



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Efecto del proceso inflamatorio inducido por la presencia de péptidos  $\beta$ -amiloides sobre la función mitocondrial en células de la microglía en un modelo murino de la enfermedad de Alzheimer.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias Bioquímicas

PRESENTA:

TONALI BLANCO AYALA

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Leonor Pérez Martínez  
Instituto de Biotecnología

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Luis Cárdenas Torres  
Dra. Magdalena Guerra Crespo

CIUDAD.UNIVERSITARIA,,CD..MX,,JUNIO.DE.2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## *COMITÉ JURADO*

---

Dr. Baltazar Becerril Luján (iBT-UNAM)

Dr. Enrique Salas Vidal (iBT-UNAM)

Dr. Ismael Secundino Velázquez (iBT-UNAM)

Dr. Mario Cruz Muñoz (Facultad de Medicina-UAEM)

Dr. Julio Morán Andrade (IFC-UNAM)

---

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Neuroinmunobiología el Departamento de Biología Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la UNAM (Cuernavaca, Morelos), bajo la tutoría de la Dra. Leonor Pérez Martínez. Este proyecto se realizó gracias al financiamiento del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IA203416, PAPIIT IN213316 Y PAPIIT IN212316) y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT 155290).

## AGRADECIMIENTOS

---

A mi familia mamá, papá y mi hermano, pero de manera muy especial a mi abuelito que siempre ha estado ahí en mis mejores momentos y sé que lo seguirá estando.

A todo el laboratorio de Neuroinmunobiología por hacer mi estancia enriquecedora tanto en lo personal como en lo académico. De manera especial a la Dra. Leonor por la oportunidad que me brindó, por su confianza, paciencia y consejos. También al Dr. Gustavo por su atención y contribución a este proyecto y todas sus recomendaciones.

A Rafa, por el apoyo incondicional que me ha brindado para la culminación de este proyecto.

# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>6</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>7</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>8</b>
<b>INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES</b> .....	<b>10</b>
<b>ENFERMEDAD DE ALZHEIMER</b> .....	<b>10</b>
<i>HIPÓTESIS AMILOIDOGÉNICA</i> .....	11
<i>EFFECTOS DELETÉREOS INDUCIDOS POR LOS PÉPTIDOS B<math>\beta</math></i> .....	13
<i>EL PAPEL DE LA MITOCONDRIA EN LA EA</i> .....	14
<b>EL SISTEMA INMUNE INNATO Y LA EA</b> .....	<b>15</b>
<i>LA MICROGLÍA, EL PROCESO INFLAMATORIO Y LA EA</i> .....	16
<b>INFLAMASOMAS EN EL SNC</b> .....	<b>19</b>
<i>EL INFLAMASOMA NLRP3 EN LA EA</i> .....	20
<i>CONTROL MITOCONDRIAL DEL INFLAMASOMA NLRP3</i> .....	22
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>24</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>25</b>
OBJETIVO GENERAL.....	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS: .....	25
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>25</b>
<i>ANIMALES</i> .....	25
<i>AISLAMIENTO DE CÉLULAS DE LA MICROGLÍA</i> .....	26
<i>CITOMETRÍA DE FLUJO</i> .....	26
<i>MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA</i> .....	27
<i>AISLAMIENTO FRACCIÓN MITOCONDRIAL</i> .....	27
<i>EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS</i> .....	29
<i>WESTERN BLOT</i> .....	29
<i>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</i> .....	30
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>30</b>
CARACTERIZACIÓN DE LA PUREZA DEL AISLAMIENTO DE LOS CULTIVOS MICROGLIALES DEL TEJIDO CEREBRAL DE RATONES ADULTOS 5XFAD.....	33
IDENTIFICAR SI LA AUSENCIA DE CASPASA 1 EJERCE ALGÚN EFECTO SOBRE LA FUNCIONALIDAD MITOCONDRIAL EN LAS CÉLULAS DE MICROGLÍA. ....	35
DETERMINAR EL EFECTO DE LA PRESENCIA DE PÉPTIDOS B-AMILOIDES SOBRE EL ESTADO FUNCIONAL GLOBAL DE LAS MITOCONDRIAS EN CÉLULAS DE LA MICROGLÍA DEL TEJIDO CEREBRAL DE RATONES 5XFAD.....	43
DILUCIDAR SI EL EFECTO EJERCIDO SOBRE EL ESTADO FUNCIONAL MITOCONDRIAL EN EL 5XFAD GUARDA UNA CORRELACIÓN POSITIVA CON UN INCREMENTO EN LOS NIVELES DE ERO MITOCONDRIALES A TRAVÉS DEL TIEMPO Y SI ESTO SE MODIFICA EN AUSENCIA DE CASPASA 1.....	45
CONFIRMAR EL IMPACTO DEL PROCESO INFLAMATORIO INDUCIDO POR LA PRESENCIA DE PÉPTIDOS B-AMILOIDES SOBRE EL ESTADO FUNCIONAL MITOCONDRIAL CON BASE EN LA MORFOLOGÍA MITOCONDRIAL EN EL TEJIDO CEREBRAL DE RATONES 5XFAD.....	46
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>51</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>58</b>
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>59</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>60</b>

## **ABREVIATURAS**

<b>ABAD</b>	Alcohol deshidrogenasa de unión a $\beta$ A
<b>APP</b>	Proteína precursora amiloide
<b>ASC</b>	Proteína adaptadora asociada a apoptosis con dominio CARD
<b>ASC</b>	Proteína adaptadora de caspasa
<b>BMDMs</b>	Macrófagos de médula ósea
<b>COX</b>	Citocromo oxidasa
<b>CTE</b>	Cadena Transportadora de Electrones
<b>CypD</b>	Ciclofilina D
<b>DAMPs</b>	Patrones moleculares asociados a daño
<b>Drp1</b>	Proteína 1 relacionada a dinamina (Drp1)
<b>EA</b>	Enfermedad de Alzheimer
<b>ERO</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>EROm</b>	Especies reactivas de oxígeno mitocondriales
<b>Fis1</b>	Proteína de fisión mitocondrial 1
<b>FM</b>	Fracción mitocondrial
<b>FMs</b>	Fracción mitocondrial sonicada
<b>hPreP</b>	Proteasa de presecuencia humana
<b>HSP60</b>	Proteína de choque térmico 60
<b>IDE</b>	Proteína degradadora de insulina
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Interferón $\gamma$
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina 1- $\beta$
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintasa
<b>LTP</b>	Potenciación a largo plazo
<b>LCF</b>	Líquido cefalorraquídeo
<b>MAMs</b>	Membranas asociadas a mitocondrias
<b>MAVs</b>	Proteína mitocondrial asociada a la señalización antiviral
<b>MDR</b>	Mitotracker Deep Red
<b>Mfn1, 2</b>	Mitofusinas 1 y 2
<b>MG</b>	Mitotracker Green
<b>MHCII</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad
<b>MPT</b>	Transportador de piruvato mitocondrial
<b>NLRP3</b>	Receptor tipo NOD con dominio de pirinas-3
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>O<math>_2</math><sup>-</sup></b>	Anión superóxido
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	Peroxinitrito
<b>ONT</b>	Ovillos neurofibrilares de la proteína $\tau$
<b>OPA1</b>	Proteína de atrofia óptica 1
<b>PAMPs</b>	Patrones moleculares asociados a patógenos
<b>PrP</b>	Proteína priónica (PrP)
<b>PS1</b>	Presenilina 1
<b>RI</b>	Respuesta inmune
<b>SII</b>	Sistema Inmune Innato
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central
<b>TLRs</b>	Receptores tipo toll
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral- $\alpha$
<b>TREM2</b>	Receptor que se expresa en células mieloides-2
<b>VDAC</b>	Canal aniónico dependiente de voltaje
<b><math>\beta</math>A</b>	$\beta$ -amiloides
<b><math>\Psi_{mit}</math></b>	Potencial de membrana mitocondrial

## **RESUMEN**

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un desorden neurodegenerativo progresivo caracterizado principalmente por fallas en la memoria, problemas de orientación espacial y alteraciones en el lenguaje hablado. Actualmente, la hipótesis amiloidogénica es la explicación con mayor evidencia experimental entorno a las causas que detonan el proceso neurodegenerativo en la EA; sin embargo, los mecanismos celulares mediante los cuales actúa no han sido plenamente esclarecidos. Se ha demostrado que la presencia de péptidos beta amiloides y neuronas disfuncionales están asociadas a un proceso neuroinflamatorio exacerbado. En este estudio decidimos comprobar si existía una alteración temprana y progresiva del estado funcional de las mitocondrias presentes en el tejido cerebral y células de microglía en el contexto proinflamatorio de la EA. Se analizó el estado funcional de las mitocondrias presentes en células de microglía aisladas de ratones adultos de 8, 12 y 20 semanas para los genotipos Wt (C57/SJL), 5XFAD y 5XFAD/casp1<sup>-/-</sup>. Nuestros resultados demostraron que la función mitocondrial disminuye en función de la edad y que esto ocurre de manera exacerbada en el 5XFAD de 20 semanas; ésta disminución se observó atenuada de manera significativa en ausencia de caspasa 1. Es importante señalar además, que la ausencia de caspasa 1 parece incrementar, en magnitud, la presencia de mitocondrias metabólicamente activas de manera significativa a partir de las 8 semanas, cuando el proceso de deposición de péptidos beta amiloides inicia. La internalización hacia mitocondrias de los péptidos beta amiloides en el cerebro de este modelo fue evidenciado a través de microcopía electrónico e inmunoblots. Además, el efecto amortiguador sobre daño mitocondrial por la ausencia de caspasa 1 también se vió reflejado en la morfología de las mitocondrias analizadas ultraestructuralmente, ya que las alteraciones morfológicas observadas en el 5XFAD de 20 semanas disminuyen significativamente, especialmente las que hacen referencia a aquellas clasificadas como hinchadas, mientras que el porcentaje de mitocondrias con morfología mitocondrial normal es mayor. Finalmente, el incremento en la frecuencia de autofagolisosomas observados en el 5XFAD/casp1<sup>-/-</sup> con respecto al 5XFAD (ambos de 20semanas) nos orienta a sugerir que, probablemente, la ausencia de caspasa 1 favorece al reestablecimiento de los mecanismos autofágicos de remoción de aquellas mitocondrias dañadas contribuyendo así a mejorar las condiciones para la preservación de una población mitocondrial sana y funcional en presencia de los péptidos beta amiloides.



## ***ABSTRACT***

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder mainly characterized by memory failures, spatial-orientation and spoken-language impairments. Nowadays, the amyloidogenic hypothesis is the one that owns more experimental evidence about the main causes that trigger the neurodegenerative process in AD; however, the cellular mechanisms through which acts have not been fully clarified. In parallel, it has been shown that the presence of amyloid- $\beta$  peptides and dystrophic neurons are associated with an exacerbated neuroinflammatory process. However, in recent years there is increasing evidence that points out neuroinflammatory process as a factor capable of contribute and drive the neurodegenerative process. Previous studies in an AD transgenic murine model, have proved that absence of NLRP3 inflammasome components, including its protein effector: Caspase-1, reduce significantly the pro-inflammatory markers and cognitive impairments associated with an overactivation of microglia with a pro-inflammatory profile. Additionally, knowing the importance of mitochondrial control of NLRP3 inflammasome, we decided to prove if there was an early and progressive mitochondrial dysfunction of those mitochondria present in the brain tissue and also in the microglial cells from an AD murine model. We analyzed the functional status of microglial mitochondria isolated from adult mice of 8, 12 and 20 weeks old from Wt (C57/SJL), 5XFAD and 5XFAD/casp1<sup>-/-</sup> genotypes. Our results show that the functional status of microglial mitochondria diminish depending on age, nevertheless, this happens in a exacerbated fashion in the 20 weeks old 5XFAD mice and is ameliorated in the absence of caspase 1. Likewise, deficiency of caspase 1 increases significantly the presence of metabolically active mitochondria since 8 weeks old, when the amyloid- $\beta$  deposition process begins. Internalized amyloid- $\beta$  peptides in mitochondria were confirmed through electron microscopy and immunoblots. The damping effect of caspase 1 deficiency on mitochondrial damage was also evidenced through the ultrastructural analysis of mitochondrial morphology, since morphologic aberrations observed in the 20 weeks old 5XFAD mitochondria were substantially reduced, specially those that were classified as swollen mitochondria, while the number with normal morphology were increased. Finally, the increase observed in the frequency of autophagolysosomes seen in the 5XFAD/casp1<sup>-/-</sup> compared to 5XFAD (both of 20 weeks old) drive us to suggest that, it seems like the absence of caspase 1 unlocks the autophagic mechanisms of damaged mitochondria removal promoting better cellular conditions for the preservation of a healthy and functional mitochondrial population even in the presence of amyloid- $\beta$  peptides.

---

Efecto del proceso inflamatorio inducido por la presencia de péptidos  $\beta$ -amiloides sobre la función mitocondrial en células de la microglía en un modelo murino de la enfermedad de Alzheimer.

---

---

## INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

---

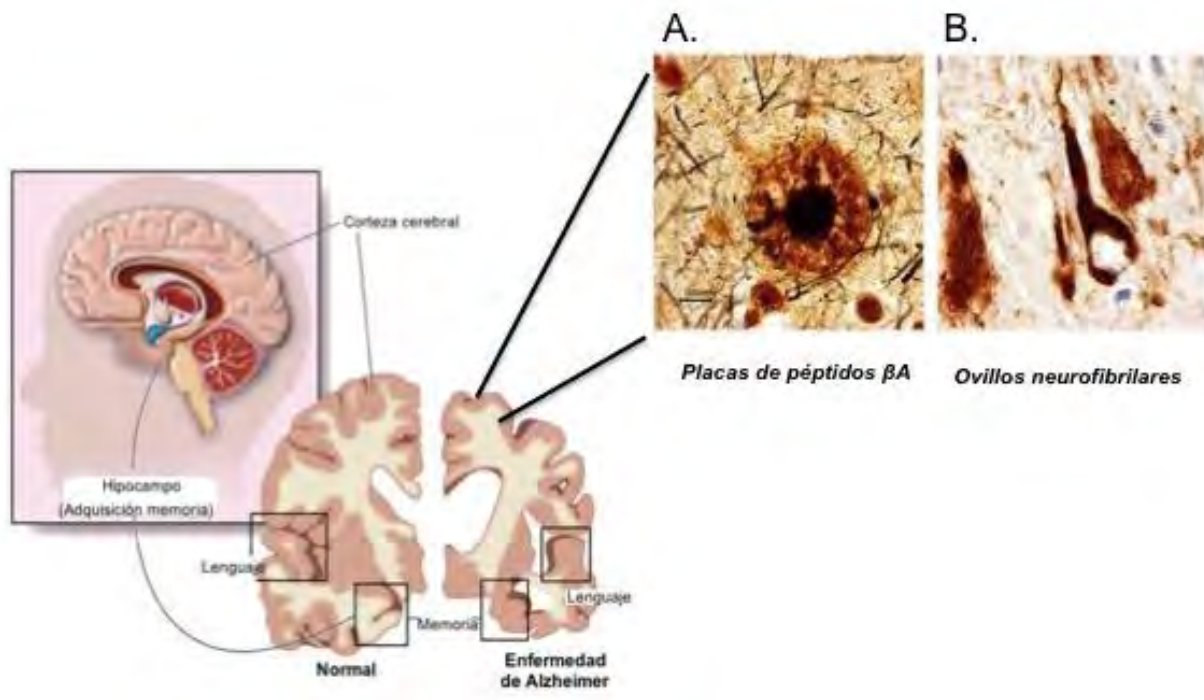
### ***Enfermedad de Alzheimer***

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un desorden neurodegenerativo progresivo caracterizado principalmente por fallas en la memoria, problemas de orientación espacial y alteraciones en el lenguaje hablado (Jin *et al.*, 2011). Mutaciones puntuales hereditarias en el gen que codifica para la proteína precursora amiloidea (APP) (ej. Swedish (K670N, M671L), Florida (I716V), London (V717I)) y en el que codifica para presenilina 1 (Human PS1 M146L/L286V) son factores de riesgo directamente asociados al desarrollo de la enfermedad (Terai *et al.*, 2001). La EA es la causa más prominente de demencia en la actualidad, reportes recientes señalan que existen cerca de 46 millones de personas que padecen demencia y se calcula que para el 2050 éstas aumentarán a 131.5 millones esto ubicará a la EA como la sexta causa de muerte en la población mayor a 65 años de edad (World Alzheimer Report, 2015).

Existen varios modelos tanto *in vivo* como *in vitro* que reproducen algunas de las características asociadas a la EA. Uno de ellos, es el modelo murino 5XFAD, un doble transgénico APP/PS1 que coexpresa las 5 mutaciones familiares asociadas con la EA mencionadas anteriormente (Eimer and Vassar, 2013). Este modelo presenta una temprana (2 meses de edad) deposición de péptidos  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ A) y formación de placas amiloides además de una marcada astrocitosis y microgliosis además, es de los pocos modelos murinos en presentar degeneración sináptica progresiva y es uno de los pocos modelos transgénicos que reproducen la pérdida neuronal de una forma edad-dependiente (Selkoe, 2001; Oakley *et al.*, 2006). Por otro lado, es importante tomar en consideración que el porcentaje de casos de Alzheimer atribuibles a estas mutaciones es muy bajo; por ello, la investigación en torno a las causas que desencadenan y favorecen el desarrollo de esta enfermedad siguen siendo objeto de estudio (Heneka and O'Banion, 2007). La mayoría de los casos de la EA existentes ocurren en individuos mayores a 65 años, y de hecho, la incidencia y la prevalencia de esta enfermedad incrementa en función de la edad (World Alzheimer Report, 2015). Esta correlación positiva con la edad avanzada sugiere que las causas y el desarrollo de este padecimiento parecen estar íntimamente asociadas a los cambios fisiológicos que ocurren normalmente durante el envejecimiento. Algunos de esos cambios incluyen características como niveles aumentados de especies reactivas de oxígeno (ERO) provocando un desbalance en el estado redox celular,

incremento en moléculas y citocinas pro-inflamatorias, disfunción mitocondrial y una reducción en los niveles de proteínas involucradas en la regulación de la homeostasis celular, tal es el caso de las proteínas autofágicas (O'Brien and Wong, 2011).

La EA afecta principalmente a regiones cerebrales como corteza e hipocampo en las que se llevan a cabo procesos de memoria y aprendizaje; fue precisamente en estas regiones cerebrales en donde se caracterizaron algunas de las marcas más visibles y mejor estudiadas de la EA: 1) las placas seniles amiloides, que son agregados proteicos extracelulares constituidos principalmente de péptidos  $\beta A$  2) los ovillos neurofibrilares (ONTs), agregados intraneuronales de la proteína tau ( $\tau$ ) en su forma hiperfosforilada. La presencia de estas marcas moleculares en el tejido cerebral post-mortem representa actualmente la única forma de confirmar el diagnóstico de este padecimiento (Selkoe, 2001).



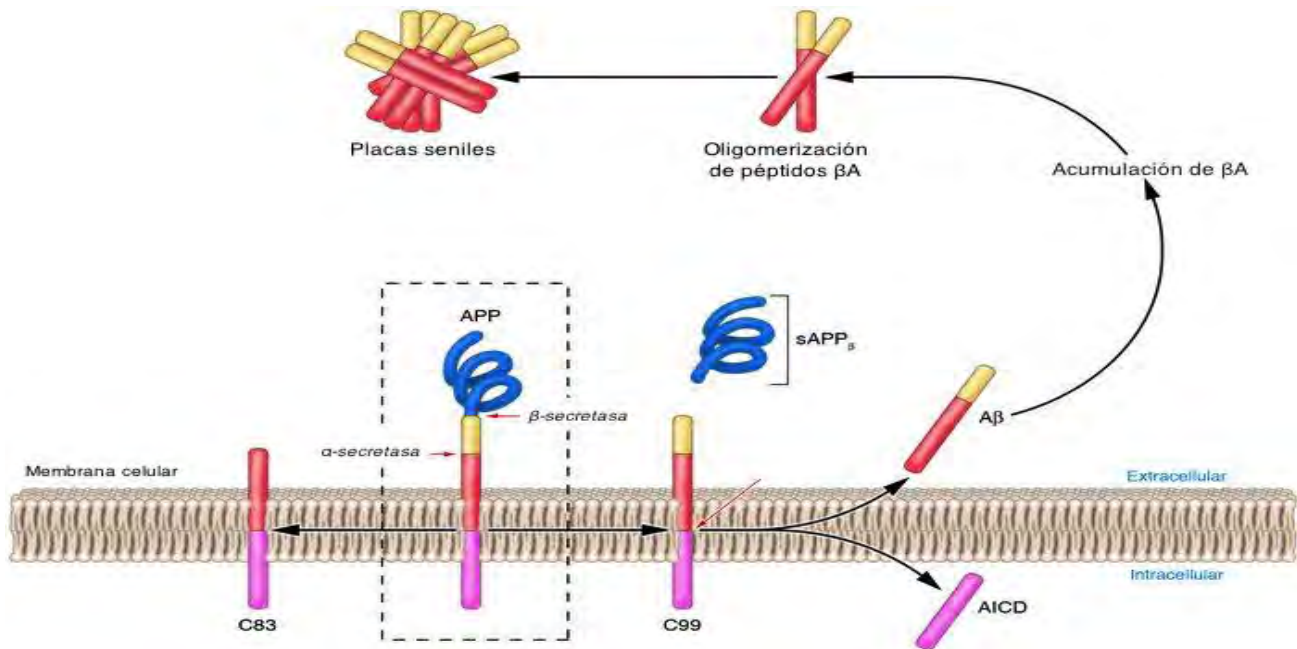
**Fig. 1.0. Marcas moleculares características de la Enfermedad de Alzheimer.** A) Inmunohistoquímica positiva para péptidos  $\beta A$  mostrando su acumulación en placas seniles B) Inmunohistoquímica positiva para la proteína Tau mostrando para los ovillos neurofibrilares al interior de neuronas. Modificado de: Haass & Selkoe, 2007, *Nat Rev Mol Cell Biol*.

### **Hipótesis amiloidogénica**

Actualmente, la hipótesis amiloidogénica es la que posee mayor evidencia experimental en la investigación referente a la EA. Tal como se ilustra en la Figura 2.0 los péptidos  $\beta A$  son generados a partir de la APP sobre la cual ocurre un corte inicial por la enzima  $\beta$ -secretasa/BACE1 (enzima de corte en el sitio  $\beta$  de la APP) dando lugar a un fragmento soluble APPs $\beta$  así como a un fragmento  $\beta$ -C-terminal ( $\beta$ -CTF). Posteriormente, ocurre un segundo

corte en donde el fragmento  $\beta$ -CTF es escindido por el complejo enzimático  $\gamma$ -secretasa (cuyo centro catalítico está conformado por las presenilinas 1 y 2) al realizar un corte en el N-terminal en los residuos 40, 42 y 55, dando así lugar a los péptidos  $\beta$ A.

La hipótesis amiloidogénica establece que el aumento y la acumulación progresiva de los péptidos  $\beta$ A (especialmente en su forma  $\beta$ A<sub>42</sub>) tanto intracelular como extracelularmente, son causa directa del desarrollo de la EA (O'Brien and Wong, 2011). De hecho, un incremento en los niveles de péptidos  $\beta$ A<sub>42</sub> en líquido cefalorraquídeo es considerado un biomarcador clave para el diagnóstico positivo para la EA (Jack *et al.*, 2013). Derivado de esta hipótesis, la mayoría de los estudios iniciales se centraron casi exclusivamente en torno a los efectos de estas placas amiloideas en el tejido cerebral y su relación con el progreso de la EA. Sin embargo, una de las críticas más severas a la hipótesis de la cascada amiloidea, como se propuso originalmente, es la falta de correlación entre el grado de demencia y el número de placas amiloideas fibrilares. De hecho, desde 1994 Martin y colaboradores sugirieron que la pérdida sináptica y la gliosis preceden a esta deposición de placas. Además, niveles elevados de péptidos  $\beta$ A son detectados incluso años antes de que alguna señal clínica se vuelva evidente (Berlau *et al.*, 2009; Sperling *et al.*, 2011, Selfridge *et al.*, 2013), por lo que, ha resultado todo un reto poder caracterizar las alteraciones que preceden a la neurodegeneración; es por ello que en años recientes éste énfasis ha virado sustancialmente hacia entender los eventos intracelulares que ocurren durante el desarrollo de la enfermedad, ésto gracias a los descubrimientos compartidos entre diversos modelos de estudio (tejidos post-mórtem de pacientes diagnosticados con la EA, cultivos celulares y modelos murinos transgénicos) en los que se ha demostrado que el procesamiento de la APP y la acumulación de los péptidos  $\beta$ A ocurre intracelularmente, y de manera específica en organelos como retículo endoplásmico, aparato de Golgi, lisosomas y mitocondrias (LaFerla, Green and Oddo, 2007).



