



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**“EXPRESIÓN DE ICAM-1 Y VCAM-1 EN MICROGLÍA EN RATONES
TRANSGÉNICOS CON PATOLOGÍA TIPO ALZHEIMER Y SU
RELACIÓN CON LA PRESENCIA DE AGREGADOS AMILOIDES”.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

ALICIA MERCEDES TORRES PANIAGUA

ASESOR DEL TEMA

GOHAR GEVORGYAN



CIUDAD DE MEXICO

AÑO 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Pedraza Chaverri José

VOCAL: Maldonado Jimenez Perla Deyanira

SECRETARIO: Gevorgyan Gohar

1er. SUPLENTE: Perez Montesinos Gibrán

2° SUPLENTE: Castro Escamilla Octavio

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

ASESOR DEL TEMA:

Gohar Gevorgyan

SUSTENTANTE:

Alicia Mercedes Torres Paniagua

Dedicatoria

A mis padres, mi hermano y Donnie.

A mis amigos y a todos quienes fueron amables conmigo.

Agradecimientos

Gracias...

- Mamá, Papá, Chicks y Donnie por su amor incondicional, apoyo y paciencia.
- Dani, Ro, Eli y Chai por darme vida en los momentos de angustia.
- Hillary, Aleida, Zay y todos mis compañeros por aliviar el camino con consejos y sonrisas.
- A la Universidad Nacional Autónoma de México, por los recursos, la enseñanza, el espacio y la formación que me permitieron cursar esta etapa.
- A los profesores que a lo largo de la carrera me brindaron sus enseñanzas y consejos.
- A la Dra. Gohar Gevorgyan por la dirección de esta tesis y por aceptarme en su equipo de trabajo.
- Al Biól. Exp. Gonzalo Asariel Galindo por su apoyo y sus enseñanzas en la realización de los experimentos.
- A la MVZ Georgina Díaz Herrera, encargada del bioterio del Instituto de Investigaciones Biómicas, por el cuidado de los animales utilizados en este trabajo.
- A los miembros del jurado por enriquecer mi trabajo con sus comentarios, correcciones y sugerencias.
- A DGAPA UNAM por el proyecto PAPIIT IN203319

Índice

Índice de Tablas y Figuras	- 1 -
Abreviaciones	- 3 -
Resumen	- 5 -
Introducción	- 6 -
Antecedentes	- 8 -
<i>Enfermedad de Alzheimer</i>	- 8 -
<i>Neuroinflamación en la enfermedad de Alzheimer</i>	- 12 -
<i>Moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1</i>	- 14 -
<i>ICAM-1 y VCAM-1</i>	- 16 -
<i>Modelos animales de la enfermedad de Alzheimer</i>	- 19 -
Planteamiento del problema	- 21 -
Objetivo general	- 21 -
Objetivos particulares	- 21 -
Procedimiento Experimental	- 22 -
Resultados	- 25 -
Discusión	- 34 -
Conclusiones	- 39 -
Referencias	- 40 -

Índice de Tablas y Figuras

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de las fases de la β -amiloidosis (Adaptación de Thal et al., 2002).	- 10 -
Figura 2. Representación de la posible influencia de la microglía en la neuroinflamación, muerte neuronal y neurodegeneración durante la patología de la Enfermedad de Alzheimer (EA). Adaptado de Ahmad et al., 2018. Se observan depósitos de Beta amiloide ($A\beta$), disrupción de la Barrera hematoencefálica (BHE) y liberación de citosinas como: Factor de necrosis tumoral α (TNF α), Interleucina (IL), Especies reactivas de Oxígeno (ROS), Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β).	- 13 -
Figura 3. Representación esquemática que resume las características de las cuatro familias de las moléculas de adhesión, imágenes adaptadas de Nair et al., 2005	- 14 -
Figura 4. Esquema de los eventos que tienen lugar en las diferentes edades de los animales transgénicos, descritos por Oddo et al., 2003. Beta Amiloide ($A\beta$).....	- 20 -
Figura 5. Identificación de células de la microglía A) Población total de células B) “Singlets”.-	- 25 -
Figura 6. Expresión del marcador de microglía (F4/80) en células de cerebros de Ratones Triple Transgénico (3xTgAD) hembra de 16 a 20 meses.	- 26 -
Figura 7. Expresión del marcador de microglía (F4/80) en células de cerebros de ratones Ratones Triple Transgénico (3xTgAD) hembra de 2 meses.	- 26 -
Figura 8. Expresión del marcador de microglía (F4/80) en células de cerebros de Ratones Triple Transgénico (3xTgAD) macho de 18 a 2.5 meses.	- 27 -
Figura 9. Expresión del marcador de microglía (F4/80) en células de ratones machos y hembra de la cepa B6129SF2/J de 17 y 17.5 meses.	- 27 -
Figura 10. Expresión de la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1) y molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1) en células de la microglía de Ratones Triple Transgénico (3xTgAD) hembra de 16 a 20 meses	- 28 -
Figura 11. Expresión de la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1) y molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1) en células de la microglía de Ratones Triple Transgénico (3xTgAD) hembra de 2 meses	- 29 -
Figura 12. Expresión de la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1) y molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1) en células de la microglía de Ratones Triple Transgénico (3xTgAD) macho de 2.5 a 18 meses.	- 29 -
Figura 13. Expresión de la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1) y molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1) en células de la microglía de ratones machos y hembra de la cepa B6129SF2/J de 17 y 17.5 meses.	- 30 -
Figura 14. Promedios de los porcentajes de expresión de de la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1) (arriba) y y molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1) (abajo) entre los grupos de ratones evaluados: Ratones Triple Transgénico (3xTgAD) hembras (izquierda), machos 3xTgAD (centro) y ratones de la cepa Wild Type (derecha).	- 30 -
Figura 15. Análisis de la presencia de agregados amiloides por inmunofluorescencia de dos ratones transgénicos 3xTgAD hembra de 17 meses y dos ratones transgénicos 3xTgAD hembra de 2 meses, $A\beta$ en color rojo y núcleos de células en azul.	- 33 -

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Edades de los Ratones Triple Transgénico (3xTgAD) utilizados en el presente estudio.....	- 22 -
Tabla 2. Edades de los Ratones Wild Type (WT) utilizados en el presente estudio. ...	- 22 -
Tabla 3. Análisis del porcentaje de células de cerebro que expresan molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1) y molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1) en ratones hembras	- 31 -
Tabla 4. Análisis del porcentaje de células de cerebro que expresan molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1) y molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1) en ratones machos	- 32 -
Tabla 5. Análisis del porcentaje de células de cerebro que expresan molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1) y molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1) en ratones machos y hembras.....	- 32 -

Abreviaturas

$\alpha 7$ nAChR	Receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$
α -CTF	Fragmento transmembranal C-terminal α
β -CTF	Fragmento transmembranal C-terminal β
3xTgAD	Ratón Triple Transgénico
A β	Beta Amiloide
AF	Alexa Fluor
APP	Proteína Precursora Amiloide
BHE	Barrera hematoencefálica
C1, C3 y C4	Factores del complemento
CSK	Proteínas del citoesqueleto
CAMs	Moléculas de Adhesión
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DNAsa I	Desoxirribonucleasa I
dPBS	Solución amortiguadora de fosfatos de Dubesco
EA	Enfermedad de Alzheimer
E-Selectina	Molécula de adhesión de leucocitos endoteliales
FAC	Complejos de adhesión focal
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GKN	Solución amortiguadora de fosfatos con glucosa
GKN-BSA	Solución amortiguadora de fosfatos con glucosa-albúmina de suero bovino
ICAM-1	Molécula de adhesión intracelular 1
IFN	Interferón
IFN- γ	Interferón gamma
Ig	Inmunoglobulina
Ig-CAM	Moléculas de adhesión tipo inmunoglobulina
IL	Interleucinas
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LFA-1	Antígeno 1 asociado a la función linfocitaria
LPS	Lipopolisacárido
L-Selectina	Receptor de autodisparo de linfocitos
MEC	Matriz extracelular
MHC-II	Complejo mayor de la histocompatibilidad II
MMP	Metaloproteinasas
NRTK	Tirosina quinasas no receptoras
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
P-Selectina	Gránulo externo dependiente de la activación de plaquetas
PSEN1	Presenilina 1

Q1, Q2, Q3 y Q4	Cuadrantes 1, 2, 3 y 4
RAGE	Receptor de productos finales de glicación avanzada
SNC	Sistema Nervioso Central
sAPP α	Proteína Precursora Amiloide α soluble
sAPP β	Proteína Precursora Amiloide β soluble N-terminal
sICAM-1	Molécula de adhesión intracelular 1 soluble
TBS	Tris Solución amortiguadora Salino
Tg2576	Modelo transgénico Hsiao
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
TLR	Receptores tipo toll
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
VCAM-1	Molécula de adhesión vascular 1
VLA-4	Receptor de integrina α 4 β 1
WT	Wild Type

Resumen

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es un desorden neurodegenerativo y mortal que se caracteriza clínicamente por un proceso demencial escalonado, donde el paciente pierde gradualmente la memoria, la capacidad de aprendizaje y el lenguaje. El riesgo de tener esta enfermedad se incrementa con la edad, y esto hace que el estudio de la patología sea un tema sustancial a nivel global.

La influencia de la neuroinflamación es un evento clave en la EA y en otras enfermedades neurodegenerativas como esclerosis múltiple y enfermedad de Parkinson. La inflamación contribuye significativamente a la patogenia de la EA. Se caracteriza principalmente por la activación de astrocitos y microglía y la expresión de mediadores proinflamatorios.

Dentro de los estudios de neuroinflamación en la EA, se ha reconocido la importancia de la expresión de las moléculas de adhesión (CAMs): molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1) y molécula de adhesión intracelular 1 (VCAM-1) como nuevas oportunidades de tratamiento inexploradas o como biomarcadores. Sin embargo, no se ha estudiado el aumento de la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 relacionado con la expresión de A β y la edad en microglía de modelos animales con patología tipo Alzheimer.

Con la finalidad de evaluar la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en células de microglía y correlacionar su expresión con la presencia de agregados beta amiloide (A β), se utilizaron ratones triple transgénico (3xTgAD) con patología tipo Alzheimer y ratones Wild Type (WT) (B6129SF2/J) de diferentes grupos de edad realizando análisis de citometría de flujo y de inmunofluorescencia.

En este trabajo observamos el aumento en la expresión de ICAM-1 en células de microglía de ratones transgénicos con patología tipo Alzheimer. En microglía de ratones WT envejecidos, no se observó aumento, lo cual nos indica que el incremento de ICAM-1 no se debe únicamente a la edad, sino que es dependiente de la presencia de A β . De igual manera, se determinó que el género no influye en el aumento de expresión de ICAM-1.

Por otro lado no se observó aumento de VCAM-1 en la microglía de los ratones transgénicos con patología tipo EA, posiblemente porque esta célula no es capaz de regular la expresión de VCAM-1 en presencia de agregados A β . Finalmente, proponemos que se puede comprobar en diferentes cepas transgénicas con patología tipo Alzheimer los resultados encontrados en este estudio.

Introducción

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más común de demencia en los adultos mayores. Las características patológicas típicas de la enfermedad son la presencia de placas amiloides y marañas neurofibrilares en el cerebro. Se ha descrito que el desarrollo de las lesiones asociadas a agregados amiloides empieza en la neocorteza y progresa hasta el hipocampo y la amígdala. El hipocampo es una de las estructuras que se ven más afectadas y ese daño se asocia con la pérdida de memoria, síntoma característico de la enfermedad.

La hipótesis más estudiada acerca del desarrollo de la enfermedad plantea que la agregación del péptido beta amiloide ($A\beta$) desencadena una cascada de procesos como la formación de las marañas fibrilares, disfunción sináptica, muerte celular, disfunción de la barrera hematoencefálica (BHE) y neuroinflamación, lo que finalmente conduce a la demencia.

La neuroinflamación es un mecanismo clave en las enfermedades neurológicas como esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson, isquemia y EA. La neuroinflamación se caracteriza, entre otras cosas, por la activación de las células gliales como la microglía y los astrocitos. Tanto las marañas formadas por la proteína Tau hiperfosforilada como las placas amiloides compuestas por $A\beta$ pueden activar la microglía. Si eso lleva a un estado de inflamación crónico, puede ocasionar más muerte celular y contribuir al avance de la patología.

La función principal de las moléculas de adhesión (CAMs), es la migración de los leucocitos hacia el sitio de inflamación.

Se han descrito en el cerebro dos CAMs, pertenecientes a la superfamilia de inmunoglobulinas (Ig): la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1) y molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1). Se observó que presentan un aumento dependiente de la presencia neuroinflamación y de los agregados $A\beta$. La presencia de ICAM-1 y VCAM-1 en las células endoteliales cerebrales explica la invasión de leucocitos al cerebro, mientras que la presencia de ICAM-1 y VCAM-1 alrededor de las placas seniles sugiere que se expresan también en otras células. Recientemente se ha encontrado que la microglía también puede expresar CAMs, aunque su función en la microglía no está estudiada de manera detallada.

Se desarrollaron modelos de ratones transgénicos con patología tipo Alzheimer, para estudiar los mecanismos de la enfermedad así como evaluar diferentes tratamientos. Uno de los modelos murinos más estudiados es el modelo triple transgénico (3xTgAD). En estos ratones, se observan agregados de $A\beta$ intracelular desde los cuatro meses de edad en las regiones del hipocampo y la neocorteza. Una vez que los ratones han envejecido, se puede ver el progreso de la acumulación de agregados amiloides. Asimismo se ha observado un

aumento en la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en cerebros de ratones transgénicos con patología tipo Alzheimer, sin embargo, no se ha determinado con certeza en qué edad y en qué fase de la patología.

En este trabajo se utilizarán ratones 3xTgAD de diferentes edades, para evaluar la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en el cerebro mediante citometría de flujo. Con la finalidad de confirmar que el aumento de la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 se asocia a la acumulación de A β y no que es debido a una secuela inherente del envejecimiento. Se evaluará la expresión de las ICAM-1 y VCAM-1 en cerebros de ratones no transgénicos o ratones Wild Ttype (WT) (B6129SF2/J). Para comprobar la presencia de agregados amiloides en los cerebros, se realizará una prueba inmunohistoquímica utilizando anticuerpos anti-A β .

Antecedentes

Enfermedad de Alzheimer

La EA es la causa más frecuente de demencia en adultos mayores. En 2016 la demencia fue la quinta causa de muerte en adultos mayores a nivel mundial (Nichols et al., 2019; Morales et al., 2016); además, se pronostica que para el 2050 habrá más adultos mayores, lo que aumenta la población en riesgo de padecer la enfermedad (World Alzheimer Report, 2016).

La demencia es un síndrome clínico caracterizado por un deterioro cognitivo global, lo que representa un declive de funcionamiento, y está asociada con un detrimento en las habilidades funcionales y, en muchos casos, disturbios de comportamiento y psiquiátricos (British Psychological Society, 2007). Existen muchas formas diferentes de demencia, la EA es la forma más común y puede contribuir al 60-70% de los casos. Únicamente en México más de 350,000 personas se ven afectadas por la EA y anualmente mueren por ella 2,030 pacientes (INNN, 2018).

La EA es una enfermedad neurodegenerativa, los síntomas característicos incluyen pérdida de memoria, deterioro cognitivo y cambios de personalidad. Fue descrita por primera vez como un caso clínico por Alois Alzheimer, donde describió que la memoria de la paciente estaba seriamente afectada y actividades como escribir y formar oraciones le eran cada vez más difíciles (Stelzman et al., 1995). Varios estudios posteriores han ilustrado que la principal característica conductual de la EA presenil es un trastorno de memoria en el que la información adquirida recientemente no alcanza el almacenamiento de memoria de largo plazo debido a una pérdida anormalmente rápida de material del almacenamiento de corto plazo (Bondi et al., 2017).

