



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Química

**Evaluación del efecto de la administración intranasal de
dexametasona sobre la reactividad astrocítica en un
modelo murino de angiopatía amiloide cerebral y
enfermedad de Alzheimer**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A

Josué Hernández Castillo

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Gohar Gevorgyan

Ciudad Universitaria, CDMX, 2023





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: LOPEZ MACIAS CONSTANTINO III ROBERTO

VOCAL: Profesor: GEVORGYAN GOHAR

SECRETARIO: Profesor: CASTRO ESCAMILLA OCTAVIO

1er. SUPLENTE: Profesor: ESPINOSA ARCINIEGA HECTOR ENRIQUE

2° SUPLENTE: Profesor: HERAS CHAVARRIA MONICA BERENICE

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Instituto de Investigaciones Biomédicas

ASESOR DEL TEMA:

DRA. GOHAR GEVORGYAN

SUSTENTANTE:

JOSUÉ HERNÁNDEZ CASTILLO



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 está 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.

Agradecimientos

Este trabajo se realizó en el laboratorio de la Dra. Gohar Gevorgyan, en el departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, y recibió apoyo financiero por el Programa de Apoyos a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-DGAPA-UNAM) IN203322.

Índice

Índice de Tablas y Figuras	1
Abreviaturas	2
Resumen	4
1. Introducción	5
1.1 Enfermedad de Alzheimer	5
1.1.1 Angiopatía amiloide cerebral	7
1.1.2 Péptido β Amiloide	7
1.1.3 Modelo Tg-SwDI de AAC y EA	8
1.2 Neuroinflamación	9
1.3 Astrocitos	10
1.3.1 Reactividad astrocítica	12
1.3.2 Proteína ácida fibrilar glial	13
1.4 Glucocorticoides	13
1.4.1 Mecanismo de acción	15
1.4.2 Vía intranasal	18
1.4.3 Dexametasona	20
3. Hipótesis	21
4. Objetivos	21

Facultad de Química

4.1 General	21
4.2 Particulares	21
5. Materiales y métodos	22
Ratones	22
Habitación de los ratones para la administración intranasal	22
Protocolo de administración	23
Sacrificio, obtención y tratamiento de tejidos	23
Ensayos de inmunofluorescencia en cortes de cerebro de ratones Tg-SwDI	24
6. Resultados	27
7. Discusión	31
8. Conclusiones	34
9. Referencias	35

Índice de Tablas y Figuras

Figura 1. Efectos propuestos de los astrocitos A1/A2 sobre las neuronas, microglía, oligodendrocitos y vasos cerebrovasculares, así como mediadores moleculares y mecanismos involucrados en la formación de los astrocitos reactivos A1/A2.....	11
Figura 2. Cascada inflamatoria asociada con daño tisular e inflamación aguda y su relación con neutrófilos, monocitos, ANXA1 y terminaciones nerviosas.....	16
Figura 3. Diagrama resumen de los mediadores inflamatorios derivados de los fosfolípidos.....	17
Figura 4. Transporte intranasal de fármacos a través de la ruta olfativa al SNC por vías intracelulares y extracelulares.....	19
Figura 5. Esquematización del protocolo de administración, sacrificio, obtención y tratamiento de los tejidos.....	24
Figura 6. Esquematización de los ensayos de inmunofluorescencia en cortes de cerebro de ratones Tg-SwDI.....	26
Figura 7. Imágenes representativas del hipocampo de ratones Tg-SwDI.....	27
Figura 8. Imágenes representativas del tálamo de ratones Tg-SwDI.....	28
Figura 9. Imágenes representativas y estimación de inmunofluorescencia.....	30

Abreviaturas

- (A β) Péptido β amiloide
- (ADN) Ácido desoxirribonucleico
- (APP) Proteína precursora amiloidea
- (APOE) Apolipoproteína E
- (ANXA1) Anexina 1
- (ARNMDA) Antagonistas de receptores de N-metil-D-aspartato
- (BHE) Barrera hematoencefálica
- (COX2) Ciclooxygenasa 2
- (D) Ácido aspártico
- (E) Ácido glutámico
- (EA) Enfermedad de Alzheimer
- (EAE) Enfermedad de Alzheimer esporádica
- (EAF) Enfermedad de Alzheimer familiar
- (GC) Glucocorticoide
- (GR) Receptor de glucocorticoides
- (GCS) Glucocorticoide sintético
- (GRE) Elementos de respuesta a glucocorticoides
- (GFAP) Proteína ácida fibrilar glial
- (Hsp90) Proteína de choque térmico de 90 KDa
- (IL-1) Interleucina 1
- (IL-1 α) Interleucina 1 alfa
- (IL-1 β) Interleucina 1 beta

- (IL-6) Interleucina 6
- (IL-10) Interleucina 10
- (I κ B) Proteína inhibidora de NF- κ B
- (IAChE) Inhibidores de acetilcolinesterasa
- (IntDen) Densidad integrada
- (K) Lisina
- (L) Leucina
- (M) Metionina
- (N) Asparagina
- (NF- κ B) Factor nuclear de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
- (PBS) Solución amortiguadora de fosfatos
- (PGE₂) Prostaglandina E₂
- (PICALM) Proteína de ensamblaje de clatrina de unión a fosfatidilinositol
- (PSEN1) Presenilina 1
- (PSEN2) Presenilina 2
- (Q) glutamina
- (SNC) Sistema Nervioso Central
- (τ) Proteína tau
- (TNF- α) Factor de necrosis tumoral alfa
- (TREM2) Receptor desencadenante expresado en las células mieloides 2

Resumen

La enfermedad de Alzheimer es la forma más común de desorden neurodegenerativo asociado con la edad. Se caracteriza por la presencia de placas neuríticas, cuyo constituyente primario es la proteína β amiloide, y ovillos neurofibrilares compuestos por la proteína tau hipersfosforilada. La angiopatía amiloide cerebral está caracterizada por la acumulación vascular del péptido β amiloide.

En ambas patologías se presenta neuroinflamación, la cual es capaz de provocar daño cerebral y tisular; esta neuroinflamación puede conducir a la activación crónica de la microglía y a la reactividad astrocítica.

Los glucocorticoides sintéticos son potentes inmunosupresores y antiinflamatorios, sin embargo, las formas de administración disponibles de estos fármacos, oral e intravenosa, presentan diversos efectos adversos. Por ende, se han evaluado otras formas de administración que resuelvan este problema, como la administración intranasal.

El objetivo principal de este trabajo fue analizar el efecto de la administración intranasal de dexametasona sobre la reactividad astrocítica en un modelo murino de angiopatía amiloide cerebral y enfermedad de Alzheimer. La hipótesis bajo la cual se realizó este trabajo es que la reactividad astrocítica, evaluada a través de la expresión de la proteína fibrilar glial, sería menor en los ratones que recibieron tres dosis intranasales de dexametasona que en animales de la misma edad que recibieron solo solución salina.

Se observó una menor expresión de la proteína fibrilar glial en los ratones que recibieron tres dosis intranasales de dexametasona que en los ratones que solo recibieron solución salina en las regiones de tálamo y giro dentado. No se encontró una diferencia significativa en la expresión de proteína fibrilar glial en la región de CA1. A partir de estos resultados, se sugiere la realización de más estudios en diferentes modelos murinos de angiopatía amiloide cerebral y enfermedad de Alzheimer para corroborar la efectividad de la administración intranasal de la dexametasona sobre la reactividad astrocítica y la neuroinflamación en general.

1. Introducción

1.1 Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA), nombrada así por el Dr. Emil Kraepelin en 1910 en honor al Dr. Alois Alzheimer quien fue la primera persona en caracterizar esta enfermedad en 1906 (Hippius & Neundörfer, 2003), es la forma más común de desorden neurodegenerativo (Demencia) asociado con la edad. Es un proceso neurodegenerativo de causa incierta y patogenia parcialmente conocida que afecta, preferentemente, a sujetos mayores de 65 años, ocasionando en la mayoría de los casos pérdida progresiva de memoria. (Merino et al., 2015).

Neuropatológicamente, la EA se caracteriza por la presencia de placas neuríticas que consisten en un núcleo del péptido β amiloide ($A\beta$) rodeado de neuritas degeneradas, es decir, fragmentos de axones y dendritas. Asimismo, se presentan ovillos neurofibrilares que son agregados intracelulares de la proteína tau (τ) hipersfosforilada. (Savonenko et al., 2023). Aunado a lo anterior, se presenta una sobreproducción de neurotransmisores excitatorios, procesos inflamatorios, estrés oxidativo e isquemia, que están relacionados con muerte neuronal irreversible. De igual manera, se presentan otros cambios patológicos como hipometabolismo, disrupción de la barrera hematoencefálica (BHE), activación de la microglía y reactividad astrocítica. (Nascimento et al., 2022)

La EA puede clasificarse con base en su heredabilidad y la edad de inicio de la patología. La EA familiar (EAF) se presenta antes de los 65 años, mientras que la EA esporádica (EAE) se manifiesta después de los 65 años y representa más del 95% de todos los casos. La EAF se presenta por herencia mendeliana, usualmente autosómica dominante, mientras que la EAE es de origen multifactorial (Talwar et al., 2016). En la EAF los factores genéticos de riesgo son mutaciones en el gen de la proteína precursora amiloidea (APP), mutaciones en los genes de presenilina 1 (PSEN1) y presenilina 2 (PSEN2). En el caso de la EAE, el riesgo más importante es la edad, También la presencia del alelo e4 del gen de la apolipoproteína E (APOE), así como el del receptor desencadenante expresado en las células mieloides 2 (TREM2) y el

gen de la proteína de ensamblaje de clatrina de unión a fosfatidilinositol (PICALM), son factores de riesgo para presentar la EAE (A. Armstrong, 2019),

De igual manera, se han descrito otros factores de riesgo como el traumatismo craneoencefálico, la hipertensión arterial, la diabetes mellitus, dislipidemia y el síndrome metabólico (A. Armstrong, 2019).

En el 2020 se estimó que más de 50 millones de personas alrededor del mundo vivían con demencia y se calcula que este número será cercano a 82 millones de personas en 2030 y 152 millones de personas en 2050 (Guerchet et al., 2020).

Hasta el momento, la EA no posee una cura, pero sí es posible utilizar tratamientos paliativos. (Folch et al., 2018). Los medicamentos disponibles que se prescriben con mayor frecuencia son inhibidores de acetilcolinesterasa (IACHÉ) como donepezilo, tacrina, galantamina y rivastigmina; y antagonistas de los receptores de N-metil-D-aspartato (ARNMDA) como memantina. Con la finalidad de modificar la evolución de la enfermedad, se han desarrollado nuevas estrategias cuyos blancos son el $A\beta$ y la τ (Kumar et al., 2015).

Los IACHÉ se utilizan como tratamiento de la EA leve o moderada e inhiben, de manera reversible, la enzima que degrada al neurotransmisor acetilcolina después de su liberación y, por ende, aumentan la disponibilidad de la acetilcolina lo que potencia la transmisión colinérgica. Los IACHÉ brindan beneficios sintomáticos de 1 a 2 años, pero no contrarrestan la progresión de la enfermedad. La mayoría de los IACHÉ disponibles son seguros y mantienen sus efectos positivos en la cognición durante algunos años (Galimberti & Scarpini, 2016; Marucci et al., 2021; Melik et al., 2014). Por otro lado, los ARNMDA están indicados en el tratamiento de la EA moderada o severa y actúan al bloquear los canales de N-metil-D-aspartato, lo cual mejora el sistema glutamatérgico y, como consecuencia, el déficit cognitivo. Sin embargo, al igual que con los IACHÉ, los resultados del tratamiento con ARNMDA son modestos (Olivares et al., 2012).

1.1.1 Angiopatía amiloide cerebral

La angiopatía amiloide cerebral (AAC) es una enfermedad cerebrovascular que se caracteriza por la acumulación del A β en los vasos sanguíneos cerebrales de tamaño pequeño y medio de la leptomeninge y la corteza cerebral. La acumulación del A β provoca que los vasos sanguíneos se vuelvan frágiles, lo que se manifiesta como hemorragias intracerebrales. La AAC además de provocar deterioro cognitivo, también puede presentarse con microhemorragias, hemosiderosis, leucoencefalopatía inflamatoria y síntomas neurológicos transitorios (Viswanathan & Greenberg, 2011).

