



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

IMPACTO DEL AMBIENTE ENRIQUECIDO SOBRE LA
CAPACIDAD COGNITIVA DEL MODELO MURINO DE LA
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER: EVALUACIÓN DEL ESTADO
DE ACTIVACIÓN DE LA MICROGLÍA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

KENYA PAOLA ROMERO BURGOS

D I R E C T O R A D E T E S I S:

DRA. LEONOR PÉREZ MARTÍNEZ





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Datos del jurado y sustentante

Alumna (Sustentante)

Kenya Paola Romero Burgos

Teléfono: 5543509851

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Carrera: Biología

No. de cuenta UNAM: 313050763

Tutora (Secretaria)

Dra. Leonor Pérez Martínez

Instituto de Biotecnología, UNAM

Sinodal 1 (Presidente)

Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade

Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Sinodal 2 (Vocal)

Dra. Cinthia Rocío Juárez Tapia

Facultad de Ciencias, UNAM

Sinodal 3 (Suplente 1)

Dra. Sara Frías Vázquez

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM / Instituto Nacional de Pediatría

Sinodal 4 (Suplente 2)

Dr. José Luis Puente García

Instituto de Biotecnología, UNAM

Datos del trabajo escrito

Romero Burgos K. P. (2022) *Impacto del ambiente enriquecido sobre la capacidad cognitiva del modelo murino de la enfermedad de Alzheimer: Evaluación del estado de activación de la microglía*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México 82p.

*A mis padres,
Ofelia Burgos y Juan Romero*

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Neuroinmunobiología del Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la UNAM bajo la tutoría de la Dra. Leonor Pérez Martínez. Este proyecto se realizó gracias al financiamiento otorgado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IN213119, IN217822 y IN211719) y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT IFC 2016 2282).

Agradecimientos académicos

- A la Dra. Leonor Pérez por brindarme la oportunidad de unirme al laboratorio y formar parte de su grupo de investigación. Por su mentoría, apoyo, paciencia, entusiasmo y sobre todo por ser un gran ejemplo a seguir. Gracias por su tutela, asesoría y retroalimentación a lo largo de la realización de mi formación académica y sobre todo gracias por ser un ejemplo de científica mexicana exitosa.
- Al Dr. Gustavo Pedraza por permitirme formar parte de su grupo de investigación y por su apoyo en la planificación y desarrollo del trabajo.
- Al Dr. David Valle por su mentoría, asesoramiento, enseñanza y acompañamiento en todos los experimentos realizados en este trabajo, sin su ayuda el trabajo no hubiera sido posible.
- A los miembros del NIB por siempre brindarme su apoyo, por enseñarme a estar por primera vez en un laboratorio y por su esencial retroalimentación durante los seminarios de grupo. Gracias a Elisa, Sol, Jorge, Bolívar y Uriel por su ayuda, por enseñarme protocolos, por ayudarme con mis dudas y por su paciencia
- A los técnicos Oswaldo y Tomás por su apoyo, asesoramiento y asistencia en el laboratorio.
- Al bioterio del IBt-UNAM. A la M.V.z. Maria Elena Elizabeth Mata Moreno y a la M.V.Z Graciela Cabeza por el apoyo en el trabajo con los ratones.
- Al Dr. José Luis Puente por su esfuerzo y dedicación en el mantenimiento del Taller que cada año forma una nueva generación de científicos, gracias por abrirnos las puertas y por apoyarnos.
- A los miembros del jurado por su asesoría y tiempo brindado para la lectura y corrección de la tesis.

Agradecimientos personales

A mis padres que siempre me han apoyado en todo y me han hecho creer que cualquier objetivo es alcanzable con la dedicación adecuada.

A mi mamá, Ofelia Burgos Mata, por impulsarme y apoyarme siempre a lo largo de mi camino y por apoyarme y aconsejarme en la toma de decisiones. Por estar en todo momento al pendiente

de mi seguridad y estabilidad, por enseñarme lo que es el amor y por ser siempre un ejemplo a seguir. Por ser una increíble persona, mujer, madre y amiga. A mi papá, Juan Romero Tenorio, por apoyarme siempre e impulsarme en cada paso que doy, por nunca limitarme y siempre educarme a partir de la equidad y del trabajo duro. Por enseñarme que nada es imposible, por ser un gran ejemplo a seguir y por siempre estar al pendiente de mi.

A mis abuelitos por siempre tenerme presente y por siempre preocuparse por mi bienestar. A mi abue Lupita por enseñarme lo que es la resiliencia, la fortaleza y el amor. A mis abuelitos Juana y Juan por procurarme y por siempre estar al pendiente de mi. Agradezco el amor en cada una de sus bendiciones.

A mi hermana Zaire, a todos mis tíos y tías por estar presentes en cada momento de mi vida y por siempre mantener a la familia unida. A mis tías Gaby, Jovita, Lupita, y Javier por celebrar cada logro y por acompañarme a lo largo de mi crecimiento.

A mis mejores amigas Sabi y Kari por su amistad incondicional, por su apoyo moral, por escucharme y por demostrarme que la distancia no importa, las amo mucho.

Gracias a los Tallerines y al Guajolocombo porque pasamos este proceso juntos, gracias por su amistad, por las risas y por el acompañamiento. Gracias Constanza, GAMA, Pablo I., Pablo O., Cesar, Razo, Armando, Dinorah, Lau, Cat, Aldo, Eira, Colu, Jime, Fer, Karen, Emi, Alan, Ana, Xai, por el apoyo, por amenizar nuestro paso por el IBT y por la tan necesaria dosis de alegría. Gracias en especial a Cony por ser una gran roomie, por tu compañía, por tu paciencia y apoyo, fue un placer que hayamos vivido juntas esta experiencia.

Gracias a Jorge Campano quien me apoyo e impulsó durante todo el proceso de titulación de Lic. que se sobrelapó con mi realización de la Maestría. Gracias por todo el amor, paciencia, apoyo y cariño.

Gracias a los miembros del laboratorio de Neuroinmunobiología por su disposición y en especial a Uriel por ser un increíble primer contacto con el mundo del laboratorio. Gracias a Karla y David ya que su llegada impulsó el desarrollo del proyecto. Gracias infinitas a David Valle-García por ser un increíble consejero, por ser un gran mentor científico, por su amistad, apoyo y por ser uno de los científicos y maestros que aspiro llegar a ser.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	9
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	10
I. RESUMEN	11
1. ABSTRACT.....	12
II. INTRODUCCIÓN	13
1. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.....	13
2. RESPUESTA INMUNE DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.....	15
3. MICROGLÍA.....	17
III. ANTECEDENTES	19
4. MICROGLÍA ASOCIADA A ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS.....	19
5. MODELOS MURINOS PARA EL ESTUDIO DE ALZHEIMER.....	21
6. AMBIENTE ENRIQUECIDO	23
i. <i>EL ambiente enriquecido en la enfermedad de Alzheimer</i>	25
IV. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	27
V. HIPÓTESIS	29
VI. OBJETIVOS.....	29
1. OBJETIVO GENERAL	29
2. OBJETIVOS PARTICULARES	29
VII. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	30
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
1. ANIMALES.....	32
2. CONDICIONES HABITACIONALES	33
3. PRUEBAS COGNITIVAS	34
I. <i>Prueba de objetos novedosos</i>	34
II. <i>Prueba de campo abierto</i>	37
III. <i>Laberinto acuático de morris</i>	38
IV. <i>Evaluación de la presencia de placas βA en los ratones 5xFAD</i>	40
V. <i>Prueba de alternancia espontánea</i>	40
VI. <i>Prueba de objetos novedosos en laberinto en Y</i>	41
VII. <i>Prueba de cierre de extremidades</i>	42
4. EXTRACCIÓN DE RNA Y RETROTRANSCRIPCIÓN (RT).....	42
5. ENSAYOS DE RETROTRANSCRIPCIÓN Y PCR EN TIEMPO REAL (RT-qPCR).....	43
I. <i>Diseño de oligos de DAM para RT-qPCR</i>	43
II. <i>Estandarización de curva de eficiencia de reacción</i>	45
IX. RESULTADOS.....	46
1. EVALUACIÓN DE LA MEMORIA Y APRENDIZAJE VISUAL Y ESPACIAL EN EL MODELO MURINO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER EN LA EDAD ADULTA	46
2. EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE PLACAS β A EN LOS RATONES 5xFAD	48
3. EL AMBIENTE ENRIQUECIDO RESCATA Y MEJORA LA MEMORIA ESPACIAL A CORTO Y LARGO PLAZO EN RATONES 5xFAD ENVEJECIDOS	48
4. EL AMBIENTE ENRIQUECIDO MEJORA LOS NIVELES DE ANSIEDAD EN RATONES WT Y EN EL MODELO 5xFAD ENVEJECIDOS	50
5. EL AMBIENTE ENRIQUECIDO REDUCE EL CIERRE DE EXTREMIDADES (<i>CLASPING</i>) EN EL MODELO MURINO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	53

6.	EL AMBIENTE ENRIQUECIDO INCREMENTA LA EXPRESIÓN DE MARCADORES MOLECULARES EN LA MICROGLÍA VINCULADOS AL FENOTIPO ASOCIADO A ENFERMEDAD (DAM)	54
X.	DISCUSIÓN	56
XI.	CONCLUSIONES	69
XII.	PERSPECTIVAS	69
XIII.	ANEXO	70
	<i>I. Metodología para la genotipificación</i>	70
	<i>II. Condiciones de RT-qPCR</i>	72
XIV.	REFERENCIAS	73

LISTA DE ABREVIATURAS

5xFAD.- Modelo murino con cinco mutaciones asociadas a la Enfermedad de Alzheimer familiar, del inglés *5x Familial Alzheimer's Disease*

AE.- Ambiente enriquecido

AN.- Ambiente normal

APP.- Precursor de la proteína amiloide, del inglés *Amyloid Precursor Protein*

ASC .- proteína de molécula adaptadora asociada a apoptosis tipo speck

BDNF.- Factor neurotrófico derivado del cerebro, del inglés *Brain Derived Neurotrophic Factor*

BHE .- Barrera hematoencefálica

CLRs .- Receptores de lectina tipo C

CRH.- Hormona liberadora de corticotropina, del inglés *Corticotropin releasing hormone*

CX3CL1.- Quimiocina C-X3-C ligando 1

CX3CR1.- Receptor de quimiocina Cx3C, del inglés *CX3C chemokine receptor 1*

DAM .- Microglía asociada a enfermedad, del inglés *Disease associated Microglia*

DAMPs.- Patrones moleculares asociados a daño, del inglés *Damage Associated Molecular Patterns*

EA.- Enfermedad de Alzheimer

EAF.- EA familiar

HIF-1a .- Factor 1-a inducible por hipoxia

IL 1-β.- Interleucina 1 beta

IL-10.- Interleucina 10

IL-17A .- Interleucina 17A

IL-4.- Interleucina 4

IL-6 .- Interleucina 6

INF-γ.- Interferón gamma

iNOS.- Óxido nítrico sintetasa inducible, del inglés *Inducible Nitric Oxide Synthase*

LAM.- Laberinto Acuático de Morris

LPS.- Lipopolisacáridos

LTM.- Lóbulo temporal medio

MCP.- Memoria de Corto Plazo

MLP.- Memoria de largo plazo

NFκB.- Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de células B activadas, del inglés *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

ONFs.- Ovillos neurofibrilares

OSVs.- Órganos sub-ventriculares

PAMPs.- Patrones moleculares asociados a patógenos, del inglés *Pattern Associated Molecular Patterns*

Pdb.- Pares de bases

PRRs .- Receptores de reconocimiento de patrones

rd-1.- degeneración retinal-1, del inglés *retinal degeneration-1*

RT.- Retrotranscripción

SNC.- Sistema Nervioso Central

βA.- β-amiloide

Thy1.- antígeno de diferenciación de timocitos de ratón 1 del inglés *Thymocyte differentiation antigen-1*

TLR.- Receptores tipo toll del inglés *Toll Like Receptors*

TNF-α .- Factor de necrosis tumoral alfa , del inglés *Tumor necrosis factor 1*

TREM2.- Receptor de activación expresado en células mieloides 2, del inglés *Triggering receptor expressed on myeloid cells 2*

TYROBP.- Proteína de unión a tirosina quinasa de proteína TYRO, del inglés *TYRO protein tyrosine kinase-binding protein*

βACE1.- β secretasa

μL.- Microlitros

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1 Modelo de los receptores especializados en detectar el daño neuronal (NAMPs).	19
Figura 2 Diseño experimental.	30
Figura 3 Estrategia experimental.	31
Figura 4 Genotipificación de <i>Psen 1</i> .	32
Figura 5 Genotipificación de <i>Pde6b</i> .	32
Figura 6 Imágenes representativas de las condiciones habitacionales.	33
Figura 7 Objetos novedosos para la prueba RON.	35
Figura 8 Fases de la prueba de RON.	35
Figura 9 Representación gráfica de la arena utilizada para la prueba de campo abierto.	37
Figura 10 Esquema del laberinto acuático de Morris.	38
Figura 11 Esquema de los sitios de corte del cerebro de ratón.	40
Figura 12 Representación gráfica de la medición de la alternancia espontánea.	41
Figura 13 Escala utilizada para evaluar el grado de cierre de extremidades.	42
Figura 14 Diseño de oligos para la amplificación de genes DAM por medio de RT-qPCR.	44
Figura 15 Amplificación de los productos de oligos DAM para la curva de calibración.	45
Figura 16 Memoria de reconocimiento a corto y largo plazo.	46
Figura 17 Memoria y aprendizaje en la prueba de laberinto acuático de Morris.	47
Figura 18 Micrografías representativas de tinción con tioflavina.	48
Figura 19 Memoria espacial en ratones silvestres y 5xFAD de 12 meses de edad expuestos a distintas condiciones habitacionales.	49
Figura 20 Prueba de alternancia espontánea.	50
Figura 21 Evaluación de la distancia recorrida y velocidad media en la prueba de campo abierto a los 6 y 12 meses en ratones expuestos a diferentes ambientes.	51
Figura 22 Evaluación de los niveles de ansiedad en los ratones wt y 5xfad de 12 meses expuestos a diferentes ambientes.	52
Figura 23 Efecto del ambiente enriquecido sobre el cierre de extremidades (<i>clasp</i>) en ratones.	53
Figura 24 Expresión de marcadores moleculares en la microglía DAM.	54
Figura 26 Programación del termociclador para la genotipificación.	70
Figura 27 Gel de poliacrilamida para validar la expresión de <i>APP</i> humano.	71
Figura 28 Programación del termociclador para la expresión de <i>APP</i> .	71
Figura 29 Condiciones de amplificación para qPCR.	72
Tabla 1 Mezcla de reacción para PCR punto final.	70
Tabla 2 Secuencia de oligos <i>Pde6B</i> .	70
Tabla 3 Secuencia de oligos <i>Psen1</i> (5xFAD).	70
Tabla 4 Mezcla de reacción para PCR punto final.	71
Tabla 5 Secuencia de oligos para <i>APP</i> .	71
Tabla 6 Secuencia de los oligos para DAM.	72

I. RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer es la principal causa de demencia a nivel mundial. Esta enfermedad es un desorden neurodegenerativo caracterizado por la pérdida de la memoria y funciones cognitivas. La microglía, el macrófago residente en el sistema nervioso central, es una célula muy dinámica que se encarga de monitorear el ambiente y regular la homeostasis cerebral a través de desplegar cambios en su metabolismo y morfología. Estudios recientes han demostrado que la microglía desencadena una respuesta neuroinflamatoria que tiene efectos tanto benéficos como perjudiciales en el curso del desarrollo y progresión de la enfermedad.

El análisis transcripcional de célula única de la microglía ha logrado identificar distintas subpoblaciones microgliales bajo condiciones de neurodegeneración. El perfil transcripcional de la microglía asociada a la enfermedad (DAM por sus siglas en inglés) desencadenado por la enfermedad Alzheimer se caracteriza por una regulación negativa en la expresión de genes homeostáticos en una primera etapa, seguida de un incremento en los genes asociados a factores antiinflamatorios en la segunda. Esta segunda etapa de DAM, conocida como DAM2, se asocia a la expresión de *Trem2* y se caracteriza por un despliegue de funciones protectoras por parte de la microglía, como son el incremento en la fagocitosis y el incremento en el metabolismo lisosomal y lipídico. Sin embargo, esta suele darse en etapas tardías de la enfermedad, en donde ya no es posible contener el daño y el perfil inflamatorio microglial contribuye con el daño.

Se ha reportado previamente que el paradigma del ambiente enriquecido retrasa el deterioro cognitivo en modelos murinos de la enfermedad de Alzheimer, incrementa la neurogénesis en el nivel del hipotálamo y disminuye los marcadores inflamatorios a nivel de Sistema Nervioso Central. Sin embargo, se conoce poco acerca del mecanismo molecular a través del cual lo logra. En el presente estudio se evaluó la capacidad del paradigma del ambiente enriquecido de modular el perfil transcripcional de la microglía DAM. Validamos la capacidad del ambiente enriquecido para mejorar la memoria y aprendizaje en ratones modelo de la enfermedad de Alzheimer 5xFAD envejecidos. De forma interesante, encontramos que este retraso en el deterioro de las capacidades cognitivas se correlaciona con una modulación en la expresión de marcadores genéticos asociados con DAM2.

Observamos que el ambiente enriquecido logra acelerar la transición hacia el fenotipo DAM2 a través de incrementar la expresión de los genes *Trem2* y *Tyrobp* y disminuir la expresión de *Cx3cr1*, evaluado a través de RT-qPCR. En este estudio se demuestra que el perfil asociado a DAM2 es neuroprotector cuando ocurre a tiempo. De igual forma, se observó que la transición hacia DAM2 propiciada por el ambiente enriquecido promueve el retraso en el desarrollo de la enfermedad, así como una mejora cognitiva en memoria, aprendizaje, capacidad motriz y conductas de ansiedad en el ratón modelo de la enfermedad de Alzheimer. Estas observaciones proponen al ambiente enriquecido como una posible estrategia preventiva para retrasar la aparición del deterioro cognitivo asociado a la enfermedad de Alzheimer.

1. ABSTRACT

Alzheimer's disease is the leading cause of dementia worldwide. This disease is a progressive neurodegenerative disorder characterized by loss of memory and cognitive functions. Microglia, the resident macrophage in the central nervous system, is a highly dynamic cell that oversees monitoring the environment and regulating brain homeostasis through changes in its metabolism and morphology. Recent studies have shown that microglia unleash a neuroinflammatory response that has both beneficial and detrimental effects on the course of disease development and progression. Single Cell Transcriptional analysis of microglia has succeeded in identifying different microglial subpopulations under neurodegenerative conditions. The transcriptional profile of disease-associated microglia (DAM) triggered in Alzheimer's disease is characterized by a negative regulation in the expression of homeostatic genes in the first stage, followed by an increase in genes associated with pro-inflammatory factors in the second stage. This second stage of DAM, known as DAM2, is associated with the expression of *Trem2* and is characterized by a display of protective functions by the microglia, such as an increase in phagocytosis and in lysosomal and lipid metabolism. However, this usually occurs in late stages of the disease when it is no longer possible to cope with the damage and the microglial profile becomes detrimental.

Alzheimer's disease is the leading cause of dementia worldwide. This disease is a progressive neurodegenerative disorder characterized by loss of memory and cognitive functions. Microglia, the resident macrophage in the central nervous system, is a very dynamic cell that oversees monitoring the environment and regulating brain homeostasis through changes in its metabolism and morphology. Recent studies have shown that microglia unleash a neuroinflammatory response that has both beneficial and detrimental effects on the course of disease development and progression. Single Cell Transcriptional analysis of microglia has succeeded in identifying different microglial subpopulations under neurodegenerative conditions. The transcriptional profile of disease-associated microglia (DAM) triggered in Alzheimer's disease is characterized by a negative regulation in the expression of homeostatic genes in the first stage, followed by an increase in genes associated with pro-inflammatory factors in the second stage. This second stage of DAM, known as DAM2, is associated with the expression of *Trem2* and is characterized by a display of protective functions by the microglia, such as an increase in phagocytosis and an increase in lysosomal and lipid metabolism. However, this usually occurs in late stages of the disease, where it is no longer possible to cope with the damage and the microglial profile becomes detrimental.

The enriched environment has previously been reported to delay cognitive decline in murine models of Alzheimer's disease, increase neurogenesis at the level of the hypothalamus, and decrease inflammatory markers at the level of the Central Nervous System. However, little is known about the molecular mechanism through which it achieves this. In the present study, the capacity of the enriched environment paradigm to modulate the activation state of DAM was evaluated. We validated the ability of the enriched environment to improve learning and memory in aged Alzheimer's disease (5xFAD) model mice. Interestingly, we found that this delay in the deterioration of cognitive abilities correlates with a modulation in the expression of genetic markers associated with the second stage of DAM.

We observed that the enriched environment accelerates the transition towards the DAM2 phenotype by increasing the expression of the *Trem2* and *Tyrobp* genes and decreasing the expression of *Cx3cr1*. This study shows that the profile associated with the second stage of DAM is neuroprotective when it occurs on time. Similarly, it was observed that the transition to DAM2 given by the enriched environment promotes the delay in the development of the disease, as well as a cognitive improvement in memory, learning, motor capacity and anxiety behaviors in a mouse model of Alzheimer's disease. These observations propose the enriched environment as a possible preventive strategy to delay the onset of cognitive decline associated with Alzheimer's disease.

II. INTRODUCCIÓN

1. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la enfermedad neurodegenerativa más común asociada con la edad. Esta se caracteriza patológicamente por la acumulación extracelular de placas de péptido β -amiloide (β A), por la acumulación intracelular de ovillos neurofibrilares (ONFs) y por la pérdida tanto sináptica como neuronal. Todo esto tiene como consecuencia un deterioro progresivo de las capacidades neurológicas que pueden llevar al desarrollo de demencia (Masters et al., 2015). A pesar de que la demencia se asocia con más de 70 causas distintas de disfunción cerebral, la EA representa el origen de alrededor de la mitad de los casos (Bondi et al., 2017) lo que hace de la enfermedad la causa más frecuente de demencia.

El péptido β A deriva de la escisión secuencial del precursor de la proteína amiloide (APP) por medio de la enzima β secretasa (β ACE1) y γ -secretasa en los extremos amino y carboxilo, respectivamente. Se libera en el espacio extracelular APP soluble y péptido β A, y en el citoplasma, el dominio amiloide intracelular (Dunham et al., 2012). La deposición de placas β A representa el primer mecanismo de desarrollo de la enfermedad y este puede influir en otro sello patológico, la acumulación de ONFs. Los ONFs son producto de la hiperfosforilación de las proteínas tau que, de forma normal, estabilizan a los microtúbulos principalmente en neuronas. La hiperfosforilación promueve el autoensamblaje de la proteína tau, lo cual lleva a la desestabilización de los microtúbulos y a la formación de ovillos que pueden producir degeneración neuronal desde el interior de las células. Se ha observado que la activación de la microglía induce la deposición de ovillos a través de la activación de IL-1 β y transducción de señal vía p38 (Heneka, Golenbock, et al., 2015)

Mutaciones en los genes *APP*, *PSEN1* y *PSEN2* llevan a un desarrollo temprano de la enfermedad (<65 años) conocido como EA familiar (EAF), el cual representa cerca del 5% de los casos. Sin embargo, el 95% de las personas que desarrollan la enfermedad presentan síntomas después de los 65 años. A esta variante se le conoce como EA de desarrollo tardío (LOAD por sus siglas en inglés). Si bien en esta última también se han observado factores genéticos que contribuyen al desarrollo de la patología como mutaciones en *TREM2* y polimorfismos como $\epsilon 4$ y $\epsilon 2$ en el gen *APOE*, su patrón heredable es complejo. En estos casos los factores genéticos se suman a factores ambientales como una pobre salud oral, obesidad, infecciones sistémicas inflamatorias, lesiones cerebrales y actividad física reducida. Aunque en

los últimos años se ha determinado que la enfermedad es de origen multifactorial, un factor común en todos los casos es el desarrollo de un proceso inflamatorio (Heneka, Carson, et al., 2015).

La característica más común de la EA es un declive significativo en la memoria, ya que la información recientemente adquirida no se logra almacenar y concretar en memoria de largo plazo, debido tanto a la pérdida rápida de material de almacenamiento de corto plazo (probablemente debido a la deficiencia de codificación neuronal) como a la dificultad de transferir información entre los sistemas de corto y largo plazo. El grado de la patología de EA se correlaciona directamente con el desempeño en pruebas cognitivas. Sin embargo, se ha observado que el proceso patofisiológico puede comenzar hasta 10 años antes de que se manifieste la etapa clínica de demencia (Masters et al., 2015). La discapacidad en la memoria episódica (amnesia) es uno de los primeros síntomas clínicos ya que la patología temprana se presenta en las estructuras del lóbulo temporal medial (LTM) como el hipocampo y el córtex entorrinal, esenciales para la memoria episódica.

Conforme la EA se propaga más allá de las estructuras de LTM a zonas del córtex adyacentes como el córtex temporal, parietal y frontal, otras habilidades cognitivas se ven afectadas. Se puede observar déficit en la correcta comunicación, fluidez verbal y amnesia retrógrada. Por otro lado, los pacientes con demencia subcortical o demencia frontotemporal mantienen el conocimiento semántico de forma adecuada, pero presentan un daño en el sistema de recuperación de los almacenes de memoria semántica. Aunado a la disminución en codificación semántica existen errores de intrusión e incluso déficits en el lenguaje (p.ej. afasia) (Bondi et al., 2017).

La acumulación de la patología en regiones relacionadas con función motriz en el cerebro puede contribuir a una pérdida en la función motora. Se ha sugerido que el péptido β A y sus precursores se pueden encontrar anormalmente presentes en cuerpos de inclusión en fibras musculares y se sabe que la patología en sistemas cognitivos puede afectar las funciones motoras a través del deterioro de sistemas neuronales que juegan papeles esenciales en la planeación y ejecución de movimientos. La patofisiología se puede observar en regiones como corteza motora primaria y suplementaria, estriado, sustancia negra y corteza motora, por tanto esta compromete no solo la capacidad cognitiva sino también la capacidad motriz (Buchman & Bennett, 2011).

La progresión de la patología y la expresión clínica pueden ser discontinuas, la patología comienza a desarrollarse muchos años antes de que comience la sintomatología. La reserva cognitiva se refiere a las sinapsis adicionales o a un número incrementado de redes

neuronales redundantes. Por tanto, si las redes neuronales o sinapsis sufren algún daño se mantiene la capacidad de sostener la disrupción y se logra operar de forma efectiva. La reserva cognitiva parece derivar de factores tanto ambientales como genéticos, ya que se observa que niveles bajos de actividad física y salud mental deteriorada se asocian con el declive cognitivo y desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Stern, 2002).

2. RESPUESTA INMUNE DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

El sistema nervioso central (SNC) es una red que se compone de más de 100 mil millones de células nerviosas formando el cerebro, la médula espinal y la retina (Mino et al., 2012). El SNC – responsable de la cognición, el movimiento, los sentidos y las emociones – se encuentra protegido por la barrera hematoencefálica (BHE). Desde hace un par de décadas se sabe que el cerebro no es un órgano inmunoprivilegiado y que la respuesta inmune no se desencadena solamente por una infección directa o por perturbaciones en la BHE (Ristori et al., 2020).

