



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

**EFFECTO DEL AMILOIDE-BETA 25-35 SOBRE LA LÍNEA
CELULAR C6 DE RATA: CRECIMIENTO, ADHESIÓN Y
PROLIFERACIÓN.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

MINERVA EDITH CALVILLO VELASCO

DIRECTOR DE TESIS. DR. MIGUEL ÁNGEL JORGE GUEVARA FONSECA

MÉXICO, D. F.

FEBRERO 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS:

Agradezco el apoyo brindado para la realización y terminación de este trabajo al:

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Del mismo modo, agradezco al comité tutorial por su apoyo y por sus aportaciones para la realización de este trabajo:

Dra. Rosalinda Guevara Guzmán.

Dr. Abel Santamaría del Ángel.

Dr. Miguel Ángel Jorge Guevara Fonseca.

Dra. Selva Rivas Arancibia.

Dr. Edgar Arturo Zenteno Galindo.

Agradezco de manera muy especial, a la M. en C. Blanca Espinosa Mancilla por sus consejos y por su orientación sobre el cultivo celular y por dedicarme su tiempo.

Al Dr. Luis Felipe Montaña por sus comentarios al trabajo y por los anticuerpos facilitados.

A la Dra. Ma. Lucinda Aguirre Cruz (Directora de Investigación) por las facilidades y el interés que me otorgó para poder finalizar este trabajo.

A la Srita. Verónica Romero Ruíz por la ayuda que, de manera desinteresada siempre me otorga.

Al Ingeniero Ricardo Resendiz por su disposición, ayuda y consejos sobre computación.

DEDICATORIAS

Este trabajo se lo dedico:

A Luis Carlos Marcherpa, por el amor que me das en todo momento.

A mis padres, seguirán siendo el ejemplo a seguir.

A todos mis hermanos y sobrinos, con mucho cariño.

A Matilde Suzuki, sigue el mismo camino...

A la banda: Rodolfo, Francisco, Joaquín y Mirella. ¡Gracias amigochos!

ÍNDICE

I.- RESUMEN.....	1
II.- ABSTRATC.....	3
III.- INTRODUCCIÓN.....	4
3.1.1.- La enfermedad de Alzheimer (EA).....	4
3.1.2.- Definición.....	5
3.1.3.- Formas de presentación.....	6
3.1.4.- Epidemiología.....	7
3.1.5.-Factores de riesgo.....	8
3.1.6.- Apolipoproteína E (ApoE).....	8
3.1.7.- Proteína precursora del amiloide- β (APP).....	10
3.1.8.-Presenilinas (PS-1, PS-2).....	12
3.2.1.- Neuropatología de la EA.....	13
3.2.2.- Las marañas neurofibrilares (MNs).....	15
3.2.3.- Las placas neuríticas (PNs).....	19
3.2.4.- Amiloide- β ($A\beta$).....	21
3.3.1.-Inflamación en la enfermedad de Alzheimer.....	24
3.4.1.-Alteración de la barrera hematoencefálica (BHE).....	27
3.5.1.-Alteración neurovascular en la enfermedad de Alzheimer.....	30
3.6.1.-Células gliales C6 y el $A\beta$	31
IV.- JUSTIFICACIÓN.....	32
V.- OBJETIVOS.....	33
VI.- HIPÓTESIS.....	34
VII.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
7.1.- Ensayo in vitro.....	35
7.1.2.- Ensayo in vivo	41
VIII.- RESULTADOS.....	44
8.1.- Efectos del $A\beta$ 25-35 sobre el cultivo de células C6.....	44
8.1.1.- Inmunocitoquímica.....	48
8.1.2.- Tabla.....	49
8.1.3.- Claudinas.....	50

8.1.4.- Lectinas.....	52
8.1.5.- CD105 y von Willebrand.....	53
8.2.1.- Efecto de la microinyección del Aβ en el hipocampo de la rata.....	54
8.2.2.- Gráfica.....	57
IX.- DISCUSIÓN.....	58
X.- CONCLUSIÓN.....	62
XI.- REFERENCIAS.....	63

RESUMEN.

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un desorden neurodegenerativo que se caracteriza por pérdida progresiva de la memoria. El análisis histológico presenta marañas neurofibrilares (la proteína tau está hiperfosforilada), placas neuríticas (depósitos extracelulares de amiloide-beta), neuritas distróficas y astrocitosis reactiva. Esta última, debido al proceso inflamatorio que provoca el depósito del amiloide-beta ($A\beta$). Se sabe que el $A\beta$ es tóxico o trófico. La toxicidad depende de la agregación del péptido, cuando se administra tanto *in vivo* como *in vitro*. Por otra parte, se proponen mecanismos de regeneración neuronal y dendrítica en la EA. Por lo tanto los mecanismos de compensación de la muerte neuronal masiva están ligados a la activación de factores tróficos y de crecimiento neuronal. De esta manera, se encuentra aumentada la expresión de proteínas sinápticas y de factores tróficos. Adicionalmente, el proceso de plasticidad neuronal está ligado a la expresión de moléculas de adhesión en cerebros con la EA. Se sabe que, la plasticidad que se observa en la EA está relacionada con la expresión de proteínas que regulan el crecimiento neuronal y se desconoce la expresión de factores tróficos y, cómo estos favorecen el proceso de plasticidad reactiva. Por lo tanto, los objetivos de este trabajo fueron: evaluar el efecto trófico de la fracción 25-35 del $A\beta$ ($A\beta_{25-35}$), así como la expresión de moléculas de adhesión, crecimiento y proliferación, tanto *in vivo* como *in vitro*. Se cultivaron células C6, con dosis crecientes del $A\beta_{25-35}$ y se dejaron incubar a diferentes tiempos. Posteriormente, las células fueron fijadas procesadas para la inmunocitoquímica con anticuerpos para claudinas 1, 4, 7 y 9; lectinas MRL y SNA; CD105 y factor von Willebrand, se observaron al microscopio y capturó la imagen. Por otro lado, se utilizaron ratas Wistar macho adultas, se hizo la microinyección por cirugía estereotáxica del $A\beta_{25-35}$ en el hipocampo. Los animales fueron sacrificados a las 8, 24, 360 y 720 horas. Se disecó y se procesó el cerebro para realizar el análisis inmunohistoquímico contra la proteína glial fibrilar ácida y revelada con peroxidasa de rábano. Se contaron los astrocitos reactivos con un sistema de medición computarizado. Los resultados del tejido se graficaron y se expresaron como media y error estándar. Los ensayos *in vitro* mostraron que a las 72 horas, las

células crecieron de tal forma que formaron cúmulos o “colonias” que, a la concentración mayor del péptido se formaron “conductos”. La claudina-1 fue positiva levemente; las claudinas 4, 7 y 9 fueron muy positivas a la concentración mayor del péptido; la CD105 y el factor von Willebrand fueron positivos respecto a su grupo control. Por otro lado, en el hipocampo de la rata el A β 25-35 no se observó efecto trófico. Se concluye que el efecto trófico del A β 25-35, en el modelo in vitro fue a las 72 horas de incubación, debido a la formación de “colonias” y a la expresión de las moléculas de adhesión y crecimiento.

ABSTRACT.

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder that presents deposits of beta amyloid in the cerebral cortex. Experimentally, beta amyloid may be both, trophic or toxic. However the plasticity observed in the AD is related with the expression of neuronal growth proteins. The expression of trophic factors and how these support the process of reactive plasticity is unknown. The aim of this study was to evaluate the trophic effects of β -amyloid, as well as expression of adhesion, growth and proliferation molecules on C6 cells incubated in vitro. Beta amyloid was added in increased concentrations on C6 cells and these were incubated in different times; claudins 1, 4, 7 and 9, lectins MRL and SNA, CD105 and von Willebrand factor were identified with immunostaining technique. The trophic effect of beta amyloid occurred 72 hours after. Clusters of cells were observed and these eventually formed colonies with structures like ducts. The claudins expression was observed only at higher concentration; CD105 and von Willebrand factor were also expressed only at higher concentration. On the other hand, beta amyloid was microinjected into the male Wistar rats hippocampus. The animals were sacrificed at different times and the brain was processed with immunostaining technique for glial fibrillary acidic protein. The astrocytes number was counted with a computerized measuring system; the number of astrocytes was expressed as mean plus standard error. The administration of beta amyloid did not produce trophic effects in rat's hippocampus. We conclude that the trophic effect of beta amyloid only was seen at 72 hours after and, both trophic and angiogenesis factors were expressed in our cellular system.

INTRODUCCIÓN.

Enfermedad de Alzheimer.

La enfermedad de Alzheimer (EA), es un desorden neurodegenerativo y progresivo con deterioro en la memoria de corto plazo. Fue descrita en 1906 por Alois Alzheimer en una paciente de 51 años que cursaba con un cuadro clínico de delirio celotípico, deterioro progresivo de la memoria y finalmente desarrolló un cuadro de demencia con desorientación, afasia, apraxia, agnosia e incapacidad para realizar actividades de la vida diaria. Esta paciente murió a los 56 años de edad en un estado de demencia severo^{1,2}fig 1.



Figura 1.- Fotografía de la paciente que atendió Alois Alzheimer.

Definición de la Enfermedad de Alzheimer.

La Clasificación Internacional de las Enfermedades define a la EA, como un síndrome debido a una enfermedad del cerebro, generalmente de naturaleza crónica o progresiva, en la que hay déficit de múltiples funciones corticales superiores que repercuten en la actividad cotidiana del enfermo³. Clínicamente, la EA se define como un síndrome neurodegenerativo caracterizado por una serie de anormalidades que afectan selectivamente regiones neuronales específicas tales como: neocorteza, área entorrinal, hipocampo, amígdala, núcleo basal, tálamo anterior y varios núcleos monoaminérgicos del tallo cerebral (locus coeruleus y raphe). También hay un declive en el funcionamiento intelectual que abarca funciones como la memoria, el lenguaje, las praxias, las gnosias así como las funciones ejecutivas y que con el paso del tiempo genera una pérdida o deterioro global en cada uno de los procesos cognitivos^{4,1} Fig. 2.

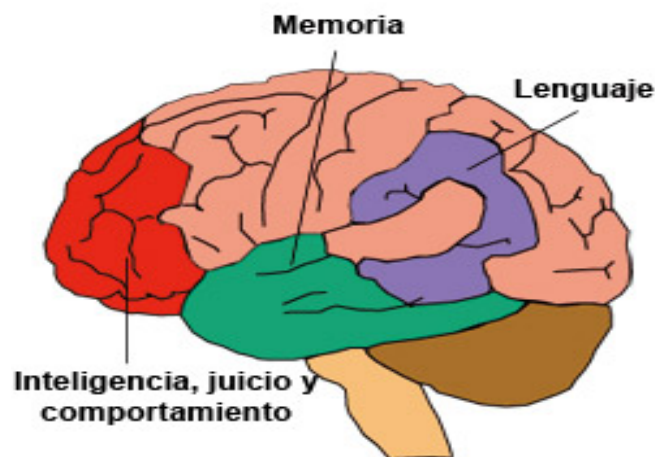


Figura 2.- Esquema de las regiones afectadas durante el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. Corteza frontal (rojo), hipocampo (verde), lóbulo parietal (azul).

Es importante mencionar que el diagnóstico de la EA se realiza por exclusión de otras patologías, utilizando criterios establecidos en DSM-IV, ICD-10 y NINCDS-ADRA, realizándose la confirmación del diagnóstico mediante el examen neuropatológico y en base a los criterios del CERAD⁵.

Formas de presentación de la EA.

La EA se manifiesta en diversas formas, según la edad de inicio se denomina como presenil de inicio precoz, generalmente con clara relación familiar; comienza antes de los 65 años, es de curso muy rápido y constituye del 5 al 10 % de los casos. La senil o de inicio tardío, aparece después de los 65 años por lo general es espontánea y de curso lento. Este tipo representa más del 90 al 95 % de los casos. Cuando la causa es genética (familiar) coincide en la mayoría de los casos con la EA presenil. Este tipo se debe, principalmente a mutaciones en el gen de la proteína precursora del A β ; el gen de las PS1 y PS2. La segunda forma de EA es la esporádica, la cual coincide generalmente con los casos de EA senil, comienza en personas mayores de 65 años y es el tipo más frecuente. Su causa es aún desconocida, aunque se han descrito distintos factores genéticos que aumentan el riesgo de padecer la enfermedad como es la presencia de la ApoE². Fig. 3

Genes relacionados con la EA				
Gen	Ubicación	Tipo de Herencia	Edad de inicio	Relación causal C/R
PPA β	21q21.2	H. A. D.	35-50	Si , $\uparrow\beta A$, $\downarrow PPA_s$, $\uparrow ROS$ y alteración del Ca^{2+}
PS1	14q24.3	H. A. D.	28-60	Si , $\uparrow\beta A_{42}$, $\uparrow ROS$ y alteración del Ca^{2+}
PS2	1q42.1	H. A. D.	35-82	Si , $\uparrow\beta A_{42}$, $\uparrow ROS$ y alteración del Ca^{2+}
ApoE	19q13.2	Polimof.	60-85	No , Unión a βA y Tau
CO-I y II	mtDNA	H. M.	60-85	No , estres oxidativo y \downarrow de energía disponible
Otros	12, 3, 4, 6, 9 y 13	Polim. o H. A. D.	Tardío, en gral.	No y si , desconocido

Figura 3. Formas de presentación de la EA. Se esquematiza aquí las dos formas de presentación de la EA. La EA familiar en donde se describe los diferentes genes involucrados y su herencia de tipo autosómico dominante. Se describe también la participación del gen de la ApoE como factor de riesgo. Y las mutaciones recientemente descritas en otros genes cuya relación con la EA aún no esta bien establecida.

Epidemiología.

Hoy en día la EA es un problema de salud pública. Se dice que es la forma más frecuente de demencia. Tan sólo en los Estados Unidos existen de 4 a 5 millones de personas que la padecen, siendo similar la incidencia de la EA en los países industrializados⁶. La EA, es considerada como la causa más frecuente de demencia en el mundo industrializado, siendo responsable del 50% al 70% del total de los casos. Afecta a uno de cada tres individuos por encima de los 85 años^{7,8}. La EA tiene un incremento exponencial de la prevalencia con la edad, que se duplica cada 4.5 años, después de los 65 años. Hay una correlación entre el incremento de la prevalencia y la edad con un crecimiento mayor para el sexo femenino⁵.

En México, la EA es un padecimiento que va en aumento. Se calcula que en nuestro país hay unos 600,000 casos de probable EA, aunque no todos están diagnosticados. Aún cuando en México no hay estadísticas precisas sobre el número de enfermos, se calcula que la frecuencia de este desorden aumenta a mayor edad, hasta llegar al 45 % de la población de 85 años en adelante^{9,10}.

Factores de riesgo.

Uno de los factores de riesgo más importante para que se desarrolle la EA es el genético. La apolipoproteína A4 es el principal factor de riesgo, entre otros, combinados con factores debido al envejecimiento, son suficientes para dicho desarrollo. Además, también contribuyen los factores ambientales. Otros factores importantes son los demográficos, como la edad, sexo, lugar de nacimiento, escolaridad. Los estudios de prevalencia demuestran un marcado efecto de la edad, estimándose que esta se duplica cada 5 años entre los 65 y los 80 años. Los antecedentes de traumatismo craneoencefálico con pérdida de conciencia duplican el riesgo de desarrollar la enfermedad¹¹.

Apolipoproteína E4.

La herencia del alelo 4 de la apolipoproteína E (ApoE4), incrementa el riesgo de desarrollar la EA. Tanto en su forma familiar como esporádica, dicho alelo ha resultado ser el responsable del 40 al 50 % del riesgo de padecer la EA de inicio tardío. El gen que codifica la Apo E se localiza en el brazo largo del cromosoma 19. Dicho gen posee tres variantes polimórficas o alelos (E2, E3, E4), de los cuales el más frecuente es el denominado E3, que constituye el 78% de los alelos presentes en la población caucásica, le sigue el alelo E4 (15% de la población caucásica), mientras que el alelo E2 es el menos frecuente (7% de la población caucásica)¹² Fig. 4. La relación que existe entre la EA y el alelo E4 de la Apo E se describió como la frecuencia de aparición elevada de este alelo, en los casos familiares de inicio tardío, así como en los casos esporádicos, comparados con los controles tomados de la población normal¹³.

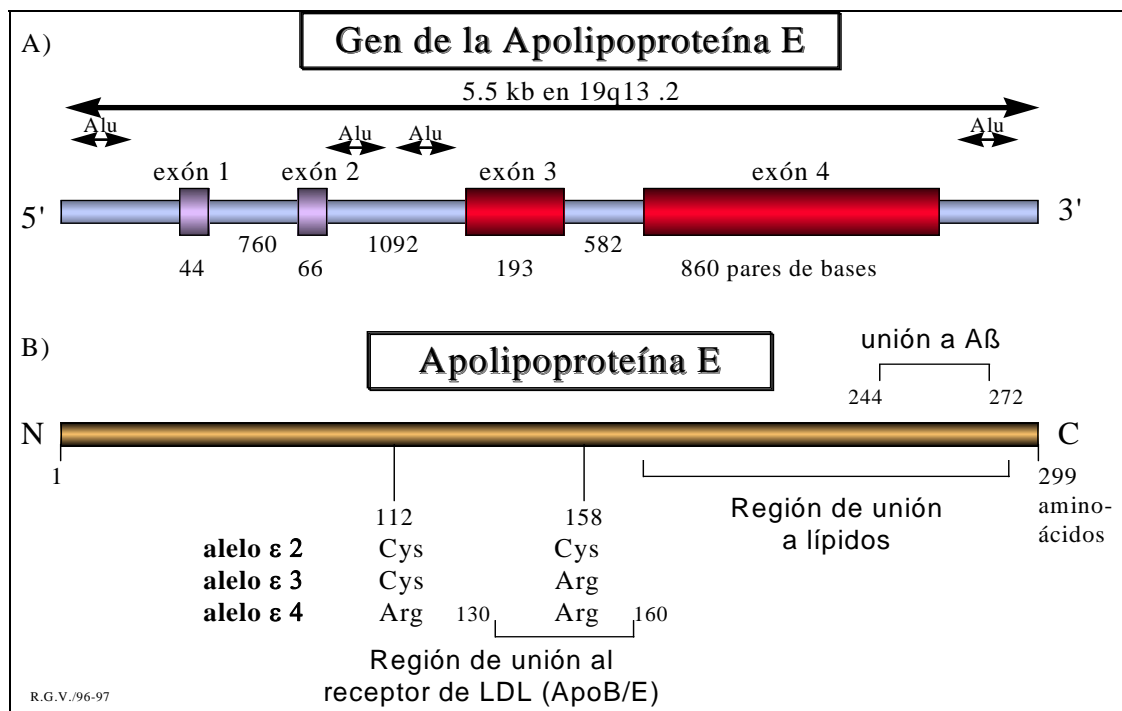


Figura 4. Gen y proteína de ApoE. Esquema que representa el gen de la ApoE (A) donde se representan sus 4 exones, peso y ubicación en el cromosoma 19. En B se observa el esquema que representa a la proteína los sitios posibles a sustituirse (112 y 158) que dan origen a las tres isoformas. También se muestran los sitios a la LDL y la región de unión a lípidos.

Proteína precursora del amiloide β .

La proteína precursora del amiloide β (APP), es una glicoproteína de membrana que pasa por el proceso de N y O-glicosilación durante su tráfico a través de la ruta secretora¹⁴; sufre 2 vías de procesamiento: la vía amiloidogénica y la no amiloidogénica, donde se genera el péptido amiloide. No se conoce la función precisa de la APP. Se menciona que sirve como un receptor ligado a proteínas G de la membrana, por medio de las cuales envía señales químicas al interior de las células^{15,16}. Tiene un dominio transmembranal único, una porción intracitoplásmica pequeña y un dominio extracitoplásmico largo. Tiene una región hidrofóbica de 23 residuos de aminoácidos, cerca de su extremo carboxilo terminal que le sirve para anclarse a la membrana. El dominio extracitoplásmico está sujeto a proteólisis parcial por la acción de las alfa, beta y gama-secretasas (α , β , γ -secretasas). El corte más frecuente se debe a la α -secretasa, y ocurre entre los aminoácidos 16 y 17 de la región del $A\beta$, que libera un fragmento soluble grande (APPs- α) y deja anclado a la membrana un fragmento de 83 aminoácidos. Cuando el fragmento carboxilo terminal de 83 residuos es cortado por la γ -secretasa, se genera un fragmento pequeño de 3 kDa denominado p3. Esta es la vía no amiloidogénica. En la vía amiloidogénica la β -secretasa lleva a cabo el corte de la APP, liberando un fragmento soluble truncado (APPs β) y deja anclado otro de 99 residuos de aminoácidos, sobre el cual el corte de la γ -secretasa genera el $A\beta$ ¹⁷. Las mutaciones descritas se localizan cerca de los cortes producidos por las α , β , y γ -secretasas. La producción y depósito de $A\beta$, especialmente el $A\beta$ 1-42, forman las placas neuríticas¹⁸. Debido a estas mutaciones, las tres isoformas más estudiadas de la APP, contienen 671, 687 y 711 (o 713) residuos de aminoácidos^{19,20} Fig. 5.