**Figura 2.0. Procesamiento de la APP.** Procesamiento amiloidogénico de la APP indicado con flechas dirigidas hacia la derecha, hacia la izquierda se muestra la ruta no-amiloidogénica dirigida por la enzima  $\alpha$ -secretasa. Se muestra el procesamiento secuencial enzimático de la APP y los fragmentos que genera: APPs $\beta$  y péptidos  $\beta$ A, así como el proceso de agregación de los péptidos  $\beta$ A hasta formar placas seniles. (Modificado de (O'Brien and Wong, 2011).

### **Efectos deletéreos inducidos por los péptidos $\beta$ A**

Existe evidencia de los efectos deletéreos de los péptidos  $\beta$ A (específicamente en su forma oligomérica) en modelos *in vivo*, en donde la inyección intrahipocampal de éstos oligómeros en ratas adultas sanas resulta en una disminución de la densidad sináptica, inhiben el proceso de potenciación a largo plazo (LTP) e incrementan a su vez, el proceso de depresión sináptica de largo plazo (Walsh *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2011). Adicionalmente, se ha demostrado que el tratamiento de cultivos neuronales hipocampales de rata con péptidos  $\beta$ A<sub>42</sub> oligoméricos extraídos de cerebros humanos con EA tardía resulta en neuritas distróficas e hiperfosforilación de la proteína tau (Jin *et al.*, 2011).

Por otro lado, en la búsqueda por caracterizar los mecanismos mediante los cuáles éstos péptidos inducen tales efectos deletéreos, se ha comprobado que los péptidos  $\beta$ A son capaces de incrementar la cantidad de especies reactivas de oxígeno (ERO) mitocondriales (provocando daño oxidativo), inducir microgliosis y astrocitosis, activar respuestas pro-inflamatorias del sistema inmune innato (SII), alterar la actividad de proteínas cinasas y fosfatasas, desestabilizar la homeostasis iónica, inducir disfunción mitocondrial al unirse a proteínas o lípidos mitocondriales (cardiolipina) e interactuar de manera directa con las espinas dendríticas de las neuronas e interferir con la funcionalidad sináptica (O'Brien & Wong, Annual

Reviews, 2011). Sin embargo, a pesar de que todos estos eventos se encuentran bastante bien caracterizados la temporalidad con la que ocurren así como su contribución al desarrollo de la EA no está del todo clara; lo único que queda de manifiesto es que esta cascada amiloidea culmina en disfuncionalidad sináptica, seguida de la muerte neuronal, y con ello, el deterioro cognitivo y la fase clínica de la EA. Actualmente, contrario a lo que se pensaba hace algunos años, se sugiere que estos procesos patológicos acontecen años, e incluso décadas antes de que la fase clínica de la EA se presente, y que este proceso neurodegenerativo tiene que ser resultado de la convergencia de una serie de alteraciones fisiológicas relacionadas en la mayoría de los casos con el proceso mismo del envejecimiento cuya capacidad compensatoria se encuentra disminuida.

### ***El papel de la mitocondria en la EA***

Existe evidencia que apoya a la idea de una estrecha relación entre la EA y la disfuncionalidad mitocondrial, la cual involucra tanto la acción directa de los péptidos  $\beta A$  intracelulares como los efectos de la sobreexpresión de la proteína precursora APP sobre los niveles de proteínas mitocondriales. Experimentos en células M17 de neuroblastoma en donde se sobreexpresó a la APP, tanto en su forma silvestre  $APP_{wt}$  como en una forma mutada  $APP_{swe}$ , dieron como resultado una disminución en las proteínas de fisión mitocondrial: proteína 1 relacionada a dinamina (Drp1), la proteína de atrofia óptica 1 (OPA1), así como las mitofusinas 1 y 2 (Mfn 1,2); en contraste, a un aumento en la proteína de fisión mitocondrial 1 (Fis1), esto significa que el proceso de fisión mitocondrial preponderará sobre el de fusión mitocondrial, esto en el mejor de los casos favorecerá a la eliminación de aquellas mitocondrias que por fisión mitocondrial se hayan separado de la red mitocondrial (Wang et al, 2008, 2009). Estos resultados concuerdan con lo observado por Walls y colaboradores en 2012, quienes utilizando la línea neuronal C17.2 determinaron que en aquellas células que presentaban la mutación Swedish (principal responsable de la amiloidosis  $\beta A_{1-42}$ )  $APP_{swe}$  tanto los niveles de ésta proteína y de péptidos  $\beta A$  eran marcadamente mayores en mitocondria con respecto a los presentes en la fracción citosólica, además determinaron que su translocación hacia mitocondria estaba mediada por la proteína chaperona HSP60, ésta asociación fue comprobada en ambas fracciones en tejidos post-mórtem de pacientes identificados con la EA así como en ratones transgénicos 3XFAD de 12 semanas de edad. La importancia de ésta proteína chaperona en el importe tanto de la proteína APP como de péptidos  $\beta A$  se evidenció en las líneas neuronales  $APP_{swe}$  ya que al interferir a HSP60, los niveles tanto de  $\beta A_{1-42}$  como de  $\beta A_{1-40}$  internalizados en mitocondria fueron reducidos significativamente (Walls *et al.*, 2012).

En línea con esta evidencia, una morfología y dinámica mitocondrial aberrantes han sido también observadas en modelos murinos mutantes para PS1 (PS1M146L). Es importante

subrayar que estas alteraciones pueden ser observadas incluso antes de la formación de depósitos de  $\beta$ A. Adicionalmente, la actividad de los complejos enzimáticos tanto de  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa como de la piruvato deshidrogenasa están reducidas en la EA (Blass et al., 2002).

Por otro lado, distintos estudios ubican físicamente a los péptidos  $\beta$ A al interior de las mitocondrias interaccionando directamente con proteínas mitocondriales que incluyen a ciclofilina D (CypD), citocromo oxidasa (COX), al canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC), Drp1, alcohol deshidrogenasa de unión a  $\beta$ A (ABAD) así como la proteasa de presecuencia humana (hPreP) (Liu *et al.*, 2002; Parihar and Brewer, 2007; Pavlov *et al.*, 2009; Du *et al.*, 2010; Yao *et al.*, 2011; Cha *et al.*, 2012). Las consecuencias funcionales resultan en un aumento en la producción de ROS, daño a la permeabilidad mitocondrial, disminución de los niveles de ATP, interrupción del transporte de metabolitos y proteínas hacia el interior de las mitocondrias, alteraciones a la cadena de transporte de electrones (CTE), fragmentación mitocondrial y alteración de la dinámica mitocondrial. Es importante mencionar que todos estos efectos conducen inevitablemente a un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno mitocondriales (ERO<sub>m</sub>), es decir, los péptidos  $\beta$ A regulan positivamente la producción de ERO<sub>m</sub> (Anandatheerthavarada and Devi, 2007). Aunado a esto, la disminución en los niveles de ATP correlaciona con un incremento en los niveles de BACE1. Por lo que, considerando que estos dos fenómenos pueden ocurrir de manera simultánea: cuando la producción de ATP disminuye generalmente se debe a alguna perturbación al sistema de la CTE caracterizada por un incremento en los niveles de ERO<sub>m</sub>. Esto contribuye a la idea de que la disfuncionalidad mitocondrial puede actuar tempranamente elevando la concentración de péptidos  $\beta$ A, y éstos a su vez pueden amplificar la cantidad de mitocondrias disfuncionales dando lugar a un ciclo vicioso de daño y disfuncionalidad celular (Anandatheerthavarada and Devi, 2007).

### ***El Sistema Inmune Innato y la EA***

Anteriormente, sugerir siquiera algún punto de comunicación entre el sistema inmune y el sistema nervioso central (SNC) parecía si no imposible, muy poco probable, primero por obstáculos físicamente tangibles como la barrera hematoencefálica y su alta selectividad, la relativa ausencia de células MHC clase I o II en el SNC así como de células presentadoras de antígeno. Sin embargo, de acuerdo con evidencia relativamente reciente ahora podemos decir que el SNC mantiene una constante comunicación con el sistema inmune (SI), y que éste ejerce una función centinela y reactiva tanto en condiciones fisiológicas normales como patológicas. Derivado de este cambio de paradigma ahora se conoce que, como respuesta a un estímulo dañino, la respuesta inmune en el SNC se puede activar y dar lugar a una cascada neuroinflamatoria.



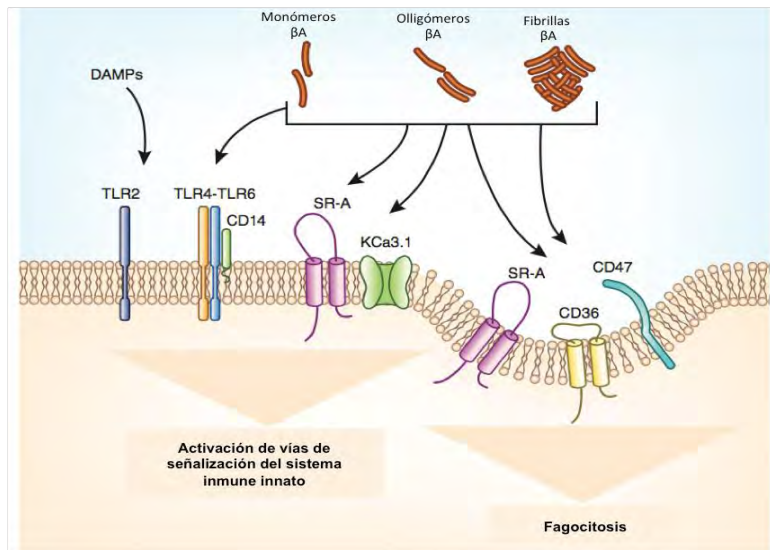
La neuroinflamación es un proceso detectado tanto en pacientes como en modelos transgénicos murinos de la EA, se caracteriza básicamente por la secreción de citocinas proinflamatorias y ERO por células especializadas en el SNC o por macrófagos infiltrados desde el torrente sanguíneo (Heneka *et al.*, 2010). Este proceso inflamatorio era tradicionalmente señalado como una consecuencia de la neurodegeneración y por ende de aparición tardía en la E. Recientemente, esta visión empieza a cambiar y ahora se reconoce que la activación del SII, específicamente de su componente inflamatorio, contribuye directamente al progreso de la enfermedad e incluso se sugiere que lo precede. Evidencia epidemiológica apoya a esta idea, ya que tratamientos prolongados con fármacos antiinflamatorios no esteroideos han demostrado reducir el riesgo de desarrollar la EA (Veld, 2001; Heneka, Golenbock and Latz, 2015). Además, datos recientes, han identificado mutaciones en genes codificantes para componentes del sistema inmune como el receptor que se expresa en células mieloides-2 (TREM2) así como, en el antígeno de superficie celular mieloides CD33 (Heppner, Ransohoff and Becher, 2015). Lo anterior, en conjunto con los niveles incrementados de citocinas, quimiocinas, factores de complemento y eicosanoides en el líquido cefaloraquídeo de pacientes con la EA (Alvarez-arellano, León-guerrero and Meza-sosa, 2013), sirve como base para sugerir que la EA constituye un proceso neuroinflamatorio.

Sin embargo, es un hecho que esta intercomunicación debe de estar finamente regulada, ya que dentro del SNC la exacerbación de un fenómeno neuroinflamatorio puede llevar a consecuencias devastadoras; por ello, ahora existe un interés cada vez mayor en torno a los mecanismos, componentes e interacciones necesarias para la regulación de la respuesta inmune en el SNC y su contribución a desórdenes o patologías neurológicas.

### ***La microglía, el proceso inflamatorio y la EA***

Las células de la microglía, son los macrófagos residentes del cerebro encargadas de orquestar la respuesta inmune innata en el SNC. Una notable diferencia que distingue a la microglía de los macrófagos de la periferia, es que la microglía posee una mayor vida media; lo que en un contexto desfavorable puede significar que la microglía disfuncional y sus efectos deletéreos permanezcan también durante un período de tiempo mayor (Ransohoff and Perry, 2009). Las células de la microglía, representan alrededor del 10-12% de la población celular total del SNC con una densidad heterogénea a lo largo de las distintas regiones cerebrales (Block, Zecca and Hong, 2007). En condiciones normales, las células de la microglía se caracterizan por poseer un pequeño soma (8-12  $\mu$ M), con un reducido citoplasma perinuclear y delgadas prolongaciones ramificadas que actúan como sensores capaces de escanear constantemente el estado fisiológico del microambiente cerebral (Kettenmann *et al.*, 2011). Esta capacidad centinela de la microglía puede ser llevada a cabo gracias a la expresión de receptores membranales (Figura

3.0) que son compartidos con algunas células del SI (monocitos y macrófagos), y que incluyen a receptores tipo toll (TLRs) 1-9 (Block, Zecca and Hong, 2007), coreceptores (CD36, CD14 y CD47) receptores scavenger, componentes del sistema complemento y del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC-II) (Salter and Beggs, 2014).



**Figura 3.0 Receptores membranales en microglía encargados del reconocimiento de varias formas de péptidos βA.** Los receptores TLR2, TLR 4 y TLR6 y sus coreceptores (CD14) detectan las formas fibrilares de βA y activan vías de señalización que activan al SI. Adicionalmente, el receptor SR-A y el canal iónico KCa 3.1 han sido señalados como promotores de la activación de la microglía por βA. SR-A, CD36 y CD-47 promueven la fagocitosis de βA. Modificado de Heneka et al, 2014.

En respuesta a una señal de daño, las células de la microglía adquieren una morfología ameboide, retrayendo y engrosando sus prolongaciones (Kettenmann *et al.*, 2011). En este estado, al que se le denomina activado, las células de la microglía son capaces de migrar al sitio de daño, proliferar, y participar en la presentación de antígenos, llevar a cabo fagocitosis (Block, Zecca and Hong, 2007).

Además de responder como primera línea de defensa inmune en el SNC, las células de la microglía poseen también varios receptores para neurotransmisores y mediadores sinápticos a través de los cuales pueden monitorear la descarga neuronal de neurotransmisores y la funcionalidad sináptica (Salter and Beggs, 2014). El contacto transitorio con espinas sinápticas y terminales pre- y post-sinápticas le confiere a las células de la microglía no sólo la capacidad de remover aquellas neuronas no funcionales sino además, remodelar los circuitos neuronales durante la sinaptogénesis o en caso de disfunción sináptica (Salter and Beggs, 2014). La activación de las células de la microglía en respuesta a una señal de daño induce una respuesta pro-inflamatoria que se caracteriza por la liberación de factores neurotóxicos que incluyen ERO como óxido nítrico (NO), anión superóxido ( $O_2^-$ ), citocinas tales como el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina 6 (IL-6), interleucina 1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e interferón  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) (Block, Zecca and Hong, 2007); además de quimiocinas como CCL2/proteína quimiotáctica 1 (Block, Zecca and Hong, 2007; Goldmann, Tay and Prinz, 2013). Adicionalmente, la retracción de las prolongaciones de la microglía en el estado activado interfiere con sus funciones en estado de "reposo" o no activado entre las que destacan: la liberación de factores neurotróficos, que

favorecen la supervivencia neuronal, el escaneo constante de la descarga neuronal y la remodelación de circuitos neuronales (Salter and Beggs, 2014). Esta dualidad de funciones, que le confieren a la microglía por un lado, un efecto neuroprotector y por el otro un efecto neurotóxico, dan pie a una gran variedad de cuestionamientos orientados a dilucidar en qué momento, bajo qué contexto y qué mecanismos son los que direccionan a la microglía a realizar el cambio entre un perfil u otro, de manera que se pueda relacionar con el proceso neurodegenerativo y la progresión de la EA.

Existen varios reportes que demuestran que la microglía es reclutada hacia las placas seniles donde fagocita péptidos  $\beta$ A, se activa y secreta citocinas proinflamatorias; este reclutamiento hacia las placas coincide además con la presencia de neuritas distróficas y anomalías dendríticas y axonales (Xiang *et al.*, 2006). Adicionalmente, hay evidencia que indica que la sobreactivación de la microglía es un evento temprano (presintomático) en la EA antecediendo a la pérdida sináptica y la muerte neuronal (Cagnin *et al.*, 2001); esto correlaciona con el hecho de que la microglía pueda reconocer a los péptidos  $\beta$ A en su forma soluble (monómeros, oligómeros) antes de la formación de placas seniles. Además, se ha determinado que la activación de la microglía incrementa a medida que la EA progresa (Xiang *et al.*, 2006). Es importante señalar que a diferencia de aquél estímulo evocado por un agente patógeno que termina una vez que éste ha sido eliminado por la microglía, la estimulación constante y prolongada por los péptidos  $\beta$ A provoca que el estado pro-inflamatorio de la microglía no se detenga, sino que persista y dé lugar a un proceso inflamatorio crónico. Incluso, algunos grupos señalan que la transformación de la microglía hacia un fenotipo pro-inflamatorio que se observa normalmente durante el envejecimiento es un reflejo de una acumulación de insultos o estímulos menores a través del tiempo que incrementan el riesgo de padecer alguna enfermedad neurodegenerativa como la EA (Block, Zecca and Hong, 2007; Ransohoff, 2016). Se ha reconocido también, que el número de células de la microglía activadas presentes en la corteza cerebral de pacientes con la EA correlaciona con el incremento del deterioro cognitivo (Block, Zecca and Hong, 2007; Heppner, Ransohoff and Becher, 2015). Acorde con lo anterior, los niveles de citocinas y quimiocinas como IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 tanto en cerebros de pacientes con la EA como en los cerebros de los ratones transgénicos modelo de la EA se encuentran incrementados (Heppner, Ransohoff and Becher, 2015).

Las citocinas pro-inflamatorias secretadas por la microglía pueden provocar muerte neuronal a través de distintos mecanismos; son capaces de estimular la expresión de la isoforma inducible de óxido nítrico sintasa (iNOS) tanto en neuronas como en células gliales, generando un subsecuente incremento en la producción de óxido nítrico (NO), radicales libres así como la producción secundaria de peroxinitrito (ONOO $^-$ ) (Heneka, Golenbock and Latz, 2015). Estas moléculas (NO, ONOO $^-$ ) son capaces de modificar directamente la estructura de los

péptidos  $\beta$ A, nitrándolos (agregándoles un -N- en algún aminoácido) e incrementando con ello su tendencia a agregarse, además pueden inhibir la respiración mitocondrial y ocasionar daño directo a los componentes celulares a través de la oxidación de proteínas, daño a DNA y peroxidación lipídica (Heneka, Golenbock and Latz, 2015). Adicionalmente, citocinas como IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  pueden reducir los niveles de la proteasa denominada enzima degradadora de insulina (IDE), principal enzima encargada de eliminar a los péptidos  $\beta$ A (Halle *et al.*, 2008). Las especies reactivas de nitrógeno, por su lado, inducen muerte neuronal a través de un mecanismo denominado fagoptosis el cual es caracterizado por desencadenarse en ausencia del ligando neuronal CXCL31 normalmente reconocido mediante el receptor membranal de microglía CXCR31 para no engullir a las neuronas sanas (Salter and Beggs, 2014). Estudios recientes, han evidenciado que en etapas tempranas de la EA, los péptidos  $\beta$ A internalizados por las células de la microglia pueden ser detectados por receptores citoplásmicos pertenecientes a la familia de los receptores citoplásmicos tipo NOD denominados NLRs (Heneka, Golenbock and Latz, 2015). La activación de los receptores NLRs conduce a la formación de un complejo de señalización multiproteico denominado inflammasoma que forma parte de la respuesta del sistema inmune innato.

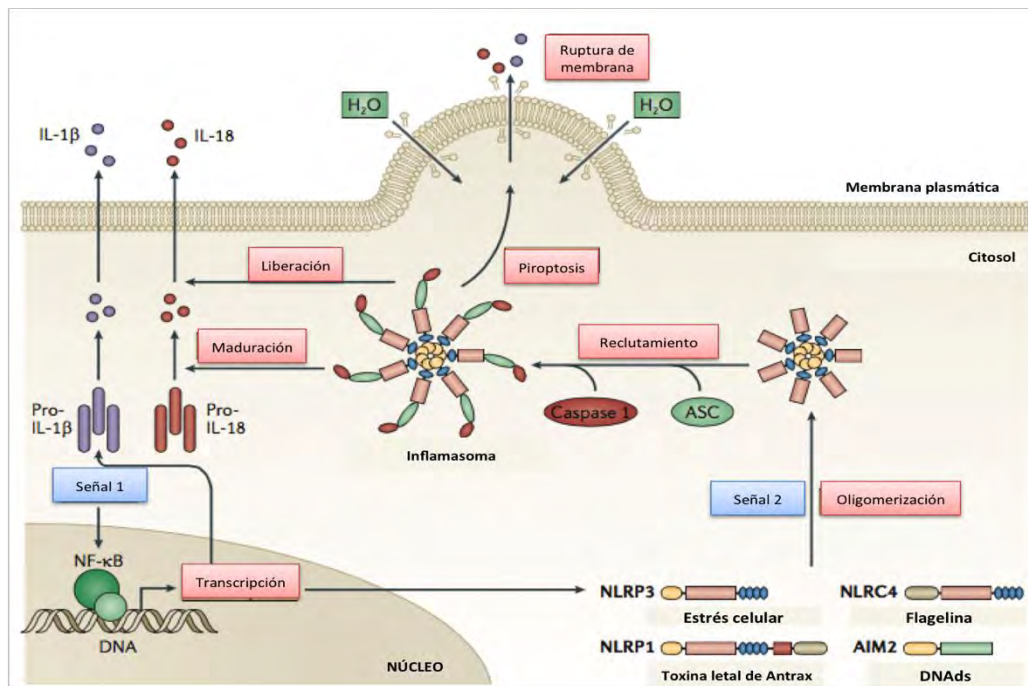
### ***Inflamasomas en el SNC***

Los inflammasomas son complejos multiproteicos constituídos principalmente por tres componentes: un receptor citosólico, la enzima caspasa 1 y, dependiendo del receptor, una proteína adaptadora de caspasa (ASC) que facilita la interacción de los primeros dos componentes (Schroder and Tschopp, 2010). Estos receptores pueden detectar señales extracelulares como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o bien, señales intracelulares como patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) (Schroder and Tschopp, 2010; Latz, Xiao and Stutz, 2013) (Fig. 4.0). La detección de alguna de estas señales promueve la oligomerización del inflammasoma mediante interacciones proteicas homotípicas que conllevan a la activación de pro-caspasa 1. Una vez activa, caspasa 1 promueve la maduración proteolítica de las pro-interleucinas IL-1 $\beta$  e IL-18 y en algunos casos, la muerte celular por piroptosis (Schroder and Tschopp, 2010). Cabe mencionar que el SNC es particularmente sensible a la activación de los inflammasomas, dado que diversos tipos neuronales expresan los receptores para ambas citocinas. Dentro del SNC se han identificado distintos receptores citosólicos expresados diferencialmente en microglía, neuronas y astrocitos, entre los que destacan NLRP1, NLRP2, NLRP3, NLRC4 y AIM2 (Fig 4.0) (Walsh, Muruve and Power, 2014).