El sistema inmune se encarga de proteger al organismo de invasores dañinos, químicos tóxicos, desechos celulares e incluso del desarrollo de cáncer. Junto con el SNC, el sistema inmune es de los sistemas más complejos en el cuerpo humano ya que provee una defensa dinámica, altamente versátil y en muchos casos específica, gracias a que comprende una gran variedad de tejidos, órganos y tipos celulares que interactúan en conjunto. El cerebro tiene su propio sistema inmune innato formado por microglía, astrocitos y mastocitos, pero también tiene la capacidad de reclutar a través de los órganos sub ventriculares (OSVs), áreas abiertas de la BHE, distintas células inmunes periféricas como macrófagos, eosinófilos y linfocitos para poder contender el daño (Blaylock, 2013; Mino et al., 2012).

La permeabilidad de la BHE puede ser alterada por diversos factores que incluyen moléculas inflamatorias tales como interleucina 1 β (IL-1 β), factor de necrosis tumoral alpha (TNF- α), motivo C-C ligando receptor 2 de quimiocina (CCL2) e interleucina 17A (IL-17A). TNF- α promueve la internalización de uniones adherentes (como claudina-5, ocludina y zona ocludens-1) en células endoteliales a través de la regulación positiva del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células β activadas (NF- κ B). De forma similar, IL-1 β promueve la degradación de las proteínas de uniones estrechas a través de la expresión del factor 1-a inducible por hipoxia (HIF-1a) (Wesselingh et al., 2019).

Una vía importante para la activación de células inmunes y la regulación del proceso inflamatorio es mediada por los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) que estas

células expresan en su superficie. La familia de los PRRs se conforma por cuatro tipos de receptores: los receptores tipo Toll (TLRs), los receptores de lectina tipo C (CLRs), los receptores citoplasmáticos tipo NOD (NLRs) y los receptores tipo RIG (RLRs). Todos los receptores anteriormente mencionados reconocen patrones conservados que pueden ser dañinos para el organismo, de tal forma que los lipopolisacáridos (LPS) y toxinas ambientales pueden actuar como patrones moleculares asociados a patógeno (PAMP's) y las moléculas nativas, por ejemplo ATP, como patrones moleculares asociados a daño (DAMPs). La activación resultante de varias cascadas de señalización intracelulares lleva a la producción y secreción de citocinas proinflamatorias (Blaylock, 2013).

El sistema inmune innato juega un papel esencial en el reconocimiento y eliminación de PAMPs y DAMPs por medio de PRRs. Los NLRs que pertenecen a los receptores tipo NOD tienen la capacidad de detectar componentes microbianos, estrés endógeno y señales de daño en el ambiente intracelular, lo que induce el ensamblaje de una plataforma de señal multiproteica llamada inflamasoma (Tan et al., 2013). El inflamasoma es un componente clave en la correcta homeostasis citosólica y ha sido caracterizada en una variedad de células; su ensamblaje sirve como una plataforma de activación para las caspasas inflamatorias 1 y 11. La activación de la caspasa-1 en el inflamasoma promueve la secreción de citocinas pro inflamatorias como IL-1 β e IL-18 que tienen la capacidad de mediar respuestas inmunes locales y sistémicas. Se ha demostrado que los péptidos β A tienen la capacidad de activar el inflamasoma NLRP3 compuesto de NLRP3, la proteína de molécula adaptadora asociada a apoptosis tipo speck (ASC) –que contiene un dominio CARD (dominio de reclutamiento de caspasa)– y la cistein proteasa de caspasa 1. El dominio N-terminal de NLRP3 permite interacciones homotípicas con el adaptador bipartita ASC que recluta procaspasa-1 a través de interacciones CARD-CARD. El reclutamiento de procaspasa-1 causa oligomerización y autocatálisis de la caspasa-1, resultando en la liberación de fragmentos de caspasa-1 activa y en el procesamiento del precursor de IL-1 β en su forma biológicamente activa. La activación de este inflamasoma se ha implicado en señales de infección, daño de tejido y desregulación metabólica, así como de señales de daño endógenas como ATP extracelular, hialuronano, fibrillas de β A y cristales de ácido úrico. La activación del inflamasoma se da en dos pasos, se requiere de la activación con TLRs y NLRs para promover la transcripción mediada por NF- κ B de *NLRP3*, y de la subsecuente exposición a toxinas bacterianas, DAMPs o sustancias cristalinas que llevan a el ensamblaje del inflamasoma NLRP3 (Tan et al., 2013).

Tanto las neuronas como las células endoteliales y de la glía (microglía, oligodendrocitos, astrocitos) son capaces de contender el daño a través de la activación de la

respuesta inmune ya que presentan PRRs (Heneka, Golenbock, et al., 2015). Sin embargo, de todas estas, la microglía es quien juega un papel esencial. Esta tiene actividades como presentación de antígenos, fagocitosis, quimiotaxis y producción de citocinas. La microglía, al ser la célula inmune residente del SNC, se encuentra constantemente censando el medio para detectar cualquier perturbación en la homeostasis que pueda indicar daño o amenaza al SNC (Hanisch & Kettenmann, 2007).

3. MICROGLÍA

La microglía representa entre el 5-10% de todas las células del cerebro y son los únicos macrófagos del parénquima cerebral. Se diferencia de los macrófagos del SNC que se encuentran en las meninges, *choroid plexus* y espacio perivascular, por presentar niveles bajos de Cd45 y de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II (Aguzzi et al., 2013). Cd45 es una tirosina fosfatasa de membrana que modula la función de las células hematopoyéticas, es crucial para el desarrollo de linfocitos y la señalización antigénica. Las moléculas de MHC-II son expresadas constitutivamente por las células presentadoras de antígenos, la microglía las expresa en un estado estacionario bajo, sin embargo, su expresión se incrementa ante la activación de la microglía en un contexto patológico (Cosenza-Nashat et al., 2006; Wolf et al., 2018).

La microglía deriva del tejido mesodermal periférico que proviene del saco vitelino. Se genera a partir de precursores eritro-mieloides del saco vitelino (EMPs) que dan lugar a macrófagos, los precursores migratorios inmediatos que surgen antes del día embrionario 8 en ratón (E8.0). Estos macrófagos primitivos migran al tubo neural en desarrollo, en donde dan lugar a la microglía (Ginhoux et al., 2010). La maduración de la microglía requiere de factores de transcripción linaje específicos como *Irf8* y *Sall1* junto con señales tanto del SNC como de la microbiota. La confluencia de estos factores lleva a una firma transcripcional única que incluye genes que codifican para receptores de superficie como *P2ry12*, *Tmem119* y *Trem2*, aunado a receptores codificados por los macrófagos de tejido *Cx3cr1*, *Mer* y *Fcgr1* (Song & Colonna, 2018).

Las células de la microglía tienen la capacidad de responder a cualquier insulto que se presente en el parénquima cerebral, ya sea a la presencia de algún agente externo (causado por agentes infecciosos como virus o bacterias) o a la sobreproducción de proteínas y desechos celulares (agentes endógenos). La célula responde cambiando su morfología y perfil transcripcional para poder eliminar dicho insulto, a esto se le conoce como activación de la

microglía. Si bien esta ha sido ampliamente estudiada, cabe destacar que no se debe considerar esta activación como un evento dual de todo o nada, ya que depende más bien del contexto, del tipo de insulto, la duración de este y del microambiente (Aguzzi et al., 2013; Deczkowska, Amit, et al., 2018).

La microglía del SNC saludable se asocia a un fenotipo antes denominado en “reposo” sin embargo, se sabe bien que este no es estático, sino más bien homeostático. Esta microglía presenta un fenotipo altamente arborizado y móvil, los procesos se construyen constantemente para percibir el ambiente sin dañar las estructuras neuronales. Cuando se reciben señales de daño esta exploración aleatoria se detiene y se desencadena una respuesta inmune que permite un movimiento dirigido hacia el sitio de lesión. La reorientación quimiotáctica y otros ajustes no transcripcionales pueden ocurrir en minutos o segundos tras la aparición repentina de factores extraños o al incremento crítico en la concentración de factores endógenos u otros factores en formas anormales (como estructuras microbianas, complejos inmunoglobulina-antígeno o agregados), los cuales son reconocidos por TLRs (Hanisch & Kettenmann, 2007).

Sin embargo, no todas las respuestas de la microglía son dependientes de receptores. La actividad inmunitaria de la microglía se encuentra restringida por vías inhibitorias inmunitarias específicas que suprimen las respuestas inflamatorias no deseadas y la destrucción de tejidos que a menudo se asocian con la activación inmunitaria. Estos mecanismos de control incluyen interacciones inhibitorias directas de la microglía con las neuronas a través de los pares receptor-ligando CX3CL1-CX3CR1 y CD200-CD200R, moléculas solubles presentes en el medio del SNC (por ejemplo, factor de crecimiento transformante β [TGF- β]) y reguladores intracelulares tales como el factor de transcripción MAFB. Cuando alguna de estas interacciones se ve alterada se desencadena la activación de la microglía (Deczkowska, Amit, et al., 2018).

En respuesta a los péptidos β A, la microglía a través de la activación TLR induce la expresión de citocinas proinflamatorias como TNF- α e IL-6 y a través de la activación del inflammasoma NLRP3 produce IL-1 β que promueve la producción de TNF- α . Lo anterior favorece el ambiente inflamatorio que compromete la función neuronal y eventualmente contribuye a la pérdida de memoria (Álvarez-Arellano et al., 2018).

En enfermedades neurológicas, se cree que la microglía pierde la capacidad de regresar a un estado homeostático e incluso contribuye al daño. Se ha observado que la activación a corto plazo de la microglía promueve la reparación del tejido, sin embargo, si esta activación se convierte en crónica, como en el caso de la EA, puede llevar a procesos neurotóxicos que contribuyan a la patogénesis de la enfermedad (Lee et al., 2018).

III. ANTECEDENTES

4. MICROGLÍA ASOCIADA A ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS.

Durante muchos años, la limitación metodológica en el análisis de la microglía había llevado a la falsa concepción de que la microglía es una población homogénea. Sin embargo, recientemente Karen-Shaul y colaboradores (2017) descubrieron, a través de análisis de RNA célula única, una población de microglía que despliega un perfil transcripcional y funcional único, presente en enfermedades neurodegenerativas, conocida como DAM. Esto ocurre de forma análoga al reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o a daño (DAMPs), es decir, la microglía expresa constitutivamente receptores que desencadenan la transición de un estado de microglía homeostática a DAM, al detectar perturbaciones en la comunicación neuronal o moléculas de daño tales como cuerpos apoptóticos, desechos celulares de mielina, productos de degradación lipídicos o péptidos β A (**Figura 1**) conocidos como patrones moleculares asociados a neurodegeneración (NAMPs por sus siglas en inglés) (Keren-Shaul et al., 2017).

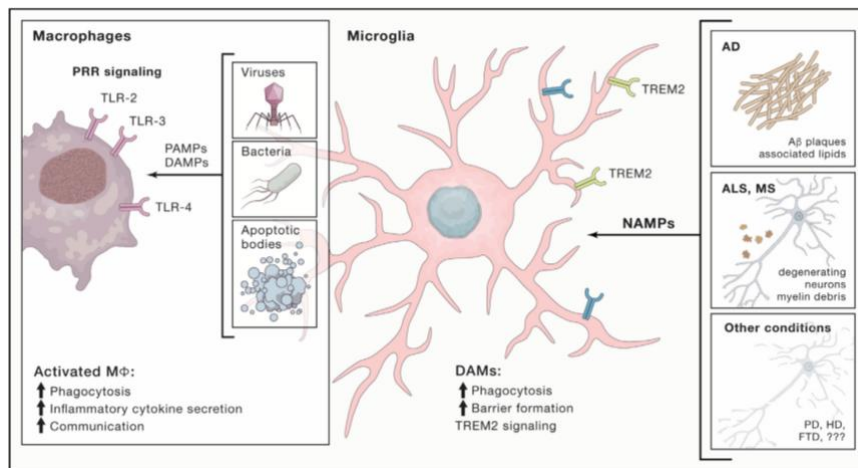


Figura 1 | Modelo de los receptores especializados en detectar el daño neuronal (NAMPs). La microglía tiene la capacidad de sentir daño neuronal a través de receptores específicos que pueden detectar DAMPs. Existen señales de daño que se comparten entre distintas enfermedades neurodegenerativas, cuando activan a los receptores de la microglía, se desencadena la transición hacia el fenotipo DAM cuya principal función es contener y remover el daño. Modificado de Karen-Shaul et al., 2018.

Las investigaciones en torno a la microglía le han asociado roles duales en la EA, tanto funciones proinflamatorias, que promueven neurotoxicidad y acumulación de placas β A, como funciones neuroprotectoras y de eliminación de placas β A. Sin embargo, el descubrimiento de la microglía DAM sugiere que la microglía homeostática gradualmente adopta un fenotipo fagocítico DAM en enfermedades neurodegenerativas, en estados de neuroinflamación crónica y en el envejecimiento avanzado (Konishi & Kiyama, 2018).

La microglía DAM se genera a través de una activación progresiva de dos pasos en donde la microglía homeostática transiciona a una etapa intermedia (conocida como etapa 1 de DAM o DAM1) de forma independiente de Trem2, que involucra una reducción crítica de la expresión de genes homeostáticos (e.g. *Cx3cr1* y *P2ry12*) junto con una regulación positiva de genes asociados a la progresión de EA (e.g. *Apoe*, *B2m*) seguida por una segunda transición dependiente de Trem2 (conocida como etapa 2 de DAM o DAM2) (Keren-Shaul et al., 2017).

La microglía DAM2 presenta un fenotipo protector, es decir, expresa altos niveles de genes involucrados en vías fagocíticas, metabolismo de lípidos, y lisosomales, incluyendo la expresión de genes que han sido catalogados como factores de riesgo para la EA gracias a estudios de asociación de genoma completo tales como *Apoe*, *Ctsd*, *Lpl*, *Tyrobp* y *Trem2* y participa en la supresión de respuesta inflamatoria por medio de la inhibición de la expresión de citocinas pro-inflamatorias (Butovsky & Weiner, 2018)

Sin embargo en enfermedades neurodegenerativas, aparentemente la transición de microglía homeostática a DAM se da en un momento tardío, tal que es insuficiente para contener el daño haciendo irreversible a la patología. Trem2 es una proteína mieloide involucrada en la supervivencia y proliferación microglial que regula un punto de control necesario para la transición a DAM. La eliminación de Trem2 previene la acumulación de microglía alrededor de las placas β A y conduce a un daño neurítico adicional. Lo anterior enfatiza la complejidad de la función de la microglía y apoya la existencia de diferentes estados proinflamatorios funcionales en DAM (Deczkowska, et al., 2018; Rangaraju et al., 2018).

La transición de la microglía homeostática hacia DAM1 no necesita de Trem2, y los factores que median esta transición son poco claros. Sin embargo, se observa que esta señal, independiente de Trem2, inicia una regulación negativa de genes de la microglía homeostática como *Cx3cr1* y *P2ry12* y se asocia con una regulación positiva de los reguladores o adaptadores de Trem2 como *Tyrobp* y *Apoe*. Por otro lado, la transición a DAM2 cuya señalización es dependiente de Trem2, conlleva a un incremento de la expresión de vías lisosomales, fagocíticas y de metabolismo de lípidos como *Lpl*, *Cst7* y *Axl* (Keren-Shaul et al., 2017).

5. MODELOS MURINOS PARA EL ESTUDIO DE ALZHEIMER

La compleja etiología y patología de la enfermedad implican un reto importante en el desarrollo y en la elección de un modelo animal adecuado para su estudio. Actualmente no hay un modelo que logre recapitular todos los aspectos patológicos y conductuales de la enfermedad. Como ya se mencionó anteriormente, adicional a la presencia de placas β A y deposición de ONFs, durante el desarrollo de la EA hay un incremento significativo de la inflamación de la microglía y de los astrocitos, acompañado de pérdida sináptica y neuronal. La pérdida de memoria se da de forma paulatina, la memoria episódica empieza a decaer en una etapa preclínica de EA y puede progresar a una pérdida de memoria semántica seguida de deterioro de la función ejecutiva.

El requerimiento de los modelos es que reproduzcan, de la forma más fiel posible, la patofisiología humana. Los avances en la ingeniería genética han permitido la generación de animales transgénicos que junto con el descubrimiento de las mutaciones en EAF y su correlación con el desarrollo de las placas β A llevaron al desarrollo de modelos murinos de la EA. Los roedores a pesar de generar péptidos β A lo hacen en concentraciones en el rango de picomolar, comparado con los humanos que lo generan en rangos de nanomolar, por ende los roedores de forma natural no desarrollan EA. Aunado a lo anterior, el β A de los roedores difiere de β A de humano por tres sustituciones (R6G, Y10F y H13R) que previenen la agregación amiloide, por ende es necesaria la introducción de genes asociados a EAF humanos en los ratones. La recombinación homóloga entre el gen endógeno y el vector (que contiene una versión modificada del gen) permite la integración de la modificación bajo un promotor nativo; los ratones más usados, son aquellos con mutaciones en los genes de *APP* y *PSENI* humanos (Esquerda-Canals et al., 2017).

Existen distintas isoformas de *APP* debido al splicing alternativo que ocurre sobre el gen (cerca de 67, de las cuales 51 se han identificado como patogénicas). Las más comunes son *APP 696*, *APP 751* y *APP 770*. Se categorizan de acuerdo con la proximidad relativa al sitio de escisión por BACE1 o al complejo γ secretasa/presenilina. La mutación *Swedish* (K670N/M671L) es una doble mutación ubicada en el sitio de escisión de BACE1 que conduce a niveles aumentados de producción de $A\beta$. Las mutaciones de *London* (V717I), *Indiana* (V717F) y *Florida* (I716V) ocurren cerca del sitio de escisión de la γ -secretasa y dan como resultado una proporción aumentada de $A\beta_{42}:A\beta_{40}$ en lugar de un aumento en los niveles generales de $A\beta$ (Myers & McGonigle, 2019a)

Los modelos murinos que solo tienen mutaciones en *APP* no han logrado recapitular la patología, por lo que se desarrollaron modelos con mutaciones en *PSEN1*. De las 230 mutaciones identificadas en *PSEN1*, 219 son patógenas, entre ellas *M146V*, *M146L*, *L286V* y *delta E9* desencadenan una proporción aumentada de A β 42:A β 40. Las mutaciones en *PSEN1* conducen a la desestabilización del complejo γ -secretasa; sin embargo, por sí solas no resultan en la deposición de las placas β A, por lo que se han generado dobles transgénicos con mutaciones tanto en *APP* como en *PSEN1*. Los cuales exhiben formación de placas β A y pérdida neuronal y sináptica, aunque la edad de desarrollo tiende a variar dependiendo del tipo de mutación, la cepa y el promotor (Amram & Frenkel, 2017).

Para acelerar el desarrollo de las placas β A e investigar los efectos de niveles cerebrales muy altos de A β 42, se generaron los ratones 5xFAD. Los ratones transgénicos *APP/PS1* coexpresan cinco mutaciones y han demostrado un aumento significativo en la producción – casi exclusiva– de A β 42. Este modelo combina las mutaciones en *APP* K670N/M671L (*Swedish*) + I716V (*Florida*) + V717I (*London*) y en *PSEN1* (M146L+ L286V) bajo el promotor neuronal específico *Thy1* (antígeno de diferenciación de timocitos de ratón 1) (Oakley et al., 2006). La acumulación del péptido β A en este modelo comienza desde las 6 semanas de edad y la formación de placas β A se observa desde los 2 meses de edad. A pesar del desarrollo temprano de las placas β A, este modelo, al igual que los modelos *APP*, no presenta formación de ONFs aunque sí presenta gliosis y pérdida sináptica y neuronal (Myers & McGonigle, 2019b).

Aunado a la temprana deposición de placas β A, este modelo tiene la ventaja de presentar disminución —dependiente de la edad— de los marcadores sinápticos como sinaptofisina, syntaxina y densidad postsináptica-95. En estos cerebros se ha observado un incremento significativo de la quinasa 5 dependiente de ciclina (Cdk5) y p25, a los 9 meses de edad. En concordancia con estudios previos (Oakley et al., 2006), en el laboratorio se ha reportado presencia de placas β A desde los 3 meses y disminución en la capacidad cognitiva a los 6 meses de edad (Álvarez-Arellano et al., 2018)

Cuando los ratones adultos son tomados por la cola y se les desciende lentamente, tienden a extender sus extremidades en anticipación al contacto con la superficie. Ratones mutantes con patologías en varias regiones del cerebro y en la espina dorsal, presentan en su lugar una respuesta de flexión. El mecanismo que subyace a esta respuesta incluye las vías cerebelo-cortico-reticular y cortico-estriado-pálido-reticular, por lo que con esta prueba se puede medir el grado de neurodegeneración asociado a la enfermedad de Alzheimer (Lalonde & Strazielle, 2011a). Se ha reportado que los modelos de la EA también presentan cierre de

extremidades y cierre de patas (clasping) anormales resultado de un incremento en la deposición de las placas β A parenquimales y neuropatología axonal tanto en cerebro como en médula espinal (Lalonde et al., 2012)

Aunque este modelo presenta la desventaja de no desarrollar anomalías en la proteína Tau y por ende no presentar deposición de ONFs, es importante recalcar que sí logra el desarrollo de la enfermedad en tiempos más cortos, recapitulando las principales características de la enfermedad, desde la parte fisiológica con la deposición de β A, disfunción neuronal y amiloidosis hasta el deterioro en la memoria y aprendizaje.

Por otro lado, es importante considerar la influencia del fondo genético de la cepa del ratón que se use para mantener el modelo de la EA. Se sabe que muchas cepas de fondo comúnmente utilizadas en modelos de ratón con EA de fondo mixto (C3H, CBA, FVB/N y SJL) albergan el alelo *rd-1* (degeneración retinal 1) en el gen *Pde6b* (subunidad β de la fosfodiesterasa cíclica específica de rod GMPc). Los ratones que tienen el alelo *Pde6^{brd-1}* están sujetos a degeneración retinal y pueden perder la vista entre las 6 y 8 semanas de edad. El producto de *Pde6b* contribuye al complejo de fosfodiesterasa heterotetramérica (PDE, $\alpha\beta\gamma_2$), que regula los niveles de GMPc citoplasmáticos en los fotorreceptores de bastón en respuesta a la luz. Después de la estimulación con luz, el PDE se activa mediante la eliminación de las subunidades inhibitorias de γ , lo que da como resultado una disminución en los niveles de GMPc e hiperpolarización del bastón. En ratones con la mutación *rd1* persisten niveles elevados de GMPc debido a una mutación nula homocigótica en el gen *Pde6b*. Esto da como resultado la apertura permanente de los canales de cationes activados por GMPc en la membrana de los bastones, lo que permite que un exceso de iones extracelulares ingrese a la célula y finalmente conduce a la muerte celular por apoptosis (Hart et al., 2005). Una de las formas de resolver esta problemática es detectar la presencia del alelo *Pde6b^{rd-1}* mediante pruebas de PCR y evitar el uso de ratones que presenten el alelo homocigoto.

6. AMBIENTE ENRIQUECIDO

La habilidad de interactuar, adaptarse y responder al ambiente depende en gran medida de la capacidad de almacenar de forma adecuada experiencias pasadas a través del aprendizaje y la memoria. La estimulación sensorial, cognitiva y motora, mediante la interacción con el ambiente, es esencial desde el nacimiento hasta la vejez para refinar los circuitos neuronales necesarios que llevan a un óptimo funcionamiento cerebral. El ambiente enriquecido (AE) es

un modelo que permite el estudio del almacenaje de nueva información y cómo este tiene la capacidad de modificar las conductas dependientes de experiencia (Bonaccorsi et al., 2013).

El AE hace referencia a las condiciones de alojamiento –en este caso de los roedores– que facilitan y promueven una estimulación sensorial, cognitiva y motora. A diferencia del ambiente normal (AN) en donde generalmente hay entre 1 y 5 animales por caja en un espacio reducido, en el AE se incrementa el número de animales, la interacción social, el espacio, la actividad física y la exposición frecuente a objetos novedosos (con diferente forma, textura y color). La complejidad se manifiesta en la interacción entre el SNC, el endócrino y el inmune a través de la estimulación visual, motora, cognitiva y somatosensorial (Nithianantharajah & Hannan, 2006a).

Se ha demostrado que el AE tiene la capacidad de impulsar cambios fisiológicos funcionales en el sistema nervioso central incluyendo el córtex, a través de mecanismos de plasticidad tanto neuronal como de células que soportan la función y crecimiento neuronal. En respuesta al paradigma de AE que conlleva a la integración de patrones más complejos sensoriales y motores, se ha observado un incremento en el número de conexiones dendríticas en áreas del cerebro como corteza, cerebelo e hipocampo. También se ha observado un incremento en la neurogénesis hipocampal y proliferación celular en amígdala, que correlacionan con mejoras en la memoria, el aprendizaje, la interacción social y el procesamiento emocional (Ali et al., 2009; Reynolds et al., 2010)

Estudios recientes demuestran que el AE tiene la capacidad de incidir de forma positiva sobre el desarrollo de patologías, incluso superando las deficiencias de la expresión génica (Nithianantharajah & Hannan, 2006b). Tiene efectos positivos en enfermedades como cáncer, obesidad, enfermedades del desarrollo neural y del SNC (Cao et al., 2010; Griñán-Ferré et al., 2018; Ziegler-Waldkirch et al., 2018). El EA tiene la capacidad de reducir tumores cancerígenos, a través de inducir la expresión del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF por sus siglas en inglés) en el hipotálamo, lo que precede la activación de neuronas productoras de hormona liberadora de corticotropina (CRH por sus siglas en inglés) involucradas en la regulación del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal. Esto influye en los niveles de adipocinas como leptina en sangre que conlleva a un aumento en células NK, lo que previene y disminuye el crecimiento tumoral (Cao et al., 2010). También se ha demostrado que el AE, a través de Bdnf, incrementa la expresión de *crh*, *trh* y de hormonas tiroideas lo que induce una reprogramación genética, morfológica y funcional de tejido adiposo blanco a pardo (Cao et al., 2011).

Este paradigma ha demostrado ser capaz de reducir el estrés oxidativo, la inflamación y la neurodegeneración al proveer en las condiciones de habitación una combinación de interacción social, y estimulación cognitiva, sensorial y motora (Griñán-Ferré et al., 2018). El AE puede incrementar los niveles de neurotrofinas como NGF (factor de crecimiento nervioso), que junto con Bdnf, juegan papeles integrales en la señalización neuronal y de factores de crecimiento como *Vegfa*, mismo que promueve la neurogénesis de la zona subventricular (SVZ) del hipocampo y la plasticidad neuronal (During & Cao, 2006). A su vez, el AE incrementa los niveles de proteínas sinápticas como sinaptofisina y PSD-95T; también se ha observado que tiene efecto sobre la señalización glutamatérgica –implicada en la regulación de sistemas motores, sensitivos y cognitivos– al incrementar los niveles de receptores sinápticos tipo NMDA (N-metil-D-aspartato) y AMPA (ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico), los cuales son esenciales para la señalización glutamatérgica (Nithianantharajah & Hannan, 2006b).

i. EL AMBIENTE ENRIQUECIDO EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Es ampliamente aceptado que la EA tiene una etiología compleja, en donde factores tanto genéticos como ambientales tienen repercusión sobre el desarrollo de la enfermedad, por lo que se considera de origen multifactorial. En la EA se observa, aunado a las características neuropatológicas ya mencionadas, degeneración de regiones del cerebro, pérdida de memoria y decaimiento cognitivo, motriz y de comportamiento. Una forma de entender la etiología y el desarrollo de la enfermedad, además de estudiar formas de contender contra ella, ha sido el estudio de modelos murinos expuestos al AE.