Al igual que con la EA, el riesgo de presentar AAC aumenta con la edad y no hay una diferencia significativa entre casos presentados por hombres y por mujeres. La AAC está fuertemente relacionada con la EA, debido a que, aunque algunas veces en grado medio, la AAC se presenta en la mayoría de los casos de EA. Asimismo, se ha encontrado que la AAC es más severa en pacientes con EA que en aquellas personas sin demencia. (Chwalisz, 2021).

La AAC puede clasificarse con base en el tipo de A β que se deposita en los vasos sanguíneos. La forma más común de AAC es esporádica y ocurre en la mayoría de los pacientes con EA. El mayor factor de riesgo para presentar AAC esporádica es poseer el alelo e2 o e4 de la APOE. (Revesz, 2007). La otra forma de AAC, que es menos común, es la familiar o hereditaria. La AAC familiar, usualmente, se presenta de manera precoz y con mayor severidad que la forma esporádica. Aunque se ha encontrado que algunas mutaciones relacionadas con el procesamiento de APP están involucradas en la AAC familiar (como la mutación Flemish), la mayoría de los casos de AAC familiar se presentan debido a mutaciones que afectan las propiedades biológicas y bioquímicas del A β (Biffi & Greenberg, 2011).

1.1.2 Péptido β Amiloide

El péptido β amiloide (A β) es producido en el cerebro a lo largo de la vida y puede acumularse en los cerebros de personas mayores que no tienen deterioro cognitivo.

Estos depósitos pueden ser en los espacios extracelulares o, como en la AAC, en las paredes arteriales. Los depósitos del A β son mucho más abundantes en los cerebros de personas con EA. La eliminación del A β del cerebro se presenta por varios mecanismos, desde su degradación por peptidasas, hasta su drenado perivascular (Weller et al., 2009).

El A β surge del procesamiento de la APP, la cual es una proteína integral de membrana tipo I de 695 a 770 aminoácidos, y su tamaño puede ir de 39 a 43 aminoácidos, sin embargo, las formas del A β predominantes son las de 40 y 42 aminoácidos, la forma de 42 aminoácidos es menos soluble que el péptido de 40 aminoácidos (Meyer, 2008). La APP es procesada por las proteasas, sitio-específicas, α , β y γ secretasas; las secretasas β y γ producen los péptidos de 40 y 42 aminoácidos (Dulubova et al., 2004; Wolfe, 2016).

La observación inicial de depósitos del A β presentes en los vasos de pacientes jóvenes con Síndrome de Down, fue seguida por el descubrimiento de placas neuríticas y ovillos neurofibrilares en pacientes adultos con EA. Estos descubrimientos llevaron a la hipótesis de que la sobreproducción del A β conduce a una catastrófica cascada, que incluye alteraciones sinápticas, fibrilación, activación de astrocitos y microglía, fosforilación anormal de la τ para formar los ovillos neurofibrilares, pérdida neuronal progresiva, pérdida de múltiples neurotransmisores (especialmente acetilcolina) y, por último, demencia (Cairns, 2009).

1.1.3 Modelo Tg-SwDI de AAC y EA

Actualmente, existen diversos modelos que recapitulan algunos aspectos de la EA; entre ellos está la cepa Tg-SwDI, la cual es un modelo murino de AAC y EA que incorpora el transgén humano APP, con las mutaciones Dutch E22Q, Iowa D23N y Swedish K670N/M671L en la APP. Se ha comprobado que la acumulación del A β en este modelo es robusta, consistente y progresiva. (Davis et al., 2004). En la mutación Dutch E22Q hay un cambio de ácido glutámico (E) por glutamina (Q) en el aminoácido 22 del A β , mientras que en la mutación Iowa D23N hay un cambio de ácido aspártico (D) por asparagina (N) en el aminoácido 23 del A β ; ambos casos resultan en la

alteración de la carga neta del péptido, lo que aumenta las propiedades fibrillogénicas y patogénicas del A β in vitro. Tanto la mutación Dutch E22Q, como Iowa D23N, están relacionadas con amiloidosis cerebrovascular familiar en donde se presentan abundantes depósitos del A β (Melchor et al., 2008; van Nostrand et al., 2001).

Por otro lado, la mutación Swedish K670N/M671L es una doble mutación, en donde se presentan dos sustituciones de aminoácidos: lisina (K) por N y metionina (M) por leucina (L) en las posiciones 670 y 671 de la APP, respectivamente. Esta mutación está localizada junto al sitio de corte, en la APP, de la β secretasa, lo que facilita el procesamiento de la APP y, por ende, incrementa la producción del A β (Oksanen et al., 2018).

1.2 Neuroinflamación

La neuroinflamación es definida como una respuesta inflamatoria que ocurre en el cerebro o en la médula espinal en respuesta a un insulto. La inflamación está mediada por la producción de citocinas, quimiocinas, especies reactivas de oxígeno y por mensajeros secundarios. Estos mediadores son producidos por la glía residente (astrocitos y microglía), células endoteliales y células inmunes de la periferia. El grado de neuroinflamación depende del contexto, duración y curso del estímulo primario. Esta inflamación puede llevar al reclutamiento de células inmunes, edema, daño de tejidos y muerte celular, lo que puede generar procesos tanto positivos como negativos. Dentro de los aspectos positivos se encuentran la respuesta al daño para suprimirlo y regenerar el tejido, mientras que dentro de los aspectos negativos se encuentra la activación crónica de la microglía (DiSabato et al., 2016).

La cascada de neuroinflamación ha sido identificada como un factor etiopatogénico común de diferentes enfermedades como: accidentes cerebrovasculares, EA, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Huntington, migraña, epilepsia, esclerosis múltiple, traumatismo cerebral y depresión (Gilhus & Deuschl, 2019). Tanto la EA, como la AAC presentan neuroinflamación y es debido a que A β puede inducir la liberación de citocinas proinflamatorias como interleucina 1

alfa (IL-1 α), interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en los astrocitos y la microglía, lo que, a su vez, puede conducir a la producción adicional de A β con la consecuente producción de placas neuríticas y, como resultado, presentar neuroinflamación intensificada (Fernandes et al., 2017).

1.3 Astrocitos

Los astrocitos son un tipo de célula glial que constituye la mayoría de las células del Sistema Nervioso Central (SNC). Son importantes para el metabolismo, la estructura y la homeostasis del SNC y también desempeñan un papel importante en la neuroprotección al eliminar el exceso de neurotransmisores o al promover la sinaptogénesis. El nombre astrocito se asignó debido a que la forma de este tipo de células asemeja a una estrella, puesto que sus prolongaciones están dispuestas alrededor del cuerpo del astrocito (Ransom & Ransom, 2012; Vasile et al., 2017). Los astrocitos proveen soporte metabólico para las neuronas y otros tipos celulares, protegen a las células vecinas al ingerir el glutamato en exceso y el potasio, y liberan factores de crecimiento, ácido láctico, glutamina, el mitógeno TNF- α y otros mensajeros secundarios. (Z. Chen et al., 2022). Asimismo, los astrocitos se encuentran fuertemente relacionados con la microglía, debido a que los primeros secretan factores que modulan los fenotipos de la microglía (Como M1 y M2) y sus funciones; además de que la microglía regula la actividad neuronal y la transmisión sináptica al interactuar con los astrocitos (Jha et al., 2019).

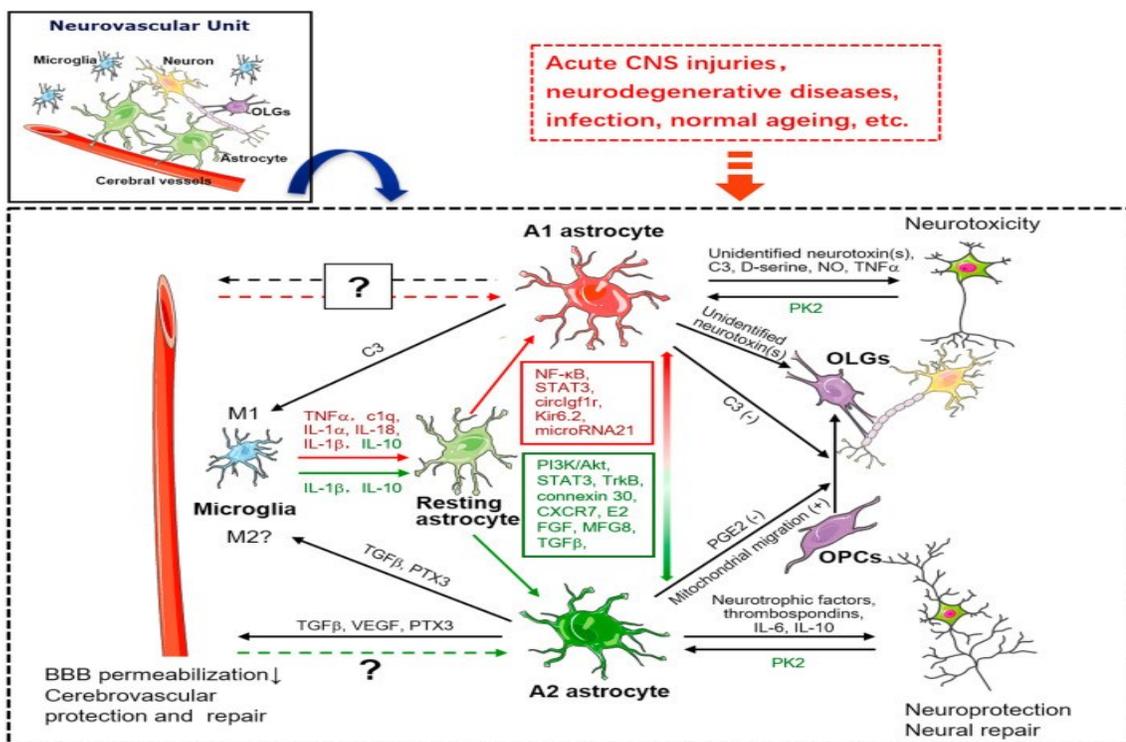


Figura 1. Efectos propuestos de los astrocitos A1/A2 sobre las neuronas, microglía, oligodendrocitos y vasos cerebrovasculares, así como mediadores moleculares y mecanismos involucrados en la formación de los astrocitos reactivos A1/A2.

(Fan & Huo, 2021)

Los astrocitos pueden clasificarse como fibrosos, que se encuentran en la materia blanca del cerebro, y como protoplásmicos, encontrados en la materia gris del cerebro. Los astrocitos protoplásmicos son complejos y cuentan con numerosas prolongaciones, mientras que los fibrosos son células más simples. Además de estos dos tipos de astrocitos, se han encontrado astrocitos especializados en diferentes áreas del cerebro, como la glía de Bergmann en el cerebelo y la glía de Müller de la retina (Oberheim et al., 2012).

Se ha visto que los astrocitos desempeñan un papel esencial durante la aparición y el desarrollo de la EA. En el estadio presintomático de la EA, los astrocitos sufren cambios en su fenotipo y morfología, como aumento o disminución del tamaño de sus dendritas. Hay una fuerte asociación entre los cambios morfológicos de los astrocitos, la τ y los ovillos neurofibrilares. Además, la función metabólica de los astrocitos está

estrechamente relacionada con el desarrollo de la EA. En los estadios avanzados de la EA se observa que los astrocitos invaden las placas neuríticas, lo que pone de manifiesto una reducción en su capacidad para eliminar A β (Bi et al., 2022).

