



UNIVERSIDAD DE PANAMÁ  
VICERRECTORIA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO  
FACULTAD DE MEDICINA



“CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y CELULAR DEL EFECTO DE LA  
SOBREENPRESIÓN DE LA PROTEÍNA CCL1 (I-309) EN EL HIPOCAMPO DE  
RATAS COMO MODELO ANIMAL”

ESTUDIANTE:

LIC. LORENA LINETH ADAMES TORRES

CÉDULA: 8-520-51

DIRECTORA DE TESIS.:

DRA. MARIA BEATRIZ CARREIRA, PH.D.

PANAMÁ, 2024

Trabajo para optar por el título de Maestría en Ciencias Biomédicas

## **DEDICATORIA**

A mi padre Daniel Adames y mi madre Griselda Torres,  
a mis hijos Lorena, Carlos y Lineth,  
y a Luis Ernesto Chen Góndola,  
quienes siempre me han apoyado e inspirado a lograr mis metas.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por guiar mi camino y bendecirme en todo momento.

A la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (SENACYT) por la oportunidad de participar y ser beneficiada en la Convocatoria Pública de Nuevos Investigadores 2019 que financió mi trabajo de investigación.

A mi asesora de tesis, la doctora María Carreira, miembro del Sistema Nacional de Investigación de SENACYT, y a todo el equipo de trabajo del Centro de Neurociencias de INDICASAT-AIP que contribuyeron en este estudio, en especial a la doctora Alanna Madrid y a los licenciados Kevin Mata y Julio Flores.

A la doctora Virginia Sánchez Pino, médico patóloga y exdirectora del Departamento de Histología Humana, Facultad de Medicina de la Universidad de Panamá, quien me animó y apoyo para que iniciara mis estudios de Maestría en Ciencias Biomédicas.

A la doctora. Maricela Urroz, directora del Departamento de Histología Humana y a la magister Hilda Acosta de Patiño, directora del CIIMET, de la Facultad de Medicina, Universidad de Panamá por autorizarme para utilizar el equipo de microscopía óptica con cámara Leica para la captura de las imágenes de mi proyecto de tesis.

Al licenciado Andrés Salazar, especialista en equipos de ALPHA MEDIQ, S.A quien amablemente me capacitó y asesoró en el uso del programa Leica Application Suite (LAS) versión 4.12.0 para la captura de imágenes de las laminillas con el microscopio óptico y la cámara fotográfica marca Leica.

## RESUMEN

El incremento de la esperanza de vida de las personas adultas ha traído como consecuencia el aumento de enfermedades crónicas como, por ejemplo, las neurodegenerativas. La enfermedad de Alzheimer es la principal causa de demencia en personas adultas y hay muchas investigaciones enfocadas en comprender el mecanismo de acción de la pérdida de sinapsis e identificar las proteínas que están implicadas. Uno de estos componentes es la proteína CCL1 (I-309) que ha sido señalada como un importante biomarcador tanto en fluido cerebroespinal como en sangre. **Objetivos:** Evaluar el efecto de la sobreexpresión de la proteína CCL1 (I-309) en la morfología celular en el hipocampo de ratas como modelo animal para comprobar si contribuye con el deterioro cognitivo al alterar la morfología celular y si afecta en el proceso de neurogénesis. **Materiales y Métodos:** Se realizó cirugías estereotáxicas a las ratas como modelo animal de la EA para tratarlas con vectores conteniendo la proteína CCL1. Se hicieron cortes histológicos coronales del cerebro para tinciones inmunohistoquímicas y de Golgi. **Conclusiones:** La sobreexpresión de la proteína CCL1 disminuyó la microgliosis, promovió la neurogénesis y no afectó la viabilidad neuronal ni el número de espinas dendríticas en el giro dentado del hipocampo, por lo que tuvo un efecto antiinflamatorio.

## GLOSARIO

- **Analgesia:** desaparición, natural o provocada, de cualquier sensación de dolor
- **Anestesia:** ausencia temporal de la sensibilidad de una parte del cuerpo o de su totalidad provocada por la administración de una sustancia química, por la hipnosis o como causa de una enfermedad
- **Astroцитos:** célula glial grande en forma de estrella que sirve de sostén de las neuronas y les ayuda a desarrollar y funcionar correctamente.
- **Citocina:** también denominadas citoquinas, son proteínas que regulan la función de las células que las producen sobre otros tipos celulares.
- **Cirugía estereotáxica:** es un tipo de cirugía de intervención quirúrgica mínimamente invasiva que utiliza un sistema de coordenadas tridimensional para localizar pequeñas estructuras dentro del cuerpo y para realizar acciones como ablación, biopsia, lesión, inyección, estimulación, implantación de dispositivos, radiocirugía, etc.
- **Demencia:** pérdida o debilitamiento de las facultades mentales, generalmente grave y progresivo debido a la edad o una enfermedad, que se caracteriza por alteraciones de la memoria y la razón y trastornos en la conducta.
- **Enfermedad de Alzheimer:** es la forma más común de demencia entre las personas mayores.
- **Enfermedades neurodegenerativas:** son incurables y debilitantes, y producen la muerte progresiva y/o la muerte de las neuronas.
- **Espinas dendríticas:** es una pequeña protuberancia en la membrana de árbol dendrítico de ciertas neuronas donde, típicamente, se produce la sinapsis con un botón axonal de otra neurona, y en ocasiones contactan varios axones.

- **GFP:** es la proteína fluorescente, por sus siglas en inglés, *Green Fluorescent Protein*. Es una proteína producida por la medusa *Aequorea victoria* que emite fluorescencia en la zona verde del espectro visible.
- **Giro dentado del hipocampo:** es una circunvolución del cerebro que se corresponde con una banda aserrada de sustancia gris, por debajo del borde medial del hipocampo y en su profundidad.
- **Hipocampo:** es un pequeño órgano situado dentro del lóbulo temporal intermedio del cerebro y crea a una parte importante del sistema límbico, la región que regula emociones. El hipocampo se asocia principal a la memoria, particularmente memoria a largo plazo.
- **Impregnación argéntica de Golgi:** es un sencillo procedimiento histológico que revela la morfología neuronal completa en tres dimensiones. Este método se fundamenta en la formación de depósitos opacos intracelulares de cromato argéntico, producto de la reacción entre el bicromato de potasio y el nitrato de plata (reacción negra).
- **Inmunohistoquímica:** la enzima o el tinte se activan cuando los anticuerpos se unen al antígeno en la muestra de tejido; de esa manera, el antígeno se puede observar al microscopio.
- **mCherry:** es un miembro de la familia mruits de proteínas fluorescentes rojas monoméricas (MRFP). Se deriva de las anémonas rojas marinas DSRED de *Discosoma*. Las fluorescentes utilizadas se usan para etiquetar como ponentes en la célula por lo que deben estudiarse por espectroscopia de fluorescencia.

- **Microglía:** son célula de la glía que funcionan como fagocitos y cuando se activan actúan como células presentadoras de antígeno y segregan citocinas.
- **Neurogénesis:** (nacimiento de nuevas neuronas) es el proceso por el cual se generan neuronas a partir de células madre y células progenitoras.
- **Neurópilo:** es la porción del tejido nervioso que contiene una trama de procesos entremezclados e interconectados de células neuronales y gliales donde ocurren la mayoría de las interacciones sinápticas.
- **Perfusión:** introducción lenta y continuada de una sustancia medicamentosa o de sangre en un organismo u órgano por vía intravenosa, subcutánea o rectal.
- **Proteína  $\beta$ - amiloide:** es un péptido de 36 a 43 aminoácidos que se sintetiza a partir de la proteína precursora amiloidea (APP)
- **Proteína CCL1:** es una quimiocina CC cuya función es atraer monocitos, linfocitos T asesinos, linfocitos B inmaduros
- **Proteína TAU:** es abundante en el sistema nervioso central (SNC) y en el sistema nervioso periférico (SNP), radica a nivel neuronal en los axones. Su función está vinculada a la unión de los microtúbulos que a su vez se asocian a la tubulina para estabilizar el citoesqueleto neuronal.
- **Vectores virales:** es un virus modificado que hace de vehículo para introducir material genético exógeno en el núcleo de una célula.

## ÍNDICE

• DEDICATORIA.....	i
• AGRADECIMIENTO.....	ii
• RESUMEN.....	iii
• GLOSARIO.....	iv
• ÍNDICE .....	vii
<b>CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>12</b>
• INTRODUCCIÓN.....	13
• ANTECEDENTES.....	16
• El sistema nervioso central .....	16
• Las células del sistema nervioso central y su rol en la EA.....	17
○ Neuronas.....	17
○ Microglía.....	18
○ Astrocitos.....	19
• Enfermedades neurodegenerativas y la EA.....	19
○ Patología de la EA.....	22
○ Sintomatología de la EA.....	24
○ Detección de la EA.....	25
○ Tratamiento de la EA.....	26
• Modelos preclínicos de la EA.....	27
○ Modelos animales transgénicos.....	27
○ Modelos animales no transgénicos.....	28
• La neurodegeneración en la EA.....	28

• La neurogénesis en la EA.....	29
• La neuroinflamación y la EA.....	30
○ La quimiocina CCL1 y la EA.....	31
CAPÍTULO II. MARCO METODOLÓGICO .....	33
• Objetivo general y específicos.....	34
• Diseño metodológico.....	35
○ Tipo de estudio.....	35
○ Muestreo.....	35
○ Materiales.....	37
○ Procedimientos.....	38
CAPÍTULO III. RESULTADOS.....	43
CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN.....	59
CONCLUSIÓN.....	64
RECOMENDACIONES.....	65
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	66
ANEXOS.....	76
○ Procedimiento de Tinción colorimétrica Iba-1.....	77
○ Procedimiento de tinción inmunohistoquímica con GFAP.....	79
○ Procedimiento de tinción colorimétrica con BrdU.....	80
○ Procedimiento de tinción colorimétrica con NeuN.....	82
○ Procedimiento de tinción Golgi.....	84

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. La estructura fisiológica del cerebro y las neuronas en (a) cerebro saludable y (b) cerebro con EA. Fuente: Breijyeh Z y Karaman R. <i>Molecules</i> (2020) .....	22
Figura 2. Función fisiológica de células gliales. Fuente: Leng F y Edison P. <i>Nature Reviews Neurology</i> (2021) .....	30
Figura 3. Distribución de las ratas Sprague Dawley según la cohorte, objetivos y las condiciones a evaluar .....	36
Figura 4. Estrategia experimental general para evaluar el efecto de sobreexpresión de CCL1 en la respuesta de los astrocitos, microglía, neuronas maduras y las espinas dendríticas en el giro dentado del hipocampo .....	39
Figura 5. Microscopía de inmunofluorescencia que muestra los astrocitos marcados con la tinción GFAP en la capa molecular del GD del corte coronal de cerebro de rata en una magnificación de 10X .....	45
Figura 6. Microscopía óptica que muestra la microglía marcada con la Tinción Inmunohistoquímica colorimétrica Iba-1 (chocolate) en la capa molecular del GD del corte coronal de cerebro de rata en una magnificación de 10X .....	48
Figura 7. Microscopía óptica que muestra las neuronas marcadas con la Tinción Inmunohistoquímica colorimétrica BrdU (chocolate) en la capa subgranular del GD del corte coronal de cerebro de rata .....	51
Figura 8. Microscopía óptica que muestra las neuronas maduras de la capa granular del giro dentado del hipocampo teñidas con la tinción inmunohistoquímica colorimétrica NeuN (chocolate) del corte coronal de cerebro de rata en una magnificación de 10X y 40X .....	54

Figura 9. Microscopía óptica que muestra las espinas dendríticas de las neuronas maduras de la capa molecular del giro dentado del hipocampo teñidas con la tinción Golgi del corte coronal de cerebro de rata en una magnificación de 100X ..... 57

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Intensidad de tinción inmunohistoquímica GFAP de los astrocitos marcados de la capa molecular del giro dentado del hipocampo de cerebro de rata según condición experimental.....	46
Gráfico 2. Número de microglías marcadas con la tinción inmunohistoquímica Iba-1 en la capa molecular del giro dentado del hipocampo según condición experimental.....	49
Gráfico 3. Número de neuronas marcadas con la tinción inmunohistoquímica BrdU en la capa subgranular del giro dentado del hipocampo de cerebro de ratas según condición experimental.....	52
Gráfico 4. Número de neuronas maduras marcadas con la tinción inmunohistoquímica NeuN de la capa granular del giro dentado del hipocampo del cerebro de rata según condición experimental.....	55
Gráfico 5. Número de espinas dendríticas de las neuronas del giro dentado del hipocampo de cerebro de rata según condición experimental, tinción Golgi.....	58

# **CAPÍTULO I:**

# **MARCO TEÓRICO**

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por alteraciones en las células neuronales con la pérdida progresiva de las mismas y su manifestación clínica dependerá del grupo neuronal afectado. La enfermedad de Alzheimer (EA) es el trastorno neurodegenerativo multifactorial más común en el mundo que causa demencia en la población adulta mayor en el 60 al 70 % de los casos; y su incidencia va en aumento debido al incremento de la esperanza de vida <sup>(1)</sup>. Inicia con una disfunción sináptica que causa la pérdida de la memoria y de las habilidades mentales de la persona de manera progresiva hasta que finalmente queda discapacitada y dependiente de sus cuidadores, lo cual repercute a nivel social y económico, convirtiéndose en un problema de salud pública. <sup>(1, 2)</sup>

Hay mayor incidencia de la forma esporádica o de inicio tardío de la EA que ocurre en personas mayores de 65 años, mientras que un 5 al 10 % de los casos de la EA son familiares o de inicio temprano en personas menores de 65 años <sup>(1)</sup>. La forma esporádica de la EA es producida por mutaciones en la proteína precursora de amiloide (APP) o en uno de los dos genes de Presenilina, que codifican para la proteína que procesa APP a  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ), que en última instancia conducen a una sobreproducción de  $A\beta$  <sup>(2)</sup>. En cuanto a la EA familiar, uno de los principales factores de riesgo es la homocigosis (dos copias) o heterocigosis (una copia) para la variante  $\epsilon 4$  del gen de la Apolipoproteína E (Apo E4) que causa la eliminación de la  $A\beta$  reducida <sup>(2, 3)</sup>.

Histológicamente, la EA se caracteriza por la acumulación de placas amiloideas y ovillos neurofibrilares en regiones específicas del cerebro. Las placas son los depósitos de péptidos  $A\beta$  agregados en el neuropilo y los ovillos son agregados de la proteína tau, que primero aparecen intracelularmente y, luego están presentes extracelularmente tras la muerte de las neuronas <sup>(2, 3, 4)</sup>. Se ha postulado que la acumulación de  $A\beta$  da inicio al desarrollo de la EA,

sin embargo, las alteraciones neuropatológicas secundarias tales como la hiperfosforilación de la proteína tau y la neuroinflamación con la consecutiva disfunción dendrítica y axonal, podrían causar el daño sináptico por sí mismos o exacerbar el daño causado por la acumulación de la A $\beta$  <sup>(4, 5)</sup>. En muchos estudios con modelos animales se ha observado que la inflamación puede jugar un papel importante en la EA, antes de que las placas y ovillos fibrilares se formen <sup>(5, 6)</sup>. Las citocinas, quimiocinas y otras proteínas solubles tienen efectos pleiotrópicos en muchos tejidos y su función es regular diversos procesos celulares tales como proliferación, supervivencia y diferenciación. En varios estudios se ha observado que las citocinas y quimiocinas tienen fuertes efectos en la amiloidosis, neurodegeneración y cognición <sup>(7)</sup>.

En la actualidad se utilizan técnicas de imágenes del cerebro (resonancia magnética y tomografía computarizada) y biomarcadores (péptidos y proteínas del fluido cerebroespinal) como métodos diagnósticos para confirmar la presencia o ausencia de la EA con muy buenos resultados <sup>(2, 8)</sup>, pero el diagnóstico es tardío, cuando ya hay síntomas avanzados de la enfermedad. Las técnicas de imágenes no detectan el estadio temprano que precede a los síntomas que ocurre 20 a 25 años antes de que se formen los depósitos de proteínas intra y extracelulares. Muchas investigaciones se han enfocado en conocer el mecanismo de acción de pérdida de sinapsis y las proteínas involucradas en esta enfermedad mediante el uso de modelos animales con la esperanza de prevenir su aparición y progreso mediante la detección de los estadios tempranos y la fabricación de medicamentos y/o terapias específicas para contrarrestar o reducir los efectos de esta enfermedad <sup>(8, 9)</sup>.

Se ha propuesto que la inflamación del cerebro ocurre tempranamente en los estadios preclínicos de la EA y puede jugar un papel en la patología de la enfermedad; además de

que se sugiere que el proceso inflamatorio del cerebro envuelve tanto el componente celular como molecular, por ejemplo: las citocinas <sup>(10)</sup>. En consecuencia, se están realizando diligentes esfuerzos por establecer pruebas diagnósticas que detecten el Deterioro Cognitivo Leve (MCI, por sus siglas en inglés de Mild Cognitive Impairment) antes de que se desarrolle la EA mediante el uso de biomarcadores en sangre <sup>(8)</sup>. Muchos investigadores han estudiado las proteínas en el plasma de personas afectadas con MCI o con EA y han concluido que es posible crear una prueba basada en sangre que sea comparable en exactitud con las pruebas del fluido cerebroespinal <sup>(8, 11)</sup>.

En el 2016, Panama Aging Research Initiative (PARI) publicó el primer reporte del perfil proteómico de una cohorte de panameños con EA, MCI y personas sanas (grupo control). PARI analizó 24 proteínas utilizadas como biomarcadores en sangre demostrando su utilidad, siendo la proteína I-309 (CCL1) quien tuvo mayor significancia estadística, tanto en personas con EA y MCI que en el grupo control, similar a lo detectado en otros estudios <sup>(11, 12)</sup>.