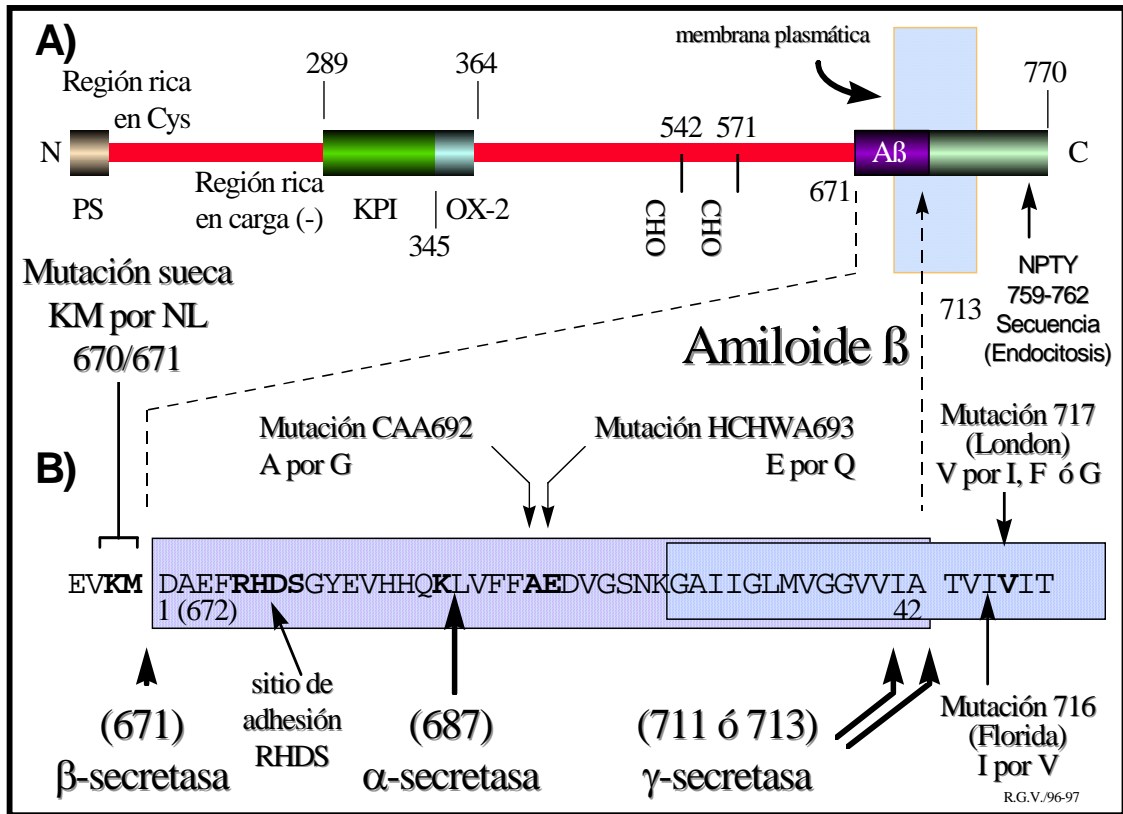


Figura 5. Esquema del precursor de la amiloide-β. A) Diagrama que representa al precursor del amiloide-β. Destacan la región Aβ que corresponde a la secuencia de amiloide-β enclavada en la membrana. B) Secuencia del amiloide-β de 42 residuos. Resaltan los tres sitios de corte posible por enzimas secretasas y los sitios de mutaciones descritas (negritas).

Presenilinas.

Las presenilinas 1 y 2 (PS1 y PS2) son proteínas de membrana politópicas, se expresan en la mayoría de los tipos celulares. Se localizan principalmente, en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi^{21,12}. Sin embargo, se ha visto que las mutaciones en las PSs influyen al procesamiento de la APP, de manera que se incrementa la producción en los niveles de A β 1-42²². Los genes de las PS1 y PS2, se localizan en los cromosomas 14 y 1 respectivamente y codifican para proteínas con múltiples dominios transmembranales y de gran homología y tiene una identidad del 62% de aminoácidos²³.

Neuropatología de la EA.

Cuando se analiza macroscópicamente el cerebro de un paciente que falleció debido a la EA, se encuentran alteraciones típicas como la atrofia cerebral generalmente simétrica y difusa de los giros cerebrales, lo que se hace evidente por la disminución del espesor de las circunvoluciones, aumento en la profundidad de los surcos, dilatación del sistema ventricular y disminución del peso y volumen cerebral, Fig 6.

Cerebro normal



Cerebro con Alzheimer



Figura 6.- En estas fotografías se muestra la alteración macroscópica del cerebro en la EA. Se aprecia la disminución de las circunvoluciones, debido a la muerte neuronal que ocurre durante la EA.

La atrofia afecta a los lóbulos temporales, frontales, parietales u occipitales. El patrón de atrofia más común es el difuso, seguido por una combinación de atrofia fronto-temporal, frontal o temporal aisladas y en menor proporción puede haber un compromiso parieto-occipital. Las secciones a través de los hemisferios cerebrales revelan un adelgazamiento de la lámina cortical y dilatación simétrica del sistema ventricular. Los ganglios basales, diencefalo, mesencefalo y el tronco cerebral no muestran anomalías notables²⁴.

Las dos alteraciones microscópicas típicas de la EA son las placas neuríticas (PNs) y las marañas neurofibrilares (MNs) Fig. 7. Sin embargo, también se observan alteraciones que incluyen: la angiopatía amiloidea, la degeneración granulovacuolar, los cuerpos de Hirano, pérdida neuronal y sináptica y gliosis reactiva.

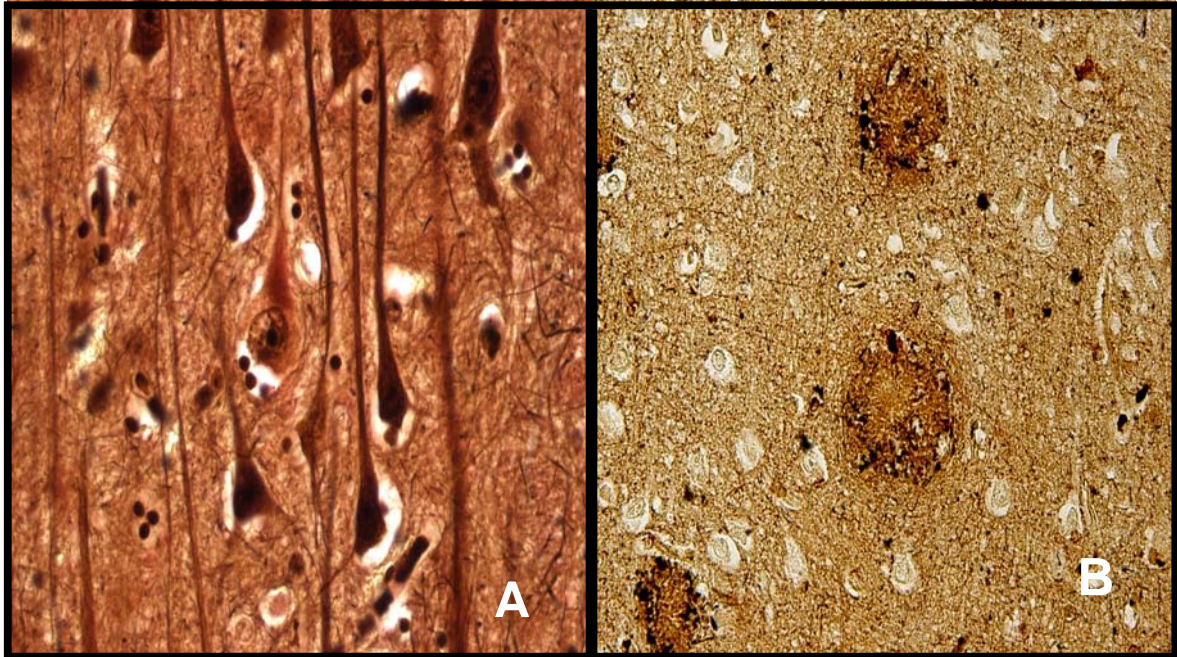


Figura 7.- En estas fotografías se observan (A): las marañas neurofibrilares que se forman por la alteración en la fosforilación de la proteína tau y (B): las placas neuríticas, se observa el núcleo del A β que se fue depositando. La tinción usada en ambas estructuras es la técnica de Wielchoscky. Fotografías del Dr. Guevara.

Marañas neurofibrilares.

Las marañas neurofibrilares (MNs), están formadas por la acumulación de la proteína tau hiperfosforilada Fig. 8. La tau es una proteína que se asocia a los microtúbulos que forman el citoesqueleto de las células. Se expresa principalmente en el sistema nervioso central (SNC). Tiene un papel central en la polimerización y estabilización de los microtúbulos y en el tráfico de los organelos a través de los axones y las dendritas²⁵.

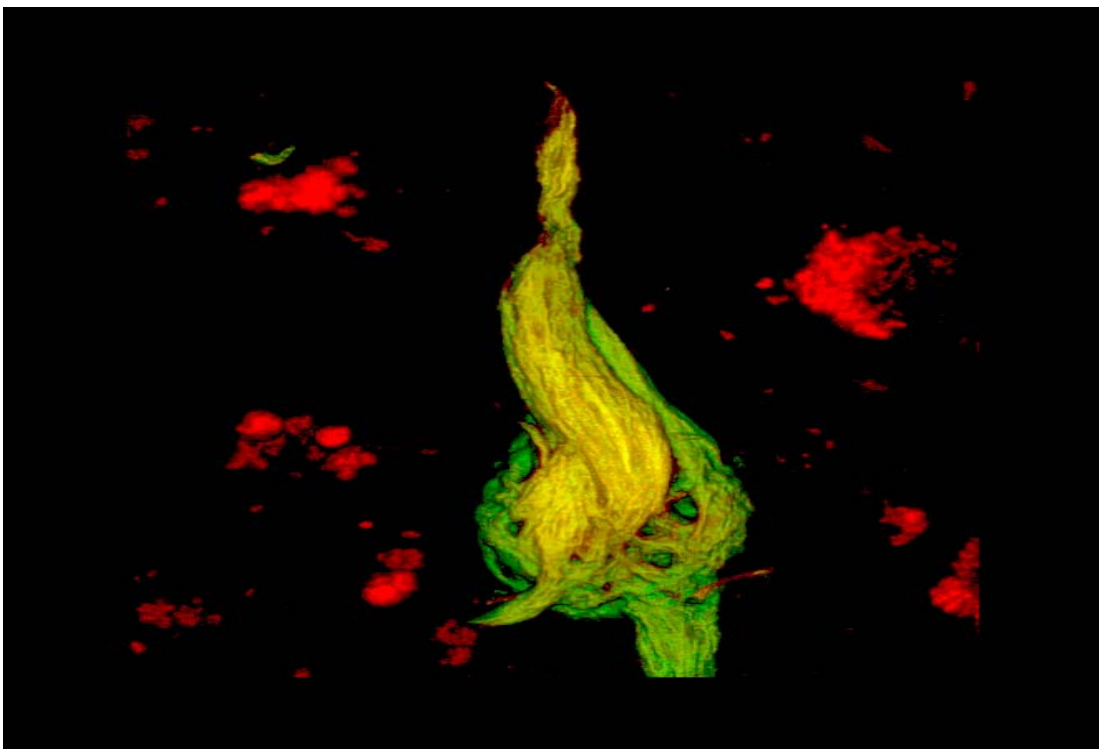


Figura 8.- Microfotografía de una maraña neurofibrilar con doble marcaje: rojo tiazina y anticuerpo anti-tau. Se observa en color verde la proteína tau normal; la colocalización con rojo de tiazina y el anticuerpo muestran los filamentos hiperfosforilados. Colección personal del Dr. Guevara.

El gen que codifica para la proteína tau se localiza en el cromosoma 17 (17q21). Es codificada por un gen que consiste de 16 exones y 100 kilobases²⁶. Su expresión se regula por el procesamiento alternativo. Existen seis isoformas con longitudes variadas (352, 381, 410, 383, 412 y 441 aminoácidos) Fig. 9. Las tres primeras son las isoformas fetales y las otras tres son las isoformas que se encuentran en el adulto; la diferencia entre ellas radica en el número de dominios

repetidos que contienen²⁷. Las isoformas en el SNC son generadas por el procesamiento alternativo de 11 exones. El procesamiento alternativo de los exones 2 (E2), 3 (E3) y 10 (E10) dan lugar a las 6 isoformas, las cuales van desde 352 a 441 aminoácidos. Las isoformas difieren si contienen 3 (tau-3L, tau-3S o tau-3: colectivamente 3R) o 4 (tau-4L, tau-4S o tau-4: colectivamente 4R), repetidos de unión a la tubulina, cada dominio repetido consta de 31 o 32 aminoácidos localizado en el carboxilo-terminal. También difieren por la presencia de 1 o 2 insertos de 29 aminoácidos localizados en el amino terminal de la molécula si tienen 2 (tau-3L, tau-4L), uno (tau-3S, tau-4S) o ninguno (tau-3, tau-4). Las secuencias repetidas de unión a microtúbulos son codificadas por los exones 9, 10, 11, o 12²⁸.

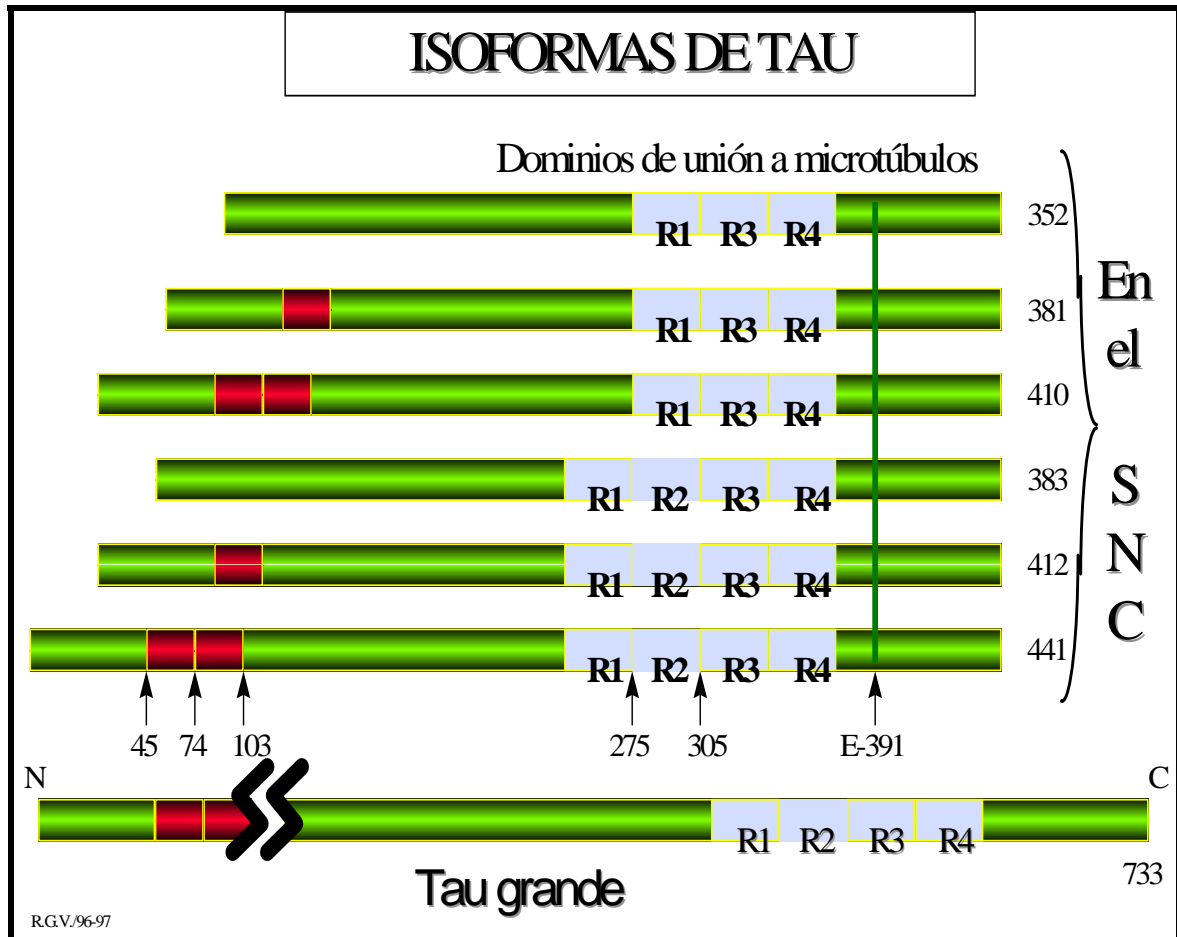


Figura 9. Isoformas de la proteína tau. Este esquema representa las 6 diferentes isoformas de la proteína tau. Las regiones marcadas con R indican los dominios repetidos de la molécula que enlazan a los microtúbulos. Se representa el sitio E-391, donde la molécula se trunca. Finalmente se esquematiza la tau grande que es la isoforma completa de tau. Nótese el número de repetidos (R) en cada isoforma.

En el cerebro adulto, la proporción de las isoformas 3R-tau a 4R-tau es de 50%, pero tau-3L (o 4L), tau-3S (o 4S), y tau-3 (o 4) es cerca del 54%, 37% y 9%, respectivamente^{28,29}.

En el proceso de fosforilación anormal de la proteína tau y su consiguiente transformación a filamentos apareados helicoidalmente (FHA del inglés filaments helicoidal apared) intervienen dos mecanismos: hiperactivación de una cinasa e hipoactivación de fosforilasas. La proteína tau hiperfosforilada conduce a un ensamblaje y desensamblaje alterado de los microtúbulos, y también contribuye a una incorporación adicional de tau normal en filamentos anormales. La glicosilación no enzimática es otra vía que puede aumentar la fosforilación de tau anormal y la estabilización de filamentos ensamblados de forma anormal. Esta vía parece contribuir de forma importante a la insolubilidad de la MN. Existen MNs intracelulares y extracelulares y son fácilmente visibles por varias tinciones histoquímicas de impregnación argéntica²⁴. Así mismo, se desarrollaron anticuerpos contra los sitios hiperfosforilados de la proteína tau y anticuerpos para el amiloide^{30,31}.

Placas neuríticas.

Las placas neuríticas (PNs) son lesiones del neuropilo, están constituidas principalmente por el depósito de A β . Son estructuras esféricas de 20 a 100 μ m de diámetro, localizadas en el espacio extracelular, donde se desplazan hacia las terminaciones nerviosas y los procesos celulares gliales del neuropilo^{32,24} Fig. 10. Además del A β se han detectado otras sustancias en las PNs, que incluyen al amiloide sérico P, así como varias proteínas de fase aguda, factores de complemento, proteoglicanos, ApoE4 y citocinas^{33,19}.

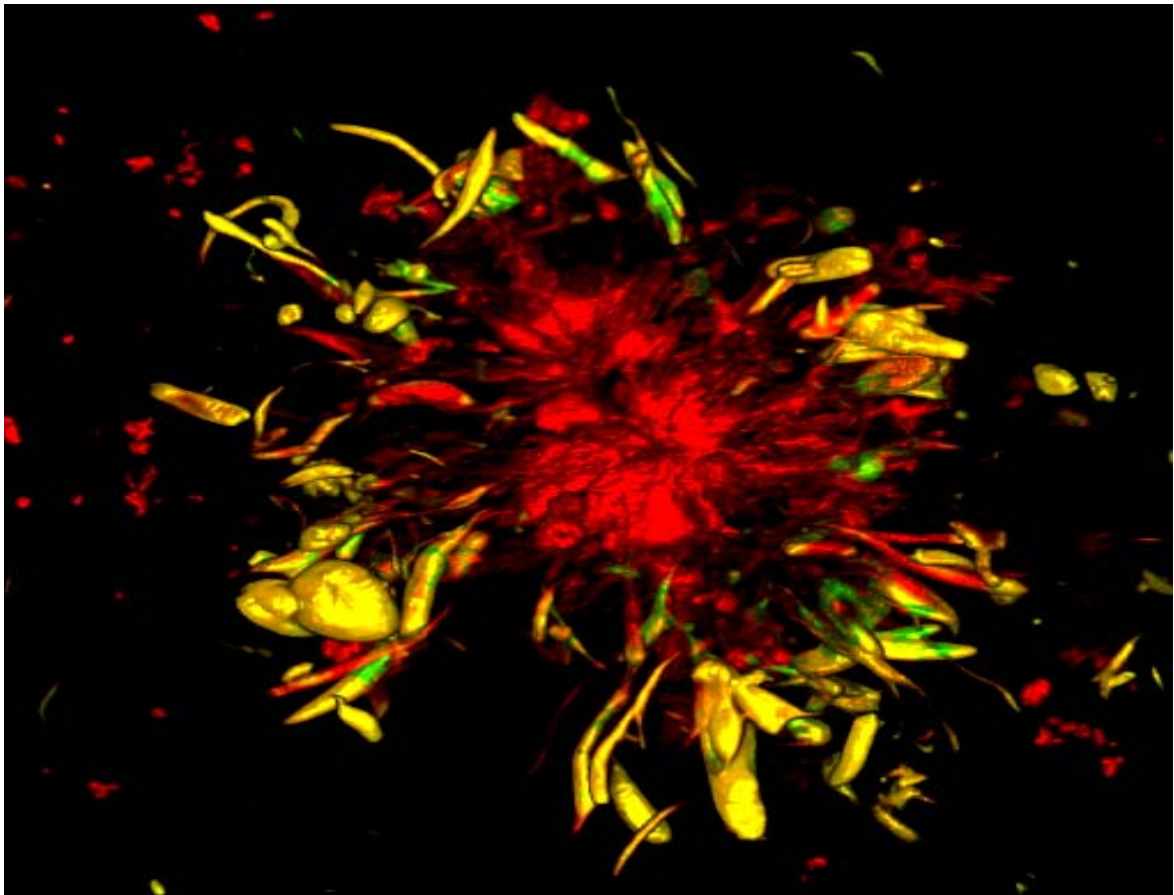


Figura 10.- Microfotografía de un placa neurítica. Se utilizó rojo tiazina y ant- β -amiloide. Se observa en rojo la proteína amiloide.