1.3.1 Reactividad astrocítica

La reactividad astrocítica, astrogliosis, astrocitosis o gliosis reactiva es una respuesta compleja del SNC ante un insulto, en donde se presenta proliferación, cambios morfológicos y adaptación funcional de los astrocitos, el cual ocurre principalmente cuando hay una disrupción de la BHE. Los mecanismos por los cuales se presenta la reactividad astrocítica aún no son bien comprendidos, sin embargo, parece que la neuroinflamación desencadena o empeora la reactividad astrocítica, en especial por la liberación de TNF- α . El contexto patológico en el que puede presentarse la reactividad astrocítica varía de manera considerable y, por ende, puede ser esporádico o genético; agudo o crónico; debido a una patología sistémica o un daño específico del SNC. La reactividad astrocítica es una respuesta secundaria que puede evolucionar con el tiempo y, en muchos casos, es reversible. A pesar de que es una clasificación somera, durante la reactividad astrocítica pueden presentarse dos tipos clave de astrocitos: A1, el cual es un fenotipo neurotóxico; y A2, un fenotipo neuroprotector. (Escartin et al., 2021; Hostenbach et al., 2014). Ahora se considera que la reactividad astrocítica es un proceso patológico clave en la progresión de la EA, la cual se identifica por un aumento en la expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y la hipertrofia de los astrocitos que rodean las placas neuríticas. La reactividad astrocítica es capaz de dañar neuronas y se ha visto que está estrechamente relacionada con las placas neuríticas en cerebros de pacientes con EA y en diferentes modelos de la enfermedad. La microglía produce citosinas proinflamatorias en respuesta a la presencia del A β , lo que activa a los astrocitos. Los astrocitos activados se integran al proceso neuroinflamatorio cuando, por su parte, comienzan a secretar IL-1 y TNF- α , lo cual se convierte en un círculo vicioso. La reactividad astrocítica aumenta, linealmente, con el deterioro cognitivo (Kumar et al., 2022; Osborn et al., 2016a).

1.3.2 Proteína ácida fibrilar glial

La proteína ácida fibrilar glial (GFAP) es un filamento intermedio, de aproximadamente 50 KD, expresado específicamente en los astrocitos. Los filamentos intermedios son componentes mayores del citoesqueleto de las células eucariotas. Con base en su tamaño y secuencia de aminoácidos, se clasifican en seis subtipos. La GFAP, junto con la vimentina y la desmina, pertenece al tipo III de los filamentos intermedios (Inagaki et al., 1994). Se encuentra bien establecido que la GFAP es el principal filamento intermedio de los astrocitos maduros del SNC, asimismo, esta proteína es importante para la motilidad y la forma de los astrocitos, ya que proporciona estabilidad estructural a las prolongaciones de los astrocitos. El aumento en la expresión de GFAP se presenta en diversos desórdenes del SNC y, por esta razón, es un indicador sensible, detectable incluso en ausencia de muerte neuronal pronunciada. Sin embargo, aunque la expresión de GFAP en astrocitos reactivos está, la mayoría de las veces, relacionada con la severidad del daño, esta correlación no siempre es proporcional. A pesar de esto, el aumento en la expresión de GFAP sí es un indicador fuerte de reactividad astrocítica (Eng et al., 2000; Escartin et al., 2021).

1.4 Glucocorticoides

Debido a que la neuroinflamación es un factor etiopatogénico de la EA, se ha considerado utilizar medicamentos antiinflamatorios como tratamiento para esta enfermedad, dentro de estos medicamentos antiinflamatorios se encuentran los glucocorticoides sintéticos (GCSs) (Briggs et al., 2016). Los glucocorticoides (GCs) son hormonas esteroideas producidas y secretadas por la corteza suprarrenal y son regulados por el eje hipotálamo-hipofisario-suprarrenal. Los GCs son esenciales para la vida, debido a que regulan diversos procesos fisiológicos como el metabolismo, crecimiento y diferenciación celular, balance electrolítico, inflamación, funciones cognitivas, función cardiovascular, respuesta inmune, desarrollo y reproducción. La

secreción de GCs, usualmente, sigue un ciclo circadiano, pero algunos estímulos estresantes, incluidos factores proinflamatorios, pueden inducir esta secreción (Ayroldi et al., 2022).

Los GCs reducen drásticamente la inflamación, debido a que tienen efectos considerables en la concentración, distribución y función de los leucocitos periféricos, además de tener un efecto supresor de citocinas y quimiocinas proinflamatorias, además de otros mediadores inflamatorios. Después de una sola dosis de GCs, la concentración de neutrófilos en circulación aumenta, mientras que la concentración de linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos disminuye; este efecto se presenta en un máximo de 6 horas y se disipa en 24 horas. (Chrousos, 2021). Asimismo, los GCs inhiben las funciones de macrófagos tisulares, células dendríticas y otras células presentadoras de antígeno. Además de los efectos que los GCs provocan en la función leucocitaria, los GCs influyen la respuesta inflamatoria al inhibir a la fosfolipasa A₂ y, por ende, reducen la síntesis de ácido araquidónico, precursor de prostaglandinas y leucotrienos, y de factor activador de plaquetas. Los GCs también reducen la expresión de ciclooxigenasa 2 (COX2) (Chrousos, 2021).

En 1950 se desarrollaron los primeros GCSs para el tratamiento de la artritis reumatoide. Las principales aplicaciones clínicas de los GCSs se basan en su efecto antiinflamatorio e inmunosupresor. Todos los GCSs están estructuralmente relacionados con la hidrocortisona y la corticosterona, que son los principales GCs endógenos de primates y roedores, respectivamente. Es posible decir que la estructura de los GCSs es, básicamente, la misma. La mayoría de ellos son compuestos policíclicos de 21 carbonos con una estructura esteroidea: un sistema de anillos de 17 carbonos con una cadena alifática en el carbono 17, un carbonilo en el carbono 3, uno o dos dobles enlaces en el anillo A, y un oxígeno unido al carbono 11.

Los GCSs tienen mayor afinidad que los GCs por los receptores de glucocorticoides (GRs) y, por ende, su efecto farmacológico es mayor (Karszen & de Kloet, 2007).

1.4.1 Mecanismo de acción

Los efectos de los GCs, en general, se deben a la interacción de estos con receptores intracelulares específicos de GCs que pertenecen a la familia de receptores nucleares que controlan la transcripción génica. En esta superfamilia también se encuentran los receptores de mineralocorticoides, esteroides sexuales, hormonas tiroideas, vitamina D₃ y ácido retinoico (Rang et al., 2016).

Los GCs difunden libremente de la circulación al interior de las células, a través de la membrana celular, y se unen a los GRs. Esto provoca que la proteína de choque térmico de 90 KDa (Hsp90), una proteína unida a la forma inactiva de los GRs, se disocie, lo cual permite la localización nuclear del complejo GR-GC y su unión al ácido desoxirribonucleico (ADN). Un GR se combina con otro GR para formar un dímero en zonas del ADN nombradas elementos de respuesta a glucocorticoides (GREs) en las regiones reguladoras de los genes de respuesta a corticoesteroides. Esta interacción permite que los GRs se asocien con complejos de ADN-Proteína para modificar y remodelar proteínas, lo que mejora la transcripción genética (Adcock et al., 2006).

Una de las proteínas reguladas por los GCs es la anexina 1 (ANXA1), la cual es una proteína que se expresa en abundancia en la glándula pituitaria y que se encuentra también en el hipotálamo, hipocampo y otras partes del cerebro (Traverso et al., 1999).

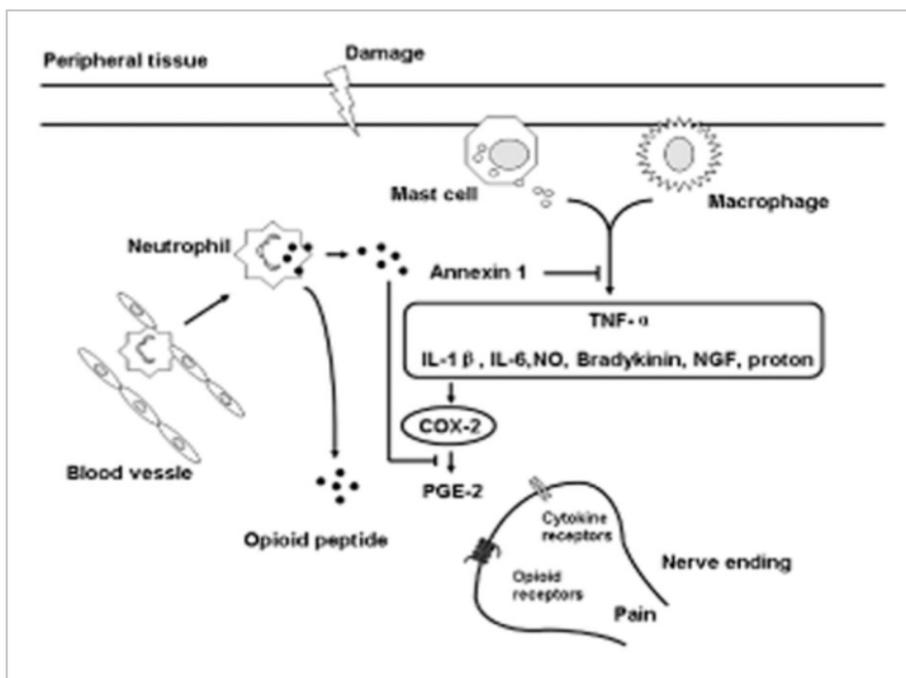


Figura 2. Cascada inflamatoria asociada con daño tisular e inflamación aguda y su relación con neutrófilos, monocitos, ANXA1 y terminaciones nerviosas

(L. Chen et al., 2014)

La expresión de ANXA1 aumenta después de la administración de GCs, además de que se induce su fosforilación, así como su translocación membranal (GOULDING, 1990; Solito et al., 2003). El incremento en la expresión de ANXA1 provoca un efecto analgésico e antiinflamatorio debido que inhibe citocinas de gran envergadura para la nocicepción, así como inhibe la producción de la COX2, responsable de la producción de prostaglandina que contribuye al proceso de hiperalgesia inflamatoria. En particular, el efecto antinociceptivo de ANXA1 se debe a la regulación de la vía de síntesis de prostaglandina E₂ (PGE₂), debido a que suprime la inducción de la fosfolipasa A₂, enzima que cataliza la liberación de ácido araquidónico, el cual es convertido por las ciclooxigenasas, en prostaglandinas (L. Chen et al., 2014; Goppelt-Struebe & Rehfeldt, 1992).

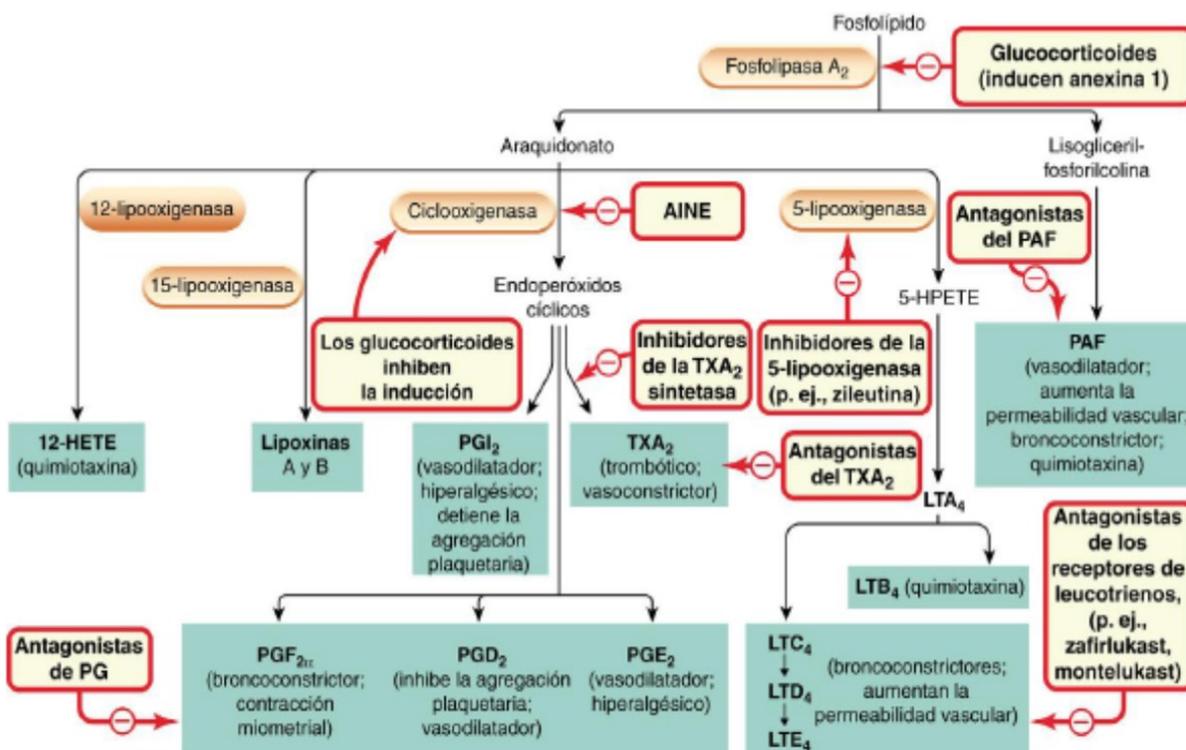


Figura 3. Diagrama resumen de los mediadores inflamatorios derivados de los fosfolípidos

con una breve descripción de sus acciones y los lugares de acción de los fármacos antiinflamatorios (Rang et al., 2016).