Los modelos animales para la EA más utilizados son las ratas y ratones por su practicidad; sin embargo, los roedores no sufren de forma natural de esta enfermedad, por lo que, para realizar estos experimentos, se pueden utilizar ratones modificados genéticamente (transgénicos) que produzcan las proteínas implicadas en esta enfermedad <sup>(6)</sup>, o se puede utilizar ratas o ratones comunes, a los cuales se le aplica micro-inyecciones de proteínas en regiones específicas del cerebro <sup>(13, 14, 15)</sup>.

El objetivo general de este estudio fue evaluar el efecto de la sobreexpresión de la proteína CCL1 (I-309) en la morfología de las células localizadas en el hipocampo de ratas como modelo animal de la EA.

## ANTECEDENTES

- **El sistema nervioso central.**

El sistema nervioso tiene como función principal controlar e integrar todas las actividades del organismo ante los estímulos externos e internos. El sistema nervioso se clasifica anatómicamente en sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso periférico (SNP). El SNC comprende el encéfalo y la médula espinal contenidas en la cavidad craneana y la columna vertebral, respectivamente. El encéfalo está constituido a su vez en: dos hemisferios cerebrales, el tallo cerebral (diencéfalo, mesencéfalo, puente y médula oblongada) y el cerebelo; y está protegido por el cráneo, las meninges y el líquido cerebroespinal. El SNP lo componen los nervios craneales, espinales y periféricos que conducen impulsos desde el SNC y hacia él, los ganglios y las terminaciones nerviosas especializadas <sup>(16)</sup>.

El encéfalo se divide en regiones anatómicas que realizan diferentes funciones, es por ello, que en base al patrón de signos y síntomas que presenta una persona con una lesión cerebral, se puede deducir la región afectada y la probable patología. La corteza entorrinal, el hipocampo y la neocorteza son áreas del cerebro que están relacionadas con la memoria y otras habilidades mentales, por esa razón, cuando están afectadas por los efectos de la EA que causa demencia <sup>(4)</sup>.

El hipocampo es una estructura marginal, pareada, con dos mitades en ambos hemisferios cerebrales, localizada en el lóbulo temporal y que se subdivide en campos designados como Cuerno de Ammon (CA<sub>1</sub>, CA<sub>2</sub>, CA<sub>3</sub> y CA<sub>4</sub>). El CA<sub>1</sub> o sector de Sommer es el campo hipocámpico más grande en los humanos y vulnerable a la anoxia e isquemia; CA<sub>2</sub> y CA<sub>3</sub> son resistentes y menos sensibles, y CA<sub>4</sub> o sector de Bratz es una zona de transición entre el hipocampo y el giro dentado. El giro dentado es una estructura de tres láminas: una capa

molecular, una de células granulosas y otra subgranular o polimórfica. En el hipocampo hay dos tipos de neuronas: las neuronas principales que tiene forma piramidal con axones que contribuyen al campo eferente del hipocampo, y las neuronas intrínsecas que son polimórficas y sus axones permanecen dentro del hipocampo y se ramifican entre las neuronas principales <sup>(17)</sup>.

- **Las células del Sistema Nervioso Central y su rol en la EA**

Las células que componen el SNC son las neuronas y la neuroglia. La neuroglia se compone de microglía, astrocitos, oligodendrocitos y células ependimarias. El encéfalo es un órgano con algunos privilegios inmunitarios, pero que tiene la capacidad de responder inmunológicamente ante una injuria. Los elementos inflamatorios que se producen en el encéfalo son producidos por las células locales: las neuronas, astrocitos y microglía, las cuales producen más de 40 proteínas que intervienen en las lesiones producidas por la EA como también de las citocinas proinflamatorias <sup>(18)</sup>.

- **Neuronas:** La neurona es la principal unidad funcional del Sistema Nervioso Central y tiene la capacidad única de comunicarse con otras células a través de áreas especializadas de contacto llamadas sinapsis. Las neuronas presentan un cuerpo o pericarión (que contiene el núcleo) y todos sus procesos (axón y dendritas). El axón es la parte efectora y las dendritas son el área receptora primaria. El número y patrón de ramificación de las dendritas varía de acuerdo, al tipo de neurona y su función. Las dendritas presentan en su superficie proyecciones especializadas diminutas llamadas espinas dendríticas o gémulas, que representan sitios de contacto sináptico con terminales de axón de otras neuronas <sup>(19)</sup>, por tal motivo, si ocurren cambios en el número y forma de las espinas dendríticas se puede alterar su dinámica <sup>(2, 4, 6, 18)</sup>. Se ha demostrado por microscopía electrónica que pacientes con

EA presentan una significativa pérdida de sinapsis y que su capacidad cognitiva se correlaciona con la densidad sináptica. Se ha postulado que la acumulación de la proteína A $\beta$ , seguido por la hiperfosforilación de la proteína tau y la inflamación provocan la disminución de las espinas dendríticas, la disfunción axonal-dendrítica y la pérdida de sinapsis <sup>(2, 3, 6)</sup>. Incluso, algunos investigadores como Ramírez et. al. han sugerido que la acumulación de la proteína A $\beta$  altera la neurogénesis en el giro dentado de hipocampo <sup>(20)</sup>. La neurotoxicidad producida por la A $\beta$  en el hipocampo, la amígdala y corteza cerebral provoca la neuroinflamación y neurodegeneración con pérdida de sinapsis que producen el deterioro cognitivo <sup>(9, 14, 15, 21)</sup>.

- **Microglía:** La microglía representa los macrófagos residentes del encéfalo, por ende, juega un papel importante en la respuesta inmunológica innata y en la respuesta inflamatoria de múltiples desórdenes neurológicos, como la EA, ya que expresan mediadores clásicos proinflamatorios y antiinflamatorios, y receptores en la superficie de su membrana <sup>(16, 22)</sup>. La microglía se activa en respuesta a una lesión tisular o a infecciones en el cerebro, actúa removiendo los patógenos potenciales y su detritus, y secreta factores de reconstrucción tisular mediante la fagocitosis. La microglía también expresa receptores asociados a la activación inflamatoria, receptores de citocinas, quimiocinas, receptor de complemento (C3), entre otros. El sistema de complemento, las citocinas y la acción fagocítica de la microglía son los principales elementos que actúan en la reacción inflamatoria y se ha propuesto que contribuyen a la patogénesis de la EA <sup>(23)</sup> por diferentes vías, como por ejemplo: la inducción de indoleamina 2,3-dioxigenasa que aumenta los niveles del ácido quinolínico (factor neurotóxico y que promueve la hiperfosforilización de tau; y la producción de citocinas antiinflamatorias que pueden ejercer efectos protectores

contra la EA, la cual se evidencia en el éxito de algunos medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) que retrasan el progreso de la EA. pero no puede prevenir la formación de las placas de A $\beta$  <sup>(24)</sup>.

- **Astroцитos:** Los astroцитos son las células más grandes de la neuroglia que proveen sostén físico y metabólico a las neuronas del SNC. Los astroцитos se clasifican en dos tipos: protoplasmáticos, que se encuentran en la sustancia gris, y los astroцитos fibrosos, que son más comunes en la sustancia blanca. Todos los astroцитos contienen en común haces prominentes de filamentos intermedios compuestos de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) <sup>(16)</sup>. En la EA, los astroцитos se unen a la A $\beta$  y secretan algunos mediadores proinflamatorios tales como interleucinas, prostaglandinas, leucotrienos, y tromboxanos <sup>(4)</sup>. La gliosis se refiere a la hipertrofia e hiperplasia de los astroцитos ante una lesión del SNC, y en la EA se puede observar astroцитos reactivos cercanos a A $\beta$  <sup>(25)</sup>.

- **Enfermedades Neurodegenerativas y la EA**

Las enfermedades neurodegenerativas son trastornos que se caracterizan por una pérdida progresiva de neuronas, que típicamente afectan grupos neuronales con funciones similares, aunque no se encuentren adyacentes. La acumulación de agregados de proteína es un proceso patológico muy común en las enfermedades neurodegenerativas, tales como: la EA, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington, y que puede ser causada por mutaciones genéticas o por desequilibrio en la síntesis y eliminación de las proteínas <sup>(26)</sup>. La acumulación de estas proteínas anómalas crea un ambiente tóxico y de estrés para las neuronas <sup>(4)</sup>.

Las enfermedades neurodegenerativas que afectan la región neocortical del cerebro manifiestan alteraciones cognitivas que conducen a la demencia. La demencia se refiere al

deterioro de la capacidad mental de la persona que interfiere con su vida cotidiana, y uno de sus síntomas es la pérdida de memoria. Esto es causado cuando las células neuronales sufren daños que le impiden comunicarse entre ellas.

La EA es la enfermedad neurodegenerativa que comúnmente causa demencia, mientras que otras enfermedades, tales como: demencia vascular, demencia por cuerpos de Lewy y un grupo de enfermedades que contribuyen a la demencia frontotemporal también la pueden ocasionar con menor frecuencia <sup>(1, 4, 26)</sup>. En muchas ocasiones, pueden coexistir dos o más de estas enfermedades en un solo paciente.

La memoria se define como la facultad psíquica por medio de la cual se retiene y recuerda el pasado. Hay dos tipos de memoria <sup>(17)</sup>:

1) **Memoria de corto plazo (inmediata, reciente, de trabajo)**: se refiere al recuerdo de una cantidad limitada de información por un periodo corto (ejemplo: un número telefónico).

2) **Memoria de largo plazo (remota)**: recuerdos de una cantidad ilimitada de datos por un periodo que varía entre minutos y horas. La memoria de largo plazo se divide a su vez en:

2.1. **Memoria explícita (declarativa)**: es el recuerdo de aprendizajes y retención de hechos y la recolección consciente de hechos anteriores (saber qué) y se accede a ella de manera consciente.

2.2. **Memoria implícita (de procedimientos)**: es el recuerdo de habilidades y retención de habilidades (saber cómo) y que se realiza de manera inconsciente.

La amnesia se define como la pérdida total o parcial de la memoria que impide recordar o identificar experiencias o situaciones pasadas. La amnesia retrógrada es aquella que ocurre cuando se pierde la memoria de los eventos anteriores a la presencia de la enfermedad y la amnesia anterógrada es aquella en donde la persona afectada pierde la capacidad de adquirir nuevos conocimientos. La amnesia global ocurre cuando no se puede recuperar la

información por ningún canal sensitivo y la amnesia de modalidad específica es la incapacidad para recuperar información a través de un canal específico. La amnesia puede ser permanente o transitoria dependiendo de la causa que la ocasionó <sup>(17)</sup>.

La EA es una enfermedad neurodegenerativa progresiva que causa daño en las capacidades y habilidades cognitivas, la pérdida de memoria es progresiva, ya que afecta primero la memoria de corto plazo, posteriormente la memoria de largo plazo, y finalmente la amnesia permanente. Alrededor del 70% al 80% de los casos de demencia en la población adulta mayor en el mundo es causada por la EA y su incidencia es alta en personas mayores de 65 años, pero existen casos esporádicos o de inicio temprano de la EA en personas menores de 65 años <sup>(1, 2)</sup>.

En los últimos años se ha incrementado la tasa de la población adulta mayor a nivel mundial, lo que ha traído como consecuencia el incremento de las enfermedades relacionadas a este grupo de edad como, por ejemplo, la demencia causada por la EA. Según datos de la OMS, la demencia afectó a 47 millones de personas a nivel mundial (5% de la población adulta mayor) y se pronostica que el número total de personas con demencia alcanzará los 75 millones en 2030 y 132 millones en 2050, con un mayor incremento en los países con ingresos bajos y medios <sup>(1)</sup>.

La demencia causa discapacidad y dependencia en los adultos mayores, y esto ocasiona un impacto financiero y humano tanto para el individuo que la padece, como también a sus familiares y la sociedad en donde habitan. La OMS reconoce la demencia como una prioridad de salud pública, por tal motivo, ha implementado un Plan de acción mundial sobre la respuesta pública a señales de demencia 2017- 2025 en donde se plantea lograr el bienestar físico, mental y social para personas con demencia, sus cuidadores y familiares;

con la visión de un mundo en donde la demencia sea prevenible y quienes la padezcan tengan una vida más digna <sup>(1)</sup>.

- **Patología de la EA**

En 1906, el Dr. Alois Alzheimer, un psiquiatra alemán, fue el primero en describir el síndrome clínico patológico que observó en su paciente llamada Auguste D., una mujer de 51 años que presentaba pérdida de memoria progresiva, función cognitiva desordenada, comportamiento alterado y una progresiva disminución de la función del lenguaje. Luego de la muerte de la mujer a la edad de 55 años, examinó su cerebro atrófico uniformemente afectado sin focos macroscópicos, y al observar la preparación histológica al microscopio observó alteraciones morfológicas, tales como fibrillas dentro de las neuronas y depósitos extracelulares de una sustancia desconocida en ese entonces <sup>(27)</sup>. Más de un siglo después, se reconoce que la EA es una enfermedad neurodegenerativa multifactorial, que se caracteriza por la acumulación anómala de péptido A $\beta$  y de la proteína tau en regiones específicas del cerebro (**Figura 1**).

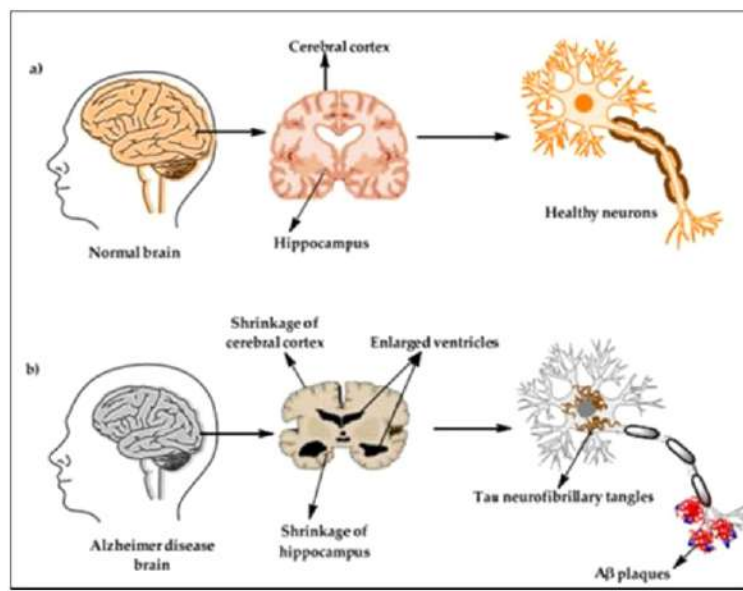


Figura 1. La estructura fisiológica del cerebro y las neuronas en (a) cerebro saludable y (b) cerebro con EA. Fuente: Breijyeh Z y Karaman R. *Molecules* (2020)

En los cortes cerebrales de pacientes que padecieron la EA avanzada se puede observar anatómicamente los signos de atrofia bilateral y difusa. Histológicamente, las dos características patológicas principales de la EA son las placas neuríticas (depósitos de A $\beta$  agregados en el neurópilo), y los ovillos neurofibrilares (agregados de la proteína tau) que aparecen intracelularmente y luego extracelularmente posterior a la muerte celular <sup>(2, 4)</sup>. Las placas pueden aparecer difusas, las cuales no contiene fibrillas, y son detectadas solo con tinciones de inmunohistoquímica usando anticuerpos dirigidos contra epítomos APP o agregados, y estas pueden teñirse con tintes específicos para agregados fibrilares tales como el rojo Congo o tioflavina S <sup>(6)</sup>.

- **Factores de riesgo de la EA:** Los factores de riesgo asociados a la enfermedad de Alzheimer son los siguientes:
  - **Edad:** afecta mayormente a las personas adultas mayores de 65 años de edad <sup>(1)</sup>.
  - **Genética:** la forma esporádica o tardía de la EA puede ser causada por mutaciones genéticas en la proteína precursora de amiloide (APP) o en uno de los dos genes presenilina (PS1 y PS2), que codifican para la enzima que procesa APP a A $\beta$  que en última instancia conducen a una sobreproducción de A $\beta$  <sup>(2, 3, 4, 6)</sup>. La forma temprana de la EA ocurre en personas menores de 65 años, tiene un componente familiar o hereditario y representa un 5% a 10% de los casos de EA. Uno de los principales factores de riesgo de este tipo de EA familiar es la homocigosis para la variante  $\xi$ 4 del gen de la Apolipoproteína E (Apo  $\xi$ 4) que causa la eliminación de la A $\beta$  reducida <sup>(2, 3, 6)</sup>
  - **Factores de riesgo ambiental:** algunos incluyen la contaminación del aire, dietas altas en grasas saturadas, la exposición a metales tóxicos (aluminio, cadmio), e infecciones tales como por *Herpes virus simple-1*, *Treponema*

*pallidum*, *Chlamydia pneumoniae* <sup>(2)</sup>. Se han relacionado otros factores que contribuyen al desarrollo de la demencia como, por ejemplo: el consumo excesivo de alcohol <sup>(28)</sup>.

- **Factores médicos:** la enfermedad cardiovascular, la obesidad y la diabetes predisponen a la persona que pueda padecer la EA <sup>(2)</sup>.

- **Sintomatología clínica de la EA**

La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad progresiva que inicia muchos años antes de que se presenten los síntomas clínicos, por lo cual este período se le conoce como Alzheimer preclínico, en donde no se presentan síntomas clínicos evidentes. La EA causa demencia a quien la padece de forma progresiva y su evolución es diferente en cada persona de acuerdo, a su personalidad al inicio de la enfermedad.

