



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

La ausencia de KChIP3 rescata las capacidades cognitivas en el modelo 5XFAD de la enfermedad de Alzheimer en ratones hembras y machos

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

LIC. EN BIOTECNOLOGÍA RUBEN ASGARD CASTORENA ANAYA

TUTOR PRINCIPAL: DRA. LEONOR PÉREZ MARTÍNEZ

Instituto de Biotecnología, UNAM.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DRA. HILDA MARÍA LOMELÍ BUYOLI

Instituto de Biotecnología, UNAM

DRA. MAGDALENA GUERRA CRESPO

Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Cuernavaca, Morelos, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

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. Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo de la beca de maestría no. 721037 otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT.

Este proyecto se realizó gracias al financiamiento otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT IFC 2016-2282) y del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IN213119, IN217822 y IN211719).

Al Camino, la Verdad y la Vida

**A mi familia,
Mi madre, mi padre, mi hermano y mi abuelita**

A Laura

Al NIB y a mis amigos y colegas de la maestría

Agradecimientos

A la UNAM por darme la oportunidad de formarme en el curso de MCBQ siendo una etapa de grandes retos y aprendizajes importantes.

Al IBt por ser el espacio donde pude desarrollar por completo mi proyecto, además de permitirme conocer a grandes personas y amigos.

Al CONACyT por darme los recursos económicos necesarios para estudiar este posgrado logrando mantenerme por mi cuenta durante el proceso.

A mi tutora, la Dra. Leonor Pérez Martínez por abrirme las puertas para pertenecer al NIB, por su dedicación, sus consejos y su excelente guía, siendo siempre comprensiva y motivándome a no desanimarme.

Al Dr. Gustavo Pedraza Alva por sus consejos y apoyo a mi proyecto dándome excelentes ideas de como seguir adelante en el proceso.

A los miembros de mi comité tutorial la Dra. Magdalena Guerra Crespo y la Dra. Hilda María Lomelí Buyoli por su tiempo, consejos y guía, ya que sus comentarios hacia mi proyecto me ayudaron a enfocarme en lo más importante del mismo y a desarrollarlo con satisfacción.

A los miembros de mi jurado de examen la Dra. Anahí Chavarría Krauser, la Dra. Celina García Melendrez, la Dra. Rosa María Uribe Villegas, la Dra. Aliesha Araceli González Arenas y el Dr. Jaime Iván Velasco Velázquez por aceptar leer y corregir mi trabajo escrito y oral, dándome los mejores consejos para construir de la mejor manera posible este trabajo de tesis.

A los encargados del Bioterio del IBt en especial a la M.V.z. Graciela Margarita Cabeza Pérez por su apoyo, enseñanza y valiosos consejos en el cuidado, reproducción, manipulación y trabajo ético con los ratones experimentales y a la Dra. María Elena Elizabeth Mata Moreno por su siempre amable ayuda.

A todos los miembros del NIB en especial a la Dra. Sol Díaz de León que me ayudó a adaptarme en el trabajo dentro del laboratorio y me ayudo en un inicio a comprender algunos protocolos experimentales que realicé durante el proyecto, también el M. C. Eladio Cortes Flores por su enseñanza y consejos para realizar pruebas cognitivas, perfusiones intracardiacas y trabajo con proteína y al Dr. Jonathan Salazar Leon.

A mi familia, que aún sin saber exactamente lo que hacía en Cuernavaca me apoyaron y tuvieron paciencia con mi proceso.

A mis amigos (Club de la tarea) del Instituto que hicieron de mi estancia en el IBt mucho más sencilla y divertida.

A mis amigos del CPU ya que siempre me ayudaron a mantener un espíritu alegre, para mantener mi fe mi esperanza y no rendirme tan fácilmente.

A Laura por estar conmigo en los mejores y más complicados momentos que tuve durante este proceso.

ÍNDICE

Lista de abreviaturas	9
RESUMEN	4
SUMMARY/ ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN	7
Enfermedad de Alzheimer	7
ANTECEDENTES	9
Cascada amiloideogénica (formación de placas seniles)	9
Taupatía en la enfermedad de Alzheimer (formación de ovillos neurofibrilares)	11
Desregulación calcio durante la enfermedad de Alzheimer	13
El género como factor diferencial en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer	14
Neuroinflamación en la enfermedad de Alzheimer	16
Neurogénesis hipocampal adulta en la enfermedad de Alzheimer	19
La neuroinflamación impacta la neurogénesis hipocampal adulta	26
KChIP3 en la EA y como intermediario en la diferenciación de células troncales	29
JUSTIFICACIÓN	32
HIPÓTESIS	32
OBJETIVOS	32
Objetivo general	32
Objetivos particulares	33
MATERIALES Y MÉTODOS	33
Organismo modelo	33
(<i>Mus musculus</i>) Ratón C57BL/6J.....	33
1. Ratón 5XFAD	34
2. Ratón R26R-eYFP y nestina-Cre ^{ERT2}	34
3. Ratón KChIP3 KO	35
Programa de cruzas para la obtención de organismos modelo nestina-Cre/R26R-eYFP/5XFAD/KChIP3KO	36
Inducción de inflamación por LPS	41

Administración de BrdU para marcar células proliferativas	41
Administración de tamoxifeno para la activación de la recombinasa Cre en los precursores neurales usando los transgenes Nest-Cre/ R26r-eYFP	42
Pruebas de capacidades cognitivas	42
1. Prueba de campo abierto.....	42
2. Reconocimiento de objeto novedoso.....	43
3. Laberinto en Y.....	45
Selección de tejido	47
Extracción de proteínas por sonicación	47
Cuantificación de citocinas proinflamatorias por ELISA	48
Detección de actividad factores de crecimiento y diferenciación	49
Perfusión intracardiaca y fijación de tejido con paraformaldehído	50
Análisis estadístico	52
RESULTADOS	52
La inducción de neuroinflamación con LPS provoca el deterioro cognitivo en ratones jóvenes	52
La ausencia de KChIP3 rescata las capacidades cognitivas disminuidas por el tratamiento con LPS en ratones adultos	59
La ausencia de KchIP3 previene el deterioro cognitivo en ratones modelo de la enfermedad de Alzheimer	65
Expresión de citocinas inflamatorias en el tejido encefálico de los ratones 5XFAD y en ausencia de KChIP3	74
En ausencia de KChIP3 se altera la expresión de proteínas neurotróficas en el hipocampo	75
Expresión diferencial de la proteína GFAP en el hipocampo	80
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	83
CONCLUSIONES	86
PERSPECTIVAS	87
REFERENCIAS	87
APÉNDICE/PROTOCOLOS	108
Inmunohistoquímica para el análisis de neurogénesis hipocampal adulta (estandarización)	108
Extracción de ADN	111
Genotipificación de organismos para obtención de modelos de estudio	111
Nnt/Cre.....	111
R26r-eYFP y WT	113
5XFAD.....	114

KChIP3 KO (Neo).....	115
KChIP3 WT	117
Cuidado de ratones en bioterio	118
Perfusión intracardiaca y fijación de tejido.....	119
Extracción de proteínas, cuantificación y WB	120
Extractos proteicos.....	120
Soluciones utilizadas:	120
Cuantificación de proteínas por el método de BSA	123
Realización de WB.....	124

Lista de abreviaturas

aa: aminoácidos.

AC3: Del inglés, *Adenylate Cyclase Type 3*.

APH-1: Del inglés, *Anterior Pharynx-defective 1*.

ApoE: Del inglés, *Apolipoprotein E*.

APP: Del inglés, *Amyloid Precursor Protein*.

ARC: Del inglés, *Activity- Regulated Cytoskeleton-associated protein*.

ATP: Del inglés, *Adenosine Triphosphate*

BDNF: Del inglés, *Brain-Derived Neurotrophic Factor*.

BHE: Barrera Hematoencefálica.

BLBP: Del inglés, *Brain Lipid Binding Protein*.

BrdU: Del inglés, *5-Bromo-2 Deoxyuridine*.

CAG: Del inglés, *CMV early enhancer/chicken β actin*.

CaMK: Del inglés, *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein Kinase*.

CDs: Cluster differentiation proteins.

Cdk5: Del inglés, *Cyclin-dependent kinase 5*.

CGRs: Células de la Glía Radial.

CNPs: Células Neurales Progenitoras.

COX: Citocromo C-Oxidasa.

CREB: Del inglés, *cAMP response element-binding protein*.

DAMPs: Del inglés, *Damage-associated molecular patterns*.

DCX: Doblecortina.

DREAM: Del inglés, *Downstream Regulatory Element Antagonistic Modulator*.

EA: Enfermedad de Alzheimer.

FGF: Del inglés, *Fibroblast Growth Factor*.

GFAP: Del inglés, *Glial Fibrillary Acidic Protein*.

GFP: Del inglés, *Green Fluorescent Protein*.

GSK3 β : Del inglés, *Glycogene Synthase Kinase 3 beta*.

hESCs: Del inglés, *human Embryonic Stem Cells*.

HNE: Del inglés, *4-Hydroxynonenal*.

IL: Interleucina

ILGF-I: Del inglés, *Insulin-Like Growth Factor -I*.

InsP3R: Del inglés, *Inositol 1,4,5-triphosphate Receptor*.

KChIP3: Del inglés, *Kv Channel-Interacting Protein 3*.

LPS: Lipopolisacáridos.

MAP: Del inglés, *Microtubule Associated Protein*.

MAPK: Del inglés, *Mitogen-Activated Protein Kinase*.

NF- κ B: Del inglés, *Nuclear Factor κ -light-enhancer of activated B cells*.

NHA: Neurogénesis Hipocampal Adulta.

NLRP3: Del inglés, *NOD-Like Receptor Protein 3*.

ONF: Ovillos Neurofibrilares.

PACAP: Del inglés, *Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Peptide*.

PAMPs: Del inglés, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*.

PEN-2: Del inglés, *Presenilin Enhancer 2*.

PKA: Del inglés, *Protein Kinase A*.

PKC: Del inglés, *Protein Kinase C*.

pro-BDNF: Proteína precursora de BDNF.

PSD-95: Del inglés, *Postsynaptic Density Protein 95*.

Psen-1: Presenilina 1.

Psen-2: Presenilina 2.

PSA-NCAM: Del inglés, *Polysialylated-Neural Cell Adhesion Molecule*.

p β A: Péptido β -amiloide.

RyR: Del inglés, *Ryanodine Receptor*.

sAPP α : Derivado soluble- α de la proteína APP.

SCARA1: Del inglés, *Scavenger receptor class A member*.

SNC: Sistema Nervioso Central.

Sox2: Del inglés, *SRY-box transcription factor 2*.

TGF- β : Del inglés, *Transforming Growth Factor Beta*.

TLR: Toll Like Receptor.

TNF α : Del inglés, *Tumor Necrosis Factor Alpha*.

TREM2: Del inglés, *Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 2*.

eYFP: Del inglés, *enhanced Yellow Fluorescent Protein*.

ZSG: Zona Subgranular.

ZSV: Zona Subventricular.

RESUMEN

El incremento en la tasa de incidencia de enfermedades neurodegenerativas es un problema creciente a nivel mundial. La organización mundial de la salud reconoce a la demencia como una prioridad en materia de salud pública, siendo la enfermedad de Alzheimer (EA) la forma más frecuente. El Alzheimer es una enfermedad asociada a la muerte neuronal que comienza su desarrollo en la corteza entorrinal y el hipocampo, causando deficiencia cognitiva asociada principalmente a la pérdida de memoria. Diversos estudios demuestran la contribución de múltiples factores de riesgo en el desarrollo de la EA, entre ellos se encuentran el envejecimiento, factores genéticos, la mala alimentación, la obesidad, otros padecimientos crónico-degenerativos, el estilo de vida sedentario, la mala higiene dental e infecciones previas. La contribución de estos factores impacta negativamente en eventos de plasticidad cerebral y de restauración de daño como el nacimiento de nuevas neuronas y la formación de nuevas sinapsis en nichos neuronales altamente plásticos como la corteza y el hipocampo.

Durante el envejecimiento y en la EA se ha visto que la pérdida de las funciones cognitivas, la neurodegeneración y la neuroinflamación están ligadas a una alteración en la homeostasis de Ca^{2+} en el sistema nervioso. KChIP3, es una proteína reguladora modulada por Ca^{2+} con funciones específicas en la membrana, en el citoplasma y en el núcleo como regulador transcripcional. Además, actúa como segundo mensajero para el control y regulación de múltiples vías, entre las cuales se encuentra la regulación de procesos inflamatorios y apoptóticos. En modelos murinos de la EA se han reportado niveles elevados de KChIP3 en el área de la corteza y el hipocampo donde se encuentra localizada la actividad inflamatoria.

Es por lo anterior que en este trabajo se evaluó el impacto que tiene el proceso neuroinflamatorio asociado a la EA y la ausencia de KChIP3 en las capacidades cognitivas y la expresión de proteínas neurotróficas relacionadas con la neurogénesis adulta en modelos murinos, encontrándose que la ausencia de la proteína KChIP3 puede

reestablecer las capacidades cognitivas en un modelo murino de la enfermedad de Alzheimer, así mismo se encontró que su ausencia provoca una diferencia en la concentración de proteínas en el hipocampo que son clave en procesos fisiológicos de plasticidad neuronal y en la actividad inflamatoria promovida por células gliales. Además, se obtuvo un modelo de ratón transgénico y tejidos para poder evaluar de manera precisa la neurogénesis adulta en un modelo de la enfermedad de Alzheimer y en ausencia de KChIP3.

SUMMARY/ ABSTRACT

The increased incidence rate of neurodegenerative diseases is a growing problem worldwide. The World Health Organization recognizes dementia as a public health priority, with Alzheimer's disease (AD) being the most common form. AD is a disease associated with neuronal death that begins its development in the entorhinal cortex and hippocampus, causing cognitive impairment mainly associated with memory loss. Several studies demonstrate the contribution of multiple risk factors in the development of AD, including aging, genetic factors, poor diet, obesity, other chronic-degenerative diseases, a sedentary lifestyle, poor dental hygiene and previous infections. The contribution between these factors negatively impacts brain plasticity and damage restoration events such as the birth of new neurons and the formation of new synapses in highly plastic neuronal niches such as the cortex and hippocampus.

During aging and AD, it has been seen that the loss of cognitive functions, neurodegeneration and neuroinflammation are linked to an alteration in Ca^{2+} homeostasis in the nervous system. KChIP3, is a regulatory protein modulated by Ca^{2+} with specific functions in the membrane, cytoplasm and nucleus as a transcriptional regulator. In addition, it acts as a second messenger for the controlling and regulating of multiple pathways, among which is the regulation of inflammatory and apoptotic processes. In mouse models of AD, elevated levels of KChIP3 have been reported in the cortex and hippocampus where is located the inflammatory activity.

For this reason, this work seeks to evaluate the impact of the neuroinflammatory process associated with AD in the absence of KChIP3 protein on cognitive abilities and the expression of neurotrophic proteins related to adult neurogenesis in murine models, finding that the absence of the KChIP3 protein can reestablish cognitive abilities in a mouse model of AD. It was also found that its absence causes differential concentration of neurotrophic proteins that are key in neural plasticity and glial inflammatory activity. In addition, it was obtained a mouse model and neuronal tissue to accurately assess adult neurogenesis in a model for AD and in the absence of KChIP3.

INTRODUCCIÓN

Enfermedad de Alzheimer

El primero en describir los efectos de la enfermedad de Alzheimer (EA) fue Alois Alzheimer en 1907, detallando las características clínicas de una mujer de 51 años donde describe un rápido y constante deterioro cognitivo asociado a la pérdida de memoria y el desarrollo de padecimientos neuropsiquiátricos que desencadenaría en su fallecimiento tan solo un año después del diagnóstico (Alzheimer, 1907). Un ejemplo interesante del deterioro cognitivo y emocional de una persona con EA lo podemos ver en los cuadros artísticos del pintor estadounidense William Utermohlen quien fue diagnosticado con EA a los 65 años. En cada cita médica mostraba un autorretrato al médico que lo trataba (figura 1), esto fue usado por el médico como criterio diagnóstico del deterioro cognitivo y psiquiátrico del paciente. Los síntomas clínicos típicos de la EA son la deficiencia cognitiva asociada principalmente a la pérdida de memoria y en etapas más avanzadas se observan síntomas como la deficiencia del lenguaje severa, pérdida severa de memoria, dificultad de desplazamiento, dificultad para hablar y padecimientos neuropsiquiátricos como depresión y ansiedad (Bird y Miller, 2009).

La EA es la cuarta causa de muerte en países desarrollados y la principal causa de demencia. En el mundo existen más de 24 millones de personas con demencia y se estiman 4.6 millones de casos nuevos cada año. Con el aumento en la esperanza de vida y en la población se espera que estas cifras se dupliquen para el año 2040 (Arnoldo *et al.*, 2008). En México, se estima que 800,000 personas tienen un trastorno de demencia (Gutiérrez-Robledo, 2014).

A la EA se le atribuyen lesiones típicas que provocan un estado de neurodegeneración que causa una pérdida de la masa encefálica ocasionada por un estado constante de muerte neuronal y neuroinflamación crónica (figura 1). Las principales características patofisiológicas de la EA son la acumulación de péptido β amiloide ($p\beta A$) en forma de placas extracelulares y la formación de ovillos neurofibrilares (ONF) ocasionado por la

hiperfosforilación y deposición intracelular de residuos de proteína Tau. Estos eventos avanzan de manera progresiva apareciendo en nichos neurales específicos en diferentes etapas de desarrollo de la enfermedad como lo describen en su modelo de desarrollo Braak E. y Braak H. (1991) (figura 2). En el modelo se describe el avance de las lesiones las cuales tienen origen en la corteza entorrinal y el hipocampo, estructuras relacionadas con el establecimiento de la memoria derivado de diversos estímulos somatosensoriales, lo que explica porque uno de los primeros síntomas en manifestarse en pacientes con EA es la pérdida de memoria a corto plazo.

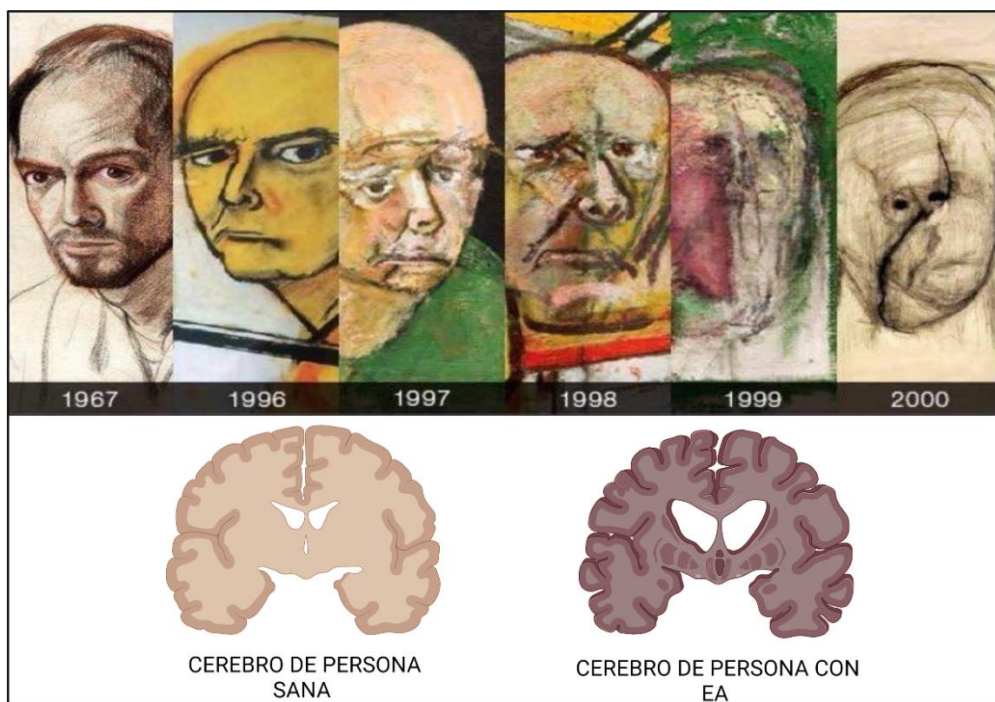


Figura 1. La enfermedad de Alzheimer. En la parte superior de la figura se muestra la progresión del trabajo “*Autorretratos*” del artista William Utermohlen (1933-2007) a quien se le diagnosticó enfermedad de Alzheimer en 1998, con síntomas de deficiencia cognitiva leve reportada años antes. En la parte inferior de la figura se muestran esquemas de cerebro de una persona sana y una con EA puntualizando la aparición de surcos corticales (*plural-surci*) y agrandamiento ventricular derivado de la pérdida de masa encefálica asociada al proceso de muerte neuronal; además de daño en la materia blanca relacionado con el deterioro axonal. Figura creada con Biorender.com. Imágenes de los autorretratos de William Utermohlen tomadas de: (<https://www.pinterest.com/pin/270708627580149071/>).

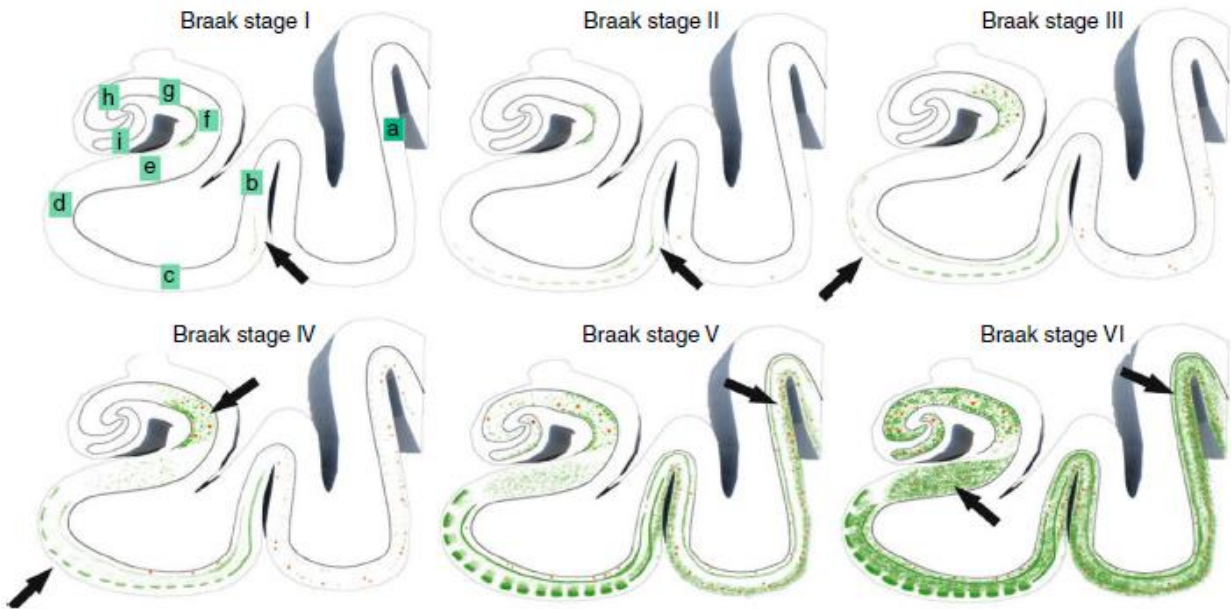


Figura 2. Progresión neuropatológica de la enfermedad de Alzheimer en el hipocampo de acuerdo con el modelo de Braak. La muerte neuronal que comienza en la corteza entorrinal se propaga hacia el hipocampo y sigue su curso hasta su subsecuente difusión en la corteza. Las placas seniles se muestran en rojo y en verde el desarrollo de devillos neurofibrilares. Regiones hipocampales: Corteza temporal (a), corteza transentorrinal (b), corteza entorrinal (c), *presubiculum* (d), *subiculum* (e), CA1 (f), CA2 (g), CA3/CA4 (h), y giro dentado (i). Tomada de Moreno-Jimenez *et al.*, (2019).

ANTECEDENTES

Cascada amiloideogénica (formación de placas seniles)

El péptido βA es un pequeño fragmento proveniente de la proteína precursora amiloide (APP), una glicoproteína transmembranal de la familia de las APLP (*amyloid precursor-like protein*), cuyo gen se encuentra en el cromosoma 21 y que se expresa en células del sistema nervioso y algunas otras de origen hematopoyético. Esta proteína se encuentra altamente expresada en neuronas del hipocampo, subregiones de la amígdala y en la neocorteza, sitios altamente neuroplásticos que son principalmente afectados en la EA (Lee *et al.*, 1996).

En condiciones fisiológicas, la APP está asociada con el desarrollo y protección del sistema nervioso central (SNC) (Lyckman et al., 1998), ésta es procesada por la proteína Alfa secretasa, una proteasa que escinde el corte proteolítico para la formación de nexina II y un péptido de 16 aminoácidos altamente soluble que no forma agregados proteicos (sAPP α), éste péptido activa un mecanismo de señalización conocido como vía no-amiloideogénica, que promueve la formación de nuevas sinapsis y fomenta la plasticidad neural (Tyan, et al., 2012), migración neuronal (Young-Pearse et al., 2007) y la neurogénesis *in-vitro* (Bolós et al., 2014; López-Toledano y Shelanski, 2004) e *in-vivo* (López-Toledano y Shelanski, 2007; Caillé et al., 2004).

En un contexto neuroinflamatorio se aumenta la expresión de la APP por NF-KB en respuesta a citocinas proinflamatorias (Mattson y Camandola, 2001) y se activa la cascada amiloideogénica donde se cataliza el corte proteolítico para la formación del péptido β A de 40 y 42 aminoácidos, realizado por los complejos beta y gamma Secretasas compuestas por cuatro segmentos (Presenilina, Nicastrina, PEN-2 y APH-1) siendo la Presenilina el sitio de catálisis. La acumulación de p β A (péptido β -amiloide) de 40-42 aminoácidos (aa) que es altamente hidrofóbico, promueve la formación de acumulados proteicos en el parénquima cerebral formando placas de difícil degradación (placas seniles) y activando la respuesta inflamatoria (Figura 3) (Carson y Turner, 2002).

El desarrollo de la EA y la formación de placas puede darse de manera espontánea derivado de la combinación de factores de riesgo que contribuyen a la pérdida de la homeostasis en el SNC, sin embargo, aproximadamente en un 1-2% de los casos totales reportados de la EA la sobreproducción de péptido β A está relacionado con factores genéticos asociado a mutaciones en genes que codifican a la APP y a las subunidades del complejo gamma-Secretasa (Psen-1, Psen-2). A estos casos de patología hereditaria se los denomina como enfermedad de Alzheimer de tipo familiar (Xia et al., 1997).

Taupatía en la enfermedad de Alzheimer (formación de ovillos neurofibrilares)

Los ONF son estructuras intracelulares compuestas por filamentos helicoidales de la proteína Tau que causan malformaciones celulares (**figura 4**). Tau es una proteína de la familia de las MAP (Microtubule Associated Protein) codificada por un gen que se encuentra en el cromosoma 17q21.31 (Maccioni y Cambiazo, 1995) que se asocia a microtúbulos de Actina, participando activamente en eventos de transporte celular, motilidad y estructura celular. Se expresa predominantemente en neuronas, contribuyendo a establecer la morfología de las células y teniendo un papel clave en la elongación o acortamiento de los axones y neuritas, siendo clave en eventos de neuroplasticidad asociados el aprendizaje y la memoria. (Arendt *et al.*, 2016; Grundke-Iqbal *et al.*, 1986).

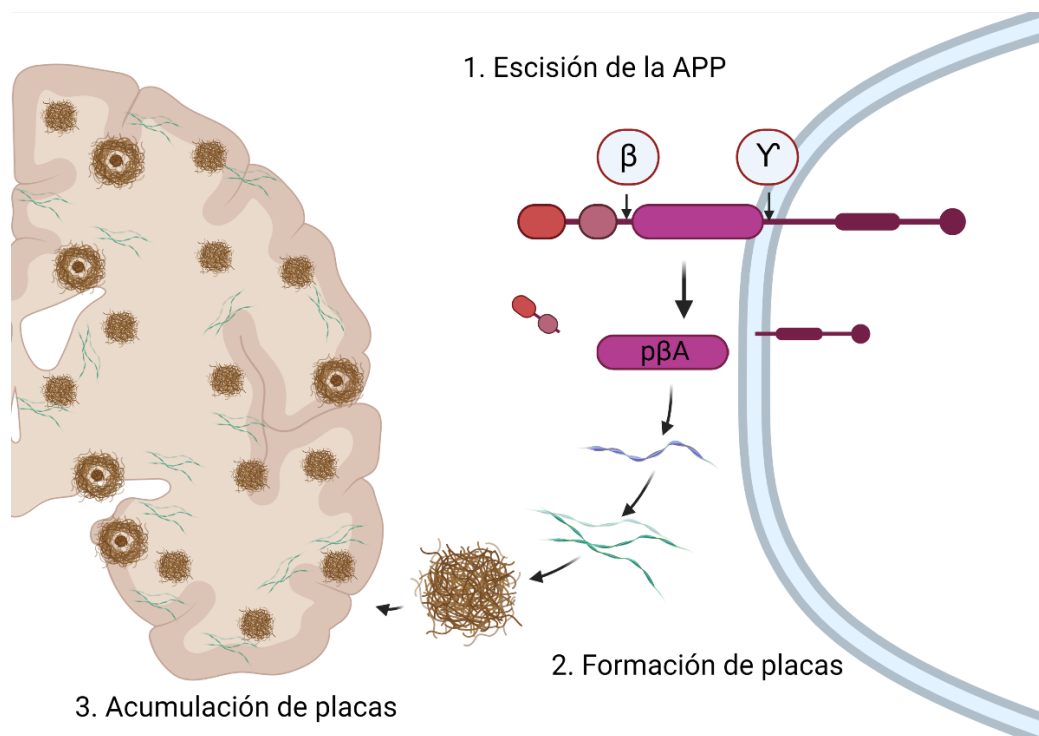


Figura 3. Cascada amiloideogénica y deposición de placas seniles. 1) Escisión de la APP por el corte proteolítico de los complejos β y γ Secretasa y formación del pβA. 2) Formación de fibras y placas seniles por la oligomerización del pβA. 3) Acumulación de placas seniles en el parénquima cerebral. Figura creada con Biorender.com.

La proteína Tau tiene múltiples sitios de fosforilación manteniéndose un equilibrio constante en la fosforilación y desfosforilación para modular la estabilidad del citoesqueleto y preservar la morfología axonal (Teter y Ashford, 2002). Durante la EA se promueve la hiperfosforilación de la proteína tau mediada por señales inflamatorias que promueven la actividad cinasa de diversas enzimas, principalmente Cdk5 y GSK3 β (Flaherty *et al.*, 2000), esto provoca su autoagregación (formación de ONF), la desestabilización de la estructura de los microtúbulos y la pérdida de la estructura axonal y dendrítica (figura 4).

La formación de ONF junto a la acumulación de p β A desencadenan el proceso de muerte celular programada por piroptosis. (Dansokho y Heneka, 2018; Shi *et al.*, 2017).

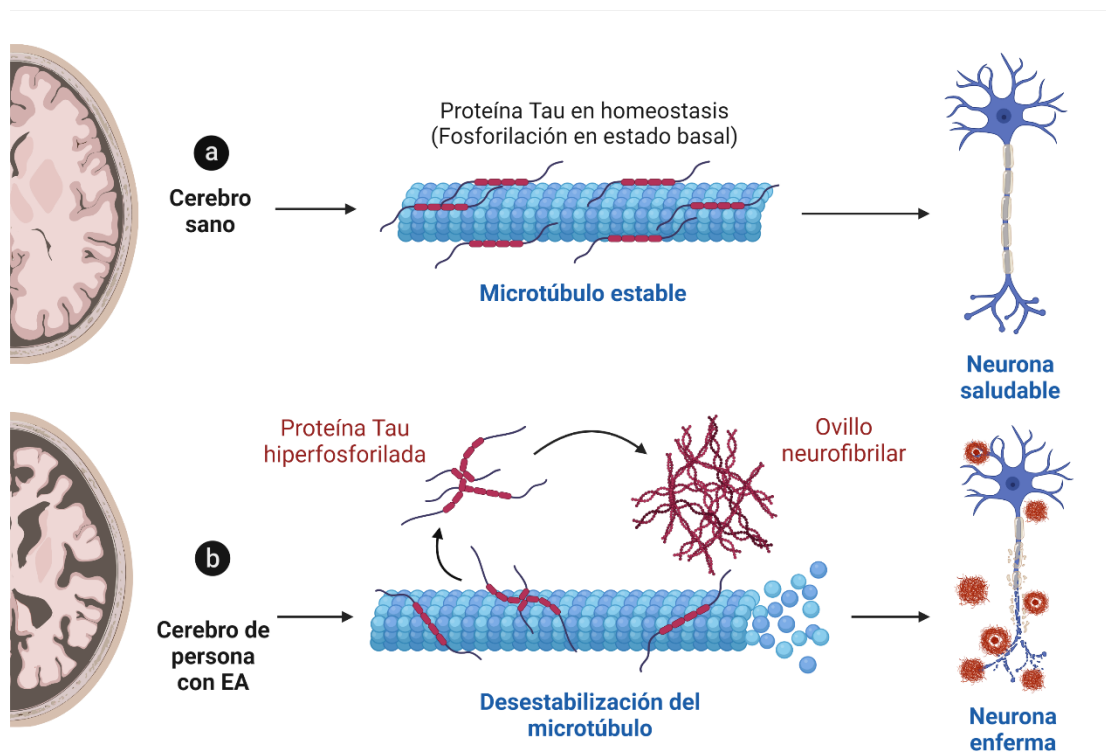


Figura 4. Tauopatía en la enfermedad de Alzheimer. a) Podemos observar la participación de la proteína Tau que se encuentra en un estado de fosforilación basal en la estabilidad de la estructura de los microtúbulos. b) En la EA se pierde la estabilidad de los microtúbulos derivado de la hiperfosforilación de tau lo que provoca la formación de ONF. Figura creada con Biorender.com.

Desregulación calcio durante la enfermedad de Alzheimer

La regulación de Ca^{2+} intracelular tiene un papel fundamental para mantener la homeostasis en el SNC, siendo necesaria para mantener procesos fisiológicos como la neurogénesis (proliferación y diferenciación), potencial de acción, plasticidad sináptica y en el aprendizaje y la memoria. Cambios en la proporción de Ca^{2+} intracelular también se encuentran relacionados con procesos celulares patofisiológicas como la muerte celular (necrosis, apoptosis, piroptosis), déficit en procesos de autofagia y degeneración general (revisado en Bezprozvanny, 2009).

A mediados de los 80 el primero en proponer que la desregulación sostenida de Ca^{2+} puede desencadenar neurodegeneración debido a la disrupción de diversas funciones neurales fue el Dr. Khachaturian (1987). Hoy en día hay mucha evidencia que sugiere que la desregulación en la homeostasis de Ca^{2+} intracelular juega un papel fundamental en el desarrollo patológico de la EA (revisado en Tong *et al.*, 2018).

Se ha observado en diversos estudios que la desregulación de Ca^{2+} en la EA ocurre antes que la formación de placas y de ONF lo que sugiere que en el estado inicial del desarrollo de la enfermedad se activan mecanismos que alteran la homeostasis de calcio en la célula y esto junto con otros mecanismos fisiológicos desencadenan la formación de placas y ONF (Etcheberrigaray *et al.*, 1998).

Los agregados de péptido βA desencadenan una disrupción general de diversas vías de señalización celular lo que promueve la liberación de reservas de Ca^{2+} del retículo endoplásmico a través de la activación de los receptores de InsP_3R y RyR (Ferreiro *et al.*, 2004; Supnet *et al.*, 2006) y la entrada de Ca^{2+} extracelular al formar poros permeables a cationes en la membrana plasmática (Arispe *et al.*, 1993).

Teniendo en cuenta que en la célula la actividad cinasa en muchos casos es dependiente de Ca^{2+} (modula la actividad de PKA, PKC, CaMK, MAPK, entre otras) el aumento

proporcional de calcio dentro de la célula en la EA podría desencadenar la hiperfosforilación de Tau y por lo tanto la formación de ONF.

El género como factor diferencial en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer

La EA afecta de mayor manera a las mujeres que a los hombres, tanto en prevalencia como en severidad, sin embargo, en la literatura es común que solo se evalúe la enfermedad con respecto a modelos animales macho, como ha ocurrido históricamente en la investigación científica, sobre todo en la rama de las neurociencias lo que recalca la importancia de evaluar los mecanismos biológicos que nos permitan entender el porqué de estas diferencias y establecer esquemas metodológicos que permitan generar conocimiento útil en el tratamiento y prevención de la enfermedad tanto en mujeres como en hombres (Laws *et al.*, 2018).

Se estima que aproximadamente el 70% de los casos totales de personas con EA son mujeres, siendo más de dos tercios de los casos totales (Carter *et al.*, 2012). Las mujeres suelen presentar mayor severidad la EA observándose un incremento en los marcadores fisiológicos de la enfermedad (acumulación de péptido β A y de Tau), en la degeneración sináptica, desórdenes cognitivos y una respuesta inflamatoria aumentada (Lewis *et al.*, 2001; Li y Singh, 2014; Lin *et al.*, 2015).