Asimismo, se ha visto que los GCs inhiben al factor nuclear de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B), factor que regula la expresión de genes involucrados en respuestas inflamatorias y estrés, al inducir la expresión de una nueva proteína. Un complejo GR-GC se une a un GRE del promotor del gen de la proteína inhibidora de NF- κ B (I κ B) y estimula su transcripción y posterior traducción. Estas proteínas son las responsables de terminar la actividad de NF- κ B (Cidlowski et al., 2016; Motolani et al., 2022).

1.4.2 Vía intranasal

Las formas de administración de los GCSs disponibles son oral e intravenosa, las cuales tienen poca eficacia para llegar al cerebro. Debido a esto, se requieren dosis elevadas de GCSs para alcanzar niveles terapéuticos. Las consecuencias de estas dosis elevadas de GCSs para llegar al SNC son varias y pueden ir desde de daños gastrointestinales severos hasta depresión y ansiedad. Para resolver este problema, se ha evaluado a la vía intranasal como una alternativa. Esta vía de administración puede transportar a los fármacos directamente al SNC, a través del bulbo olfatorio y los nervios trigéminos, por lo que no tienen que atravesar la BHE (Erdő et al., 2018; Pérez-Osorio et al., 2021). La administración intranasal se presenta como una combinación de dos rutas: una intracelular y otra extracelular. El mecanismo intracelular involucra la endocitosis del fármaco por neuronas sensoriales olfativas en la cavidad nasal antes de ser transportadas a lo largo del axón hasta la sinapsis. Ahí el fármaco es expulsado al bulbo olfatorio, donde las neuronas que se proyectan a las regiones del cerebro repiten el proceso. Por otro lado, el mecanismo extracelular involucra la entrada del fármaco al espacio paracelular para luego ser transportado a la lámina propia, donde es transportado del espacio perineural al espacio subaracnoideo. En este transporte están involucradas diversas fuerzas como el flujo masivo y la bomba perivascular (Crowe et al., 2018).

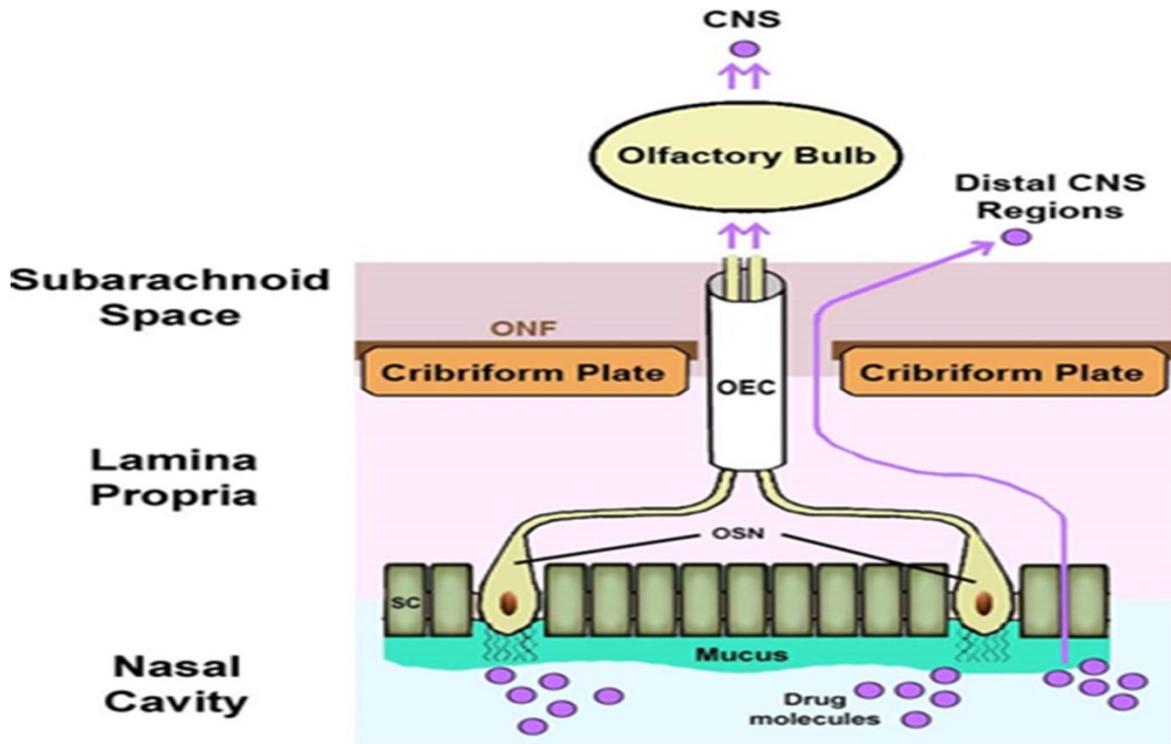


Figura 4. Transporte intranasal de fármacos a través de la ruta olfativa al SNC por vías intracelulares y extracelulares.

El fármaco es captado por las neuronas receptoras olfativas que proyectan al bulbo olfatorio. La ruta extracelular se da entre células de soporte, donde el fármaco pasa las uniones estrechas, la hendidura paracelular, la lámina propia, el espacio perineural y, por último, el espacio subaracnoideo, donde se transporta a objetivos distales del SNC (Erdő et al., 2018).

La vía de administración intranasal, además, evita el metabolismo de primer paso y la degradación gastrointestinal que se presentan con la administración oral (Gibaldi et al., 1971). Por último, en trabajos recientes, se demostró que hay una mayor distribución de fármacos en el cerebro cuando son administrados de manera intranasal en comparación de su administración intravenosa, además de que el tiempo que tardan los fármacos en alcanzar al SNC es menor cuando se utiliza la administración intranasal (Pérez-Osorio et al., 2021).

1.4.3 Dexametasona

Uno de los GCSs más estudiados es la dexametasona, la cual tiene efectos pleiotrópicos en varias vías de señalización y se ha utilizado en un gran número de patologías, además de que se ha evaluado su efecto antiinflamatorio en enfermedades como estrés y depresión. (Reichardt et al., 2021). La dexametasona es un GCS disponible en varias presentaciones y es usada para el tratamiento de varias enfermedades en donde se presenta inflamación, incluyendo asma y desórdenes endocrinos y reumáticos. Al igual que otros GCs, la dexametasona inhibe a la fosfolipasa A₂, lo que disminuye la formación de ácido araquidónico y sus derivados, además de inhibir al NF- κ B; por otro lado, promueve la transcripción de factores antiinflamatorios, como el gen de la interleucina 10 (IL-10). Las dosis bajas de dexametasona producen efectos antiinflamatorios, mientras que las dosis elevadas provocan efectos inmunosupresores (Yasir et al., 2022).

El tratamiento crónico con dexametasona puede inducir patología de la τ , aumentar la expresión del A β y potenciar el deterioro cognitivo en la EA (Joshi et al., 2012), sin embargo, administrada por corto tiempo, la dexametasona puede inhibir la neuroinflamación relacionada con la EA y prevenir el daño cognitivo (Vyas et al., 2016). Asimismo, se ha demostrado que, en combinación con aciclovir, la dexametasona puede proteger del deterioro cognitivo provocado por la EA en ratones (Hui et al., 2020).

3. Hipótesis

La reactividad astrocítica, evaluada a través de la expresión de GFAP, será menor en los ratones que recibieron tres dosis intranasales de dexametasona que en animales de la misma edad que recibieron solo solución salina.

4. Objetivos

4.1 General

Analizar el efecto de la administración intranasal de dexametasona sobre la reactividad astrocítica en ratones de la cepa Tg-SwDI, modelo murino de Enfermedad de Alzheimer y Angiopatia Amiloide Cerebral.

4.2 Particulares

- Evaluar la expresión de GFAP en cerebros de ratones de la cepa Tg-SwDI que recibieron tres dosis de dexametasona intranasal: a los 3, 4 y 5 meses de edad.
- Comparar la expresión de GFAP en cerebros de ratones de la cepa Tg-SwDI que recibieron tres dosis de dexametasona intranasal y ratones de la misma cepa y de la misma edad que recibieron solo solución salina.

5. Materiales y métodos

Ratones

Se emplearon 9 ratones Tg-SwDI, C57BL/6-Tg(ThBy1-APPSwDutlowa) BWevn/J. (Laboratorios Jackson, Bar-Harbor, ME, USA). Los ratones se mantuvieron en bioterio con un ciclo de luz/oscuridad 12/12 y con alimento y agua *ad libitum*. Los experimentos se realizaron siguiendo los protocolos aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) (Protocol ID: 209) y en conformidad con los lineamientos del National Institute of Health (NIH) para el uso de animales experimentales.

Habitación de los ratones para la administración intranasal

La duración del procedimiento fue de tres días previos a la administración intranasal y se trabajó cada ratón individualmente, ofreciendo una recompensa dulce al final de cada sesión.

El primer día se colocó al ratón sobre la palma de la mano, sujetándolos de la cola y frotando suavemente su lomo durante tres minutos. Posteriormente se volvió a colocar al ratón sobre la palma de la mano y se pellizó suavemente el pelaje durante 3 minutos.

El segundo día se colocó al ratón sobre una rejilla donde se inmovilizó con la mano durante 30 segundos y se liberó por 30 segundos para después repetir. Posteriormente se realizó el agarre durante 30 segundos, se liberó y se permitió descansar por un minuto para después repetir. Por último, se realizó el agarre para la administración intranasal (en vertical) durante 30 segundos y se repitió tras haber dejado descansar al ratón.

El tercer día se colocó al ratón nuevamente sobre una rejilla, se colocaron en posición de administración intranasal durante 30 segundos y se les permitió descansar por un minuto, se realizó el procedimiento nuevamente. Después se colocó a los ratones en

posición de administración intranasal, se acercó la pipeta a las narinas de los ratones durante 30 segundos seguido de un minuto de descanso por dos veces. Finalmente, se le administró a cada ratón 5 μ L de solución salina en cada narina.

Protocolo de administración

6 ratones hembra de la cepa Tg-SwDI fueron administrados con una dosis de dexametasona (Alin® Depot, 21-Isonicotinato de dexametasona 8mg/2mL) de 0.25 mg por Kg de peso a los 3, 4 y 5 meses de edad. La vía de administración fue intranasal, previa habituación, la dexametasona fue suministrada por goteo con una micropipeta en cada fosa nasal. Por otro lado, 3 ratones hembra, de la cepa Tg-SwDI usados como control fueron administrados, por vía intranasal, con solución salina a los 3, 4 y 5 meses de edad.

Sacrificio, obtención y tratamiento de tejidos

Se sacrificó a los ratones a los 6 meses de edad por inhalación letal de sevoflurano (Abbot Lab), mientras se realizó la perfusión cardiaca ventricular con 50 mL de una solución amortiguadora de fosfatos (PBS, pH 7.4) a 4°C y 5 mL de Paraformaldehído al 4% en PBS. Inmediatamente se procedió con la disección del cerebro, el cual se colocó en una caja Petri sobre hielo, se separaron los dos hemisferios y se continuó la fijación en 10mL de para-formaldehído al 4% en PBS por otras 24 horas. Después de lavar los dos hemisferios en con dos pases de 10 mL de PBS, en agitación por cinco minutos, se inició la deshidratación en 10 mL de soluciones sacarosa al 10%, 20% y 30% en PBS durante 24 horas, respectivamente. Los tejidos se mantuvieron en Tissue Plus (Fisher HealthCare, TX, USA) y se realizaron cortes coronales de 30 μ m de grosor, en congelación, desde -1.6 mm a -2.3 mm de bregma con un criostato (Kedee, KD2850).

