



---

---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

***Evaluación del efecto de la dexametasona administrada por  
vía intranasal sobre microglía en un modelo murino de  
enfermedad de Alzheimer y Angiopatía Amiloide Cerebral  
(Tg-SwDI)***

**Tesis**

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

**PRESENTA**

**MÓNICA ALEJANDRA HERRERA ÁNGELES**

**ASESOR DEL TEMA**

**DRA. GOHAR GEVORGYAN**



**CIUDAD UNIVERSITARIA CDMX AÑO 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:** Coello Coutiño Martha Patricia

**VOCAL:** Gevorgyan Gohar

**SECRETARIO:** Domínguez Romero Allan Noe

**1er. SUPLENTE:** Moreno Eutimio Mario Adán

**2° SUPLENTE:** García Lozano Alberto

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

*Instituto de Investigaciones Biomédicas*

**Asesor del tema:**

---

Dra. Gohar Gevorgyan

**SUSTENTANTE:**

---

Mónica Alejandra Herrera Ángeles

## **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).

Agradezco a la Dra. Gohar Gevorgyan por la dirección de mi tesis, por su apoyo académico y por impulsar mi formación profesional.

Agradezco a la QFB. Alicia Mercedes Torres Paniagua por su asesoría durante la realización de mi tesis.

Agradezco al M. en C. Gilberto Adrián Rodríguez López por su asesoría durante la realización de este proyecto.

Agradezco al Biol. Gonzalo Acero Galindo, técnico del laboratorio, por su enseñanza y ayuda en el laboratorio.

Agradezco a los miembros de mi jurado, Dra. Martha Patricia Coello Coutiño y Dr. Allan Noe Domínguez Romero por sus valiosas aportaciones y comentarios, los cuales permitieron enriquecer el presente trabajo.

# Índice

Índice de Tablas y Figuras .....	2
Índice de Figuras.....	2
Índice de Tablas.....	5
Abreviaturas .....	6
Resumen .....	7
Introducción .....	9
Enfermedad de Alzheimer .....	10
Epidemiología .....	10
Tipos de Enfermedad de Alzheimer .....	11
Patología .....	12
Factores de riesgo .....	13
Angiopatía amiloide cerebral .....	14
Relación Angiopatía Amiloide Cerebral y Enfermedad de Alzheimer.....	15
APP.....	16
Procesamiento de APP: producción de A $\beta$ .....	16
Eliminación de A $\beta$ .....	19
Neuroinflamación .....	19
Microglía .....	20
Funciones .....	21
Microglía activada .....	22
Iba-1 .....	24
Microglía en Enfermedad de Alzheimer .....	24
Dexametasona .....	26
Dexametasona en Enfermedad de Alzheimer y Angiopatía Amiloide Cerebral .....	30
Administración Intranasal de Dexametasona .....	31
Vía de administración intranasal.....	31
Características de los fármacos para la administración intranasal .....	32
Mecanismos de administración intranasal.....	33
Modelos animales de la patología de EA.....	37
Antecedentes.....	39
Planteamiento del problema .....	39
Hipótesis.....	40

Objetivo general.....	40
Objetivos particulares .....	40
Procedimiento Experimental .....	41
Metodología .....	41
Ratones .....	42
Habitación a la manipulación de ratones para la administración Intranasal.....	42
Tratamiento con Dexametasona .....	43
Obtención de tejidos .....	44
Inmunofluorescencia.....	44
Análisis estadístico .....	46
Resultados.....	46
Evaluación de la expresión de Iba-1 en microglía de ratones Tg-SwDI tratados con dexametasona y tratados con solución salina. ....	46
Evaluación cualitativa de la asociación entre la microglia positiva a Iba-1 con la presencia de agregados amiloides. ....	51
Discusión .....	54
Conclusiones .....	59
Perspectivas .....	59
Referencias .....	60

# Índice de Tablas y Figuras

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Fases de la deposición de A $\beta$ en la Enfermedad de Alzheimer. Las áreas del cerebro que presentan deposición amiloide en cada una de las fases están representadas con color rojo. Por otro lado, el gradiente a colores más oscuros indica que la acumulación de A $\beta$ es continua. (Hampel, H., et. al., 2021).....	13
<b>Figura 2.</b> Procesamiento proteolítico de APP: vía amiloidogénica y vía no amiloidogénica. En la vía no amiloidogénica, la $\alpha$ -secretasa realiza un corte sobre el dominio A $\beta$ de la APP, generando el fragmento sAPP $\alpha$ que es liberado al medio extracelular y C83 que permanece en la membrana. Posteriormente la $\gamma$ -secretasa realiza un corte sobre C83, produciendo p3 y el fragmento AICD, que son liberados al medio extracelular y al citoplasma respectivamente. Por otro lado, en la vía amiloidogénica la $\alpha$ -secretasa realiza un corte sobre APP fuera del dominio de A $\beta$ , generando sAPP $\beta$ que es liberado al medio y C99 que permanece en la membrana. La $\gamma$ -secretasa realiza el segundo corte sobre C99, generando A $\beta$ y AICD. En esta vía AICD actúa como un regulador transcripcional de varios genes, mientras que en la no amiloidogénica es degradado. APP: proteína precursora amiloide; $\alpha$ -sec: $\alpha$ -secretasa; $\beta$ -sec: $\beta$ -secretasa; $\gamma$ -sec: $\gamma$ -secretasa; sAPP $\alpha$ :APP- $\alpha$ soluble; sAPP $\beta$ :APP- $\beta$ soluble; AICD: Amyloid precursor protein intracellular domain; A $\beta$ : péptido $\beta$ -amiloide. (Adaptación de Coronel, R., et. al., 2019).....	18
<b>Figura 3.</b> Activación de la microglía y muerte neuronal. (Shabab, T., et. al. 2017). .....	22
<b>Figura 4.</b> Morfología de la microglía (Rawlinson, C., et. al., 2020).....	23
<b>Figura 5.</b> Estructura química de la dexametasona .....	27
<b>Figura 6.</b> Mecanismo de acción de los corticoesteroides en la inhibición de la inflamación (Sibila, O. et. al., 2015). .....	28
<b>Figura 7.</b> Cavidad nasal humana (Campbell, C., et. al., 2012) .....	33
<b>Figura 8.</b> Transporte de fármacos al SNC vía intranasal por mecanismos intracelulares y extracelulares (Erdő, F., et. al., 2018). .....	35
<b>Figura 9.</b> Cavidad nasal humana (A) y murina (B). Se muestran las zonas de la cavidad nasal, así como los nervios trigéminos y olfatorios que median el paso de las moléculas al Sistema Nervioso Central. OE: Epitelio olfatorio; RE: epitelio respiratorio (Gänger, S., & Schindowski, K, 2018). .....	36
<b>Figura 10.</b> Esquema de la construcción del modelo Tg-SwDI (Davis, J., Xu, et. al., 2004). .....	37
<b>Figura 11.</b> Procedimiento esquematizado de la administración intranasal de dexametasona o solución salina isotónica y de la obtención y preparación de cortes coronales de cerebros de ratones Tg-SwDI.....	41

<b>Figura 12.</b> Procedimiento esquematizado de la técnica de inmunofluorescencia utilizando cortes coronales de cerebros de ratones Tg-SwDI. ....	41
<b>Figura 13.</b> Imágenes representativas de los cortes coronales de -2.155 mm a -2.480 mm del bregma de cerebros de ratones Tg-SwDI utilizados en los experimentos. Se muestra en azul la tinción de núcleos con DAPI. La escala es de 2.0 mm.....	47
<b>Figura 14.</b> Regiones estudiadas del hipocampo. Del lado izquierdo se muestra la referencia del Allen Mouse Brain Atlas y del lado derecho la imagen representativa del corte coronal de cerebro de ratón Tg-SwDI de 6 meses de edad, a -2.255 del bregma a una escala de 2.0 mm. Se muestra en azul la tinción de núcleos con DAPI. Se delimitan en líneas blancas las zonas tomadas como GD y CA1 para posteriores análisis. GD: Giro dentado. Modificado de Allen Mouse Brain Atlas.....	47
<b>Figura 15.</b> Imágenes representativas de CA1 de ratones Tg-SwDI que recibieron tres dosis intranasales de dexametasona (0.25 mg/Kg) o de solución salina isotónica, cada una a los 3, 4 y 5 meses de edad. Se muestra la tinción de Iba-1 en rojo. La escala es de 500 $\mu$ m. ....	48
<b>Figura 16.</b> Imágenes representativas del giro dentado de ratones Tg-SwDI que recibieron tres dosis intranasales de dexametasona (0.25 mg/Kg) o de solución salina isotónica, cada una a los 3, 4 y 5 meses de edad. Se muestra la tinción de Iba-1 en rojo. La escala es de 500 $\mu$ m. ....	49
<b>Figura 17.</b> Imágenes representativas del tálamo de ratones Tg-SwDI que recibieron tres dosis intranasales de dexametasona (0.25 mg/Kg) o de solución salina isotónica, cada una a los 3, 4 y 5 meses de edad. Se muestra la tinción de Iba-1 en rojo. La escala es de 500 $\mu$ m. ....	49
<b>Figura 18.</b> Cuantificación de la expresión de Iba-1 en microglía de ratones Tg-SwDI que recibieron tres dosis intranasales de dexametasona o de solución salina isotónica. Se muestran imágenes representativas del hipocampo y del tálamo a una escala de 2.0 mm, a partir de las cuales se cuantificaron las tres regiones por separado: CA1, giro dentado y tálamo. No se encontraron diferencias significativas en ninguno de los casos. Se muestran los promedios $\pm$ DE. Para el análisis estadístico se realizó una prueba de Mann Whitney ( $p \leq 0.05$ ) mediante el software GraphPad Prism 8.0.....	50
<b>Figura 19.</b> Imágenes representativas de la región CA1 del hipocampo de cerebros de ratones Tg-SwDI tratados intranasalmente con tres dosis de dexametasona (0.25 mg/Kg) o con solución salina isotónica en el caso del control, cada una a los 3, 4 y 5 meses de edad. Se muestra en azul la tinción de núcleos con DAPI, en rojo la expresión de Iba-1, en verde A $\beta$ y finalmente el merge, Las flechas blancas señalan las zonas de colocalización de Iba-1 y A $\beta$ . La escala es de 500 $\mu$ m.....	52
<b>Figura 20.</b> Imágenes representativas del giro dentado de cerebros de ratones Tg-SwDI tratados intranasalmente con tres dosis de dexametasona (0.25 mg/Kg) o con solución salina isotónica en el caso del control, cada una a los 3, 4 y 5 meses de edad. Se muestra en azul la tinción de núcleos con DAPI, en rojo la expresión de Iba-1, en verde A $\beta$ y finalmente el merge. Las flechas blancas señalan las zonas de colocalización de Iba-1 y A $\beta$ . La escala es de 500 $\mu$ m. ....	53

**Figura 21.** Imágenes representativas del tálamo de cerebros de ratones Tg-SwDI tratados intranasalmente con tres dosis de dexametasona (0.25 mg/Kg) o con solución salina isotónica en el caso del control, cada una a los 3, 4 y 5 meses de edad. Se muestra en azul la tinción de núcleos con DAPI, en rojo la expresión de Iba-1, en verde A $\beta$  y finalmente el merge. Las flechas blancas señalan las zonas de colocalización de Iba-1 y A $\beta$ . La escala es de 500  $\mu$ m. .... 53

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Características de la EAIP y EAIT .....	12
<b>Tabla 2.</b> Interacción de A $\beta$ con receptores de microglía involucrados en la Enfermedad de Alzheimer .....	25
<b>Tabla 3.</b> Efectos secundarios del uso de glucocorticoides a largo plazo.....	29
<b>Tabla 4.</b> Esquema de administración de los tratamientos.....	43
<b>Tabla 5.</b> Anticuerpos utilizados para los ensayos de inmunofluorescencia. ....	44

## Abreviaturas

AAC	Angiopatía Amiloide Cerebral
Ac	Anticuerpo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AF	Alexa Fluor
AICD	Dominio intracelular de la Proteína Precursora Amiloide
ApoE	Apolipoproteína E
APP	Proteína Precursora Amiloide
A $\beta$	Beta amiloide
BHE	Barrera hematoencefálica
C83	Fragmento carboxilo terminal de 83 aminoácidos
C99	Fragmento carboxilo terminal de 99 aminoácidos
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DXM	Dexametasona
EA	Enfermedad de Alzheimer
EAIP	Enfermedad de Alzheimer de Inicio Precoz
EAIT	Enfermedad de Alzheimer de Inicio Temprano
GPCRs	Receptores acoplados a proteínas G
h	horas
Iba-1	Molécula adaptadora de unión a calcio ionizado
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
IN	Intranasal
IV	Intravenoso(a)
kDa	kilo Dalton
LPS	Lipopolisacárido
M	mol/litro
min	minutos
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PSEN1	Presenilina 1
PSEN2	Presenilina 2
SRs	Receptores Scavenger
SSI	Solución Salina Isotónica
sAPP $\alpha$	Proteína Precursora Amiloide alfa soluble
sAPP $\beta$	Proteína precursora Amiloide beta soluble
SNC	Sistema Nervioso Central
TA	Temperatura Ambiente
TBS	Tris-buffer salino
Tg-SwDI	Modelo transgénico Swedish Dutch Iowa
TLR	Receptores tipo Toll
Tx	Tratamiento

## Resumen

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un desorden neurodegenerativo progresivo que se caracteriza por la acumulación de beta amiloide (A $\beta$ ) y ovillos neurofibrilares compuestos de proteína tau hiperfosforilada en el cerebro; por otro lado, la Angiopatía Amiloide Cerebral (AAC) es una neuropatología en la cual A $\beta$  se acumula en vasculatura cerebral, causando eventualmente hemorragias e infartos cerebrales.