Uno de los primeros eventos fisiológicos reportados durante el desarrollo de la EA son el hipometabolismo cerebral y un aumento en el estrés oxidativo, eventos que se pueden observar incluso antes de la aparición de las marcas histopatológicas clásicas de la EA (formación de placas y ONF), estos eventos están directamente asociados a disfunción mitocondrial (Perry *et al.*, 2000; Schmitt *et al.*, 2012). Cada vez hay más evidencia que indica que los cambios bioenergéticos y la homeostasis redox durante el envejecimiento están sujetos a diferencias debido al sexo. Antes de la menopausia, se ha visto que las mujeres se encuentran mejor protegidas con respecto a los hombres para contener el estrés oxidativo ya que producen más antioxidantes (Vina y Borras, 2010). De la misma manera se ha observado que la disminución en la producción de andrógenos tanto en

hombres como en modelos animales macho representa un factor de riesgo en el desarrollo de la patología de la EA (Grimm *et al.*, 2012), ya que las hormonas sexuales en los machos actúan como neuroprotectores como observaron Meydan y colaboradores en ratas macho gonadectomizadas que disminuyeron su actividad hipocampal en comparación a las ratas control (2010).

En estudios en modelos murinos con hembras se ha visto que en la perimenopausia hay una disminución significativa en la concentración de progesterona y estradiol, lo que va acompañado de un incremento en la expresión genes involucrados en la beta oxidación, vías de metabolismo cetogénico y una disminución en la actividad de COX (citocromo c oxidasa) y la producción de ATP, lo que desencadena la liberación de marcadores oxidativos (Yao *et al.*, 2010; Yin *et al.*, 2015). En paralelo, se ha observado un incremento en los niveles del marcador por daño oxidativo 4-hidroxinonenal (HNE) durante la EA, con una mayor producción del marcador en pacientes mujeres que en hombres indicando que las pacientes con EA son más sensibles al daño ocasionado por estrés oxidativo (Schuessel, *et al.*, 2004).

Uno de los factores de riesgo hereditario para el desarrollo de la EA es la presencia de la isoforma ApoE ϵ 4 de la apolipoproteína E, encontrándose una alta correlación de pacientes con EA y la presencia del alelo que codifica para la ApoE ϵ 4, con mayor riesgo de desarrollo de la enfermedad para individuos homocigotos del gen, por lo que es considerado como uno de los factores genéticos de riesgo más comunes para el desarrollo de la enfermedad (Uddin *et al.*, 2016). ApoE es una proteína de 299 aminoácidos que se expresa en altas concentraciones en el cerebro, sintetizada principalmente por los astrocitos y actúa como transportador lipídico participando en vías de regulación metabólica (Mahley, *et al.*, 2006; Bretsky *et al.*, 1999).

Se ha observado que incrementa la expresión de ApoE en el hipocampo mediante estímulos con estrógeno promueve eventos de neuroplasticidad, efecto que puede ser inhibido con el uso de bloqueadores del receptor a estrógeno (McEwen, 2001) lo que podría verse reducido en la postmenopausia. Los efectos derivados de la presencia de

la ApoE ϵ 4 son más pronunciados en pacientes mujeres de la EA además de observarse que las pacientes que poseen el alelo para esta isoforma presentan un grado más severo de deficiencia cognitiva y atrofia cerebral, así como la presencia de placas β A y ONF (Reitz y Mayeux, 2014; Mielke *et al.* 2014).

Neuroinflamación en la enfermedad de Alzheimer

Los principales efectores de la respuesta inmune en el SNC son la microglía y los astrocitos (Amor *et al.*, 2010).

Se ha relacionado a los procesos de neuroinflamación crónica con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, Parkinson y Huntington, entre otros, como factor de daño tisular y muerte neuronal (Tovar-y-Romo *et al.*, 2016), por lo que se busca entender las interacciones entre el sistema inmune y el sistema nervioso para poder prevenir o retrasar el desarrollo de estas patologías y en específico de la EA (Heneka *et al.*, 2015).

La acumulación de p β A desencadena eventos neuroinflamatorios modulados por los diferentes tipos celulares que componen al SNC (microglía, astrocitos, neuronas, etc.) (Hansen *et al.*, 2018). Se ha observado que la aparición de estos eventos ocurre antes de que se hagan patentes los primeros síntomas clínicos de la EA.

La microglía son las células fagocíticas residentes del SNC y el principal tipo celular encargado de la respuesta inmune innata en el tejido encefálico. Estas células presentan una alta motilidad que le permite mantener procesos de supervivencia para contender ante la presencia de patógenos y restos celulares dañinos, además de producir factores moleculares para establecer procesos fisiológicos con el fin de reestablecer la homeostasis del sistema (Kettenmann *et al.*, 2011). Por otro lado, se sabe que la microglía participa directamente en la plasticidad de circuitos neuronales y contribuye a la protección, remodelación y actividad sináptica (figura 5a) (Parkhurst *et al.*, 2013).

En presencia de PAMPs (del inglés, *Pathogen-associated molecular patterns*) o DAMPs (del inglés, *Damage-associated molecular patterns*), la microglía pasa a un estado fisiológico activado extendiendo procesos al sitio afectado y migrando hacia la lesión donde inicia una respuesta inmune. En la EA la microglía puede unir diversos receptores (TREM2, SCARA1, CD36, CD14, integrina $\alpha 6\beta 1$, CD47) y algunos receptores tipo Toll (TLR2, TLR4, TLR6 y TLR9) al p β A, oligómeros, fibrillas y pacas seniles iniciando un proceso inflamatorio con el fin de eliminar el péptido del parénquima cerebral (Bamberger *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2005) promoviendo su fagocitosis o bien su degradación enzimática al liberar diversas moléculas. En casos esporádicos de la EA se ha detectado una ineficiencia en la eliminación del p β A lo que promueve el desarrollo patológico (Mawuenyega *et al.*, 2010), que sugiere como responsable al desequilibrio en la expresión de citocinas inflamatorias y la actividad microglial (Hickman *et al.*, 2008).

Se ha reportado que la actividad inflamatoria mediada por la microglía promueve la activación de la cascada amiloideogénica por lo que se produce más péptido, exacerbando la inflamación y entrando en un ciclo de retroalimentación positiva entre ambos procesos. Respecto a lo anterior se ha visto en ensayos *in vitro* que la delección genética de CD36, TLR4 o TLR6 reduce la producción inducida por citocinas de p β A (El Khoury *et al.*, 2003) y la acumulación intracelular y activación de complejos multiprotéicos de respuesta llamados inflamosomas (Sheedy *et al.*, 2013).

La activación de la microglía involucra diversos fenómenos fisiológicos que resultan en cambios en el fenotipo de la célula (figura 5b). De manera similar a los fenotipos clásicos M1 y M2 en los macrófagos (Mantovani *et al.*, 2002), la microglía activada M1 se caracteriza por el incremento en la secreción de proteínas inflamatorias (TNF α , IL-1, IL-6, IL-12, IL-18, entre otras), mientras que en estado M2 se caracteriza por la secreción de factores anti-inflamatorios (IL-4, IL-10, IL-13 y TGF- β) (Colton y Wilcock, 2010). En la EA la microglía presenta un fenotipo alternativo a los dos mencionados anteriormente, manteniendo una producción alterada de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias (Leng y Edison, 2021).

Durante la EA también se observa el infiltrado de células inmunes periféricas debido a cambios en la permeabilidad de la BHE, como macrófagos, linfocitos B y linfocitos T, los cuales tienen un papel activo en el proceso inflamatorio durante la enfermedad y la eliminación de las p β a (figura 5b) (Town *et al.*, 2005; Perry y Teeling, 2013; Wu *et al.*, 2021).

Otras células que tienen un papel activo durante la EA son los astrocitos. Los astrocitos son células de la glía en el SNC, que tienen como función el soporte estructural y metabólico de las neuronas, además de participar activamente en la mayoría de las funciones de circuitos neurales, incluyendo fenómenos de plasticidad y sinapsis (figura 5a) y también durante procesos de inmunidad innata generando factores de neuroprotección y de reparación tisular en un proceso conocido como astrogliosis (Sofroniew, 2020). En pacientes *post-mortem* (Medeiros y LaFerla, 2013) y modelos animales de la EA (Olobarria *et al.*, 2010) se han visto astrocitos reactivos que se acumulan alrededor de las placas seniles en etapas tempranas de la enfermedad. Estos astrocitos activos se caracterizan por el aumento en la expresión de la proteína GFAP y signos de su deterioro funcional como el soporte metabólico neuronal y cambios morfológicos (aumento de proyecciones) (figura 5b) (Olobarria *et al.*, 2011).

Múltiples factores de riesgo para el desarrollo de la EA como la inflamación sistémica, la obesidad, lesiones traumáticas craneoencefálicas, degeneración del *locus coeruleus* y el envejecimiento son también factores que contribuyen a la activación de procesos inflamatorios en el SNC, lo cual podría ser una clave en el entendimiento de la aparición y desarrollo de la EA (Heneka *et al.*, 2015).

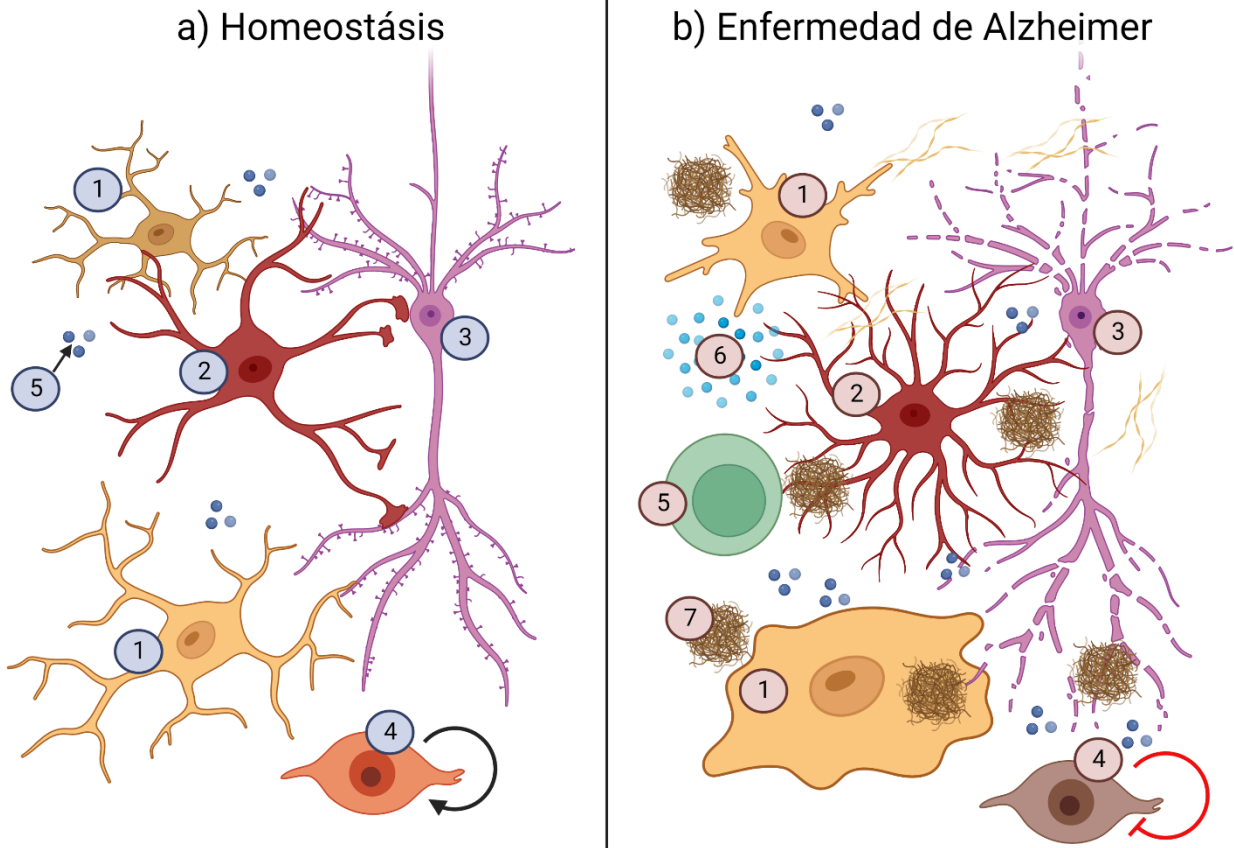


Figura. 5. Impacto de la inflamación en la homeostasis celular durante la enfermedad de Alzheimer. a) **Integración celular durante la homeostasis.** 1) Microglía, 2) Astrocito, 3) Neurona, 4) Progenitor neural (se encuentra en nichos neurogénicos). 5) Mediadores inflamatorios en homeostasis b) **Integración celular en la EA.** 1) Microglía reactiva (microgliosis), 2) Astrocito reactivo (astrogliosis), 3) Neurona enferma, 4) Progenitor neural (pérdida de la proliferación y diferenciación neural), 5) Infiltrado de células mononucleares del sistema inmune periférico 6) Aumento en la producción de mediadores inflamatorios 7) Acumulación de placas seniles. Obsérvese que ocurre un aumento en la producción de factores inflamatorios y de reparación derivado de la interacción con placas amiloides. Figura creada con Biorender.com.

Neurogénesis hipocampal adulta en la enfermedad de Alzheimer

En la actualidad se sabe que el nacimiento de nuevas neuronas no se restringe al periodo de desarrollo embrionario, ocurre en el cerebro adulto en distintos nichos neurales. Los más estudiados en mamíferos son la zona subventricular (ZSV) de los ventrículos laterales y la zona subgranular (ZSG) del giro dentado del hipocampo (figura 6), donde se mantienen poblaciones de células troncales neurales conocidas como células de la

glía radial (CGRs) o troncales tipo 1 y de precursores neurales (CPNs) o de tipo 2a, 2b y neuroblastos, las cuales continúan generando neuronas nuevas (figura 6c) (Fuentealba et al., 2012). Las neuronas maduras generadas en la ZSG mandan proyecciones axónicas a la zona CA3 del hipocampo conocidas como fibras de Mossy y fomentan la arborización detritica hacia CA1 (Lledo et al., 2006). El proceso completo de neurogénesis hipocampal adulta (NHA) incluye la proliferación, diferenciación, migración, extensión de neuritas y la integración sináptica, regulado por múltiples señales ambientales del nicho y de circuitos neurales locales (Toda et al., 2018).

Lo que entendemos sobre la neurogénesis en humanos se basa en una visión retrospectiva en análisis de tejidos *postmortem* y de lo que se sabe usando modelos animales. La NHA se encuentra evolutivamente conservada en mamíferos, incluyendo seres humanos (Jurkowski et al., 2020), teniendo un papel clave en la regulación de la fisiología asociada al estado cognitivo normal, con implicaciones en establecimiento de la memoria, el aprendizaje y el mantenimiento del estado anímico saludable, siendo un proceso activo que se modula en respuesta al daño y neurodegeneración (De-Lucia et al., 2015). Cuando la NHA no está correctamente regulada, se asocian síntomas relacionados a desordenes cognitivos, psicológicos y psiquiátricos como depresión y ansiedad (Toda et al., 2018).

Las células de la glía radial son células multipotenciales con propiedades astrocíticas que pueden dar origen tanto a células de la glía como a neuronas maduras dependiendo el tipo de señales que reciban (De Carolis, et al., 2013). Estas células expresan la proteína GFAP (del inglés, Glial fibrillary acidic protein) un marcador que se usa tradicionalmente para la identificación de astrocitos y Nestina una proteína de filamentos intermedios, que se considera el primer indicador hacia un destino neurogénico (Kempermann et al., 2015; Lagace et al., 2007). También expresan el factor de transcripción Sox2, presente durante la proliferación celular usándose como marcador de mantenimiento del linaje y BLBP (del inglés, Brain lipid binding protein) que se expresa mediante la activación de la vía de Notch (Kempermann et al., 2015).

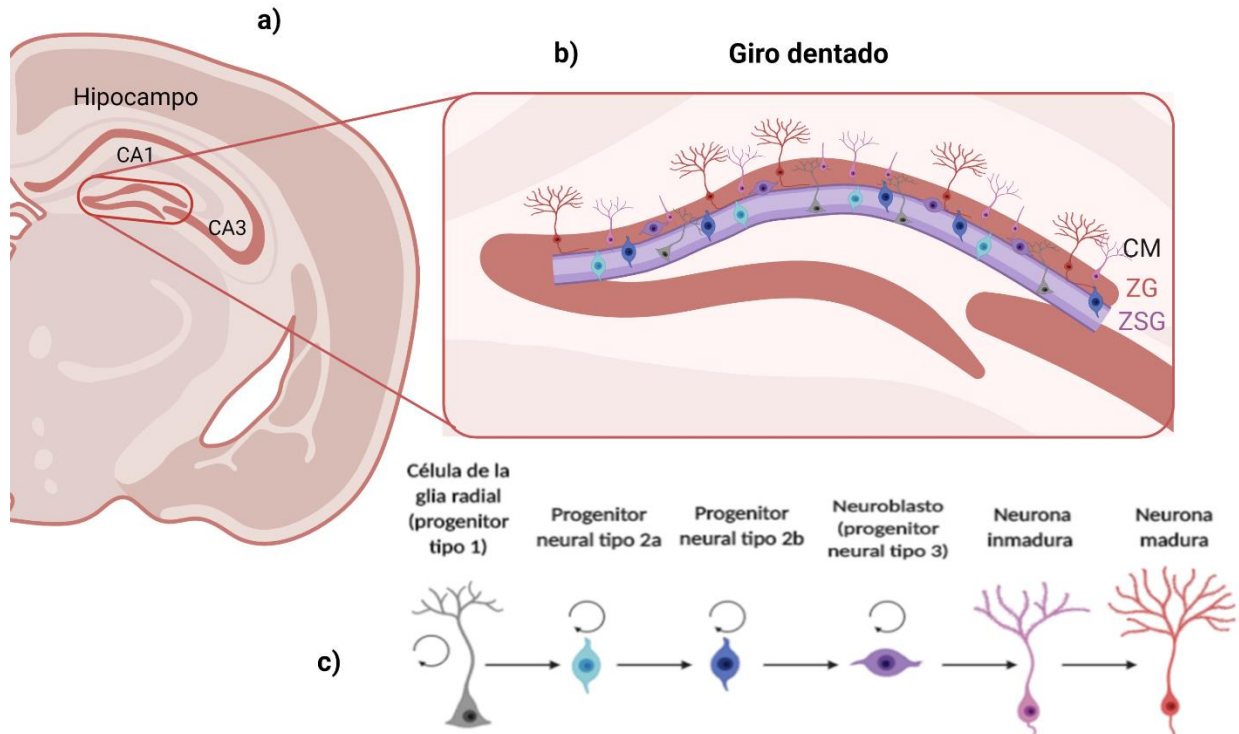


Figura 6. Neurogénesis hipocampal adulta. a) Ilustración del corte coronal del hemisferio izquierdo del cerebro de ratón donde se observa el hipocampo izquierdo; b) Capas del giro dentado del hipocampo; CM: capa molecular, ZG: Zona granular, ZSG: Zona subgranular; c) Fases de diferenciación de los precursores neurales hacia neuronas granulares maduras. Figura creada con Biorender.com.

Las células de la glía radial que definen su destino hacia un fenotipo neuronal dan origen a los progenitores neurales intermedios (progenitores tipo 2a), que mantienen una alta actividad proliferativa. En estas células se siguen expresando algunos marcadores presentes en las células de la glía radial como los mencionados anteriormente (GFAP, Nestina, BLBP y Sox2), aunque GFAP disminuye significativamente su expresión ya que el aumento en la expresión de este marcador determina la diferenciación de los precursores neurales hacia astrocitos. También se observa un cambio drástico en su morfología con carencia de proyecciones membranales. El perfil de expresión cambia gradualmente hacia un fenotipo de progenitores 2b por la actividad de algunos factores de transcripción como NeuroD y Prox1. En este punto las células expresan doblecortina (DCX) una proteína de asociación a microtúbulos relacionada con la actividad proliferativa, la cual presenta el mismo perfil de expresión con solapamiento en su

tendencia con PSA-NCAM (del inglés, Polysialylated-Neural cell adhesión molecule) (Kempermann *et al.*, 2015).

Las células progenitoras de tipo 3 son células que mantienen su capacidad proliferativa hasta que termina el proceso de migración que va de la ZSG hacia el giro dentado en el hipocampo, donde pierden su capacidad proliferativa y comienzan a expresar marcadores de diferenciación como NeuN, un marcador post-mitótico de linaje exclusivamente neuronal y Calretinina, un marcador transitorio que se expresa únicamente en neuronas inmaduras (Brandt *et al.*, 2003).

Una neurona se encuentra en estado de madurez cuando se integra en la red sináptica, durante este periodo que ocurre aproximadamente de la segunda a la cuarta semana desde el comienzo de la neurogénesis disminuye gradualmente la expresión de la proteína de unión a calcio Calretinina y se expresa en su lugar la proteína Calbindina, esta célula será fenotípicamente indistinguible de las neuronas granulares que comparten su nicho ya que habrá madurado (figura 7) (Kempermann *et al.*, 2015).

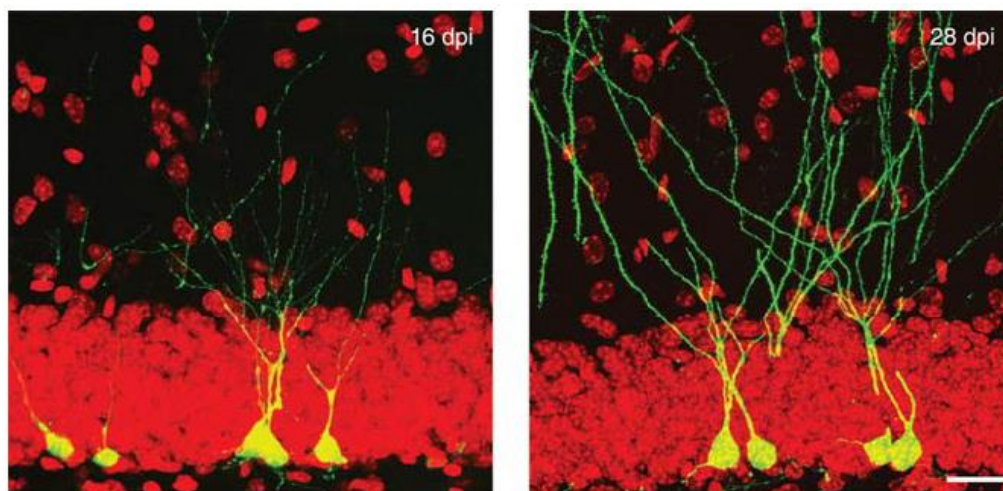


Figura 7. Maduración de neuronas granulares de ratón en la neurogénesis hipocampal adulta. Células proliferativas fueron marcadas con la inyección de un vector retroviral que conlleva a la expresión de GFP bajo el promotor CAG (del inglés, *CMV early enhancer/chicken β actin*) usado para observar la diferenciación de precursores neurales. Lado izquierdo: 16 días post-inyección. Lado derecho 28 días post inyección. Figura tomada de Kempermann *et al.*, (2015).

La mayoría de la evidencia en la literatura muestra que ocurre una disminución en la NHA en modelos murinos de la enfermedad de Alzheimer (tabla 1). De forma contradictoria en algunos artículos se ha visto también un aumento en los marcadores de neurogénesis (ver tabla 1). Esto podría deberse a múltiples factores, incluyendo el modelo y protocolo experimental, la edad y procesos fisiológicos específicos como que en etapas tempranas de la enfermedad se podría exacerbar la proliferación de precursores neurales como mecanismo de respuesta al deterioro neural en un intento por restablecer la homeostasis. Es también importante recordar que la proliferación de células troncales y la identificación de marcadores tempranos de células progenitoras no necesariamente llevará al establecimiento de neuronas funcionales (Toda *et al.*, 2018), en condiciones normales y como mecanismo de regulación el 80% de los precursores neurales entran en proceso de apoptosis (Fourgeaud *et al.*, 2016), ésto puede ocurrir en cualquier etapa anterior a la producción de una neurona inmadura (Kempermann *et al.*, 2015). Además, se sabe que durante la EA se ve comprometida la capacidad autofágica por parte de la microglía (Álvarez-Arellano *et al.*, 2018), mecanismo que tiene un papel fundamental en la regulación de la eferocitosis (fagocitosis de células apoptóticas), por lo que podría haber una acumulación de células progenitoras apoptóticas que no pueden ser eliminadas.

En un acercamiento más reciente (Moreno-Jiménez *et al.*, 2019) usando como marcador DCX, proteína que se sabe es expresada por células progenitoras e interviene en mecanismos de motilidad en la migración de precursores neurales en modelos murinos, encontraron células neurales DCX positivas en individuos sanos de hasta 90 años las cuales migran y se establecen dentro del hipocampo. Además, también encontraron este tipo celular en tejido de pacientes con EA, observando una disminución en la cantidad de progenitores con respecto al estadio de avance de la enfermedad (figura 8).

Muchas de las moléculas involucradas en el desarrollo de la enfermedad son moduladoras de vías de activación de la neurogénesis. Se sabe que la Presenilina-1 (PS1) regula la diferenciación de precursores neurales y activa la vía de Notch-1, además se encuentra mutada en algunos de los casos hereditarios de la enfermedad de

Alzheimer. El complejo α -Secretasa se sabe que también regula indirectamente la proliferación de precursores neurales (Gakhar-Koppole, 2008) a través del procesamiento de la APP por la vía no amiloideogénica, al mismo tiempo se sabe que existe una relación entre la disminución en la expresión del complejo y el desarrollo de la EA. Se ha observado que las mutaciones relacionadas con Psen1 y la vía no amiloideogénica (producción de sAPP α) afectan la actividad enzimática durante el metabolismo, lo que disminuye la neurogénesis.

Tabla 1. Artículos publicados acerca del impacto de la enfermedad de Alzheimer en la neurogénesis hipocampal adulta.

Modelo de AD	Edad en que se observan cambios	Marcadores de proliferación y/o neurogénesis	Efecto en NHA observado	Referencia
Ratón C56B16 mutante de APP	12 meses	BrdU y NeuN	Disminución	Haughey <i>et al.</i> (2002)
Ratón Tg2576 (doble mutante APP/PS1)	6 meses	BrdU, NeuN y GFAP	Disminución	Dong <i>et al.</i> (2004)
Ratón C56BL6 transgénico de mutación de PS1	3 meses	BrdU y NeuN	Disminución	Wang <i>et al.</i> (2004)
Ratón mutante de PS-1	3 meses	BrdU, β III-Tubulina, Calbindina	Disminución	Wen <i>et al.</i> , (2004)
Ratón J20, PDGF (mutante APP swe/ind)	12 meses	BrdU, DCX	Aumento	Jin <i>et al.</i> , (2004)
Ratón mutante de PS-1	3 meses	BrdU	Aumento	Chevallier <i>et al.</i> , (2005)
Ratones C56BL6, Webster y DBA2 mutantes de APP (PDAPP)	2 y 12 meses	BrdU, NeuN, GFAP, DCX y AC3	* 2 meses de edad (igual a control). * 12 meses de edad (disminuida).	Donovan <i>et al.</i> (2006)

Ratón doble mutante (APP/PS1)	8-9 y 18-24 meses	BrdU, NeuN, DCX y MCM2	Disminución	Zhang <i>et al.</i> (2007)
Ratón doble mutante (APP/PS1)	6 meses	BrdU, NeuN	Disminución	Verret <i>et al.</i> (2007)
Ratón J20, PDGF (mutante APP swe/ind)	3 y 5 meses	BrdU, Ki67, NeuN, PSA-NCAM	3 meses (aumentada) 5 meses (disminución)	Lopez-Toledano y Shelanski (2007)
Ratón 3xTgAD (triple mutante, APP, PS1 y Tau)	2,3,4,6 y 9 meses	BrdU, DCX	*2-4 meses de edad (igual control). *6 y 9 meses de edad (disminuida).	Rodríguez <i>et al.</i> (2008)
Ratón C57BL6 mutante de APP23	6 y 18 meses	BrdU, NeuN, DCX y calretinina	Igual que el control	Mirochnic <i>et al.</i> (2009)
Ratón J20, PDGF (mutante APP swe/ind)	2-3 meses	Reportero de GFP y morfología	Disminución	Sun <i>et al.</i> , (2009)
Ratón 3xTgAD	11 y 18 meses	BrdU, Ki67, DCX	Disminución	Hamilton <i>et al.</i> , (2010)
Ratón doble mutante (APP/PS1)	2 meses	BrdU, DCX	Disminución	Demars <i>et al.</i> , (2010)
Ratón 3xTgAD	6 meses	BrdU/NeuN, DCX	Disminución	Valero <i>et al.</i> , (2014)
Ratón 5XFAD (transgénico de APP y PS1 mutantes)	2 meses	DCX	Disminución	Moon <i>et al.</i> , (2014)
Ratón 3xTgAD	2 meses	Ki67, DCX, GFAP	Disminución	Hamilton <i>et al.</i> , (2015)
Ratón doble mutante (APP/PS1)	6 meses	BrdU, DCX, GFAP, Nestina-GFP	Disminución	Zeng <i>et al.</i> , (2016)
Ratón 5XFAD	2 meses	DCX y Ki67	Disminución	Zaletel <i>et al.</i> , (2018)
Cerebros post-mortem de pacientes con EA	52 a 97 años	DCX, morfología y migración	Disminución	Moreno-Jimenez <i>et al.</i> , (2019)

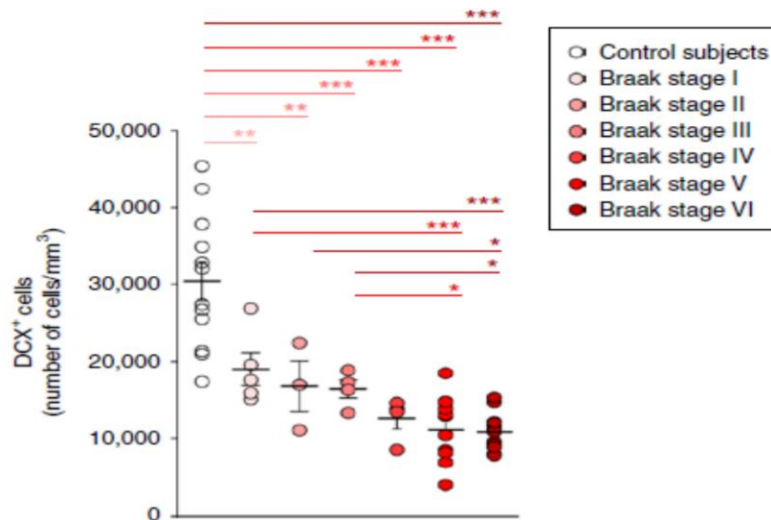


Figura 8. Cuantificación de células progenitoras de la ZSG en individuos con distintos niveles de desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. Figura tomada de Moreno-Jiménez *et al.*, (2019).

La neuroinflamación impacta la neurogénesis hipocampal adulta

En diversos eventos patológicos y traumatismos de respuesta inflamatoria aguda se ha visto que la neuroinflamación altera la neurogénesis, como un mecanismo para la reparación de daños causados (Miller y Gómez-Nicola, 2014). En contraparte, se ha visto que durante un proceso neuroinflamatorio crónico ocurre una disminución en la NHA. (Ekdahl *et al.*, 2003; Monje *et al.*, 2003). Melo-Salas y colaboradores reportan que, durante un proceso inflamatorio sistémico inducido, disminuye de manera significativa la cantidad de CPNs del tipo 2 en fases G2, S, y M del ciclo celular, lo que explica la caída en la neurogénesis (2018).

De manera interesante, es posible restaurar la neurogénesis a tasas normales inhibiendo el proceso inflamatorio. Ekdahl y colaboradores, administraron dosis de lipopolisacáridos (LPS) en modelos murinos para inducir un proceso inflamatorio sistémico generando un deterioro en la neurogénesis hipocampal (2003). Posteriormente, administraron minociclina, un inhibidor de la actividad de la microglía, logrando recuperar la

neurogénesis. En un trabajo similar realizado por Monje y colaboradores, bloquearon la neuroinflamación con indometacina, un fármaco anti-inflamatorio no esteroideo, con lo cual también lograron aumentar la neurogénesis adulta después de un insulto inflamatorio (2003). Algunos estudios indican que el tratamiento con ciertos componentes anti-inflamatorios suprime la actividad neuroinmune y esto ayuda a reducir la probabilidad de desarrollar EA. Además, Ortega-Martínez y colaboradores observaron que al depletar la microglía casi por completo en ratones modelos de Alzheimer es posible reestablecer la neurogénesis hipocampal adulta a sus niveles basales (2019). En este sentido se han propuesto estrategias de prevención usando diversos mecanismos para inhibir la inflamación modulada por la microglía como el uso de fármacos anti-inflamatorios no esteroideos, aunque se ha observado que el uso de estos fármacos puede provocar efectos secundarios como daño hepático y renal (Wyss-Coray y Rogers, 2012).

La microglía regula tanto el proceso inflamatorio como la NHA. Se sabe que existe un incremento en la NHA relacionada a la expansión de la población de la microglía, observando también que al inhibir su proliferación disminuye a su vez la NHA. Este evento supone que la microglía regula la NHA dependiendo el contexto inflamatorio (De-Lucia *et al.*, 2015; He *et al.*, 2014).

La activación del inflamosoma, un complejo multiprotéico que se ensambla debido a diversas señales de estrés celular, promueve la activación de Caspasa-1 que cataliza el corte de las proformas de Interleucina 1 β (IL-1 β) e Interleucina 18 (IL-18) y los transforma a sus formas activas como citocinas pro-inflamatorias (Yu y Finlay, 2008). Caspasa-1 se expresa de manera constitutiva principalmente en macrófagos y en la microglía y está involucrado tanto en procesos pro-inflamatorios y de muerte celular (Gemma *et al.*, 2007). Se ha reportado un aumento en la producción de IL-1 β e IL-18 en pacientes y ratones modelo de la EA (Heneka *et al.*, 2015). Halle y colaboradores observaron que la acumulación de péptido β A promueve la activación del inflamosoma NLRP3 en la microglía lo que activa a Caspasa-1 (2008). A su vez, se ha visto que la actividad de Caspasa-1 está autorregulada, ya que actúa como mediador de su activación promoviendo el ensamblaje del inflamosoma, lo que podría explicar su persistencia

durante un proceso inflamatorio crónico (Van de Veerdonk *et al.*, 2011). Al inhibir Caspasa-1 es posible mejorar significativamente las funciones cognitivas asociadas a inflamación relacionadas con la actividad en el hipocampo, disminuyendo la producción de IL-1 β , TNF α y Caspasa-3 (Gemma *et al.*, 2005). Además, en otra aproximación Gemma y colaboradores observaron que al administrar Ac-YVAD-CMK (inhibidor específico de Caspasa-1) a ratones de edad avanzada se puede revertir el deterioro en la proliferación celular asociada a neurogénesis hipocampal adulta provocado por el aumento en la inflamación sistémica (2007). En ratones modelo de la EA deficientes de Caspasa-1 o del inflamosoma NLRP3 se ha observado una protección contra la pérdida de memoria espacial, la plasticidad sináptica hipocampal y otros efectos relacionados con la enfermedad (Heneka *et al.*, 2013). Con respecto a esto, Álvarez-Arellano y colaboradores observaron una reducción en la acumulación de placas β A en un modelo murino de la EA (5XFAD) deficiente en la expresión de Caspasa-1, lo cual correlacionó con el mantenimiento en la capacidad cognitiva de manera muy similar al ratón silvestre (2018). Este estudio demostró que la ausencia de proceso inflamatorio en el modelo 5XFAD/Caspasa 1-/- conlleva al restablecimiento del flujo autofágico.

Algunos estudios demuestran que la actividad de algunos factores de crecimiento como TGF- β , ILGF-I, BDNF y FGF (Battista *et al.*, 2006; Lichtenwalner *et al.*, 2000; Sharfman *et al.*, 2005; Wagner *et al.*, 1999) y de algunas citocinas anti-inflamatorias como IL-4 e IL-10 (Butovsky *et al.*, 2006; Kiyota *et al.*, 2012) promueven la neurogénesis, sin embargo, recientemente Sanchez-Molina y colaboradores demostraron que el aumento en la expresión de IL-10 promueve un desequilibrio en la señalización microglía-neurona, lo que provoca la disminución de la NHA y la pérdida de las capacidades cognitivas en modelos murinos (2022), por lo que es posible que para mantener las tasas neurogénicas sea necesario mantener un estricto equilibrio en la producción de citocinas pro y anti-inflamatorias.

KChIP3 en la EA y como intermediario en la diferenciación de células troncales

Como observamos anteriormente durante la EA se ha observado que la pérdida de las funciones cognitivas, la neurodegeneración y la neuroinflamación están ligadas a una alteración en la homeostasis de Ca^{2+} en el SNC, esto altera directamente la actividad de proteínas moduladas por su interacción con Ca^{2+} y múltiples vías de señalización.

KChIP3 (del inglés, Potassium channel interacting protein 3) es una proteína modulada por Ca^{2+} , también conocida como DREAM (del inglés "Downstream Regulatory Element Antagonistic Modulator) o Calsenilina de la familia de las proteínas EF-hand, la cual mantiene funciones específicas por su unión a proteínas de membrana como canales de potasio dependientes de voltaje tipo A; en el citoplasma interactuando con ARC y Cadmodulina y en el núcleo regula la transcripción mediante la unión a sitios DRE en el ADN o mediante la interacción con nucleoproteínas reguladoras como CREB (Carrion *et al.*, 1999; Rivas *et al.*, 2004). Además, actúa como segundo mensajero para el control y regulación de múltiples vías, entre las cuales se encuentran la regulación de procesos inflamatorios y apoptóticos (Grillo *et al.*, 2018).