Desde las primeras etapas de la enfermedad, se manifiesta el deterioro de la memoria de corto plazo. A medida que avanza la enfermedad, los pacientes no pueden realizar muchas actividades básicas necesarias para la vida diaria. Aunque pueden mostrar un conocimiento reducido de los eventos actuales y recientes, también expresan una disminución de la concentración y otras acciones como la capacidad para viajar solos, manejar las finanzas o realizar tareas complejas (White y Ruske, 2002). El patrón de déficits cognitivos típicamente asociados con la EA se caracteriza por déficits prominentes en la memoria episódica y semántica, con déficits adicionales, aunque algo menos prominentes, en las funciones ejecutivas, habilidades visuoespaciales y atención (Bondi et al., 2017).

Se observa en los cerebros de pacientes enfermos un patrón simétrico típico de atrofia cortical que perjudica principalmente al lóbulo temporal y que respeta relativamente las

cortezas motoras, sensoriales y visuales primarias (Serrano-Pozo et al., 2011). En concreto, las estructuras cerebrales que se ven más afectadas por las pérdidas neuronales son el hipocampo y la corteza entorrinal que forman parte del sistema de memoria del lóbulo temporal mesial; la corteza entorrinal conecta la neocorteza con el hipocampo, proporcionando a esta última información sensorial multimodal (De Toledo et al., 2000).

Los estudios post mortem han implicado a la corteza entorrinal como uno de los primeros sitios de la aparición de la patología de la EA (De Toledo et al., 2000). Además, se ha observado que la enfermedad implica una ruptura en la conectividad entre el hipocampo y el resto del cerebro. Los circuitos disfuncionales que conectan el hipocampo con otras regiones cerebrales, como la neocorteza, probablemente contribuyen a los déficits en el aprendizaje y la memoria y otras áreas de cognición características de la EA (Allen et al., 2007).

Las características principales de la enfermedad, además de la pérdida neuronal, son las placas neuríticas, depósitos extracelulares abundantes del péptido A β y las marañas neurofibrilares (Serrano-Pozo et al., 2011).

El componente principal de las marañas neurofibrilares es la proteína Tau asociada a los microtúbulos, incapaz de mantener su función puesto que se encuentra anormalmente hiperfosforilada y aberrantemente mal plegada. Estos cambios conformacionales, incluyendo la acetilación y el truncamiento de la proteína Tau conducen a su agregación en estructuras fibrilares dentro de las neuronas. La fosforilación de Tau regula su actividad para unirse a los microtúbulos y estimular su ensamblaje. Se requiere un nivel normal de fosforilación para la función óptima de Tau, mientras que el estado hiperfosforilado hace que la proteína pierda su actividad biológica; esta fosforilación anormal de Tau podría deberse a la regulación positiva de las enzimas cinasas o la regulación negativa de las fosfatasa (Koralova et al., 2012).

El péptido A β se produce principalmente en los endosomas y membranas neuronales por proteólisis de la proteína precursora amiloide (APP). El procesamiento de esta proteína puede ocurrir por dos vías: la vía no amiloidogénica y la vía amiloidogénica. En la primera, la α -secretasa corta a la APP, este corte se produce en la región media de A β y produce un fragmento N-terminal de APP α soluble (sAPP α) y un fragmento transmembranal C-terminal (α -CTF). α -CTF después de ser escindido por la γ -secretasa genera un péptido de 23-25 aminoácidos designado como p3, y como consecuencia el proceso no lleva a la formación de agregados amiloides. En la vía amiloidogénica, la β -secretasa proteoliza la APP. Este truncamiento se lleva a cabo en el extremo N de APP, se produce un fragmento N-terminal soluble de APP (sAPP β) y un fragmento transmembranal C-terminal (β -CTF). El β -CTF se corta en la membrana celular por la enzima γ -secretasa y genera A β . Dependiendo del sitio de corte de la γ -secretasa, se generan dos especies principales de A β : A β ₄₀ y A β ₄₂ con 40 y 42 aminoácidos, respectivamente, siendo A β ₄₂ la especie más propensa

a agregarse. En condiciones patológicas la vía amiloidogénica se incrementa, aumentándose la cantidad de $A\beta$ lo que conduce a su agregación anormal, formando oligómeros, y posteriormente placas amiloides (Huang et al., 2020; Serrano-Pozo et al., 2011; Soto et al., 2015).

Como se observa en la *Figura 1*, la deposición secuencial de $A\beta$ en las regiones del cerebro define su evolución en cinco fases.

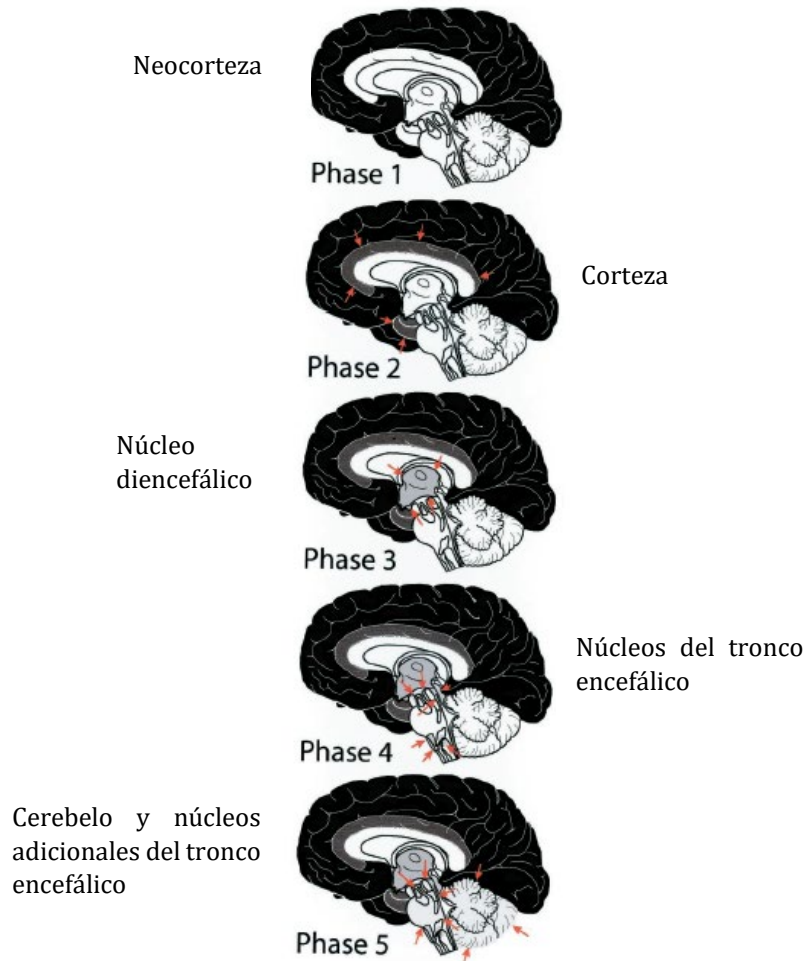


Figura 1. Esquema de las fases de la β -amiloidosis (Adaptación de Thal et al., 2002).

Es importante notar que en la primera etapa, el $A\beta$ se encuentra en la neocorteza. La neocorteza es siempre la primera región en desarrollar depósitos $A\beta$ que aparecen al menos 10-20 años antes que los síntomas clínicos (LaFerla et al., 2007). En la segunda etapa se hallan depósitos en la corteza entorrinal, hipocampo, amígdala, corteza insular y cingulada; en la tercera etapa en los núcleos subcorticales. La cuarta etapa se caracteriza por la

presencia de depósitos en las estructuras del tronco encefálico, finalmente, en la quinta etapa, los depósitos se observan en la protuberancia y la capa molecular del cerebelo (Thal et al., 2002).

El descubrimiento de A β y la vía amiloidogénica brindó una nueva perspectiva a las investigaciones de la enfermedad. Gracias a su estudio se planteó un nuevo enfoque en los primeros pasos del desarrollo patológico de la EA: la cascada amiloide, donde se propone que los agregados A β desatan una serie de eventos que derivan en la neurodegeneración. Los oligómeros A β son más tóxicos que cualquier otra forma de A β , por lo que se cree que los oligómeros son los responsables de desencadenar la cascada amiloide que se caracteriza por disfunción del proteasoma, dishomeostasis de calcio, una reducción en el consumo de oxígeno por acumulación de A β en mitocondria, la fosforilación y agregación anormal de Tau, la disfunción sináptica, muerte celular y pérdida de la memoria. (Jack et al., 2010; Huang et al., 2020; LaFerla et al., 2007).

Además de los péptidos A β producidos extra- e intracelularmente, también es posible que algunos que fueron previamente secretados puedan ser absorbidos por las células e internalizados en conjuntos intracelulares. Para entender cómo se relaciona A β con las estructuras celulares se observó la capacidad de A β de unirse a diversas biomoléculas, incluidos lípidos, proteínas y proteoglicanos. Se ha estudiado la unión de las diversas formas de A β a la membrana plasmática y se identificaron varios transportadores de A β putativos, por ejemplo, A β se une al receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$ ($\alpha 7$ nAChR) con alta afinidad, y se ha demostrado que esta unión da como resultado la internalización del receptor y la acumulación de A β intracelularmente (LaFerla et al., 2007).

Como se mencionó anteriormente, una de las peculiaridades que tiene A β es que los oligómeros A β , que se producen principalmente de forma extracelular, pueden unirse a múltiples receptores en la superficie de la membrana neuronal (LaFerla et al., 2007) e interferir con las vías de señalización normales de los receptores, también pueden interactuar directamente con la membrana para deformar la estructura de los poros, lo que lleva al cambio de la integridad y permeabilidad de la membrana causando en última instancia muerte celular (Huang et al., 2020).

Neuroinflamación en la enfermedad de Alzheimer

La neuroinflamación se define como la activación del sistema inmunológico innato del Sistema Nervioso Central (SNC), y su función principal es proteger el SNC contra agresiones, daños, lesiones o enfermedades infecciosas. Es una respuesta compleja que implica una serie de cambios celulares y moleculares, el reclutamiento de células inmunitarias periféricas, la inducción de algunas vías de señalización intracelular y la liberación de mediadores inflamatorios en el cerebro (McGeer et al., 2013).

Las principales células del sistema inmunitario innato en el cerebro son la microglía. La función microglial es normalmente protectora, implicada en diversas funciones como la fagocitosis de patógenos invasores y la eliminación de desechos de proteínas mal plegadas, la homeostasis celular, la plasticidad sináptica y la reparación de tejidos. Sin embargo, la microglía activada crónicamente se asocia con desórdenes neurológicos como la EA, la enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple e isquemia (Hansen et al., 2018; Marttinen et al., 2018; Morales et al., 2016; Soto-Rojas et al., 2015; Zhang et al., 2015), se ha visto en la EA, que la respuesta inflamatoria se localiza principalmente en la vecindad de las placas A β (Ahmad et al., 2018).

La acumulación de oligómeros y fibrillas A β en el parénquima cerebral y los vasos sanguíneos promueve la migración y activación microglial a través de interacciones con varios receptores captadores de citosinas y quimiocinas, receptores del complemento, receptores tipo Toll (TLR) y receptores que se unen a A β como el receptor de productos finales de glicación avanzada (RAGE), lo que causa una respuesta inflamatoria crónica y aguda que eventualmente puede causar la muerte neuronal (Ahmad et al., 2018; Heneka et al., 2010; Marttinen et al., 2018; Soto et al., 2015; Edler et al., 2021).

Se ha descrito que A β provoca la activación de la microglía y astrocitos a través de los TLR 2, 4 y 9 (Soto-Rojas et al., 2015; Leng et al., 2020). Cuando las células microgliales se activan, producen moléculas que pueden ser neurotóxicas y se ubican estratégicamente en las proximidades de las placas amiloides. Esta cascada proinflamatoria generada por la activación de la microglía da como resultado la liberación de moléculas citotóxicas como las interleucinas (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, IL-16, IL-23), factores de crecimiento (factor de crecimiento transformante beta, TGF- β), quimiocinas, metaloproteinasas (MMP-2, MMP-3, MMP-9), eicosanoides (prostaglandinas, leucotrieno C4, catepsinas B y L) y factores del complemento (C1, C3, C4); también causa quimiotaxis de astrocitos alrededor de las placas amiloides (Heneka et al., 2010; Soto-Rojas et al., 2015; Edler et al., 2021).

Además, a medida que se acumulan especies de amiloides tóxicas, simultáneamente las marañas neurofibrilares se acumulan en las neuronas estresadas o dañadas, lo que también

induce a la microglía a un estado inflamatorio y destructivo (Benveniste et al., 2001; Zhang et al., 2015). Este proceso da lugar a un círculo vicioso de activación de la microglía y liberación de moléculas pro-inflamatorias, que acaba por deteriorar a la microglía y que afecta a las demás células residentes del SNC (astrocitos, oligodendrocitos y neuronas). Al perpetuarse este estado durante un período prolongado, la microglía adopta un fenotipo distrófico parecido al "agotamiento", que se cree que es irreversible (Heppner et al., 2015).

Cabe señalar que algunos aspectos de la función de la microglía pueden ser beneficiosos, ya que la microglía activada puede reducir la acumulación de A β al aumentar su fagocitosis, supresión y degradación (Heneka et al., 2010). La liberación concomitante de mediadores antiinflamatorios a veces antagoniza los procesos inflamatorios y conduce a la gravedad de la enfermedad (Ahmad et al., 2018). Sin embargo, como se enfatiza en la Figura 2, la producción de neuroinflamación, que parece ser un biomarcador temprano, contribuye significativamente a la progresión de la EA (Ahmad et al., 2018; Heneka et al., 2010; Marttinen et al., 2018; Soto et al., 2015).

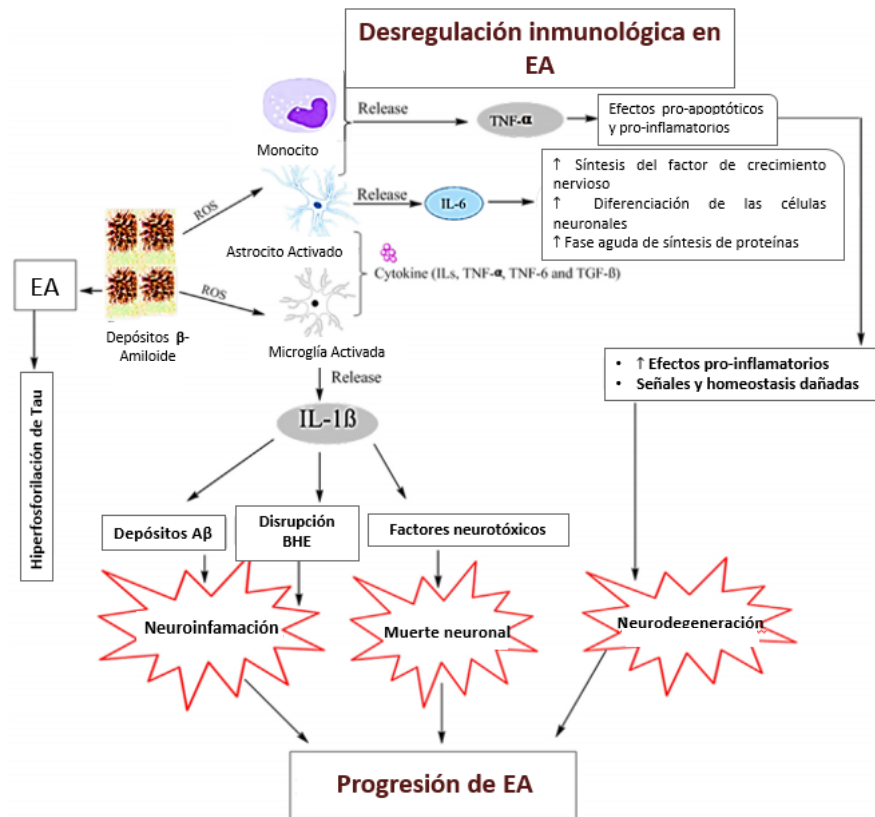


Figura 2. Representación de la posible influencia de la microglía en la neuroinflamación, muerte neuronal y neurodegeneración durante la patología de la Enfermedad de Alzheimer (EA). Adaptado de Ahmad et al., (2018). Se observan depósitos de Beta amiloide (A β), disrupción de la Barrera hematoencefálica (BHE) y liberación de citosinas como: Factor de necrosis tumoral α (TNF α), Interleucina (IL), Especies reactivas de Oxígeno (ROS), Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β).

Moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1

Las CAMs, son proteínas transmembranales con una cola citoplasmática, lo que les permite ser receptores celulares funcionales con la capacidad de transducir señales al interior de las células después de su interacción con sus ligandos, desencadenando diferentes eventos funcionales celulares como la expresión génica, cambios fenotípicos de inducción y/o sobreexpresión de determinadas moléculas en la membrana celular, y por lo tanto, cambios en el estado de activación de la célula. Las interacciones entre las células y la matriz extracelular (MEC) son cruciales para los procesos que controlan la proliferación, activación, migración y supervivencia celular (Macías, 2006).

Las CAMs desempeñan un papel fundamental en la migración, extravasación y activación de los leucocitos en la inmunovigilancia, en el desarrollo de la respuesta inflamatoria y en los mecanismos que intervienen en la respuesta inmune celular (Macías, 2006; Barreiro et al., 2009).

Con base en sus estructuras moleculares específicas, generalmente se clasifican en cuatro familias principales de CAMs, como se esquematiza en la Figura 3:

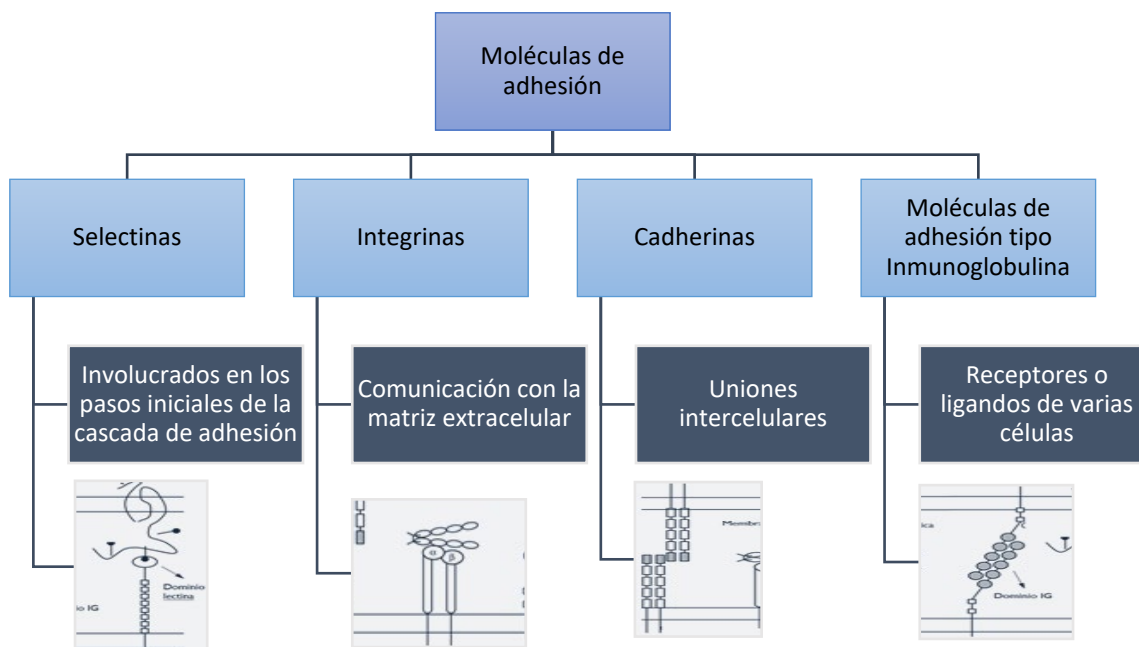


Figura 3. Representación esquemática que resume las características de las cuatro familias de las moléculas de adhesión, imágenes adaptadas de Nair et al., (2005).

La primera de las cuatro familias es la de selectinas, que consta de tres miembros conocidos que median los pasos iniciales de la cascada de adhesión de leucocitos, el receptor de autodisparo de linfocitos (L-selectina), la molécula de adhesión de leucocitos endoteliales (E-selectina) y el gránulo externo dependiente de la activación de plaquetas (P-selectina). Todas las selectinas interactúan con los glicanos sialilados de una manera dependiente de calcio. Las formas solubles de las tres selectinas se pueden encontrar tanto en el plasma como en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y parecen reflejar el estado de activación de las células originarias (Barreiro, 2009; Macías, 2006).

Las integrinas pertenecen a una familia que incluye 18 subunidades alfa y 9 beta. Las subunidades forman al menos 24 receptores heterodiméricos diferentes y, a través de estos receptores, las células se comunican con la MEC y las células circundantes, tanto de afuera hacia adentro como de adentro hacia afuera. Cuando las otras CAMs expresadas en las células vecinas se adhieren a las integrinas, se produce el reclutamiento de tirosina quinasas no receptoras citosólicas (NRTK) y proteínas del citoesqueleto (CSK), que forman complejos de adhesión focal (FAC). Estos complejos se asocian con el citoesqueleto de actina y múltiples vías de señalización que involucran procesos como la supervivencia celular, la inflamación y la angiogénesis (Barreiro, 2009; Macías, 2006).

Las cadherinas participan en las uniones intercelulares de tipo adherentes, en particular las subfamilias clásicas de cadherina y protocadherina, se encuentran en todo el sistema nervioso. Las dos subfamilias de cadherinas se encuentran principalmente en las sinapsis neuronales, y estudios extensos han demostrado que las cadherinas clásicas juegan un papel crucial en la plasticidad neuronal y la sinaptogénesis. Las funciones de las cadherinas clásicas están mediadas por un complejo que se forma entre la cola citoplasmática de la cadherina y las cateninas citosólicas, que están vinculadas al citoesqueleto de actina. Al igual que las otras CAMs, las cadherinas son sensibles al desprendimiento proteolítico (Macías, 2006).

Las moléculas de adhesión tipo inmunoglobulina (Ig-CAM) se definen por una o más repeticiones de Ig de 60 a 100 aminoácidos que forman el sitio de adhesión activo. Las CAM de esta familia se pueden encontrar tanto en la periferia, donde las interacciones mediadas por Ig-CAM son principalmente heterófilas (unión con otras moléculas), como en el sistema nervioso, donde las interacciones son predominantemente homófilas (son su mismo ligando), con esto se entiende que son receptores de varias células (Macías, 2006; Pielsanguineti y Rodríguez-Tafur, 1999).

Varios miembros de Ig-CAM parecen ser específicos del tejido nervioso donde desempeñan funciones vitales, por ejemplo, en la neurogénesis, la elongación de neuritas y la plasticidad cerebral. Además, las Ig-CAM pueden desprenderse de las membranas celulares y las

versiones solubles pueden tener efectos separados de las formas unidas a las células (Wennström et al., 2012).

El proceso de extravasación está compuesto por una secuencia de eventos estrictamente controlada, impulsada por quimiocinas que se presentan en la superficie de la célula endotelial y por CAMs. La extravasación se inicia por la adhesión de los leucocitos al endotelio por laminación mediada por selectina y dependiente de integrina. A esta adhesión le sigue la propagación, el rastreo y la migración transendotelial real del leucocito. Varios estudios han demostrado que las interacciones leucocito-endotelio van acompañadas de cambios en los niveles de calcio intracelular, la organización del citoesqueleto de actina endotelial y la fosforilación de la cinasa de cadena ligera de miosina. La evidencia de que esta señalización es iniciada Ig-CAM proviene de estudios que muestran reordenamientos citoesqueléticos endoteliales, fosforilación de proteínas y activación de factores de transcripción sobre ICAM-1 o VCAM-1 reticulación. (Van Wetering et al., 2003).

ICAM-1 y VCAM-1

ICAM-1 es una glicoproteína inducible de la superfamilia de Ig que contiene cinco dominios distintos similares a Ig, un dominio transmembranal y una cola citoplasmática corta. Fue descrita por primera vez como ligando de antígeno 1 asociado a la función linfocitaria (LFA-1) que se presentaba tanto en células hematopoyéticas como en células no hematopoyéticas. En condiciones normales se encuentra en células donde también se expresa el complejo mayor de la histocompatibilidad II (MHC II) y en el endotelio. Su expresión aumenta en presencia de IL-1 e interferón (IFN). En este mismo estudio se sugirió que el rol de ICAM-1 era el de adhesión leucocitaria en el endotelio (Dustin et al., 1986). Se ha estudiado que su estructura, especialmente el arreglo de sus dominios, es lo que le permite unirse a LFA-1 para realizar la adhesión celular de los leucocitos; además el dominio D1 está asociado a otras funciones de ICAM-1 como receptor de un gran grupo de rinovirus humano (Bella et al., 1998).

Posteriormente, se descubrieron más funciones de ICAM-1, ya que se asoció como un ligando para Mac- 1 (CD11b / CD18), y se reportó su participación en el desarrollo y función de las células T reguladoras (Gottrand et al., 2015).

La primera vez que se asoció a ICAM-1 con la EA fue en un estudio de 1991, donde observaron que la expresión de ICAM-1 se encontraba alrededor de las placas neuríticas, sin embargo, este estudio descartó que ICAM-1 se expresara en la microglía (Frohman et al., 1991). Tiempo después se sugirió que ICAM-1 se expresaba en los astrocitos porque también observaron expresión cerca de las placas en cerebros post-mortem (Akiyama et al., 1993). Posteriormente, se descubrió que después de una lesión en la corteza entorrinal de la

rata, la microglía con criterios morfológicos de activación expresa ICAM-1 (Hailer et al., 1997).

El envejecimiento es el principal factor de riesgo de la EA, y se observa un aumento dramático de ICAM-1 extravascular (asociado con astrocitos inmunorreactivos a proteína ácida fibrilar glial (GFAP)) en la corteza orbitofrontal en el envejecimiento normal. Este aumento puede contribuir a un mayor riesgo de procesos inflamatorios en el SNC durante el envejecimiento (Miguel-Hidalgo, 2007). Se demostró que estos agregados inmunorreactivos de ICAM-1 están en su mayoría ausentes en individuos de control sin demencia, incluso en presencia de inmunoreactividad vascular normal de ICAM-1 (Lee y Benveniste, 1999).

La asociación directa entre ICAM-1 y la neurodegeneración aún no se ha estudiado a profundidad. Sin embargo, hay estudios que reportan que los niveles más altos de ICAM-1 aumentaron el riesgo de desarrollar demencia por EA en pacientes sin demencia. Los autores concluyeron que la neuroinflamación y la disfunción cerebrovascular son eventos tempranos que ocurren en las etapas pre-sintomáticas de la EA y contribuyen a la progresión de la enfermedad; por lo que se esperaría que también la microglía comience a expresar ICAM-1 una vez que aumenten los niveles de A β intra- y extracelular (Gottrand, 2015).

VCAM-1 pertenece a las moléculas similares a las Ig con una masa molecular relativa de 90 - 110 kDa. Se pueden encontrar principalmente en las células del endotelio vascular en el área de las superficies luminal y laterales y se secretan en forma constitutiva o inducida. VCAM-1 es un factor de adhesión significativo de células inmunocompetentes, se regula positivamente en el endotelio en respuesta a la inflamación en todo el cuerpo, donde facilita la unión de leucocitos, y la migración a los tejidos, principalmente de linfocitos, a través del receptor de integrina α 4 β 1 (VLA-4), también conocido por sus siglas en inglés como antígeno-4 muy tardío (Shimizu et al., 1992; Yousef et al., 2019).

La molécula de VCAM-1 tiene una estructura característica de CAM análoga a ICAM-1 (Pepinsky et al., 1992); y de manera similar a ICAM-1, los factores que aumentan la expresión de este tipo de CAMs incluyen citocinas proinflamatorias como TNF α (factor de necrosis tumoral α), IL 1 β e INF γ , y anoxia (Pepinsky, et al., 1992; Soto-Rojas et al., 2015).

Se ha visto que VCAM-1 puede tener un rol importante en el inicio de la aterosclerosis (Cybulsky et al., 2001). Tomando en cuenta que el envejecimiento y las enfermedades neurovasculares conducen a una mayor susceptibilidad a las cascadas ateroscleróticas en los vasos sanguíneos, se puede explicar que se observe un aumento dependiente de la edad en la expresión de VCAM-1 (Huang et al., 2015). Sin embargo, cuando se compararon grupos de ratones WT contra ratones transgénicos con patología tipo Alzheimer, se observó que VCAM-1 es regulado positivamente solamente en los cerebros de modelos de animales con patología tipo Alzheimer (Pietronigro et al., 2019).

VCAM-1 en venas y arterias inflamadas y activadas envía señales al parénquima cerebral, lo que puede inducir la activación de la microglía (Yousef et al., 2019). Anteriormente se consideraba que la molécula se expresa únicamente en el endotelio de la BHE, sin embargo, en enfermedades neuropatológicas como lo es la esclerosis múltiple, la microglía puede expresar VCAM-1 (Peterson, 2002), y también en respuesta a estímulos agudos como la exposición a lipopolisacárido (LPS) (O'Sullivan et al., 2010).

Se ha reportado que tanto ICAM-1 como VCAM-1 aumentaron su expresión en la microglía en la EA durante las etapas preclínica y prodrómica. Además, se observó que este aumento se encuentra relacionado con la aparición de Tau fosforilada y está asociado con el deterioro cognitivo y un mayor riesgo de posteriormente desarrollar EA (Janelidze et al., 2018). También, se reportó que ICAM-1 y VCAM-1, se expresan en la microglía cuando esta es sometida a estímulos inflamatorios crónicos, como lo es la EA, sin embargo, aún no se caracteriza el papel fisiológico de la expresión de las CAMs en las células gliales. Aunque, con base en el papel general de las CAMs en otros tipos de células, se infieren dos posibles roles en la microglía, el primero es la extravasación y migración de leucocitos, como su función conocida en el endotelio y los astrocitos, y el segundo es la presentación de antígenos, como se ha visto en algunos macrófagos (Lee y Benveniste, 1999).

Modelos animales de la enfermedad de Alzheimer

La EA parece ser exclusiva de pocas especies, notablemente, los seres humanos, asimismo, la edad de aparición, la velocidad de progresión y el desarrollo de la patología son muy variables entre pacientes y, como se estableció anteriormente, la presencia y cantidad de las diferentes especies de A β es crítica porque cada especie tiene una tasa de agregación diferente y preferentemente forman diferentes especies agregadas (Drummond et al., 2017; Huang et al., 2020).

El uso de animales con fines científicos es una práctica que se ha utilizado por bastante tiempo debido a las notables similitudes anatómicas y fisiológicas entre humanos y animales, particularmente mamíferos. Los mayores desafíos que enfrenta la investigación biomédica moderna se centra en enfermedades multifactoriales como cáncer, enfermedades cardiovasculares, consecuencias patológicas del envejecimiento, trastornos neurodegenerativos, entre otras (Barré-Sinoussi y Montagutelli., 2015).