El inflammasoma NLRP3 es por mucho, el inflammasoma más estudiado dentro de distintos contextos de daño neurológico que incluyen infecciones, daño cerebral agudo así como enfermedades neurodegenerativas crónicas. Particularmente, se han identificado algunas

moléculas asociadas a enfermedades neurológicas como los péptidos  $\beta A$ , la proteína priónica (PrP) y  $\alpha$ -sinucleína como activadores de este inflamasoma (Walsh et al, 2014). Otras señales intracelulares como cambios en los flujos iónicos, ruptura de endosomas, producción e de ERO y disfunción mitocondrial también pueden activarlo (Walsh et al, 2014).

Son tan variados los estímulos activadores del inflamasoma NLRP3 que es inevitable suponer que debe de existir un punto de convergencia entre todos ellos que funcione como un nodo conector capaz de regular finamente su activación.

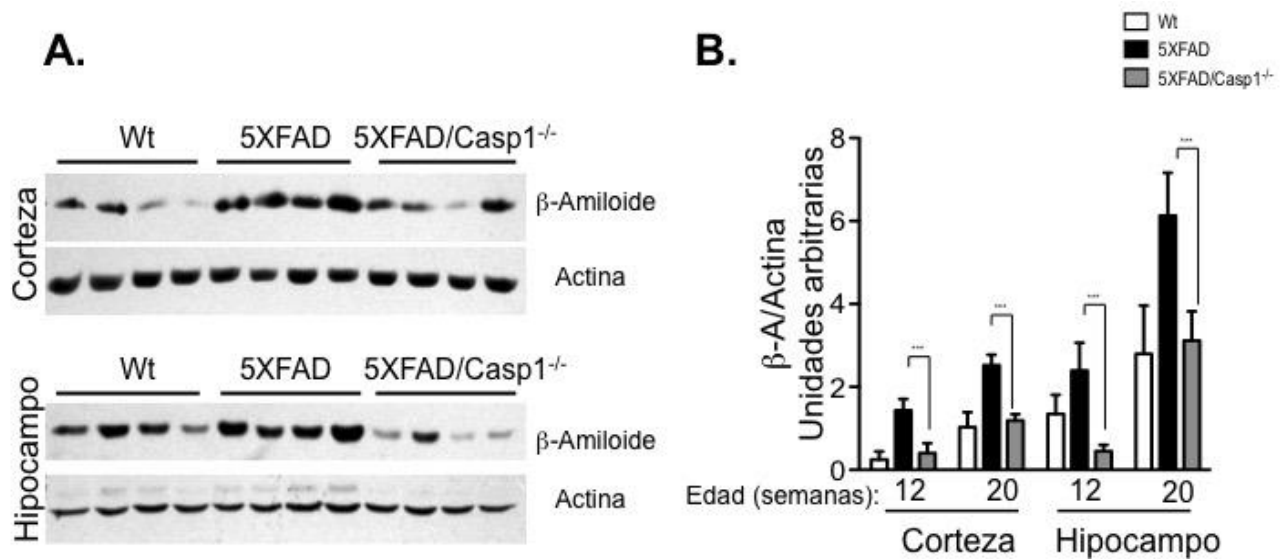


**Fig 4.0 Activación del inflamasoma.** En respuesta a patógenos individuales o insultos derivados del ambiente intracelular, distintos receptores citosólicos (receptores tipo NOD-, LRR y con dominio de pirinas-1 (NLRP1), NLRP3, NLRP5, NLRC4 y AIM2) son capaces de formar inflamasomas mediante cascadas de señalización río abajo en común. Un primer estímulo denominado "priming" (Señal 1), actúa a nivel transcripcional a través de la vía de NF- $\kappa$ B para inducir la expresión de los precursores pro-interleucina-1 $\beta$  (pro-IL-1 $\beta$ ) y de receptores como NLRP3. En el citosol, los receptores citosólicos detectan distintos ligandos que contienen DAMPs o PAMPs (Señal 2) y oligomerizan para formar una plataforma de activación para caspasa 1. Para algunos complejos, el reclutamiento de caspasa 1 requiere de una proteína adaptadora denominada ASC. A través de su actividad proteasa caspasa 1 regula la maduración y liberación de IL-1 $\beta$  e IL-18 así como la muerte celular por piroptosis. Para algunos complejos de inflamasomas, su estímulo activador es conocido, pero para otros (como NLRP3) su activación ha sido asociada con un rango muy amplio de estresores fisiológicos, incluyendo flujos iónicos, ruptura endosomal, ERO ó disfunción mitocondrial, DNAds, así como la toxina letal del antrax. (Modificado de Walsh, Muruve and Power, 2014)

### ***El inflamasoma NLRP3 en la EA***

La importancia de la activación del inflamasoma NLRP3 tanto en la EA como en el proceso normal de envejecimiento ha quedado de manifiesto con el retraso del declive cognitivo en

ratones seniles nulos para el receptor NLRP3 (Heneka et al, 2013). De manera más específica, Halle y colaboradores demostraron *in vitro* que la fagocitosis de péptidos  $\beta$ A fibrilares por células de microglía inmortalizadas resulta en la activación del inflammasoma NLRP3, y más aún, que ésta es específica de este inflammasoma dado que aquellas células de la microglía NLRP3<sup>-/-</sup> y ASC<sup>-/-</sup> no liberaban IL-1 $\beta$  al medio extracelular. El mecanismo al que atribuyen la activación del inflammasoma NLRP3, es mediante daño lisosomal y la liberación de la enzima proteolítica cathepsina b, sin embargo, es importante señalar que esto sólo sucedería una vez que el sistema de degradación lisosomal se encuentre saturado por péptidos  $\beta$ A en su forma fibrilar (Halle *et al.*, 2008). La ausencia de ASC, NLRP3 y caspasa 1 en células de microglía, previene los efectos neurotóxicos de éstas al abatir o atenuar la liberación de óxido nítrico y TNF- $\alpha$ , respectivamente. Y además, que este proceso está regulado autócrina y parácrinamente por IL-1 $\beta$  ya que la liberación de estos factores es mucho menor en aquellas células de microglía deficientes en el receptor IL-1R (Halle *et al.*, 2008). En línea con esto, también se demostró que la ausencia de caspasa 1 previene la inducción del incremento en la expresión del RNAm de quimiocinas (CCL2, CCL4y CXCL2) liberadas por la microglía tras ser estimuladas por péptidos  $\beta$ A. Estas evidencias también fueron comprobadas *in vivo* tras una inyección intraestriatal de péptidos  $\beta$ A fibrilares comparando ratones nulos para el receptor IL-1R y para la proteína adaptadora MyD88 con ratones silvestres (Heneka *et al.*, 2013). La quimiotaxis y por lo tanto, el reclutamiento de células de microglía, detectada histológicamente con el marcador F4-80, al sitio de inyección resultó mucho menor en los ratones nulos comparados con los silvestres (Heneka *et al.*, 2013). Paralelamente, datos de nuestro laboratorio, corroboran la importancia de la activación de caspasa 1 en la EA, ya que tanto la deposición de péptidos  $\beta$ A (Figura 5.0) como la gliosis reactiva en corteza e hipocampo disminuyen en ratones 5XFAD/caspasa 1<sup>-/-</sup>, además de mostrar un retraso en el declive cognitivo con una evidente mejoría en pruebas de aprendizaje y memoria comparados con aquellos 5XFAD/caspasa1<sup>+/+</sup>(Fig 5.0). Por lo que, existe suficiente evidencia que demuestra que la activación de NLRP3 es un proceso relevante en el proceso neuroinflamatorio asociado al inicio, desarrollo y progresión de la neurodegeneración.



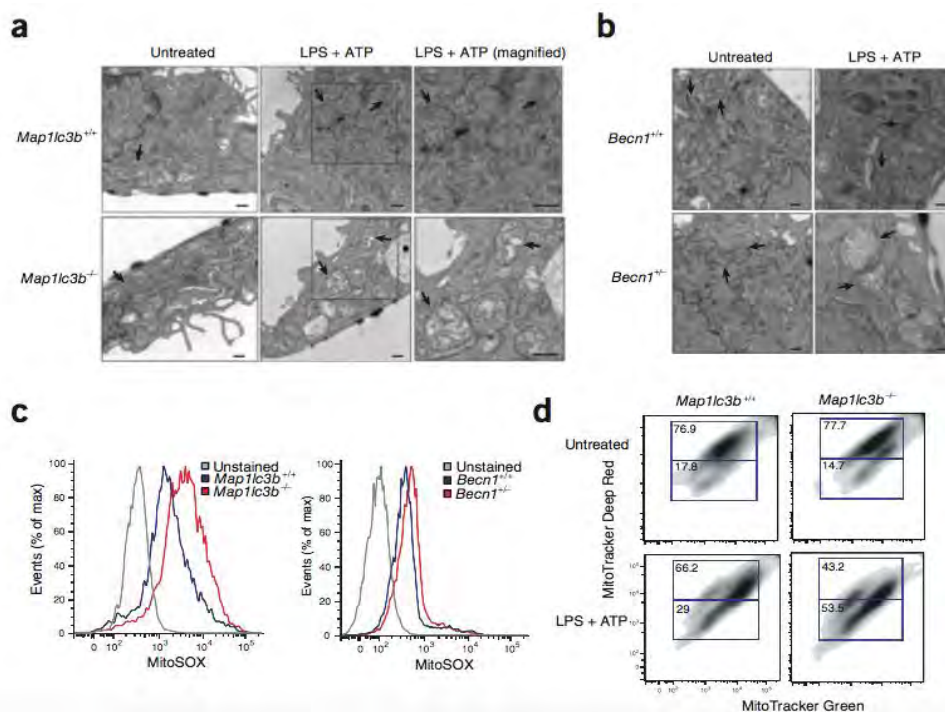
**Fig. 5.0** **Reducción de los niveles de péptidos Aβ en corteza e hipocampo de ratones 5XFAD/casp1<sup>-/-</sup> vs 5XFAD.** A) Niveles de péptidos Aβ evaluados por western blot utilizando anticuerpos específicos para péptidos Aβ oligoméricos detectados a partir de extractos proteicos totales de ratones de 20 semanas: silvestres (Wt), 5XFAD y 5XFAD/casp1<sup>-/-</sup>; se muestra Actina como control se carga. B) Valores densitométricos normalizados de los niveles de péptidos Aβ correspondientes a corteza e hipocampo de ratones Wt, 5XFAD y 5XFAD/casp1<sup>-/-</sup> de 12 y 20 semanas. Los valores corresponden al promedio ± erro estándar, las diferencias fueron analizadas mediante un ANOVA de una vía seguida de una prueba Tukey, n=5 por grupo, \*\*\*p<0.001. (Álvarez-Arellano et al, manuscrito en preparación).

### Control mitocondrial del inflammasoma NLRP3

El control de la mitocondria sobre la activación del inflammasoma NLRP3 incluye la participación de proteínas presentes en la membrana externa mitocondrial como la proteína mitocondrial asociada a la señalización antiviral (MAVS) o las proteínas mitofusinas 1 y 2 (Mfn1 y Mfn2) así como el lípido cardiolipina constituyente de la membrana interna mitocondrial (Lyer *et al.*, 2013; Gurung, Lukens and Kanneganti, 2015). Resultados obtenidos por Lyer et al, mostraron que cuando cardiolipina se expone en la membrana externa mitocondrial es capaz de unirse directamente al dominio LRR de NLRP3 induciendo su activación (Lyer et al. 2013). Adicionalmente se ha comprobado que la proteína MAVS, es requerida para el reclutamiento de NLRP3 con el que interacciona a través de su dominio PYD hacia la membrana mitocondrial sin necesidad de la proteína adaptadora ASC (Koshiba, 2013).

Por otro lado, las ERO mitocondriales generadas al inhibir tanto el complejo I como el complejo III de la cadena transportadora de electrones, con rotenona y antimicina respectivamente, son capaces de activar al inflammasoma NLRP3 (Zhou, Yazdi and Menu, 2011; Heid *et al.*, 2013); ya que su presencia induce el aumento en la secreción de IL-1β en macrófagos THP-1 de manera dosis-dependiente (Zhou, Yazdi and Menu, 2011). Esta relación se confirmó cuando al utilizar el atrapador específico de EROmit MitoTEMPO se inhibía la activación del inflammasoma NLRP3 (Zhou, Yazdi and Menu, 2011). Además, la activación del inflammasoma NLRP3 (por nigericina ó sales de uridato) provoca que tanto NLRP3 como ASC se relocalicen hacia las membranas de asociación a retículo endoplásmico y mitocondria (Zhou,

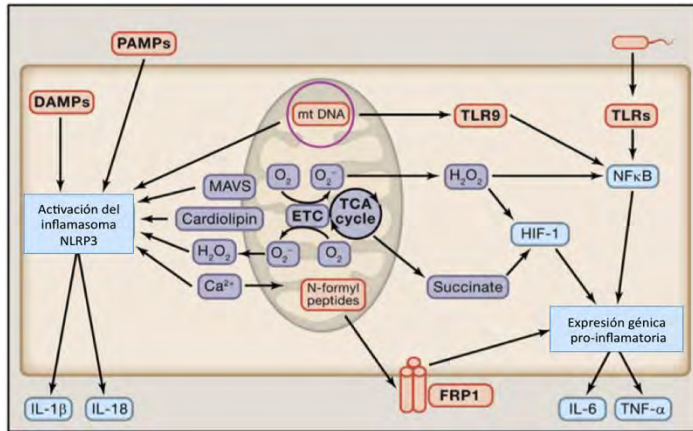
Yazdi and Menu, 2011). El DNAMit también juega un rol importante en la activación del inflammasoma, ya que Nakahira y colaboradores demostraron que el DNAMit oxidado colocaliza directamente con NLRP3 e induce su activación directamente al liberarse al citosol con la subsecuente liberación de IL-1 $\beta$ (Nakahira *et al.*, 2010). Por si esto fuera poco, en el 2011 Zhou y colaboradores demostraron en macrófagos de humano THP1 que la activación del inflammasoma NLRP3 en respuesta a distintos estímulos (nigericina, alumbre, sales de uridato) requiere de una relocalización del receptor NLRP3 desde retículo endoplásmico hasta los sitios adyacentes entre mitocondria y retículo endoplásmico, también denominadas membranas asociadas a mitocondria (MAMs) (Wieckowski *et al.*, 2009). Además se ha comprobado que existe una estrecha relación entre el control de la activación del inflammasoma NLRP3 y las proteínas autofágicas LC3 y Beclina, ya que se ha demostrado que el proceso autofágico contiene el daño mitocondrial controlando con ello los niveles de ERO mitocondriales así como la liberación del DNA mitocondrial al citosol por mitocondrias dañadas, en la figura 6.0 la ausencia tanto de LC3 como de Beclina en macrófagos de médula ósea (BMDMs) tratados con activadores del inflammasoma NLRP3, LPS+ATP, exagera el daño mitocondrial en macrófagos tal como se muestra en las alteraciones morfológicas las imágenes 6a y 6b, además de un aumento de ERO mitocondriales (6.0c) y una marcada disminución en su funcionalidad mitocondrial (6.0d) (Nakahira et al, 2010).



**Figura 6.0 La ausencia de proteínas autofágicas altera el fenotipo mitocondrial.** a) b) Micrografías electrónicas que muestran alteraciones morfológica mitocondrial de BMDMs *Map1c3b*<sup>-/-</sup> ó *Becn1*<sup>-/-</sup> (indicadas con flechas) ;(b) BMDMs no tratados o incubados por 6h con LPS (10 ng/ml) y luego estimulados por 30min con ATP (1mM). Escala de 500 nm (barras negras). c) Citometría de flujo de BMDMs *Map1c3b*<sup>-/-</sup> ó *Becn1*<sup>-/-</sup> sin teñir (izquierda) o marcados con MitoSOX (derecho). d) Citometría de flujo de BMDMs no tratados (izquierda) o bien estimulados con LPS+ATP; las células fueron teñidas por 15min con Mitotracker Deep Red y Mitotracker Green antes del tratamiento con ATP. Se muestran imágenes y datos representativos de tres experimentos. (Nakahira et al, 2010)



Finalmente, esta evidencia se muestra resumida en el esquema de la Figura 7.0 (Weinberg, Sena and Chandel, 2015) , en su conjunto vuelve factible sugerir que la mitocondria puede ser ese nodo interconector en donde converjan los distintos estímulos activadores del inflamasoma NLRP3 para ser traducidos en señales de daño mitocondriales específicas capaces de activar directamente la formación de este complejo multiproteico y con ello la activación de sus efectores, detonando y coadyuvando el proceso neuroinflamatorio descrito para la EA (Guerrero-Beltrán *et al.*, 2010).



**Figura.7.0 Vías de activación de la respuesta inmune reguladas por mitocondria.** Componentes mitocondriales como el DNAmít así como sus péptidos N-formilo pueden ser detectados al interior de la célula como DAMPs. El DNAmít puede activar directamente al inflamasoma NLRP3 y a TLR9 para inducir una respuesta inflamatoria. Adicionalmente, las EROmit favorecen la expresión génica pro-inflamatoria, son activadores del inflamasoma NLRP3 y moléculas efectoras antimicrobianas. Succinato y los péptidos N-formilo también favorecen a la expresión génica pro-inflamatoria. Componentes estructurales mitocondriales como la proteína MAVS y lípidos como cardiolipina también participan en la activación del inflamasoma NLRPP3. Finalmente, el calcio intracelular también está implicado en la activación de éste inflamasoma y en la función y señalización de mitocondria. Modificado de Weinberg et al, 2014.

## HIPÓTESIS

La respuesta inflamatoria resultante de la presencia de péptidos β-amiloides en el tejido cerebral de ratones 5XFAD induce alteraciones en la función mitocondrial en células de la microglía durante el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer.

---

## OBJETIVOS

---

### **Objetivo General**

Determinar la alteración temprana y progresiva del estado funcional de las mitocondrias presentes en el tejido cerebral y células de la microglía de ratones 5XFAD.

### **Objetivos específicos:**

- a) Determinar el impacto del proceso inflamatorio inducido por la presencia de péptidos  $\beta$ -amiloides sobre la morfología mitocondrial en el tejido cerebral de ratones 5XFAD.
- b) Determinar el efecto de la presencia de péptidos  $\beta$ -amiloides sobre el estado funcional global de las mitocondrias en células de la microglía del tejido cerebral de ratones 5XFAD.
- c) Identificar si la ausencia de caspasa 1 ejerce algún efecto sobre la funcionalidad mitocondrial en las células de microglía.
- d) Dilucidar si existe alguna relación entre el estado funcional mitocondrial de las células de microglía y los niveles de ERO y si la ausencia de caspasa 1 tiene algún efecto sobre esta relación.

---

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

### ***Animales***

Se utilizaron 66 ratones machos adultos: 20 ratones transgénicos 5XFAD, 20 ratones silvestres C57/SJL, ambos obtenidos de The Jackson Laboratory, 18 ratones transgénicos 5XFAD Casp1<sup>-/-</sup> los cuales fueron obtenidos al cruzar la cepa 5XFAD con ratones deficientes de Caspasa 1 provistos por el Dr. Teuscher de la Universidad de Vermont con ratones 5XFAD, y 8 ratones Casp1<sup>-/-</sup>. Se formaron tres distintos grupos correspondientes a 8, 12 y 20 semanas de edad. Los

animales fueron mantenidos en cajas convencionales con un máximo de 5 ratones por jaula, y se mantuvieron en el bioterio del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, siguiendo las reglas establecidas por el comité de bioética, manteniendo un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas con agua y comida *ad libitum*.

### ***Aislamiento de células de la microglía***

Cada ratón fue sacrificado por decapitación, su cerebro fue removido y sometido a una digestión enzimática de tejido mediante el kit de disociación Neural Tissue Dissociation Kit (P) Cat. No. 130-092-628 de Milteny Biotec® siguiendo el protocolo anexo al Kit con algunas modificaciones (Anexo I). Posteriormente, para remover el debris celular de nuestra suspensión se utilizaron las perlas magnéticas de remoción de mielina Myelin Removal Bead II Cat. No. 130-096-433 y se realizó una selección positiva de mielina mediante el uso de columnas magnéticas tipo LS de acuerdo con el protocolo descrito anexo, recuperando así la selección negativa de células para su posterior separación (Anexo II). En sustitución de este método también se utilizó la remoción de mielina por separación de gradientes de Percoll de acuerdo con el método descrito en el Capítulo 3 del manual titulado Microglia: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. Finalmente, se utilizaron perlas magnéticas para CD11b+ , CD11b (Microglia) Microbeads, tanto las células recuperadas tanto de la separación por perlas magnéticas de mielina como a la fase libre de mielina correspondiente al método de gradiente de Percoll fueron marcadas magnéticamente con ayuda de estas perlas y posteriormente la suspensión celular fue colocada en una columna tipo LS y colocadas en el magneto del separador de MACS de una columna. La columna LS es retirada del magneto de tal modo que las células marcadas como CD11b+ retenidas en ella pudieran ser eluidas y así obtener la fracción positiva de células de microglía.

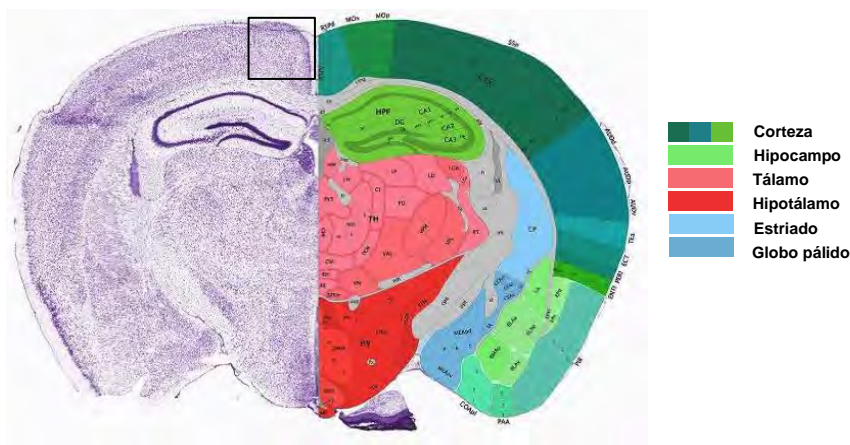
### ***Citometría de flujo***

Las células de microglía (100, 000 células por tinción) aisladas fueron teñidas, de manera simple o con doble marcaje, con Mitotracker Green (Invitrogen, M7514), para medir masa mitocondrial y Mitotracker Deep Red (Invitrogen, M22426), para medir funcionalidad mitocondrial, ambas a 50 nM durante 15 min a 37 °C. Las especies reactivas de oxígeno mitocondriales fueron cuantificadas mediante la tinción MitoSOX (Invitrogen, M36008) usada a una concentración de 2.5 µM por 30 min a 37 °C. Una vez teñidas las células fueron centrifugadas a 300 g x 5 min y resuspendidas en solución FACS (PBS 1X + 2% SFB). Para el marcaje con CD11b, brevemente, 100, 000 células fueron resuspendidas en 100 µl de solución FACS a la que se le añadió el anti-CD11b acoplado a Alexa 488 utilizando una dilución de 1:2000, se incubó durante 20 min en hielo bajo condiciones de oscuridad, posteriormente las células fueron centrifugadas a 300 g x 5 min, se recuperó el pellet y posteriormente éste fue fijado con 25 µl de PFA 4% en 100 µl de solución FACS. La detección y cuantificación de cada

una de las tinciones se realizó a través del citómetro FACS-canto II (BD), el análisis de las tinciones mitocondriales se realizó el mismo día del aislamiento celular, mientras que el marcaje de Cd11b con las células ya fijadas en PFA 4% se llevó a cabo al día siguiente. El análisis citométrico se realizó con el software FlowJo 8.7 (TreeStar, Ashland, OR).