KChIP3 se expresa en todas las regiones del tejido cerebral en el ratón adulto, con una alta expresión en el hipocampo en las capas de células piramidales, desde CA1 a CA3 y en la capa granular del giro dentado (Spreafico *et al.*, 2001). Fontán-Lozano y colaboradores observaron que en ratones de 18 meses de edad los animales knock-out (KO) de KChIP3 se mantienen las capacidades cognitivas, la plasticidad sináptica y el tamaño total del hipocampo observadas en ratones más jóvenes (6 meses de edad), además de mostrar una expresión similar de proteínas como NeuN y MAP-2 (2009).

En modelos murinos de la EA se han reportado niveles elevados de KChIP3 en el área de la corteza y el hipocampo donde se encuentra localizada la actividad inflamatoria dependiente de la microglía y la astrogía que rodea a las placas y ovillos de péptido β -amiloide. El bloqueo de la expresión de KChIP3 genera un efecto protector a la muerte

celular (Dong-Gyu *et al.*, 2004). De manera interesante Dong-Gyu y colaboradores observaron que cuando se inactiva Caspasa-1 en modelos de EA con el inhibidor específico z-VAD-fmk se bloquea la transcripción de KChIP3, ligando su transcripción con mecanismos que regulan la activación de procesos inflamatorios (2004).

También se ha visto que KChIP3 regula la diferenciación de células troncales embrionarias humanas (hESCs) a través de prevenir la interacción de la nucleoproteína reguladora CREB con el coactivador CBP (proteína de unión a CREB) manteniendo de esta forma, el fenotipo pluripotente de las hESCs e inhibiendo su diferenciación (Fontán-Lozano *et al.* 2016). CREB es un importante regulador transcripcional durante el proceso de la diferenciación neuronal y es esencial para el progreso de la neurogénesis adulta (Merz *et al.*, 2011). Villeda y colaboradores identificaron que al promover un incremento de CREB fosforilado en el hipocampo se rescatan las capacidades cognitivas y la plasticidad sináptica deterioradas durante el envejecimiento (2014). Por lo tanto, se propone que la inhibición de KChIP3 podría aumentar la diferenciación de hESCs y la neurogénesis adulta a través de inducir la activación de CREB en precursores neurales (figura 9) (Fontán-Lozano *et al.*, 2016).

Por otra parte, Cebolla y colaboradores observaron que durante el desarrollo embrionario al activarse la vía de PACAP (polipéptido de la adenilato ciclasa de la pituitaria) se estimula el aumento de Ca^{2+} en el citoplasma lo que provoca la activación de KChIP3, y este a su vez modula la diferenciación de precursores neurales mediante su interacción con sitios DRE en el promotor de GFAP, promoviendo su expresión, esto provoca que las células precursoras neurales cambien su destino hacia la diferenciación de astrocitos (2008). De manera similar podemos especular que esto podría estar ocurriendo durante la neurogénesis adulta.

Otro aspecto que refuerza la hipótesis de que KChIP3 participa como modulador de la neurogénesis adulta es que actúa como regulador negativo de genes que expresan proteínas que promueven la neurogénesis como c-Fos, c-Jun, Jun-B y BDNF (Fontán-Lozano *et al.*, 2009), además modula la actividad de proteínas involucradas en la

regulación de la neurogénesis adulta como las presenilina 1 y 2, PSD-95, Calmodulina y ARC (Buxbaum *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2010; Melström *et al.*, 2016).

Debido a que la NHA recapitula al desarrollo neural y que la diferenciación de la población de células de la glía radial se rigen por señales moleculares homólogas (Espósito *et al.*, 2005) hipotetizamos que la actividad de KChIP3 tiene el mismo efecto observado durante la diferenciación de células troncales (Fontán-Lozano *et al.*, 2016) y en precursores neurales durante el neurodesarrollo (Cebolla, *et al.*, 2008) y que esta proteína podría tener un papel clave en la neurogénesis adulta promoviendo la astrogliogénesis e inhibiendo la neurogénesis durante la EA, lo que nos lleva a pensar que en ausencia de esta proteína es posible rescatar parcial o totalmente la tasa de neurogénesis adulta, además mejorar los síntomas asociados a la enfermedad (figura 9).

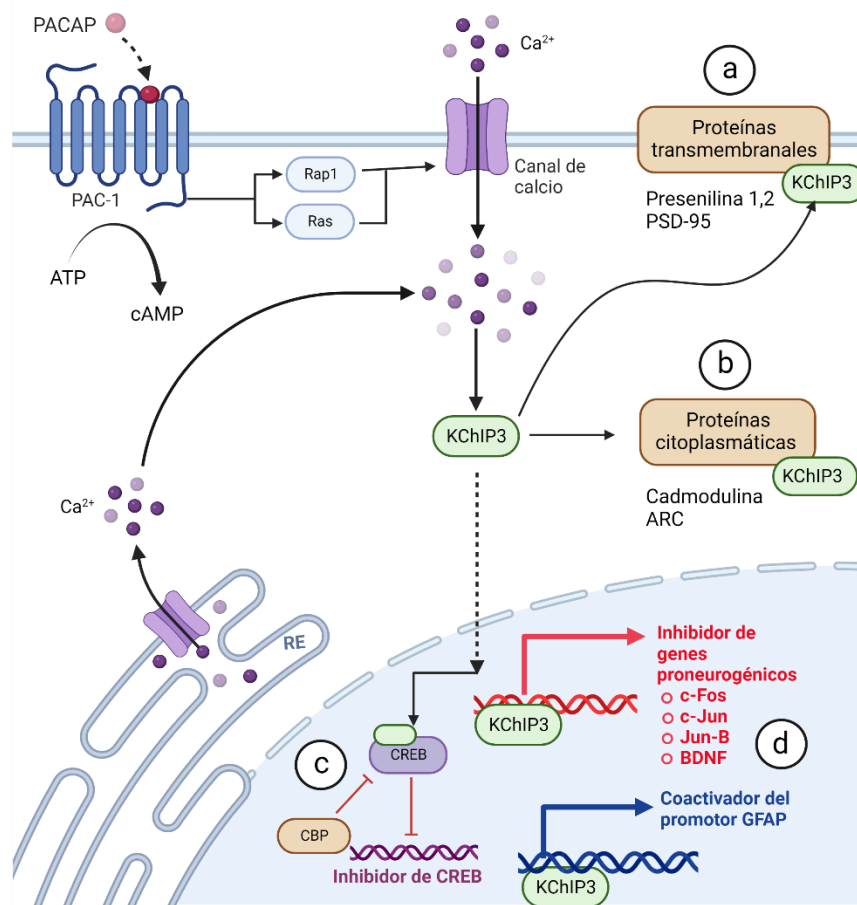


Figura 9. Actividad regulatoria de KChIP3 que podría impactar a la neurogénesis hipocampal adulta. En esta figura se resume el conocimiento que se tiene de la actividad de la proteína KChIP3 que podrían participar en la modulación de la neurogénesis hipocampal adulta. En el esquema podemos ver que diversas moléculas señalizadoras (como PACAP) provocan activación de vías de señalización que promueven la entrada Ca^{2+} al citosol desde el parénquima o liberado del RE, esto promueve la actividad de la proteína KChIP3. Al activarse KChIP3 tiene la capacidad de interactuar con diversas proteínas que modulan la neurogénesis como: **a)** proteínas de membrana (Presenilinas 1-2, PSD-95), **b)** proteínas citoplasmáticas (Calmodulina y ARC) y **c)** proteínas nucleares (CREB). **d)** Además KChIP3 tiene la capacidad de unirse al ADN en sitios DRE de promotores génicos relacionados con el control fisiológico de la neurogénesis tanto inhibiendo la expresión de genes neurogénicos (c-Fos, c-Jun, JUN-B, BDNF) como promoviendo la expresión de genes astrocitogénicos (GFAP). Figura creada con Biorender.com.

JUSTIFICACIÓN

Dado que hasta el momento no se cuenta con una estrategia terapéutica para retrasar y/o prevenir la EA, es de suma importancia el estudio de las bases moleculares que subyacen a esta patología. Así, este estudio busca determinar si en ausencia de la proteína KChIP3 es posible rescatar las capacidades cognitivas.

HIPÓTESIS

La ausencia de KChIP3 rescata las capacidades cognitivas en un modelo murino de la enfermedad de Alzheimer.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar si la ausencia de KChIP3 restablece las capacidades cognitivas y la neurogénesis adulta en un modelo murino de la enfermedad de Alzheimer.

Objetivos particulares

1. Determinar si la ausencia de KChIP3 previene el deterioro cognitivo asociado a una inflamación sistémica en machos de un modelo murino.
2. Determinar si la ausencia de KChIP3 previene el deterioro cognitivo en ratones hembra y machos modelo 5XFAD de la enfermedad de Alzheimer.
3. Generar un modelo para evaluar neurogénesis hipocampal adulta en el ratón 5XFAD que no expresa KChIP3.

MATERIALES Y MÉTODOS

Organismo modelo

(*Mus musculus*) Ratón C57BL/6J

Para todos los estudios realizados en este trabajo se utilizaron ratones con el fondo genético de la cepa C57BL/6J (The Jackson Laboratory ®), los cuales fueron mantenidos y sacrificados en el bioterio mediante alimentación *ad libitum* y siguiendo la normativa establecida por el Comité de Bioética del Instituto de Biotecnología de la UNAM con base en lo establecido en la NOM-062-ZOO-1999.

También conocido como Black 6, B6, B6J, C57 Black es un modelo usado en diversas ramas de estudio incluyendo la neurobiología y la inmunología. Fue el

primero en su especie del que se secuenció su genoma, expresa bien las mutaciones y es un buen modelo de estudio de inflamación crónica.

En el fondo genético del ratón C57BL/6J se usaron los siguientes organismos transgénicos y mutantes:

|

1. Ratón 5XFAD

Modelo transgénico de la enfermedad de Alzheimer con la inserción del gen que codifica la APP humana con 3 mutaciones (Swedish [K670N/M671L], Florida [I716V] y London [V717I]) y el gen que codifica para la Psen1 humana con 2 mutaciones (M146L y L286V). Estas mutaciones provocan el desarrollo de EA de tipo familiar. El modelo desarrolla amiloideopatía severa rápidamente, pudiéndose detectar placas seniles en el hipocampo y la corteza aproximadamente a los 6 meses de edad, por lo que es un modelo ideal para estudiar el efecto de la neuroinflamación crónica provocada por la acumulación de péptido β -amiloide en el parénquima cerebral (Oakley *et al.*, 2006).

2. Ratón R26R-eYFP y nestina-Cre^{ERT2}

El modelo es descrito con detalle en (Lagace *et al.*, 2007). Se trata de un organismo transgénico formado por la inserción en el locus endógeno del gen Gt(ROSA)26Sor de la secuencia que codifica para la expresión de una proteína amarillo fluorescente modificada (enhanced YFP) río abajo de un codón de paro flanqueado por sitios loxP. Además, la construcción presenta la recombinasa Cre fusionada con el receptor de estrógenos modificado (Cre^{ERT2}) cuya expresión se encuentra bajo el promotor de Nestina, marcador de progenitores neurales.

Para inducir fluorescencia durante la neurogénesis se administraron inyecciones intraperitoneales de tamoxifeno 180mg/kg durante 5 días. El tamoxifeno se preparó 20mg/ml en una solución de etanol al 10% y aceite de girasol 90% (Lagace *et al.*, 2007). El tamoxifeno se une y activa a la recombinasa Cre^{ERT2} la

cual remueve el codón de paro flanqueado por los sitios loxP y posibilita la expresión de la proteína fluorescente eYFP, expresándose diferencialmente en los progenitores neurales (figura 10).

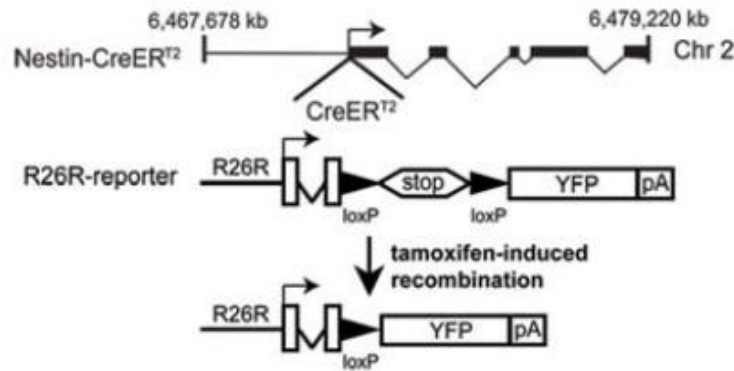


Figura 10. Modelo Nestina/Cre con eYFP en el gen endógeno bajo el promotor R26r. Reportero de expresión de neurogénesis adulta inducido con la administración de tamoxifeno. Tomado de Lagace *et al.* (2007).

Es importante destacar que la administración de tamoxifeno puede tener un efecto fisiológico relacionado con la EA (Pandey, *et al.* 2016) y que podría ser diferente en hembras y machos (Teter *et al.*, 2002).

Aunado a esto es importante destacar que el uso de tamoxifeno en el modelo R26R-eYFP y nestina-Cre/ERT2 es confiable para medir la tasa neurogénica, ya que además de mostrar un panorama mucho más específico de la neurogénesis adulta que el uso de metodologías clásicas como administración de marcadores de la proliferación (BrdU, EdU, CrdU, etc.), permite la observación más completa del destino neurogénico (fate mapping).

3. Ratón KCHIP3 KO

El ratón KCHIP3 KO contiene un cassette de neomicina diseñado para reemplazar los exones 3-5 del gen *Kcnp3* (del inglés, Kv channel interacting protein 3) que

codifica para la proteína KChIP3. Los ratones homocigotos del gen mutante no expresan la proteína KChIP3 presentando un fenotipo de reducción a respuesta térmica aguda, de dolor visceral y mecánico además de disminuir el dolor neuropático crónico y el dolor provocado por inflamación (Cheng *et al.*, 2002).

Programa de cruzas para la obtención de organismos modelo nestina-Cre/R26R-eYFP/5XFAD/KChIP3KO

Los modelos experimentales usados en la estrategia experimental de este proyecto fueron obtenidos usando un programa de cruzas de los distintos modelos necesarios mencionados anteriormente (figura 11).

Para verificar el genotipo de cada ratón se realizó una prueba de PCR punto final por cada mutación para identificar los alelos de los genes transgénicos (Cre, eYFP, Psen-1) y para el KO de KChIP3 la presencia del cassette de neomicina (Neo) utilizado como reportero en el proceso de transformación.

De las cruzas se obtuvieron hembras y machos de los siguientes grupos experimentales:

Grupo 1: Ratón R26R-eYFP/nestina-Cre^{ERT2}/ 5XFAD / KChIP3 KO

Organismo modelo de la EA que no expresa KChIP3, para determinar neurogénesis adulta (Control 5XFAD/ KChIP3 KO).

Grupo 2: Ratón R26R-eYFP/nestina-Cre^{ERT2}/5XFAD

Organismo modelo de la EA que expresa KChIP3, para determinar neurogénesis adulta (Control 5XFAD). **Grupo 3: Ratón R26R-eYFP/nestina-Cre^{ERT2}/KChIP3 KO**

Organismo que no expresa KChIP3, para determinar neurogénesis adulta.
(Control KChIP3 KO).

Grupo 4: Ratón R26R-eYFP/nestina-Cre^{ERT2}

Organismo que expresa constitutivamente KChIP3, para determinar neurogénesis adulta (control WT).

El diseño del protocolo de cruzas se realizó en cuatro generaciones por 3 vías diferentes que convergen en la F4 para la obtención del modelo (figuras 11).

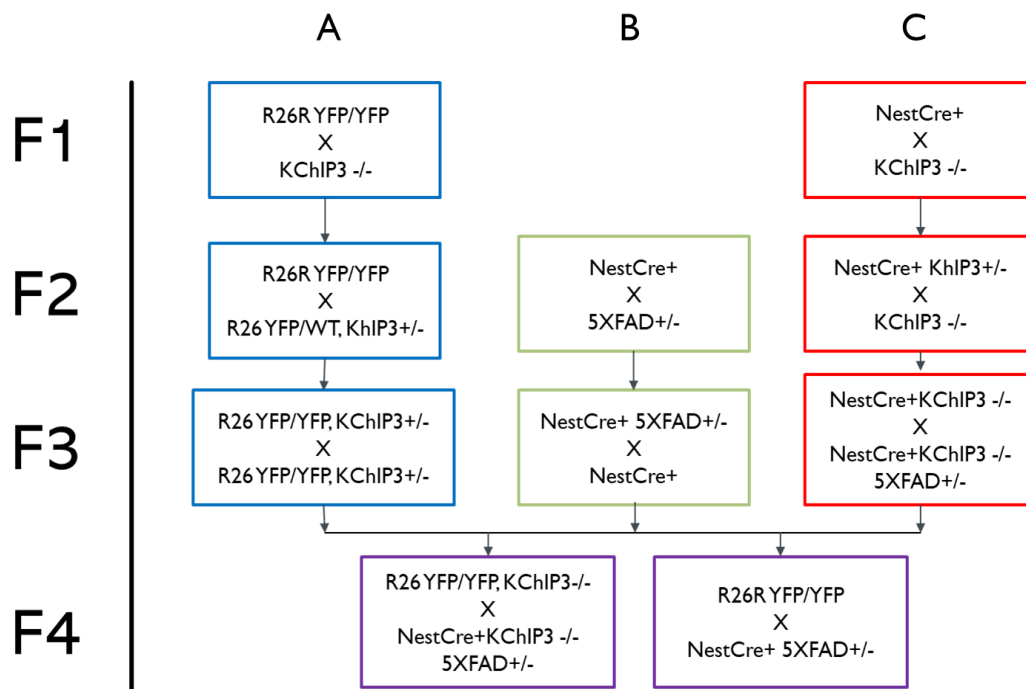


Figura 11. Programa de cruzas para la obtención de modelos experimentales.

Se seleccionaron los ratones con el genotipo deseado para la siguiente cruce de manera escalonada hasta la obtención de los modelos experimentales.

La estrategia de selección se muestra a continuación en relación con los genotipos que se podían obtener de manera predictiva usando tablas de Punnet (figuras 12 -16).

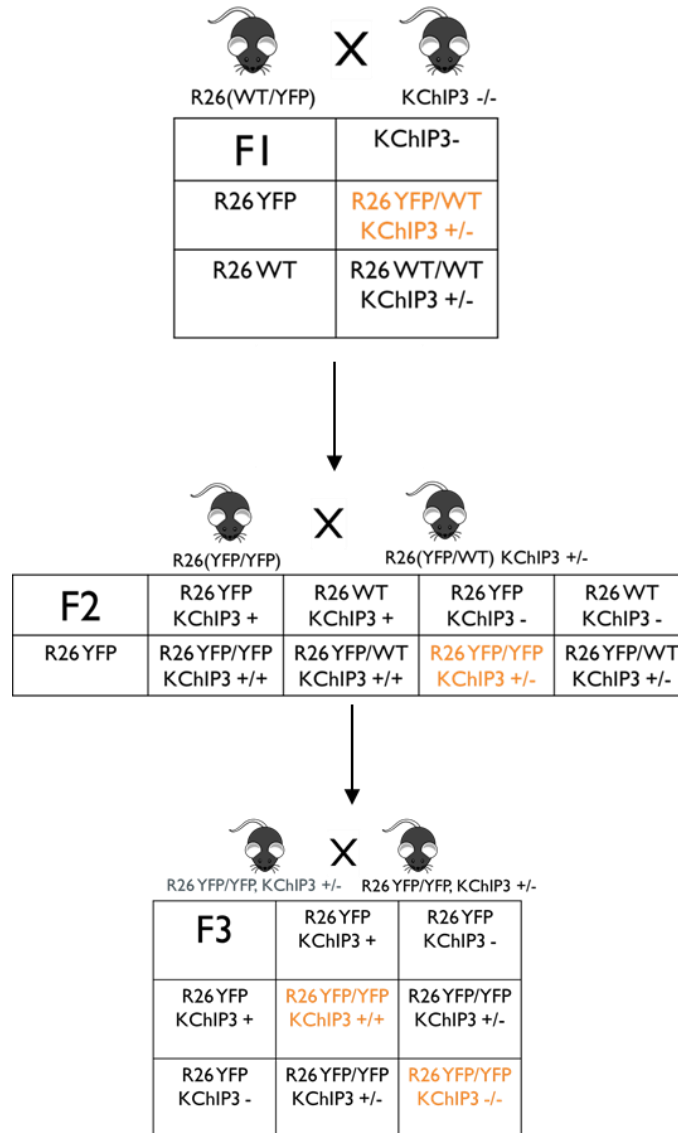


Figura 12. Planteamiento de cruzas de la vía A de las F1, F2, F3.

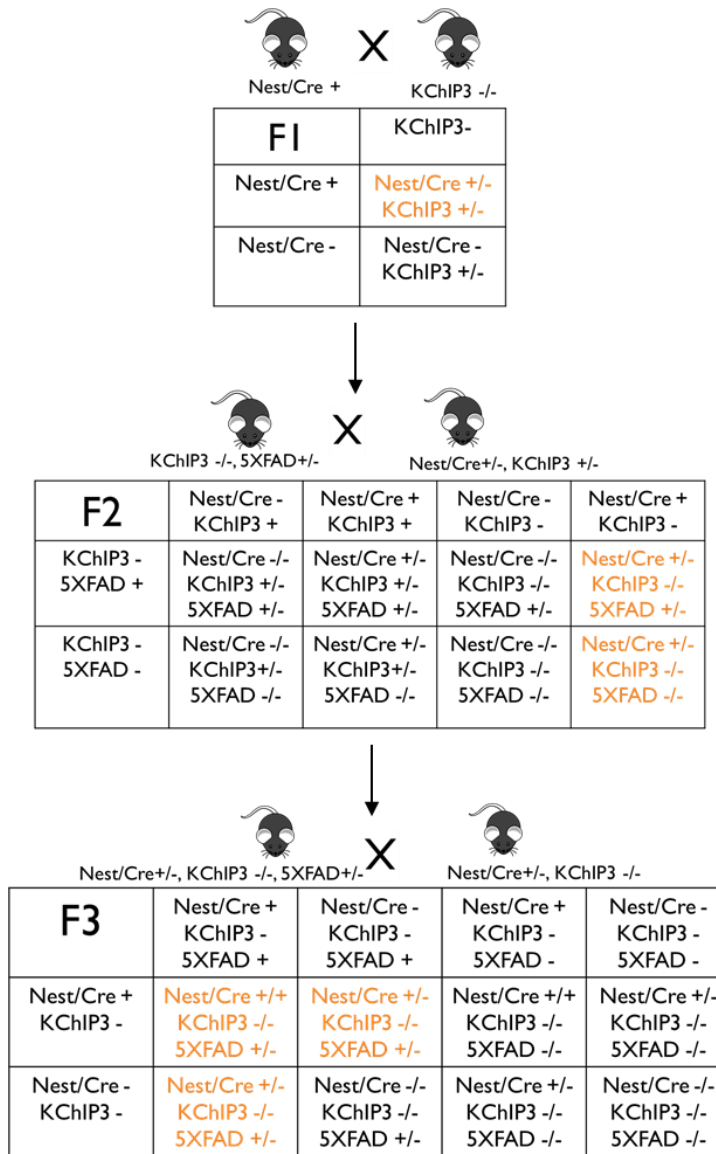


Figura 13. Planteamiento de cruzas de la vía C de las F1, F2, F3.

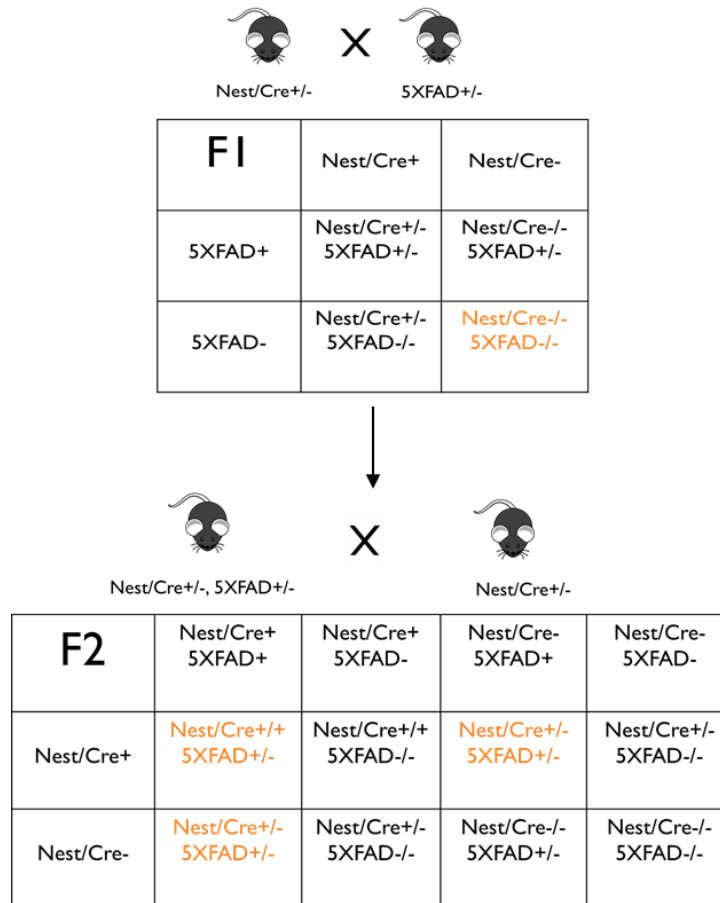


Figura 14. Planteamiento de cruzas de la vía B de las F1, F2, F3.

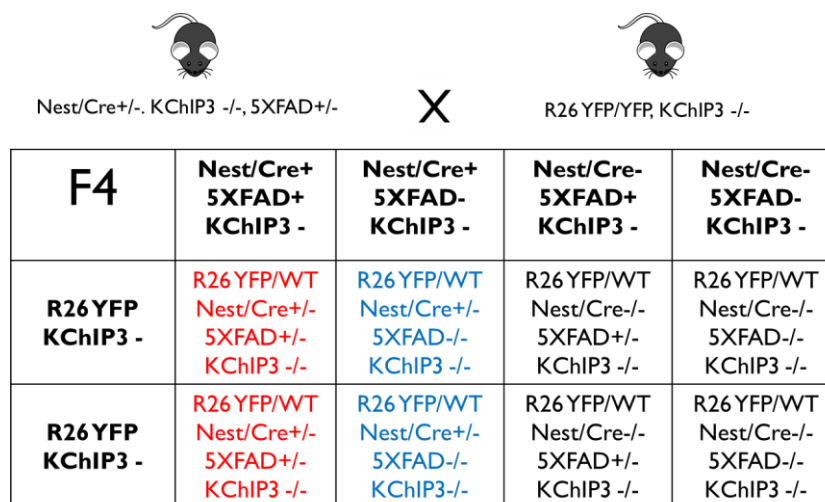


Figura 15. F4 para obtención del grupo 1 (rojo) y grupo 3 (azul).

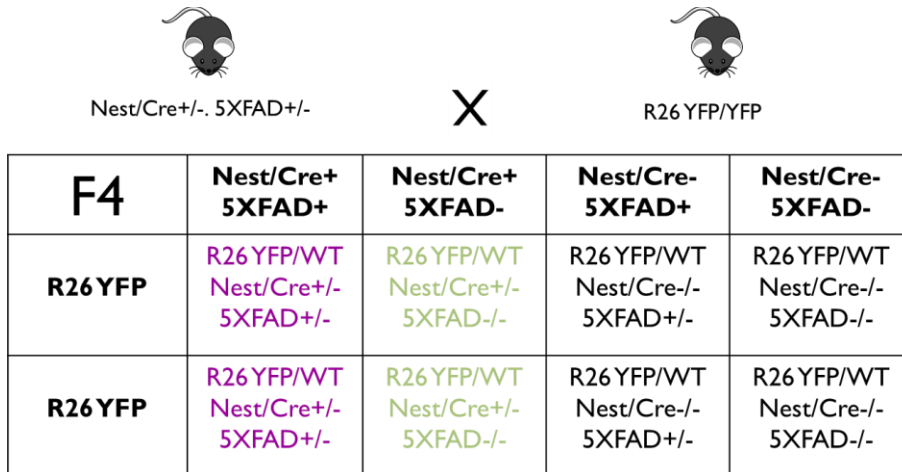


Figura 16. F4 para obtención del grupo 2 (morado) y grupo 4 (verde).

Inducción de inflamación por LPS

Para inducir un proceso neuroinflamatorio se realizó la administración intraperitoneal de LPS 1 mg/kg y 125 µg/kg (*Escherichia coli* serotype O127:B8, Cat# L3129; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) en una sola dosis a ratones WT de 2 meses de edad como se realizó en Perez-Dominguez *et al.* (2019), ratones WT y KChiP3 KO de 6 meses de edad para poder comparar con ratones 5XFAD que desarrollan deficiencia cognitiva a partir de los 6 meses de edad. Como control negativo se administró vehículo (PBS 1X) a los ratones.

Administración de BrdU para marcar células proliferativas

Para marcar células proliferativas se administró por vía intraperitoneal BrdU (50 mg/kg) durante 3 días una dosis por día a ratones WT de 2 meses y durante 5 días, dos dosis por día a ratones WT y KChiP3 KO de 6 meses de edad como se muestra en Perez-Dominguez *et al.* (2019).

Administración de tamoxifeno para la activación de la recombinasa Cre en los precursores neurales usando los transgenes Nest-Cre/ R26r-eYFP

Para promover la actividad recombinasa y la expresión de la proteína eYFP en precursores neurales se administró tamoxifeno vía intraperitoneal a ratones de 7 meses en una dosis de 180 mg/kg/d durante 5 días disuelta en una solución (10% etanol, 90% aceite de girasol), siendo la dosis estandarizada por Lagace *et al.*, (2007).

Pruebas de capacidades cognitivas

Se realizaron pruebas de análisis cognitivo y conductual que involucran la actividad hipocampal y su correlación a otras áreas neurales relacionadas con el establecimiento de memoria y el estado fisiopatológico en que se encuentran los ratones. Las pruebas se muestran a continuación:

1. Prueba de campo abierto

La prueba de campo abierto es una de las pruebas más comúnmente usadas para determinar el comportamiento y estado anímico en diversos modelos animales. Es una prueba rápida que no requiere entrenamiento en el cual se observa el comportamiento y desplazamiento del roedor en el campo. Se evalúan diversos parámetros como la velocidad del movimiento, la distancia recorrida, el número de cruces hacia el centro del campo, y conductas como acicalamiento y posición en dos patas. Con esto es posible evaluar diversos comportamientos, desde el estado general de salud del animal, como su estado anímico o deficiencias de capacidades motoras.

En este trabajo se evaluó la exploración dentro del campo abierto usando cuadrantes concéntricos virtuales para analizar la conducta exploratoria de ratones inducidos a inflamación por LPS (figura 17). Además, se evaluó el desplazamiento individual de cada ratón para medir el tiempo que permanecen en reposo los ratones durante la prueba con el fin de analizar el estado anímico de los ratones con el software (Any maze).

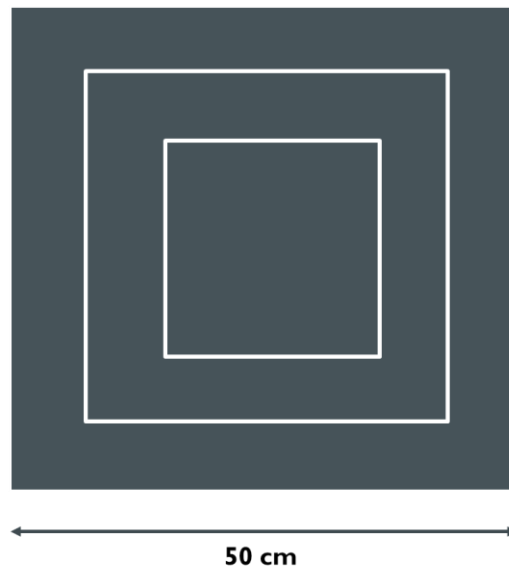


Figura 17. Prueba de campo abierto. Los cuadros concéntricos son de una dimensión $2/3$ y $1/3$ de la medida total. Estos se colocan como guía dentro del software de análisis, no son visibles para los ratones en prueba.

2. Reconocimiento de objeto novedoso

La prueba de reconocimiento de objeto novedoso (RON) se usa comúnmente en la investigación para determinar las capacidades cognitivas de modelos murinos enfocándose en memoria y aprendizaje con funciones relacionadas al hipocampo y la corteza entorrinal y la corteza visual para el establecimiento de memorias visuales. Se trata de una prueba relativamente sencilla que requiere corto tiempo para realizarla comparándola con otras pruebas.

Esta prueba como lo dice su nombre consiste en la exposición del animal a un objeto novedoso contra un objeto conocido aprovechando la tendencia innata de los ratones a explorar objetos desconocidos, para que esto ocurra debe haberse establecido un

recuerdo del objeto previamente observado. El protocolo realizado consiste en dos etapas, la fase de entrenamiento y la fase de prueba (figura 18).

En la fase de entrenamiento se colocaron dos objetos idénticos y se dejó cada ratón durante 5 minutos de tiempo de exposición. En la fase de prueba se sustituyó uno de los dos objetos usados en la prueba de entrenamiento por un objeto novedoso cuidando que este no sea más atractivo para los ratones en cuanto a textura u olor que el otro, para que lo único que influya en la exploración sea la curiosidad a la exposición a un objeto novedoso por estimulación visual. Se analiza el tiempo invertido en la exploración de ambos objetos, teniendo en cuenta cual fue el objeto que exploró el ratón durante más tiempo, de esta forma se analiza la memoria y el aprendizaje del animal. Esta prueba es ideal para análisis cognitivo relacionado a enfermedades neurodegenerativas enfocadas en la actividad hipocampal y es ampliamente utilizado en modelos de EA (Lueptow, 2016).

Para cuantificar la preferencia del ratón hacia el objeto novedoso se calcula el índice de discriminación usando la siguiente ecuación:

$$\text{Índice de discriminación} = \frac{tON}{tON + tOC}$$

Donde:

tON es el tiempo de exploración del objeto novedoso

tOC es el tiempo de exploración del objeto conocido

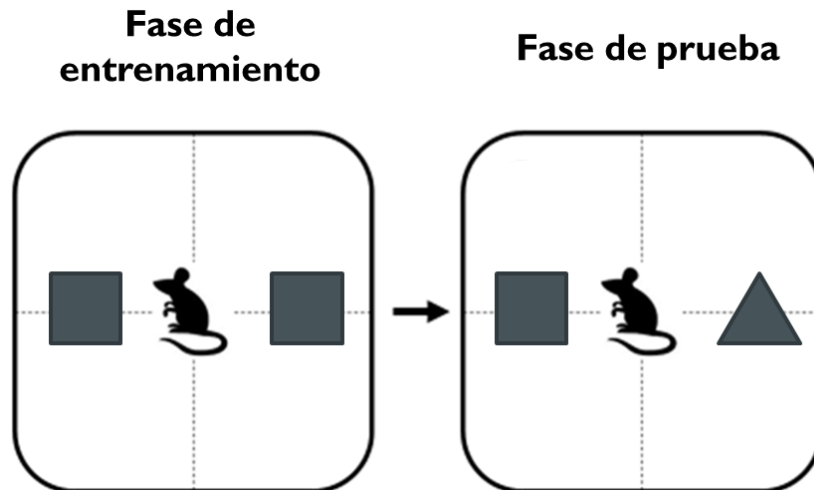


Figura 18. Prueba de reconocimiento de objetos novedosos. En la fase de entrenamiento se utilizan dos objetos idénticos y en la fase de prueba se intercambia uno de esos objetos por un objeto novedoso.

3. Laberinto en Y

Esta prueba consiste en el uso de una plataforma en forma de Y donde se evalúa el comportamiento y exploración de los ratones mediante el análisis del movimiento a través de los brazos de la plataforma.

En este trabajo se realizó la prueba de alternancia espontánea, que consiste en el análisis de la transición por los diferentes brazos del laberinto en triadas (paso por los tres brazos, ABC). Generalmente los ratones tienden a investigar todos los brazos de la plataforma por igual, alternando entre los brazos sin regresar al mismo que estuvieron anteriormente (exploración de localización novedosa). Este tipo de memoria corresponde a la consolidación de memoria espacial que involucra la actividad del hipocampo y la corteza entorrinal (figura 19).

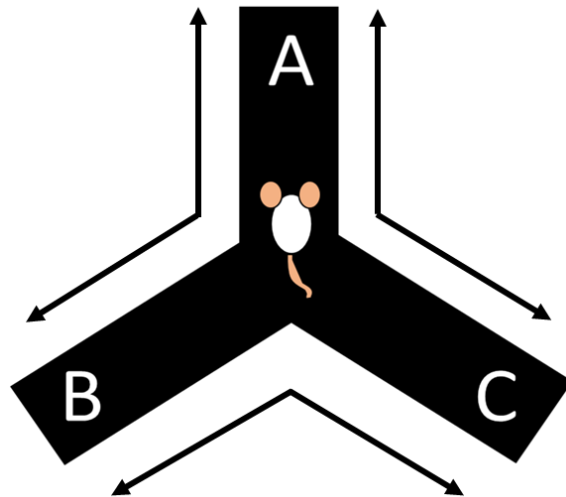


Figura 19. Prueba de alternancia en laberinto en Y. El laberinto contiene 3 brazos de idéntico tamaño y forma.