Aunque menos del 1% de los casos en humanos son casos de EA familiar de aparición temprana causados por mutaciones autosómicas dominantes en APP, PSEN1 o PSEN2, todos los modelos transgénicos principales expresan estas formas mutadas de APP y PSEN1. Los mejores modelos animales disponibles de EA son los primates no humanos (Drummond et al., 2017).

El uso de modelos murinos permite observar distintos rasgos patológicos, solamente para el estudio de la EA se han desarrollado más de 100 líneas murinas genéticamente modificadas (Jankowsky y Zheng, 2017). Una de las líneas ampliamente utilizadas, es la denominada 3xTgAD (Oddo et al., 2003; Billings et al., 2005).

Los ratones de la cepa 3xTg-AD expresan los alelos mutantes humanos APP^{Swedish}, y PSEN1^{M146V}, este último expresa la presinilina 1(PSEN1) mutada. Ambos alelos son asociados con una mayor producción y secreción de A β ₄₀ y A β ₄₂ en la EA familiar. Por último, esta cepa contiene la mutación tau^{P301L} asociada con la patología de marañas de Tau humana. Gracias a estos tres alelos mutantes, los ratones transgénicos desarrollan los rasgos patológicos más importantes: agregados amiloides y marañas neurofibrilares (Oddo et al., 2003).

Los ratones 3xTg-AD tienen los siguientes antecedentes genéticos: B6; 129, 129S4 o C57BL / 6J-congénico Los últimos se utilizan a menudo debido a su vigor híbrido, como fondo para algunas mutaciones deletéreas, para el trasplante de tejidos, para determinar el modo de herencia y para crear o mejorar la expresión de enfermedades poligénicas (The Jackson Laboratory; Belfiore et al., 2019).

La edad de aparición y el desarrollo de la acumulación de agregados amiloides son importantes para los estudios en animales transgénicos, y el grupo de Oddo y colaboradores (2003) quienes reportaron por primera vez el modelo 3xTg-AD, mencionan tres edades importantes, mostradas en el esquema (Figura 4).

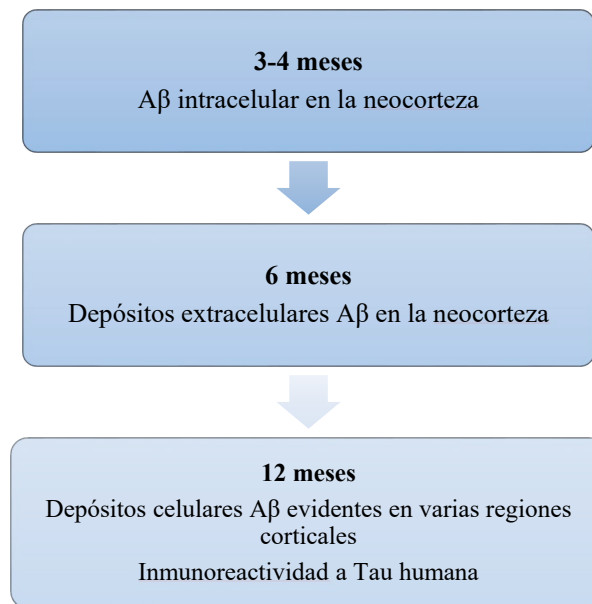


Figura 4. Esquema de los eventos que tienen lugar en las diferentes edades de los animales transgénicos, descritos por Oddo et al., (2003). Beta Amiloide (Aβ)

Análogo a lo que sucede en humanos (Ver *Figura 1*), este estudio señala que la aparición de Aβ en la cepa 3xTgAD, tiene lugar en la neocorteza a los 4 meses, hasta los 6 meses se expresa de manera extracelular y a los 12 meses varias regiones corticales y el hipocampo contienen estos depósitos.

Este modelo se considera como uno de los más completos porque permite una mejor visualización de la patología, su transcurso y sus implicaciones, ya que también se han podido observar respuestas como desarrollo temprano de la desregulación inmunológica en ratones 3xTgAD, incluso a nivel sistémico, producción de especies reactivas de oxígeno, entre otras (Marchese et al., 2014; Oddo et al., 2003).

Planteamiento del problema

Se ha demostrado la relación de expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en células endoteliales y microglía durante la EA en modelos tanto *in vitro* como *in vivo*, y se ha reconocido su importancia como marcadores de neuroinflamación. Sin embargo, no se ha estudiado la relación que existe entre el aumento en la expresión de ICAM-1 y VCAM-1, con la expresión de A β y la edad en modelos animales con patología tipo Alzheimer.

Al evaluar ratones 3xTgAD con patología tipo Alzheimer de diferentes grupos de edad, se espera determinar en qué edad comienza el aumento en la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en células de la microglía y su correlación con la presencia de agregados amiloides A β .

Objetivo general

Evaluar la expresión de ICAM-1 y VCAM-1, en ratones transgénicos 3xTgAD con patología tipo Alzheimer de diferentes grupos de edad.

Objetivos particulares

1. Evaluar la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en cerebros de ratones de diferentes edades por citometría de flujo.
2. Comparar la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 entre ratones transgénicos y ratones Wild Type.
3. Correlacionar la expresión de moléculas de adhesión con la presencia de agregados amiloides.

Procedimiento Experimental

Metodología

Ratones

En el presente estudio utilizamos ratones transgénicos homocigotas B6; 129-Psen1^{tm1Mpm}Tg (APPSwe tauP301L1Lfa/J (3xTgAD), con fondo genético B6129SF2/J, y controles híbridos B6129SF2/J, obtenidos de la cruce C57BL/6J (B6) y 129S1/SvImJ (129S). Ambas cepas fueron adquiridas en The Jackson Laboratory, EUA y se mantuvieron en el Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, bajo condiciones controladas de temperatura, humedad y períodos de luz/obscuridad 12/12 h. Para el presente estudio se incluyeron tanto machos como hembras.

La edad de los animales de ambas cepas utilizadas se muestra en las Tablas 1 y 2, respectivamente.

Tabla 1. *Edades de los Ratones Triple Transgénico (3xTgAD) utilizados en el presente estudio.*

Hembras	Machos
20 meses	18 meses
17 meses	17 meses
16 meses	
2 meses	2.5 meses

Tabla 2. *Edades de los Ratones Wild Type (WT) utilizados en el presente estudio.*

Hembras	Machos
17 meses	17 meses

Preparación de tejidos

Se anestesió a los ratones por inhalación de Sevoflurano (Abbot Lab), rápidamente se les realizó una perfusión cardíaca ventricular con una solución amortiguadora de fosfatos con glucosa (GKN) a 4°C y se disectó el cerebro. Un hemisferio se colocó en una caja Petri sobre hielo y se picó con una navaja, en seguida el tejido se homogenizó entre dos mallas de 75 µm y se resuspendió en una solución amortiguadora de fosfatos con glucosa-albúmina de suero bovino (GKN-BSA) a 4°C. Se centrifugó a 400 g por 10 min a temperatura ambiente y se resuspendió el pellet con 10 mL de solución de digestión suplementada con 500 U de desoxirribonucleasa I (DNAsa I) (Sigma) y 150 U de colagenasa II (Sigma). Después de incubar 1 hora a 37°C en agitación se detuvo la reacción con 45 mL de GKN-BSA a 4°C y se centrifugó a 400 g por 10 min.

Citometría de flujo

Se resuspendió el pellet obtenido en 4 mL de Percoll (Sigma) isotónico al 30% y se depositó sobre 4 mL de percoll isotónico al 70%, y finalmente se depositaron 2 mL de la solución de GKN/BSA 0.2%. Se centrifugó a 300 g por 40 min a 18°C, sin freno y se colectaron 3 mL de la interfase 70-30%. Se agregaron 9 mL de GKN-BSA y se centrifugó por 7 min a 500 g a 4°C, después se resuspendió el pellet con 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos de Dubesco (dPBS)-Facs (dPBS/5%SFB/0.02%NaN₃), se centrifugó a 500 g, 5 min a 4°C y se resuspendió en 100 µL del cocktail de bloqueo (anti CD16/CD32) dilución 1:100. Se incubó con la solución de bloqueo por 15 min, se realizaron dos lavados y se procedió a marcar con el cocktail de tinción con anti-CD54 Alexa Fluor (AF) 488 (ICAM-1) (Biolegend)/ anti-CD106 PE (VCAM-1) (Biolegend) / anti-F4-80 PE-Cy5 (microglía) (Biolegend) por 20 min a 4°C. Se detuvo la reacción con 1mL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS)-Facs. Por último, se realizaron dos lavados con 1 mL de dPBS-Facs a 500xg, por 5 min a 4°C y se analizaron las células en el citómetro Attune Next (Life Technologies).

Inmunohistoquímica

El otro hemisferio de los cerebros de ratones transgénicos 3xTgAD se fijó con una solución de paraformaldehído al 4% por 24 h a 4°C. Posteriormente se deshidrataron en una solución de sacarosa al 10%, 20% y 30% en PBS por 24 h, respectivamente. Una vez deshidratados, los tejidos se mantuvieron en TissuePlus (Fisher HealthCare) y se cortaron en congelación con un crióstato (Kedee, KD2850) obteniendo cortes coronales de 30 µm de grosor a -1.6 mm del bregma. Se incubó cada tejido individualmente en agitación en 500µL de Tris Solución amortiguadora Salino (TBS) 1x a temperatura ambiente por 5 min, luego se realizó la exposición de epítomos con 500µL de amortiguador de citratos (ácido cítrico 0.1M, Tween 20 al 0.05%, pH 6.0) durante, 30 min a 60°C. Posteriormente se lavaron los tejidos en agitación con 500µL TBS 1x por 5 min a temperatura ambiente, a continuación se permeabilizaron en agitación con 500 µL de TBS A (TBS1X/Tritón X-100 0.1%) por 15 min, se llevó a cabo el bloqueo en agitación con 500 µL de TBS B (TBS1X/A/BSA 2%) por 20 min y, finalmente se agregaron 100 µl de anticuerpo primario, en este caso Bam10 (anti-A-β42) (Sigma-Aldrich) en diluyente de anticuerpos (TBS A/Suero Normal de Cabra 5) toda la noche. Al día siguiente, se lavaron los cortes subsecuentemente con 500 µL de TBS 1x, TBS A y TBS B, por 5 min en agitación. Se agregaron 100 µL del anticuerpo secundario anti-IgG de conejo AF 594 (Invitrogen) en diluyente de anticuerpos, se incubaron 1 hora en agitación y se lavaron subsecuentemente con 500 µL de TBS 1x, TBS A y TBS B, respectivamente por 5 min en agitación. El tejido se inmovilizó sobre un portaobjetos, se agregó medio de montaje VectaShield (Vector Labs) y se colocó un cubreobjetos. Las observaciones se llevaron a cabo en un microscopio de epifluorescencia Nikon i5 y las fotos se tomaron con una cámara Olympus DP71 usando el Software DP Controller 3.2.1.276.

Análisis estadístico

Se utilizó la prueba t de Student para calcular la existencia de significación estadística, determinada a un valor de $p \leq 0.05$. Los análisis estadísticos se realizaron con el software SigmaPlot (versión 12.0).

Resultados

Evaluación de la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en la microglía en cerebros de ratones con 3xTgAD y ratones Wild Type

Con la finalidad de evaluar la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en microglía, se realizaron experimentos de citometría de flujo utilizando células de ratones transgénicos 3xTgAD y ratones WT. Las células obtenidas del gradiente utilizado para enriquecer la fracción que contiene microglía, fueron marcadas con anticuerpos fluorescentes anti-F4/80, anti-ICAM-1 y anti-VCAM-1.

En el apartado A de la Figura 5 se muestra una imagen representativa de la población total de células obtenidas del cerebro y el grupo de células viables seleccionado, excluyendo la parte que corresponde a debris celulares, mientras que el apartado B corresponde al gráfico que muestra la población obtenida de las células seleccionadas en A delimitadas como Singlets para descartar lecturas que incluyan más de una célula.

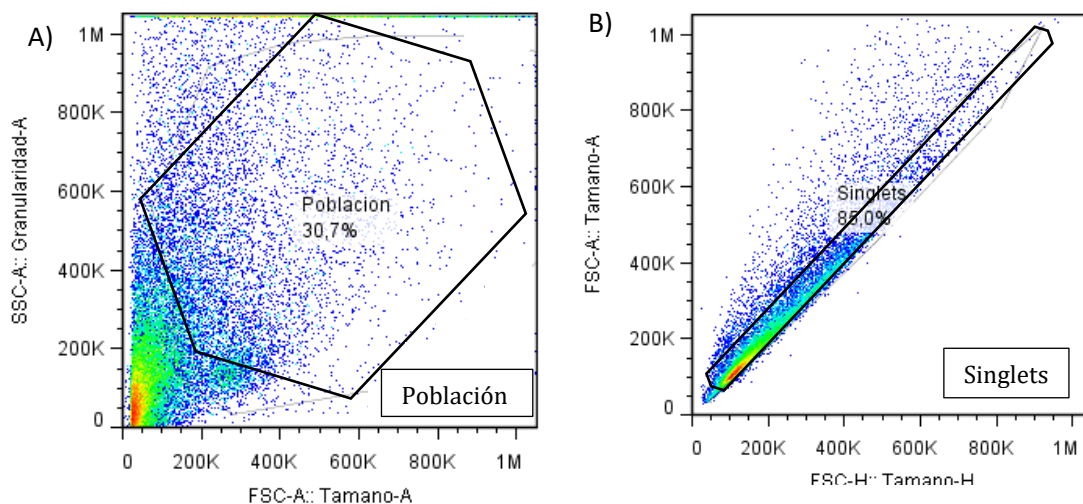


Figura 5. Identificación de células de la microglía A) Población total de células B) "Singlets".

Posteriormente, de la población Singlets fue seleccionada la subpoblación de células F4/80+. Se seleccionó F4/80 en el eje horizontal (eje X) del gráfico Dot plot, de modo que, los eventos en el cuadrante 2 (Q2) expresan F4/80 (F4/80 positivos). Los demás cuadrantes no expresan F4/80 (F4/80 negativos).

Los gráficos resultantes se muestran en las figuras: Figura 6, Figura 7, Figura 8 y Figura 9, dependiendo de la cepa, sexo y edad.

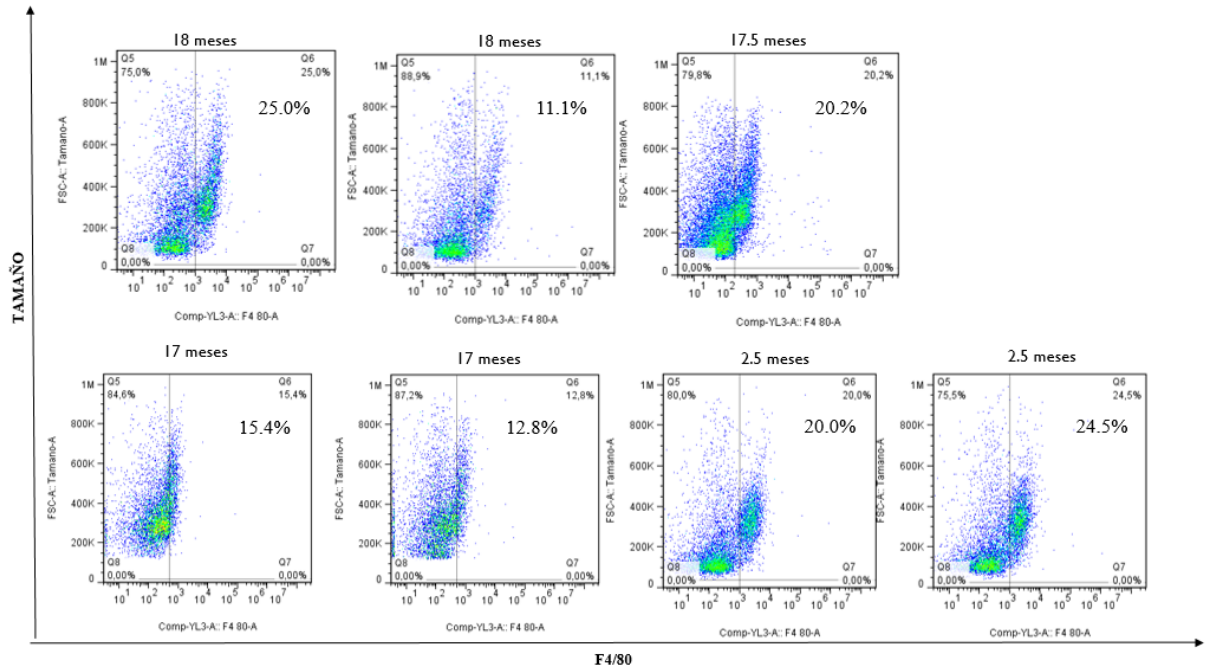


Figura 6. Expresión del marcador de microglía (F4/80) en células de cerebros de Ratones Triple Transgénico (3xTgAD) hembra de 16 a 20 meses.