### **Microscopía electrónica**

Ratones 5XFAD y 5XFAD/caspasa 1<sup>-/-</sup> de 20 semanas fueron anestesiados con ketamina (80mg/kg) y luego perfundidos transcárdialmente con solución salina PBS y 4% de paraformaldehído a temperatura ambiente durante 20 minutos. Una vez perfundidos se extrajeron rápidamente los cerebros y se colocaron en paraformaldehído al 4% hasta su análisis. Se realizaron los cortes coronales en la región que se muestra a continuación (enmarcada en un rectángulo) (Fig. 8.0). Después de tres lavados en PBS, los tejidos fueron fijados nuevamente pero ahora con 1% de tetróxido de osmio a 4°C por 2h y posteriormente lavados tres veces más con PBS. Posteriormente fueron embebidos en resina EPON® por 48h. Los cortes ultrafinos fueron realizados con un ultramicrotomo (UltraCut-UCT, Leica) para obtener rebanadas de 70 nm de grosor que luego fueron colocadas en rejillas de cobre. Finalmente, se realiza una tinción con uranilo al 2% durante 15 minutos a temperatura ambiente, para ser analizadas posteriormente en el microscopio de transmisión electrónica Zeiss Libra 120 y las imágenes adquiridas con una cámara CCD (300 W Dual Vision Gatan Inc) con una aceleración de 120 kV. Para la comparación relativa de la morfología ultraestructural mitocondrial fueron analizadas un total de 10 cuadrantes de 4µm x 4µm en las micrografías electrónicas de tres cerebros distintos de 5XFAD y 5XFAD/caspasa 1<sup>-/-</sup>.

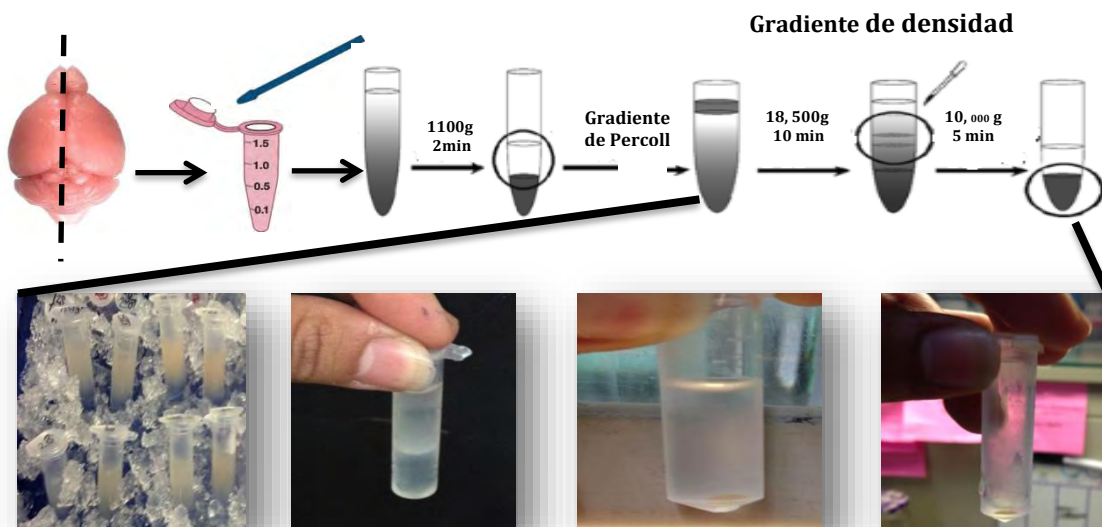


**Fig. 8.0 Sección coronal examinado por microscopía electrónica.** Esquema representativo del corte coronal correspondiente a la sección examinada, se señala en un recuadro negro exactamente el área a partir de la cual se realizaron rebanadas de 70 nm con un ultramicrotomo (UltraCut-UCT, Leica). El esquema se toma del atlas murino interactivo <http://atlas.brain-map.org> (P56), de lado izquierdo se muestra el corte con la tinción Nissl, y en su contraparte derecha se muestran las regiones cerebrales específicas correspondientes.

### **Aislamiento fracción mitocondrial**

El aislamiento de las fracciones mitocondriales se realizó mediante un gradiente de Percoll a partir del cerebro completo de ratones C57/SJL, 5XFAD y 5XFAD/casp1<sup>-/-</sup> de acuerdo a lo

reportado por Wang et al, 2011 (Método B) con algunas modificaciones (Figura 9.0). Brevemente, los ratones fueron sacrificados por decapitación y el cerebro fue rápidamente extraído y dividido en dos hemisferios; cada hemisferio se colocó en un tubo eppendorff de 1.5 ml con 950 $\mu$ l amortiguador de aislamiento IBA (Manitol 225 mM, Sacarosa 75 mM, EGTA 1mM, HEPES-KOH 5mM, pH 7.4 + 1mg BSA) y se disoció con ayuda de un homogenizador plástico de tejido (esta acción se repite dos veces en el mismo tubo eppendorff). Los homogenizados fueron centrifugados durante 2 min a 1, 100g a 4°C. El sobrenadante resultante se separó en 2 tubos eppendorff a los cuales de les colocó 700 $\mu$ l, el pellet fue recolectado y guardado a -70°C para análisis posteriores. Cada 700 $\mu$ l de sobrenadante es mezclado con 75 $\mu$ l de Percoll al 80% diluído en el buffer de aislamiento IB<sub>B</sub> (Sacarosa 1M, HEPES 50mM, EGTA 10 mM, pH 7.0). Enseguida, esta mezcla fue transferida cuidadosamente por encima de 750 $\mu$ l de Percoll al 10% (diluído en IBA a partir del Percoll al 80%) contenidos en un nuevo tubo eppendorff de 2 ml. Una vez que las dos fases de Percoll fueron distinguibles (Figura 9.0) se realizó una centrifugación de 18, 500g durante 10min a 4°C, se removió la fracción superior que está enriquecida en mielina, el pellet fue posteriormente lavado al agregarle 1ml de amortiguador de lavado (Sacarosa 250mM, HEPES-KOH 5mM y EGTA 0.1mM, ph 7.2) y centrifugarlo a 10, 000g por 5 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el pellet final es conservado ya que se encuentra enriquecido en mitocondrias, éste puede fue congelado a -70°C ó bien, mantenido en hielo para realizar extracción de proteínas.



**Fig. 9.0 Aislamiento de fracciones mitocondriales.** Se muestra el esquema y las imágenes representativas del método de aislamiento de fracciones mitocondriales a partir de cerebros de ratones ratones C57/SJL, 5XFAD y 5XFAD/casp1<sup>-/-</sup> de 8, 12 y 20 semanas de acuerdo al método descrito por Wang et al, 2011.

### ***Extracción de proteínas***

Se extrajo proteína total a partir de las fracciones mitocondriales aisladas como se describió previamente. Los extractos proteicos se prepararon usando el amortiguador de lisis TLB (Tris 20 mM pH 7.4 NaCl 137 mM,  $\beta$ -glicerol fosfato 25mM, pirofosfato de sodio 2 mM, EDTA 2mM pH 7.4, Tritón X-100 1%, Glicerol 10%) adicionado con un cocktail de inhibidores de proteasas denominado cOmplete™, PMSF 1mM (fluoruro de fenilmetilsulfonilo),  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  1 $\mu$ M (ortovanadato de sodio) y DTT 0.5mM (ditiotreitól). A cada fracción mitocondrial se le añadió 200 $\mu$ l de esta mezcla de amortiguador de lisis manteniendo las muestras en hielo y posteriormente sonicados durante 10s a una intensidad de frecuencia al 25%. Este lisado se centrifugó a 14, 500 rpm durante 10min y se recupera el sobrenadante. La concentración proteica se determinó posteriormente por el método de Bradford normalizando con una curva estándar de albúmina.

### ***Western Blot***

Se utilizaron 30 ó 50 $\mu$ g (para la detección de péptidos  $\beta$ A) de extractos de proteína, las cuales se separaron las proteínas de interés mediante electroforesis en geles de poliacrilamida de 15 o 20% utilizando una corriente de 35 mA por gel. Posterior a la separación, éstas proteínas fueron transferidas, en húmedo, a membranas de nitrocelulosa o PVDF utilizando una corriente eléctrica de 100 V por 90 min, la transferencia de proteínas se corrobora mediante la tinción de la membrana con rojo de Ponceau (P7170, Sigma). Las membranas son bloqueadas en agitación durante 1h con leche al 5% disuelta en TBS1X/Tween 0.1% (TBS-T 0.1%). Se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno con TBS-T 0.1%. Enseguida, las membranas fueron incubadas con los anticuerpos primarios correspondientes durante toda la noche a 4°C, las especificaciones para el uso de cada anticuerpo se encuentran señaladas en la Tabla 1.0. %). Se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno con TBS-T 0.1%. Posteriormente, las membranas fueron incubadas con anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa de rábano (HRP) durante 1h a T° amb. Finalmente, se realizaron los últimos 3 lavados con TBS-T 0.1% , el revelado se realizó en películas radiográficas (Kodak films-Medical X-ray general purpose blue)

## Anticuerpos

Anticuerpo	# catálogo	Diluyente	Dilución anticuerpo 1º	Anticuerpo 2º	Dilución anticuerpo 2º
actina	SC	Leche 5%	1:1000	$\alpha$ -goat	1:3000
BRP44-L ó MPT	AB 157547	TBS-T 0.1%	1:500	$\alpha$ -rabbit	1:3000
caveolina	BD 610060	Leche 5%	1:5000	$\alpha$ -rabbit	1:5000
$\beta$ -Amiloide (1-42)	Covance 9142-02	Leche 5%	1:500	$\alpha$ -mouse	1:3000

## Análisis estadístico

Cada experimento fue realizado tres o cuatro veces de manera independiente con ratones 5XFAD, 5XFAD/caspasa 1<sup>-/-</sup> y C57/SJL de 8, 12 y 20 semanas. Los datos fueron analizados con el software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) comparando entre genotipos y entre las distintas edades mediante pruebas t-student (Mann-Whitney), las diferencias se consideraron significativas a partir de \* $p < 0.05$ , los resultados se muestran graficados como el promedio  $\pm$  desviación estándar.

---

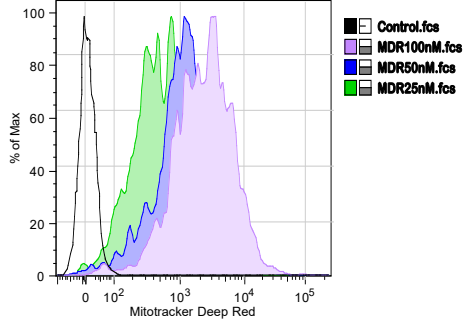
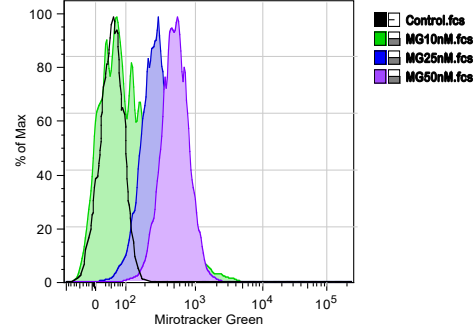
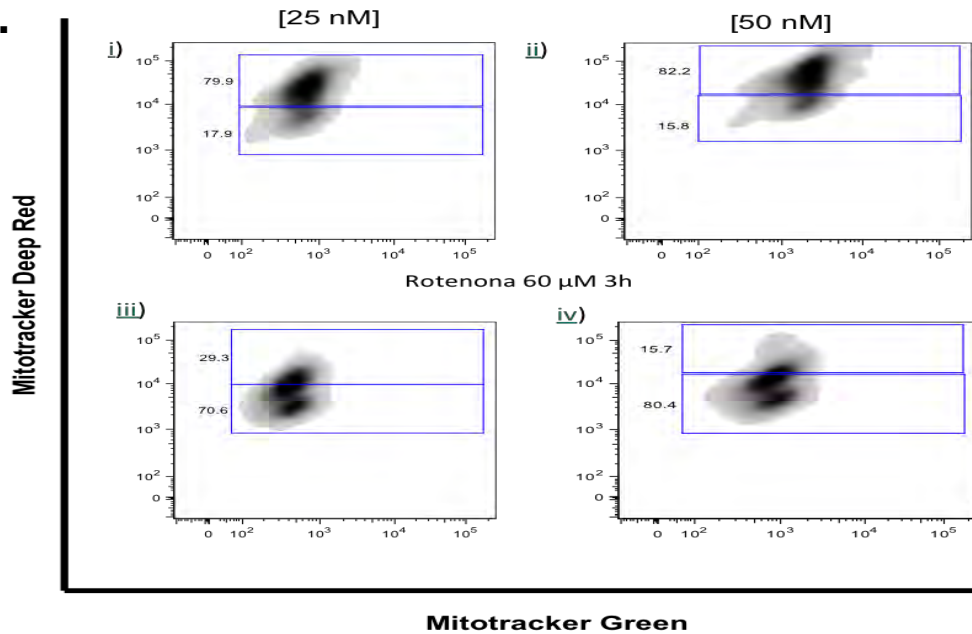
## RESULTADOS

---

Como se ha reportado previamente en diversos trabajos (Zhou et al, 2011; Nakahira et al, 2010, Shimada et al, 2012) el estado funcional mitocondrial celular puede ser monitoreado a través de tinciones específicas para mitocondria: Mitotracker Green, tiñe a la masa mitocondrial en general; Mitotracker Deep Red es sensible a cambios en el potencial de membrana mitocondrial permitiendo distinguir aquellas mitocondrias funcionales (respirando) de las que no y MitoSOX, que tiñe principalmente a la ERO anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) cuya principal fuente de generación es mitocondrial.

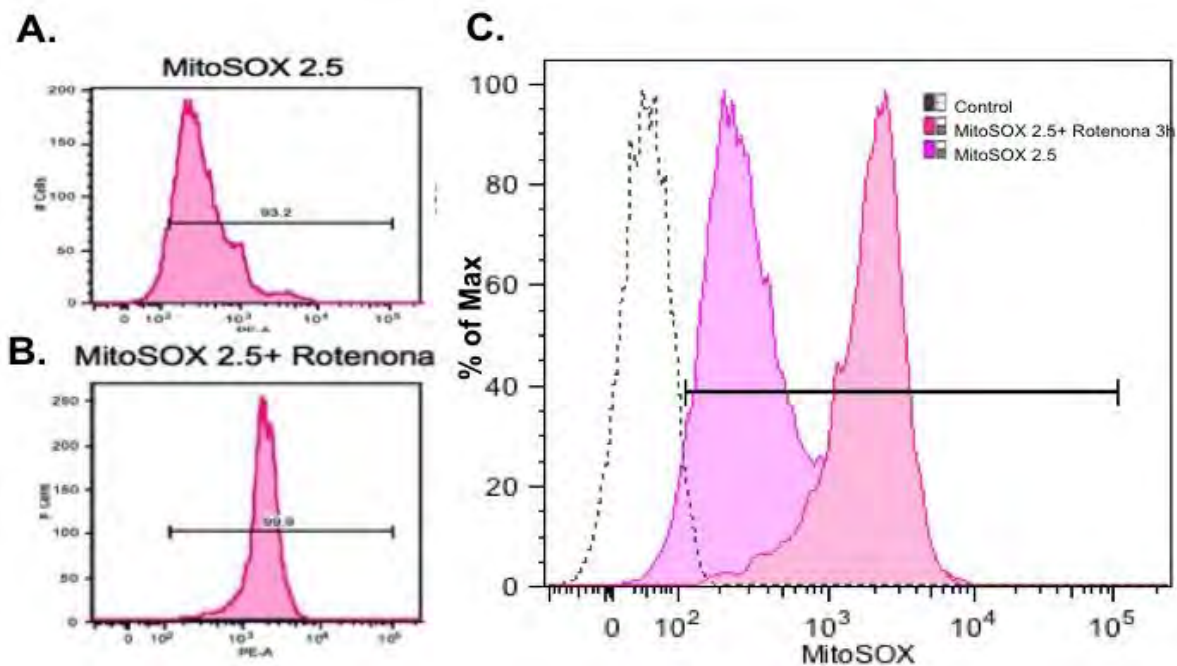
Antes de realizar la evaluación de la funcionalidad mitocondrial global en células de microglía con estas tinciones, se realizó la estandarización de cada tinción para determinar la concentración, así como el tiempo de incubación adecuado para los ensayos posteriores bajo nuestras propias condiciones. Se probaron tres concentraciones distintas para Mitotracker Green (MG), 10, 25 y 50 nM y tres para Mitotracker Deep Red (MDR), 25 nM, 50 nM y 100 nM; con incubaciones de 15 min a 37°C de acuerdo con lo reportado por la literatura (Zhou et al 2011, Nakahira et al 2010). Se utilizaron macrófagos Raw Blue de ratón, las figuras 10A y 10B muestran el conteo celular y el valor logarítmico de intensidad de fluorescencia tanto para Mitotracker Deep Red (Fig. 10.0A) como para Mitotracker Green (Fig 10.0B). Los reportes en los cuales se han utilizado estas tinciones para realizar un doble marcaje celular indican su uso en concentraciones equimolares, por lo que, con base en lo que se puede observar en la figura 10.0 A) y B), decidimos realizar la doble tinción con las concentraciones que resultaron más óptimas para el caso de MG por lo que se escogieron las concentraciones 25 y 50 nM para probar el doble marcaje. En la Fig.10.0 C) se muestra el doble marcaje en células Raw Blue con MG y MDR a 25 y 50 nM. Para comprobar la sensibilidad a los cambios en el potencial de membrana mitocondrial del MDR se utilizó Rotenona, un inhibidor específico del complejo I de la cadena transportadora de electrones. Las células Raw Blue fueron incubadas durante 3h con una concentración de 60  $\mu$ M de Rotenona en medio DMEM 4.5 g/l de glucosa sin suplementar. Tal como se puede observar en la figura 10C, en las células control (i y ii) , sin estímulo, se observa una población homogénea y bien definida con doble marcaje, sin embargo en aquellas células tratadas con Rotenona se observa la separación de una subpoblación mitocondrial que presenta una disminución en la intensidad de señal para Mitotracker Deep Red (iii y iv). Se delimitó a esta subpoblación, sobre el eje Y, justamente en el punto donde se separa del resto de la población, la selección de ésta área es la misma para ambos casos C) y D), donde se observa que entre un 70.6% y un 80.4 % de la población mitocondrial total se encuentra funcionalmente comprometida tras el tratamiento con Rotenona. Con esto comprobamos que esta tinción es efectivamente sensible a estímulos que alteran el potencial de membrana mitocondrial ( $\Psi_{mit}$ ). Se eligió la concentración de 50 nM para ambas tinciones ya que como se puede observar en el mismo gráfico, el cambio en la distribución de las células teñidas con MDR tras el tratamiento con Rotenona resulta más claro a esta concentración (Fig 10.0C, iv).



**A.****B.****C.**

**Fig. 10.0 Estandarización de tinciones mitocondriales por citometría de flujo.** Se tiñeron 250,000 células Raw Blue en medio DMEM con glucosa (4.5g/l) sin suplementar durante 15 min a 37°C. A) Se muestra la titulación de Mitotracker Deep Red a 25, 50 y 100 nM B) Titulación correspondiente a 10, 25 y 50 nM de Mitotracker Green C) Doble marcaje en células Raw Blue con concentraciones equimolares de Mitotracker Green y Mitotracker Deep Red (25 y 50 nM) con o sin un tratamiento con Rotenona 60  $\mu$ M por 3h.

Simultáneamente, aquellas células Raw Blue tratadas con Rotenona también fueron analizadas por citometría de flujo con la tinción para ERO mitocondriales (EROm) MitoSOX, utilizando una concentración de 2.5  $\mu$ M por 30 min a 37°C conforme a lo reportado (Zhou, Yazdi and Menu, 2011). En la Figura 11C se puede observar el aumento en la intensidad de fluorescencia de MitoSOX en aquellas células tratadas con Rotenona comparado con aquellas sin tratamiento. Estos resultados nos indican que las condiciones de concentración e incubación de MitoSOX son adecuadas para identificar cambios en los niveles de EROm como se aprecia por la intensidad de fluorescencia.

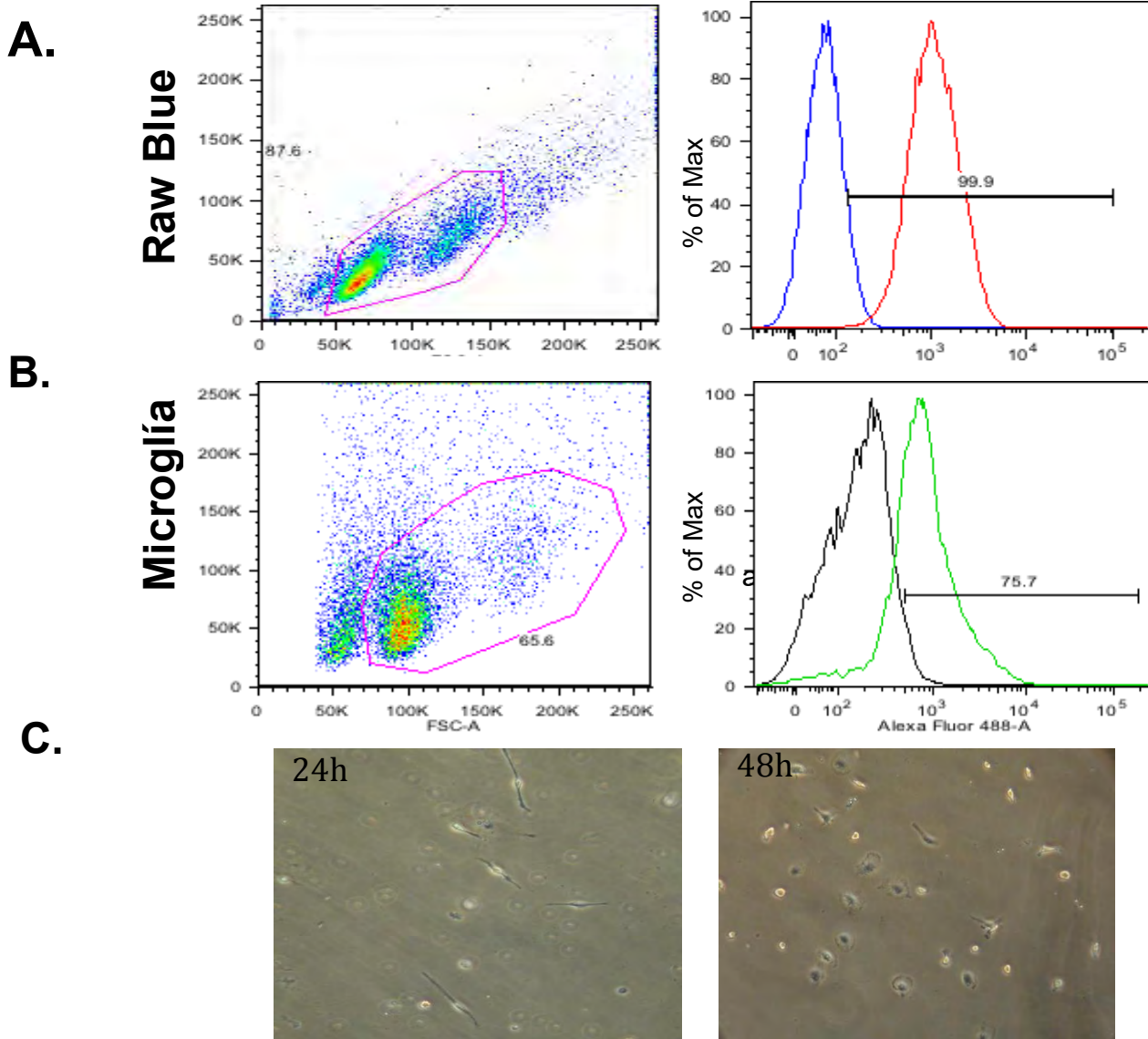


**Fig. 11.0 Cuantificación de EROm por MitoSOX por citometría de flujo.** Se tiñeron 250,000 células Raw Blue en medio DMEM con glucosa (4.5g/l) sin suplementar durante 30 min a 37°C. Se muestran individualmente los histogramas correspondientes a la intensidad de fluorescencia de MitoSOX de aquellas células Raw Blue no tratadas A) y en B) aquellas tratadas con Rotenona 60  $\mu$ M por 3h. C) Sobrelape de los histogramas de A) y B) y las células no teñidas.