También se realizó la prueba de memoria de trabajo dentro del laberinto en Y (figura 20). Esta prueba involucra el funcionamiento conjunto de diversas partes del cerebro que incluyen al hipocampo, el septum, prosencéfalo basal y la corteza prefrontal; y consiste en dos etapas, la primer etapa es de entrenamiento donde se mantiene cerrado uno de los brazos del laberinto mientras el ratón explora los dos brazos abiertos restantes durante 10 minutos, tanto dentro como fuera de los brazos se colocan pistas visuales para dar un contexto visual diferente a cada brazo, la segunda etapa es la fase de prueba y consiste en la apertura del brazo cerrado durante la fase de entrenamiento y la exploración durante 5 minutos, lo que se espera es que el ratón al tener memoria visual y espacial de los brazos previamente explorados entren más veces y permanezcan más tiempo en el brazo nuevo (SBFNL, 2020).

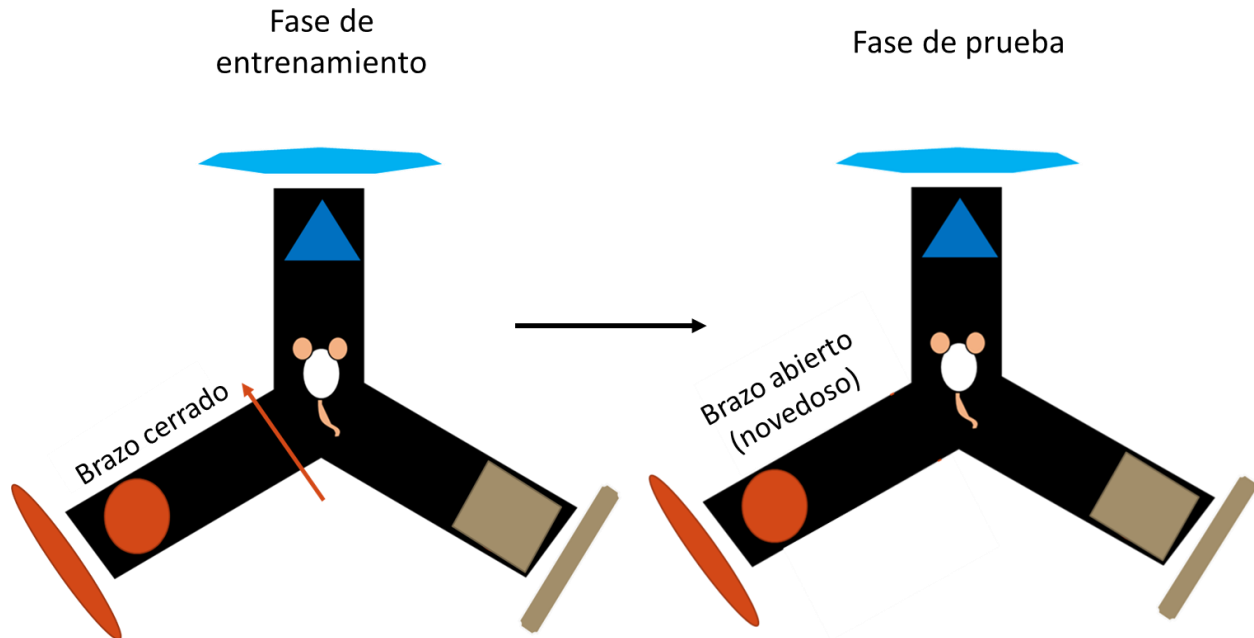


Figura 20. Prueba de memoria de trabajo por contexto novedoso en el laberinto en Y. En esta prueba se utiliza un laberinto en Y con pistas visuales diferentes dentro y fuera de cada brazo. En la fase de entrenamiento uno de los tres brazos es cerrado y se deja a los ratones explorar los brazos restantes. En la fase de prueba se abre el brazo que corresponde a un paradigma novedoso.

Selección de tejido

Se realizó la eutanasia de los ratones por decapitación para la extracción de tejido fresco, separando por secciones el encéfalo (corteza, hipocampo y resto del cerebro). Inmediatamente después de la extracción y segmentación del tejido se colocaron las muestras en tubos eppendorf (1.5ml) y se colocaron en hielo seco para preservar el tejido. Posteriormente se almacenaron las muestras a -70°C hasta su uso.

Extracción de proteínas por sonicación

Se homogenizó el tejido (corteza, hipocampo y resto del cerebro) por sonicación en buffer de lisis (20mM Tris pH 7.4, 137mM de NaCl, 2mM de PPiNa , 2mM de EDTA, 1% Triton X-100, 10% glicerol, 0.5 mM DTT, 25mM β -glicerolfosfato, 200

mM Na₃VO₄, 1mM PMSF e inhibidor de proteasas) 500µl de buffer para el hipocampo y 1000µl de buffer para la corteza y el resto del cerebro.

Los lisados se incubaron por 10 minutos a 4°C y se centrifugaron a 13000 rpm a 4°C durante 15 minutos. Posteriormente se tomó una fracción del sobrenadante 100 µL para las muestras de hipocampo y 250µl para las muestras de corteza y se almacenaron a -70°C hasta su posterior análisis.

Cuantificación de citocinas proinflamatorias por ELISA

Para determinar el estado inflamatorio del encéfalo se midieron citocinas inflamatorias en extractos de proteína de cerebro total de:

Proinflamatorias:

- IL-1β (Kit ELISA MAXTM Deluxe Set Mouse IL1β, BioLegend)
- TNFα (Kit ELISA MAXTM Deluxe Set Mouse TNF-α, BioLegend)

Antiinflamatoria:

- IL-10. (Kit ELISA MAXTM Deluxe Set Mouse IL-10, BioLegend)

Se analizaron muestras con una concentración de proteínas de 1 µg/µl. En una placa de 96 pozos se colocan junto con los controles las muestras por duplicados y se añade 100 µl de solución de anticuerpos para incubar durante 12 horas a 4°C.

Se bloquea la placa con la solución A (1X Assay Diluent A) y se incuba en un agitador oscilatorio (200rpm) a temperatura ambiente durante 1 h.

Se realizan los lavados correspondientes y se agregan la 100 μ l de dilución estándar y se incuba durante 2 horas a temperatura ambiente en agitador oscilatorio (200 rpm).

Se realizan los lavados correspondientes y se añaden 100 μ l de solución de detección de anticuerpos y se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente en agitador oscilatorio (200 rpm).

Se realizan nuevamente los lavados correspondientes y se añaden 100 μ l de solución de Avidina-HRP y se incuban a temperatura ambiente durante 30 minutos en agitador oscilatorio (200 rpm).

Se vuelven a lavar las muestras y se añaden 100 μ l de solución D y se incuba en oscuridad durante 15 minutos. Inmediatamente pasado este tiempo se añaden 100 μ l de solución Stop y se mide la absorbancia (450 nm y 520 nm) en el lector de placas.

Detección de actividad factores de crecimiento y diferenciación

Detección de factores de crecimiento y diferenciación celular en precursores neurales hipocampales, (BDNF, CREB, cFos) por western blot.

Se realiza a partir de lisados obtenidos mediante la extracción de proteínas mostrada en la sección anterior. Se usaron 100 μ g de proteína por muestra

disueltos en solución con loading buffer 1X y se desnaturalizaron durante 5 minutos en baño María a punto de ebullición.

Para separar las proteínas se realizaron electroforesis en gel de poliacrilamida concentrado al 10% a 30 amperes durante 1 hora aproximadamente verificando el desplazamiento del marcador de peso molecular.

Se realiza la transferencia de proteínas en fase líquida hacia una membrana de nitrocelulosa usando buffer de transferencia 1X (10% etanol), usando un voltaje de 100 voltios durante 90 minutos.

Para verificar que la transferencia fue exitosa se realiza la tinción con Pons-O verificando que el patrón de bandas y la concentración sea relativamente homogéneo entre muestras.

Para bloquear la membrana se incubó durante una hora sumergiendo la membrana en solución de leche 5%, buffer TBS1X, Tween-20 0.1%. Posteriormente se incubó con el anticuerpo primario correspondiente durante 12 h mínimo a 4°C. Se realiza la incubación con el anticuerpo secundario durante 2 horas. La cantidad de anticuerpo usada para la detección de cada proteína usada en este trabajo se especifica en la sección de anexos.

Se revela en un equipo Licor C-DiGit® Blot Scanner, exponiendo la membrana a solución de luminol y agente oxidante. durante 1 minuto.

Perfusión intracardiaca y fijación de tejido con paraformaldehído

Los ratones fueron sedados administrando intraperitonealmente una mezcla 1:1 de ketamina/xilacina 25 µl/g de peso. Posteriormente se realizó la perfusión intracardiaca como se muestra en la figura 15, realizando un lavado con solución salina isotónica seguido de la fijación con solución de paraformaldehído (PFA 4%

p/v) diluido en PBS (pH: 7.2), posteriormente se extrae el cerebro completo y se realiza una post-fijación del tejido sumergido en PFA 4% p/v durante 1 día, después se transfiere el tejido a una solución de sacarosa 30% p/v diluida en PBS 1X con azida de sodio al 0.01% para la criopreservación del tejido almacenándolo a 4°C.

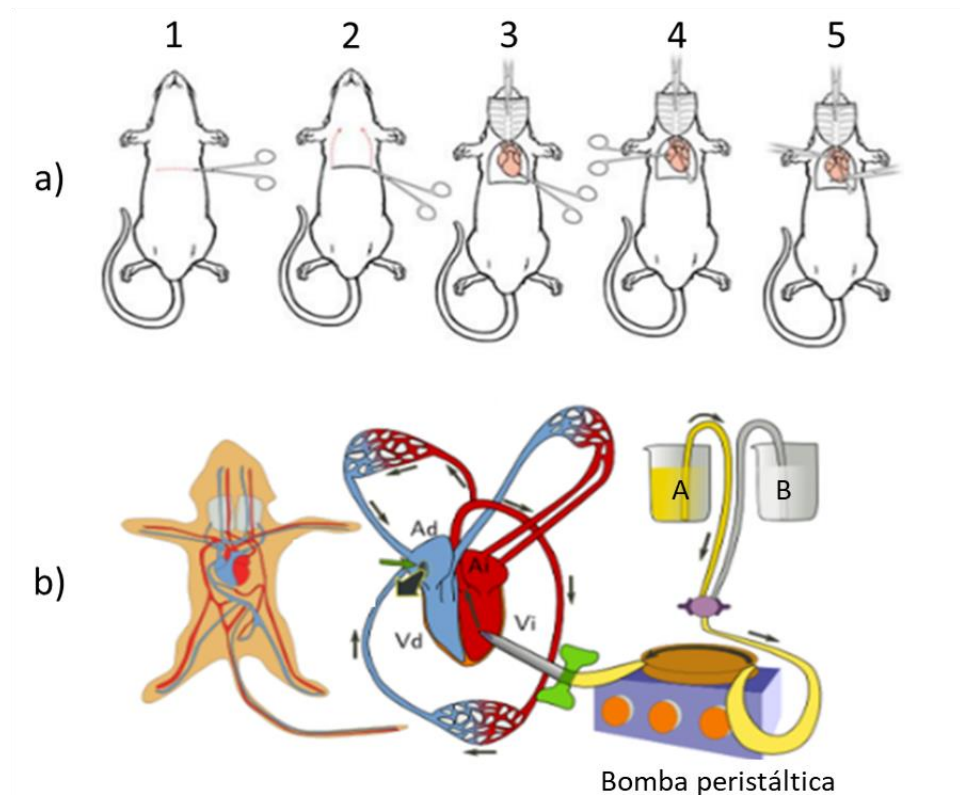


Figura 21. Proceso en la perfusión intracardiaca. a) Inserción de cánula cardíaca: 1) Se realiza un corte horizontal en la zona abdominal superior del tórax. 2) Se realizan dos cortes horizontales partiendo del ápice del corte horizontal al inicio y al final del mismo hacia la parte superior para abrir una ventana de trabajo donde quede expuesto el corazón. 3) Se inserta la cánula de flujo de entrada en el ventrículo izquierdo del corazón. 4) Se realiza un corte en la aurícula derecha para permitir el flujo de salida de sangre y las soluciones. 5) Se inicia el flujo de líquido activando la bomba peristáltica. b) Diagrama de proceso de perfusión intracardiaca. Primero circula la solución A (solución salina) para limpiar el sistema circulatorio de sangre y posteriormente se intercambia por el flujo de solución B (PFA al 4%) para fijar el tejido.

Se realiza el corte coronal de rebanadas de cerebro con un grosor de 50 μm en las secciones del hipocampo y la corteza frontal en microtomo deslizante por congelamiento y se dejan en suspensión en la solución de sacarosa al 30% p/v.

Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron en el software Statgraphics Centurion XVI (versión 16.1.15) incluyendo la comparación de medias por la prueba t de Student, análisis de datos independientes ANOVA de varianza mixta para analizar la variación en el peso con respecto al tiempo y ANOVA de 2 vías para los demás datos, además de las pruebas de distribución normal por la prueba de Kolmogorov-Smirnov, tomando en cuenta significancias de $*p < 0.05$ y $**p < 0.01$. La construcción de gráficos se realizó usando el software GraphPad Prisma para Windows (Versión 8.0.1). Todos los valores se expresan con respecto a la media y (+/-) la desviación estándar.

RESULTADOS

La inducción de neuroinflamación con LPS provoca el deterioro cognitivo en ratones jóvenes

Como se mencionó en los antecedentes, se sabe que la actividad inflamatoria en el SNC altera la homeostasis celular lo que provoca una pérdida general de las capacidades cognitivas y la disminución de la neurogénesis adulta (Miller y Gómez-Nicola, 2014).

Por ese motivo y para establecer un modelo de neuroinflamación inducida y determinar el efecto de la neuroinflamación en la neurogénesis hipocampal adulta y las alteraciones en las capacidades cognitivas se realizó el siguiente

experimento (figura 22) basado en el protocolo reportado en (Perez-Dominguez, *et al.*, 2019).

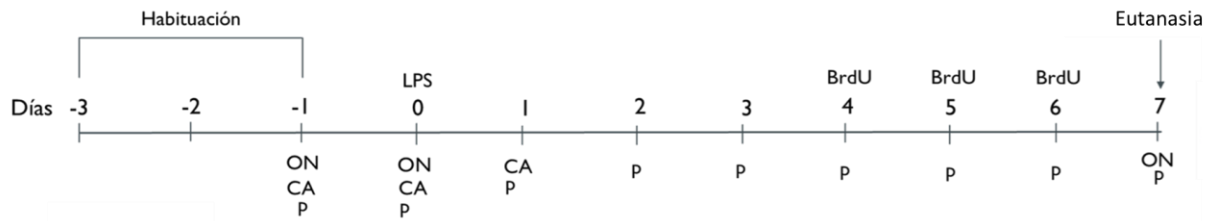


Figura 22. Esquema general del proceso experimental. La prueba se realizó en ratones WT de 2 meses de edad. El proceso completo duró al menos 10 días, desde el período de habituación a la sala experimental (al menos 3 días antes de iniciar las pruebas) hasta el día de la eutanasia. *Nomenclatura*; CA: prueba de campo abierto, ON: prueba de reconocimiento de objeto novedoso, P: medición del peso del ratón, LPS: inyección intraperitoneal con LPS (o PBS para grupo control), BrdU: inyección intraperitoneal de BrdU (Una dosis al día).

La primera etapa fue de adecuación a la sala experimental, lo que supone que los ratones se sientan acostumbrados al ambiente, temperatura, humedad y luz de la sala donde se realizaron los experimentos para que estos factores no afecten el comportamiento de los ratones dentro de la sala.

Después de que los ratones se habituaron a la sala por al menos 3 días consecutivos el día -1 se realizaron las pruebas de campo abierto y reconocimiento de objetos novedosos (entrenamiento). El día 0 se inyectó a los ratones con LPS y se inició el monitoreo del peso de cada ratón diariamente (Tabla 2). Pudimos observar que los ratones que perdían mayor peso eran los ratones que habían sido administrados con LPS, además de no haber podido recuperar su peso inicial durante los 7 días de monitoreo (figura 23).

Tabla 2. Peso promedio por día de cada grupo.

Grupo	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
PBS	24.9 g	23.9 g	24.7 g	24.7 g	24.8 g	25.1 g	24.7 g	24.3 g
LPS (1mg/ml)	26.2 g	23.3 g	24.1 g	24.5 g	24.4 g	25.0 g	24.7 g	24.6 g
LPS (125µg/ml)	25.9 g	22.8 g	23.8 g	23.9 g	23.9 g	24.4 g	24.4 g	24.1 g

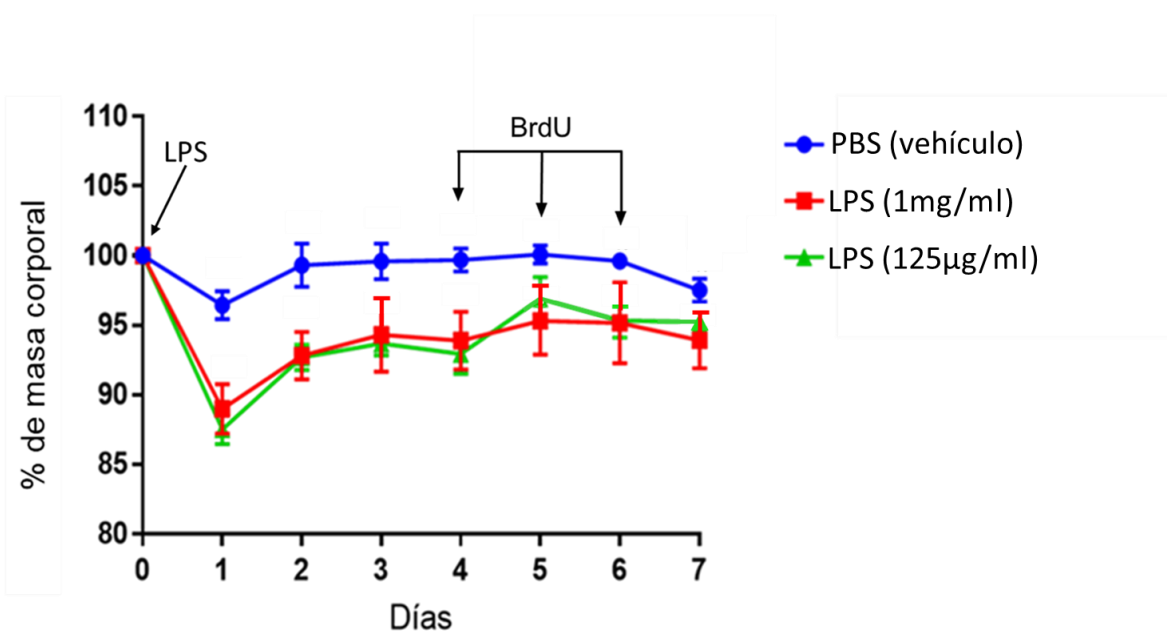


Figura 23. Los ratones administrados con LPS pierden más peso. El porcentaje fue ajustado al peso inicial de los ratones previo a las inyecciones intraperitoneales. Error correspondiente al valor +/- DE, n=4.

Un día después de la inyección intraperitoneal con LPS tanto con la dosis alta como con la dosis más baja los ratones perdieron en promedio del 10 al 14% de su masa corporal mientras que el grupo control inyectado con solución salina solo perdió aproximadamente el 3% (figura 24). Lo anterior demuestra que hay una pérdida de peso ocasionada por el

LPS tanto en una dosis alta como en una menor, lo cual podría deberse al estado de malestar general (pérdida de apetito e incremento en el gasto energético por el incremento en la temperatura corporal) ocasionado por la activación de procesos inflamatorios como ocurriría durante una infección.

Para analizar el estado anímico de los ratones se evaluó su conducta con la prueba del campo abierto, donde se midió las veces que cruzaban al centro del campo dibujando digitalmente cuadrantes internos, un cuadrante más amplio (cuadrante externo) y un cuadrante más pequeño y concéntrico (cuadrante interno), esto con el fin de determinar si los ratones preservaban su conducta exploratoria.

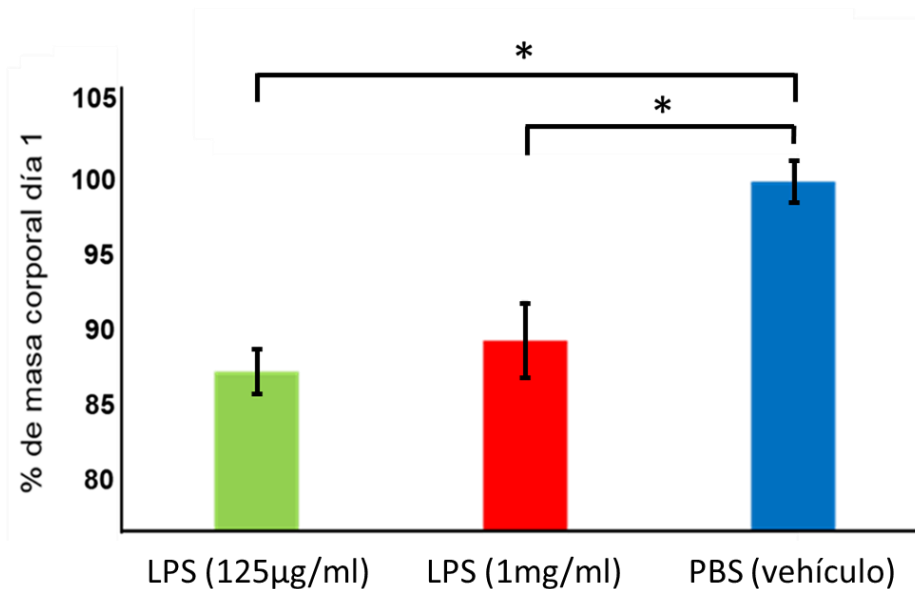


Figura 24. La pérdida de peso por la administración de LPS ocurre desde el día 1 post-inyección. % de masa corporal el día siguiente a la inyección intraperitoneal. Comparación de medias con t-student, n=4 *p< 0.05, error correspondiente al valor +/- DE.

Dos horas después de la inyección intraperitoneal con LPS o PBS los ratones se sometieron a la prueba de campo abierto donde se observó una disminución significativa en el número de cruces al centro del campo abierto tanto del cuadrante externo como del interno (figura 25a), además de permanecer más tiempo sin moverse dentro del campo (figura 25b). Esto nos dice que los ratones inyectados con LPS con ambas dosis disminuyen su conducta exploratoria probablemente debido al malestar ocasionado por la inflamación inducida por el LPS.

Un día después de la administración con LPS se volvió a realizar la prueba de campo abierto donde a diferencia del día anterior no se encontraron diferencias significativas en el número de cruces hacia el centro del campo de los ratones administrados con LPS y el grupo control (figura 26) y tampoco hay diferencias entre el tiempo que se mantuvieron sin desplazarse en el campo. Una observación importante es que en este día de prueba los ratones del grupo control disminuyeron el número de cruces al centro del campo respecto al día anterior además de aumentar el tiempo que se mantuvieron sin desplazarse durante la prueba, mientras que lo opuesto ocurrió con los ratones inyectados con LPS, quienes exploraron más el centro del campo y disminuyó el tiempo que se mantuvieron sin moverse durante la prueba; esto podría ocurrir debido a que los ratones inyectados con LPS recuperaron su estado anímico al día siguiente de la inducción lo que permite que se sientan en condiciones de explorar el campo, mientras que los ratones del grupo control al haber explorado el campo de manera activa el día anterior sin sentir malestar al día siguiente disminuyó su interés de explorar el campo nuevamente posiblemente al manifestarse la habituación por la regulación del eje adrenal.

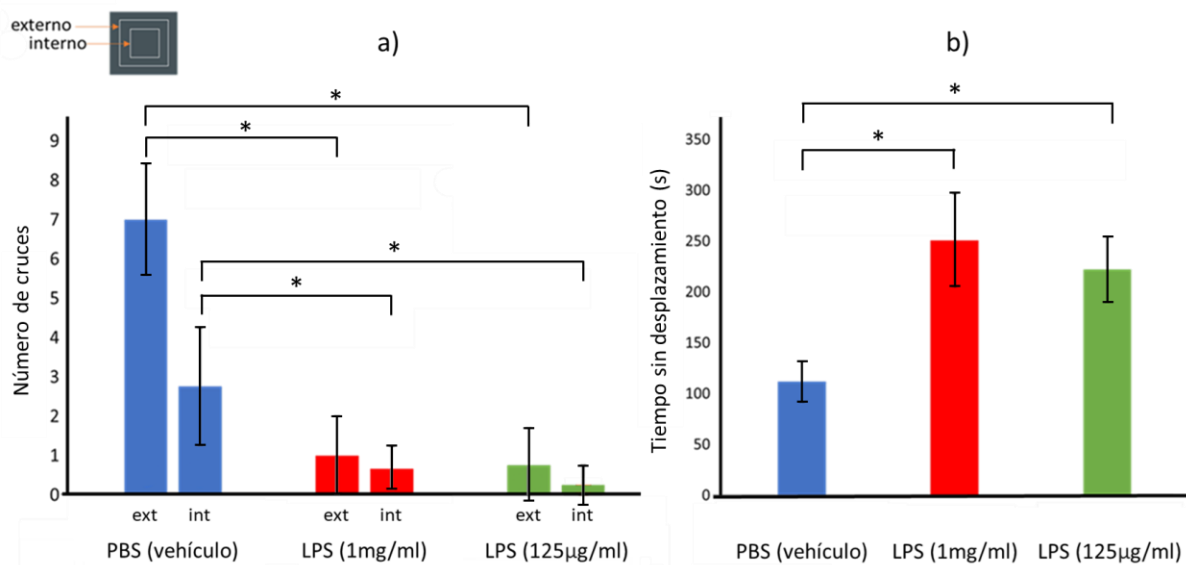


Figura 25. La conducta exploratoria y el desplazamiento de los ratones disminuyen 2 horas después de la administración con LPS. a) número de cruces al interior del campo, b) tiempo que se mantuvieron los ratones sin desplazarse dentro del campo. Nomenclatura; ext: cuadrante exterior, int: cuadrante interior. Comparación de medias con t-student, n=4, *p< 0.05, error correspondiente al valor +/- DE.

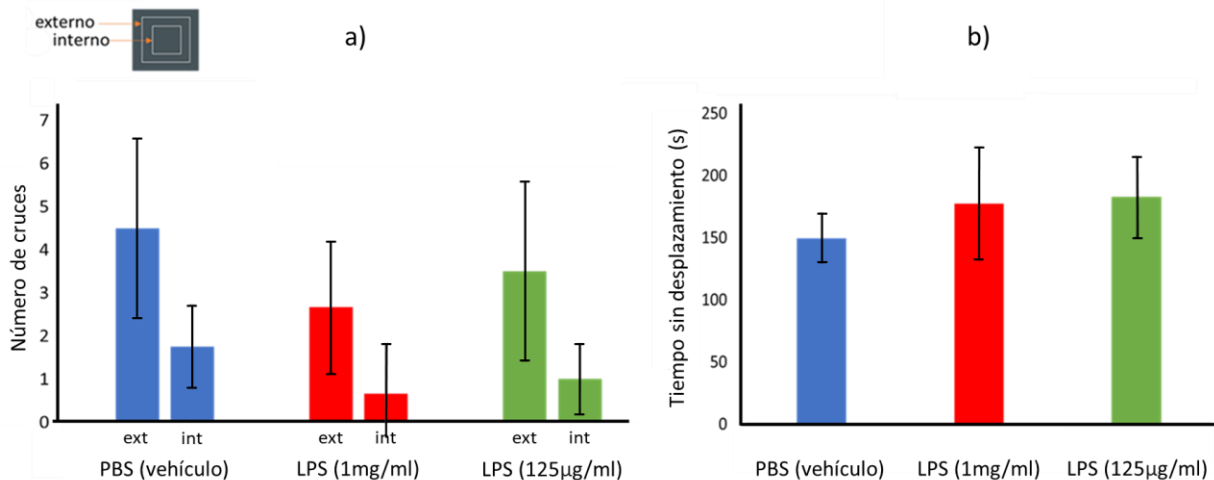


Figura 26. La conducta exploratoria y el desplazamiento de los ratones se reestablece al día siguiente después de la administración con LPS. a) número de cruces al interior del campo, b) tiempo que se mantuvieron los ratones sin desplazarse dentro del campo. Nomenclatura; ext: cuadrante exterior, int: cuadrante interior. Comparación de medias con t-student, n=4, error correspondiente al valor +/- DE.

Para determinar cómo afecta la neuroinflamación inducida por la administración de LPS en las capacidades cognitivas se realizó la prueba de reconocimiento de objetos novedosos. La etapa de entrenamiento se realizó un día antes de la inyección intraperitoneal (día -1) para que esto no afectara a la exploración de los ratones sobre los objetos. Ese mismo día dos horas después se realizó la primera fase de prueba donde podemos observar que todos los ratones divididos en tres grupos aleatorios tuvieron un índice de exploración del objeto novedoso similar (figura 27a) como se esperaba. Al día siguiente (día 0), el día de la administración de LPS se realizó una segunda prueba con un nuevo objeto novedoso, los ratones inyectados con LPS no mantuvieron una conducta exploratoria como ocurrió en la prueba de campo abierto debido al efecto en el estado anímico que tuvo la inducción, mientras que los ratones inyectados con PBS exploraron de manera similar a la prueba anterior el objeto novedoso, por este motivo no fue posible graficar los datos.

Ya que el efecto de la inyección con LPS afecta la conducta exploratoria de los ratones se decidió realizar la prueba nuevamente horas antes del sacrificio de los ratones para evitar lo más posible que el malestar provocado por la inducción afectase el análisis de

la prueba. En esta prueba cómo se esperaba los ratones de cada grupo exploraron de manera normal los objetos, pero el grupo con PBS fue el que tuvo el mejor índice de discriminación del objeto novedoso. Por otro lado, el grupo de ratones al que se le administró la dosis más alta de LPS fueron los que obtuvieron el peor registro en el índice de exploración del objeto novedoso (Figura 27b). Estos resultados muestran que la administración intraperitoneal de LPS afecta el establecimiento de memorias visuales hacia objetos nuevos, además de que una dosis más alta de LPS afecta la memoria. Es muy posible que esto se deba a la pérdida en la homeostasis del sistema nervioso derivado de la activación de procesos inflamatorios y el debilitamiento de la barrera hematoencefálica lo que como se explicó anteriormente altera la neuroplasticidad y la capacidad de generar nuevas memorias.

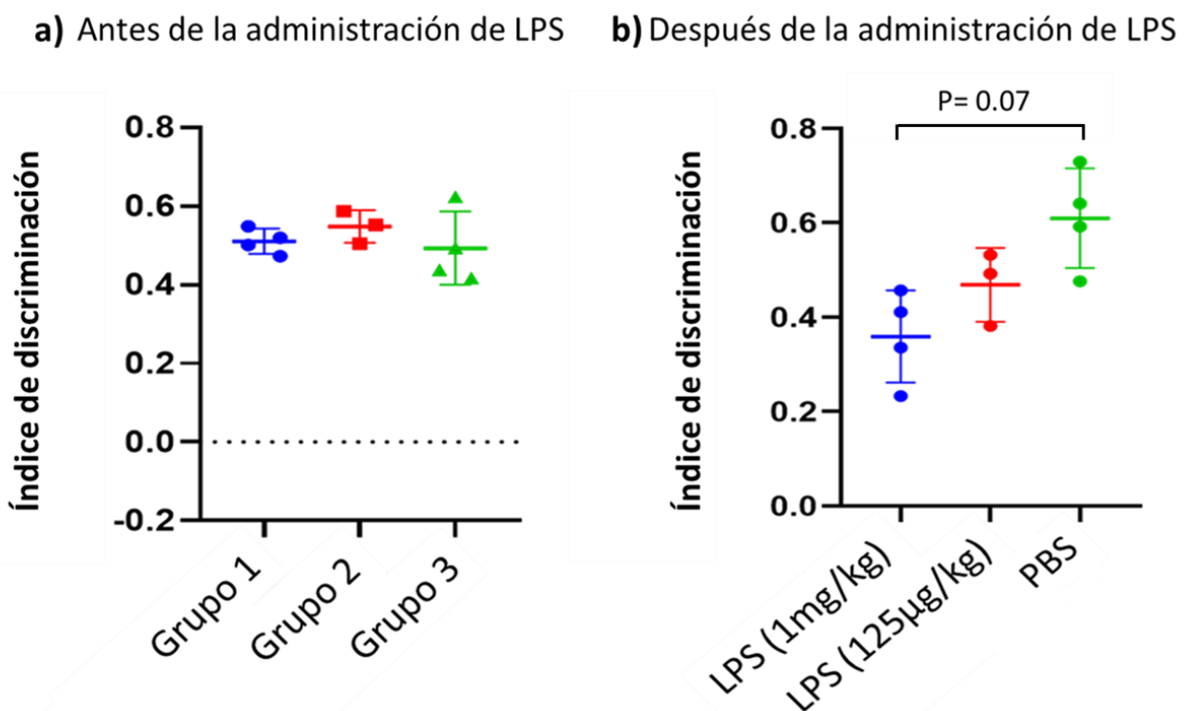


Figura 27. Hay una tendencia a disminuir el reconocimiento del objeto novedoso en los ratones administrados con LPS de manera dosis dependiente. El índice de exploración corresponde a la exploración del objeto novedoso respecto al objeto conocido. a) Prueba realizada 1 hora antes de la administración de LPS; b) Prueba realizada 7 días después de la administración de LPS. Comparación de medias con t-student, n=4, error correspondiente al valor +/- DE.

La ausencia de KChIP3 rescata las capacidades cognitivas disminuidas por el tratamiento con LPS en ratones adultos

Para determinar si la ausencia de la proteína KChIP3 puede prevenir el deterioro cognitivo ocasionado por la neuroinflamación inducida con LPS en ratones adultos, se usaron ratones KChIP3 KO y WT de 6 meses de edad, que es la misma edad a la que se desarrolla la amiloideopatía en ratones 5XFAD. A estos ratones se les realizó el mismo protocolo presentado anteriormente con algunas modificaciones como se muestra en la figura (28).

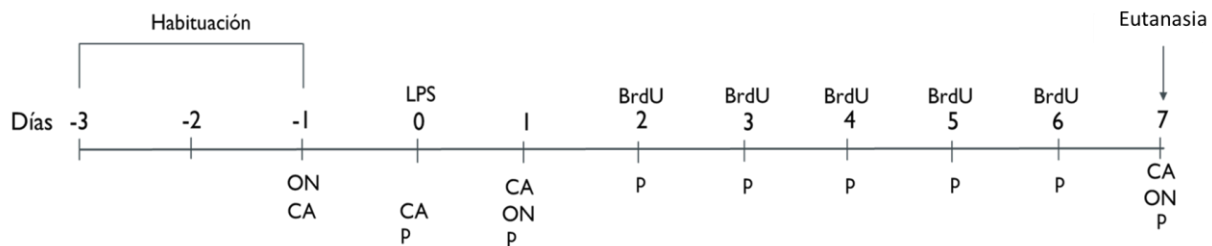


Figura 28. Esquema general del proceso experimental. La prueba se realizó en ratones KChIP3 KO y WT de 6 meses de edad. El proceso completo duró al menos 10 días, desde el periodo de habituación a la sala experimental (al menos 3 días antes de iniciar las pruebas) hasta el día de la eutanasia. *Nomenclatura*; CA: prueba de campo abierto, ON: prueba de reconocimiento de objetos novedosos, P: medición del peso del ratón, LPS: inyección intraperitoneal con LPS (o PBS para grupo control), BrdU: inyección intraperitoneal de BrdU (1 dosis cada 12 h, 2 dosis al día).

Se decidió administrar una dosis de LPS (1 mg/kg) por vía intraperitoneal ya que fue la dosis que dio mejores resultados previamente. Además, se aumentó el número de dosis de BrdU con respecto a las pruebas con ratones de 2 meses de edad, esto debido a que la neurogénesis hipocampal adulta se ve disminuida en relación con el envejecimiento (Miller y Gómez-Nicola, 2014), en este caso se aumentó a dos dosis por día durante los últimos 5 días antes del sacrificio.

Como ocurrió con los ratones jóvenes la administración de LPS provocó una pérdida de peso entre el 10 al 13% de la masa corporal inicial tanto en los ratones WT como en los KChIP3 KO mientras los ratones inyectados con el vehículo solo tuvieron una pequeña pérdida del 2% aproximadamente (figuras 29 y 30), además de que ninguno de los ratones inyectados con LPS logró recuperar su peso inicial durante el tiempo que duró el experimento. Esto nos dice que la ausencia de KChIP3 no rescata el efecto en la pérdida de peso que resulta del tratamiento con LPS, además que los ratones adultos (6 meses de edad) tienen una respuesta similar al LPS que los ratones jóvenes (2 meses de edad).

Tabla 3. Peso promedio por día de cada grupo.