Se han descrito varios subtipos de PNs en función del contenido relativo de amiloide, neuritas distróficas, células gliales o la presencia de capilar central: placas difusas, placas primitivas, placas neuríticas clásicas y placas quemadas³⁴.

Las PNs clásicas, difusas y primitivas son más abundantes en la corteza, hipocampo y tálamo. En la corteza, las placas se distribuyen más densamente en la base de los giros. En el cerebelo hay placas difusas y clásicas en todas las capas corticales. Las PNs suelen ser más abundantes que las MN y más específicas para la EA ^{35,24,36}.

Amiloide- β ($A\beta$).

El $A\beta$ es un péptido pequeño de 4 a 4.5 kDa, consiste de 39 a 43 residuos de aminoácidos. Su estructura es beta plegada laminar^{37,38}. Es el producto del corte de la APP Fig. 11. Se deposita principalmente, en el hipocampo, en la corteza y en la microvasculatura cerebral. Por su estructura beta plegada, su conformación determina los efectos neurotóxicos^{39,40}.

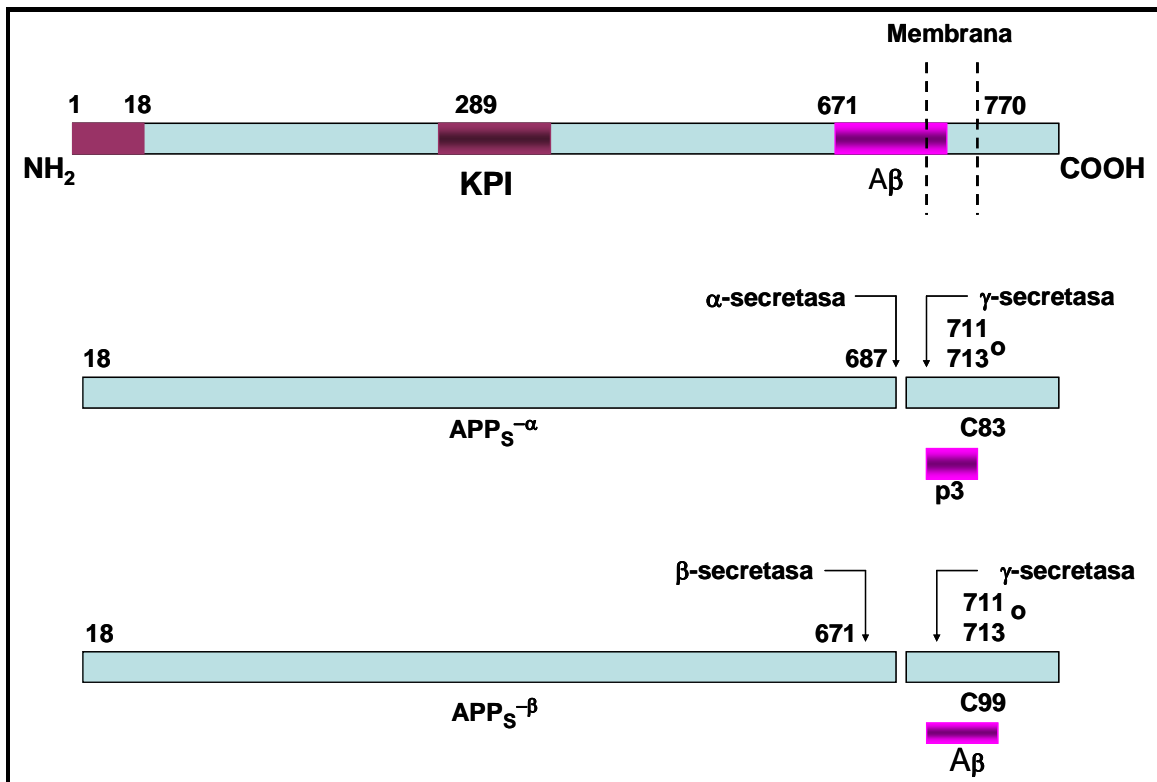


Figura 11.- Esquema simplificado para mostrar el procesamiento del fragmento del $A\beta$.

Se han utilizado diversos fragmentos del péptido $A\beta$ 1-40 o $A\beta$ 1-42, para comprobar los efectos tóxicos, ya que se ha visto que algunos de estos fragmentos producen efectos neurotróficos, en cultivo de neuronas hipocampales a concentraciones nanomolares^{41,42}. La agregación del $A\beta$ determina su neurotoxicidad; en cultivo primario de neuronas de hipocampo $A\beta$ 1-42 y $A\beta$ 1-28 sin incubar e incubados por un tiempo a una temperatura de 37°C, se mostró que los péptidos incubados son neurotóxicos⁴³. La modulación del flujo de Ca^{2+} por el $A\beta$ 1-40, en neuronas corticales de rata, es dependiente del estado de agregación

del péptido⁴⁴. En estudios in vitro, la toxicidad del A β es mediada por el amiloide en estado fibrilar. El A β agregado amorfo, no es tóxico, lo que indica que se requiere la formación de A β fibrilar^{45,46}.

No es claro el mecanismo por el cual el A β ejerce sus efectos neurotóxicos. Sin embargo, existen trabajos que sugieren que la alteración en la homeostasis del Ca²⁺ intracelular, modifica la actividad de la ATPasa de sodio y potasio (Na⁺/K⁺), provocando daño neuronal y muerte^{47,48}. El uso de un sistema de bicapas de membrana; mostró que el A β forma canales debido a la interacción con la membrana⁴⁹, y que esta interacción es la causa de la alteración de la homeostasis del Ca²⁺^{50,51}. Los canales formados por el A β 1-40, son de tamaño heterogéneo. Son independientes de voltaje y relativamente pobres en iones, permiten la entrada al Ca²⁺, Na⁺, K⁺, Cs⁺, Li⁻ y Cl⁻. Estos son bloqueados reversiblemente por el Zn²⁺ e irreversiblemente por el aluminio. El rojo congo inhibe la formación del canal⁵².

La fracción 25-35 (A β 25-35) del A β , representa el dominio funcional del péptido completo. El A β 25-35 consiste de la siguiente secuencia de 11 aminoácidos: NH₂-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-COOH⁵³. El A β 25-35 tiene efectos neurotóxicos y neurotróficos, los cuales dependen de la concentración y de la agregación^{54,55}.

Se ha observado que a bajas concentraciones el A β 25-35 es neurotrófico en cultivo de neuronas hipocampales indiferenciadas y a concentraciones altas es neurotóxico en células diferenciadas. Los efectos del A β 25-35 fueron mimetizados por los antagonistas de la taquicinina, un homólogo del péptido, y fueron revertidos completamente por agonistas de la taquicinina⁵⁶. A β 25-35 genera radicales libres en solución acuosa, estos radicales conducen al estrés oxidativo⁵⁷.

Se propone que el estrés oxidativo sea el mecanismo por el cual el A β ejerza su toxicidad⁵⁸.

El uso de antioxidantes previene la muerte celular de neuronas corticales de rata expuestas crónicamente al A β . Este tipo de tratamiento ejerce su efecto protector bajo ciertas condiciones del cultivo⁵⁹.

La microinyección de los fragmentos de A β 1-40, A β 1-38 y A β 25-35 en el cerebro de ratas, a diferentes concentraciones no muestra la patología relacionada a la EA^{60,61}. Debido a la falta de un modelo animal de la EA como tal, se han desarrollado varios experimentos para probar el efecto tóxico del A β . Se separó el núcleo de amiloide de la placa neurítica de un cerebro humano con la EA, se inyectaron varios núcleos de amiloide, en el cerebro de ratas, observándose efectos neurotóxicos y favoreciendo la hiperfosforilación de la proteína tau, reconocida por la expresión del antígeno Alz50 característico en la EA⁶², cuando se aplicó al cerebro de la rata.

La microinyección del A β 1-40 y del A β 25-35 en la corteza de monos no mostró daño similar a la EA⁶³. En ratones transgénicos se observó el mismo tipo de daño oxidativo que en la EA y la importancia de este daño correlacionó directamente con los depósitos de A β ⁶⁴.

El A β provoca muerte celular por apoptosis o por necrosis y es dependiente del tipo celular⁶⁵.

Un modelo in vitro de placas amiloides fue desarrollado a partir de A β 1-40 agregado, el cual fue añadido al cultivo de células gliales y se observó la formación de agregados esféricos grandes rodeados de astrocitos y glia. Estos agregados se analizaron y se observó que están rodeados de los mismos componentes que las placas en la EA e incluyen la birrefringencia verde intensa bajo la luz polarizada con el rojo congo y la liberación de sustancias como el complejo de histocompatibilidad mayor de clase II e IL-1 β ⁶⁶. Los experimentos con el hipocampo de ratas muestran que la falla de la potenciación a largo plazo (LTP), provocada por la administración de A β 25-35 (nanomolar) es dependiente de la concentración y del tiempo⁶⁷.

Inflamación en la EA.

La inflamación es un proceso fisiológico protector localizado, inducido por una lesión o por la destrucción del tejido. Su función es destruir y diluir al agente tóxico, así como proteger al tejido que está siendo lesionado⁶⁸. La respuesta inflamatoria en la EA se clasifica como una respuesta crónica contra los depósitos de A β e incluye la activación de la microglia la cual ataca a la placa neurítica y a la astroglia, que la rodea⁶⁹.

La activación continua de la microglia en las PNs y en las MNs, provoca una respuesta inflamatoria persistente. Esta respuesta inflamatoria crónica y la respuesta del tejido en las lesiones de la EA apoyan la noción de que el proceso inflamatorio es una parte de la patología de la EA⁷⁰ Fig. 12.

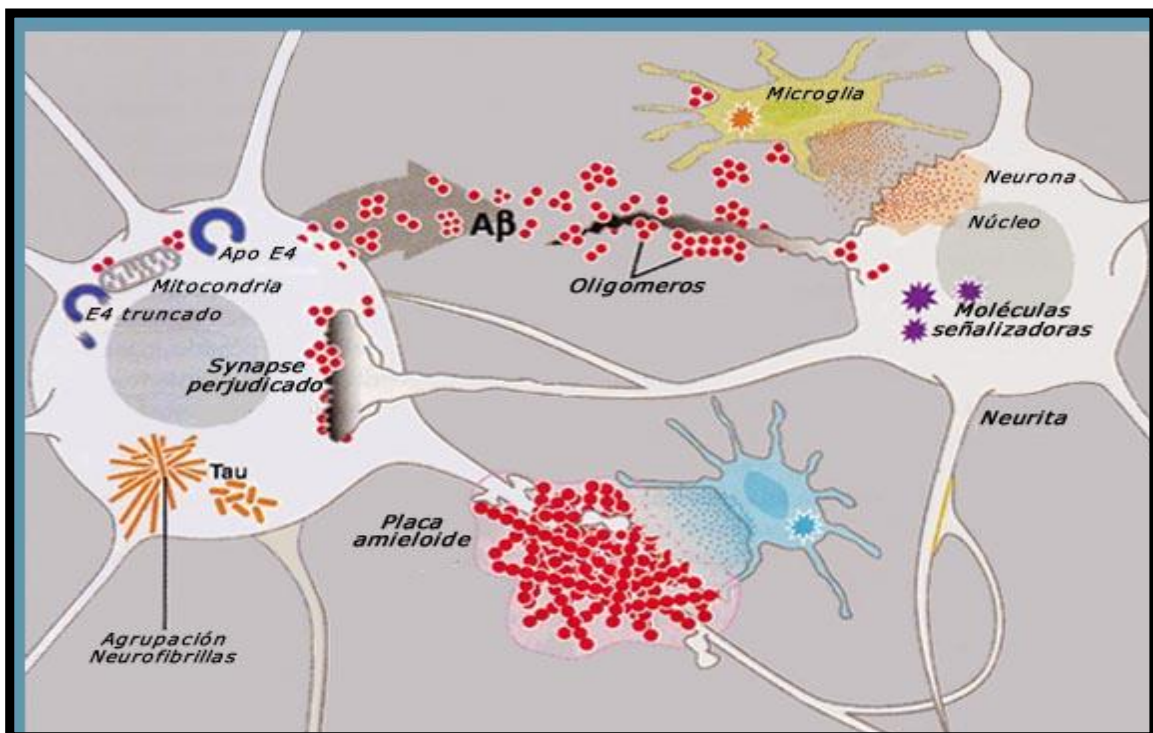


Figura 12.- Esquema que representa la activación de los astrocitos por el A β y, la consiguiente liberación de factores pro-inflamatorios.

El A β es un factor que desencadena la respuesta inflamatoria crónica en los cerebros de individuos afectados por la EA, dando lugar a la activación del sistema del complemento tanto por la vía clásica así como por la vía alterna, generando la

expresión y secreción de citocinas, interleucinas y proteínas de fase aguda y la secreción del A β ^{71,72,73,74}.

Además de expresar moléculas del sistema del complemento, la microglia activada expresa moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHCII), así como proteínas de fase aguda, que alteran la tasa de producción del A β . El primer componente de la ruta clásica del complemento es C1q, el cual acelera la génesis del A β llevando a la formación del complejo de ataque de membrana (MAC, C5b-9). Algunas de las citocinas (p. e. la interleucina 1 β , IL-1 β) influyen la expresión y metabolismo de la APP⁷⁴. Los fármacos antiinflamatorios dirigidos al complemento, pueden retrasar el inicio de la demencia en la EA^{75,76}.

Los cultivos primarios de astrocitos humanos, expresan moléculas del sistema del complemento así como otras moléculas reguladoras de la ruta lítica. El complemento sinergiza con el A β , aumentando la neurotoxicidad. La microglia asociada a las placas expresa receptores del complemento tales como CR3 y CR4, los cuales se unen a la opsonina C3b, derivada del complemento, sobre la superficie celular blanco^{77,78,79}.

La región amino terminal del A β activa directamente al sistema del complemento por la vía clásica a través de la interacción con Cq1. La IL-1 promueve la síntesis y procesamiento de APP, mientras que APP produce un aumento en la producción de IL-1. La IL-6 modula la síntesis y la transcripción de la APP. Es mínima en la vida adulta y es fuertemente inducible en condiciones patológicas⁸⁰.

Otra interleucina asociada es el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), el cual se encuentra aumentado en el líquido cefalorraquídeo, en el suero y en la corteza cerebral de pacientes con la EA. También se encuentra en los cultivos de células gliales y en astrocitos después de la exposición con el A β . Los mecanismos de acción y los efectos neurofisiológicos del TNF α en la EA son controversiales debido a su doble función de citocina proinflamatoria y factor trófico⁸¹. El A β es un potente estimulador del factor nuclear kapa-B (NF κ -B), el cual aumenta la expresión de otros factores proinflamatorios; esta activación ocurre selectivamente a partir del dominio 2 de transactivación de p65 y la expresión de la síntasa del

óxido nítrico (iNOs) y la producción del óxido nítrico (NO), inducido por el A β a través de un mecanismo dependiente del NF κ B⁸².

La secreción del TNF- α y de glutamato por el A β , induce efectos sinérgicos de la muerte neuronal, requiriendo la actividad de la iNOS y la producción de peroxinitrito. La muerte celular requiere de la estimulación con ambos ligandos ya que ninguno produce pérdida neuronal por separado⁸³.

El A β induce a la glia a ser reactiva in vitro, ya que aumentan los niveles de proteoglicanos de condroitin sulfato; un inhibidor de la regeneración neuronal encontrado en la cicatriz glial^{84,85}.

La IL-1 β sobrerregula la expresión de la proteína S100 β (un factor neurotrófico) así como a la APP, in vitro. Esta expresión apoyó la idea de que la IL-1 β en la EA dirige la sobreexpresión astrocítica de la proteína S100 β , favoreciendo el crecimiento de neuritas distróficas necesarias para la evolución del depósito del A β ^{86,69,87}.

Los estudios epidemiológicos indicaron que los pacientes que toman fármacos antiinflamatorios o sufren condiciones en las cuales los fármacos antiinflamatorios son usados de manera rutinaria, han disminuido el riesgo a desarrollar la EA⁸⁸.

Los astrocitos inhiben la producción de factores pro-apoptóticos por la microglia expuesta al A β ⁸⁹.

En cultivo de astrocitos de rata, el A β oligomérico indujo niveles altos de la IL-1 β , que disminuyeron con el tiempo. También, indujo niveles altos de la iNOs, NO y TNF α . El A β oligomérico, provocando una respuesta inflamatoria fuerte, mientras que el A β fibrilar mostró un incremento menor de los factores pro-inflamatorios⁹⁰.

Las proteínas de choque térmico (HSP) indujeron la activación microglial dando como resultado la producción de citocinas y la aclaración de A β . Se observaron los efectos de las HSP70, HSP90 y HSP32 sobre la producción de IL-6 y el TNF α y la fagocitosis de A β 1-42 en la microglia de rata⁹¹.

Alteración de la Barrera Hemato Encefalica (BHE) en la EA.

La BHE mantiene la homeostasis cerebral por la limitación de la entrada de sustancias tóxicas al SNC, a través de la interacción de las proteínas transmembranales e intracelulares que forman las uniones estrechas. Recientemente, se mostró que la BHE puede ser modulada por las patologías de las enfermedades⁹².

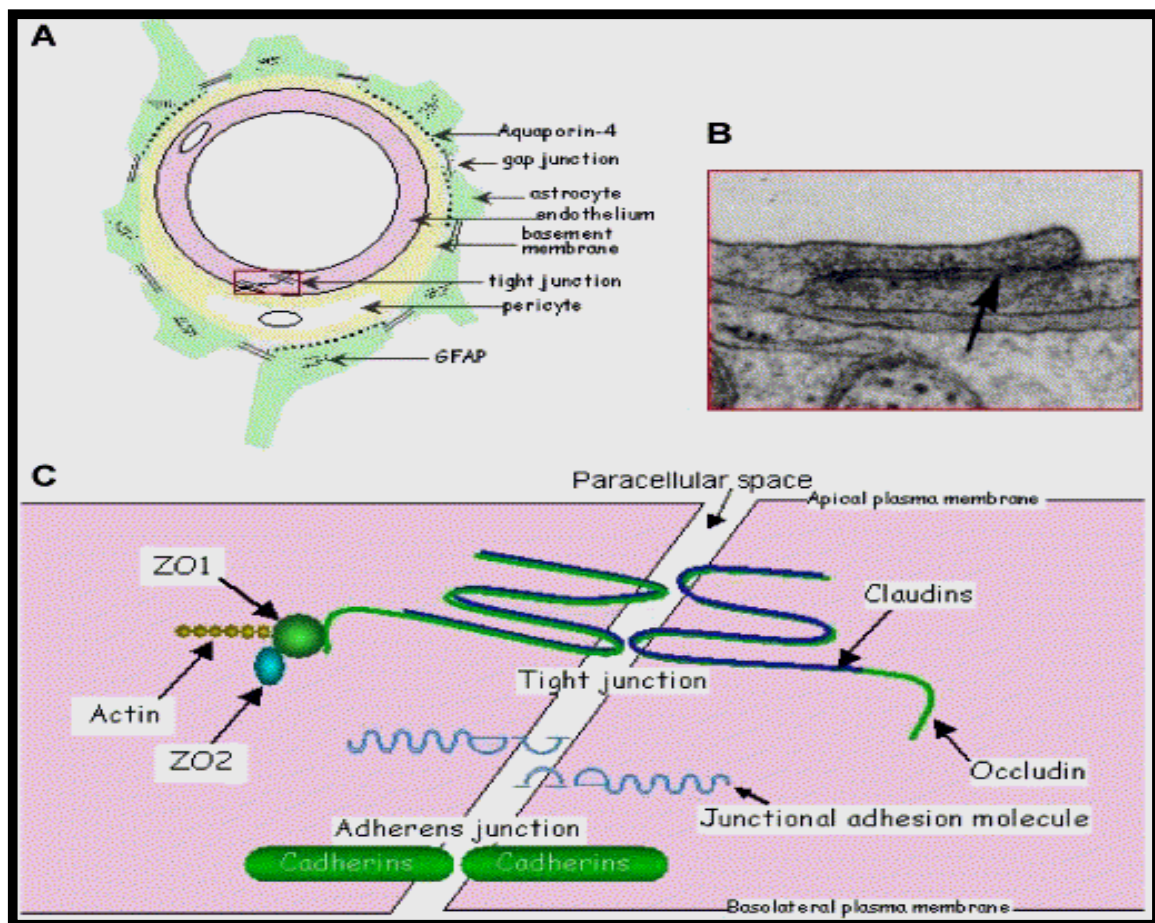


Figura 13.-Esquema de la barrera hematoencefálica mostrando un acercamiento de las uniones estrechas, donde se localizan las claudinas.