La etapa inicial de la EA ocurre de manera sigilosa con leve pérdida de memoria episódica para recordar detalles de eventos recientes, nombre de personas y objetos, además de desorientación en tiempo y espacio. En la etapa prodromal, denominada MCI, los síntomas son más evidentes y limitantes, tales como amnesia de acontecimientos recientes y de nombres de personas, dificultad para comunicarse, cambios de comportamiento y requieren de ayuda para su cuidado personal. En la etapa tardía o de EA, la dependencia e inactividad es casi total debido a la pérdida de la memoria, desubicación de tiempo y espacio, problemas para reconocer familiares y amigos, mal comportamiento que puede tornarse agresivo que lo discapacita y lo lleva a la muerte <sup>(29)</sup>.

La severidad de la EA correlaciona con la presencia de los ovillos neurofibrilares, mientras que las placas seniles de A $\beta$  se observan en la fase sintomática temprana de la EA temprana. Los ovillos fibrilares de la tau hiperfosforilada se pueden observar en la corteza entorrinal y en el hipocampo en las fases tardías de la EA <sup>(4)</sup>.

- **Detección de la EA**

Por muchos años, la única forma de confirmar la EA en una persona con signos de demencia era post mortem, mediante el análisis histopatológico para determinar la presencia de placas seniles en el cerebro. En la actualidad, cuando una persona presenta síntomas clínicos sospechosos de EA, el médico evalúa primero su historial clínico y farmacológico, y los antecedentes patológicos personales y familiares, realiza pruebas psicológicas y solicita pruebas físicas, tales como pruebas de laboratorio para descartar que la causa sea por otros factores, tales como por ejemplo la deficiencia de Vitamina B12 <sup>(2)</sup> y de imágenes del cerebro (resonancia magnética, tomografía computarizada y tomografía por emisión de positrones) para confirmar la EA. La resonancia magnética permite medir la atrofia cerebral, la mientras que, la tomografía por emisión de positrones (TEP) es la más útil porque puede detectar la presencia de A $\beta$  <sup>(7)</sup>. La desventaja tanto de la resonancia magnética y de las tomografías es que son métodos costosos y que confirman la EA en su estadio avanzado.

Se han realizado muchos estudios para determinar los paneles de biomarcadores en el líquido cefalorraquídeo (LCR) que permitan confirmar la EA en sus etapas preclínicas y clínicas <sup>(30)</sup>. La desventaja de estudiar el LCR es que la técnica de obtención de la muestra conlleva riesgos para el paciente y debe ser realizada y analizado por profesional de salud capacitado.

Varios investigadores han demostrado la utilidad de los biomarcadores en el suero de sangre periférica como una técnica de diagnóstico de las etapas preclínicas y clínicas de la EA que tiene el beneficio que es más fácil de tomar la muestra, menos riesgo para el paciente y más económico comparado con la muestra de LCR. Hay biomarcadores que son

productos de la degeneración neuronal y otros que son proteínas inflamatorias que se producen en la etapa preclínica y clínica de la EA <sup>(12, 30 31)</sup>.

- **Tratamiento de la EA**

En la actualidad, no existe medicamentos que curen la EA, ya que es irreversible, se han fabricado medicamentos que ayudan a retrasar su progreso y aliviar algunos de sus síntomas. Food and Drug Administration (FDA) ha aprobado el uso de cinco medicamentos para tratamiento farmacológico de la EA que actúan contra los síntomas de la enfermedad de Alzheimer; cuatro de los medicamentos son inhibidores de la colinesterasa (Tacrina, Donepezilo, Rivastigmina y Galantamina) y uno, la Memantina, que bloquea de forma no competitiva el receptor NMDA. La memantina tiene un aparente efecto neuroprotector que previene la pérdida de las neuronas <sup>(32)</sup>.

Se han realizado estudios enfocados en las citocinas proinflamatorias relacionadas a la neuroinflamación que contribuyen en la patogénesis de la EA, con el objetivo de crear estrategias terapéuticas que contribuyan a detener la progresión de la enfermedad <sup>(5, 12)</sup>, como por ejemplo el estudio realizado por Nasiri et al donde concluyeron que la inhibición del factor inhibidor de migración de macrófagos (MIF) puede servir de estrategia terapéutica para disminuir la neurodegeneración y la progresión de la enfermedad de Alzheimer <sup>(33)</sup>.

Recientemente se están haciendo ensayos clínicos con anticuerpos monoclonales (mab) anti-A $\beta$ , como por ejemplo Aducanumab y Lecanemab que prometen ser útiles en la inmunoterapia para el tratamiento de la EA <sup>(34)</sup>.

Se ha observado que varios estudios epidemiológicos apoyan la posibilidad de que los medicamentos anti- inflamatorios en pacientes con EA pueden ser terapéuticos <sup>(18)</sup>.

- **Modelos pre-clínicos de la EA**

Los estudios preclínicos son útiles para investigar todos los aspectos relacionados a los mecanismos biológicos de acción y desarrollo de las enfermedades. Los modelos animales experimentales son un ejemplo de estudios preclínicos que sirven para descubrir si un procedimiento, medicamento o tratamiento puede ser útil en seres humanos.

Muchas investigaciones se han enfocado en conocer el mecanismo de la neurodegeneración, neuroinflamación y las proteínas involucradas en esta enfermedad mediante el uso de modelos animales, siendo las ratas y los ratones más utilizados por su practicidad. Debido a que los ratones no sufren de manera natural de la EA, se utilizan ratones modificados genéticamente (ratones transgénicos) para que produzcan las proteínas implicadas en esta enfermedad o se puede utilizar ratones comunes, a los cuales se les aplica inyecciones del péptido A $\beta$  en regiones específicas del cerebro <sup>(20)</sup> para que produzcan algunas de las alteraciones histológicas, tales como amiloidosis, pérdida de sinapsis y neuronas, hiperfosforilación tau e inflamación que ha permitido una mejor comprensión de la neurotoxicidad de la beta amiloide <sup>(6, 15, 35)</sup>.

- **Modelos animales transgénicos:** En las últimas dos décadas se han desarrollado ratones genéticamente manipulados (transgénicos) como modelos animales para la investigación de la EA. La producción de modelos animales transgénicos es muy costosa, pero proporciona resultados muy fiables y reproducibles en las investigaciones. Las líneas de ratones transgénicos más utilizadas que albergan genes humanos mutados van desde locus como APP, PSEN1, APOE $\epsilon$ 4, relacionadas a la producción de  $\beta$ -amiloide, modelos de ratón basados en mutaciones de Mapt relacionadas con tauopatía <sup>(36)</sup>. En el estudio de Pan H, et al, utilizaron dos grupos de ratones transgénicos que sobreexpresan la

proteína precursora humana precursora de amiloide (hAPP) y compararon los resultados con un grupo control de ratones no transgénicos para evaluar la neurogénesis en el hipocampo. Los ratones transgénicos presentaron distorsión en la neurogénesis adulta, mientras que en el grupo control no tuvo ningún efecto <sup>(35)</sup>.

- **Modelos animales no transgénicos:** Los modelos animales no transgénicos utilizados en la EA consisten en animales criados en bioterios bajo condiciones estándares a quienes se les administra  $A\beta_{1-42}$  mediante inyecciones en zonas específicas del cerebro para producir las características histopatológicas de la EA humana y producir la disfunción de la memoria espacial <sup>(15)</sup> y disminuir el número de espinas dendríticas y alterar la neurogénesis en el giro dentado del hipocampo <sup>(20)</sup>.

- **La neurodegeneración en la EA**

La neurodegeneración se produce por la acumulación de ovillos neurofibrilares y placas amiloides, como también por neuroinflamación, estrés oxidativo y lesión de las neuronas colinérgicas <sup>(2)</sup>. Se postula que la toxicidad de la  $A\beta$  causa la hiperfosforilación de la proteína tau y que los cambios inflamatorios son como reacciones endógenas por la presencia del estímulo tóxico, lo cual causa la disfunción sináptica que produce el déficit cognitivo de la persona que padece EA.

La hipótesis de la cascada amiloide es la más aceptada como la pieza central que desencadena la patogénesis de la EA <sup>(5)</sup>, sin embargo, McGeer et al sugieren que no es la única, ya que la respuesta inflamatoria inducida por la acumulación de  $A\beta$  puede causar daño sináptico antes que se formen las placas de  $A\beta$  (etapa preclínica) <sup>(7)</sup>. Si bien la hipótesis de la cascada de amiloide no está exenta de controversia, existe amplia evidencia

de que el péptido  $A\beta$  y la proteína tau hiperfosforilada, así como la inflamación resultante, pueden dañar la función sináptica <sup>(18)</sup>. El estudio de los mecanismos que producen la pérdida de sinapsis puede ayudar a comprender mejor la enfermedad, y en un futuro prevenir su aparición y el progreso mediante la fabricación de medicamentos y/o terapias específicas.

- **La neurogénesis en la EA.**

La neurogénesis es el proceso por el cual se generan nuevas neuronas a partir de células madre y células progenitoras durante el desarrollo natal y recientemente se ha reportado en el adulto. La neurogénesis adulta solo se genera en dos partes del cerebro del mamífero adulto: la zona subgranular del giro dentado del hipocampo y la zona ventricular de los ventrículos laterales <sup>(37)</sup>.

Algunos estudios han reportado la disminución de la neurogénesis adulta en personas con EA ya que la presencia de péptidos de  $A\beta_{25-35}$  afecta la recuperación de la memoria al disminuir el número de espinas dendríticas <sup>(37)</sup>, mientras que otros investigadores han formulado la hipótesis que la EA estimula la neurogénesis como un método natural de compensar la pérdida de neuronas. En el estudio realizado por Pan et al, demostraron que la neurogénesis se afectó en el giro dentado del hipocampo de los ratones manipulados genéticamente para sobreexpresar la proteína precursora amiloide humana (hAPP) en comparación con los controles. Incluso hubo diferencias entre los dos grupos transgénicos experimentales, en donde los ratones hAPP-I5 causaron deterioro severo en la neurogénesis adulta en comparación con los ratones hAPP-J20 que producía niveles más alto de  $A\beta$ , por lo que llegaron a la conclusión que la  $A\beta$  no es el principal factor que afecta la neurogénesis en el hipocampo de adulto <sup>(36)</sup>.

- **La neuroinflamación y la EA.**

La respuesta inflamatoria del sistema nervioso central se activa ante factores exógenos y endógenos que afectan la homeostasis celular como, por ejemplo: procesos infecciosos o traumatismos (**Figura 2**).

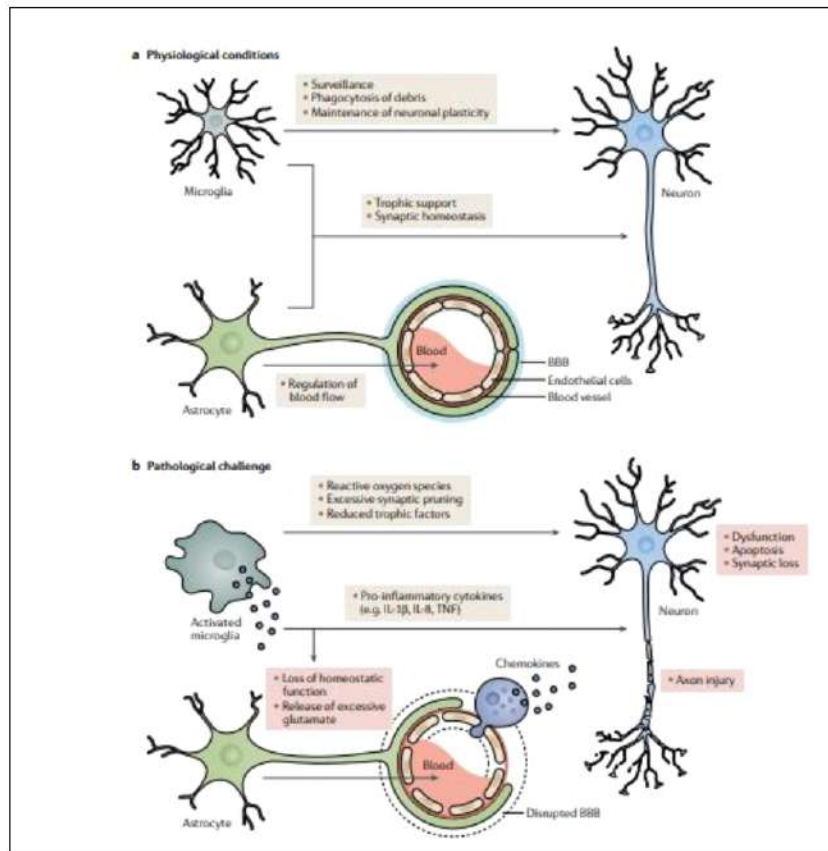


Figura 2. Función fisiológica de células gliales. Fuente: Leng F y Edison P. *Nature Reviews Neurology* (2021).

La acumulación anómala de A $\beta$  y Tau conduce a una respuesta inflamatoria de la microglía que libera moléculas tales como citocinas proinflamatorias que pueden causar daño neuronal y degeneración <sup>(22)</sup>. Recientemente, se ha demostrado en estudios preclínicos y clínicos que la respuesta inflamatoria inicia muchos años antes que se formen las placas seniles y los ovillos neurofibrilares, en el estadio pre-clínico de la EA, como un método de defensa y búsqueda de la homeostasis celular <sup>(7, 10)</sup>.

Las células gliales como los astrocitos contribuyen en las enfermedades neurodegenerativas<sup>(38)</sup>. A medida que las neuronas mueren envían un estímulo inflamatorio que con el tiempo se hace crónica exacerbando el fenotipo y el desarrollo de la EA. Actualmente se analizan estas proteínas inflamatorias como marcadores de EA en el líquido cefalorraquídeo para determinar el estadio de la enfermedad y en la identificación de proteínas inflamatorias útiles en la búsqueda de medicamentos antiinflamatorios que reduzcan el progreso de la enfermedad<sup>(32)</sup>. Brosseron et al, observaron una interrelación entre tres marcadores que indican neurodegeneración (ferritina, proteína de unión a ácidos grasos 3 (FABP-3) y neurogranina) con marcadores de proteínas inflamatorias en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con EA<sup>(31)</sup>. Se están realizando muchas investigaciones para estudiar las proteínas involucradas en la neuroinflamación y su participación en la evolución de la EA. Una de ellas son las quimiocinas, que son producidas por la microglía, muchas de las cuales se desconoce su rol en la EA<sup>(23, 24)</sup>.

- **La quimiocina CCL1 y la EA:** Las quimiocinas en la EA regulan la migración microglial y el reclutamiento de los astrocitos al área de la inflamación que se produce por el depósito de A $\beta$ . La CCL1 promueve la infiltración de linfocitos T reguladores en el cerebro de ratones que suprime la astrogliosis, posibilitando la recuperación neurológica después de un accidente isquémico<sup>(39)</sup>.

Se han realizado investigaciones para conocer su función específica en la EA. En el estudio de Jordán et al, 2019, observaron que hubo una mayor expresión de CCL1 en los ratones control (tipo salvaje) en comparación con los ratones transgénicos con APP/PS1, detectando cambio en la expresión del receptor CCR8 y su quimiocina, CCL1 en ratones transgénicos. La expresión del CCR8 se incrementó

en los ratones transgénicos, lo que indicó un aumento en la expresión del receptor para proporcionar una regulación a la baja de su quimiocina CCL1<sup>(40)</sup>.

Gupta et al, analizaron un panel de 14 biomarcadores en la sangre de una cohorte de australianos con EA y encontraron niveles altos de apolipoproteína J y quimiocina-309 (I-309) en el grupo con EA comparado con el grupo control (personas saludables)<sup>(30)</sup>. En el meta-análisis realizado por Zhou et al<sup>(41)</sup>, encontraron que hubo diferencias significativas en la presencia de quimiocina CCL1 al comparar muestras de sangre de personas con EA y MCI, al igual que las quimiocinas CXCL9 y CX3CL1, por lo que concluyen que podrían servir de base para marcadores moleculares de deterioro cognitivo.

En un estudio realizado en Panamá por PARI, identificaron el perfil proteico en sangre de un grupo de personas adultas diagnosticadas con EA y/o deterioro cognitivo leve y demostraron la presencia de la quimiocina I-309 (CCL1) elevada lo cual lo hace un biomarcador de primera elección<sup>(12)</sup>. La quimiocina I-309 atraen y reclutan células inflamatorias al sitio de la lesión y su aumento constante en pacientes con deterioro cognitivo leve puede indicar un aumento de la lesión cerebral o bien un mecanismo para promover la neurogénesis, que es un proceso que se ha propuesto como compensatorio en la EA<sup>(37)</sup>.

El estudio de los mecanismos que producen la pérdida de sinapsis puede ayudar a comprender mejor la enfermedad, y en un futuro prevenir su aparición y el progreso mediante la fabricación de medicamentos y/o terapias específicas. Por ello, es importante los estudios de ciencias básicas para comprender el rol de las quimiocinas involucradas en la EA como la CCL1 (I-309) en la morfología celular del hipocampo

# **CAPÍTULO II: MARCO METODÓLOGICO**

## **OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS**

### **OBJETIVO GENERAL:**

Evaluar el efecto de la sobreexpresión de la proteína CCL1(I-309) en la morfología celular en el hipocampo de ratas como modelo animal

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

1. Evaluar el estadio de células gliales (microglía y astrocitos) de la capa molecular del giro dentado del hipocampo en las cohortes de ratas tratadas con infusión del vector AAV-GFP + mCherry, AAV-CCL1-mCherry y AAV-A $\beta_{1-42}$ -GFP+ CCL1-mCherry.
2. Comparar los estadios del proceso de neurogénesis en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo de las cohortes de ratas tratadas con infusión del vector AAV-GFP + mCherry, AAV-CCL1-mCherry y AAV-A $\beta_{1-42}$ -GFP+ CCL1-mCherry.
3. Comparar el número de espinas dendríticas de las neuronas del giro dentado del hipocampo en las cohortes de ratas tratadas con infusión del vector AAV-GFP + mCherry, AAV-CCL1-mCherry y AAV-A $\beta_{1-42}$ -GFP+ CCL1-mCherry.