Se ha observado que el AE puede participar en la modificación de marcadores epigenéticos como metilación e hidroximetilación, mismos que se ha demostrado tienen la capacidad de alterar la función neuronal a través de influenciar la expresión génica. En ratones 5xFAD, el ambiente enriquecido puede participar en la reducción de 5-mC por medio de un incremento en la expresión del gen *Dnmta/b*. También se ha reportado un incremento en los niveles de 5-hmC, un producto oxidativo de la metilación del DNA; así como en los niveles de expresión de genes que participan en su procesamiento como *Tet2* (Griñán-Ferré et al., 2018).

Algunos estudios también han demostrado que el AE tiene la capacidad de reducir el tamaño de las placas β A, de incrementar la proliferación de precursores neurales (células DCX-positivas) y de disminuir la muerte celular (al haber un número menor de células TUNEL-positivas) lo cual se ha observado está asociado a la activación y reclutamiento de la microglía

(mayor número de células Iba1-, CD86-positivas). Los depósitos de β A son capaces de desencadenar una cascada patogénica mediada por caspasa-3 que lleva a neurodegeneración y daños cognitivos. Sin embargo, el AE es capaz de inducir supervivencia y maduración de neuronas nuevas así como de prevenir la neurodegeneración (Griñán-Ferré et al., 2018; Ziegler-Walckirch et al., 2018)

Se ha demostrado que ratones que realizan ejercicio diariamente muestran un incremento en la capacidad cognitiva y decremento en la deposición de placas β A en comparación con aquellos que no realizan actividad física (Adlard et al., 2005). Estos beneficios también se observan en ratonas embarazadas y durante la lactancia (periodos en los cuales hay una gran disminución en la neurogénesis hipocampal y un incremento significativo en la deposición de placas β A debido al incremento de β A). Sin embargo, los beneficios son fuertemente incrementados en el AE donde a la actividad física se suman factores sociales y de novedad (Ziegler-Walckirch et al., 2018).

IV. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La EA es la principal causa de demencia y constituye un problema de salud a nivel mundial. Actualmente se han reportado alrededor de 55 millones de personas con demencia y se espera que este número se duplique cada 20 años, alcanzando 78 millones de casos para el año 2030 y 139 millones para el año 2050. En el mundo, cada 3 segundos alguien desarrolla demencia. El costo asociado de la demencia supera los 1.3 trillones de dólares, incluyendo costos atribuidos a la atención informal (atención no pagada brindada por familiares y conocidos de los pacientes), asistencia social proporcionada por profesionales de la salud y costos directos de atención médica (el costo de tratar la demencia y condiciones subyacentes en atención médica de primer y segundo nivel) (Alzheimer's Research UK, 2012). Por lo tanto, es de suma importancia ahondar en la búsqueda de estrategias para prevenir y/o revertir la enfermedad.

La evidencia reciente indica que la microglía juega un papel esencial en las enfermedades neurodegenerativas, incluyendo el Alzheimer, ya que un despliegue del fenotipo adecuado puede llegar a controlar la progresión de la enfermedad. Sin embargo, si estos no se activan a tiempo, pueden llegar a ser dañinos y contribuir al desarrollo de la EA.

Por otro lado, se ha demostrado ampliamente que el AE tiene un papel preventivo y terapéutico en muchas enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la EA. Los efectos benéficos que tiene el AE sobre el desarrollo de la enfermedad y las capacidades cognitivas en modelos de la EA son muy evidentes, sin embargo, los mecanismos moleculares que subyacen a esta mejora aún no son del todo claros. Se ha propuesto que el AE ejerce este efecto a través de modular la capacidad fagocítica de la microglía, la neurogénesis y la inflamación, por lo que se ha propuesto a la microglía como blanco para el tratamiento de la EA.

Estudios recientes de secuenciación de célula única han identificado subpoblaciones de la microglia caracterizadas por la expresión de marcadores específicos que regulan su estado de activación. Así, se han identificado además del fenotipo homeostático dos estados asociados a la enfermedad, la DAM1 y la DAM2. De manera interesante los niveles de expresión de los marcadores que distinguen a cada fenotipo se regulan por la señales presentes en el microambiente (por ejemplo señales inflamatorias).

El descubrimiento reciente de la microglía DAM que despliega un fenotipo protector si se activa a tiempo, ha llevado a la búsqueda de distintos mecanismos que logren acelerar la transición hacia DAM2 de forma temprana.

Con base en los datos anteriores, este estudio investiga si parte del mecanismo molecular que tiene el AE de retrasar el deterioro cognitivo propio de la EA es a través de modular o

acelerar el mecanismo de transición de la primera a la segunda etapa de DAM –que se sabe es protectora cuando logra desplegarse a tiempo–. Lo anterior resulta de gran importancia ya que se logra demostrar que los factores ambientales y cambios en el estilo de vida, tienen la capacidad de modular la respuesta fenotípica de la microglía para contener y retrasar el deterioro cognitivo de forma efectiva.

V. HIPÓTESIS

El ambiente enriquecido retrasa el deterioro cognitivo en el modelo murino de la enfermedad de Alzheimer 5xFAD, a través de modular la neuroinflamación y acelerar la transición hacia una microglía asociada a la enfermedad (DAM) protectora.

VI. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar uno de los mecanismos moleculares asociados al perfil transcripcional de DAM a través de los cuales el ambiente enriquecido ejerce un efecto benéfico sobre la enfermedad de Alzheimer

2. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Demostrar que el ambiente enriquecido mejora la capacidad cognitiva en un modelo murino de la Enfermedad de Alzheimer.
- 2.- Caracterizar el perfil transcripcional de la microglía en un modelo murino de la enfermedad de Alzheimer en respuesta al ambiente enriquecido.
- 3.- Evaluar el impacto del ambiente enriquecido sobre los niveles de ansiedad en un modelo murino de la enfermedad de Alzheimer.

VII. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para poder determinar el impacto del ambiente enriquecido sobre la capacidad cognitiva y perfil transcripcional de la microglía utilizamos un modelo murino (5xFAD) que presenta cinco mutaciones humanas de EA y lo sometimos a un ambiente normal (AN) durante 4 meses. Posteriormente, los ratones fueron divididos en AN o ambiente enriquecido (AE) durante 8 meses para evaluar el desarrollo de la enfermedad y valorar los efectos del AE (**Figura 2**).

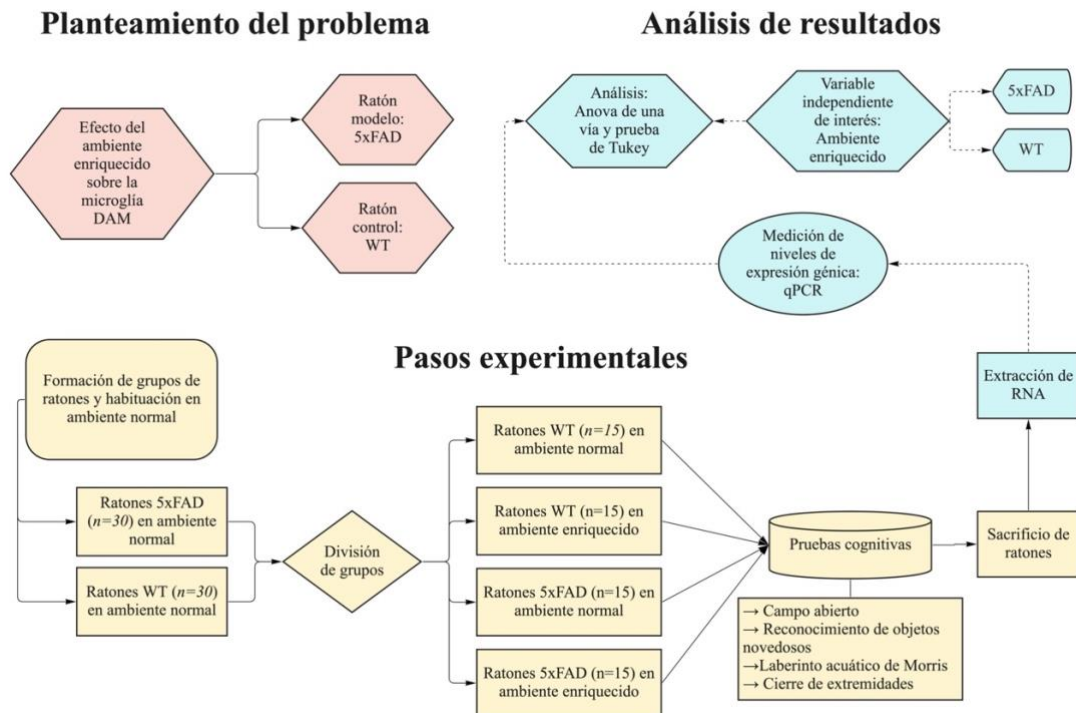


Figura 2 | Diseño experimental. Se muestra el planteamiento del problema, los pasos experimentales y el análisis de resultados que se llevaron a cabo durante el desarrollo del experimento

Los ratones 5xFAD presentan cinco mutaciones que les confieren la capacidad de desarrollar signos claros de la enfermedad desde etapas tempranas (deposición de péptidos β A desde los 2 meses y medio, y déficit cognitivo desde los 6 meses). Se realizó la genotipificación de los genes *Psen1* y *Pde6b*. Los ratones positivos para el primer gen y heterocigotos para el segundo, formaron parte del grupo experimental 5xFAD, mientras que los ratones negativos para el primero y heterocigotos para el segundo, formaron parte del grupo control WT.

Se ha reportado que la exposición al ambiente enriquecido tiene la capacidad de retrasar el desarrollo de la EA en modelos murinos de la enfermedad. A los 4 meses de edad, se dividió en dos a ambos grupos de ratones (5xFAD y WT) para formar el grupo experimental que sería expuesto al paradigma del ambiente enriquecido y sus respectivos controles expuestos a un

ambiente normal (**Figura 3**). Dos meses después se realizaron pruebas de ansiedad (campo abierto), memoria (reconocimiento de objeto novedoso, RON) y aprendizaje (laberinto acuático de Morris, LAM). Al no observar disfunción cognitiva a los 6 meses de edad, se optó por que los ratones permanecieran en sus respectivos ambientes seis meses más. Se realizaron las pruebas cognitivas y se procedió con el sacrificio y disección de los ratones a los 12 meses. Finalmente se realizó la extracción de RNA y se evaluó la expresión de los genes de DAM a través de qPCR

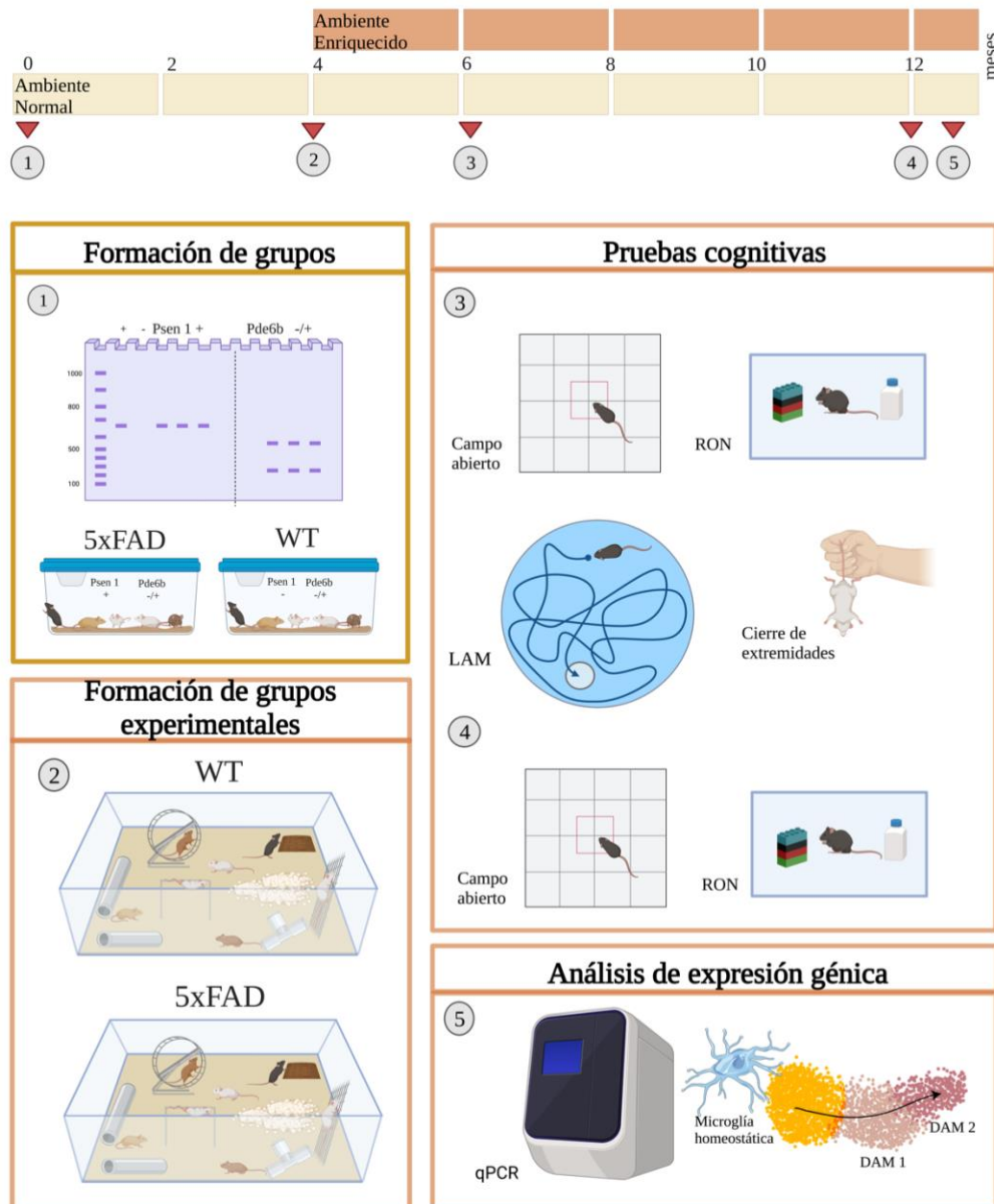


Figura 3 | Estrategia experimental. Se muestra la estrategia experimental utilizada durante el desarrollo del experimento. La habituación de los ratones en sus respectivos ambientes tuvo una duración total de 12 meses. Se muestran con flechas rojas los análisis y pruebas cognitivas realizadas durante el curso del experimento.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

1. ANIMALES

Se utilizaron ratones macho de 2-3 semanas de edad con un peso de 20 ± 5 gr de la cepa transgénica 5xFAD (fondo híbrido *C57/SJL*) que expresan el gen *APP* humano con tres mutaciones de EA familiar, (*Swedish* (K670N, M671L), *Florida* (I716V), *London* (V717I)) y *PSEN1* humana con dos mutaciones (M146L and L286V), obtenidos del laboratorio Jackson (Bar Harbor, ME, USA). Los animales permanecieron en el bioterio del Instituto de Biotecnología de la UNAM, siguiendo las normas establecidas por el comité de bioética del mismo, manteniendo un ciclo de luz-oscuridad de 12 h, una temperatura de 22 ± 1 °C y humedad controlada. Se realizó extracción de DNA a partir de cola y se realizaron PCRs de punto final con oligos para los genes *PSEN1* y *Pde6b^{rd-1}* (**Figura 4** y **Figura 5**). Se utilizaron 25 machos 5xFAD (positivos para *Psen1* y heterocigotos para *Pde6b^{rd-1}*) para los grupos experimentales y 25 machos WT (negativos para *Psen1* y heterocigotos para *Pde6b^{rd-1}*) para los grupos control.

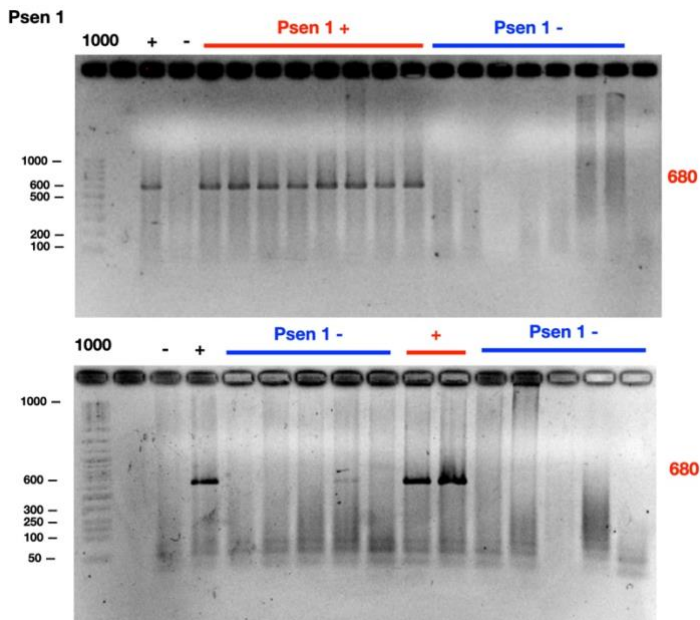


Figura 4 | Genotipificación de *Psen 1*. Imágenes representativas de electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR punto final de *Psen1*. se formaron grupos con los ratones *psen+* marcados en rojo (680 pdb).

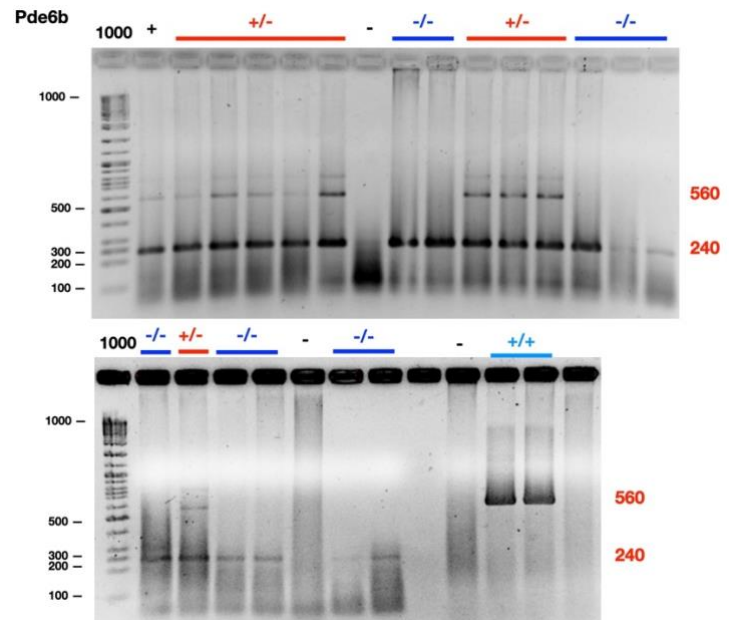


Figura 5 | Genotipificación de *Pde6b*. Imágenes representativas de electroforesis de agarosa de productos de PCR punto final de *pd6b*. Se formaron grupos con los ratones *pd6b +/-* marcados en rojo (240 y 560 pdb)

Es importante señalar que los ratones *Pde6b*^{rd-1} homocigotos (*Pde6b*^{+/+}) no fueron utilizados en los experimentos con el fin de evitar resultados sesgados por la ceguera que confiere este alelo homocigoto. Los ratones permanecieron en jaulas convencionales de 5 ratones por caja (Ambiente normal, AN). Después de 4 meses en los que todos los grupos permanecieron en AN cada grupo fue dividido en dos condiciones habitacionales diferentes, 10 ratones de cada grupo se mantuvieron en AN y 15 ratones se pasaron a un ambiente enriquecido AE.

2. CONDICIONES HABITACIONALES

Cincuenta ratones modelos de la EA (fondo híbrido *C57/SJL*) de 4 semanas fueron mantenidos en jaulas estándar con 5 ratones por jaula. Se formaron dos grupos, el primero con 25 ratones homocigotos para *Psen1* y heterocigotos para *Pd6b* (5xFAD) y el segundo con ratones negativos para *Psen1* y heterocigotos para *Pd6b* (Wild Type: WT).



Figura 6 | Imágenes representativas de las condiciones habitacionales. Condiciones habitacionales normales y de ambiente enriquecido. Fotografías representativas de la vista lateral y superior de ratones en un ambiente enriquecido (A y B) y en un ambiente normal (C y D).

A los 4 meses cada grupo fue dividido en dos condiciones habitacionales diferentes: 10 ratones de cada grupo fueron mantenidos en jaulas normales (Ambiente Normal: AN) y 15 fueron sometidos a un paradigma de ambiente enriquecido (AE) (**Figura 6**)

El AN consiste en cajas de 21cm ancho x 29cm largo x 16cm de altura, en las cuales se colocaron 5 ratones. El AE consiste en cajas de 32 cm ancho x 88 cm largo x 47.6cm altura en las cuales se colocaron 15 ratones; en estas jaulas se colocaron juguetes de varios tipos incluyendo túneles, rollos de cartón, casas de plástico, pelotas, estructuras de madera, material de anidación (aserrín grueso, rollos de papel, maíz seco, olotes secos y trozos de papel de cocina) y dos ruedas de ejercicio por caja. Durante todo el experimento, los juguetes y su ubicación fueron cambiados cada semana para mantener el componente de novedad. La comida y el agua en todos los grupos estuvo disponible *ad libitum*. Los ratones se sacrificaron a los 12 meses de edad por medio de inhalación de CO₂

3. PRUEBAS COGNITIVAS

Todas las pruebas cognitivas fueron realizadas durante el periodo de luz (entre las 9 y 11 am). Una hora antes del inicio de cada sesión se colocaron las cajas en el cuarto de experimentación para que los animales tuvieran un periodo de habituación a la nueva sala. Antes del inicio de cada sesión y entre las pruebas de cada ratón, las cajas y los objetos fueron limpiados con etanol al 70% y el aserrín reemplazado para evitar la impregnación de olores.

I. PRUEBA DE OBJETOS NOVEDOSOS

Uno de los tipos de memoria que se compromete en la EA es la memoria de reconocimiento, la cual depende de un buen funcionamiento de la corteza y el hipocampo. La prueba de RON permite analizar problemas cognitivos y neuropsicológicos en roedores ya que el acceso a la novedad (ya sea a través de un objeto o ambiente) provoca comportamientos de acercamiento y exploración en los roedores. Durante la sesión de familiarización (entrenamiento) se le permite al ratón explorar dos objetos similares, uno de los cuales es reemplazado por un objeto nuevo (sesión de experimentación). Esta prueba, al no requerir el aprendizaje de reglas, se conoce como prueba de una sola tarea, de igual forma es una prueba que no requiere refuerzos ya que depende puramente de la tendencia innata de los roedores a explorar más los objetos nuevos que los objetos conocidos. El roedor que recuerde más el objeto familiar va a pasar más tiempo explorando el nuevo objeto. Esta prueba deriva del “Paradigma visual de comparación pareada” realizada en humanos y primates no humanos, en donde un estímulo familiar y uno

nuevo se aparean y en donde el reconocimiento se infiere a partir de la visualización preferencial al nuevo blanco (Leger et al., 2013b). En la formación de memoria de RON el hipocampo dorsal juega un papel importante específicamente cuando la información espacial o contextual es un factor relevante. El hipocampo es importante para la memoria de reconocimiento de objetos, si existe alguna lesión en esta estructura, ocurrirán deterioro en la memoria anterógrada (Antunes & Biala, 2012a)

La prueba se realizó a todos los ratones a los 6 meses de edad. Se realizó la prueba de acuerdo con el protocolo estandarizado por Leger (Leger et al., 2013a). Se utilizaron cajas de madera de 33x33x30 cm (con aserrín y claves visuales diferentes en las dos paredes paralelas), dos bloques de lego y dos botellas tipo Flask de cultivo rellenas de arena (Error! Reference source not found.); se colocó una cámara sobre las cajas. Se posicionó al ratón experimental en la caja y se permitió que explorara por 5 min. En la fase de entrenamiento se colocaron 2 objetos similares (Botellas o Bloques Lego) en el centro de la caja, separados por 5 cm de distancia entre ellos y entre las paredes de la caja, permitiendo el libre paso del ratón entre los objetos y las paredes. Dichos objetos se fueron cambiando conforme pasaron los ratones uno por uno (si se empezó con dos botellas después se entrenó con dos bloques lego y así sucesivamente). Al concluir la fase de entrenamiento se dejó descansar a los ratones durante 6 h para la prueba de memoria de corto plazo (MCP) y 48 h para la prueba de memoria de largo plazo (MLP) (Error! Reference source not found.). Durante las fases de prueba se introdujo un nuevo objeto, distinto al objeto con el cual fue entrenado (si el ratón entrenó con dos bloques de lego uno de ellos fue ahora sustituido por una botella, si el ratón entrenó con dos botellas, una de ellas fue sustituida por un bloque de lego), se colocó al ratón en la caja y se permitió su exploración durante 5 min.

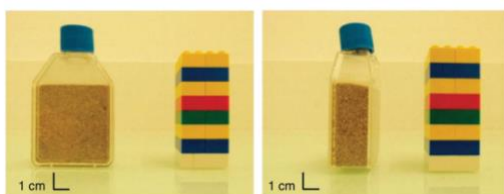


Figura 7 | Objetos novedosos para la prueba RON. Fotografía representativa de los dos objetos utilizados para la prueba RON (Leger et al., 2013)

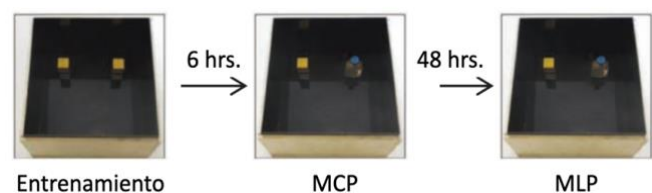


Figura 8 | Fases de la prueba de RON. Diseño experimental para la prueba de RON, MCP y MLP (leger et al., 2013)

Concluidas las pruebas, las cajas con los ratones fueron regresadas a la sala habitual. Se analizaron manualmente los videos tanto de la fase de entrenamiento como de las fases de prueba, cuantificando el tiempo que pasó el ratón explorando cada uno de los objetos. Se

consideraron tres criterios para determinar la exploración de los objetos: (1) se consideró la exploración directa (nariz-objeto), a no menos de 1 cm de distancia, (2) escalar los objetos no se consideró exploración (a menos que la acción haya sido acompañada por una exploración directa al objeto) ya que al escalar los objetos se considera que el ratón intenta explorar las afueras de la arena y no el objeto como tal. (3) Morder los objetos no se consideró exploración ya que esta conducta puede ser un signo de ansiedad indicando que hay un factor en la fase de habituación que pudo haber estresado al ratón (es importante destacar que no se observó dicha conducta durante las pruebas realizadas en este estudio). Una vez obtenido el tiempo de exploración de cada uno de los objetos se cuantificó el índice de exploración (IE), mediante la siguiente fórmula:

$$IE = \frac{ON}{OF + ON} = \frac{ON}{Tt}$$

En donde

ON = Objeto Novedoso

OF = Objeto Familiar

Tt = Tiempo total

Las pruebas conductuales que evalúan la habilidad de los ratones de reconocer un estímulo previamente presentado son sumamente informativas en los modelos animales que ayudan a estudiar la demencia humana. En la prueba de RON los animales no tienen recompensa alguna al ser evaluados (a diferencia de pruebas –no realizadas en este estudio– en donde los ratones reciben un alimento palatable como recompensa al escoger el objeto nuevo), los animales exploran el objeto novedoso como parte de su propensión natural hacia la novedad. Los ratones son capaces de diferenciar entre objetos y tienen la capacidad de diferenciar objetos que han visto previamente de los objetos novedosos (Antunes & Biala, 2012b). Se ha reportado ampliamente que la EA se caracteriza por un declive en memoria contextual, declarativa y de reconocimiento de objetos. Por lo tanto, esta prueba busca evaluar problemas cognitivos y neurofisiológicos en los roedores.