La disfunción en la BHE altera el sello de las uniones estrechas, complicando las enfermedades neurológicas, incluyendo al infarto y desordenes neuroinflamatorios⁹³. Las uniones estrechas forman la barrera primaria que regula la difusión de fluidos, electrolitos y macromoléculas, a través de la ruta paracelular. Las claudinas son los componentes estructurales y funcionales de las uniones

estrechas. Forman una familia de más de 20 miembros y muestran diferentes patrones de expresión⁹⁴. Las claudinas forman canales paracelulares y tienen un papel importante en la tumorigénesis⁹⁵.

Se detectaron a las claudinas-1 y 3, la ZO1 y la ocludina, pero no las claudinas-2, 4 y 5 expresadas en el perineuro del nervio periférico de humano adulto. La ocludina, la ZO-1, la claudina-1, 3 y 5 se expresaron en el perineuro de humano en desarrollo. La claudina-1 estuvo ampliamente restringida a estructuras derivadas del perineuro en fetos de 11 semanas, mientras que la claudina-3 y la ocludina se expresaron débilmente en las estructuras perineurales a esta edad y adquirió una distribución perineural bien definida entre la semana fetal 22 y 35. La barrera de difusión perineural madura relativamente tarde, durante el desarrollo del nervio periférico humano^{96,97}.

La claudina-7, se expresó en el hipocampo pero no en la corteza. Durante el kindling amigdalino la claudina-8 fue poco regulada en el hipocampo. Este resultado enlazó por primera vez la modulación de la expresión de una proteína de la unión estrecha a una sincronización neuronal anormal que probablemente puede reflejarse en los cambios de la permeabilidad de la BHE o al edema^{98,99}.

En cultivo primario de astrocitos humanos se observó la expresión de la claudina-1 después de aplicar la IL-1 β . Se observó la pérdida en la expresión de la conexina-43, proteína presente en las uniones gap de los astrocitos. La IL-1 β reguló la expresión de la claudina-1, las uniones estrechas y las uniones gap fueron inversamente reguladas por esta citocina pro-inflamatoria¹⁰⁰.

El A β 1-42 soluble presente en el plasma de pacientes con la EA, sugirió que hay un defecto en la BHE. La administración intravenosa de A β 1-40 y A β 1-42 a ratones mostró que el péptido atraviesa la BHE y que al cruzarla se unió de manera selectiva a neuronas y no a la glia¹⁰¹.

La BHE es crítica para regular el transporte y la homeostasis de A β , a través de dos receptores, el receptor de la lipoproteína 1 de baja densidad (LRP1) y el receptor de los productos de glicación avanzada (RAGE)¹⁰².

Mediante la construcción de anticuerpos dirigidos contra sistemas de transporte, se observó que el A β atraviesa a la BHE a una tasa de flujo muy lenta¹⁰³.

El transporte del A β circulante que atraviesa la BHE contribuyó a la acumulación en el parénquima cerebral del amiloide en primates no humanos. El pool periférico y central del amiloide no estuvo separado de la BHE vascular en el sistema nervioso de primates¹⁰⁴

Alteración neurovascular en la EA.

La disfunción neurovascular contribuye al deterioro cognitivo y a la neurodegeneración en la EA. Se propuso la hipótesis del defecto en la aclaración del $A\beta$ a través de la BHE, en la cual la angiogénesis aberrante inicia un desacople neurovascular, la regresión de vasos, la hipoperfusión cerebral y la inflamación vascular¹⁰⁵.

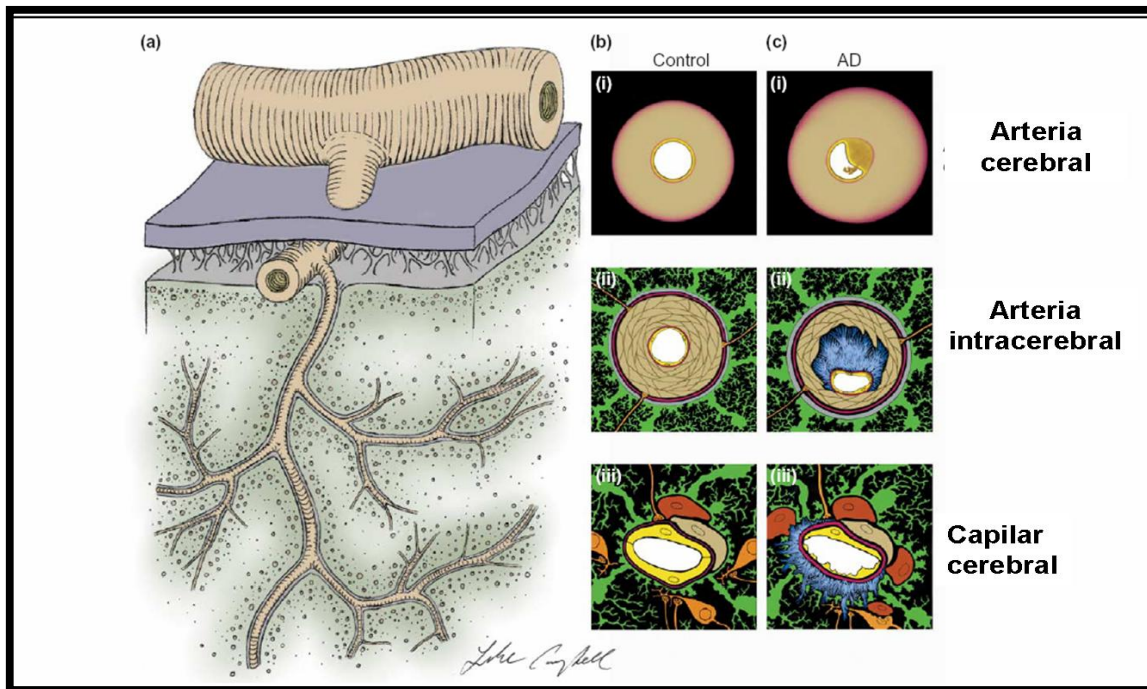


Figura 14.-Esquema que muestra las alteraciones de la unidad neurovascular en la enfermedad de Alzheimer (panel de la derecha). A) arteria; AIC) arteria intracerebral; C) capilar.

La disminución en el depósito del $A\beta$ fibrilar microvascular fue acompañado de la disminución de las células neuroinflamatorias asociadas a la microvasculatura y en los niveles de la $IL-1\beta$, en ratones transgénicos *Tg-SwDI*. La importancia del depósito del amiloide microvascular fue promover la neuroinflamación en las enfermedades donde se deposita el amiloide. El depósito de amiloide microvascular induce la neuroinflamación local en el ratón transgénico para la APP humana, en ausencia del depósito del amiloide fibrilar¹⁰⁶.

Se atribuyó la falla de la BHE a la presencia del A β en las PN y en la microvasculatura cerebral¹⁰⁷.

Células gliales C6 y A β .

A partir del establecimiento de la línea celular C6 de glioma de rata, ésta se ha usado para realizar modelos in vitro¹⁰⁸. Se mostró que la línea C6 y otros tipos celulares secretan *per se* el A β ¹⁰⁹. El A β reguló la expresión de la proteína S100 β con potencial trófico o tóxico¹¹⁰. El A β 25-35 fue capaz de inducir la producción del óxido nítrico en presencia del TNF α o el interferón gamma (ITN γ)¹¹¹. Las células C6 mostraron características parecidas al glioblastoma multiforme de humanos. La inmunohistoquímica con el factor von Willebrand mostró que los tumores inducidos por estas células son altamente vascularizados,¹¹⁰. Se observó que la toxicidad del A β en el cultivo de células C6, disminuyó con la aplicación del resveratrol, el cual tiene efectos antiinflamatorios¹¹². La privación del suero al cultivo de células C6, provocó la alteración en el procesamiento alternativo de los exones 7, 8 y 15 de la APP¹¹³. El tratamiento con melatonina a diferentes concentraciones inhibió la apoptosis inducida por el A β 25-35 o A β 1-42 en el astrocitoma C6¹¹⁴.

JUSTIFICACIÓN

La EA es un padecimiento neurodegenerativo que se caracteriza por la pérdida progresiva de la memoria. La EA es un problema de salud pública ya que afecta a más de 4 millones de personas en el mundo. El análisis histopatológico revela la presencia de lesiones que la definen. Tales lesiones son las marañas neurofibrilares y las placas neuríticas. Sin embargo, también está presente el componente de inflamación crónica, que se produce por el depósito del amiloide beta (componente central de la placa neurítica), en el tejido cerebral. La expresión de factores tróficos como las moléculas de adhesión o de crecimiento, debido a la astrocitosis reactiva observada en el tejido cerebral con la EA, sugieren la existencia de mecanismos de regeneración neurítica y neuronal. Estos mecanismos están ligados a la activación de la cascada de factores tróficos y de crecimiento neuronal en cerebros con la EA. Se sugiere que la diferenciación astrocítica está afectada por la interacción de los factores tróficos, así como por los de la matriz celular con la que interactúa. Además, se ha observado que los procesos astrocíticos están asociados íntimamente a los contactos sinápticos, lo que sugiere que los astrocitos alteran la concentración de sustancias y iones en la hendidura sináptica.

Las evidencias señalan que, también están presentes las alteraciones de la barrera hematoencefálica y de la placa neurovascular.

Por esta razón, es importante evaluar los efectos tróficos del amiloide beta en un modelo celular y correlacionarlo con el modelo *in vivo*.

En el laboratorio se estandarizó el modelo de toxicidad en rata y el modelo en cultivo celular con células de la astroglia. Es necesario, seguir investigando la participación de las moléculas de adhesión, de crecimiento y de proliferación tanto en el modelo animal como en otras líneas celulares como las neuronales.

Objetivo general:

Evaluar el efecto trófico del A β 25-35 in vivo e in vitro.

Objetivos particulares:

-Caracterizar el efecto del A β 25-35 sobre la expresión de moléculas de adhesión, tales como las claudinas 1, 4, 7 y 9.

-Caracterizar el efecto A β 25-35 sobre la expresión de factores angiogénicos como el factor von Willebrand y el CD105.

-Caracterizar el efecto A β 25-35 sobre la expresión de las lectinas como la *Macrobranchium rossebergii* (MRL) y *Sambucus nigra* (SNA).

-Analizar el efecto trófico del A β 25-35 en la activación glial a través de la astrocitosis reactiva en el hipocampo de rata.

HIPÓTESIS

Sí se produce la activación astrocítica debido a que el A β 25-35 induce cambios en la liberación de factores neurotróficos que incrementen el crecimiento, la proliferación y la diferenciación de las células gliales (C6), entonces se modificará la expresión de factores involucrados en la adhesión celular.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Ensayo in vitro.

Se realizó el cultivo a partir de un vial con 1×10^6 de células C6, las cuales se descongelaron y sembraron dejándolas crecer hasta obtener una confluencia de más del 80 %. Las células se lavaron con solución salina estéril. Para despegar a las células, se añadieron 800 μl de tripsina; se tiñeron con el azul tripano (SIGMA) y se contaron en la cámara de Neuvauer para sembrar 600 células/100 μl de medio, por pozo (las cámaras son de ocho pozos). Se dejaron crecer por 72 horas. El péptido fue incubado durante 24 horas, antes de añadirlo al cultivo, a 37°C en la incubadora con el fin de polimerizarlo. Para sembrar las células, en cada pozo se colocaron 300 μl de medio esencial modificado por Dubelco (DMEM) más suero fetal bovino (SFB) al 10 % con antibiótico (10000 unidades de penicilina más 10 μg de estreptomicina) y los 100 μl de medio con las células; se ocuparon dos pozos para las células control, las cuales sólo contenían el medio DMEM con SFB al 10 % y se llevaron a 500 μl ; a los 6 pozos restantes se añadieron las concentraciones crecientes (5, 10, 20, 50, 75 y 100 μM) de $\text{A}\beta_{25-35}$. Finalmente, las células se dejaron incubar durante 3, 5 y 7 días. Transcurrido el tiempo de incubación, las células fueron lavadas con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4 %, y se tiñeron con Zytex Green y se observaron al microscopio. Se realizó otro cultivo, en el cual se usaron las concentraciones de 50 y 100 μM de $\text{A}\beta_{25-35}$ y se dejaron 72 horas incubando. Después de este tiempo se lavaron las células con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% y realizar inmunocitoquímicas

con anticuerpos contra claudinas 1, 4, 7 y 9 (Sta. Cruz); lectinas *Macrobrachium rosebergii* y *Sambucus nigra* (MRL y SNA), así como para el factor von Willebrand y la CD105 (ambos de RD System).

Método para congelar células.

Se observaron las células al microscopio para ver la monocapa confluyente al 80%. Con una pipeta serológica, se eliminó el medio de cultivo del frasco y se lavó tres veces con PBS sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} (también se puede usar solución salina estéril). Para despegar las células se cubrió la monocapa con 800 μl de una solución de tripsina+EDTA al 2.5 % (GIBCO). En el microscopio se observaron las células, con la tripsina (se dejó de 5 a 15 minutos), cuando se vieron los primeros signos de desprendimiento celular, se golpeo el frasco a fin de levantar toda la monocapa celular. Se agregaron 300 μl de suero fetal bovino para desactivar a la tripsina en 3 ml de medio esencial modificado por Dubelco (DMEM), se homogenizaron las células pipeteando con cuidado y en repetidas ocasiones para deshacer los cúmulos celulares. Luego, se retiraron las células del frasco y se transfirieron a un tubo cónico de 15 ml, se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el botón celular con 2 ml de DMEM.

Se contaron las células por el método de azul de tripano al 0.4 % (SIGMA). Se usó azul de tripano porque permite distinguir las células viables de las que no son. Estas últimas han perdido su permeabilidad selectiva y se tiñen de azul, mientras que las células viables permanecen incoloras.

Se preparó el medio de congelación con dimetil sulfóxido (DMSO, GIBCO), al 10 % más suero fetal bovino (SFB) 90 % en ausencia de células, después se esterilizó con un filtro de poro de 0.22 μm (MILLIPORE) y se llevó a la suspensión celular a una concentración de 1×10^6 células por mililitro de medio. Se

resuspendieron las células en la solución de congelación. Se tomó en cuenta la concentración de células al efectuar la dilución, se llenaron los criotubos hasta un mililitro y se cerraron.

Finalmente se rotularon los criotubos, poniendo: línea celular, número de pase, número de células y fecha. Se colocaron los criotubos en el congelador de -70°C durante 24 horas, para finalizar, se llevaron al nitrógeno líquido.

Método para descongelar.

Se descongelaron las células poniéndolas en baño maría calentado previamente a 37°C . En lo que se descongelaron los viales, se prendió la campana. Ya que estuvieron descongeladas las células, el vial se limpió con alcohol al 70 % y se abrió con cuidado dentro de la campana. Con una pipeta Pasteur se recuperaron las células y se vaciaron a un tubo cónico de 15 ml, se diluyeron las células con 9 ml de DMEM solo. Se sembraron en un frasco para cultivo de 25 cm^2 . Se marcaron y se metieron a la incubadora.

Pase celular.

Se observó que las células estuvieran confluentes. Dentro de la campana se lavaron 3 veces con solución salina estéril más antibiótico. Se añadieron $800\ \mu\text{l}$ de tripsina, por cada caja de 50 ml se dejaron durante 10 minutos, se dieron pequeños golpes para despegar las células y se desprendan. Posteriormente, se resuspendieron en 3 ml, de PBS estéril y se centrifugaron por 10 minutos a 3000 rpm, se desechó el sobrenadante y se recuperó el botón celular. Posteriormente, se resuspendió el botón celular con 2 ml de medio. Se resuspendió varias veces y se tomó una alícuota de $10\ \mu\text{l}$ de células y se añadió a $990\ \mu\text{l}$ de azul de tripano.

En la cámara de Neubauer se contó un millón de células (1×10^6) y se colocaron en cajas con medio DMEM+SFB 10%+antibiótico. Se dejaron en la incubadora con una atmósfera húmeda y aporte de 5 % de bióxido de carbono y 95 % de oxígeno a 37°C.

Preparación del Medio Esencial Modificado por Dubelco (DMEM).

Se disolvieron 17.32 gr de medio (SIGMA), en aproximadamente 800 ml de agua desionizada. Se agitó hasta disolverlo. Por otro lado, se pesaron 3.7 gr de bicarbonato de sodio (Na_2CO_3 , SIGMA), y se le agregaron al medio con agitación. Se ajustó el pH= 6.8. Se aforo a un litro, sin dejar de agitar. Se filtró en la campana, usando una unidad de filtración, con filtros de papel (MILLIPORE) de 0.45 y 22 μm de diámetro de poro. Se añadió el suero fetal bovino (SFB, BIOMEDA) para alcanzar una solución al 10%. Se agregó al medio, 1 ml de la solución de 10000 UI/ml de penicilina sódica G y 10 μg /ml de sulfato de estreptomicina en solución salina al 0.85 % (GIBCO), por cada 100 ml de medio. Se hicieron alícuotas de 100, 250 y 500 ml en las botellas para medio de cultivo, se cubrieron las tapas con parafilm y se etiquetaron con fecha, nombre y contenido.

Preparación de la solución stock de A β 25-35.

Un vial de 1 mg de A β 25-35 liofilizado (SIGMA) se disolvió en 940 μl de agua estéril y se hicieron alícuotas de 20 y 50 μl , las cuales se mantuvieron a -20°C hasta el momento de incubar el péptido para polimerizarlo. El tiempo de incubación fue de 24 horas a 37°C.

Inmunocitoquímica.

Después de fijar en paraformaldehído, las células se enjuagaron con PBS pH 7.4 por 5 minutos.

Se hizo la recuperación antigénica:

Se colocaron en las cámaras de cultivo 500 μ l de amortiguador de citratos 10 mM, pH 6.0.

Se colocaron en un baño maría las cámaras de cultivo.

Se metieron en el horno de microondas y se calentaron durante 90 segundos.

Se dejaron enfriar a temperatura ambiente.

Posteriormente, se enjuagaron las células con PBS durante 5 minutos.

Se dejaron las células en una solución de albúmina sérica bovina libre de inmunoglobulinas al 2 % en PBS, durante 10 minutos, en una cámara húmeda.

Se enjuagaron con PBS durante 5 minutos.

Se dejaron durante 10 minutos en una solución de tritón al 0.2 %.

Se enjuagaron con PBS durante 5 minutos.

Se dejaron Incubando con el Sytox Green.

Se montaron con DAPI.

Se sellaron con barniz y se observaron al microscopio y se tomaron fotografías.

Ensayo in vivo.

Se utilizaron ratas macho Wistar de 250gr, las cuales se mantuvieron en condiciones controladas de bioterio a 23°C de temperatura y 60% de humedad, con un ciclo luz:oscuridad de 12 horas, con alimento y agua *ad libitum*. Los animales se pesaron y se anestesiaron con hidrato de cloral a una dosis de 350 mg/kg vía intraperitoneal.

Se hizo la microinyección, unilateral en el hipocampo, del A β 25-35 por cirugía estereotáxica, a una concentración de 100 μ M/1 μ l, según las coordenadas del atlas de Paxinos¹⁶ (Paxinos y Watson, 1998): AP=-4.2; L= \pm .3, respecto a Bregma; y P=-2.9, respecto a la dura madre. Posteriormente, los animales se dejaron en condiciones de bioterio a diferentes tiempos: 8, 24, 120, 240, 360 y 720 horas. Posteriormente, los animales se sacrificaron con una sobredosis de pentobarbital sódico y se perfundieron vía intracardiaca con paraformaldehído al 4 % en buffer de fosfatos 0.1 M pH= 7.4, se extrajo el cerebro y se procesó para hacer cortes histológicos para su análisis posterior con la técnica de inmunohistoquímica con peroxidasa de rábano y el anticuerpo contra la proteína fibrilar ácida (GFAP, DAKO, Cytomation System).

Se contaron los astrocitos reactivos en cada preparación, con un sistema de medición computarizado en el microscopio Leica IM100. Se hizo el análisis estadístico con un ANOVA, los resultados son expresados como media \pm error estándar (X \pm e.e.).

Técnica básica de inmunohistoquímica.

Se marcaron las laminillas.

Se desparafinaron y rehidrataron los cortes de la siguiente manera:

2 cambios de xilol 15 minutos cada uno
1 cambio de XILOL:OH-100 % 1:1, 3 minutos
2 cambios con OH-100 %, 3 minutos cada uno.
2 cambios de OH-96 %, 3 minutos cada uno
1 cambio de OH-70 %, 3 minutos
1 cambio de H₂O destilada, 3 minutos.

Inmunohistoquímica para GFAP

Se hizo la recuperación antigénica: las laminillas se colocaron en buffer de citratos durante 30 minutos en baño maría, se dejaron enfriar.

Se hizo el bloqueo de la peroxidasa endógena con una solución de peróxido de hidrógeno al 0.33 % durante 30 minutos.

Se enjuagaron 5 minutos con PBS.

Se dejaron las laminillas en una solución de albúmina al 2 % durante 20 minutos, en una cámara húmeda.

Se enjuagaron 5 minutos con PBS.

Se dejaron en una solución de Tritón X100 al 0.2 % durante 10 minutos.

Se enjuagaron durante 5 minutos con PBS.

Se incubaron con el anticuerpo primario GFAP monoclonal de ratón a una dilución de 1:60, por 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C.

Se enjuagaron durante 5 minutos con PBS.