## DISEÑO METODOLÓGICO

- **TIPO DE ESTUDIO**

Se realizó un estudio experimental controlado con dos cohortes de ratas Sprague Dawley de aproximadamente 250 gramos (**Figura 3**). Las dos cohortes de ratas jóvenes se mantuvieron bajo condiciones estándares con libre acceso a agua y comida en un ciclo de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad siguiendo las normas establecidas por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de INDICASAT AIP. (Aprobado el 8 de julio de 2019 mediante la nota CICUA19-006).

- **MUESTREO**

Las ratas se dividieron en dos cohortes:

- **Cohorte N°1:** para la evaluación de glías (objetivo 1) y la neurogénesis (objetivo 2) en el giro dentado del hipocampo, las ratas fueron tratadas con tres vectores: AAV-GFP + mCherry (control negativo), AAV-GFP + CCL1-mCherry y AAV- $A\beta_{1-42}$ -GFP + CCL1-mCherry de Vector Biolabs en el área CA1 del hipocampo. Se evaluó el efecto de CCL1 en la formación de nuevas neuronas (división, grupo de ratas 1 en tabla) y en la integración/maduración de nuevas neuronas (maduración, grupo 2 de ratas).
- **Cohorte N°2:** para la evaluar las espinas dendríticas en el giro dentado del hipocampo (objetivo 3) las ratas fueron tratadas con tres vectores: AAV-GFP + mCherry (control negativo), AAV-GFP + CCL-1 mCherry (experimental) y AAV- $A\beta_{1-42}$ -GFP + CCL1 mCherry de Vector Biolabs en el área CA1 del hipocampo.

Cohorte	Objetivo	Grupos de ratas	Condición (Vectores AAV)	Nº de de ratas por condición
1	1	1	1. AAV-GFP + mCherry	6
			2. AAV-GFP + CCL1 mCherry	6
			3. AAV-A $\beta_{1-42}$ -GFP + CCL1 mCherry	6
	2	2 (División y maduración)	1. AAV-GFP + mCherry	6
			2. AAV-GFP + CCL1 mCherry	6
			3. AAV-A $\beta_{1-42}$ -GFP + CCL1 mCherry	6
2	3	3	1. AAV-GFP + mCherry	3
			2. AAV-GFP + CCL1 mCherry	3
			3. AAV-A $\beta_{1-42}$ -GFP + CCL1 mCherry	3
<b>Total de ratas (N)</b>				<b>45</b>

Figura 3. Distribución de las ratas Sprague Dawley según la cohorte, objetivos y las condiciones a evaluar

- **MATERIALES Y EQUIPOS UTILIZADOS**

<b>Materiales</b>	<b>Equipos</b>
Ratas Sprague Dawley	Aparato estereotáxico
Vectores virales	Micrótopo de deslizamiento
Indumentaria quirúrgica (batas, gorros y guantes desechables)	Criostato
Materiales quirúrgicos (bisturí, aguja e hilo de sutura)	Cabina de seguridad
Materiales de laboratorio (jeringuilla, tubos, algodón, gasas, etc)	Microscopio óptico
Insumos de Tinción de inmunohistoquímica (anticuerpos primarios y secundarios)	Microscopio de fluorescencia
Insumos para impregnación de Tinción Golgi	Refrigeradora
Analgésicos	Congelador a - 4°C
Anestésicos	Agitadores electrónicos
Guantes de látex	Balanzas electrónicas
Batas de laboratorio	Cámara conectada al microscopio
Jeringuillas	
Componentes quirúrgicos	Computadora con el software para análisis de imágenes
Hielo seco	
Portaobjetos y cubreobjetos	
Agentes para preservar secciones	
Tampones varios (PBS, TBS)	
Cajas húmedas	
Micropipetas	
Cajas para guardar laminillas	
DPX	
Materiales para microtopo (pinceles, OCT)	

- **PROCEDIMIENTOS**

**Cirugía:** Las ratas fueron anestesiadas con una inyección intraperitoneal de una mezcla de ketamina y xilazina. Los animales fueron colocados en un aparato estereotáxico, se les realizó una incisión en la línea media del cuero cabelludo, luego la piel y los músculos fueron cuidadosamente abiertos para exponer el cráneo, y se perforó un agujero sobre el área objetivo siguiendo las coordenadas Bregma: - 4.30 <sup>(14, 42)</sup>. Se utilizó micro-inyectores para infusión del vector AAV-GFP + mCherry, AAV-CCL1-mCherry y AAV-A $\beta$ <sub>1-42</sub>-GFP+ CCL1-mCherry (Vector Biolabs) en el área CA1 del giro dentado del hipocampo. El animal se recuperó con cuidados postoperatorios por una semana y se esperó tres semanas para la expresión de AAV (**Figura 4-A**).

**Bio-marcación de células proliferativas del giro dentado del hipocampo para verificar la contribución de la CCL1 en la neurogénesis:** Las ratas Sprague Dawley recibieron una inyección intraperitoneal de 150mg/kg 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU, Sigma) una semana después de recobro de cirugía estereotáxica. En esta actividad, se marcaron las neuronas en proliferación al inicio del estudio; y luego de la cirugía se evaluaron cuántas células sobrevivieron y maduraron de acuerdo con el tiempo de desarrollo descrito en la literatura <sup>(43)</sup> (**Ver Figura 4-B**).

**Obtención y cortes de cerebro para inmunohistoquímica:** Los cerebros fueron colectados de animales anestesiados con una sobredosis de ketamina/xilazina, luego fueron expuestos a una solución de 4% paraformaldehído utilizando la técnica de perfusión. Una vez colectados y post-fijados por un mínimo de 12 horas, los cerebros se crio-protegieron (20% sucrosa en PBS) por 48 horas. Se procedió a coleccionar secciones del cerebro de 50 micrómetros para cortar el tejido con ayuda de un micrótopo de deslizamiento. Se colocó

hielo seco pulido en la base para mantener la temperatura adecuada para poder realizar los cortes.

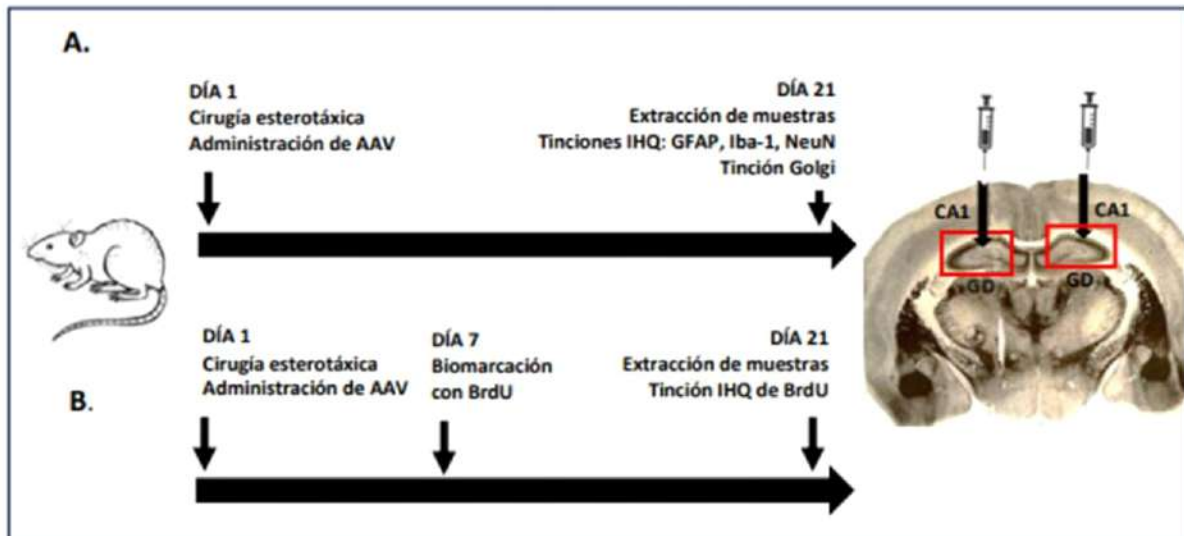


Figura 4. A. Estrategia experimental general para evaluar el efecto de sobreexpresión de CCL1 en la respuesta de los astrocitos, microglía, neuronas maduras y las espinas dendríticas en el giro dentado del hipocampo. Este diseño refleja la estrategia utilizada en el objetivo 1 y 3. B. Estrategia experimental general para evaluar el efecto de sobreexpresión de CCL1 en la respuesta de la neurogénesis en el giro dentado del hipocampo. Este diseño refleja la estrategia utilizada en el objetivo 2.

#### Evaluación del estadio de células gliales (microglía y astrocitos) en las cohortes de ratas:

La tinción inmunohistoquímica para células microgliales se utilizó el anticuerpo primario IBA-1/AIF-1(E404W) XP® Rabbit mAB, 1.50- 1.200 en bloqueo de Cell Signaling Technology), seguido con la incubación con el anticuerpo secundario Rabbit Alexa Fluor 594, 1:200- 1:1000 en solución de bloqueo (**Ver Anexo #1. Procedimiento de Tinción colorimétrica con Iba-1**). Para distinguir astrocitos se utilizó el anticuerpo GFAP (GA5) Mouse mAB, Cell Signaling, 1:300 en solución de bloqueo, seguido por la incubación del anticuerpo secundario: Goat anti-mouse 1/1000) Ig H&L (Alexa Fluor 488) (**Ver Anexo #2. Procedimiento de Tinción IHQ con GFAP**).

#### Evaluación del estadio del proceso de neurogénesis en las cohortes de las ratas:

La inmunohistoquímica se logró siguiendo los protocolos establecidos en Noonan et al, 2008

con modificaciones menores <sup>(44)</sup> (**Ver Anexo #3. Procedimiento de Tinción colorimétrica con BrdU**). Para la tinción de BrdU, se utilizaron tres pasos de pretratamiento: 1) desenmascaramiento del antígeno utilizando 0.01M de ácido cítrico (pH 6.0, 95°C, 15m); 2) permeabilización de la membrana utilizando Tripsina al 0.1% en Tris 0.1 M y CaCl<sub>2</sub> al 1%; y 3). desnaturalización del ADN con 2MHCl en 1x PBS, 30 min. Luego del pretratamiento, las secciones se incubaron en Solución de Bloqueo (2% BSA, Triton.100 en PBS+ 0.02%NaN<sub>3</sub>) por una hora. Se incubaron en los anticuerpos primarios: Monoclonal anti-BrdU de ratón (SIGMA) para marcar las células en proliferación al momento de la administración de BrdU y Anti-NeuN de ratón (Millipore) para marcar las células maduras. Las incubaciones duraron ~12 h a 4°C (**Ver Anexo# 4. Procedimiento de Tinción colorimétrica con NeuN**). Al día siguiente, se lavaron las muestras en PBS y se incubaron en anticuerpo secundarios: Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) ab205718 por 1 h a temperatura ambiente. Luego de lavados, se incubaron en 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) por 1 h a temperatura ambiente para identificar el núcleo celular.

**Microscopía de luz y de fluorescencia:** Análisis morfológico se completó utilizando microscopio con filtros de inmunofluorescencia Axioskop 2 plus (Zeiss) con cámara fotográfica adaptada al mismo para observar y captar imágenes de las tinciones de IHQ para GFAP. Las secciones teñidas con inmunohistoquímicas colorimétricas fueron analizadas con el microscopio óptico de luz Leica DM 3000 LED las imágenes se capturaron a través de una cámara fotográfica Leica MC170 HD con el utilizando el Programa Leica Application Suite versión 4.12.0. El análisis de las células se hizo ciego a condición de los investigadores y magnificación de 40x. Se utilizó el Programa Image J para la evaluación de las secciones teñidas con IHQ: en la tinción de GFAP se midió el umbral de intensidad de los astrocitos en la capa molecular de la porción dorsal del giro

dentado, en la tinción Iba-1 se contaron el número de microglías en la capa molecular de la porción dorsal del giro dentado, y en la tinción de NeuN se contó las neuronas en la zona granular del giro dentado y la tinción de BrdU se contó las neuronas ubicadas en la capa subgranular del giro dentado del hipocampo.

#### **Cuantificación de la densidad de las espinas dendríticas usando impregnación Golgi:**

Las ratas fueron profundamente anestesiadas antes de remover el cerebro del cráneo. Los cerebros fueron retirados del cráneo y fijados en paraformaldehído al 5% por al menos dos días a 21 °C a un pH de 7.4. Después de la fijación inicial, los cerebros fueron transferidos dentro de una solución de cromado recién preparada que contiene un 3% de dicromato de potasio y 5% de paraformaldehído en PBS, pH 7.6. Todas las soluciones de cromado fueron cambiadas diariamente con solución de cromado recién preparada. Después de 48 horas de cromación, los cerebros fueron lavados con solución de 2% de nitrato de plata en agua destilada antes de la incubación en nitrato de plata por otras 48 horas. Durante el proceso completo de tinción, los cerebros fueron cubiertos con papel aluminio para evitar la exposición de la luz <sup>(45)</sup>. Se realizaron cortes coronales con un criostato de 80 µm de espesor a una temperatura de -5°C. Las secciones fueron montadas sobre un portaobjetos cubierto con gelatina. Después se le colocaron cubreobjetos utilizando el medio de montaje DPX. **Ver Anexo # 5. Procedimiento de tinción rápida de Golgi.**

**Microscopia de luz óptica:** Las secciones Golgi fueron estudiadas por microscopía óptica de luz Leica DM 3000 LED usando el objetivo de 100x o de inmersión. Se contaron un total de 3 neuronas piramidales del hipocampo dorsoventral por cada animal. Se analizó la densidad de las espinas proximales apicales (mínimo 100 micrómetros de soma). Cada neurona fue examinada y se eligió un segmento de 10 micrómetros de longitud de una dendrita de segundo o tercer orden (que sobresaliera de su dendrita apical original) para la

cuantificación de la densidad de la columna tal como se describió previamente. Las dendritas se seleccionarán bajo una lente de inmersión en aceite 100x y las imágenes de estas dendritas apicales se capturaron a través de una cámara fotográfica Leica MC170 HD conectada al microscopio óptico Leica. Se captaron imágenes en serie de cada dendrita en todo el segmento analizado (Z-stack) utilizando el Programa Leica Application Suite versión 4.12.0. Las microfotografías de una dendrita se apilaron en un solo archivo. Se utilizó el programa Image J para la evaluación de las secciones con tinción rápida de Golgi.

**Universo de estudio, selección y tamaño de la muestra.** Se utilizaron ratas como modelo animal para estudiar el efecto de la sobreexpresión de la proteína CCL1 en la morfología celular. Cada grupo o cohorte de ratas tuvo un número de seis ratas (n=6 ratas por cohorte).

**Procedimientos para la recolección de información, instrumentos a utilizar y métodos para el control de calidad de los datos.** Todos los análisis por microscopía se hicieron ciego a condición experimental. Se tabularon los datos mediante cuadros y fotografías de lo observado en el microscopio de luz. Análisis estadístico se completó utilizando Prism (GraphPad).

**Procedimientos para garantizar aspectos éticos den las investigaciones con animales.** Se obtuvo aprobación mediante la nota CICUA-19-006 del 8 de julio de 2019, para el protocolo descrito anteriormente y se siguieron las normas establecidas por el Comité Institucional de Cuidad y Uso de Animales (CICUA) y el bioterio de INDICASAT AIP.

**Plan de análisis de los resultados:** Se tabularon los datos mediante cuadros y se realizó la Prueba de ANOVA de una vía y la prueba post-hoc Tukey's comparison multiple test. utilizando el Programa Prism Graph Pad para el análisis estadístico.

# **CAPÍTULO III:**

# **RESULTADOS**

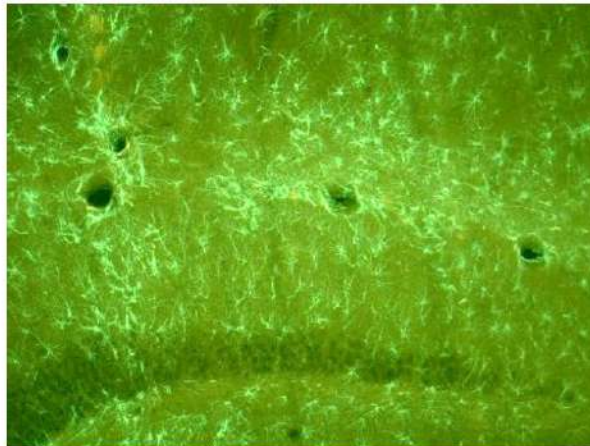
**Análisis inmunohistoquímico de los astrocitos de la capa molecular del giro dentado del hipocampo de cerebro de rata.** Las secciones de cerebro de rata se prepararon siguiendo el protocolo descrito para la Tinción de GFAP en la sección de materiales y métodos. Mediante el programa Image J se evaluó el umbral de intensidad de cada una de las imágenes captadas mediante el microscopio de fluorescencia. En la **Figura 5** se observa las imágenes con la presencia de las células que marcaron positivamente con la tinción de GFAP (específico para astrocitos) en la capa molecular del giro dentado del hipocampo según condición experimental.