Se sabe que una de las características de estas enfermedades es la neuroinflamación crónica, la cual puede ocasionar daño neuronal y muerte celular, contribuyendo sustancialmente a la patogenia y a la sintomatología clínica. Las células de microglía, al ser los macrófagos residentes del Sistema Nervioso Central (SNC), están involucradas en este proceso.

Los glucocorticoides son potentes antiinflamatorios, sin embargo, su uso en enfermedades del SNC ha sido limitado, principalmente debido a la gran cantidad de efectos adversos que ocasiona su uso crónico y sistémico.

Por otro lado, la vía intranasal tiene ciertas características que permiten el fácil acceso de moléculas al SNC, una de ellas es la evasión de la barrera hematoencefálica; por lo que, el uso de esta vía en enfermedades del SNC ha ganado interés en años recientes ya que se espera lograr una respuesta efectiva utilizando menores dosis de los fármacos y así mismo, disminuyendo los efectos secundarios ocasionados por la administración sistémica de estos.

Con la finalidad de evaluar el efecto de la dexametasona administrada por vía intranasal sobre microglía reactiva, se utilizaron ratones Tg-SwDI jóvenes que al cumplir los 6 meses de edad se sacrificaron para evaluar por medio de inmunofluorescencia la expresión del marcador de microglía reactiva, *Iba-1*, y la acumulación de A $\beta$ , esto último para determinar de manera cualitativa la asociación entre la activación de la microglía y su localización respecto a los agregados amiloides. Como controles se utilizaron ratones de la misma cepa y edad, a los

cuales se les administró solución salina isotónica, esto con el objetivo de comparar la respuesta de la microglía con y sin dexametasona.

En este trabajo se determinó que no hay diferencias significativas entre la expresión de *Iba-1* en microglía de ratones tratados por vía intranasal con dexametasona o solución salina isotónica en ninguna de las regiones evaluadas (hipocampo y tálamo). Adicionalmente, se observó que no hay cambios en la distribución de microglía reactiva respecto a los agregados amiloides en ambos grupos. Por otra parte, el análisis cualitativo apunta a una tendencia de disminución de la acumulación A $\beta$  en el hipocampo y tálamo de los ratones tratados con dexametasona; sin embargo, se necesitan más datos para un análisis cuantitativo.

En conclusión, se propone la cuantificación de más marcadores de microglía activada, así como de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias con el objetivo de tener más información acerca de las vías que pudieran estar involucradas; asimismo se propone la cuantificación de A $\beta$ . Esto en conjunto permitirá tener más claridad acerca del papel de la dexametasona sobre la microglía y la neuroinflamación en el modelo Tg-SwDI.

## Introducción

Se le denomina “demencia” al grupo de síntomas asociados con el deterioro del funcionamiento del cerebro (Alzheimer’s Association, 2022). La demencia se caracteriza por el declive de la capacidad cognitiva; afectando así la memoria, el aprendizaje, el pensamiento, la comprensión, el comportamiento social y el control emocional. Existen múltiples tipos de demencia, las cuales son ocasionadas por diferentes enfermedades que afectan al cerebro, como, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer (EA) y los accidentes cerebrovasculares (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2020).

La demencia tiene un gran impacto a nivel mundial, pues afecta a unos 50 millones de personas. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, se estima que en el año 2050 el número de personas con demencia alcanzará los 152 millones. Dentro de los casos reportados en la actualidad, la EA representa entre el 60-70 % (OMS, 2020).

Por lo tanto, es de suma relevancia contribuir al estudio de la EA ya que es considerada la causa más frecuente de demencia, además de que tiene un gran impacto en la sociedad debido a la naturaleza de la enfermedad y a la variedad de síntomas neuropsiquiátricos que ésta presenta y que, a su vez, ocasionan una restricción de las actividades diarias de los pacientes que la padecen (Piaceri et. al., 2013).

Un mayor entendimiento de la patología conducirá a nuevas oportunidades terapéuticas y a un mejoramiento de la calidad de vida de los pacientes.

## Enfermedad de Alzheimer

En 1907, el psiquiatra Alois Alzheimer describió el primer caso de la EA, correspondiente a una mujer de 51 años cuyos síntomas incluían un rápido deterioro de memoria, problemas de lenguaje y cambios en la conducta. A pesar de que en ese momento se conocían diferentes neuropatologías incluyendo demencia senil, la temprana edad de aparición, así como el hallazgo de ovillos neurofibrilares en el tejido cerebral de la paciente diferenciaron esta condición de las observadas anteriormente (Castellani et al., 2011 y National Institute on Aging [NIA], 2021).

La EA es un trastorno neurodegenerativo progresivo caracterizado por la acumulación en el cerebro del péptido  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) en forma de placas extracelulares y de la proteína tau hiperfosforilada, en forma de ovillos neurofibrilares intracelulares. Comúnmente la EA comienza con deterioro cognitivo amnésico, es decir, la memoria es la que se ve afectada principalmente; sin embargo, también puede presentarse deterioro cognitivo no amnésico (Knopman, et. al., 2021).

### Epidemiología

La EA es el tipo de demencia que afecta a adultos mayores con más frecuencia (Reyna, et. al., 2014). Se estima que alrededor de 46.8 millones de personas en el mundo padecen EA u otras demencias, mientras que para el 2030 este número podría incrementar hasta los 74.7 millones (BrightFocus Foundation, 2021).

En cuanto a los datos reportados por parte de la Secretaría de Salud, en México se estima que aproximadamente 1.3 millones de personas padecen esta enfermedad, representando entre un 60 y 70 % de los casos de demencia reportados en el país, siendo adultos mayores de 65 años los principalmente afectados.

Por otro lado, en Estados Unidos se realizó un estudio en el cual se reportó que para el año 2050 el número de personas mayores de 65 años que padezcan EA puede alcanzar los 12.7 millones en el país (Alzheimer's Association, 2022).

El envejecimiento poblacional en combinación con el aumento de la esperanza de vida tiene como consecuencia un aumento en el número de adultos mayores de al menos 65 años, y, por lo tanto, se incrementa también la incidencia de EA tomando en cuenta que uno de los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de esta enfermedad es la edad (Castellani et al., 2011).

### Tipos de Enfermedad de Alzheimer

De acuerdo con la edad de aparición de los síntomas, la EA se clasifica en dos tipos: Enfermedad de Alzheimer de inicio precoz (EAIP) y Enfermedad de Alzheimer de inicio tardío (EAIT). Las características generales de cada una se mencionan a continuación (Tabla 1).

La EAIT, también conocida como EA de tipo esporádico, es el tipo de la EA que predomina en la población. Las causas puntuales por las cuales se da el inicio y la progresión aún son desconocidas, sin embargo, se tiene la hipótesis de que la enfermedad empieza a desarrollarse de 20 a 30 años antes de que aparezcan los primeros síntomas, por lo que es probable que la enfermedad sea el resultado de una combinación de factores de riesgo asociados al estilo de vida o a factores genéticos (Foidl, B. M. & Humpel, C., 2020).

Por otro lado, la EAIP, también conocida como Alzheimer de tipo familiar, representa aproximadamente solo el 3 % de los casos de EA (Foidl, B. M. & Humpel, C., 2020). La enfermedad de Alzheimer de tipo familiar es ocasionada por mutaciones que se heredan con un patrón mendeliano. Las mutaciones implicadas ocurren en los genes *APP*, *PSEN1* y *PSEN2* (Piaceri, I., et. al., 2013).

**Tabla 1.** Características de la EAIP y EAIT

	<b>EAIT</b>	<b>EAIP</b>
<b>Edad de inicio</b>	Más de 65 años	Menor de 65 años
<b>Forma de presentación</b>	Amnésica	No amnésica
<b>Progresión</b>	Lenta	Rápida
<b>Neuropsicológica</b>	Peor memoria	Peor función ejecutiva, visuoespacial y praxias
<b>Patología</b>	Placas seniles y ovillos neurofibrilares	Placas seniles y ovillos neurofibrilares con más preservación de hipocampo
<b>Genotipo ApoE</b>	Favorecido por uno o dos alelos $\epsilon 4$	Favorecido por ausencia de alelos $\epsilon 4$

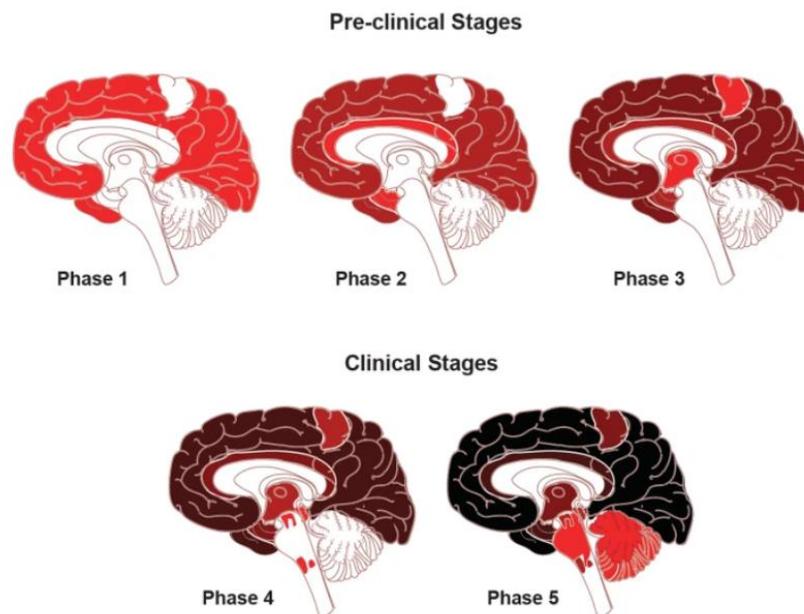
Modificado de (Tellechea, P. et. al, 2018)

### Patología

La EA ocasiona cambios neuropatológicos en el cerebro, entre los cuales se encuentran las placas amiloides extracelulares, que pueden ser difusas o fibrilares. Estas últimas generalmente están rodeadas de neuritas distróficas, astrocitos y microglia activados, lo cual se asocia con una pérdida de la sinapsis. Asimismo, se puede encontrar acumulación de oligómeros solubles de A $\beta$  de 40 a 42 residuos de aminoácidos que también son sinaptotóxicos. De forma paralela, en la EA, se forman agregados de proteína tau hiperfosforilada y mal plegada, mejor conocidos como ovillos o marañas neurofibrilares (Serrano-Pozo, A, et. al., 2011).