Se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado link universal (DAKO, CYTOMATION) por 15 minutos.

Se enjuagó por 5 minutos con PBS.

Se incubó con streptavidin-HRP por 15 minutos.

Se enjuagó durante 5 minutos con PBS.

Se revelaron las laminillas con diaminobenzidina (DAB+cromógeno):

Liquid-DAB+substrate chromogen system, DAKO CYTOMATION SYSTEM.

Se hizo la contratinción con hematoxilina de Gill, durante 2 minutos.

Se hizo la deshidratación con alcoholes graduales.

Se montaron las laminillas con resina y se observaron al microscopio y se capturaron imágenes en el fotomicroscopio Leica y el software IM1000.

RESULTADOS

Efecto del A β 25-35 sobre células C6.

El A β 25-35 a diferentes concentraciones provocó cambios morfológicos en las células, se diferenciaron a fibroblastos. Estos cambios fueron dependientes de la concentración del péptido y del tiempo de incubación con las células. Se observó que a las 72 horas de incubación, las células empezaron a agregarse hasta formar cúmulos o "colonias". En estas "colonias" se observaron "conductos", a las concentraciones de 50, 75 y 100 μ M (flechas, fig. 15), comparado con el grupo control (c). En los experimentos de 120 y 168 horas se observó que las células disminuyeron de manera importante. En las figuras 16 y 17 se observan pocas células, incluso en el grupo control, debido a que después de que se forma la monocapa hay inhibición por contacto y las células se desprenden. Sin embargo, aún con pocas células se observaron algunos cúmulos (flechas). Es importante mencionar que no se cambió el medio durante todo el tratamiento.

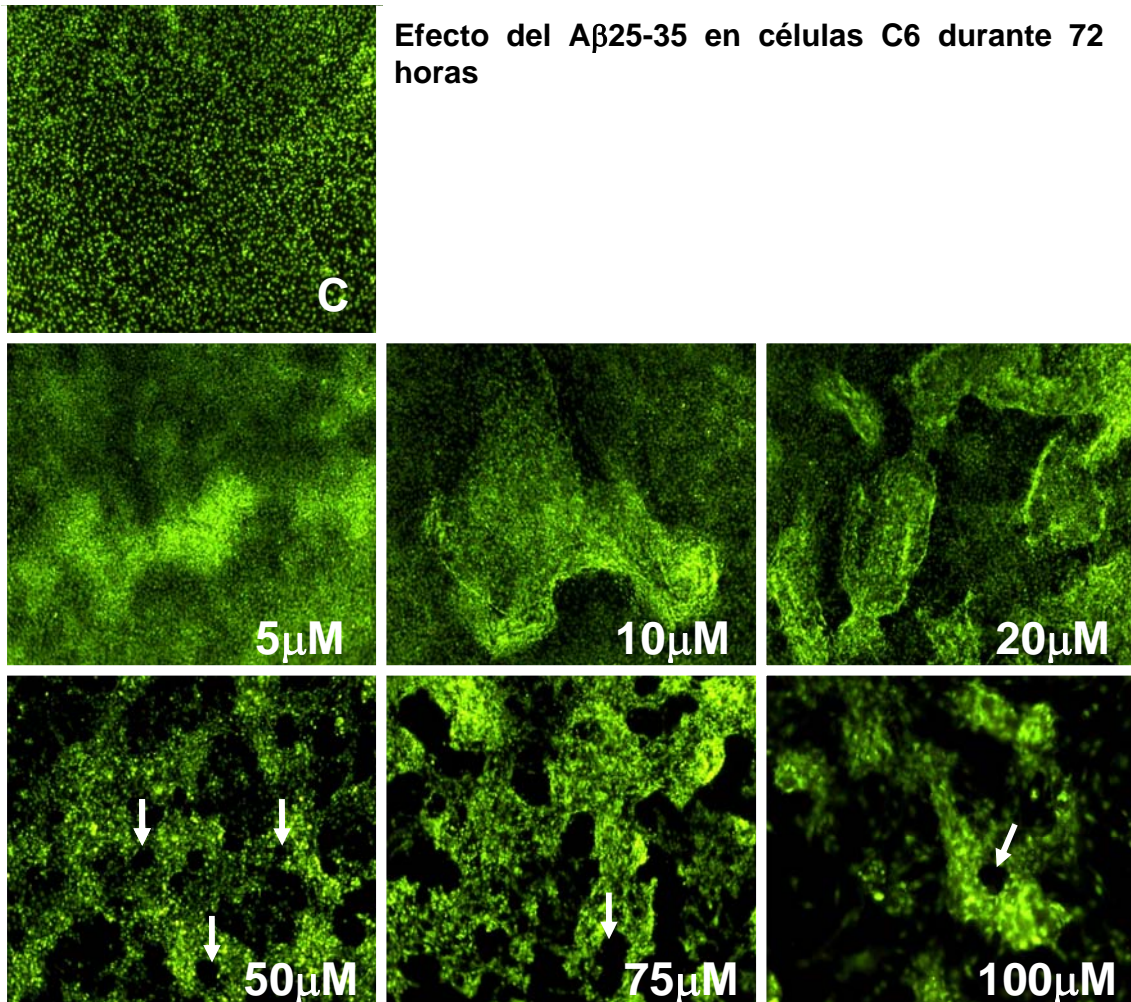


Figura 15.-En este panel se observó que las células C6 se agregaron formando “colonias”, conforme aumentó la concentración del A β 25-35 durante 72 horas de incubación, se observan “conductos” a partir de 50 μ M (flechas). Tinción con Zyttox green; el aumento es 10X con el fotomicroscopio Leica y con el software IM1000.

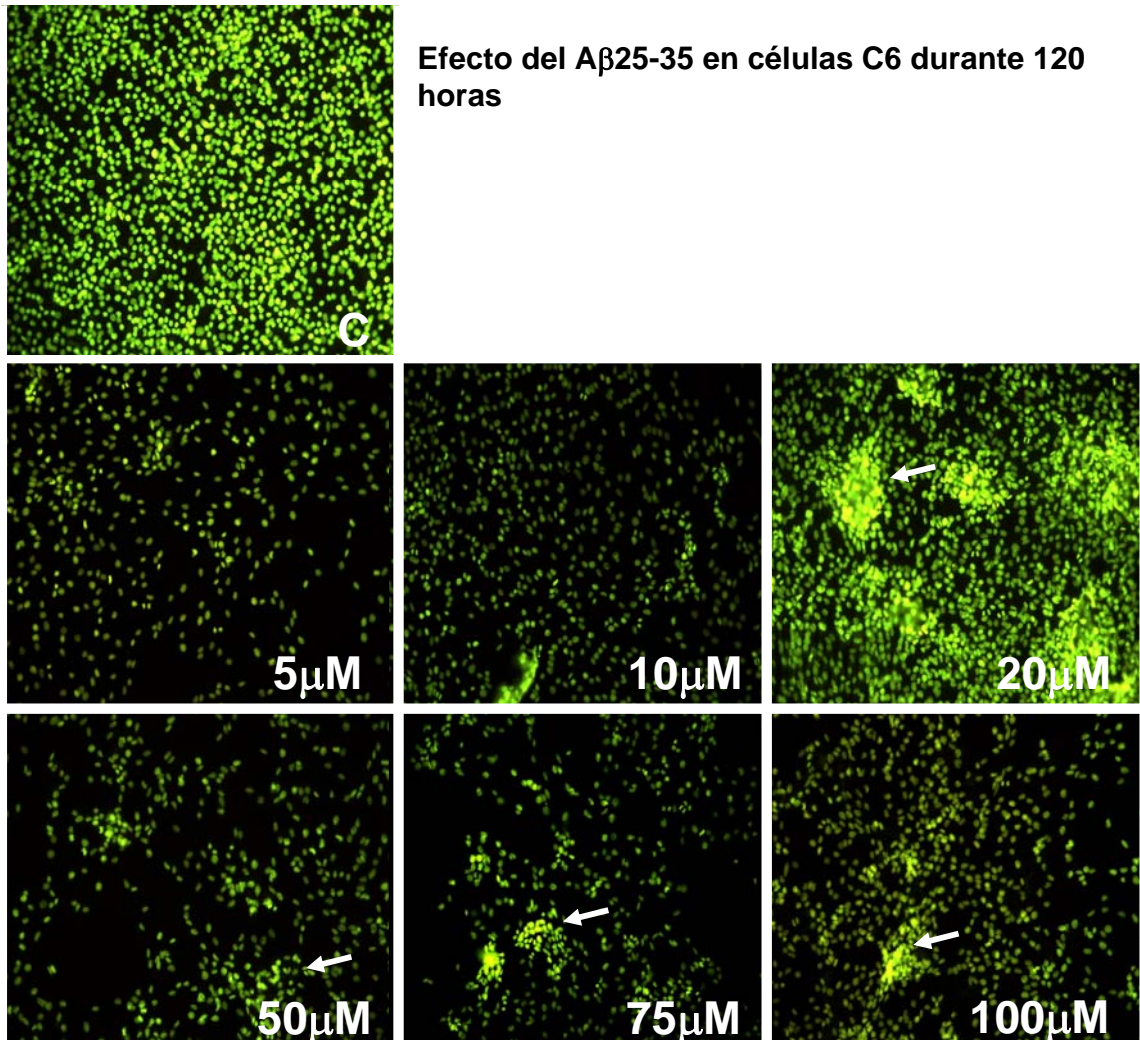
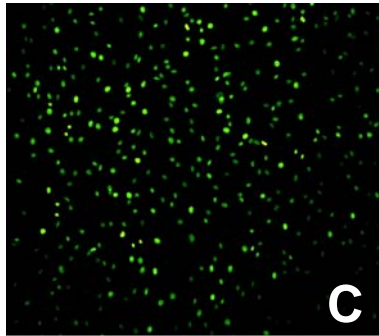


Figura 16.- En esta figura se observa que las células tratadas con las concentraciones crecientes del A β 25-35, durante 120 horas, disminuyeron. Tinción con Zyttox green; el aumento es 20X con el fotomicroscopio Leica y con el software IM1000.



Efecto del A β 25-35 en células C6 durante 168 horas.

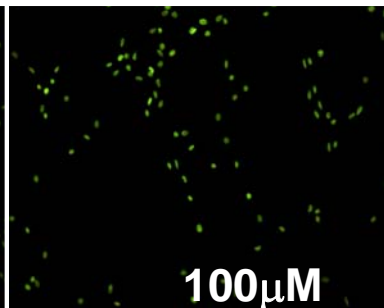
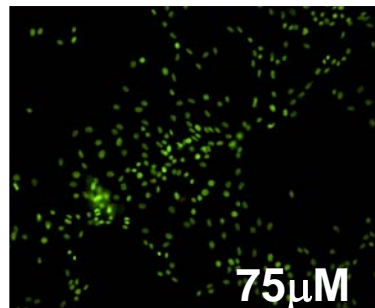
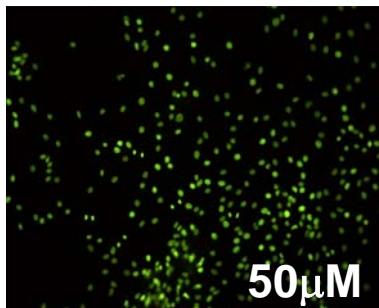
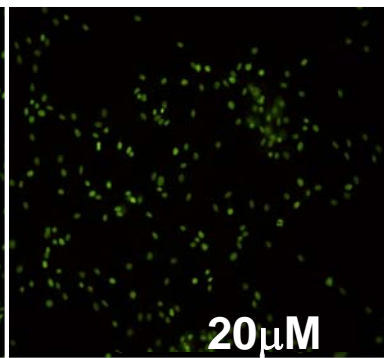
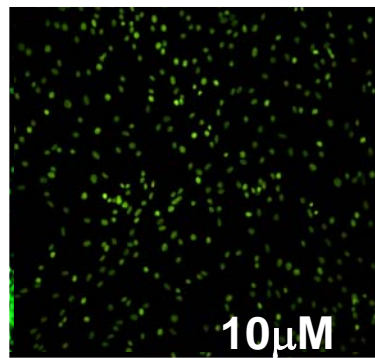
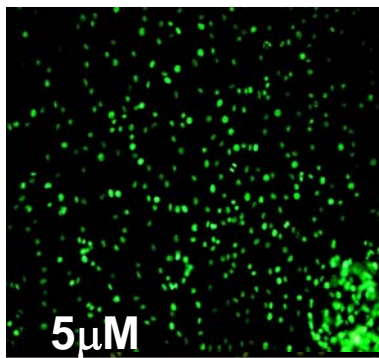


Figura 17.- En todos los ensayos se sembró el mismo número de células C6 (700 células /pozo). Sin embargo a las 168 horas de incubación con el péptido se observó una disminución de las células.

Inmunocitoquímica.

Los resultados de la inmunocitoquímica en el cultivo con 50 y 100 μM de $\text{A}\beta_{25-35}$ fueron evaluadas como: poca positividad (+); abundante (++) y muy abundante (+++), como se muestra en la tabla 1. Se observó que la claudina 1 (figura 19) fue positiva en ambas concentraciones, cuando se comparó con el grupo control. Por otro lado, las claudinas 4, 7 y 9 fueron positivas tanto en el grupo control como en ambas concentraciones. La claudina-4 es muy positiva a la concentración de 100 μM , figura 20. La claudina-7 fue muy positiva a ambas concentraciones, figura 21. La claudina-9 fue muy positiva a la concentración de 100 μM del $\text{A}\beta_{25-35}$, figura 22. Como se observa en la figura 23 la lectina SNA es poco positiva tanto en el grupo control como en los grupos experimentales a diferencia de la lectina MRL que fue positiva en ambas concentraciones del péptido, cuando fueron comparadas con el control (fig.24). Cuando se usó el anticuerpo para CD105, ésta fue intensamente positiva en la concentración de 100 μM , el grupo control y en la concentración de 50 μM (fig. 25), se observaron con poca intensidad. Por último, las células con el factor vonWillebrand más la proteína glial fibrilar ácida (GFAP, en inglés), mostraron ser positivas a ambos anticuerpos en los grupos experimentales. Sin embargo, en el grupo control no se observó al factor von Willebrand pero si a la GFAP, figura 26.

	Control	Aβ25-35 50 μM	Aβ25-35 100μM
Claud-1	---	+	+
Claud-4	+	+	+++
Claud-7	+	+++	+++
Claud-9	+	++	+++
vonW/GFAP	---/++	+++/++	+++/++
CD105	+	+	+++
MRL	---	---	+
SNA	+	+	+

Tabla 1. Se muestra la expresión positiva de los anticuerpos utilizados: +) poca; ++) abundante y +++) muy abundante. Las células C6 fueron tratadas con los siguientes anticuerpos: anti-claudinas 1, 4, 7 y 9. Anti-factor von Willebrand; proteína glial fibrilar ácida (GFAP). Lectinas MRL y SNA.

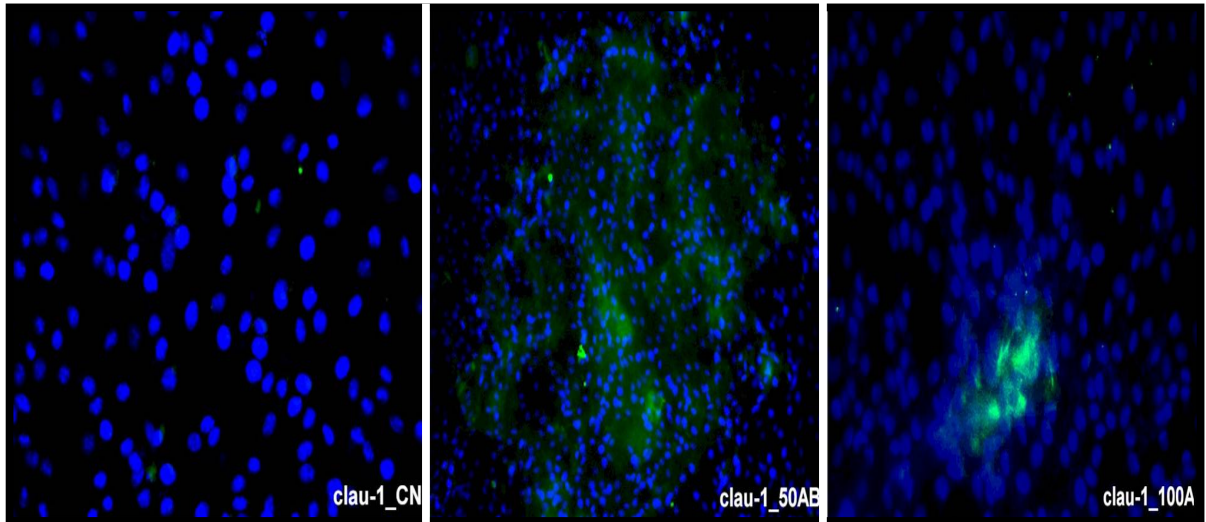


Figura 19. La claudina 1 (clau-1), fue positiva en las dos concentraciones del péptido y se observó en los agregados celulares-. En azul se observaron los núcleos y fueron teñidos con DAPI. En verde la expresión de la claudina 1. El aumento fue de 40X.

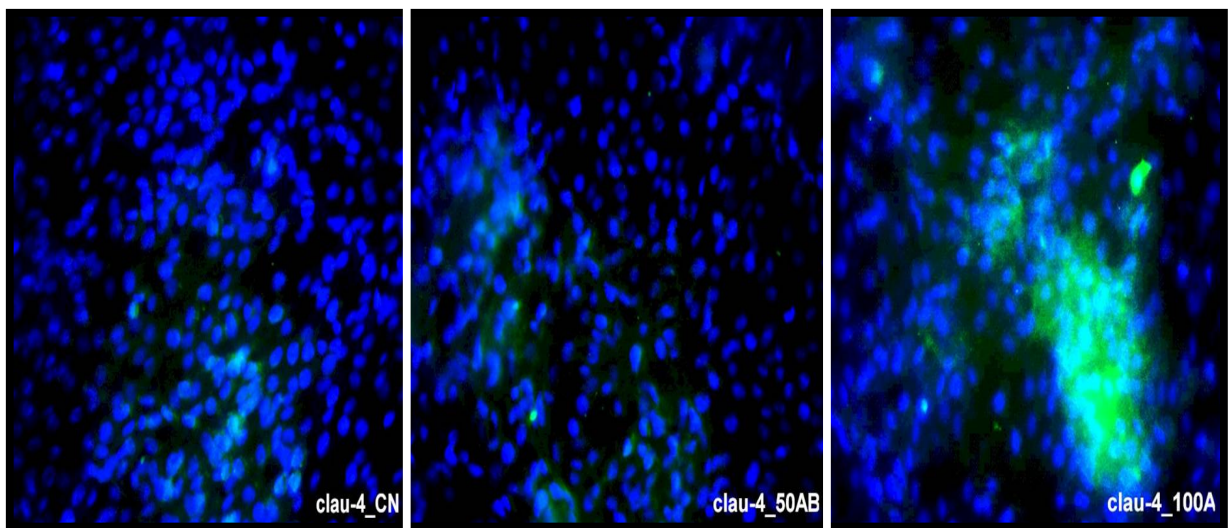


Figura 20.- La claudina-4 (clau-4) fue positiva en la concentración de 100 μ M, se observó sobre todo en los agregados celulares. En azul se observaron los núcleos (DAPI), en verde la expresión de la claudina 4. Se observó que en los tres grupos está presente. El aumento fue de 40X.

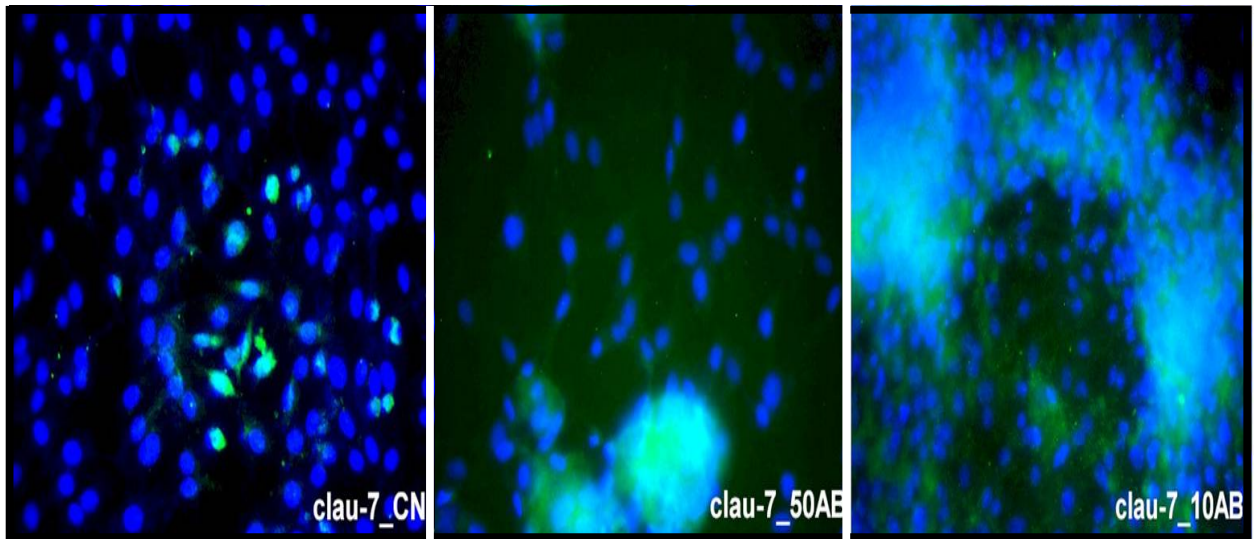


Figura 21.- La claudina-7 (clau-7), fue positiva en los tres grupos, específicamente en los agregados. Se observó menos intensidad en el grupo control. En azul se observaron núcleos y en verde la expresión de la claudina: se observó blanco en los agregados celulares. El aumento fue de 40X.