Grupo	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6
WT + PBS	36.7 g	35.9 g	35.7 g	35.6 g	35.5 g	35.4 g	35.4 g
WT + LPS	38.2 g	34.6 g	33.2 g	35.3 g	34.8 g	34.6 g	34.8 g
KKO + PBS	37.1 g	36.4 g	36.0 g	35.9 g	35.4 g	35.3 g	35.3 g
KKO + LPS	38.6 g	33.8 g	34.4 g	35.2 g	35.1 g	35.4 g	35.2 g

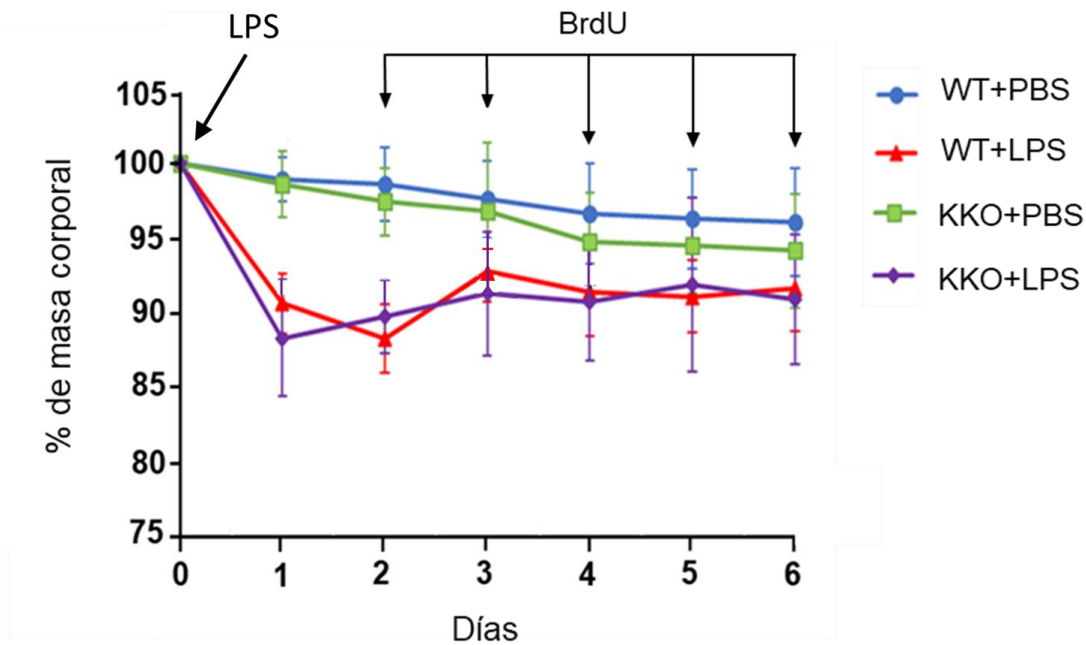


Figura 29. La ausencia de KCHIP3 no rescata la pérdida de peso ocasionada por la administración de LPS. El porcentaje fue ajustado al peso inicial de los ratones previo a las inyecciones intraperitoneales. Error correspondiente al valor +/- DE, n=6.

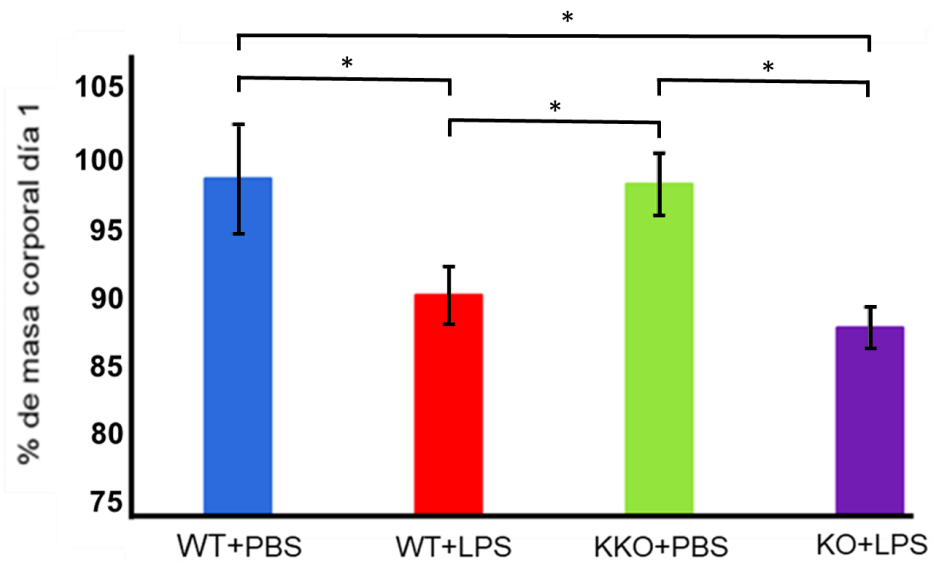


Figura 30. La pérdida de peso por la administración de LPS ocurre desde el día 1 post-inyección y se mantiene así durante la fase experimental. % de masa corporal el día siguiente a la inyección intraperitoneal. Comparación de medias con t-student, n=6, *p< 0.05, error correspondiente al valor +/- DE.

Para determinar si la ausencia de KChIP3 tiene un efecto positivo en la conducta de los ratones se realizó la prueba de campo abierto de la misma manera que se hizo con los ratones jóvenes. De manera similar a lo que ocurrió con respecto a la pérdida de peso, el día de la inducción los ratones inyectados con LPS, tanto el grupo WT como el grupo KChIP3 KO tuvieron un menor número de cruces hacia el interior del campo tanto del cuadrante externo como el cuadrante interno (figura 31a), además de mantenerse más tiempo sin moverse durante la prueba (figura 31b) aunque en el caso de los ratones inyectados con el vehículo los ratones KChIP3 KO se mantuvieron más tiempo moviéndose que los ratones WT, lo que nos dice que los ratones adultos KChIP3 KO son más activos que los ratones WT (figura 31b). Como ocurrió con los ratones jóvenes los ratones adultos recuperaron su conducta exploratoria al día siguiente de la inducción con LPS teniendo el mismo número de cruces al interior del campo (figura 32a) y aumentando el movimiento que tuvieron durante la prueba (figura 32b), aunque los ratones que se movieron más dentro del campo y con mayor conducta exploratoria fueron los ratones KChIP3 KO inyectados con PBS, lo que confirma que estos ratones son más activos que los ratones WT.

Estos resultados nos muestran que la ausencia de KChIP3 tampoco evita que se pierda la conducta exploratoria y la actividad de los ratones inyectados con LPS lo que nos dice que su ausencia no evita el malestar que presentan los ratones tratados con LPS. Un dato adicional que si nos muestra esta prueba es que los ratones adultos de 6 meses de edad KChIP3 KO son más activos y tienen una mayor conducta exploratoria que los ratones WT, aspecto que concuerda con datos de trabajos previos realizados en el laboratorio que aún no han sido publicados, pero donde observan que los KChIP3 KO adultos se mantienen fenotípica y conductualmente similares a los jóvenes.

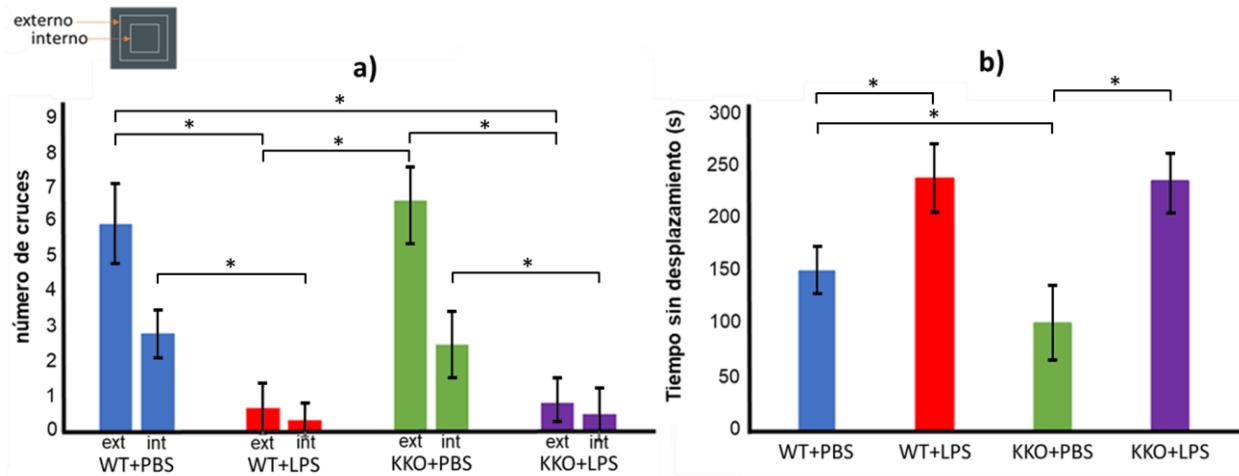


Figura 31. La ausencia de KChIP3 no rescata la pérdida en la conducta exploratoria y el desplazamiento de los ratones 2 h después del tratamiento con LPS. a) número de cruces al interior del campo, b) tiempo que se mantuvieron los ratones sin desplazarse dentro del campo. Nomenclatura; ext: cuadrante exterior, int: cuadrante interior. Comparación de medias con t-student, n=6, *p< 0.05, error correspondiente al valor +/- DE.

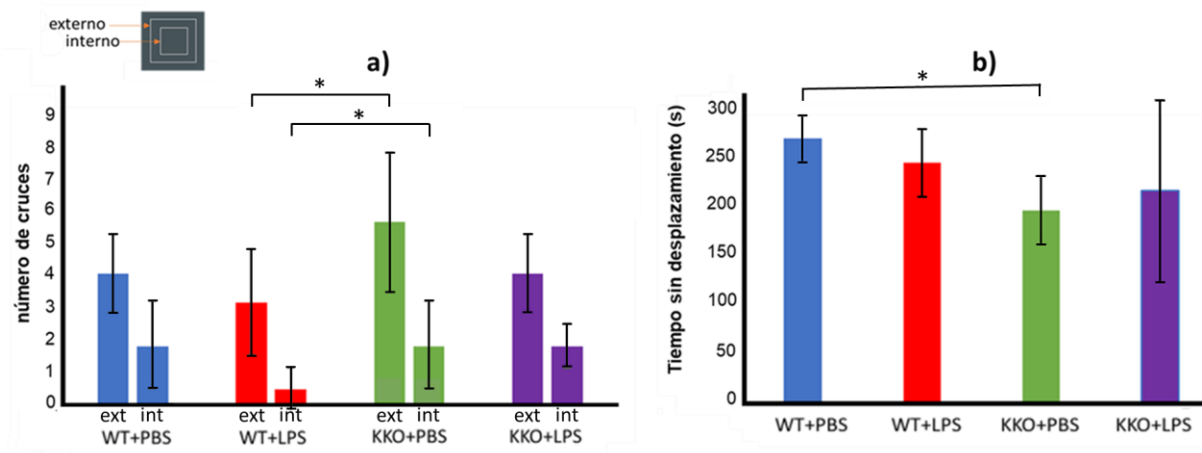


Figura 32. La conducta exploratoria y el desplazamiento de los ratones se reestablece al día siguiente después de la administración con LPS. a) número de cruces al interior del campo, b) tiempo que se mantuvieron los ratones sin desplazarse dentro del campo. Comparación de medias con t-student, n=6, *p< 0.05, error correspondiente al valor +/- DE.

Para observar el efecto de la ausencia de KChIP3 en el aprendizaje cuando se somete a un estímulo inflamatorio por la administración de LPS se realizó la

prueba de objetos novedosos. Cuando se realizó la prueba antes de la administración de LPS se observó que no existen diferencias en el aprendizaje entre los ratones WT y los ratones KChIP3 KO, lo que nos dice que la ausencia de KChIP3 no tiene un efecto en el aprendizaje en ratones de 6 meses de edad (figura 33a). Como se observó en ratones de 2 meses la administración con LPS provocó que no hubiera conducta exploratoria el día de la administración con LPS tanto WT como KChIP3 KO, lo que concuerda con los resultados obtenidos en la prueba de campo abierto.

En la prueba de memoria que se realizó 7 días después de la administración de LPS se observó una clara mejoría en el aprendizaje de los ratones KChIP3 KO con respecto a los ratones WT que fueron inyectados con LPS. El mejor índice de discriminación lo obtuvo el grupo de ratones KChIP3 KO que fueron administrados únicamente con el vehículo, mientras que el grupo con el registro de media más bajo fue el grupo de ratones WT que fueron administrados con LPS (figura 33b). Este resultado nos dice que la ausencia de la proteína KChIP3 evita el deterioro en la memoria ocasionada por un evento neuroinflamatorio, en este caso por la administración con LPS lo que sienta las bases para realizar pruebas el modelo de la enfermedad de Alzheimer (ratón 5XFAD).

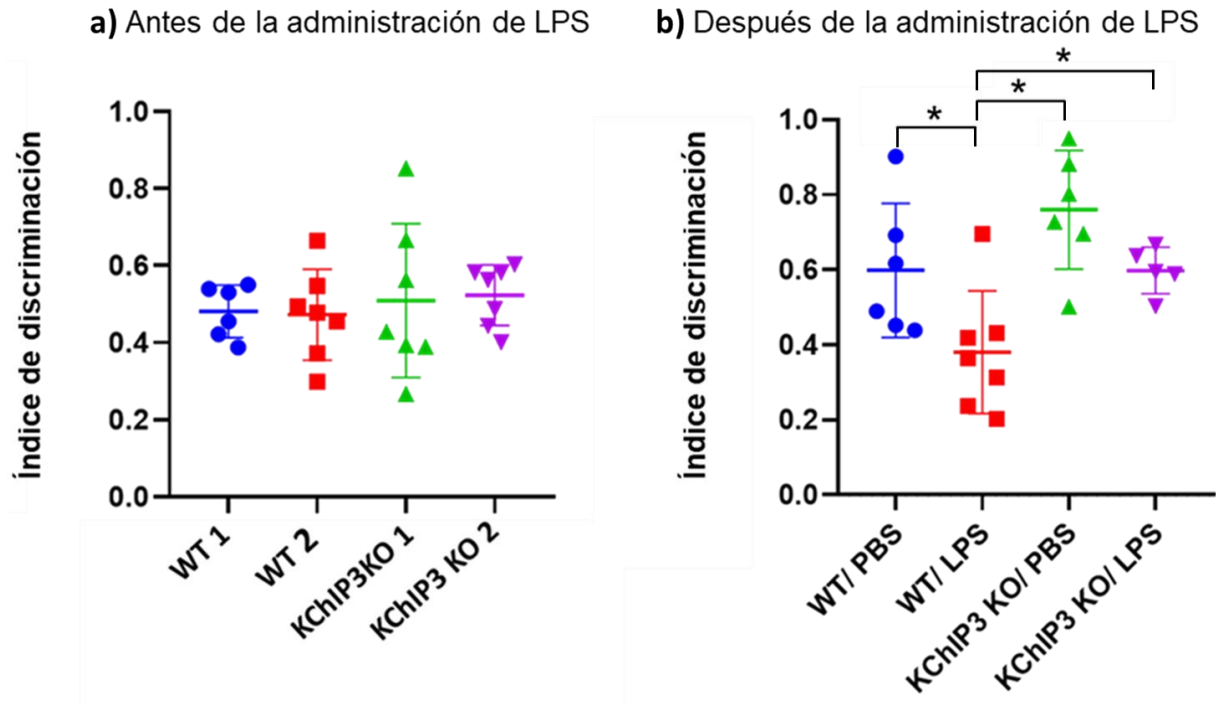


Figura 33. La ausencia de KCHIP3 previene el deterioro cognitivo resultante de un insulto inflamatorio periférico. El índice de exploración corresponde a la exploración del objeto novedoso respecto al objeto conocido. a) Antes de la administración de LPS, b) 7 días después de la administración de LPS. Comparación de medias con t-student, n=6, *p< 0.05, error correspondiente al valor +/- DE.

La ausencia de KchIP3 previene el deterioro cognitivo en ratones modelo de la enfermedad de Alzheimer

Para realizar los siguientes experimentos se generó el modelo experimental a partir de la genotipificación y cruza de modelos adquiridos previamente, proceso que duró un año y medio hasta obtener los modelos deseados tanto machos como hembras. Los grupos son los siguientes (detallado en la metodología):

1. Modelo silvestre (WT)
2. Modelo de Alzheimer (5XFAD)
3. Modelo ausente de KChIP3 (KChIP3 KO)
4. Modelo de Alzheimer ausente de KChIP3 (5XFAD, KChIP3 KO)

***Todos, además con los genes R26R-eYFP y Nest-Cre/ERT2**

Los grupos de ratones obtenidos fueron mantenidos en el bioterio del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo las condiciones especificadas por el comité de bioética hasta terminar las pruebas *in-vivo*.

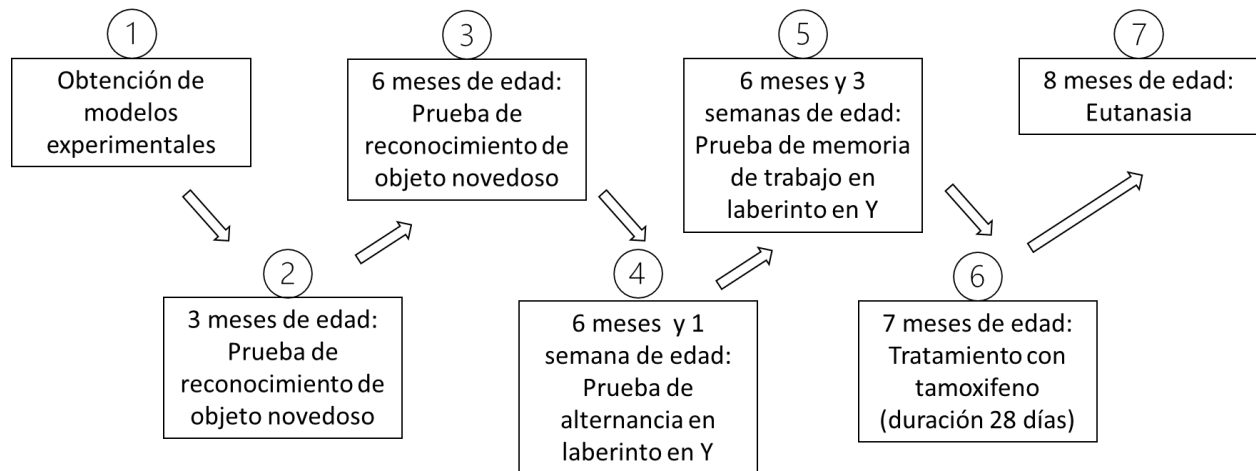


Figura 34. Procedimientos realizados a los ratones experimentales desde su nacimiento hasta su eutanasia. Este esquema se aplicó a los grupos experimentales obtenidos a partir de cruces de los modelos preexistentes.

Para hacer un análisis más completo y teniendo en cuenta las diferencias encontradas que se reportan en la literatura en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer con respecto al sexo se decidió realizar las pruebas en ratones hembra y en ratones macho usando los mismos grupos experimentales en cuanto a genotipo.

A los 3 meses de edad se les realizó la prueba de reconocimiento de objetos novedosos (figura 34) para ver el estado cognitivo de los ratones a edades juveniles como control del estado cognitivo entre los grupos experimentales donde no se encontraron diferencias significativas en el índice de discriminación del objeto novedoso entre grupos tanto en hembras (figura 35), como en machos (figura 36), tanto en la prueba hecha a corto plazo en un lapso de 2 h después de

haber hecho el entrenamiento para observar la memoria inmediata de los ratones, como en un lapso a más largo realizando la prueba 2 días después del entrenamiento para analizar el establecimiento de memoria a más largo plazo. Este resultado era lo esperado según la literatura, ya que el deterioro cognitivo en el modelo 5XFAD con fondo C57BL/6J se comienza a ver en ratones adultos de aproximadamente 6 meses de edad (ver modelos experimentales en materiales y métodos).

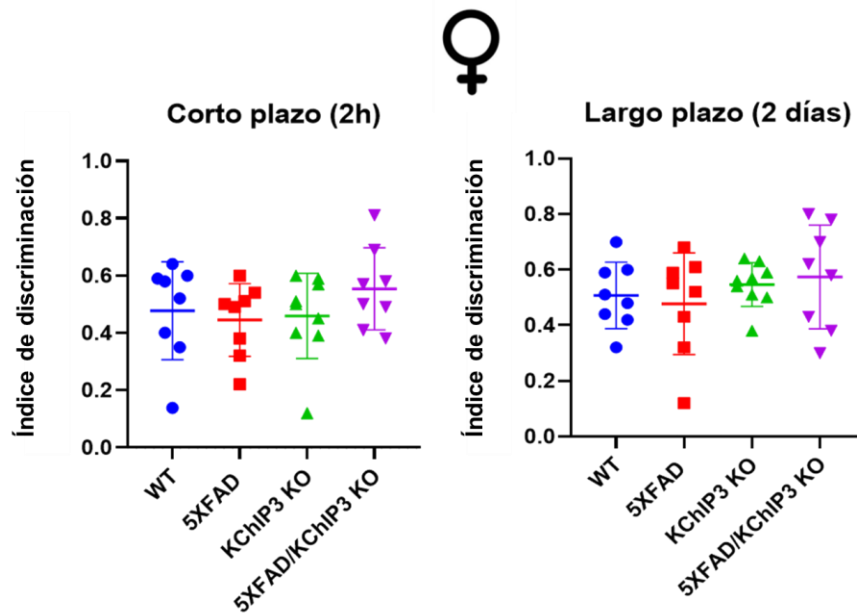


Figura 35. No hay deterioro cognitivo observado en ratones hembra jóvenes modelo 5XFAD de la enfermedad de Alzheimer. Se usaron ratones hembra de 3 meses de edad. Comparación de medias con t-student, n=8, error correspondiente al valor +/- DE.

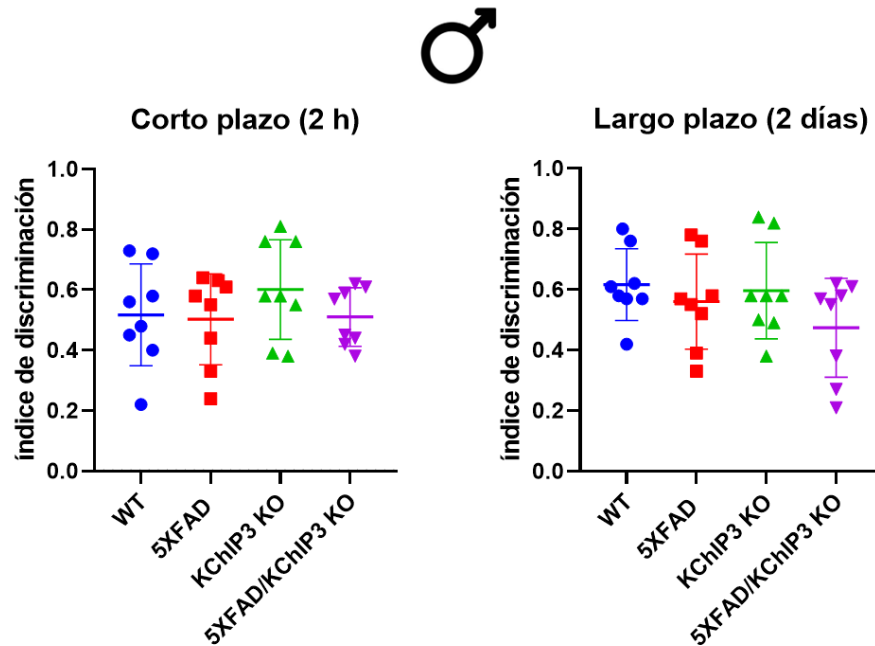


Figura 36. No hay deterioro cognitivo observado en ratones macho jóvenes modelo 5XFAD de la enfermedad de Alzheimer. Se usaron ratones macho de 3 meses de edad. Comparación de medias con t-student, n=8, error correspondiente al valor +/- DE.

Para ver si la ausencia de KChIP3 ayuda a rescatar el deterioro cognitivo asociado al establecimiento de nuevas memorias visuales se volvió a realizar la prueba de objeto novedoso a los 6 meses de edad. Tanto en hembras (figura 37), como en machos (figura 38) se encontraron resultados muy similares, donde podemos observar que la media en el índice de exploración tanto a corto plazo (2 h después del entrenamiento) como a largo plazo (2 días después del entrenamiento) varía según el genotipo.

Como era de esperarse, la media del grupo 5XFAD tanto en hembras como en machos reportó el menor índice de exploración del objeto novedoso, tanto en hembras, como en machos, lo que indica que hay un deterioro cognitivo en esos ratones en comparación al grupo WT. Se encontró que el grupo de ratones 5XFAD/ KChIP3 KO tuvieron una media en el índice de discriminación del objeto novedoso similar al grupo de ratones WT tanto en machos como en hembras en las pruebas a corto (2 h) y largo (2 días) plazo, este resultado nos dice que la

ausencia de KChIP3 en el modelo 5XFAD de la enfermedad de Alzheimer ayuda a prevenir la aparición del deterioro cognitivo asociado a la pérdida de memoria en el reconocimiento de nuevos estímulos visuales a la edad de 6 meses. En contraste los grupos de ratones KChIP3 KO tanto en hembras como en machos presentaron el mejor registro en el índice de discriminación a corto y largo plazo, lo que nos dice que la ausencia la proteína KChIP3 podría ayudar a mantener una mejor capacidad cognitiva durante la adultez.

Para complementar estos datos y someter a los ratones a pruebas cognitivas que involucraran actividades distintas se realizaron las pruebas de alternancia y de memoria de trabajo en el laberinto en Y. La prueba de alternancia se realizó una semana después de haber terminado la prueba de reconocimiento de objetos novedosos dejando ese periodo de latencia entre prueba y prueba mientras que la prueba de memoria de trabajo se realizó dos semanas después de la prueba de alternancia finalizando la fase de pruebas cognitivas a los 7 meses de edad.

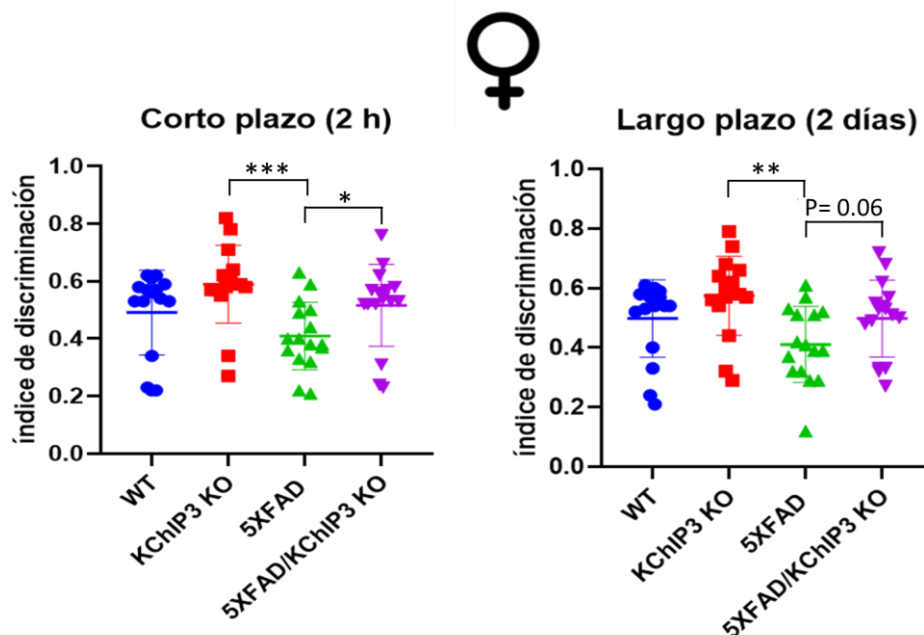


Figura 37. La ausencia de KChIP3 mejora la memoria visual en ratones hembra modelo 5XFAD de la enfermedad de Alzheimer de 6 meses de edad. Comparación de medias con t-student, n=16, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, error correspondiente al valor +/- DE.

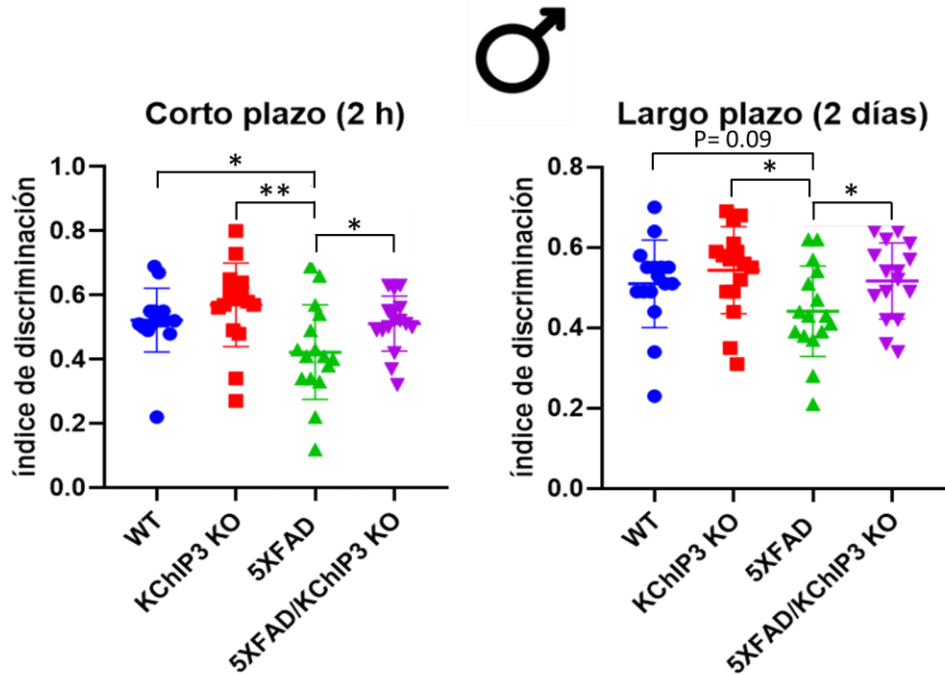


Figura 38. La ausencia de KChIP3 mejora la memoria visual en ratones macho modelo 5XFAD de la enfermedad de Alzheimer de 6 meses de edad. Comparación de medias con t-student, n=16, *p<0.05, **p<0.01, error correspondiente al valor +/- DE.

En la prueba de alternancia tanto en hembras (figura 39) como en machos (figura 40) no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de alternancia en la entrada a los brazos del laberinto entre los grupos experimentales lo que nos dice que en cuanto a memoria espacial no hay diferencias en el estado cognitivo de los ratones a la edad de 6 meses. Por otro lado, tanto en hembras como en machos se encontró un aumento en el número total de entradas a los brazos en los grupos KChIP3 KO y con significancia estadística en los grupos 5XFAD y 5XFAD/KChIP3 KO en comparación el grupo WT. Estos resultados nos dicen que por un lado a los 6 meses de edad no hay un deterioro cognitivo asociado al establecimiento de memoria espacial sin embargo los ratones con genotipo 5XFAD esté o no ausente la proteína KChIP3 presentan una mayor actividad dentro del laberinto que se puede deber a un aumento en la ansiedad o hiperactividad de los ratones con ese genotipo.

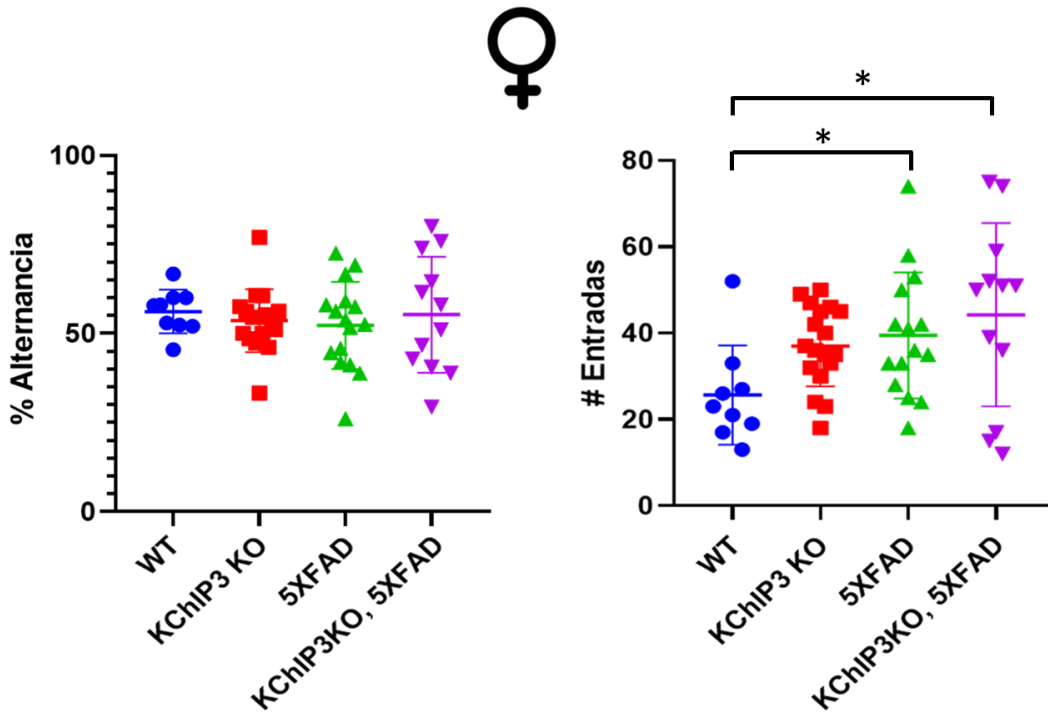


Figura 39. No existen diferencias en la memoria espacial en ratones hembra entre los grupos experimentales. Comparación de medias con t-student, n=16, *p<0.05, error correspondiente al valor +/- DE.

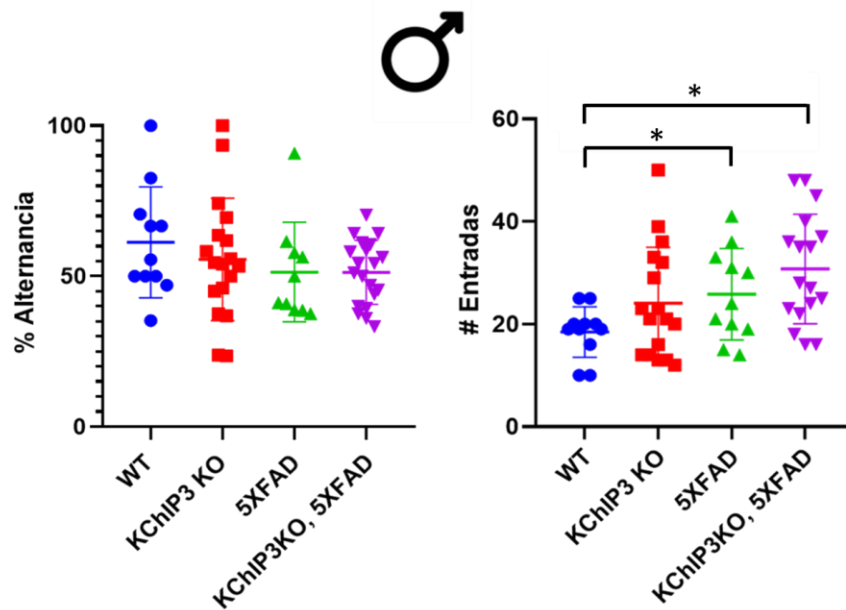


Figura 40. No existen diferencias en la memoria espacial en ratones macho entre los grupos experimentales. Comparación de medias con t-student, n=16, *p<0.05, error correspondiente al valor +/- DE.

Para determinar de manera más robusta la adquisición de nuevas memorias en los modelos se realizó la prueba de memoria de trabajo en el laberinto en Y la cual involucra el establecimiento de nuevas memorias tanto espaciales como por pistas visuales que están tanto fuera como dentro del laberinto.

En el caso de las hembras de manera contradictoria no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al porcentaje de entradas al brazo nuevo entre el grupo WT, el grupo 5XFAD y el grupo 5XFAD/ KChIP3KO, sin embargo, el grupo KChIP3 KO obtuvo una media significativamente mayor, en cuanto al tiempo en que permanecieron los ratones dentro del brazo nuevo podemos observar en el mapa de calor que al menos en el grupo KChIP3 KO el tiempo invertido en el brazo nuevo es mayor que el tiempo que permanecieron en promedio en los brazos conocidos mientras que en los otros grupos no se observa esa diferencia (figura 41).

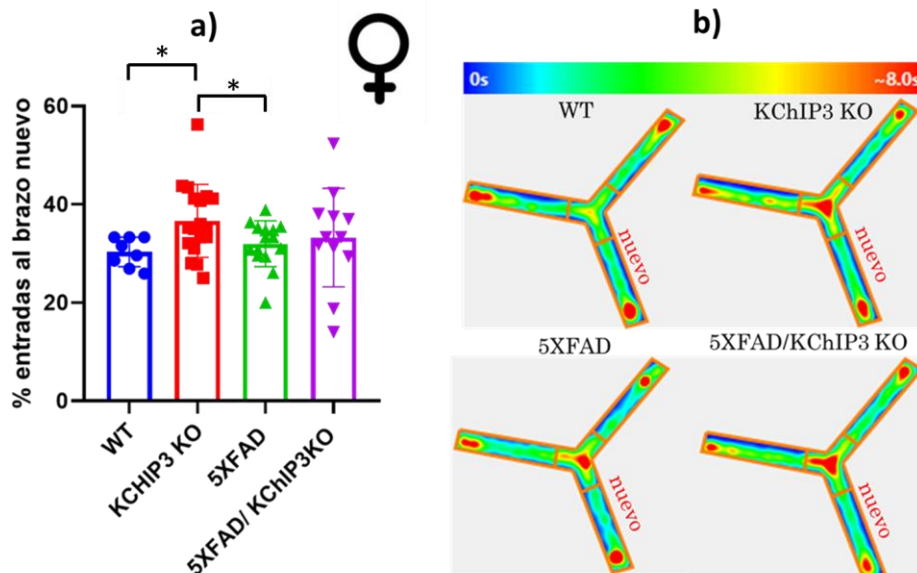


Figura 41. La ausencia de KChIP3 mejora la memoria visuo-espacial en ratones hembra de 6 meses de edad. a) Porcentaje de entradas al brazo nuevo con respecto a

las entradas totales, b) Mapa de calor del tiempo invertido promedio dentro del campo. Comparación de medias con t-student, n=16, *p<0.05, error correspondiente al valor +/- DE.

