., Kobayashi, K., & Mannaioni, G. (2015). Differential contribution of Ih to the integration of excitatory synaptic inputs in substantia nigra pars compacta and ventral tegmental area dopaminergic neurons. *European Journal of Neuroscience*, 42(9), 2699–2706. <https://doi.org/10.1111/EJN.13066>

Offenburger, S. L., Ho, X. Y., Tachie-Menson, T., Coakley, S., Hilliard, M. A., & Gartner, A.

(2018). 6-OHDA-induced dopaminergic neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans* is promoted by the engulfment pathway and inhibited by the transthyretin-related protein TTR-33. *PLOS Genetics*, 14(1), e1007125.

<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1007125>

Ohnuki, M., & Takahashi, K. (2015). Present and future challenges of induced pluripotent stem cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1680).

<https://doi.org/10.1098/RSTB.2014.0367>

Olanow, C. W., Stern, M. B., & Sethi, K. (2009). The scientific and clinical basis for the treatment of Parkinson disease (2009). *Neurology*, 72(21 Supplement 4), S1–S136.

<https://doi.org/10.1212/WNL.0B013E3181A1D44C>

Paoletti, F. P., Gaetani, L., & Parnetti, L. (2020). The Challenge of Disease-Modifying Therapies in Parkinson's Disease: Role of CSF Biomarkers. *Biomolecules* 2020, Vol. 10, Page 335, 10(2), 335. <https://doi.org/10.3390/BIOM10020335>

Perez-Bonilla, P., Santiago-Colon, K., & Leininger, G. M. (2020). Lateral hypothalamic area neuropeptides modulate ventral tegmental area dopamine neurons and feeding.

Physiology & Behavior, 223, 112986. <https://doi.org/10.1016/J.PHYSBEH.2020.112986>

Politis, M., & Lindvall, O. (2012). Clinical application of stem cell therapy in Parkinson's disease.

BMC Medicine, 10, 1. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-10-1>

Prest, S. J., May, F. E. B., & Westley, B. R. (2002a). The estrogen-regulated protein, TFF1, stimulates migration of human breast cancer cells. *The FASEB Journal*, 16(6), 592–594.

<https://doi.org/10.1096/FJ.01-0498FJE>

Prest, S. J., May, F. E. B., & Westley, B. R. (2002b). The estrogen-regulated protein, TFF1,

stimulates migration of human breast cancer cells. *The FASEB Journal*, 16(6), 592–594.

<https://doi.org/10.1096/FJ.01-0498FJE>

Pristerà, A., Lin, W., Kaufmann, A. K., Brimblecombe, K. R., Threlfell, S., Dodson, P. D., Magill, P. J., Fernandes, C., Cragg, S. J., & Ang, S. L. (2015). Transcription factors FOXA1 and FOXA2 maintain dopaminergic neuronal properties and control feeding behavior in adult mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(35), E4929–E4938.

https://doi.org/10.1073/PNAS.1503911112/SUPPL_FILE/PNAS.201503911SI.PDF

Radzikowska, U., Ding, M., Tan, G., Zhakparov, D., Peng, Y., Wawrzyniak, P., Wang, M., Li, S., Morita, H., Altunbulakli, C., Reiger, M., Neumann, A. U., Lunjani, N., Traidl-Hoffmann, C., Nadeau, K. C., O'Mahony, L., Akdis, C., & Sokolowska, M. (2020). Distribution of ACE2, CD147, CD26, and other SARS-CoV-2 associated molecules in tissues and immune cells in health and in asthma, COPD, obesity, hypertension, and COVID-19 risk factors. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *75*(11), 2829–2845.

<https://doi.org/10.1111/all.14429>

Ritz, B., Lee, P. C., Hansen, J., Lassen, C. F., Ketzel, M., Sørensen, M., & Raaschou-Nielsen, O. (2016). Traffic-related air pollution and parkinson's disease in Denmark: A case–control study. *Environmental Health Perspectives*, *124*(3), 351–356.