Estudios de imagenología indican que la evolución de la acumulación de A $\beta$  en el cerebro se puede describir en cinco fases (Figura 1). Las primeras tres fases se consideran como preclínicas porque no hay aparición de síntomas aún; en ellas se observa que la acumulación de A $\beta$  comienza en la neocorteza (fase 1), posteriormente se extiende a la alo corteza (fase 2) hasta llegar al diencefalo (fase 3). En las fases 4 y 5 el paciente ya presenta sintomatología, por lo que estas se

definen como etapas clínicas. En la fase 4 se observan depósitos en algunos núcleos del tronco encefálico, y finalmente, en la fase 5 la deposición amiloide se extiende hasta el cerebelo y núcleos adicionales del tronco encefálico (Thal, D. R.; et. al.,2002).



**Figura 1.** Fases de la deposición de Aβ en la Enfermedad de Alzheimer. Las áreas del cerebro que presentan deposición amiloide en cada una de las fases están representadas con color rojo. Por otro lado, el gradiente a colores más oscuros indica que la acumulación de Aβ es continua. (Hampel, H., et. al., 2021).

### Factores de riesgo

La EA es considerada como una enfermedad multifactorial, sin embargo, se sabe que la edad es el factor de riesgo más importante al hablar de EA y demencia; un claro ejemplo de ello está en que su prevalencia incrementa un 19 % en individuos de 75 a 84 años y de 30 a 35 % en mayores de 85 años (Armstrong, R. A., 2019).

En cuanto a los factores de riesgo genéticos, ciertas mutaciones han sido encontradas en pacientes con EAIP (Alzheimer de tipo Familiar), principalmente en los genes *APP*, *PSEN1* y *PSEN2*.

El procesamiento proteolítico de APP da lugar a la formación de péptidos A $\beta$ , por lo que, mutaciones en dicho gen pueden ocasionar un incremento de la producción de A $\beta$  y, por ende, un aumento en su acumulación (Armstrong, R. A., 2019). Por otro lado, la presenilina 1 (PSEN1) y presenilina 2 (PSEN2) están relacionadas con  $\gamma$ -secretasa, que es una de las enzimas que juega un papel importante en la proteólisis de APP, por lo que, de igual manera, mutaciones en dichos genes pueden provocar cambios en la producción de A $\beta$  (Kabir, M. et. al, 2020.).

Con respecto a la EAIT o esporádica, se sabe que un factor predisponente es la apolipoproteína E (ApoE), ya que, dependiendo del alelo que posea el individuo, éste puede incrementar la posibilidad de desarrollar la enfermedad si se trata del alelo  $\epsilon$ 4 o bien, de reducir dicho riesgo si se trata del alelo  $\epsilon$ 2 (Foidl, B, & Humpel, C., 2020). Sin embargo, más del 60 % de los casos de EAIT no están asociados con el alelo  $\epsilon$ 4 (Piaceri, I., 2013); por lo que, en realidad, el desarrollo y progresión de esta patología es más compleja y están involucrados otro tipo de factores de riesgo asociados al estilo de vida, como por ejemplo, el tipo de alimentación, estrés, consumo de alcohol y tabaco, exposición a metales pesados, inflamación crónica y factores vasculares como hipertensión, diabetes, hipercolesterolemia, entre otros (Foidl, B. M. & Humpel, C., 2020 ; Armstrong, R., 2019).

### Angiopatía amiloide cerebral

La angiopatía amiloide cerebral (AAC) es un desorden cerebrovascular que se caracteriza por la deposición de péptido A $\beta$  en las paredes de vasos sanguíneos cerebrales de tamaño pequeño y mediano (Kuhn J & Sharman T, 2021). En contraste con la EA, los depósitos amiloides vasculares están constituidos principalmente por A $\beta$ 40 (Viswanathan, A., & Greenberg, S. M., 2011).

La deposición amiloide en la vasculatura cerebral ocasiona el deterioro de los vasos sanguíneos, volviéndolos más frágiles y, en consecuencia, más susceptibles a las hemorragias cerebrales. La zona en la cual ocurra, así como la extensión de esta, son factores que van a determinar las complicaciones que presenten los pacientes

(Kuhn J & Sharman T, 2021); sin embargo, el lóbulo occipital es la zona del cerebro que suele ser afectada con mayor frecuencia y severidad en pacientes con AAC. (Yamada, M., 2000).

La AAC puede ser de tipo familiar o esporádica, tal como ocurre en la EA. En la AAC de tipo familiar están involucradas mutaciones en el gen *APP*, las cuales alteran el procesamiento de  $A\beta$  y pueden favorecer la producción de péptidos  $A\beta$  vasculotrópicos, mientras que en la de tipo esporádico aún no se tiene claro el mecanismo por el cual ésta se desarrolla; sin embargo, entre los factores que pudieran influir se encuentran la edad, la hipertensión, inmunoterapias anti- $A\beta$  y terapias trombolíticas o anticoagulantes. Por otro lado, existe evidencia de que el gen *ApoE* pudiera estar involucrado, pues se ha observado que personas que poseen el alelo  $\epsilon 2$  o  $\epsilon 4$  tienen mayor susceptibilidad a presentar hemorragias cerebrales en comparación con el resto de la población (Yamada, M., 2015; Kuhn J, & Sharman T., 2022).

### Relación Angiopatía Amiloide Cerebral y Enfermedad de Alzheimer.

La AAC se encuentra en pacientes que padecen EA con una incidencia del 80 al 90 % (Yamada, M., 2015), sin embargo, es importante mencionar que esta patología también puede desarrollarse en ausencia de la EA.

En otros trabajos, se ha demostrado la coexistencia de estas enfermedades; por ejemplo, al realizar autopsias de cerebros de personas mayores pertenecientes al Religious Order Study, se observó que la correlación entre la severidad de la AAC y EA fue de 0.68 (Arvanitakis, Z., et. al., 2011); mientras que los resultados obtenidos en otro estudio realizado a partir de datos recuperados del National Alzheimer's Coordinating Center de Estados Unidos demuestran que el grado de severidad de la AAC se correlacionaba con la densidad de las placas neuríticas que presentaban los cerebros, así como con el deterioro cognitivo de los pacientes. (Brenowitz, W.D., et. al., 2015).

A pesar de la coexistencia de estas enfermedades, los mecanismos por los cuales se desarrollan y ocasionan daño a los tejidos no han sido dilucidados por completo, pero al parecer son independientes entre sí ya que la EA promueve pérdida neuronal y sináptica mientras que la AAC genera lesiones tisulares por medio de hemorragias o lesiones isquémicas en el cerebro. Sin embargo, probablemente coexisten debido a que el péptido A $\beta$  tiene un papel patogénico en ambas enfermedades (Greenberg, et. al., 2020).

Asimismo, la presencia de AAC en EA se asocia con un declive cognitivo más marcado y cuyo desarrollo es más rápido, indicando que, a pesar de que los mecanismos implicados en cada patología son distintos, finalmente contribuyen a la sintomatología clínica (Greenberg, et. al., 2020).

## APP

La proteína precursora amiloide (APP) es una glicoproteína transmembranal cuyo procesamiento proteolítico da origen al péptido A $\beta$ , el cual puede tener una longitud de 38 a 43 aminoácidos (Rukmangadachar, L. A., & Bollu, P. C, 2022; Chow, V. W. et. al., 2010).

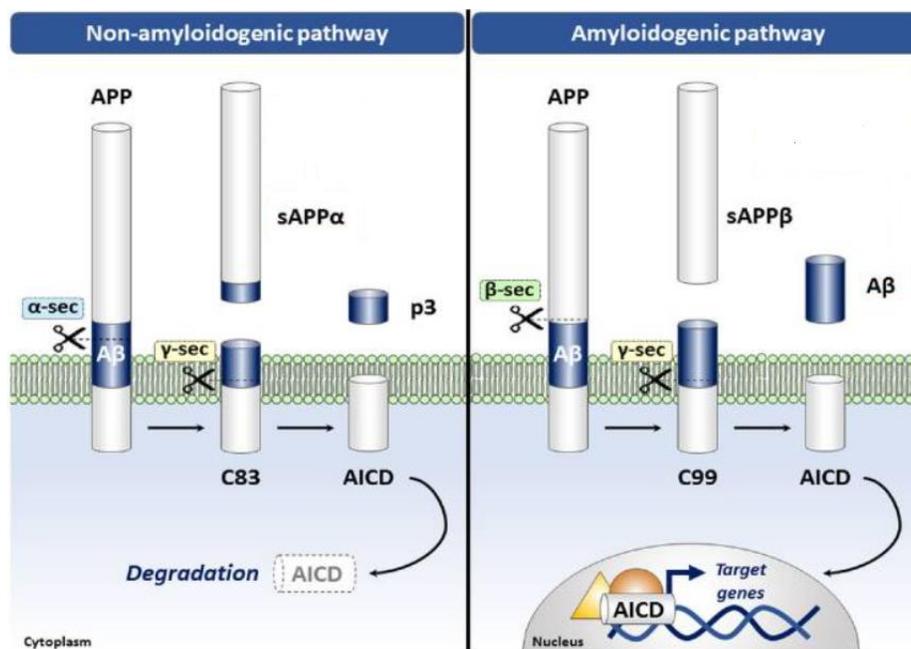
Actualmente se desconoce cuáles son las funciones fisiológicas de la APP, sin embargo, estudios recientes han propuesto que tiene un papel importante en el desarrollo neuronal y su maduración puesto que se ha observado una expresión elevada de APP en embriones que están en etapas tempranas del desarrollo del sistema nervioso; mientras que en cerebros adultos se propone que es una proteína multimodal capaz de modular diversos procesos biológicos, desde la regulación transcripcional hasta la regulación de la sinapsis (Müller et al., 2017; Coronel, R., et. al., 2019).

### Procesamiento de APP: producción de A $\beta$

Existen dos vías para el procesamiento de APP mediadas por enzimas proteolíticas: la vía amiloidogénica y la vía no amiloidogénica (Figura 2).

La vía no amiloidogénica como su nombre lo indica, se caracteriza por no producir péptido A $\beta$ , y, en condiciones homeostáticas, ésta es la vía predominante. En ella, la  $\alpha$ -secretasa realiza un corte sobre el dominio A $\beta$  de la APP, evitando la producción de este péptido y generando en su lugar el fragmento sAPP $\alpha$ , que es liberado al medio extracelular, mientras que el fragmento del carboxilo terminal, C83, permanece en la membrana celular. Posteriormente, la  $\gamma$ -secretasa ejerce un corte sobre C83, produciendo el péptido soluble p3 y el fragmento AICD (Amyloid precursor protein intracellular domain), los cuales son liberados al medio extracelular y al citoplasma, respectivamente (Coronel, R., et. al., 2019).

Por otro lado, la vía amiloidogénica se caracteriza por la producción de péptido A $\beta$ . En esta vía, la  $\beta$ -secretasa realiza el primer corte sobre APP fuera del dominio de A $\beta$ , por lo que la formación de este péptido no puede ser evitada. Como resultado de este primer corte, se generan el fragmento sAPP $\beta$ , que es liberado al medio extracelular, y el extremo carboxilo terminal C99. Posteriormente, la  $\gamma$ -secretasa realiza un corte sobre C99, liberando el péptido A $\beta$  al medio extracelular y el fragmento AICD al citoplasma (Coronel, R., et. al., 2019). Los fragmentos de A $\beta$  tienden a agregarse y a formar las placas amiloides características de la EA (Chow, V. W. et. al., 2010).



**Figura 2.** Procesamiento proteolítico de APP: vía amiloidogénica y vía no amiloidogénica. En la vía no amiloidogénica, la  $\alpha$ -secretasa realiza un corte sobre el dominio A $\beta$  de la APP, generando el fragmento sAPP $\alpha$  que es liberado al medio extracelular y C83 que permanece en la membrana. Posteriormente la  $\gamma$ -secretasa realiza un corte sobre C83, produciendo p3 y el fragmento AICD, que son liberados al medio extracelular y al citoplasma respectivamente. Por otro lado, en la vía amiloidogénica la  $\alpha$ -secretasa realiza un corte sobre APP fuera del dominio de A $\beta$ , generando sAPP $\beta$  que es liberado al medio y C99 que permanece en la membrana. La  $\gamma$ -secretasa realiza el segundo corte sobre C99, generando A $\beta$  y AICD. En esta vía AICD actúa como un regulador transcripcional de varios genes, mientras que en la no amiloidogénica es degradado. APP: proteína precursora amiloide;  $\alpha$ -sec:  $\alpha$ -secretasa;  $\beta$ -sec:  $\beta$ -secretasa;  $\gamma$ -sec:  $\gamma$ -secretasa; sAPP $\alpha$ :APP- $\alpha$  soluble; sAPP $\beta$ :APP- $\beta$  soluble; AICD: Amyloid precursor protein intracelular domain; A $\beta$ : péptido  $\beta$ -amiloide. (Adaptación de Coronel, R., et. al., 2019).