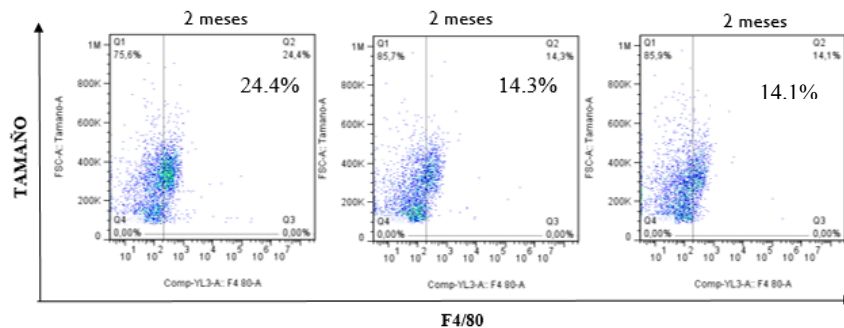


Figura 7. Expresión del marcador de microglía (F4/80) en células de cerebros de ratones Ratones Triple Transgénico (3xTgAD) hembra de 2 meses.

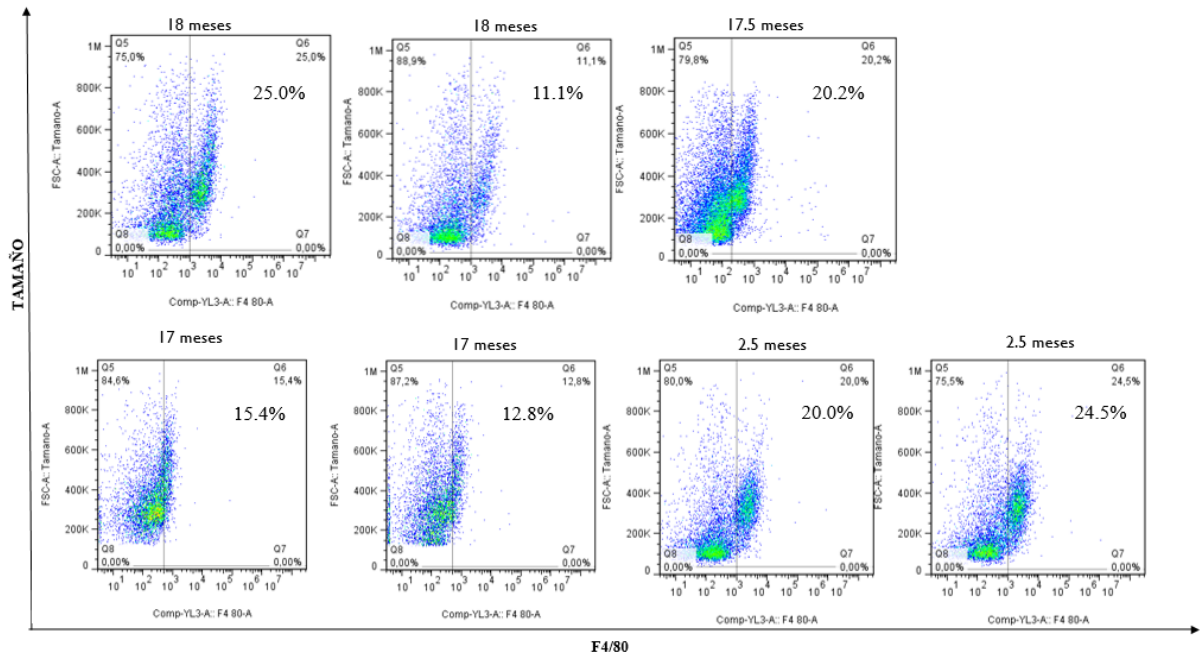


Figura 8. Expresión del marcador de microglía (F4/80) en células de cerebros de Ratones Triple Transgénico (3xTgAD) macho de 18 a 2.5 meses.

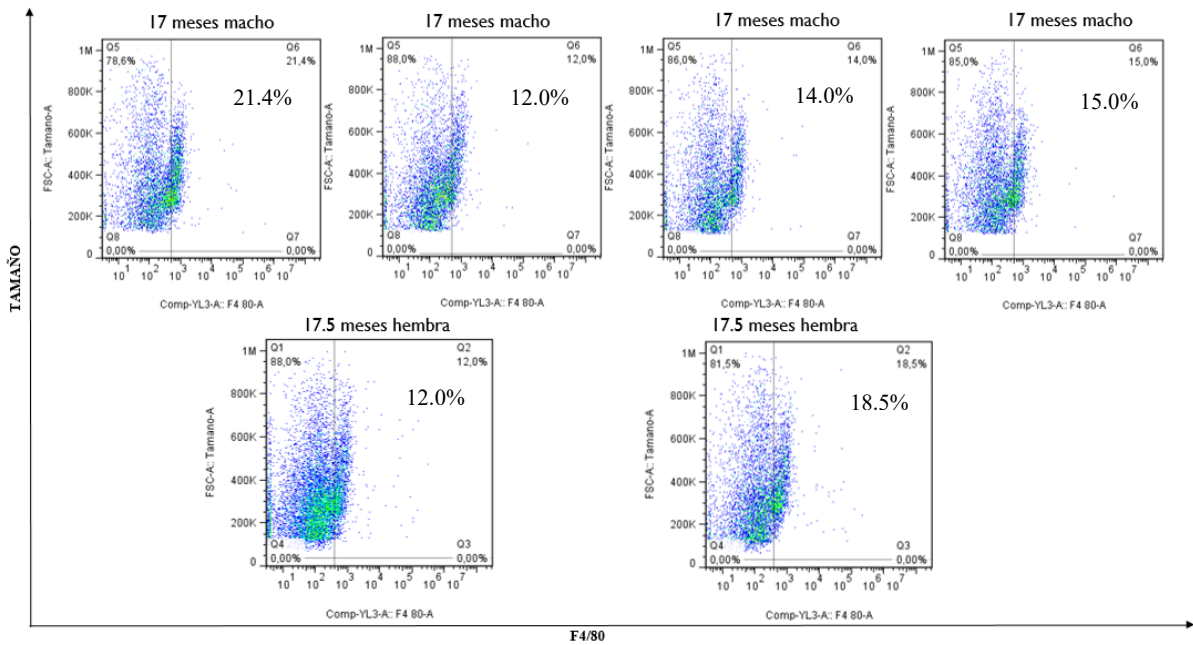


Figura 9. Expresión del marcador de microglía (F4/80) en células de ratones machos y hembra de la cepa B6129SF2/J (WT) de 17 y 17.5 meses.

Para evaluar la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 dentro de la población de microglía se seleccionó el subgrupo celular llamado “Microglía”. Se identificó ICAM-1 para el eje vertical (eje y) y VCAM-1 para el eje horizontal (eje x), de modo que, los eventos en el cuadrante 1 (Q1) son ICAM-1 positivo y VCAM-1 negativo, el cuadrante 2 (Q2) es ICAM-1 y VCAM-1 positivo, el cuadrante 3 (Q3) es únicamente VCAM-1 positivo y el cuadrante 4 (Q4) es negativo para ambos.

Los gráficos resultantes se muestran en las figuras: Figura 10, Figura 11, Figura 12 y Figura 13, dependiendo de la cepa, sexo y edad.

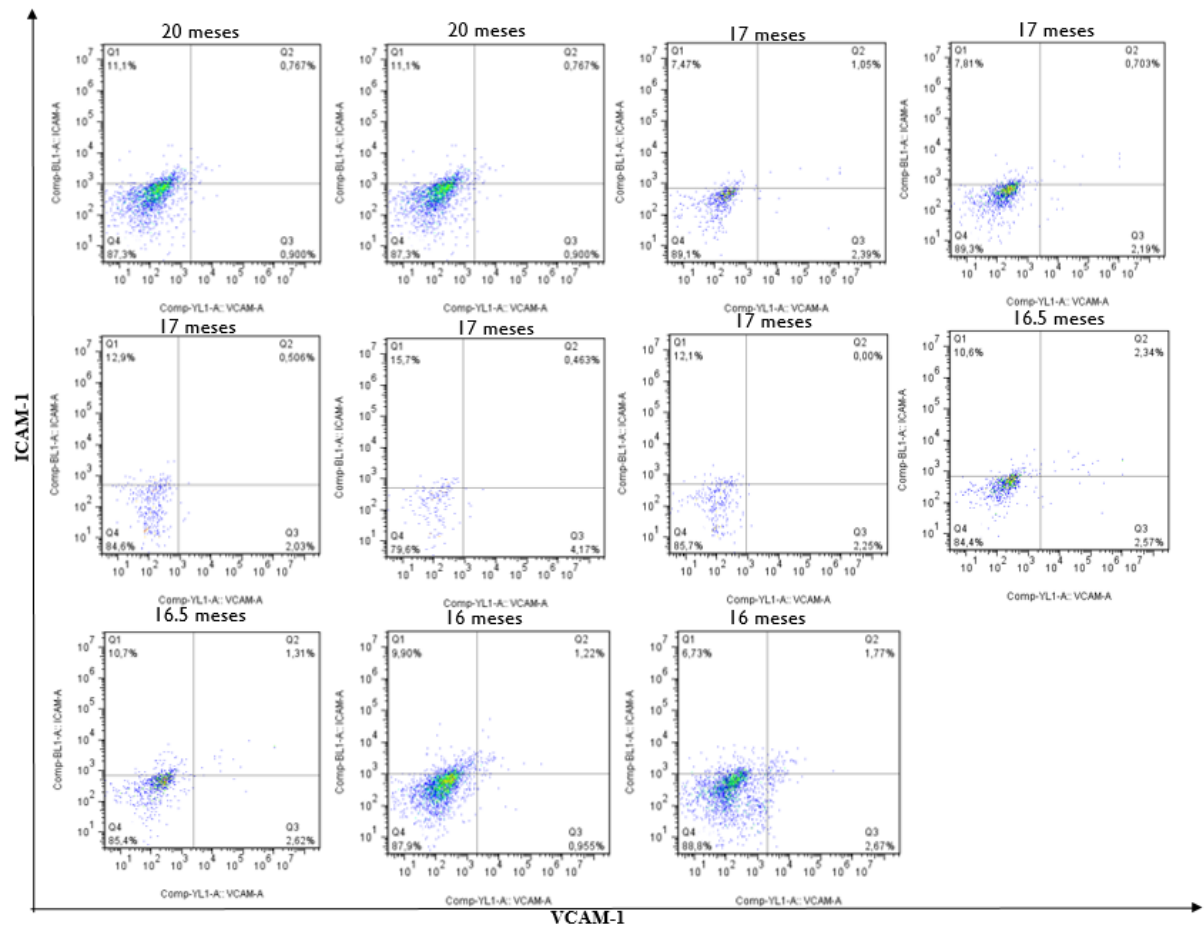


Figura 10. Expresión de la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1) y molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1) en células de la microglía de Ratones Triple Transgénico (3xTgAD) hembra de 16 a 20 meses

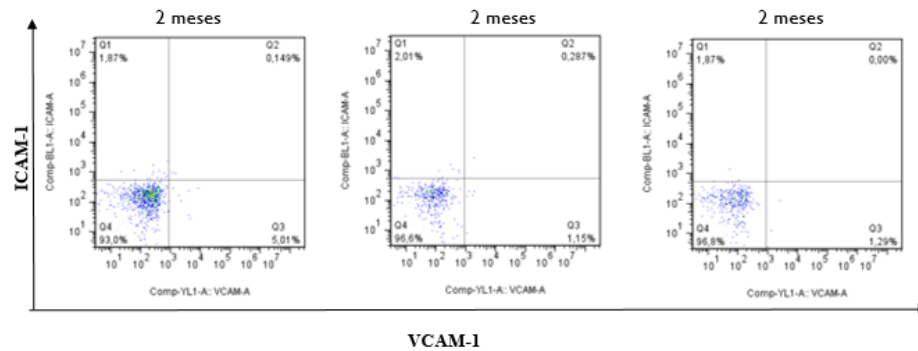


Figura 11. Expresión de la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1) y molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1) en células de la microglía de Ratones Triple Transgénico (3xTgAD) hembra de 2 meses

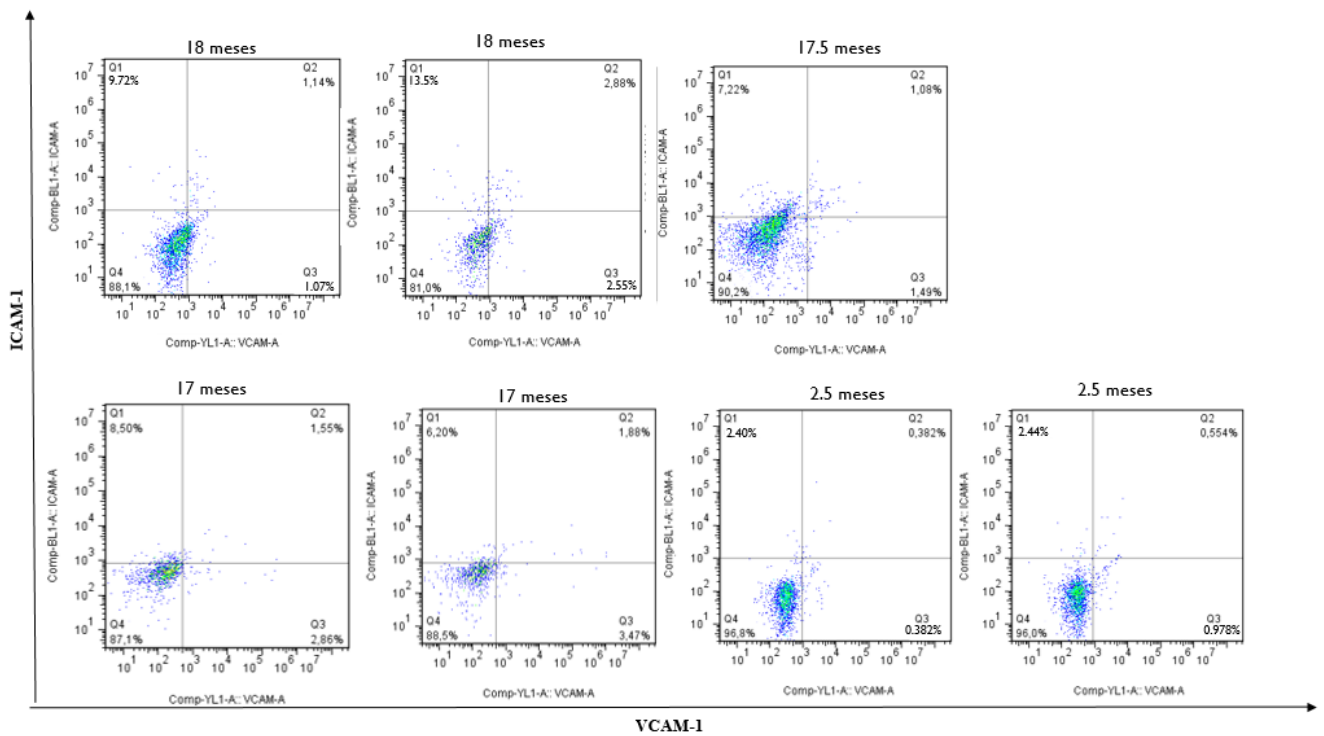


Figura 12. Expresión de la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1) y molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1) en células de la microglía de Ratones Triple Transgénico (3xTgAD) macho de 2.5 a 18 meses.