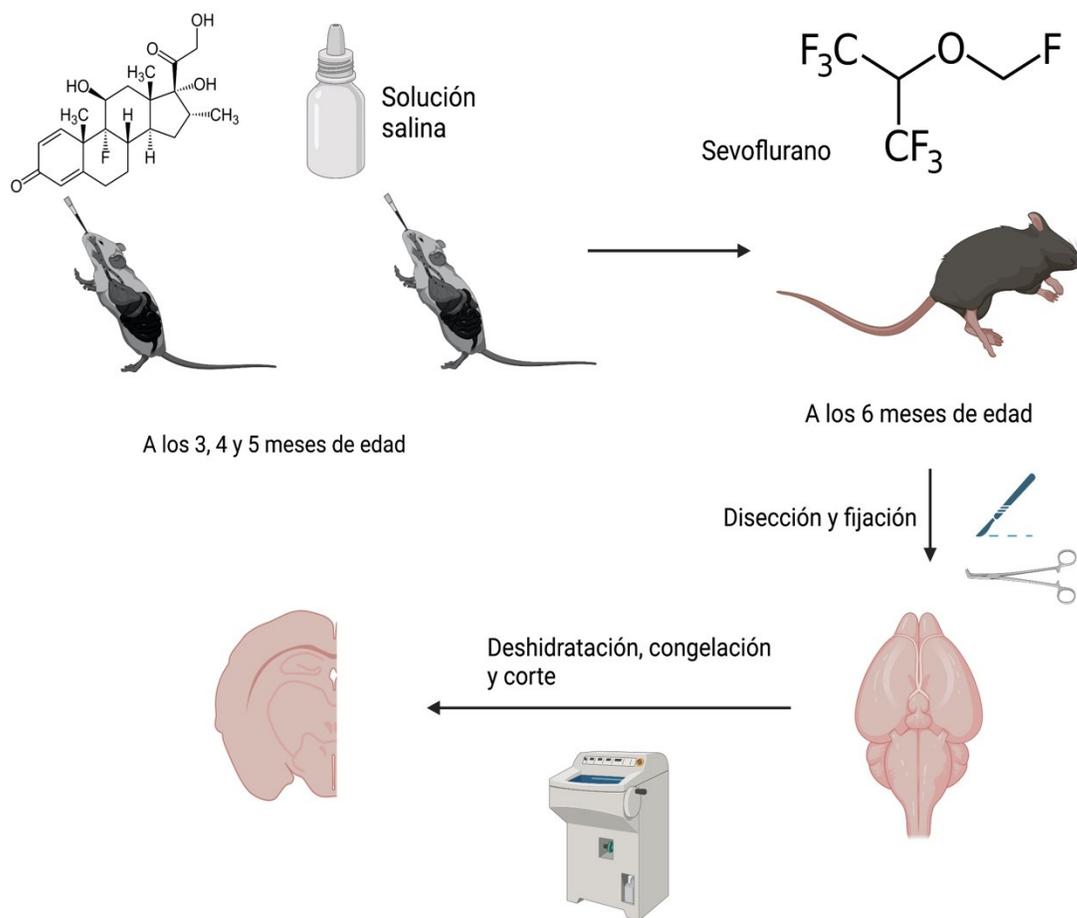


Figura 5. Esquemización del protocolo de administración, sacrificio, obtención y tratamiento de los tejidos

Hecho en <https://biorender.com/>.

Ensayos de inmunofluorescencia en cortes de cerebro de ratones Tg-SwDI

Todo el ensayo se llevó a cabo en flotación de los cortes coronales de 30 μm de cerebro de ratones transgénicos Tg-SwDI. Se realizaron dos lavados con 500 μL de TBS (50 mM Tris, 250mM NaCl), durante 5 minutos. Enseguida, se realizó la recuperación de epítomos al incubar los tejidos en 500 μL de amortiguador de citrato

de sodio a pH 6, durante 30 minutos en horno a 60°C. Después de dos lavados con 500 µL de TBS, se realizó la permeabilización de los tejidos por 15 minutos en 500 µL de una solución de TBS A (TBS, Tritón X-100 al 0.1%) y, se realizó el bloqueo de los tejidos al incubarlos, por 20 minutos, en 500 µL de TBS B (Albúmina sérica bovina (BSA) al 2% en TBS A). Los tejidos se incubaron con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-GFAP (Invitrogen, MA, USA), diluido (1:1,500) en una solución de suero normal de cabra en TBS A (5%) a 4°C, durante toda una noche.

Los tejidos se lavaron tres veces, con 500 µL de TBS, 500 µL de TBS A y 500 µL de TBS B durante 5 minutos cada uno. Posteriormente, los tejidos incubaron con el anticuerpo secundario de cabra anti-IgG₁ de ratón AlexaFluor 594 (Invitrogen, MA, USA) diluido (1:500) en una solución de suero normal de cabra (5%) en TBS A, por 1.5 horas a temperatura ambiente. Después de tres lavados con 500 µL de TBS, 500 µL de TBS A y 500 µL de TBS B durante 5 minutos cada uno, las muestras se inmovilizaron en portaobjetos, se cubrió con medio de montaje Vectashield con DAPI (Vector Labs) y un portaobjetos, y se sellaron los bordes con barniz. Las muestras se observaron en un microscopio de epifluorescencia Nikon Ix51 equipado con una cámara Olympus DP71, con la que se tomaron las fotografías, a través del *software* DP Controller 3.2.1.276. De las fotos se seleccionaron las regiones del hipocampo (CA1 y giro dentado) y tálamo y se procedió a realizar la cuantificación de la densidad integrada (IntDen) con ayuda del *software* ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA).

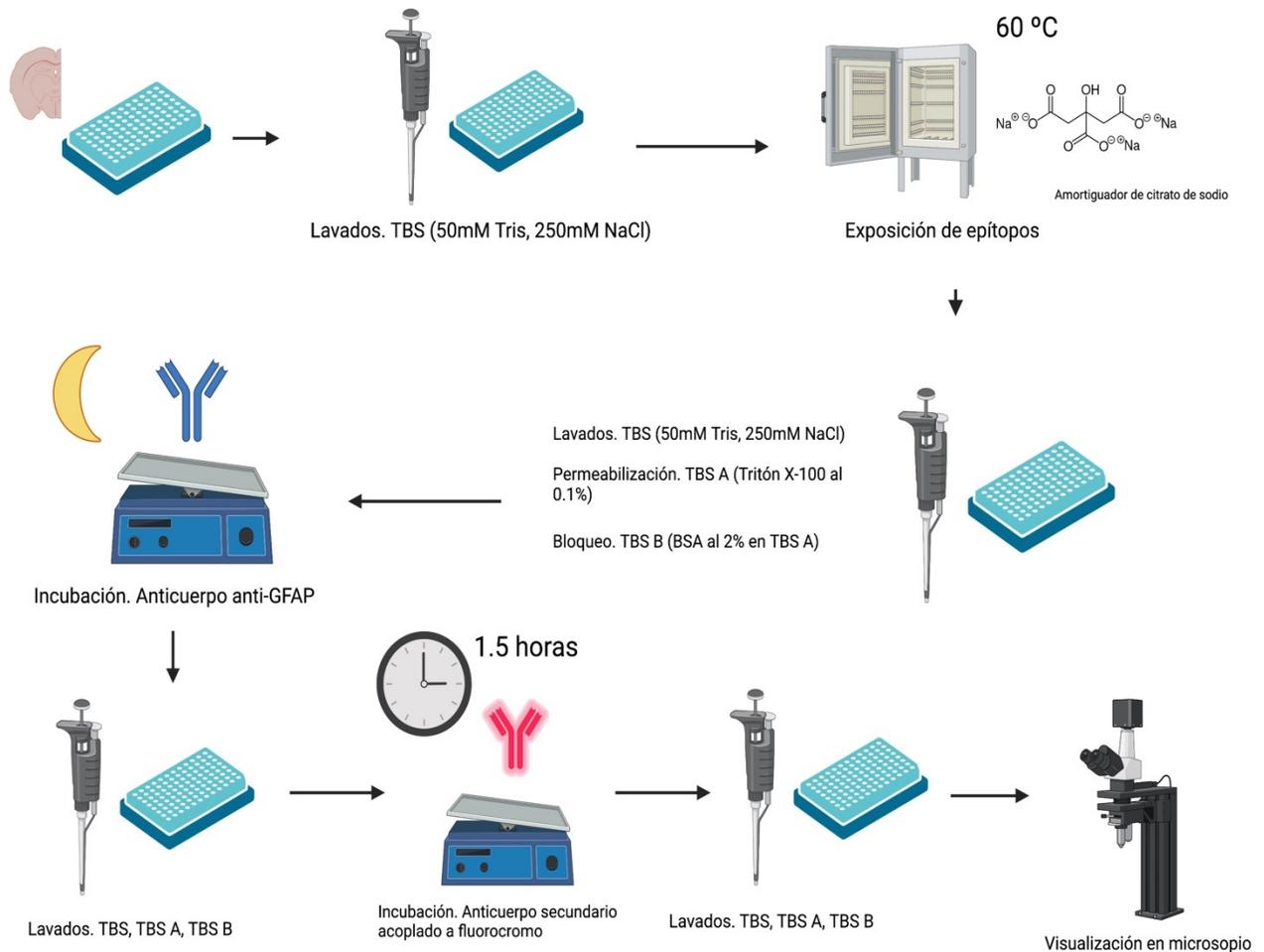


Figura 6. Esquematización de los ensayos de inmunofluorescencia en cortes de cerebro de ratones Tg-SwDI.

Hecho en <https://biorender.com/>.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con ayuda del *software* GraphPad InStat (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Las diferencias entre los grupos se evaluaron a través de una prueba T de Student independiente. Las diferencias se consideraron significativas a un valor P menor de 0.05.

6. Resultados

La evaluación de la expresión de GFAP en los ratones Tg-SwDI que recibieron tres dosis intranasales de dexametasona y en los ratones que recibieron solo solución salina se llevó a cabo a través de ensayos de inmunofluorescencia. En estos ensayos se utilizó un anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-GFAP y un anticuerpo secundario de cabra anti-IgG₁ de ratón (AlexaFluor 594), debido a esto, es que la GFAP se observa de color rojo.

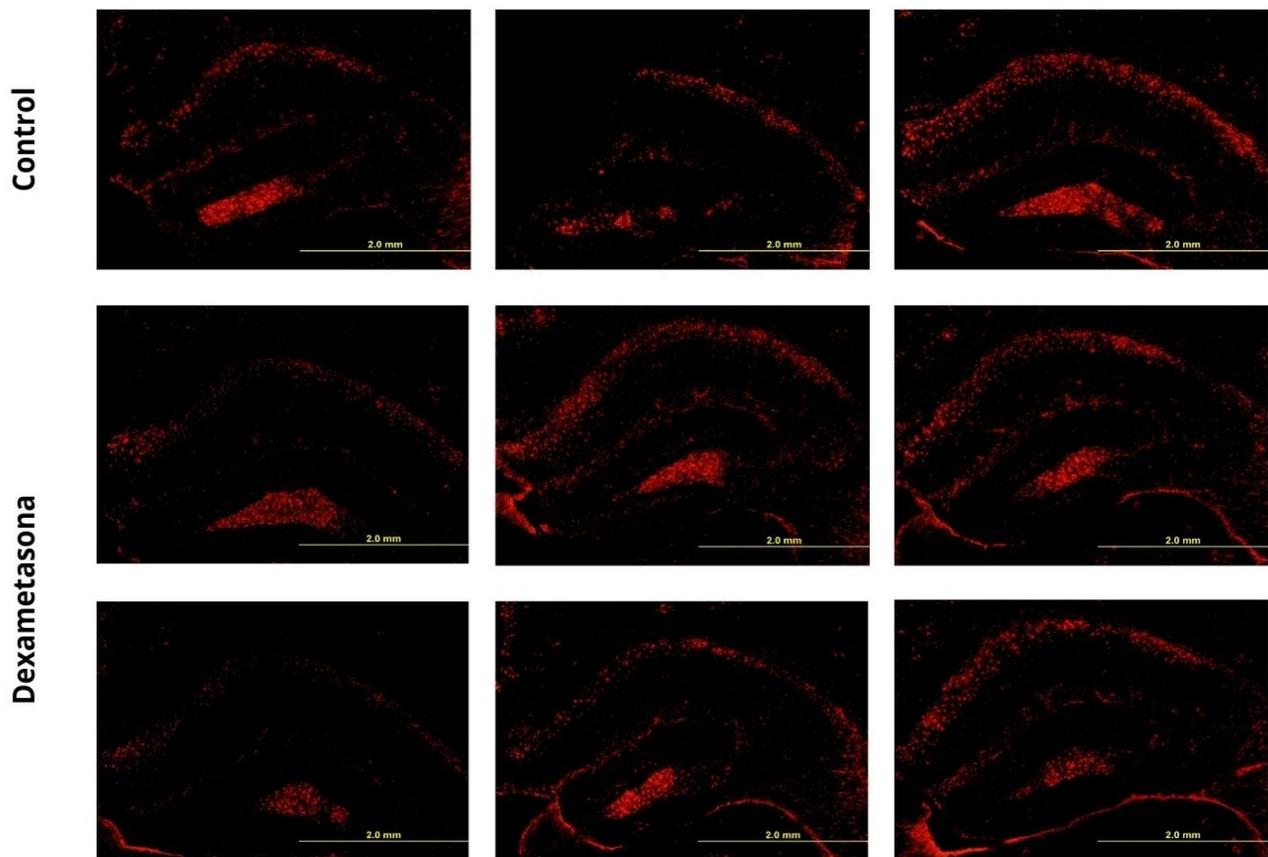


Figura 7. Imágenes representativas del hipocampo de ratones Tg-SwDI

Imágenes representativas del hipocampo de ratones Tg-SwDI que recibieron tres dosis intranasales de dexametasona (n = 6) y de los ratones que recibieron solo solución salina como grupo control (n = 3). La marca roja, dada por AlexaFluor 594, indica la presencia de GFAP. La escala es de 2.0 mm.