El ANOVA el de una vía mostró un  $F(2, 8) = 4.361$  y una  $P = 0.0524$ , por lo que hay diferencia significativa entre las medias de los tres grupos experimentales (**Gráfico 1**). Se realizó la prueba de comparación múltiple de Tukey en donde se observó que la diferencia significativa está entre el grupo Control y el grupo  $AVV + A\beta_{1-42} + CCL1$  con una  $p = 0.0482$  ( $p < 0.05$ ).

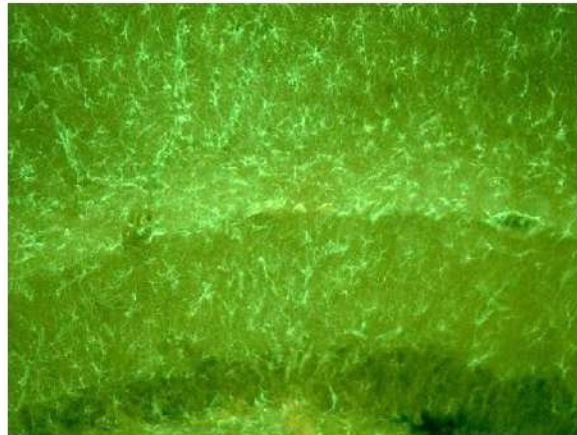
#### Estadística descriptiva:

ANOVA	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	671.5	2	335.7	$F(2, 8) = 4.361$	$P = 0.0524$
Residual (within columns)	615.9	8	76.99		

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
Control vs. CCL1	5.118	-14.03 to 24.27	No	ns	0.7342	A-B
Control vs. $A\beta_{1-42} + CCL1$	-12.76	-31.91 to 6.385	No	ns	0.1991	A-C
CCL-1 vs. $A\beta_{1-42} + CCL1$	-17.88	-35.61 to -0.1543	Yes	*	0.0482	B-C



**A. CONTROL**



**B. AVV+CCL1**



**C. AVV+Aβ<sub>1-42</sub>+CCL1**

*Figura 5. Microscopía de inmunofluorescencia que muestra los astrocitos marcados con la tinción GFAP en la capa molecular del GD del corte coronal de cerebro de rata en una magnificación de 10X. A. Se observa la sección de cerebro del grupo experimental con el vector vacío (control negativo). B. Se observa la sección del hipocampo del grupo experimental que contenía la proteína CCL1. C. Se observa la sección del hipocampo del grupo experimental con el vector Aβ<sub>1-42</sub> + proteína CCL1.*

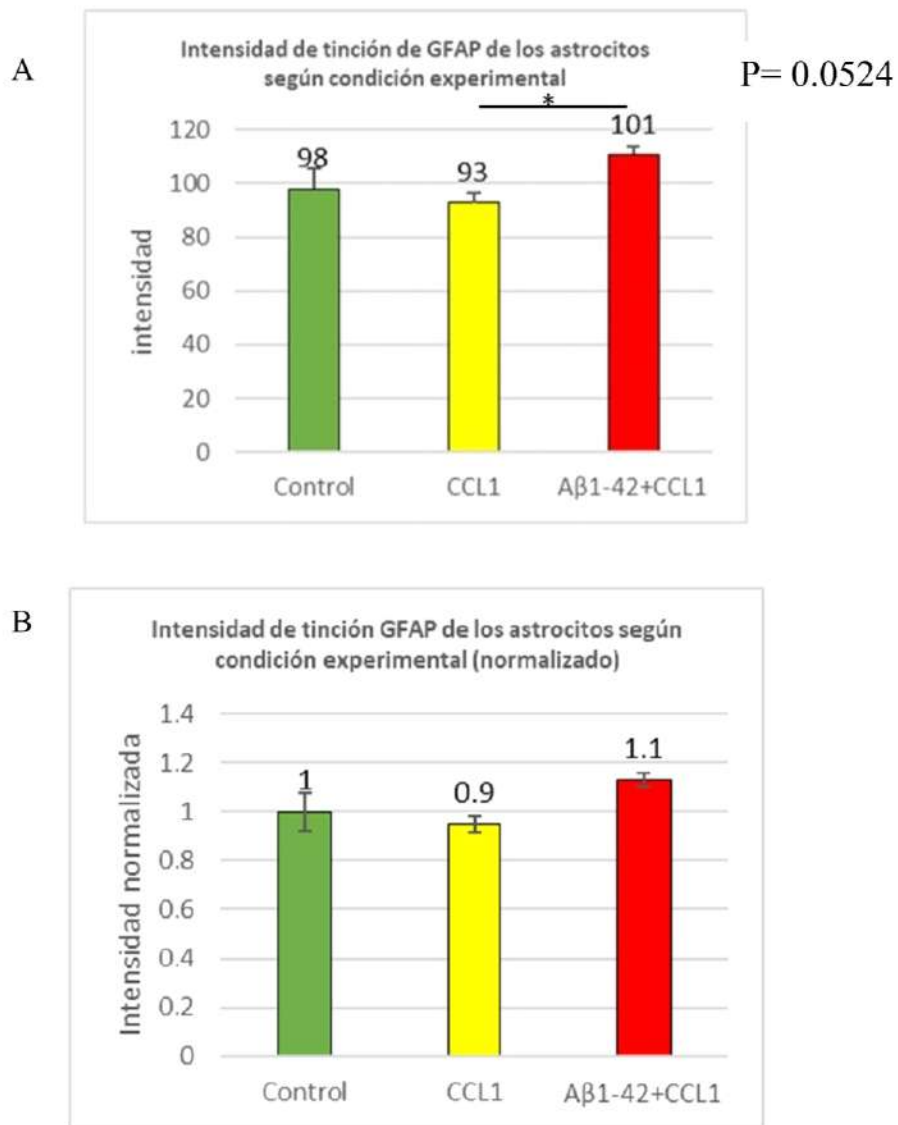


Gráfico 1. Intensidad de tinción inmunohistoquímica GFAP de los astrocitos marcados de la capa molecular del giro dentado del hipocampo de cerebro de rata según condición experimental. A. El ANOVA de una vía mostró una  $p= 0.0524$ , por lo que si hay diferencia significativa entre las medias de los tres grupos experimentales ( $p>0.05$ ) Se realizó la prueba de Tukey en donde se observó que la diferencia significativa está entre el grupo Control y el grupo AVV+ proteína  $A\beta_{1-42} + CCL1$  con una  $p= 0.0482$  ( $p<0.05$ ). B. Se observa el gráfico con los valores normalizados.

**Análisis inmunohistoquímico de la microglía de la capa molecular en el giro dentado del hipocampo del cerebro de rata.** Las secciones de cerebro de rata se prepararon siguiendo el protocolo descrito para la Tinción Iba-1 en la sección de materiales y métodos. Las imágenes captadas al microscopio óptico fueron analizadas con el programa Image J para contar el número de microglías en un área definida. En la **Figura 6** se muestra las imágenes representativas de los tres grupos experimentales, la presencia de células que marcaron positivamente con la tinción de Iba-1 (específica para microglía) en la capa molecular del giro dentado del hipocampo según condición experimental.

El ANOVA de una vía mostró un  $F(2, 9) = 4.366$  y una  $P = 0.0473$ , por lo que si hay diferencia significativa entre las medias de los tres grupos experimentales (**Gráfico 2**). Se realizó la prueba de comparación múltiple de Tukey en donde se observó que la diferencia significativa está entre el grupo Control y el grupo AVV+ CCL1 con una  $p = 0.0473$  ( $p < 0.05$ ).

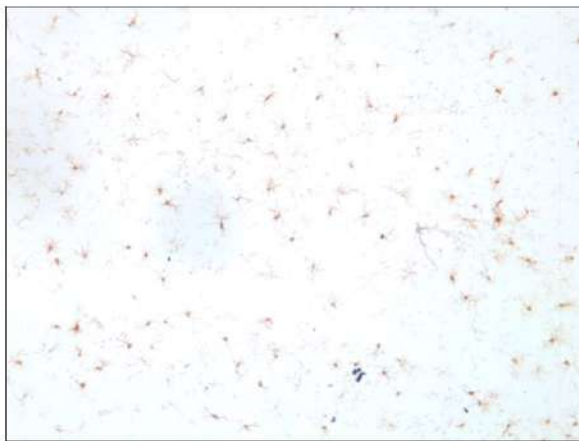
**Estadística descriptiva:**

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	475.2	2	237.6	$F(2, 9) = 4.366$	$P = 0.0473$
Residual (within columns)	489.8	9	54.42		
Total	964.9	11			

Tukey's multiple comparisons test	Mean	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
	Diff.					
Control vs. CCL1	14.75	0.1864 to 29.31	Yes	*	0.0473	A-B
Control vs. $A\beta_{1-42}$ + CCL1	3.5	-11.06 to 18.06	No	ns	0.7856	A-C
CCL-1 vs. $A\beta_{1-42}$ + CCL1	-11.25	-25.81 to 3.314	No	ns	0.133	B-C



**A. VECTOR VACÍO**

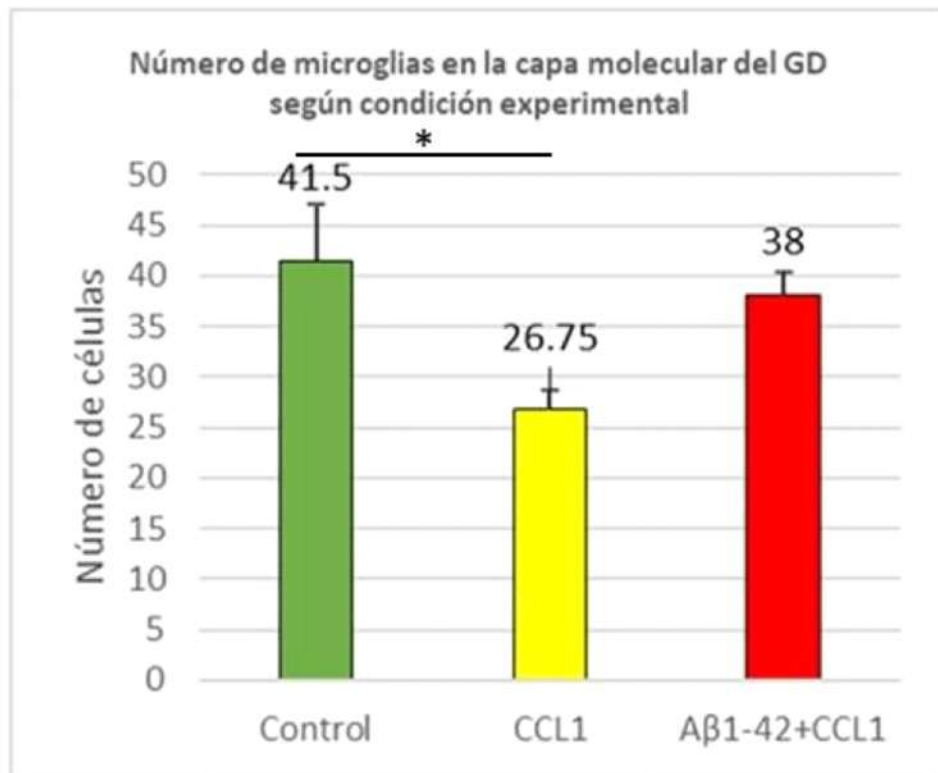


**B. AVV+CCL1**



**C. AVV+A $\beta$ <sub>1-42</sub>+CCL1**

*Figura 6. Microscopía óptica que muestra la microglía marcada con la Tinción inmunohistoquímica colorimétrica Iba-1 (chocolate) en la capa molecular del GD del corte coronal de cerebro de rata en una magnificación de 10X. A. Se observa la sección de cerebro del grupo experimental con el vector vacío (control negativo). B. Se observa la sección del hipocampo del grupo experimental que contenía la proteína CCL1. C. Se observa la sección del hipocampo del grupo experimental con el vector A $\beta$  + proteína CCL1.*



P= 0.0473

Gráfico 2. Número de microglías marcadas con la tinción inmunohistoquímica Iba-1 en la capa molecular del giro dentado del hipocampo según condición experimental. El ANOVA de una vía mostró un  $F(2, 9) = 4.366$  y una  $P = 0.0473$ . Se realizó la prueba de Tukey en donde se observó que la diferencia significativa está entre el grupo Control y el grupo  $AVV+$  proteína CCL1 con una  $p = 0.0473$  ( $p < 0.05$ ).

**Análisis inmunohistoquímico de la neurogénesis en el giro dentado del hipocampo.** Las secciones de cerebro de rata se prepararon siguiendo el protocolo descrito en la sección de materiales y métodos. En la **Figura 7** se muestra imágenes representativas de la presencia de células que marcaron positivamente con la tinción de BrdU en la capa subgranular del giro dentado del hipocampo tanto en la etapa de división como en la etapa de maduración según condición experimental.

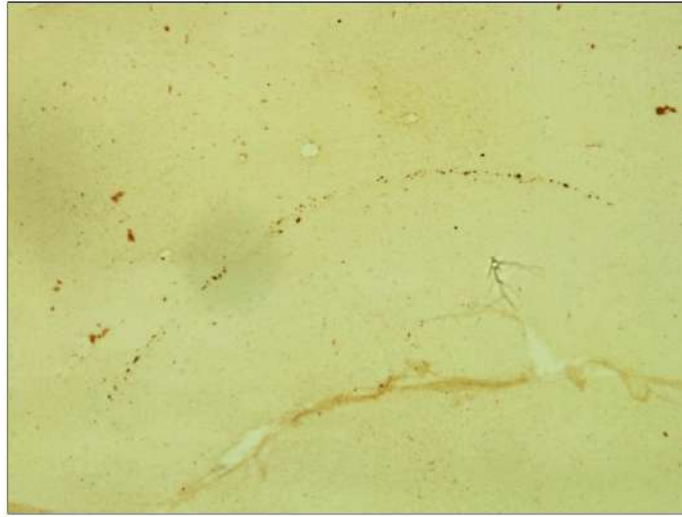
El ANOVA de una vía mostró un  $F(2, 27) = 2.242$  y una  $p = 0.1257$ , por lo que no hubo diferencia significativa entre las medias de los tres grupos experimentales en la etapa de división (**Gráfico 3-A**). El ANOVA de una vía mostró una  $F(2, 33) = 46.07$  y una  $p < 0.0001$ , que si hubo diferencias significativas entre los grupos ( $p < 0.001$ ) en la etapa de maduración. Se realizó un análisis de Tukey para los datos de la etapa de maduración y se observó que hubo diferencias significativas entre los tres grupos experimentales (Valor ajustado de  $p < 0.05$ ) (**Gráfico 3-B**).

### Estadística descriptiva:

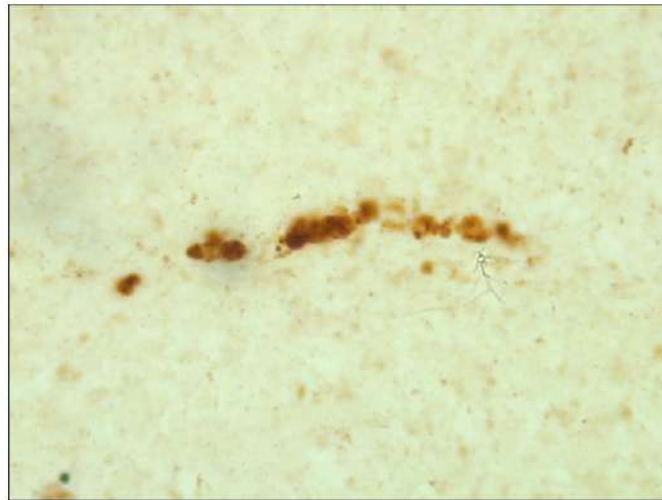
ETAPA DE DIVISION					
TABLA DE ANOVA	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	52.05	2	26.03	$F(2, 27) = 2.242$	<b>P=0.1257</b>
Residual (within columns)	313.4	27	11.61		
Total	365.5	29			

ETAPA DE MADURACIÓN					
TABLA DE ANOVA	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	1803	2	901.4	$F(2, 33) = 46.07$	<b>P&lt;0.0001</b>
Residual (within columns)	645.6	33	19.56		
Total	2448	35			

ETAPA DE MADURACIÓN						
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
Control vs. CCL-1	-11.08	-15.51 to -6.653	Yes	****	<0.0001	A-B
Control vs. $A\beta_{1-42} + CCL1$	-17.08	-21.51 to -12.65	Yes	****	<0.0001	A-C
CCL-1 vs. $A\beta_{1-42} + CCL1$	-6	-10.43 to -1.569	Yes	**	0.006	B-C



**A. Tinción BrdU de la capa subgranular del GD (10x)**



**B. Tinción en BrdU en la capa subgranular del GD (40x)**

*Figura 7. Microscopía óptica que muestra las neuronas marcadas con la Tinción Inmunohistoquímica colorimétrica BrdU (chocolate) en la capa subgranular del giro dentado del hipocampo de cerebro de rata. A. Se observa la sección del giro dentado del cerebro en una magnificación de 10x. B. Se observa la sección del giro dentado del cerebro en una magnificación de 40x.*