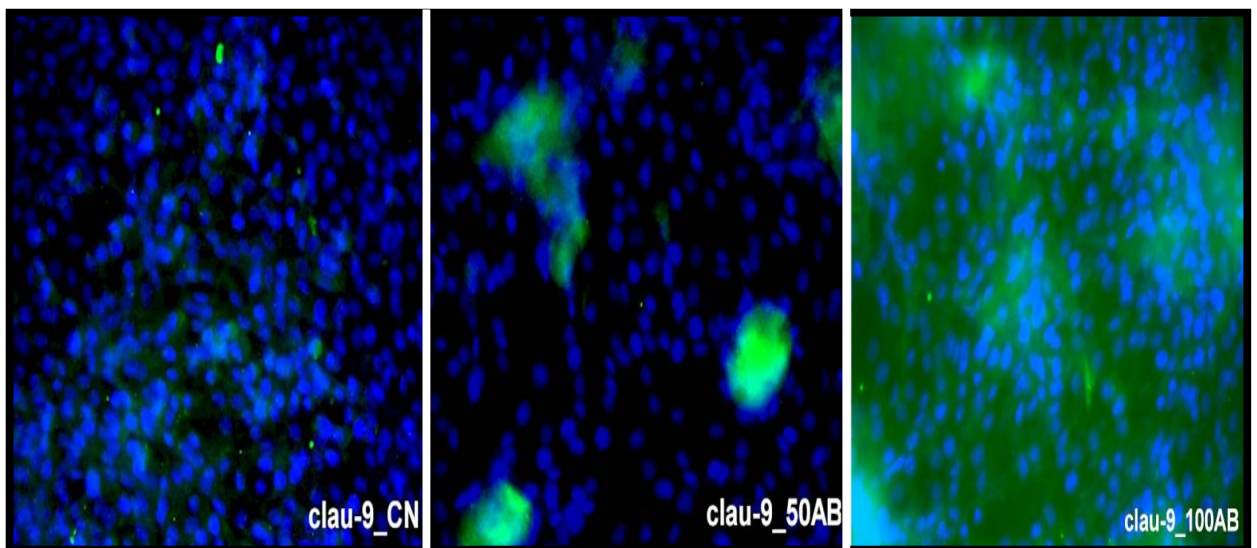


Figura 22.- La claudina 9 (clau-9) fue positiva con las dos concentraciones del A β 25-35. Sin embargo, en el grupo control se logró ver que también fue positivo. La intensidad es mayor en los agregados celulares, como lo muestra el color verde. El aumento fue de 40X.

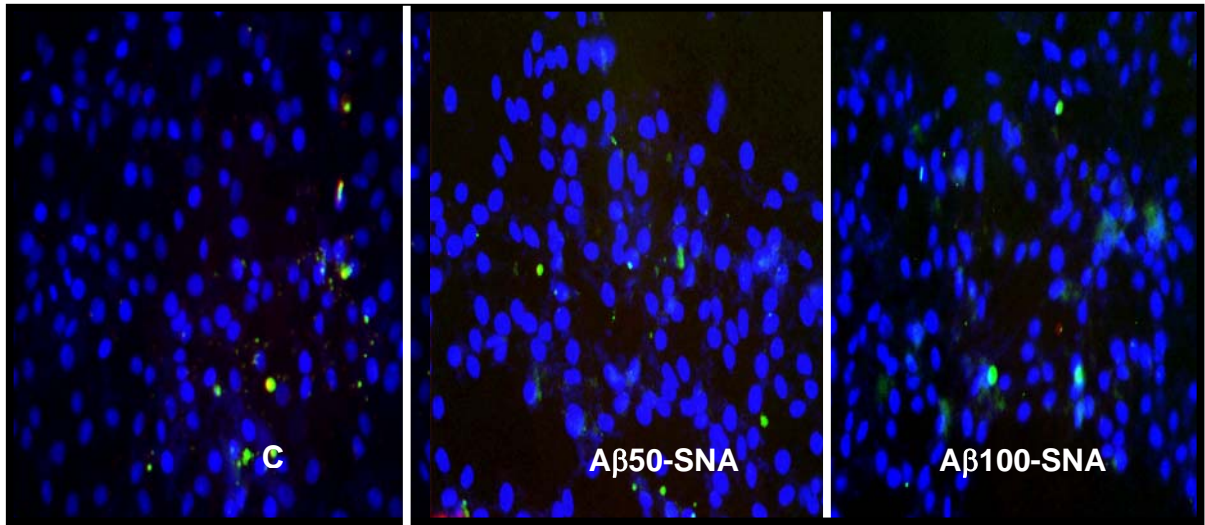


Figura 23.- La lectina *Sambucus nigra* (SNA), no fue positiva en ninguno de los tres grupos. El aumento fue de 40X.

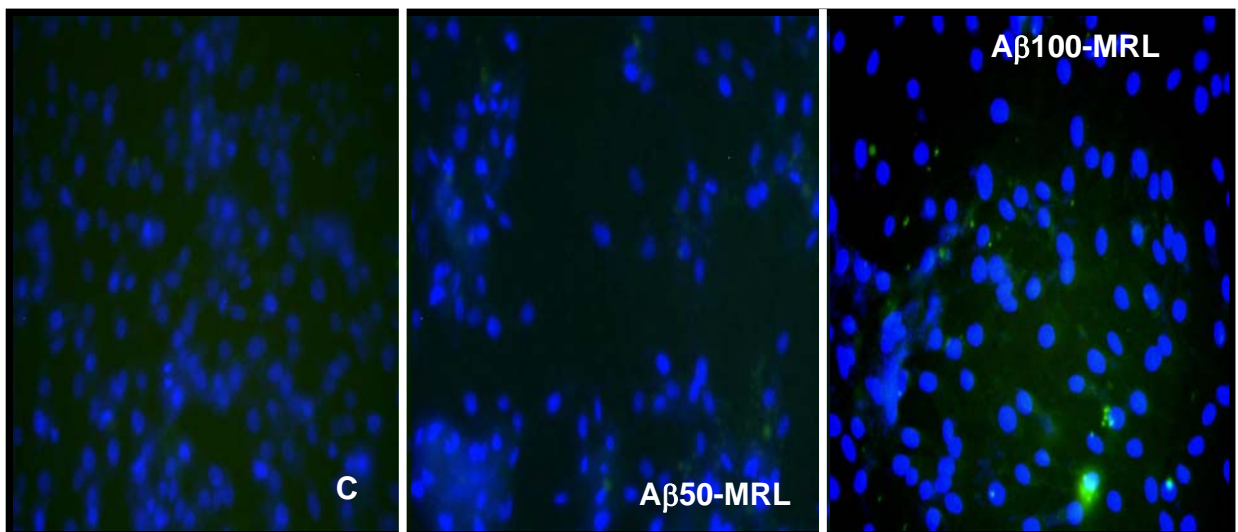


Figura 24.-La lectina de *Macrobrachium rosebergii* (MRL), fue positiva solo a 100mM del Aβ25-35. También se observó en los agregados celulares. En azul los núcleos y en verde la expresión de la lectina. El aumento fue de 40X.

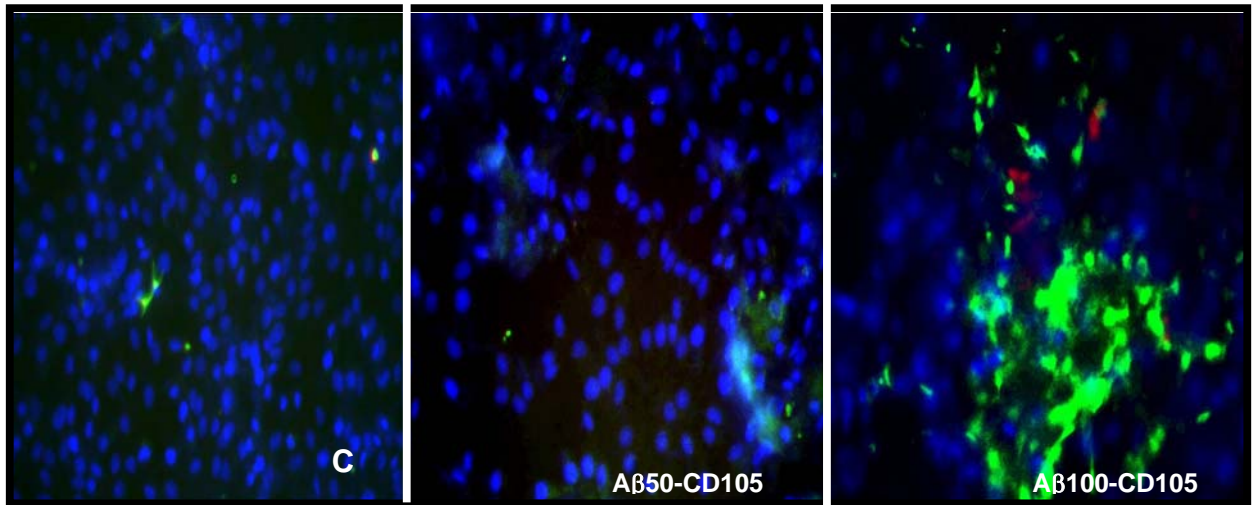


Figura 25.- La CD105 fue intensamente positiva con la concentración de 100 μ M del A β 25-35. Se observó entre los agregados celulares. Se observó a un aumento de 40X

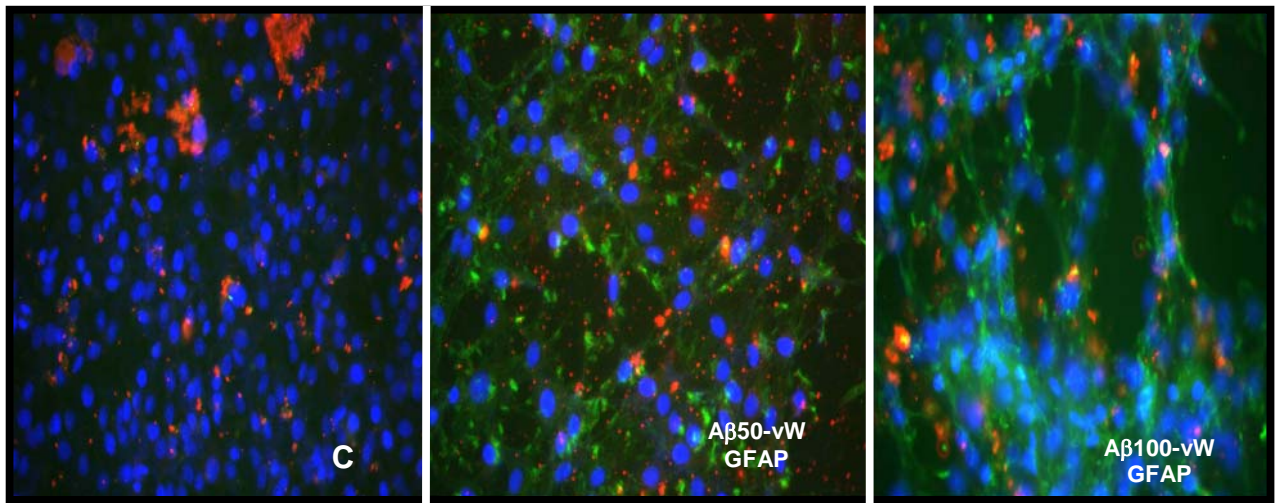


Figura 26.- El factor von Willebrand (vW), fue positivo a las 2 concentraciones del A β 25-35. Se observó a la GFAP en rojo y en verde al factor von Willebrand, en azul los núcleos. El aumento fue 40X.

Efecto de la microinyección del A β en el hipocampo de ratas.

Después de la microinyección del A β 25-35 (100 μ M), se observó un incremento no significativo en los astrocitos activados por el A β 25-35 vistos con el anticuerpo contra la GFAP. Este incremento se mantuvo durante 240 horas (Figuras 27-30). A partir de las 360 horas se observó un incremento significativo en el número de astrocitos ($P > 0.001$, ANOVA) a las 360 y 720 horas, cuando se comparó con el grupo control. Gráfica 1.

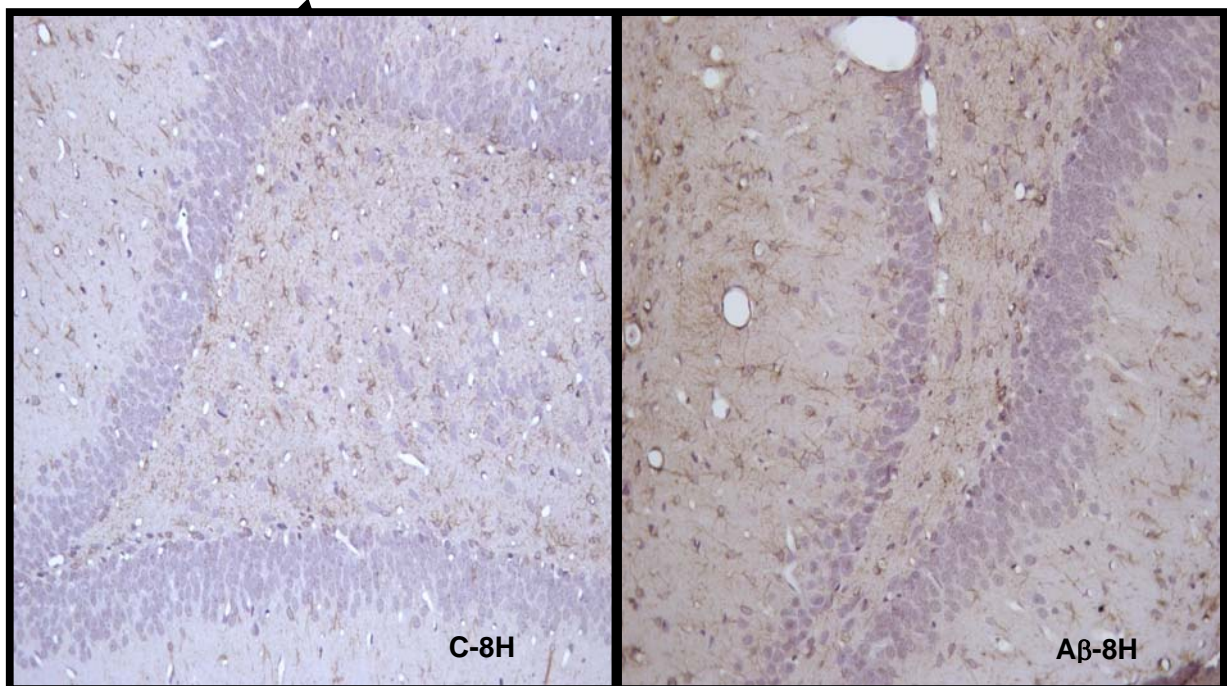


Figura 27.- Microinyección de A β 25-35 (100 μ M) en el hipocampo de la rata. C-8H=grupo control a las 8 horas con solución salina; A β -8H, grupo con A β 25-35 a las 8 horas. Inmunohistoquímica para la proteína glial fibrilar ácida (GFAP) con peroxidasa de rábano (HRP).

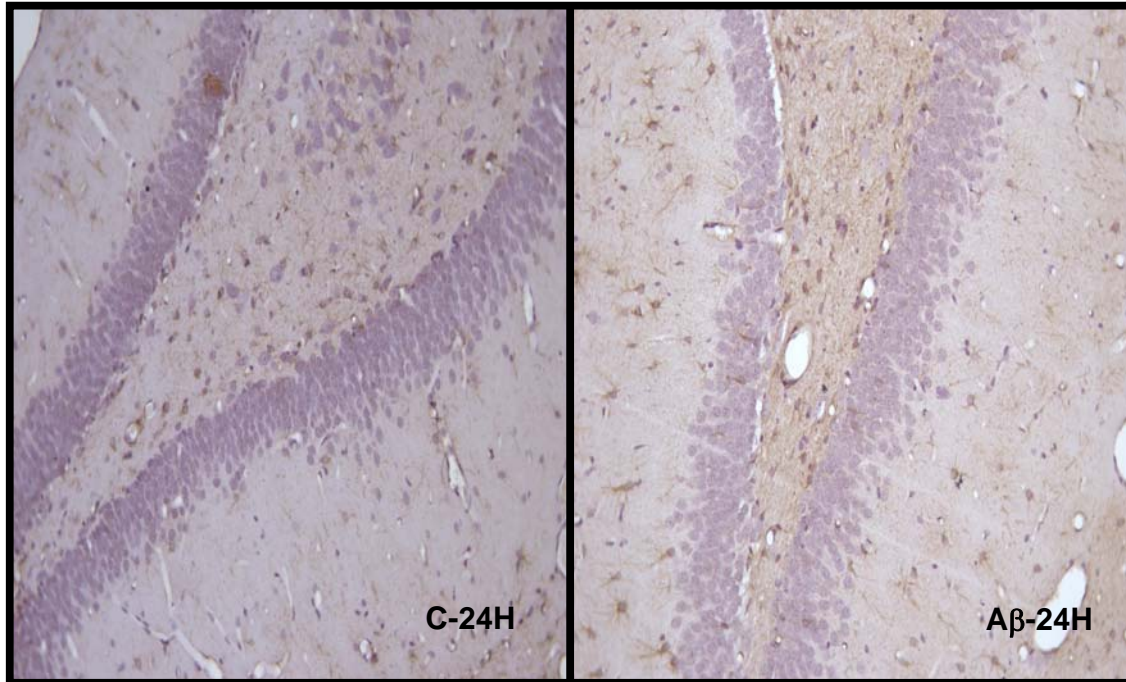


Figura 28.- Microinyección de A β 25-35 (100 μ M) en el hipocampo de la rata. C-24H=grupo control a las 24 horas con solución salina; A β -24H, grupo con A β 25-35 a las 24 horas. Inmunohistoquímica para la proteína glial fibrilar ácida (GFAP) con peroxidasa de rábano (HRP).

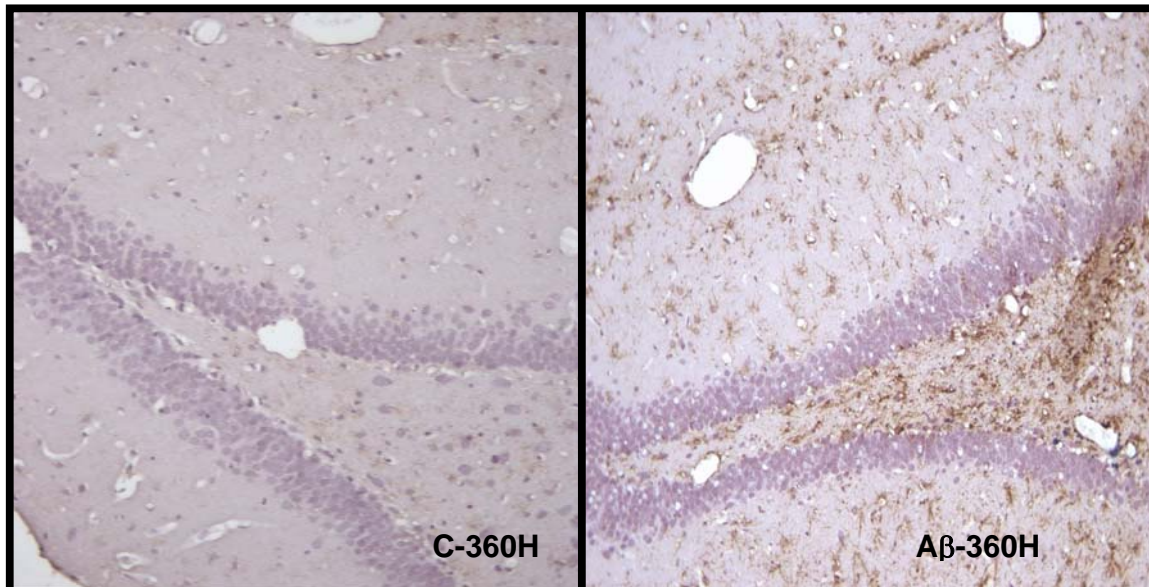


Figura 29.- Microinyección de A β 25-35 (100 μ M) en el hipocampo de la rata. C-360H=grupo control a las 360 horas con solución salina; A β -360H, grupo con A β 25-35 a las 360 horas. Inmunohistoquímica para la proteína glial fibrilar ácida (GFAP) con peroxidasa de rábano (HRP).

