



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Efecto del ácido escamónico A en un modelo de
neurotoxicidad inducido por amiloide β 1-42**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Biólogo

P R E S E N T A:

Fernando Becerril Pérez



**DIRECTOR DE TESIS:
Dra. Victoria Campos Peña**

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2017



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.

1. Datos del alumno

Fernando
Becerril
Pérez
22 35 13 68
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
308695193

2. Datos del tutor

Doctora
Victoria
Campos
Peña

3. Datos del sinodal 1

Doctora
Rosalinda
Guevara
Guzmán

4. Datos del sinodal 2

Doctor
Ismael
León
Rivera

5. Datos del sinodal 3

Doctora
Josefina
Herrera
Santoyo

6. Datos del sinodal 4

Doctora
Rosario
Ortiz
Hernández

Índice

1. Resumen-----	5
2. Introducción-----	6
3. Antecedentes-----	8
3.1 Desorden neurodegenerativo-----	8
3.1.1 Demencia-----	9
3.2 Enfermedad de Alzheimer-----	10
3.2.1 Características macroscópicas-----	10
3.2.2 Lesiones microscópicas-----	11
3.3 Hipocampo-----	15
3.4 Péptido amiloide β -----	19
3.4.1 Agregación-----	21
3.4.2 Toxicidad-----	23
3.4.3 Modelos de inyección intracerebral-----	25
3.5 Astrocitos-----	26
3.5.1 Astrocitos y $A\beta$ -----	30
3.6 Microglía-----	30
3.6.1 Microglía y $A\beta$ -----	32
3.7 Metabolitos obtenidos de plantas con efecto en el SNC-----	33
3.7.1 Familia <i>Convolvulaceae</i> -----	34
3.7.2 Actividad biológica de resinas glicosídicas-----	35
3.7.3 <i>Convolvulus scammonia</i> -----	36
3.8 <i>Ipomoea tyrianthina</i> -----	38
4. Justificación-----	42
5. Hipótesis-----	44
6. Objetivos-----	45
7. Metodología-----	46
8-9. Resultados y discusión-----	55
10. Conclusiones-----	81
11. Bibliografía-----	82

Abreviaturas

EA – Enfermedad de Alzheimer

A β - Péptido beta amiloide

PPA β – Proteína precursora del beta amiloide

PN – Placas neuríticas

MNF – Marañas neurofibrilares

CA – Cuerno de Amón (Región hipocampal)

GM1 – Gangliósido 1

NeuN – Neuronal nuclei (marcador neuronal)

GFAP – Proteína ácida fibrilar glial (marcador de astrocitos)

Iba1 - Ionized calcium binding adapter molecule 1 (marcador de microglía)

SNC – Sistema nervioso central

NMDA - N-metil D-aspartato

AMPA - Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico

GABA – Ácido γ aminobutírico

PBS – Buffer fosfato salino

MHC – Complejo mayor de histocompatibilidad

LPS – Lipopolisacáridos

1. Resumen

La Enfermedad de Alzheimer es la principal causa de demencia y representa un problema de salud principalmente en individuos de edad avanzada mediante la generación de deterioro progresivo de las capacidades cognitivas. Uno de los principales componentes patológicos de esta enfermedad es el péptido A β principalmente en estado oligomérico. Debido a esto se planteó en el presente trabajo el estudio del efecto del ácido escamónico A en un modelo de neurotoxicidad inducido por la inyección de oligómeros de A β en el hipocampo en ratas Wistar, esto se realizó en base a que estudios previos con moléculas similares han mostrado un efecto neuroprotector así como antiinflamatorio en otros modelos animales. Al observar la estructura tisular mediante el uso de tinciones generales e inmunohistoquímica para los principales tipos celulares de la región hipocampal se observó preservación del tejido así como disminución en el proceso inflamatorio generado por el A β en comparación con los grupos sin administración previa de AE.

2. INTRODUCCIÓN

Por desorden neurodegenerativo se considera a algunas enfermedades del sistema nervioso que tienen como características, la pérdida neuronal progresiva y la pérdida de la función a nivel celular, tisular, del órgano y sistémico. Sus causas por lo general, se desconocen aunque, se propone que su generación es multifactorial y en algunos casos podrían deberse a factores genéticos.

En múltiples ocasiones, el desarrollo del desorden neurodegenerativo se asocia con acumulación anormal de una o más proteínas en el sistema nervioso central. Cuando es así, estas proteínas generalmente se encuentran en un estado anormal de agregación, presentan una conformación anormal y/o modificaciones postraduccionales. Cuando se trata de esta situación deberá pasar un tiempo durante el cual, dicha proteína se acumula y posteriormente se comienza a manifestar la sintomatología.

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la principal causa de demencia. El deterioro de las capacidades cognitivas, es una característica predominante en esta patología. En etapas avanzadas el individuo que la padece, se ve incapacitado en la realización de actividades cotidianas.

Dentro de las características neuropatológicas más relevantes de la EA, se encuentran la presencia de placas neuríticas (PN) extracelulares, formadas por el péptido amiloide beta ($A\beta$) y marañas neurofibrilares intracelulares (MNF), formadas por agregados de la proteína tau hiperfosforilada. Las estructuras cerebrales más susceptibles al daño son el hipocampo y la corteza entorrinal.

Existen diversas teorías propuestas que tratan de definir la generación y evolución de la EA. Algunas de ellas proponen que factores tales como la inflamación, trastornos metabólicos o vasculares, pueden predisponer al desarrollo de la EA. Sin embargo, la teoría más aceptada es la cascada de amiloide beta, la cual establece que la acumulación del péptido $A\beta$ y la formación de agregados desencadena una serie de eventos moleculares que dan lugar a las características observadas en la enfermedad. Esta teoría

está sustentada en la gran cantidad de estudios realizados tanto *in vitro* como *in vivo*, que han demostrado la toxicidad del péptido.

En la medicina tradicional, diversas plantas han demostrado tener acción farmacológica y son usadas para tratar distintos tipos de patologías. Por lo tanto, es importante el aislamiento de sus componentes, así como el desarrollo de modelos experimentales para conocer sus mecanismos de acción.

Diversas especies de la familia *Convolvulaceae* son usadas con fines medicinales y su acción se atribuye a la presencia de resinas glicosídicas producidas por células secretoras. Algunos de los compuestos aislados de ellas, han demostrado tener acción en el sistema nervioso central. En el presente estudio, se efectúa la evaluación del efecto protector que pudiera tener el ácido escamónico A (un ácido glicosídico obtenido de *I. tyrianthina*) en un modelo de neurotoxicidad en rata, inducido por la inyección de A β en la región CA1 del hipocampo.

3. ANTECEDENTES

3.1 Desorden neurodegenerativo

Son enfermedades del sistema nervioso que tienen como características, la pérdida neuronal progresiva y la pérdida de la función a nivel celular, tisular, del órgano y sistémico. Sus causas por lo general, se desconocen aunque, se propone que su generación es multifactorial y en algunos casos podrían deberse a factores genéticos [1].

En múltiples ocasiones, su desarrollo se asocia con acumulación anormal de una o más proteínas en el sistema nervioso central. Cuando es así, estas proteínas generalmente se encuentran en un estado anormal de agregación, presentan una conformación anormal y/o modificaciones postraduccionales, tales como la fosforilación (Figura 1). Cuando se trata de esta situación deberá pasar un tiempo durante el cual, dicha proteína se acumula y posteriormente se comienza a manifestar la sintomatología [2, 3]. De acuerdo al área del sistema nervioso afectada (que generalmente no se restringe a una en específico), y a las manifestaciones clínicas de la enfermedad, un desorden neurodegenerativo se puede clasificar en distintos subtipos:

Demencia: Predominantemente afectan áreas corticales, la más común es la enfermedad de Alzheimer seguida por la demencia vascular [3].

Desorden hiperkinético de movimiento: Se manifiesta como un exceso de movimientos involuntarios. Las áreas involucradas son los ganglios basales, tálamo y cerebelo. El caso más común es la enfermedad de Huntington [4].

Enfermedades acinéticas-rígidas: Afectan predominantemente la sustancia nigra. Se manifiesta como una extrema lentitud para realizar movimientos voluntarios y rigidez que pueden o no estar acompañados de temblores. La más común es la enfermedad de Parkinson [5].

Desordenes de neuronas motoras: Degeneración en neuronas motoras corticales y/o espinales. Se manifiesta como debilidad asimétrica y pérdida de la función de las extremidades [6].

Desordenes atáxicos: La estructura afectada de manera predominante es el cerebelo y sus conexiones. Se manifiesta como desequilibrio y descoordinación en la marcha y las extremidades [7].

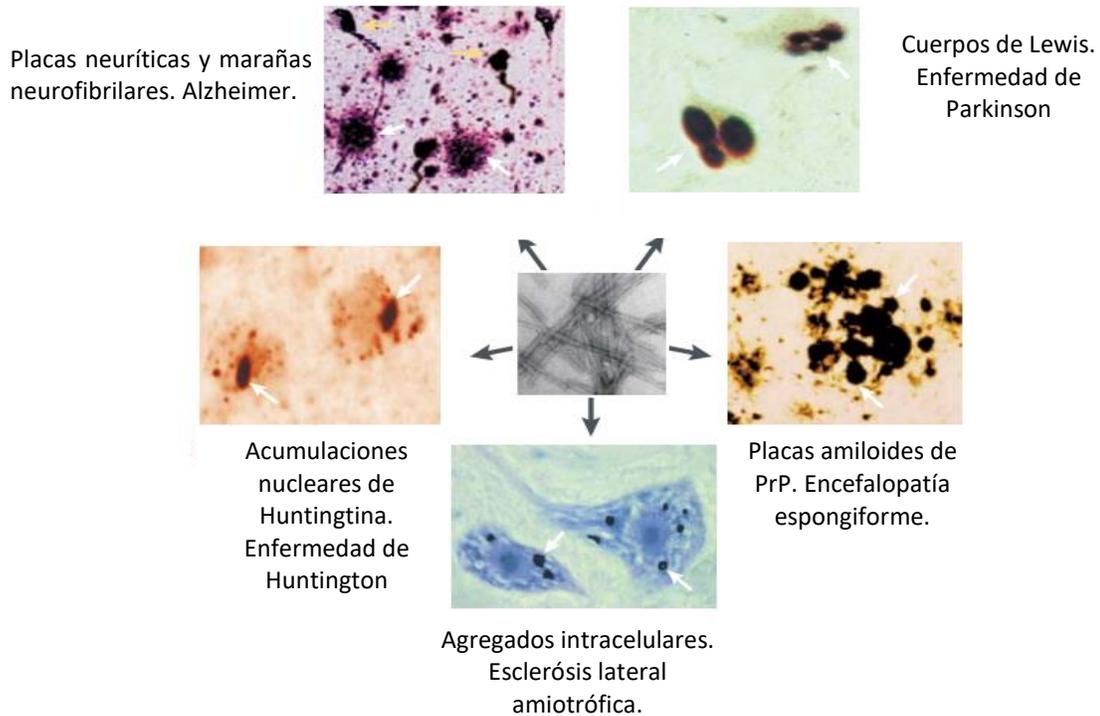


Figura 1 - Distintos desordenes neurodegenerativos que como característica cuentan con acumulaciones anormales de proteína, en algunos de ellos la acumulación es intracelular mientras que en otros es extracelular. En la enfermedad de Alzheimer (esquina superior izquierda) se observa acumulación intracelular (tau) y extracelular (amiloides β). (Modificado de Soto, C. 2003).

3.1.1 Demencia

Es un desorden neurocognitivo, que genera deterioro permanente de las funciones mentales superiores. Implica un deterioro en la memoria y algunas otras funciones que pueden ser el lenguaje, personalidad, emociones, cognición o la función viso-espacial. Este deterioro, es lo suficientemente severo como para afectar la vida cotidiana de los individuos que la padecen. La principal causa de esta afectación son las enfermedades neurodegenerativas, aunque también puede ser generada por otros factores que afectan el sistema nervioso central como pueden ser infecciones, tumores o inflamación [1].

De acuerdo a la World Health Organization (WHO, 2015) se distinguen 3 etapas de evolución de una demencia de acuerdo a los síntomas que se presentan:

Temprana: Generalmente se pasa por alto ya que el comienzo es gradual. Las alteraciones observadas son olvidar cosas, perder la noción del tiempo y perderse en lugares familiares.

Intermedia: En esta etapa los síntomas ya son notorios e imposibilitan la realización de ciertas actividades. Olvidarse de eventos recientes y nombres, perderse en su casa, dificultades para comunicarse, necesidad de ayuda para cuidado personal y cambios de comportamiento.

Avanzada: La dependencia del paciente es total y permanece inactivo la mayor parte del tiempo. Los signos físicos y síntomas se vuelven muy evidentes. Se pierde la noción del tiempo y espacio, dificultad para reconocer parientes y amigos, dificultad al caminar, requiere de asistencia para cualquier tipo de tareas y cambios de comportamiento.

3.2 Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA), es una enfermedad neurodegenerativa que altera prácticamente todas las funciones cognitivas y la memoria. Genera una pérdida neuronal y de la función principalmente en la corteza límbica y de asociación. Representa la principal causa de demencia siendo responsable de un 70 a 80% de los casos [1].

En la actualidad hay aproximadamente 900 millones de personas mayores de 60 años. Se estima que para el año 2015 existan 46.8 millones de personas viviendo con la enfermedad y que para 2050 esta cifra llegará a los 131.5 millones. El costo global de la enfermedad para 2015 es de 818 billones de dólares [8].

3.2.1 Características macroscópicas

A nivel macroscópico, el cerebro muestra atrofia en la allocorteza y áreas límbicas siendo especialmente susceptible al daño la corteza mesial temporal, que está constituida por la corteza entorrinal y el hipocampo. Se ha estimado que en pacientes con la enfermedad de Alzheimer, el hipocampo sufre una pérdida del 4 al 6% de su volumen

cada año. La pérdida de tejido en el cerebro de un paciente de Alzheimer provoca la dilatación de los ventrículos laterales [9]. Particularmente la dilatación del asta temporal de los ventrículos laterales pone en evidencia la gran atrofia del hipocampo que se encuentra adyacente a esta estructura (Figura 2). Mientras tanto se puede ver preservación de la corteza motora primaria y visual [10].

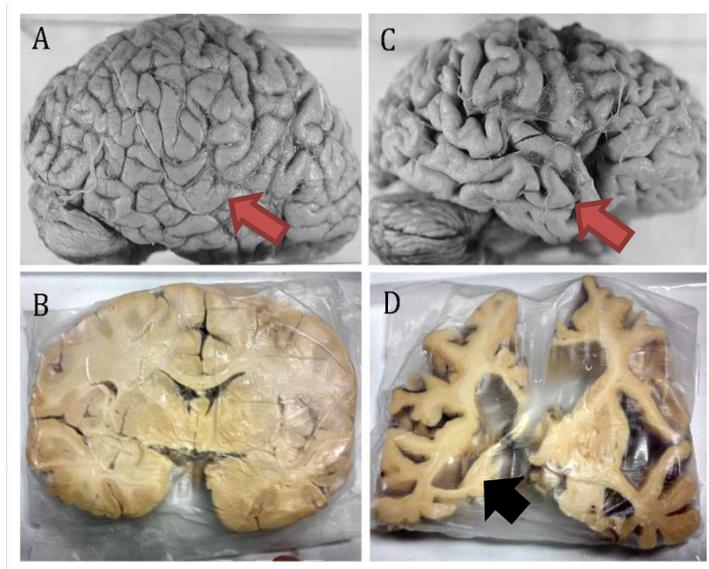


Figura 2 – En los recuadros A y B se observa el cerebro de un individuo sano mientras que en los recuadros C y D el de una persona con la patología de Alzheimer. En las flechas rojas se muestra el ensanchamiento de los surcos en el caso de C en comparación con A mientras que la flecha negra muestra la atrofia del hipocampo en el cerebro con la EA.

3.2.2 Lesiones microscópicas

-Placas de amiloide

Son depósitos formados por el péptido A β en un estado de agregación fibrilar y con configuración de hoja β plegada. Al estudiarse a detalle se pueden encontrar muchos tipos de placas pero se dividen principalmente en dos: Placas difusas y Placas neuríticas.

-Placas difusas

No presentan un núcleo central, sus límites no se encuentran bien definidos y son irregulares [11]. Se observa una menor proporción de neuritas distróficas aproximadamente sólo el 12% de las placas difusas se encuentran asociadas con neuritas

distróficas [12]. En ratones APP23 los cuales sobreexpresan la proteína APP con la mutación sueca; no se ha visto una respuesta significativa de la microglía, asociada a este tipo de placas. Sin embargo en tejido humano, es posible detectar microglía reactiva en este tipo de placas [13] [14]. Se ha observado en tejido de pacientes con la enfermedad de Alzheimer, que la cantidad de sinapsis en regiones con placas difusas, no tiene una diferencia significativa con regiones libres de amiloide [15]. Se tiñen muy levemente con rojo congo o tioflavina [11]. Este tipo de placas, pueden encontrarse en tejido de individuos de edad avanzada con función cognitiva normal [9]. Anteriormente, se pensaba que representaban un estadio temprano en la formación de las placas neuríticas, sin embargo se ha visto que su formación es independiente [16].

-Placas neuríticas (PN)

Presentan un “núcleo” o región central con mayor densidad de amiloide en conformación de hoja β plegada, el cual es altamente insoluble (Figura 3). Las neuritas cercanas a estas placas, se vuelven distróficas a los pocos días del surgimiento de la placa, sin embargo el desarreglo del citoesqueleto subyacente a este fenómeno es un proceso que avanza con el tiempo [16]. En la cercanía de la placa, la pérdida sináptica es significativa; en un estudio realizado en ratones transgénicos APPSI, se observó una pérdida sináptica bastante notoria en un radio de 50 μm alrededor de la placa [17]. La pérdida sináptica es una de las características de la enfermedad que tiene mayor correlación con el deterioro cognitivo [18].

Sin embargo en los últimos años, la toxicidad generada por el amiloide, se ha atribuido en mayor medida a las especies oligoméricas del péptido $A\beta_{1-42}$ las cuales se pueden encontrar dentro y en la periferia de dichas placas. Por otro lado, también se ha demostrado en un modelo murino que formas oligoméricas de $A\beta$, correlacionan mejor con la pérdida y disminución del tamaño de las sinapsis en la periferia de la placa y sus cercanías [19]. En tejido de pacientes con EA y adultos mayores con función cognitiva normal, se ha observado que el número y tamaño de las PN es hasta 25% a 30% mayor en el grupo de Alzheimer [20]. Son claramente detectables con rojo congo o tioflavina[9].

Estudios realizados en tejido humano, se ha visto que cúmulos de microglía HLA-DR (+) se encuentran principalmente asociado a PN y casi ausentes por completo en placas difusas. Estos cúmulos correlacionan regionalmente con las áreas con mayor daño observado [21].

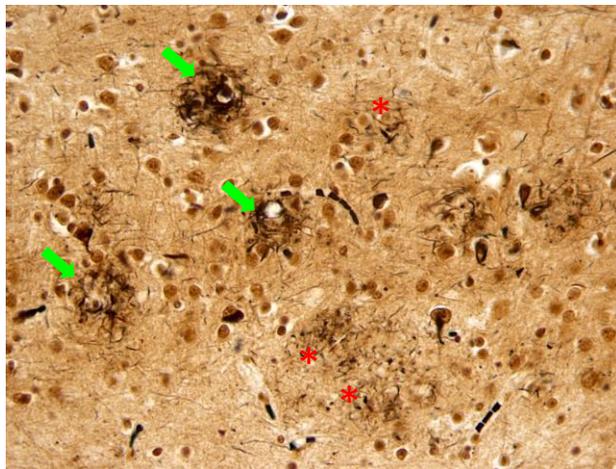


Figura 3 – Placas de amiloide difusas (40x) (asteriscos en rojo) y Placas neurítica (PN) (flechas verdes) en tejido cerebral de un individuo con EA, evidenciadas con impregnación argéntica (Bielchowski).

-Marañas neurofibrilares

Esta lesión está formada por la proteína tau en un estado hiperfosforilado, como ha sido evidenciado mediante ensayos de inmunohistoquímica e inmunoblot, en tejido de pacientes con la enfermedad de Alzheimer [22].

Se ha observado que algunos de los aminoácidos fosforilados son específicos para distintas taupatías y por lo tanto representan una característica diagnóstica [23]. Entre las modificaciones post-traduccionales de tau presentes en distintas patologías, se encuentra la truncación y la hiperfosforilación la cual conduce a su deslocalización en el soma y dendritas [24]. La agregación de esta proteína se ve facilitada por moléculas polianiónicas, fosforilación y truncación por proteasas [25]. En diversas taupatías la proteína tau se encuentra agregada en forma de filamentos helicoidales apareados, cada filamento tiene un ancho de 10 a 22 nm con un diámetro aproximado de 10nm[26] los cuales se localizan en el interior de las neuronas [27] y pueden ser detectadas mediante la tinción con rojo congo o tioflavina debido a la afinidad de estas moléculas por estructuras polipeptídicas con conformación de hoja β plegada [28]. Este tipo de lesiones, presentan una mejor

correlación con la severidad y progresión de la demencia observada en la EA que las PN (Figura 4) [29].

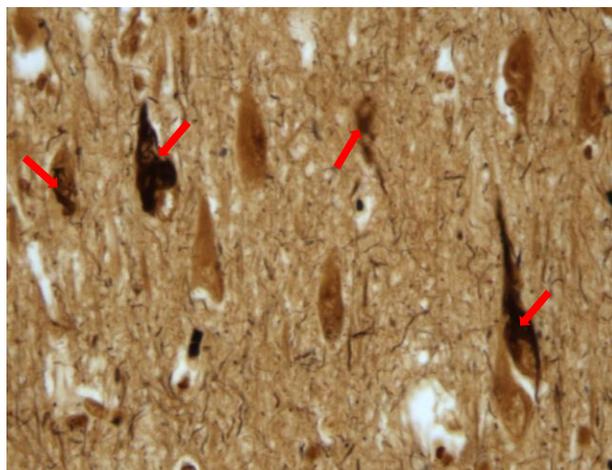


Figura 4 – Micrografía mostrando marañas neurofibrilares (MNF) intracelulares evidenciadas por impregnación argéntica (Bielchowski). Las flechas muestran la formación de agregados fibrilares de la proteína Tau.

La proteína de unión a microtúbulos tau es intracelular y se encuentra tanto en los axones de neuronas maduras participando en el transporte a lo largo del axón y organización de microtúbulos. La proteína tau está formada principalmente por aminoácidos de tipo polar lo cual le confiere una conformación de hélice al azar [30], debido a esto y a la presencia de pocos aminoácidos hidrofóbicos esta proteína es altamente soluble. Tau se divide principalmente en dos dominios, el de unión a microtúbulos y el de proyección; en el primero tiene de 3 a 4 regiones de repetidos (dependiendo de la isoforma de la que se trate), que le confieren la capacidad de unión a tubulina y entre la que se encuentran dos hexapéptidos que se ven involucrados en su agregación [24, 30, 31]. Estos hexapéptidos denominados PHF6 y PHF6* han demostrado tener la capacidad de formar hojas β y por lo tanto son propensos a formar fibras [32]. En la región de unión a microtúbulos, la proteína tiene varios sitios de fosforilación y mediante este mecanismo se regula su afinidad de unión a los microtúbulos.

Al disociarse tau de los microtúbulos se pierde la estabilidad del citoesqueleto y se ve disminuido el transporte de vesículas y organelos a través de los microtúbulos lo que puede resultar en daño neuronal [33]. Tau ha demostrado ser mediador de mecanismos

de toxicidad de A β . Esto fue demostrado al cultivar neuronas hipocampales obtenidas a partir de ratones knockout (que carecen de la expresión de tau), ratones transgénicos que sobre-expresan la proteína tau humana y ratones silvestres. Los diferentes cultivos fueron expuestos a la presencia de A β fibrilar y el análisis morfológico demostró que las neuronas obtenidas de ratones que sobre-expresan la proteína tau humana, degeneraron en presencia de A β , de forma similar a las neuronas que expresan la proteína tau endógena (ratones silvestres). Por el contrario, las neuronas obtenidas de los ratones knockout, no mostraron signos de degeneración en presencia del péptido A β [34]. Un intermediario de los efectos tóxicos generados por Tau es Fyn, un receptor con función de tirosín cinasa activado por Tau que fosforila la subunidad 2 del receptor NMDA lo que aumenta su actividad resultando en daño excitotóxico para la neurona [35].

3.3 Hipocampo

Es una estructura cerebral ubicada en el lóbulo temporal mesial, está formado por una serie de subregiones vinculadas entre sí, que interactúan para llevar a cabo las funciones correspondientes a esta estructura [36].

El primer indicio de su función, se observó en un paciente con resección bilateral del lóbulo temporal mesial, donde pudo observarse una pérdida de la memoria a corto plazo, por lo que se comenzó a estudiar en un grupo mayor de pacientes con procedimientos similares. Se observó que esta pérdida de memoria era más severa en aquellos pacientes en los que se había resecado gran parte del hipocampo [37]. Este hallazgo ha sido confirmado por otros estudios de correlación entre volumen hipocampal por MRI y test de memoria [38].

En roedores, el hipocampo se encuentra involucrado en la memoria de tipo espacial [39]. Así mismo el hipocampo interactúa con la región parahipocampal y la corteza cerebral para la formación de memorias funcionando como una estructura involucrada en el procesamiento de la memoria inmediata hacia memorias permanente [40].

Los correlatos a nivel molecular del aprendizaje y memoria son la potenciación y depresión a largo plazo. Estos mecanismos se definen como cambios en la eficacia sináptica y se encuentran presentes de manera importante en el hipocampo. En la potenciación a largo plazo, la eficacia de las sinápsis excitatorias se ve incrementada, por lo que la activación de los receptores NMDA es indispensable para que se lleve a cabo este proceso [41]. El Ca^{2+} genera a través de la calmodulina, la activación de la proteína CAMKII, la cual a su vez genera un aumento en la densidad de receptores tipo AMPA en la sinápsis [42]. Contrario a esto la depresión a largo plazo es un proceso que culmina con la eliminación de las sinápsis excitatorias, algunos de los procesos involucrados en este mecanismo son la expresión de caspasa 3 y la internalización de receptores AMPA. Este proceso, también es dependiente de los receptores NMDA y se ha observado que puede incrementarse en presencia del péptido $\text{A}\beta$ [43]. El principal circuito descrito en el hipocampo, se denomina circuito trisináptico que comienza en la corteza entorrinal la cual hace sinápsis con las neuronas granulares del giro dentado mediante la vía perforante, esta a su vez contactan las neuronas piramidales del CA3 mediante las fibras musgosas y por último las colaterales axónicas de CA3 realizan sinápsis con las neuronas piramidales de CA1 (figura 5).

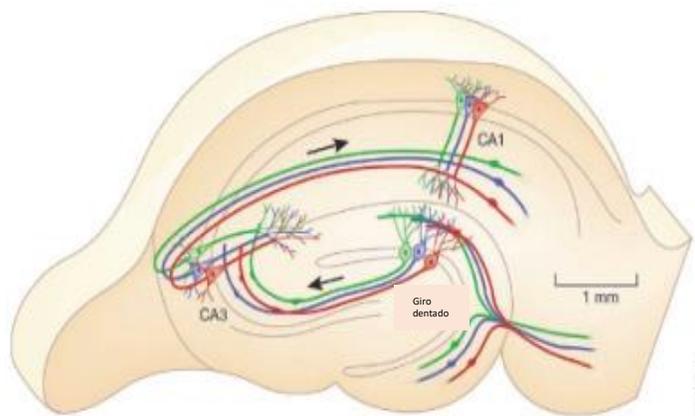


Figura 5 - Hipocampo. Se muestran las principales conexiones dentro del circuito trisináptico. Corteza entorrinal – Giro dentado (vía perforante, Giro dentado – CA3 (fibras musgosas), CA3-CA1 (colaterales de Schaffer). (Tomado de Moser E. 2011).

La mayor cantidad de aferencias que recibe el hipocampo provienen de la corteza entorrinal a través de la vía perforante, que en ratas se compone de 2 subregiones, la región medial que recibe aferencias de regiones relacionadas con el procesamiento espacial y la región lateral cuyas aferencias provienen de regiones involucradas con el reconocimiento de objetos [44]. Los axones de ambas regiones, tienen sinapsis con las células del estrato granular del giro dentado y CA3, el neurotransmisor liberado por las neuronas de la corteza entorrinal es el glutamato [45], aunque se ha reportado también la presencia de interneuronas GABAérgicas en esta vía [46]. Otra referencia de la vía perforante que se ha observado es directamente hacia la región CA1 [47]. Los axones de las células granulares del giro dentado a su vez, establecen contactos sinápticos con las neuronas piramidales de CA3, a estos axones se les denomina fibras musgosas que son principalmente excitatorias y liberan el neurotransmisor glutamato. Las colaterales de estos axones llegan a la región del hilus [48]. Los axones eferentes de estas neuronas van hacia la fimbria hipocampal pero tienen ramas colaterales que se desvían y establecen sinapsis con las neuronas piramidales de CA1, y se denominan colaterales de Schaffer. Estas son las principales aferencias de la región CA1 y el neurotransmisor que liberan es el glutamato [49].