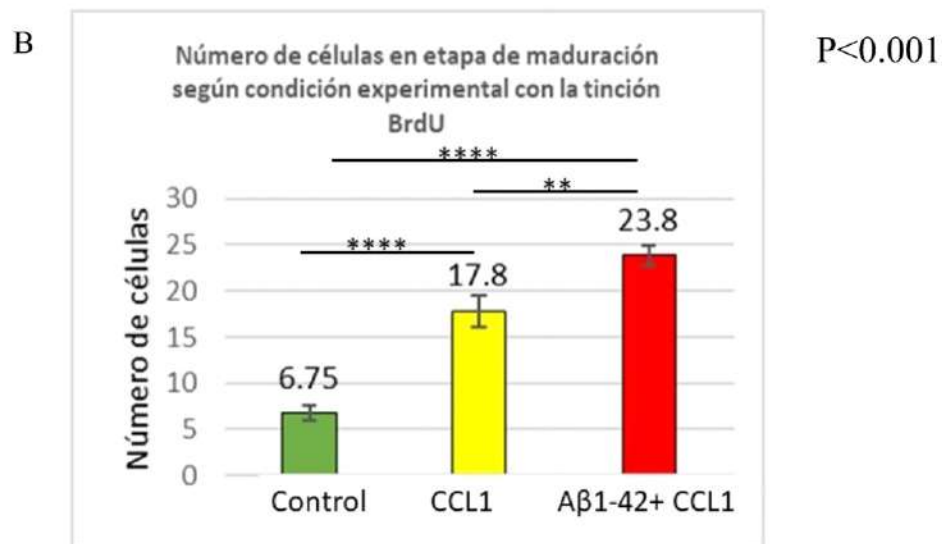
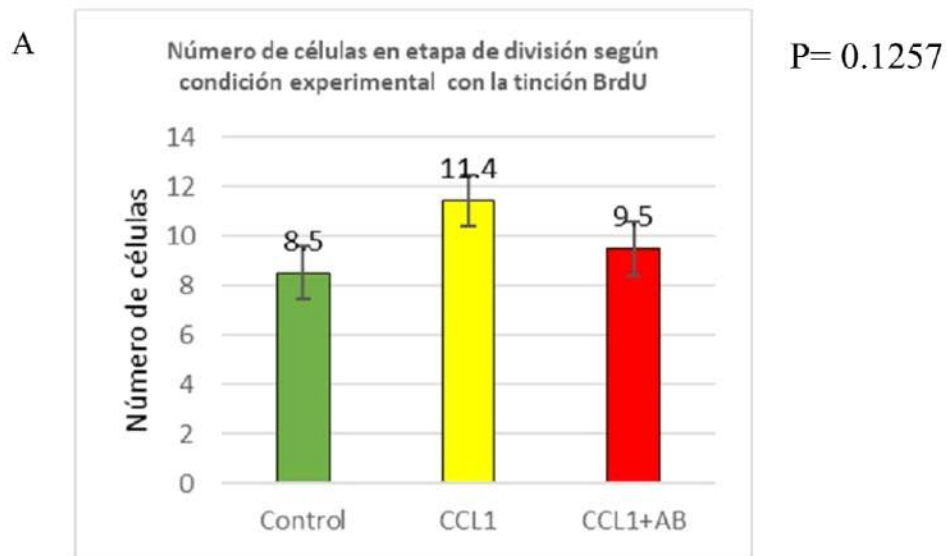


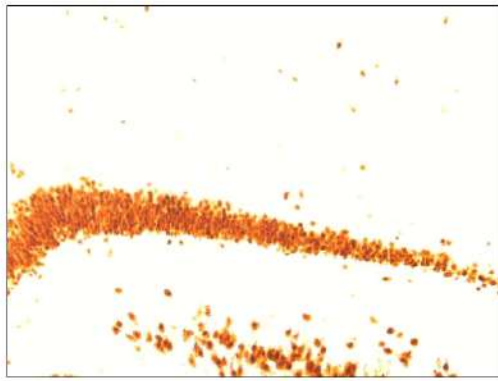
Gráfico 3. Número de neuronas marcadas con la tinción inmunohistoquímica BrdU en la capa subgranular del giro dentado del hipocampo de cerebro de ratas según condición experimental. A. El ANOVA de una vía mostró una  $p= 0.1257$ , por lo que no hubo diferencia significativa entre las medias de los tres grupos experimentales en la etapa de división. B. El ANOVA de una vía mostró una  $p < 0.0001$ , por lo que si hubo diferencias significativas entre los grupos ( $p < 0.001$ ) en la etapa de maduración. Se realizó un análisis de Tukey para los datos de la etapa de maduración y se observó que hubo diferencias significativas entre los tres grupos experimentales ( $p < 0.001$ ).

**Análisis inmunohistoquímico de las neuronas maduras de la capa granular del giro dentado del hipocampo del cerebro de rata.** Las secciones de cerebro de rata se prepararon siguiendo el protocolo descrito en la sección de materiales y métodos para la tinción de NeuN. En la **Figura 8** se muestra imágenes representativas de la presencia de células maduras que marcaron positivamente con la tinción de NeuN (específica para núcleos de neuronas maduras) en la capa granular del giro dentado del hipocampo según condición experimental.

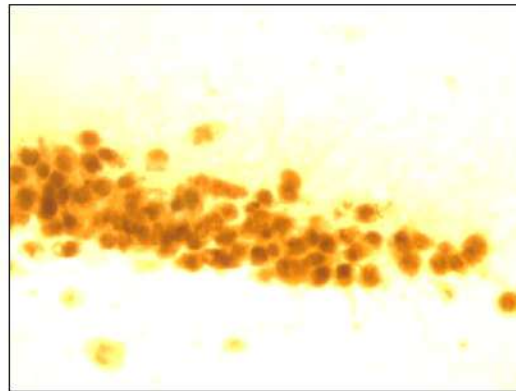
El ANOVA de una vía mostró un  $F(2, 8) = 3.768$  y una  $P = 0.0703$ , por lo que no hay diferencia significativa entre las medias de los tres grupos experimentales ( $p > 0.05$ ), sin embargo, existe una tendencia (**Gráfico 4**).

**Estadística descriptiva:**

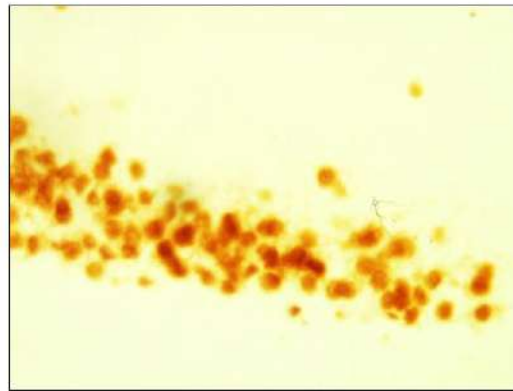
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	7544	2	3772	$F(2, 8) = 3.768$	<b>P=0.0703</b>
Residual (within columns)	8009	8	1001		
Total	15553	10			



**A. CONTROL**

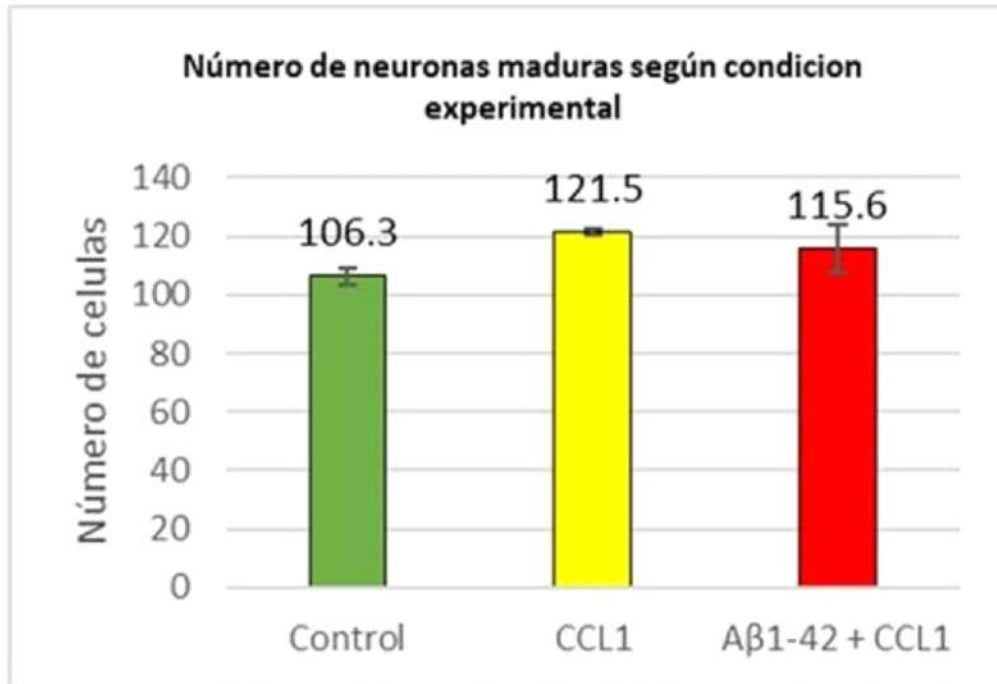


**B. AVV+CCL1**



**C. AVV+Aβ<sub>1-42</sub>+CCL1**

*Figura 8. Microscopía óptica que muestra las neuronas maduras de la capa granular del giro dentado del hipocampo teñidas con la tinción inmunohistoquímica colorimétrica NeuN (chocolate) del corte coronal de cerebro de rata en una magnificación de 10X y 40X. A. se observa la sección de cerebro del grupo experimental con el vector vacío (control negativo) y su respectiva imagen ampliada de una sección. B. se observa la sección del hipocampo del grupo experimental que contenía la proteína CCL1 y su respectiva imagen ampliada de una sección. C. se observa la sección del hipocampo del grupo experimental con el vector Aβ<sub>1-42</sub> + proteína CCL1 y su respectiva imagen ampliada de una sección.*



P= 0.0703

Gráfico 4. Número de neuronas maduras marcadas con la tinción inmunohistoquímica NeuN de la capa granular del giro dentado del hipocampo del cerebro de rata según condición experimental. El ANOVA de una vía mostró una  $P= 0.0703$ , por lo que no hay diferencia significativa entre las medias de los tres grupos experimentales ( $p>0.05$ ).

### **Análisis de las espinas dendríticas de las neuronas del giro dentado del hipocampo.**

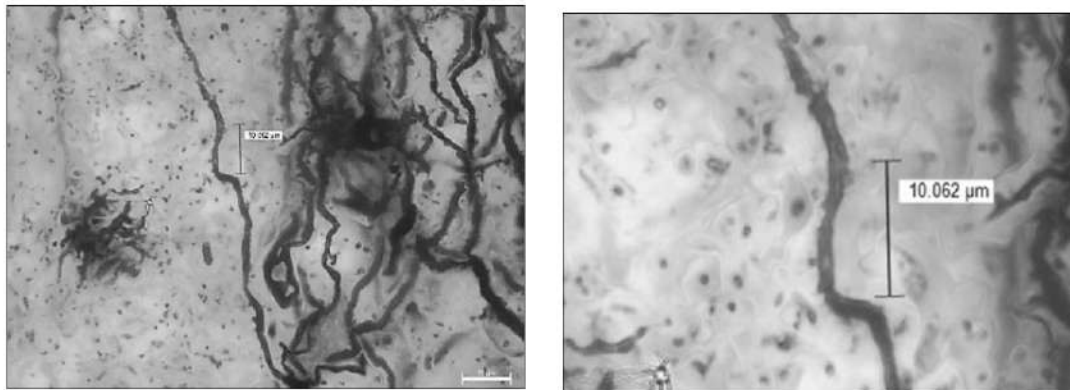
Las secciones de cerebro de rata se prepararon siguiendo el protocolo descrito en la sección de materiales y métodos para la tinción rápida de Golgi. En la **Figuras 9** se muestra las imágenes representativas de los tres grupos experimentales en donde se observaron y contabilizaron el número de espinas dendríticas de las neuronas de la capa granular del giro dentado del hipocampo teñidas con la tinción Golgi según condición experimental.

El ANOVA de una vía mostró una  $F(2, 15) = 7.625$  y una  $P = 0.0052$ , por lo que si hay diferencia significativa entre las medias de los tres grupos experimentales (**Gráfico 5**). Se realizó la prueba de comparación múltiple de Tukey en donde se observó que la diferencia significativa se encuentra entre el grupo Control versus el grupo AVV+  $A\beta_{1-42}$  + CCL1 (Valor ajustado de  $p = 0.0038$ ).

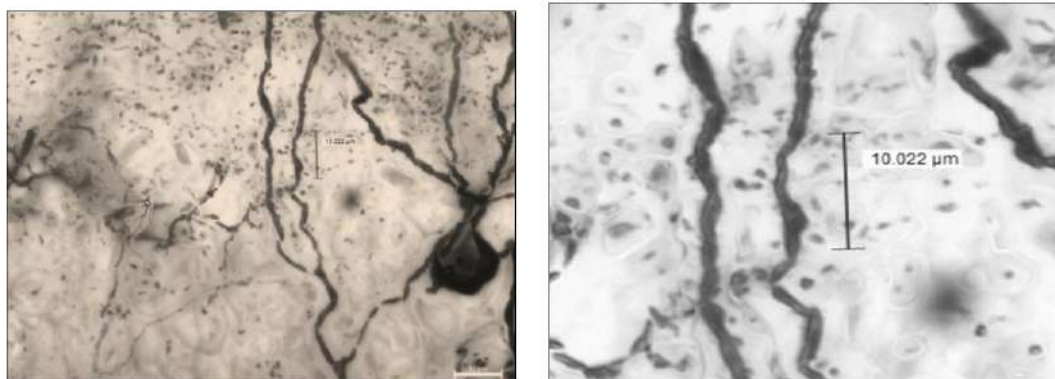
#### **Estadísticas descriptivas:**

<b>ANOVA table</b>	<b>SS</b>	<b>DF</b>	<b>MS</b>	<b>F (DFn, DFd)</b>	<b>P value</b>
Treatment (between columns)	27.11	2	13.56	$F(2, 15) = 7.625$	<b>P=0.0052</b>
Residual (within columns)	26.67	15	1.778		
Total	53.78	17			

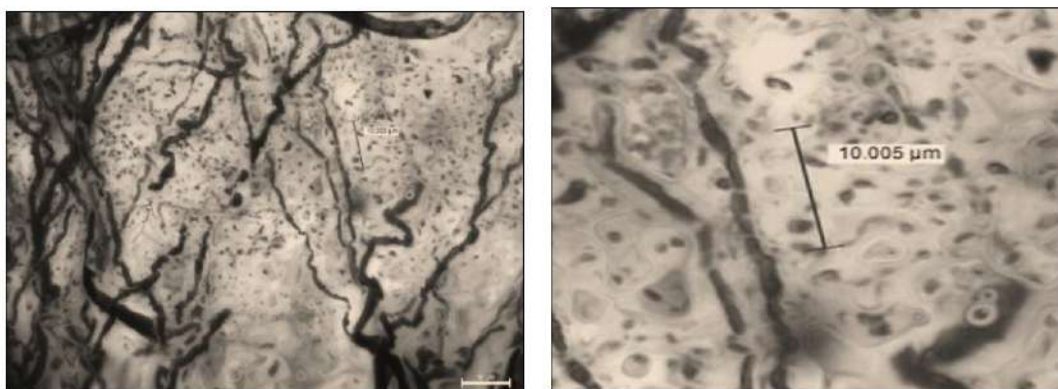
<b>Tukey's multiple comparisons test</b>	<b>Mean Diff.</b>	<b>95.00% CI of diff.</b>	<b>Significant?</b>	<b>Summary</b>	<b>Adjusted P Value</b>	
Control vs. CCL1	1.667	-0.3329 to 3.666	No	ns	<b>0.1102</b>	A-B
Control vs. $A\beta_{1-42}$ + CCL1	3	1.000 to 5.000	Yes	**	<b>0.0038</b>	A-C
CCL1 vs. $A\beta_{1-42}$ + CCL1	1.333	-0.6662 to 3.333	No	ns	<b>0.2261</b>	B-C



**A. VECTOR VACÍO**

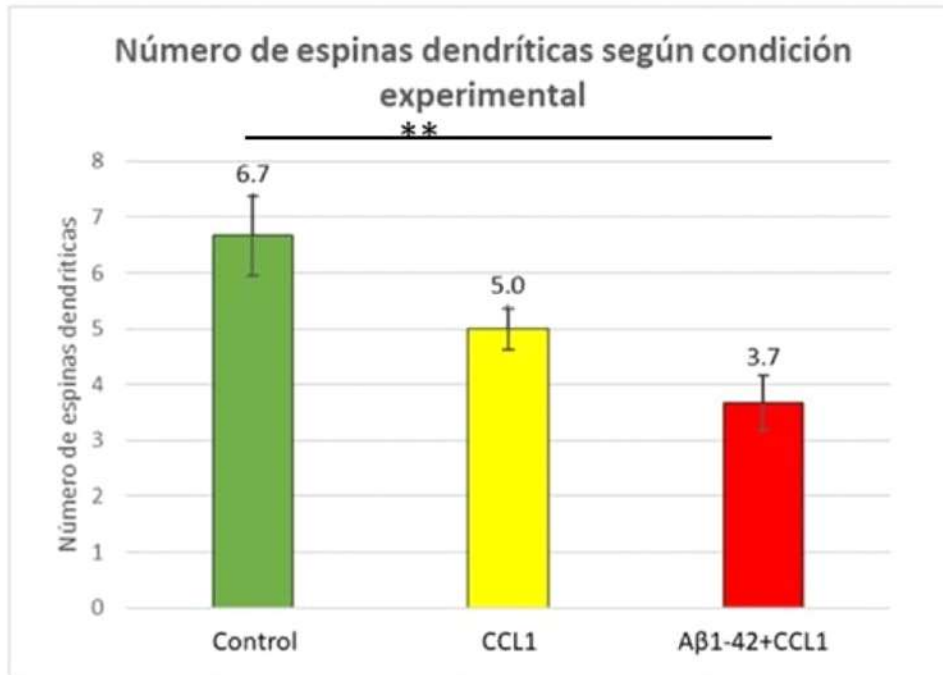


**B. AVV+ CCL1**



**C. AVV+ A $\beta_{1-42}$  + CCL1**

*Figura 9. Microscopía óptica que muestra las espinas dendríticas de las neuronas maduras de la capa molecular del giro dentado del hipocampo teñidas con la tinción Golgi del corte coronal de cerebro de rata en una magnificación de 100X. A. Se observa la sección de cerebro del grupo experimental con el vector vacío (control negativo) y su correspondiente imagen ampliada. B. Se observa la sección del hipocampo del grupo experimental que contenía la proteína CCL1 y su correspondiente imagen ampliada. C. Se observa la sección del hipocampo del grupo experimental con el vector A $\beta_{1-42}$  + proteína CCL1 y su correspondiente imagen ampliada.*



P= 0.0052

Gráfico 5. Número de espinas dendríticas de las neuronas del giro dentado del hipocampo de cerebro de rata según condición experimental, tinción Golgi. El ANOVA de una vía mostró una  $P= 0.0052$ , por lo que si hay diferencia significativa entre las medias de los tres grupos experimentales La prueba de comparación múltiple de Tukey mostró que la diferencia significativa se encuentra entre el grupo Control versus el grupo  $AVV+ A\beta_{1-42} + CCL1$  (Valor ajustado de  $p= 0.0038$ ).