Como resultado de los cortes de la  $\beta$  y  $\gamma$ -secretasa, se pueden generar monómeros de A $\beta$  de diferentes longitudes. Las isoformas solubles más comunes son: A $\beta$ <sub>1-40</sub> (<80 %), A $\beta$ <sub>1-38</sub> (<20 %) y A $\beta$ <sub>1-42</sub> (10 %). i) A $\beta$ <sub>1-40</sub>, que es la isoforma más soluble y abundante en la patogénesis de la AAC, tiende a depositarse en vasculatura, ii) A $\beta$ <sub>1-38</sub> tiende a agregarse menos tanto en parénquima como en vasculatura y, iii) A $\beta$ <sub>1-42</sub> es el péptido más patogénico en EA puesto que es el más hidrofóbico, lo que favorece su agregación en oligómeros y fibrillas (Tarasoff-Conway, J. M., et. al., 2015).

El péptido A $\beta$  está altamente conservado pues tiene una homología de alrededor del 60 y 70 % entre la secuencia de humano y de otros vertebrados. En consecuencia, esto sugiere que también tiene funciones fisiológicas, las cuales aparentemente dependen de la isoforma de A $\beta$ . Entre las funciones que han sido encontradas, se ha observado que monómeros de A $\beta$ <sub>42</sub> promueven la proliferación de células madre neuronales de humano y gliogénesis, mientras que monómeros de A $\beta$ <sub>40</sub> promueven la diferenciación neuronal (Coronado, R., et. al., 2019).

En cuanto al resto de los fragmentos generados durante el procesamiento proteolítico de APP, las funciones aún no son del todo conocidas. Se asocia a sAPP $\alpha$  con funciones neuroprotectoras y neurotróficas, las funciones de sAPP $\beta$  son desconocidas y en cuanto a C83 y C99 no se han descubierto funciones biológicas relevantes (Chow, V. W. et. al., 2010); Coronel, R., et. al., 2019).

## Eliminación de A $\beta$

La eliminación de A $\beta$  del cerebro es un proceso importante puesto que su deficiencia, puede provocar la acumulación del péptido. Existen evidencias de que incluso la eliminación de A $\beta$  tiene mayor influencia en el desarrollo de la EA que un aumento en su producción. Además, las deficiencias en la eliminación son de relevancia puesto que también pueden predisponer al desarrollo de AAC. (Yoon, S. S., & Jo, S. A., 2012.).

Diferentes mecanismos están involucrados en la eliminación de A $\beta$ , los que se conocen hasta el momento incluyen la degradación enzimática, el drenaje perivascular, la fagocitosis y el transporte a través de la barrera hematoencefálica; sin embargo, se desconoce cuánto contribuye cada uno de ellos (Greenberg, S. M., et. al.,2020)

## Neuroinflamación

La inflamación es un proceso mediado por el sistema inmunológico cuyo propósito es proteger y defender al organismo de estímulos extraños y patógenos mediante el control y eliminación de estos; sin embargo, cuando ocurre de manera exacerbada y crónica, puede tener un efecto contraproducente puesto que favorece el daño en el tejido afectado (Lyman, M., et. al., 2014).

En la respuesta inflamatoria están involucrados diferentes tipos de células que interactúan entre sí, además de mediadores proinflamatorios y moléculas de señalización como prostaglandinas, citocinas, óxido nítrico, entre otras (Lyman, M., et. al., 2014).

De manera concreta, la neuroinflamación es un término que describe las respuestas inflamatorias que se dan en el SNC y que involucran a las células presentes en el mismo, como la microglía y los astrocitos. El grado de neuroinflamación depende del contexto, la duración y el tipo de estímulo que desencadenó la respuesta. (DiSabato, D. J., et. al., 2016).

En el caso de la EA, se sabe que una de las características de la patología es la neuroinflamación crónica, la cual contribuye al daño en el SNC, al deterioro sináptico y, por ende, a la sintomatología. Además, se ha observado que en la EA se genera un microambiente que favorece la auto propagación de neuroinflamación ya que, por un lado, los mediadores proinflamatorios pueden contribuir a una aceleración en el proceso de acumulación de agregados amiloides y proteína tau hiperfosforilada y, por otro lado, el desarrollo de la enfermedad inicia y contribuye a la neuroinflamación y promueve la activación de astrocitos y microglía, lo que resultará eventualmente en una mayor producción de moléculas proinflamatorias (Lyman, M., et. al., 2014).

## Microglía

La microglía tiene un rol importante en la neuroinflamación puesto que es la población de macrófagos residentes del SNC y, por lo tanto, está implicada en la defensa y reparación de este (Perry, V. et. al., 2010; Shabab, T., et. al. 2017). Se ha demostrado que la microglía proviene de los precursores del saco vitelino embrionario y que mantiene su población en el SNC mediante autorrenovación, es decir, hay poca contribución por parte de las células sanguíneas (Li, Q., & Barres, B. A., 2018)

La distribución de la microglía no es homogénea, siendo el hipocampo, ganglios basales y la sustancia negra las regiones más pobladas. No se conoce exactamente por qué su distribución es heterogénea, pero podría deberse a que la microglía tenga funciones homeostáticas localizadas, lo cual implica que su participación en procesos neurodegenerativos, así como la sensibilidad a una desregulación de la microglía, también sea diferente según la región (Rawlinson, C., et. al., 2020).

Anteriormente se hacía uso del término “microglía en reposo” para referirse a aquella microglía que no está involucrada en un contexto patológico (Perry, V. et. al., 2010); sin embargo, la microglía es una población celular que está en continuo

funcionamiento, y cuya participación es esencial para el mantenimiento de la homeostasis y no únicamente en procesos patológicos.

### Funciones

La microglía es principalmente reconocida porque se encarga de examinar el entorno en el que se encuentra en busca de patógenos, cuerpos extraños y células apoptóticas con el objetivo de fagocitar dichos elementos y mantener la homeostasis (Lee, C. & Landreth, G., 2010); sin embargo, la microglía lleva a cabo otras funciones que de igual manera son esenciales para el desarrollo del cerebro y el mantenimiento de la homeostasis, ya que además interactúa con otras células que residen en el SNC tales como las neuronas, oligodendrocitos y astrocitos (Borst, K., Dumas, A. A., & Prinz, M., 2021).

Durante el desarrollo del cerebro se forma una gran cantidad de sinapsis, sin embargo, para un correcto funcionamiento de la red neuronal algunas deben ser eliminadas. En este proceso mejor conocido como “poda sináptica”, la microglía detecta y engulle el material sináptico de las neuronas menos activas. Asimismo, la microglía también se encarga de la eliminación de células apoptóticas, lo cual previene la inflamación y la autoinmunidad (Bohlen, C. J., et. al., 2019).

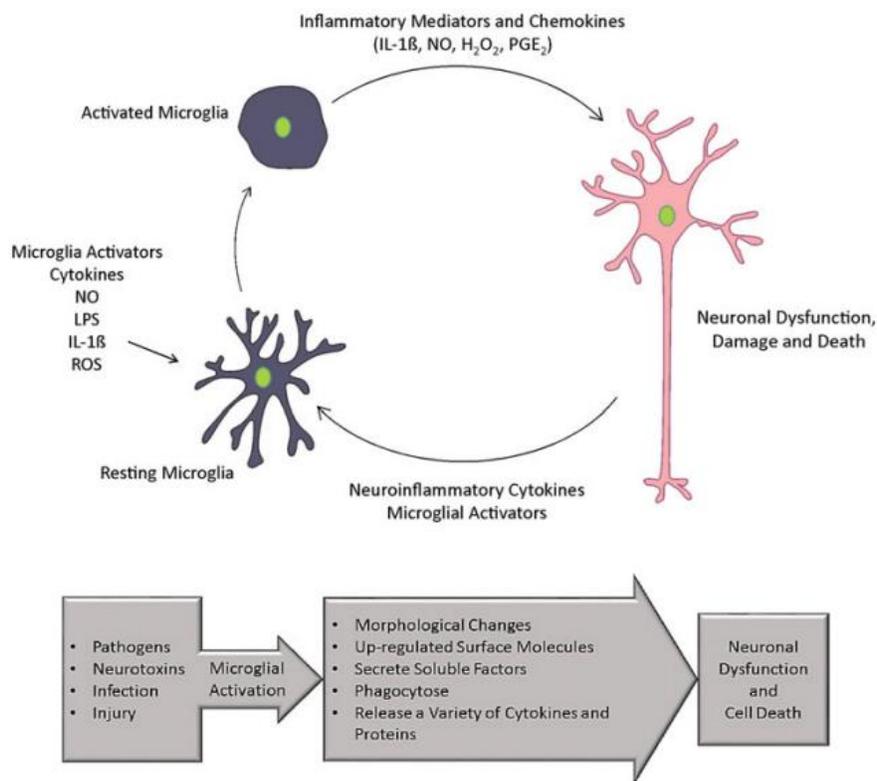
La microglía postnatal participa en el proceso de maduración de los oligodendrocitos, en su mantenimiento y en el proceso de mielinogénesis, aunque los mecanismos por los cuales se lleva a cabo esta interacción entre ambos tipos celulares aún no han sido dilucidados por completo (Borst, K., Dumas, A. A., & Prinz, M., 2021).

Por otro lado, los astrocitos proveen a la microglía de factores tróficos como CSF1, IL-34, TGF- $\beta$  y colesterol, promoviendo sus funciones y morfología homeostática. Durante la poda sináptica, los astrocitos detectan sinapsis redundantes y secretan IL-33, la cual recluta a la microglía. Además, ambas células se coordinan para la eliminación de células apoptóticas, siendo la microglía la que se encarga de fagocitar dendritas, cuerpos celulares y núcleos mientras que los astrocitos

fagocitan cuerpos dendríticos apoptóticos pequeños (Borst, K., Dumas, A. A., & Prinz, M., 2021).

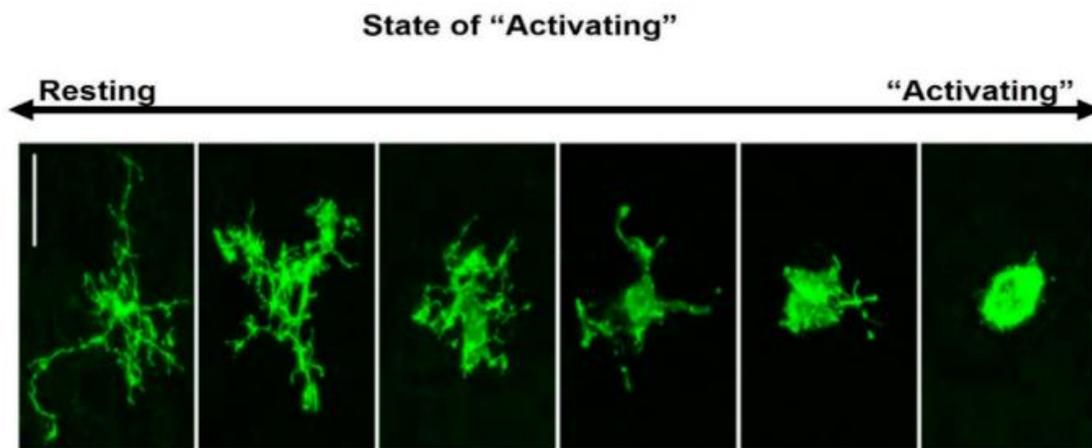
### Microglía activada

Ante algún signo de infección, daño o estímulo anormal, la microglía se activa, prolifera, migra a los sitios donde esto está ocurriendo y ejerce su función reclutando otras células, realizando fagocitosis y secretando factores apoptóticos, proinflamatorios y otros compuestos neurotóxicos (Figura 3). La activación de la microglía tiene como objetivo eliminar los patógenos, teniendo un papel neuroprotector; sin embargo, durante el proceso también puede matar neuronas sanas, por lo que, si la neuroinflamación es persistente y eventualmente crónica, el efecto será neurodegenerativo. En general, la activación de la microglía es un proceso complejo, puesto que hay cambios visibles en su morfología, pero también en el perfil de expresión de genes y proteínas (Shabab, T., et. al. 2017).