En los machos en la prueba de memoria de trabajo en el laberinto en Y se encontró algo similar a las hembras, pero en el caso de los machos el grupo con la media más baja fue claramente el grupo de ratones 5XFAD. En contraparte hay una diferencia estadística viéndose más altas las medias en el porcentaje de entradas al brazo nuevo de los ratones con genotipo 5XFAD/KChIP3 KO y KChIP3 KO con respecto a los ratones 5XFAD. Complementando lo anterior en el mapa de calor se puede observar claramente como los ratones 5XFAD/KChIP3 KO y KChIP3 KO se mantuvieron más tiempo en el brazo nuevo que en los brazos conocidos (figura 42). Con estos resultados podemos decir que la ausencia de la proteína KChIP3 puede rescatar la pérdida de memoria visuoespacial provocada por el desarrollo patológico en ratones macho de 6 meses modelo de la enfermedad de Alzheimer.

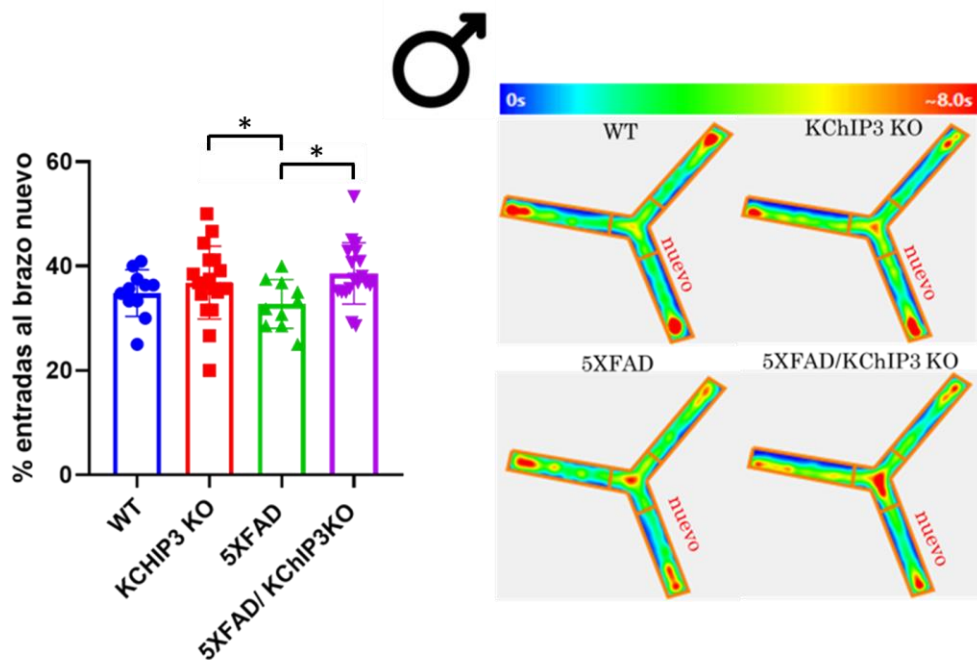


Figura 42. La ausencia de KChIP3 mejora la memoria visuo-espacial en ratones macho de 6 meses de edad. a) Porcentaje de entradas al brazo nuevo con respecto a las entradas totales, b) Mapa de calor del tiempo invertido promedio dentro del campo. Comparación de medias con t-student, n=16, *p<0.05, error correspondiente al valor +/- DE.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos de las pruebas cognitivas podemos decir que la ausencia de la proteína KChIP3 tiene un efecto positivo en la memoria de los ratones tanto hembras como machos modelo de la enfermedad de Alzheimer.

Expresión de citocinas inflamatorias en el tejido encefálico de los ratones 5XFAD y en ausencia de KChIP3

Inmediatamente después del sacrificio a los 8 meses de edad de algunos ratones de cada grupo se extrajo tejido encefálico fresco para la extracción de proteínas y su posterior análisis. Se cuantificaron por el método de ELISA TNF α e IL-1 β como marcadores proinflamatorios e IL-10 como marcador antiinflamatorio. Las pruebas se realizaron con una n=3 por lo que los resultados no son totalmente concluyentes y tienen que complementarse con un mayor número de muestras y de pruebas.

En el caso de las hembras no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de las citocinas inflamatorias (figura 43). Tomando en cuenta estos resultados sabemos que se requiere replantear la metodología experimental y aumentar el número de muestras que se tienen en este trabajo, además de considerar factores como el ciclo estral el cual no se tomó en cuenta en el momento de hacer el sacrificio en este trabajo y que puede afectar de manera significativa la expresión proteica incluida la abundancia de citocinas inflamatorias.

Con respecto a los ratones macho (figura 44) en cuanto a la concentración de TNF α existe una tendencia a verse aumentada en el ratón 5XFAD con respecto al grupo WT, y en ausencia de la proteína KChIP3, tanto el grupo 5XFAD/KChIP3 KO como el grupo KChIP3 KO hay una tendencia a disminuir la expresión de TNF α con respecto al ratón 5XFAD, estos datos no pueden ser concluyentes, pero pueden darnos una idea de lo que podría ocurrir si aumentamos el número de muestras analizadas. En cuanto a la concentración de IL-1 β no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos experimentales ni tampoco tendencias claras. En el caso de la concentración de la IL-10 hay una disminución significativa en su concentración en el

grupo 5XFAD/KChIP3 KO con respecto a el grupo 5XFAD pero también con el grupo KChIP3 KO y una tendencia con los ratones WT, este resultado con IL-10 tiene implicaciones interesantes que se discutirán más ampliamente en el apartado de discusión de resultados y conclusiones pero que nos dice en primera instancia que en ausencia de la proteína KChIP3 en el ratón 5XFAD se disminuye la concentración de la proteína IL-10 en machos lo que puede implicar mecanismos regulatorios de respuesta a mantener la homeostasis.

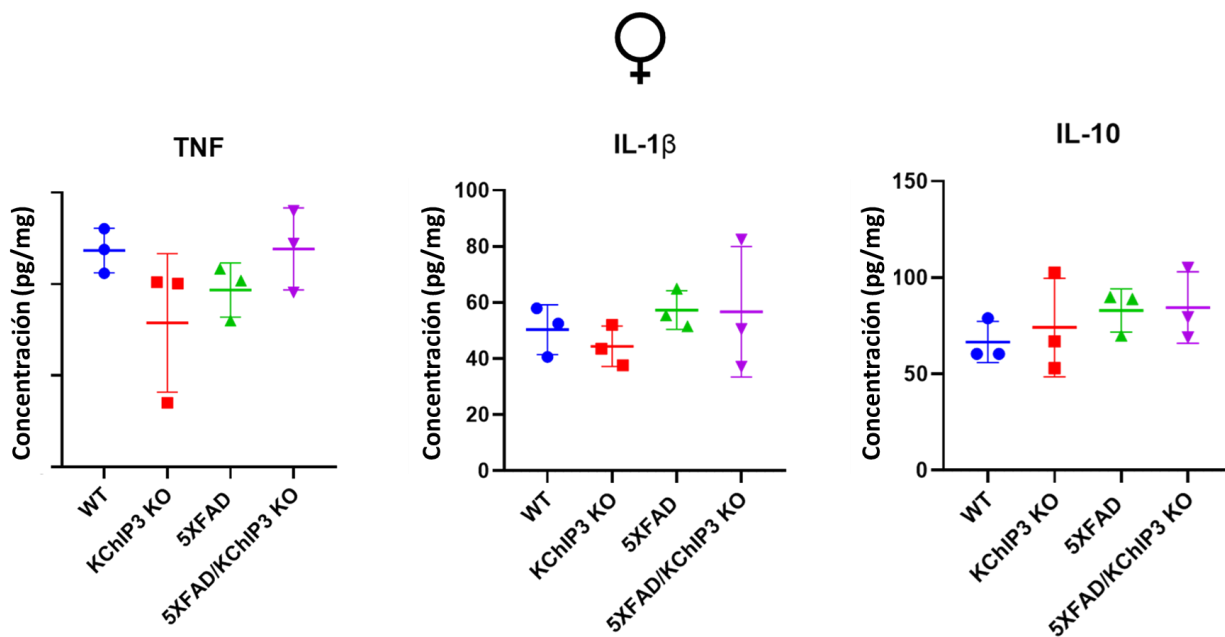


Figura 43. Concentración de citocinas inflamatorias (TNF α , IL-1 β , IL-10) en hembras de 8 meses. Realizado por el método de ELISA. Concentración (pg de proteína blanco / mg de proteína total) de una solución proteica de extractos de cerebro total. Comparación de medias con t-student, n=3, error correspondiente al valor +/- DE.

En ausencia de KChIP3 se altera la expresión de proteínas neurotróficas en el hipocampo

La expresión de proteínas neurotróficas como BDNF y el marcador de actividad neuronal c-Fos promueven la neuroplasticidad, la neurogénesis adulta y el

desarrollo de las capacidades cognitivas y procesos de memoria, en este sentido se decidió realizar la cuantificación mediante el análisis por *western blot* de las proteínas pro-BDNF, BDNF y c-Fos en extractos de hipocampo de ratones de 8 meses.

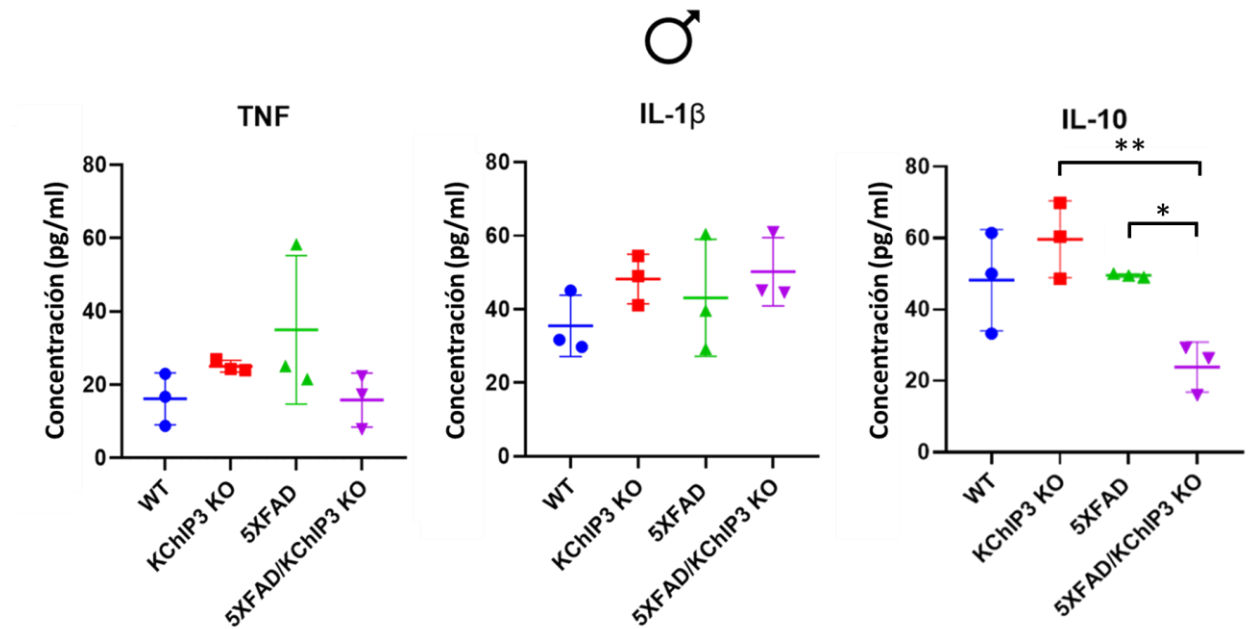


Figura 44. Concentración de citocinas inflamatorias (TNF α , IL-1 β , IL-10) en machos de 8 meses. Realizado por el método de ELISA. Concentración (pg de proteína blanco /mg de proteína total) de una solución proteica de extractos de cerebro total. Comparación de medias con t-student, n=3, *p<0.05, **p<0.01, error correspondiente al valor +/- DE.

No se observaron diferencias en la cantidad de c-Fos los diferentes grupos de hembras (figura 45), posiblemente por la misma razón que en el análisis de citocinas, que puede ser necesario aumentar el número de muestras además de verificar el estadio en el ciclo estral que se encuentran para homogenizar las muestras y eliminar la variabilidad que puede ejercer ese factor.

En cuanto a los machos (figura 46) se observa un incremento en la cantidad de c-Fos en los grupos 5XFAD como se reporta previamente en Choi, *et al* (2019) y del grupo KChIP3 KO como era de esperarse, ya que se sabe que la proteína KChIP3

actúa como represor transcripcional de la proteína c-Fos, esto con relación al grupo de ratones WT. Contradictoriamente el nivel de expresión de c-Fos en el grupo 5XFAD/KChIP3 KO es similar al observado en el grupo WT. Estos resultados nos dicen que la proteína KChIP3 modula la expresión de c-Fos ya que su ausencia provoca el incremento de este factor transcripcional en el hipocampo, de la misma manera hay un aumento de su expresión en el modelo 5XFAD que se explica en Choi *et al.* (2019) como un mecanismo en un intento por reestablecer la homeostasis del sistema. Sin embargo en el modelo 5XFAD/KChIP3 KO la expresión de la proteína es similar al grupo de ratones silvestres lo que nos dice que la ausencia en la expresión de la proteína KChIP3 en el contexto de la EA podría modificar diversos factores en la célula lo que cambia el patrón de expresión de algunas proteínas, incluyendo c-Fos, aspecto que se ha comenzado a evaluar en otros trabajos dentro del laboratorio, ya que como se mencionó en los antecedentes, la actividad de la proteína KChIP3 modula diferentes vías de señalización por su interacción con diversas proteínas y sitios del ADN.

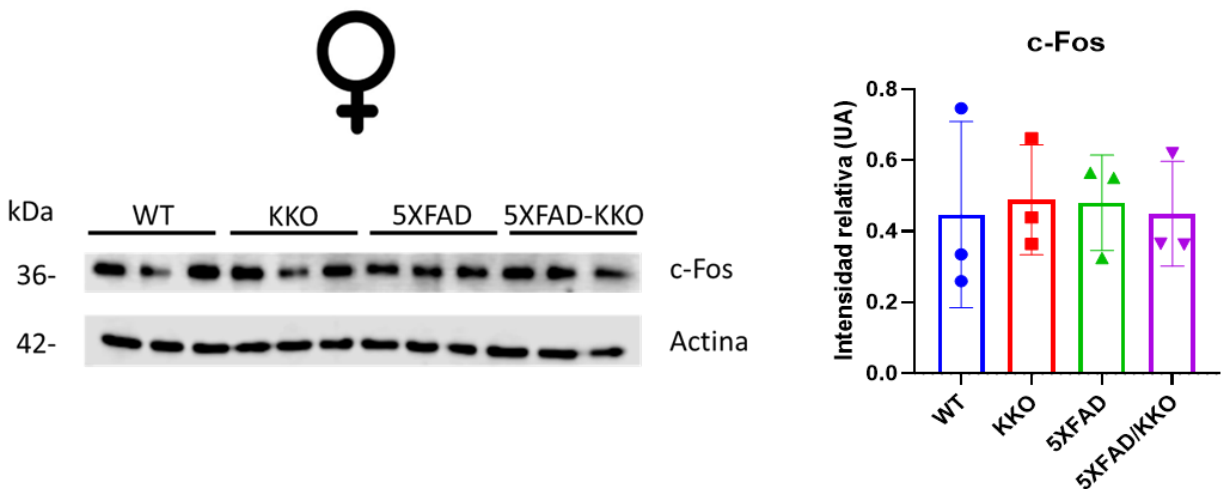


Figura 45. No hay diferencias en la expresión de c-Fos en hembras de 8 meses. Realizado por el método de *western blot* a extractos proteicos de hipocampo de ratones hembra de 8 meses de edad. La cantidad relativa se calibra en relación con Actina. Comparación de medias con t-student, n=3, error correspondiente al valor +/- DE.

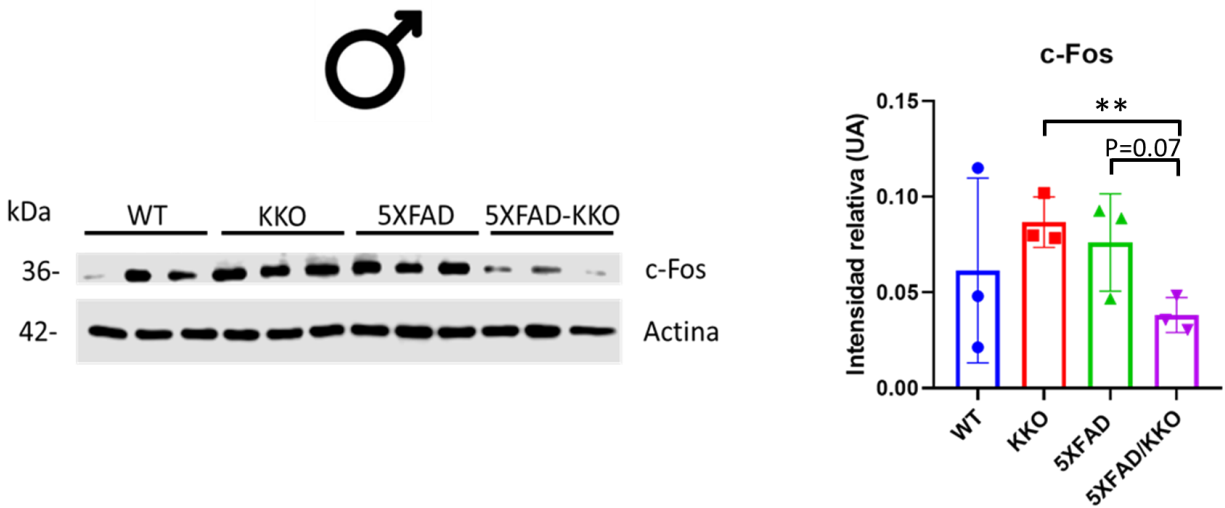


Figura 46. Hay una disminución en la expresión de c-Fos en machos 5XFAD/KCHIP3KO de 8 meses. Realizado por el método de *western blot* a extractos proteicos de hipocampo de ratones macho de 8 meses de edad. La cantidad relativa se calibra en relación con Actina. Comparación de medias con t-student, n=3, **p<0.01, error correspondiente al valor +/- DE.

En cuanto a la expresión de BDNF se realizó la medición tanto de la forma precursora de la proteína (pro-BDNF), como de la forma procesada de la misma (BDNF).

Nuevamente en las hembras (figura 47) los resultados no son concluyentes por los motivos previamente mencionados, por lo que en próximas pruebas se requiere poner más atención en la metodología experimental para el correcto procesamiento y análisis de resultados.

En cuanto a los machos (figura 48), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales en los niveles de la proteína procesada (BDNF), pero si en el precursor de la proteína (pro-BDNF) donde se observa un aumento significativo en su expresión tanto en el grupo 5XFAD como en el grupo 5XFAD/KCHIP3 KO, esto con respecto a lo observado en los grupos WT y KCHIP3 KO. La media más alta en la expresión de la proteína se observa en el grupo 5XFAD lo que es consistente con datos observados por

otros miembros del laboratorio en su trabajo de investigación (datos no mostrados), mientras que el grupo 5XFAD/KChIP3 KO tiene una menor expresión de la proteína con respecto al grupo 5XFAD, pero que no es significativa. Estos resultados nos dicen que hay una alteración en la expresión de la proteína precursora pro-BDNF en el hipocampo de ratones 5XFAD y que la ausencia de la proteína KChIP3 no parece tener repercusión en los niveles de pro-BDNF.

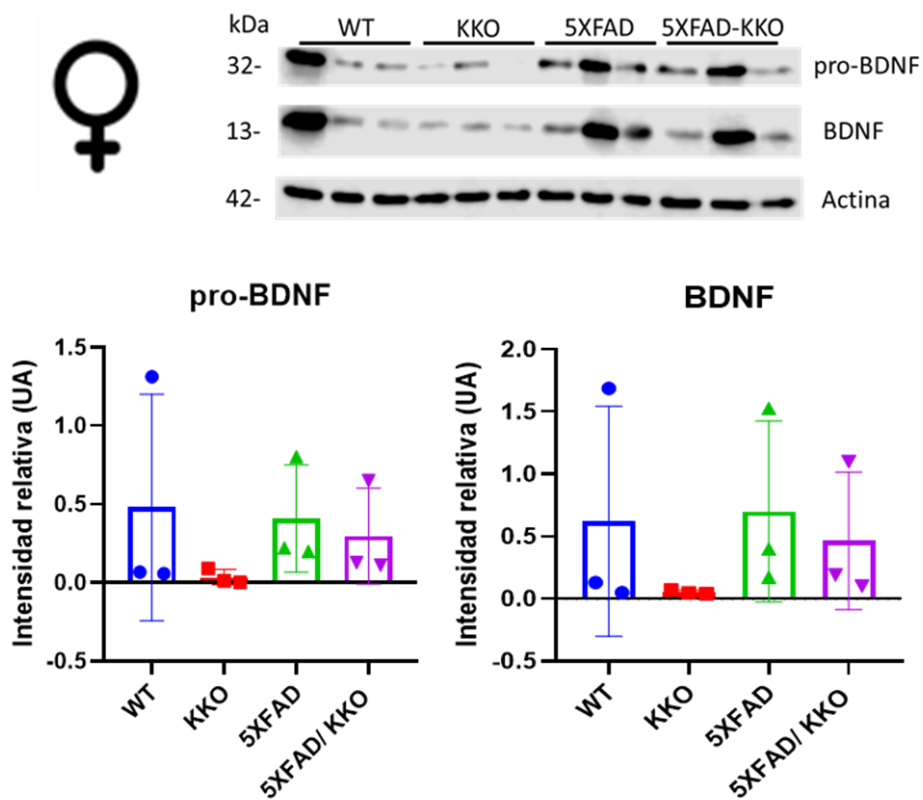


Figura 47. Expresión de pro-BDNF y BDNF en extractos de hipocampo en hembras de 8 meses. Realizado por el método de *western blot*. La cantidad relativa se calibra en relación con Actina. Comparación de medias con t-student, n=3, error correspondiente al valor +/- DE.

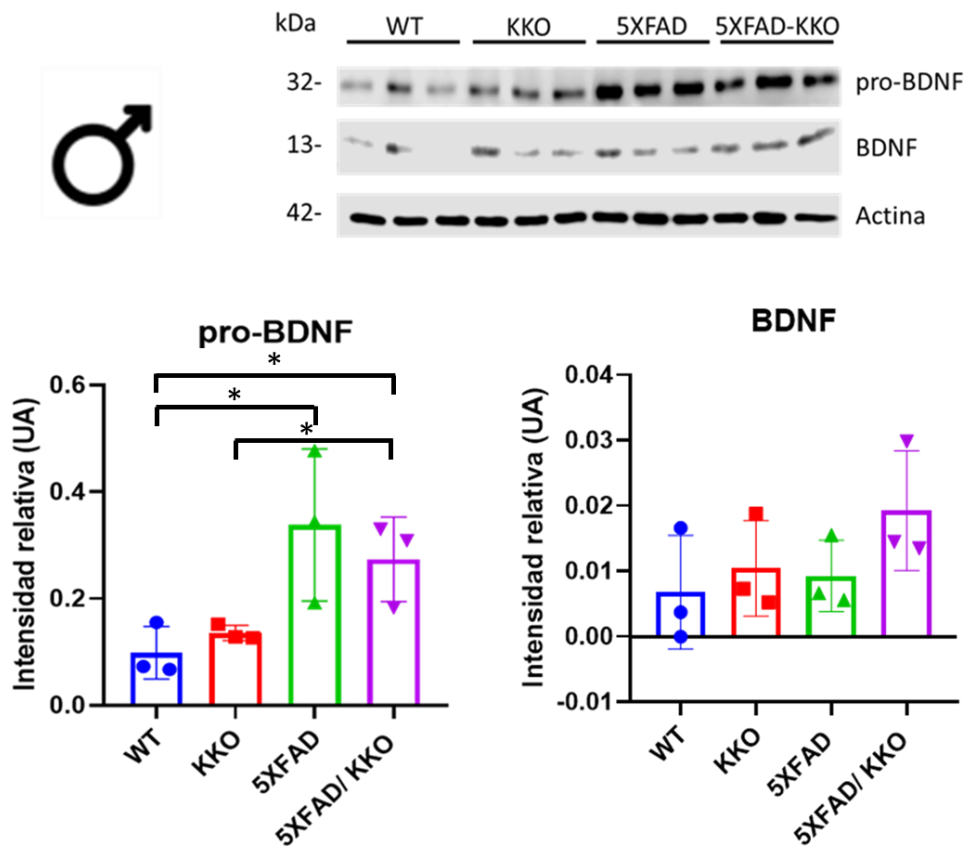


Figura 48. Expresión de pro-BDNF y BDNF en extractos de hipocampo en machos de 8 meses. Realizado por el método de *western blot*. La cantidad relativa se calibra en relación con Actina. Comparación de medias con t-student, $n=3$, $*p<0.05$, error correspondiente al valor \pm DE.

Expresión diferencial de la proteína GFAP en el hipocampo

Como se mencionó en los antecedentes el aumento de la proteína GFAP en los astrocitos durante la enfermedad de Alzheimer es evidencia de astrogliosis en respuesta a un factor disruptivo de la homeostasis en el sistema nervioso central (Olobarria *et al.*, 2011), además, las observaciones de Cebolla *et al.* (2008) donde se concluye que el aumento en la expresión de GFAP en células precursoras durante el neurodesarrollo promueven su diferenciación hacia astrocitos inhibiéndose la neurogénesis, lo cual podría ocurrir también con el aumento de su expresión en un

modelo de neuroinflamación sostenida durante el proceso de neurogénesis hipocampal adulta, como ocurre en el modelo 5XFAD de la enfermedad de Alzheimer. Es por eso por lo que se decidió realizar el análisis de GFAP en el hipocampo de los ratones hembra y machos de 8 meses por el método de western blot.

En el caso de las hembras (figura 49) se observó, como era de esperarse, un aumento significativo en la expresión de la proteína GFAP en el hipocampo del grupo 5XFAD con respecto a los ratones WT, la media de los grupos KChIP3 KO y 5XFAD/ KChIP3 KO es menor al grupo 5XFAD, pero no se encontraron diferencias significativas en su expresión. Estos resultados nos dicen que en hembras también hay un aumento en la expresión de GFAP en el modelo 5XFAD, sin embargo, hay mucha variabilidad en los datos respecto los modelos ausentes de la proteína KChIP3 por lo que es necesario como ya se ha mencionado anteriormente complementar estos resultados con más muestras y controlando la etapa del ciclo estral en que se sacrifican los ratones.

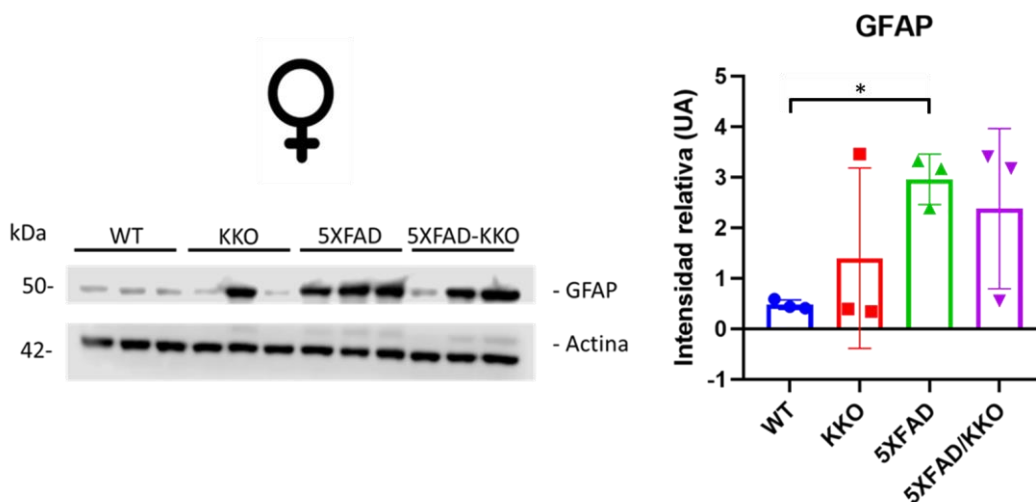


Figura 49. Cuantificación de GFAP en extractos de hipocampo en hembras de 8 meses. Realizado por el método de *western blot*. La cantidad relativa se calibra en relación con Actina. Comparación de medias con t-student, n=3, *p<0.05, error correspondiente al valor +/- DE.

Con respecto a los grupos experimentales de machos (figura 50) se observa en los resultados como se esperaba, un incremento en la expresión de GFAP en el

hipocampo del grupo 5XFAD con respecto al WT. El grupo que reporta la menor expresión de GFAP es el grupo KChIP3 KO, este resultado también era esperado porque como reportan Cebolla, *et al.*, (2008) la actividad de KChIP3 en el núcleo de células precursoras neurales promueve la expresión de GFAP, por lo tanto, en ausencia de la proteína se espera una disminución de su expresión. Con respecto al grupo 5XFAD/ KChIP3 KO hay una tendencia a verse disminuida la expresión de GFAP con respecto al modelo 5XFAD, pero esta tendencia no es significativa, sin embargo, tampoco hay diferencias significativas entre el grupo de ratones WT y el grupo 5XFAD/ KChIP3 KO. Estos resultados nos sugieren que KChIP3 en machos, al modular la expresión de GFAP en el hipocampo en su ausencia podría reestablecer el fenotipo de astrogliosis.

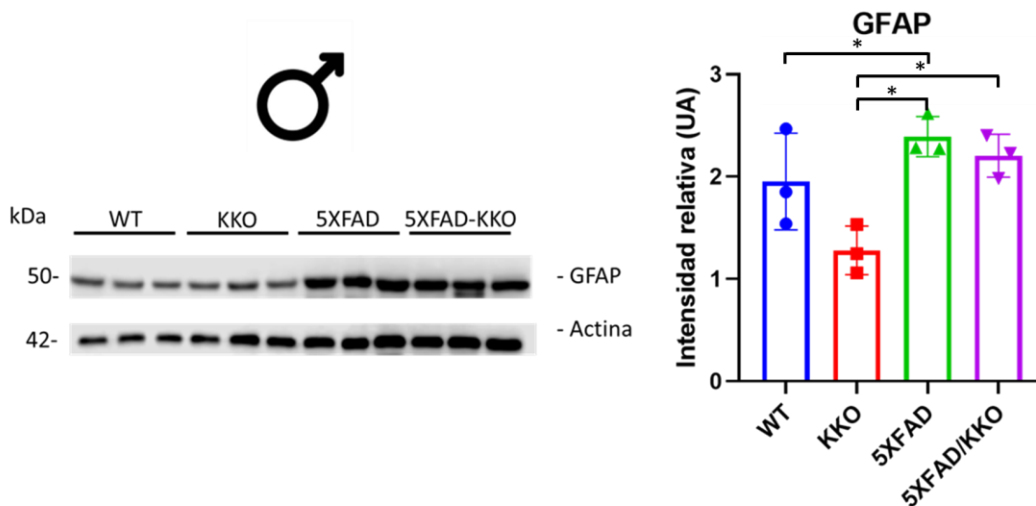


Figura 50. Cuantificación de GFAP en extractos de hipocampo en machos de 8 meses. Realizado por el método de *western blot*. La cantidad relativa se calibra en relación con Actina. Comparación de medias con t-student, n=3, *p<0.05, error correspondiente al valor +/- DE.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En este trabajo se obtuvieron modelos experimentales únicos para la realización de “fate mappings” (mapeo de destino celular) en un modelo de la EA ausentes en la expresión de la proteína KChIP3, además de coleccionar tejido perfundido y fresco de todos los ratones experimentales utilizados en este trabajo para realizar análisis correspondientes.

Se observó en ratones jóvenes y en ratones adultos que, debido a un evento inflamatorio inducido, en este caso por la inyección intraperitoneal con LPS, se ven afectados la conducta y las capacidades cognitivas, esto ocurre debido a los eventos neuroinflamatorios inducidos, como describen de manera detallada Zhao y colaboradores (2019). En este trabajo observamos que la capacidad para generar nuevas memorias se ve afectada con cualquier dosis administrada de LPS, viéndose que una dosis mayor afecta aún más el establecimiento de nuevas memorias, aunque no de forma estadísticamente significativa.

Uno de los principales objetivos en este trabajo era evaluar cual es el efecto que tiene la ausencia en la expresión de la proteína KChIP3 en las capacidades cognitivas y como se refleja eso en la tasa neurogénica. Por ese motivo se usó el modelo KChIP3KO y se planeó un esquema para la realización de pruebas cognitivas tanto el modelo de inflamación inducida con LPS como en el modelo de la enfermedad de Alzheimer (5XFAD), y para la cuantificación de la NHA con la administración de BrdU para marcar células proliferativas y de tamoxifeno para activar la expresión de eYFP en precursores neurales que expresan Nestina usando el modelo transgénico Nest-Cre^{ERT2}/R26reYFP.

Se observó en ratones macho, que la ausencia de KChIP3 tiene un efecto neuroprotector en el modelo de inflamación inducida por LPS ya que evita que se pierdan las capacidades cognitivas a comparación de los ratones WT. Este efecto neuroprotector se vuelve a observar tanto en ratones hembra como machos en el modelo 5XFAD de la

enfermedad de Alzheimer donde su ausencia mejora las capacidades cognitivas en las pruebas de memoria relacionadas con la exposición a estímulos visuales novedosos. Estos resultados abren una pauta interesante para evaluar de manera más específica la actividad de KChIP3 durante la adquisición de nuevas memorias, aspecto que ya se está evaluando por miembros del laboratorio.

Un aspecto importante para tomar en cuenta es la edad de los ratones a la que se realizan las pruebas en este trabajo, ya que de eso podría depender el correcto diseño experimental de trabajos futuros. Para las pruebas cognitivas en el modelo 5XFAD es más probable encontrar significancia en los datos obtenidos entre mayor sea la edad de los ratones. En este trabajo se lograron obtener diferencias significativas entre grupos con respecto a las pruebas cognitivas lo cual confirma que hay un déficit cognitivo en el modelo 5XFAD en el fondo C57BL/6J a la edad de 6 meses, pero se recomienda para futuras aproximaciones usar ratones de edades más avanzadas, para ver un efecto más claro del deterioro cognitivo en el modelo experimental.

En este trabajo se buscó también realizar las pruebas necesarias tanto en hembras como en machos. Consideramos necesario realizar este tipo de pruebas en ambos sexos para evitar de este modo sesgos en la interpretación de datos, sobre todo cuando es conocido que ciertas patologías como la EA, afecta de manera diferente a la población de mujeres y hombres. Otro aspecto importante para considerar es que se deben estandarizar protocolos más cuidadosos para realizar pruebas en hembras, ya que se debe considerar las variaciones en la producción hormonal que supone trabajar con hembras además de controlar de manera precisa y exhaustiva factores intrínsecos que puedan afectar los resultados experimentales.

Se sabe que hay eventos neuroinflamatorios asociados a la sobreproducción de p β A durante el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer y que estos eventos provocan en gran medida la aparición del déficit cognitivo asociado a diversos cambios fisiológicos en las células (Hansen *et al*, 2018). Uno de los resultados más interesantes obtenidos en este trabajo fue observar la disminución de la citocina IL-10 en el modelo 5XFAD ausente

de la proteína KChIP3. Debido a la actividad anti-inflamatoria que tiene esta citocina, es intuitivo pensar que su expresión tiene un efecto neuroprotector al promover la disminución de los eventos neuroinflamatorios, pero en el caso del envejecimiento y enfermedad crónica inflamatoria el aumento de la IL-10 puede ser deletéreo a la memoria y la neurogénesis hipocampal como lo muestran en un artículo publicado recientemente Sanchez-Molina y colaboradores (2022). No es por tanto sorpresa observar un incremento en la producción de IL-10 en el modelo 5XFAD de la enfermedad de Alzheimer y suponer que este aumento tiene un efecto deletéreo en la memoria y la neurogénesis, y es interesante el observar que en ausencia de KChIP3 haya una disminución en la expresión de IL-10, lo que nos dice que podría estar involucrado en la regulación de vías pro-inflamatorias en el cerebro.

De la misma manera que no es extraño observar un aumento en la producción de IL-10 tampoco lo es el aumento en la producción del factor neurotrófico BDNF y de la proteína c-Fos; el aumento en la expresión de estos factores podría darse en respuesta a los estímulos deletéreos en un intento por reestablecer la homeostasis del sistema.

El aumento de GFAP durante la enfermedad de Alzheimer ya ha sido reportado anteriormente (Olobarria *et al.*, 2011), fenómeno que promueve la astrogliosis, si la ausencia de KChIP3 al menos de manera parcial disminuye la expresión de GFAP como se muestra en los resultados, es posible que se regule la respuesta inflamatoria alterando el fenotipo de los astrocitos por la actividad de KChIP3 que puede ser un blanco terapéutico interesante en el tratamiento de neuropatologías asociadas a la activación astrocítica. Otra consideración importante es como podría impactar la ausencia de KChIP3 en la expresión de GFAP en células precursoras neurales del hipocampo adulto, ya que como observaron Cebolla y colaboradores (2008) en células precursoras en el neurodesarrollo, por la similitud de las células precursoras en los nichos neurales adultos es probable que la disminución en la neurogénesis adulta en modelos murinos de la enfermedad de Alzheimer ocurra debido al incremento en la producción de GFAP en las células progenitoras por la actividad de la proteína KChIP3, promoviendo la astrogliogénesis e inhibiendo la neurogénesis como ocurre en el neurodesarrollo,

poniendo como blanco la inhibición de la actividad de la proteína KChIP3 como estrategia para reestablecer la tasa de NHA en modelos de inflamación crónica.