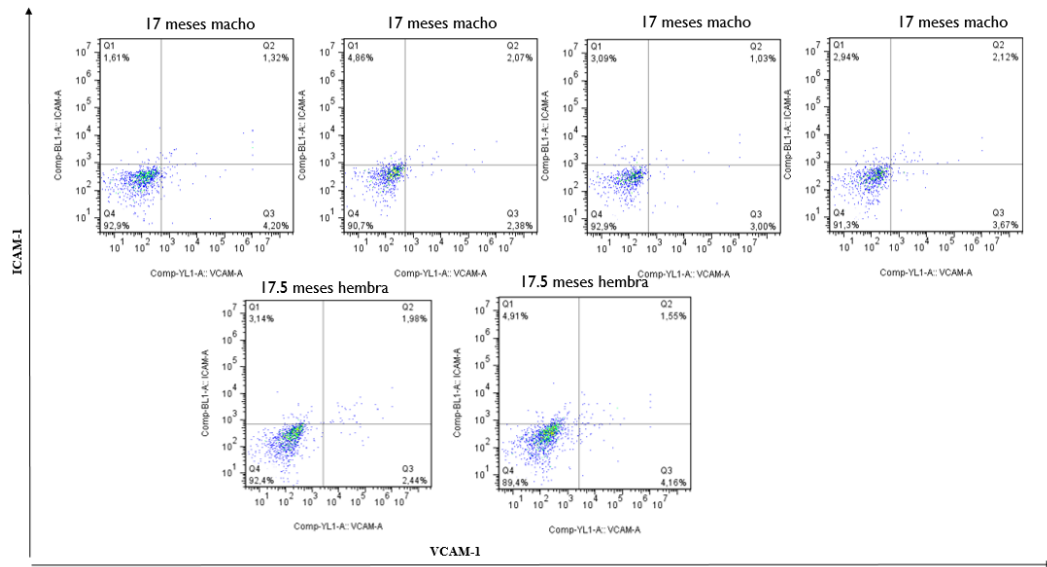


Figura 13. Expresión de la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1) y molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1) en células de la microglía de ratones machos y hembra de la cepa B6129SF2/J (WT) de 17 y 17.5 meses.

En la Figura 14, se encuentran gráficos que sintetizan los resultados de las citometrías de flujo realizadas. Se agruparon y promediaron los datos de acuerdo con la edad de los animales para poder comparar las diferencias en la expresión.

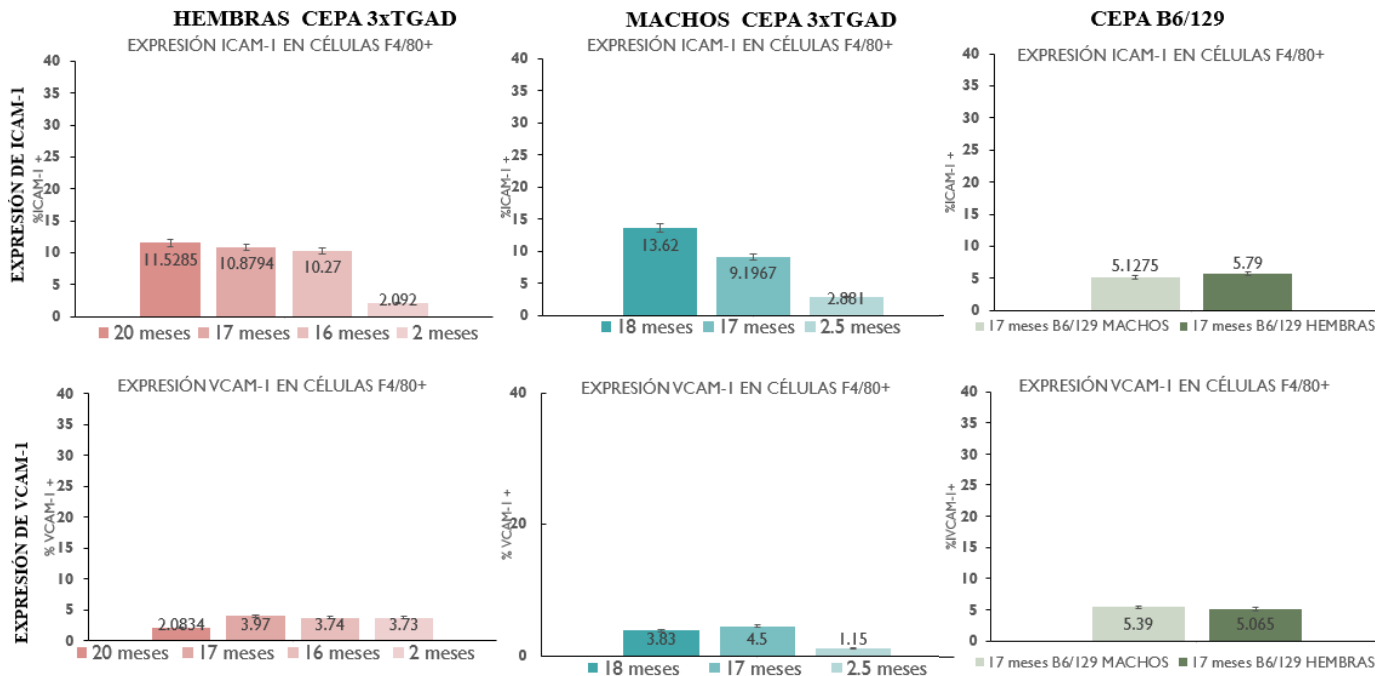


Figura 14. Promedios de los porcentajes de expresión de de la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1) (arriba) y y molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1) (abajo) entre los grupos de ratones evaluados: Ratones Triple Transgénico (3xTgAD) hembras (izquierda), machos 3xTgAD (centro) y ratones de la cepa Wild Type (derecha).

En la primera fila se aprecian las gráficas de la expresión de ICAM-1: como se observa en la gráfica de los datos de los ratones 3xTgAD, se tiene que la expresión de ICAM-1 va aumentando conforme se incrementa la edad.

En el caso de las hembras, la diferencia de la expresión de ICAM-1 en microglía entre los 17 y los 20 meses es mínima, aunque se distingue un aumento. En el caso de los machos la diferencia entre los 17 y 18 meses es notable e incluso sobrepasa la expresión de ICAM-1 de los 20 meses de las hembras.

Por el contrario, la expresión en la cepa Wild Type se mantuvo por debajo de la expresión en machos y hembras 3xTgAD de la misma edad y sin diferencia entre animales de diferentes edades.

No hay aumento en la expresión de VCAM-1 de microglía en hembras y machos de la cepa 3xTgAD. La expresión de VCAM-1 en la cepa Wild Type se mantuvo por arriba de los valores expresados por la cepa 3xTgAD.

Se realizó un análisis estadístico con asistencia del programa SigmaPlot para definir si existen diferencias significativas entre los grupos de animales; el criterio para aceptar que los resultados presentan diferencia significativa, se eligió como $p < 0.05$. Los resultados se muestran en las Tablas 3, 4 y 5.

Tabla 3. Análisis del porcentaje de células de cerebro que expresan molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1) y molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1) en ratones hembras

Grupos retados	ICAM-1		VCAM-1	
	%	p	%	p
20 meses Ratones Triple Transgénico (3xTgAD) contra 17 meses 3xTgAD	11.53±0.48	0.749	2.08±0.59	0.095
	10.88±2.56		3.97±1.35	
17 meses 3xTgAD contra 16 meses 3xTgAD	10.88±2.56	0.716	3.97±1.35	0.796
	10.27±2.16		3.74±1.21	
16 meses 3xTgAD contra 2 meses 3xTgAD	10.27±2.16	0.001	3.74±1.21	0.995
	2.09±0.26		3.73±3.13	
17 meses 3xTgAD contra 17 meses Wild Type (WT)	10.88±2.56	0.047	3.97±1.35	0.381
	5.79 ±0.95		5.07±0.91	

Los valores que expresan una diferencia significativa están resaltados en negritas.

Tabla 4. Análisis del porcentaje de células de cerebro que expresan molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1) y molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1) en ratones machos

Grupos retados	ICAM-1		VCAM-1	
	%	p	%	p
18 meses Ratones Triple Transgénico (3xTgAD) contra 17 meses 3xTgAD	13.62±3.90 9.20±1.43	0.152	3.83±2.28 4.50±1.74	0.727
17 meses 3xTgAD contra 2.5 meses 3xTgAD	9.20±1.43 2.88± 0.16	0.010	4.50±1.74 1.15±0.54	0.085
17 meses 3xTgAD contra 17 meses Wild Type (WT)	9.20±1.43 5.13 ±1.65	0.019	4.50±1.74 5.39 ±1.00	0.361

Los valores que expresan una diferencia significativa están resaltados en negritas.

Tabla 5. Análisis del porcentaje de células de cerebro que expresan molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1) y molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1) en ratones machos y hembras.

Grupos retados	ICAM-1		VCAM-1	
	%	p	%	p
20 meses Ratones Triple Transgénico (3xTgAD) hembra contra 18 meses 3xTgAD macho	11.53±0.48 13.62±3.90	1.000	2.08±0.59 3.83±2.28	0.667
17 meses 3xTgAD hembra contra 17 meses 3xTgAD macho	10.88±2.56 9.20±1.43	0.345	3.97±1.35 4.50±1.74	0.643
2 meses 3xTgAD hembra contra 2.5 meses 3xTgAD macho	2.09±0.26 2.88± 0.16	0.034	3.73±3.13 1.15±0.54	0.353
17 meses Wild Type (WT) hembra contra 17 meses WT macho	5.79 ±0.95 5.13 ±1.65	0.638	5.39 ±1.00 5.39 ±1.00	0.677

Los valores que expresan una diferencia significativa están resaltados en negritas.

Comprobamos, como se observa en las Tablas 3, 4 y 5, el aumento significativo del porcentaje de células que expresan ICAM-1 en el cerebro de los ratones hembras 3xTgAD entre ratones de 16 y 2 meses, así como diferencia significativa entre ratones WT y ratones 3xTgAD de la misma edad. El mismo caso se observa para los ratones machos; diferencia significativa entre ratones machos 3xTgAD de 17 y 2.5 meses, así como en ratones machos 3xTgAD y WT de 17 meses.

Análisis de la presencia de agregados amiloides por inmunofluorescencia

Con el objetivo de detectar la presencia de agregados $A\beta$, se realizó una tinción por inmunofluorescencia en hipocampo y amígdala en ratones 3xTgAD hembra de 18 meses y ratones 3xTgAD hembra de 2 meses. Para esta tinción se utilizó como anticuerpo primario un anticuerpo anti- $A\beta$ producido en conejo y como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo anti-IgG de conejo AF 594, por lo que se observa $A\beta$ extracelular en color rojo, mientras que en azul se aprecia el marcaje a los núcleos celulares realizado con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Los ratones de 17 meses tienen presencia de agregados amiloides tanto en el hipocampo como en la amígdala, mientras que los ratones de 2 meses no muestran expresión.

A continuación en la Figura 15 se muestran las imágenes obtenidas.

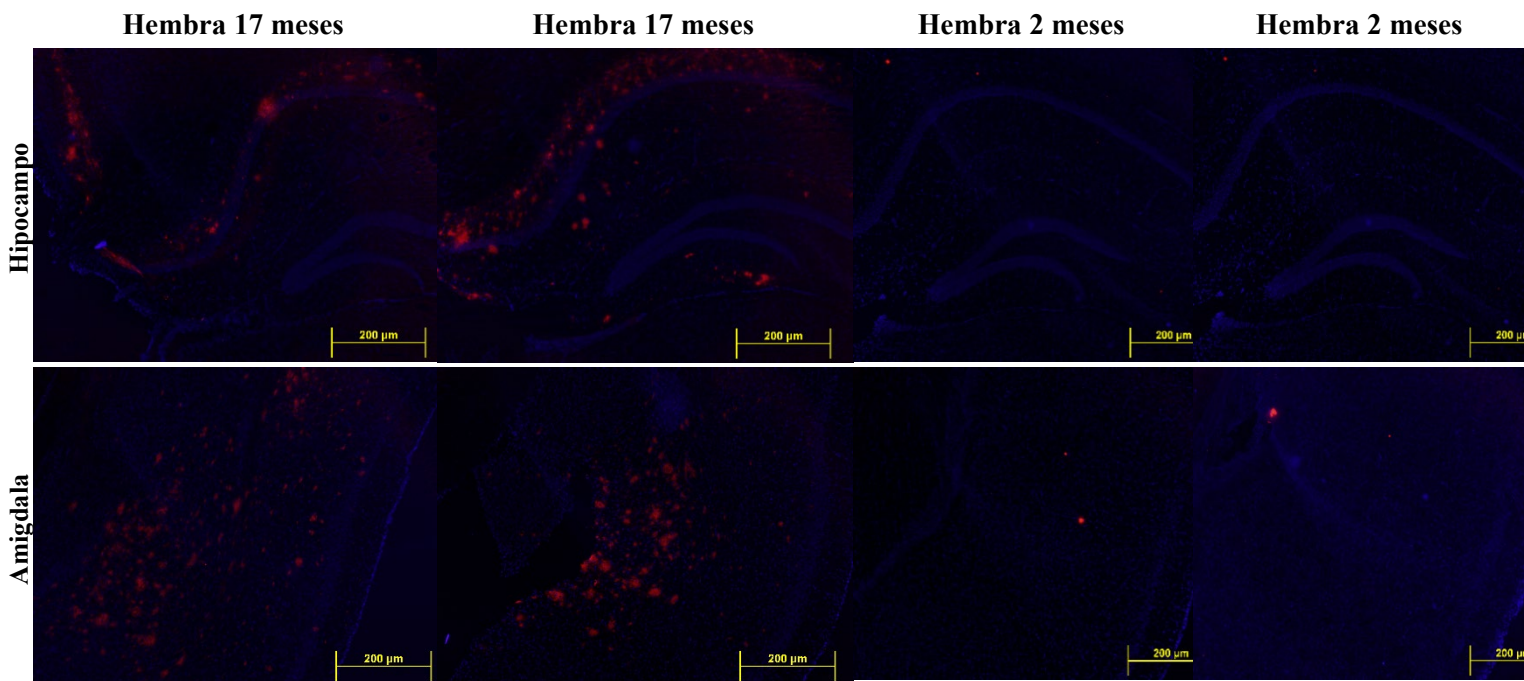


Figura 15. Análisis de la presencia de agregados amiloides por inmunofluorescencia de dos ratones transgénicos 3xTgAD hembra de 17 meses y dos ratones transgénicos 3xTgAD hembra de 2 meses, $A\beta$ en color rojo y núcleos de células en azul.