**Figura 3.** Activación de la microglía y muerte neuronal. (Shabab, T., et. al. 2017).

La morfología de la microglía puede variar de acuerdo con la edad, el sexo y la región; sin embargo, los mayores cambios morfológicos ocurren cuando hay algún proceso patológico o inflamatorio (Figura 4). En homeostasis, la microglía tiene una forma ramificada y con un soma pequeño, esto le permite extraer y retraer sus procesos para monitorear su entorno; sin embargo, al estar en un ambiente inflamatorio, la microglía retrae los procesos, adoptando una forma amebode (Rawlinson, C., et. al., 2020 & Davis, B. M., et. al., 2017).



**Figura 4.** Morfología de la microglía (Rawlinson, C., et. al., 2020).

Anteriormente la microglía activada era categorizada según sus funciones predominantes en microglía proinflamatoria (M1) o antiinflamatoria (M2), además del estado en "reposo", también conocido como M0. Sin embargo, actualmente se prefiere no usar dicha clasificación puesto que asume que la población de la microglía es homogénea, polariza su fenotipo y su función, mientras que omite que hay otros fenotipos intermedios en los cuales hay diferentes perfiles de expresión. Por lo que, a pesar de que actualmente no hay una clasificación oficial de los diferentes fenotipos de microglía activada, se recomienda que este sea descrito por mediciones fisiológicas cuantitativas y no solamente por mediciones cualitativas como lo es la morfología (Rawlinson, C., et. al., 2020 & Davis, B. M., et. al., 2017).

Se han realizado estudios transcriptómicos en poblaciones celulares de modelos murinos de enfermedades neurodegenerativas, y se ha encontrado que la microglía activada expresa un set de genes mejor conocidos como DAM o microglía asociada a daño. En general, este tipo de microglía expresa más genes asociados a lisosomas, fagosomas y presentación de antígenos. (Bohlen, C. J., et. al., 2019).

### Iba-1

La proteína Iba-1 (molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1) es un miembro del grupo de proteínas que se unen a calcio, su peso molecular es de 17 kDa y dado que se expresa en microglía y en macrófagos, es utilizada como marcador de estos tipos celulares, ya que, además, la secuencia de Iba-1 está altamente conservada entre humanos y animales (Korzhevskii, D. E., & Kirik, O. V. 2016).

Las funciones de Iba-1 son poco conocidas, sin embargo, se ha observado que participa en procesos que ocurren durante la fagocitosis (Ohsawa, K., et. al., 2004).

Por otro lado, se ha reportado que la expresión de Iba-1 está aumentada en microglía activada de personas con diferentes enfermedades cerebrales; por lo que en otros estudios se ha utilizado a esta proteína como un marcador de microglía activada y en la caracterización de su morfología, distribución, así como para su cuantificación (Shi, F. J., et. al., 2021).

### Microglía en Enfermedad de Alzheimer

La microglía puede responder no sólo a signos de infección o daño, sino que también puede ser activada por otros estímulos como A $\beta$ , prueba de ello es que, en cerebros de personas con EA y en modelos murinos, se ha observado que la microglía se encuentra activada y rodeando a las placas amiloides (Lee, C. & Landreth, G., 2010, Yu, Y., & Ye, R. D., 2015). Estas placas pueden tener distinta morfología; las compactas suelen estar en contacto cercano con la microglía de los

alrededores, mientras que las placas difusas suelen estar en regiones donde la microglía no es muy abundante (Bohlen, C. J., et. al., 2019).

A $\beta$  activa a la microglía por medio de distintos receptores de membrana (Tabla 2), entre los cuales se encuentran receptores de tipo Scavenger, acoplados a proteínas G y receptores tipo Toll. Asimismo, existe evidencia de que el receptor TREM2 también interactúa directamente con A $\beta$  y regula su degradación y otros procesos de la microglía como la migración (Zhao, Y., et. al., 2018).

**Tabla 2.** Interacción de A $\beta$  con receptores de microglía involucrados en la Enfermedad de Alzheimer

Receptor		Unión a A $\beta$	Expresión	Importancia en EA (microglía)
SRs	SCARA-1	sA $\beta$ y fA $\beta$	Microglía, macrófagos, monocitos	↑ fagocitosis de sA $\beta$ y fA $\beta$
	CD36	fA $\beta$	Microglía, macrófagos, monocitos, astrocitos	↑ ROS y fagocitosis de A $\beta$
	RAGE	sA $\beta$	Microglía y astrocitos	Induce mediadores proinflamatorios y migración celular
GPCRs	CMKLR1	sA $\beta$	Microglía y astrocitos	↑ captación de A $\beta$
TLRs	CD14/TLR2/TLR4	fA $\beta$	Microglía	Induce respuesta inflamatoria y fagocitosis de A $\beta$

Modificado de (Yu, Y., & Ye, R. D., 2015).

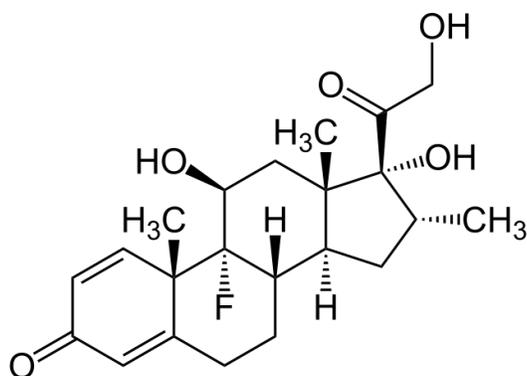
En etapas tempranas de la EA, la microglía se asocia con las placas amiloides y forma una barrera protectora alrededor de las mismas con el propósito de compactarlas y que sean menos tóxicas para las neuronas, así como para prevenir su extensión. (Hansen, D. V., et. al., 2018). Además, se han observado agregados de A $\beta$  en endosomas y lisosomas de microglía, confirmando así su capacidad de fagocitosis de oligómeros de A $\beta$  (Bohlen, C. J., et. al., 2019).

A pesar de sus funciones protectoras, existe evidencia de que la actividad de la microglía, sobre todo en etapas tardías de la EA, puede tener efectos dañinos y neurodegenerativos, ya el avance de la EA puede resultar en una disminución de la capacidad fagocítica de la microglía, lo cual repercute directamente sobre la eliminación de A $\beta$  (Lee, C. & Landreth, G., 2010).

Aunado a la disminución de la capacidad fagocítica, la microglía mantiene su habilidad de producir citocinas proinflamatorias en respuesta a A $\beta$ , las cuales pueden reducir la expresión de receptores a A $\beta$  y enzimas, llevando a una menor capacidad de eliminación de A $\beta$ , mayor acumulación, así como a la persistencia del ambiente inflamatorio (Yu, Y., & Ye, R. D., 2015). En conjunto, esto favorece la progresión de la enfermedad.

## Dexametasona

La dexametasona (DXM) es un corticoesteroide fluorado con alta capacidad antiinflamatoria e inmunosupresora de larga duración de acción (Vademecum, 2021). La DXM tiene una gran variedad de usos terapéuticos, incluyendo el tratamiento de enfermedades endócrinas, reumáticas, alérgicas, dermatológicas, oftálmicas, gastrointestinales, neoplásicas, entre otras; incluso se recomendó su uso a partir de junio del 2020 para el tratamiento de COVID-19 en personas con síntomas respiratorios severos (DrugBank., 2022).



**Figura 5.** Estructura química de la dexametasona

### Mecanismo de acción

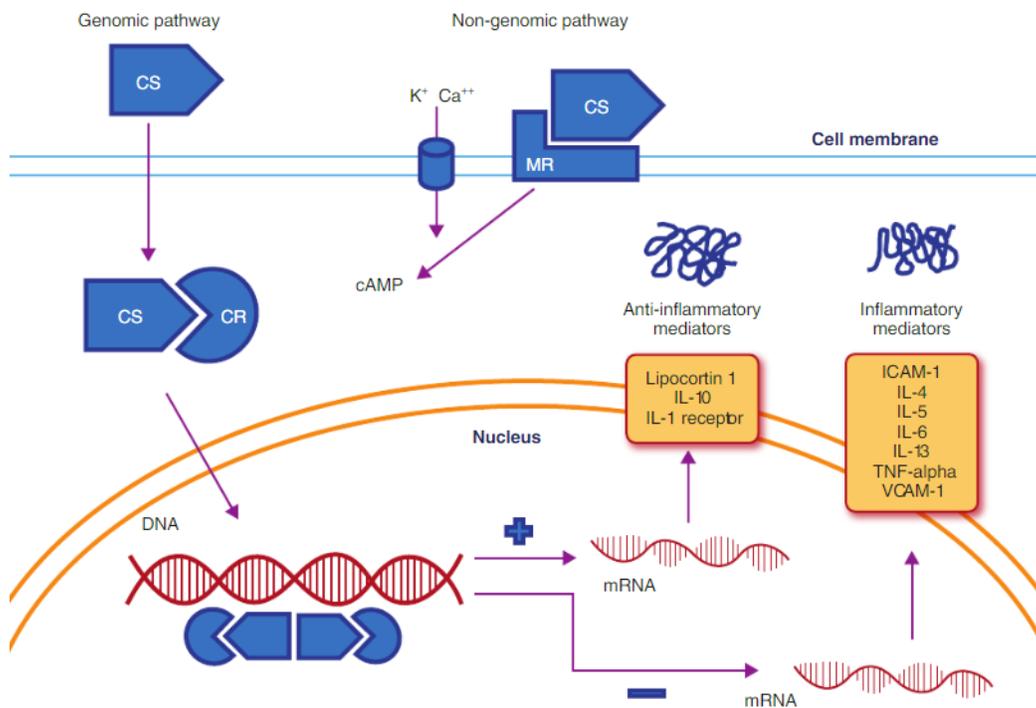
Por su estructura pequeña y lipofílica, los corticoesteroides son capaces de atravesar la membrana celular y posteriormente entrar al citoplasma, en donde se unen a receptores de glucocorticoides intracitoplasmáticos. La activación de estos receptores ocasiona que el complejo fármaco-receptor sea traslocado al núcleo, en donde se une de manera reversible a sitios específicos del ADN (Yasir M, et. al., 2022).

En general, existen tres mecanismos moleculares implicados en los efectos de los corticoesteroides (Figura 6). En el primero, mejor conocido como transactivación, el complejo fármaco-receptor se une a secuencias de ADN localizadas en regiones promotoras de genes que inducen la transcripción de moléculas antiinflamatorias, como IL-10, el receptor de IL-1 o lipocortina 1. De manera alterna, en la transrepresión el complejo fármaco-receptor regula de manera negativa factores de transcripción proinflamatorios, como la proteína activadora-1 y NF- $\kappa$ B, lo cual inhibe la transcripción de genes con un papel importante en la inflamación, afectando la síntesis de diversas citocinas como IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-4, entre otras. (Sibila, O. et. al., 2015; Yasir M, et. al., 2022).

En el tercer mecanismo, los corticoesteroides se unen a receptores localizados en la membrana celular e intervienen segundos mensajeros. Al ser un mecanismo no

genómico, algunos le atribuyen los efectos más rápidos de los corticosteroides. (Sibila, O. et. al., 2015; Yasir M, et. al., 2022).

Al alterar la producción de mediadores inflamatorios por medio de los mecanismos anteriormente mencionados, los glucocorticoides provocan la supresión del sistema inmunológico y una disminución de la inflamación, ya que además se dirigen a una amplia variedad de células, incluidos los linfocitos T, los macrófagos, los neutrófilos, los eosinófilos y los basófilos. Algunos de los efectos posteriores de los glucocorticoides incluyen: la inhibición de la adhesión de neutrófilos a las células endoteliales, disminución de la proliferación de fibroblastos, disminución de la fagocitosis y de la presentación de antígenos por macrófagos, disminución de la producción de citocinas por macrófagos y linfocitos, inhibición de la fosfolipasa A2 como efecto de la síntesis de lipocortina-A, lo que resulta en una reducción en la síntesis de derivados del ácido araquidónico, entre otros (Yasir M, et. al., 2022).