Por último, los axones de estas células viajan en el alveus hasta juntarse con los de la fimbria hipocampal y dejar finalmente el hipocampo [50]. Se dice por lo tanto que el hipocampo fisiológicamente se encuentra organizado en lamelas ya que una activación localizada en la vía perforante activará una región o parte del hipocampo formada por los 4 circuitos excitadores que se mencionan es decir: vía perforante, fibras musgosas, colaterales de Schaffer y fibras del Alveus [50]. De manera que un determinado grupo celular, de cualquiera de estas regiones (corteza entorrinal, giro dentado, CA3 y CA1), activará un segmento específico de la región con la que establece contacto sináptico [51].

La región conocida como Cuerno de Amón formado por las subregiones CA1, CA3 y CA4 se compone de 6 estratos, el más externo denominado stratum oriens está formado por dendritas de las neuronas piramidales así como interneuronas en canasta. El estrato piramidal contiene los cuerpos celulares de las neuronas piramidales, tiene un grosor que

va de los 40 a 100 μm dependiendo de la subregión que se observe, el stratum lucidum formado por las fibras musgosas que van desde el giro dentado hacia la subregión CA3, el stratum radiatum que contiene fibras comisurales así como las colaterales de Schaffer y tiene un grosor que va de los 75 a 200 μm y dos estratos que por su tamaño se agrupan en el stratum lacunosum-moleculare el cual contiene colaterales de Schaffer así como sinápsis de la vía perforante con dendritas distales de las neuronas piramidales [52].

El giro dentado se encuentra formado por 3 estratos, el más externo denominado molecular donde se encuentran las dendritas de las neuronas granulares junto con algunas interneuronas. El estrato granular está formado por neuronas granulares su grosor va de 4 a 8 células siendo aproximadamente de 60 μm y finalmente el estrato polimórfico formado principalmente por las células musgosas e interneuronas [53]. Muchas de las neuronas granulares del giro dentado se generan posterior al nacimiento y a lo largo de la vida y constituye uno de los pocos nichos neurogénicos en el organismo adulto; las demás estructuras del hipocampo se forman entre los días 15 y 19 de la gestación en rata [54, 55].

El nicho neurogénico está formado por los precursores neurales, células de la glía, células endoteliales, matriz extracelular y células del sistema inmune. Los cuerpos celulares de los precursores neurales, se encuentra en la zona subgranular la cual se ubica entre la capa granular del giro dentado y el hilus y sus prolongaciones se extienden hasta el estrato molecular [56]. La neurogénesis se puede evidenciar mediante el uso de un marcador como doblecortina (DCX), una fosfoproteína asociada a microtúbulos que se expresa en las neuronas recién diferenciadas [57].

Las neuronas granulares del giro dentado son de morfología elíptica y tienen aproximadamente 18 μm de altura por 10 μm de ancho. Estas neuronas son las responsables de las eferencias excitatorias del giro dentado mientras que otras neuronas denominadas piramidales en canasta son interneuronas y su función es inhibitoria [53].

3.4 Péptido A β

Este péptido se forma durante el procesamiento de la proteína precursora del amiloide (PPA β) (Figura 6). PPA β es una proteína transmembranal por lo que su procesamiento se lleva a cabo en la membrana plasmática y/o compartimentos membranosos mediante dos vías. [58, 59].

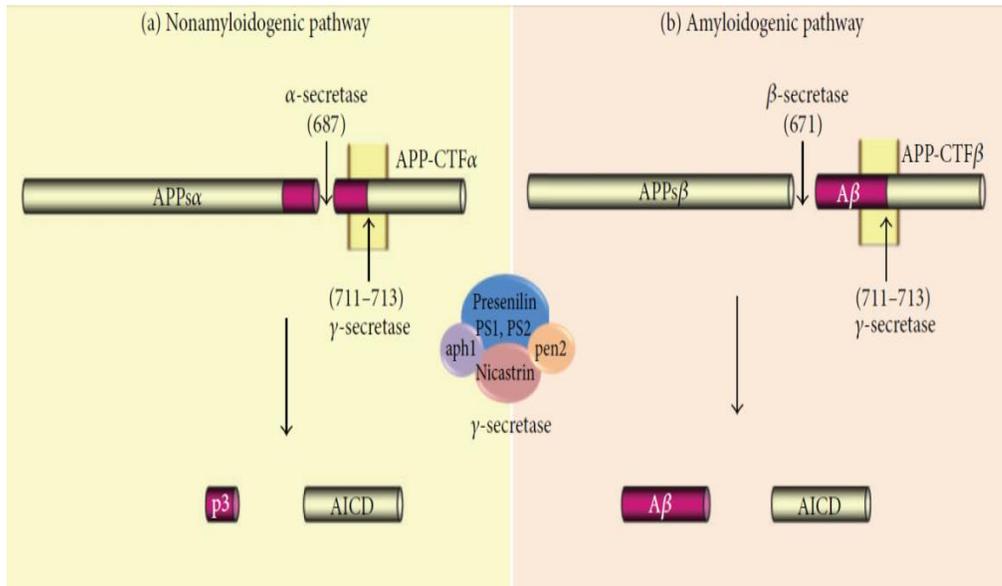


Figura 6 - Procesamiento de la PPA β por las vías amiloidogénica **(a)** y no amiloidogénica **(b)**. En **(a)** la secuencia correspondiente al péptido A β se escinde por la mitad por la α -secretasa por lo que no se origina el péptido A β . En el caso de **(b)** la β -secretasa corta al inicio de la secuencia de A β dando lugar a su generación, por la posterior acción de γ -secretasa. (Tomada de Campos-Peña V. et al 2014).

a) Vía no amiloidogénica

Inicialmente PPA β debe ser escindido por las α secretasa, la cual está constituida por miembros de la familia de proteasas ADAM (9,10 y 17) y genera los fragmentos sAPP y CTF83 y en la cual, no se genera A β [60, 61]. El procesamiento por esta vía es el que ocurre de manera más frecuente en condiciones fisiológicas [62].

b) Vía amiloidogénica

Otra vía de procesamiento denominada amiloidogénica, ocurre cuando el primer corte es realizado por la β secretasa (BACE1), una aspartil proteasa localizada en

compartimentos de la vía secretoria como endosomas o aparato de Golgi así como en la membrana plasmática. [63, 64]. Esto es congruente con un estudio realizado en cultivo celular en el que se determinó que gran parte del A β generado se produce en endosomas [65]. En el caso del procesamiento por BACE1 en la membrana plasmática se ha visto que este ocurre preferentemente dentro de balsas lipídicas [66]. Altos niveles de colesterol en la membrana plasmática [66] y niveles altos de glucocorticoides como los generados durante periodos de estrés [67], favorecen el procesamiento por esta vía.

La estructura del péptido A β , se ha dilucidado mediante estudios de resonancia magnética nuclear y se ha observado que está formado por dos alfa hélices conectadas por un pliegue (Figura 7) [68].

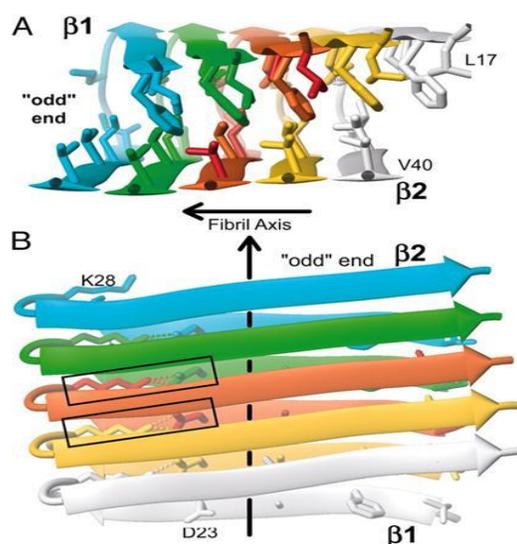


Figura 7 – Se observan los fragmentos del péptido A β del aminoácido 17 al 42 interactuando para la formación de estructuras beta y su agregación para la formación de fibras. Mediante este proceso de agregación, las especies de amiloide se vuelven tóxicas (Tomado de Thorsten Lührs et al 2005).

Su longitud va desde los 36 a los 43 aminoácidos sin embargo las formas más abundantes son de 40 y 42 aminoácidos [69]. Los residuos 1 al 28 del extremo NH₂ terminal, forman un dominio con características hidrofílicas y muchos de ellos tienen carga; mientras que el dominio COOH terminal, formado por los residuos de aminoácido del 28 al 40/42 es hidrofóbico. A pH ácidos (1-4) y básicos (7-12) el péptido tiene una

estructura secundaria de alfa hélice mientras que a pH intermedios (4-7) forma estructuras de hoja beta [70]. Otra región hidrofóbica que se ha encontrado en el péptido va de los aminoácidos 16 a 20 y también se ha visto implicada en su agregación ya que esta disminuye al sustituir estos por aminoácidos hidrofílicos [71].

El péptido A β en su estado monomérico ha demostrado tener un papel trófico y protector en células neuronales. Induce la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 y activa la vía de PI3K que participa en la supervivencia neuronal [72]. Monómeros de A β 1-40 han demostrado también tener un papel neuroprotector y antioxidante en daño causado por especies reactivas de oxígeno generadas por metales [73].

3.4.1 Agregación

La capacidad de agregación de una cadena polipeptídica depende en gran medida de las características fisicoquímicas de la molécula: cargas, hidrofobicidad, presencia de aminoácidos polares y apolares en la cadena y estabilidad de ésta en su estado nativo. También se encuentran involucradas características extrínsecas a la cadena polipeptídica como pueden ser el pH, la temperatura, presencia de iones, concentración proteica y presión del ambiente [74].

Se ha visto que la región implicada en la formación de hojas beta es el dominio COOH terminal, ya que por su naturaleza hidrofóbica, es propenso a formar estructura secundaria tipo hoja beta plegada (Figura 8) [70, 75]. Esta transición es fundamental durante el proceso de agregación [76]. La transición de alfa hélice a hoja beta es reversible bajo ciertas condiciones de laboratorio (en una mezcla de agua y hexafluoroisopropanol) pero no se ha reportado que ocurra en condiciones fisiológicas [77].

Algunas moléculas facilitan el proceso de agregación de amiloide. El gangliósido (GM1) al ser incubado junto con A β , genera un incremento en la formación de fibras y se ha detectado en tejido de individuos durante etapas tempranas de la EA [78]. Por lo tanto se ha propuesto que las balsas lipídicas, las cuales son ricas en GM1 como sitios importantes para la agregación de A β . También se cree que el colesterol puede estar involucrado en este proceso, ya que balsas lipídicas depletadas de GM1 aún conservan

aunque en menor grado, la capacidad de aumentar la agregación de A β [79]. También algunos metales pueden aumentar la capacidad de agregación del péptido como es el caso del Zn²⁺ [80] También su agregación se incrementa en presencia de Ni²⁺ y Cu²⁺ en pH de 6.6 a 7.4 [81]. Sustituciones de un solo aminoácido en la secuencia del péptido A β 40 por aminoácidos hidrofóbicos han demostrado también aumentar su capacidad de agregación [82]. In vitro, el uso de detergentes que simulan el entorno de la membrana plasmática también han demostrado ser efectivos propiciando la agregación de los péptidos A β 1-40 y A β 1-42 [83].

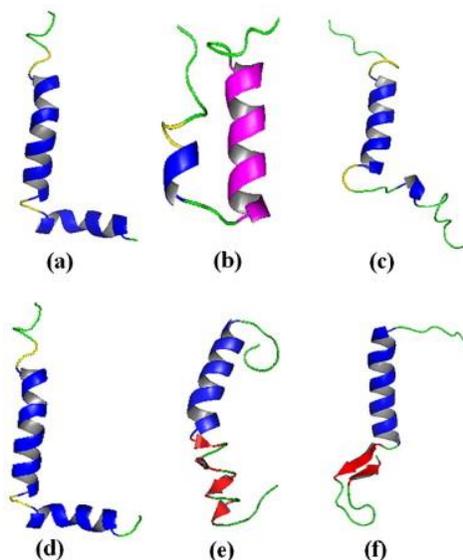


Figura 8 – Estructuras de los péptidos A β 1-40 (superiores) y A β 1-42 (inferiores) en su conformación inicial (a y d), en agua (b y e) y metanol (c y f). La diferencia entre ambos péptidos son dos residuos a.a. extras en A β 1-42 (Ile y Ala) los cuales le confieren mayor capacidad de agregación. Se observa en las conformaciones en metanol y agua que este péptido es capaz de formar estructuras beta mientras que el de 40 aminoácidos no es capaz de formarlas en estas condiciones. (Tomado de Cao Yang et al 2009).

Análisis de los componentes de placas neuríticas han demostrado que estas se encuentran predominantemente formadas por agregados del péptido A β 1-42 mientras que en el caso de los depósitos vasculares correspondientes a angiopatía amiloide cerebral el péptido de 40 residuos es el que predomina [84]. En las placas difusas esta diferencia es más marcada siendo casi exclusivamente formadas por el péptido de 40 residuos mientras que las placas maduras este llega a formar hasta un tercio de su totalidad, lo que sugiere que el fragmento depositado inicialmente debe ser A β 1-42 [85].

En ensayos bioquímicos, se ha observado que el fragmento A β 1-42 es necesario para el proceso de nucleación y es más propenso a la agregación que el fragmento de 40 residuos [86]. Esta característica, se atribuye a los dos aminoácidos hidrofóbicos que tiene respecto al fragmento A β 1 - 40 y también se ha observado que la formación de fibras es acelerada mientras la concentración del péptido es mayor siendo la tasa de agregación más alta a concentraciones de 1 a 3 mg/kg [87].

Al comienzo del proceso de fibrillogénesis debe formarse un núcleo o semilla, un proceso conocido como nucleación. Al periodo inicial, se le conoce como fase de retardo y en ella no se detectarán estructuras beta, mientras que en la fase de elongación se comenzarán a detectar fibras en crecimiento [88]. No todos los oligómeros darán lugar a la formación de fibras, algunos de ellos permanecerán en estado oligomérico [89]. A los oligómeros a partir de los cuales se elongará una fibra se les denomina oligómeros críticos, durante la primera fase del proceso de fibrillogénesis, los monómeros se agregarán hasta formar una población de oligómeros críticos, que posteriormente se agregarán para formar una protofibrilla [90]. A este mecanismo de fibrillogénesis a partir de monómeros, se le denomina agregación primaria. Una segunda vía por la cual se forman agregados denominada vía secundaria, puede ocurrir de dos maneras; en la primera se fragmentan fibras preexistentes que se elongan de nuevo aumentando el número de fibras y la segunda en la que las fibras preexistentes catalizan la nucleación de monómeros disponibles en el medio [91].

3.4.2 Toxicidad

El péptido A β , ha demostrado ejercer toxicidad neuronal mediante mecanismos muy diversos en un gran número de estudios. Por ello una de las hipótesis más aceptadas para la generación de la patología de Alzheimer es la hipótesis de la cascada de amiloide, la cual postula que la formación de depósitos del péptido A β , es el evento que desencadena todas las características fisiopatológicas observadas en esta enfermedad [92]. En la actualidad, hay algunos estudios que cuestionan el papel de esta molécula y

proponen otras alternativas [93]. Debido a la amplia evidencia respecto a su toxicidad e impacto negativo en la fisiología neuronal, es una molécula altamente estudiada.

La toxicidad de A β , varía dependiendo de su estado de agregación [94]. En el cerebro de un individuo con EA, el péptido A β se encuentran presente en distintos estados de agregación, por lo que resulta difícil saber el efecto provocado por cada uno de estos péptidos [95].

Los primeros estudios sobre la toxicidad de amiloide, se hicieron con amiloide fibrilar (el estado más avanzado de agregación de A β) y que son el principal constituyente de las placas neuríticas [10]. Al estudiar estas placas neuríticas en rebanadas de tejido, se observó que su presencia estaba acompañada por una disminución en el número de sinapsis y una reducción del tamaño de las espinas dendríticas. De igual manera, los axones que se encontraban dentro de los límites de la placa presentaban varicosidades [96]. En un cultivo de neuronas hipocampales, tratadas por 10 días con A β fibrilar, se observaron neuritas distróficas, aunque la muerte neuronal no fue tan evidente (20%+-7%) [97].

Sin embargo, se ha demostrado que las placas neuríticas están rodeadas por especies oligoméricas por lo que en los estudios sobre toxicidad de fibras de amiloide en PN, no se puede asegurar que la toxicidad observada sea exclusivamente por la acción del amiloide fibrilar [19]

Los oligómeros son teóricamente más propicios para generar daño, en especial en las sinapsis ya que por su tamaño, es probable que interaccionen con moléculas presentes en la hendidura sináptica. En este sentido, se ha observado la colocalización de amiloide oligomérico con PSD95, un marcador de membrana postsináptica [19]. La incubación de rebanadas de hipocampo de rata, con oligómeros de A β por 5 días, genera una reducción en la densidad de espinas dendríticas, en las neuronas piramidales del hipocampo.

Cada una de estas estructuras se asocia generalmente con un solo tipo de sinápsis en este caso glutamatérgica, por lo cual al perderse se tiene una reducción en la potenciación a largo plazo (LTP) [98]. Este proceso ha sido medido en rebanadas de tejido cerebral y se ha observado que en este modelo especies de amiloide también son capaces

de inhibir la potenciación a largo plazo sin afectar el proceso de depresión a largo plazo en giro dentado [99].

También el cultivo de neuronas hipocampales en presencia de especies oligoméricas de A β a una concentración 5 μ M, induce la retracción de procesos neuronales y la presencia de cuerpos apoptóticos así como la condensación nuclear e hinchazón de los somas neuronales; tan sólo a las tres horas de tratamiento. A las 24 horas existe una marcada muerte neuronal (73%), un daño más rápido que el inducido por amiloide en estado fibrilar. Se ha reportado que este efecto puede ser dependiente de Ca²⁺ [97]. En cultivos en rebanada de hipocampo de ratón, las especies difusibles derivadas de amiloide mostraron tener un efecto neurotóxico, provocando muerte de las neuronas piramidales en las regiones CA3 y CA4 así como las neuronas granulares del giro dentado. También se mide la potenciación a largo plazo en la vía perforante y se ve abatida. También se ha reportado una disfunción mitocondrial, ya que se observan anomalías a nivel de la cadena respiratoria en pacientes con EA, lo que lleva a la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno tóxicas para las neuronas. Al agregar A β 1-40 se observa un incremento en la producción de la actividad de caspasa 3 y un aumento en la liberación de citocromo C de la mitocondria [100].

3.4.3 Modelos de inyección intracerebral

La inyección intracerebral de A β es considerado como un modelo de neurotoxicidad y neuroinflamación adecuado para observar parte de la patología de la EA [101].

La inyección 1 o 2 nmoles del péptido A β 1-42. en la región CA1 produjo una pérdida neuronal marcada en relación al control de PBS a los 7 días (Figura 9)[102]. En otro estudio en el que se administran distintos análogos de A β 25-35 en hipocampo dorsal se vio pérdida neuronal en el estrato piramidal [40]. Otro grupo reportó que la administración de 3 nmoles de amiloide en la misma región genera una disminución en la densidad neuronal [103]. En el caso de la inyección de A β intraventricular se observó incremento de las

citocinas proinflamatorias IL-1 β , IFN γ y TNF α en homogenados de hipocampo, lo cual puede ser revertido co-inyectando con IL-4 [104].

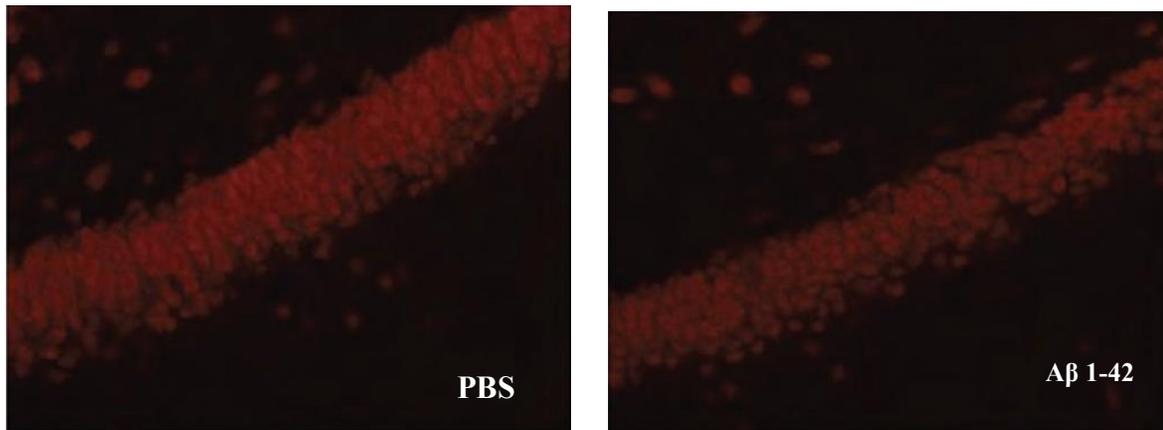


Figura 9 – Micrografías 40x con inmunotinción para NeuN, se observa el giro dentado en una rata administrada con PBS y otra con A β 1-42 en la región CA1 a los 7 días postoperatorios. Se reporta una disminución en la densidad neuronal en el grupo tratado con amiloide. (McLarnon J. 2014)

Otro grupo reportó que 1 μ M de A β 1-40 intraventricularmente genera una disminución en el desempeño en laberintos acuáticos a los 0, 3 y 6 días postoperatorios [101]. Similarmente, otro experimento se llevó a cabo en el cual A β 1-42 se inyectó en la región CA3 del hipocampo y se realizaron pruebas conductuales. Se observó diferencia en la habilidad cognitiva entre el grupo control y el grupo administrado con amiloide hasta los 50 días posteriores a la cirugía [105].

3.5 Astrocitos

Son células de la glia que desarrollan diversas funciones, tanto en el sistema nervioso sano como en condiciones patológicas y constituyen aproximadamente un tercio de la masa cerebral [106]. Morfológicamente se dividen en protoplásmicos y fibrosos; los primeros se localizan en la sustancia gris y tienen ramificaciones gruesas que a su vez se ramifican en otras más delgadas; los segundos, se ubican en la sustancia blanca y presentan ramificaciones largas similares a fibras [107].

Los astrocitos se encuentran involucrados en el mantenimiento de la homeostásis y permiten el correcto funcionamiento de las neuronas [108]. La identificación de astrocitos generalmente se hace mediante el marcaje de GFAP, una proteína de

filamentos intermedios presente predominante en este tipo celular. Los astrocitos saludables lo expresan en niveles bajos y sus niveles aumentan al volverse reactivos [107]. La astrogliosis se produce como respuesta de los astrocitos a daño, patógenos o anomalías en el sistema nervioso central y entre sus principales características se encuentran el aumento en los niveles de GFAP en soma y prolongaciones, engrosamiento de las prolongaciones, cambio en su perfil de expresión génica y en casos severos existe proliferación de los astrocitos y formación de una cicatriz. [109, 110] La presencia de astrogliosis es una característica presente en diversas patologías del CNS.

Funcionalmente, los astrocitos presentan dos dominios, uno que interactúa con las sinapsis y otro con los vasos sanguíneos. El dominio que interacciona con las neuronas cuenta con gran cantidad de transportadores, receptores y canales iónicos que le permiten el mantenimiento del microambiente, para el correcto funcionamiento neuronal; ya sea mediante la regulación del pH, osmolaridad, concentración de K^+ extracelular y recaptura de neurotransmisores, principalmente de glutamato [111, 112]; así como la capacidad de proveer las neuronas de lactato durante periodos de hipoglucemia [112]. Finalmente, el dominio que interactúa con el endotelio se encarga del mantenimiento de la barrera hematoencefálica [106].

Las prolongaciones de los astrocitos, se elongan apuntando hacia el área de la lesión, proceso al que se denomina polarización y existe proliferación de los astrocitos en el área cercana al sitio de lesión. A medida que la lesión es de mayor magnitud, se tendrá un área de alcance mayor y habrá proliferación de astrocitos (Figura 10) [113].

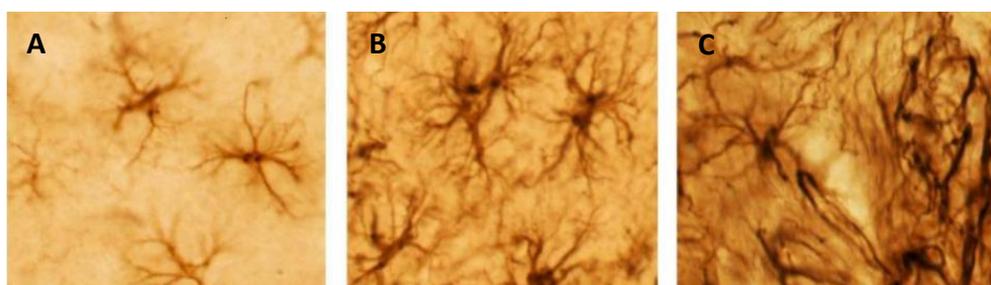


Figura 10– Micrografías mostrando los distintos estadios de los astrocitos mediante inmunohistoquímica para GFAP, en condiciones normales se encuentran en estado quiescente (A); cuando existe una lesión o daño en el tejido se vuelven reactivos lo cual se observa como un engrosamiento de sus procesos, de acuerdo a la gravedad del insulto la gliosis puede ser moderada (B) o severa(C). (Tomada de Sofroniew, M. 2009).

Existen diversos estudios para medir la respuesta de los astrocitos ante un daño en el SNC. En algunos modelos de daño mecánico, se introduce una aguja en determinada región del cerebro mediante cirugía estereotáxica. Se ha observado, que durante las primeras horas del daño, se acumulan astrocitos alrededor de la lesión aunque no existe un aumento en la expresión total de GFAP en el tejido, medido por inmunoblot. A las 24 horas postoperatorias, se observa un incremento en la expresión total de GFAP, alcanzando su máximo nivel a los 7 días postoperatorios [114]. Este tipo de lesiones en la corteza, reclutan a los astrocitos en la lesión y áreas cercanas durante las primeras horas. Posteriormente, esta respuesta se extiende hasta abarcar por completo la corteza ipsilateral y más adelante los astrocitos vuelven a niveles normales [115]. También en este tipo de lesiones se ha detectado edema tisular, células picnóticas y eritrocitos en la zona de la lesión.

Entre las moléculas que se ha visto inducen la activación de astrocitos, se encuentra la interleucina 6 [116]. Así mismo en estado basal los astrocitos expresan los TLR 1, 2, 3 y 4. Al estar en contacto con citocinas inflamatorias, TLR3 incrementa su expresión hasta en 360 veces de sus niveles basales. Mediadores liberados en respuesta a la activación de este TLR, se sabe están involucrados en la supervivencia neuronal así como en la inhibición de la proliferación de astrocitos [117]. También se ha observado que en presencia, los astrocitos producen quimiocinas como MCP-1, RANTES, MIP-1a, MIP-1b, MIP-2 y CINC las cuales, atraen células de la microglía. De igual manera, la presencia de A β 1-42 induce un incremento en las citocinas proinflamatorias como TNF- α e IL-1 β [118]. En caso de que una lesión genere un daño irreversible en el tejido, la astrogliosis será persistente; de manera contraria, cuando el daño es menor y reversible, los astrocitos regresan a sus niveles basales en un periodo de 2 a 5 semanas [119]. Se ha observado en un modelo de daño mecánico en la corteza cerebral de rata, que la astrogliosis se aumenta de manera dramática cuando se inyectan 2 μ l de una solución de citocinas

proinflamatorias en el área de la lesión [120]. Por el contrario en el mismo modelo se muestra que la aplicación de IL-10 (una citocina antiinflamatoria), disminuye de manera significativa la astrogliosis en el área de la lesión [121].

Existe una controversia respecto a si la astrogliosis es un proceso que favorece la recuperación y protección del tejido o aumenta el daño. Los astrocitos reactivos, tienen la capacidad de proteger a las neuronas del estrés oxidativo generado, por la presencia de óxido nítrico en cultivos celulares mediante la producción de glutatión [122]. Actualmente, no se sabe con certeza si los astrocitos observados durante la astrogliosis, migran de otras regiones o provienen de la proliferación de astrocitos, que se encuentran en el área lesionada. En un estudio en ratones con una lesión mecánica en la corteza cerebral, se observó, que los astrocitos quiescentes, tienen la capacidad de proliferar y generar astrocitos reactivos e incluso, se demostró en un ensayo *in vitro*, que estos astrocitos reactivos y generados posterior a la lesión, presentan algunas características propias de células madre; como la capacidad de formar neuroesferas y la capacidad de autoregenerarse [123].

Durante su activación, se liberan una serie de moléculas proinflamatorias e inmunosupresoras, que deben estar en balance para llevar a cabo una reacción efectiva, que permita eliminar o contener el daño que se genera en el sistema nervioso; pero, lo suficientemente controlada para no generar por si misma daño al tejido. Entre las acciones generadas por mediadores proinflamatorios, se encuentra el aumento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, activación de microglía, reclutamiento de células inmunes de la periferia y proliferación y supervivencia de astrocitos. Al mismo tiempo, también se liberan mediadores que promueven la inmunosupresión, neuroprotección, migración de progenitores neurales y neurogénesis [124].