CONCLUSIONES

- Se obtuvo el modelo experimental Nestina-Cre/R26R-eYFP/5XFAD/KChIP3KO, que permitirá evaluar de manera precisa el destino de los precursores neurales en un modelo de la EA ausente de la proteína KChIP3KO.
- Se observó que la ausencia de la proteína KChIP3 disminuye el efecto en la pérdida de memoria en ratones macho inyectados con LPS.
- Se observó que la ausencia de la proteína KChIP3 disminuye el impacto negativo en las capacidades cognitivas en ratones macho y hembra 5XFAD, modelo de la EA.
- Se observó que la ausencia de la proteína KChIP3 en ratones macho de la EA modifica la concentración de la proteína c-Fos en el hipocampo, lo cual podría tener un efecto directo en fenómenos de neuroplasticidad, incluyendo la NHA.
- Se observó que en ratones hembra 5XFAD ausentes de la proteína KChIP3 la expresión de BDNF, c-Fos y GFAP son muy variables por lo que se deben idear protocolos para eliminar los posibles factores que provoquen dichas variaciones.
- Se observó que en ratones 5XFAD macho ausentes de KChIP3 KO no hay un efecto en la cantidad de GFAP en el hipocampo, el cual es muy similar a los ratones WT y 5XFAD por lo que es importante estudiar el fenotipo y la dinámica astrocítica en este modelo de estudio y sus repercusiones en la fisiología de la EA.

PERSPECTIVAS

Este trabajo sirve como precedente para investigar de manera más específica como actúa la proteína KChIP3 en el desarrollo de la EA y a su vez lo pone como blanco en la regulación de la NHA. Las muestras y el tejido que se logró conseguir en este proyecto serán analizadas posteriormente en busca de complementar los resultados mostrados en este proyecto escrito para lograr cumplir los objetivos planteados en su totalidad.

REFERENCIAS

- Alzheimer, A. (1907). Uber eine eigenartige erkrankung der hirnrinde. *Allgemeine. J. Psychiatry and Forensic Medicine-phychish (Berlin)*, 64, 146-148.
- Álvarez-Arellano, L., Pedraza-Escalona, M., Blanco-Ayala, T., Camacho-Concha, N., Cortés-Mendoza, J., 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.
- Alzforum. (2018). Research models, 5xFAD. 28/11/2018, de Alzforum Sitio web: <https://www.alzforum.org/research-models/5xfad>
- Amor, S., Puentes, F., Baker, D., & Van Der Valk, P. (2010). Inflammation in neurodegenerative diseases. *Immunology*, 129(2), 154-169.
- Arendt, T., Stieler, J. T., & Holzer, M. (2016). Tau and tauopathies. *Brain research bulletin*, 126, 238-292.

- Arispe, N., Rojas, E., & Pollard, H. B. (1993). Alzheimer disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminum. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(2), 567-571.
- Arnoldo, P. S., Marilet, Á. S., & Lázaro, Á. (2008). Fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer. *Revista Mexicana de Neurociencia*, 9(3), 196-201.
- Bales, K. R., Verina, T., Dodel, R. C., Du, Y., Altstiel, L., Bender, M., & Piccardo, P. (1997). Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid β -peptide deposition. *Nature genetics*, 17(3), 263-264.
- Bamberger, M. E., Harris, M. E., McDonald, D. R., Husemann, J., & Landreth, G. E. (2003). A cell surface receptor complex for fibrillar β -amyloid mediates microglial activation. *Journal of Neuroscience*, 23(7), 2665-2674.
- Batista-Brito, R., Close, J., Machold, R., & Fishell, G. (2008). The distinct temporal origins of olfactory bulb interneuron subtypes. *Journal of Neuroscience*, 28(15), 3966-3975.
- Battista, D., Ferrari, C. C., Gage, F. H., & Pitossi, F. J. (2006). Neurogenic niche modulation by activated microglia: transforming growth factor β increases neurogenesis in the adult dentate gyrus. *European Journal of Neuroscience*, 23(1), 83-93.
- Bezprozvanny, I. (2009). Calcium signaling and neurodegenerative diseases. *Trends in molecular medicine*, 15(3), 89-100.
- Bird T., Miller B. (2009). Demencia. En Harrison Medicina Interna (Vol. 2, p.2536). Estados Unidos de America: Mc Graw Hill.

- Bolós, M., Hu, Y., Young, K. M., Foa, L., & Small, D. H. (2014). Neurogenin 2 mediates amyloid- β precursor protein-stimulated neurogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 289(45), 31253-31261.
- Braak, H., & Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta neuropathologica*, 82(4), 239-259.
- Brandt, M. D., Jessberger, S., Steiner, B., Kronenberg, G., Reuter, K., Bick-Sander, A. & Kempermann, G. (2003). Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 24(3), 603-613.
- Bretsky, P. M., Buckwalter, J. G., Seeman, T. E., Miller, C. A., Poirier, J., Schellenberg, G. D. & Henderson, V. W. (1999). Evidence for an interaction between apolipoprotein E genotype, gender, and Alzheimer disease. *Alzheimer disease and associated disorders*.
- Butovsky, O., Ziv, Y., Schwartz, A., Landa, G., Talpalar, A. E., Pluchino, S., & Schwartz, M. (2006). Microglia activated by IL-4 or IFN- γ differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 31(1), 149-160.
- Buxbaum, J. D., Choi, E. K., Luo, Y., Lilliehook, C., Crowley, A. C., Merriam, D. E., & Wasco, W. (1998). Calsenilin: a calcium-binding protein that interacts with the presenilins and regulates the levels of a presenilin fragment. *Nature medicine*, 4(10), 1177-1181.
- Caillé, I., Allinquant, B., Dupont, E., Bouillot, C., Langer, A., Müller, U., & Prochiantz, A. (2004). Soluble form of amyloid precursor protein regulates proliferation of progenitors in the adult subventricular zone. *Development*, 131(9), 2173-2181.

- Carson, J. A., & Turner, A. J. (2002). β -Amyloid catabolism: roles for neprilysin (NEP) and other metallopeptidases. *Journal of neurochemistry*, 81(1), 1-8.
- Carter, C. L., Resnick, E. M., Mallampalli, M., & Kalbarczyk, A. (2012). Sex and gender differences in Alzheimer's disease: recommendations for future research. *Journal of women's health*, 21(10), 1018-1023.
- Cebolla, B., Fernández-Pérez, A., Perea, G., Araque, A., & Vallejo, M. (2008). DREAM mediates cAMP-dependent, Ca²⁺-induced stimulation of GFAP gene expression and regulates cortical astrogliogenesis. *Journal of Neuroscience*, 28(26), 6703-6713.
- Cheng, H. Y. M., Pitcher, G. M., Laviolette, S. R., Whishaw, I. Q., Tong, K. I., Kockeritz, L. K., & Penninger, J. M. (2002). DREAM is a critical transcriptional repressor for pain modulation. *Cell*, 108(1), 31-43.
- Chevallier, N. L., Soriano, S., Kang, D. E., Masliah, E., Hu, G., & Koo, E. H. (2005). Perturbed neurogenesis in the adult hippocampus associated with presenilin-1 A246E mutation. *The American journal of pathology*, 167(1), 151-159.
- Choi, H., Kim, C., Song, H., Cha, M. Y., Cho, H. J., Son, S. M., ... & Mook-Jung, I. (2019). Amyloid β -induced elevation of O-GlcNAcylated c-Fos promotes neuronal cell death. *Aging Cell*, 18(1), e12872.
- Colton, C. A., & Wilcock, D. M. (2010). Assessing activation states in microglia. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)*, 9(2), 174-191.
- Dansokho, C., & Heneka, M. T. (2018). Neuroinflammatory responses in Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission*, 125(5), 771-779.

- De Carolis, N. A., Mechanic, M., Petrik, D., Carlton, A., Ables, J. L., Malhotra, S., & Eisch, A. J. (2013). In vivo contribution of nestin-and GLAST-lineage cells to adult hippocampal neurogenesis. *Hippocampus*, *23*(8), 708-719.
- De Lucia, C., Rinchon, A., Olmos-Alonso, A., Riecken, K., Fehse, B., Boche, D. & Gomez-Nicola, D. (2016). Microglia regulate hippocampal neurogenesis during chronic neurodegeneration. *Brain, behavior, and immunity*, *55*, 179-190.
- Demars, M., Hu, Y. S., Gadadhar, A., & Lazarov, O. (2010). Impaired neurogenesis is an early event in the etiology of familial Alzheimer's disease in transgenic mice. *Journal of neuroscience research*, *88*(10), 2103-2117.
- Dong, H., Goico, B., Martin, M., Csernansky, C. A., Bertchume, A., & Csernansky, J. G. (2004). Modulation of hippocampal cell proliferation, memory, and amyloid plaque deposition in APP^{sw} (Tg2576) mutant mice by isolation stress. *Neuroscience*, *127*(3), 601-609.
- Dong-Gyu, J., Joo-Yong, L., Yeon-Mi, H., Sungmin, S., Inhee, M. J., Jae-Young, K., & Yong-Keun, J. (2004). Induction of pro-apoptotic calsenilin/DREAM/KChIP3 in Alzheimer's disease and cultured neurons after amyloid- β exposure. *Journal of neurochemistry*, *88*(3), 604-611.
- Donovan, M. H., Yazdani, U., Norris, R. D., Games, D., German, D. C., & Eisch, A. J. (2006). Decreased adult hippocampal neurogenesis in the PDAPP mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Comparative Neurology*, *495*(1), 70-83.
- Ekdahl, C. T., Claasen, J. H., Bonde, S., Kokaia, Z., & Lindvall, O. (2003). Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(23), 13632-13637.

- Espósito, M. S., Piatti, V. C., Laplagne, D. A., Morgenstern, N. A., Ferrari, C. C., Pitossi, F. J., & Schinder, A. F. (2005). Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *Journal of Neuroscience*, *25*(44), 10074-10086.
- El Khoury, J. B., Moore, K. J., Means, T. K., Leung, J., Terada, K., Toft, M. & Luster, A. D. (2003). CD36 mediates the innate host response to β -amyloid. *The Journal of experimental medicine*, *197*(12), 1657-1666.
- Etcheberrigaray, R., Hirashima, N., Nee, L., Prince, J., Govoni, S., Racchi, M., & Alkon, D. L. (1998). Calcium responses in fibroblasts from asymptomatic members of Alzheimer's disease families. *Neurobiology of disease*, *5*(1), 37-45.
- Ferreiro, E., Oliveira, C. R., & Pereira, C. (2004). Involvement of endoplasmic reticulum Ca²⁺ release through ryanodine and inositol 1, 4, 5-triphosphate receptors in the neurotoxic effects induced by the amyloid- β peptide. *Journal of neuroscience research*, *76*(6), 872-880.
- Flaherty, D. B., Soria, J. P., Tomasiewicz, H. G., & Wood, J. G. (2000). Phosphorylation of human tau protein by microtubule-associated kinases: GSK3 β and cdk5 are key participants. *Journal of neuroscience research*, *62*(3), 463-472.
- Fontán-Lozano, A., Capilla-González, V., Aguilera, Y., Mellado, N., Carrión, A. M., Soria, B., & Hmadcha, A. (2016). Impact of transient down-regulation of DREAM in human embryonic stem cell pluripotency: The role of DREAM in the maintenance of hESCs. *Stem cell research*, *16*(3), 568-578.
- Fontán-Lozano, Á., Romero-Granados, R., del-Pozo-Martín, Y., Suárez-Pereira, I., Delgado-García, J. M., Penninger, J. M., & Carrión, Á. M. (2009). Lack of DREAM protein enhances learning and memory and slows brain aging. *Current Biology*, *19*(1), 54-60.

- Fourgeaud, L., Través, P. G., Tufail, Y., Leal-Bailey, H., Lew, E. D., Burrola, P. G., & Lemke, G. (2016). TAM receptors regulate multiple features of microglial physiology. *Nature*, *532*(7598), 240.
- Fuentealba, L. C., Obernier, K., & Alvarez-Buylla, A. (2012). Adult neural stem cells bridge their niche. *Cell stem cell*, *10*(6), 698-708
- Gakhar-Koppole, N., Hundeshagen, P., Mandl, C., Weyer, S. W., Allinquant, B., Müller, U., & Ciccolini, F. (2008). Activity requires soluble amyloid precursor protein α to promote neurite outgrowth in neural stem cell-derived neurons via activation of the MAPK pathway. *European Journal of Neuroscience*, *28*(5), 871-882.
- Gemma, C., Bachstetter, A. D., Cole, M. J., Fister, M., Hudson, C., & Bickford, P. C. (2007). Blockade of caspase-1 increases neurogenesis in the aged hippocampus. *European Journal of Neuroscience*, *26*(10), 2795-2803.
- Gemma, C., Fister, M., Hudson, C., & Bickford, P. C. (2005). Improvement of memory for context by inhibition of caspase-1 in aged rats. *European Journal of Neuroscience*, *22*(7), 1751-1756.
- Gandhi, S., Gupta, J., & Tripathi, P. P. (2019). The Curious Case of Human Hippocampal Neurogenesis.
- Godin, J. D., & Nguyen, L. (2014). Novel functions of core cell cycle regulators in neuronal migration. In *Cellular and Molecular Control of Neuronal Migration* (pp. 59-74). Springer, Dordrecht.
- Grillo, M. A., Grillo, S. L., Gerdes, B. C., Kraus, J. G., & Koulen, P. (2018). Control of Neuronal Ryanodine Receptor-Mediated Calcium Signaling by Calsenilin. *Molecular neurobiology*, 1-10.

- Grimm, A., Lim, Y. A., Mensah-Nyagan, A. G., Götz, J., & Eckert, A. (2012). Alzheimer's disease, oestrogen and mitochondria: an ambiguous relationship. *Molecular neurobiology*, 46(1), 151-160.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y. C., Quinlan, M., Wisniewski, H. M., & Binder, L. I. (1986). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(13), 4913-4917.
- Gutiérrez-Robledo, L. M., (2014). Plan de Acción Alzheimer y Otras Demencias, México. 24/10/2018, de Instituto Nacional de Geriatria Sitio web: http://www.geriatria.salud.gob.mx/descargas/plan_alzheimer.pdf
- Halle, A., Hornung, V., Petzold, G. C., Stewart, C. R., Monks, B. G., Reinheckel, T. & Golenbock, D. T. (2008). The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid- β . *Nature immunology*, 9(8), 857.
- Hamilton, L. K., Aumont, A., Julien, C., Vadnais, A., Calon, F., & Fernandes, K. J. (2010). Widespread deficits in adult neurogenesis precede plaque and tangle formation in the 3xTg mouse model of Alzheimer's disease. *European Journal of Neuroscience*, 32(6), 905-920.
- Hamilton, L. K., Dufresne, M., Joppé, S. E., Petryszyn, S., Aumont, A., Calon, F., & Fernandes, K. J. (2015). Aberrant lipid metabolism in the forebrain niche suppresses adult neural stem cell proliferation in an animal model of Alzheimer's disease. *Cell stem cell*, 17(4), 397-411.
- Hansen, D. V., Hanson, J. E., & Sheng, M. (2018). Microglia in Alzheimer's disease. *J Cell Biol*, 217(2), 459-472

- Haughey, N. J., Nath, A., Chan, S. L., Borchard, A. C., Rao, M. S. & Mattson, M. P. (2002). Disruption of neurogenesis by amyloid β -peptide, and perturbed neural progenitor cell homeostasis, in models of Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry*, 83(6), 1509-1524.
- He, Y., Zhang, H., Yung, A., Villeda, S. A., Jaeger, P. A., Olayiwola, O., ... & Wyss-Coray, T. (2014). ALK5-dependent TGF- β signaling is a major determinant of late-stage adult neurogenesis. *Nature neuroscience*, 17(7), 943.
- Heneka, M. T., Carson, M. J., El Khoury, J., Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L. & Herrup, K. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*, 14(4), 388-405.
- Heneka, M. T., Kummer, M. P., Stutz, A., Delekate, A., Schwartz, S., Vieira-Saecker, A., & Gelpi, E. (2013). NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature*, 493(7434), 674.
- Hickman, S. E., Allison, E. K., & El Khoury, J. (2008). Microglial dysfunction and defective β -amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice. *Journal of Neuroscience*, 28(33), 8354-8360.
- Irizarry, M. C., Rebeck, G. W., Cheung, B., Bales, K., Paul, S. M., Holzman, D., & Hyman, B. T. (2000). Modulation of A β deposition in APP transgenic mice by an apolipoprotein E null background. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 920(1), 171-178.
- Jin, K., Peel, A. L., Mao, X. O., Xie, L., Cottrell, B. A., Henshall, D. C., & Greenberg, D. A. (2004). Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(1), 343-347.

- Jurkowski, M. P., Bettio, L., K. Woo, E., Patten, A., Yau, S. Y., & Gil-Mohapel, J. (2020). Beyond the hippocampus and the SVZ: adult neurogenesis throughout the brain. *Frontiers in cellular neuroscience*, 14, 576444.
- Kempermann, G., Song, H., & Gage, F. H. (2015). Neurogenesis in the adult hippocampus. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(9), a018812.
- Kettenmann, H., Hanisch, U. K., Noda, M., & Verkhratsky, A. (2011). Physiology of microglia. *Physiological reviews*, 91(2), 461-553. Kettenmann, H., Hanisch, U. Noda, M., & Verkhratsky, A. (2011). Physiology of microglia. *Physiological reviews*, 91(2), 461-553.
- Khachaturian, Z. S. (1987). Hypothesis on the regulation of cytosol calcium concentration and the aging brain. *Neurobiology of aging*, 8(4), 345-346.
- Kiyota, T., Ingraham, K. L., Swan, R. J., Jacobsen, M. T., Andrews, S. J., & Ikezu, T. (2012). AAV serotype 2/1-mediated gene delivery of anti-inflammatory interleukin-10 enhances neurogenesis and cognitive function in APP+ PS1 mice. *Gene therapy*, 19(7), 724-733.
- Lagace, D. C., Whitman, M. C., Noonan, M. A., Ables, J. L., DeCarolis, N. A., Arguello, A. A. & DiLeone, R. J. (2007). Dynamic contribution of nestin-expressing stem cells to adult neurogenesis. *Journal of Neuroscience*, 27(46), 12623-12629.
- Laws, K. R., Irvine, K., & Gale, T. M. (2018). Sex differences in Alzheimer's disease. *Current opinion in psychiatry*, 31(2), 133-139.
- Lazarov, O., y Marr, R. (2013). Of mice and men: neurogenesis, cognition and Alzheimer's disease. *Frontiers in aging neuroscience*, 5, 43.

- Lee, M. K., Slunt, H. H., Martin, L. J., Thinakaran, G., Kim, G., Gandy, S. E., & Sisodia, S. S. (1996). Expression of presenilin 1 and 2 (PS1 and PS2) in human and murine tissues. *Journal of Neuroscience*, *16*(23), 7513-7525.
- Leger, M., Quiedeville, A., Bouet, V., Haelewyn, B., Boulouard, M., Schumann-Bard, P., & Freret, T. (2013). Object recognition test in mice. *Nature protocols*, *8*(12), 2531.
- Leng, F., & Edison, P. (2021). Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here?. *Nature Reviews Neurology*, *17*(3), 157-172.
- Lewis, J., Dickson, D. W., Lin, W. L., Chisholm, L., Corral, A., Jones, G. & Eckman, C. (2001). Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science*, *293*(5534), 1487-1491.
- Li, R. & Singh, M. (2014). Sex differences in cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Frontiers in neuroendocrinology*, *35*(3), 385-403.
- Lichtenwalner, R. J., Forbes, M. E., Bennett, S. A., Lynch, C. D., Sonntag, W. E., & Riddle, D. R. (2001). Intracerebroventricular infusion of insulin-like growth factor-I ameliorates the age-related decline in hippocampal neurogenesis. *Neuroscience*, *107*(4), 603-613.
- Lin, K. A., Choudhury, K. R., Rathakrishnan, B. G., Marks, D. M., Petrella, J. R., Doraiswamy, P. M., & Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. (2015). Marked gender differences in progression of mild cognitive impairment over 8 years. *Alzheimer's & dementia: translational research & clinical interventions*, *1*(2), 103-110.
- Liu, Y., Walter, S., Stagi, M., Cherny, D., Letiembre, M., Schulz-Schaeffer, W., & Fassbender, K. (2005). LPS receptor (CD14): a receptor for phagocytosis of Alzheimer's amyloid peptide. *Brain*, *128*(8), 1778-1789.

- Lledo, P. M., Alonso, M., & Grubb, M. S. (2006). Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(3), 179.
- López-Toledano, M. A., & Shelanski, M. L. (2004). Neurogenic effect of β -amyloid peptide in the development of neural stem cells. *Journal of Neuroscience*, 24(23), 5439-5444.
- López-Toledano, M. A., & Shelanski, M. L. (2007). Increased neurogenesis in young transgenic mice overexpressing human APP Sw, Ind. *Journal of Alzheimer's Disease*, 12(3), 229-240.
- Lueptow, L. M. (2017). Novel object recognition test for the investigation of learning and memory in mice. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (126), e55718.
- Lyckman, A. W., Confaloni, A. M., Thinakaran, G., Sisodia, S. S., & Moya, K. L. (1998). Post-translational processing and turnover kinetics of presynaptically targeted amyloid precursor superfamily proteins in the central nervous system. *Journal of Biological Chemistry*, 273(18), 11100-11106.
- Maccioni, R. B., & Cambiazo, V. (1995). Role of microtubule-associated proteins in the control of microtubule assembly. *Physiological reviews*, 75(4), 835-864.
- Mahley, R. W., Weisgraber, K. H., & Huang, Y. (2006). Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(15), 5644-5651.
- Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., & Sica, A. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in immunology*, 23(11), 549-555.

- Mattson, M. P., & Camandola, S. (2001). NF- κ B in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *The Journal of clinical investigation*, 107(3), 247-254.
- Mawuenyega, K. G., Sigurdson, W., Ovod, V., Munsell, L., Kasten, T., Morris, J. C. & Bateman, R. J. (2010). Decreased clearance of CNS β -amyloid in Alzheimer's disease. *Science*, 330(6012), 1774-1774.
- McEwen, B. S. (2001). Invited review: Estrogens effects on the brain: multiple sites and molecular mechanisms. *Journal of applied physiology*, 91(6), 2785-2801.
- Medeiros, R., & LaFerla, F. M. (2013). Astrocytes: conductors of the Alzheimer disease neuroinflammatory symphony. *Experimental neurology*, 239, 133-138.
- Mellström, B., Kastanauskaite, A., Knafo, S., Gonzalez, P., Dopazo, X. M., Ruiz-Nuño, A. & DeFelipe, J. (2016). Specific cytoarchitectural changes in hippocampal subareas in daDREAM mice. *Molecular brain*, 9(1), 1-12.
- Merz, K., Herold, S., & Lie, D. C. (2011). CREB in adult neurogenesis—master and partner in the development of adult-born neurons?. *European Journal of Neuroscience*, 33(6), 1078-1086.
- Meydan, S., Kus, I., Tas, U., Ogeturk, M., Sancakdar, E., Dabak, D. O., ... & Sarsilmaz, M. (2010). Effects of testosterone on orchietomy-induced oxidative damage in the rat hippocampus. *Journal of chemical neuroanatomy*, 40(4), 281-285.
- Mielke, M. M., Vemuri, P., & Rocca, W. A. (2014). Clinical epidemiology of Alzheimer's disease: assessing sex and gender differences. *Clinical epidemiology*, 6, 37.
- Miller, V., & Gomez-Nicola, D. (2014). How can we exploit the brain's ability to repair itself? 1345-1348.

- Mirochnic, S., Wolf, S., Staufenbiel, M., & Kempermann, G. (2009). Age effects on the regulation of adult hippocampal neurogenesis by physical activity and environmental enrichment in the APP23 mouse model of Alzheimer disease. *Hippocampus*, *19*(10), 1008-1018.
- Moon, M., Cha, M. Y., & Mook-Jung, I. (2014). Impaired hippocampal neurogenesis and its enhancement with ghrelin in 5XFAD mice. *Journal of Alzheimer's Disease*, *41*(1), 233-241.
- Monje, M. L., Toda, H., & Palmer, T. D. (2003). Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science*, *302*(5651), 1760-1765.
- Moreno-Jiménez, E. P., Flor-García, M., Terreros-Roncal, J., Rábano, A., Cafini, F., Pallas-Bazarra, N., & Llorens-Martín, M. (2019). Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer's disease. *Nature medicine*, *1*.
- Nature Editorials. (2019). Debate about birth of new neurons in adult brains extends to Alzheimer's disease. 08/04/2019, de *Nature* Sitio web: <https://www.nature.com/articles/d41586-019-00891-7>
- Oakley, H., Cole, S. L., Logan, S., Maus, E., Shao, P., Craft, J., ... & 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.
- Okonogi, T., Nakayama, R., Sasaki, T., & Ikegaya, Y. (2018). Characterization of peripheral activity states and cortical local field potentials of mice in an elevated plus maze test. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *12*, 62.

- Olabarria, M., Noristani, H. N., Verkhratsky, A., & Rodríguez, J. J. (2010). Concomitant astroglial atrophy and astrogliosis in a triple transgenic animal model of Alzheimer's disease. *Glia*, *58*(7), 831-838.
- Olabarria, M., Noristani, H. N., Verkhratsky, A., & Rodríguez, J. J. (2011). Age-dependent decrease in glutamine synthetase expression in the hippocampal astroglia of the triple transgenic Alzheimer's disease mouse model: mechanism for deficient glutamatergic transmission?. *Molecular neurodegeneration*, *6*(1), 1-9.
- Ortega-Martinez, S., Palla, N., Zhang, X., Lipman, E., & Sisodia, S. S. (2019). Deficits in Enrichment-Dependent neurogenesis and enhanced Anxiety behaviors mediated by expression of Alzheimer's disease-linked PS1 variants are rescued by Microglial Depletion. *Journal of Neuroscience*, *39*(34), 6766-6780.
- Parkhurst, C. N., Yang, G., Ninan, I., Savas, J. N., Yates III, J. R., Lafaille, J. J. & Gan, W. B. (2013). Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell*, *155*(7), 1596-1609.
- Pandey, D., Banerjee, S., Basu, M., & Mishra, N. (2016). Memory enhancement by Tamoxifen on amyloidosis mouse model. *Hormones and behavior*, *79*, 70-73.
- Perez-Dominguez, M., Ávila-Muñoz, E., Domínguez-Rivas, E., & Zepeda, A. (2019). The detrimental effects of lipopolysaccharide-induced neuroinflammation on adult hippocampal neurogenesis depend on the duration of the pro-inflammatory response. *Neural regeneration research*, *14*(5), 817.
- Perry, G., Nunomura, A., Hirai, K., Takeda, A., Aliev, G., & Smith, M. A. (2000). Oxidative damage in Alzheimer's disease: the metabolic dimension. *International Journal of Developmental Neuroscience*, *18*(4-5), 417-421.

- Perry, V. H., & Teeling, J. (2013). Microglia and macrophages of the central nervous system: the contribution of microglia priming and systemic inflammation to chronic neurodegeneration. *Seminars in immunopathology* (Vol. 35, No. 5, pp. 601-612). Springer Berlin Heidelberg.
- Qiao, F., Gao, X. P., Yuan, L., Cai, H. Y., & Qi, J. S. (2014). Apolipoprotein E4 impairs in vivo hippocampal long-term synaptic plasticity by reducing the phosphorylation of CaMKII α and CREB. *Journal of Alzheimer's disease*, 41(4), 1165-1176.
- Reitz, C., & Mayeux, R. (2014). Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochemical pharmacology*, 88(4), 640-651.
- Rotheneichner, P., Romanelli, P., Bieler, L., Pagitsch, S., Zaunmair, P., Kreutzer, C., & Couillard-Després, S. (2017). Tamoxifen activation of Cre-recombinase has no persisting effects on adult neurogenesis or learning and anxiety. *Frontiers in neuroscience*, 11, 27.
- Rodríguez, J. J., Jones, V. C., Tabuchi, M., Allan, S. M., Knight, E. M., LaFerla, F. M. & Verkhratsky, A. (2008). Impaired adult neurogenesis in the dentate gyrus of a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *PloS one*, 3(8), e2935.
- Sanchez-Molina, P., Almolda, B., Giménez-Llort, L., González, B., & Castellano, B. (2022). Chronic IL-10 overproduction disrupts microglia-neuron dialogue similar to aging, resulting in impaired hippocampal neurogenesis and spatial memory. *Brain, Behavior, and Immunity*, 101, 231-245.
- Scharfman, H., Goodman, J., Macleod, A., Phani, S., Antonelli, C., & Croll, S. (2005). Increased neurogenesis and the ectopic granule cells after intrahippocampal BDNF infusion in adult rats. *Experimental neurology*, 192(2), 348-356.

- Schmitt, K., Grimm, A., Kazmierczak, A., Strosznajder, J. B., Götz, J., & Eckert, A. (2012). Insights into mitochondrial dysfunction: Aging, amyloid- β , and tau-A deleterious trio. *Antioxidants & redox signaling*, *16*(12), 1456-1466.
- Schuessel, K., Leutner, S., Cairns, N. J., Müller, W. E., & Eckert, A. (2004). Impact of gender on upregulation of antioxidant defence mechanisms in Alzheimer's disease brain. *Journal of neural transmission*, *111*(9), 1167-1182.
- Sheedy, F. J., Grebe, A., Rayner, K. J., Kalantari, P., Ramkhelawon, B., Carpenter, S. B., & Moore, K. J. (2013). CD36 coordinates NLRP3 inflammasome activation by facilitating intracellular nucleation of soluble ligands into particulate ligands in sterile inflammation. *Nature immunology*, *14*(8), 812-820.
- Shi, J., Gao, W., & Shao, F. (2017). Pyroptosis: gasdermin-mediated programmed necrotic cell death. *Trends in biochemical sciences*, *42*(4), 245-254.
- Sofroniew, M. V. (2020). Astrocyte reactivity: subtypes, states, and functions in CNS innate immunity. *Trends in Immunology*, *41*(9), 758-770.
- Spreafico, F., Barski, J. J., Farina, C., & Meyer, M. (2001). Mouse DREAM/calsenilin/KChIP3: gene structure, coding potential, and expression. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *17*(1), 1-16.
- Stanford Behavioral and Functional Neuroscience Laboratory (SBFNL). (2020). Y maze spontaneous alternation test. 11/06/2020, de Stanford Medicine. Sitio web: <https://med.stanford.edu/sbfnl/services/bm/lm/ymaze.html#:~:text=Y%20Maz%20Spontaneous%20Alternation%20Test,one%20that%20was%20previousl%20visited>.
- Sun, B., Halabisky, B., Zhou, Y., Palop, J. J., Yu, G., Mucke, L., & Gan, L. (2009). Imbalance between GABAergic and glutamatergic transmission impairs adult

- neurogenesis in an animal model of Alzheimer's disease. *Cell stem cell*, 5(6), 624-633.
- Supnet, C., Grant, J., Westaway, D., & Mayne, M. (2006). Amyloid- β -(1-42) increases ryanodine receptor-3 expression and function in neurons of TgCRND8 mice. *Journal of Biological Chemistry*, 281(50), 38440-38447.
- Teter, B., & Ashford, J. W. (2002). Neuroplasticity in Alzheimer's disease. *Journal of neuroscience research*, 70(3), 402-437.
- The Jackson Laboratory. (2018). C57BL/6J, MOUSE STRAIN DATASHEET - 000664. 27/11/2018, de TjL Sitio web: <https://www.jax.org/strain/000664>
- Toda, T., Parylak, S. L., Linker, S. B., & Gage, F. H. (2019). The role of adult hippocampal neurogenesis in brain health and disease. *Molecular psychiatry*, 24(1), 67-87.
- Tong, B. C. K., Wu, A. J., Li, M., & Cheung, K. H. (2018). Calcium signaling in Alzheimer's disease & therapies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1865(11), 1745-1760.
- Tovar-y-Romo, L. B., Penagos-Puig, A., & Ramírez-Jarquín, J. O. (2016). Endogenous recovery after brain damage: molecular mechanisms that balance neuronal life/death fate. *Journal of neurochemistry*, 136(1), 13-27.
- Town, T., Tan, J., Flavell, R. A., & Mullan, M. (2005). T-cells in Alzheimer's disease. *Neuromolecular medicine*, 7(3), 255-264.
- Tyan, S. H., Shih, A. Y. J., Walsh, J. J., Maruyama, H., Sarsoza, F., Ku, L., & Dickstein, D. L. (2012). Amyloid precursor protein (APP) regulates synaptic structure and function. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 51(1-2), 43-52.

- Uddin, M. S., Haque, A., Mamun, A. A., Iqbal, M. A., Kabir, M. T., Rony, R. K., & Begum, M. M. (2016). Searching the linkage between high fat diet and Alzheimer's disease: a debatable proof stand for ketogenic diet to alleviate symptoms of Alzheimer's patient with APOE ϵ 4 allele. *J Neurol Neurophysiol*, 7(5), 1-9.
- Uddin, M. S., Kabir, M. T., Al Mamun, A., Abdel-Daim, M. M., Barreto, G. E., & Ashraf, G. M. (2019). APOE and Alzheimer's disease: evidence mounts that targeting APOE4 may combat Alzheimer's pathogenesis. *Molecular neurobiology*, 56(4), 2450-2465.
- Vadodaria, K., & Jessberger, S. (2013). Maturation and integration of adult born hippocampal neurons: signal convergence onto small Rho GTPases. *Frontiers in synaptic neuroscience*, 5, 4.
- Valero, J., Mastrella, G., Neiva, I., Sánchez, S., & Malva, J. O. (2014). Long-term effects of an acute and systemic administration of LPS on adult neurogenesis and spatial memory. *Frontiers in neuroscience*, 8, 83.
- Van de Veerdonk, F. L., Netea, M. G., Dinarello, C. A., & Joosten, L. A. (2011). Inflammasome activation and IL-1 β and IL-18 processing during infection. *Trends in immunology*, 32(3), 110-116.
- Verret, L., Jankowsky, J. L., Xu, G. M., Borchelt, D. R., & Rampon, C. (2007). Alzheimer's-type amyloidosis in transgenic mice impairs survival of newborn neurons derived from adult hippocampal neurogenesis. *Journal of Neuroscience*, 27(25), 6771-6780.
- Villeda, S. A., Plambeck, K. E., Middeldorp, J., Castellano, J. M., Mosher, K. I., Luo, J. & Wabl, R. (2014). Young blood reverses age-related impairments in cognitive function and synaptic plasticity in mice. *Nature medicine*, 20(6), 659.

- Vina, J., & Borras, C. (2010). Women live longer than men: understanding molecular mechanisms offers opportunities to intervene by using estrogenic compounds. *Antioxidants & redox signaling*, 13(3), 269-278.
- 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.
- Wagner, J. P., Black, I. B., & DiCicco-Bloom, E. (1999). Stimulation of neonatal and adult brain neurogenesis by subcutaneous injection of basic fibroblast growth factor. *Journal of Neuroscience*, 19(14), 6006-6016.
- Wang, R., Dineley, K. T., Sweatt, J. D., & Zheng, H. (2004). Presenilin 1 familial Alzheimer's disease mutation leads to defective associative learning and impaired adult neurogenesis. *Neuroscience*, 126(2), 305-312.
- Wen, P. H., Hof, P. R., Chen, X., Gluck, K., Austin, G., Younkin, S. G. & Elder, G. A. (2004). The presenilin-1 familial Alzheimer disease mutant P117L impairs neurogenesis in the hippocampus of adult mice. *Experimental neurology*, 188(2), 224-237.
- WHO. (2017). Dementia. 24/10/2018, de Word Health Organization Sitio web: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
- Wu, L. J., Mellström, B., Wang, H., Ren, M., Domingo, S., Kim, S. S. & Zhuo, M. (2010). DREAM (downstream regulatory element antagonist modulator) contributes to synaptic depression and contextual fear memory. *Molecular brain*, 3(1), 1-13.
- Wu, Q., Kong, W., & Wang, S. (2021). Peripheral blood biomarkers cxcl12 and tnfrsf13c associate with cerebrospinal fluid biomarkers and infiltrating immune cells in alzheimer disease. *Journal of Molecular Neuroscience*, 71(7), 1485-1494.

- Wyss-Coray, T., & Rogers, J. (2012). Inflammation in Alzheimer disease a brief review of the basic science and clinical literature. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(1), a006346.
- Xia, W., Zhang, J., Kholodenko, D., Citron, M., Podlisny, M. B., Teplow, D. B., & Selkoe, D. J. (1997). Enhanced production and oligomerization of the 42-residue amyloid β -protein by Chinese hamster ovary cells stably expressing mutant presenilins. *Journal of Biological Chemistry*, 272(12), 7977-7982.
- Yanguas, J. (2012). El caso Utermohlen. 2022, de El País Sitio web: https://elpais.com/sociedad/2012/09/19/actualidad/1348071805_613092.html
- Yao, J., Hamilton, R. T., Cadenas, E., & Brinton, R. D. (2010). Decline in mitochondrial bioenergetics and shift to ketogenic profile in brain during reproductive senescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1800(10), 1121-1126.
- Yin, F., Yao, J., Sancheti, H., Feng, T., Melcangi, R. C., Morgan, T. E. & Brinton, R. D. (2015). The perimenopausal aging transition in the female rat brain: decline in bioenergetic systems and synaptic plasticity. *Neurobiology of aging*, 36(7), 2282-2295.
- Young-Pearse, T. L., Bai, J., Chang, R., Zheng, J. B., LoTurco, J. J., & Selkoe, D. J. (2007). A critical function for β -amyloid precursor protein in neuronal migration revealed by in utero RNA interference. *Journal of Neuroscience*, 27(52), 14459-14469.
- Yu, H. B., & Finlay, B. B. (2008). The caspase-1 inflammasome: a pilot of innate immune responses. *Cell host & microbe*, 4(3), 198-208.