Durante la fase de entrenamiento se le presentan al ratón dos objetos iguales, se espera que el ratón explore ambos objetos de forma indistinta. Durante la fase de prueba se cambia uno de los objetos usados en la fase de entrenamiento por un objeto nuevo, este último debe ser detectado (y sus características analizadas) mientras que las características del objeto familiar deben ser reconocidas y consolidadas. En ratones que no tienen comprometida su capacidad cognitiva (p.ej en ratones WT) se espera que durante la fase de prueba se explore por un periodo

significativamente más largo de tiempo el objeto novedoso (índice exploratorio > 0.5), por el contrario en los animales 5xFAD que tienen daño neurofisiológico y capacidad cognitiva comprometida, se espera que exploren de forma indistinta tanto el objeto novedoso como el objeto familiar o, en su defecto que permanezcan explorando más el objeto que ya habían explorado previamente (índice exploratorio ≤ 0.5). El índice exploratorio permite evaluar el nivel del daño cognitivo, la disminución de exploración del objeto novedoso dependiente del retraso en el reconocimiento de la memoria resulta de un deterioro en la memoria del objeto familiar.

II. PRUEBA DE CAMPO ABIERTO

La prueba de campo abierto permite evaluar la locomoción general de los animales así como los comportamientos relacionados con ansiedad. El comportamiento de los ratones en la arena de campo abierto permite evaluar la actividad general y la conducta exploratoria de los animales. De forma natural los ratones tienden a explorar de forma preferencial las periferias de la arena (tigmotaxis), esta es una conducta que se asocia a la propensión natural de los ratones a evitar espacios abiertos grandes o espacios que se perciban como peligrosos.

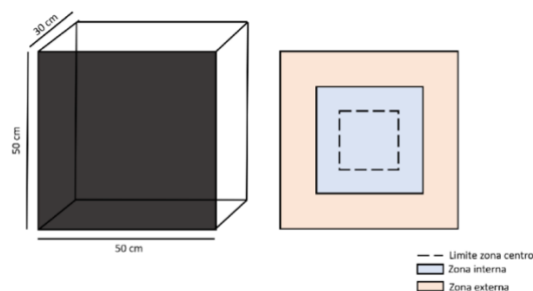


Figura 9 | Representación gráfica de la arena utilizada para la prueba de campo abierto. La base de la arena es color negro y las paredes son transparentes para que el ratón pueda reconocer que se encuentra en el mismo lugar en donde se llevó a cabo la fase de habituación. Se muestran las tres zonas de la arena delimitadas (digitalmente) en zona centro, zona media y zona externa.

Sin embargo, a pesar de esta tendencia, se ha observado que cuando los ratones permanecen más tiempo en la zona interna o cuando incrementa la latencia de entrar en ella, es un signo de actividad ansiolítica (Seibenhener & Wooten, 2015).

La prueba se realizó a todos los ratones a los 6 y 12 meses de edad. Concluido el tiempo de habituación, se colocó al ratón experimental en el centro de la caja (30x50x50 cm) y se le permitió explorar libremente durante 5 min mientras se grababa su actividad con una cámara colocada en la parte superior. Al término del tiempo, se regresó el ratón a su caja habitual. Se limpió la arena con alcohol al 70 % y se cambió el aserrín entre la prueba de cada ratón. Para

el análisis digital la arena fue dividida en tres secciones, (1) zona centro: zona cuadrada de 16.67 x 16.67 cm al centro de la arena; (2) zona interna: zona cuadrada de 30 x 30 cm al centro de la arena y (3) zona externa o periférica: área comprendida entre el límite de la zona interna y el límite de la arena (**Figura 9**). Los videos fueron analizados con el software Any Maze® 6.1 tomando en cuenta la cabeza del animal para determinar la zona en la que se encuentra. Se contabilizaron las entradas a cada zona, tiempo por zona, y velocidad promedio y máxima de cada ratón.

III. LABERINTO ACUÁTICO DE MORRIS

La prueba del laberinto acuático de Morris permite evaluar el aprendizaje espacial en los ratones, en ella se colocan marcas visibles en cuatro extremos de la piscina que le permiten al ratón navegar desde distintos puntos de inicio para poder localizar la plataforma de escape sumergida. Debido a que no hay ninguna clave que guíe al ratón directamente a la plataforma, este debe aprender el lugar en donde se encuentra basándose en las relaciones espaciales entre los objetos que puede ver fuera del laberinto (las marcas de colores vistosos y formas distintas localizadas sobre cada cuadrante) y la plataforma sumergida. En esta prueba se necesita la unión de elementos diferentes en un único recuerdo, se necesita de la memoria declarativa que requiere de la unificación de componentes separados proceso que se lleva a cabo principalmente por medio del hipocampo (Vorhees & Williams, 2006).

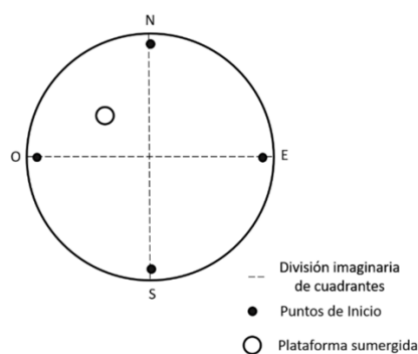


Figura 10 | Esquema del laberinto acuático de Morris. Representación gráfica de la piscina circular y los cuadrantes determinados para la prueba de laberinto acuático de Morris. Se muestra con un círculo la ubicación de la plataforma en el cuadrante NO.

Durante la prueba conforme progresan los días de aprendizaje, se espera que los ratones control (en este caso WT) naden de forma directa y con rapidez hacia la plataforma, por otro lado los ratones con lesiones a nivel de hipocampo tienden a fallar en la tarea, incluso en los últimos días de entrenamiento los ratones que presentan déficit cognitivo tardan mucho o fallan

en localizar la plataforma ya que son incapaces de encontrar la relación entre los elementos visuales y espaciales, por ende actúan por ensayo y error dando vueltas alrededor de la piscina. Por lo anterior el nado de los ratones y el tiempo que tardan en llegar a la plataforma desde los diferentes puntos permite evaluar si existe o no daño a nivel de hipocampo y si la exposición al ambiente enriquecido logra retrasar la aparición del daño.

La prueba se realizó a cinco ratones de cada grupo experimental a los 6 meses de edad. Cada ratón fue colocado en una piscina circular de 1,83 m de diámetro llena de agua mezclada con pintura blanca no tóxica (óxido de titanio). El tanque se dividió en cuatro cuadrantes (NO, SO, SE y NE) de igual tamaño (**Figura 10**), cada uno con una marca visual clara para el ratón. Los ratones fueron entrenados para montar una plataforma de escape oculta, sumergida 1 cm por debajo de la superficie del agua (15 cm de diámetro) en una región restringida de la piscina (NO). Los ratones fueron entrenados durante 5 días consecutivos colocándolos para iniciar el nado desde los cuatro cuadrantes del tanque, se colocaron en el agua frente a la pared (en donde se colocó una señal visual distinta y clara para el ratón sobre cada cuadrante) y se les permitió nadar durante un máximo de 90 s. La prueba terminó cuando el ratón subió a la plataforma o después de transcurrido el intervalo de 90 s. Si un ratón no localizó la plataforma durante la prueba, se le colocó en la plataforma durante 20 s y luego se le trasladó a una jaula de retención. Las latencias de escape a la plataforma oculta durante la fase de aprendizaje se analizaron utilizando el tiempo integrado recorrido y el tiempo necesario para llegar a la plataforma (AUC) para cada grupo. Después de dos días, se realizó una prueba de memoria en ausencia de la plataforma. Los ratones fueron liberados desde los cuatro puntos de inicio y se les permitió nadar libremente en la piscina durante 90 s. Se registraron latencia de escape y senderos de natación.

IV. EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE PLACAS β A EN LOS RATONES 5xFAD

Para determinar si la falta en la pérdida en las capacidades cognitivas se debía a la ausencia en la deposición de placas β A, un ratón WT y un ratón 5xFAD fueron sacrificados a los 8 meses de edad y se evaluó la presencia de placas β A. Los ratones fueron perfundidos con PFA al 4% para la fijación del cerebro y se realizaron cortes a nivel de corteza e hipocampo de 60 μ m. Las placas β A se detectaron mediante la tinción con tioflavina y microscopía usando emisión de espectro de 550 nm (**Figura 11**).

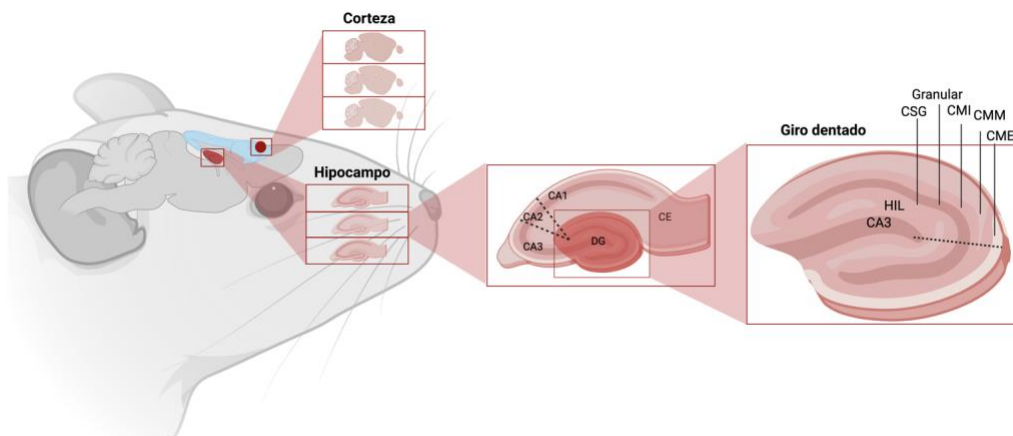


Figura 11 | Esquema de los sitios de corte del cerebro de ratón. Se muestra un acercamiento de los sitios de corte (corteza e hipocampo) y se observa un acercamiento al hipocampo en el giro dentado (DG) con las respectivas zonas evaluadas

V. PRUEBA DE ALTERNANCIA ESPONTÁNEA

La prueba de alternancia espontánea se basa en la tendencia natural de los roedores a preferir explorar un brazo nuevo sobre uno que ya ha sido previamente explorado. Tras una primera elección, en el segundo ensayo se prefiere el brazo que no ha sido explorado previamente. En el tercer juicio, cuando ambos brazos han sido visitados, el brazo con el mayor grado de novedad (el brazo que fue explorado hace más tiempo) se prefiere.

Para que el ratón pueda alternar exitosamente entre los brazos (lo cual se refleja en un porcentaje alto de alternancia), este debe recordar que brazo ha sido visitado previamente, por tanto esta prueba es idónea para evaluar la memoria de trabajo. Se espera que los animales que no presenten daño cognitivo tengan un alto porcentaje de alternancia espontánea, mientras que los ratones que tienen daño cognitivo presentan porcentajes bajos de alternancia.

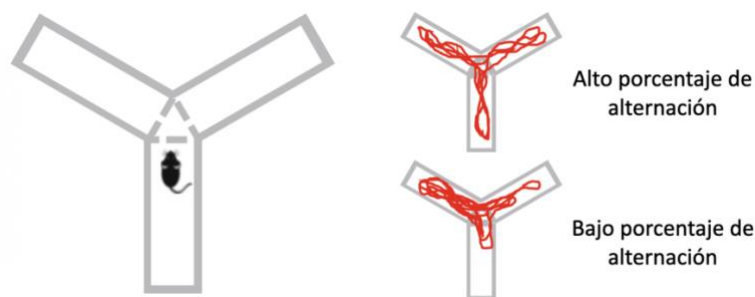


Figura 12 | Representación gráfica de la medición de la alternancia espontánea.

Un alto porcentaje se observa cuando existe una gran proporción de entradas en brazos consecutivos, por otro lado cuando existe una alta proporción de entradas en el mismo brazo se tiene un bajo porcentaje de alternancia (Kraeuter et al., 2019).

La prueba se realizó a todos los ratones a los 2 meses de exposición al ambiente (6 meses de edad). Se utilizó un laberinto en Y de 21x7x15.5 cm (misma distancia entre cada brazo) y se colocó una marca en cada extremo (A, B y C). Concluido el tiempo de habituación (1 hr), se colocó al ratón experimental en el centro del laberinto y se le permitió explorar libremente durante 10 minutos mientras se grababa su actividad con una cámara colocada en la parte superior. Al término del tiempo, se regresó el ratón a su caja habitual. Se limpió el laberinto con alcohol al 70 % entre la prueba de cada ratón. Se analizó el tiempo que el ratón pasó en cada brazo con las cuatro patas dentro de la zona (tomando como referencia el centro de este) y se calculó el porcentaje de alternancias (**Figura 12**).

VI. PRUEBA DE OBJETOS NOVEDOSOS EN LABERINTO EN Y

La prueba se realizó a todos los ratones a los 12 meses de edad. Se utilizó un laberinto en Y y se realizó una modificación a la prueba de objetos novedosos (Leger et al., 2013b). Se realizó protocolo para la prueba de objetos novedosos antes descrito. Los objetos fueron colocados en dos de los brazos del laberinto y se dejó explorar en la fase de entrenamiento por 5 min (con el mismo objeto) y 24 y 48 h después con un objeto diferente. Se utilizaron los parámetros de medición mencionados en la prueba de objeto novedoso.

A diferencia de la prueba de reconocimiento de objetos novedosos en campo abierto, en la prueba de reconocimiento de objetos novedosos en laberinto en Y, la discriminación de objetos se basa más en la recolección de experiencias pasadas que simplemente en la familiaridad del objeto ya que no solo se explora el objeto, sino que también se añade el componente de memoria espacial de los ratones.

VII. PRUEBA DE CIERRE DE EXTREMIDADES

La prueba se realizó a todos los ratones a los 12 meses de edad. Para realizar esta prueba se tomó por la cola a cada ratón y se grabó su movimiento por 12 s. Se colocó una cámara para posteriormente evaluar el cierre de extremidades en una escala del 0 al 4. Cuando se toma por la cola a los ratones y lentamente se les descende, estos tienden a extender las cuatro extremidades anticipando el contacto con una superficie. Los ratones con patologías en regiones cerebrales o en la médula espinal presentan el lugar de extensión de las extremidades, flexión de estas, por tanto esta es una prueba rápida que permite evaluar la función motora y el grado de lesiones a nivel cerebelo-cortico-reticular (**Figura 13**) (Lalonde & Strazielle, 2011b).

Descripción	
0	Sin agarre de extremidades. Extensión de escape normal
1	Una extremidad trasera muestra una separación incompleta y pérdida de movilidad. Los dedos de los pies exhiben una separación normal
2	Ambas extremidades posteriores muestran una separación incompleta y pérdida de movilidad. Los dedos de los pies exhiben una separación normal
3	Ambas extremidades traseras exhiben abrochamiento con dedos curvados e inmovilidad
4	Las extremidades anteriores y las extremidades posteriores exhiben abrochamiento y son cruzadas, dedos curvados e inmovilidad




Figura 13 | Escala utilizada para evaluar el grado de cierre de extremidades. Imagen representativa del cierre de extremidades en ratones con distinta gravedad de daño (Miedel et al., 2017)

4. EXTRACCIÓN DE RNA Y RETROTRANSCRIPCIÓN (RT)

A los 12 meses de edad se realizó el sacrificio de los ratones por medio de inhalación de CO₂ y se procedió con la inmediata disección de los cerebros que se conservaron a – 80 °C hasta su análisis. Se extrajo RNA total a partir de corteza frontal con el reactivo TRIzol™ de Invitrogen™. Se homogeneizó el tejido agregando 200 µL de TRIzol™ (1 volumen) a la muestra, la cual se sonicó al 30 % con 3 pulsos de 10 s y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Se agregaron 0.2 volúmenes de cloroformo, se incubó por 2 min y se centrifugó por 15 min a 12,000 rcf a 4 °C. Se separó la fase cristalina-acuosa, se adicionaron 0.5 volúmenes de isopropanol, se incubó por 10 min y se centrifugó por 10 min a 12,000 rcf a 4 °C. Se descartó

el sobrenadante, se resuspendió en 1 volumen de etanol al 75% y se centrifugó por 10 min. a 7500 rcf a 4°C. Se descartó el sobrenadante y resuspendió nuevamente en 1 volumen de etanol al 75 %. Finalmente se centrifugó a 7500 rcf durante 5 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se dejó secar la muestra a temperatura ambiente por 10 min. El *pellet* resultante se precipitó en 50 µL de agua DEPC y la muestra fue cuantificada por espectrofotometría en un equipo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Se utilizaron las muestras cuya relación 260/280 fuera mayor a 1.5, y posteriormente se verificó la integridad del RNA por medio de un gel blanqueador de agarosa al 1% (Aranda et al., 2012). Las bandas correspondientes a las subunidades 28S y 18S guardaron una proporción 2:1 y no se observó barrido de degradación. Las muestras se almacenaron a – 80 °C hasta su uso. Para la reacción de retrotranscripción (RT) se utilizó 1 µL de RNA (500 ng/µL) y 19 µL de mezcla de reacción (ver Anexos). La retrotranscripción se llevó a cabo durante 30 min a 37°C. Se realizó una dilución 1:10 del cDNA resultante.

5. ENSAYOS DE RETROTRANSCRIPCIÓN Y PCR EN TIEMPO REAL (RT-QPCR)

I. DISEÑO DE OLIGOS DE DAM PARA RT-QPCR

Se sintetizaron oligonucleótidos iniciadores (oligos) específicos para la amplificación de tres genes relacionados a la activación de la microglía asociada a la enfermedad (DAM): *Tyrobp*, *Trem2* y *Cx3cr2*. Se realizó la búsqueda de las secuencias de los genes en la base de datos *e!Ensembl* (<https://www.ensembl.org/index.html>). Posteriormente, se evaluaron las variantes de *splicing* existentes para cada gen y se trabajó con aquella que fuera más representativa de cada uno, es decir que tuviera la mayor parte de secuencias codificantes presentes en las demás variantes (**Figura 14-A**). Para poder cerciorarse de que el segmento amplificado fuera producto de la RT del mRNA y descartar completamente la posibilidad de amplificación de DNA en caso de algún remanente previo a la RT, se realizaron los diseños de oligos exon-exon. Para la secuencia delantera (*forward*) se tomaron 9-11 pdb (pares de bases) de la secuencia final de un exón y las siguientes 9-11 pdb con la secuencia del siguiente exón, excluyendo así cualquier secuencia de los intrones. Aproximadamente 80 pdb después se buscó una secuencia apropiada para el oligonucleótido (*reverse*). Se tomó una secuencia de 20-22 pdb y se sacó su secuencia complementaria (**Figura 14-B**). Posteriormente se verificó la especificidad de los oligos a través de *primer BLAST* en la base de datos de *NCBI* (National Center for Biotechnology

dímeros. Los oligos que cumplieron con las características antes mencionadas, se mandaron a sintetizar a la Unidad de Secuenciación y Síntesis del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

II. ESTANDARIZACIÓN DE CURVA DE EFICIENCIA DE REACCIÓN

Se verificó que los oligos fueran capaces de amplificar RNA extraído a partir de tejido. Una vez que se observó un solo producto amplificado y del tamaño esperado (**Figura 15-A**) se procedió a realizar la curva de calibración. Se utilizaron las condiciones mencionadas en Anexos (Condiciones de RT-qPCR), posteriormente se realizaron tres diluciones seriadas (1:2, 1:4 y 1:8) para cada set de oligos. Se puede observar que cada gen presenta un rango de expresión esperado, existe proporcionalidad lineal en la amplificación con respecto a la cantidad de cDNA (**Figura 15-B**)

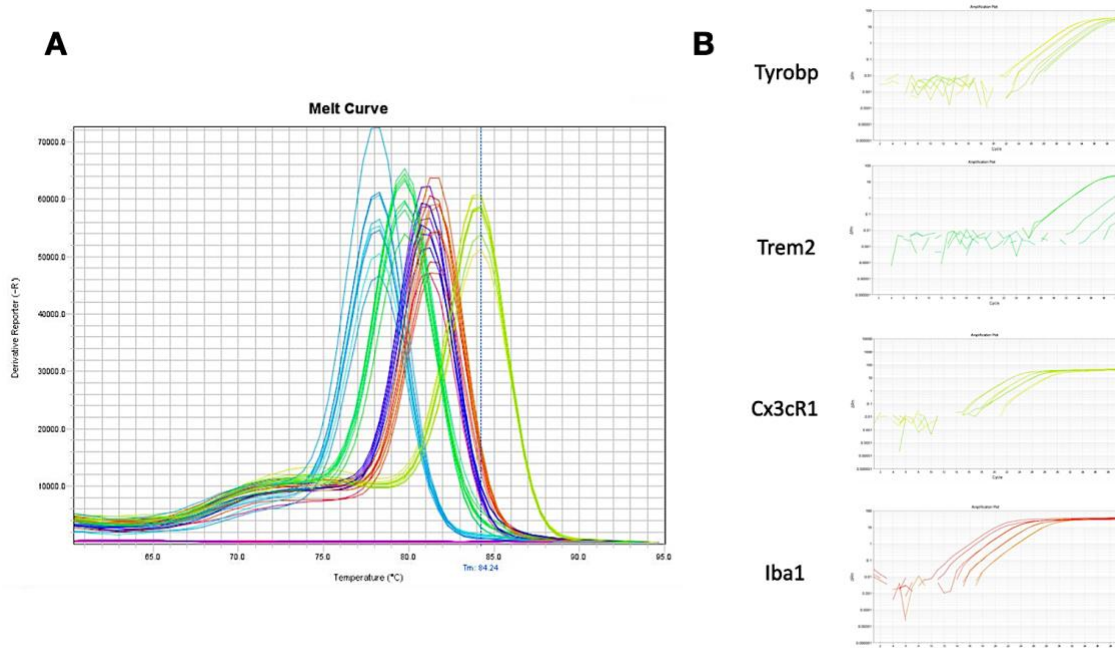


Figura 15 | Amplificación de los productos de oligos DAM para la curva de calibración. A) Se observa que cada set de oligos amplifican un solo producto específico y claramente distinguible de los demás oligos. B) Amplificación de las diluciones de cDNA para cada gen. Se puede observar que la amplificación es proporcional conforme incrementa la dilución de templado.

IX. RESULTADOS

1. EVALUACIÓN DE LA MEMORIA Y APRENDIZAJE VISUAL Y ESPACIAL EN EL MODELO MURINO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER EN LA EDAD ADULTA

A los 2 meses de exposición a los diferentes ambientes (6 meses de edad) se evaluó la memoria espacial de reconocimiento a corto (MCP) y a largo plazo (MLP) por medio de la prueba de reconocimiento de objeto novedoso (RON) en campo abierto. Se evaluó el índice de exploración en todos los grupos, posteriormente se realizó ANOVA de una vía y prueba de Tukey de comparaciones múltiples, sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los grupos.

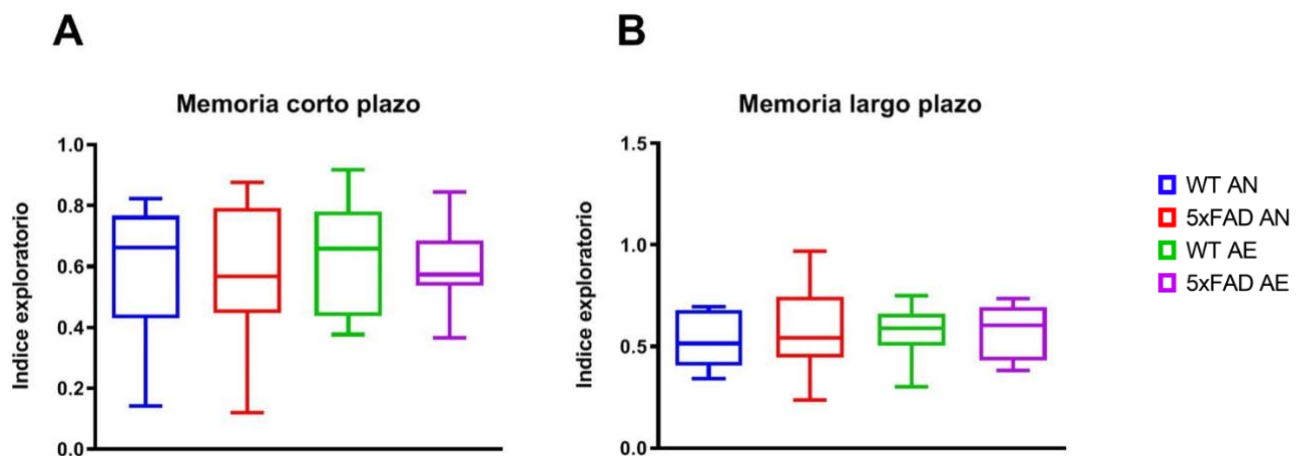


Figura 16 | Memoria de reconocimiento a corto y largo plazo. (A) Memoria a corto plazo y (B) memoria a largo plazo en ratones silvestres y 5xFAD de 6 meses de edad expuestos a distintas condiciones habitacionales. Promedio \pm SEM, Anova de una vía y Prueba de Tukey de comparaciones múltiples (n:WT AN=10; n:WT AE=15; n:5xFAD AN=10; n 5xFAD AE=15).

Tal como se observa en la **Figura 16-A**, todos los grupos muestran una MCP similar; sólo observamos una tendencia a explorar más el objeto nuevo, lo que refleja una memoria efectiva a corto plazo. El índice exploratorio en la MLP (**Figura 16-B**) muestra una ligera tendencia a incrementar la exploración por el nuevo objeto en los ratones WT expuestos a AE, sin embargo, esta diferencia no es significativa. Se puede observar que el grupo 5xFAD control (5xFAD AN) y 5xFAD experimental (5xFAD AE) conservan los mismos índices de memoria,

es decir, a la edad de 6 meses, en este estudio, no se observa una pérdida de la memoria de reconocimiento en el modelo murino de la enfermedad.