**Figura 6.** Mecanismo de acción de los corticosteroides en la inhibición de la inflamación (Sibila, O. et. al., 2015).

### Efectos secundarios

Dado que los glucocorticoides son estructural y farmacológicamente similares a la hormona endógena cortisol, están implicados una gran variedad de funciones celulares, por lo cual los efectos secundarios son muy comunes. Se ha reportado que más del 90 % de los pacientes en tratamientos con una duración mayor a 60 días presentan efectos secundarios (Tabla 2), los cuales pueden ser endócrinos, neuropsiquiátricos, gastrointestinales, musculoesqueléticos, cardiovasculares, oculares o inmunológicos (Oray, M., et. al., 2016).

**Tabla 3.** Efectos secundarios del uso de glucocorticoides a largo plazo

<b>Sistema afectado</b>	<b>Efectos secundarios</b>
<b>Musculoesquelético</b>	Osteoporosis, necrosis avascular en huesos, miopatía
<b>Endócrino y Metabólico</b>	Hiperglicemia, diabetes mellitus, dislipidemia ganancia de peso, síndrome de Cushing, supresión del crecimiento, supresión adrenal
<b>Gastrointestinal</b>	Gastritis, úlcera péptica, sangrado gastrointestinal, perforación visceral, esteatosis hepática, pancreatitis
<b>Cardiovascular</b>	Hipertensión, enfermedad coronaria, cardiopatía isquémica, fallo cardiaco
<b>Dermatológico</b>	Dermatoporosis, atrofia cutánea, equimosis, púrpura, erosiones, estrías, retraso en la cicatrización, moretones, acné, hirsutismo, pérdida capilar
<b>Neuropsiquiátrico</b>	Cambios en el estado de ánimo, depresión, euforia, irritabilidad, acatisia, ansiedad, deterioro cognitivo, psicosis, demencia
<b>Oftalmológico</b>	Cataratas, glaucoma, ptosis, midriasis, infecciones oculares oportunistas, coriorretinopatía serosa central
<b>Inmunológico</b>	Supresión de la inmunidad celular, predisposición a infecciones, reactivación de infecciones latentes

Modificada de (Oray, M., et. al., 2016).

## Dexametasona en Enfermedad de Alzheimer y Angiopatía Amiloide Cerebral

Como se ha mencionado anteriormente, se sabe que en la EA están involucrados varios procesos inflamatorios, por lo tanto, existe el interés de estudiar si estos tienen un papel patogénico y si su inhibición reduce el riesgo y el desarrollo de la enfermedad. Como ya se ha mencionado, los corticoesteroides son fármacos con un potente efecto antiinflamatorio, por lo que el estudio de su administración en enfermedades del SNC es interesante; sin embargo, el número de investigaciones que analicen el efecto de la dexametasona u otros corticoesteroides es limitado, probablemente debido a que el uso crónico de este tipo de medicamentos ocasiona muchos efectos secundarios (Beeri, M. S., et. al., 2012).

No obstante, en un estudio *post mortem* se analizaron cerebros de personas que presentaron placas neuríticas, ovillos neurofibrilares y que hubieran estado en tratamiento con corticoesteroides; como resultado encontraron que los cerebros con estas características presentaban una disminución del 50 % de placas y ovillos neurofibrilares en comparación con los cerebros de sujetos no medicados (Beeri, M. S., et. al., 2012). Por otro lado, se ha observado que la administración de altas dosis de corticoesteroides de manera crónica puede agravar el déficit cognitivo observado en la EA (Joshi et al., 2012); sin embargo, en otros estudios realizados en ratones se ha observado que la administración de dexametasona en bajas concentraciones y de manera aguda tiene efectos antiinflamatorios y que reduce la expresión de IL-6 y TNF- $\alpha$  mediada por A $\beta$  (Hui, Z., et. al., 2020).

Respecto a la AAC, algunos reportes indican que el tratamiento con esteroides reduce la neuroinflamación, las hemorragias recurrentes y el déficit cognitivo características de esta enfermedad (Previti, M. L., et. al., 2006); sin embargo, esto aún debe ser estudiado. Por otro lado, en un modelo *in vitro* de AAC en el que se utilizaron células de músculo liso cerebrovascular, el tratamiento antiinflamatorio con dexametasona no tuvo efecto sobre la acumulación vascular de A $\beta$ ; sin embargo, sí redujo los procesos de inflamación y degeneración celular, los cuales probablemente contribuyen a la sintomatología observada en estas enfermedades (Previti, M. L., et. al., 2006).

## Administración Intranasal de Dexametasona

Actualmente la dexametasona suele ser administrada por vía oral, intravenosa, intramuscular e intraarticular (Vademecum, 2021), sin embargo, estas vías tienen una baja eficiencia en alcanzar el cerebro, y, como se ha mencionado previamente, altas dosis o un uso prolongado de glucocorticoides puede ocasionar una gran variedad de efectos no deseados (Oray, M., et. al., 2016). Por ello, la alternativa de una administración intranasal es atractiva además de que cuenta con varias ventajas que se abordarán más adelante.

Perez-Osorio, et. al. (2021), realizaron un estudio de biodistribución de dexametasona en cerebros de ratones C57BL/6, administrando una dosis de 0.25 mg/kg a cada ratón. Los resultados indicaron que hay una mayor y más rápida distribución de dexametasona en el cerebro en regiones importantes como los ganglios basales al utilizar la vía de administración IN en comparación con la vía IV. Por otro lado, en un modelo murino de sepsis en el cual se utilizó LPS, la administración IN de dexametasona controló de manera más eficiente la neuroinflamación que la administración IV, reduciendo la activación de astrocitos reactivos y los niveles de IL-6 (Meneses, G., et. al., 2017).

Estos resultados indican que la vía IN pudiera ser una mejor alternativa para el control de la neuroinflamación en EA y AAC, potencialmente reduciendo la sintomatología de estas enfermedades y los efectos secundarios asociados a la administración sistémica y crónica de los glucocorticoides.

## Vía de administración intranasal

A pesar de que la vía de administración oral es la más usada, no siempre es la ideal debido a la biodisponibilidad de algunos compuestos y a la accesibilidad del fármaco al blanco terapéutico. Se han buscado otras alternativas que puedan disminuir dicho problema, siendo la vía intranasal una buena opción (Pires, A., et. al., 2009; Bitter, C., et. al., 2011).

La vía intranasal tiene una serie de ventajas que hacen que haya ganado el interés en años recientes; por ejemplo, la mucosa nasal es de fácil acceso y por lo tanto, facilita el ingreso de moléculas pequeñas y grandes, es ideal para fármacos poco estables en el tracto gastrointestinal o que se absorben poco en el intestino, el tiempo de acción es menor, se evade el metabolismo hepático del primer paso, no hay degradación gastrointestinal ni toxicidad en pulmones, no es invasiva, es fácil de autoadministrar y, además, los dispositivos que se requieren para su administración son menos costosos que los utilizados en vías invasivas (Pires, A., et. al., 2009; Bitter, C., et. al., 2011; Erdő, F., et. al., 2018).

En el presente trabajo, esta vía de administración es de particular interés ya que por medio de ella es posible evadir la barrera hematoencefálica, permitiendo que el acceso de compuestos activos en el SNC sea más directo; otro punto muy importante es que se evitan los efectos no deseados de la administración sistémica de los fármacos, en este caso de la dexametasona (Pires, A., et. al., 2009; & Chapman, C. D., et. al., 2013). Por lo tanto, la vía IN podría ser una alternativa para el tratamiento de enfermedades del SNC.

### Características de los fármacos para la administración intranasal

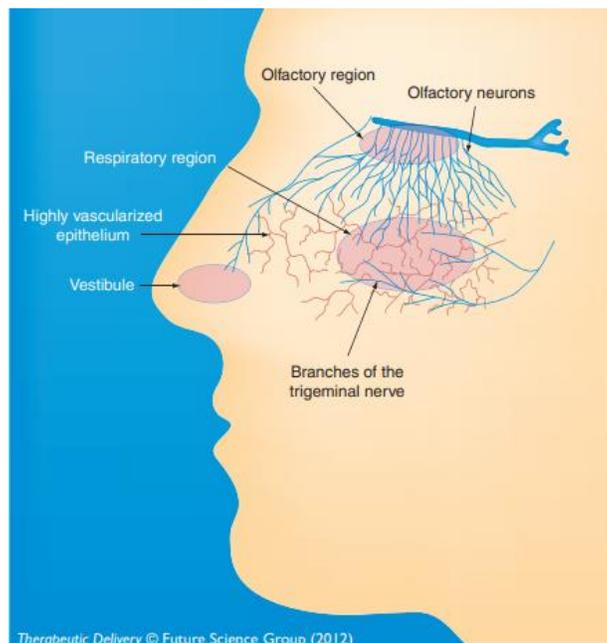
Los fármacos que sean administrados por vía intranasal deben tener ciertas características fisicoquímicas, ya que el peso molecular, la lipofiliidad, el pKa y la solubilidad del fármaco pueden influir en su absorción (Pires, A., et. al., 2009).

La membrana nasal es lipofílica en su mayoría, por lo tanto, las moléculas lipofílicas son generalmente absorbidas de manera eficiente en la cavidad nasal por medio de mecanismos transcelulares, sobre todo si son pequeñas; sin embargo, cabe mencionar que moléculas muy lipofílicas no se disuelven fácilmente en el ambiente acuoso de la cavidad nasal, dificultando la permeabilidad. Por otro lado, las moléculas hidrofílicas generalmente tienen una baja eficiencia de absorción y ésta depende fuertemente del tamaño molecular de las mismas (Pires, A., et. al., 2009).

Por último, otro factor que puede afectar la absorción es el pKa pues éste va a determinar si la molécula se encuentra en su forma ionizada o no ionizada dependiendo del pH del sitio de absorción (el epitelio nasal tiene un pH de 5.5-6.5), siendo la fracción no ionizada más permeable. Conforme a la clasificación biofarmacéutica, los fármacos que son mejores candidatos a esta vía de administración son los de clase I, es decir, aquellos con alta permeabilidad y solubilidad (Pires, A., et. al., 2009; Bitter, C., et. al., 2011).

### Mecanismos de administración intranasal

Aunque existen diferencias anatómicas y prioridades entre el ratón y el humano, la nariz es un órgano que tiene varias funciones fisiológicas como la respiración, el olfato, la humidificación y calentamiento del aire que es aspirado, entre otras. En cuanto a la anatomía, está compuesta por dos cavidades simétricas divididas por el septum nasal (Campbell, C., et. al., 2012); y, a su vez, la cavidad nasal puede dividirse en tres regiones (Figura 7), es decir: la vestibular, la respiratoria y la olfatoria (Pires, A., et. al., 2009; Bitter, C., et. al., 2011).

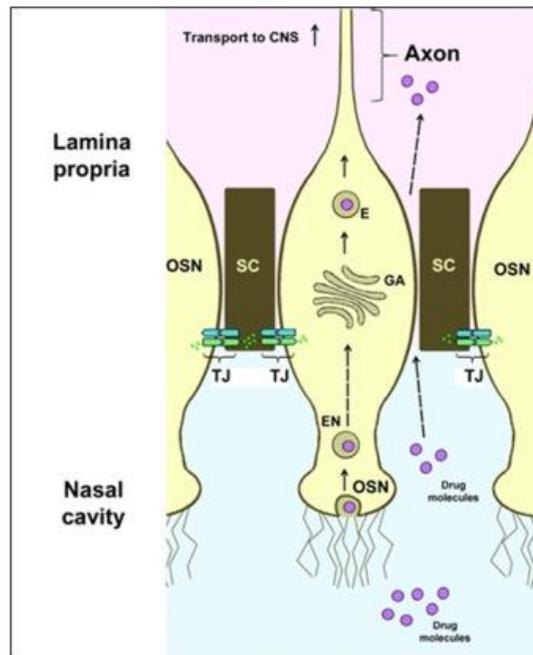


**Figura 7.** Cavidad nasal humana (Campbell, C., et. al., 2012)

La zona vestibular es la más cercana a las fosas nasales, posee vellos nasales que sirven para filtrar las partículas inhaladas, tiene muy poca superficie y, por lo tanto, la absorción es muy baja. La zona respiratoria comprende las paredes laterales de las cavidades nasales, es el área con mayor superficie y está altamente vascularizada, además de que contiene células de Goblet, productoras de mucina. Debido al gran área de superficie y a que está muy vascularizada, en esta área se absorben las moléculas principalmente hacia circulación sistémica. Cabe mencionar que esta área está inervada por ramas del nervio trigémino, lo cual representa un posible camino para el transporte de moléculas al SNC (Erdő, F., et. al., 2018).