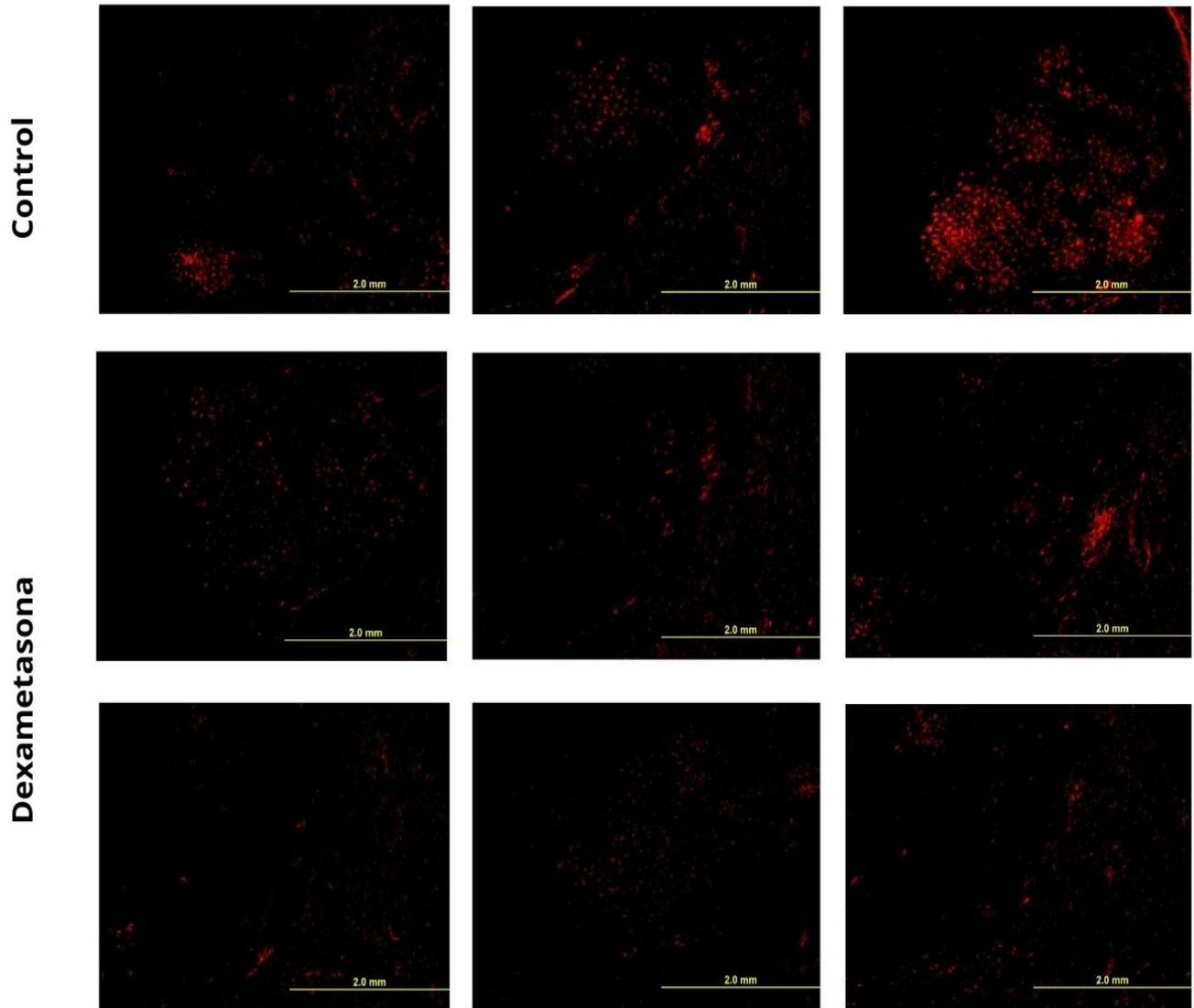


Figura 8. Imágenes representativas del tálamo de ratones Tg-SwDI

Imágenes representativas del tálamo de ratones Tg-SwDI que recibieron tres dosis intranasales de dexametasona (n = 6) y de los ratones que recibieron solo solución salina como grupo control (n = 3). La marca roja, dada por AlexaFluor 594, indica la presencia de GFAP. La escala es de 2.0 mm.

En la figura 8, donde se visualizan las imágenes representativas de la tinción de GFAP en el tálamo de ratones Tg-SwDI, se observa una diferencia notable en la intensidad de la marca de GFAP, esta es de mayor intensidad en los ratones Tg-SwDI que recibieron solo solución salina (Control).

La diferencia en la intensidad de la marca de GFAP entre los ratones Tg-SwDI que recibieron solo solución salina y los ratones Tg-SwDI que recibieron el tratamiento de dexametasona no es tan evidente en la región del hipocampo, como puede apreciarse en la figura 7.

Para corroborar las diferencias cualitativas, se evaluó la expresión de GFAP en los cerebros de los ratones Tg-SwDI que recibieron tres dosis de dexametasona y los que recibieron solo solución salina, a través de la cuantificación de la densidad integrada (IntDen), de las imágenes tomadas, con ayuda del *software* ImageJ y se procedió a realizar una prueba T de Student independiente con estos datos. Los resultados, mostrados en la figura 9 resaltan que hay una diferencia significativa en la región del tálamo entre los ratones Tg-SwDI que recibieron solo solución salina y los ratones Tg-SwDI que recibieron las tres dosis de dexametasona. Sin embargo, en la región del hipocampo, donde se tomaron por separado la región CA1 y giro dentado, se obtuvo una diferencia significativa solo en la región de giro dentado. Es decir, la expresión de GFAP fue mayor en los ratones Tg-SwDI que recibieron solo solución salina únicamente en las regiones de tálamo y giro dentado, mientras que en la región de CA1 no hubo diferencia significativa entre los ratones Tg-SwDI que recibieron dexametasona y los ratones Tg-SwDI que recibieron solo solución salina.

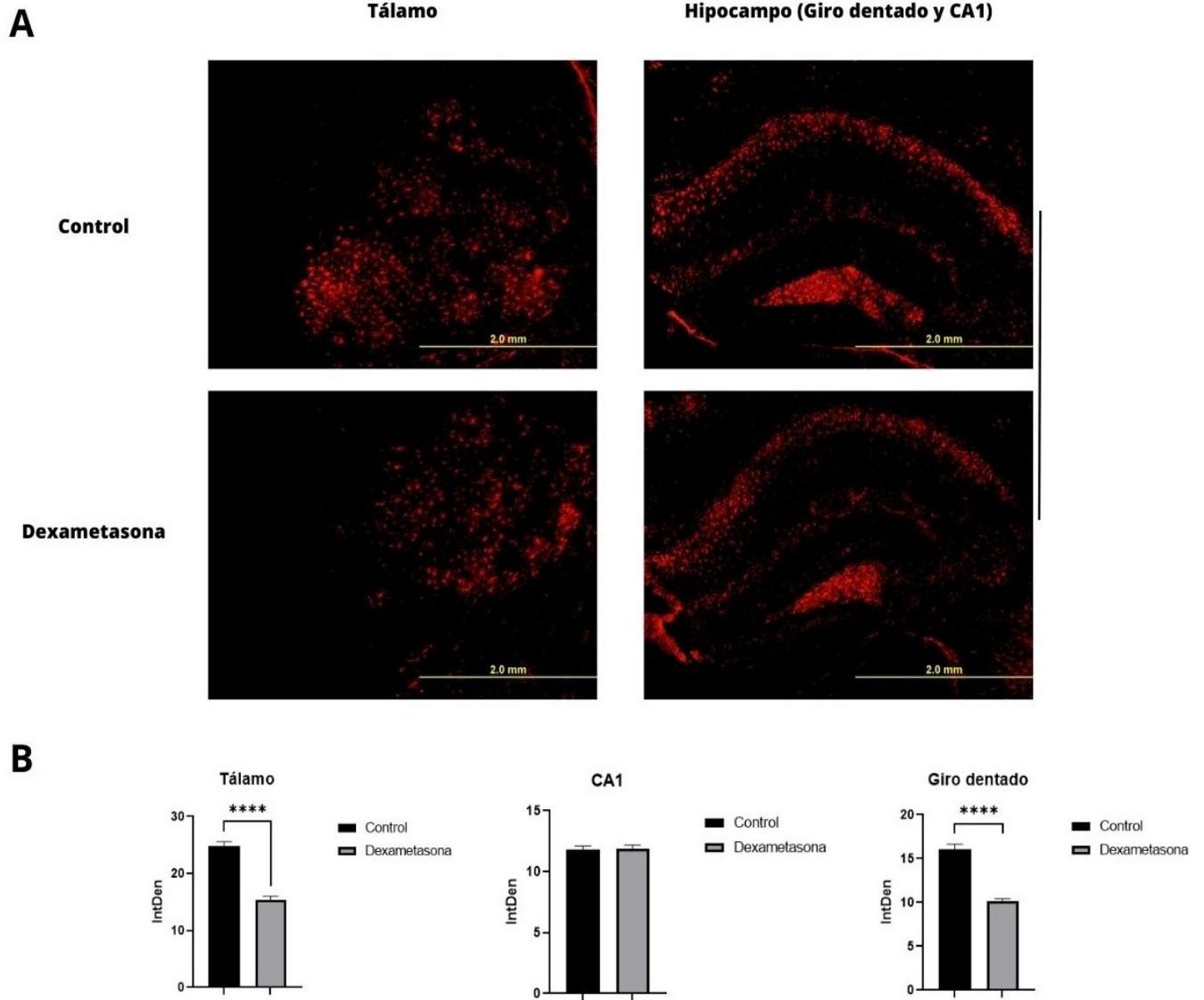


Figura 9. Imágenes representativas y estimación de inmunofluorescencia

A, Imágenes representativas del tálamo e hipocampo de los cerebros de ratones Tg-SwDI que recibieron tres dosis intranasales de dexametasona (n = 6) y de los ratones que recibieron solo solución salina como grupo control (n = 3). La marca roja, dada por AlexaFluor 594, indica la presencia de GFAP. La escala es de 2.0 mm. B. Cuantificación de inmunofluorescencia de GFAP en las regiones de tálamo, CA1 y giro dentado. Se observa una IntDen significativamente mayor en los ratones que recibieron solo solución salina en las regiones de tálamo y giro dentado (****P = 0.0001)., en CA1 no se encontraron diferencias significativas.