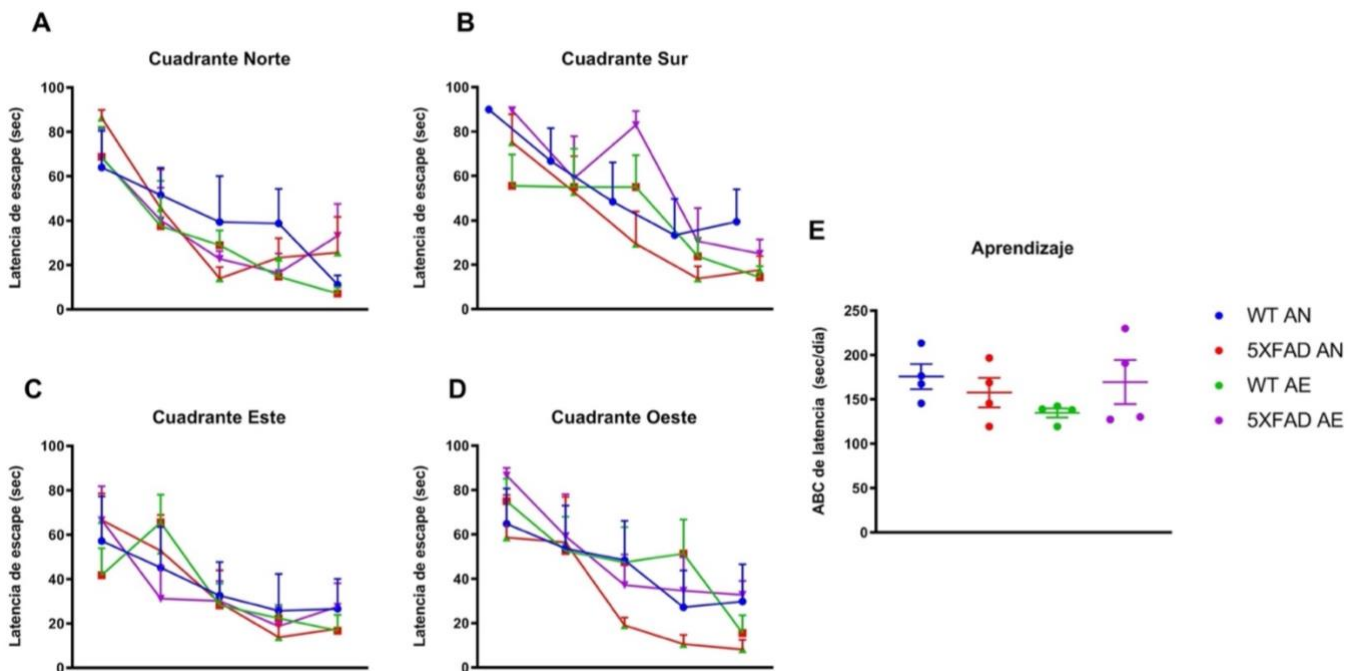


Figura 17 | Memoria y aprendizaje en la prueba de laberinto acuático de Morris. Se muestra la latencia de escape desde cada uno de los cuadrantes hacia la plataforma sumergida durante la semana de entrenamiento (A-D) y el aprendizaje analizado a través del área bajo la curva (ABC) de la latencia de escape (E) de los ratones WT AN y AE y de los ratones 5XFAD AN y AE. Los datos se muestran con la media \pm EEM, $n=5$ animales por grupo

Para poder determinar el grado de daño cognitivo se realizó, posterior a la prueba de RON, la prueba de laberinto acuático de Morris (LAM) que, a diferencia de la anterior, da información acerca del estado de la memoria espacial. De forma similar a la prueba de RON, a los 6 meses de edad no existen diferencias significativas en el aprendizaje o la memoria entre los diferentes grupos de ratones. Se puede observar que todos los grupos presentan el mismo patrón de aprendizaje íntegro ya que cada día disminuye de forma gradual el tiempo de latencia a la plataforma desde los cuatro cuadrantes (**Figura 17-A.D**). Lo anterior se confirmó al calcular el área bajo la curva de este parámetro para cada grupo (**Figura 17-E**).

2. EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE PLACAS β A EN LOS RATONES 5xFAD

Para determinar si la falta en la pérdida en las capacidades cognitivas se debía a la ausencia en la deposición de placas β A, un ratón WT y un ratón 5xFAD fueron sacrificados a los 6 meses de edad y se evaluó la presencia de placas β A. Los ratones fueron perfundidos con PFA para la fijación del cerebro y se realizaron cortes a nivel de corteza e hipocampo.

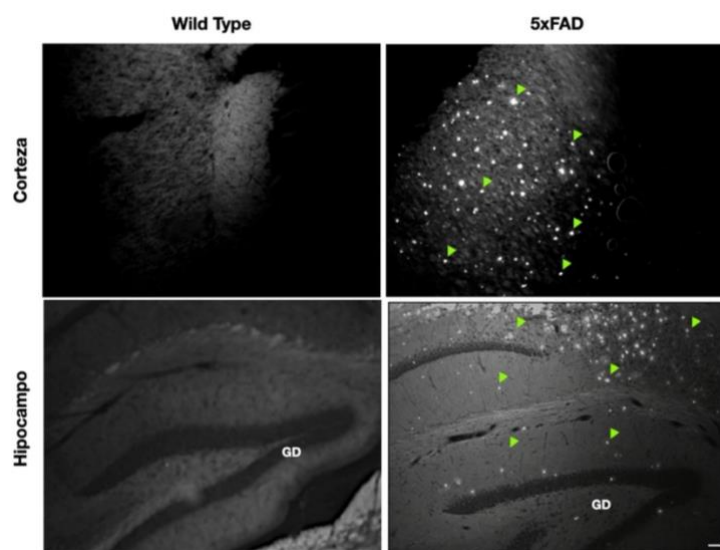


Figura 18 | Micrografías representativas de tinción con tioflavina Se muestra la tinción de las placas β A (punta de flecha verde) en corteza e hipocampo de ratones de 6 meses de edad ($n=1$). Barra de escala 100 μ m.

Las placas β A se detectaron mediante la tinción con tioflavina y microscopía usando emisión de espectro de 550 nm. Nuestros resultados muestran que el ratón 5xFAD, a pesar de no presentar deterioro cognitivo a los 6 meses (tal como se observa en las pruebas cognitivas de RON **Figura 16**), presenta deposición de placas β A de manera significativa (**Figura 18**).

3. EL AMBIENTE ENRIQUECIDO RESCATA Y MEJORA LA MEMORIA ESPACIAL A CORTO Y LARGO PLAZO EN RATONES 5xFAD ENVEJECIDOS

Al no observar diferencias significativas en las pruebas de memoria a los 6 meses de edad, los ratones permanecieron 6 meses más en sus respectivos ambientes. A los 8 meses de exposición

a los diferentes ambientes (12 meses de edad), se realizó la prueba de RON en laberinto en Y para evaluar la MCP y MLP.

La metodología de la prueba de RON es la misma que la que se describió antes, sin embargo, en esta ocasión se utilizó un laberinto en Y en lugar de una caja de campo abierto ya que en esta prueba se juntan los componentes de memoria espacial y visual de las pruebas anteriores.

Se evaluó el índice de exploración en todos los grupos, posteriormente se realizó ANOVA de una vía y prueba de Tukey de comparaciones múltiples mediante lo cual se confirmó que los animales 5xFAD AN tienen un índice exploratorio de 0.5 o menor, lo que refleja deficiencia en MCP y en MLP.

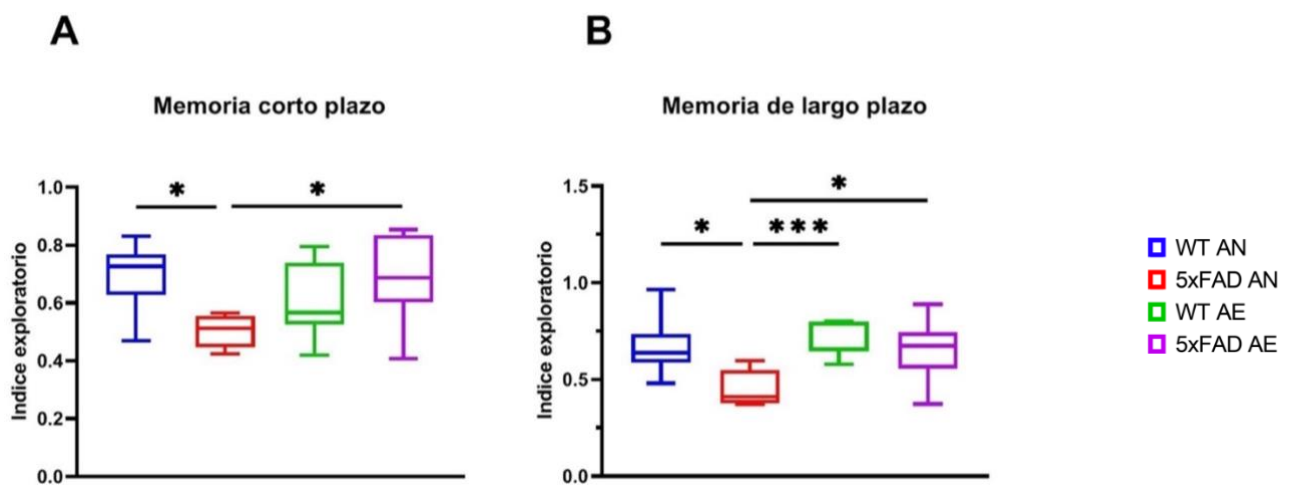


Figura 19 | Memoria espacial en ratones silvestres y 5xFAD de 12 meses de edad expuestos a distintas condiciones habitacionales. A) Memoria a largo plazo. B) Memoria a corto plazo. Promedio \pm SEM, Anova de una vía y Prueba de Tukey de comparaciones múltiples * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ (n WT AN=10; n WT AE=15; n 5xFAD AN=8; n 5xFAD AE=15)

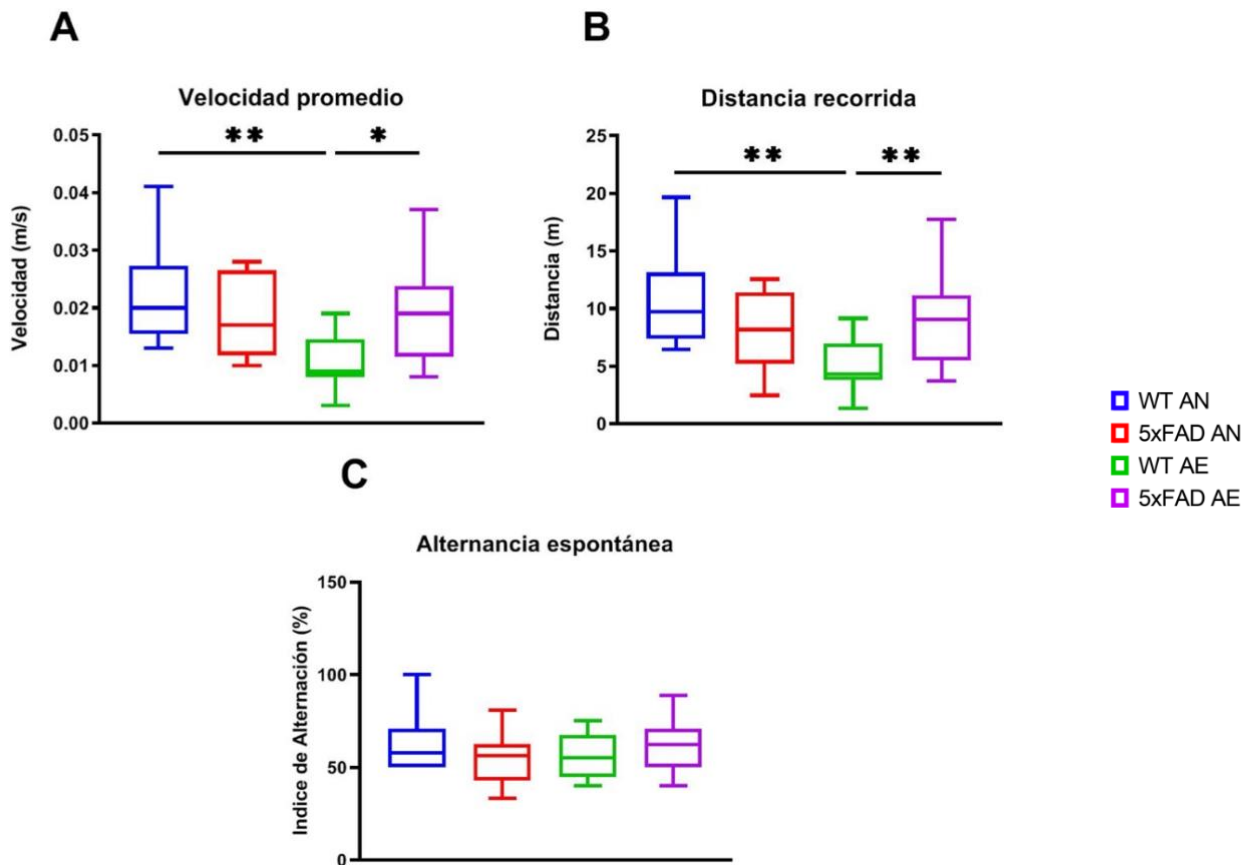


Figura 20 | Prueba de alternancia espontánea. Velocidad promedio (A) y distancia recorrida (B) durante la prueba de alternancia espontánea en el laberinto en Y. Se muestra el índice de alternancia espontánea (C) en ratones 5xFAD de 12 meses expuestos a distintas condiciones habitacionales. ANOVA de una vía y prueba de tukey de comparaciones múltiples. Promedio \pm EEM * p <0.05, ** p <0.01 (WT AN n =10; WT AE n =15; 5xFAD AN n =8; 5xFAD AE n =15).

Tal como se observa en la **Figura 19-A y B** la exposición de los ratones 5xFAD al AE logra restaurar el deterioro de la memoria a niveles comparables con los silvestres de forma significativa

Posterior a la prueba de RON en laberinto en Y, se realizó la prueba de alternancia espontánea para evaluar la capacidad de retención. Sin embargo, no se encontró ninguna diferencia significativa entre los grupos como se puede observar en la **Figura 20-C**.

4. EL AMBIENTE ENRIQUECIDO MEJORA LOS NIVELES DE ANSIEDAD EN RATONES WT Y EN EL MODELO 5xFAD ENVEJECIDOS

Se realizó la prueba de campo abierto a los 6 y a los 12 meses de edad. Tal como se puede observar en la **Figura 21**, no existen diferencias significativas entre la distancia recorrida y la

velocidad media entre los diferentes grupos en ratones adultos (6 meses) y ratones envejecidos (12 meses). Es decir, no existe un déficit motor que impacte de forma negativa en la movilidad de los ratones de los diferentes tratamientos y entre las dos edades evaluadas.

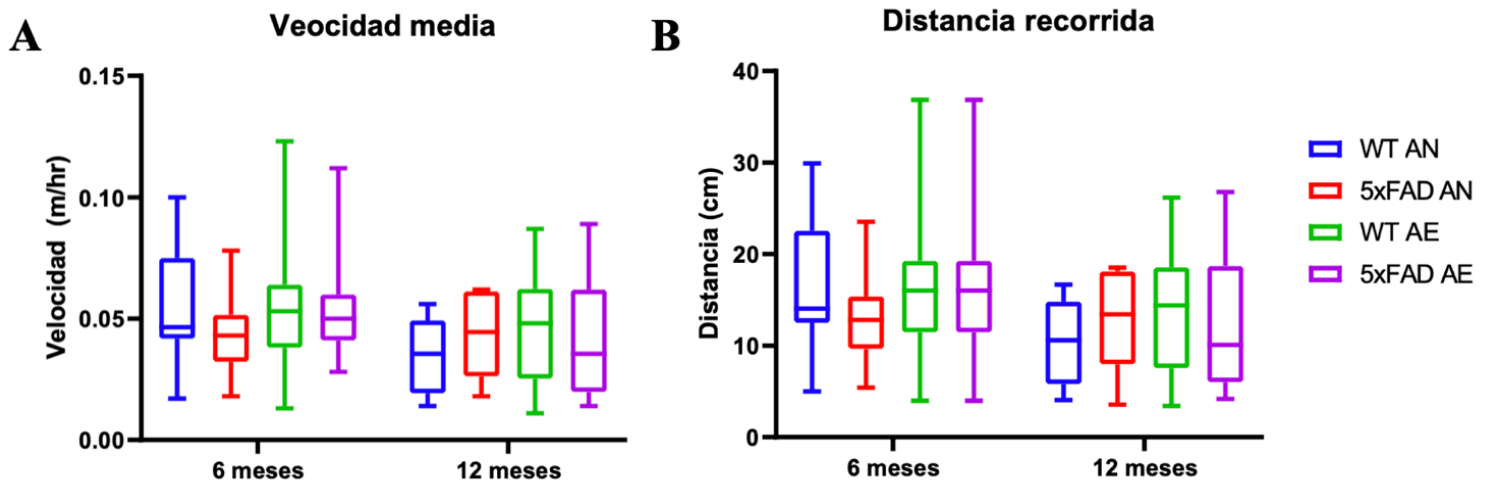


Figura 21 | Evaluación de la distancia recorrida y velocidad media en la prueba de campo abierto a los 6 y 12 meses en ratones expuestos a diferentes ambientes. Velocidad media (A) y distancia recorrida (B) de los ratones durante la prueba de campo abierto. ANOVA de una vía y prueba de Tukey de comparaciones múltiples. Promedio \pm EEM * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (WT AN $n = 10$; WT AE $n = 15$; 5xFAD AN $n = 8$; 5xFAD AE $n = 15$)

Para poder evaluar los niveles de ansiedad entre los diferentes grupos, se midió el tiempo que los ratones pasan en la zona centro y en la zona externa. Posteriormente, se evaluó el tiempo en cada zona de todos los grupos a través de ANOVA de una vía y prueba de Tukey de comparaciones múltiples. Se puede observar que los ratones no presentan ansiedad a los 6 meses, ya que todos pasan un tiempo similar tanto en la zona externa como en la zona centro (**Figura 22-A y B**). Es decir, a los 6 meses no hay síntomas de ansiedad o déficits en la exploración. Sin embargo, conforme los ratones envejecen, los niveles de ansiedad incrementan ya que se puede observar que a los 12 meses los ratones WT AN pasan significativamente menos tiempo en el centro y más tiempo en la zona externa (se observa la misma tendencia a los 6 meses, sin embargo, no es significativa). Esta conducta se logra recuperar con el AE, dado que el grupo WT-AE pasa significativamente más tiempo en el centro (**Figura 22-A**) y su permanencia en la zona externa es comparable con la que presentan los ratones a los 6 meses (**Figura 22-B**).

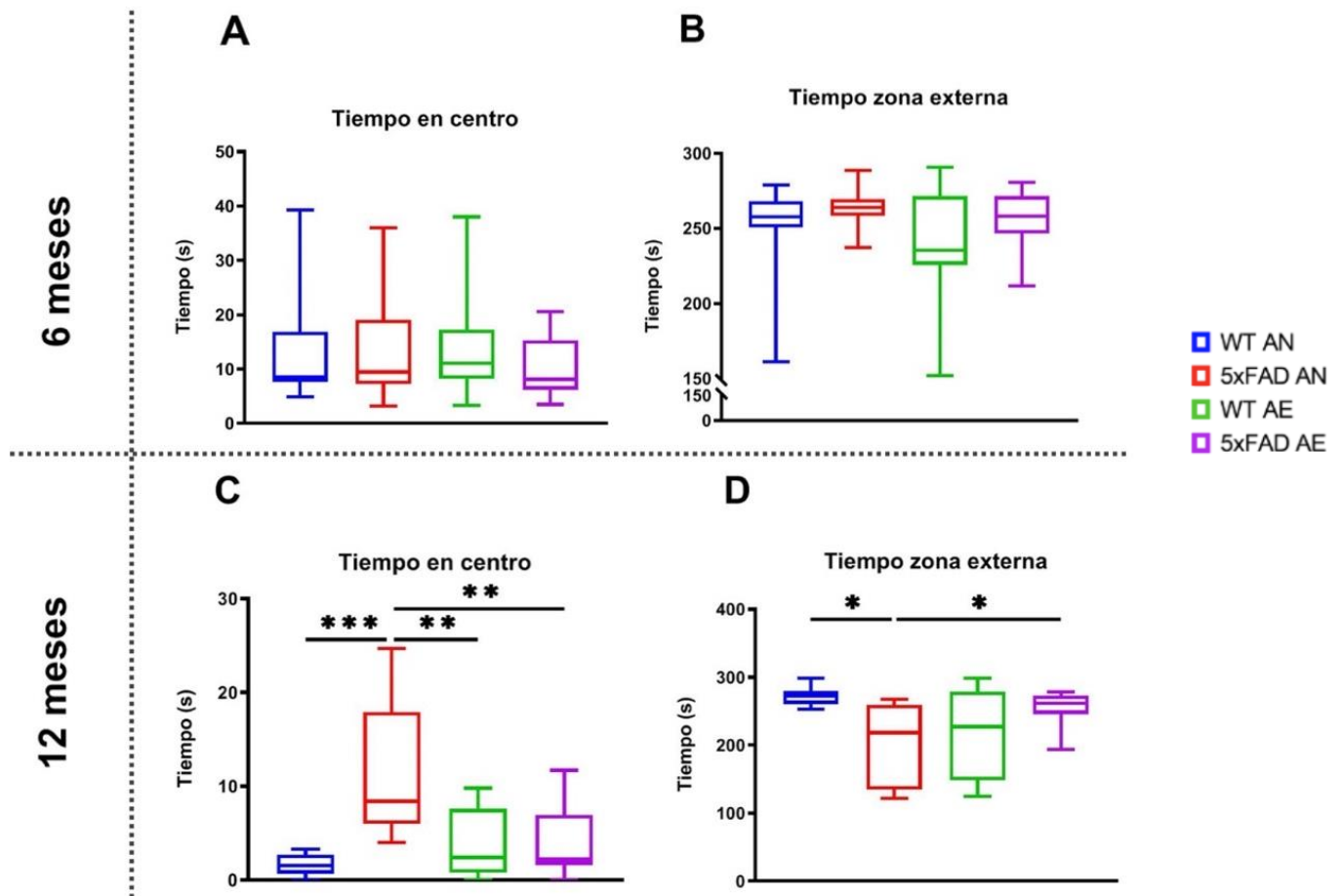


Figura 22 | Evaluación de los niveles de ansiedad en los ratones wt y 5xfad de 12 meses expuestos a diferentes ambientes. Tiempo que los ratones permanecieron en la zona centro (A y C) y en la zona externa (B y D) a los 6 y 12 meses, respectivamente. ANOVA de una vía y prueba de Tukey de comparaciones múltiples. Promedio \pm EEM * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (WT AN $n = 10$; WT AE $n = 15$; 5xFAD AN $n = 8$; 5xFAD AE $n = 15$)

De forma contraria, los ratones 5xFAD-AN envejecidos presentan niveles notablemente bajos de ansiedad, ya que permanecen mucho tiempo en la zona centro. Esta conducta, asociada a una falta de aversión a situaciones peligrosas, logra recuperarse por medio de la exposición al AE dado que el grupo 5xFAD-AE, pasa significativamente menos tiempo en el centro (**Figura 22-C**). Tanto el incremento en la ansiedad de los ratones WT AN, como el decremento excesivo de la misma en los ratones 5xFAD AN, logran recuperarse con la exposición al AE, ya que estos grupos (WT AE y 5xFAD AE) presentan niveles de ansiedad comparables entre sí.

5. EL AMBIENTE ENRIQUECIDO REDUCE EL CIERRE DE EXTREMIDADES (*CLASPING*) EN EL MODELO MURINO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

A los 7 meses de exposición a los diferentes ambientes (11 meses de edad) se realizó la prueba de cierre de extremidades o *claspings*. El cierre de extremidades en roedores puede recapitular deficiencias motoras debidas a la acumulación de placas β A. Tal como se puede observar en la **Figura 23** la EA incrementa el índice de cierre de los ratones, sin embargo, la exposición al AE tiene la capacidad de disminuir de forma significativa el índice de cierre de los ratones 5xFAD AE a niveles comparables con los ratones WT.

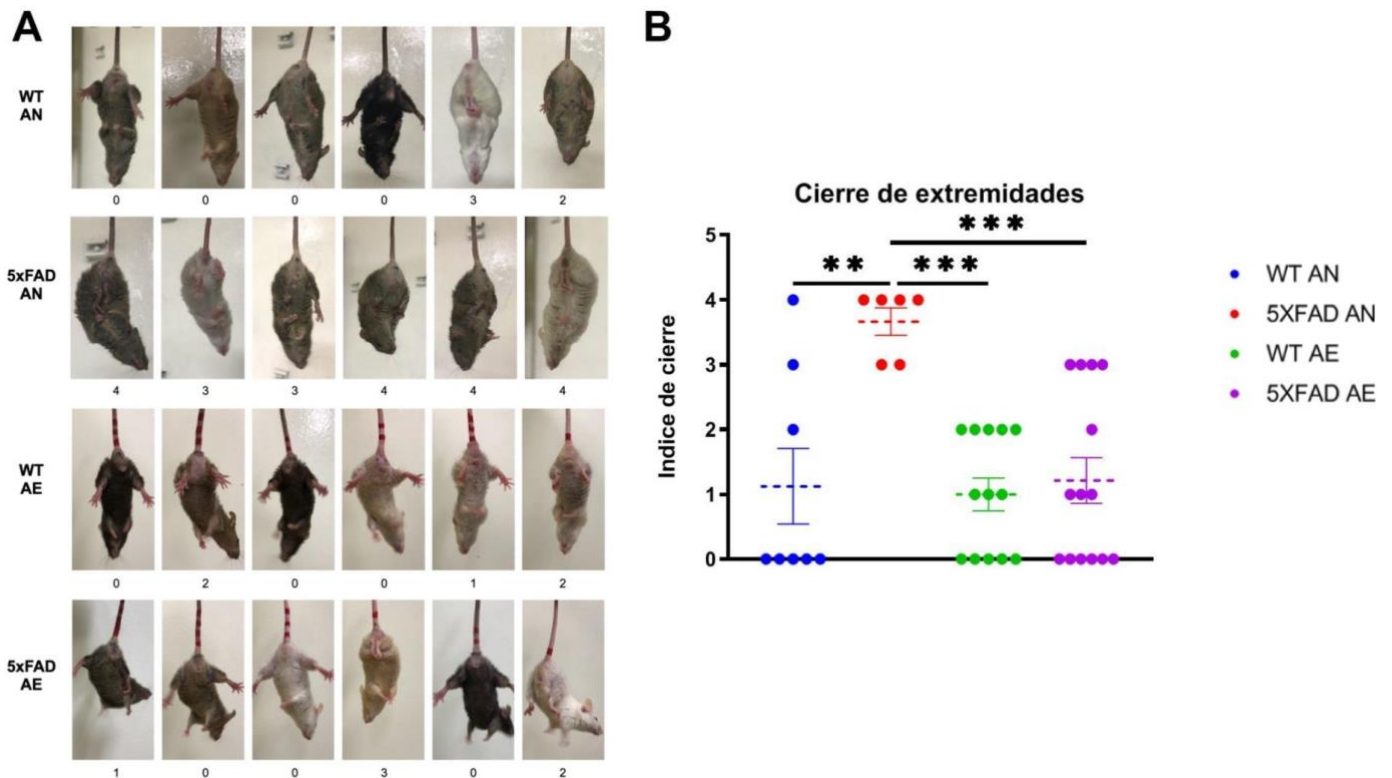


Figura 23 | Efecto del ambiente enriquecido sobre el cierre de extremidades (*claspings*) en ratones. Imágenes representativas de ratones que exhiben distintos niveles de *claspings* (A). Ratones 5xFAD y WT de 12 meses de edad en AE exhiben niveles de *claspings* significativamente menores en comparación con los grupos control de AN. ANOVA de una vía y prueba de Tukey de comparaciones múltiples. Promedio \pm EEM, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (WT AN $n = 10$; WT AE $n = 15$; 5xFAD AN $n = 8$; 5xFAD AE $n = 15$)

6. EL AMBIENTE ENRIQUECIDO INCREMENTA LA EXPRESIÓN DE MARCADORES MOLECULARES EN LA MICROGLÍA VINCULADOS AL FENOTIPO ASOCIADO A ENFERMEDAD (DAM)

Posterior al sacrificio de los animales (12 meses de edad, 8 meses de exposición a los ambientes respectivos) se extrajo RNA a partir de corteza frontal, se generó cDNA por medio de una reacción de retrotranscripción (RT) y se evaluó la expresión de tres diferentes marcadores asociados a la enfermedad (DAM) por medio de PCR cuantitativa (qPCR) (ver Anexos). La expresión de los genes fue normalizada contra la expresión del gen *housekeeping* específico de microglía *Iba1*, se presenta en unidades arbitrarias en tasa de recambio (*fold change*) con respecto a la expresión *Iba1*. Se analizó el nivel de expresión de los marcadores moleculares mediante ANOVA de una vía y prueba de Tukey de comparaciones múltiples.