### **Caracterización de la pureza del aislamiento de los cultivos microgliales del tejido cerebral de ratones adultos 5XFAD.**

Una vez obtenidas las condiciones óptimas de tinción para los parámetros de funcionalidad mitocondrial y niveles de EROm se corroboró también por citometría de flujo el grado de pureza de aislamiento por columna de las células de la microglía de ratones adultos 5XFAD (8, 12 y 20 semanas). Se obtuvieron las células de microglía aisladas correspondientes un pull de 3 cerebros de ratones de 8 semanas. Se utilizó como marcador a la proteína de superficie Cd11b, normalmente usada para identificar a macrófagos y microglía. Tal como se observa en la figura 12B el porcentaje de células de microglía aisladas positivas para Cd11b es igual a 75.7%, lo cual indica que nuestro método de aislamiento es eficiente; se utilizó el mismo anticuerpo en macrófagos Raw Blue como control positivo. Del total de microglías aisladas y posteriormente marcadas para Cd11b, se separaron 200, 000 células para ser sembradas y caracterizadas al microscopio óptico; 50, 000 células por pozo fueron sembradas en cámaras Labtecks y mantenidas en medio de cultivo DMEM-F12 con suero fetal bovino inactivado (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), en el inciso C) de la misma figura se observan las imágenes en campo claro (40X para 24h y 20x para 48h) de estas microglías una vez transcurridas 24 y 48 h posteriores a su aislamiento. Como se puede observar, las células obtenidas mediante el uso de perlas magnéticas anti-Cd11b claramente coincide con la morfología y tamaño descrita para las células de la microglía.

Particularmente, se puede observar que transcurridas 24 h posteriores a su siembra la mayoría de las microglías presentes poseen una morfología mayoritariamente bipolar mientras que a las 48 h observamos que éste tipo de morfología es menos representativa y en su lugar aparecen varias microglías con morfología ameboide, característica del estado activado de estas células, sin embargo, ha sido ampliamente reportado que esta activación sucede normalmente en células de microglía mantenidas en cultivo (Kettenman, 2006).

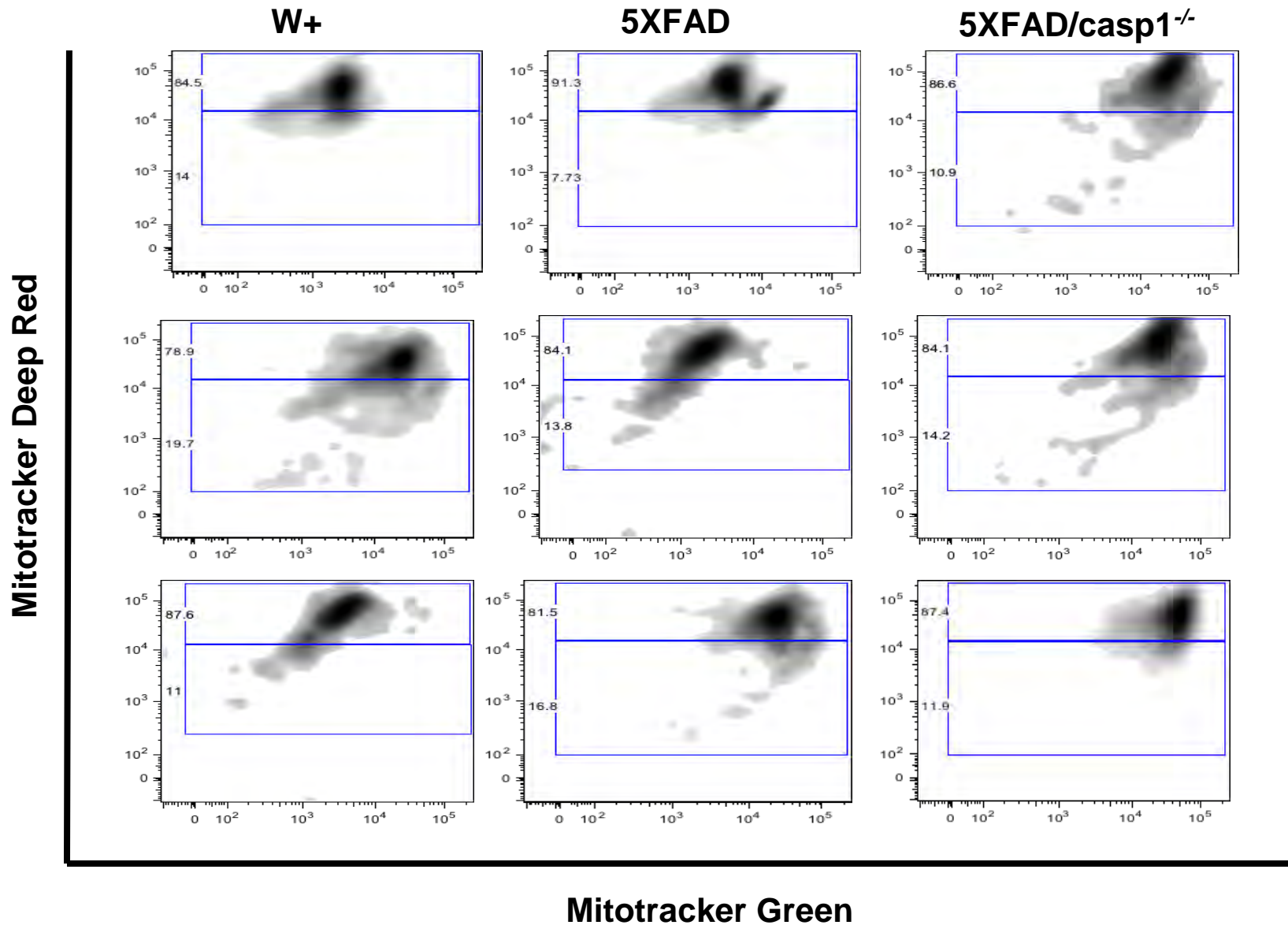


**Fig. 12.0 Determinación del porcentaje de pureza del aislamiento de microglía por marcaje positivo para Cd11b-Alexa 488.** A) Se muestra la selección de las poblaciones de macrófagos Raw Blue por granularidad y el histograma correspondiente al porcentaje de células marcadas positivamente para Cd11b B) Se muestra la población seleccionada como microglía y el histograma correspondiente a aquellas células teñidas positivamente contra Cd11b C) Imágenes en campo claro (40 y 20X) correspondientes a estas microglías aisladas 24 y 48 h posteriores a su siembra en cámaras de cultivo Labtecks ®

## **Identificar si la ausencia de caspasa 1 ejerce algún efecto sobre la funcionalidad mitocondrial en las células de microglía.**

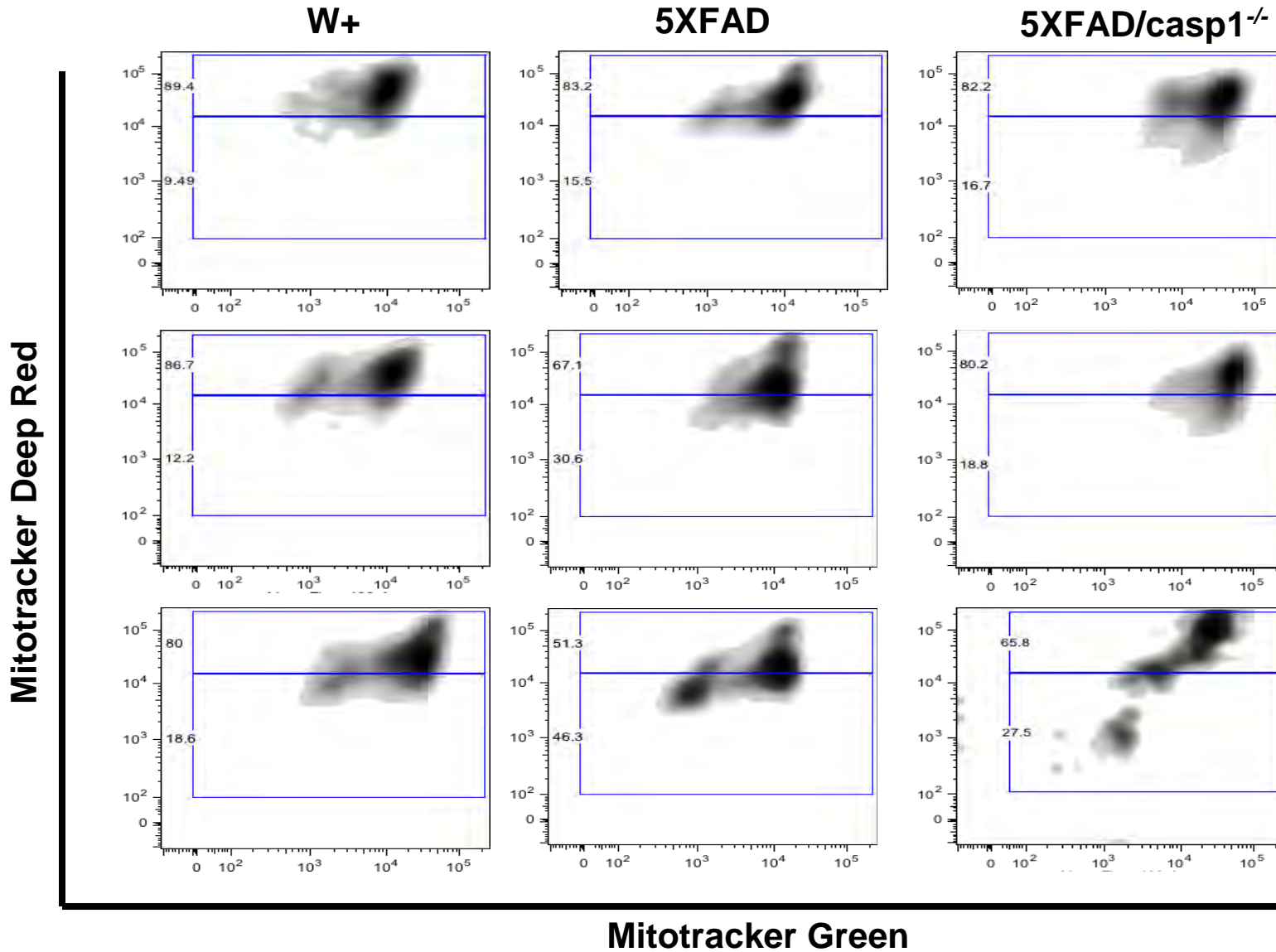
Tomando en consideración el hecho de que en nuestro modelo transgénico 5XFAD para la EA la deposición de péptidos  $\beta$ -amiloides comienza a escasos 1.5 meses de edad y que a partir de los 2 meses estos niveles aumentados de péptidos pueden ser detectados (Oakley et al, 2006) por las células de la microglía iniciamos la caracterización del estado funcional de las mitocondrias microgliales a partir de las 8 y hasta las 20 semanas, tomando como punto intermedio las 12 semanas de edad. Primero determinamos si existía una correlación entre el inicio del aumento de los niveles de péptidos  $\beta$ -amiloides y algún cambio en la funcionalidad mitocondrial de la población microglial en ratones adultos 5XFAD de 8 semanas. El doble marcaje mitocondrial permitió distinguir aquellas poblaciones positivas para mitocondrias (Mitotracker Green) que se encuentran comprometidas o dañadas debido a que su permeabilidad de membrana está alterada (principalmente depolarizada) lo cual se traduce en una disminución en la intensidad de la tinción para Mitotracker Deep Red que es sensible al  $\Psi_m$ . En las figuras 13.0 y 14.0 se muestra el estado funcional de las mitocondrias de las distintas poblaciones microgliales; como se puede notar, el porcentaje de mitocondrias funcionales (panel superior) y dañadas (panel inferior) es muy similar entre los distintos genotipos a las 8 y 12 semanas de edad (Figuras 13 y 14.0, respectivamente). Sin embargo, hacia las 20 semanas (Figura 15.0) podemos diferenciar claramente como con el paso de la edad la funcionalidad mitocondrial en poblaciones microgliales disminuye, ya que incluso en el genotipo silvestre observamos una disminución ( $\approx 30\%$ ) en el porcentaje de mitocondrias sanas con respecto al porcentaje de mitocondrias intactas reportadas a las 8 y 12 semanas. Más aún, es importante notar que para esta edad el porcentaje de mitocondrias sanas en el 5XFAD representa en promedio sólo el 37.72% mientras que el silvestre ( $Wt^+$ ) de la misma edad mantiene en promedio el 59.22 % de sus mitocondrias funcionales. Una relación inversa guarda el porcentaje de mitocondrias dañadas ya que es notablemente mayor (59.26%) en el 5XFAD con respecto al  $W^+$ . Sin embargo, se puede observar claramente que esta tendencia de daño mitocondrial se previene en ausencia de caspasa 1, en línea con nuestra hipótesis. Si observamos el mismo panel a las 20 semanas, el porcentaje de mitocondrias sanas con respecto a las dañadas en el 5XFAD Caspasa 1<sup>-/-</sup> resulta muy similar al  $Wt^+$ , es decir, en ausencia de caspasa 1 aún cuando la deposición de péptidos  $\beta$ -amiloides persiste, la población mitocondrial se mantiene con un porcentaje promedio de 56.17% de mitocondrias sanas mientras que el porcentaje de mitocondrias dañadas es ligeramente mayor con respecto al silvestre (42.67% vs. 37.74%, respectivamente); sin embargo, sigue siendo menor comparado al 5XFAD (56.71%).

# Funcionalidad mitocondrial 8 semanas



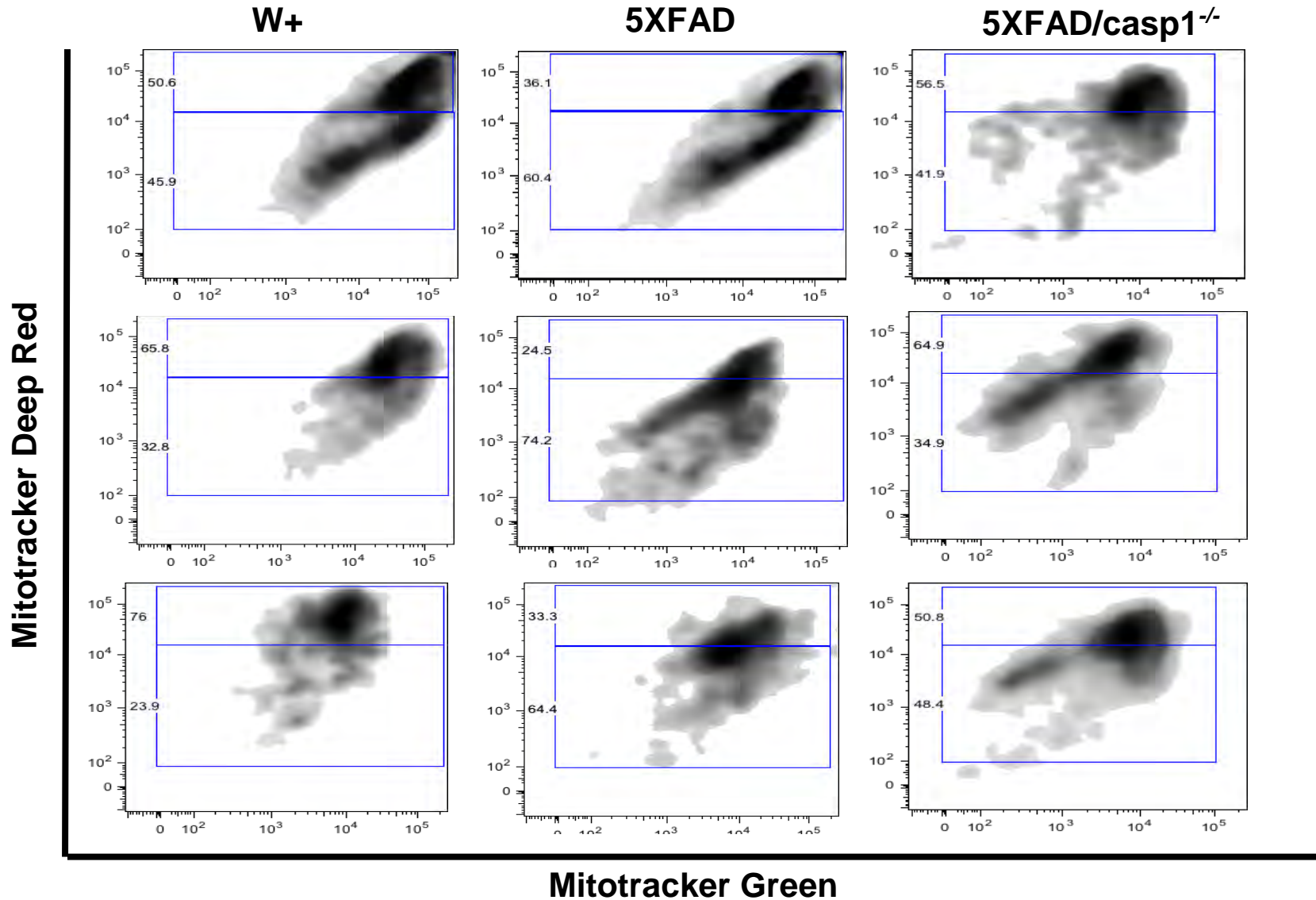
**Fig. 13.0 Estado funcional mitocondrial en células de microglía de ratones 5XFAD de 8 semanas.** Se muestran imágenes representativas del doble marcaje Mitotracker Deep Red/Mitotracker Green de las mitocondrias presentes en las células de la microglía de los 3 distintos genotipos evaluados C57/SJL (silvestre; W+), 5XFAD y 5XFAD Casp 1<sup>-/-</sup>. El panel superior en cada gráfico representa el porcentaje de la población mitocondrial funcional mientras que el panel inferior muestra el marcaje de aquellas mitocondrias dañadas o disfuncionales (n=3 para cada genotipo y edad).

# Funcionalidad mitocondrial 12 semanas

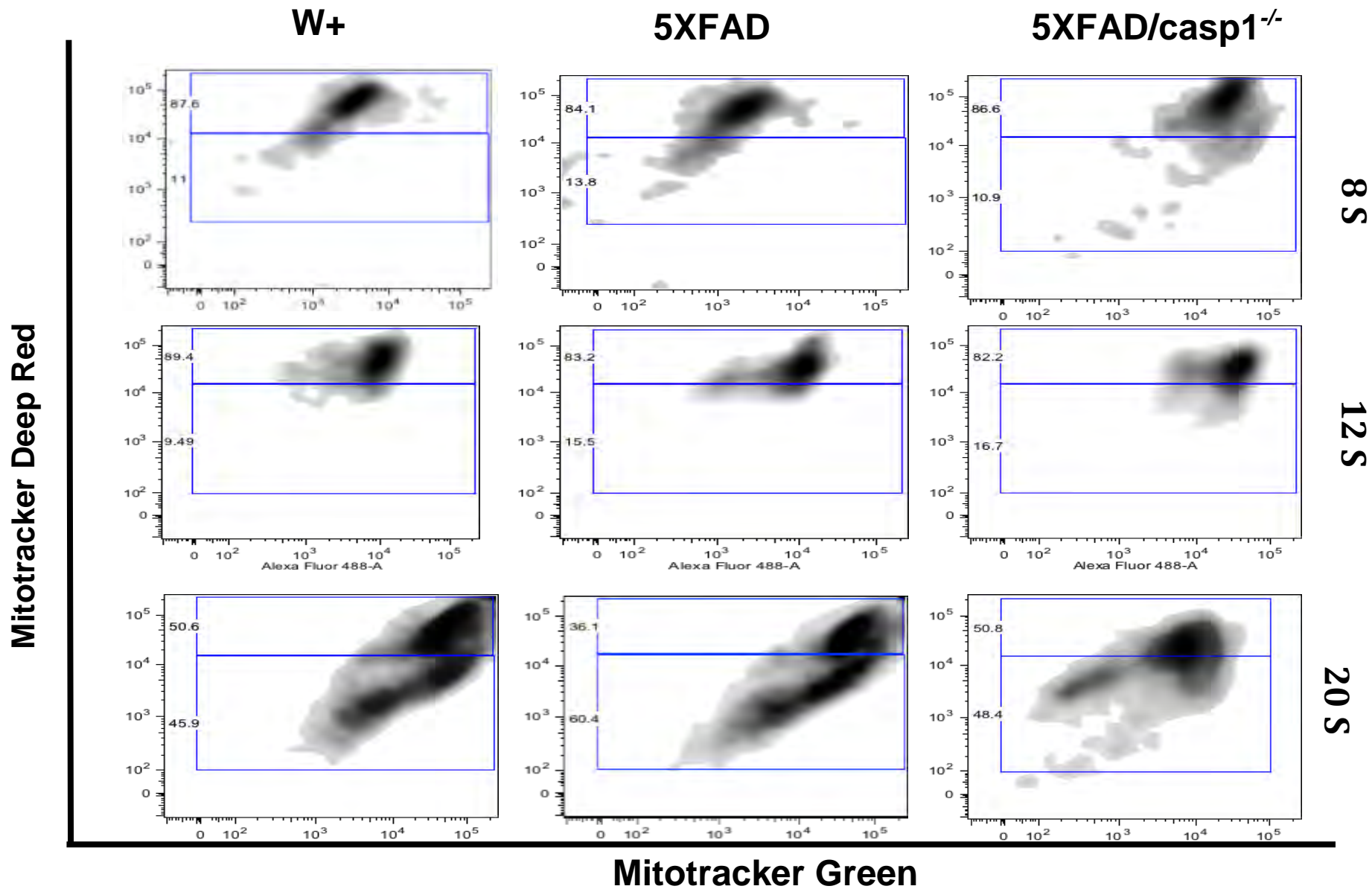


**Fig. 14.0 Estado funcional mitocondrial en células de microglía de ratones 5XFAD de 12 semanas.** Se muestran imágenes representativas del doble marcaje Mitotracker Deep Red/Mitotracker Green de las mitocondrias presentes en las células de la microglía de los 3 distintos genotipos evaluados C57/SJL (silvestre; W+), 5XFAD y 5XFAD Casp 1<sup>-/-</sup>. El panel superior en cada gráfico representa el porcentaje de la población mitocondrial funcional mientras que el panel inferior muestra el marcaje de aquellas mitocondrias dañadas o disfuncionales (n=3 para cada genotipo y edad).