Hay estudios en un modelo de daño contusivo en la médula espinal, en los que se observa, una disminución en la astrogliosis al bloquear IL-6, se disminuye la inflamación y aumenta la recuperación funcional de la lesión [116].

3.5.1 Astrocitos y A β

En relación con A β se ha observado en estudios *in vitro*, que los astrocitos son capaces de fagocitar y degradar de manera eficiente el A β [125].

La administración de 2nmoles del péptido A β 1-42 en la región CA1 sacrificando al animal 7 días posteriores a la cirugía se observa un incremento en la intensidad de la señal de GFAP casi duplicando la señal del grupo control administrado con PBS [102]. También en un modelo de inyección de amiloide 40-1 en nucleus basalis se observa que los astrocitos (GFAP) se concentran alrededor de la lesión y muestran hipertrofia en comparación con astrocitos de áreas lejanas a la lesión [126]. En un modelo en el que se inyecta A β 25-35 solo o en conjunto con TNF- α se observó aumento en la marca de GFAP así como hipertrofia de astrocitos siendo más notorio en el grupo con TNF- α [127]. En otro estudio en el que se inyecta A β en la región CA3, al obtener el tejido 90 días postoperatorios aún se observa astrogliosis alrededor de los depósitos de amiloide [105].

3.6 Microglía

Son células del linaje mielóide de origen mesodérmico que migran al sistema nervioso central con una morfología ameboide durante el desarrollo y posteriormente se ramifican [128]. Forman aproximadamente el 12% del total de células del cerebro; sin embargo hay regiones que tienen mayor concentración de este tipo celular, entre ellas se encuentra el hipocampo [129]. Durante el desarrollo tienen un papel importante en el moldeamiento del sistema nervioso y el establecimiento de circuitos neurales eliminando las sinápsis aberrantes [130]. Funcionan como las células inmunes residentes del sistema nervioso central y como tales responden a patógenos y daño [131]. En estado de reposo (en el que se encuentran bajo condiciones normales), su morfología se caracteriza por la presencia de ramificaciones delgadas y un soma pequeño [132] (Figura 11).



Figura 11 – En esta imagen se muestran los distintos estadios de las células de la microglía. Del lado izquierdo se observa una célula de la microglía en reposo con morfología alargada y ramificaciones delgadas. Posteriormente hacia la derecha se muestran los cambios en su morfología a medida que se vuelve reactiva engrosándose y adoptando una morfología ameboide. (Tomada de Kreutzberg G. 1992).

La microglía quiescente, se distribuyen en el parenquima cerebral sensando el ambiente extracelular y en este estado son incapaces de realizar presentación de antígenos y llevar a cabo mecanismos efectores [130, 133]. También se ha visto involucrada en el mantenimiento de la zona subgranular del giro dentado, mediante la fagocitosis de restos de neuroblastos que llevaron a cabo apoptosis [134]. Aún en estado de quiescencia son células muy dinámicas y sus prolongaciones tienen una tasa alta de movimiento lo que permite una vigilancia muy eficiente de su entorno y se ha visto que estas interactúan con estructuras sinápticas, aunque la función de estas interacciones aún se desconoce [135]. Como células de la inmunidad innata la microglía expresa constitutivamente TLR's, receptores capaces de reconocer patrones moleculares asociados a daño (DAMP) y a patógenos (PAMP) [133].

Cuando se vuelven reactivos, debido a daño en el tejido o a la presencia de patógenos, su morfología se vuelve ameboide con hipertrofia y ramificaciones más cortas y engrosadas [136].

Existe debate respecto al papel de la microglía ya que se ha visto que pueden incrementar el daño generado durante una lesión y resultar perjudiciales para la

supervivencia neuronal, sin embargo también se han descrito funciones neurotróficas [137]. Un factor de importancia durante algunas enfermedades neurodegenerativas es la neuroinflamación. Cuando esta está presente de manera crónica puede llevar a la pérdida neuronal y en gran medida está dada por la microglía [138]. Estas células en presencia de interferón γ expresan MHC tipo II lo que les permite funcionar como células presentadoras de antígeno, la presencia de interleucina 3 y de factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos son moléculas que estimulan su proliferación [139].

En estudios en ratas jóvenes y de edad avanzada en las que se genera daño mecánico en hipocampo, se observa que en individuos de edad avanzada el daño inicia de manera más tardía pero la respuesta es más fuerte y tiene mayor latencia que en individuos jóvenes [140].

3.6.1 Microglia y A β

La microinyección intraventricular de A β 1-42 ha demostrado duplicar la cantidad de MHC-II, un marcador de microglia en homogenados de hipocampo lo cual es evitado en gran medida si IL4 se inyecta conjuntamente con el amiloide [104]. Mientras que al inyectar este péptido en CA1 hay una respuesta de la microglía muy superior a la observada en el control inyectado con PBS. Se reporta que es aproximadamente 4 veces mayor la marca de Iba-1 observada y la morfología de la microglía en el grupo administrado con amiloide tiene una morfología ameboide característica de microglía reactiva mientras que el fenotipo de la microglia en el grupo control corresponde más al de las células hiperramificadas en un bajo nivel de activación [102].

En un estudio en cuerpo estriado en el que se compara, la respuesta generada por la inyección de A β en estado fibrilar o soluble, se reporta que la respuesta de la microglía es similar en el grupo control con inyección de fluido cerebroespinal artificial y el grupo tratado con amiloide en conformación soluble. En el grupo administrado con amiloide soluble a partir del primer día postoperatorio se observa microglía en la cercanía del sitio de inyección y un pequeño porcentaje ha fagocitado el péptido y se reporta que el radio a partir del sitio de lesión en el cual la microglía se encuentra activa es de 100 μm a partir del sitio de inyección mientras que 150 μm a la redonda la microglía se encuentra en

reposo. Sin embargo este grupo reporta que el grupo administrado con amiloide fibrilar tiene una mayor activación de la microglía y que esta internaliza el péptido en esta conformación más eficientemente que cuando se encuentra en estado soluble [141].

3.7 Metabolitos aislados de plantas con efecto sobre el SNC

Varios compuestos obtenidos de fuentes naturales que se ha reportado tienen un efecto sobre el SNC. Algunos de ellos han mostrado un efecto neuroprotector, mediante un mecanismo de acción como antioxidantes y dado que muchas enfermedades neurodegenerativas, tienen como característica la presencia de estrés oxidativo, el uso de compuestos que lo reduzcan es una opción terapéutica viable. De igual forma algunos de estos compuestos, funcionan como inmunomoduladores.

Ya que la inflamación es también una característica presente en las enfermedades neurodegenerativas, y está asociada con un incremento en el daño neuronal, es un blanco terapéutico importante, que puede ser disminuido por compuestos presentes en plantas medicinales [142, 143]. Existen diversos compuestos naturales, derivados de plantas que han mostrado tener una respuesta antiinflamatoria, al disminuir la respuesta de la microglía [143]. Estudios epidemiológicos, han demostrado que la terapia con moléculas antioxidantes y algunos agentes antiinflamatorios, presentan un efecto en la reducción en el riesgo de padecer EA [144].

Algunos compuestos obtenidos de vegetales, han demostrado tener un efecto antiinflamatorio en SNC lo cual tiene relación con una disminución en el daño neuronal. Por ejemplo, el flavonoide wogonin reduce la liberación de citocinas proinflamatorias inducida por LPS en cultivos de microglía. Al ver su efecto en un cultivo mixto de neuronas con microglía se observó una disminución en la muerte neuronal causada por la activación microglial, también esto fue demostrado en hipocampo en dos modelos *in vivo*, uno de isquemia por oclusión de vasos sanguíneos y otro de excitotoxicidad inducido por ácido kaínico [145]. Una acción similar, fue reportada en el caso del flavonoide bacaleína el cual, previene la degeneración de neuronas dopaminérgicas, inducida por lipopolisacáridos en un cultivo mixto de neuronas con microglía. Al observar las células de microglía en el

tratamiento con LPS y bacaleina se observa, que estas se encuentran en estado de reposo. También se observó que este flavonoide es capaz de disminuir la expresión de iNOS y la generación de superóxido [146].

Otros compuestos han demostrado una protección ante la toxicidad del péptido A β . Tal es el caso del extracto alcalino de *Lycium barbarum* que disminuye la muerte neuronal en cultivos tratados con el péptido A β 25-35 ó A β 1-42, también demostró la capacidad de preservar la morfología neuronal [147].

3.7.1 Familia Convolvulaceae

La familia *Convolvulaceae* tiene aproximadamente 1650 especies, entre estas se encuentra el género *Ipomoea* siendo el más abundante en especies de esta familia [148]. Una de las principales características de la familia *Convolvulaceae* es la presencia de células secretoras de resinas glicosídicas. Estas células secretoras se encuentran en el tejido floral y foliar así como en las semillas y las raíces [149].

Uno de los usos más comunes del género *Ipomoea* es como purgante, para este propósito, se usa principalmente la raíz cuyo consumo induce movimientos peristálticos en el tracto intestinal.



Figura 12 – Parte floral de *Ipomoea tyrianthina* (A) y semillas (B). De ambas estructuras se pueden obtener resinas glicosídicas.

Las plantas de la familia *Convolvulaceae*, se han usado con fines medicinales desde la época prehispánica debido a metabolitos con acción farmacológica. En murales de la zona arqueológica de Teotihuacán, se considera que está pintada alguna planta de la familia Convolvulaceae, la cual puede ser *Ipomea tricolor* (la cual tiene propiedades alucinógenas debido a la producción de metabolitos derivados del ácido lisérgico) o podría tratarse de *Ipomea murucoides* [150].

Se ha reportado el uso de *Ipomoea purga* para el tratamiento de gastritis, inflamación abdominal y entero meningitis. Se ha observado que estas tienen actividad antiinflamatoria y antimicrobiana [151]. También en el caso de *Ipomea pes-caprae* se reporta su uso para tratar desordenes inflamatorios, artritis, desordenes gastrointestinales, lumbago y cólicos [152]. Por otro lado, *Ipomea murucoides* se usa en la medicina tradicional, para tratar condiciones reumatoides o inflamatorias. La aplicación de emplastos de las flores y hojas de esta planta, son empleados para tratar golpes o inflamación generada por picaduras de artrópodos o mordeduras de serpiente [150].

3.7.2 Actividad biológica de resinas glicosídicas

El género *Ipomea* produce como metabolitos a: las resinas glicosídicas, alcaloides del tipo de ácido lisérgico, así como derivados del ácido cinámico y cumarinas. Estos glicolípidos, son una característica importante para la sistemática de especies de esta familia [153].

Las resinas glicosídicas se encuentran compuestas de mezclas de glicolípidos. Son moléculas de carácter anfipático, la parte hidrofóbica funciona como aglicona y la parte hidrofílica un heteropolisacárido (di, tri, tetra, penta y hexasacáridos). Los pesos moleculares de los glicolípidos van desde los 500 hasta los 3 000 g/mol.

Las resinas glicosídicas se clasifican de acuerdo a su solubilidad en éter en dos tipos. La jalapina que es soluble en éter etílico y que tiene una macrolactona en su estructura. La convolvulina es insoluble en éter etílico, compuesta por ácidos glicosídicos y dímeros [149][154].

La administración oral de la jalapina de *Ipomea stans*, por dos semanas, demostró tener un aumento en el tiempo de latencia para la generación de convulsiones, generadas por choques electroconvulsivos. El extracto sin embargo resultó ineficaz para controlar convulsiones inducidas por la inyección de 85 mg/kg de pentilenetetrazol y en la necropsia se observó sangrado y dilatación del tracto gastrointestinal. A una dosis menor de pentilenetetrazol (40 mg/kg), la administración de 0.25 mg/kg de la jalapina redujo de manera significativa las convulsiones y la administración de 0.12 mg/kg de la fracción B del extracto las eliminó por completo [155]. En otro experimento, a ratones se les administró la jalapina raíz de *Ipomea stans* y se midieron diversos parámetros relacionados con la disminución de actividad en el sistema nervioso central. Entre los resultados que se obtuvieron están el aumento en el efecto hipnótico inducido por pentobarbital en los animales administrados con el extracto, también se midió el efecto de la jalapina al administrar intraperitonealmente 30 minutos antes de la inyección por esta misma vía de pentilenetetrazol. Las dosis de 2.5, 5, 10 y 20 mg/kg demostraron tener una protección del 71.4% en la mortalidad sin embargo no modifican el tiempo de inicio de las convulsiones [156].

La estansina 6, un glicolípido aislado de la jalapina de *Ipomea stans* fue probado en un modelo de crisis convulsivas inducido por la inyección intraperitoneal de ácido kaínico. Al realizar un análisis histológico de hipocampo se observó que los animales pretratados con dosis desde 10 a 80 mg/kg de estansina 6 mostraron una reducción en el daño neuronal generado por la inyección de ácido kaínico así como una disminución en la reactividad de astrocitos. También se reporta que todos los animales pretratados con estansina 6 no generaron convulsiones y sobrevivieron hasta el final del estudio [157].

3.7.3 *Convolvulus scammonia*

La escamonea (*Convolvulus scammonia*) es una planta perenne de la familia de las Convolvuláceas, de cuya raíz carnosa (1 - 1.5 m de largo y de 8 - 15 cm. de grueso) se extrae una resina. La resina de escamonea es un poderoso catártico y forma parte de muchas preparaciones purgantes, la resina se combina generalmente con otros catárticos

con actividad menor, para disminuir su acción y para evitar daños mayores. Se considera que el principio activo de la resina de escamonea (sin demostración experimental) son los glicolípidos denominados escamoninas.

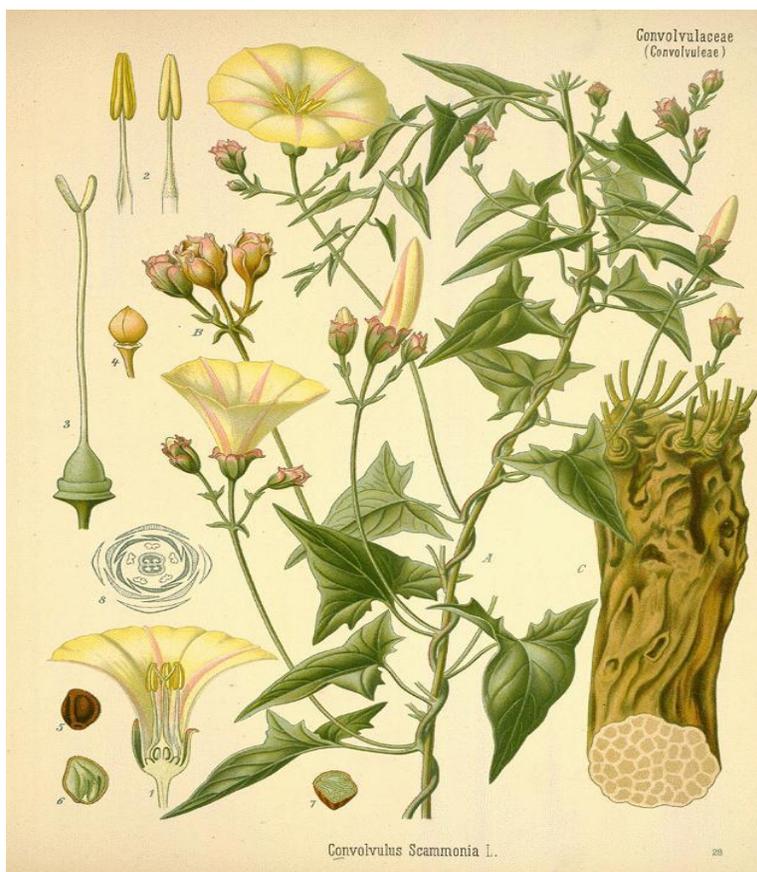


Figura 13- Partes de la planta *Convolvulus scammonia*. Grieve, M. A Modern Herbal. (<http://www.botanical.com/botanical/mgmh/b/binwsy42.html>)

Estudios sobre la composición química de la raíz de *Convolvulus scammonia*, han reportado el aislamiento de las escamoninas a partir de la resina obtenida del extracto soluble en éter (jalapina) [158]. La hidrólisis básica de las escamoninas produjo el ácido escamónico A, su elucidación estructural se realizó con la espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear unidimensional (^1H y ^{13}C) y bidimensional (COSY y HETCOR), y la espectrometría de masas.

3.8 *Ipomoea tyrianthina*

Es una planta perene que llega a medir varios metros de largo en sus tallos, generalmente con abundantes tricomas rígidos y erectos, sus hojas son alternas, acorazonadas o bien ovaladas casi circulares de 4 a 13 cm de largo, con presencia de tricomas rígidos y erectos de color blanco-amarillento, los pecíolos tan largos como la lámina de la hoja, las flores son solitarias, sostenidos por pedúnculos delgados de 10 a 30 cm de largo y cubiertos de tricomas rígidos y erectos, cada flor sobre pedicelos de hasta 5 cm de largo, la semilla se encuentra en una cápsula globosa, de hasta 7 mm de diámetro, que se abre a través de 4 valvas para liberar sus 4 semillas, éstas con dos caras planas y una convexa, de color café oscuro y cubiertas con abundantes tricomas, la raíz muy engrosada, de hasta 30 cm de diámetro, se encuentra en vegetación primaria, a veces como ruderal o arvense.

Su clasificación botánica es la siguiente:

Reino	Plantae
Division	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Familia	Convolvulaceae
Género	<i>Ipomoea</i>
Especie	<i>I. tyrianthina</i>

Ipomoea tyrianthina es comúnmente conocida como raíz de escomonea, quiebraplato, manto de la virgen. En algunas comunidades la infusión acuosa de la raíz es utilizada en la medicina tradicional para el tratamiento de ataques de nervios, como sedante, purgante y para el tratamiento de enfermedades renales.

Mirón y colaboradores realizaron un estudio fitoquímico de las resinas glicosídicas de las raíces de *I. tyrianthina*, la hidrólisis básica de la jalapina produjo como ácido glicosídico al ácido escamónico A.

En un estudio se administró vía intraperitoneal la jalapina de *I. tyrianthina* a ratones produciendo: un efecto ansiolítico; protegiendo contra convulsiones inducidas por pentilentetrazol; aumentando la liberación del GABA en la corteza cerebral, y mostró un efecto vasorrelajante (León *et al* 2014).

El ácido escamónico A a la dosis de 80 mg/kg fue capaz de proteger a los ratones de la muerte, en el modelo de convulsiones inducidas con picrotoxina (PTX). La administración de ác. escamónico A a las dosis de 5, 10, 40 y 80 mg/kg provoca un incremento significativo en el tiempo de latencia de la primera convulsión en comparación con el grupo que sólo recibe vehículo. En la evaluación de ác. escamónico A sobre las convulsiones inducidas con PTZ, se observó que este compuesto a las diferentes dosis administradas, disminuye significativamente la latencia en que se presenta la primera convulsión.

La escamonina 1 fue evaluada a diferentes dosis por vía oral, contra las convulsiones inducidas con el tóxico PTX. Se observó que todas las dosis de este compuesto fueron capaces de retardar, de manera significativa (en comparación con el vehículo), el tiempo en que se presenta la primera convulsión. Los animales que recibieron alguna de las dosis mayores (20, 40 y 80 mg/kg), sobreviven a la muerte después de la administración de PTX.

La convolvulina obtenida de raíces de *Ipomea tyrianthina* (Figura 12) también se probó en experimentos similares demostrando un efecto nulo en la generación de crisis convulsivas inducidas por pentilenetetrazol así como en la mortalidad. En el caso de la administración en conjunto con pentobarbital se observó que se aumentan la latencia y duración del sueño inducido con pentobarbital. También se midió la liberación de GABA en rebanadas de cerebro observándose un incremento inicial en la liberación de este aminoácido pero decayendo de nuevo rápidamente. También se midió su efecto en anillos aórticos de rata y demostró tener un efecto vasodilatador en una dosis de 50 mg/kg. Estos resultados demuestran que similar a los experimentos mencionados anteriormente para *Ipomea stans*, la convolvulina de *I. tyrianthina* también tiene efectos como depresor del sistema nervioso central [159].

Posteriormente de este extracto se purificaron 8 compuestos y se probó cada uno de ellos en la misma serie de experimentos mencionada previamente. Tres de estos compuestos (tiriantinas D, C y E), administrados intraperitonealmente en una dosis de 80 mg/kg en ratón demostraron proteger contra la mortalidad generada por la inyección intraperitoneal de pentilene tetrazol en un 31.2, 28.3 y 26.9 % respectivamente, también estos 3 compuestos probados en dosis de 20, 40 y 80% incrementaron la latencia y duración del sueño inducido por pentobarbital. También indujeron un incremento leve en la liberación de GABA en rebanadas de cerebro siendo este más marcado en el caso de la tiriantina D. Por último, demostraron ser vasodilatadores en el estudio de anillos aórtico. Los demás compuestos purificados no tuvieron ningún efecto en los experimentos realizados.

Las tiriantinas son heterodímeros del ácido escamónico A (Figura 13), el cual puede ser obtenido mediante la hidrólisis básica de dichos glicolípidos [160].

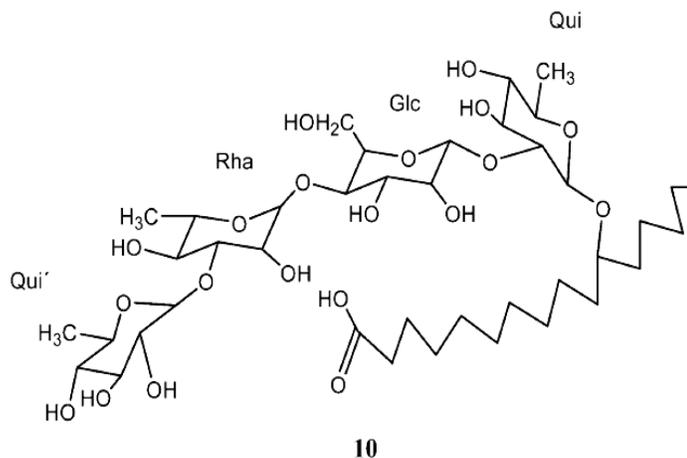


Figura 13– Ácido escamónico A. Glicolípido obtenido de la jalapina de algunas especies de *Convolvulacea* entre ellas *C. scammonia*, *I. orizabensis*, *I. stans* e *I. tyrianthina*.

Otros compuestos purificados, los ácidos tyriantínicos 1, 2, 3 y 4 administrados intraperitonealmente en ratones a una dosis de 10 mg/kg aumentó la duración y latencia de la hipnosis, también en una dosis de 40 mg/kg reduce la mortalidad en un porcentaje de 70 al 100%. Los ácidos tyriantínicos 3 y 4 generan un aumento en la liberación de GABA en rebanadas de tejido cerebral.

Respecto a compuestos de este tipo (glicolípidos) en relación con A β se ha observado que el A β posee un dominio que va de los aminoácidos 5 al 16 y que pertenece al denominado dominio de unión a esfingolípidos (SBD) el cual tiene afinidad por el gangliósido 1 (GM1) el cual se encuentra presente en las membranas postsinápticas y debido a esto se piensa que permite el anclaje de A β a la membrana. Se observó mediante estudios de mutación dirigida que las histidinas 13 y 14 son indispensables para la interacción del péptido amiloide con GM1 y que para esta interacción se requieren de dos moléculas de GM1 ya que cada una de ellas interactúa con una histidina para que la unión sea estable [161].

Se ha demostrado en extractos de cerebro administrado con especies monoméricas y diméricas de A β que la mayor parte del péptido administrado se une de manera rápida y fuerte a GM1. Se observó también que las especies diméricas presentan una mayor afinidad por este. Al bloquear la unión del amiloide con el ácido siálico de GM1 utilizando la subunidad β de la toxina del cólera se observó que se evita el deterioro en la potenciación a largo plazo generado por A β demostrando el papel que juega GM1 en la toxicidad sináptica generada por éste [162].

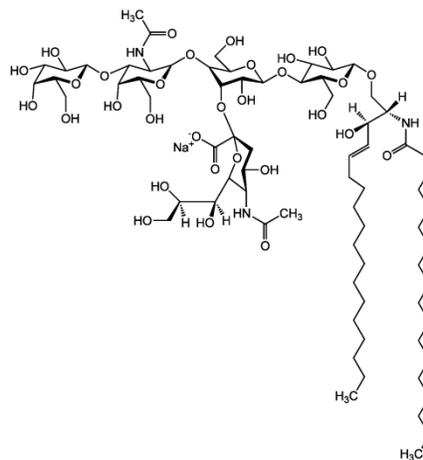


Figura 14 – Estructura del gangliósido GM1, esta molécula tiene la capacidad de unirse al péptido β amiloide lo cual facilita su agregación.

4 – JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de Alzheimer es la principal causa de demencia en el adulto mayor inhabilitándolo de manera total en etapas avanzadas, además de afectar a sus familiares y demás individuos que tienen relación con él. Actualmente no se cuenta con una terapia efectiva para el tratamiento y prevención de la patología. Los medicamentos usados en la actualidad resultan benéficos para el tratamiento de la sintomatología sin embargo no alteran su progresión, ni evitan el proceso neurodegenerativo.

Parte importante de esta patología es el péptido A β , generado durante el procesamiento proteolítico de la proteína transmembranal PPA β por medio de la vía amiloidogénica. En estado monomérico se han descrito funciones como la protección de daño excitotóxico así como un papel neurotrófico y estimulante para la proliferación de progenitores neurales. Sin embargo, cuando se agrega en estado oligomérico se han descrito gran cantidad de efectos tóxicos y adversos para el tejido cerebral en distintos modelos experimentales.

Una alternativa terapéutica es el uso de plantas medicinales o compuestos aislados de éstas. Existe evidencia que plantas de la familia *Convulvulaceae* han sido usadas desde épocas prehispanicas para el tratamiento de diversos desordenes inflamatorios y epilepsia. Esta acción se atribuye a las resinas glicosídicas presentes en diversas estructuras de la planta principalmente en la raíz. Estudios realizados con diversos extractos de plantas del género *Ipomoea* en modelos de crisis epilépticas, han demostrado tener efectos benéficos como son la reducción de las crisis y disminución en la mortalidad de los animales tratados.

Algunos extractos obtenidos de *I. tyrianthina* han demostrado generar incremento en la liberación de GABA así como un aumento en el tiempo de sueño inducido por pentobarbital. Recientemente, un glicolípido derivado de *I. stans* demostró un decremento en el daño en la región del hipocampo inducida por la inyección intraperitoneal de ácido kaínico, así como disminución en la gliosis reactiva.

Debido a lo observado anteriormente en los extractos de *I. tyrianthina* así como el estudio con el glicolípido de *I. stans* se plantea probar el ácido escamónico A aislado de *I. tyrianthina* en un modelo de inyección intrahipocampal de A β 1-42 el cual ha demostrado ser neurotóxico así como inducir gliosis reactiva en el hipocampo.

5 – HIPÓTESIS

El daño neuronal y en la estructura tisular de las subregiones hipocampales analizadas así como la gliosis generada por la inyección de oligómeros de amiloide beta 1-42 ($A\beta$ 1-42) disminuirán en los grupos administrados previamente por vía intraperitoneal de ácido escamónico A.

6 - OBJETIVOS

General

Determinar si el ácido escamónico A administrado previamente a la inyección intracerebral de oligómeros de A β 1-42 en rata disminuye la toxicidad generada en este modelo.

Particulares

-Determinar en caso de observar diferencias en los tejidos de animales administrados previamente con ácido escamónico A si estas varían dependiendo de la dosis usada (10, 15 y 20 mg/kg).

-Determinar si el ácido escamónico A ejerce un efecto en los tipos celulares analizados (neuronas, astrocitos y microglia) en ausencia de daño inducido por la inyección intracerebral (A β 1-42 y SS).

-Identificar si la administración previa de ácido escamónico A tiene un efecto anti-inflamatorio en nuestro modelo de daño.

7 – METODOLOGÍA

La raíz de *Ipomoea tyrianthina* fue recolectada en el Municipio de Ahuazotepec, Puebla (Agosto de 2000). Un ejemplar de *I. tyrianthina*, está depositado en el Herbario del IMSS en la ciudad de México, con número de registro 15073. La identificación botánica la realizó el Biólogo Manuel Castro de la Facultad de Ciencias de la UNAM.



Figura 15- Ejemplar de *I. tyrianthina* recolectado en el estado de Puebla. Raíz (A) y parte aérea (B).

Los ejemplares de *I. tyrianthina* se cortaron en pedazos y se dejaron secar a la sombra a temperatura ambiente. Se tomaron 100 g del material vegetal seco y molido, para ser macerados con 500 mL de cada uno de los siguientes disolventes en forma consecutiva n-hexano, CH_2Cl_2 y CH_3OH , durante una semana, una vez terminado el tiempo de extracción, el material se filtra y el disolvente se elimina a presión reducida mediante un evaporador rotatorio y el extracto seco es pesado.