<https://doi.org/10.1289/EHP.1409313>

Rivetti di Val Cervo, P., Romanov, R. A., Spigolon, G., Masini, D., Martín-Montañez, E., Toledo, E. M., La Manno, G., Feyder, M., Pifl, C., Ng, Y.-H., Sánchez, S. P., Linnarsson, S., Wernig, M., Harkany, T., Fisone, G., & Arenas, E. (2017). Induction of functional dopamine neurons from human astrocytes in vitro and mouse astrocytes in a Parkinson's disease model. *Nature Biotechnology* 2017 35:5, *35*(5), 444–452. <https://doi.org/10.1038/nbt.3835>

Romano, E., Villahu, M., Bizzarro, V., Belvedere, R., Esposito, R., Petrella, A., & Tosco, A.

- (2018). TFF1 Promotes EMT-Like Changes through an Auto-Induction Mechanism. *International Journal of Molecular Sciences* 2018, Vol. 19, Page 2018, 19(7), 2018. <https://doi.org/10.3390/IJMS19072018>
- Samii, A., Nutt, J. G., & Ransom, B. R. (2004). Parkinson's disease. *The Lancet*, 363(9423), 1783–1793. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16305-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16305-8)
- Satarker, S., & Nampoothiri, M. (2020). Structural Proteins in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2. *Archives of Medical Research*, 51(6), 482–491. <https://doi.org/10.1016/J.ARCMED.2020.05.012>
- Shen, J., Lee, W., Li, Y., Lau, C. F., Ng, K. M., Fung, M. L., & Liu, K. J. (2008). Interaction of caveolin-1, nitric oxide, and nitric oxide synthases in hypoxic human SK-N-MC neuroblastoma cells. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05630.x>
- Simon, D. K., Tanner, C. M., & Brundin, P. (2020). Parkinson Disease Epidemiology, Pathology, Genetics, and Pathophysiology. *Clinics in Geriatric Medicine*, 36(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/J.CGER.2019.08.002>
- Singh, N., Pillay, V., & Choonara, Y. E. (2007). Advances in the treatment of Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*, 81(1), 29–44. <https://doi.org/10.1016/J.PNEUROBIO.2006.11.009>
- Smith, Y., & Masilamoni, J. G. (2010). Substantia Nigra. *Encyclopedia of Movement Disorders*, 189–192. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374105-9.00288-4>
- Soutto, M., Chen, Z., Saleh, M. A., Katsha, A., Zhu, S., Zaika, A., Belkhiri, A., & El-Rifai, W. (2014). TFF1 activates p53 through down-regulation of miR-504 in gastric cancer. *Oncotarget*, 5(14), 5663. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.2156>

- Soutto, M., Peng, D., Katsha, A., Chen, Z., Piazuolo, M. B., Washington, M. K., Belkhiri, A., Correa, P., & El-Rifai, W. (2015). Activation of β -catenin Signaling by TFF1 Loss Promotes Cell Proliferation and Gastric Tumorigenesis. *Gut*, *64*(7), 1028.
<https://doi.org/10.1136/GUTJNL-2014-307191>
- Sudhakar, V., & Richardson, R. M. (2018). Gene Therapy for Parkinson's Disease. *Progress in Neurological Surgery*, *33*, 253–264. <https://doi.org/10.1159/000481109>
- Tarakad, A., & Jankovic, J. (2017). Diagnosis and Management of Parkinson's Disease. *Seminars in Neurology*, *37*(02), 118–126. <https://doi.org/10.1055/S-0037-1601888>
- Tönges, L., Metzdorf, J., & Zella, S. (2018). Parkinson-Erkrankung und Neuroinflammation – Zelluläre Pathologie, Mechanismen und therapeutische Optionen. *Fortschritte Der Neurologie · Psychiatrie*, *86*(S 01), S10–S20. <https://doi.org/10.1055/S-0044-101608>
- Tysnes, O.-B., & Storstein, A. (2017). Epidemiology of Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission* 2017 124:8, *124*(8), 901–905. <https://doi.org/10.1007/S00702-017-1686-Y>
- Uitti, R. J. (2012). Treatment of Parkinson's disease: focus on quality of life issues. *Parkinsonism & Related Disorders*, *18*(SUPPL. 1), S34–S36.
[https://doi.org/10.1016/S1353-8020\(11\)70013-X](https://doi.org/10.1016/S1353-8020(11)70013-X)
- Urban, P., Falkenburger, B., Jost, W. H., Ransmayr, G., Riederer, P., & Winkler, C. (2020). Struktur und Efferenzen der Substantia nigra pars compacta beim idiopathischen Parkinson-Syndrom. *Fortschritte Der Neurologie · Psychiatrie*, *88*(09), 591–599.
<https://doi.org/10.1055/A-1149-9280>
- Vila, M. (2019). Neuromelanin, aging, and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Movement Disorders*, *34*(10), 1440–1451. <https://doi.org/10.1002/MDS.27776>
- Wang, M., Ling, K. H., Tan, J. J., & Lu, C. B. (2020). Development and Differentiation of