# Funcionalidad mitocondrial 20 semanas



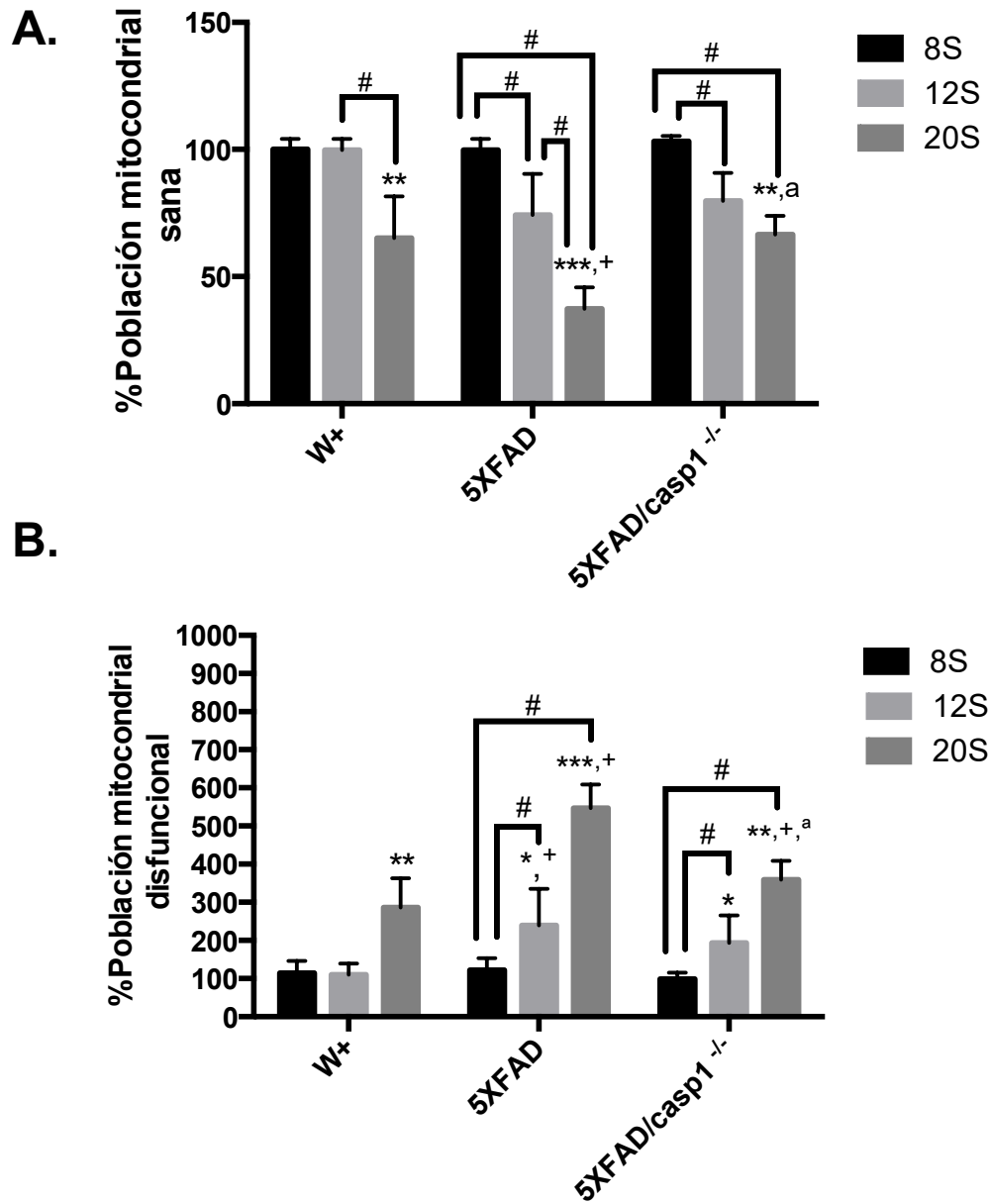
**Fig. 15.0 Estado funcional mitocondrial en células de microglía de ratones 5XFAD de 20 semanas.** Se muestran imágenes representativas del doble marcaje Mitotracker Deep Red/Mitotracker Green de las mitocondrias presentes en las células de la microglía de los 3 distintos genotipos evaluados C57/SJL (silvestre; W+), 5XFAD y 5XFAD Casp 1<sup>-/-</sup>. El panel superior en cada gráfico representa el porcentaje de la población mitocondrial funcional mientras que el panel inferior muestra el marcaje de aquellas mitocondrias dañadas o disfuncionales (n=3 para cada genotipo y edad). 38



**Fig. 16.0** Resumen cronológico del estado funcional mitocondrial de las células de microglía de ratones C57/SJL (silvestre; W+), 5XFAD y 5XFAD Casp 1<sup>-/-</sup>. Se muestran imágenes representativas del doble marcaje Mitotracker Deep Red/Mitotracker Green de las mitocondrias presentes en las células de la microglía de los 3 distintos genotipos evaluados C57/SJL (silvestre; W+), 5XFAD y 5XFAD Casp 1<sup>-/-</sup>. El panel superior en cada gráfico representa el porcentaje de la población mitocondrial funcional mientras que el panel inferior muestra el marcaje de aquellas mitocondrias dañadas o disfuncionales (n=3 para cada genotipo y edad).



En la figura 17A, se muestran las diferencias en los porcentajes de poblaciones mitocondriales sanas y disfuncionales considerando al W+ de 8 semanas como el 100%. De acuerdo con estas consideraciones, el porcentaje de mitocondrias sanas disminuye a las 20 semanas para los 3 distintos genotipos (Figura 17.0A). Por otro lado, tanto el silvestre como el 5XFAD/casp1<sup>-/-</sup> presentan un porcentaje significativamente mayor de mitocondrias sanas con respecto a aquellas presentes en el 5XFAD a esta misma edad (Figura 17.0A). En cuanto al análisis de las poblaciones mitocondriales disfuncionales se observa una evidente disminución en la funcionalidad mitocondrial a través del tiempo en el 5XFAD y el 5XFAD/casp1<sup>-/-</sup> (Figura 17.0A). Sin embargo, el 5XFAD/casp1<sup>-/-</sup> posee una población mitocondrial significativamente mayor en las microglías de las 20 semanas con respecto al 5XFAD de la misma edad (Figura 17.0A). Esto coincide con el análisis de la población mitocondrial disfuncional, en donde se muestra que la población disfuncional a las 20 semanas está mayormente representada en el 5XFAD con respecto al 5XFAD/casp1<sup>-/-</sup>, y también se observa un aumento progresivo y significativo de la disfuncionalidad mitocondrial en el 5XFAD y 5XFAD/casp1<sup>-/-</sup> de 8 hacia las 20 semanas (Figura 17.0B). En conjunto, estos datos muestran que el porcentaje de mitocondrias sanas/intactas presentes en las células de la microglía disminuye con la edad; además, que esto se exponencia en el 5XFAD y logra atenuarse significativamente en ausencia de caspasa 1.



**Figura 17.0. Diferencias en el porcentaje de poblaciones mitocondriales sanas a través del tiempo y por genotipo.** A) Porcentaje de población sana con respecto al genotipo W+ de 8 semanas (100%) B) Porcentaje de población disfuncional con respecto al genotipo W+ de 8 semanas (100%). Análisis por t-student \*\*\*p<0.001, \*\*p<0.01, \*p<0.05 (Mann-Whitney test vs W+ 8S); Mann-Whitney test entre edades del mismo genotipo: # p<0.05. Mann-Whitney test entre genotipos: + indica p<0.05 vs 8S, <sup>a</sup> indica p<0.05 12 vs 20S.

Con la finalidad de realizar un análisis cuantitativo del grado de funcionalidad mitocondrial en aquellas poblaciones señaladas como sanas y disfuncionales mostradas en el panel de la figura 16.0, se calculó la intensidad media geométrica de fluorescencia (GMIF) por población. Diferencias más detalladas surgieron de este análisis, por ejemplo, a pesar de que el porcentaje de mitocondrias sanas a las 8 semanas no presentó diferencias entre genotipos, la funcionalidad mitocondrial en las células de microglía del 5XFAD Caspasa  $^{-/-}$  resultó ser significativamente mayor con respecto al silvestre de la misma edad (Figura 18.0 B); aunque la funcionalidad mitocondrial, entre genotipos, en aquella población delimitada como disfuncional se mantuvo con valores de GMIF igualmente bajos (Figura 18.0 C). Es decir, aquellas mitocondrias sanas presentes en el 5XFAD Caspasa  $^{-/-}$  están en la misma proporción con respecto a los demás genotipos pero en términos funcionales se encuentran mejor funcionalmente al inicio de la deposición de péptidos  $\beta$ -amiloides.

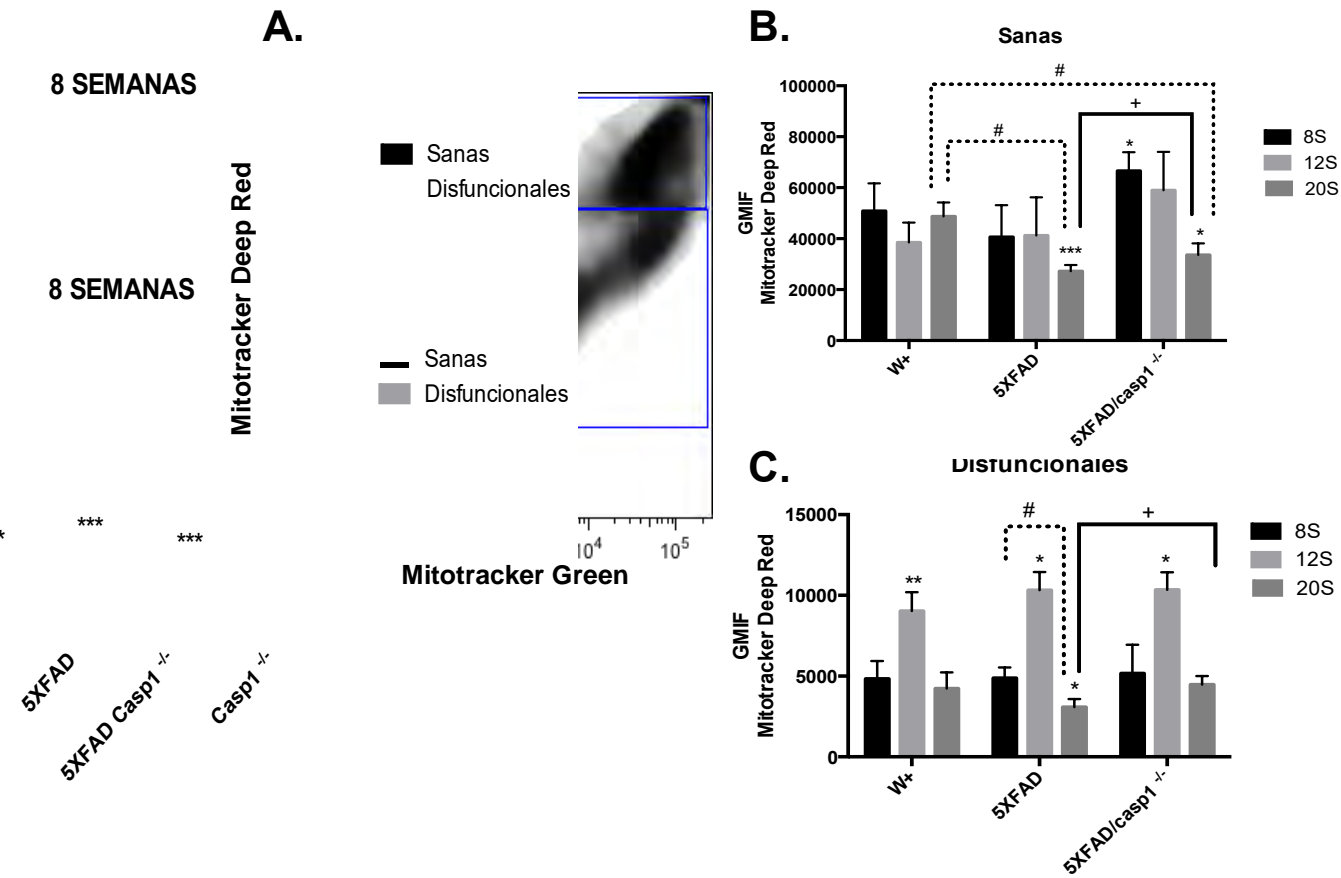


Figura 18.0. Diferencias en la GMIF Mitotracker Deep Red de las poblaciones mitocondriales del W<sup>+</sup>, 5XFAD y 5XFAD/casp1 $^{-/-}$  a través del tiempo. a) Esquema señalando la delimitación de mitocondrias sanas y disfuncionales a partir del doble marcaje Mitotracker Green/Mitotracker Deep Red. b) Valores de GMIF

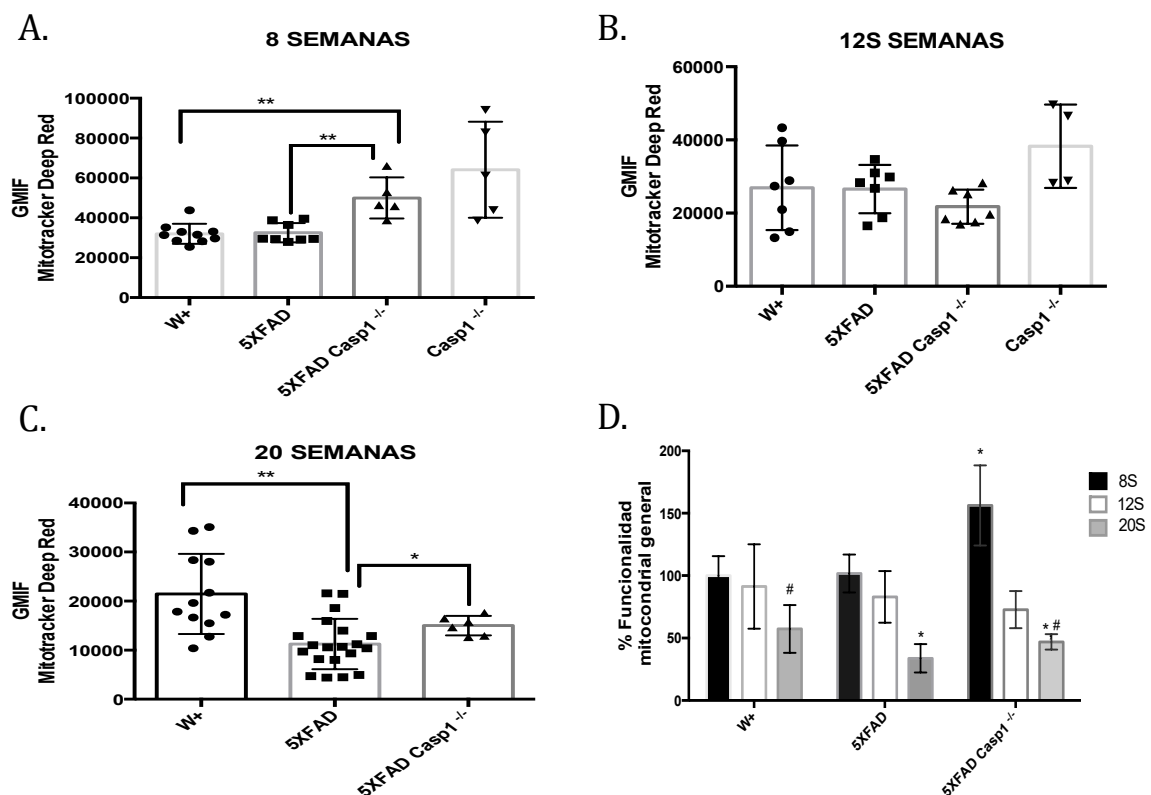
correspondientes a los 3 distintos genotipos (W+, 5XFAD y 5XFAD/casp1<sup>-/-</sup>) a las 8, 12 y 20 semanas de las poblaciones mitocondriales sanas. c) Valores de GMIF correspondientes a los 3 distintos genotipos (W+, 5XFAD y 5XFAD/casp1<sup>-/-</sup>) a las 8, 12 y 20 semanas de las poblaciones mitocondriales disfuncionales. Pruebas t-student (Mann-Whitney) \*p<0.05 (Mann-Whitney test vs W+ 8S); Mann-Whitney test entre genotipos 20S (#p<0.05).

Por otro lado, al analizar a las poblaciones mitocondriales clasificadas como disfuncionales se observa que las 12 semanas parece haber una tendencia a la alta en los valores de GMIF de las mitocondrias disfuncionales que resulta ser significativa respecto al silvestre de 8 semanas, pero no entre genotipos de la misma edad. Podría pensarse en mecanismos compensatorios que se activan ante la pérdida de funcionalidad mitocondrial a razón del incremento en la deposición de péptidos  $\beta$ -amiloides e incluso sólo del proceso normal de envejecimiento ó bien, a un aumento en la tasa metabólica mitocondrial global. Por otro lado, a las 20 semanas, se aprecia una tendencia a la baja en la funcionalidad de la población mitocondrial definida como disfuncional, que resulta ser marcadamente significativa en los 5XFAD con respecto a su población de 8 semanas, y también respecto al Wt de 8 la misma edad. De manera interesante, esta población se encuentra también más disfuncional con respecto a su contraparte 5XFAD/casp1<sup>-/-</sup> de la misma edad. Es decir, estos datos apuntan que, hacia las 20 semanas, en ausencia de caspasa 1 las poblaciones mitocondriales en células de microglía se mantienen más sanas y significativamente menos disfuncionales con respecto al 5XFAD.

### **Determinar el efecto de la presencia de péptidos $\beta$ -amiloides sobre el estado funcional global de las mitocondrias en células de la microglía del tejido cerebral de ratones 5XFAD.**

Cada población de células de microglía fue teñida por separado utilizando solamente la tinción sensible a  $\Psi_m$  (Mitotracker Deep Red), esto nos permitiría conocer si existían diferencias en la funcionalidad general de las mitocondrias presentes en cada una de las poblaciones de microglía. En la figura 19.0 se representan los valores de GMIF para esta tinción a las 8, 12 y 20 semanas distinguiendo entre genotipo. De acuerdo con las observaciones realizadas con el doble marcaje mitocondrial, en aquellas mitocondrias delimitadas como sanas, se puede corroborar que a las 8 semanas la funcionalidad general mitocondrial en el 5XFAD/casp1<sup>-/-</sup> es mayor con respecto al 5XFAD y al silvestre de la misma edad (Fig. 19.0 A) . Es interesante notar que existe una tendencia *a priori* de esta condición en el Caspasa 1<sup>-/-</sup>, sin embargo la -n- correspondiente a estos

experimentos no es lo suficientemente robusta para afirmarlo. Para las 12 semanas esta tendencia se pierde y no hay diferencias significativas entre genotipos, aunque el Caspasa 1  $^{-/-}$  sigue mostrando una tendencia de mayor funcionalidad mitocondrial (Fig. 19.0 B). Finalmente, hacia las 20 semanas la funcionalidad del estado mitocondrial general en el 5XFAD disminuye significativamente con respecto a su par silvestre, mientras que la ausencia de caspasa 1 en el 5XFAD pareciera amortiguar esta disminución en la funcionalidad ya que se encuentra significativamente mejor con respecto al 5XFAD (Fig. 19.0 C).



**Figura 19.0. Diferencias en la GMIF de Mitotracker Deep Red de las mitocondrias totales del W+, 5XFAD y 5XFAD/casp1  $^{-/-}$  a través del tiempo.** a) Valores de GMIF de Mitotracker Deep Red de mitocondrias totales a las 8 semanas. b) Valores de GMIF de Mitotracker Deep Red de mitocondrias totales a las 12 semanas. c) Valores de GMIF de Mitotracker Deep Red de mitocondrias totales a las 20 semanas d) Porcentaje funcional general de las mitocondrias totales con respecto al W+ de 8 semanas. Pruebas t-student (Mann-Whitney) entre genotipos para a) b) y c) \*\*p<0.01, \*p<0.05. Pruebas t-student (corregidas por el método de Holm-Sidak) \*p<0.05 (con respecto al W+ 8S); Mann-Whitney test entre genotipos 20S (#p<0.05 con respecto al 5XFAD 20S).

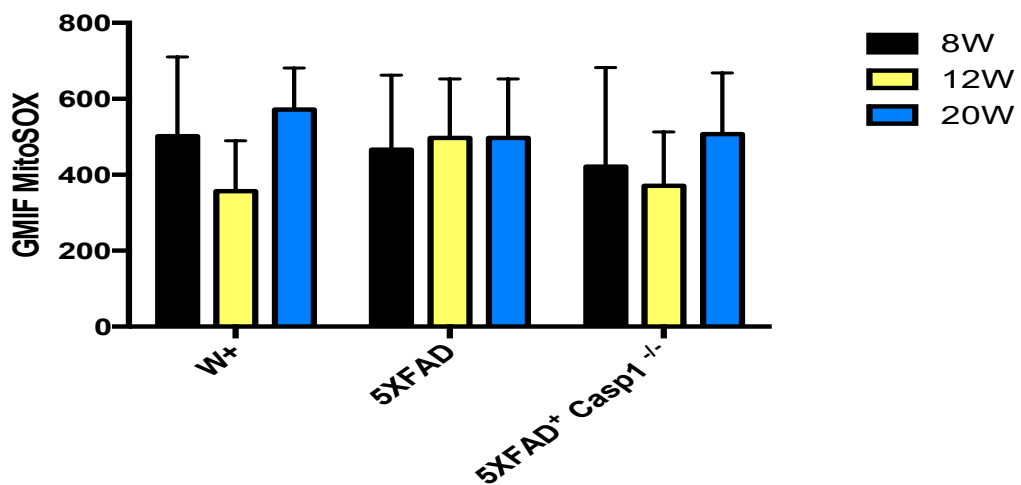
El resumen de estos datos se muestra como funcionalidad mitocondrial general en el panel D) de la figura 19.0. Podemos notar una tendencia a la baja de la funcionalidad mitocondrial general a través del tiempo tomando como referencia el valor inicial del silvestre a las 8 semanas (100%); esta tendencia se vuelve

significativa hacia las 20 semanas ya que disminuye en 42.66% para el W+, en 66.24% en el 5XFAD y en 53.1% para el caso del 5XFAD/caspasa 1<sup>-/-</sup>. Es importante hacer notar que la disminución en el porcentaje de la funcionalidad mitocondrial general en el 5XFAD/caspasa 1<sup>-/-</sup> es significativamente menor al 5XFAD en esta edad.

**Dilucidar si el efecto ejercido sobre el estado funcional mitocondrial en el 5XFAD guarda una correlación positiva con un incremento en los niveles de ERO mitocondriales a través del tiempo y si esto se modifica en ausencia de caspasa 1.**

Finalmente, determinamos el nivel de ERO mitocondriales con la tinción de MitoSOX. Cada población de células de microglía aisladas fueron teñidas con MitoSOX 2.5 μM por 15 minutos.