La separación de los componentes del extracto de CH_2Cl_2 , por lo que el fraccionamiento primario se realizó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice tamaño de partícula 70-210 (Merck), utilizando un sistema de elusión CH_2Cl_2 - CH_3OH con las proporciones de CH_2Cl_2 (100%), CH_2Cl_2 - CH_3OH (98:02, 97:03, 95:05, 94:06, 93:07, 90:10, 85:15, 80:20) y CH_3OH (100%). El análisis por cromatografía en capa delgada con gel de sílice (CCD) se realiza en cromatofolios de aluminio impregnados con una capa de gel de sílice GF_{254} de 0.25 mm de espesor (Merck), la fase estacionaria consistió de una mezcla CH_2Cl_2 - CH_3OH (90:10). La placa se revela utilizando una mezcla de ácido sulfúrico

y calor. Se obtuvieron 20 fracciones, las cuales se agruparon en los conjuntos 1A – 6A, la fracción 2 corresponde a la escamonina 1.

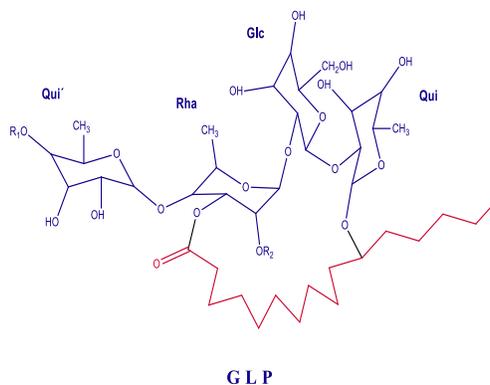


Figura 16- Estructura de la escamonina 1. Forma parte de los glicolípidos que se pueden encontrar en *I. tyrianthina*.

Se colocaron 150 mg de la jalapina a reflujo en 10 mL de una solución 0.2 N de NaOH durante 60 min. La mezcla de reacción fue acidificada a pH 5 y extraída con CH₂Cl₂. La fase orgánica fue lavada con H₂O y secada con Na₂SO₄ anhidro, el solvente fue evaporado a presión reducida. La fase acuosa fue liofilizada y el residuo fue disuelto en CH₃OH, al evaporar el solvente se obtuvo un sólido amorfo de color blanco (Ácido Escamónico 1).

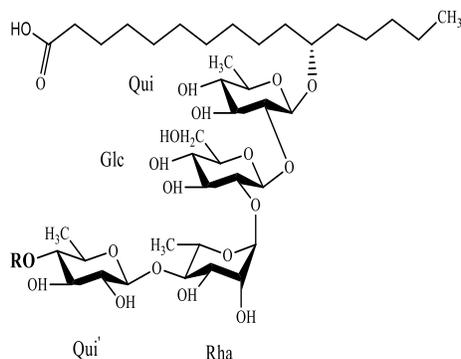


Figura 17- Estructura del ácido escamónico A, este glicolípidos se obtuvo de ejemplares de *I. tyrianthina* colectados en el estado de Puebla su posterior utilización en el presente estudio.

El estudio fue realizado en ratas macho de la cepa Wistar con un peso aproximado de 250 gr. Las ratas fueron mantenidas en cajas de policarbonato en condiciones de temperatura y humedad adecuadas, y bajo un ciclo de luz-obscuridad invertido de 12 horas x 12 horas. Se les proporcionó agua y alimento ad libitum.

El ácido escamónico A fue disuelto en solución salina inyectable para la preparación de una solución stock a una concentración de 20 mg/ml. A partir de ésta se realizaron diluciones. A las ratas se les administró el ácido escamónico A en 3 concentraciones: 10, 15 y 20 mg/kg por vía intraperitoneal media hora previa a la cirugía (grupos 2, 4 y 6).

Los animales fueron anestesiados usando una mezcla de ketamina (85 mg/kg) / xylazina (12 mg/kg) administrada por vía intramuscular. Se verificó que el animal se encontrara totalmente sedado mediante el pellizco de cola y pata. Si el animal aún conservaba reflejos se administraba el 10% de la dosis inicial de anestésico. Se rasura el cuero cabelludo del animal en el área aproximada donde se realizará la incisión. El animal se monta en un aparato estereotáxico de rata marca Stoelting y se aseguró que el cráneo se encontrara completamente fijo y horizontal. Se realiza una incisión en el cuero cabelludo de la rata de aproximadamente 2cm a partir de la cual el bregma sea identificable así como la parte posterior del cráneo que es donde se encuentra la región donde se desea inyectar. Se limpia el periostio hasta que el bregma sea visible de manera clara. A partir del bregma se toman las coordenadas para realizar las siguientes modificaciones:

AP: -4.2mm, L:+-3mm y V:-3mm

Estas coordenadas fueron obtenidas del atlas de G. Paxinos y estandarizadas para la edad y peso de las ratas usadas en el estudio mediante la inyección de 1 µl de azul de metileno que será el volumen inyectado durante el estudio.

La inyección se realizó en un periodo de 3 minutos y se esperan dos minutos más para evitar el reflujo de la solución inyectada. Este procedimiento se realiza de manera bilateral. Posterior a esto el animal será suturado. Se registra la hora de término de la cirugía. Se analizaron diferentes grupos de estudio.

Grupos experimentales:

Grupo 1. Basal

Este grupo no tiene ningún tipo de tratamiento (sin administración de ácido escamónico A ni realización de cirugía estereotáxica).

Grupo 2. Ácido Escamónico

En este grupo de animales se realizó la inyección intraperitoneal de ácido escamónico A (AE) a distintas dosis. Se probaron 3 distintas dosis (10, 15 y 20 mg/kg).

10mg/kg – 1 rata, se revisaron ambos hemisferios, 15 mg/kg - 1 rata, se revisaron ambos hemisferios y 20mg/kg - 2 ratas, se revisaron ambos hemisferios.

Grupo 3. Solución salina

En este grupo se realizó cirugía estereotáxica para administrar 1 ul de solución salina esteril por hemisferio de manera bilateral. Se realizaron 2 ratas y se analizaron ambos hemisferios de cada una.

Grupo 4. Solución salina + AE

La inyección de 1µL por hemisferio de solución salina inyectable se realizó de manera bilateral. En este grupo se analiza el efecto generado por la inyección intrahipocampal en ausencia de los oligómeros de amiloide. SE probaron las 3 distintas dosis de AE administradas 30 minutos previos a la cirugía estereotáxica: 10 mg/kg y 15 mg/kg – 1 animal, se realizó inyección bilateral y se analizaron ambos hemisferios. 20mg/kg - 2 animales, se realizó inyección bilateral y se analizaron ambos hemisferios.

Grupo 5. Péptido Aβ 1-42

En este grupo de estudio, en el que se inyectaron 100 µM de oligómeros del péptido sintético Aβ1-42 (1 µl) por hemisferio y se realizó de manera bilateral. Se utilizaron 2 ratas y se analizaron los dos hemisferios de cada una de ellas.

Grupo 6. Péptido A β 1-42 + AE

Grupo de estudio, en el que se inyectaron 100 μ M de oligómeros del péptido sintético A β 1-42 (1 μ l). Se probaron las 3 distintas dosis de AE administrado 30 minutos previos a la cirugía estereotáxica. 10 mg/kg - 1 animal, se realizó inyección bilateral y se analizaron ambos hemisferios. 15 mg/kg - 1 animal, se realizó inyección bilateral y se analizaron ambos hemisferios. 20mg/kg - 2 animales, se realizó inyección bilateral y se analizaron ambos hemisferios.

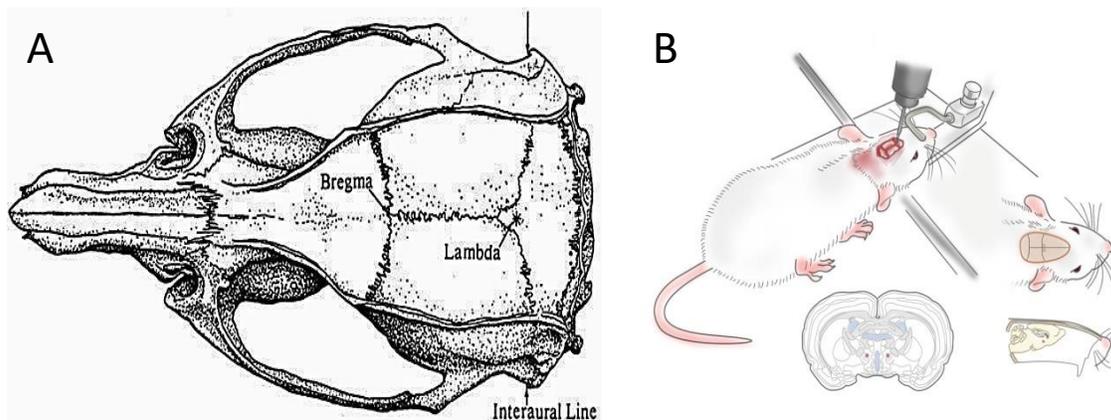


Figura 18 – En la figura A se muestra el bregma en el cráneo de la rata. En la figura B se muestra una rata montada en el aparato estereotáxico, este nos permite la fijación del cráneo de la rata para que mediante un sistema de coordenadas descender la aguja de inyección a un punto determinado en el cerebro.

Perfusión y obtención del tejido.

18 horas posteriores al término de la cirugía (grupos 2-6) y dentro del mismo periodo de tiempo (grupo 1) las ratas fueron anestesiadas en una cámara de cloroformo y se perfundieron por vía intracardiaca con solución de NaCl 0.9% para limpiar los vasos sanguíneos y posteriormente con formol al 4% para fijar el tejido. Una vez realizado esto se decapitó al animal y se obtuvo el cerebro. Se colocó en un vial con paraformaldehido-sacarosa y se almacenó hasta su uso.

Inclusión de tejidos

Los cerebros almacenados en paraformaldehido fueron tomados y seccionados en los dos hemisferios con el uso de una matriz de corte para cerebro de rata. Cada hemisferio se

colocó en un casete para tejido y se etiquetó de acuerdo al grupo de estudio al que pertenecía. Posteriormente el tejido fue deshidratado con alcoholes graduales (60-100%), aclarado (Xilol) e incluido en parafina. Una vez incluido en bloques de parafina se realizaron cortes del tejido de 5 y 8 μM de grosor.

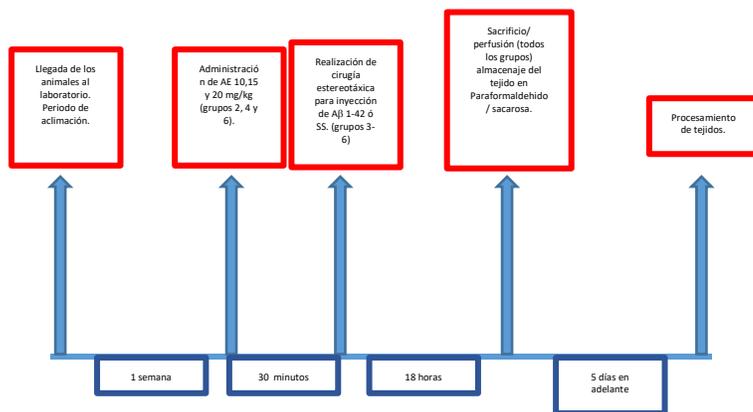


Figura 19 – Cronograma de los procedimientos realizados con los distintos grupos de estudio. El péptido usado en la cirugía estereotáxica en los grupos 5 y 6 fue incubado 24 horas previas a la inyección para su oligomerización.

Obtención de cortes.

Los cortes se realizaron en el micrótopo Thermo Scientific, Microm HM325 a partir de bloques con un hemisferio cerebral incluido en parafina. Y con la ayuda de un baño de flotación en el cual la temperatura elegida para estirar los cortes fue de 38-40 $^{\circ}$. Se comenzó a cortar el tejido hasta llegar a una altura cercana del sitio de lesión (aproximadamente 900 μm). A partir de este punto se tomaron cortes para observar en el microscopio que estuviéramos cerca del área deseada. Cuando la lesión era visible se comenzaron a levantar cortes de 5 μm para realizar la tinción de hematoxilina-eosina (4 laminillas con dos cortes cada una) y de 8 μm de grosor para la realización de inmunohistoquímicas.

Tinción de hematoxilina-eosina

Esta tinción histoquímica permite observar la estructura general del tejido. La hematoxilina es un colorante de procedencia vegetal capaz de teñir compuestos aniónicos como es el caso del ADN por lo cual, los núcleos celulares quedarán marcados de un color morado oscuro o azul. Por otro lado, la eosina es un colorante basófilo debido a su

naturaleza ácida por lo que es capaz de teñir el citoplasma en tonalidades que van del rosa al rojo. Para este procedimiento en primer lugar se desparafinó el tejido sumergiendo las laminillas en xilol por 45 minutos y posteriormente pasándolas por un tren de alcoholes graduales (etanol/xilol, etanol 100%, etanol 96%) por 5 minutos en cada uno de ellos y finalmente 5 minutos en agua destilada para que el tejido se hidrate. Después el tejido, se sumerge por 3 minutos en hematoxilina de Harris, se utilizó agua amoniacal como mordiente sumergiéndola 3 veces rápidamente en esta. Después se sumergió 1 minuto en eosina, se enjuagó en agua y se regresó por los alcoholes graduales (etanol 96%, etanol 100%, etanol-xilol y xilol) para su posterior montaje.

Inmunohistoquímica.

Para esta técnica se usaron los cortes de 5 μ m de grosor. Se desparafinó el tejido por el mismo método mencionado en la tinción de H-E. Posterior a esto se colocaron las laminillas en frascos coplin con buffer de citratos y estos en baño maría durante 12 minutos para la recuperación antigénica.

Se dejó reposar hasta que estuviera a temperatura ambiente. Posteriormente las laminillas se lavaron con PBS1x y se rodeó cada tejido con marcador hidrofóbico. Se bloqueó la peroxidasa endógena con H₂O₂ 3% durante 10 minutos y una vez concluido el tiempo se realizaron 3 lavados con PBS 1x de 5 minutos cada uno.

Se añadió albúmina de suero bovino (BSA) 2% /tritón y se dejó por 30 minutos. Se lavó 3 veces con PBS1x por 5 minutos cada lavado y se añadió BSA2% esta vez por 15 minutos. Posterior a esto se agregó el anticuerpo diluido en BSA 1% y se incubó con toda la noche a 4°C. Los Anticuerpos usados fueron mouse anti-NeuN (mab 377a, Millipore), chicken anti-GFAP (ab 4674, Abcam) y rabbit anti-Iba1 (gtx 100042, GeneTex).

Al día siguiente se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS1X y posteriormente se añade un enlace universal biotinilado de DAKO por 1 hora, se realizaron de nuevo 3 lavados de 5 minutos y se añade estreptavidina acoplada a peroxidasa de rábano picante (HRP). Se dan nuevamente 3 lavados de 5 minutos con PBS1X y por último se realizó el revelado con DAB (1ml de sustrato DAB + 1 gota de cromógeno diaminobencidina de

DAKO) colocando 50 µl de esta mezcla durante un tiempo aproximado de 1 minuto que varía dependiendo de la coloración que el tejido vaya adquiriendo. La laminilla se lava abundantemente con agua destilada y se coloca en el contenedor con agua destilada. Se realiza la contratinción del tejido pasando por hematoxilina por 1 minuto y realizando la estabilización del colorante sumergiendo 3 veces la canastilla en agua amoniacal. Posteriormente se deshidrata la laminilla en alcoholes graduales y se coloca una gota de resina sobre el tejido para fijar el cubreobjetos.

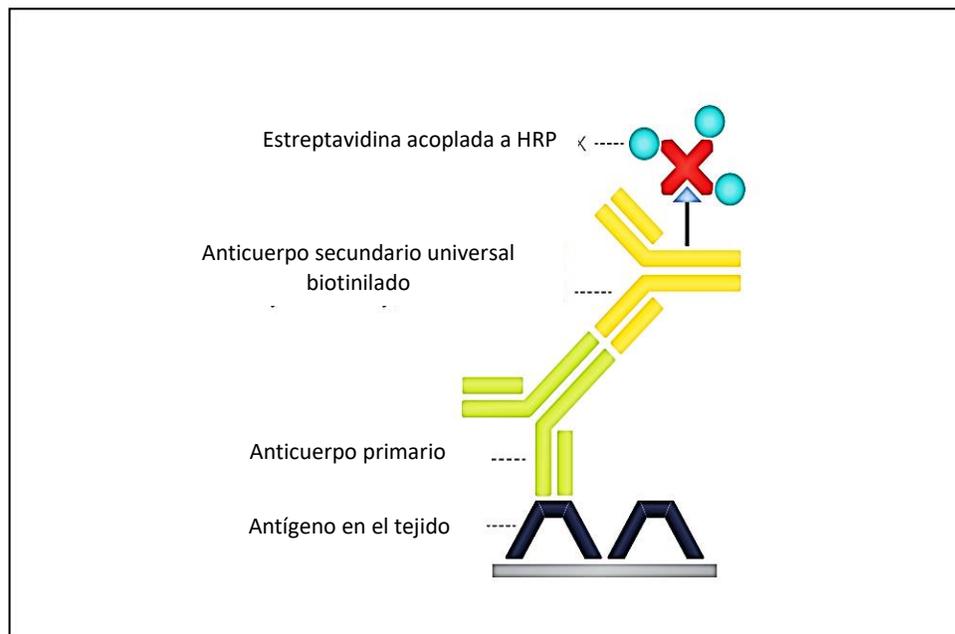


Figura 13 – Se muestra el sistema de detección usado en inmunohistoquímica. Se basa en el acoplamiento de un anticuerpo secundario de reconocimiento universal acoplado a biotina a la cual se unirá estreptavidina la cual a su vez está acoplada a la enzima HRP que al reaccionar con el cromógeno diaminobencidina dará una coloración marrón en los sitios donde se unió el anticuerpo.

Microscopía confocal: Para esta técnica se usaron los cortes de 8 µm de grosor. Se siguieron los mismos pasos iniciales que en la inmunohistoquímica a excepción del bloqueo de la peroxidasa endógena, el cual no se realizó. Los anticuerpos primarios usados fueron: mouse anti-NeuN (mab 377a, Millipore), chicken anti-GFAP (ab 4674, Abcam) y rabbit anti-Iba1 (gtx 100042, GeneTex). Se incubo cada uno individualmente durante un periodo de 2 horas y se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno en agitación con PBS 1X entre la incubación de cada anticuerpo. Después de la agregación del

último anticuerpo se realizaron los lavados correspondientes y se agregó una mezcla de los anticuerpos secundarios (IgG anti-mouse Cy5, IgG anti-rabbit Alexa 555 y IgY anti-chicken Alexa 488) respectivos disueltos en BSA 1%.

Las laminillas se dejaron incubar con el anticuerpo en agitación por dos horas.

Posteriormente fueron montadas utilizando medio de montaje para fluorescencia Vectashield, fueron observadas y se tomaron fotos en microscopio confocal.

8-9 – RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del ácido escamónico

Debido a la prevalencia de la enfermedad de Alzheimer y al decremento en la calidad de vida que representa para quienes la padecen así como para sus familiares, es fundamental el estudio y entendimiento de dicha enfermedad, así como la búsqueda de estrategias terapéuticas. Hasta el momento, no existe una cura ni se han encontrado fármacos capaces de detener el deterioro generado por ésta. Por tal motivo, es importante el estudio de moléculas que puedan reducir ciertas características patológicas de la EA.

En el presente estudio, inicialmente se evaluó el efecto del glicolípido de origen vegetal denominado ácido escamónico A (AE), aislado de *Ipomoea tyrianthina*, el cual ha demostrado tener un efecto “protector” en un modelo de daño neuronal y gliosis.

Para tal efecto planteamos llevar a cabo la administración intraperitoneal de 10, 15 y 20mg/kg de AE en grupos de ratas (A β , SS y C), las cuales fueron sacrificadas 18 horas posteriores al tratamiento. El cerebro de dichos animales fue incluido y se realizaron cortes los cuales fueron teñidos con H&E para evaluar de manera general, la estructura del tejido cerebral en las regiones de giro dentado y CA3.

Los resultados muestran que la administración de AE, no genera por si solo alteraciones en el tejido cerebral a ninguna de las 3 dosis probadas. Las estructuras analizadas permanecen intactas al igual que en el grupo basal (grupo 1).

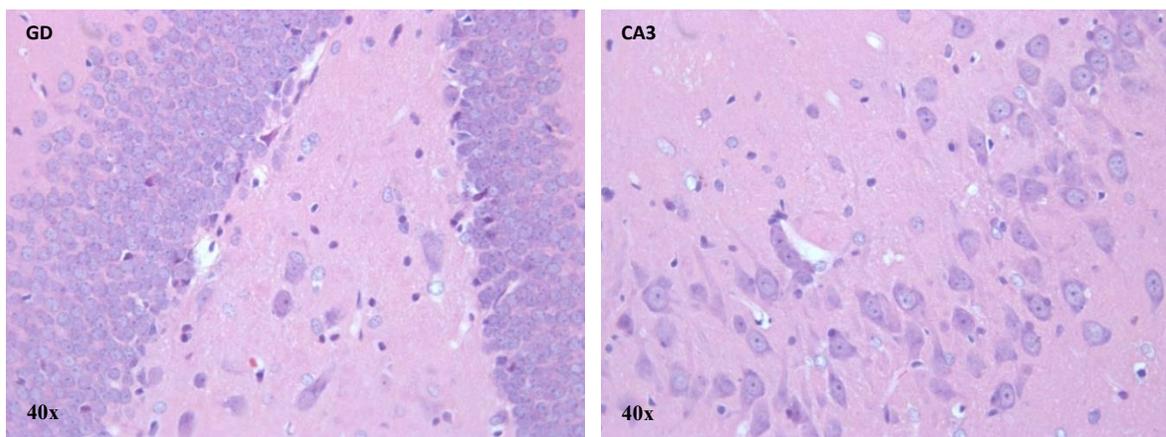


Figura A. Microfotografías con la tinción de H&E de corte de cerebro de rata basal (grupo 1), donde se muestra la estructura de las subregiones hipocampales analizadas en condiciones normales (40X). (A) Giro dentado (GD) con las neuronas granulares agrupadas dentro de su estrato correspondiente y (B) CA3 con las neuronas piramidales mostrando la morfología típica de este tipo celular dentro del estrato piramidal.

De igual manera es importante señalar que no se encontraron diferencias en los animales tratados a distintas dosis de AE en ninguna de las regiones analizadas, giro dentado (GD) y CA3 (Figura B).

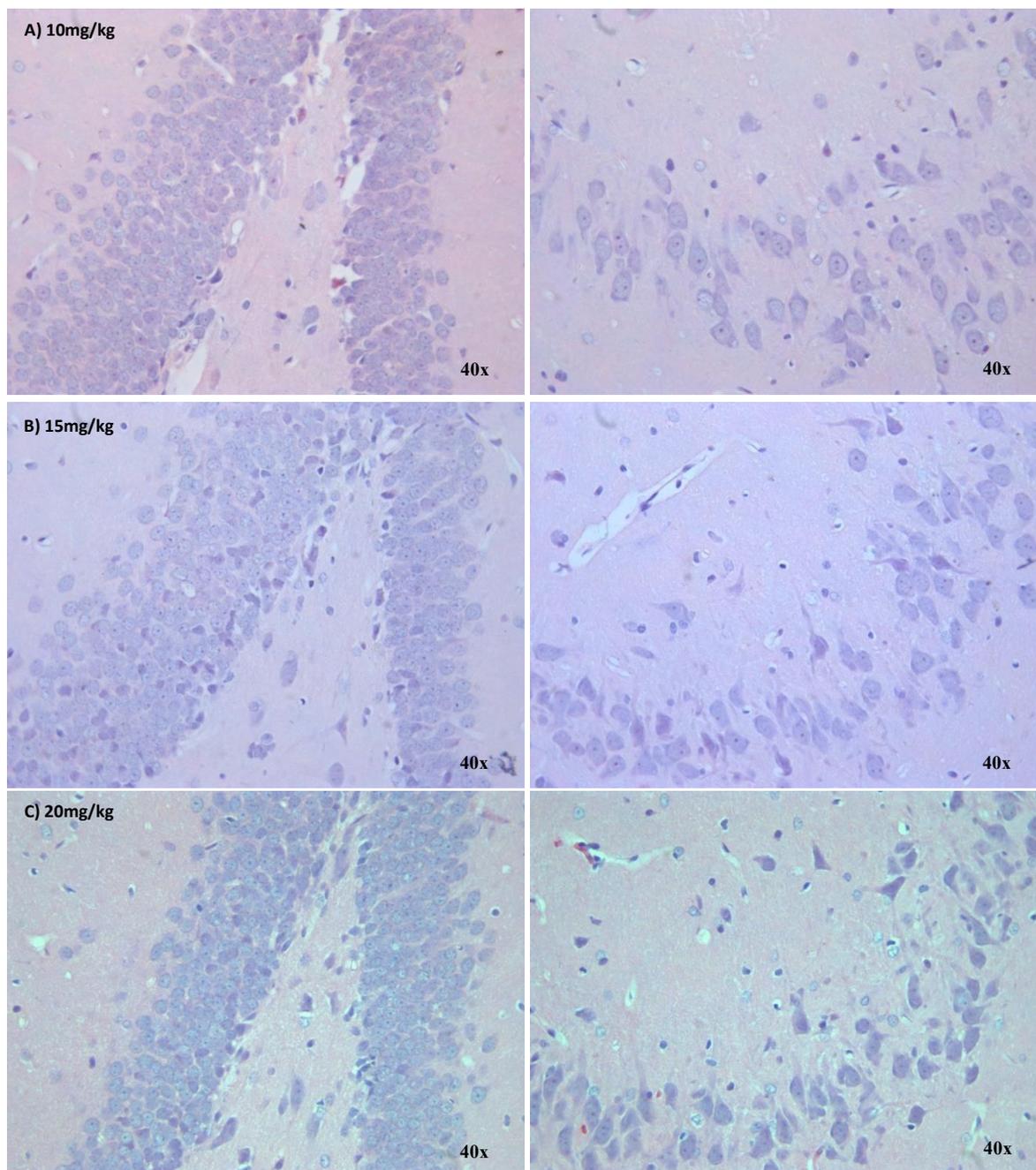


Figura B. Micrografías con la tinción de H&E que muestran el hipocampo de ratas tratadas con diferentes dosis de AE en ausencia de intervención para la inyección intracerebral (SS ó A β 1–42). (A) 10mg/kg, (B) 15mg/kg y (C) 20mg/kg. A las 3 dosis se observa ausencia de daño con los estratos granular (GD) y piramidal

(CA3) bien definidos así como morfología de las neuronas granulares y piramidales típica, como la observada en el grupo basal (grupo 1).

Daño generado por inyección de oligómeros de A β y solución salina

Numerosos estudios han demostrado diversos efectos tóxicos propios de las especies oligoméricas de A β en el sistema nervioso central, entre estos se encuentran: la disminución de la viabilidad neuronal y la potenciación a largo plazo, generación de procesos neuronales distróficos y generación de gliosis reactiva con proliferación y activación de microglía y astrocitos.

En el presente estudio, se utilizó un modelo animal de daño neuronal e inflamación, generados por la inyección intrahipocampal (dirigida a la subregión CA1 del hipocampo) de 100 μ M de amiloide beta 1-42 (A β 1-42) en estado de agregación oligomérico. Como control de daño mecánico, se realizó la inyección de 1 μ l de solución salina en el mismo sitio.

Este modelo nos permite observar en primer lugar, el daño agudo generado por oligómeros de A β directamente en el área de interés y en segundo lugar, observar si la molécula administrada (AE) tiene un efecto “protector” y es capaz de disminuir los procesos de gliosis y degeneración neuronal causados por el A β 1–42 al tiempo y dosis administrada.

El AE fue administrado intraperitonealmente (con base a estudios previos realizados en el laboratorio) 30 minutos previos a la cirugía estereotáxica. Se eligieron tres dosis (10, 15 y 20 mg/kg) con la finalidad de observar si su efecto puede ser dependiente de la dosis administrada.

Tinción con Hematoxilina-eosina (H&E).

La tinción con H&E nos permite ver de manera general la estructura del tejido. De acuerdo a lo esperado se observó daño en los grupos inyectados con amiloide (Figura 16), en el giro dentado donde es más notorio, se observan de manera general vacuolizaciones en la región subyacente (subgranular). Esto es indicativo de degeneración neuronal debido a la presencia de edema en los procesos neuronales. Otro hallazgo observado, es la presencia de picnosis dada por la condensación de la cromatina y que en etapas más avanzadas de

degeneración celular conducirá a la cariólisis y liberación de desechos nucleares que darán lugar a un proceso inflamatorio [163, 164]. En el estrato granular e hilus, se observa también pérdida de la estructura tisular así como disminución de la densidad neuronal al compararlo con el grupo basal.

En la región CA3 aunque en menor medida también se observa disminución en la densidad neuronal, picnósis y pérdida de la morfología característica de las neuronas piramidales de esta región. En el grupo inyectado con solución salina aunque en menor medida también se observan alteraciones, entre ellas la presencia de núcleos picnóticos sin embargo no se observa presencia de vacuolas en la región subgranular como en el tejido de los animales inyectados con A β . Los resultados observados fueron de acuerdo a lo esperado según la literatura consultada previamente a la realización de este estudio y a los efectos adversos reportados para el péptido A β .