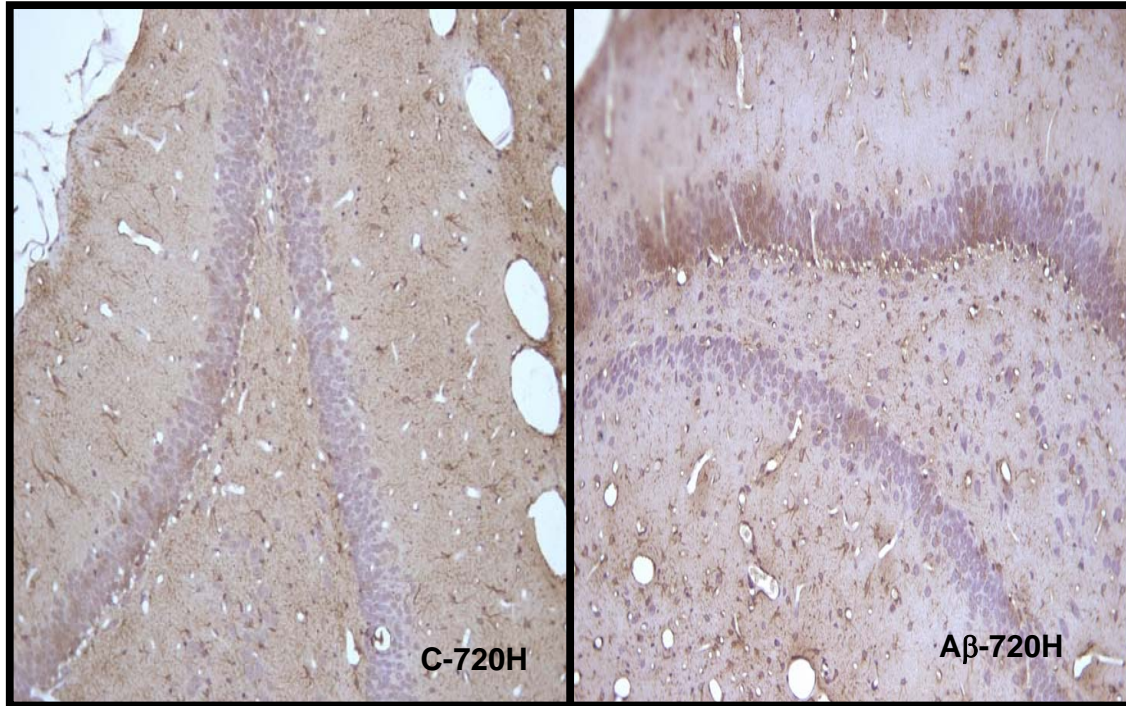


Figura 30.- Microinyección de A β 25-35 (100 μ M) en el hipocampo de la rata. C-720H=grupo control a las 720 horas con solución salina; A β -720H, grupo con A β 25-35 a las 720 horas. Inmunohistoquímica para la proteína glial fibrilar ácida (GFAP) con peroxidasa de rábano (HRP).

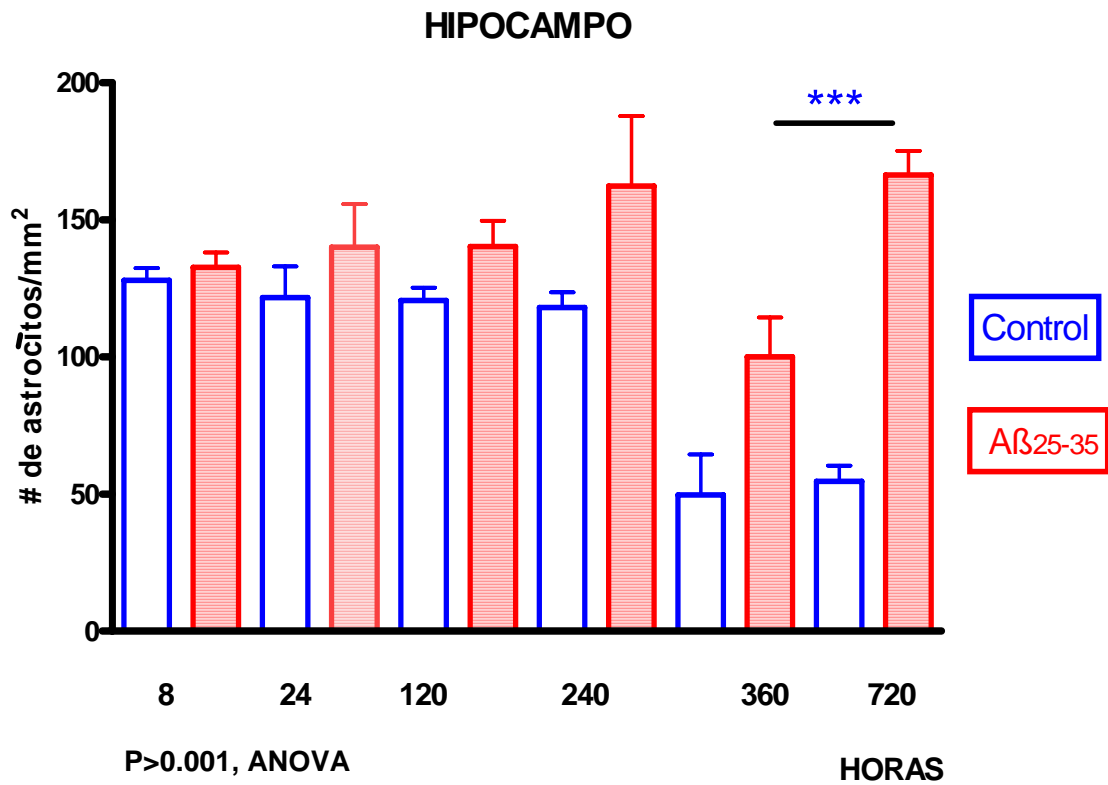


Tabla 1.-En esta gráfica se muestra el número de astrocytos activados por horas, por los efectos del Aβ25-35. Se hizo la microinyección del Aβ25-35 a una concentración de 100 μM en el hipocampo de la rata.

DISCUSIÓN

En este trabajo mostramos que el tratamiento con concentraciones crecientes del A β 25-35 agregado, afecta el crecimiento y diferenciación de las células C6. Se observaron los efectos neurotróficos del A β 25-35 en el cultivo celular de la línea de astrocitoma C6 de rata. Estas células han sido usadas ampliamente en diversos trabajos.¹⁰⁸ Las células C6 tienen una tasa alta de proliferación y han mostrado características de inducir angiogénesis en un modelo de tumor en rata^{106,107}. Los resultados de este trabajo indicaron que las células modificaron su crecimiento y se vieron alteradas por las diferentes concentraciones del péptido. Se observó que a las 72 horas de incubar con el A β 25-35 las células se diferenciaron y no disminuyeron, por el contrario, se observó que empezaron a agregarse, de manera dependiente de la concentración y del tiempo de incubación del péptido. Se fueron separando hasta verse espacios entre los agregados formando “colonias”. El crecimiento de cualquier tipo celular en cultivo lo determina el espacio que tengan para crecer y por tanto hay inhibición por contacto que, en condiciones normales las células cuando llegan a más del 80 % de confluencia, se empiezan a despegar y mueren. Las células C6 a pesar de la administración del péptido crecieron y se diferenciaron, se observó que se adherían unas con otras. El A β no alteró el crecimiento celular, en forma independiente de la concentración y del estado de agregación de péptido. Se ha determinado que la forma agregada es neurotóxica. Sin embargo, en este trabajo la incubación del péptido por 24 horas, ejerció efectos tróficos en el cultivo de la línea celular C6. Se ha reportado que el tipo celular es importante ya que la liberación y expresión de ciertos factores también es dependiente del tipo celular^{65,115}. Las células C6 liberan factores tróficos¹⁰⁷. En cultivo de neuronas corticales el A β a concentraciones subletales baja la regulación del factor neurotrófico derivado del cerebro¹¹⁷. También media la activación aberrante de las proteínas de adhesión focal a concentraciones bajas¹¹⁸.

En condiciones normales, las células astrocíticas producen agentes tróficos y factores básicos de crecimiento^{68,74}. Se ha visto que el crecimiento celular en

cultivo depende de las condiciones experimentales en que se trabajen¹¹³. Existen reportes donde ven diferentes efectos del A β en ausencia del suero^{110,113}. En las C6 el medio contenía el suero fetal al 10 %, no se sometieron al estrés de no tener sustancias nutritivas, probablemente esto permitió que, a pesar del péptido las células sobrevivieran y realizaran la división constante, ya que durante la incubación, se observaron células en mitosis.

Por otro lado, se sabe que los procesos patológicos alteran la estructura de la barrera hematoencefálica. Diversos trabajos han mostrado que el A β atraviesa la barrera hematoencefálica a una tasa muy lenta y que se une a dos receptores, que regulan su transporte^{103,104}. El paso lento a través de la barrera hematoencefálica depende de las uniones estrechas que la forman^{92,101}.

Para determinar por qué las células formaron estos agregados, se usaron anticuerpos contra moléculas como las claudinas, estas proteínas forman parte de las uniones estrechas que forman la barrera hematoencefálica que se da con la unión de los astrocitos con las células endoteliales cerebrales. Se ha visto que participan en la adhesión celular y se expresan en diversos tipos de tumores^{94,95}. En este trabajo la claudina 1 fue positiva a las concentraciones de 50 y 100 μ M. En cultivo de astrocitos primarios se observa su expresión después de aplicar la IL-1 β ¹⁰⁰. En estos resultados, es probable, que el A β indujera la liberación de esta interleucina y por lo tanto la activación de la claudina 1. Se ha visto que esta claudina se expresa en cerebro así como las claudinas 5 y 8⁹⁸. Se localiza en el perineuro de humano adulto y en desarrollo⁹⁷. En los oligodendrocitos solo se ha visto la expresión de las claudinas 11 y 5. La expresión de la claudina 1 se relacionó de manera recíproca con la expresión de la conexina 43 en cultivo primario de astrocitos, lo que indicó que esta reciprocidad se manifiesta en estados patológicos¹⁰⁰.

Las claudinas 4, 7 y 9 fueron positivas a las concentraciones de 50 y 100 μ M del A β 25-35, pero no son diferentes al grupo control. Estas claudinas están expresadas en tumores de riñón, colón, mama y otros⁹⁵. No existen reportes de su expresión en cerebro.

La unidad neurovascular se observa alterada en la EA, provocando una angiogénesis aberrante⁹³. En este trabajo se usaron marcadores angiogénicos como el factor von Willebrand (adhesión endotelial) y la CD105 (angiogénesis y adhesión endotelial). Es importante mencionar que las células C6 liberan *per se* factores angiogénicos debido a su alta tasa de proliferación¹²⁵. La interacción con el A β y el crecimiento de las células provocó la activación de factores angiogénicos tales como el factor von Willebrand o la CD105.

El factor von Willebrand fue positivo con la concentración de 100 μ M del A β 25-35 a las 72 horas de incubación. Se observó en los agregados celulares que mostraron el mayor número de células adheridas. Se sabe que este factor favorece la revascularización en los vasos de todo el cuerpo, cuando existe una patología. El factor von Willebrand se expresa en tejido cerebral con Alzheimer en estados avanzados de la enfermedad, haciendo evidente que hay un daño en las células endoteliales^{107,124}.

La CD105 fue positiva las concentraciones de 50 y 100 μ M del A β 25-35. Esta endoglina se encuentra en el endotelio vascular y se expresa en procesos angiogénicos¹¹⁹. Es una glicoproteína que se encuentra en el endotelio vascular. Se ha visto que se enlaza al factor de crecimiento transformante humano¹¹⁹⁻¹²². Se esta usando como marcador en cáncer humano¹²³.

El uso de lectinas para observar alteraciones en el proceso de glicosilación de las proteínas es de mucha utilidad en la búsqueda de marcadores de las proteínas alteradas en la EA. En trabajos de nuestro grupo, se detectó en el tejido post mortem de pacientes con la EA, que el patrón de glicosilación esta alterado, en el cerebro¹²⁶. En este trabajo la lectina MRL fue positiva a la concentración de 100 μ M del A β 25-35. El nivel de intensidad de esta lectina es significativo en el tejido cerebral con la EA y en tumores cerebrales, indicando el crecimiento explosivo de células¹²⁶.

En este modelo celular se mostró que el A β 25-35 es neurotrófico en las células C6. Surge la pregunta ¿En el cultivo de la línea celular C6 de rata, la administración del A β 25-35 a las concentraciones usadas, provoca la formación de

vasos? Para responder esta pregunta se requieren de ensayos con estos anticuerpos pero variando el tiempo o utilizar una sola concentración del péptido.

Por otro lado, en el ensayo con las ratas, la microinyección del A β 25-35 en el hipocampo, provocó la activación de los astrocitos expresados por la GFAP. Al contar a los astrocitos, a las 240 horas, el número se incrementó, pero no fue significativo cuando se comparó con el grupo control. A partir de las 360 horas hubo una diferencia significativa. Lo que indicó que el A β 25-35 en forma agregada no se eliminó por completo y entonces siguió provocando que los astrocitos se mantuvieran activados. Es conveniente realizar inmunohistoquímicas con anticuerpos para detectar interleucinas o el anticuerpo para el A β y así comprobar si sigue ahí el péptido. El A β es factor que desencadena la respuesta proinflamatoria, provoca la liberación de factores proinflamatorios, tales como la IL-1 β o el TNF α . Se sabe que el A β regula la expresión de la IL-1 β y que el TNF α también ejerce efectos moduladores que desencadenan la liberación y formación de los factores inflamatorios haciendo el círculo "vicioso" de la inflamación crónica. Los resultados que se observaron a partir de las 720 horas, afirman el hecho de que el A β desencadena este proceso inflamatorio crónico, de aquí que, en el grupo control se disminuyeran de manera significativa los astrocitos activados. En la literatura, se observa que la microinyección, en animales, del A β provoca efectos tóxicos y tróficos dependiendo de la concentración y del estado de agregación del péptido, ya que se observó que la agregación del péptido es esencial para su toxicidad. Un modelo como tal para el desarrollo de la patología relacionada a la EA no se ha encontrado. Solo la construcción de animales transgénicos ha puesto de manifiesto características de un modelo para la EA, por ejemplo ratones con el gen de APP o para la proteína tau han hecho posible el estudio de los posibles mecanismos de la toxicidad del péptido. También a los animales que se le quita un gen (knockout), han servido para estudiar los efectos del A β , sobre todo los efectos tóxicos.

CONCLUSIONES

Se observó el efecto trófico del A β 25-35 en el cultivo de la línea celular C6 de rata. Este efecto sólo se observó a las 72 horas de incubación de las células con la fracción del péptido.

El crecimiento y la diferenciación de las células se modificaron con las concentraciones crecientes del péptido.

Se formaron cúmulos de células que se separaron hasta formar “colonias”. Estas “colonias” mostraron estructuras parecidas a “conductos”, con la concentración de 100 μ M.

Las claudinas 1, 4, 7 y 9 se expresaron en los cultivos a las concentraciones de 50 y 100 μ M. También, se expresaron los factores angiogénicos, CD105 y el factor von Willebrand.

En el modelo animal, se observó astrogliosis en el grupo experimental indicando que el A β 25-35 no tuvo efectos tróficos en el tejido cerebral de la rata.

REFERENCIAS

1. Price D. L. Chap. 58. Aging of the brain and dementia of the Alzheimer type. In: Kandel E. R., Schwartz J. H. and Jessel T. M. Principles of neuronal science. Ed Mc Graw-Hill, fourth ed. 2000. Pag. 1149.
2. Pousa L. S. Definición y epidemiología de la enfermedad de Alzheimer. En: Enfermedad de Alzheimer y otras demencias. R. Alberca y S. López Pousa. Ed. Médica Panamericana, 2ª ed. 2002, pp147-148.
3. CIE-10, Clasificación Internacional de las Enfermedades, 10ª edición, OMS 194-25.
4. Arango L. J. C. y Fernández G. S. Características clínicas de la EA. En: Las demencias. Aspectos clínicos, neuropsicológicos y tratamiento. Arango L. J. C., Fernández G. S., Ardila A. y Morales S. J. L. Ed. El manual Moderno. 1ª edición, Vol. II, p. 197-208, 2003.
5. Pousa L. S. Definición y epidemiología de la enfermedad de Alzheimer. En: Enfermedad de Alzheimer y otras demencias. R. Alberca y S. López.Pousa. Ed. Médica Panamericana, 2ª ed. 2002, pp147-148.
6. Richter B. Z. and Richter R. W. Alzheimer's disease. Epidemiological and statistical data. En: Current content clinical neurology. Alzheimer's disease: a physician's guide to practical management. Ed. Humana. 1ª ed., 2004, cap. 5; 51-55.
7. Papolla M. A. La neuropatología y la Biología Molecular de la Enfermedad de Alzheimer. pp. 543-553. En: Neuropatología. Diagnóstico y Clínica. Cruz-Sánchez F. F. Ed. Edimusa. 2000.

8. López de Munain A. La enfermedad de Alzheimer genéticamente determinada. En: Enfermedad de Alzheimer y otras demencias. R. Alberca y S. López-Pousa. Ed. Médica Panamericana, 2ª ed. 2002, p. 157.
9. Morales-Virgen J. J. y Gutiérrez-Robledo L. M. Epidemiología de las demencias. Arch. Neurocién. (Méx.). 2006, 11(supl. 1): 3-13.
10. Trujillo Z., Becerra M. Y Rivas M. S. Latinoamérica envejece. Visión gerontológica/geriátrica. 2008, vol. 1, pp 124. Ed. McGraw-Hill.
11. Valdivieso A. F. Genética de la enfermedad de Alzheimer no genética, compleja. En: Martínez Lage J. M., Khachaturian S. Z., Artells H. J. J., Guillén Ll. F., López-Ibor A. J. J., Mayor M. F. y Segovia de Arana J. M. Alzheimer XXI: Ciencia y Sociedad. Ed. Masson, 1ª ed. pp 125-126.
12. Arango L. J. C. y Fernández G. S. Características genéticas de la EA. En: Aspectos clínicos, neuropsicológicos y tratamiento. Arango L. J. C., Fernández G. S., Ardila A. y Morales S. J. L. Ed. El Manual Moderno. 1ª edición Vol. II; pág. 194-196, 2003.
13. Pericak-Vance M. A., St. George-Hyslop P. H., Gaskell P. C. Jr., Growdon J., Crain B. J., Hulette C., Gusella J. F., Yamaoka L., Tanzi R. E., Roses A. D., et al. Linkage analysis in familial Alzheimer's disease: description of the Duke and Boston data sets. Genet. Epidemiol. 1993, 10(6): 361-364.
14. Tomita S., Kirino Y. and Suzuki T. Cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein (APP) by secretases occurs after O-glycosylation of APP in the protein secretory pathway. J. Biol. Chem. 1998, 273(11): 6277-6284.
15. Selkoe J. D. Deciphering the genesis and fate of amyloid β -protein yields novel therapies for Alzheimer disease. J. Clin. Inv. 2002, 10(10): 1375-1381.

16. Murayama Y., Takeda S., Yonezawa Giambarella U., Nishimoto I. and Ogata E. Cell surface receptor function of amyloid precursor protein that activates Ser/Thr kinases. *Gerontology*, 1996, 42(1): 2-4.
17. Selkoe D. and Schenk D. Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics. *Ann. Rev. Pharmacol. Tol.* 2003, 43:545-584.
18. Glenner G. G. and Wong C. W. Alzheimer's disease and Down's síndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem. Biophys. Res. Común.* 1984, 122: 1131-1135.
19. Kitaguchi N., Takahashi Y., Tokushima Y., Shiojiri S., Ito H. Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity. *Nature.* 1988, 331(6156): 530-532.
20. Tanzi R. E. McClatchey A. I., Lamperti E. D., Villa-Komaroff L., Gusella J. F. and Neve R. L. Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease. *Nature.* 1988, 331: 528-530.
21. T. Gómez Islas y E. Ribé Garrido. Neurobiología y mecanismos moleculares en la EA. En *Alzheimer XXI: Ciencia y Sociedad*. Martínez L. J. M., S. Khachaturian Z. S., Artells H. J. J., Guillén LI. F., López-Ibor A. J. J., Mayor M. F. y Segovia de Arana J. M. Ed. Masson vol. II, 1ª. Edición, páginas 155-156; 2001.
22. Thinakaran G. and Sisodia S. S. The molecular Biology of presenilin 1. Chap. 10, in: *Molecular Biology of Alzheimer's disease. Genes and mechanisms involved in amyloid generation*. Harwood Academic Publishers.

23. Newman M., Musgrave F. I. and Lardelli M. Alzheimer disease: amyloidogenesis, the presenilins and animals models. *Biochem. Biophys. Acta.* 2007, 1772: 285-297.
24. Guimerá A., Jirones X. y Cruz-Sánchez F. Actualización sobre la patología de la enfermedad de Alzheimer. *Rev. Esp. Patol.* 2002, 35(1): 21-48.
25. Schraen-Maschke S. Dhaenens C-M., Delacourte A. and Sablonniere B. Microtubule-associated protein tau gene: a risk factor in human neurodegenerative diseases. *Neurobiol. Dis.* 2004, 15: 449-460.
26. Kosik K. The molecular and cellular biology of tau. *Brain Pathol.* 1993, 3: 39-43.
27. Buee L. Bussiere T. Buee-Scherrer V., Delacourte A. and Hof P. R. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 2000, 33: 95-130.
28. Trojanowsky J. Q. and Lee V. M. The role of tau in Alzheimer's disease. *Med. Clin. North Am.* 2002, 86: 615-627.
29. Robert M. and Mathuranath. Tau and taupathies. *Neurology India.* 2007, 55: 11-16.
30. Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Tung Y. C., Quinlan M., Winiewsky H. M. and Binder L. I. Abnormal hyperphosphorylation of microtubule associated protein (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1986, 93: 4913-4917.
31. Iqbal K. Grundke-Iqbal I., Zaidi T., Merz P. A., Wen G. Y., Shaikh S. S., Winiewsky H. M., Alafusoff I. and Winblad B. Defective brain microtubule assembly in Alzheimer's disease. *Lancet.* 1986, 2: 421-426.