Midbrain Dopaminergic Neuron: From Bench to Bedside. In *Cells* (Vol. 9, Issue 6). NLM (Medline). <https://doi.org/10.3390/cells9061489>

Weise, A., & Dünker, N. (2012). High trefoil factor 1 (TFF1) expression in human retinoblastoma cells correlates with low growth kinetics, increased cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor levels and a selective down-regulation of CDK6. *Histochemistry and Cell Biology* 2012 139:2, 139(2), 323–338. <https://doi.org/10.1007/S00418-012-1028-Y>

Wu, Y. Y., Chiu, F. L., Yeh, C. S., & Kuo, H. C. (2019). Opportunities and challenges for the use of induced pluripotent stem cells in modelling neurodegenerative disease. In *Open Biology* (Vol. 9, Issue 1). Royal Society Publishing. <https://doi.org/10.1098/rsob.180177>

Yamaguchi, J., Yokoyama, Y., Kokuryo, T., Ebata, T., Enomoto, A., & Nagino, M. (2018). Trefoil factor 1 inhibits epithelial-mesenchymal transition of pancreatic intraepithelial neoplasm. *The Journal of Clinical Investigation*, 128(8), 3619–3629. <https://doi.org/10.1172/JCI97755>

Yang, M., Donaldson, A. E., Jiang, Y., & Iacovitti, L. (2003). Factors influencing the differentiation of dopaminergic traits in transplanted neural stem cells. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 23(4–5), 851–864. <https://doi.org/10.1023/A:1025017423102>

Yasuhara, T., Kameda, M., Sasaki, T., Tajiri, N., & Date, I. (2017). Cell Therapy for Parkinson's Disease. *Cell Transplantation*, 26(9), 1551. <https://doi.org/10.1177/0963689717735411>

Zesiewicz, T. A., Bezchlibnyk, Y., Dohse, N., & Ghanekar, S. D. (2020). Management of Early Parkinson Disease. *Clinics in Geriatric Medicine*, 36(1), 35–41. <https://doi.org/10.1016/J.CGER.2019.09.001>

Zhang, B.-Z., Chu, H., Han, S., Shuai, H., Deng, J., Hu, Y., Gong, H., Lee, A. C.-Y., Zou, Z., Yau, T., Wu, W., Hung, I. F.-N., Chan, J. F.-W., Yuen, K.-Y., & Huang, J.-D. (2020). SARS-CoV-2 infects human neural progenitor cells and brain organoids. *Cell Research*, 30(10), 1.

<https://doi.org/10.1038/S41422-020-0390-X>

Zhang, H., Penninger, J. M., Li, Y., Zhong, N., & Slutsky, A. S. (2020). Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: molecular mechanisms and potential therapeutic target. *Intensive Care Medicine*. <https://doi.org/10.1007/s00134-020-05985-9>

Zhang, J., Xiao, T., Cai, Y., & Chen, B. (2021). Structure of SARS-CoV-2 spike protein. *Current Opinion in Virology*, 50, 173–182. <https://doi.org/10.1016/J.COVIRO.2021.08.010>

Zhang, Y., Li, Y., & Bian, L. (2019). Design and Unique Expression of a Novel Antibacterial Fusion Protein Cecropin B-Human Lysozyme to Be Toxic to Prokaryotic Host Cells. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 2019 11:4, 11(4), 1362–1369. <https://doi.org/10.1007/S12602-019-09527-8>

Znalesniak, E. B., Fu, T., Guttek, K., Händel, U., Reinhold, D., & Hoffmann, W. (2016). Increased Cerebral Tff1 Expression in Two Murine Models of Neuroinflammation. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 39(6), 2287–2296. <https://doi.org/10.1159/000447921>

飛鳥森実. (2019). パーキンソン病に対する多能性幹細胞を用いた細胞移植治療の現状. *臨床神経学*, 59(3), 119–124. <https://doi.org/10.5692/CLINICALNEUROL.CN-001235>