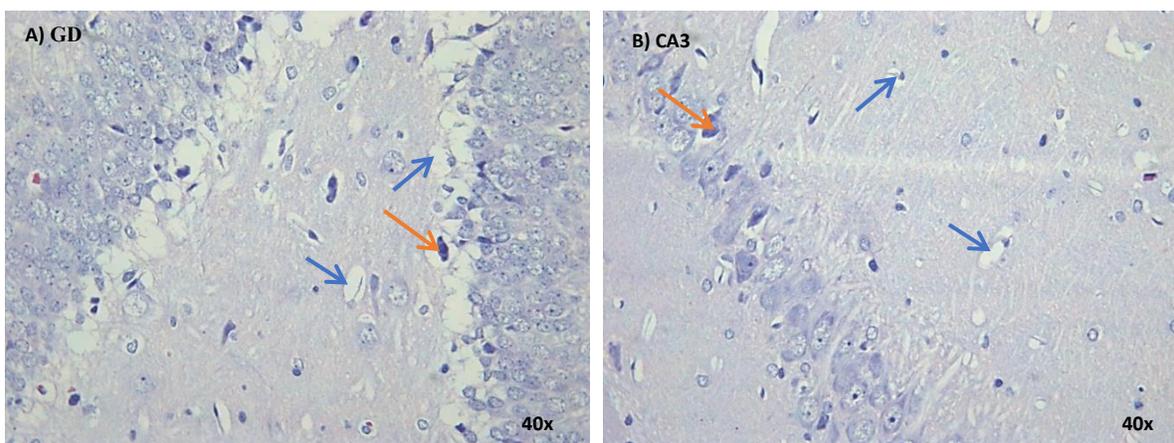


Figura 16 – Micrografía con la tinción de H&E que muestra el Giro dentado (A) y región CA3 (B) de hipocampo de rata inyectado con 100 μ M de A β 1-42 (grupo 5) (40x). Se observa presencia de vacuolas en la región subgranular del GD y CA3 (flechas azules) así como células picnóticas en el estrato granular del GD, CA3 e hilus (flechas naranjas).

La administración previa a la cirugía con AE, permitió observar una “recuperación” del daño generado por A β 1-42, en las tres dosis empleadas, aunque fue más evidente a los 20mg/kg. A dosis de 10 mg/kg en el grupo de ratas inyectadas con A β , existen algunas células con picnósis que ya no se encuentran presentes a las dosis de 15 y 20 mg/kg, las vacuolizaciones observadas en el grupo sin previa administración de AE no se observan en

ninguna de las 3 dosis probadas de AE y la estructura del estrato granular se ve bien conservada a las 3 dosis. Esto ocurre también en los grupos inyectados con SS. Los resultados muestran que el mayor efecto se tiene a las dosis de 15 y 20mg/kg, como se puede observar en las Figuras 17 y 18 en las distintas regiones analizadas (GD y CA3 respectivamente).

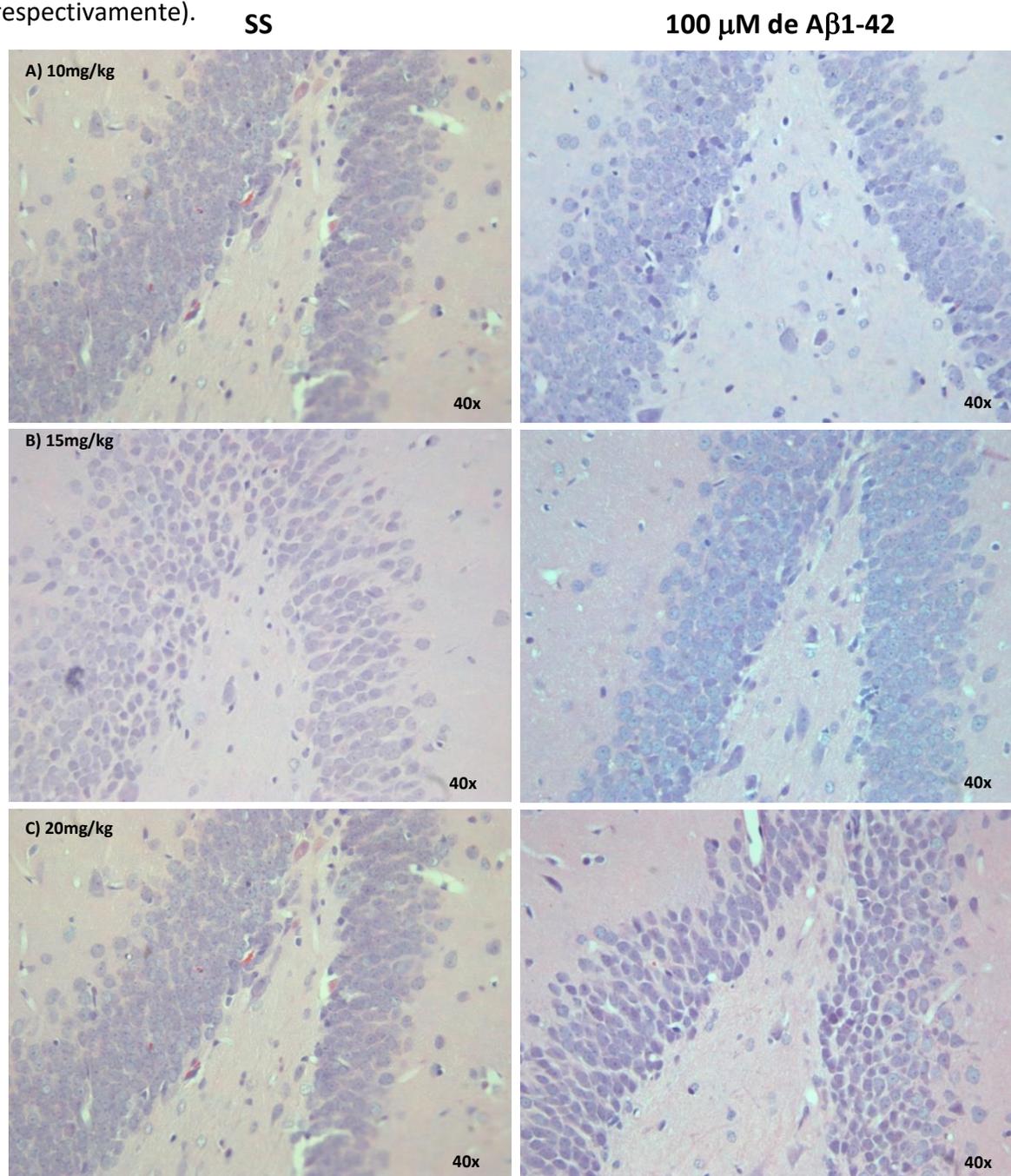


Figura 17 – Micrografías con la tinción de H&E de los grupos 3 y 5 (SS y A β) tratados con AE en la región de giro dentado. En (A) Efecto del AE a 10mg/kg en los diferentes grupos de estudio.(B) AE a 15mg/kg y (C) AE a 20mg/kg. Las dosis de 20mg/kg se observa un efecto más notorio.

SS

100 μ M de A β 1-42

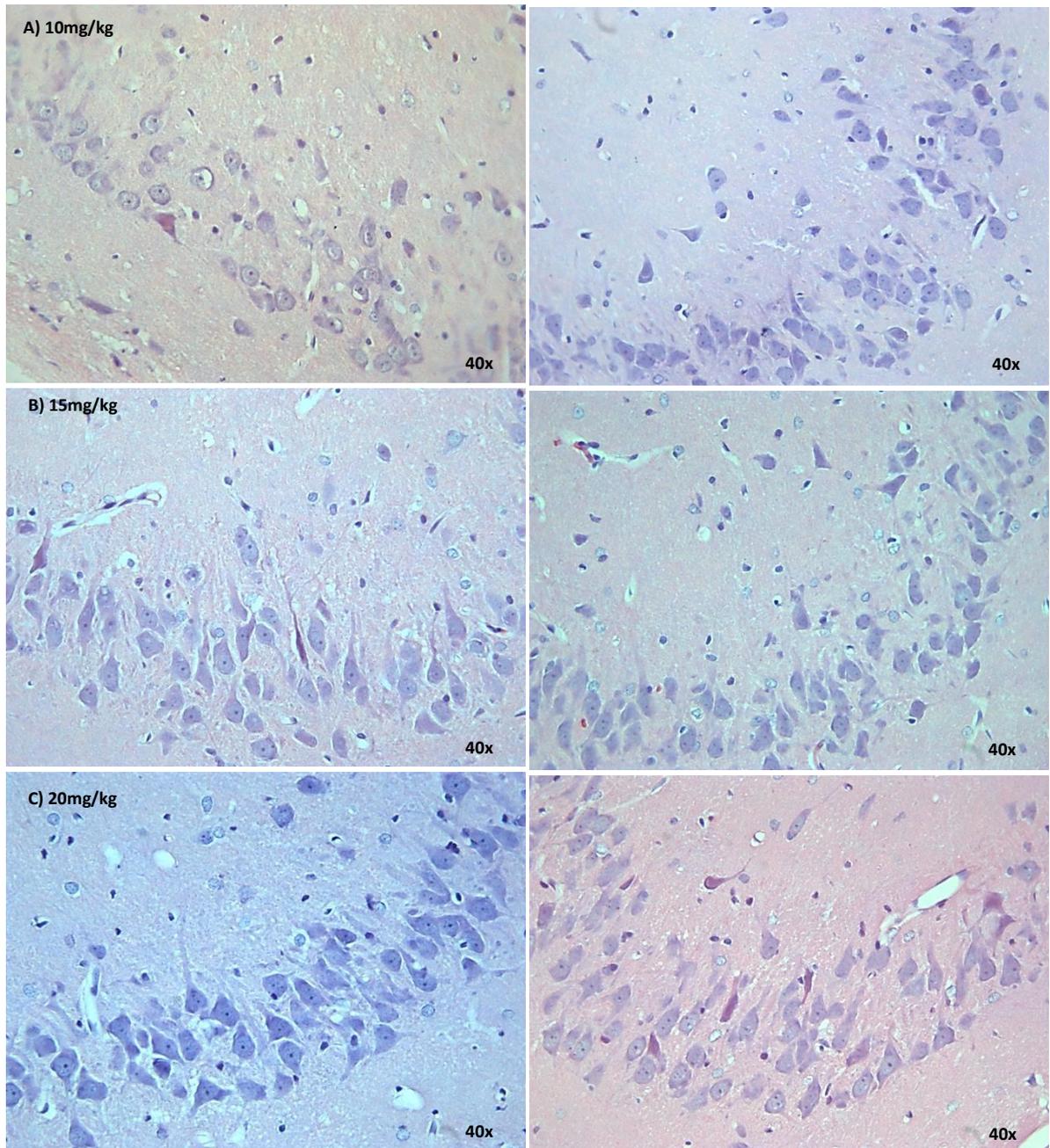


Figura 18 – Micrografías con la tinción de H&E de los distintos grupos (A β y SS) tratados con AE a diferentes dosis, en la región de CA3 **(A)** 10mg/kg de AE; **(B)** 15mg/kg de AE y **(C)** 20mg/kg de AE. Se puede observar en (A) células picnóticas en el tejido del animal inyectado con 100 μ M de A β 1-42. En esta región los cambios observados son menores que en el caso del giro dentado aunque si se observa una disminución del daño y las imágenes de los 3 tratamientos con AE son muy similares entre sí.

Inmunohistoquímica con NeuN

La integridad de las poblaciones neuronales, fue confirmada mediante inmunohistoquímica, empleando el anticuerpo anti-NeuN, el cual detecta la proteína NeuN, esta es una proteína de unión a ADN y se encuentra exclusivamente en neuronas maduras, se expresa en el núcleo de la mayoría de los tipos neuronales en etapas adultas. Los resultados observados tras la inmunohistoquímica con NeuN, muestran que en el caso de la inyección con A β , existe una disminución en la marca dada por este anticuerpo en la región del GD, esto puede deberse a que muchas de las células del estrato granular se encuentran en picnósis y algunas otras tienen presencia de vacuolas. Se observa también que hay una pérdida de la morfología del estrato granular del giro dentado. En ambos casos, ya no son marcadas por el anticuerpo. Para la región CA3 se observa también una disminución en el número de neuronas piramidales en el grupo de amiloide así como dispersión del estrato piramidal (Figura 19).

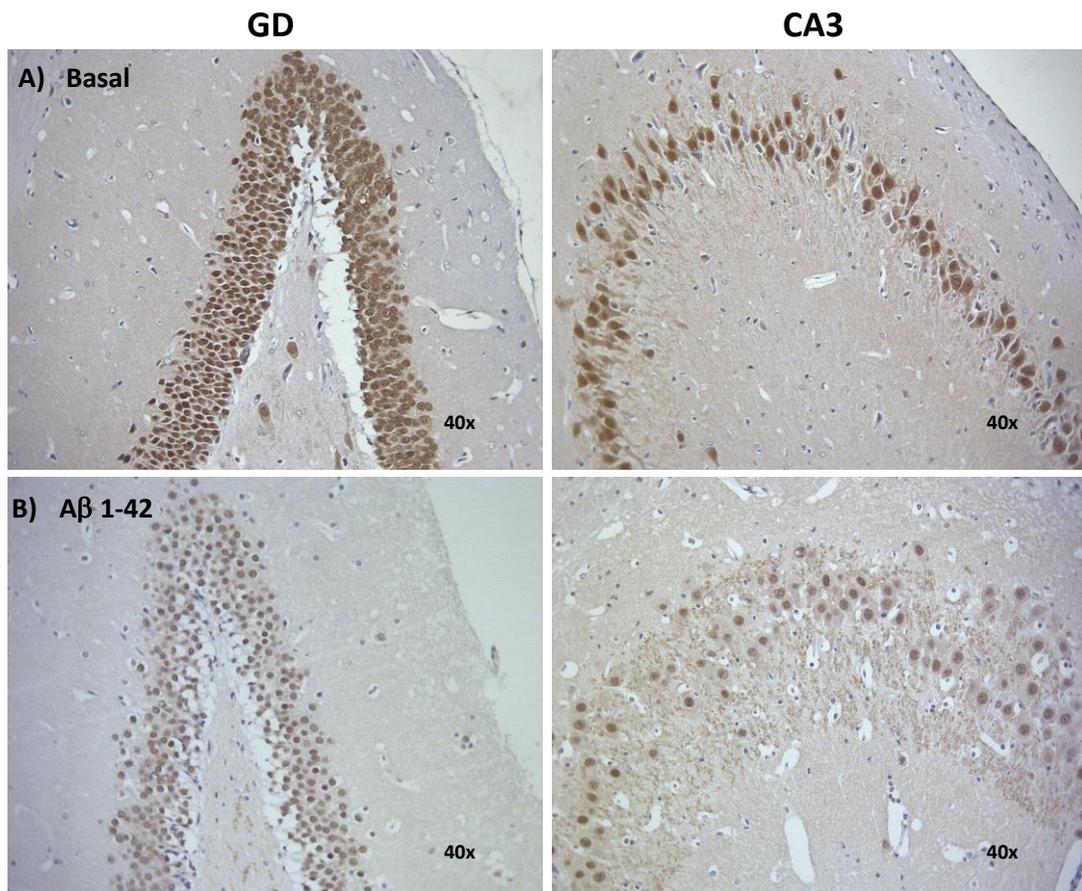


Figura 19 – Microfotografías con inmunohistoquímica para la proteína NeuN, en cerebro de rata, donde se observan los niveles basales de NeuN, en las regiones de GD y CA3 (A). Cerebro de ratas inyectadas con 100µM de Aβ1–42 (grupo 5)(B) y tejido de rata basal (grupo1).

Con el uso de este anticuerpo se pudo observar que en los grupos administrados previamente con AE (grupo 6) a las dosis de 10 y 15 mg/kg, tienen una disminución en la pérdida de la marca respecto al grupo sin previa administración de AE (grupo 5), aún se observan algunas células con núcleos picnóticos los cuales no son marcados por el anticuerpo disminuyéndose de esta manera la marca generada por este en los grupos 3 y 5 (SS y Aβ 1-42).

En el tejido de los animales administrados con 20 mg/kg de AE previamente (grupo 6), se observa una disminución aún mayor en la pérdida de la marca de NeuN, observándose una mayor densidad neuronal, así como ausencia de vacuolas y núcleos picnóticos en la región subgranular e hilus. También se observa preservación de la estructura tisular en GD y CA3 así como densidad neuronal equiparable a la del grupo basal (grupo 1)(Figura 20).

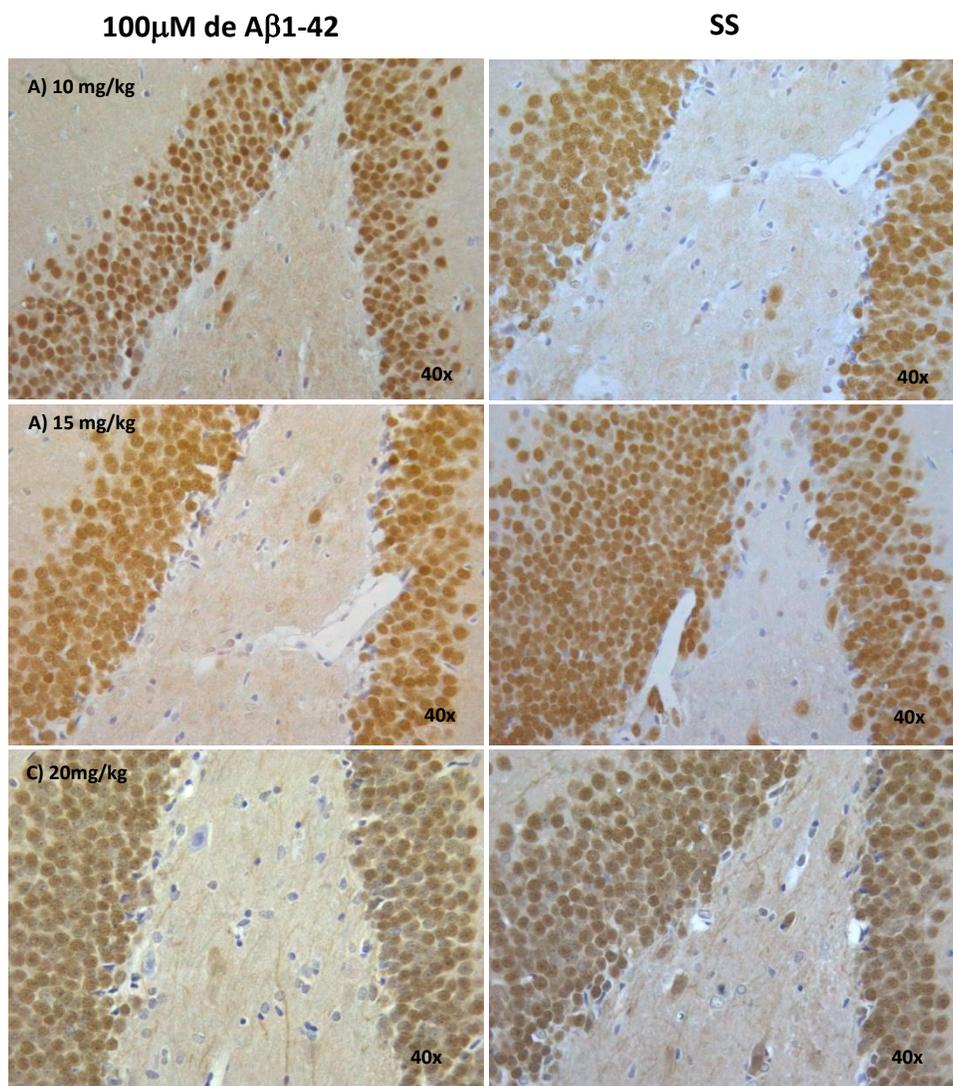


Figura 20 – Micrografías de inmunohistoquímica para NeuN en ratas administradas con diferentes dosis de AE. (A) 10mg/Kg, (B) 15 mg/kg y (C) 20mg/kg, previa a la cirugía estereotáctica con microinyección de SS (grupo 3) y 100 μ M de A β 1-42 (grupo 5).

100 μ M de A β 1-42

SS

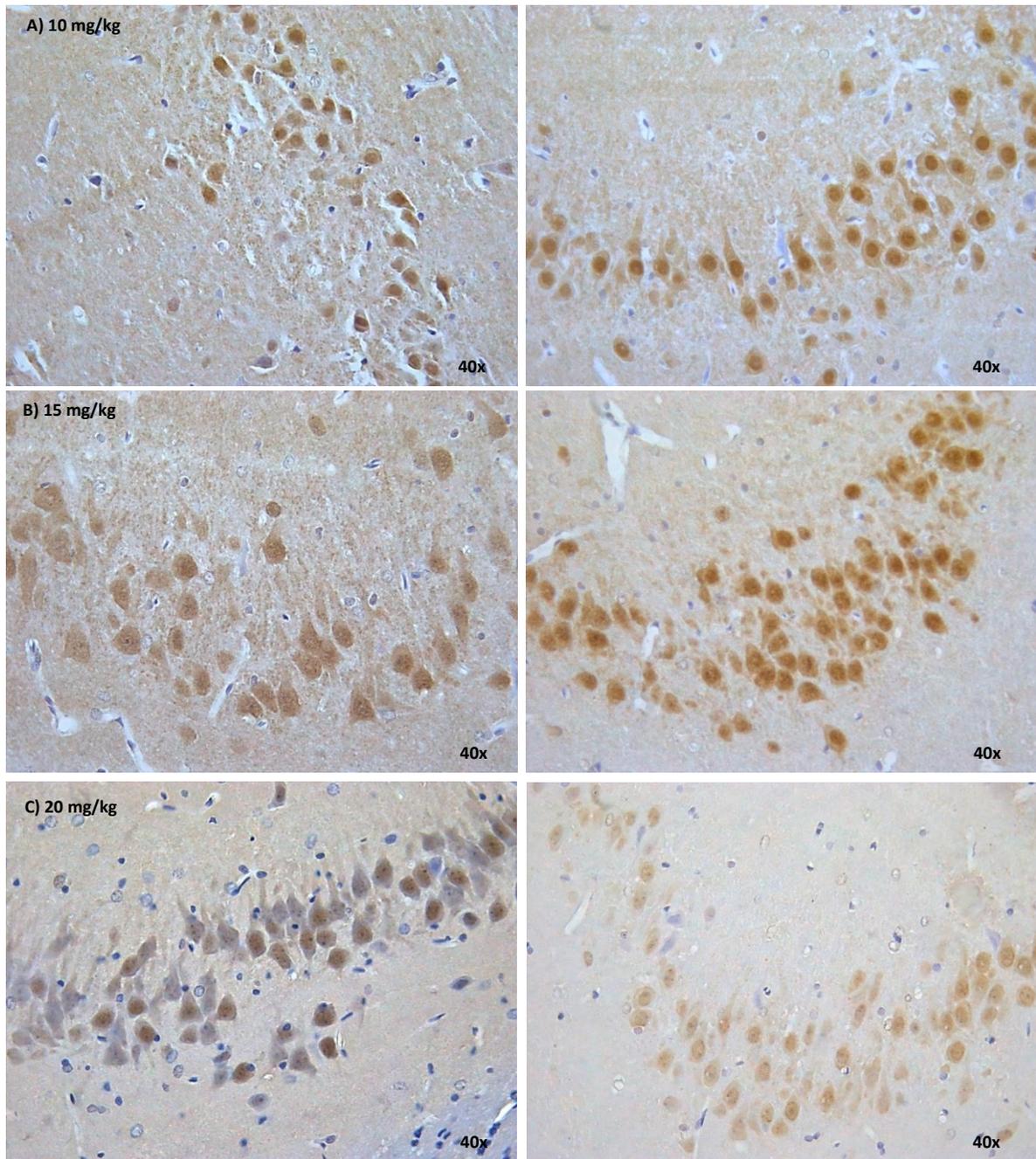


Figura 21- Micrografías de inmunohistoquímica para NeuN en la región CA3 de ratas administradas con diferentes dosis de AE. (A) 10mg/Kg, (B) 15 mg/kg y (C) 20mg/kg, de manera previa a la cirugía estereotáxica con SS (grupo 3) y 100 μ M de A β 1-42 (grupo 5).

Inmunohistoquímica con GFAP

La proteína ácida fibrilar glial (GFAP) es una proteína de filamento intermedio de 52kDa que se expresa en los astrocitos y su expresión se incrementa en situaciones de daño tisular.

Con base en lo anterior, se decidió evaluar la expresión de GFAP en la región de GD y CA3 del hipocampo, y se observó que ante la microinyección de A β 1-42 (grupo 5) existe un incremento en el número de células que expresan dicho marcador, el cual también se encuentra asociado con cambios en la morfología de las células, lo que señala la presencia de astrogliosis. Es importante señalar, que estos resultados se observaron mayoritariamente con microinyección del péptido A β 1-42 (Figura 22). Entre los cambios se observó lo esperado de acuerdo a los reportes previos consultados: engrosamiento de las prolongaciones de los astrocitos y pérdida de sus dominios, ya que se observa solapamiento de las prolongaciones de los astrocitos que se encuentran próximos.

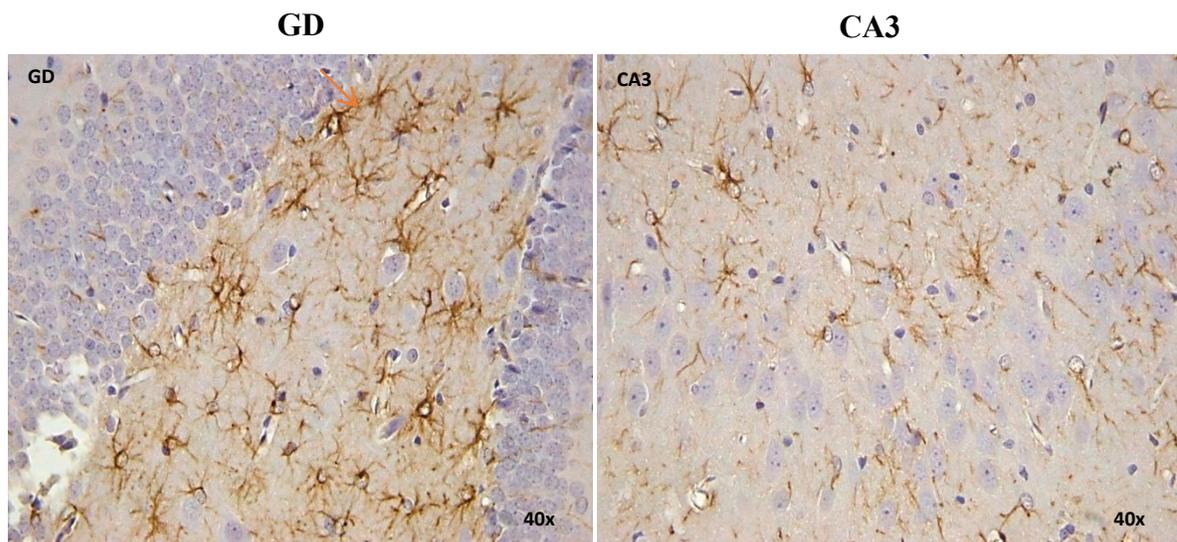


Figura 22- Micrografías que muestran la expresión de GFAP en cerebro de rata tratada con 100 μ M de A β (grupo 5), en distintas regiones del hipocampo; giro dentado (GD) y CA3. En la flecha naranja se muestra el solapamiento de los dominios de dos astrocitos.

A diferencia del grupo de A β 1-42, en el grupo 3 (SS), no se observaron cambios en la expresión del marcador ni en la morfología de las células para ninguna de las distintas regiones analizadas, algo muy similar a la expresión de esta proteína en condiciones basales (Figura 23-A).