Por último, la región olfativa se localiza en la parte superior de la cavidad nasal. Contiene neuronas sensoriales olfativas, las cuales son importantes para la percepción del olfato (Pires, A., et. al., 2009). Estas neuronas extienden sus dendritas y axones desde la superficie del epitelio olfatorio, pasando por la lámina cribosa, hasta el bulbo olfatorio (Campbell, C., et. al., 2012).

El transporte de moléculas de la cavidad nasal al cerebro ocurre por medio del nervio olfatorio y el trigémino. Las moléculas, al alcanzar los orígenes de los nervios en el cerebro y en el puente de Varolio respectivamente, se dispersan por medio de dos vías (Figura 8): intracelular y extracelular (Crowe, Tyler P., et. al., 2017. & Erdő, F., et. al., 2018.)



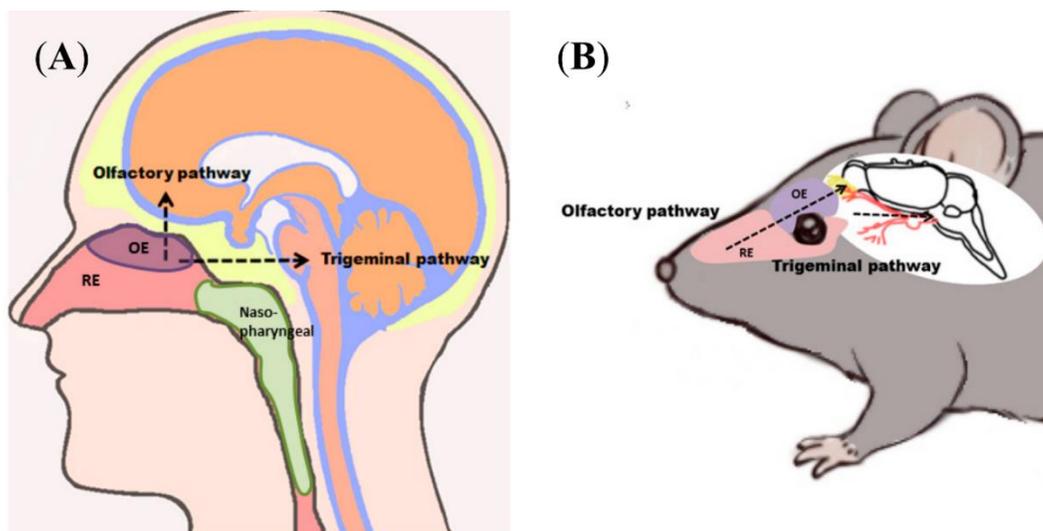
**Figura 8.** Transporte de fármacos al SNC vía intranasal por mecanismos intracelulares y extracelulares (Erdő, F., et. al., 2018).

En el mecanismo intracelular, se da la internalización de la molécula por parte de una neurona olfativa, lo cual ocurre ya sea por pinocitosis o por endocitosis mediada por receptores, sin embargo, debido a la amplia variedad de moléculas, es más probable que predomine la primera. Después, el endosoma es transportado por el soma y a lo largo del axón al aparato de Golgi y posteriormente hacia el sitio de proyección, el bulbo olfatorio. Una vez que las vesículas alcanzan la terminal nerviosa, el contenido es liberado por exocitosis en las células postsinápticas del bulbo olfatorio. Este proceso puede llegar a tardar hasta 24 horas, por lo que es poco probable que sea el mecanismo predominante en el transporte de moléculas al SNC por vía intranasal (Crowe, Tyler P., et. al., 2017).

Por otro lado, en el transporte extracelular las moléculas atraviesan el epitelio nasal por difusión paracelular en los espacios entre las células del epitelio, permitiendo a las moléculas pasar de la cavidad nasal a la lámina propia. A pesar de que las uniones estrechas entre las células del epitelio pudieran representar un obstáculo, las neuronas olfativas tienen una alta tasa de renovación puesto que su tiempo de

vida va de los 30 a los 60 días y posteriormente comienzan el proceso de apoptosis. Cuando las células epiteliales son reemplazadas, hay un retardo en la formación de las uniones estrechas, lo que resulta en un incremento de la permeabilidad y, por lo tanto, permite el paso de moléculas. El fármaco puede llegar al SNC por procesos de difusión desde la lámina propia al espacio subaracnoideo, donde se distribuye a otras regiones distantes del SNC. Este proceso de transporte es mucho más rápido que el transporte axonal que se da en la vía intracelular (Crowe, Tyler P., et. al., 2017).

En los roedores, la cavidad nasal de igual manera es una estructura con funciones relacionadas con el sistema respiratorio y olfatorio, sin embargo, al ser animales macrosmáticos, es decir, con el sentido del olfato muy desarrollado, tienen una región olfatoria más ancha y los turbinatos son más complejos. (Alvites, R. D., et. al., 2018). Sin embargo, a pesar de las diferencias entre especies, la vía de administración intranasal permite el transporte de fármacos desde la cavidad nasal al SNC tanto en humanos como en roedores (Figura 9).

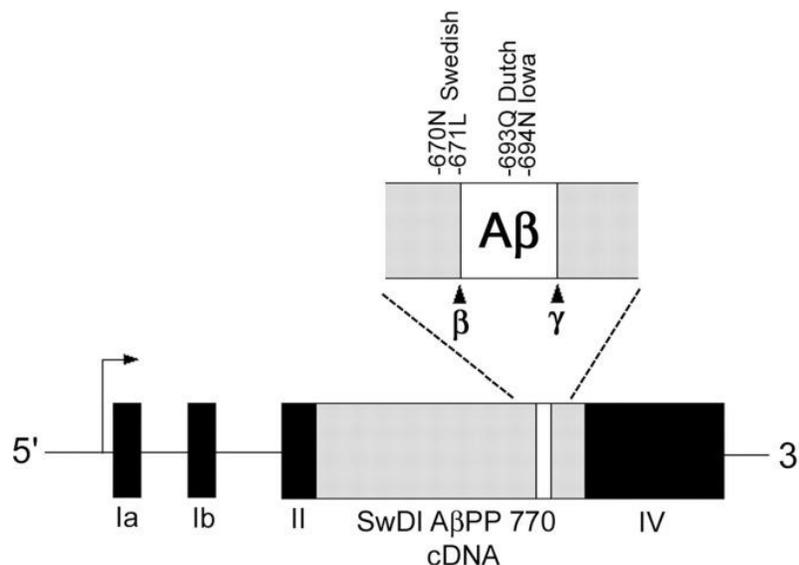


**Figura 9.** Cavidad nasal humana (A) y murina (B). Se muestran las zonas de la cavidad nasal, así como los nervios trigéminos y olfatorios que median el paso de las moléculas al Sistema Nervioso Central. OE: Epitelio olfatorio; RE: epitelio respiratorio (Gänger, S., & Schindowski, K, 2018).

## Modelos animales de la patología de EA

En las últimas décadas, se han desarrollado diversos modelos murinos de EA y AAC, los cuales mimetizan ciertas características relevantes de estas patologías. A pesar de que estos modelos no pueden mimetizar por completo la enfermedad, constituyen una herramienta importante en la investigación puesto que permiten un mayor entendimiento de los mecanismos moleculares implicados e incluso ayudan al desarrollo de nuevas terapias; sin embargo, una desventaja es que a pesar de que más del 97% de los casos de EA son de origen esporádico, los modelos animales que existen actualmente han sido creados mediante la inducción de mutaciones encontradas en la EA de tipo familiar (Foidl, B. M., & Humpel, C., 2020).

En el presente trabajo se utilizó un modelo transgénico, el Tg-SwDI, el cual contiene un transgen compuesto por el cDNA de APP humana con las siguientes mutaciones: la doble mutación Swedish, la Dutch y la Iowa (Figura 10).



**Figura 10.** Esquema de la construcción del modelo Tg-SwDI (Davis, J., Xu, et. al., 2004).

La doble mutante Swedish, se encuentra adyacente al sitio de anclaje de la  $\beta$ -secretasa en APP, y consiste en la sustitución de dos aminoácidos, lisina y

metionina por asparagina y leucina (APP KM670/671NL). Esta mutación ha sido encontrada en pacientes con Alzheimer de tipo familiar y, en cuanto a su efecto biológico, se ha observado que incrementa la producción y secreción de  $A\beta_{40}$  y  $A\beta_{42}$ , ya que se induce un cambio conformacional que ocasiona que la  $\beta$ -secretasa tenga un aumento en su actividad (Alzforum, 2022).

Las mutaciones Dutch (APP E22Q) y Iowa (APP D23N), han sido encontradas en pacientes con AAC de tipo familiar. Se ha observado que las mutaciones en APP que se encuentran sobre los residuos 21-23 de  $A\beta$ , provocan la acumulación de  $A\beta$  en vasculatura cerebral; en el caso de las mutaciones Dutch y Iowa, probablemente se deba a la pérdida de la carga negativa del Ácido Glutámico de la posición 22 y del Ácido Aspártico de la posición 23 respectivamente, haciendo que los péptidos generados sean más fibrilogénicos y patogénicos (Davis, J., et al., 2004; Alzforum, 2022).

En este modelo, los niveles de expresión de APP de humano son menores a los de APP endógena de ratón; sin embargo, aun así, se desarrolla la acumulación de  $A\beta$  en cerebro con alta tendencia a acumularse en microvasculatura, siendo las regiones del subículo y del tálamo las más afectadas. Esta deposición se desarrolla a partir de los 6 meses con potenciales hemorragias a los 12 meses. Asimismo, los depósitos amiloides vasculares son fibrilares, lo cual es consistente con la naturaleza de los depósitos de  $A\beta$  cerebrovasculares encontrados en personas con las mutaciones Dutch o Iowa. Por otro lado, también se observa acumulación amiloide en zonas contiguas a vasos sanguíneos, predominantemente en la fisura hipocampal (Davis, J., et al., 2004).

En cuanto a los agregados amiloides parenquimales, estos se empiezan a observar a los 3 meses de edad, principalmente en el subículo, hipocampo y corteza, mientras que a los 6 meses se extienden hasta regiones como el bulbo olfatorio y el tálamo. Contrario a los depósitos vasculares, los depósitos amiloides en parénquima suelen ser difusos, lo cual de igual manera concuerda con lo encontrado en cerebros de personas con las mutaciones involucradas (Davis, J., et al., 2004).

## **Antecedentes**

Previamente en el laboratorio se realizó un estudio longitudinal de la expresión de Iba-1 en microglía de ratones Tg-SwDI. Esto es de interés debido a que Iba-1 es una molécula regulada a la alza por la microglía cuando está activada, lo cual sucede en un ambiente inflamatorio como el de la EA y del modelo transgénico con el que se trabaja en el presente estudio.

Los resultados obtenidos muestran que hay un pico en la expresión de Iba-1 a los 6 meses de edad; dicho antecedente fue tomando en cuenta para la elección de la edad de los ratones en la cual se realizarían los análisis del presente estudio, pues permitiría saber si el tratamiento con dexametasona tiene algún efecto preventivo.

## **Planteamiento del problema**

Se sabe que una de las características de la EA y la AAC es la neuroinflamación crónica, la cual puede ocasionar daño neuronal y muerte celular, siendo la microglía una de las células que participan en este proceso. Por otro lado, aunque los glucocorticoides son potentes antiinflamatorios, su uso en enfermedades del SNC ha sido limitado, en parte por la gran cantidad de efectos adversos que ocasiona su uso sistémico y crónico. Por lo tanto, es de interés estudiar si existe un efecto de la dexametasona, administrada por vía intranasal, en la activación de la microglía; ya que, como ha demostrado ser una vía de fácil acceso al SNC, se espera que se requieran menores dosis y se disminuyan los efectos adversos.

## **Hipótesis**

La administración intranasal de dexametasona disminuirá la neuroinflamación en ratones Tg-SwDI y, por lo tanto, se observará una menor expresión de Iba-1 en microglía.