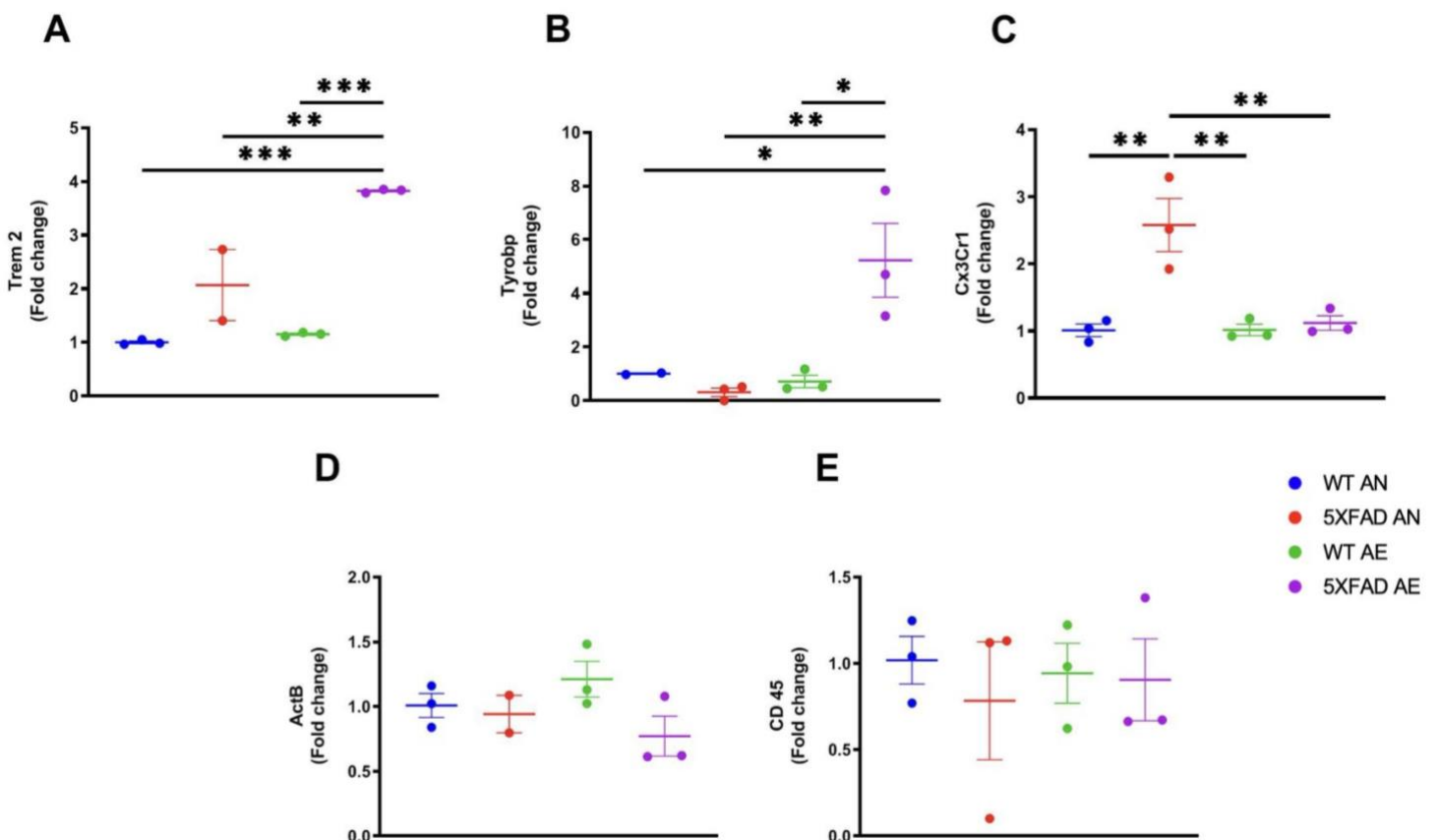


Figura 24| Expresión de marcadores moleculares en la microglía DAM. Se muestran los niveles de expresión de los genes asociados a DAM (A - C) y los niveles de expresión de genes *housekeeping* (D - E). Los valores fueron normalizados con la expresión de *Iba1*. ANOVA de una vía y prueba de Tukey de comparaciones múltiples. Promedio \pm EEM *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, (n = 3).

Nuestros datos indican un incremento significativo en la expresión de *Trem2* en ratones 5xFAD-AN con respecto a WT-AN (**Figura 24-A**). Este marcador asociado a fagocitosis y del cual depende la progresión de DAM1 a DAM2 incrementa aún más de forma significativa, en un factor de dos, en los ratones 5xFAD expuestos a un ambiente enriquecido. Se puede observar un incremento significativo en la expresión de *Tyrobp* en los animales 5xFAD con respecto al resto de los grupos (**Figura 24-B**). *Trem2* necesita de *Tyrobp* para poder transducir la señal del exterior al interior de la célula. En la transición de la microglía homeostática hacia DAM, *Tyrobp* se regula positivamente antes que *Trem2*.

Se puede observar que la expresión de *Cx3cr1* en ratones 5xFAD AN incrementa de forma significativa con respecto a los demás grupos, el ambiente enriquecido es suficiente para regresar la expresión de *Cxcr3* a los niveles de los ratones WT (**Figura 24-C**). Se evaluaron tres genes housekeeping: *Iba1* (gen normalizador), *Actb* y *Cd45* (**Figura 24-D y E**). No se observó diferencia significativa en la expresión de los genes *ActB* ni *CD45*.

X. DISCUSIÓN

La enfermedad de Alzheimer es un padecimiento neurológico cuya incidencia ha incrementado alarmantemente conforme al incremento en la esperanza de vida. Si bien se han observado mutaciones asociadas al desarrollo de la enfermedad de tipo hereditario (FAD), esta se presenta en un porcentaje bajo de la población y a edades tempranas. La mayoría de los pacientes presenta la enfermedad en etapas de adulto mayor (>65 años), en ellos los factores genéticos se suman al estilo de vida, dieta, enfermedades, infecciones y lesiones previas, lo cual lleva a la conclusión de que la enfermedad desarrollada en la vejez (Enfermedad de Alzheimer de desarrollo tardío, por sus siglas en inglés LOAD) es de origen multifactorial.

Diferentes estudios han determinado que la exposición a un ambiente enriquecido favorece la activación de diversas regiones cerebrales y el retraso de la aparición de los problemas cognitivos en enfermedades neurodegenerativas. Los ratones modelos de la EA que son expuestos a un AE presentan un retraso en la deposición de placas β A, incremento en la neurogénesis hipocampal, incremento en la actividad fagocítica de la microglía y mejora en las pruebas de memoria y aprendizaje (Hüttenrauch et al., 2017; Nithianantharajah & Hannan, 2006b; Ziegler-Waldkirch et al., 2018).

La microglía, el macrófago residente en el SNC, es la primera línea de defensa ante un desbalance homeostático tal como el que se presenta en la EA. Se ha observado que la deposición del péptido β A induce la transición de la microglía homeostática a DAM1. Esta puede llegar a ser protectora durante la progresión temprana de la enfermedad, mientras que en etapas tardías, cuando la acumulación de las placas β A activa el inflammasoma de la microglía, DAM se desregula y acelera la enfermedad. Cuando la transición hacia DAM2 no es rápida, el fenotipo DAM1 no es suficiente para contener el daño y contribuye al mismo (Deczkowska, Keren-Shaul, et al., 2018; Keren-Shaul et al., 2017)

Los péptidos β A activan a la microglía a través de TLRs lo que induce la expresión de citocinas inflamatorias como TNF- α e IL-6 que activan el inflammasoma NLRP3 lo que resulta en la activación de caspasa-1 y producción de IL-1 β e IL-18, que a su vez incrementan la producción de TNF- α favoreciendo el ambiente inflamatorio. Se ha demostrado que la activación del inflammasoma conlleva a una disminución en el flujo autofágico de la microglía. La acumulación de las placas β A, y la incapacidad de la microglía para fagocitarlas, deteriora la función neuronal y eventualmente lleva a la pérdida de la memoria (Álvarez-Arellano et al., 2018).

Lo anterior propone que acelerar la transición a DAM2 en etapas tempranas de la enfermedad puede contender con la neurodegeneración tan pronto como esta se desarrolle, previniendo el daño al SNC. La enfermedad de EA es una enfermedad heterogénea en donde múltiples factores detrimentales contribuyen a la pérdida cognitiva y al escalamiento de la enfermedad. Por tanto, tener como blanco terapéutico a cualquiera de los factores principales por separado (péptido β A, tau o neuroinflamación) —aunque se observen resultados preliminares exitosos—, puede que no sea suficiente para contender con la enfermedad eficazmente. Por consiguiente, en este estudio quisimos evaluar si un acercamiento de naturaleza holística, tal como el ambiente enriquecido, es capaz de llevar a la modulación de la protección intrínseca del SNC suficiente para acelerar la progresión de las etapas de DAM durante la EA.

En nuestras condiciones, si bien no logramos recapitular el deterioro cognitivo en edad adulta (6 meses), sí logramos recapitular el deterioro cognitivo y fisiológico en etapas de vejez (12 meses), tal como deposición de placas β A, deterioro en el aprendizaje y en la memoria de reconocimiento y espacial. De acuerdo con nuestra hipótesis, observamos que someter a los ratones 5xFAD a un ambiente enriquecido mejora las capacidades cognitivas, regula los niveles de ansiedad y restaura la memoria a corto y largo plazo en ratones envejecidos.

Una de las pruebas más usadas en la neurobiología para poder evaluar la memoria y el aprendizaje de modelos murinos es la prueba de reconocimiento de objetos novedosos (RON). Durante la prueba de RON, la memoria se consolida y las características espaciales o contextuales de los objetos pueden ser recolectadas en diferentes partes del cerebro. Este procesamiento de la memoria se conoce como consolidación y está involucrada en la organización de las memorias previamente formadas, permitiendo la incorporación de nueva información. La consolidación de la memoria parece ser dependiente del hipocampo ya que se sabe que la tasa de neurogénesis en esta área está relacionada con la consolidación de la memoria espacial (Antunes & Biala, 2012b). En el lóbulo temporal medial existe un grupo de estructuras —particularmente el hipocampo y áreas corticales adyacentes incluyendo la corteza entorrinal, perirrinal y parahipocampal— involucradas en la función normal de la memoria. El hipocampo recibe entradas de la corteza perirrinal, que en sí misma es el sitio de muchas entradas de información como estímulos visuales, olfatorios y somatosensoriales, todos involucrados en el reconocimiento de objetos (Oliveira et al., 2010). Durante el desarrollo de EA el hipocampo es una de las áreas más fuertemente afectadas, por ende, la pérdida de memoria es de los primeros síntomas reportados por los pacientes de EA (Antunes & Biala, 2012b; Jahn, 2013). El patrón individual de daño cognitivo se correlaciona con los parámetros

de integridad y funcionalidad del cerebro. En etapas avanzadas de la EA – donde el ambiente inflamatorio está consolidado – se compromete la formación de la memoria desde el nivel molecular hasta las vías estructurales neuronales (Jack et al., 2013). Por tanto, las pruebas de RON permiten, a través de una prueba conductual, evaluar el progreso de la enfermedad, el nivel de daño y sobre todo la efectividad de las terapias a estudiar. Con base en esta información proponemos que el AE es capaz de actuar a los distintos niveles para favorecer la capacidad de la memoria y aprendizaje durante la vejez incluso en el modelo de la AE.

Estudios previos han reportado pérdida de las capacidades cognitivas desde edades tempranas (5 meses) en el modelo 5xFAD (Álvarez-Arellano et al., 2018) en fondo híbrido (C57/SJL) tal como se usó en este estudio. Sin embargo, nosotros no observamos diferencias en la memoria espacial (LAM) ni visual (ON) entre los ratones silvestres (WT) y los 5xFAD expuestos a distintos ambientes (AN y AE) a la edad de 6 meses; esto a pesar de que se confirmó la presencia del gen *APP* (a través de PCR) y de placas β A (a través de tinción con tioflavina), a dicha edad. La discordancia entre resultados reportados previamente en la literatura (Álvarez-Arellano et al., 2018) y el presente estudio puede deberse a diversos factores que puedan llegar a interferir con la estabilidad del genotipo de los ratones tales como contaminación genética o la inserción de la mutación en algunos genes que determinan el fenotipo transgénico (Kelmenson, 2016).

La contaminación genética es la introducción accidental de alelos de una cepa a otra a través de errores en el cruzamiento. El fondo genético es crucial para la reproducibilidad de los resultados, ya que se sabe que diferentes fondos pueden impactar sobre el desarrollo del fenotipo transgénico o sobre la penetrancia del mismo (Doetschman, 2009). La inserción de mutaciones en genes que determinan el fenotipo puede darse debido a mutaciones espontáneas que se expanden en la colonia hasta que los ratones se vuelven homocigotos en ellas (Zeldovich, 2017). Para verificar la presencia del gen humano *APP* (introducido en el modelo transgénico 5xFAD) se evaluó su expresión en los ratones utilizados en el presente estudio a través de PCR punto final [ver anexos]. Tras verificar la presencia del gen *APP*, se realizaron cortes histológicos en el cerebro de ratones y se tiñó con tioflavina la corteza e hipocampo. Se verificó que los ratones 5xFAD tienen presencia de placas β A a los 6 meses de edad. Sin embargo, no se observó la pérdida cognitiva en estos últimos, por lo que probablemente la contaminación genética pudo haber tenido repercusión con la penetrancia del fenotipo, ya que este se observa meses después de lo esperado. Una de las formas de resolver este problema es “refrescar” la colonia, lo cual consiste en retrocruzar los ratones con la cepa endogámica control (se pueden comprar nuevos ratones del laboratorio que fabricó los primeros ratones transgénicos utilizados

en el laboratorio, en este caso Laboratorio Jackson), de esta forma se asegura que los ratones tengan el fenotipo transgénico y se mantiene la reproductibilidad de los datos.

En este estudio pudimos observar que a pesar de que la deposición de las placas β A se encuentra presente a los 6 meses, la pérdida de capacidades cognitivas es evidente hasta los 12 meses. Previamente en el laboratorio se observó que a pesar de que las placas β A son visibles a los 3 meses, se compromete la capacidad cognitiva hasta los 5 meses, lo anterior evaluado a través de la prueba de laberinto acuático de Morris (Álvarez-Arellano et al., 2018). De igual forma, estudios recientes han demostrado que a pesar de que la deposición de placas β A comienza a los 2 meses en el modelo 5xFAD (en fondo C57BL16/J), las fallas cognitivas en memoria y aprendizaje se observan hasta los 9 meses (Richard et al., 2015). Esto sugiere que en estos modelos la deposición de placas β A antecede a la aparición de la pérdida cognitiva como ocurre en el humano, en donde la mayor parte de los diagnósticos ocurre después de los 65 años mientras que el proceso neurodegenerativo que subyace la enfermedad neurodegenerativa comienza años o incluso décadas antes de que el diagnóstico clínico pueda ser realizado (Heneka, et al., 2015; Jack et al., 2013).

La EA además de afectar la memoria y el aprendizaje, induce cambios neuropsiquiátricos en los pacientes. Se observan síntomas conductuales y psicológicos severos en los pacientes con demencia, entre los cuales destacan la depresión, agitación, apatía, agresión, desinhibición, alucinaciones, delusiones, irritabilidad y labilidad emocional (Bhattacharya et al., 2014; Jawhar et al., 2012; Richard et al., 2015). Los síntomas representan un déficit común en la apropiada inhibición de las acciones dada por la pérdida del control y la reducción de la neurotransmisión de las entradas monoaminérgicas que regulan el circuito cortico-estriado (Keszycski et al., 2019). La desinhibición en los ratones modelos de EA, se manifiesta en conductas inapropiadas (como por ejemplo la falta de aversión a la exposición de lugares nuevos) y en el incremento en los niveles de euforia (Ognibene et al., 2005). Estudios previos han demostrado que los ratones 5xFAD muestran niveles disminuidos de ansiedad (conducta comparable con la desinhibición en pacientes con EA). Lo anterior evaluado a través de las pruebas de campo abierto (CA) y de laberinto de cruz elevada, en donde los ratones 5xFAD pasan más tiempo en las áreas desprotegidas (en el centro en el caso de CA y en los brazos abiertos en el caso de laberinto en cruz elevada) en oposición a las áreas protegidas, lo cual es indicativo de niveles decrementados de ansiedad (Jawhar et al., 2012).

Se ha observado que durante un proceso normal de envejecimiento, los ratones tienden a presentar niveles de corticosterona aumentados, por lo que al ser expuestos a un ambiente nuevo —como en el caso de la exposición al campo abierto— presentan niveles incrementados

de ansiedad (en comparación con ratones jóvenes) (Shoji et al., 2016). En concordancia con lo previamente reportado, nuestros datos indican que los niveles de ansiedad en ratones WT incrementan con la edad. A los 6 meses de edad todos los grupos mostraron niveles normales de ansiedad ya que, tal como se puede observar en la prueba de CA, los ratones pasaron la mayor parte del tiempo explorando la zona externa y poco tiempo explorando la zona centro. Sin embargo, conforme se da el proceso normal de envejecimiento se puede observar un incremento en los niveles de ansiedad ya que a los 12 meses de edad los ratones WT pasan menos tiempo en el centro en comparación con los ratones de 6 meses de edad.

Por otro lado, a los 12 meses de edad, los animales 5xFAD AN pasan de forma significativa más tiempo en el centro y menos tiempo en las zonas externas, lo cual se interpreta como conducta deshinibitoria o de ansiedad anormalmente baja. Se observa un decremento significativo en el tiempo en la zona centro en los ratones 5xFAD AE en comparación con los ratones 5xFAD AN. Es decir, el nivel de ansiedad de los ratones 5xFAD envejecidos logra recuperarse cuando estos son expuestos al ambiente enriquecido.

Posteriormente, se realizó la prueba de objetos novedosos en laberinto en Y que logra recapitular la memoria episódica de forma efectiva, ya que a los ratones se les permite la libre exploración en un ambiente no estresante en ausencia de refuerzos positivos o negativos. Aunado a esto, el componente espacial del laberinto en Y permite no sólo la discriminación de los objetos basada en familiaridad (como en el caso de la prueba de ON en CA) sino también la discriminación de los objetos basada en la recolección de experiencias pasadas (Krauter et al., 2018). Esta prueba permite la evaluación de distintas partes del cerebro, ya que la literatura menciona que el involucramiento del hipocampo es más sensible al arreglo espacial del objeto, mientras que el córtex perirrinal está más asociado a la naturaleza del objeto (familiar o nuevo) (Krauter et al., 2018).

Se ha reportado ampliamente que el hipocampo es una zona altamente activa durante la adquisición de información relacionada a objetos. Leger y colaboradores (2012), demostraron que la exposición a experiencias nuevas a través de la exposición a un AE lleva a un procesamiento más rápido de la información en el hipocampo. La actividad del hipocampo en ratones de AE se correlaciona con la actividad en regiones prefrontales (pre-límbica, infra-límbica y córtex cingulado anterior) que no se detecta en ratones AN. Por tanto, ellos proponen que las regiones prefrontales participan en las redes neuronales que conducen a una mejor adquisición de información relacionada con los objetos, en ratones expuestos a AE (Leger et al., 2012). Durante la fase de reconocimiento, los ratones de AE presentan activación del córtex infra-límbico (en el córtex prefrontal) y del hipocampo, lo cual no se observa en ratones AN.

En este estudio se lograron recapitular los efectos benéficos del AE en ratones envejecidos 5xFAD, en vista de que éstos, a diferencia de su contraparte en ambiente normal (5xFAD AN), lograron una mejor discriminación del objeto novedoso tanto a corto como a largo plazo. Uno de los principales factores a los cuales se le atribuye al AE la mejora en la memoria es la modulación en la neurogénesis, el incremento en la proliferación y supervivencia incrementada, y la sinaptogénesis en células del hipocampo. La exposición continua a distintos objetos (el factor de novedad) que se da en el AE modifica la actividad cerebral y los circuitos neuronales funcionales que se encargan de la adquisición y retención de la información, actividad que se ve severamente comprometida durante el desarrollo de la enfermedad de EA (Leger et al., 2015). Aunado a lo anterior, los animales expuestos al AE presentan una reducción en la actividad de la amígdala basolateral (involucrada en el procesamiento de la información emocional), es decir, el AE promueve la habilidad del animal a regular la conducta emocional durante la adquisición de información de un nuevo objeto, lo cual puede contribuir a la mejora de la memoria – esta región también está involucrada en la formación de la memoria a largo plazo– (Dupret et al., 2008; Girard et al., 2014; Leger et al., 2012). El AE modifica las redes neuronales asociadas a la prueba de ON, en particular la modulación hipocampal lo cual es crucial en los circuitos neuronales que llevan a la mejora de memoria debido a AE.

Un factor esencial que evaluar en modelos murinos de neurodegeneración – aunado a la cognición y ansiedad de los ratones– es la integridad motora, los reflejos y el correcto funcionamiento de las extremidades. Cuando se toma por la cola a los ratones y lentamente se les descende, estos tienden a extender las cuatro extremidades anticipando el contacto con una superficie, esta respuesta se desencadena por estímulos visuales o táctiles (por medio de las vibrisas o las patas) que dependen de vías de señalización de la médula espinal. Sin embargo, en muchos ratones modelos de enfermedades neurodegenerativas se presenta cierre de extremidades en lugar de extensión. El cierre de extremidades en roedores puede recapitular deficiencias motoras observadas en pacientes en etapas avanzadas de la EA, como reflejo de agarre, trastorno de la marcha y distonía. Se ha observado que el cierre en las extremidades posteriores se desarrolla como un reflejo de la acumulación de las placas β A en las neuronas motoras de la médula espinal. Esta conducta se asocia a lesiones en cerebelo, ganglio basal y neocortex, mediada por cambios en la transmisión monoaminérgica de noradrenalina y 5HT (Lalonde & Strazielle, 2011c; Miedel et al., 2017).

De manera interesante, observamos que el AE logró disminuir la severidad del cierre de extremidades en los ratones 5xFAD en comparación con los 5xFAD AN. Estudios previos han demostrado que estas deficiencias se correlacionan con la formación de esferoides axonales en

cerebro y en médula espinal. La presencia de β A intraneuronal en neuronas motoras de la médula espinal puede llevar a una discapacidad en el transporte axonal, tal como ocurre en pacientes de esclerosis lateral amiotrófica (ELA) en donde el péptido β A se acumula en neuronas motoras lumbares causando déficit de transporte axonal (Jawhar et al., 2012). Lo anterior evidencia que los efectos benéficos del AE no sólo inciden en la actividad fagocítica de la microglía sobre los depósitos extracelulares de péptido β A, sino también sobre la acumulación intracelular. Se puede observar que en los grupos silvestres control también se presenta cierto grado de cierre de extremidades, sin embargo, se ha observado previamente que la presencia de *clasp* en animales silvestres *c57b6/sjl* de fondo híbrido (en un porcentaje significativamente menor que los ratones modelos de neurodegeneración), probablemente exista como consecuencia del gen *Sjl*. Esta conducta también se le suele atribuir a la mutación *SWE* ya que se relaciona con una concentración mayor de niveles de 5HT (Lalonde et al., 2012; Lalonde & Strazielle, 2011c).

Dado que pudimos verificar que el ambiente enriquecido tiene la capacidad de mejorar parámetros de memoria y aprendizaje en el ratón modelo de la EA y con el antecedente inmediato de que la EA induce un cambio en el perfil de la microglía directamente relacionado con la progresión de la enfermedad (Keren-Shaul et al., 2017), decidimos investigar si parte del mecanismo molecular por medio del cual el AE ejerce su efecto protector es a través de modular el estado de activación de la microglía asociado a neurodegeneración, DAM. Se evaluaron tres genes que cambian su expresión en cada una de las etapas DAM: *Trem2*, *Cx3Cr1* y *Tyrbp*, junto con tres genes control que mantienen su expresión sin importar el estado de activación de la microglía *Iba1* (gen normalizador), *ActB* y *CD45*. La exposición al AE, tuvo un impacto significativo sobre la expresión de los tres genes evaluados asociados a DAM. La activación de la microglía es esencial para la contención de la enfermedad, sin embargo, esta activación es insuficiente cuando no se logran extender a tiempo los programas adecuados encaminados a la resolución del insulto tales como la migración de la microglía hacia la fuente del daño, secreción de citocinas inflamatorias e incremento en la fagocitosis. Tal es el caso de los estados de activación de la microglía DAM, en donde se ha observado que esta despliega un perfil inflamatorio (DAM1) necesario para poder desplegar el incremento en la fagocitosis, proliferación y agrupamiento alrededor de placas β A, propio de DAM2, el cual es dependiente de la señalización por medio de *Trem2* (Keren-Shaul et al., 2017).

Tal como indican nuestros datos, se puede observar que los ratones 5xFAD-AN presentan un incremento significativo en la expresión de *Trem2* con respecto a los ratones WT-AN. De forma interesante este marcador incrementa en un factor de dos en los ratones 5xFAD

AE. *Tyrobp* es un adaptador microglial, citoplasmático para *Trem2* y otros receptores (como CR3) que promueve la fagocitosis y la proliferación microglial necesario para limitar el crecimiento de los depósitos de péptido β A (Audrain et al., 2020). En la transición de la microglía homeostática hacia DAM, *Tyrobp* se regula positivamente antes que *Trem2* (Audrain et al., 2020) por tanto, es de llamar la atención el incremento significativo en la expresión de *Tyrobp* en los animales 5xFAD con respecto al resto de los grupos ya que dichos marcadores además de encontrarse relacionados al desarrollo y progreso de la enfermedad, se han visto implicados con la regulación de los niveles de ansiedad (Castranio et al., 2017)

Trem2 es un regulador negativo de la autoinmunidad y juega un papel en la inhibición de IL6 y TNF- α . La expresión de *Trem2* en la microglía y en los macrófagos se asocia específicamente con un fenotipo activado, que desempeña funciones protectoras como reparación del tejido, control de la inflamación local y la promoción de fagocitosis de células apoptótica (Mecca et al., 2018a).