# **CAPÍTULO IV:**

## **DISCUSIÓN**

## DISCUSIÓN

La neuroinflamación juega un papel importante en la EA, ya que sus efectos se pueden evidenciar en todas las etapas de la enfermedad, como se ha podido corroborar en diferentes estudios que utilizan ratas como Modelo Animal de la EA <sup>(46, 47, 48)</sup>. La respuesta inmunológica puede producir resultados beneficiosos (antiinflamatorios) como perjudiciales (proinflamatorios) en las neuronas dependiendo de la complejidad de los factores involucrados. Se ha identificado y estudiado la función de varias citocinas producidas por los astrocitos que están implicadas en la EA <sup>(49)</sup> y que han sido detectadas en el suero de la sangre, en el LCR y en tejido cerebral de los pacientes que la padecen como futuras estrategias terapéuticas de la EA, como por ejemplo la citocina CCL1 <sup>(41)</sup>. Este estudio demostró el rol de la citocina CCL1 en la neuroinflamación del giro dentado del hipocampo mediante el uso de las técnicas de inmunohistoquímicas.

La CCL1 es expresada por los astrocitos reactivos para atraer las células inmunitarias al sitio de la injuria <sup>(39)</sup>. Varios investigadores han evidenciado que los astrocitos reaccionan ante cualquier daño aumentando su densidad y tornándose reactivos cuando hay una exposición a algún agente tóxico <sup>(38)</sup> como, por ejemplo: el hierro <sup>(50)</sup>, el cobre <sup>(51)</sup> y a la acumulación anormal de la proteína A $\beta$  en el caso de la EA <sup>(52, 53)</sup>.

En este estudio, se evidenció que la sobreexpresión de A $\beta$ <sub>1-42</sub> + CCL1 aumentó la reactividad de los astrocitos lo que coincide con otros estudios que relacionan la astrogliosis con la presencia anómala de A $\beta$  <sup>(38, 53)</sup>, mientras que el grupo experimental que se le inoculó el vector con la proteína CCL1 aparentemente no modificó el estadio de los astrocitos en la capa molecular del giro dentado del hipocampo del cerebro de las ratas. En cambio, la sobreexpresión de CCL1 disminuyó significativamente el número de microglías

en la capa molecular del giro dentado del hipocampo en comparación con el grupo Control y el grupo con el vector  $A\beta_{1-42}$  + CCL1.

En el estudio realizado por Yi et al, demostraron mediante Resonancia Magnética multi-compartamental, que durante la inflamación aguda, la microglía incrementa su densidad y se hiperramifica, mientras que en la neuroinflamación crónica comienza a reducir su densidad <sup>(54)</sup>. La microglía puede generar una respuesta proinflamatoria para responder a una injuria en el sistema nervioso central, como también producir un efecto antiinflamatorio enfocado a restaurar el daño causado por la injuria <sup>(21)</sup> y esto ocurre dependiendo del estímulo, la microglía se activará de acuerdo con el estímulo en diferentes perfiles <sup>(55)</sup>.

En el estudio de Jorda et al <sup>(40)</sup>, probaron la hipótesis de que la quimiocina CCL1 tienen un papel importante en la cascada inflamatoria, ya que observaron que una disminución de la CCL1 conlleva a la disminución de la eliminación de  $A\beta$  por fagocitosis que ha sido detectada en la EA. Takata et al <sup>(56)</sup> demostraron que al estimular la función fagocítica de la microglía mediante el uso de receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) se logró una disminución de la  $A\beta$  cerebral en la EA y una mejoría en la memoria utilizando ratas como Modelo Animal de EA.

La CCL1 inhibió la activación de las microglías por lo que sugiere que es una citocina antiinflamatoria, resultado que coincide con la literatura ya que se ha identificado a la CCL1 como una citocina también producida por la microglía en el perfil alternativo (M2b) en donde ocurre la desactivación y cicatrización de las heridas, ya que en esta etapa M2b se producen citocinas tanto proinflamatorias y antiinflamatorias que tienen una función inmunomoduladora <sup>(55)</sup>.

En el estudio de Hain et al <sup>(57)</sup>, probaron que el uso de Indometina, un medicamento antiinflamatorio, previene el daño del proceso neurogénico en el hipocampo adulto reduciendo el número de microglía (en su estadio ameboide), además de que también incrementa la sobrevivencia de las neuronas maduras.

En este estudio no hubo diferencias significativas en la etapa de división de las neuronas en la capa subgranular del giro dentado del hipocampo entre el grupo control y los grupos experimentales, en cambio se evidenció un aumento significativo en el número de neuronas en la etapa de maduración en los grupos AVV+ CCL1 y AVV+ A $\beta$ <sub>1-42</sub>+ CCL1 en comparación con el grupo Control, contrario a los resultados de otros estudios en donde la neurogénesis fue inhibida por la proteína A $\beta$  <sup>(37)</sup>, y puede deberse a que la proteína CCL1 contribuyó en la proliferación de nuevas células probablemente al inhibir la activación de la microglía como se ha observado en otros estudios que han aplicado sustancias antiinflamatorias en el hipocampo de ratas como modelo animal de EA para mejorar la neurogénesis en el adulto cuya acción es inhibir a la microglía, como en el estudio de Takamura et al en donde usaron ácido retinoico <sup>(58)</sup>, Mirza et al utilizaron ácido rosmarínico y ácido ursólico <sup>(59)</sup>, mientras que Wadhwa et al observaron incluso mejoría en la memoria espacial <sup>(60)</sup>.

La cantidad de neuronas maduras de la capa granular del giro dentado aumentó ligeramente en el grupo experimental que se le administró la proteína CCL1 en comparación con el grupo control y el grupo con A $\beta$ <sub>1-42</sub> + CCL1, pero no fue estadísticamente significativo. En el estudio realizado por Yenkovyan et al, observaron que las neuronas en el giro dentado fueron más resistentes a la exposición de A $\beta$  <sup>(61)</sup>. Estos hallazgos nos indican que la proteína CCL1 podría tener una función neuroprotectora.

Las espinas dendríticas son protrusiones especializadas de las neuronas donde forman sinapsis para recibir e integrar información. Por lo tanto, si ocurren cambios en el número y forma de las espinas dendríticas se puede alterar su dinámica <sup>(6)</sup>. La neurotoxicidad producida por la A $\beta$  en el hipocampo de ratas como modelo animal provoca la neuroinflamación y neurodegeneración con pérdida de sinapsis que producen el deterioro cognitivo <sup>(13)</sup>. La sobreexpresión de la proteína CCL1 no afectó el número de espinas dendríticas en nuestro estudio. Las espinas dendríticas disminuyeron significativamente en cantidad en el grupo con el vector A $\beta_{1-42}$  + CCL1 comparado con el grupo Control, lo que coincide con otros estudios como el de Boberly et al <sup>(14)</sup> y Kasza et al <sup>(15)</sup>, en donde se observó una disminución de las espinas dendríticas ante la injuria por la A $\beta_{1-42}$ .

## CONCLUSIÓN

La neuroinflamación en la EA ha sido tema relevante de investigación en los últimos años, debido a que el estudio del comportamiento de las células gliales y las proteínas que generan son de utilidad para el diagnóstico de la etapa preclínica de la EA y para la elaboración de tratamientos antiinflamatorios específicos para atenuar su evolución.

Este estudio demostró que la citocina CCL1 cumple con un rol en la neuroinflamación en el giro dentado del hipocampo del cerebro de ratas como modelo animal de la Enfermedad de Alzheimer mediante el uso de las técnicas de inmunohistoquímicas.

La citocina CCL1 (I-309) ha sido útil como biomarcador para detectar los estadios preclínicos de la EA y en nuestro estudio se observó que su sobreexpresión disminuyó la microgliosis y promovió la neurogénesis y no afectó la viabilidad neuronal ni el número de espinas dendríticas de las neuronas en el giro dentado del hipocampo de las ratas como modelo animal, por lo que sugiere que se trata de una citocina antiinflamatoria. Se evidenció el aumento de la reactividad de los astrocitos y la fragilidad de las espinas dendríticas ante la sobreexpresión de proteínas involucradas en la neurodegeneración como la  $A\beta_{1-42}$ .

## **RECOMENDACIONES**

Este estudio tuvo limitaciones porque coincidió con el inicio de la Pandemia por COVID-19 lo que causó el retraso del mismo, redujo la cantidad de ratas que se había planeado utilizar por cohorte y grupo experimental, la demora en el envío de los kits de tinción inmunohistoquímica y de Golgi y la reducción de los insumos para los vectores virales, proteína CCL1 y el  $A\beta_{1-42}$ .

Para futuras investigaciones recomiendo que se utilice un número mayor de ratas y se evalúe la morfología de la glía y de las espinas dendríticas de las neuronas del giro dentado del hipocampo utilizando microscopio confocal para estudiar mejor las espinas dendríticas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. (2017). Global action plan on the public health response to dementia 2017–2025. World Health Organization.  
<https://apps.who.int/iris/handle/10665/259615>. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
2. Breijyeh Z and Karaman B. (2020). Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules* 2020, 25(24): 5789.doi:103390/molecules25245789.
3. Kumar D, Sharma A and Sharma L. (2020). A Comprehensive Review of Alzheimer's Association with Related Proteins: Pathological Role and Therapeutic Significance. *Current Neuropharmacology*, 2020; 18: 674-695. DOI: 10.2174/1570159X18666200203101828.
4. Kumar, V., Abbas, A. and Aster, J. (2015). Patología estructural y funcional. Robbins y Cotran. Novena edición. 2015, Elsevier España. a S. L. L. Capítulo 28, págs:1287-1292.
5. McGeer PL and McGeer EG. (2013). The amyloid cascade-inflammatory hypothesis of Alzheimer disease: implications for therapy. *Acta Neuropathol*, 2013; 126(4):479-97. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1177-7>.
6. Dorostkar, M. M., Zou, C., Blazquez-Llorca, L., & Herms, J. (2015). Analyzing dendritic spine pathology in Alzheimer's disease: problems and opportunities. *Acta Neuropathologica*, 130(1), 1–19. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1449-5>
7. Leng F and Edison P. (2021). Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer's disease: where do we go from here? *Nature Reviews Neurology*. DOI: [10.1038/s41582-020-00435-y](https://doi.org/10.1038/s41582-020-00435-y)

8. Hu WT, Chen-Plotkin A, Arnold SE, et al. (2010). Novel CSF biomarkers for Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Acta Neuropathol* 119(6),669-678 (2010). <https://doi.org/10.1007/s00401-010-0667-0>.
9. Rajasekhar, K., Chakrabarti, M., & Govindaraju, T. (2015). Function and toxicity of amyloid beta and recent therapeutic interventions targeting amyloid beta in Alzheimer's disease. *Chemical Communications*, 51(70), 13434–13450. <https://doi.org/10.1039/c5cc05264e>
10. Monson NL, Ireland SJ, Ligocki AJ, Chen Hounds WH, Li M et al. (2014). Elevated CNS inflammation in patients with preclinical Alzheimer's disease. *Journal of Cerebral Blood Flow & metabolism*. 2014, 30-33. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2013.183>.
11. O'Bryant SE, Xiao G, Barber R, et al. (2011). A blood-based screening tool for Alzheimer's disease that spans serum and plasma: findings from TARC And ADNI. (2011). *Plos ONE* 6(12), e28092. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028092>.
12. Villarreal, A., O'Bryant, S., Edwards, M., Grajales, S., & Britton, G. (2016). Serum-based protein profiles of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment in elderly Hispanics. *Neurodegenerative Disease Management*, 6(3), 203-213. doi: 10.2217/nmt-2015-0009.
13. Facchinetti, R., Bronzuoli, M., & Scuderi, Caterina. (2018). An animal model disease based on the intrahippocampal injection of amyloide  $\beta$ -peptido (1-42). (2018). Stephen d. Skaper (ed), *Neurotrophic Factors: Methods and Protocols*, *Methods in Molecular Biology*, Springer Bussines Media, LLC 2018. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7571-6\\_25](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7571-6_25).

14. Borbely E, Horvath J, Furdan S, Bozso Z, Penke B & Fülöp. (2014). Simultaneous changes of spatial memory and spine density after intrahippocampal administration of fibrillar Abeta 1-42 to the rat brain. *Biomed Research International*, Vol. 2014, articulo ID 345305. <https://doi.org/10.1155%2F2014%2F345305>.
15. Kasza, A, Penke B, Frank Z, Bozso V, Szegedi V, Hunya A et al. (2017). Studies for improving a rat model of Alzheimer's Disease: ICV administration of well-characterized B-amyloid 1-42 oligomers induce disfunction in spatial memory. *Molecules* 2017, 22,2007. <https://doi.org/10.3390/molecules22112007>
16. Pawlina W. (2020). *Ross Histología. Texto y Atlas. Correlación con Biología Molecular*. Editorial Wolters Kluwer. 8ª edición. Capítulo 12, págs. 380-404.
17. Afifi, A. y Bergman, R. *Neuroanatomía funcional. Texto y Atlas*. (1999) Primera Edición. McGraw-Hill Interamericana. Cap. 21, págs. 429-434, Cap.22:448-449.
18. Kumar, K., Kumar A, Keegan R and Deshmukh R. (2018). Recent advances in the neurobiology and neuropharmacology of Alzheimer's disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 98 (2018) 297-307. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.12.053>
19. Splittgerber, R. 2019. *Snell's Clinical Neuroanatomy*. 8º Edición. 2019. Wolters Kluwer. Capítulo 2, págs.: 33-39, 54-59.
20. Ramírez, E, Mendieta L, Flores G y Limón D. (2018). Neurogenesis and morphological-neural alterations closely related to amyloid B-peptide (25-35)-induced memory impairment in male rats. *Neuropeptides* 67 (2018): 9-19. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2017.11.001>
21. Maccioni R, Gonzalez A, Andrade V, Cortes N, Tapia J and Guzmán-Martinez L. (2018). Alzheimer's Disease in the Perspective of Neuroimmunology. *The Open Neurology Journal*, 2018, 12 50-56. DOI: 10.2174/1874205X01812010050

22. Petralia M., Battaglia P., Bruno V., Pennisi M., Mangano K., Lombardo S. and et al. (2020). The role of macrophage migration inhibitory factor in Alzheimer's disease: conventionally pathogenetic or unconventionally protective?. *Molecules*. 2020, 25, 291. <https://doi.org/10.3390/molecules25020291>.
23. Morgan, B. (2018). Complement in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Semin Immunopathol* 2018; 40(1): 113-124. <https://doi.org/10.1007%2Fs00281-017-0662-9>.
24. Rubio-Pérez and Morillas-Ruiz J. (2012). A Review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of Cytokines. *The Scientific World Journal*. Vol 2012. Article ID 756357 | <https://doi.org/10.1100/2012/756357>
25. Kamphuis, W, Kooijman L, Orre M, Stassen O, Pekny M and Hoy E. (2015). GFAP and Vimentin Deficiency Alters Gene Expression in Astrocytes and microglia in wild-type mice and changes the transcriptional response of reactive glia in mouse Model for Alzheimer's Disease. *Wiley Periodicals, Inc. Glia* 2015; 63 (6): 1036-1056. DOI: 10.1002/glia.22800
26. Hilton, D. & Shivane, A. (2015). *Neuropathology simplified. A guide for clinicians and neuroscientists*. Springer International Publishing 2015, Cap. 12: 183-187.
27. Stelzmann R, Schnitzlein N and Murtaghi. (1995). An English Translation of Alzheimer's 1907 Paper, "Über eine eigenartige Erkankung der Hirnrinde". *Clinical Anatomy* 8:429-431. <https://doi.org/10.1002/ca.980080612>.
28. Scharzinger M, Pollock B, Hasan O, Dufouil C, Rehm J, for the Qaly Study Group. (2018). Contribution of alcohol use disorders to the burden of dementia in France 2008-2013: a nation wide retrospective cohort study. [www.thelancet.com/public-health](http://www.thelancet.com/public-health). 2018; 3, e124-32. [https://doi.org/10.1016/s2468-2667\(18\)30022-7](https://doi.org/10.1016/s2468-2667(18)30022-7)