- Zaletel, I., Schwirtlich, M., Perović, M., Jovanović, M., Stevanović, M., Kanazir, S., & Puškaš, N. (2018). Early impairments of hippocampal neurogenesis in 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease are associated with altered expression of SOXB transcription factors. *Journal of Alzheimer's Disease*, 65(3), 963-976.
- Zeng, Q., Zheng, M., Zhang, T., & He, G. (2016). Hippocampal neurogenesis in the APP/PS1/nestin-GFP triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 314, 64-74.
- Zhang, C., McNeil, E., Dressler, L., & Siman, R. (2007). Long-lasting impairment in hippocampal neurogenesis associated with amyloid deposition in a knock-in mouse model of familial Alzheimer's disease. *Experimental neurology*, 204(1), 77-87.
- Zhao, J., Bi, W., Xiao, S., Lan, X., Cheng, X., Zhang, J., & Zhu, L. (2019). Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment in mice. *Scientific reports*, 9(1), 1-12.

APÉNDICE/PROTOCOLOS

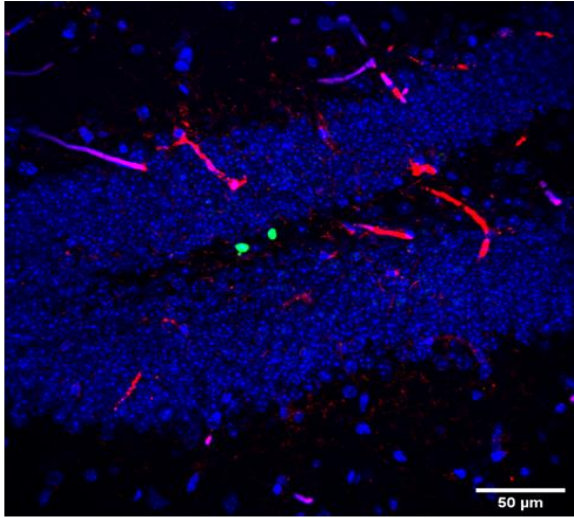
Imunohistoquímica para el análisis de neurogénesis hipocampal adulta (estandarización).

Uno de los objetivos iniciales en este proyecto era el análisis de la NHA de los grupos experimentales. Dentro de cada uno de los protocolos se realizó la administración de BrdU como marcador de células proliferativas para

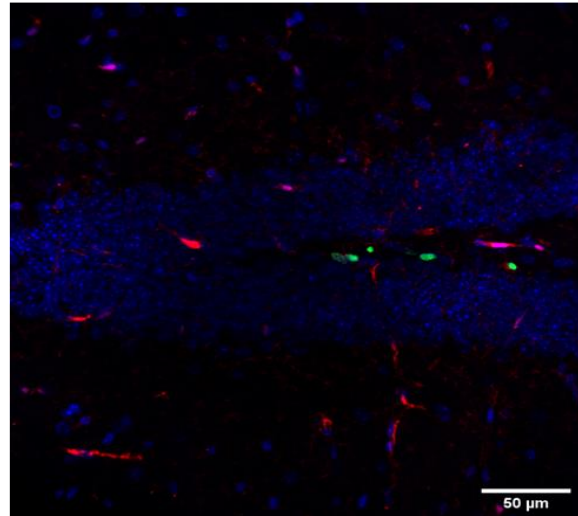
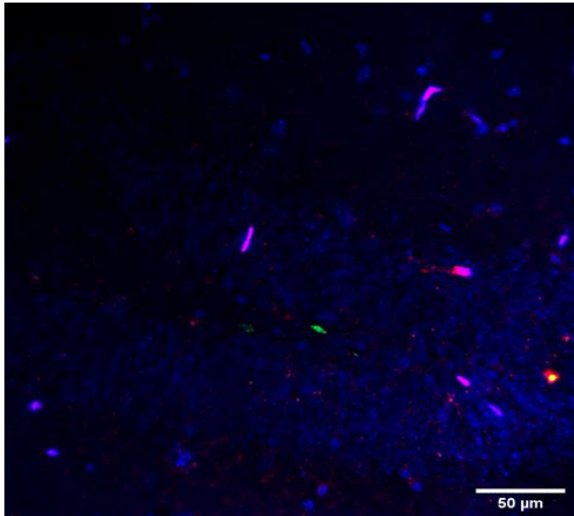
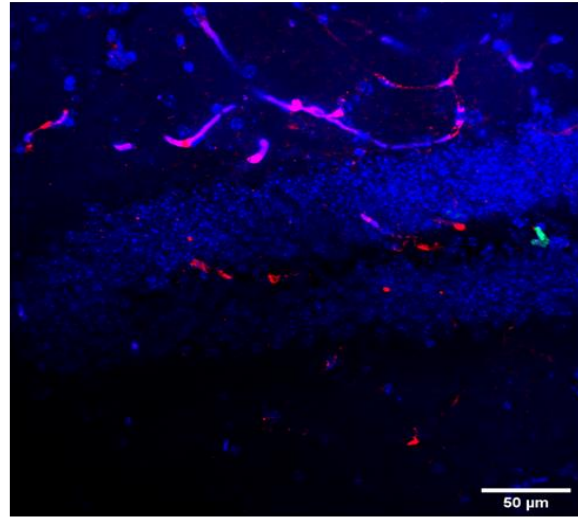
posteriormente fijar el tejido por el método de perfusión intracardiaca. Posteriormente se realizaron cortes para la estandarización de la inmunohistoquímica. Lamentablemente no fue posible realizar las pruebas por las dificultades que trajo la pandemia, por lo que el tejido está almacenado y listo para su análisis.

Lo que se busca con la inmunohistoquímica era marcar células proliferativas con BrdU en combinación con doblecortina (DCX) que es un marcador temprano de precursores neurales siguiendo el protocolo previamente descrito (Perez-Dominguez, *et al.*, 2019).

NIB



AZ



Estandarización de inmunohistoquímica en cortes de cerebro perfundido de ratones administrados con BrdU. Microscopía confocal de cortes coronales del giro dentado del hipocampo (bregma 0.82-4.24mm) de ratones WT administrados con BrdU. Como control positivo se usaron muestras obtenidas en el laboratorio de la Dra. Angélica Zepeda, autores del artículo Perez-Dominguez, *et al.*, (2019) Marcadores: DAPI (azul), BrdU (verde), DCX (rojo). Nomenclatura; AZ: son muestras provenientes del laboratorio C-211 a cargo de la Dra. Angélica Zepeda en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM; NIB: Es el laboratorio/consorcio de Neuroinmunobiología del Instituto de Biotecnología de la UNAM a cargo de la Dra. Leonor Pérez Martínez y del Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva donde se realizó la mayor parte de este trabajo.

Extracción de ADN

1. Agregar 500 µl de SDS al 4% y 6µl de Proteinasa K (10 mg/ml) a cada muestra e incubar toda la noche a 56°C
2. Al día siguiente, colocar las muestras en hielo durante 5 minutos.
3. Posteriormente, agregar 200 µl de NaCl 5M, mezclando por inversión. Mantener las muestras en hielo por 15 minutos.
4. Centrifugar a T. A durante 30 minutos a 14000 rpm, separando el sobrenadante en tubos limpios.
5. Agregar 5 µl de RNAasa (20 mg/ml) e incubar a 37°C durante 30 minutos.
6. Después de la incubación, llenar el tubo con etanol absoluto y mezclar invirtiendo los tubos.
7. Centrifugar a T. A. por 30 minutos a 14000rpm. Descartar el sobrenadante.
8. Adicionar a cada tubo 250 µl de etanol al 70% y centrifugar 2 minutos a 14500 rpm. Descartar el sobrenadante.
9. Dejar los tubos a T. A para evaporar el exceso de etanol.
10. Re suspender en 100-200µl de buffer TE o agua.
 - Cuantificar cada una de las muestras en NanoDrop

Genotipificación de organismos para obtención de modelos de estudio

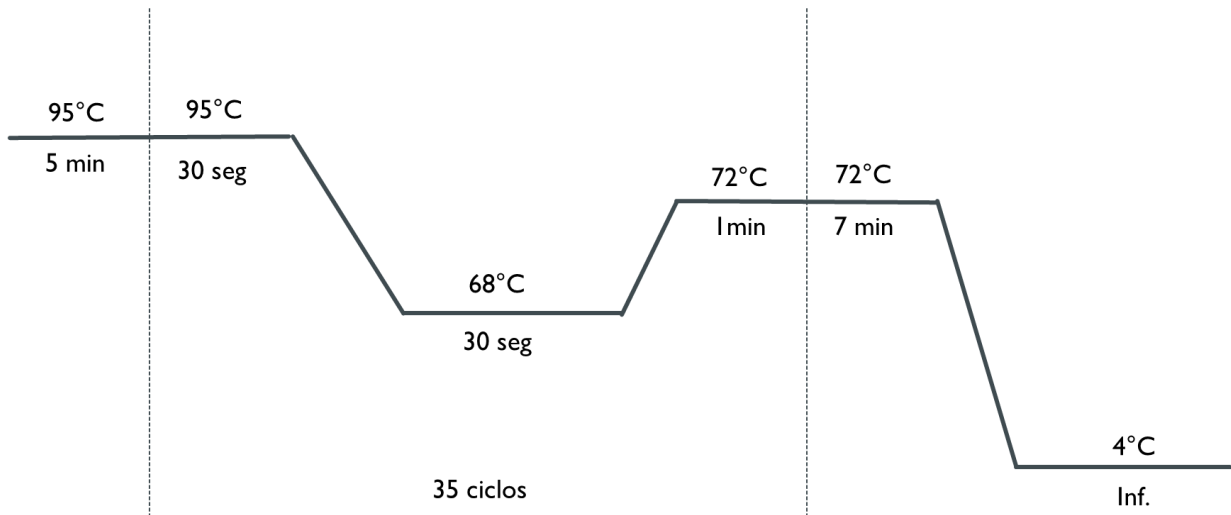
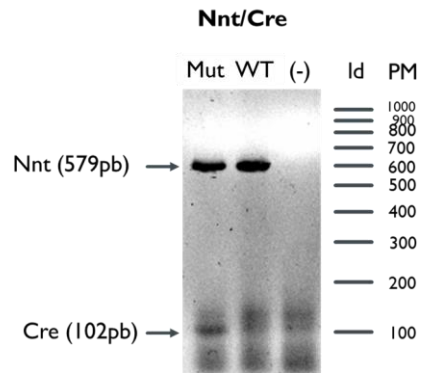
Nnt/Cre

Secuencia de oligos (5´-> 3´):

Nnt Wt (Forward): GGG CAT AGG AAG CAA ATA CCA AGT TG
Nnt COM (Reverse): GTA GGG CCA ACT GTT TCT GCA TGA
Cre (Forward): GCG GTC TGG CAG TAA AAA CTA TC
Cre (Reverse): GTG GCT TCT GAG GAC CG

Programa de reacción

Solución	Cantidad (µl)
H ₂ O	14
Buffer	2
MgCl ₂	1
dNTP's	1
Oligo Nnt F	0.6
Oligo Nnt R	0.6
Oligo Cre F	0.15
Oligo Cre R	0.15
Taq pol	0.5
Total	20
DNA (ng)	100



R26r-eYFP y WT

Secuencia de oligos (5' -> 3'):

Rosa WT (Forward): CTG GCT TCT GAG GAC CG

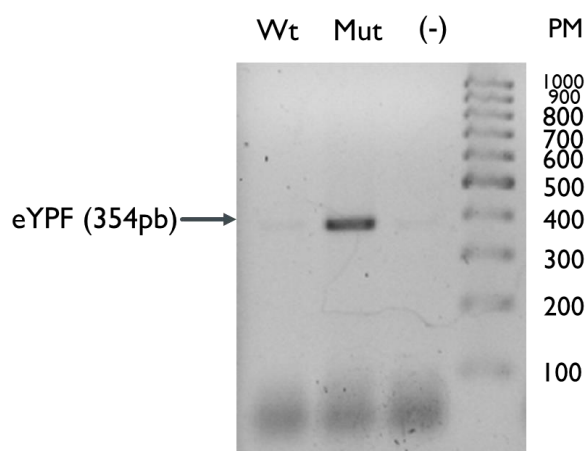
Rosa WT (Reverse): CAG GAC AAC GCC CAC ACA

Rosa eYFP (Forward): AGG GCG AGG AGC TGT TCA

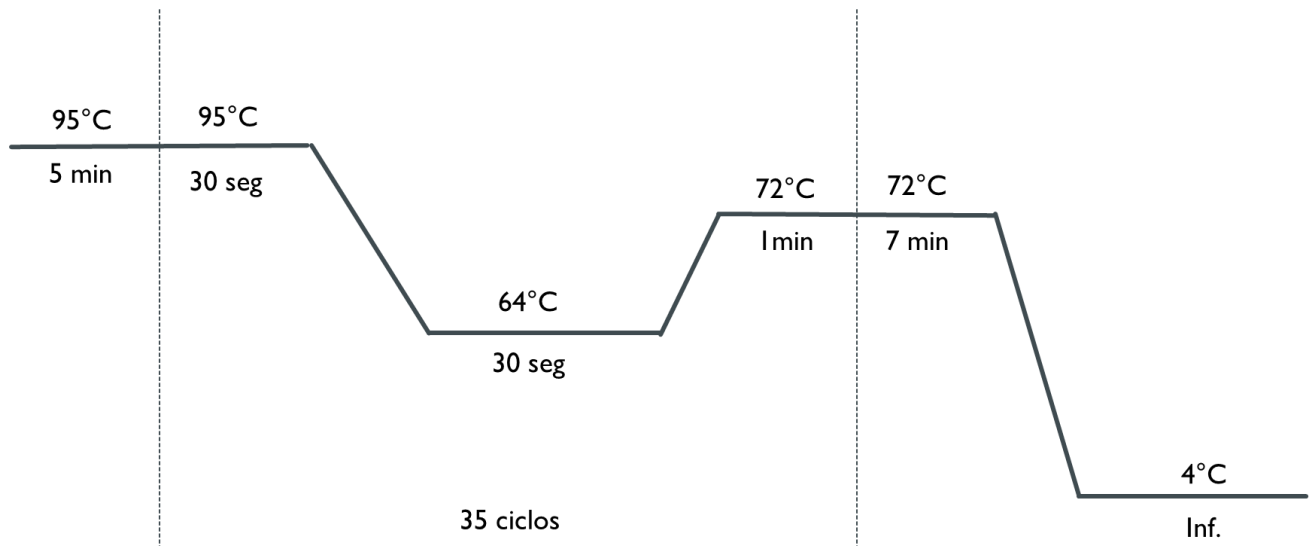
Rosa eYFP (Reverse): TGA AGT CGA TGC CCT TCA G

Preparación de la reacción

Solución	Cantidad (µl)
H ₂ O	12.7
Buffer	2
MgCl ₂	1
dNTP's	1
Oligo R26r WT F	0.4
Oligo R26r WT R	0.4
Oligo R26r eYFP F	1
Oligo R26r eYFP R	1
Taq pol	0.5
Total	20
DNA (ng)	100



Programa de reacción



5XFAD

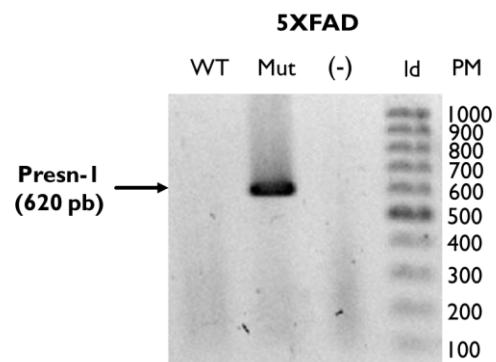
Secuencia de oligos (5' → 3'):

Psen-1 (Forward): AAT AGA GAA CGG CAG GAG CA

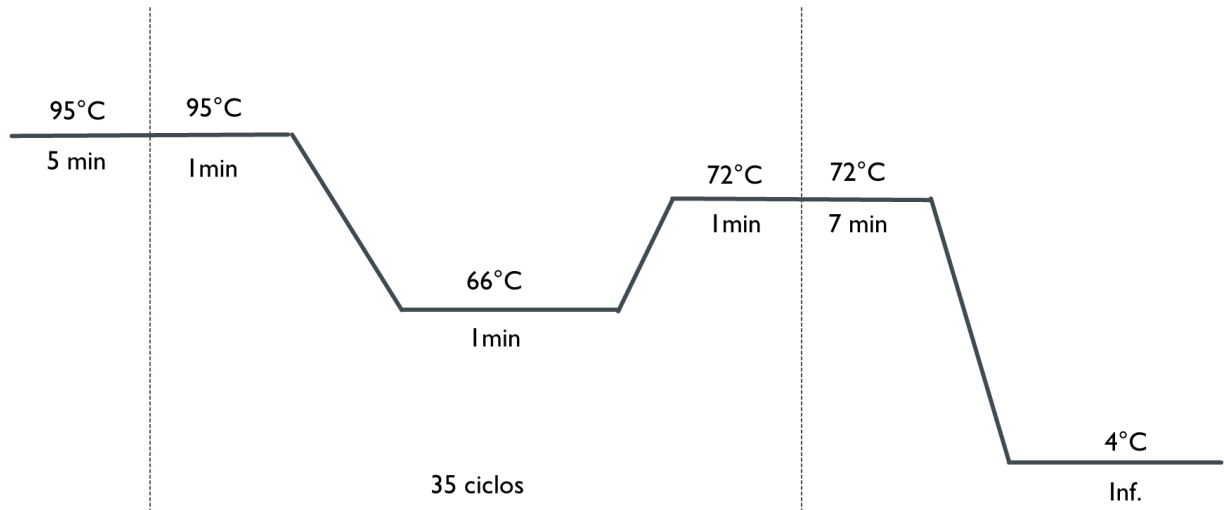
Psen-1 (Reverse): GCC ATG AGG GCA CTA ATC AT

Preparación de reacción

Solución	Cantidad (µl)
H ₂ O	15.3
Buffer	2
MgCl ₂	1
dNTP's	0.5
Oligo Pres-1 F	0.5
Oligo Pres-1 R	0.5
Taq pol	0.2
Total	20
DNA (ng)	100



Programa de reacción



KChIP3 KO (Neo)

A continuación, se muestran las especificaciones protocolarias para la identificación de la secuencia asociada a la expresión de KChIP3. No es posible acoplar en un mismo protocolo la identificación del KO debido a las características necesarias para cada una de las reacciones.

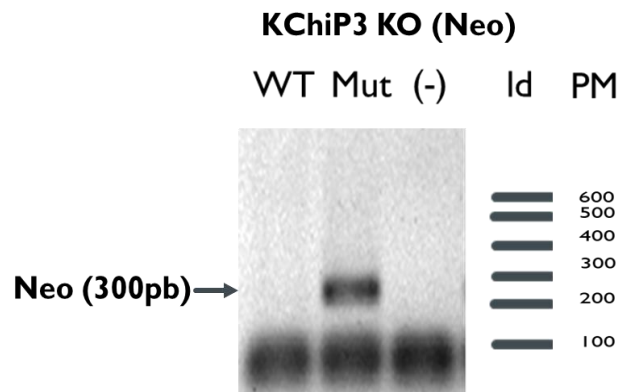
Secuencia de oligos (5' -> 3'):

KChIP3 WT (Forward): CTG GGA CAT ATT TGG AAC AAG C

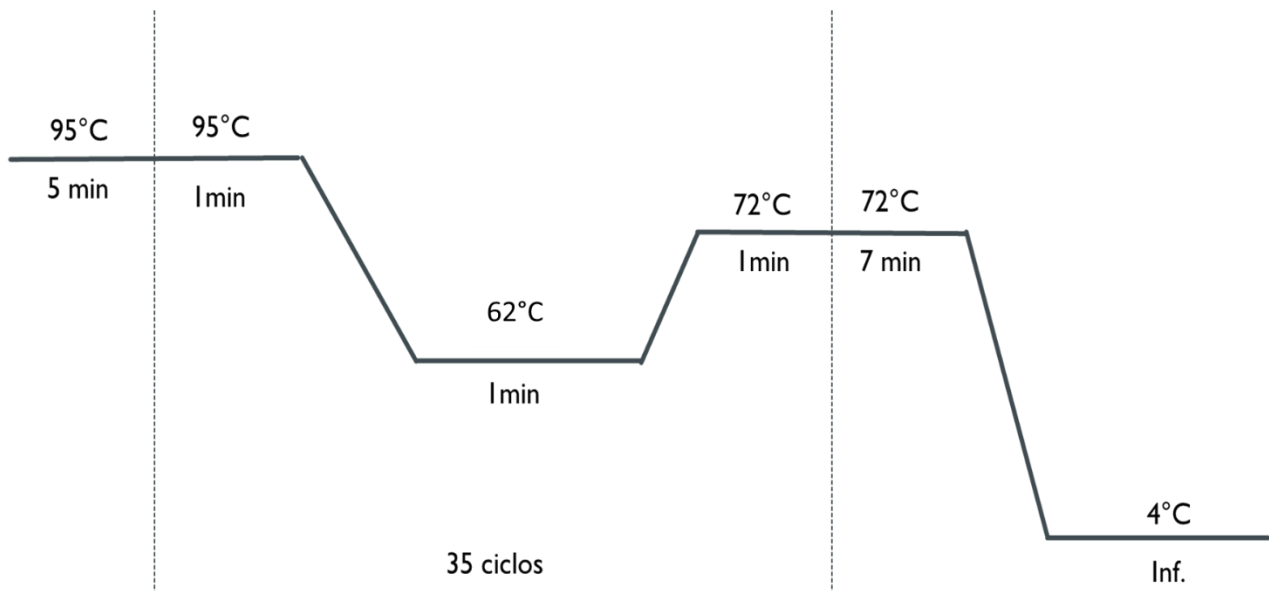
Casete de neomicina (Forward): CTG CAG CGC ATC GCC TTC TAT C

Preparación de reacción

Solución	Cantidad (μl)
H ₂ O	15.3
Buffer	2
MgCl ₂	1
dNTP's	0.5
Oligo Neo F	0.5
Oligo KChIP3 R	0.5
Taq pol	0.2
Total	20
DNA (ng)	100



Programa de reacción



KChIP3 WT

A continuación, se muestran las especificaciones protocolarias para la identificación de la secuencia asociada al caset de neomicina, insertado en el gen endógeno de KChIP3 para producir el KO.

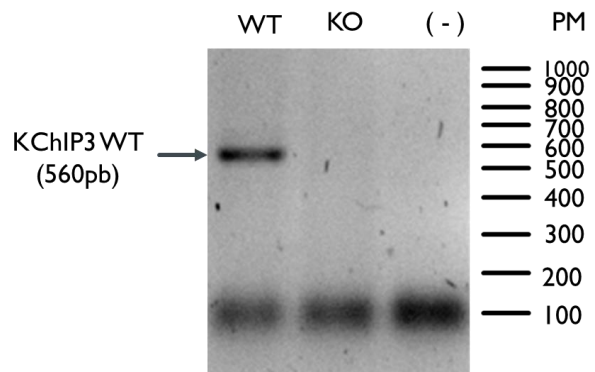
Secuencia de oligos (5' → 3'):

KChIP3 WT (Forward): CTG GGA CAT ATT TGG AAC AAG C

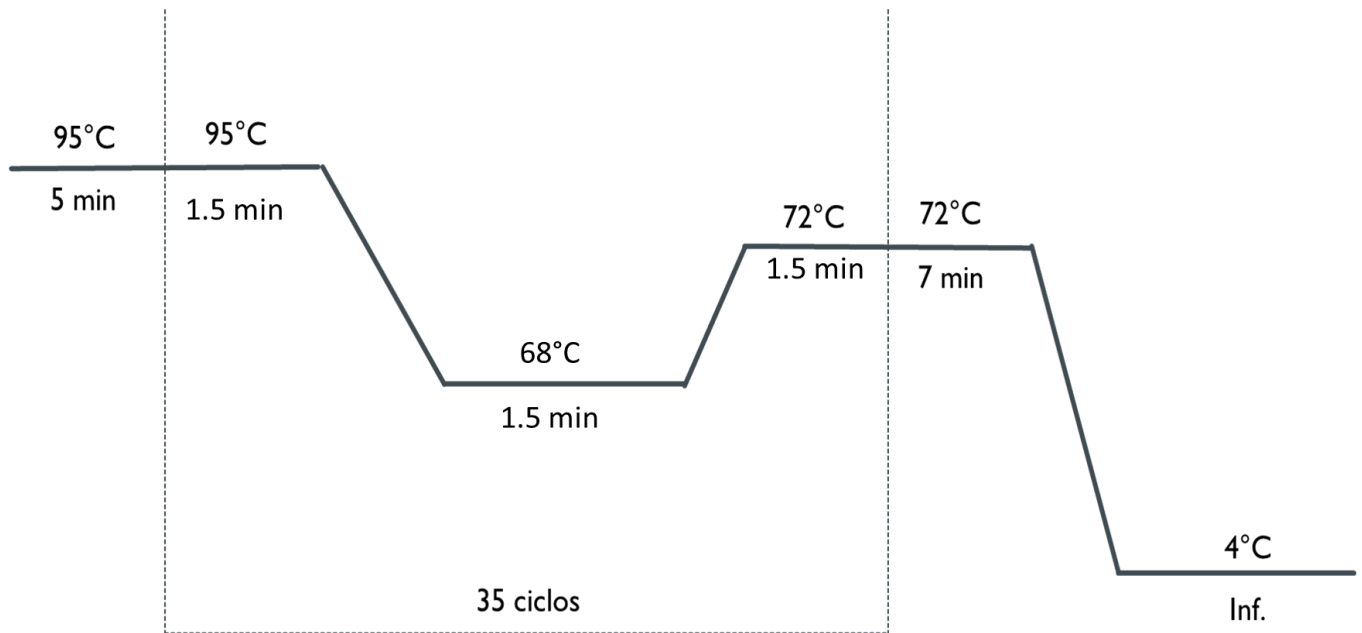
KChIP3 WT (Reverse): CTG CAT ACG CCC TAA GGA ATA GAG C

Preparación de reacción

Solución	Cantidad (μl)
H ₂ O	14.4
Buffer	2
MgCl ₂	1
dNTP's	0.5
Oligo KChIP3 F	1
Oligo KChIP3 R	1
Taq pol	0.4
Total	20.3
DNA (ng)	150



Programa de reacción



Cuidado de ratones en bioterio

Los ratones se mantuvieron dentro de una sala de bioseguridad nivel 2 del bioterio del Instituto de Biotecnología de la UNAM bajo mi cuidado y la supervisión del personal del bioterio siguiendo la normativa bioética promovida por el comité de bioética del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

El hábitat cuenta de una caja con un mínimo de 100cm² de espacio por ratón, en cama de aserrín cambiada 1 o dos veces por semana dependiendo el número de ratones por caja, alimentación *ad libitum* y recirculación de aire manteniendo una temperatura y humedad constantes.

Los ratones fueron sacrificados por métodos éticos aprobados por el comité de bioética del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Perfusión intracardiaca y fijación de tejido

PREPARACIÓN DE PARAFORMALDEHIDO.

Para 1 l.

- Pesar 40 g de paraformaldehído en polvo (Almacenado a 4C°) y poner en vaso de precipitado o matraz.
- Agregar PBS (agregar poco menos de 1 l para luego aferrar).
- Calentar con agitación hasta llegar a 60 °C (hacer esto en campana de extracción).
- Agregar gotas de NaOH 1M hasta que quede transparente.
- Enfriar y ajustar pH a 7.2 con HCl 1M.
- Aforar a 1l con PBS.
- Filtrar con papel filtro y embudo.
- Vaciar en botellas protegidas de la luz y guardar a 4C° si va a usarse a la brevedad o a -20C° para almacenar varios días.

Procedimiento:

- Medir el flujo de la bomba y ajustar a 3.5 ml/min.
- Llenar manguera de solución salina.
- Anestesiarse al ratón con ketamina/xilacina intraperitoneal.
- Una vez que se verifique que el ratón no siente dolor, realizar un corte en la piel a la altura del esternón, separar la piel y cortar las costillas para dejar expuesto el corazón (tener cuidado para no dañar hígado).
- Tomar el corazón con unas pinzas (se recomienda tomarlo por la parte de las aurículas, ya que es más resistente ahí) y hacer un corte en aurícula derecha con unas tijeras para dejar fluir la sangre y los líquidos a perfundir.
- Con la bomba peristáltica encendida, pinchar de forma perpendicular el ventrículo izquierdo con la aguja conectada a bomba.
- Perfundir 15 minutos con solución salina. Al finalizar estos 15 min, el ratón debe tener un aspecto pálido.
- Parar la bomba y pasar la manguera a vaso con formaldehido.
- Perfundir 15 minutos con paraformaldehído recién preparado (que sea la primera vez que se descongele). Al finalizar los 15 min. el ratón debe estar muy rígido.
- Parar la bomba y quitar aguja del corazón del ratón.
- Poner bomba peristáltica en reversa para vaciar la manguera del paraformaldehído. Volver a cambiar manguera a solución salina y llenar nuevamente la manguera.
- Colectar los órganos requeridos y colocarlos en tubos Falcon de 50 ml con paraformaldehído (suficiente para que cubra el órgano).
- Guardar órganos a 4 °C.
- Dejar los órganos por dos días en paraformaldehído y cambiarlos posteriormente a sacarosa 30% (en PBS y con 0.01% de azida de sodio). Almacenar a 4C°.

Extracción de proteínas, cuantificación y WB

Extractos proteicos

- 1.- Descongelar tejido
- 2.- Agregar de 200-600ml de buffer de lisis (TLB o RIPA), suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas (Aproptihina 10 μ h/ml, prestatina 10 μ g/ml, leupeptina μ g/ml, antripirina μ g/ml, Na₃VO₄ 200mM, PTT 0.1mM, PMSF 1mM). Comenzar a contar 10min antes de sonicar.
- 3.- Sonicar el tejido con un homogeneizador de aguja de entre 5-10seg.
- 4.- Incubar en hielo entre sonicadas.
- 5.- Centrifugar 14 500rpm a 4°C por 10min y recuperar sobrenadante.
- 6.- Almacenar a -70°C hasta usarse.

Soluciones utilizadas:

TLB (Triton Lysis Buffer)

25 mM HEPES

100 mM NaCl

1 mM EDTA

10% (v/v) glycerol

1% (v/v) Triton X-100

Almacenar a -70°C hasta usarse.

RIPA 50ml (Radio-Immunoprecipitation Assay)

NaCl 150mM

Desoxicolato de sodio 0.5%

SDS 0.1%

Tris 50mM

Igepal® CA-630 1%

Ajustar pH 8

Almacenar a -70°C hasta usarse.

TLB o RIPA suplementado (1ml)

10ul PMSF (100mM) → 1mM

2ul leupeptina (5µg/ml)

2ul pestanina (5µg/ml)

2ul ant. paina (5µg/ml)

2ul antiprotinina (5µg/ml)

- Nota: En caso de contar con **Complete** solo agregar 20ul.

10ul Na₃VO₄ (100mM) → 1mM

1ul DTT (0.5M) → 0.5mM

5ul DTT (0.1M) → 0.5mM

PMSF (100mM)

Para preparar una solución 100 mM, agregar 17.4 mg de PMSF por mililitro de isopropanol.

Alicuotar en 200ul. Almacenar a -20°C.

Sodium orthovanadate (100mM)

- Sodium orthovanadate

- H₂O destilada

* Agregar 1.839 g de Sodium orthovanadate a 8ml de agua destilada. Ajustar pH a 10. Alicuotar en 200ul. Almacenar a -20°C.

Dithiothreitol (DTT, 1M)

Agregar 1.542 g dithiothreitol a 10ml a agua destilada.

Alicuotar en 200ul. Almacenar a -20°C.

Tris 1M pH7.4

Tris 121.14 g

H₂O 1 l

Ajustar pH

EDTA 0.5 pH 7.4

EDTA 376 g
H₂O 1 l
Ajustar pH

Buffer de muestra

	1x	2x	6x
4x Tris/SDS pH 6.8	3.125 ml	6.25 ml	7 ml
Glicerol	2.5 ml	5 ml	3ml
SDS	6.5 ml	1 g	1 g
2-ME ó DTT	0.5 ml ó 0.388g	0.5 ml ó 0.775g	0.93 g DTT
Azul de bromofenol	≥10 mg	≥10 mg	≥10 mg
H ₂ O	a 25 ml	a 25 ml	a 10 ml

*4x Tris/SDS pH 6.8

Para 40 ml H₂O agregar 6.05 g Tris base, 0.4 g SDS y ajustar pH 6.8 con HCl. Agregar H₂O a 100 ml reajustar pH, filtrar con filtro 6.45µm y almacenar a 4°C.

Soluciones para “striping” o “desnudante” de membrana

a) Solución desnudante (p/500 ml) 2 lavados (20 min) 15 ml solución.

- 200 mM Glicina (7.5 g).
- 500 mM NaCl (14.61 g).
- Se ajusta el pH 2.5 y se mantiene a 4°C.

b) TBS-T (alta sol) (p/500 ml) 2 lavados (15 min) 15 ml solución.

- NaCl (13.5 g).
- Se almacena a TA.

c) TBS-T. 1 lavado (10 min) 15 ml solución.

Acrilamida 30% en 100ml H₂O.

30 Acrilamida.

0.8 Bis-Acrilamida.

Diluir con 80 ml después aforar a 100.

Soluciones para WB

4x Lower gel Buffer.

Tris-base 18.17 g

SDS 0.4 g

Ajustar pH 8.8 y aforar a 100 ml.

4x Upper gel Buffer.

Tris-base 6.06 g

SDS 0.4 g

Ajustar pH 6.8 y aforar a 100 ml

Running buffer 900 ml.

Tris base 5.46 g

Glicina 25.68 g

SDS 1.8 g

Solución para transferir en cámara húmeda 1 l.

Tris base 3.03 g

Glicina 14.43 g

SDS 0.1 g

Metanol o Alcohol 200 ml

Cuantificación de proteínas por el método de BSA

- Para preparar la reacción de BCA se multiplica el número duplicado de muestras totales por 200 µl más los controles, muestras para realizar la curva estándar y los controles (volumen de BCA en el que se cuantifica la muestra).
- La solución de BCA se prepara a partir de los reactivos Solución A y Solución B en una relación 1:50 respectivamente.

Para los extractos de tejido cerebral fresco:

Hipocampo: Las muestras de hipocampo se diluyen en la mezcla de BCA en una relación 1:75 respectivamente

Corteza y resto de cerebro: Las muestras de corteza y resto de cerebro se diluyen en la mezcla de BCA en una relación 1:150 respectivamente

- Se ordenan las mezclas con su respectiva muestra en una placa de 96 pozos
- Se incuba durante 2h a 37°C
- Se realiza la lectura y se verifica matemáticamente la concentración proteica en relación con las muestras de concentración conocida de la curva estándar.

Realización de WB

Preparación del gel de acrilamida

- Limpiar cristales cuidadosamente con etanol.
- Acomodar el cassette en el porta-cassete de manera que no existan fugas de líquido.
- Preparar la solución “lower” de acrilamida y agregar los catalizadores (APS y TEMED) y pipetearlo rápidamente en la placa hasta la línea de referencia.
- Para evitar la acumulación de burbujas en la parte superior se agrega etanol hasta el borde de los cristales.
- Esperar el tiempo necesario hasta la polimerización del gel.
- Vaciar el etanol que se encuentra en la superficie.
- Preparación de la solución “upper” agregando los catalizadores y poniéndolo rápidamente en la placa hasta la línea de referencia, inmediatamente poner el peine separador para formar los carriles.
- Esperar el tiempo necesario hasta la polimerización del gel.

Guía para la preparación del “Lower buffer” a diferentes concentraciones:

SEPARADOR	10%	12%	15%	17%
Acrilamida	3.3 ml	4 ml	5ml	5.67ml
Tris-SDS pH 8.8	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
Agua	4.17 ml	3.5 ml	2.5 ml	1.83 ml
APS 20%	50 ul	50 ul	50 ul	50 ul
TEMED	16 ul	16 ul	16 ul	16 ul
CONCENTRADOR	10%	12%	15%	17%

Guía para la preparación del “upper buffer”

CONCENTRADOR	
Acrilamida	0.75 ml
Tris-SDS pH 6.8	1.25 ml
Agua	3ml
APS 20%	25ul
TEMED	16ul

Concentración usada para cada anticuerpo:

Anticuerpo primario	Concentración (primario)	Anticuerpo secundario	Concentración (secundario)
α -BDNF	1:1000	α -conejo	1:2500
α -c-Fos	1:500	α -conejo	1:2500
α -C-Jun	1:500	α -conejo	1:2500
α -GFAP	1:10000	α -ratón	1:15000
α -Actina	1:10000	α -ratón	1:15000

Revelado de membrana

- Secar cuidadosamente la membrana y marcar la zona del marcador de peso molecular con el plumón especial de Licore.
- Colocar una mezcla 1:1 de luminol y agente oxidante sobre la membrana durante un minuto.
- Colocar inmediatamente la membrana en el equipo Licore e iniciar la revelación el programa.
- Analizar los datos obtenidos dentro del mismo programa de Licore.