Estudios recientes demuestran que neuronas apoptóticas desencadenan la señalización de *Trem2-Apoe* lo que suprime la firma homeostática que es altamente regulada por *Tgf- β* . Krasemann y colaboradores, observaron en un modelo neurodegenerativo de esclerosis lateral amiloidotrópica (ASL por sus siglas en inglés), que la activación de *Trem2* mediada por *Apoe* impide que la microglía pueda prevenir la pérdida neuronal, regula negativamente los genes homeostáticos e impide que se provean señales tolerogénicas a células T (*ex vivo*). Ellos proponen que tener como blanco a esta vía, es decir buscar la regulación negativa de *Trem2* (para evitar la vía de señalización mediada por *Apoe*) puede restaurar la homeostasis en la microglía para tratar desórdenes neuronales tales como los que se observan en ALS (Krasemann et al., 2017). Por otro lado, Wang y colaboradores demostraron en un modelo neurodegenerativo de EA que los niveles de *Trem2* mejoran la respuesta neuroinflamatoria y el daño cognitivo a través de la inhibición de la vía de señalización Pi3k/Akt/Foxo3. En el estudio antes mencionado se demostró —en concordancia con los resultados aquí presentados— que los niveles de *Trem2* se ven incrementados en el hipocampo de ratones 5xFAD mientras que su inhibición agrava el aprendizaje y el déficit cognitivo. El mismo estudio demostró en microglía inducida con LPS que la sobreexpresión de *Trem2* regula negativamente la microglía con fenotipo M1 (pro-inflamatorio), la expresión de IL-6, IL-1B y TNF- α al mismo tiempo que incrementa la microglía con fenotipo M2 (neuroprotector), por lo que sugieren que la regulación positiva de *Trem2* puede inhibir la neuroinflamación y mejorar las capacidades cognitivas en ratones modelo de EA (Wang et al., 2020).

A pesar de que hay literatura controversial acerca del papel de *Trem2* en la neuroprotección de la microglía, diversos autores proponen que no es solo la presencia o ausencia de la expresión del gen sino la temporalidad de esta y la naturaleza del insulto (Jay et al., 2017). En este estudio encontramos que el ambiente enriquecido es capaz de lograr un incremento significativo de la expresión de *Trem2* tanto en ratones WT como en ratones 5xFAD (hasta en un factor de tres en comparación con su contraparte expuesta a AN). Este incremento se correlaciona con una mejora cognitiva tanto en la memoria a corto plazo como en la memoria a largo plazo.

Los receptores tipo Toll y tipo NOD se han implicado previamente en la respuesta de la microglía a la acumulación de β A y se ha visto que median la respuesta inflamatoria que contribuye a la patología (Becher et al., 2017). Para mantener la secreción de las citocinas, estos receptores llevan a cabo una reprogramación metabólica, que consiste en un intercambio del metabolismo de ácidos grasos y fosforilación oxidativa hacia glicólisis. *Trem2* emerge como un receptor del sistema inmune innato que impacta sobre el metabolismo de la microglía a través de la activación de mTOR que desencadena y regula el tropismo celular a largo plazo, la supervivencia, crecimiento y proliferación en lugar de reprogramar de forma drástica el metabolismo. Los fosfolípidos de membrana y partículas lipoproteicas pueden unirse continuamente a *Trem2* induciendo la señalización de mTOR a través de activadores corriente arriba como Pi3k, Pkd1 y Akt, que son reclutados por Dap12 (Tyrobp) y Dap10 (Ulland et al., 2017). Esto puede explicar el impacto de *Trem2* sobre distintas funciones microgliales, como supervivencia, proliferación, agrupamiento alrededor de placas β A al igual que fagocitosis de células apoptóticas y desechos celulares de mielina. Estudios recientes concuerdan con que el incremento en la expresión de *Trem2* en modelos de inflamación y neurodegeneración se correlacionan con la capacidad de mejorar las capacidades cognitivas (memoria y aprendizaje) a través de mantener un estado anti-inflamatorio M2 (Medrano-Jiménez et al., 2019; Wang et al., 2020).

Se ha demostrado que la activación de *Trem2* lleva a la fosforilación de Tyrobp vía cinasas SRC, iniciando señalización corriente abajo de Pi3, Pkc y Erk (Mecca et al., 2018a). De igual forma se sabe que la unión de *Trem2* a lípidos negativamente cargados, resulta en la fosforilación de Tyrobp, activación de SYK y de la vía de señalización SYK-RAS-ERK, remodelamiento de actina y movilización de calcio necesaria para la fagocitosis (Colonna & Wang, 2016)

La deficiencia de *Trem2* lleva a una regulación negativa de Wnt/ β catenina, pero no de otras cinasas, junto con un decremento en la supervivencia y promoción de la muerte celular de

la microglía. Trem2 interactúa con Dap12 y activa la señalización de Pi3k/Akt, inactivando Gsk3b y estabilizando β -catenina. La inhibición de *Gsk3B* determina la acumulación y estabilización de β -catenina y transloca dentro del núcleo, en donde se une a factores de transcripción promoviendo la expresión de genes de supervivencia, pro mitóticos y antiapoptóticos. La activación de Pi3k/Akt a través de Trem2 contribuye a la regulación de Nfkb y a la expresión de genes inflamatorios. Esta vía de señalización también inhibe la señalización de TLR al bloquear la señal Mapk a nivel de Raf (Mecca et al., 2018a; Peng et al., 2010; Wang et al., 2016).

El AE induce un incremento en un factor de 10 en la expresión de *Tyrobp* en los ratones 5xFAD en comparación con su contraparte de AN. *Tyrobp* es un polipéptido de señal transmembranal de 113 aminoácidos que debido a su corto dominio extracelular, no tiene capacidad de unión a ligando, sin embargo, forma complejos con receptores asociados y transduce la señal al citoplasma (Mecca et al., 2018b). *Tyrobp* tiene un dominio de activación inmunoreceptores basada en tirosina (ITAM) en el dominio citoplasmático, se expresa en la microglía en el cerebro y sirve como adaptador para una variedad de receptores inmunitarios incluyendo Trem2 y receptor de complemento 3 (Cr3). *Tyrobp* se une a Trem2 a través de residuos de cargas opuestas en sus dominios transmembranales (Ford & McVicar, 2009). Por tanto, es posible que aunque en los ratones 5xFAD AN se observe una expresión alta de Trem2, esta no pueda llegar a señalizar por la falta del adaptador que transduce la señal. Tras la unión del ligando a Trem2, los residuos de tirosina dentro del dominio ITAM de *Tyrobp* se fosforilan, reclutando a la quinasa Syk para activar moléculas de señalización corriente abajo, como la proteína cinasa regulada por señal extracelular (Erk), la fosfatidilinositol 3-quinasa (Pi3k), la fosfolipasa C γ (Plc γ) y Vav (Konishi & Kiyama, 2018).

En los ratones 5xFAD la expresión de *Tyrobp* se logra incrementar de forma significativa tras la exposición al ambiente enriquecido, lo cual se da de forma paralela al incremento en la expresión de *Trem2*. La regulación positiva de *Tyrobp* es un marcador temprano de la microglía reclutada, este es un adaptador para muchos otros receptores (como receptores SIGLEC) que pueden tener la capacidad de sensar la deposición de placas β A incluso en ausencia de Trem2. Tanto Trem2 como CD33 interactúan con *Tyrobp* (directamente y a través de factores de señal intracelular comunes respectivamente). Audrain y colaboradores proponen que Cd33 actúa corriente arriba de Trem2 y que la interacción de Apoe con *Tyrobp* (independiente de Trem-2) puede ser un evento temprano o incluso iniciador de la transición de la microglía homeostática a la microglía DAM. Se propone que *Tyrobp* puede jugar un papel central en una alternativa y temprana en el sensoma de la microglía (Audrain et al., 2020). Por

lo tanto, es posible que el incremento significativo de *Tyrobp* inducido por el AE sea suficiente para acelerar la transición hacia DAM en etapas tempranas para poder desplegar el fenotipo protector.

Tal como se puede observar, hubo un incremento significativo en la expresión de *Cx3cr1* en corteza de ratones 5xFAD AN en comparación con todos los demás grupos. La señal en el SNC entre la fractalquina (*Cx3cl1*) y su receptor (*Cx3cr1*) representa una vía de comunicación sumamente importante entre las neuronas y la microglía ya que esta vía media la quimiotaxis de la microglía hacia el sitio de daño (Wu et al., 2013). A pesar de que usualmente se correlaciona su expresión con microglía homeostática (Guedes et al., 2018), su sobreexpresión en algunos casos puede llegar a ser detrimental. De forma intuitiva se esperaría que *Cx3cr1* al ser un marcador asociado a microglía en estado homeostático tenga una regulación negativa en su expresión en etapas avanzadas de la enfermedad. Sin embargo, en concordancia con nuestros resultados, estudios previos han observado un incremento en la expresión de *Cx3cr1* en cerebro de ratones 5xFAD, probablemente como resultado de un esfuerzo compensatorio de la microglía para reestablecer el balance alterado por la pérdida de neuronas productoras de *Cx3cr1* (González-Prieto et al., 2021).

En el presente estudio observamos que el incremento en su expresión se relaciona con el deterioro cognitivo y con la inhibición de la ansiedad de los ratones 5xFAD. La exposición al AE tiene la capacidad tanto de mejorar los niveles cognitivos como de regularizar los niveles de ansiedad (reducción del fenotipo inhibitorio) en los ratones 5xFAD en comparación con los ratones 5xFAD AN. La sobreexpresión de *Cx3cr1* logra restaurarse a niveles comparables con los WT cuando los ratones son expuestos a AE.

Se ha observado que la sobreexpresión de *Cx3cr1* hace menos efectiva la fagocitosis microglial, por tanto previene una correcta eliminación del péptido β A probablemente debido a que la señalización entre la fractalquina y su receptor establece un ambiente permisivo para la deposición de las placas β A (Lee et al., 2010).

Se ha reportado previamente que *Cx3cr1* tiene un claro papel en mantener la microglía en estado homeostático en condiciones fisiológicas. Sin embargo, la desregulación del eje *Cx3cl1/Cx3cr1* en modelos de la EA (en condiciones de patología) puede tener efectos tanto neuroprotectores como neurotóxicos dependiendo del modelo murino y de la temporalidad de la enfermedad (Guedes et al., 2018). La fractalquina con expresión neuronal, es una quimiocina que junto con su receptor (*Cx3cr1*) que se expresa en microglía, juegan un papel importante en la neuroinflamación a través de señalización paracrina entre las neuronas y la microglía. La fractalina puede señalizar a través de su receptor en su forma anclada a membrana o como

ligando secretado por la escisión secuencial de las metaloproteasas Adam10 y Adam17. Se ha demostrado previamente que en modelos murinos de la EA (APP/PS1, R1.40, 3xTg, y 5xFAD) la deficiencia de Cx3cr1 disminuye la deposición del péptido β A, incrementa la expresión de TNF- α aa y Ccl2, y disminuye la activación microglial observada a través de Cd68 (A. E. Cardona et al., 2006; Fuhrmann et al., 2010; Keren-Shaul et al., 2017; Lee et al., 2010). El efecto de la deficiencia del receptor aparentemente depende de la naturaleza del insulto. Se sabe que disrupciones en la señalización Cx3cl1/Cx3cr1 promueven neurodegeneración en modelos de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica y neuroinflamación inducida por la administración de LPS. De acuerdo con estas observaciones, ratones *Cx3cr1*^{-/-} muestran una desregulación de la respuesta microglial que conlleva a una neurotoxicidad significativa en modelos de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica y neuroinflamación inducida por la administración de LPS (Zhou et al., 2019). Estos datos demuestran el efecto neuroprotector de *Cx3cr1*.

En modelos de EA, la acumulación de β A se asocia con estrés neuronal y con la liberación proteolítica de Cx3cl1 lo que promueve el reclutamiento de la microglía hacia las neuronas dañadas. Estudios previos proponen que la señalización Cx3cl1/Cx3cr1 regula la capacidad fagocítica de la microglía ya que se ha observado que el tratamiento de microglía primaria (WT) con Cx3cl1 lleva a una reducción del 50% en el número de microesferas fagocitadas, mientras que la capacidad fagocítica en microglía *APP/PS1 Cx3cr1*^{-/-} tratada con Cx3cl1 no cambia, indicando que la reducción en la fagocitosis microglial es mediada por el receptor (Cardona et al., 2018). También se ha observado que cerca del 60% de la microglía que se encuentra alrededor de placas β A en ratones *APP/PS1 Cx3cr1*^{-/-} son fagocíticas, mientras que en ratones *APP/PS1 Cx3cr1*^{+/+} solo el 16% lo es. Es decir la señalización de Cx3cl1/Cx3cr1 inhibe la fagocitosis microglial (Hickman et al., 2019). Por otro lado, Fuhrman y colaboradores (2010) proponen que la comunicación de la fractalquina con su receptor no incide sobre la capacidad fagocítica de la microglía debido a que el *KO* de *Cx3cr1* no observaron cambios en los niveles elevados de AB en el ratón modelo 3tg (*PSEN/APP/Tau*), pero el *KO* de *Cx3cr1* logró restaurar la pérdida neuronal, por tanto proponen que el receptor incide sobre la capacidad de la microglía para contribuir con la pérdida neuronal (Fuhrmann et al., 2010).

En concordancia con los resultados aquí presentados, se ha observado que la acumulación de placas β A induce la producción de Cx3cr1 en corteza total de ratones y de humanos (González-Prieto et al., 2021). Esta producción es proporcional al grado de progresión de la enfermedad. Se propone que la señalización de CX3CL1-CX3CR1 establece un entorno permisivo para la deposición de β A en los cerebros de pacientes con EA y modelos de ratones transgénicos, al regular negativamente la respuesta fagocítica microglial de las placas de β A y

promover la muerte neuronal (González-Prieto et al., 2021). Se observó que la exposición al AE logró mantener los niveles de *Cx3cr1* en ratones 5xFAD en una proporción comparable con la de ratones WT AE y AN (no se observaron diferencias significativas en cuanto a la expresión del marcador entre las dos condiciones de habitación en ratones silvestres). De acuerdo con estos resultados, el incremento en la expresión del receptor de fractalquina acelera el desarrollo de la enfermedad. Es importante recalcar que para determinar si esta respuesta desfavorable, dada por el incremento en la expresión de *Cx3cr1* en los ratones 5xFAD AN, es mediante el incremento de la microglía reclutada que contribuye con la muerte neuronal, o si es sobre la capacidad decrementada de la microglía para fagocitar el péptido β A, es necesario evaluar —a través de ensayos inmunohistoquímicos— la cantidad de placas β A y los niveles de muerte neuronal. Sin embargo, con los datos presentados, es posible concluir que el decremento de la señal del receptor, gracias a la exposición al AE, tiene efectos benéficos sobre la cognición y los niveles de ansiedad en el modelo murino de AE. El incremento de la expresión debido a la deposición del péptido β A probablemente se debe a un incremento en la acetilación de la histona H3 en la región promotora de *Cx3cr1* ya que se sabe que la supresión de este gen rescata las capacidades cognitivas, la activación de la microglía y la expresión de *Il-1 β* (Wu et al., 2013).

A través de este estudio es posible observar que el ambiente enriquecido tiene la capacidad de cambiar el perfil de expresión génica de marcadores asociados con un cambio en el estado de activación de la microglía asociada a la enfermedad (DAM). El AE tiene la capacidad de acelerar la transición hacia un fenotipo DAM2 caracterizado por un incremento en la capacidad fagocítica mediado por incremento en la expresión de *Trem2* y *Tyrobp*, y un decremento en la expresión de *Cx3cr1* que correlacionan con la mejora en las capacidades cognitivas y en los niveles de ansiedad de ratones 5xFAD.

Se ha observado que la microglía que despliega el fenotipo DAM suele estar asociada con una cercanía espacial a las placas β A. Sin embargo, cabe resaltar que dichos estudios suelen evaluar no solo la población de microglía, sino la subpoblación de la microglía que despliega el fenotipo DAM a través de RNA-seq de una sola célula (Keren-Shaul et al., 2017). En el presente estudio se realizó un análisis en la expresión a través de los niveles de mRNA totales en corteza, de forma indirecta se evaluaron todas las poblaciones celulares que expresan los marcadores de DAM. No obstante, este análisis general del cerebro fue capaz de recapitular los resultados de análisis de una sola célula con el uso de marcadores específicos de microglía en SNC.

XI. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos podemos concluir:

- Se logró estandarizar un método eficaz para evaluar la expresión de distintos marcadores de la microglía asociada a la enfermedad a partir de muestras de tejido murino.
- El ambiente enriquecido modula la expresión de los tres genes evaluados asociados a DAM2.
- El ambiente enriquecido normaliza los niveles de ansiedad en ratones 5xFAD (en niveles comparables con los WT).
- El ambiente enriquecido rescata las capacidades cognitivas en el modelo murino de la enfermedad (5xFAD).
- Proponemos que el ambiente enriquecido ejerce un efecto neuroprotector a través de modular el estado de la activación de la microglía.

XII. PERSPECTIVAS

Dado que existen evidencias de que el ambiente enriquecido modula la expresión de genes asociados a DAM, es necesario evaluar el mecanismo molecular a través del cual ejerce este efecto. Estudios de transcriptómica y del estado de remodelación de la cromatina, tras la exposición al ambiente enriquecido, permitirían identificar los genes y las vías de señalización que participan en esta rápida transición de DAM1 a DAM2. De igual forma, es necesario evaluar el estado inflamatorio de los ratones estudiados —a través de medir los niveles de citocinas— y la deposición de las placas β A —a través de ensayos de inmunohistoquímica— para validar los efectos benéficos del ambiente sobre la etiología de la enfermedad, así como el estado de la cromatina para determinar si el ambiente enriquecido ejerce su efecto a nivel epigenético.

XIII. ANEXO

I. METODOLOGÍA PARA LA GENOTIPIFICACIÓN

Para la genotipificación se realizó extracción de DNA a partir de tejido. Se cortó un fragmento de cola del animal y se adicionaron 500 μ L de SDS al 4%, 10 mL de pronasa y se incubó a baño maría por 12 hrs. Se adicionaron 200 μ L de NaCl 3M, se mezcló por inversión, se incubó en hielo durante 15 min y se centrifugó durante 20 min. a 14,500 rpm.

Tabla 1 | Mezcla de reacción para PCR punto final **Tabla 2** | Secuencia de oligos *Pde6B*

Reactivo	1x (μ L)	
Buffer 10x	2.0	
MgCl ₂ (30 mM)	1.0	
dNTPs (10 mM)	1.0	
Oligos	WT	0.6
	Comp	0.6
	Mut	0.6
Taq Pol	0.5	
DNA (50 ng/ μ L)	2.0	
H ₂ O miliQ	11.7	

Oligo	Secuencia
Silvestre (WT) <i>Pde6b</i>	ACC TGC ATG TGA ACC CAG TAT TCT ATC
Mutante (Mut) <i>Pde6b</i>	AAG CTA GCT GCA GTA ACG CCA TTT
Complementario (Comp) <i>Pde6b</i>	CTA CAG CCC CTC TCC AAG GTT TAT AG

Tabla 3 | Secuencia de oligos *Psen1* (5xFAD)

Oligo	Secuencia
<i>Psen1</i> Forward	GCC ATG AGG GCA CTA ATC AT
<i>Psen1</i> Reverse	AAT AGA GAA CGG CAG GAG CA

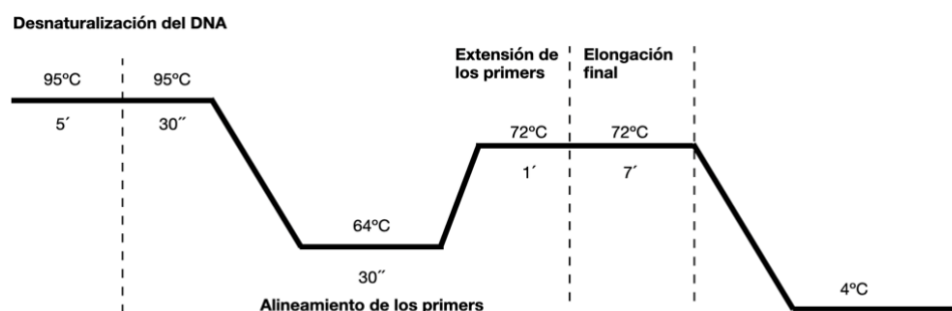


Figura 25 | Programación del termociclador para la genotipificación

Se recuperó el sobrenadante, se adicionaron 2 μ L de RNAsa y se incubó a 37°C durante 30 min. Posteriormente se agregaron 900 μ L de EtOH al 100% y se incubó a -20°C por 12 hrs. Se centrifugó durante 20 min a 14,500 rpm, se descartó el sobrenadante y se adicionaron 250 μ L de EtOH al 70%. Se centrifugó una última vez por 5 min a 15,500 rpm, se decantó el

sobrenadante, se dejó secar por 5 min, se resuspendió en 50 μ L de H₂O milliQ y se cuantificó por medio de espectrofotometría en un equipo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

Para la PCR se utilizaron 2 μ g de DNA en una mezcla de reacción de 20 μ L (Ver Tabla 1). Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador con la programación que se muestra en la Fig. XIV-1. Finalmente los productos fueron separados en un gel de agarosa al 1.5% que se tiñó durante 15 min en una solución de BrEth.

Tabla 4 | Mezcla de reacción para PCR punto final

Reactivo		1x (μ L)
Buffer 10x		2.0
MgCl ₂ (30 mM)		1.0
dNTPs (10 mM)		1.0
Oligos	FW	0.6
	RV	0.6
Taq Pol		0.5
DNA (50 ng/ μ L)		2.0
H ₂ O miliQ		11.7

Tabla 5 | Secuencia de oligos para APP

Oligo	Secuencia
APP Fw	AGG ACT GAC CAC TCG ACC AG
APP Rv	CGG GGG TCT AGT TCT GCA T

Para verificar la presencia del transgen *APP* en la colonia de ratones se genotificaron 4 animales (2 WT y 2 5xFAD), por medio de la técnica antes descrita, con los oligos para el gen *APP* humano que expresan los utilizados. Se muestra el gel de agarosa con la expresión de los genes *APP* y *Psen1* (Figura 26).

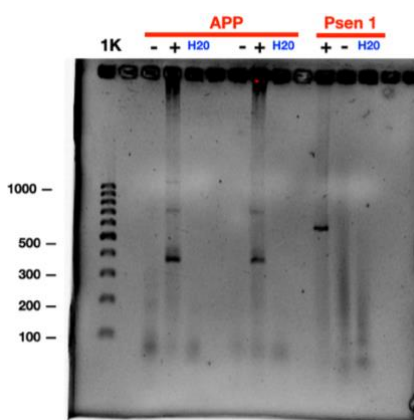


Figura 26 | Gel de poliacrilamida para validar la expresión de *APP* humano. Se muestran los 5xFAD (+) y WT (-)

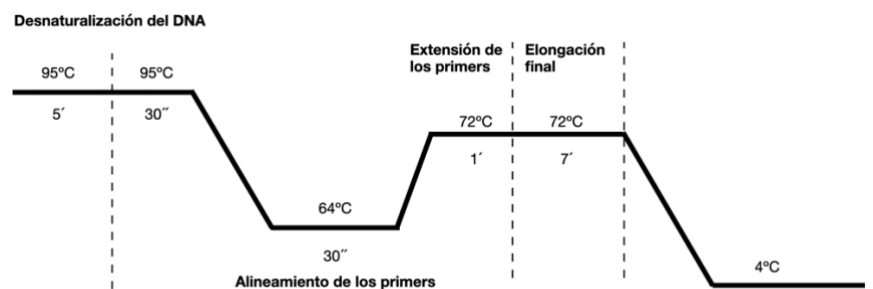


Figura 27 | Programación del termociclador para la expresión de *APP*

II. CONDICIONES DE RT-QPCR

Para la reacción de retrotranscripción se utilizó 1 μL de RNA (500 $\text{ug}/\mu\text{L}$), se agregaron los dNTPs, oligonucleótidos y RNA (tabla 1). Para la desnaturalización de RNA y alineamiento de oligos se incubó a 65°C por 5 min, inmediatamente después se incubaron las muestras por dos minutos en hielo. Se agregaron la enzima de RT y el buffer y se continuó con la reacción a 35°C por 2 hrs. Se realizó una dilución 1:10 del cDNA resultante. En la qPCR se utilizaron 2 μL de cDNA y 8 μL de la mezcla de reacción (los reactivos se muestran en la Tabla 2).

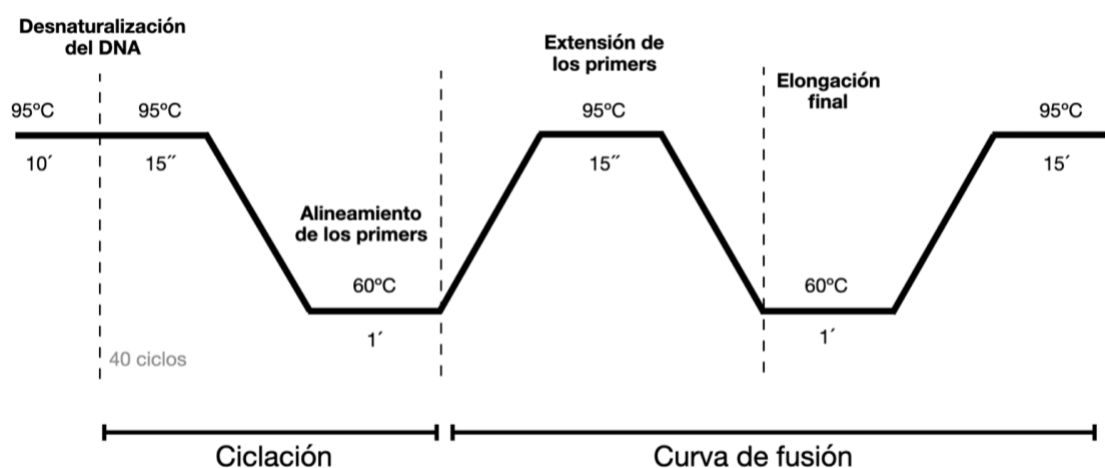


Figura 28 | Condiciones de amplificación para qPCR

Tabla 3 | Mezcla de reacción para la RT

Reactivo	1x (μL)
H2O	12
Random hexamers	0.5
Oligo DT	1
dNTPs	1
RNA (500 $\text{ug}/\mu\text{L}$)	1
5 min a 65°C	
5x Buffer RT	4
RT	0.5

Tabla 4 | Mezcla de reacción para qPCR

Reactivo	1x (μL)
H2O	2.5
Oligos (Fw y Rv)	0.5
SYBR™Green	5
cDNA	2

Tabla 6 | Secuencia de los oligos para DAM.