29. Soria, J., González. H., & Léger, G. (2019). Alzheimer's disease. Handbook of Clinical Neurology. Chaper 13. Geriatric Neurology. 231-255. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804766-8.00013-3>.
30. Gupta VB, et al. (2017). Altered levels of blood proteins in Alzheimer's disease longitudinal study: results from australian imaging biomarkers lifestyle study of ageing cohort. Alzheimer's & dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring 8 (2017) 60-72
31. Brosseron F, Kleemann K, Kolbe C, et al. (2021). Interrelations of Alzheimer's disease candidate biomarkers neurogranin, fatty acid-binding protein 3 and ferritin to neurodegeneration and neuroinflammation. J Neuroch 2021. Jun;157(6):2210-2224. doi: 10.1111/jnc.15175.
32. Briggs, R; Kennelly, S; O'Neill, D. (2016) Drug treatments in Alzheimer's disease. Clin. Med. 2016, 247-253. [Drug treatments in Alzheimer's disease \(nih.gov\)](#)
33. Nasiri E, Sankowski R, Dietrich H, Oikonomidi A, Huerta P, Popp J, Al-Abed Y and Bacher M. (2020). Key role of MIF-related neuroinflammation in neurodegeneration and cognitive impairment in Alzheimer's disease. Mol Med. 2020; 26:34. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7164357/>
34. Shi M, Chu F, Zhu F and Zhu J. (2022). Impact of Anti-amyloid-  $\beta$  monoclonal antibodies on the pathology and Clinical profile of Alzheimer's Disease: A focus on Aducanumab and Lecanemab. Front Aging Neurosci. April;14:870517. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.870517>.
35. Pan H, Wang D, Zhang X, Zhou D, Zhang H, Qian Q, He X and et al. (2016). Amyloid  $\beta$  is not the major factor accounting for impaired adult hippocampal

- neurogenesis in mice overexpressing amyloid precursor protein. *Stem Cell Reports* (2016);7: 707-718. <http://dx.doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.08.019>.
36. Yokohama M, Kobayashi H, Tatsumi L and Tomita T. (2022). Mouse Models of Alzheimer's Disease. *Front Mol Neurosci.* 2022; 15:912995. doi: [10.3389/fnmol.2022.912995](https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.912995).
37. Taupin P. (2009). Adult neurogenesis, neural stem cells and Alzheimer's disease: developments, limitations, problems and promises. *Current Alzheimer Research*, 6, 10.
38. Preman P, Alfonso-Triguero, Alberdi E, Verkhratsky A y Arranz A. (2021). Astrocytes in Alzheimer's disease: Pathological significance and molecular pathways. *Cells* 2021, 10, 540. <https://doi.org/10.3390/cells10030540>
39. Ito M, Komai K, Mise-Omata S, Iizuka.koga M, Noguchi Y and et al. (2019). Brain Regulatoru T cells suppress astrogliosis and potentite neurological recovery. *Nature.* 2019; 565: 246-250. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0824-5>
40. Jorda A, Cauli O, Sentoja J., Aldasoro M., Aldasoro C., Obrador E., et l (2019). Changes in Chemokines and Chemokine Receptors Expression in a Mouse Modelo of Alzheimer's Disease. *Int. J. Biol. Sci.* 2019; 15(2):453-463. doi: [10.7150/ijbs.26703](https://doi.org/10.7150/ijbs.26703)
41. Zhou, F, Sun, Y, Xie, X \$ Zhao, Y. (2023). Blood and CSF chemokines in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a systematic review and meta-analysis. *Alzheimer's Research & Therapy.* 2023; 15: 107. <https://doi.org/10.1186/s13195-023-01254-1>.
42. Paxinos, G. & Watson Ch. (2006). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* Academic Press, 6th Edition.

43. Kuhn G, Eish A, Spalding K, and Peterson D. (2018). Detection and Phenotypic of adult neurogenesis. *Cold Spring Harb Protoc*, 2018, 14. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025981>
44. Noonan M, Choi K, Self D and Eish A. (2008). Withdrawal from cocaine self-administration normalizes deficits in proliferation and enhances maturity of adult generated hippocampal neurons. *The Journal of Neuroscience*. 2008, Mar 5 28(10): 2516-26. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.4661-07.2008>.
45. Pilati N, Barker M, Panteleimonitis S, Donga R, and Hamann M. (2008). A rapid Method Combining Golgi and Nissl Staining to study neuronal morphology and cytoarchitecture. *Journal of histochemistry & Cytochemistry*. Vol 56(6): 539-550, 2008. <https://doi.org/10.1369/jhc.2008.950246>.
46. Götz J, Bodea L-V and Goeder M. (2018). Rodent models for Alzheimer disease. *Nature Reviews, Neuroscience* 2018;18: 583-598. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0054-8>
47. McLarnon J. (2014). Correlated Inflammatory responses and neurodegeneration in peptide-injected Animals Models of Alzheimer's Disease. Review Article. Hindawi Publishing corporation. *Biomed Research International* Vol 2014, Article ID923670. <https://doi.org/10.1155/2014/923670>
48. Xia Z, Peng W., Cheng S., Zhong B., Sheng Ch., Zhang Ch. et al. (2017). Naoling decoction restores cognitive function by inhibiting the neuroinflammatory network in a rat model of Alzheimers disease. *Oncotarget*, 2017; 8 (26): 42648-42663. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17337>
49. Liu Ch., Cui G., Zhu M., Kang X. and Guo. H. (2014). Neuroinflammation in Alzheimer's disease: chemokines produced by astrocytes and chemokine

- receptors. Review Article. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014;7 (12): 8342-8355.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc4314046/>
50. Venkatesh A, Daugherty A and Bennett I. (2021). Neuroimaging measures of iron and gliosis explain memory performance in aging, *Human Brain Mapp.* 2021, Dec 1; 42(17): 5761-5770. doi: [10.1002/hbm.25652](https://doi.org/10.1002/hbm.25652)
51. Kalita J, Kumar V, Misra U and Bora H. (2017). Memory and learning dysfunction following copper toxicity: biochemical and immunohistochemical basis. *Mol Neurobiol.* DOI [10.1007/s12035-017-0619](https://doi.org/10.1007/s12035-017-0619)
52. Serrano-Pozo A, Musikansky A, Gomez-Isla T et al. (2013). Differential relationships of reactive astrocytes and microglia to fibrillar amyloid deposits in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2013 Jun; 72(6): 462-471. doi: [10.1097/NEN.0b013e3182933788](https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3182933788).
53. Kaur D., Sharma V and Deshmukh. (2019). Activation of microglia and astrocytes: a roadway to neuroinflammation and Alzheimer's disease. *Inflammopharmacology*, 2019;27:663-677. <https://doi.org/10.1007/s10787-019-00580-x>.
54. Yi S, Barnett B, Torres-Velásquez M, Zhang Y, Hurley S, et al. (2019) Detecting Microglial Density with quantitative multi-compartment diffusion MRI. *Front Neurosci.* 2019 Feb 19, 13:81. doi: [10.3389/fnins.2019.00081](https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00081). eCollection 2019.
55. Franco R and Fernández- Suarez D. (2015). Alternatively activated microglia and macrophages in the central nervous system. *Prog Neurobiol.* (2015) Aug;131:65-86. doi: [10.1016/j.pneurobio.2015.05.003](https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.05.003).
56. Takata, K, Amamiya, T, Mizoguchi, H, Kawachi, S, et al. (2018). Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor specific agonist DMXBBA (GTS-21) attenuates A $\beta$  accumulation through suppression of neuronal  $\gamma$ -secretase activity and promotion of microglial

- amyloid- $\beta$  phagocytosis and ameliorates cognitive impairment in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*. 2018; 62: 197-209. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2017.10.021>.
57. Hain E., Sparenberg M., Rasinska J., Klein Ch., Akyuz L and Steines B. (2018). Indomethacin promotes survival of new neurons in the adult murine hippocampus accompanied by anti-inflammatory effects following MPTP-induced dopamine depletion. *Journal of Neuroinflammation*. 2018; 15: 162. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1179-4>.
58. Takamura R., Watanura N., Nikkuni M. and Ohshima T. (2017). All-trans retinoic acid improved impaired proliferation of neural stem cells and suppress microglial activation in the hippocampus in a Alzheimer's model. *J Neurosci Res*. 2017; 95(3):897-906. doi: 10.1002/jnr.23843.
59. Mirza F., Amber S., Sumera, Hassan Deeba., Ahmed T and Zahid S. (2021). Rosmarinic acid and ursolic acid alleviate deficits in cognition, synaptic regulation and adult hippocampal neurogenesis in an A $\beta_{1-42}$ -induced mouse model of Alzheimer's disease. *Phytomedicine* 83(2021) 153490. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153490>
60. Wadhwa M., Prabhakar A., Ray K., Roy K., Kumanri P., Kumar Jha P. and et al. (2017). Inhibiting the microglia activation improves the spatial memory and adult neurogenesis in rat hippocampus during 48 h of sleep deprivation. *J Neuroinflammation* 2017; |4:222. doi: [10.1186/s12974-017-0998-z](https://doi.org/10.1186/s12974-017-0998-z).
61. Yenkyoyan K., Margaryan T., Martinyan S., Chavushyan V., and et al. (2022). Effects of  $\beta$ -amyloid (1-42) administration on the main neurogenic niches of the adult brain:

amyloid-induced neurodegeneration influences neurogenesis. *Int J. Mol Sci.* 2022; 23(23): 15444. DOI: [10.3390/ijms232315444](https://doi.org/10.3390/ijms232315444).

# **ANEXOS**

## Anexo# 1

### Procedimiento de tinción inmunohistoquímica colorimétrica Iba-1

Modificado 2021.04.26 Lorena Adames/MBC

1. Seleccionar de 3 a 5 cortes por pozo (hipocampo dorsal).
2. Bloquear 2%BSA, 0.3% TritonX100 en PBS + 0.02 % NaN<sub>3</sub> una hora a temperatura ambiente en un agitador de laboratorio. 500 ml/pocillo
3. Remover la solución de bloqueo aspirando con una pipeta.
4. **Primer anticuerpo:** Incubar los cortes de tejido cerebral toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario en el agitador de laboratorio, (300 ml/pocillo)

**Anticuerpo primario: Iba1/AIF-1 (E404W) XP® Rabbit mAB**, 1:50-1:200 en solución de bloqueo (Cell Signaling Technology) para la detección de las células de la microglía. Se utilizó como marcador la proteína Iba1, que se expresa de forma específica en macrófagos y en células de la microglía, y que es regulada positivamente ante la activación de dichas células.

Mezclar: 1000 ml solución de bloqueo +5 µl anticuerpo

5. En la mañana del día siguiente: **Lavado:** 3 veces con 1x PBS. Cada lavado tuvo una duración de 5 minutos en el agitador de laboratorio.

6. **Segundo anticuerpo Para Iba-1:** Rabbit Alexa Fluor 594, 1:200- 1:1000 en Blocking.  
300 ml/pocillo

Mezclar: 1000 ml solución de bloqueo+ 1 µl anticuerpo

7. **Lavado:** 3 veces con 1x PBS. Cada lavado tuvo una duración de 5 minutos en el agitador de laboratorio. (300 ml/pocillo)
8. Montar secciones en portaobjeto.

9. Agregar una gota de **Fluoro Shield Mounting Medium with DAPI** por sección montada.

Cubrir con cubreobjeto.

10. Guardar a 4°C hasta visualizar en microscopio.

## Anexo #2

### Procedimiento de tinción inmunohistoquímica con fluorescencia GFAP

Modificado 2021.04.26 Lorena Adames/MBC

1. Seleccionar de 3 a 5 cortes por pozo (hipocampo dorsal).
2. Bloquear 2%BSA, 0.3% TritonX100 en PBS + 0.02 % NaN<sub>3</sub> media a una hora a temperatura ambiente en agitador de laboratorio. 500 ml/pocillo
3. Remover la solución de bloqueo aspirando con una pipeta o mover tejido al siguiente pocillo (ya con anticuerpo)
4. Incubar toda la noche las secciones flotando libremente con moderada agitación a temperatura ambiente con el anticuerpo primario **GFAP (GA5) Mouse mAB**, Cell Signaling, 1:300 in solución de bloqueo  
Mezclar: 1000 ml solución de bloqueo + 3.3 µl anticuerpo
5. Lavar tres veces con PBS por 5 minutos sobre el agitador.
6. Incubar con el **anticuerpo secundario**: Goat anti-mouse Ig H&L, Alexa Fluor 488 (abcam) por 60 minutos a temperatura ambiente.  
Mezclar: 1000 ml solución de bloqueo + 1 µl anticuerpo
7. Lavar tres veces con PBS por 5 minutos sobre el agitador.
8. Cubrir las laminillas con **Fluro Shield Mounting with DAPI** para marcar los núcleos de las células.
9. Observar los tejidos con microscopio de fluorescencia

**Control negativo:** se usará el mismo protocolo para cada grupo experimental sin incubación con el respectivo anticuerpo primario

## ANEXO # 3

### Procedimiento de tinción inmunohistoquímica colorimétrica BrdU

Modificado 2021.05.24 Lorena Adames/MBC

**DÍA 1: siguiendo el tiempo de incubación de 1-2 horas con el anticuerpo primario, el procedimiento puede realizarse todo en un día.**

#### **I. Desenmascaramiento de antígeno**

1. Calentar las secciones en baño maría a 80 grados centígrados con 10 ml de solución de ácido cítrico al 0.01M, pH 6 por 20min.
2. Dejar enfriar por 20 min hasta aproximadamente temperatura ambiente.
3. Lavar 2X con PBS 1X por 5 min cada lavado

#### **II. Bloqueo y anticuerpo primario**

1. Incubar con solución de bloqueo por 1 hora a temperatura ambiente.
2. Incubar con anticuerpo primario: monoclonal Anti BrdU clone BU 33 de ratón (SIGMA), en una dilución 1:200) a temperatura ambiente por 1-2 horas o toda la noche a 4°C.
3. Lavar 3X con PBS 1X por 5 min cada lavado.

#### **DÍA 2**

#### **III. Anticuerpo secundario (Biotin-Extravidin conjugado)**

1. Incubar con biotin (1:20) por 30 min.
2. Lavar 3X con PBS 1X por 5 min cada lavado.
3. Incubar con extravidin (1:20) por 30 min.
4. Lavar 3X con PBS 1X por 5 min cada lavado.

#### **IV. Signal stain with DAB**

1. Preparar solución de trabajo: Agregar una gota de “Signal stain concentrate” a 1ml de la mezcla diluyente DAB (es estable por 14 días si es protegido contra la luz y guardado a 4 grados centígrados).
2. Agregar 300  $\mu$ l de solución de trabajo DAB a un pocillo.
3. Pasar secciones al pocillo e incubar por 10 min.
4. Lavar 1X con PBS 1X por 5 min.

#### **V. Montaje**

1. Montar secciones en orden siguiendo el Atlas de Paxinos y Watson.
2. Quitar el exceso de PBS con toallitas delicadas y dejar secar por 10 min aproximadamente.
3. Colocar DPX que es el medio de montaje
4. Colocar cubreobjeto, evitando formar burbujas
5. Dejar secar.
6. Las secciones pueden ser vistas en el microscopio.

## ANEXO #4

### Procedimiento de tinción inmunohistoquímica colorimétrica NeuN

Modificado 2021.05.20 Lorena Adames/MBC

**DÍA 1: siguiendo el tiempo de incubación de 1-2 horas con el anticuerpo primario, el procedimiento puede realizarse todo en un día.**

#### **I. Bloqueo y anticuerpo primario**

1. Incubar con buffer de bloqueo por 1 hora a temperatura ambiente.
2. Incubar con anticuerpo primario (Anti-NeuN rb, dilución 1:300) a temperatura ambiente por 1-2 horas o toda la noche a 4°C.
3. Lavar 3X con PBS 1X por 5 min cada lavado.

#### **DÍA 2**

#### **III. Anticuerpo secundario**

1. Incubar con Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) ab205718 en (1:2000) por 1h.
2. Lavar 3X con PBS 1X por 5 min cada lavado.

#### **IV. Signal stain with DAB**

1. Preparar solución de trabajo: Agregar una gota de “signal stain concentrate” a 1ml de la mezcla diluyente DAB (es estable por 14 días si es protegido contra la luz y guardado a 4 grados centígrados).
2. Agregar 300 µl de solución de trabajo DAB a un pocillo.
3. Pasar secciones al pocillo e incubar por 10 min.
4. Lavar 1X con PBS 1X por 5 min.

#### **V. Montaje**

1. Montar secciones en orden siguiendo el Atlas de Paxinos y Watson.

2. Quitar el exceso de PBS con toallitas limpiadoras y dejar secar por 10 min aproximadamente.
3. Colocar DPX o medio de montaje.
4. Colocar cubreobjeto, evitando formar burbujas
5. Dejar secar.
6. Las secciones pueden ser vistas en el microscopio de luz.

## **ANEXO# 5**

### **Procedimiento de Tinción Rápida de Golgi**

Modificado por 2022.02.12. Lorena Adames/María Carreira

#### **FIJACIÓN**

1. Disecar los cerebros del cráneo, cortarlos por la mitad.
2. Fijar inmediatamente en paraformaldehído al 5% en PBS con un pH 7.6 durante 2 días a 21°C.

#### **TINCIÓN**

3. Después de la fijación inicial, transferir los cerebros a una solución cromatada recién preparada conteniendo 3% de dicromato de potasio y 5% de paraformaldehído en PBS con pH 7.6.
4. Cambiar la solución cromatada diariamente con soluciones recién preparadas.
5. Después de 48 horas de cromación, lavar los cerebros varias veces con una solución de nitrato de plata al 2% en agua destilada antes de la incubación en nitrato de plata durante otras 48 horas para que se produzca la precipitación de metales pesados
6. Cubrir los cerebros con papel de aluminio para evitar la exposición a la luz.
7. Etiquetar los bloques de tejido etiquetados con el método Golgi y guardar a 4°C.

#### **CORTE HISTOLÓGICO Y MONTAJE**

8. Cortar secciones de 80 micrómetros en un criostato a 5°C
9. Colocar las secciones cortadas a temperatura ambiente en portaobjetos cubiertos previamente con gelatina
10. Montar el cubreobjetos utilizando DPX.