7. Discusión

En el presente trabajo se encontró que los ratones Tg-SwDI que recibieron tres dosis intranasales de dexametasona presentaron una menor reactividad astrocítica en las regiones de tálamo y giro dentado, evaluada a través de la expresión de GFAP, que los ratones Tg-SwDI que solo recibieron solución salina. Esto está en concordancia con lo reportado en un trabajo anterior donde se indujo la neuroinflamación con una inyección de lipopolisacárido en un modelo murino (Meneses et al., 2017). En dicho trabajo se encontró que la dexametasona reducía la expresión de GFAP en ratones tratados con dexametasona y que tal reducción era más pronunciada en la región de CA2; además de que la dexametasona, administrada intranasalmente, redujo significativamente los niveles de IL-6 en el cerebro. Asimismo, se encontró que la administración intranasal de dexametasona reducía con mayor efectividad la expresión de GFAP que la administración intravenosa (Meneses et al., 2017). Otros estudios demostraron que la dexametasona reduce la población de astrocitos, al inhibir su proliferación y que esta reducción es dependiente de la dosis de dexametasona administrada, aunque sí presenta un efecto máximo. (Crossin et al., 1997; Unemura et al., 2012). En el presente estudio únicamente se utilizó una dosis de dexametasona, por lo que sería conveniente analizar el efecto de la dosis en la administración intranasal de dexametasona para el tratamiento de la reactividad astrocítica.

El hecho de que la vía de administración intranasal posea una mayor efectividad para reducir la expresión de GFAP que la vía de administración intravenosa, se debe a que la dexametasona, administrada por vía intranasal, es capaz de llegar al SNC a través del bulbo olfatorio y los nervios trigéminos. Asimismo, la dexametasona administrada por vía intranasal presenta una mayor biodisponibilidad en el cerebro que cuando se administra de manera intravenosa. Aunado a esto, la dexametasona es internalizada por los astrocitos, lo que puede explicar la modulación en la expresión de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias, así como su respuesta a algunos neurotransmisores. (Pérez-Osorio et al., 2021). Las enfermedades neurodegenerativas se han vuelto de mayor envergadura conforme han pasado los

años y los tratamientos disponibles aún son inadecuados. Varios estudios han demostrado que la vía de administración intranasal puede transportar a los fármacos directamente al cerebro al eludir la BHE. El transporte de las moléculas de la cavidad nasal al parénquima cerebral ocurre, como se mencionó anteriormente, a través del bulbo olfatorio para dispersarse por el cerebro, alcanzando casi todas sus regiones. La vía de administración intranasal se presenta como una combinación de dos rutas, una extracelular y una intracelular, sin embargo, parece que la ruta extracelular es la más importante en este proceso (Crowe et al., 2018). Este trabajo se une a la creciente literatura sobre el potencial de la administración intranasal para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

Dentro del hipocampo se presentó un comportamiento distinto en las dos regiones donde se realizó la estimación de la inmunofluorescencia de GFAP, giro dentado y CA1. Mientras que en la región de giro dentado hubo una disminución significativa en la expresión de GFAP en los ratones Tg-SwDI que recibieron tres dosis intranasales de dexametasona en comparación con los ratones Tg-SwDI que recibieron solo solución salina, en la región de CA1 no hubo diferencias significativas. Se ha visto que estas dos regiones son sumamente diferentes en cuanto a su vulnerabilidad a varios insultos, por ejemplo: EA, estrés e hipotiroidismo. También presentan diferencias importantes en cuanto su capacidad de neurogénesis, la cual tiende a ser menor en CA1; esta diferencia hace que el giro dentado sea mayormente regulado por diversos factores ambientales y neurotróficos. El área de CA1 está constituida por neuronas piramidales grandes que están empaquetadas estrechamente; sin embargo, el giro dentado, también compuesto por células densamente empaquetadas, posee células de menor tamaño y, por ende, estas regiones difieren a nivel funcional, celular y molecular (Alkadhi, 2019).

Por lo mencionado anteriormente, estas dos regiones del hipocampo, CA1 y giro dentado, responden de manera diferente a los agentes endógenos y medicamentos. Un ejemplo de esto es que la noradrenalina modula la liberación de glutamato en el giro dentado, mientras que en la región de CA1 su efecto es mínimo (Lynch & Bliss, 1986).

La reactividad astrocítica es una característica predominante en la EA que está involucrada en la cascada degenerativa de la pérdida sináptica. Los astrocitos, activados por mediadores secretados por la microglía, forman parte del proceso neuroinflamatorio al secretar, por su parte, citosinas proinflamatorias como IL-1 y TNF- α . A pesar de que la reactividad astrocítica comienza como un mecanismo de protección en los estadios iniciales de la EA, termina siendo una pieza fundamental en el proceso del deterioro cognitivo (Osborn et al., 2016b). Debido a esto, es que el presente trabajo tiene especial relevancia, pues ha demostrado el efecto de la administración intranasal de dexametasona sobre la reactividad astrocítica y, por ende, su potencial como posible tratamiento para la neuroinflamación en general y la neuroinflamación presente en la EA. Es el primer estudio en un modelo de la AAC y EA.

Los actuales tratamientos de la EA, IChE y ARNMDA, han probado tener efectos benéficos a corto plazo en la EA, además de ser seguros, sin embargo, ninguno de los dos ha demostrado cambiar el curso o la progresión de la EA, aunado a que sus efectos son modestos (Galimberti & Scarpini, 2016; Marucci et al., 2021; Olivares et al., 2012). Por tal motivo, se sugiere que se realicen más estudios sobre la administración intranasal de GCS como un tratamiento adyuvante de la EA.

8. Conclusiones

- La dexametasona administrada por vía intranasal es capaz de reducir la reactividad astrocítica, evaluada a través de la expresión de GFAP, en los cerebros de ratones Tg-SwDI, modelo de la ACC y EA.
- Es necesario realizar más estudios sobre el efecto de la administración intranasal de dexametasona con el fin de proponer este protocolo como tratamiento de la neuroinflamación en diferentes enfermedades neurológicas.

9. Referencias

- A. Armstrong, R. (2019). Risk factors for Alzheimer's disease. *Folia Neuropathologica*, 57(2), 87–105. <https://doi.org/10.5114/fn.2019.85929>
- Adcock, I. M., Hayashi, R., Ito, K., & Caramori, G. (2006). CORTICOSTEROIDS | Glucocorticoid Receptors. In *Encyclopedia of Respiratory Medicine* (pp. 568–576). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-370879-6/00100-9>
- Alkadhi, K. A. (2019). Cellular and Molecular Differences Between Area CA1 and the Dentate Gyrus of the Hippocampus. *Molecular Neurobiology*, 56(9), 6566–6580. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-1541-2>
- Ayroldi, E., Migliorati, G., & Riccardi, C. (2022). Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Properties of Glucocorticoids. In *Comprehensive Pharmacology* (pp. 394–421). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820472-6.00052-9>
- Bi, W., Lei, T., Cai, S., Zhang, X., Yang, Y., Xiao, Z., Wang, L., & Du, H. (2022). Potential of astrocytes in targeting therapy for Alzheimer's disease. *International Immunopharmacology*, 113, 109368. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.109368>
- Biffi, A., & Greenberg, S. M. (2011). Cerebral Amyloid Angiopathy: A Systematic Review. *Journal of Clinical Neurology*, 7(1), 1. <https://doi.org/10.3988/jcn.2011.7.1.1>
- Briggs, R., Kennelly, S. P., & O'Neill, D. (2016). Drug treatments in Alzheimer's disease. *Clinical Medicine*, 16(3), 247–253. <https://doi.org/10.7861/clinmedicine.16-3-247>

- Cairns, N. J. (2009). Alzheimer's Disease: Neurodegeneration. In *Encyclopedia of Neuroscience* (pp. 275–281). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-008045046-9.00509-X>
- Chen, L., Lv, F., & Pei, L. (2014). Annexin 1: A glucocorticoid-inducible protein that modulates inflammatory pain. *European Journal of Pain*, *18*(3), 338–347. <https://doi.org/10.1002/j.1532-2149.2013.00373.x>
- Chen, Z., Yuan, Z., Yang, S., Zhu, Y., Xue, M., Zhang, J., & Leng, L. (2022). Brain Energy Metabolism: Astrocytes in Neurodegenerative Diseases. *CNS Neuroscience & Therapeutics*. <https://doi.org/10.1111/cns.13982>
- Chrousos, G. P. (2021). Adrenocorticosteroids & Adrenocortical Antagonists. In B. G. Katzung & T. W. Vanderah (Eds.), *Basic & Clinical Pharmacology, 15e*. McGraw-Hill. accesspharmacy.mhmedical.com/content.aspx?aid=1176467921
- Chwalisz, B. K. (2021). Cerebral amyloid angiopathy and related inflammatory disorders. *Journal of the Neurological Sciences*, *424*, 117425. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2021.117425>
- Cidlowski, J. A., Malchoff, C. D., & Malchoff, D. M. (2016). Glucocorticoid Receptors, Their Mechanisms of Action, and Glucocorticoid Resistance. In *Endocrinology: Adult and Pediatric* (pp. 1717-1726.e4). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-18907-1.00098-6>
- Crossin, K. L., Tai, M.-H., Krushel, L. A., Mauro, V. P., & Edelman, G. M. (1997). Glucocorticoid receptor pathways are involved in the inhibition of astrocyte proliferation. *Proceedings*

of the National Academy of Sciences, 94(6), 2687–2692.

<https://doi.org/10.1073/pnas.94.6.2687>

Crowe, T. P., Greenlee, M. H. W., Kanthasamy, A. G., & Hsu, W. H. (2018). Mechanism of intranasal drug delivery directly to the brain. *Life Sciences*, 195, 44–52.

<https://doi.org/10.1016/J.LFS.2017.12.025>

Davis, J., Xu, F., Deane, R., Romanov, G., Previti, M. lou, Zeigler, K., Zlokovic, B. v., & van Nostrand, W. E. (2004). Early-onset and Robust Cerebral Microvascular Accumulation of Amyloid β -Protein in Transgenic Mice Expressing Low Levels of a Vasculotropic Dutch/Iowa Mutant Form of Amyloid β -Protein Precursor. *Journal of Biological Chemistry*, 279(19), 20296–20306. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312946200>

DiSabato, D. J., Quan, N., & Godbout, J. P. (2016). Neuroinflammation: the devil is in the details. *Journal of Neurochemistry*, 139, 136–153. <https://doi.org/10.1111/jnc.13607>

Dulubova, I., Ho, A., Huryeva, I., Südhof, T. C., & Rizo, J. (2004). Three-Dimensional Structure of an Independently Folded Extracellular Domain of Human Amyloid- β Precursor Protein. *Biochemistry*, 43(30), 9583–9588. <https://doi.org/10.1021/bi049041o>

Eng, L. F., Ghirnikar, R. S., & Lee, Y. L. (2000). Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochemical Research*, 25(9/10), 1439–1451.