Primer	Secuencia	
Cx3cR1	Fwd	CAT CTG CTC AGG ACC TCA C
	Rvs	GTT CCA AAG GCC ACA ATG TC
Trem2	Fwd	GGA ACC GTC ACC ATC ACT C
	Rvs	GAT CTC CAG CAT CTT GGT CAT C
Tyrobp	Fwd	CCT TAT CAG GAG CTT CAG GG
	Rvs	GCT TGT TGA GTA GGC ATC TG
Cd45	Fwd	GGT GTC TAT GAT TCA GGA CCT C
	Rvs	GGC ACA GAA CAA CCC TGT
Iba1	Fwd	GAG GGG ATC AAC AAG CAA TTC
	Rvs	CAG CAT TCG CTT CAA GGA C

XIV. REFERENCIAS

- Aguzzi, A., Barres, B. A., & Bennett, M. L. (2013). Microglia: Scapegoat, Saboteur, or Something Else? *Science*, 339(6116), 156–161. <https://doi.org/10.1126/science.1227901>
- Ali, A. E. A. A., Wilson, Y. M., & Murphy, M. (2009). A single exposure to an enriched environment stimulates the activation of discrete neuronal populations in the brain of the fos-tau-lacZ mouse. *Neurobiology of Learning and Memory*, 92(3), 381–390. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2009.05.004>
- Álvarez-Arellano, L., Pedraza-Escalona, M., Blanco-Ayala, T., Camacho-Concha, N., Cortés-Mendoza, J., Pérez-Martínez, L., Pedraza-Alva, G., Pérez-Martínez, L., & Pedraza-Alva, G. (2018). Autophagy impairment by caspase-1-dependent inflammation mediates memory loss in response to β -Amyloid peptide accumulation. *Journal of Neuroscience Research*, 96(2), 234–246. <https://doi.org/10.1002/jnr.24130>
- Alzheimer's Research UK. (2012). Dementia Statistics. *Alzheimer's Disease International (ADI)*, 1–8. <https://www.alzint.org/about/dementia-facts-figures/dementia-statistics/>
- Amram, S., & Frenkel, D. (2017). Animal Models of Alzheimer's Disease. In *Neuroprotection in Alzheimer's Disease* (pp. 31–58). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803690-7.00003-X>
- Antunes, M., & Biala, G. (2012a). The novel object recognition memory: Neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cognitive Processing*, 13(2), 93–110. <https://doi.org/10.1007/s10339-011-0430-z>
- Antunes, M., & Biala, G. (2012b). The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cognitive Processing*, 13(2), 93. <https://doi.org/10.1007/S10339-011-0430-Z>
- Aranda, P. S., Lajoie, D. M., & Jorcyk, C. L. (2012). Bleach gel: A simple agarose gel for analyzing RNA quality. *Electrophoresis*, 33(2), 366–369. <https://doi.org/10.1002/elps.201100335>
- Audrain, M., Haure-Mirande, J.-V., Mleczko, J., Wang, M., Griffin, J. K., St George-Hyslop, P. H., Fraser, P., Zhang, B., Gandy, S., Ehrlich, M. E., & Peters, J. J. (2020). Reactive or transgenic increase in microglial TYROBP reveals a TREM2-independent TYROBP-APOE link in wild-type and Alzheimer's-related mice. <https://doi.org/10.1002/alz.12256>
- Becher, B., Spath, S., & Goverman, J. (2017). Cytokine networks in neuroinflammation. *Nature Reviews Immunology*, 17(1), 49–59. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.123>

- Blaylock, R. L. (2013). Immunology primer for neurosurgeons and neurologists part I: Basic principles of immunology. In *Surgical Neurology International* (Vol. 4, Issue 1). Scientific Scholar. <https://doi.org/10.4103/2152-7806.106564>
- Bonaccorsi, J., Cintoli, S., Mastrogiacomo, R., Baldanzi, S., Braschi, C., Pizzorusso, T., Cenni, M. C., & Berardi, N. (2013). System consolidation of spatial memories in mice: Effects of enriched environment. *Neural Plasticity*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/956312>
- 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. <https://doi.org/10.1017/S135561771700100X>
- Buchman, A. S., & Bennett, D. A. (2011). Loss of motor function in preclinical Alzheimer's disease. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 11(5), 665. <https://doi.org/10.1586/ERN.11.57>
- Butovsky, O., & Weiner, H. L. (2018). Microglial signatures and their role in health and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 19(10), 622–635. <https://doi.org/10.1038/S41583-018-0057-5>
- Cao, L., Choi, E. Y., Liu, X., Martin, A., Wang, C., Xu, X., & During, M. J. (2011). White to brown fat phenotypic switch induced by genetic and environmental activation of a hypothalamic-adipocyte axis. *Cell Metabolism*, 14(3), 324–338. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.06.020>
- Cao, L., Liu, X., Lin, E. J. D., Wang, C., Choi, E. Y., Riban, V., Lin, B., & During, M. J. (2010). Environmental and Genetic Activation of a Brain-Adipocyte BDNF/Leptin Axis Causes Cancer Remission and Inhibition. *Cell*, 142(1), 52–64. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.05.029>
- Cardona, A., Piro, E., Sasse, M., Kostenko, V., Cardona, S. M., Dijkstra, I. M., Huang, D., Kidd, G., Dombrowski, S., Dutta, R., Lee, J.-C., Cook, D. N., Jung, S., Lira, S. A., Littman, D. R., & Ransohoff, R. M. (2006). Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. In *Nature Neuroscience* (Vol. 9, Issue 7, pp. 917–924). <https://doi.org/10.1038/nn1715>
- Cardona, S. M., Kim, S. v., Church, K. A., Torres, V. O., Cleary, I. A., Mendiola, A. S., Saville, S. P., Watowich, S. S., Parker-Thornburg, J., Soto-Ospina, A., Araque, P., Ransohoff, R. M., & Cardona, A. E. (2018). Role of the fractalkine receptor in CNS autoimmune inflammation: new approach utilizing a mouse model expressing the human CX3CR1I249/M280 variant. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 365. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00365>
- Castranio, E. L., Mounier, A., Wolfe, C. M., Nam, K. N., Fitz, N. F., Letronne, F., Schug, J., Koldamova, R., & Lefterov, I. (2017). Gene co-expression networks identify Trem2 and Tyrobp as major hubs in human APOE expressing mice following traumatic brain injury. *Neurobiology of Disease*, 105, 1. <https://doi.org/10.1016/J.NBD.2017.05.006>
- Colonna, M., & Wang, Y. (2016). TREM2 variants: new keys to decipher Alzheimer disease pathogenesis. *Nature Reviews Neuroscience*, 17(4), 201–207. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.7>

- Cosenza-Nashat, M. A., Kim, M. O., Zhao, M. L., Suh, H. S., & Lee, S. C. (2006). CD45 Isoform Expression in Microglia and Inflammatory Cells in HIV-1 Encephalitis. *Brain Pathology*, *16*(4), 256. <https://doi.org/10.1111/J.1750-3639.2006.00027.X>
- Deczkowska, A., Amit, I., & Schwartz, M. (2018). Microglial immune checkpoint mechanisms. *Nature Neuroscience*, *21*(6), 779–786. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0145-x>
- Deczkowska, A., Keren-Shaul, H., Weiner, A., Colonna, M., Schwartz, M., & Amit, I. (2018). Disease-Associated Microglia: A Universal Immune Sensor of Neurodegeneration. *Cell*, *173*(5), 1073–1081. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.05.003>
- Doetschman, T. (2009). *Influence of Genetic Background on Genetically Engineered Mouse Phenotypes*. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-471-1_23
- Dunham, I., Kundaje, A., Aldred, S. F., Collins, P. J., Davis, C. A., Doyle, F., Epstein, C. B., Frietze, S., Harrow, J., Kaul, R., Khatun, J., Lajoie, B. R., Landt, S. G., Lee, B.-K., Pauli, F., Rosenbloom, K. R., Sabo, P., Safi, A., Sanyal, A., ... Birney, E. (2012). An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*, *489*(7414), 57–74. <https://doi.org/10.1038/nature11247>
- Dupret, D., Revest, J. M., Koehl, M., Ichas, F. F., de Giorgi, F., Costet, P., Abrous, D. N., Piazza, P. V., Giorgi, F. de, Costet, P., Abrous, D. N., & Piazza, P. V. (2008). Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. *PLoS ONE*, *3*(4), 1959. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001959>
- During, M., & Cao, L. (2006). VEGF, a Mediator of the Effect of Experience on Hippocampal Neurogenesis. *Current Alzheimer Research*, *3*(1), 29–33. <https://doi.org/10.2174/156720506775697133>
- Esquerda-Canals, G., Montoliu-Gaya, L., Güell-Bosch, J., & Villegas, S. (2017). Mouse Models of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *57*(4), 1171–1183. <https://doi.org/10.3233/JAD-170045>
- Ford, J. W., & McVicar, D. W. (2009). TREM and TREM-like receptors in inflammation and disease. In *Current Opinion in Immunology* (Vol. 21, Issue 1, pp. 38–46). <https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.01.009>
- Fuhrmann, M., Bittner, T., Jung, C. K. E., Burgold, S., Page, R. M., Mitteregger, G., Haass, C., Laferla, F. M., Kretschmar, H., & Herms, J. (2010). Microglial Cx3cr1 knockout prevents neuron loss in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature Neuroscience*, *13*(4), 411–413. <https://doi.org/10.1038/nn.2511>
- Fuhrmann, M., Bittner, T., Jung, C. K. E. E., Burgold, S., Page, R. M., Mitteregger, G., Haass, C., LaFerla, F. M., Kretschmar, H., & Herms, J. (2010). Microglial Cx3cr1 knockout prevents neuron

- loss in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature Neuroscience*, *13*(4), 411–413. <https://doi.org/10.1038/nn.2511>
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M. F., Conway, S. J., Ng, L. G., Stanley, E. R., Samokhvalov, I. M., & Merad, M. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*, *330*(6005), 841–845. <https://doi.org/10.1126/science.1194637>
- Girard, S. D., Jacquet, M., Baranger, K., Migliorati, M., Escoffier, G., Bernard, A., Khrestchatsky, M., Féron, F., Rivera, S., Roman, F. S., & Marchetti, E. (2014). Onset of hippocampus-dependent memory impairments in 5XFAD transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Hippocampus*, *24*(7), 762–772. <https://doi.org/10.1002/hipo.22267>
- González-Prieto, M., Gutiérrez, I. L., García-Bueno, B., Caso, J. R., Leza, J. C., Ortega-Hernández, A., Gómez-Garre, D., & Madrigal, J. L. M. (2021). Microglial CX3CR1 production increases in Alzheimer's disease and is regulated by noradrenaline. *Glia*, *69*(1), 73–90. <https://doi.org/10.1002/glia.23885>
- Griñán-Ferré, C., Izquierdo, V., Otero, E., Puigoriol-Illamola, D., Corpas, R. R., Sanfeliu, C., Ortuño-Sahagún, D., Pallàs, M., Ortúno-Sahagún, D., & Pallàs, M. (2018). Environmental enrichment improves cognitive deficits, AD hallmarks and epigenetic alterations presented in 5xFAD mouse model. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *12*, 224. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00224>
- Guedes, J. R., Lao, T., Cardoso, A. L., & el Khoury, J. (2018). Roles of Microglial and Monocyte Chemokines and Their Receptors in Regulating Alzheimer's Disease-Associated Amyloid- β and Tau Pathologies. *Frontiers in Neurology*, *9*(AUG), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00549>
- Hanisch, U.-K. K., & Kettenmann, H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature Neuroscience*, *10*(11), 1387–1394. <https://doi.org/10.1038/nn1997>
- Hart, A. W., McKie, L., Morgan, J. E., Gautier, P., West, K., Jackson, I. J., & Cross, S. H. (2005). Genotype-phenotype correlation of mouse Pde6b mutations. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *46*(9), 3443–3450. <https://doi.org/10.1167/iovs.05-0254>
- Heneka, M. T., Carson, M. J., Khoury, J. el, Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., Jacobs, A. H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R. M., Herrup, K., Frautschy, S. A., Finsen, B., Brown, G. C., Verkhratsky, A., Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A., ... Kummer, M. P. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*, *14*(4), 388–405. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(15\)70016-5](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(15)70016-5)
- Heneka, M. T., Golenbock, D. T., & Latz, E. (2015). Innate immunity in Alzheimer's disease. *Nature Immunology*, *16*(3), 229–236. <https://doi.org/10.1038/ni.3102>

- Hüttenrauch, M., Walter, S., Kaufmann, M., Weggen, S., & Wirths, O. (2017). Limited Effects of Prolonged Environmental Enrichment on the Pathology of 5XFAD Mice. *Molecular Neurobiology*, *54*(8), 6542–6555. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0167-x>
- Jack, C. R., Jr., Knopman, D. S., Jagust, W. J., Petersen, R. C., Weiner, M. W., Aisen, P. S., Shaw, L. M., Vemuri, P., Wiste, H. J., Weigand, S. D., Lesnick, T. G., Pankratz, V. S., Donohue, M. C., & Trojanowski, J. Q. (2013). Update on hypothetical model of Alzheimer’s disease biomarkers. *Lancet Neurology*, *12*(2), 207. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(12\)70291-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70291-0)
- Jahn, H. (2013). Memory loss in Alzheimer’s disease. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, *15*(4), 445. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2013.15.4/HJAHN>
- Jawhar, S., Trawicka, A., Jenneckens, C., Bayer, T. A., & Wirths, O. (2012). Motor deficits, neuron loss, and reduced anxiety coinciding with axonal degeneration and intraneuronal A β aggregation in the 5XFAD mouse model of Alzheimer’s disease. *Neurobiology of Aging*, *33*(1), 196.e29--196.e40. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.05.027>
- Jay, T. R., Hirsch, A. M., Broihier, M. L., Miller, C. M., Neilson, L. E., Ransohoff, R. M., Lamb, B. T., & Landreth, G. E. (2017). Disease progression-dependent effects of TREM2 deficiency in a mouse model of Alzheimer’s disease. *Journal of Neuroscience*, *37*(3), 637–647. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.2110-16.2016>
- Kelmenson, P. (2016). *Maybe it’s not you, maybe it’s your mice!* MAYBE IT’S NOT YOU, MAYBE IT’S YOUR MICE! <https://www.jax.org/news-and-insights/jax-blog/2016/august/maybe-its-not-you#>
- Keren-Shaul, H., Spinrad, A., Weiner, A., Matcovitch-Natan, O., Dvir-Szternfeld, R., Ulland, T. K., David, E., Baruch, K., Lara-Astaiso, D., Toth, B., Itzkovitz, S., Colonna, M., Schwartz, M., & Amit, I. (2017). A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer’s Disease. *Cell*, *169*(7), 1276--1290.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.018>
- Konishi, H., & Kiyama, H. (2018). Microglial TREM2/DAP12 Signaling: A Double-Edged Sword in Neural Diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *12*, 206. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00206>
- Kraeuter, A. K., Guest, P. C., & Sarnyai, Z. (2018). The Y-Maze for Assessment of Spatial Working and Reference Memory in Mice. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1916, pp. 105–111). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2_10
- Krasemann, S., Madore, C., Cialic, R., Baufeld, C., Calcagno, N., el Fatimy, R., Beckers, L., O’Loughlin, E., Xu, Y., Fanek, Z., Greco, D. J., Smith, S. T., Tweet, G., Humulock, Z., Zrzavy, T., Conde-Sanroman, P., Gacias, M., Weng, Z., Chen, H., ... Butovsky, O. (2017). The TREM2-APOE

- Pathway Drives the Transcriptional Phenotype of Dysfunctional Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Immunity*, 47(3). <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.08.008>
- Lalonde, R., Fukuchi, K. I., & Strazielle, C. (2012). Neurologic and motor dysfunctions in APP transgenic mice. *Reviews in the Neurosciences*, 23(4), 363–379. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2012-0041>
- Lalonde, R., & Strazielle, C. (2011a). Brain regions and genes affecting limb-clasping responses. In *Brain Research Reviews* (Vol. 67, Issues 1–2, pp. 252–259). <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2011.02.005>
- Lalonde, R., & Strazielle, C. (2011b). Brain regions and genes affecting limb-clasping responses. *Brain Research Reviews*, 67(1–2), 252–259. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESREV.2011.02.005>
- Lalonde, R., & Strazielle, C. (2011c). Brain regions and genes affecting limb-clasping responses. *Brain Research Reviews*, 67(1–2), 252–259. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2011.02.005>
- Lee, D., Daggett, A., Gu, X., Jiang, L.-L., Langfelder, P., Li, X., Wang, N., Zhao, Y., Park, C. S., Cooper, Y., Ferando, I., Mody, I., Coppola, G., Xu, H., & Yang, X. W. (2018). Elevated TREM2 Gene Dosage Reprograms Microglia Responsivity and Ameliorates Pathological Phenotypes in Alzheimer's Disease Models. *Neuron*, 97(5), 1032-1048.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.02.002>
- Lee, S., Varvel, N. H., Konerth, M. E., Xu, G., Cardona, A. E., Ransohoff, R. M., & Lamb, B. T. (2010). CX3CR1 deficiency alters microglial activation and reduces beta-amyloid deposition in two Alzheimer's disease mouse models. *American Journal of Pathology*, 177(5), 2549–2562. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.100265>
- Leger, M., Paizanis, E., Dzahini, K., Quiedeville, A., Bouet, V., Cassel, J. C., Freret, T., Schumann-Bard, P., & Boulouard, M. (2015). Environmental enrichment duration differentially affects behavior and neuroplasticity in adult mice. *Cerebral Cortex*, 25(11), 4048–4061. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhu119>
- Leger, M., Quiedeville, A., Bouet, V., Haelewyn, B. B., Boulouard, M., Schumann-Bard, P., & Freret, T. (2013a). Object recognition test in mice. *Nature Protocols*, 8(12), 2531–2537. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.155>
- Leger, M., Quiedeville, A., Bouet, V., Haelewyn, B., Boulouard, M., Schumann-Bard, P., & Freret, T. (2013b). Object recognition test in mice. *Nature Protocols*, 8(12), 2531–2537. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.155>
- Leger, M., Quiedeville, A., Paizanis, E., Natkunarajah, S., Freret, T., Boulouard, M., & Schumann-Bard, P. (2012). Environmental Enrichment Enhances Episodic-Like Memory in Association with a

- Modified Neuronal Activation Profile in Adult Mice. *PLoS ONE*, 7(10), e48043. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048043>
- Masters, C. L., Bateman, R., Blennow, K., Rowe, C. C., Sperling, R. A., & Cummings, J. L. (2015). Alzheimer's disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 1(1), 15056. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.56>
- Mecca, C., Giambanco, I., Donato, R., & Arcuri, C. (2018a). Microglia and Aging: The Role of the TREM2–DAP12 and CX3CL1–CX3CR1 Axes. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), 318. <https://doi.org/10.3390/ijms19010318>
- Mecca, C., Giambanco, I., Donato, R., & Arcuri, C. (2018b). Microglia and aging: The role of the TREM2–DAP12 and CX3CL1–CX3CR1 Axes. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), 1–27. <https://doi.org/10.3390/ijms19010318>
- Medrano-Jiménez, E., Jiménez-Ferrer Carrillo, I., Pedraza-Escalona, M., Ramírez-Serrano, C. E., Álvarez-Arellano, L., Cortés-Mendoza, J., Herrera-Ruiz, M., Jiménez-Ferrer, E., Zamilpa, A., Tortoriello, J., Pedraza-Alva, G., Pérez-Martínez, L., Carrillo, I. J.-F., Pedraza-Escalona, M., Ramírez-Serrano, C. E., Álvarez-Arellano, L., Cortés-Mendoza, J., Herrera-Ruiz, M., Jiménez-Ferrer, E., ... Pérez-Martínez, L. (2019). Malva parviflora extract ameliorates the deleterious effects of a high fat diet on the cognitive deficit in a mouse model of Alzheimer's disease by restoring microglial function via a PPAR- γ -dependent mechanism. *Journal of Neuroinflammation*, 16(1), 143. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1515-3>
- Miedel, C. J., Patton, J. M., Miedel, A. N., Miedel, E. S., & Levenson, J. M. (2017). Assessment of Spontaneous Alternation, Novel Object Recognition and Limb Clasping in Transgenic Mouse Models of Amyloid- β and Tau Neuropathology. *Journal of Visualized Experiments*, 2017(123), 55523. <https://doi.org/10.3791/55523>
- Mino, M., Homicsko, K., & Stupp, R. (2012). Central nervous system. In *Side Effects of Medical Cancer Therapy: Prevention and Treatment*. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1007/978-0-85729-787-7_7
- Myers, A., & McGonigle, P. (2019a). Overview of Transgenic Mouse Models for Alzheimer's Disease. *Current Protocols in Neuroscience*, 89(1), 1–21. <https://doi.org/10.1002/cpns.81>
- Myers, A., & McGonigle, P. (2019b). Overview of Transgenic Mouse Models for Alzheimer's Disease. *Current Protocols in Neuroscience*, 89(1), 1–21. <https://doi.org/10.1002/cpns.81>
- Nithianantharajah, J., & Hannan, A. J. (2006a). Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(9), 697–709. <https://doi.org/10.1038/nrn1970>

- Nithianantharajah, J., & Hannan, A. J. (2006b). Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(9), 697–709. <https://doi.org/10.1038/nrn1970>
- Oakley, H., Cole, S. L., Logan, S., Maus, E., Shao, P., Craft, J., Guillozet-Bongaarts, A., Ohno, M., Disterhoft, J., Van Eldik, L., Berry, R., & Vassar, R. (2006). Intraneuronal β -amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: Potential factors in amyloid plaque formation. *Journal of Neuroscience*, 26(40), 10129–10140. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1202-06.2006>
- Ognibene, E., Middei, S., Daniele, S., Adriani, W., Ghirardi, O., Caprioli, A., & Laviola, G. (2005). Aspects of spatial memory and behavioral disinhibition in Tg2576 transgenic mice as a model of Alzheimer's disease. *Behavioural Brain Research*, 156(2), 225–232. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2004.05.028>
- Oliveira, A. M. M., Hawk, J. D., Abel, T., & Havekes, R. (2010). Post-training reversible inactivation of the hippocampus enhances novel object recognition memory. *Learning & Memory*, 17(3), 155. <https://doi.org/10.1101/LM.1625310>
- Peng, Q., Malhotra, S., Torchia, J. A., Kerr, W. G., Coggeshall, K. M., & Humphrey, M. B. (2010). TREM2- and DAP12-dependent activation of PI3K requires DAP10 and is inhibited by SHIP1. *Science Signaling*, 3(122), ra38. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000500>
- Rangaraju, S., Dammer, E. B., Raza, S. A., Rathakrishnan, P., Xiao, H., Gao, T., Duong, D. M., Pennington, M. W., Lah, J. J., Seyfried, N. T., & Levey, A. I. (2018). Identification and therapeutic modulation of a pro-inflammatory subset of disease-associated-microglia in Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 13(1), 24. <https://doi.org/10.1186/s13024-018-0254-8>
- Reynolds, S., Lane, S. J., & Richards, L. (2010). Using animal models of enriched environments to inform research on sensory integration intervention for the rehabilitation of neurodevelopmental disorders. *Journal of Neurodevelopmental Disorders*, 2(3), 120–132. <https://doi.org/10.1007/s11689-010-9053-4>
- Richard, B. C., Kurdakova, A., Baches, S., Bayer, T. A., Weggen, S., & Wirths, O. (2015). Gene Dosage Dependent Aggravation of the Neurological Phenotype in the 5XFAD Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 45(4), 1223–1236. <https://doi.org/10.3233/JAD-143120>
- Ristori, E., Donnini, S., & Ziche, M. (2020). New Insights Into Blood-Brain Barrier Maintenance: The Homeostatic Role of β -Amyloid Precursor Protein in Cerebral Vasculature. *Frontiers in Physiology*, 11, 1056. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2020.01056/BIBTEX>

- Seibenhener, M. L., & Wooten, M. C. (2015). Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 96, 52434. <https://doi.org/10.3791/52434>
- Song, W. M., & Colonna, M. (2018). The identity and function of microglia in neurodegeneration. *Nature Immunology* 2018 19:10, 19(10), 1048–1058. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0212-1>
- Stern, Y. (2002). What is cognitive reserve? Theory and research application of the reserve concept. *Journal of the International Neuropsychological Society*, 8(3), 448–460. <https://doi.org/10.1017/S1355617702813248>
- Tan, M.-S., Yu, J.-T., Jiang, T., Zhu, X.-C., & Tan, L. (2013). The NLRP3 Inflammasome in Alzheimer's Disease. *Molecular Neurobiology*, 48(3), 875–882. <https://doi.org/10.1007/s12035-013-8475-x>
- Ulland, T. K., Song, W. M., Huang, S. C. C., Ulrich, J. D., Sergushichev, A., Beatty, W. L., Loboda, A. A., Zhou, Y., Cairns, N. J., Kambal, A., Loginicheva, E., Gilfillan, S., Cella, M., Virgin, H. W., Unanue, E. R., Wang, Y., Artyomov, M. N., Holtzman, D. M., & Colonna, M. (2017). TREM2 Maintains Microglial Metabolic Fitness in Alzheimer's Disease. *Cell*, 170(4), 649-663.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.023>
- Vorhees, C. v., & Williams, M. T. (2006). Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nature Protocols*, 1(2), 848–858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.116>
- Wang, Y., Lin, Y., Wang, L., Zhan, H., Luo, X., Zeng, Y., Wu, W., Zhang, X., & Wang, F. (2020). TREM2 ameliorates neuroinflammatory response and cognitive impairment via PI3K/AKT/FoxO3a signaling pathway in Alzheimer's disease mice. *Aging (Albany NY)*, 12(20), 20862. <https://doi.org/10.18632/AGING.104104>
- Wang, Y., Ulland, T. K., Ulrich, J. D., Song, W., Tzaferis, J. A., Hole, J. T., Yuan, P., Mahan, T. E., Shi, Y., Gilfillan, S., Cella, M., Grutzendler, J., DeMattos, R. B., Cirrito, J. R., Holtzman, D. M., & Colonna, M. (2016). TREM2-mediated early microglia. *Journal of Experimental Medicine*, 213(5), 667–675. <https://doi.org/10.1084/jem.20151948>
- Wesselingh, R., Butzkueven, H., Buzzard, K., Tarlinton, D., O'Brien, T. J., & Monif, M. (2019). Innate Immunity in the Central Nervous System: A Missing Piece of the Autoimmune Encephalitis Puzzle? In *Frontiers in Immunology* (Vol. 10, p. 2066). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02066>
- Wolf, Y., Shemer, A., Levy-Efrati, L., Gross, M., Kim, J. S., Engel, A., David, E., Chappell-Maor, L., Grozovski, J., Rotkopf, R., Biton, I., Eilam-Altstadter, R., & Jung, S. (2018). Microglial MHC class II is dispensable for experimental autoimmune encephalomyelitis and cuprizone-induced

- demyelination. *European Journal of Immunology*, 48(8), 1308–1318. <https://doi.org/10.1002/EJI.201847540>
- Wu, J., Bie, B., Yang, H., Xu, J. J., Brown, D. L., & Naguib, M. (2013). Suppression of central chemokine fractalkine receptor signaling alleviates amyloid-induced memory deficiency. *Neurobiology of Aging*, 34(12), 2843–2852. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.06.003>
- Zeldovich, L. (2017). Genetic drift: the ghost in the genome. *Lab Animal* 2017 46:6, 46(6), 255–257. <https://doi.org/10.1038/labani.1275>
- Zhou, Y., Liu, D., Chen, S., Sun, J., Zhou, X., Xing, C., Ye, D., & Tian, Y. (2019). The Role of CXCR3 in Neurological Diseases. *Current Neuropharmacology*, 17(2), 142–150. <https://doi.org/10.2174/1570159x15666171109161140>
- Ziegler-Waldkirch, S., d'Errico, P., Sauer, J., Erny, D., Savanthrapadian, S., Loreth, D., Katzmarski, N., Blank, T., Bartos, M., Prinz, M., & Meyer-Luehmann, M. (2018). Seed-induced A β deposition is modulated by microglia under environmental enrichment in a mouse model of Alzheimer's disease. *The EMBO Journal*, 37(2), 167–182. <https://doi.org/10.15252/emj.201797021>
- Ziegler-Waldkirch, S., Marksteiner, K., Stoll, J., D'Errico, P., Friesen, M., Eiler, D., Neudel, L., Sturn, V., Opper, I., Datta, M., Prinz, M., & Meyer-Luehmann, M. (2018). Environmental enrichment reverses A β pathology during pregnancy in a mouse model of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica Communications*, 6(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s40478-018-0549-6>