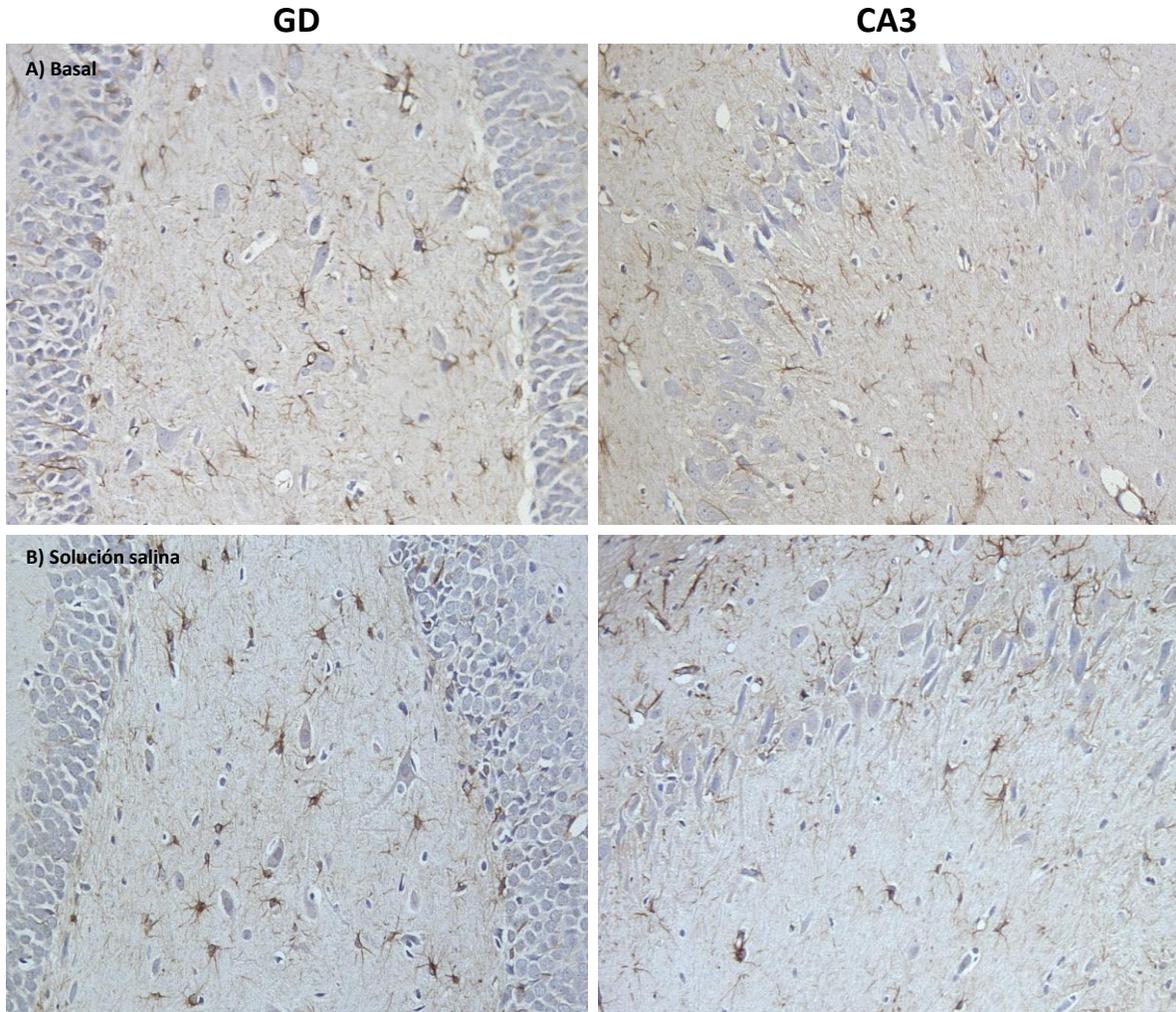


Figura 23 - Micrografías que muestran la expresión basal (grupo 1) de GFAP en cerebro de rata (A) y en ratas inyectadas con solución salina SS (grupo 3) (B) en distintas regiones del hipocampo; giro dentado (GD) y CA3.

La administración previa a la cirugía estereotáxica de AE por vía intraperitoneal a distintas dosis, permitió observar una disminución en la presencia de astrogliosis a las 3 dosis probadas. En el grupo de 10 mg/kg se observa una disminución en la marca de GFAP debida tanto a la disminución en el número de astrocitos como a la disminución en el grosor de sus prolongaciones. Su morfología con prolongaciones delgadas y con una expresión baja de GFAP es muy similar a la de astrocitos quiescentes. El dominio de cada astrocito se encuentra bien definido.

A dosis de 15 y 20 mg/kg se disminuye aún más la astrogliosis generada por el de A β , se observa disminución del número de astrocitos marcados respecto al grupo de 10 mg/kg y la morfología de todos ellos corresponde a la morfología quiescente de este tipo celular. Los dominios de todos los astrocitos marcados se encuentran bien definidos (Figura 24).

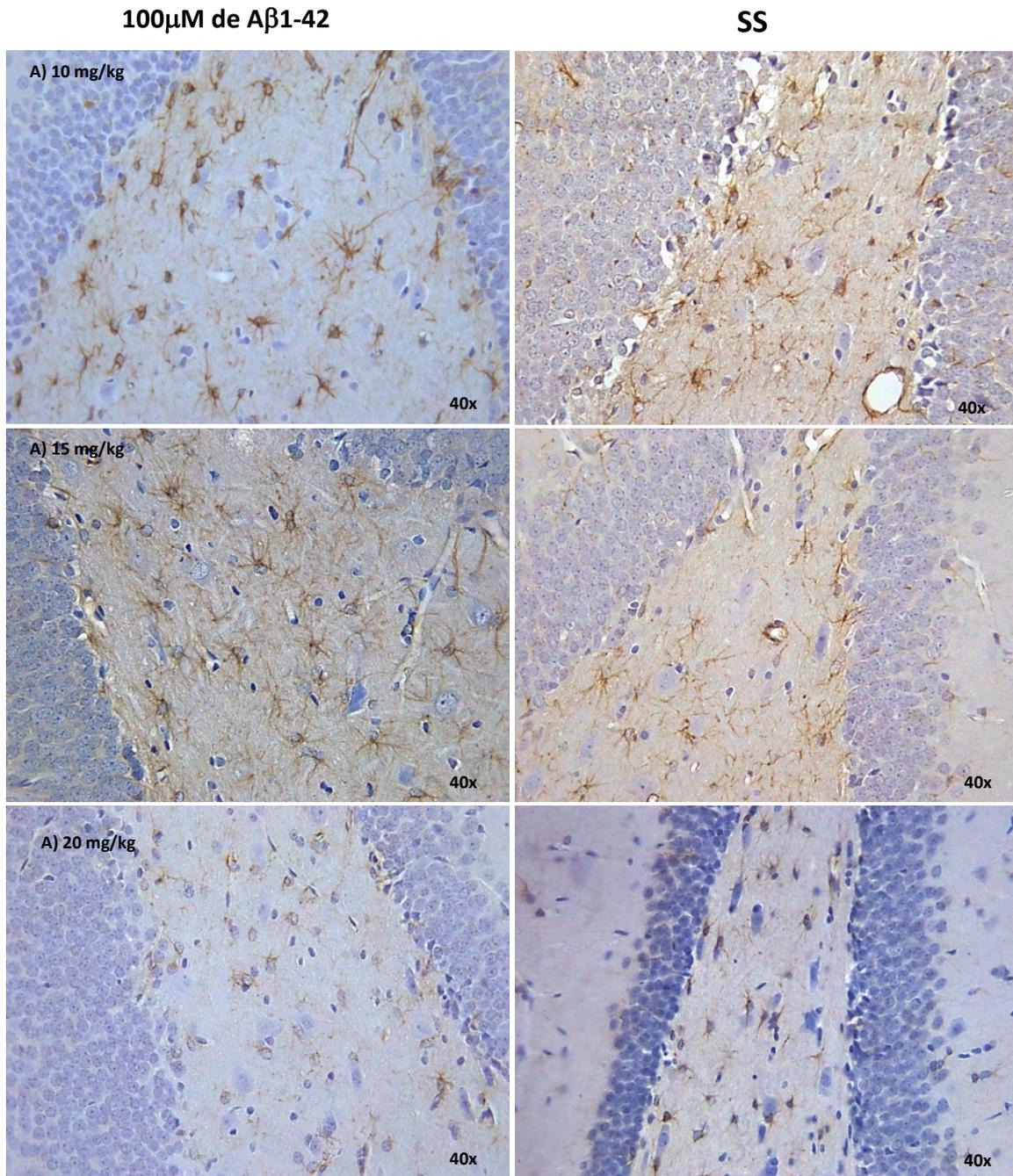


Figura 24 - Micrografías con inmunohistoquímica para GFAP en ratas administradas con diferentes dosis de AE. (A) 10mg/kg, (B) 15 mg/kg y (C) 20mg/kg, previa a la cirugía estereotáxica con SS y 100 μ M de A β 1-42. En los grupos administrados previamente con AE hay una disminución de astrocitos reactivos.

A l igual que en el GD, en la región CA3 se observa una disminución en la cantidad de astrocitos reactivos. Sin embargo, es importante señalar que a dosis de 20mg/kg la reducción en el número de astrocitos así como el mantenimiento de su estado quiescente es más evidente.

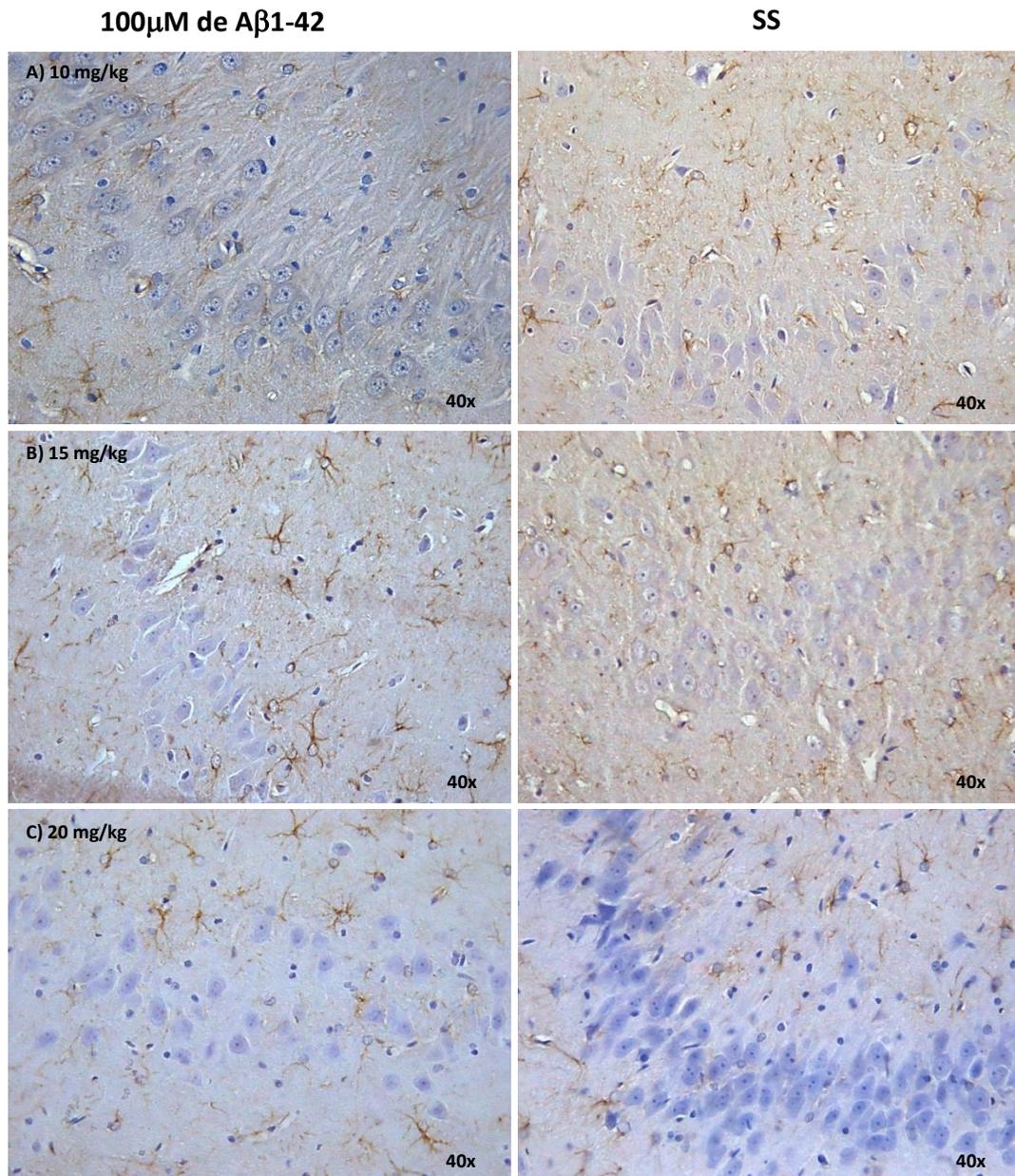


Figura 25 - Micrografías de inmunohistoquímicas para GFAP en ratas administradas con diferentes dosis de AE. (A) 10mg/Kg, (B) 15 mg/kg y (C) 20mg/kg, previa a la cirugía estereotáxica para administración de SS (grupo 3) y 100 μ M de A β 1-42 (grupo 5). En la región CA3 se observa una disminución en la reactividad de astrocitos en los grupos administrados previamente con AE.

La astrogliosis juega un papel muy importante en distintas patologías neurodegenerativas incluyendo la EA. Se sabe, que los astrocitos se vuelven disfuncionales y contribuyen a exacerbar el daño generado por los demás componentes patológicos presentes en la enfermedad. De esta manera, la disminución de la astrogliosis puede ser un blanco terapéutico para tratar la EA y otras enfermedades neurodegenerativas [175-177].

Inmunohistoquímica con Iba1

Iba 1 (ionized calcium binding adaptor molecule 1), es una proteína que se localiza específicamente en la microglia ramificada y por lo tanto juega un papel muy importante en la regulación de la función de la microglia. Los resultados obtenidos en el presente estudio, demostraron que la morfología de las células en el cerebro de ratas tratadas con A β 1-42; corresponde, a microglia ramificada que progresa hacia estadios reactivos ya que algunas de las células presentan prolongaciones engrosadas largas así como prolongaciones cortas con somas engrosados además de encontrarse en mayor número que en el tejido basal (grupo 1). Esta marca se observa aumentada de manera muy notoria en el grupo tratado con A β , a diferencia del grupo tratado con SS, donde las células positivas son de menor tamaño y las ramificaciones presentes no corresponden a las de la microglia activa [132, 168] (Figura 26).

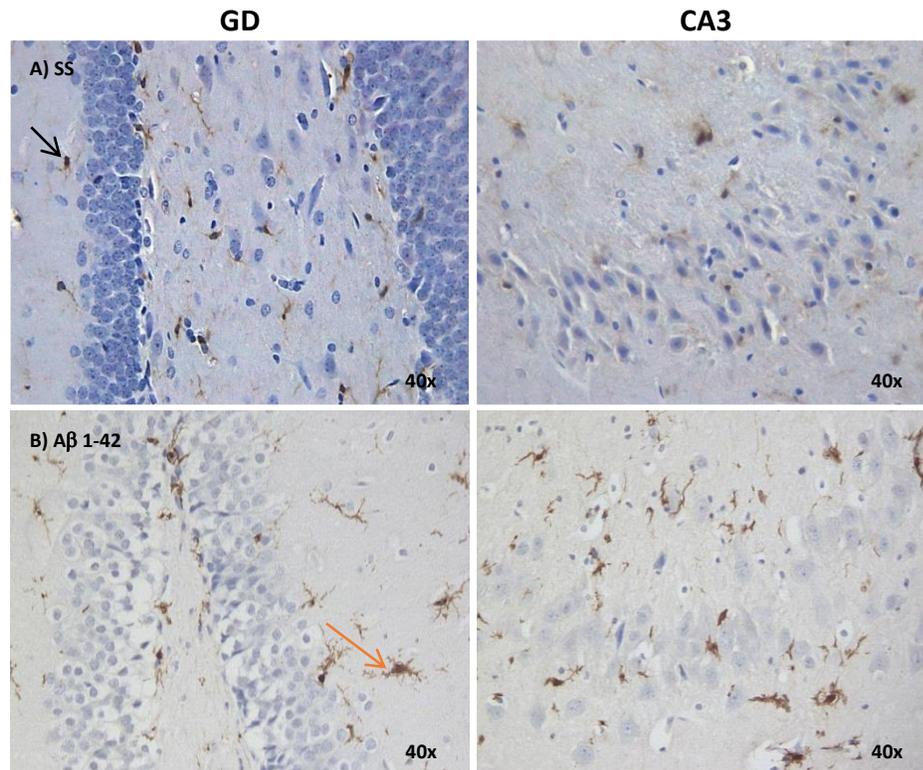


Figura 26. Micrografías que muestran la expresión de Iba 1 en GD y CA3 de cerebro de ratas tratadas con SS (grupo 3) (A) y 100 μ M de A β 1–42 (grupo 5) (B). La diferencia entre la morfología de las células de microglía con ramificaciones delgadas en el grupo 3 (SS)(flecha negra) y en el grupo 5 (A β 1–42)(flecha naranja) donde las prolongaciones se encuentran engrosadas y son más cortas son muy notorias.

Los cambios observados en las células gliales (astrocitos y microglia) en animales tratados con A β ya han sido reportados previamente en la literatura, entre estos cambios se reporta un aumento en la intensidad en la expresión de GFAP e IBA1 así como morfología de estadio reactivo en ambos tipos celulares.

La administración previa a la cirugía con AE a las 3 dosis probadas, dio como resultado una disminución en la expresión de Iba 1 así como conservación de la morfología quiescente de este tipo celular, un efecto similar al observado con la expresión de GFAP. A dosis bajas de AE (10mg/kg), aún se observa un incremento de la marca respecto al grupo basal (grupo 1) sin embargo la morfología de este tipo celular es más cercana a la de microglia quiescente a diferencia del grupo 5 que no se administró previamente con AE. Para las dosis de 15 y 20 mg/kg se observa una reducción bastante más evidente en el número de células, reactivas tanto en el grupo de SS como en el grupo de A β mostrando la totalidad de las células morfología quiescente. A la dosis de 20 mg/kg el marcaje se observa prácticamente indistinguible del grupo 1 (basal). El efecto es igual para las dos regiones analizadas (GS y CA3) (Figura 27 y Figura 28).

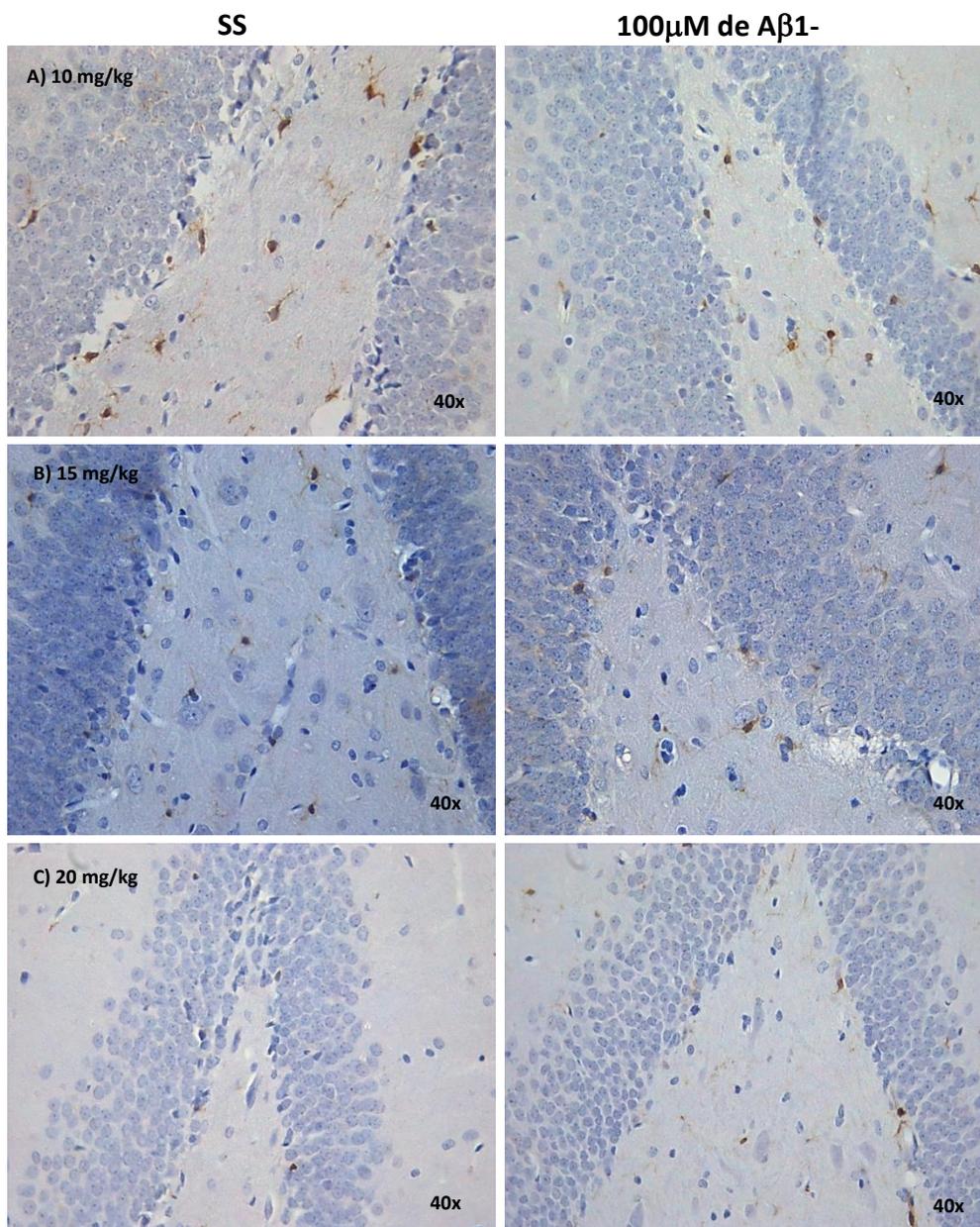


Figura 27 - Micrografías que muestran la expresión de Iba 1 en GD de cerebro de ratas tratadas con A β (grupo 6)(A) y SS (grupo 4) (B). Ratas administradas con diferentes dosis de AE (A) 10mg/Kg, (B) 15 mg/kg y (C) 20mg/kg, previa a la cirugía estereotáxica con SS y 100 μ M de A β 1-42. En los grupos administrados previamente con AE hay una evidente disminución de microglia reactiva que es mayor con el aumento de la dosis de AE.

Resultados similares, se observan en la región CA3 de hipocampo, haciendo evidente que la administración previa a la cirugía de AE, reduce en gran medida la respuesta inflamatoria observada, este efecto aumenta conforme aumenta la dosis (Figura 28).

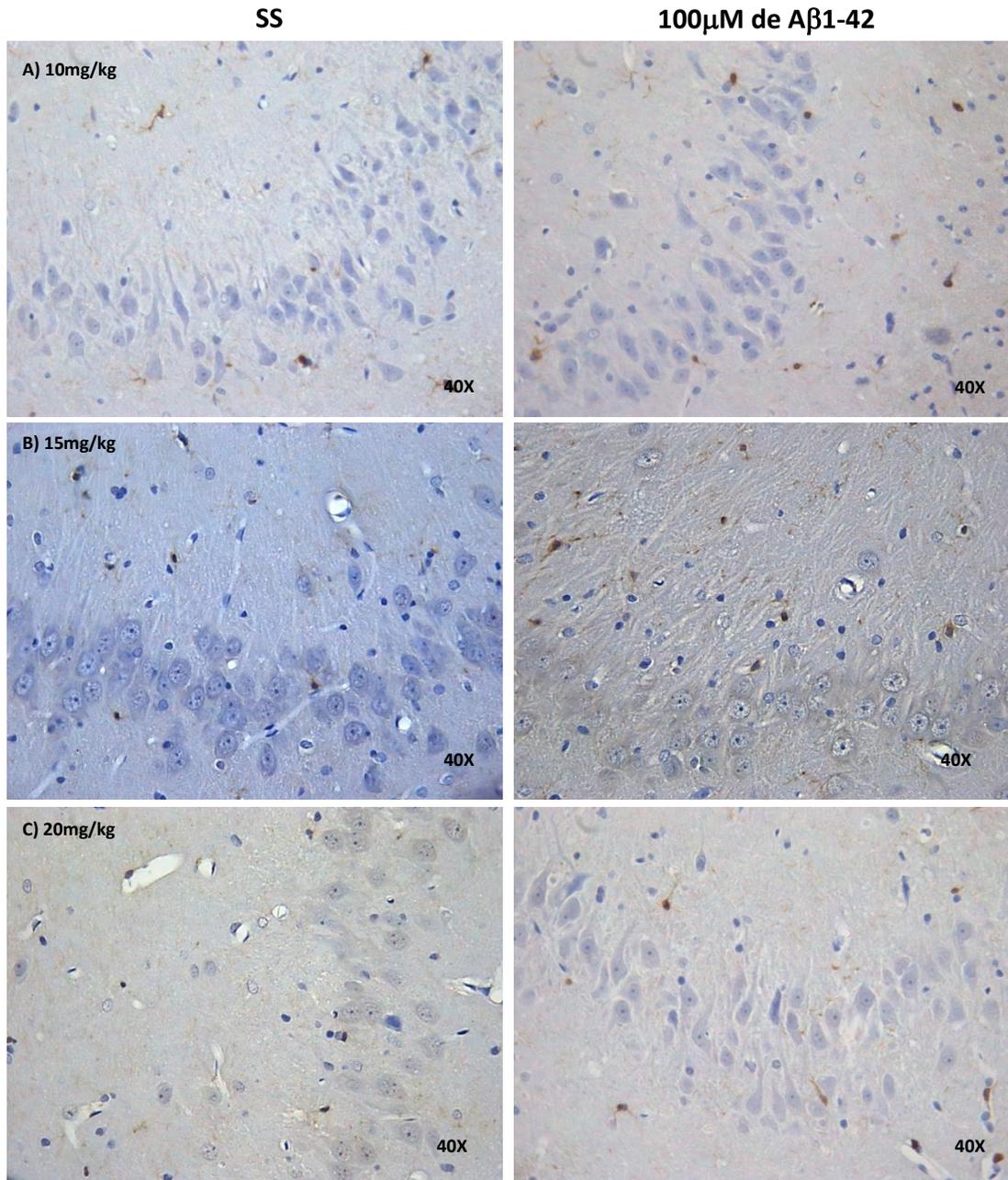


Figura 28. Micrografías que muestran la expresión de Iba 1 en CA3 de cerebro de ratas tratadas con A β (grupo 6) (A) y SS (grupo 4)(B). Ratas administradas con diferentes dosis de AE (A) 10mg/Kg, (B) 15 mg/kg y (C) 20mg/kg, previa a la cirugía estereotáxica con SS y 100 μ M de A β 1-42. En los grupos administrados previamente con AE hay una evidente disminución de microglia reactiva.

De esta manera, podemos observar que a administración previa a la cirugía de AE, parece disminuir el proceso de gliosis preferentemente a dosis de 15 y 20 mg/kg.

Al igual que para los astrocitos el aumento en el número y grado de activación de estas células durante la progresión de las enfermedades neurodegenerativas, generalmente se relaciona con un aumento en el daño y degeneración neuronal mediante el establecimiento de un proceso inflamatorio crónico y que contribuye de manera negativa a la protección y reparación del tejido circundante [129, 179].

Microscopía Confocal.

El uso de microscopía confocal, nos permitió observar de manera más clara el proceso de astrogliosis que está presente en los grupos inyectados con 100 μ M de Ab1-42 y SS. Como podemos observar en la figura 29, la expresión de GFAP e Iba1 en el grupo control (basal) es baja y la estructura del hipocampo se observa conservada

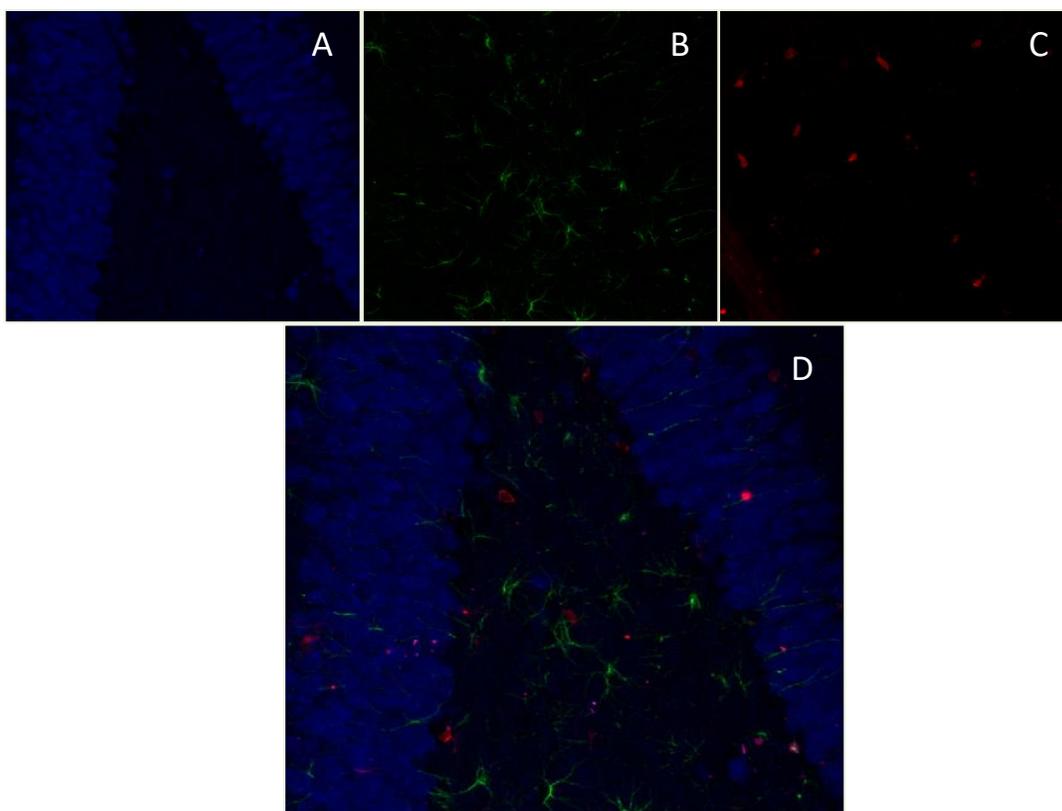


Figura 29 - Microscopía confocal que muestra la expresión basal de GFAP (grupo 1)(B) e Iba 1 (C) en hipocampo de rata. En azul (A) se muestran los núcleos de las neuronas del GD, evidenciadas con el anticuerpo anti-NeuN y en (D) la sobreposición de los tres canales

Al igual que en el grupo control (Figura 29) la administración de AE (20mg/kg), el número de astrocitos y microglia es bajo en las distintas regiones analizadas (Figura 30).