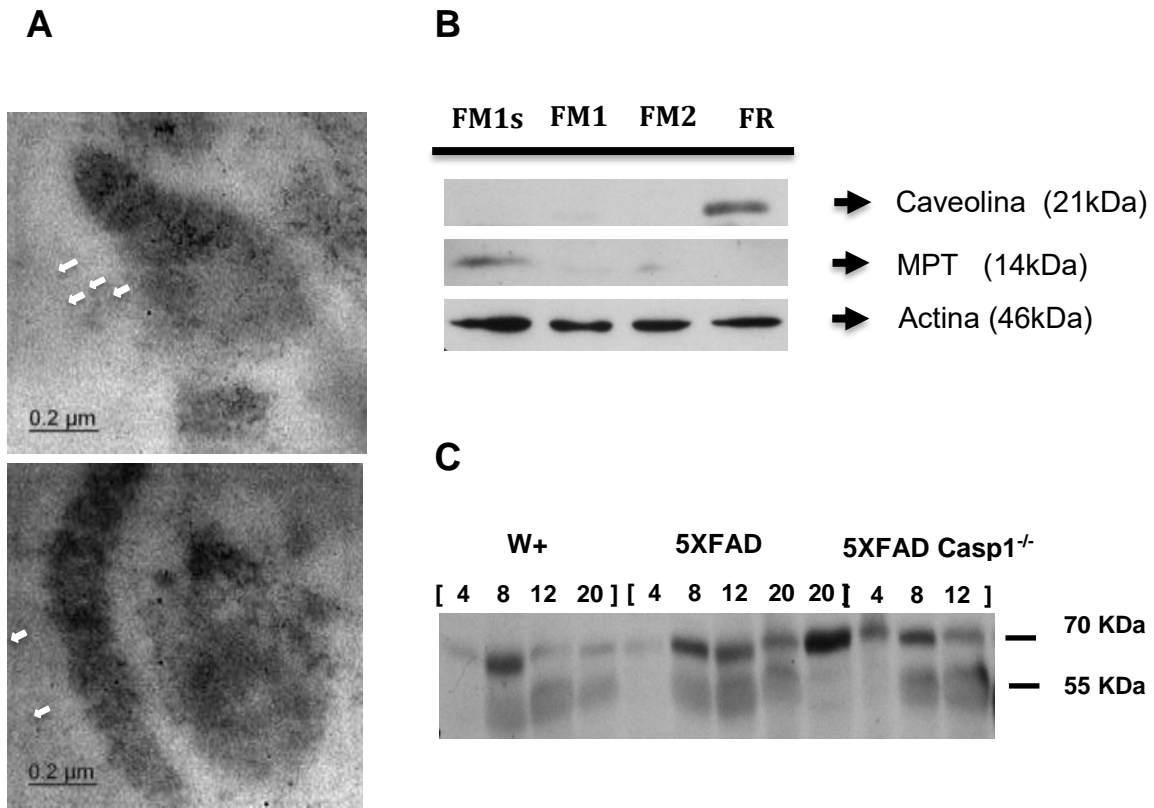
Estudios previos muestran que en modelos de la EA, la remoción de mitocondrias dañadas por mitofagia se encuentra comprometida (Pickford *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009; Luo and Rubinsztein, 2010; Wong and Cuervo, 2010; Kandalepas *et al.*, 2013). Dado que nuestros datos indican un aumento en la disfuncionalidad mitocondrial en el modelo 5XFAD, se esperaba un aumento en la producción de ERO mitocondriales resultante de la disfuncionalidad. Sin embargo, como se muestra en la figura 20.0 en donde se grafica la intensidad media geométrica de fluorescencia para los tres distintos genotipos evaluados W+, 5XFAD y 5XFAD/caspasa 1<sup>-/-</sup> no existe un aumento significativo en los niveles de ERO mitocondriales a través del tiempo



**Fig. 20.0 Niveles de EROmit entre genotipos W+, 5XFAD y 5XFAD/caspasa1<sup>-/-</sup> a través del tiempo . Se muestran los valores absolutos de GMIF correspondientes a la tinción de MitoSOX a las 8, 12 y 20 semanas.**

**Confirmar el impacto del proceso inflamatorio inducido por la presencia de péptidos  $\beta$ -amiloides sobre el estado funcional mitocondrial con base en la morfología mitocondrial en el tejido cerebral de ratones 5XFAD.**

Con la finalidad de confirmar si existía evidencia morfológica que confirmara la disfuncionalidad mitocondrial diferencial encontrada entre el 5XFAD y el 5XFAD/casp1<sup>-/-</sup> a las 20 semanas, se analizaron por microscopía electrónica varios cortes de una de las regiones en donde se presenta una mayor deposición de péptidos  $\beta$ -amiloides, la corteza media prefrontal. Para comprobar la presencia de péptidos  $\beta$ -amiloides al interior de las mitocondrias, se realizó un ensayo utilizando partículas de oro electrodensas acopladas a un anticuerpo secundario capaz de reconocer al anticuerpo primario anti-  $\beta$ -amiloide. Como se puede observar en el panel A. de la Figura 21.0, se observaron puntos electrodensos que indican una señal positiva para péptidos  $\beta$ -amiloide al interior de las mitocondrias específicamente, en la zona correspondiente a las crestas mitocondriales. Paralelamente, se aislaron mitocondrias de cerebro total de ratones de 4, 8, 12 y 20 semanas para verificar la presencia de péptidos  $\beta$ A en estas fracciones; el panel A muestra la estandarización de la técnica de aislamiento mitocondrial conforme a lo reportado por Wang et al, 2011 con algunas modificaciones, se utilizó como marcador mitocondrial específico el transportador de piruvato mitocondrial (MPT) y caveolina como marcador de membrana plasmática y vesículas, en la figura 21B. se observa claramente la presencia del MPT en el carril correspondiente a aquellas fracciones mitocondriales aisladas y posteriormente sonicadas (FMs) en buffer de lisis para obtener proteína, mientras que parece casi imperceptible la presencia de éste mismo transportador en aquellas fracciones mitocondriales que no fueron sonicadas posteriormente. En contraste, la banda correspondiente a caveolina no es detectada en ninguna de las fracciones mitocondriales pero sí en la fracción celular remanente del mismo procedimiento de aislamiento donde sí puede observarse claramente. Adicionalmente, en la figura 21C se muestran evidencias preliminares que muestran la presencia de péptidos  $\beta$ A en su forma oligomérica (70 KDa) con una presencia más prominente en los 5XFAD con respecto a su contraparte silvestre (W+) y 5XFAD/casp1<sup>-/-</sup>.

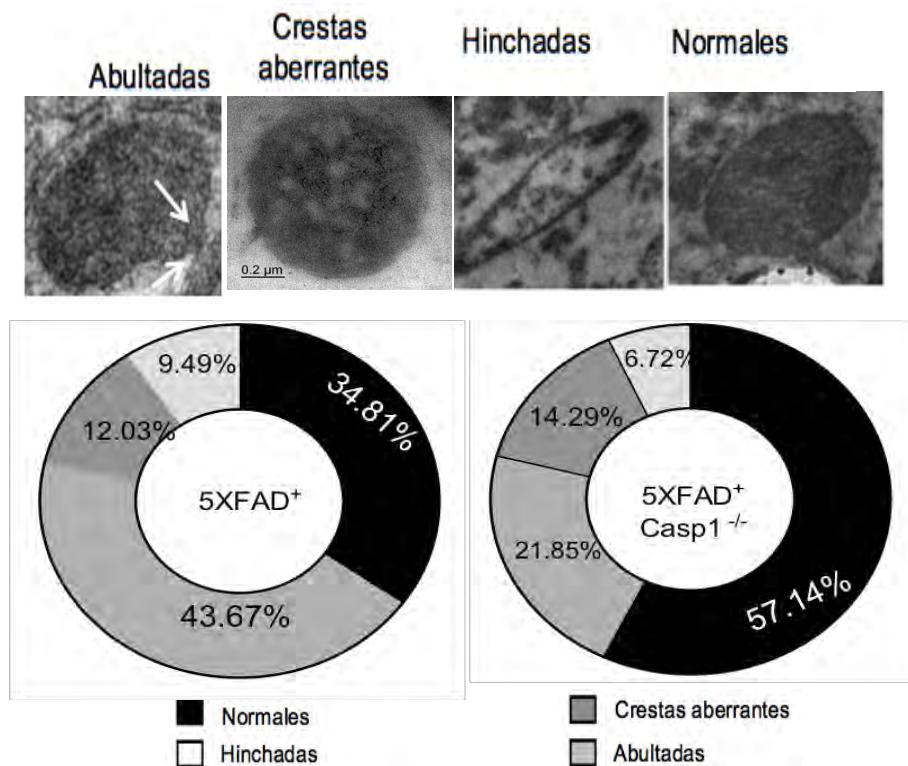


**Figura 21.0 Detección de péptidos  $\beta$ -amiloides mitocondriales por microscopía electrónica y western blot.** A) Mitochondrias con señal positiva para péptidos  $\beta$ A en su interior B) WB correspondiente a la estandarización del aislamiento mitocondrial FMs indica la fracción mitocondrial aislada y posteriormente sonicada en buffer de lisis, FM son las fracciones mitocondriales aisladas con el mismo procedimiento pero sin sonicar y FR corresponde a la fracción celular remanente del aislamiento C) WB único de fracciones mitocondriales que muestra evidencia de la presencia de péptidos  $\beta$ A en las fracciones mitocondriales aisladas (4, 8, 12 y 20 indican la edad de los ratones en semanas).

Por otro lado, en la figura 22 podemos observar imágenes representativas de alteraciones a la morfología mitocondrial utilizando la clasificación previamente reportada (Choi *et al.*, 2014). La cuantificación relativa se realizó a partir de 10 cuadrantes de  $4\mu\text{m} \times 4\mu\text{m}$  de distintos cortes de tres animales distintos para 5XFAD y para 5XFAD/caspasa1<sup>-/-</sup>. Derivado de este análisis se confirmó por un lado, que existen alteraciones en la ultraestructura mitocondrial en la corteza prefrontal de ambos genotipos; además de que existen diferencias cuantitativas entre ambos: el porcentaje de mitocondrias normales en el 5XFAD representó sólo el 34.81% de las mitocondrias cuantificadas mientras que en el 5XFAD/caspasa1<sup>-/-</sup> este porcentaje ascendió a un 57.14%. Además, el daño en la ultraestructura mitocondrial en el 5XFAD/caspasa1<sup>-/-</sup> fue notoriamente menor con respecto al 5XFAD, tanto en la

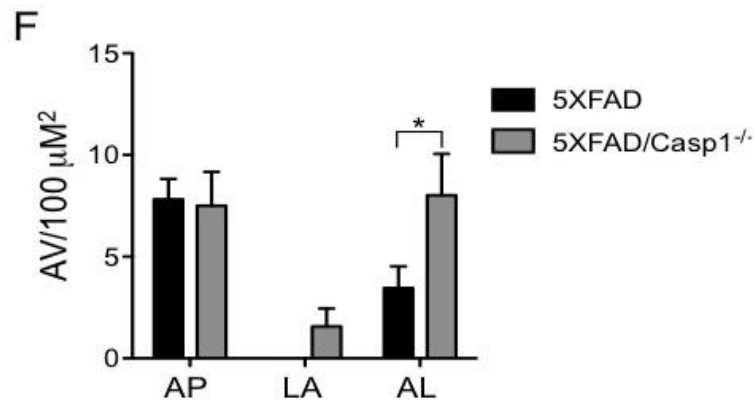
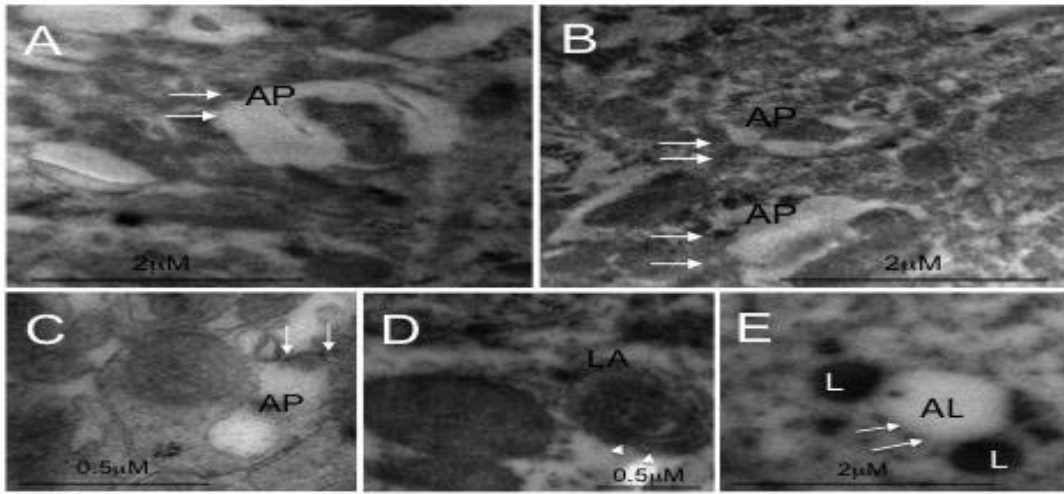


clasificación de mitocondrias dañadas como en aquellas que presentaban abultamientos en la membrana mitocondrial externa. El 21.85% de las mitocondrias cuantificadas en el 5XFAD/caspasa1<sup>-/-</sup> representaban el porcentaje de mitocondrias clasificadas como hinchadas con pérdida de contenido interno, mientras que en el 5XFAD estas alteraciones correspondieron al 43.67%, es decir presentaban prácticamente el doble de mitocondrias con esta alteración morfológica severa. Alteraciones morfológicas más sutiles como la presencia de abultamientos de la membrana externa mitocondrial, indicativo de disfuncionalidad, también fueron evaluadas y del mismo modo, en el 5XFAD representaban un porcentaje mayor (9.49%) con respecto al 5XFAD/caspasa1<sup>-/-</sup> (6.72%), mientras que aquellas mitocondrias con crestas mitocondriales aberrantes o no distinguibles pero con un tamaño representativo normal representaron un porcentaje ligeramente mayor en el 5XFAD/caspasa1<sup>-/-</sup>, con respecto al 5XFAD, 14.29% y 12.03% respectivamente.



**Figura 22.0 Alteraciones ultraestructurales de la morfología mitocondrial de cerebros 5XFAD vs 5XFAD/casp1<sup>-/-</sup> de 20 semanas.** Imágenes representativas de alteraciones a la morfología mitocondrial y cuantificación de estas alteraciones en 10 cuadrantes de 4µm<sup>2</sup> representadas como porcentaje con respecto al total de mitocondrias cuantificadas. (n=3)

Finalmente, las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de estos tejidos fueron analizadas de manera más exhaustiva en búsqueda de autofagosomas dentro de los cuales se pudieran distinguir mitocondrias. Se analizaron cuadrantes de mayor extensión por imagen ( $10 \mu\text{m}^2$ ) en la parte superior del panel de la figura 23.0 se puede observar la presencia de varias estructuras vesiculares delimitadas por una doble membrana clasificadas como autofagosomas con mitocondrias internalizadas (A y B). En la segunda línea del panel se muestran otras estructuras también observadas en estos cuadrantes: autofagosomas (C), autofagosomas tardíos (D) y autofagolisosomas (E). En el gráfico F se representa la cuantificación de cada una de estas estructuras. De los 10 cuadrantes analizados por genotipo ( $n=3$ ) se observa un número similar de autofagosomas presentes tanto en el 5XFAD como en el 5XFAD/caspasa 1<sup>-/-</sup> de 20 semanas, sin embargo no fue posible distinguir estructuras clasificadas como autofagosomas tardíos en el 5XFAD pero sí en el 5XFAD/caspasa1<sup>-/-</sup>. Por otro lado, existe diferencia significativa entre la cantidad de autofagolisosomas encontrados en el 5XFAD/caspasa1<sup>-/-</sup> con respecto al 5XFAD, es decir, en la corteza media prefrontal la cantidad de autofagolisosomas es más frecuente en el 5XFAD/caspasa1<sup>-/-</sup>. Estos datos en conjunto, nos sugieren que el proceso autofágico es favorecido en ausencia de caspasa 1, lo que en el contexto de la EA significaría una ventaja en el proceso de eliminación directa de péptidos  $\beta$ -amiloides y mitocondrias dañadas que son capaces de inducir procesos de muerte celular programada contribuyendo al proceso neurodegenerativo.



**Fig. 23.0 Imágenes y cuantificación de estructuras autofágicas por microscopía electrónica.** A y B muestran autofagosomas señalados con dobletes de flechas blancas con mitocondrias en su interior C) D) y E) muestran imágenes representativas de autofagosomas (flechas blancas), autofagosomas tardíos (puntas de flecha blancas) y autofagolisosomas (flechas blancas). F) Cuantificación de las distintas estructuras autofágicas correspondientes a 10 cuadrantes de 10 μm x μm (n=3) (\*p<0.0

---

## DISCUSIÓN

---

A pesar de la tendencia al aumento en el número de casos de la EA (casi al doble cada 20 años), de representar la primera causa de demencia senil y potencialmente la sexta causa de muerte a nivel mundial en personas mayores a 65 años, actualmente, no existe un tratamiento efectivo para la cura de esta enfermedad; esto se debe en buena medida a que las causas que detonan y favorecen su progresión siguen sin ser plenamente identificadas. Las posibles causas de este padecimiento han sido estudiadas desde distintos enfoques. Este estudio decidió tomar el enfoque que coloca a la neuroinflamación como un agente determinante en la aparición y desarrollo de la EA. Por lo que, nuestro principal objetivo fue el de abonar respuestas a la búsqueda de los mecanismos celulares que regulan la activación del sistema inmune innato en las células de la microglía, capaces de contribuir al proceso neurodegenerativo característico de este padecimiento.

Existen evidencias controversiales acerca del papel que juegan las células de la microglía en el desarrollo y progresión de la EA y en general, del proceso de neurodegeneración. La mayoría de los estudios realizados, principalmente en cocultivos con neuronas, apuntan a que la sobreactivación de las células de la microglía provoca la liberación de citocinas pro-inflamatorias y ERO capaces de inducir directamente daño neuronal a través de alterar sus conexiones sinápticas, la morfología de las espinas dendríticas así como el daño oxidante ejercido directamente en las membranas celulares del soma neuronal. Además, la sobreactivación de las poblaciones microgliales y su inducción hacia este fenotipo pro-inflamatorio (M1, en el que sus ramificaciones se retraen y adquieren una forma ameboides) significa también, que las funciones que ejerce normalmente como la vigilancia del estado neuronal, remodelamiento de las conexiones sinápticas y la liberación de factores neurotróficos estarán comprometidos. La EA es un claro

ejemplo de un contexto celular patológico en donde el estímulo (péptidos  $\beta$ A) que desencadena la activación de la respuesta pro-inflamatoria de las microglías, no sólo no desaparece sino que persiste y se acumula a través del tiempo, de tal modo que los mecanismos homeostáticos encargados de regular la respuesta pro-inflamatoria (inducción de citocinas anti-inflamatorias, autofagia) no pueden ser inducidos, ya que este estímulo sigue presente, esto inducirá a su vez el reclutamiento (a través de la secreción de quimiocinas) y proliferación de poblaciones microgliales con el mismo perfil pro-inflamatorio, lo que finalmente exacerbará y mantendrá el ambiente neuroinflamatorio, contribuyendo así a un contexto celular hostil que promueva el daño neuronal. Sin embargo, más que ser sólo actores reactivos ante los péptidos  $\beta$ A, nos encontramos convencidos que, como se ha propuesto previamente, las células de la microglía podrían ser agentes detonantes de la progresión de la EA a través de mantener un estado inflamatorio de bajo tono, incluso antes de la aparición de síntomas o la deposición de placas amiloides. Nuestra hipótesis se basa en la idea de que la activación del sistema inmune innato al interior de las microglías ocurre principalmente por la presencia de las formas solubles de los péptidos  $\beta$ A, que pueden ser producidos intracelularmente vía endosomal. Esto resulta particularmente relevante si tomamos en cuenta que existen reportes en modelos transgénicos en los que hay una correlación positiva entre el deterioro cognitivo temprano y el incremento en los niveles de péptidos  $\beta$ A intracelularmente, en ausencia de deposición de péptidos. La producción intracelular de éstos péptidos pueden ser posteriormente secretados al medio extracelular en cuerpos multivesiculares (MVB) contribuyendo con la formación de placas amiloides. De hecho, la forma oligomérica de los péptidos  $\beta$ A es considerada la más neurotóxica *in vitro*, sin embargo, *in vivo* se cree sus efectos deletéreos están mediados por la microglía y la secreción de proteínas pro-inflamatorias y ERO.

La importancia de la activación de la respuesta inmune innata en el contexto de la EA, y particularmente del inflamasoma NLRP3, ya había sido evidenciada por datos experimentales de nuestro laboratorio y paralelamente confirmado por el grupo de Golenbock en 2013. Derivado de estas observaciones conocíamos que la fagocitosis *in vitro* de péptidos  $\beta$ A por las células de la microglía era indispensable

para la activación del inflamasoma NLRP3, y que la ausencia tanto de NLRP3 como de Caspasa 1 en microglías aisladas del doble transgénico (APP/PS1) para la EA no sólo disminuía la secreción de citocinas pro-inflamatorias, sino que favorecía la eliminación de péptidos  $\beta$ A incrementando la expresión de CD36 y con ello la fagocitosis además de favorecer la síntesis microglial de la proteína degradadora de insulina (IDE), una enzima proteolítica capaz de degradar a los péptidos  $\beta$ A extracelularmente; esto en general se traducía en una disminución de la carga peptídica en el tejido cerebral de los APP/PS1/Nlrp3<sup>-/-</sup>, APP/PS1/Caspasa1<sup>-/-</sup> (tanto de formas solubles como insolubles de los péptidos  $\beta$ A) y una significativa reducción del deterioro cognitivo reportado para este modelo.

Hasta este punto la relevancia de la contribución de la activación del inflamasoma NLRP3 activado en las células de la microglía en el deterioro cognitivo y la progresión de la EA estaban bastante claras. Sin embargo, los mecanismos que regulan y desencadenan ésta activación en presencia de los péptidos  $\beta$ A (dado que éstos no son ligandos directos del NLRP3) al interior de las células de la microglía no estaba esclarecido.

La extensa variedad y naturaleza de los activadores del inflamasoma NLRP3 y la falta de consenso entre sus PAMPs y DAMPS hacen poco probable que su mecanismo sea, como sucede en los TLRs, por interacción directa entre este receptor y cada PAMP ó DAMP reportado como su activador; sería más parsimonioso pensar que todos estos activadores convergen en alguna estructura celular u organelo que integre y traduzca estas señales en moléculas conocidas que indiquen daño celular y en consecuencia, se active la señalización para la oligomerización y reclutamiento del inflamasoma NLRP3. El daño mitocondrial y con ello su disfuncionalidad, ha sido una marca característica de distintas enfermedades neurodegenerativas incluyendo la EA, el daño a éstos organelos se refleja en un nivel incrementado de EROmit, niveles anormales de Ca<sup>2+</sup> intracelular, disminución en los niveles de ATP, alteraciones en los niveles de proteínas claves de la dinámica mitocondrial (eventos de fusión/fisión mitocondrial) así como alteraciones morfológicas a su ultraestructura. Anteriormente, se había determinado que la reducción en la masa mitocondrial en macrófagos reducía

significativamente la activación del inflamasoma NLRP3 ante la presencia de distintos agonistas, el mismo efecto se obtiene al reducir la expresión del canal dependiente de voltaje mitocondrial (VDAC) y ante el uso del antioxidante específico para EROmit MitoTempo® independientemente del agonista utilizado. Por lo que, entonces, en lugar de detectar cada una de las señales de daño, el inflamasoma NLRP3 *sólo* tendría que monitorear el estado mitocondrial de las células. Es importante recordar que para la activación y ensamblaje eficiente del inflamasoma NLRP3, este receptor y su proteína adaptadora ASC tienen que relocalizarse desde el citosol hacia mitocondria, específicamente en los sitios adyacentes a retículo endoplásmico, denominados membranas asociadas a mitocondria (MAMs). Por lo que, evidenciada también, la importancia de la mitocondria en el control de la activación del inflamasoma NLRP3, decidimos indagar si la activación del inflamasoma NLRP3 en células de la microglía estaba relacionada con la disfuncionalidad mitocondrial de las células de la microglía que tendría que reflejarse en mayor daño mitocondrial y un incremento en las EROmit.

Analizando la poblaciones microgliales aisladas de tres genotipos distintos: Wt, 5XFAD y 5XFAD/Caspasa1<sup>-/-</sup> a las 8, 12 y 20 semanas, edades en las que los niveles de péptidos  $\beta$ A están lo suficientemente elevados para ser detectados en el parénquima cerebral del modelo 5XFAD. Como se mencionó durante la descripción del proceso de estandarización de las técnicas utilizadas, la tinción Mitotracker Deep Red (MDR) es altamente sensible al potencial de  $\Psi_m$  por lo que su acumulación está en función de la CTE y la fuerza protomotriz mitocondrial, es por ello que se señala a esta tinción como selectiva de aquellas mitocondrias funcionales o respirando. La diferenciación entre aquellas mitocondrias disfuncionales de las sanas se logró gracias a la doble tinción realizada con Mitotracker Green, cuyo marcaje es independiente del  $\Psi_m$ . Este trabajo evaluó por primera vez la funcionalidad mitocondrial de las células de la microglía en el contexto de la EA, y en ausencia de Caspasa 1. De los resultados anteriormente expuestos se desprenden varias observaciones: 1) el daño mitocondrial en las células de la microglía aumenta significativamente a través del tiempo 2) el daño y disfunción mitocondrial aumentan en proporción y magnitud en el contexto de la EA; hacia las 12 semanas la

población disfuncional mitocondrial en el 5XFAD aumenta al doble, mientras que para las 20 semanas es casi seis veces mayor; 3) comparado con el silvestre de 8 semanas el porcentaje de mitocondrias sanas en el 5XFAD de 20 semanas representa sólo alrededor del 37% de su población mitocondrial total. Antes de precisar el efecto de la ausencia de caspasa 1 en la integridad y funcionalidad mitocondrial es necesario mencionar la importancia de que exista una mayor disfuncionalidad mitocondrial en las células de la microglía del 5XFAD. Quizás la respuesta más obvia a la proposición anterior sería que la disfuncionalidad y daño mitocondrial pueda ser de tal magnitud que eventualmente se induzca apoptosis, sin embargo, los cambios en la funcionalidad mitocondrial observados en estas células aún no comprometen su viabilidad celular, más aún, no existen reportes en el contexto de la EA en donde se mencione que existe muerte celular de las poblaciones de microglía, por el contrario, la tasa de proliferación de éstas se encuentra incrementada significativamente; por otro lado, la disminución en la funcionalidad mitocondrial significaría también una disminución en los niveles de ATP y un aumento en la concentración de AMP lo que podría inducir la activación de la cinasa dependiente de AMP (AMPK) que es un regulador positivo del proceso autofágico, esto por un lado, confirma las observaciones de microscopía electrónica realizadas en cortes cerebrales de pacientes con la EA o modelos transgénicos en los que se observa una gran acumulación de vesículas autofágicas en los que se pueden diferenciar mitocondrias internalizadas acompañadas de otros componentes intracelulares que no han podido ser totalmente degradados por la maquinaria autofágica, y que en la mayoría de los casos se interpreta como un bloqueo en el flujo autofágico. Además, la disminución en la funcionalidad mitocondrial significará una disminución en el consumo de oxígeno, esto virará el metabolismo hacia uno glucolítico, una robusta glucólisis es característica indispensable para la polarización de los macrófagos hacia un fenotipo pro-inflamatorio. Entonces, resulta altamente probable que el perfil de las microglías analizadas en las que hay una marcada disfuncionalidad mitocondrial sea pro-inflamatorio, por lo que el control de la polarización de las microglías en el 5XFAD estaría mediado por la disfuncionalidad mitocondrial; adicionalmente a esto, un incremento en el daño



mitocondrial debería significar un aumento en las ERO mitocondriales, y con ello la sobreactivación del inflammasoma NLRP3, sin embargo, nuestros resultados no mostraron una clara correlación entre el aumento de la disfuncionalidad mitocondrial y los niveles de  $O_2^{\cdot-}$  detectados por MitoSOX. Descartando que la aproximación técnica no haya sido la mejor, para comprobar la activación mitocondrial del inflammasoma NLRP3 en las células de la microglía debería de analizarse la liberación de DNA mitocondrial al citosol, o bien, la exposición de cardiolipina en la membrana externa mitocondrial, ambos agonistas de éste inflammasoma.