32. Coria B. F. Amiloidosis y Enfermedad de Alzheimer. Cap. 13, en: Alberca R. y López-Pousa Enfermedad de Alzheimer y otras demencias. 2002, 2a. Edición. Edit. Panamericana, pags. 667.
33. Ponce P., González D. P., Schilling J., Hsu D., Greenberg B., Davis K. Wallace., W., Lieberburg I. and Fuller F. A new A4 amyloid mRNA contains a domain homologous to serina proteinase inhibitors. *Nature* 1988, 331: 525-527.
34. Ikeda S., Allsop D. and Glenner G. G. A study of the morphology and distribution of amyloid beta protein immunoreactive plaque and related lesions in the brains of Alzheimer's disease and adult Down's síndrome. *Prog. Clin. Biol. Res.* 1989, 317: 313-323.
35. Armstrong R. A. β -amyloid plaques: stages in life history or independent origen? *Dement. Geriart. Cogn. Disord.* 1998, 9: 227-238.
36. Dickson T. C. and Vickers J. C. The morphological phenotype of the β -amyloid plaques and associated neuritic changes in Alzheimer's disease. *Neuroscience.* 2001, 105(1): 99-107.
37. Glenner G. G. and Wong C. W. Alzheimer's disease: inicial report of the purication and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1984, 120(3): 885-890.
38. Selkoe D. J., Abraham G. R., Podlisny M. B., and Duffy L. K. Isolation of low-molecular-weight protein from amyloid plaque fibers in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 1986, 46(6): 1820-1834.

39. Koh J., Yang L. L., and Cotman C. W. β -amyloid protein increases the vulnerability of cultured cortical neurons to excitotoxic damage. *Brian Res.* 1990, 533: 315-328.
40. Kowall N. W., Beal M. F., Busciglio J. Duffy L. K. and Yankner B. J. An in vivo model for the neurodegenerative effects of beta-amyloid and protection by substance P. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1991, 88:7247-7251.
41. Whitson S. J. Selkoe J. D. and Cotman W. C. Amyloid β protein enhances the survival of hippocampal neurons in vitro. *Science.* 1989, 243: 1488-1490.
42. Whitson S. J., Glabe G. C., Shintani E., Abcar A. and Cotman W. C. β -amyloid protein promotes neuritis branching in hippocampal cultures. *Neurosci. Letters.* 1990, 110: 319-324.
43. Pike J. C. Walencewicz J. A., Glabe G. C. and Cotman W. C. Aggregation-related toxicity of synthetic β -amyloid protein in hippocampal cultures. *Euro. J. Pharmacol.* 1991, 207: 367-368.
44. Ramsden M. Henderson Z. and Pearson H. Modulation of Ca^{2+} channel currents in primary cultures of rats cortical neurons by amyloid β protein (1-40) is dependent on solubility status. *Brain Res.* 2002, 956: 254-261.
45. Lorenzo A. and Yankner A. B. β -amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1994, 91: 12243-12247.
46. Howlett R. D., Jennings H. K., Lee C. D., Clark S. G. M., Brown F., Wetzel R., Word J. S. Camillero P. and Roberts W. G. Aggregation state and neurotoxic properties of Alzheimer beta-amyloid peptide. *Neurodegeneration.* 1995, 4: 23-32.

47. Mark J. R., Hensley K., Butterfield D. A. and Mattson M. P. Amyloid β -peptide impairs ion-motive ATPase activities: evidence for a role in loss of neuronal Ca^{2+} homeostasis and cell death. *J. Neuroscience*. 1995, 15(9): 6239-6249.
48. Mattson P. M., Cheng B., Davis D., Bryant K., Lieberburg I. and Rydel E. R. β -amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J. Neurosci*. 1992, 12(2): 376-389.
49. Arispe N., Rojas E. and Pollard B. H. Alzheimer disease amyloid β protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminum. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1993, 90: 567-571.
50. Kawahara M. and Kuroda Y. Molecular mechanisms of neurodegeneration induced by Alzheimer's β -amyloid protein: channel formation and disruption of calcium homeostasis. *Brain Res. Bull*. 2000, 53(4): 389-397.
51. Kagan B. L., Hirakura Y., Azimov R., Azimova R. and Lin M.-C. The channel hypotheses of Alzheimer's disease: current status. *Peptides*, 2002, 23: 1311-1315.
52. Arispe N., Pollard H. and Rojas E. Zn^{2+} interaction with Alzheimer amyloid β protein calcium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1996, 93: 1710-1715.
53. Chen S. Y., Harding J. W. and Barnes C. D. Neuropathology of synthetic β -amyloid peptide analogs in vivo. *Brain Res*. 1996, 715: 44-50.
54. Pike J. C. Walencewicz J. A., Glabe G. C. and Cotman W. C. Aggregation-related toxicity of synthetic β -amyloid protein in hippocampal cultures. *Europ. J. Pharmacol*. 1991, 207: 367-368.

55. Forloni G., Lucca E., Angeretti N., Della Torre P. and Saltona M. Amidation of β -amyloid peptide strongly reduced the amyloidogenic activity without alteration of the neurotoxicity. *J. Neurochem.* 1997, 69(5): 2048-2054.
56. Yankner A. B., Duffy K. L. and Kirschner A. D. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid β protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science*, 1990, 250: 279-282.
57. Hensley K., Carney J. M., Mattson M. P., Aksenova M., Harris M., Wu J. F., Floyd R. A. and Butterfield D. A. A model for β -amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevante to Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1994, 91: 3270-3274.
58. Huang H-M. Ou H-C. and Hsieh S-J. Antioxidants prevent amyloid peptide-induced apoptosis and alteration of calcium homeostasis in cultured cortical neurons. *Life Sciences.* 2000, 66(19): 1879-1892.
59. Lucca E., Angeretti N. and Forloni G. Influence of cell culture conditions on the protective effect of antioxidants against β -amyloid toxicity: studies with lazaroids. *Brain Res.* 1997, 764: 293-298.
60. Games D., Khan K. M., Soriano F. G., Kein P. S. Davis D. L., Bryant K. and Leiberburg I. Lack of Alzheimer pathology alter β -amyloid protien injection in rat brain. *Neurobiol. Aging.* 1992, 13(5): 569-576.
61. Stein-Behrens B., Adams K., Yeh M. and Sapolsky R. Failure of beta-amyloid protein fragment 25-35 to cause hippocampal damage in the rat. *Neurobiol. Aging.* 1992, 13(5): 377-379.
62. Frautschy A. S., Baird A. and Cole M. G. Effects of injected alzheimer β -amyloid cores in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1991, 88: 8362-8366.

63. Podlisny B. M., Stephenson T. D., Frosch P. M., Lieberburg I., Clames A. J. and Selkoe D. Synthetic amyloid β -protein fails to produce specific neurotoxicity in monkey cerebral cortex. *Neurobiol. Aging*. 1992, 13(5): 561-562.
64. Smith M. A., Iría K., Hsiao K., Pappolla M. A., Harris P. L. R., Siedlak S. L., Tabaton M. and Perry G. Amyloid β deposition in Alzheimer transgenic mice is associated with oxidative stress. *J. Neurochem*. 1998, 70: 2212-2215.
65. Gschwind M. and Huber G. Apoptotic cell death induced by β -amyloid 1-42 peptide is cell type dependent. *J. Neurochem*. 1995, 65: 292-300.
66. Isobe I., Yanagisawa K. and Michikawa M. A possible model of senile plaques using synthetic amyloid β -protein and rat glial culture. *Exp. Neurol*. 2000, 162: 51-60.
67. Freir D. B., Holscher C. and Herron C. E. Blockade of long-term potentiation by β -amyloid peptides in the CA1 region of the rat hippocampus in vivo. *J. Neurophysiol*. 2001, 85: 708-713.
68. Wood L. P. Roles of CNS macrophages in neurodegeneration. Chap. 1. En: *Neuroinflammation. Mechanisms and management*. Wood L. P. Humana Press, 1998.
69. García G., Vélez C. y Jiménez M. El β -amiloide: modulador de la enfermedad de Alzheimer. *IATREIVA*, 2001, 14(1): 73-85.
70. Akima H. Inflammatory response in Alzheimer's disease. *Tohoku. J. Exp. Med*. 1994, 174: 295-303.

71. Masliah E. and Licastro F. Neuronal and synaptic loss, reactive gliosis, microglial response and induction of the complement cascade in Alzheimer's disease. In: Clark C. M., Trojanowski J. Q., eds. Neurodegenerative dementias: clinical features and pathological mechanisms. 1th ed. McGraw-Hill; 2000: 131-146.
72. Heneka M. T., O'Banion M. K. Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *J. Neuroimmunol.* 2007, 184(1-2): 69-91.
73. Rogers J., Webster S., Lue L-F., L. Brachova W., Civin H., Emmerling M., Shivers B., Walker D. and McGeer P. Inflammation and Alzheimer's disease pathogenesis. *Neurobiology of Aging.* 1996, 17(5): 681-686.
74. Muñoz G. D. G. Neuroinflamación en la EA. En: Alzheimer XXI: Ciencia y Sociedad. Martínez L. J. M., Khachaturian Z. S., Artells H. J. J., Guillén LI. F., López-Ibor A. J. J., Mayor M. F. y Segovia de Arana J. M. Ed. Masson vol. II, 1^a edición, pp: 175-179; 2001.
75. Pasinetti G. M. Inflammatory mechanisms in neurodegeneration and Alzheimer's disease: the role of the complement system. *Neurobiology of Aging.* 1996, 7(5): 707-716.
76. Aisen P. S. and Davis K. L. Inflammatory mechanisms in Alzheimer's disease: implications for therapy. *Am. J. Psychiatry.* 1994, 15(8): 1105-1113.
77. Johnson S. A., Lampert-Etchells M., Pasinetti G. M., Rozovsky I. and Finch C. E. Complement mRNA in the mammalian brain: responses to Alzheimer's disease and experimental brain lesioning. *Neurobiol. Aging.* 1992, 13(6): 641-648.

78. Jiang H., Burdick D. Glabe C. G., Cotman C. W. and Tenner A. J. beta-amyloid activates complement by binding to specific region of the collagen-like domain of the Cq1 Achain. *J. Immunol.* 1994, 152(10): 5050-5059.
79. Barger S. W. and Harmon A. D. Microglia activation by Alzheimer amyloid precursor protein and modulation by apolipoprotein E. *Nature.* 1997, 388: 878-881.
80. Frei K., Malipiero U. V., Zinkernagel R. M., Schwab M. E. and Fontana A. On the cellular source and function of interleukin-6 produced in the central nervous system in viral disease. *Eur. J. Immunol.* 1989, 19:689-694.
81. Yamamoto K., Arakawa T., Ueda N. and Yamamoto S. Transcriptional roles of nuclear factor-IL-6 in the TNF alpha-dependent induction of cyclooxygenase-2 in MC3T3-E cells. *J. Biol. Chem.* 1995, 270: 31315-31320.
82. Akama T. K., Albanese C., Pestell G. R. and Van Eldik J. L. amyloid β -peptide stimulates nitric oxide production in astrocytes through an NF κ B-dependent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998, 95: 5795-5800.
83. Floden M. A., Li S. and Combs K. C. β -amyloid-stimulated microglia induce neuron death via synergistic stimulation of tumor necrosis factor α and NMDA receptors. *J. Neurosci.* 2005, 25(10): 2566-2575.
84. Canning D. R., McKeon R. J., De Witt D. A., Perry G., Wuje K. J. R., Frederickson R. C. A. and Silver J. β -amyloid of Alzheimer's disease induces reactive gliosis that inhibits axonal outgrowth. *Exp. Neurol.* 1993, 124: 289-298.
85. De Witt D. A. and Silver J. Regenerative failure: a potential mechanism for neuritic dystrophy in Alzheimer's disease. *Exp. Neurol.* 1996, 142: 103-110.

86. Sheng J. G., Ito K., Mrak R. D., Rovnaghi C. R., Van Eldik L. J. and Griffin W. S. T. In vivo and in vitro evidence supporting a role for the inflammatory cytokine interleukin-1 as a driving force in Alzheimer pathogenesis. *Neurobiology of aging*. 1996, 17(5): 761-766.
87. Kalaria R. N., Harshbarger-Kelly M., Cohen D. L. and Premkumar D. R. D. Molecular aspects of inflammatory and immune responses in Alzheimer's disease. *Neurobiology Aging*. 1996, 17(5): 687-693.
88. McGeer P. L. and McGeer E. G. The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Res. Rev.* 1995, 21: 195-218.
89. Bernhardt Von R. and Eugenin J. Microglial reactivity to β -amyloid is modulated by astrocytes and pro-inflammatory factors. *Brain Res.* 2004, 1025: 186-193.
90. White J. A., Manelli A. M., Holmberg K. H., Van Eldik L. J. and Ladu M. J. Differential effects of oligomeric and fibrillar amyloid- β 1-42 on astrocyte-mediated inflammation. *Neurobiol. Dis.* 2005, 18: 459-465.
91. Kakimura J-I., Kitamura Y., Takata K., Umeki M., Suzuki S., Shibagaki K., Taniguchi T., Nombra Y., Gebike-Haerter P. S., Smith M. A., Perry G. and Shimohama S. Microglial activation and amyloid- β clearance induced by exogenous heat shock proteins. *FASEB. J.* 2002, 16: 601-603.
92. Brooks T. A., Hawkins B. T., Huber J. D., Egleton R. D. and Davis T. P. Chronic inflammatory pain leads to increase blood-brain barrier permeability and tight junction proteins alterations. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2005, 289: 738-743.

93. Ballabh P., Braun A. and Nedergaard M. The blood-brain-barrier: an overview structure, regulation and clinical implications. *Neurobiol. Dis.* 2004, 16: 1-13.
94. Oliveira S. S. and Morgado-Díaz J. A. Claudins: multifunctional players in epithelial tight junctions and their role in cancer. *Cell Mol. Life Sci.* 2007, 64(1): 17-28.
95. Swisshelm K., Macek R. and Kubbies M. Role of claudins in tumorigenesis. *Adv. Drug Del. Rev.* 2005, 57: 919-928.
96. Furuse M., Fujita K., Hiiiragi T., Fujimoto K. And Tsukita S. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J. Cell Biol.* 1998, 141: 1539-1550.
97. Pummi K. P., Heape A. M., Grénman R. A., Peltonen J. T. K. and Peltonen S. A. Tight junction proteins ZO-1, occludin, claudins in developing and adult human perineurium. *J. Histochemistry and Cytochemistry.* 2004, 52(8): 1037-1046.
98. Lamas M., Gozález-Mariscal L., Gutierrez R. Presence of claudins mRNA in the brain selective modulation of expression by kindling epilepsy. *Mol. Brain Res.* 2002, 104: 250-254.
99. González-Mariscal L., Betanzos A., Nava P. and Jaramillo B. E. Tight junction proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2003, 81: 1-44.
100. Duffy H. S., John G. R., Lee S. C., Brosnan C. F. and Spray D. C. Reciprocal regulation of the junctional proteins claudin-1 and connexin43 by interleukin-1 β in primary human fetal astrocytes. *J. Neuroscience.* 2000, 20: 1-6.

101. Clifford P. M., Zarrabi S., Siu G., Kinsler K. J., Kosciuk M. C., Venkataraman V., D'Andrea M. R., Dinsmore S. and Nagele R. G. A β peptides can enter the brain through a defective blood-brain-barrier and bind selectively to neurons. *Brain Res.* 2007, 1142: 223-236.
102. Deane R. and Zlokovic B. V. Role of the blood-brain-barrier in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* 2007, 4(2): 191-197.
103. Banks W. A., Terrell B., Farr S. A., Robinson S. M., Nonaka N. and Morley J. E. Passage of amyloid β -protein across the blood-brain-barrier in a mouse model of Alzheimer's disease. *Peptides.* 2002, 23: 2223-2226.
104. Mackic J. B., Bading J., Ghiso J., Walter L., Wisniewski T., Frangione B. and Zlokovic V. Circulating amyloid- β peptide crosses the blood-brain-barrier in aged monkey and contributed to Alzheimer's disease lesions. *Vascular Pharmacology.* 2002, 38: 303-313.
105. Zlokovic B. Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration. *TREN's in Neuroscience.* 2005, 28(4): 202-208.
106. Miao J., Vitek M. P., Xu F., Previti M. L., Davis J. and Van Nostrand W. E. Reducing cerebral microvascular amyloid- β protein deposition diminishes regional neuroinflammation in vasculotropic mutant amyloid precursor protein transgenic mice. *J. Neuroscience.* 2005, 25(27): 6271-6277.
107. Zipser B. D., Johanson C. E., González L., Berzin T. M., Tavares R., Hulette C. M., Vitek M. P., Hovanesian V. Stopa E. G. Microvascular injury and blood-brain-barrier leakage in Alzheimer's disease. *Neurobiology Aging.* 2007, 28: 977-986.

108. Benda P., Lightbody J., Sato G., Levine L. and Sweet W. Differential rat glial cell strain in tissue culture. *Science*. 1968, 161(839): 370-371.
109. Morato E. and Mayor F. Jr. Production of the Alzheimer's β -amyloid peptide by C6 glioma cells. *FEBS*. 1993, 336(2): 275-278.
110. Peña L. A., Brecher C. W. and Marshak D. R. β -amyloid regulates gene expression of glial trophic substance S100 β in C6 glioma and primary astrocyte cultures. *Mol. Brain Res*. 1995, 34: 118-126.
111. Plate K. H., Breier G., Millauer B., Ullrich A. and Risau W. Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its cognate receptors in a rat glioma model of tumor angiogenesis. *Cancer Res*. 1993, 53(23): 5822-5827.
112. Kim Y. A., Lim S. Y., Rhee S. H., Park K. Y., Kim C., Choi B. T., Lee S. J., Park Y. M. and Choi Y. H. Resveratrol inhibits inducible oxide synthase and cyclooxygenase2-expression in beta-amyloid-treated C6. *Int. J. Mol. Med*. 2006, 17(6): 1069-1075.
113. Sudoh S., Kawakami H. and Nakamura S. Serum deprivation alters expression and the splicing at exons 7, 8 y 15 of the beta-amyloid precursor protein in the C6 glioma cell line . *Brain Res. Mol. Brain Res*. 1996, 39(1-2): 12-22.
114. Feng Z. and Zhang J-T. Protective effects of the melatonin on β -amyloid-induced apoptosis in rat astrogloma C6 cells and it's mechanism. *Free Radical Biology Medicine*. 2004, 37(11): 1790-1801.
115. Hammond R. R., Iskander S., Achim C. L., Hearn S., Nassif J. and Wiley C. A. A reliable primary human CNS cuture protocol for morphological

- studies of dendritic and synaptic elements. *J. Neurosci. Meth.* 2002, 118: 189-198.
116. Paxinos and Watson, 1998.
117. Tong L. Balazs R., Thornton P. L. and Cotman C. W. β -amyloid peptide at sublethal concentrations downregulates brain-derived neurotrophic factor functions in cultures cortical neurons. *J. Neurosci.* 2004, 24(30):6799-6809.
118. Grace E. A. and Busciglio J. Aberrant activation of focal adhesion proteins mediates fibrillar amyloid b-induced neuronal dystrophy. *J. Neurosci.* 2002, 23(2): 493-502.
119. Duff S. E., Li C., Garland J. M. And Kumar S. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J.* 2003, 17: 984-992.
120. Gougos A. and Letarte M. Primary structure of endoglin, a RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 1990, 265: 8361-8364.
121. Bellon T., Corbi A., Lastres P., Calés C., Cebrain M., Vera S., Cheifetz S., Massagé J., Letarte M. and Bernabéu C. Identification and expresión of two forms of the human transforming growth factor-beta-binding protein endoglin with distinct cytoplasmic regions. *Eur. J. Immunol.* 1993, 23: 2340-2345.
122. Lastres P., Martín-Pérez J., Langa C. and Bernabéu C. Phosphorylation of the human-transforming-growth- β -binding protein endoglin. *Biochem. J.* 1994, 301: 765-768.

123. Fonsatti E. and Maio M. Highlights on endoglin (CD105): from basic findings towards clinical applications in human cancer. *J. Translational Medicine*. 2004, 2(18): 1-7.

124. González S. R., Rivero J. R., Batista S. L., González G. J. M., Díaz C. A., González G. A. y Rubio R. R. Descripción de un inmunoensayo enzimático que reconoce anticuerpos anti-factor VIII/Von Willebrand obtenidos a partir de hibridomas murinos. *Rev. Cubana Hematol. Inmunol. Hemoter*. 1999, 15(1): 46-53.

125. Arrieta O., Guevara P., Tamariz J., Rembao D. and Sotelo J. Antiproliferative effect of thalidomide alone and combined with carmustine against C6 glioma. *Int. J. Exp. Pathol*. 2002, 83(2): 99-104.

126. Guevara J., Espinosa B., Zenteno E., Vázquez L., Luna J., Perry G. and Mena R. Altered glycosylation pattern of proteins in Alzheimer disease. *J. Neuropathology Exp. Neurol*. 1998, 57(10): 905-914.