Discusión

La EA es la causa principal de demencia en adultos mayores (Nichols et al., 2019), y se estima que es responsable de un 4,9% de las muertes en adultos mayores de 65 años. El riesgo se incrementa con la edad (Villarejo et al., 2017), y esto hace que el estudio de la patología sea un tema sustancial a nivel global. Como otras enfermedades neurodegenerativas, se trata de una condición multifactorial y es necesario considerar todas las implicaciones de la patología (Morales et al., 2016; Kolarova et al., 2012)

La influencia de la neuroinflamación es un evento clave en las enfermedades neurodegenerativas como esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson y EA (Morales et al., 2016). La inflamación contribuye significativamente a la patogénesis de la EA. La generación y secreción de mediadores proinflamatorios puede interactuar en múltiples niveles con el mecanismo neurodegenerativo (Ahmad et al., 2018; Heneka et al., 2010). Incluso se demostró que los cambios inmunológicos observados en ratones jóvenes 3xTgAD son consistentes con la evidencia clínica sobre una mayor producción de citocinas proinflamatorias (Marchese et al., 2014).

La microglía es el principal representante del sistema inmunológico en el SNC. Este tipo de célula puede detectar patógenos extraños o nocivos y desencadenar su propia activación y la generación de procesos neuroinflamatorios a través de la fagocitosis, la liberación de citosinas y la expresión de diversas moléculas en su membrana, con el fin de mantener el microambiente celular (Martinen et al., 2018; Morales et al., 2016; Soto et al., 2015; Zhang et al., 2015).

Dentro de los estudios de neuroinflamación en la EA, se ha reconocido la importancia de la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 como nuevas oportunidades de tratamiento inexploradas. Cuando se utilizan como biomarcadores, pueden ser valiosas herramientas para permitir el seguimiento clínico de la inflamación relacionada con la EA y sus complicaciones e incluso dar seguimiento a la respuesta al tratamiento (Wennström et al. 2012). Aunque el papel exacto de las células inmunes circulantes en la patogénesis y la progresión de la EA no se comprende completamente, hay evidencia de que las CAMs juegan un papel en el metabolismo de β amiloide, la plasticidad celular, la señalización, la neuroinflamación y los cambios vasculares (Leshchynska y Sytnyk 2016; Pietronigro et al. 2016). Debido a la participación de ICAM-1 y VCAM-1 en la patogénesis de la EA, se convierten en posibles factores de riesgo genético. Un estudio en la población eslovaca encontró que un polimorfismo en el gen ICAM1 muestra una asociación significativa con una mayor gravedad del deterioro cognitivo en la EA (Shawkatová et al., 2019).

La mayoría de los estudios sobre ICAM-1 y VCAM-1 durante la EA giran en torno a su expresión en las células vasculares y su relación con la disrupción de la BHE (Dietrich et al., 2002; Soto et al., 2015; Zenaro et al., 2015; Bowman et al., 2018). Cuando se observó que estas CAMs estaban asociadas con placas seniles en la EA, se atribuyó su expresión a los astrocitos y su función como ligando de LFA-1 para activar a la microglía (Akiyama et al., 1993; Frohman et al., 1991). Incluso recientemente se encontró que sICAM-1 derivada de células madre de cordón umbilical humano disminuye las placas de A β *in vivo*, induciendo la expresión de una enzima degradante en microglía a través de la vía de señalización sICAM-1 / LFA-1 (Kim, J.-Y, 2011). Además de las células endoteliales y astrocitos, ICAM-1 y VCAM-1 unidas a membrana, se expresan también en las células de la microglía (Lee y Benveniste, 1999; Hailer et al., 1997).

En este estudio observamos un aumento en la expresión de ICAM-1 en microglía en ratones 3xTgAD. En el caso de los grupos de las hembras, existe diferencia significativa entre el grupo de ratones de 16 meses y el grupo de ratones de 2 meses ($p=0.001$), al comparar los grupos de 16, 17 y 20 meses entre sí, se observa un ligero aumento, sin embargo, no se encuentran diferencias significativas (Tabla 3, Figura 14). Análogo a la situación de las hembras, el grupo de ratones macho 3xTgAD de 17 meses tiene un aumento significativo de expresión de ICAM-1 en microglía con respecto al grupo de ratones 3xTgAD de 2 meses ($p=0.010$), y al comparar los grupos de edad de 17 y 18 meses no se obtuvo diferencia significativa (Tabla 4).

Cabe mencionar que uno de los factores medioambientales que afectan profundamente la neuroinflamación es la edad. Durante el proceso de envejecimiento, la microglía reside en un estado de activación crónico de bajo nivel con una morfología distrófica (Leng, 2020). Además, en una publicación previa se observó un drástico aumento de la expresión de ICAM-1 extravascular que se produjo principalmente entre grupos de pacientes de 60 y 70 años de edad (Miguel-Hidalgo et al., 2007). Se sabe que la edad también implica un avance de la patología y la acumulación de péptido A β tanto en humanos como en modelos murinos (Marchese et al., 2014; Morales et al., 2016; Oddo et al., 2003; Villarejo et al., 2017).

Con el objetivo de descartar que el aumento de ICAM-1 y VCAM-1 era debido al envejecimiento, se compararon grupos de ratones WT envejecidos con ratones 3xTgAD de la misma edad, 17 meses para ambos sexos. Observamos que la expresión de ICAM-1 presentó diferencias significativas, siendo el valor de porcentaje más alto en los ratones 3xTgAD, tanto en machos ($p=0.019$) como en hembras ($p=0.047$) (Tablas 3 y 4, Figura 14). Estos resultados nos indican que el aumento en la expresión de ICAM-1 en las células de la microglía depende de la presencia de agregados de A β y no se debe únicamente a la edad.

En el análisis de inmunofluorescencia realizado en ratones hembras 3xTgAD de 17 y 2 meses, encontramos una amplia señal de A β (Figura 15) en los individuos de 17 meses, tanto en hipocampo como en amígdala, demostrando que los ratones jóvenes utilizados no iniciaron la acumulación de péptido A β . En la literatura se ha reportado que este modelo desarrolla el péptido intracelularmente a partir de los 4 meses (Oddo et al., 2003), y en relación con las moléculas de adhesión, se encontró una mayor expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en células endoteliales de ratones de 4 meses 3xTgAD a comparación del modelo WT (Zenaro et al., 2015). Por otra parte, se reportó que el aumento de la expresión de microglía en ratones 3xTgAD fue evidente a los 6 meses de edad (Belfiore et al., 2018). Considerando ambos resultados, es probable que la expresión de ICAM-1 en microglía empiece a aumentar a partir de los 6 meses de edad.

Al comparar los resultados de expresión de ICAM-1 por sexo, observamos que en el grupo de ratones macho 3xTgAD más envejecidos (18 meses) no hay aumento significativo en comparación con el grupo de hembras 3xTgAD más envejecidas (20 meses). En cambio, comparando los grupos de ratones más jóvenes (2 meses) observamos un aumento significativo en la expresión de ICAM-1 de los ratones machos 3xTgAD con respecto a los ratones hembra 3xTgAD ($p=0.034$) (Tabla 5). Asimismo, en muestras de LCR de pacientes cursando diferentes etapas de la EA, se encontró que ICAM-1 es expresado más en hombres que en mujeres (Jandelize et al., 2018).

Se han presentado informes de hembras que sobreviven más que los machos en modelos de ratones 3xTgAD y el modelo transgénico Hsiao (Tg2576) (Westmark et al., 2008; Freude et al., 2009). En el modelo 3xTgAD machos y hembras se encuentran igualmente afectados por placas A β y marañas neurofibrilares (Clinton et al., 2007) similar a lo que ocurre en pacientes con EA (Sandberg et al., 2001). Lo que sugiere que la sobrevivencia dependiente del dimorfismo sexual no se debe a la influencia de placas A β , sino a otro factor como la neuroinflamación, análogo a nuestros resultados.

Por otra parte, en el análisis de la expresión de VCAM-1 por citometría de flujo, obtuvimos un aumento no significativo al comparar ratones macho 3xTgAD de 17 meses y 2 meses (Tabla 4, Figura 14). Contrario a lo esperado, en el caso de las hembras 3xTgAD no se observó diferencia entre los grupos de edad y tampoco hubo diferencia al contrastar los datos por sexo. Resultados similares se obtuvieron al comparar los individuos del modelo murino 3xTgAD con los individuos del modelo no transgénico (B6129SF2/J) de la misma edad (Tabla 3, Tabla 5, Figura 15).

Anteriormente se ha reportado en la literatura un aumento de la expresión de VCAM-1 con la presencia de placas amiloides únicamente en células endoteliales (Jandelize et al., 2018; Zenaro et al., 2015; Pietronigro et al., 2019; Wennström et al., 2012). También se ha reportado un aumento relacionado con la edad: en un estudio se encontró que el bloqueo de VCAM-1 con un anticuerpo o la eliminación de su expresión en la BHC, contrarrestó los

efectos del envejecimiento en el plasma de pacientes y ratones envejecidos (Yousef et al., 2019). Y en algunos estudios, se reporta expresión de VCAM-1 en microglía tras la exposición a estímulos agudos como lo es la exposición a LPS (O'Sullivan et al., 2010) y alrededor de lesiones de esclerosis múltiple (Peterson et al., 2002). Aunque en este estudio no se reportó un aumento dependiente de las lesiones y, al igual que con la EA, se ha estudiado más su expresión en las células endoteliales (Yednock et al., 1992; Serres et al., 2011). Es posible que no hayamos visto un aumento en la expresión de VCAM-1 en microglía debido a que esta célula no es capaz de regular la expresión de VCAM-1 en presencia de agregados A β .

La regulación del incremento de ICAM-1 y VCAM-1 en la microglía de pacientes con EA aún no se conoce del todo. Una ruta sugerida para su activación es por citocinas como TNF α , TGF- β , IFN- γ e IL-1 β (Ferreti et al., 2016; Frohman et al., 1989), aunque ese podría ser el caso de ICAM-1 y VCAM-1 solamente en células endoteliales. Entre las citosinas proinflamatorias que estimulan la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en células gliales, destaca el IFN- γ ya que puede estimular su expresión tanto en astrocitos como en microglía (Lee y Benveniste, 1999; Shrikant et al., 1995).

La función principal de las CAMs en el endotelio del SNC, es la migración de los leucocitos hacia el sitio de inflamación. Su expresión se coordina para asegurar que los procesos de rodamiento de leucocitos y adhesión/emigración pueden ocurrir durante varias h después del inicio de una respuesta inflamatoria. (Wennström et al., 2012; Granger et al., 2010). Es posible que las CAMs expresadas en las células gliales puedan modular la activación de las células T aumentando la afinidad de las interacciones célula-célula o enviando señales coestimuladoras a través de sus ligandos en los linfocitos (Lee y Benveniste, 1999; Gottrand et al., 2015). Igualmente se ha visto que funcionan como conectores hacia otras células cerebrales, como astrocitos, neuronas y BHE (Lee y Benveniste, 1999; Zenaro et al., 2015)

Su potencial como biomarcador se debe a su forma soluble, la cual no se deriva de un splicing alternativo, sino por escisión proteolítica de la superficie celular (Hahne et al., 1994, Lee y Benveniste, 2019; Wennström et al., 2012), con lo que se puede correlacionar positivamente la presencia de sICAM-1 y sVCAM-1 en LCR o plasma con la actividad de la enfermedad. Rentzos y colaboradores reportaron que los pacientes con EA tenían un nivel de sICAM-1 más alto en comparación con los sujetos control (Rentzos et al., 2004). Otro estudio encontró que los niveles en el LCR de ICAM-1 y VCAM-1 aumentaron durante las etapas de la EA, además los niveles altos de estos biomarcadores se asociaron con niveles aumentados de tau total en el LCR y un aumento en el riesgo de desarrollar demencia por EA en pacientes sin demencia (Jandelize et al., 2018).

La orientación terapéutica de las moléculas de adhesión celular para disminuir la inflamación ha resultado prometedora en enfermedades neurodegenerativas como la encefalomiелitis autoinmune experimental, esclerosis múltiple y EA (Peterson et al., 2002, Wennström et al., 2012, Walker et al., 2017, Miklossy, et al., 2006).

A continuación se mencionan algunos ejemplos donde el blanco terapéutico fueron ICAM-1 y VCAM-1 en la EA. La administración sistémica de anticuerpo anti-VCAM1 contrarresta los efectos perjudiciales en el plasma de individuos de edad avanzada en cerebros jóvenes e invierte los aspectos del envejecimiento, incluida la reactividad microglial y los déficits cognitivos, en los cerebros de ratones envejecidos (Yousef et al., 2019). La administración de anti-ICAM-1 en modelos animales de lesiones por reperusión demostró un efecto neuroprotector (Cao et al., 2009; Kanemoto et al., 2002). La lipoxina A4 inhibió la estimulación inducida por IL-1 β de la expresión de IL-8 e ICAM-1 en astrocitos (Decker et al., 2009).

Los resultados descritos en este trabajo contribuyen a lo que se sabe sobre la expresión de CAMs en células gliales, aunque se necesitarán más estudios para establecer su importancia.

Conclusiones

- Se evaluó la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 en células de la microglía de cerebros de ratones transgénicos de diferentes edades por citometría de flujo, así como en cerebros de ratones de la cepa WT.
- Se determinó que el aumento en la expresión de ICAM-1 en células de microglía se debe a la presencia de A β en cerebros de ratones transgénicos con patología tipo Alzheimer.
- Se determinó que el género no influye en el aumento de expresión de ICAM-1.
- No se observó aumento de VCAM-1 en la microglía de los ratones transgénicos con patología tipo EA.

Perspectivas

Se incluyen propuestas que no fue posible realizar experimentalmente y que no se encontraron en la literatura

- Comprobar si existe diferencia detectable de la fracción soluble de ICAM-1 (sICAM-1) en el suero de los animales.
- Comprobar en diferentes cepas transgénicas con patología tipo Alzheimer los resultados encontrados en este estudio.
- Evaluar la respuesta neuroinmunológica de los animales ante un bloqueador de ICAM-1.

Referencias

1. Ahmad, M. H., Fatima, M., & Mondal, A. C. (2018). Influence of microglia and astrocyte activation in the neuroinflammatory pathogenesis of Alzheimer's disease: Rational insights for the therapeutic approaches. *Journal of Clinical Neuroscience*. doi:10.1016/j.jocn.2018.10.034
2. Allen, G., Barnard, H., McColl, R., Hester, A. L., Fields, J. A., Weiner, M. F., ... Cullum, C. M. (2007). Reduced Hippocampal Functional Connectivity in Alzheimer Disease. *Archives of Neurology*, 64(10), 1482. doi:10.1001/archneur.64.10.1482
3. Barré-Sinoussi, F., & Montagnutelli, X. (2015). Animal models are essential to biological research: issues and perspectives. *Future Science OA*, 1(4). doi:10.4155/fso.15.63
4. Belfiore, R., Rodin, A., Ferreira, E., Velazquez, R., Branca, C., Caccamo, A., & Oddo, S. (2018). Temporal and regional progression of Alzheimer's disease-like pathology in 3xTg-AD mice. *Aging Cell*, e12873. doi:10.1111/acel.12873
5. Bella, J., Kolatkar, P. R., Marlor, C. W., Greve, J. M., Rossmann, M. G. (1998) The structure of the two amino-terminal domains of human ICAM-1 suggests how it functions as a rhinovirus receptor and as an LFA-1 integrin ligand. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 95: 4140-4145.
6. Benveniste, E. N., Nguyen, V. T., & O'Keefe, G. M. (2001). Immunological aspects of microglia: relevance to Alzheimer's disease. *Neurochemistry international*, 39(5-6), 381–391. [https://doi.org/10.1016/s0197-0186\(01\)00045-6](https://doi.org/10.1016/s0197-0186(01)00045-6)
7. Bondi, M. W., Edmonds, E. C., & Salmon, D. P. (2017). Alzheimer 's disease: Past, Present, and Future. *Journal of the International Neuropsychological Society*, 23(9-10), 818–831. doi:10.1017/s135561771700100x
8. British Psychological Society (2007). National Collaborating Centre for Mental Health (UK). *Dementia: A NICE-SCIE Guideline on Supporting People With Dementia and Their Carers in Health and Social Care*. (NICE Clinical Guidelines, No. 42.) 4, DEMENTIA. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK55480/>
9. Cao J, Shi X, Li W, Liu J, Miao X, Xu J, (2009). Protective effect of anti-intercellular adhesion molecule-1 antibody on global cerebral ischemia/reperfusion injury in the rat. *Biosci Trends*.;3(2):48–52.