<https://doi.org/10.1023/A:1007677003387>

Erdő, F., Bors, L. A., Farkas, D., Bajza, Á., & Gizurarson, S. (2018). Evaluation of intranasal delivery route of drug administration for brain targeting. *Brain Research Bulletin*, 143, 155–170. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.10.009>

- Escartin, C., Galea, E., Lakatos, A., O'Callaghan, J. P., Petzold, G. C., Serrano-Pozo, A., Steinhäuser, C., Volterra, A., Carmignoto, G., Agarwal, A., Allen, N. J., Araque, A., Barbeito, L., Barzilai, A., Bergles, D. E., Bonvento, G., Butt, A. M., Chen, W.-T., Cohen-Salmon, M., ... Verkhratsky, A. (2021). Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nature Neuroscience*, *24*(3), 312–325.
<https://doi.org/10.1038/s41593-020-00783-4>
- Fan, Y.-Y., & Huo, J. (2021). A1/A2 astrocytes in central nervous system injuries and diseases: Angels or devils? *Neurochemistry International*, *148*, 105080.
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2021.105080>
- Fernandes, G. L., Araujo, P., Tufik, S., & Andersen, M. L. (2017). The role of IL-6 and STAT in sleep and neuroinflammation. *Clinical Immunology*, *180*, 58–59.
<https://doi.org/10.1016/j.clim.2017.04.004>
- Folch, J., Busquets, O., Ettcheto, M., Sánchez-López, E., Castro-Torres, R. D., Verdaguer, E., Garcia, M. L., Olloquequi, J., Casadesús, G., Beas-Zarate, C., Pelegri, C., Vilaplana, J., Auladell, C., & Camins, A. (2018). Memantine for the Treatment of Dementia: A Review on its Current and Future Applications. *Journal of Alzheimer's Disease*, *62*(3), 1223–1240. <https://doi.org/10.3233/JAD-170672>
- Galimberti, D., & Scarpini, E. (2016). Old and new acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, *25*(10), 1181–1187.
<https://doi.org/10.1080/13543784.2016.1216972>

- Gibaldi, M., Boyes, R. N., & Feldman, S. (1971). Influence of First-Pass Effect on Availability of Drugs on Oral Administration. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *60*(9), 1338–1340. <https://doi.org/10.1002/jps.2600600909>
- Gilhus, N. E., & Deuschl, G. (2019). Neuroinflammation — a common thread in neurological disorders. *Nature Reviews Neurology*, *15*(8), 429–430. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0227-8>
- Goppelt-Struebe, M., & Rehfeldt, W. (1992). Glucocorticoids inhibit TNF α -induced cytosolic phospholipase A2 activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, *1127*(2), 163–167. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(92\)90273-X](https://doi.org/10.1016/0005-2760(92)90273-X)
- GOULDING, N. (1990). Anti-inflammatory lipocortin 1 production by peripheral blood leucocytes in response to hydrocortisone. *The Lancet*, *335*(8703), 1416–1418. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(90\)91445-G](https://doi.org/10.1016/0140-6736(90)91445-G)
- Guerchet, M., Prince, M., & Prina, M. (2020, November 30). *Numbers of people with dementia worldwide*. <https://www.alzint.org/u/Numbers-People-with-Dementia-2017.Pdf>.
- Hippius, H., & Neundörfer, G. (2003). The discovery of Alzheimer's disease. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, *5*(1), 101–108. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2003.5.1/hhippius>
- Hostenbach, S., Cambron, M., D'haeseleer, M., Kooijman, R., & de Keyser, J. (2014). Astrocyte loss and astrogliosis in neuroinflammatory disorders. *Neuroscience Letters*, *565*, 39–41. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.10.012>
- Hui, Z., Zhijun, Y., Yushan, Y., Liping, C., Yiyang, Z., Difan, Z., Chunglit, C. T., & Wei, C. (2020). The combination of acyclovir and dexamethasone protects against Alzheimer's disease-

related cognitive impairments in mice. *Psychopharmacology*, 237(6), 1851–1860.

<https://doi.org/10.1007/s00213-020-05503-1>

Inagaki, M., IMakamura, Y., Takeda, M., Nishimura, T., & Inagaki, N. (1994). Glial Fibrillary Acidic Protein: Dynamic Property and Regulation by Phosphorylation. *Brain Pathology*, 4(3), 239–243. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1994.tb00839.x>

Jha, M. K., Jo, M., Kim, J.-H., & Suk, K. (2019). Microglia-Astrocyte Crosstalk: An Intimate Molecular Conversation. *The Neuroscientist*, 25(3), 227–240.

<https://doi.org/10.1177/1073858418783959>

Joshi, Y. B., Chu, J., & Praticò, D. (2012). Stress Hormone Leads to Memory Deficits and Altered Tau Phosphorylation in a Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 31(1), 167–176. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-120328>

Karszen, A. M., & de Kloet, E. R. (2007). Synthetic Glucocorticoids. In *Encyclopedia of Stress* (pp. 704–708). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012373947-6.00371-8>

Kumar, A., Fontana, I. C., & Nordberg, A. (2022). Reactive astrogliosis: A friend or foe in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*.

<https://doi.org/10.1111/jnc.15565>

Kumar, A., Singh, A., & Ekavali. (2015). A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. *Pharmacological Reports*, 67(2), 195–203.

<https://doi.org/10.1016/j.pharep.2014.09.004>

Lynch, M. A., & Bliss, T. V. P. (1986). Noradrenaline modulates the release of [14C]glutamate from dentate but not from CA1/CA3 slices of rat hippocampus. *Neuropharmacology*, 25(5), 493–498. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(86\)90173-5](https://doi.org/10.1016/0028-3908(86)90173-5)

- Marucci, G., Buccioni, M., Ben, D. D., Lambertucci, C., Volpini, R., & Amenta, F. (2021). Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*, *190*, 108352. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2020.108352>
- Melchor, J. P., McVoy, L., & van Nostrand, W. E. (2008). Charge Alterations of E22 Enhance the Pathogenic Properties of the Amyloid β -Protein. *Journal of Neurochemistry*, *74*(5), 2209–2212. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0742209.x>
- Melik, R. el, Dubil, A., & Pound, M. W. (2014). Duration of Therapy with Acetylcholinesterase Inhibitors in Patients with Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease as Reported in the Literature. *The Consultant Pharmacist*, *29*(6), 400–407. <https://doi.org/10.4140/TCP.n.2014.400>
- Meneses, G., Gevorkian, G., Florentino, A., Bautista, M. A., Espinosa, A., Acero, G., Díaz, G., Fleury, A., Pérez Osorio, I. N., del Rey, A., Fragoso, G., Sciutto, E., & Besedovsky, H. (2017). Intranasal delivery of dexamethasone efficiently controls LPS-induced murine neuroinflammation. *Clinical and Experimental Immunology*, *190*(3), 304–314. <https://doi.org/10.1111/cei.13018>
- Merino, E. N., Sendin, M. A. C., & Osorio, J. A. V. (2015). Enfermedad de Alzheimer. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, *11*(72), 4306–4315. <https://doi.org/10.1016/j.med.2015.01.002>
- Meyer, R. (2008). Beta Amyloid. In *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference* (pp. 1–3). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.63864-4>

- Motolani, A., Martin, M., Sun, M., & Lu, T. (2022). NF- κ B and Cancer Therapy Drugs. In *Comprehensive Pharmacology* (pp. 351–363). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820472-6.00064-5>
- Nascimento, A. L. C. S., Fernandes, R. P., Carvalho, A. C. S., Frigieri, I., Alves, R. C., & Chorilli, M. (2022). Insights for Alzheimer's disease pharmacotherapy and current clinical trials. *Neurochemistry International*, *159*, 105401. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2022.105401>
- Oberheim, N. A., Goldman, S. A., & Nedergaard, M. (2012). *Heterogeneity of Astrocytic Form and Function* (pp. 23–45). https://doi.org/10.1007/978-1-61779-452-0_3
- Oksanen, M., Hyötyläinen, I., Voutilainen, J., Puttonen, K. A., Hämäläinen, R. H., Graff, C., Lehtonen, Š., & Koistinaho, J. (2018). Generation of a human induced pluripotent stem cell line (LL008 1.4) from a familial Alzheimer's disease patient carrying a double KM670/671NL (Swedish) mutation in APP gene. *Stem Cell Research*, *31*, 181–185. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2018.07.024>
- Olivares, D., K. Deshpande, V., Shi, Y., K. Lahiri, D., H. Greig, N., T. Rogers, J., & Huang, X. (2012). N-Methyl D-Aspartate (NMDA) Receptor Antagonists and Memantine Treatment for Alzheimer's Disease, Vascular Dementia and Parkinson's Disease. *Current Alzheimer Research*, *9*(6), 746–758. <https://doi.org/10.2174/156720512801322564>
- Osborn, L. M., Kamphuis, W., Wadman, W. J., & Hol, E. M. (2016a). Astroglialosis: An integral player in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology*, *144*, 121–141. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2016.01.001>

- Osborn, L. M., Kamphuis, W., Wadman, W. J., & Hol, E. M. (2016b). Astrogliosis: An integral player in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology*, *144*, 121–141. <https://doi.org/10.1016/J.PNEUROBIO.2016.01.001>
- Pérez-Osorio, I. N., Espinosa, A., Giraldo Velázquez, M., Padilla, P., Bárcena, B., Fragoso, G., Jung-Cook, H., Besedovsky, H., Meneses, G., & Sciutto Conde, E. L. (2021). Nose-to-Brain Delivery of Dexamethasone: Biodistribution Studies in Mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *378*(3), 244–250. <https://doi.org/10.1124/jpet.121.000530>
- Rang, H. P., Ritter, J. M., & Flower, R. J. (2016). *Rang y Dale. Farmacología*. Elsevier Health Sciences Spain - T. <http://ebookcentral.proquest.com/lib/unam/detail.action?docID=4499180>
- Ransom, B. R., & Ransom, C. B. (2012). *Astrocytes: Multitalented Stars of the Central Nervous System* (pp. 3–7). https://doi.org/10.1007/978-1-61779-452-0_1
- Reichardt, S. D., Amouret, A., Muzzi, C., Vettorazzi, S., Tuckermann, J. P., Lühder, F., & Reichardt, H. M. (2021). The Role of Glucocorticoids in Inflammatory Diseases. *Cells*, *10*(11), 2921. <https://doi.org/10.3390/cells10112921>
- Revesz, T. (2007). S.19.02 Sporadic and familial cerebral amyloid angiopathies. *European Neuropsychopharmacology*, *17*, S204–S205. [https://doi.org/10.1016/S0924-977X\(07\)70248-1](https://doi.org/10.1016/S0924-977X(07)70248-1)
- Savonenko, A. v., Wong, P. C., & Li, T. (2023). Alzheimer diseases. In *Neurobiology of Brain Disorders* (pp. 313–336). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85654-6.00022-8>

Solito, E., Mulla, A., Morris, J. F., Christian, H. C., Flower, R. J., & Buckingham, J. C. (2003).

Dexamethasone Induces Rapid Serine-Phosphorylation and Membrane Translocation of Annexin 1 in a Human Folliculostellate Cell Line via a Novel Nongenomic Mechanism Involving the Glucocorticoid Receptor, Protein Kinase C, Phosphatidylinositol 3-Kinase, and Mitogen-Activated Protein Kinase. *Endocrinology*, *144*(4), 1164–1174.

<https://doi.org/10.1210/en.2002-220592>

Talwar, P., Sinha, J., Grover, S., Rawat, C., Kushwaha, S., Agarwal, R., Taneja, V., & Kukreti, R.

(2016). Dissecting Complex and Multifactorial Nature of Alzheimer's Disease Pathogenesis: a Clinical, Genomic, and Systems Biology Perspective. *Molecular Neurobiology*, *53*(7), 4833–4864. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9390-0>

Traverso, V., Christian, H. C., Morris, J. F., & Buckingham, J. C. (1999). Lipocortin 1 (Annexin

1): A Candidate Paracrine Agent Localized in Pituitary Folliculo-Stellate Cells1. *Endocrinology*, *140*(9), 4311–4319. <https://doi.org/10.1210/endo.140.9.7008>

Unemura, K., Kume, T., Kondo, M., Maeda, Y., Izumi, Y., & Akaike, A. (2012). Glucocorticoids

Decrease Astrocyte Numbers by Reducing Glucocorticoid Receptor Expression In Vitro and In Vivo. *Journal of Pharmacological Sciences*, *119*(1), 30–39.

<https://doi.org/10.1254/jphs.12047FP>

van Nostrand, W. E., Melchor, J. P., Cho, H. S., Greenberg, S. M., & Rebeck, G. W. (2001).

Pathogenic Effects of D23N Iowa Mutant Amyloid β -Protein. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(35), 32860–32866. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104135200>

Vasile, F., Dossi, E., & Rouach, N. (2017). Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain. *Brain Structure and Function*, 222(5), 2017–2029.

<https://doi.org/10.1007/s00429-017-1383-5>

Viswanathan, A., & Greenberg, S. M. (2011). Cerebral amyloid angiopathy in the elderly.

Annals of Neurology, 70(6), 871–880. <https://doi.org/10.1002/ana.22516>

Vyas, S., Rodrigues, A. J., Silva, J. M., Tronche, F., Almeida, O. F. X., Sousa, N., & Sotiropoulos,

I. (2016). Chronic Stress and Glucocorticoids: From Neuronal Plasticity to Neurodegeneration. *Neural Plasticity*, 2016, 1–15.

<https://doi.org/10.1155/2016/6391686>

Weller, R. O., Carare, R. O., & Boche, D. (2009). Amyloid: Vascular and Parenchymal. In

Encyclopedia of Neuroscience (pp. 355–362). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-008045046-9.00105-4>

Wolfe, M. S. (2016). Aspartic Proteases of Alzheimer's Disease: β - and γ -Secretases. In

Encyclopedia of Cell Biology (pp. 661–669). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394447-4.10077-X>

Yasir, M., Goyal, A., & Sonthalia, S. (2022). *Corticosteroid Adverse Effects*.