Por otro lado, el marcado incremento del daño mitocondrial observada en el 5XFAD se previene por la ausencia de caspasa 1. De manera interesante, se observan diferencias de funcionalidad mitocondrial entre genotipos desde las 8 semanas, aunque las proporciones de mitocondrias sanas/disfuncionales no difieran, la intensidad de fluorescencia de la tinción MDR resultó significativamente mayor en las mitocondrias del 5XFAD/Caspasa1<sup>-/-</sup> comparado con su contraparte 5XFAD pero de manera sorprendente también con respecto al Wt<sup>+</sup>, esto podría interpretarse como que, a las 8 semanas en el 5XFAD/Caspasa1<sup>-/-</sup> la tasa de respiración mitocondrial es significativamente mayor. Estos niveles incrementados de funcionalidad mitocondrial pueden observarse también hacia las 12 semanas, tanto en los 5XFAD como en el 5XFAD/Caspasa1<sup>-/-</sup> lo que nos hace sospechar de un mecanismo compensatorio ante la pérdida de mitocondrias funcionales. La posible explicación de este incremento en el metabolismo mitocondrial podría estar relacionada con el factor NFκB, este factor transcripcional es particularmente reelevante en la activación del inflammasoma NLRP3, ya que forma parte de la cascada de señalización denominado como "priming" inducida tras el reconocimiento de los péptidos βA, particularmente a través de los receptores TLR2-6 y el receptor scavenger CD36, que garantiza la transcripción de mediadores pro-inflamatorios incluyendo las formas inactivas de IL-1β, IL-18 y Caspasa1, así como del propio receptor NLRP3 y ASC. Sin embargo, Mauro et al en 2011 identificó que a la par con estas funciones, NFκB funciona como un regulador fisiológico positivo de la respiración mitocondrial a través de la inducción de la transcripción

de la citocromo-c oxidasa 2 incrementando la fosforilación oxidativa (Mauro et al, 2011). De tal manera que, el aumento en la funcionalidad mitocondrial podría deberse a la inducción de este mecanismo regulatorio de NFκB sobre la mitocondria, inducido por la presencia de los péptidos βA, por lo que, las diferencias con el 5XFAD en donde también está presente este mismo estímulo podrían deberse a 1) al estar ausente caspasa 1, Parkina, que es uno de sus blancos celulares, podría inducir con mayor eficiencia la remoción por mitofagia de mitocondrias dañadas contribuyendo al reciclaje de sus componentes, y controlando con ello los niveles de EROmit 2) niveles disminuídos de βA reportados para el KO de Caspasa1, esto reduce la probabilidad de que éstos puedan acumularse activamente al interior de las mitocondrias y alteren su funcionaidad, a través de la interacción directa de los péptidos βA con proteínas o lípidos mitocondriales.

Para establecer una correlación más sólida entre los efectos deletéreos sobre la funcionalidad mitocondrial y la presencia de los péptidos βA solubles internalizados en las mitocondrias del 5XFAD, se corroboró mediante microscopía electrónica e inmunoblot la presencia de los péptidos βA al interior de las mitocondrias tanto del 5XFAD como del 5XFAD/Caspasa1<sup>-/-</sup> y aunque con nuestros datos no podemos establecer una acumulación progresiva a través del tiempo, su presencia al interior de las mitocondrias sugiere que éstas podrían actuar en etapas muy tempranas. En etapas tempranas las mitocondrias podrían actuar como almacenes de las formas solubles de los péptidos βA, pero a medida que sus concentración siga aumentando los efectos deletéreos que pueden ocasionar desde el interior mitocondrial podrían derivar en la pérdida de su funcionalidad. Finalmente, dado que se ha reportado que la interacción directa de los péptidos βA con los lípidos y proteínas mitocondriales pueden causarles alteraciones morfológicas, se evaluó mediante microscopía electrónica en la mPFC de ratones 5XFAD y 5XFAD/Caspasa1<sup>-/-</sup> de 20 semanas, si la ausencia de caspasa 1 lograba prevenir éstas alteraciones; se confirmó que en comparación con el 5XFAD las alteraciones ultraestructurales en las mitocondrias son proporcionalmente menores y se logra preservar un mayor porcentaje de mitocondrias con morfología normal/intacta, y aunque a este nivel de detalle estructural no podemos saber el

tipo celular en el que se encuentran, el efecto positivo de la ausencia de caspasa 1 en el 5XFAD se confirmó una vez más. En conjunto, este trabajo evidencia, por primera vez, en las células efectoras de la respuesta inmune innata en el SNC: las células de la microglía, que la disfuncionalidad mitocondrial incrementa a través del tiempo y se exagera en el modelo 5XFAD en donde prevalecen los péptidos  $\beta$ A. La preservación de la funcionalidad mitocondrial en ausencia de caspasa 1 podría reflejar una regulación autocrina en las células de la microglía que podría estar formando un loop de retroalimentación positiva de caspasa 1 que ayuda a mantener el ambiente pro-inflamatorio, exagera el daño mitocondrial y abona al mantenimiento del ambiente hostil perfecto para propiciar el daño neuronal y con ello, el proceso neurodegenerativo observado en la EA.

---

## CONCLUSIONES

---

- La población mitocondrial disfuncional, evidenciada por la disminución en el  $\Psi_{mit}$ , en células de microglía incrementa con la edad, independientemente del genotipo analizado.
- El porcentaje de mitocondrias dañadas y la pérdida de la funcionalidad mitocondrial es significativamente mayor en las microglías de los 5XFAD de 20 semanas con respecto a los demás genotipos de la misma edad.
- La ausencia de Caspasa 1 en el 5XFAD incrementa significativamente la funcionalidad mitocondrial a partir de las 8 semanas y previene el daño mitocondrial observado en este modelo a las 20 semanas.
- No se observó un incremento significativo en los niveles de ERO mitocondriales en las microglías del 5XFAD de 20 semanas, ni diferencias significativas entre genotipos o con respecto a la edad.
- Las mitocondrias de la mPFC y el tejido cerebral de los 5XFAD y 5XFAD/Casp1<sup>-/-</sup> presentan péptidos  $\beta$ A internalizados.

- La ausencia de Caspasa 1 previene el daño ultraestructural mitocondrial observado en la mPFC del 5XFAD de 20 semanas, preservando significativamente la proporción de mitocondrias con morfología intacta.
- Se identificó la presencia de mitocondrias internalizadas en autofagosomas en la mPFC del 5XFAD y el 5XFAD/caspasa1<sup>-/-</sup> de 20 semanas.
- En la mPFC, la cantidad de vesículas autofágicas y particularmente de autofagolisosomas se observó con mayor frecuencia en el 5XFAD/caspasa1<sup>-/-</sup> con respecto al 5XFAD, a las 20 semanas.

---

## PERSPECTIVAS

---

- Determinar la presencia de péptidos  $\beta$ A en las mitocondrias de las células de la microglía (especialmente en aquellas que rodean a las placas)
- Determinar los niveles de DNAmít y ROS mitocondriales en células de la microglía en presencia de péptidos  $\beta$ A y comprobar la ausencia de catepsina b en citosol.
- Confirmar si la presencia de los péptidos  $\beta$ A promueve la relocalización de NLRP3 y ASC desde el citosol hacia las mitocondrias en células de microglía.
- Analizar si existe una correlación entre la funcionalidad mitocondrial y el fenotipo M1 o M2 en las células de la microglía.
- Determinar los niveles de proteínas autofágicas específicas de mitofagia (Parkina, PINK1) en ausencia de Caspasa 1 en el 5XFAD.

---

## REFERENCIAS

---

1. Alvarez-Arellano, L., León-guerrero, S. D. De and Meza-sosa, K. F. (2013) 8 . *Neurodegenerative disorders and inflammation*.
2. Anandatheerthavarada, H. K. and Devi, L. (2007) 'Amyloid precursor protein and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease.', *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, 13(6), pp. 626–638. doi: 10.1177/1073858407303536.
3. Block, M. L., Zecca, L. and Hong, J.-S. (2007) 'Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms.', *Nature reviews. Neuroscience*, 8(1), pp. 57–69. doi: 10.1038/nrn2038.
4. Cagnin, A., Brooks, D. J., Kennedy, A. M., Gunn, R. N., Myers, R., Turkheimer, F. E., Jones, T. and Banati, R. B. (2001) 'In-vivo measurement of activated microglia in dementia', *Lancet*, 358(9280), pp. 461–467. doi: 10.1016/S0140-6736(01)05625-2.
5. Cha, M. Y., Han, S. H., Son, S. M., Hong, H. S., Choi, Y. J., Byun, J. and Mook-Jung, I. (2012) 'Mitochondria-specific accumulation of amyloid ?? induces mitochondrial dysfunction leading to apoptotic cell death', *PLoS ONE*, 7(4). doi: 10.1371/journal.pone.0034929.
6. Choi, K. J., Kim, M. J., Je, a R., Jun, S., Lee, C., Lee, E., Jo, M., Huh, Y. H. and Kweon, H.-S. (2014) 'Three-dimensional analysis of abnormal ultrastructural alteration in mitochondria of hippocampus of APP/PSEN1 transgenic mouse', *Journal of Biosciences*, 39(1), pp. 97–105. doi: 10.1007/s12038-013-9406-8.
7. Du, H., Guo, L., Yan, S., Sosunov, A. a, McKhann, G. M. and Yan, S. S. (2010) 'Early deficits in synaptic mitochondria in an Alzheimer's disease mouse

- model.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(43), pp. 18670–18675. doi: 10.1073/pnas.1006586107.
8. Eimer, W. a and Vassar, R. (2013) 'Neuron loss in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease correlates with intraneuronal A $\beta$ 42 accumulation and Caspase-3 activation.', *Molecular neurodegeneration*. Molecular Neurodegeneration, 8(1), p. 2. doi: 10.1186/1750-1326-8-2.
  9. Goldmann, T., Tay, T. L. and Prinz, M. (2013) 'Love and death: microglia, NLRP3 and the Alzheimer's brain.', *Cell research*. Nature Publishing Group, 23(5), pp. 595–6. doi: 10.1038/cr.2013.24.
  10. Guerrero-Beltrán, C. E., Calderón-Oliver, M., Martínez-Abundis, E., Tapia, E., Zarco-Márquez, G., Zazueta, C. and Pedraza-Chaverri, J. (2010) 'Protective effect of sulforaphane against cisplatin-induced mitochondrial alterations and impairment in the activity of NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 and  $\gamma$  glutamyl cysteine ligase: studies in mitochondria isolated from rat kidney and in LLC-PK1 cells', *Toxicology letters*, 199(1), pp. 80–92. doi: 10.1016/j.toxlet.2010.08.009.
  11. Gurung, P., Lukens, J. R. and Kanneganti, T. (2015) 'Mitochondria : diversity in the regulation of the NLRP3 inflammasome', *Trends in Molecular Medicine*. Elsevier Ltd, 21(3), pp. 193–201. doi: 10.1016/j.molmed.2014.11.008.
  12. Halle, A., Hornung, V., Petzold, G. C., Stewart, C. R., Monks, B. G., Reinheckel, T., Fitzgerald, K. a, Latz, E., Moore, K. J. and Golenbock, D. T. (2008) 'The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta.', *Nature immunology*, 9(8), pp. 857–865. doi: 10.1038/ni.1636.
  13. Heid, M. E., Keyel, P. A., Kamga, C., Shiva, S., Watkins, S. C. and Salter, R. D. (2013) 'Mitochondrial Reactive Oxygen Species Induces NLRP3-Dependent Lysosomal Damage and Inflammasome Activation', *The Journal of Immunology*, 191(10), pp. 5230–5238. doi: 10.4049/jimmunol.1301490.
  14. Heneka, M. T., Golenbock, D. T. and Latz, E. (2015) 'Innate immunity in Alzheimer's disease', 16(3), pp. 229–236. doi: 10.1038/ni.3102.A.
  15. Heneka, M. T., Kummer, M. P., Stutz, A., Delekate, A., Schwartz, S., Vieira-Saecker, A., Griep, A., Axt, D., Remus, A., Tzeng, T.-C., Gelpi, E., Halle, A., Korte,

- M., Latz, E. and Golenbock, D. T. (2013) 'NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice.', *Nature*. Nature Publishing Group, 493(7434), pp. 674–8. doi: 10.1038/nature11729.
16. Heneka, M. T. and O'Banion, M. K. (2007) 'Inflammatory processes in Alzheimer's disease', *Journal of Neuroimmunology*, 184(1–2), pp. 69–91. doi: 10.1016/j.jneuroim.2006.11.017.
  17. Heneka, M. T., O'Banion, M. K., Terwel, D. and Kummer, M. P. (2010) 'Neuroinflammatory processes in Alzheimer's disease', *Journal of Neural Transmission*, 117(8), pp. 919–947. doi: 10.1007/s00702-010-0438-z.
  18. Heppner, F. L., Ransohoff, R. M. and Becher, B. (2015) 'Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease', *Nature Publishing Group*. Nature Publishing Group, 16(6), pp. 358–372. doi: 10.1038/nrn3880.
  19. Iyer, S. S., He, Q., Janczy, J. R., Elliott, E. I., Zhong, Z., Olivier, A. K., Sadler, J. J., Knepper-adrian, V., Han, R., Qiao, L., Eisenbarth, S. C. and Nauseef, W. M. (2013) 'Article Mitochondrial Cardiolipin Is Required for Nlrp3 Inflammasome Activation', *Immunity*. Elsevier Inc., 39(2), pp. 311–323. doi: 10.1016/j.immuni.2013.08.001.
  20. Jack, C. R., Knopman, D. S., Jagust, W. J., Petersen, R. C., Weiner, M. W., Aisen, P. S., Shaw, L. M., Vemuri, P., Wiste, H. J., Weigand, S. D., Lesnick, T. G., Pankratz, V. S., Donohue, M. C. and Trojanowski, J. Q. (2013) 'Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: An updated hypothetical model of dynamic biomarkers', *The Lancet Neurology*, 12(2), pp. 207–216. doi: 10.1016/S1474-4422(12)70291-0.
  21. Jin, M., Shepardson, N., Yang, T., Chen, G., Walsh, D. and Selkoe, D. J. (2011) 'Soluble amyloid beta-protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(14), pp. 5819–24. doi: 10.1073/pnas.1017033108.
  22. Kandalepas, P. C., Sadleir, K. R., Eimer, W. a, Zhao, J., Nicholson, D. a and Vassar, R. (2013) 'The Alzheimer's  $\beta$ -secretase BACE1 localizes to normal presynaptic terminals and to dystrophic presynaptic terminals surrounding

- amyloid plaques.', *Acta neuropathologica*, 126(3), pp. 329–52. doi: 10.1007/s00401-013-1152-3.
23. Kettenmann, H., Hanisch, U.-K., Noda, M. and Verkhratsky, A. (2011) 'Physiology of microglia.', *Physiological reviews*, 91(2), pp. 461–553. doi: 10.1152/physrev.00011.2010.
24. Koshiba, T. (2013) 'Biochimica et Biophysica Acta Mitochondrial-mediated antiviral immunity ☆', *BBA - Molecular Cell Research*. Elsevier B.V., 1833(1), pp. 225–232. doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.03.005.
25. LaFerla, F. M., Green, K. N. and Oddo, S. (2007) 'Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease.', *Nature reviews. Neuroscience*, 8(7), pp. 499–509. doi: 10.1038/nrn2168.
26. Latz, E., Xiao, T. S. and Stutz, A. (2013) 'Activation and regulation of the inflammasomes.', *Nature reviews. Immunology*, 13(6), pp. 397–411. doi: 10.1038/nri3452.
27. Li, S., Jin, M., Koeglsperger, T., Shepardson, N., Shankar, G. and Selkoe, D. (2011) 'NIH Public Access', 31(18), pp. 6627–6638. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0203-11.2011.Soluble.
28. Liu, J., Head, E., Gharib, A. M., Yuan, W., Ingersoll, R. T., Hagen, T. M., Cotman, C. W. and Ames, B. N. (2002) 'Memory loss in old rats is associated with brain mitochondrial decay and RNA/DNA oxidation: partial reversal by feeding acetyl-L-carnitine and/or R-alpha -lipoic acid.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(4), pp. 2356–61. doi: 10.1073/pnas.261709299.
29. Luo, S. and Rubinsztein, D. C. (2010) 'Apoptosis blocks Beclin 1-dependent autophagosome synthesis: an effect rescued by Bcl-xL.', *Cell death and differentiation*. Nature Publishing Group, 17(2), pp. 268–277. doi: 10.1038/cdd.2009.121.
30. Nakahira, K., Haspel, J. A., Rathinam, V. A. K., Lee, S., Dolinay, T., Lam, H. C., Englert, J. A., Rabinovitch, M., Cernadas, M., Kim, H. P., Fitzgerald, K. A., Ryter, S. W. and Choi, A. M. K. (2010) 'Autophagy proteins regulate innate immune



- responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome', (December), pp. 1–10. doi: 10.1038/ni.1980.
31. O'Brien, R. J. and Wong, P. C. (2011) 'Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease', *Annu Rev Neurosci*, 34, pp. 185–204. doi: 10.1146/annurev-neuro-061010-113613.
  32. Oakley, H., Cole, S. L., Logan, S., Maus, E., Shao, P., Craft, J., Guillozet-Bongaarts, A., Ohno, M., Disterhoft, J., Van Eldik, L., Berry, R. and Vassar, R. (2006) 'Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(40), pp. 10129–10140. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1202-06.2006.
  33. Parihar, M. S. and Brewer, G. J. (2007) 'Mitochondrial failure in Alzheimer disease.', *American journal of physiology. Cell physiology*, 292(1), pp. C8–C23. doi: 10.1152/ajpcell.00232.2006.
  34. Pavlov, P. F., Petersen, C. H., Glaser, E. and Ankarcrona, M. (2009) 'Mitochondrial accumulation of APP and A $\beta$ : significance for Alzheimer disease pathogenesis', *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(10), pp. 4137–4145. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00892.x.
  35. Pickford, F., Masliah, E., Britschgi, M., Lucin, K., Narasimhan, R., Jaeger, P. a., Small, S., Spencer, B., Rockenstein, E., Levine, B. and Wyss-Coray, T. (2008) 'The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid  $\beta$  accumulation in mice', *Journal of Clinical Investigation*, 118(6), pp. 2190–2199. doi: 10.1172/JCI33585.
  36. Ransohoff, R. M. (2016) 'How neuroinflammation contributes to neurodegeneration.', *Science*, 353(6301), pp. 777–83. doi: 10.1126/science.aag2590.
  37. Ransohoff, R. M. and Perry, V. H. (2009) 'Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses.', *Annual review of immunology*, 27, pp. 119–45. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132528.
  38. Salter, M. W. and Beggs, S. (2014) 'Sublime microglia: Expanding roles for the

- guardians of the CNS', *Cell*. Elsevier Inc., 158(1), pp. 15–24. doi: 10.1016/j.cell.2014.06.008.
39. Schroder, K. and Tschopp, J. (2010) 'Review The Inflammasomes', pp. 821–832. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.040.
40. Selkoe, D. J. (2001) 'Alzheimer ' s Disease : Genes , Proteins , and Therapy', *Perspective*, 81(2), pp. 741–767. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11274343>.
41. Terai, K., Iwai, a, Kawabata, S., Tasaki, Y., Watanabe, T., Miyata, K. and Yamaguchi, T. (2001) 'beta-amyloid deposits in transgenic mice expressing human beta-amyloid precursor protein have the same characteristics as those in Alzheimer's disease.', *Neuroscience*, 104(2), pp. 299–310. doi: S0306-4522(01)00095-1 [pii].
42. Veld, B. A. A. R. H. (2001) 'NONSTEROIDAL ANTIINFLAMMATORY DRUGS AND THE RISK OF ALZHEIMER'S DISEASE', 345(21), pp. 1515–1521.
43. Walls, K. C., Coskun, P., Gallegos-Perez, J. L., Zadourian, N., Freude, K., Rasool, S., Blurton-Jones, M., Green, K. N. and LaFerla, F. M. (2012) 'Swedish Alzheimer mutation induces mitochondrial dysfunction mediated by HSP60 mislocalization of Amyloid Precursor Protein (APP) and beta-amyloid', *Journal of Biological Chemistry*, 287(36), pp. 30317–30327. doi: 10.1074/jbc.M112.365890.
44. Walsh, D. M., Klyubin, I., Fadeeva, J. V, Cullen, W. K., Anwyl, R., Wolfe, M. S., Rowan, M. J. and Selkoe, D. J. (2002) 'Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo.', *Nature*, 416(6880), pp. 535–539. doi: 10.1038/416535a.
45. Walsh, J. G., Muruve, D. A. and Power, C. (2014) 'Inflammasomes in the CNS', 15(February). doi: 10.1038/nrn3638.
46. Wang, X., Su, B., Lee, H., Li, X., Perry, G., Smith, M. a and Zhu, X. (2009) 'Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(28), pp. 9090–103. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1357-09.2009.
47. Weinberg, S. E., Sena, L. A. and Chandel, N. S. (2015) 'Mitochondria in the

- regulation of innate and adaptive immunity', *Immunity*. Elsevier Inc., 42(3), pp. 406–417. doi: 10.1016/j.immuni.2015.02.002.
48. Wieckowski, M. R., Giorgi, C., Lebiedzinska, M., Duszynski, J. and Pinton, P. (2009) 'Isolation of mitochondria-associated membranes and mitochondria from animal tissues and cells.', *Nature protocols*. Nature Publishing Group, 4(11), pp. 1582–1590. doi: 10.1038/nprot.2009.151.
49. Wong, E. and Cuervo, A. M. (2010) 'Autophagy gone awry in neurodegenerative diseases.', *Nature neuroscience*. Nature Publishing Group, 13(7), pp. 805–811. doi: 10.1038/nn.2575.
50. Xiang, Z., Haroutunian, V., Ho, L., Purohit, D. and Pasinetti, G. M. (2006) 'Microglia activation in the brain as inflammatory biomarker of Alzheimer's disease neuropathology and clinical dementia.', *Disease markers*, 22(1–2), pp. 95–102.
51. Yao, J., Du, H., Yan, S., Fang, F., Wang, C., Lue, L.-F., Guo, L., Chen, D., Stern, D. M., Gunn Moore, F. J., Xi Chen, J., Arancio, O. and Yan, S. S. (2011) 'Inhibition of amyloid-beta (Aβ) peptide-binding alcohol dehydrogenase-Aβ interaction reduces Aβ accumulation and improves mitochondrial function in a mouse model of Alzheimer's disease.', *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 31(6), pp. 2313–2320. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4717-10.2011.
52. Zhou, R., Yazdi, A. S. and Menu, P. (2011) 'A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation', pp. 1–7. doi: 10.1038/nature09663.