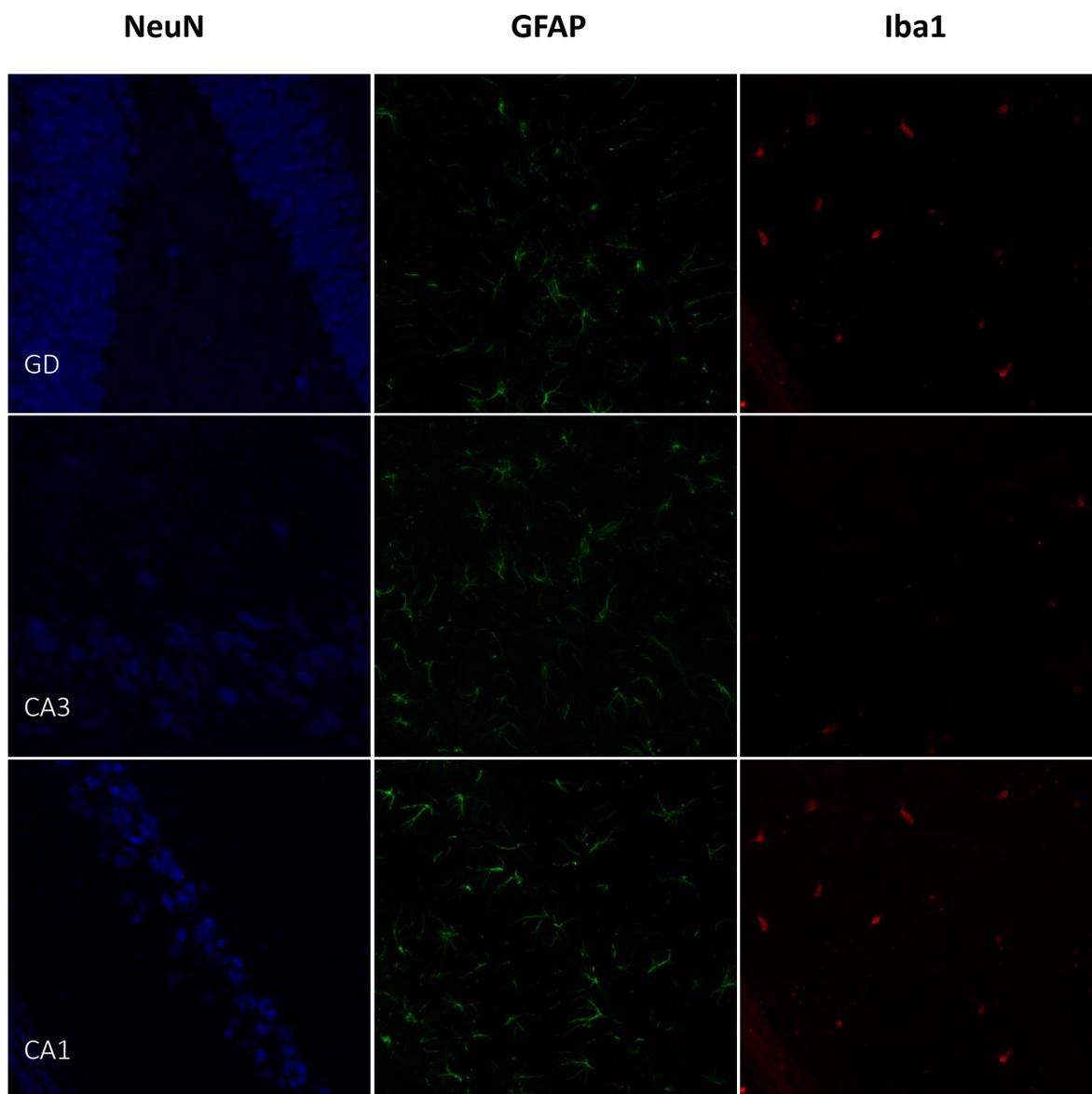


Figura 30 - Microscopía confocal que muestra la expresión de GFAP (B) e Iba 1 (C) en hipocampo de rata en el grupo 2 (20mg/kg AE). En azul (A) se muestran los núcleos de las neuronas del GD, evidenciadas con el anticuerpo anti-NeuN y en (D) la sobreposición de los tres canales.

De manera contraria, en los grupos inyectados con A β y SS, el número de astrocitos y microglia se incrementan de manera significativa, siendo más evidentes en las ratas tratadas con 100 μ M de A β 1–42 (Figura 31).

Como podemos observar, aunque ambos grupos presentan un incremento en la presencia de astrocitos y microglia; la morfología de estas células es distinta en ambos grupos, siendo sus prolongaciones y soma más gruesos, en el grupo inyectado con A β 1-42.

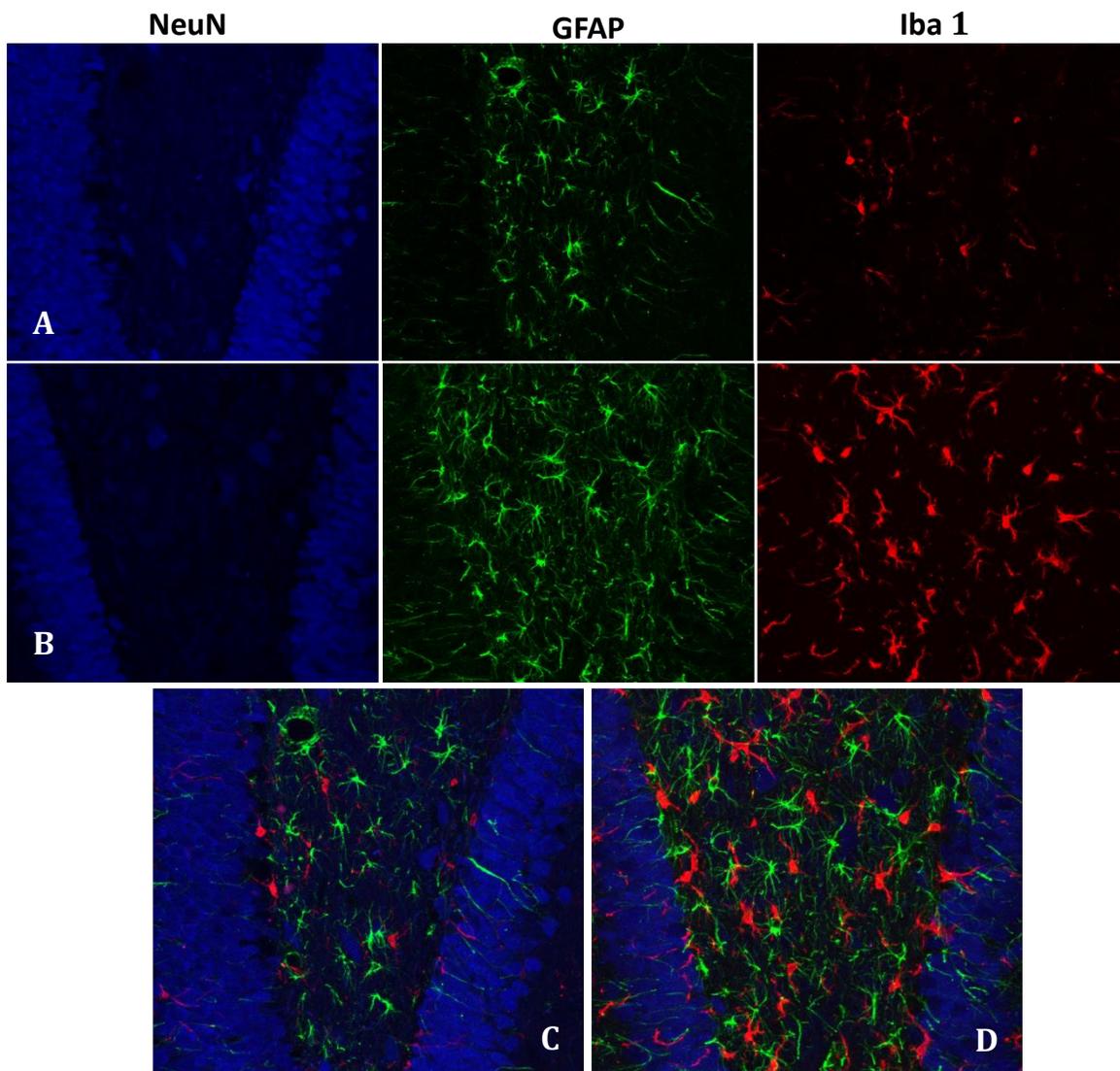


Figura 31. Microscopía confocal de cerebro de rata tratados con SS (grupo 3)(A) y 100mM de A β 1-42(grupo 5) (B). La presencia de astrogliosis fue evidenciada mediante el uso del anticuerpo anti-GFAP (verde) y la microglia con el anticuerpo anti-Iba 1 (rojo). En azul, se observan los núcleos de las neuronas evidenciados con el anticuerpo anti-NeuN. En el extremo derecho se observa la sobreposición de los 3 canales.

En la Figura 32, se puede observar claramente, mediante microscopía confocal la reducción en la astrogliosis; cuando se administran 20mg/kg de AE previos a la cirugía estereotáxica en ratas tratadas con SS.

GIRO DENTADO (1 μ l SS)

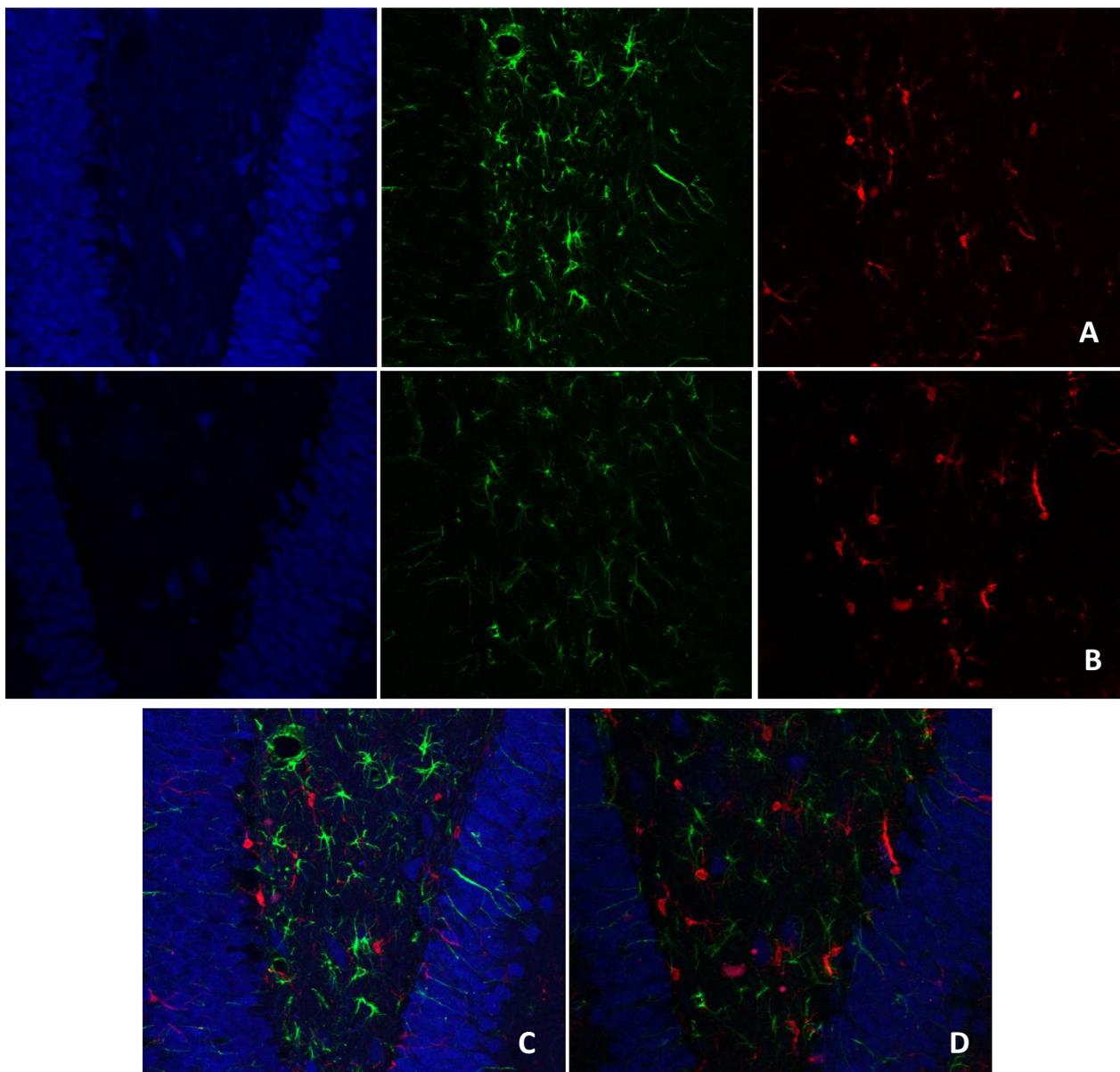


Figura 32 - Microscopía confocal de cerebro de rata administradas con SS, y tratadas con AE 20mg/kg (B). La presencia de astrogliosis fue evidenciada mediante el uso del anticuerpo anti-GFAP (verde) y la microglia con el anticuerpo anti-Iba 1 (rojo). En azul, se observan los núcleos de las neuronas evidenciados con el anticuerpo anti-NeuN. En (A) se muestran animales no tratados con AE, se observa una mayor presencia de astrocitos y microglia activa. En (C) y (D), se observa la sobreposición de todos los canales en los distintos tratamientos

A diferencia de grupo con SS, el grupo de animales administrados con A β 1-42, presenta una astrogliosis más evidente. La morfología de los astrocitos difiere mucho del grupo control (SS), (Figura 32)), así como del grupo sin previa administración de AE tanto en la cantidad de astrocitos como en el nivel de activación (Figura 33).

GIRO DENTADO (100 μ M A β 142)

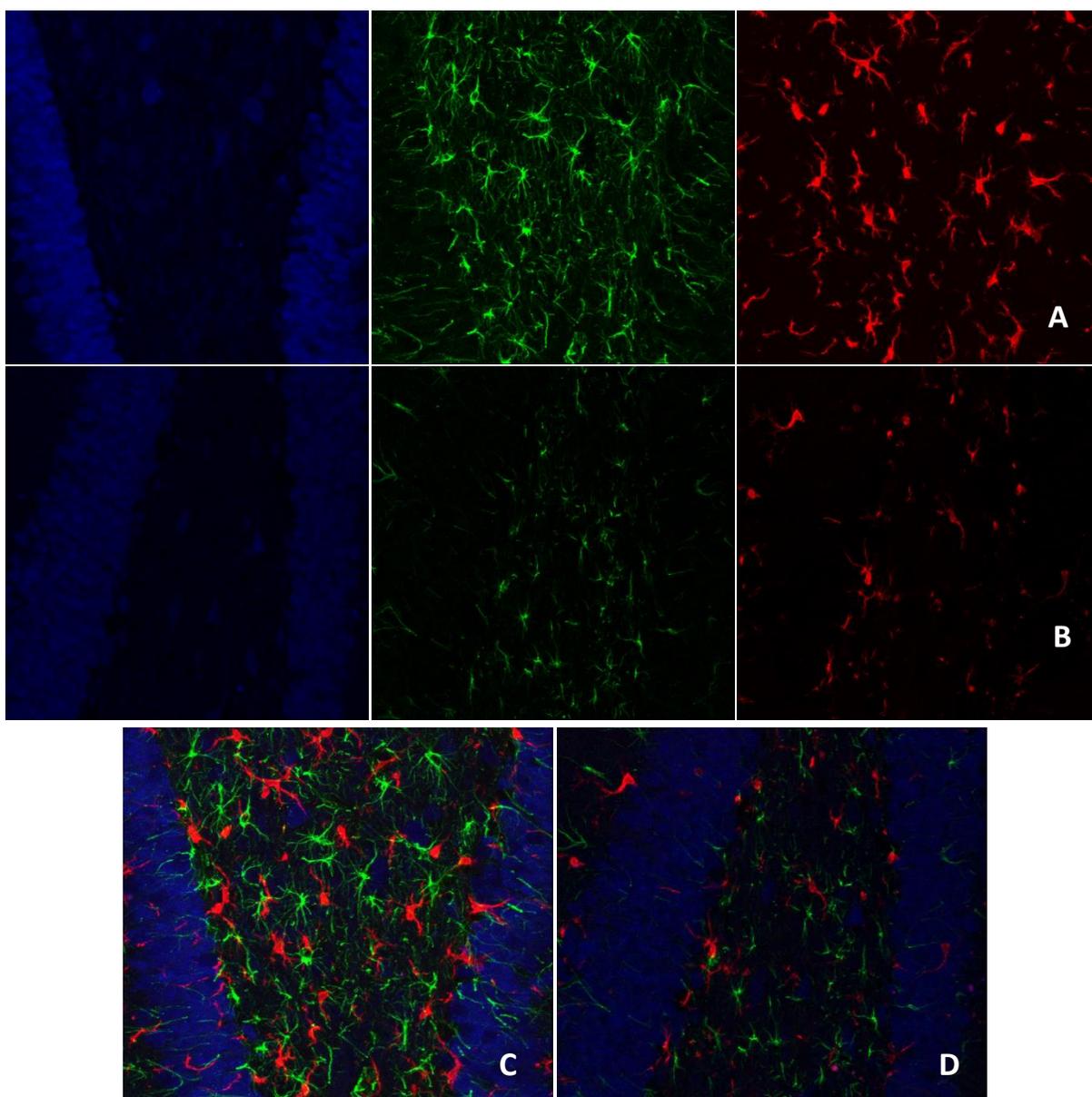


Figura 33 - Microscopía confocal de giro dentado de cerebro de rata pre-tratados con AE 20mg/kg (B) y administrados con 100 μ M de A β 1-42. La presencia de astrogliosis fue evidenciada mediante el uso del

anticuerpo anti-GFAP (verde) y la microglia con el anticuerpo anti-Iba 1 (rojo). En azul, se observan los núcleos de las neuronas evidenciados con el anticuerpo anti-NeuN. En (A) se muestran animales no tratados con AE, se observa una mayor presencia de astrocitos y microglia activa. En (C) y (D), se observa la sobreposición de todos los canales en los distintos tratamientos

Resultados similares fueron observados en corteza/CA1 y región CA3 del hipocampo (Figura 34 y Figura 35).

CORTEZA/CA1 (100 μ M A β 1-42)

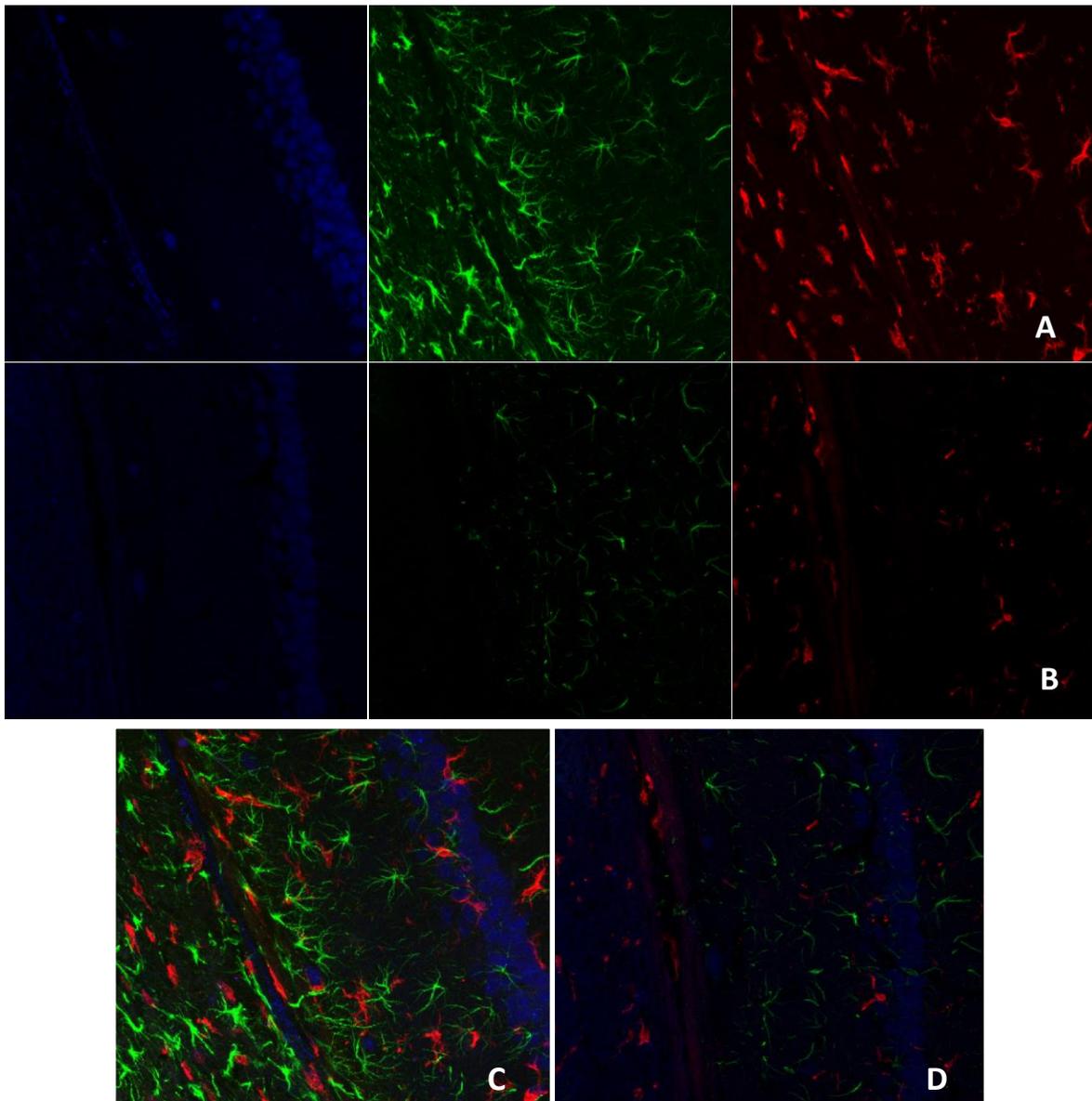


Figura 34 - Microscopía confocal de la corteza/CA1 de cerebro de rata pre-tratados con AE 20mg/kg (B) y administrados con 100 μ M de A β 1-42 (grupo 6) y sin administración previa de AE (A). La presencia de astrogliosis fue evidenciada mediante el uso del anticuerpo anti-GFAP (verde) y la microglia con el anticuerpo anti-Iba 1 (rojo). En azul, se observan los núcleos de las neuronas evidenciados con el anticuerpo anti-NeuN. En (A) se muestran animales no tratados con AE, se observa una mayor presencia de astrocitos y microglia activa. En (C) y (D), se observa la sobreposición de todos los canales en los distintos tratamientos

CA3 (100 μ M A β 1-42)

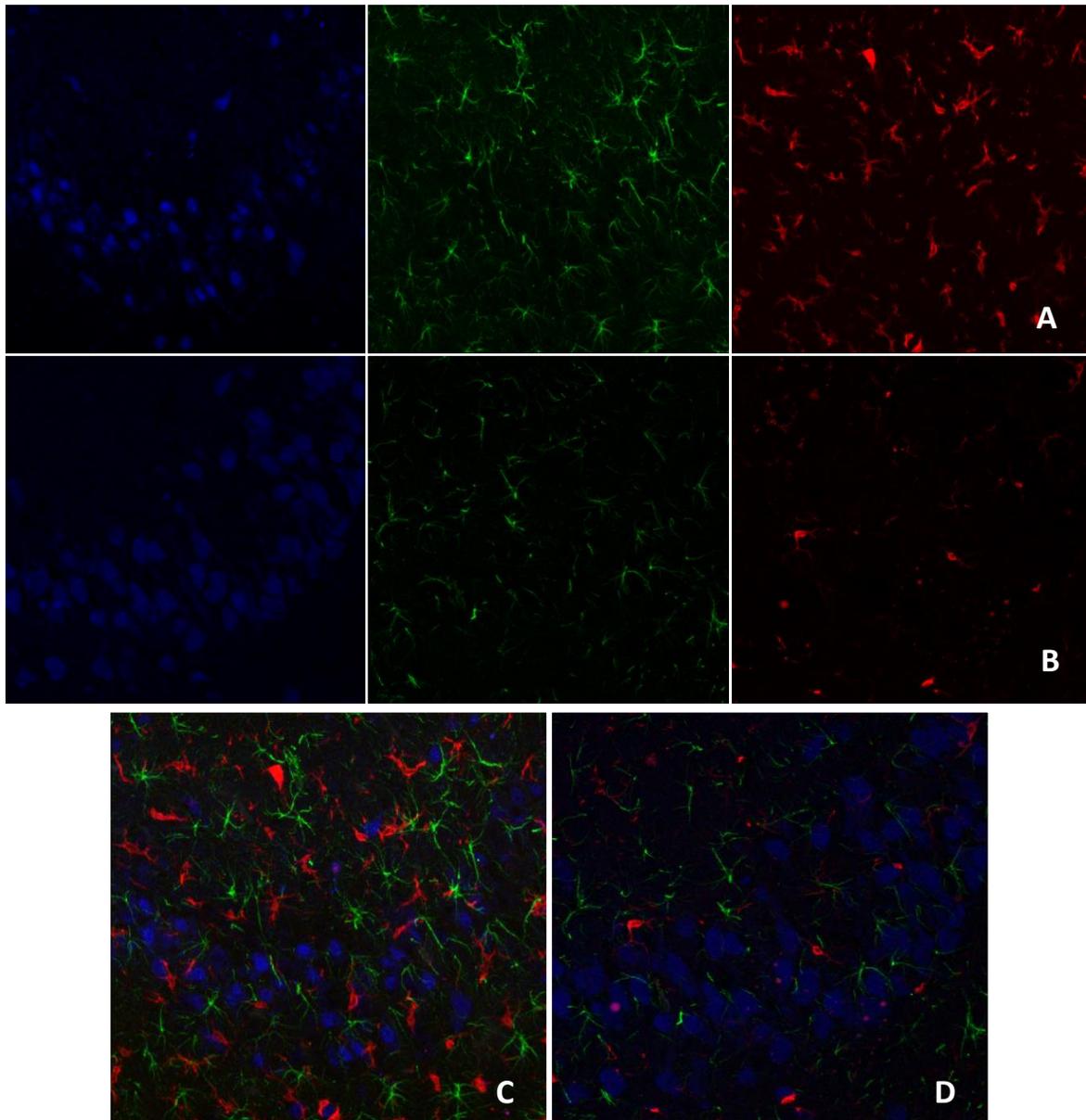


Figura 35 - Microscopía confocal de la región CA3 de cerebro de rata pre-tratados con AE 20mg/kg (B) y administrados con 100 μ M de A β 1-42 (grupo 6) y sin administración previa de AE (grupo 5). La presencia de astrogliosis fue evidenciada mediante el uso del anticuerpo anti-GFAP (verde) y la microglia con el anticuerpo anti-Iba 1 (rojo). En azul, se observan los núcleos de las neuronas evidenciados con el anticuerpo

anti-NeuN. En (A) se muestran animales no tratados con AE, se observa una mayor presencia de astrocitos y microglia activa. En (C) y (D), se observa la sobreposición de todos los canales en los distintos tratamientos

De acuerdo a los estudios que se consultaron para la realización de este trabajo, o a los usos dados a distintas especies de *Ipomoea* en la medicina tradicional; este género ha demostrado tener efecto inmunomodulador. Diversas fracciones de estos organismos han mostrado tener efectos positivos. En el modelo estudiado en este trabajo, la administración previa a la cirugía de ácido escamónico mostró tener efectos positivos esperados mediante la reducción de la gliosis.

Esta hipótesis se validó al observar que los grupos tratados con distintas dosis de este glicolípido, había una reducción en la densidad y grado de activación tanto de astrocitos como de células de la microglía; siendo este efecto mayor a dosis de 20 mg/kg. La disminución en la activación de ambos tipos celulares, puede contribuir también a la preservación del tejido ya que como se mencionó previamente el proceso inflamatorio agudo, habitualmente exacerba al daño generado -en este caso- por la inyección intracerebral del A β 1-42.

Se ha reportado previamente, que el proceso inflamatorio agudo, es capaz por sí mismo de generar neurodegeneración tras la inyección intrahipocampal de LPS. La administración de LPS, induce una respuesta inflamatoria severa [180], la cual puede verse disminuida mediante el uso de memantina [181].

Por otro lado, los resultados obtenidos tras la administración de ácido escamónico en relación con la activación de células gliales, es evidente en el presente estudio. Existe una disminución considerable en el proceso neurodegenerativo ocasionado por el Ab, mediante la disminución del proceso inflamatorio. Sin embargo, para dilucidar los mecanismos por lo que esto ocurre, se necesitan realizar más estudios.