10. Clinton, L. K., Billings, L. M., Green, K. N., Caccamo, A., Ngo, J., Oddo, S. ... LaFerla, F. M. (2007). Age-dependent sexual dimorphism in cognition and stress response in the 3xTg-AD mice. *Neurobiology of Disease*, 28(1), 76–82. doi:10.1016/j.nbd.2007.06.013
11. Cybulsky, M., Iiyama, K., Li, H., Zhu, S., Chen, M., Iiyama, M., Davis, V., Gutierrez-Ramos, J., Connelly, P. and Milstone, D., (2001). A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *Journal of Clinical Investigation*, 107(10), pp.1255-1262.
12. DE TOLEDO-MORRELL, L., GONCHAROVA, I., DICKERSON, B., WILSON, R. S., & BENNETT, D. A. (2006). From Healthy Aging to Early Alzheimer's Disease: In Vivo Detection of Entorhinal Cortex Atrophy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 911(1), 240–253. doi:10.1111/j.1749-6632.2000.tb06730.x
13. Drummond, E., & Wisniewski, T. (2017). Alzheimer's disease: experimental models and reality. *Acta neuropathologica*, 133(2), 155–175. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1662-x>
14. Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA (1986). Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol.* 1;137(1):245-54. PMID: 3086451.
15. Edler, M., Mhatre-Winters, I., Richardson, J. (2021). "Microglia in Aging and Alzheimer 's disease: A Comparative Species Review" *Cells* 10, no. 5: 1138. <https://doi.org/10.3390/cells10051138>
16. Freude, S., Hettich, M.M., Schumann, C., Stöhr, O., Koch, L., Köhler, C., Udelhoven, M., Leiser, U., Müller, M., Kubota, N., Kadowaki, T., Krone, W., Schröder, H., Brüning, J.C., Schubert, M., (2009). Neuronal IGF-1 resistance reduces abeta accumulation and protects against premature death in a model of Alzheimer's disease. *FASEB J* 23, 3315–3324.
17. Frohman, E.M., Frohman, T.C., Dustin, M.L., Vayuvegula, B., Choi, B., Gupta, A., van den Noort, S., Gupta, S., (1989). The induction of intercellular adhesion molecule1 ICAM-1. expression on human fetal astrocytes by interferon-g, tumor necrosis factor-a, lymphotoxin, and interleukin-1: relevance to intracerebral antigen presentation. *J. Neuroimmunol.*23, 117–124.
18. Frohman EM, Frohman TC, Gupta S, de Fougerolles A, van den Noort S, (1991). Expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 106:105-111
19. Glenner, G. G., & Wong, C. W. (1984). Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein.

Biochemical and Biophysical Research Communications, 120(3), 885–890.
doi:10.1016/s0006-291x(84)80190-4

20. Gottrand, G., Courau, T., Thomas-Vaslin, V., Prevel, N., Vazquez, T., Ruocco, M. G., Lambrecht, B., Bellier, B., Colombo, B. M., Klatzmann, D., (2015). Regulatory T-cell development and function are impaired in mice lacking membrane expression of full length intercellular adhesion molecule-1. *Immunology* 146: 657-670, 2015.
21. Granger DN, Senchenkova E, (2010). *Inflammation and the Microcirculation*. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences. Chapter 7, Leukocyte–Endothelial Cell Adhesion. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53380/>
22. Hahne, M., Lenter, M., Jäger, U., Vestweber, D., (1994); A novel soluble form of mouse VCAM-1 is generated from a glycolipid-anchored splicing variant. *Eur. J. Immunol.* 24, 421–428
23. Hansen, D., Hanson, J., Sheng, M., (2018); Microglía in Alzheimer’s disease. *J Cell Biol*; 217 (2): 459–472. doi: <https://doi.org/10.1083/jcb.201709069>
24. Heneka, M. T., O’Banion, M. K., Terwel, D., & Kummer, M. P. (2010). Neuroinflammatory processes in Alzheimer’s disease. *Journal of Neural Transmission*, 117(8), 919–947. doi:10.1007/s00702-010-0438-z
25. Heppner, F. L., Ransohoff, R. M., & Becher, B. (2015). Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nature reviews. Neuroscience*, 16(6), 358–372. <https://doi.org/10.1038/nrn3880>
26. Huang, Y., Liu, R. (2020), The Toxicity and Polymorphism of β -Amyloid Oligomers. *International Journal of Molecular Sciences*.
27. Jack, C. R., Knopman, D. S., Jagust, W. J., Shaw, L. M., Aisen, P. S., Weiner, M. W., ... Trojanowski, J. Q. (2010). Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer’s pathological cascade. *The Lancet Neurology*, 9(1), 119–128. doi:10.1016/s1474-4422(09)70299-6
28. Janelidze, S., Mattsson, N., Stomrud, E., Lindberg, O., Palmqvist, S., Zetterberg, H., ... Hansson, O. (2018). CSF biomarkers of neuroinflammation and cerebrovascular dysfunction in early Alzheimer disease. *Neurology*, 10.1212/WNL.0000000000006082. doi:10.1212/wnl.0000000000006082
29. Jankowsky, J. L., & Zheng, H. (2017). Practical considerations for choosing a mouse model of Alzheimer’s disease. *Molecular Neurodegeneration*, 12(1). doi:10.1186/s13024-017-0231-7
30. Kanemoto Y, Nakase H, Akita N, Sakaki T, (2002). Effects of anti-intercellular adhesion molecule-1 antibody on reperfusion injury induced by late reperfusion in the

rat middle cerebral artery occlusion model. *Neurosurgery*; 51 (4):1034–1041, [discussion 1041–1042].

31. Kim, J.-Y., Kim, D. H., Kim, J. H., Lee, D., Jeon, H. B., Kwon, S.-J., ... Chang, J. W. (2011). Soluble intracellular adhesion molecule-1 secreted by human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell reduces amyloid- β plaques. *Cell Death & Differentiation*, 19(4), 680–691. doi:10.1038/cdd.2011.140
32. Kolarova, M., García-Sierra, F., Bartos, A., Ricny, J., & Ripova, D. (2012). Structure and Pathology of Tau Protein in Alzheimer Disease. *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2012, 1–13. doi:10.1155/2012/731526
33. LaFerla, F. M., Green, K. N., & Oddo, S. (2007). Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(7), 499–509. doi:10.1038/nrn2168
34. Lee, S. J., & Benveniste, E. N. (1999). Adhesion molecule expression and regulation on cells of the central nervous system. *Journal of Neuroimmunology*, 98(2), 77–88. doi:10.1016/s0165-5728(99)00084-3
35. Leng, F., & Edison, P. (2020). Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? *Nature Reviews Neurology*. doi:10.1038/s41582-020-00435-y
36. Leshchynska I, Sytnyk V (2016) Synaptic cell adhesion molecules in Alzheimer's disease. *Neural Plast* 2016:6427537. <https://doi.org/10.1155/2016/6427537>
37. Macías Abraham, Consuelo. (2006). Moléculas de adhesión: Importancia en la respuesta inmune e inflamatoria. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 22(2) Recuperado en 17 de enero de 2021, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892006000200003&lng=es&tlng=es.
38. Marttinen, M., Takalo, M., Natunen, T., Wittrahm, R., Gabbouj, S., Kemppainen, S., Hiltunen, M. (2018). Molecular Mechanisms of Synaptotoxicity and Neuroinflammation in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neuroscience*, 12. doi:10.3389/fnins.2018.00963
39. McGeer, P. L., & McGeer, E. G. (2013). The amyloid cascade-inflammatory hypothesis of Alzheimer disease: implications for therapy. *Acta Neuropathologica*, 126(4), 479–497. doi:10.1007/s00401-013-1177-7
40. Morales, I., Farías, G., Cortes, N., y Maccioni, R. (2016). Neuroinflammation and Neurodegeneration, Update on Dementia, Davide Vito Moretti, IntechOpen, DOI: 10.5772/64545. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/51676>

41. Nair, K. S. (2005). Expression of cell adhesion molecules in oesophageal carcinoma and its prognostic value. *Journal of Clinical Pathology*, 58(4), 343–351. doi:10.1136/jcp.2004.018036
42. Nichols E., Szoeke C.E.I., Vollset S.E., Abbasi N., Abd-Allah F., Abdela J., Aichour M.T.E., (...), (2019), Dementia Collaborators Global, regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016, *The Lancet Neurology*, 18 (1) , pp. 88-106.
43. Pepinsky B, Hession C, Chen LL, Moy P, Burkly L, Jakubowsky A et al. (1992) Structure/function studies on vascular cell adhesion molecule-1. *J BiolChem*; 267(25): 17820–17826.
44. Peterson, J. W., Bö, L., Mörk, S., Chang, A., Ransohoff, R. M., & Trapp, B. D. (2002). VCAM-1-Positive Microglia Target Oligodendrocytes at the Border of Multiple Sclerosis Lesions. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 61(6), 539–546. doi:10.1093/jnen/61.6.539
45. Pietronigro, E., Zenaro, E., Bianca, V.D. et al. (2019) Blockade of $\alpha 4$ integrins reduces leukocyte–endothelial interactions in cerebral vessels and improves memory in a mouse model of Alzheimer’s disease. *Sci Rep* 9, 12055. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48538-x>
46. Oddo, S. et al. (2003) Triple-transgenic model of Alzheimer’s disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* 39, 409–421.
47. O’Sullivan, J. B., Ryan, K. M., Harkin, A., & Connor, T. J. (2010). Noradrenaline reuptake inhibitors inhibit expression of chemokines IP-10 and RANTES and cell adhesion molecules VCAM-1 and ICAM-1 in the CNS following a systemic inflammatory challenge. *Journal of Neuroimmunology*, 220(1-2), 34–42. doi:10.1016/j.jneuroim.2009.12.007
48. Pielsanguineti Ac1, Rodríguez-Tafur, (1999), Moléculas de Adhesión Y Jm2., *Dermatología Peruana - Vol. 9, Suplemento 1.*
49. Pietronigro, E., Zenaro, E., & Constantin, G. (2016). Imaging of Leukocyte Trafficking in Alzheimer’s Disease. *Frontiers in Immunology*, 7. doi:10.3389/fimmu.2016.00033
50. Rentzos, M., Michalopoulou, M., Nikolaou, C., Cambouri, C., Rombos, A., Dimitrakopoulos, A., Vassilopoulos, D. (2004). Serum Levels of Soluble Intercellular Adhesion Molecule-1 and Soluble Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule-1 in Alzheimer’s Disease. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology*, 17(4), 225–231. doi:10.1177/0891988704269822

51. Serrano-Pozo, A., Frosch, M. P., Masliah, E., & Hyman, B. T. (2011). Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 1(1), a006189. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006189>
52. Serres, S., Mardiguian, S., Campbell, S. J., McAteer, M. A., Akhtar, A., Krapitchev, A., Choudhury, R. P., Anthony, D. C., & Sibson, N. R. (2011). VCAM-1-targeted magnetic resonance imaging reveals subclinical disease in a mouse model of multiple sclerosis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 25(12), 4415–4422. <https://doi.org/10.1096/fj.11-183772>
53. Shawkatová, I., Javor, J., Párnická, Z. et al. (2019). ICAM1 gene polymorphism in late-onset Alzheimer's disease. *Biologia* 74, 1531–1538, <https://doi.org/10.2478/s11756-019-00295-y>
54. Shimizu Y, Newman W, Tanaka Y, Shaw S (1992). Lymphocyte interactions with endothelial cells. *Immunol Today*; 13(3): 106–112.
55. Shrikant, P., Weber, E., Jilling, T., Benveniste, E.N., (1995). ICAM-1 gene expression by glial cells: differential mechanisms of inhibition by interleukin-10 and interleukin-6. *J. Immunol.* 155, 1489–1501.
56. Soto-Rojas, L. O., Cruz-López, F. de la, Ontiveros-Torres, M. A., Viramontes-Pintos, A., Cárdenas-Aguayo, M. del C., Meraz-Ríos, M. A., Luna-Muñoz, J. (2015). Neuroinflammation and Alteration of the Blood-Brain Barrier in Alzheimer's Disease. *Alzheimer's Disease - Challenges for the Future*. doi:10.5772/60024
57. Thal DR, Rüb U, Orantes M, Braak H (2002). Phases of A β -deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology* 58: 1791–1800.
58. Van Wetering, S., van den Berk, N., van Buul, J. D., Mul, F. P. J., Lommerse, I., Mous, R., Hordijk, P. L. (2003). VCAM-1-mediated Rac signaling controls endothelial cell-cell contacts and leukocyte transmigration. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 285(2), C343–C352. doi:10.1152/ajpcell.00048.2003
59. Villarejo Galende, A., Eimil Ortiz, M., Llamas Velasco, S., Llanero Luque, M., López de Silanes de Miguel, C., & Prieto Jurczynska, C. (2017). Informe de la Fundación del Cerebro. Impacto social de la enfermedad de Alzheimer y otras demencias. *Neurología*. doi:10.1016/j.nrl.2017.10.005
60. Walker, D. G., Lue, L.-F., Tang, T. M., Adler, C. H., Caviness, J. N., Sabbagh, M. N., ... Beach, T. G. (2017). Changes in CD200 and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) levels in brains of Lewy body disorder cases are associated with amounts of Alzheimer's pathology not α -synuclein pathology. *Neurobiology of Aging*, 54, 175–186. doi:10.1016/j.neurobiolaging.20

61. Westmark, C.J., Westmark, P.R., Beard, A.M., Hildebrandt, S.M., Malter, J.S., (2008). Seizure susceptibility and mortality in mice that over-express amyloid precursor protein. *Int J Clin Exp Pathol* 1, 157–168
62. White, G., Ruske, A. (2002), Memory deficits in Alzheimer’s disease: The encoding hypothesis and cholinergic function. *Psychonomic Bulletin & Review*, 9 (3), 426-437
63. World Alzheimer Report (2016). The global impact of dementia. An analysis of prevalence, incidence, cost and trends. London: Alzheimer’s Disease International (ADI), 2016. Disponible en: <https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2016.pdf>.
64. Yednock TA, Cannon C, Fritz LC, Sanchez-Madrid F, Steinman L, Karin N (1992), Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature*; 356(6364):63-6.
65. Yousef, H., Czupalla, C. J., Lee, D., Chen, M. B., Burke, A. N., Zera, K. A., ... Wyss-Coray, T. (2019). Aged blood impairs hippocampal neural precursor activity and activates microglia via brain endothelial cell VCAM1. *Nature Medicine*, 25(6), 988–1000. doi:10.1038/s41591-019-0440-4
66. Zhang, F., & Jiang, L. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer’s disease. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 243. doi:10.2147/ndt.s75546
67. Zenaro, E., Pietronigro, E., Bianca, V. D., Piacentino, G., Marongiu, L., Budui, S., ... Constantin, G. (2015). Neutrophils promote Alzheimer’s disease–like pathology and cognitive decline via LFA-1 integrin. *Nature Medicine*, 21(8), 880–886. doi:10.1038/nm.3913
68. INNN, (2018). Enfermedad de Alzheimer. <http://www.innn.salud.gob.mx/interna/medica/padecimientos/alzheimer.html>
69. The Jackson Laboratory. <https://www.jax.org/strain/004807>