Debido a la estructura glicolípida de la molécula y basándonos en bibliografía reportada, existe la posibilidad de que interactúe directamente con el péptido A β 1-42 en su dominio de unión a esfingolípidos, de manera similar a como lo hace el gangliósido 1 [162]. Sin embargo, a diferencia de éste que permite la unión del péptido a las membranas celulares y favorece su proceso de agregación, el AE por los resultados

obtenidos podría actuar de manera distinta evitando que el péptido interactúe ya sea con las células gliales disminuyendo de esta manera la respuesta inflamatoria que generen o directamente con las neuronas y de esta manera disminuyendo los efectos adversos generados por el péptido en estas.

También es importante realizar estudios a tiempos más largos para determinar si el efecto de esta molécula, puede tener un efecto similar al observado en fases más avanzadas. Se necesita también estudiar a fondo las implicaciones que puede tener la disminución observada en la respuesta inflamatoria ya que como se mencionó anteriormente puede también estar implicada en procesos de reparación y recuperación de la homeostasis.

10 - Conclusiones

- La administración previa del ácido escamónico a las distintas dosis probadas tiene un efecto positivo tras la inyección intrahipocampal de A β 1-42. Esto se observa como una reducción en el daño observado principalmente en la región de GD aunque también se observó en CA3 y es más notorio a la dosis de 20 mg/kg. También se observa una reducción en el daño en el grupo inyectado con solución salina.
- A las 3 dosis probadas se observó una disminución en la gliosis (astrocitos y microglía) observada en el grupo inyectado con amiloide y en menor medida en el de solución salina.

11 - Bibliografía

1. Hilton, D.A. and A.G. Shivane, *Neuropathology simplified*. 2015, Springer International Publishing Switzerland.
2. Shastri, B.S., *Neurodegenerative disorders of protein aggregation*. *Neurochem Int*, 2003. **43**(1): p. 1-7.
3. Williams, A., *Defining neurodegenerative diseases*. *BMJ*, 2002. **324**(7352): p. 1465-6.
4. Suchowersky, O.C., Cynthia, *Hyperkinetic movement disorders*, O.C. Suchowersky, Cynthia, Editor. 2012, Springer Science+Business Media
5. Madhuri, B.P., Gupta, *Akinetic rigid syndrome: an overview*. *Annals of Indian Academy of Neurology*, 2007. **10**: p. 21--30.
6. Talbot, K., *Motor neurone disease*. *Postgrad Med J*, 2002. **78**(923): p. 513-9.
7. Subramony, S.H., *Approach to ataxic diseases*. *Handb Clin Neurol*, 2012. **103**: p. 127-34.
8. Prince, M.W., Anders; Guerchet, Maëlen; Claire-Ali, Gemma; Wu, Yu-Tzu; Prinna, Matthew, *World Alzheimer Report 2015*, Alzheimer Disease International.
9. Serrano-Pozo, A., et al., *Neuropathological alterations in Alzheimer disease*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2011. **1**(1): p. a006189.
10. Perl, D.P., *Neuropathology of Alzheimer's disease*. *Mt Sinai J Med*, 2010. **77**(1): p. 32-42.
11. Yamaguchi, H., et al., *Diffuse type of senile plaques in the brains of Alzheimer-type dementia*. *Acta Neuropathol*, 1988. **77**(2): p. 113-9.
12. Dickson, T.C. and J.C. Vickers, *The morphological phenotype of beta-amyloid plaques and associated neuritic changes in Alzheimer's disease*. *Neuroscience*, 2001. **105**(1): p. 99-107.
13. Cras, P., et al., *Neuronal and microglial involvement in beta-amyloid protein deposition in Alzheimer's disease*. *Am J Pathol*, 1990. **137**(2): p. 241-6.
14. Stalder, M., et al., *Association of microglia with amyloid plaques in brains of APP23 transgenic mice*. *Am J Pathol*, 1999. **154**(6): p. 1673-84.
15. Masliah, E., et al., *Diffuse plaques do not accentuate synapse loss in Alzheimer's disease*. *Am J Pathol*, 1990. **137**(6): p. 1293-7.
16. Meyer-Luehmann, M., et al., *Rapid appearance and local toxicity of amyloid-beta plaques in a mouse model of Alzheimer's disease*. *Nature*, 2008. **451**(7179): p. 720-4.
17. Bittner, T., et al., *Amyloid plaque formation precedes dendritic spine loss*. *Acta Neuropathol*, 2012. **124**(6): p. 797-807.
18. Coleman, P.D. and P.J. Yao, *Synaptic slaughter in Alzheimer's disease*. *Neurobiol Aging*, 2003. **24**(8): p. 1023-7.
19. Koffie, R.M., et al., *Oligomeric amyloid beta associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(10): p. 4012-7.
20. Serrano-Pozo, A., et al., *Stable size distribution of amyloid plaques over the course of Alzheimer disease*. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2012. **71**(8): p. 694-701.
21. Giulian, D., et al., *Senile plaques stimulate microglia to release a neurotoxin found in Alzheimer brain*. *Neurochem Int*, 1995. **27**(1): p. 119-37.
22. Grundke-Iqbal, I., et al., *Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986. **83**(13): p. 4913-7.
23. Hampel, H., et al., *Total and phosphorylated tau protein as biological markers of Alzheimer's disease*. *Exp Gerontol*, 2010. **45**(1): p. 30-40.
24. Eckermann, K., et al., *The beta-propensity of Tau determines aggregation and synaptic loss in inducible mouse models of tauopathy*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(43): p. 31755-65.

25. Kolarova, M., et al., *Structure and pathology of tau protein in Alzheimer disease*. Int J Alzheimers Dis, 2012. **2012**: p. 731526.
26. Friedhoff, P., et al., *Structure of tau protein and assembly into paired helical filaments*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1502**(1): p. 122-32.
27. Kidd, M., *Alzheimer's Disease--an Electron Microscopical Study*. Brain, 1964. **87**: p. 307-20.
28. Glenner, G.G., E.D. Eanes, and D.L. Page, *The relation of the properties of Congo red-stained amyloid fibrils to the -conformation*. J Histochem Cytochem, 1972. **20**(10): p. 821-6.
29. Arriagada, P.V., et al., *Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease*. Neurology, 1992. **42**(3 Pt 1): p. 631-9.
30. Meraz-Rios, M.A., et al., *Tau oligomers and aggregation in Alzheimer's disease*. J Neurochem, 2010. **112**(6): p. 1353-67.
31. Buee, L., et al., *Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders*. Brain Res Brain Res Rev, 2000. **33**(1): p. 95-130.
32. Li, W. and V.M. Lee, *Characterization of two VQIXXK motifs for tau fibrillization in vitro*. Biochemistry, 2006. **45**(51): p. 15692-701.
33. Lee, H.G., et al., *Tau phosphorylation in Alzheimer's disease: pathogen or protector?* Trends Mol Med, 2005. **11**(4): p. 164-9.
34. Rapoport, M., et al., *Tau is essential to beta -amyloid-induced neurotoxicity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(9): p. 6364-9.
35. Haass, C. and E. Mandelkow, *Fyn-tau-amyloid: a toxic triad*. Cell, 2010. **142**(3): p. 356-8.
36. Iglesias, J.E., et al., *A computational atlas of the hippocampal formation using ex vivo, ultra-high resolution MRI: Application to adaptive segmentation of in vivo MRI*. Neuroimage, 2015. **115**: p. 117-37.
37. Scoville, W.B. and B. Milner, *Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1957. **20**(1): p. 11-21.
38. Vargha-Khadem, F., et al., *Differential effects of early hippocampal pathology on episodic and semantic memory*. Science, 1997. **277**(5324): p. 376-80.
39. Bunsey, M. and H. Eichenbaum, *Conservation of hippocampal memory function in rats and humans*. Nature, 1996. **379**(6562): p. 255-7.
40. Eichenbaum, H., et al., *Functional organization of the hippocampal memory system*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(24): p. 13500-7.
41. Bliss, T.V. and G.L. Collingridge, *A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus*. Nature, 1993. **361**(6407): p. 31-9.
42. Herring, B.E. and R.A. Nicoll, *Long-Term Potentiation: From CaMKII to AMPA Receptor Trafficking*. Annu Rev Physiol, 2016. **78**: p. 351-65.
43. Sheng, M. and A. Erturk, *Long-term depression: a cell biological view*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2014. **369**(1633): p. 20130138.
44. Knierim, J.J., *The hippocampus*. Curr Biol, 2015. **25**(23): p. R1116-21.
45. White, W.F., et al., *Glutamate as transmitter of hippocampal perforant path*. Nature, 1977. **270**(5635): p. 356-7.
46. Germroth, P., W.K. Schwerdtfeger, and E.H. Buhl, *GABAergic neurons in the entorhinal cortex project to the hippocampus*. Brain Res, 1989. **494**(1): p. 187-92.
47. Doller, H.J. and F.F. Weight, *Perforant pathway activation of hippocampal CA1 stratum pyramidale neurons: electrophysiological evidence for a direct pathway*. Brain Res, 1982. **237**(1): p. 1-13.
48. Frotscher, M., E. Soriano, and U. Misgeld, *Divergence of hippocampal mossy fibers*. Synapse, 1994. **16**(2): p. 148-60.

49. Collingridge, G.L., S.J. Kehl, and H. McLennan, *Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus*. J Physiol, 1983. **334**: p. 33-46.
50. Andersen, P., et al., *Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways*. Acta Physiol Scand, 1969. **76**(1): p. 4A-5A.
51. Sloviter, R.S. and T. Lomo, *Updating the lamellar hypothesis of hippocampal organization*. Front Neural Circuits, 2012. **6**: p. 102.
52. Hussein, A.A.W. and N.T. George, *Histological and Morphological Analysis of the Hippocampal Subfields in the Adult Rat*. Journal of the Faculty of Medicine of Baghdad, 2009. **51**(3): p. 323-328.
53. Amaral, D.G., H.E. Scharfman, and P. Lavenex, *The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies)*. Prog Brain Res, 2007. **163**: p. 3-22.
54. Bayer, S.A., *Development of the hippocampal region in the rat. I. Neurogenesis examined with 3H-thymidine autoradiography*. J Comp Neurol, 1980. **190**(1): p. 87-114.
55. Cameron, H.A., et al., *Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat*. Neuroscience, 1993. **56**(2): p. 337-44.
56. Kempermann, G., H. Song, and F.H. Gage, *Neurogenesis in the Adult Hippocampus*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2015. **5**(7): p. a018812.
57. Rao, M.S. and A.K. Shetty, *Efficacy of doublecortin as a marker to analyse the absolute number and dendritic growth of newly generated neurons in the adult dentate gyrus*. Eur J Neurosci, 2004. **19**(2): p. 234-46.
58. Sisodia, S.S., *Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(13): p. 6075-9.
59. Choy, R.W., Z. Cheng, and R. Schekman, *Amyloid precursor protein (APP) traffics from the cell surface via endosomes for amyloid beta (A β) production in the trans-Golgi network*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(30): p. E2077-82.
60. Asai, M., et al., *Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP alpha-secretase*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **301**(1): p. 231-5.
61. Tang, B.L., *Alzheimer's disease: channeling APP to non-amyloidogenic processing*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **331**(2): p. 375-8.
62. De Strooper, B. and W. Annaert, *Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein*. J Cell Sci, 2000. **113 (Pt 11)**: p. 1857-70.
63. Cole, S.L. and R. Vassar, *The Basic Biology of BACE1: A Key Therapeutic Target for Alzheimer's Disease*. Curr Genomics, 2007. **8**(8): p. 509-30.
64. von Einem, B., et al., *The Golgi-Localized gamma-Ear-Containing ARF-Binding (GGA) Proteins Alter Amyloid-beta Precursor Protein (APP) Processing through Interaction of Their GAE Domain with the Beta-Site APP Cleaving Enzyme 1 (BACE1)*. PLoS One, 2015. **10**(6): p. e0129047.
65. Perez, R.G., S.L. Squazzo, and E.H. Koo, *Enhanced release of amyloid beta-protein from codon 670/671 "Swedish" mutant beta-amyloid precursor protein occurs in both secretory and endocytic pathways*. J Biol Chem, 1996. **271**(15): p. 9100-7.
66. Ehehalt, R., et al., *Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts*. J Cell Biol, 2003. **160**(1): p. 113-23.
67. Catania, C., et al., *The amyloidogenic potential and behavioral correlates of stress*. Mol Psychiatry, 2009. **14**(1): p. 95-105.

68. Crescenzi, O., et al., *Solution structure of the Alzheimer amyloid beta-peptide (1-42) in an apolar microenvironment. Similarity with a virus fusion domain.* Eur J Biochem, 2002. **269**(22): p. 5642-8.
69. Masters, C.L. and D.J. Selkoe, *Biochemistry of amyloid beta-protein and amyloid deposits in Alzheimer disease.* Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(6): p. a006262.
70. Barrow, C.J. and M.G. Zagorski, *Solution structures of beta peptide and its constituent fragments: relation to amyloid deposition.* Science, 1991. **253**(5016): p. 179-82.
71. Hilbich, C., et al., *Substitutions of hydrophobic amino acids reduce the amyloidogenicity of Alzheimer's disease beta A4 peptides.* J Mol Biol, 1992. **228**(2): p. 460-73.
72. Giuffrida, M.L., et al., *Beta-amyloid monomers are neuroprotective.* J Neurosci, 2009. **29**(34): p. 10582-7.
73. Zou, K., et al., *A novel function of monomeric amyloid beta-protein serving as an antioxidant molecule against metal-induced oxidative damage.* J Neurosci, 2002. **22**(12): p. 4833-41.
74. Pawar, A.P., et al., *Prediction of "aggregation-prone" and "aggregation-susceptible" regions in proteins associated with neurodegenerative diseases.* J Mol Biol, 2005. **350**(2): p. 379-92.
75. Danielsson, J., et al., *The Alzheimer beta-peptide shows temperature-dependent transitions between left-handed 3-helix, beta-strand and random coil secondary structures.* FEBS J, 2005. **272**(15): p. 3938-49.
76. Chimon, S., et al., *Evidence of fibril-like beta-sheet structures in a neurotoxic amyloid intermediate of Alzheimer's beta-amyloid.* Nat Struct Mol Biol, 2007. **14**(12): p. 1157-64.
77. Tomaselli, S., et al., *The alpha-to-beta conformational transition of Alzheimer's Abeta-(1-42) peptide in aqueous media is reversible: a step by step conformational analysis suggests the location of beta conformation seeding.* Chembiochem, 2006. **7**(2): p. 257-67.
78. Yanagisawa, K., *Role of gangliosides in Alzheimer's disease.* Biochim Biophys Acta, 2007. **1768**(8): p. 1943-51.
79. Rushworth, J.V. and N.M. Hooper, *Lipid Rafts: Linking Alzheimer's Amyloid-beta Production, Aggregation, and Toxicity at Neuronal Membranes.* Int J Alzheimers Dis, 2010. **2011**: p. 603052.
80. Miller, Y., B. Ma, and R. Nussinov, *Zinc ions promote Alzheimer Abeta aggregation via population shift of polymorphic states.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(21): p. 9490-5.
81. Atwood, C.S., et al., *Dramatic aggregation of Alzheimer abeta by Cu(II) is induced by conditions representing physiological acidosis.* J Biol Chem, 1998. **273**(21): p. 12817-26.
82. Kim, W. and M.H. Hecht, *Mutations enhance the aggregation propensity of the Alzheimer's A beta peptide.* J Mol Biol, 2008. **377**(2): p. 565-74.
83. Yamamoto, N., et al., *Environment- and mutation-dependent aggregation behavior of Alzheimer amyloid beta-protein.* J Neurochem, 2004. **90**(1): p. 62-9.
84. Miller, D.L., et al., *Peptide compositions of the cerebrovascular and senile plaque core amyloid deposits of Alzheimer's disease.* Arch Biochem Biophys, 1993. **301**(1): p. 41-52.
85. Iwatsubo, T., et al., *Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43).* Neuron, 1994. **13**(1): p. 45-53.
86. Jarrett, J.T., E.P. Berger, and P.T. Lansbury, Jr., *The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease.* Biochemistry, 1993. **32**(18): p. 4693-7.
87. Burdick, D., et al., *Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/beta amyloid peptide analogs.* J Biol Chem, 1992. **267**(1): p. 546-54.

88. Cabriolu, R. and S. Auer, *Amyloid fibrillation kinetics: insight from atomistic nucleation theory*. J Mol Biol, 2011. **411**(1): p. 275-85.
89. Auer, S., P. Ricchiuto, and D. Kashchiev, *Two-step nucleation of amyloid fibrils: omnipresent or not?* J Mol Biol, 2012. **422**(5): p. 723-30.
90. Modler, A.J., et al., *Assembly of amyloid protofibrils via critical oligomers--a novel pathway of amyloid formation*. J Mol Biol, 2003. **325**(1): p. 135-48.
91. Cohen, S.I., et al., *Proliferation of amyloid-beta42 aggregates occurs through a secondary nucleation mechanism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(24): p. 9758-63.
92. Hardy, J.A. and G.A. Higgins, *Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis*. Science, 1992. **256**(5054): p. 184-5.
93. Robakis, N.K., *Are Abeta and its derivatives causative agents or innocent bystanders in AD?* Neurodegener Dis, 2010. **7**(1-3): p. 32-7.
94. Glabe, C.G., *Structural classification of toxic amyloid oligomers*. J Biol Chem, 2008. **283**(44): p. 29639-43.
95. Hardy, J. and D.J. Selkoe, *The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics*. Science, 2002. **297**(5580): p. 353-6.
96. Tsai, J., et al., *Fibrillar amyloid deposition leads to local synaptic abnormalities and breakage of neuronal branches*. Nat Neurosci, 2004. **7**(11): p. 1181-3.
97. Deshpande, A., et al., *Different conformations of amyloid beta induce neurotoxicity by distinct mechanisms in human cortical neurons*. J Neurosci, 2006. **26**(22): p. 6011-8.
98. Shankar, G.M., et al., *Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway*. J Neurosci, 2007. **27**(11): p. 2866-75.
99. Wang, H.W., et al., *Soluble oligomers of beta amyloid (1-42) inhibit long-term potentiation but not long-term depression in rat dentate gyrus*. Brain Res, 2002. **924**(2): p. 133-40.
100. Cardoso, S.M., et al., *Mitochondria dysfunction of Alzheimer's disease cybrids enhances Abeta toxicity*. J Neurochem, 2004. **89**(6): p. 1417-26.
101. Takeda, S., et al., *Validation of Abeta1-40 administration into mouse cerebroventricles as an animal model for Alzheimer disease*. Brain Res, 2009. **1280**: p. 137-47.
102. McLarnon, J.G., *Correlated inflammatory responses and neurodegeneration in peptide-injected animal models of Alzheimer's disease*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 923670.
103. Wang, Z., et al., *Hippocampal beta-amyloid reduces locus coeruleus glutamate and tyrosine hydroxylase*. Brain Res Bull, 1994. **35**(5-6): p. 485-91.
104. Lyons, A., et al., *IL-4 attenuates the neuroinflammation induced by amyloid-beta in vivo and in vitro*. J Neurochem, 2007. **101**(3): p. 771-81.
105. O'Hare, E., et al., *Delayed behavioral effects following intrahippocampal injection of aggregated A beta (1-42)*. Brain Res, 1999. **815**(1): p. 1-10.
106. Simard, M. and M. Nedergaard, *The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis*. Neuroscience, 2004. **129**(4): p. 877-96.
107. Sofroniew, M.V. and H.V. Vinters, *Astrocytes: biology and pathology*. Acta Neuropathol, 2010. **119**(1): p. 7-35.
108. Allen, N.J. and B.A. Barres, *Neuroscience: Glia - more than just brain glue*. Nature, 2009. **457**(7230): p. 675-7.
109. Pekny, M. and M. Nilsson, *Astrocyte activation and reactive gliosis*. Glia, 2005. **50**(4): p. 427-34.
110. Sofroniew, M.V., *Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation*. Trends Neurosci, 2009. **32**(12): p. 638-47.

111. Rothstein, J.D., et al., *Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate*. *Neuron*, 1996. **16**(3): p. 675-86.
112. Benarroch, E.E., *Neuron-astrocyte interactions: partnership for normal function and disease in the central nervous system*. *Mayo Clin Proc*, 2005. **80**(10): p. 1326-38.
113. Bardehle, S., et al., *Live imaging of astrocyte responses to acute injury reveals selective juxtavascular proliferation*. *Nat Neurosci*, 2013. **16**(5): p. 580-6.
114. Hozumi, I., F.C. Chiu, and W.T. Norton, *Biochemical and immunocytochemical changes in glial fibrillary acidic protein after stab wounds*. *Brain Res*, 1990. **524**(1): p. 64-71.
115. Mathewson, A.J. and M. Berry, *Observations on the astrocyte response to a cerebral stab wound in adult rats*. *Brain Res*, 1985. **327**(1-2): p. 61-9.
116. Okada, S., et al., *Blockade of interleukin-6 receptor suppresses reactive astrogliosis and ameliorates functional recovery in experimental spinal cord injury*. *J Neurosci Res*, 2004. **76**(2): p. 265-76.
117. Bsibsi, M., et al., *Toll-like receptor 3 on adult human astrocytes triggers production of neuroprotective mediators*. *Glia*, 2006. **53**(7): p. 688-95.
118. Johnstone, M., A.J. Gearing, and K.M. Miller, *A central role for astrocytes in the inflammatory response to beta-amyloid; chemokines, cytokines and reactive oxygen species are produced*. *J Neuroimmunol*, 1999. **93**(1-2): p. 182-93.
119. Petit, C.K., et al., *The two patterns of reactive astrocytosis in postischemic rat brain*. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1990. **10**(6): p. 850-9.
120. Balasingam, V., et al., *Reactive astrogliosis in the neonatal mouse brain and its modulation by cytokines*. *J Neurosci*, 1994. **14**(2): p. 846-56.
121. Balasingam, V. and V.W. Yong, *Attenuation of astroglial reactivity by interleukin-10*. *J Neurosci*, 1996. **16**(9): p. 2945-55.
122. Chen, Y., et al., *Astrocytes protect neurons from nitric oxide toxicity by a glutathione-dependent mechanism*. *J Neurochem*, 2001. **77**(6): p. 1601-10.
123. Buffo, A., et al., *Origin and progeny of reactive gliosis: A source of multipotent cells in the injured brain*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(9): p. 3581-6.
124. Farina, C., F. Aloisi, and E. Meinl, *Astrocytes are active players in cerebral innate immunity*. *Trends Immunol*, 2007. **28**(3): p. 138-45.
125. Wyss-Coray, T., et al., *Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ*. *Nat Med*, 2003. **9**(4): p. 453-7.
126. Giovannelli, L., et al., *Differential effects of amyloid peptides beta-(1-40) and beta-(25-35) injections into the rat nucleus basalis*. *Neuroscience*, 1995. **66**(4): p. 781-92.
127. Stepanichev, M.Y., et al., *Effects of tumor necrosis factor-alpha central administration on hippocampal damage in rat induced by amyloid beta-peptide (25-35)*. *J Neurosci Res*, 2003. **71**(1): p. 110-20.
128. Cuadros, M.A. and J. Navascues, *The origin and differentiation of microglial cells during development*. *Prog Neurobiol*, 1998. **56**(2): p. 173-89.
129. Block, M.L., L. Zecca, and J.S. Hong, *Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms*. *Nat Rev Neurosci*, 2007. **8**(1): p. 57-69.
130. Barres, B.A., *The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease*. *Neuron*, 2008. **60**(3): p. 430-40.
131. Soulet, D. and S. Rivest, *Microglia*. *Curr Biol*, 2008. **18**(12): p. R506-8.
132. Kettenmann, H., et al., *Physiology of microglia*. *Physiol Rev*, 2011. **91**(2): p. 461-553.
133. Olson, J.K. and S.D. Miller, *Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs*. *J Immunol*, 2004. **173**(6): p. 3916-24.

134. Sierra, A., et al., *Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis*. Cell Stem Cell, 2010. **7**(4): p. 483-95.
135. Tremblay, M.E., et al., *The role of microglia in the healthy brain*. J Neurosci, 2011. **31**(45): p. 16064-9.
136. Torres-Platas, S.G., et al., *Morphometric characterization of microglial phenotypes in human cerebral cortex*. J Neuroinflammation, 2014. **11**: p. 12.
137. Streit, W.J., *Microglial response to brain injury: a brief synopsis*. Toxicol Pathol, 2000. **28**(1): p. 28-30.
138. Streit, W.J., R.E. Mrak, and W.S. Griffin, *Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective*. J Neuroinflammation, 2004. **1**(1): p. 14.
139. Frei, K., et al., *Antigen presentation and tumor cytotoxicity by interferon-gamma-treated microglial cells*. Eur J Immunol, 1987. **17**(9): p. 1271-8.
140. Zhu, W., et al., *Different glial reactions to hippocampal stab wounds in young adult and aged rats*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2003. **58**(2): p. 117-22.
141. Weldon, D.T., et al., *Fibrillar beta-amyloid induces microglial phagocytosis, expression of inducible nitric oxide synthase, and loss of a select population of neurons in the rat CNS in vivo*. J Neurosci, 1998. **18**(6): p. 2161-73.
142. Aruoma, O.I., T. Bahorun, and L.S. Jen, *Neuroprotection by bioactive components in medicinal and food plant extracts*. Mutat Res, 2003. **544**(2-3): p. 203-15.
143. Choi, D.K., S. Koppula, and K. Suk, *Inhibitors of microglial neurotoxicity: focus on natural products*. Molecules, 2011. **16**(2): p. 1021-43.
144. Cole, G.M., et al., *NSAID and antioxidant prevention of Alzheimer's disease: lessons from in vitro and animal models*. Ann N Y Acad Sci, 2004. **1035**: p. 68-84.
145. Lee, H., et al., *Flavonoid wogonin from medicinal herb is neuroprotective by inhibiting inflammatory activation of microglia*. FASEB J, 2003. **17**(13): p. 1943-4.
146. Li, F.Q., et al., *Inhibition of microglial activation by the herbal flavonoid baicalein attenuates inflammation-mediated degeneration of dopaminergic neurons*. J Neural Transm (Vienna), 2005. **112**(3): p. 331-47.
147. Ho, Y.S., et al., *Characterizing the neuroprotective effects of alkaline extract of Lycium barbarum on beta-amyloid peptide neurotoxicity*. Brain Res, 2007. **1158**: p. 123-34.
148. Meira, M. and e. al., *Review of the genus Ipomoea: traditional uses, chemistry and biological activities*. Revista Brasileira de Farmacognosia, 2012. **22**(3): p. 682-713.
149. Pereda-Miranda, R., D. Rosas-Ramirez, and J. Castaneda-Gomez, *Resin glycosides from the morning glory family*. Fortschr Chem Org Naturst, 2010. **92**: p. 77-153.
150. Cherigo, L. and R. Pereda-Miranda, *Resin glycosides from the flowers of Ipomoea murucoides*. J Nat Prod, 2006. **69**(4): p. 595-9.
151. Castaneda-Gomez, J. and R. Pereda-Miranda, *Resin glycosides from the herbal drug jalap (Ipomoea purga)*. J Nat Prod, 2011. **74**(5): p. 1148-53.
152. Escobedo-Martinez, C. and R. Pereda-Miranda, *Resin glycosides from Ipomoea pes-caprae*. J Nat Prod, 2007. **70**(6): p. 974-8.
153. Wagner, H., *The chemistry of resin glycosides of the Convolvulaceae family*. Chemistry in botanical classification, 1973. **25**: p. 235-240.
154. Ono, M., et al., *Components of ether-insoluble resin glycoside (rhamnoconvulvin) from rhizoma jalapae braziliensis*. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2009. **57**(3): p. 262-8.
155. Contreras, C.M., L. Chacon, and R.G. Enriquez, *Anticonvulsant properties of Ipomoea stans*. Phytomedicine, 1996. **3**(1): p. 41-4.
156. Herrera-Ruiz, M., et al., *Central nervous system depressant activity of an ethyl acetate extract from Ipomoea stans roots*. J Ethnopharmacol, 2007. **112**(2): p. 243-7.

157. Leon-Rivera, I., et al., *Evaluation of the neuroprotective activity of stansin 6, a resin glycoside from Ipomoea stans*. Bioorg Med Chem Lett, 2014. **24**(15): p. 3541-5.
158. Noda, N., et al., *Scammonins VII and VIII, two resin glycosides from Convolvulus scammonia*. Phytochemistry, 1992. **31**(8): p. 2761-6.
159. Leon-Rivera, I., et al., *Sedative, vasorelaxant, and cytotoxic effects of convolvulin from Ipomoea tyrianthina*. J Ethnopharmacol, 2011. **135**(2): p. 434-9.
160. Leon-Rivera, I., et al., *Resin glycosides from Ipomoea tyrianthina and their sedative and vasorelaxant effects*. J Nat Med, 2014. **68**(4): p. 655-67.
161. Yahi, N. and J. Fantini, *Deciphering the glycolipid code of Alzheimer's and Parkinson's amyloid proteins allowed the creation of a universal ganglioside-binding peptide*. PLoS One, 2014. **9**(8): p. e104751.
162. Hong, S., et al., *Soluble Abeta oligomers are rapidly sequestered from brain ISF in vivo and bind GM1 ganglioside on cellular membranes*. Neuron, 2014. **82**(2): p. 308-19.