## **Objetivo general**

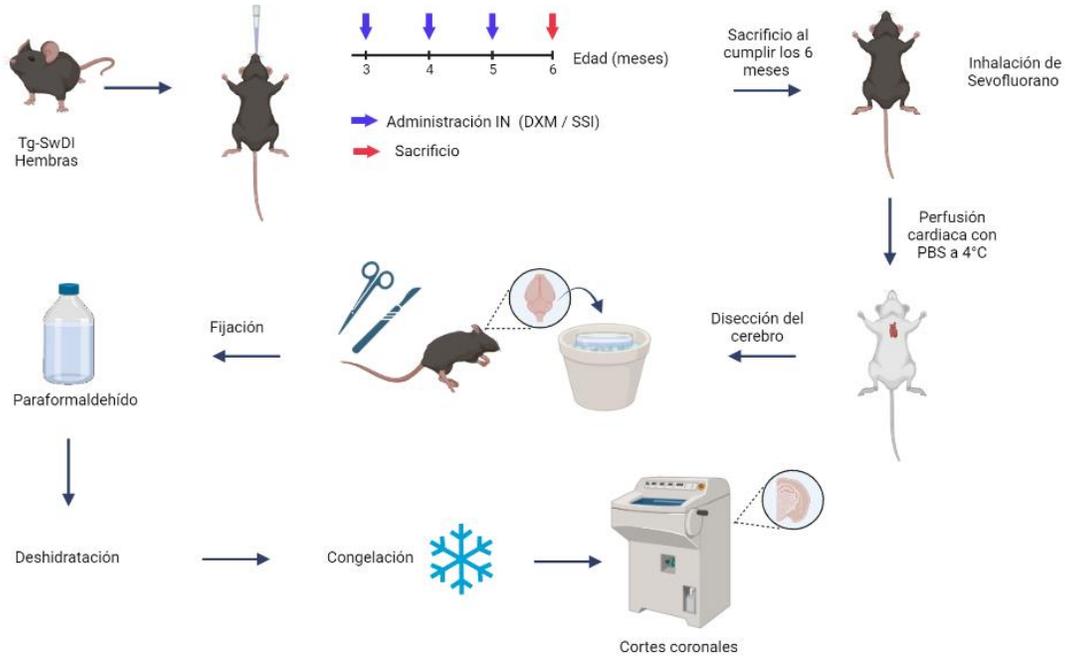
Evaluar el efecto de la administración intranasal de una dosis mensual de dexametasona en ratones Tg-SwDI de 3 meses, hasta los 6 meses, sobre la microglía reactiva mediante la cuantificación de Iba-1, lo cual será un indicativo indirecto del efecto del fármaco sobre la neuroinflamación.

## **Objetivos particulares**

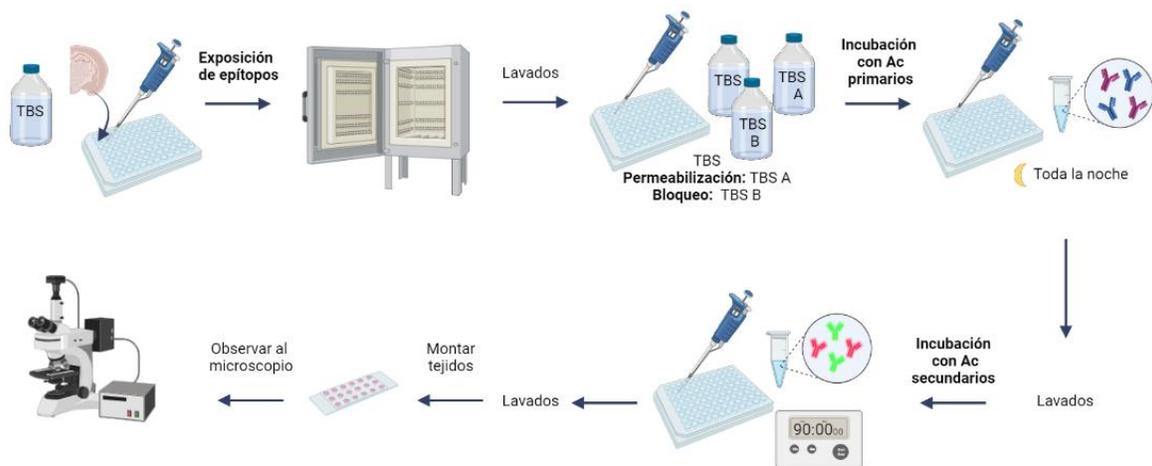
1. Evaluar la expresión de Iba-1 en cerebros de ratones Tg-SwDI tratados con dexametasona y tratados con solución salina.
2. Evaluar si existe una asociación entre Iba-1 y la presencia de agregados amiloides en cerebros de ratones Tg-SwDI tratados con dexametasona y tratados con solución salina.

# Procedimiento Experimental

## Metodología



**Figura 11.** Procedimiento esquematizado de la administración intranasal de dexametasona o solución salina isotónica y de la obtención y preparación de cortes coronales de cerebros de ratones Tg-SwDI.



**Figura 12.** Procedimiento esquematizado de la técnica de inmunofluorescencia utilizando cortes coronales de cerebros de ratones Tg-SwDI.

## Ratones

En este estudio se utilizaron ratones transgénicos homocigotos Tg-SwDI (*APP* con las mutaciones Swedish K670N/M671L, Dutch E693Q y Iowa D694N) de 3 meses con un fondo genético C57BL/6. Esta cepa fue adquirida en The Jackson Laboratory y los ratones se mantuvieron en el Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM en condiciones controladas de temperatura, humedad y ciclos de luz y oscuridad (12/12). Asimismo, todos los ratones fueron sacrificados cumpliendo los lineamientos de bioética correspondientes. Únicamente se emplearon hembras en este estudio.

### Habitación a la manipulación de ratones para la administración Intranasal

Se empleó un protocolo de habituación a la manipulación de ratones con el fin de evitar el uso de anestésicos y la generación de estrés hacia los animales de experimentación.

Se inició el protocolo colocando a cada ratón en la palma de la mano del experimentador durante 3 minutos, posteriormente se soltó al ratón y se le dio un breve momento de descanso. Después, se volvió a colocar al ratón en la palma de la mano por 3 minutos, esta vez acariciándolo, se soltó y se le dio otro momento de descanso. Finalmente, se colocó al ratón en la palma de la mano, se pinchó suavemente la piel del lomo durante 3 minutos se le soltó y se le recompensó con una pieza de cereal dulce.

Al día siguiente, se colocó a cada ratón sobre una rejilla y se le sujetó del lomo durante 30 segundos, luego, se le dejó libre por otros 30 segundos y se repitió este paso una vez más. Posteriormente se realizó un agarre intranasal que consiste en sujetar al ratón de la cola, el pecho y la cabeza y se mantuvo en dicha posición durante 30 segundos, seguido de un descanso de un minuto; esto se realizó por duplicado. Después, se hizo el agarre intranasal, esta vez incorporando la inversión

en posición vertical durante 30 segundos, el ratón descansó 1 minuto y se repitió una vez más. Se le recompensó igual que el día anterior.

En el tercer día de la habituación se realizó en cada ratón el agarre intranasal e inversión en posición vertical por 30 segundos, se soltó al ratón durante 1 minuto y se repitió la maniobra una vez más. Posteriormente, se realizó nuevamente el agarre intranasal e inversión, esta vez acercando la punta de una micropipeta de 10  $\mu$ L a las fosas nasales del ratón de manera gentil y continua durante 30 segundos. Se dio 1 minuto de descanso y se repitió este paso. Finalmente, se realizó la administración intranasal de 5  $\mu$ L de SSI en cada fosa nasal del ratón. Se recompensaron de la misma manera.

#### Tratamiento con Dexametasona

Se empleó para los tratamientos una presentación comercial de dexametasona *Alin Depot* (CHINOIN), suspensión de 4 mg/mL.

Se administraron dosis intranasales de dexametasona (250  $\mu$ g/kg de peso, en 20  $\mu$ L de SSI) o SSI utilizando una micropipeta, para lo cual se colocó la punta en la fosa nasal y se liberó la suspensión lentamente con el ratón en posición de agarre intranasal e inversión vertical. Se esperó un momento y posteriormente se incorporó al ratón en la caja.

Los ratones se dividieron en dos grupos y el esquema de administración fue el siguiente:

**Tabla 4.** Esquema de administración de los tratamientos

<b>Grupo</b>	<b>n</b>	<b>Tx</b>	<b>Dosis (mg/kg)</b>	<b>Edad 1<sup>a</sup> admin. (meses)</b>	<b>Edad 2<sup>a</sup> admin. (meses)</b>	<b>Edad 3<sup>a</sup> admin. (meses)</b>
<b>Control</b>	3	SSI	-	3	4	5
<b>Dexametasona</b>	6	DXM	0.25	3	4	5

La dosis de dexametasona fue la misma durante las 3 administraciones; por otro lado, todos los ratones fueron sacrificados al cumplir los 6 meses de edad.

### Obtención de tejidos

Los ratones fueron anestesiados profundamente por inhalación de Sevoflurano (Abbot Lab) (Figura 11). De manera inmediata se realizó una perfusión cardiaca ventricular con una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) a 4°C seguido de 5 mL de PFA 4 % en PBS. Posteriormente, se extrajo el cerebro y se colocó en una caja Petri sobre hielo, se separaron los hemisferios, se continuó la fijación por inmersión en 10 mL de PFA al 4 % en PBS por 24 h a 4°C. Después de la fijación, se lavaron los hemisferios con PBS y se deshidrataron en soluciones de PBS/sacarosa al 10 %, 20 % y 30 % durante 24 h, respectivamente. A continuación, los tejidos se mantuvieron por 24 h en una mezcla de PBS/Sacarosa 30 %: Tissue Plus (Fisher HealthCare) (1:1). Finalmente se congelaron y se realizaron cortes coronales en congelación (-20 °C) de 30 µm de grosor, desde -1.6 mm a -2.3 mm de bregma usando un criostato (Kedee, KD2850).

### Inmunofluorescencia

Para realizar la tinción con Iba-1 o la doble inmunotinción de Iba-1 y Aβ (Figura 12), se usaron cortes de cerebros de ratón Tg-SwDI de 6 meses de edad (aprox. a 1.9-2.1 de bregma) y se realizaron lavados en flotación con TBS 1x de manera individual. Para la exposición de epítomos, los tejidos se incubaron en buffer de citratos (ácido cítrico 0.1M, Tween 20 al 0.05 %, pH=6) a 60 °C durante 30 min, se realizaron dos lavados con TBS 1x, y en seguida, solo para la doble inmunotinción, se adicionó ácido fórmico al 80 % durante 3 min. Posteriormente estos últimos tejidos se lavaron con TBS 1x sin incubación, y se realizó un segundo lavado en agitación con TBS 1x por 5 min a temperatura ambiente (TA). Se llevó a cabo la permeabilización, incubando con TBS A (TBS 1x, Tritón al 0.1 %) por 15 min a TA

en agitación, y el bloqueo con TBS B (TBS A, BSA al 2 %) por 20 min a TA en agitación. Después, se incubaron los tejidos con los anticuerpos primarios (Tabla 5) en diluyente de anticuerpos (TBS A, Suero Normal de Cabra al 5 %) a 4 °C durante toda la noche en agitación. Se realizaron los lavados con TBS 1x, TBS A y TBS B, cada uno durante 5 min en agitación. Se adicionaron los anticuerpos secundarios en diluyente de anticuerpos y se incubaron los tejidos durante 1.5 h en agitación a TA en oscuridad. Se lavaron nuevamente los tejidos con TBS 1x, TBS A y TBS B y se inmovilizaron en un portaobjetos, se agregó medio de montaje VectaShield con DAPI (Vector Labs), se colocó un cubreobjetos y se selló con barniz.

Se incluyeron controles negativos en el análisis para verificar la especificidad de los anticuerpos primarios, para lo cual se incubaron los tejidos correspondientes únicamente con los anticuerpos secundarios, el resto del tratamiento fue el mismo.

**Tabla 5.** Anticuerpos utilizados para los ensayos de inmunofluorescencia.

Marcador	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
Iba-1	Ac monoclonal de conejo anti-Iba 1 1:800 (Wako, Japón)	IgG de cabra anti-IgG de conejo /AF 594 1:500 (Invitrogen, Waltham, MA)
A $\beta$	Ac monoclonal de ratón 6E10 1:1500 (BioLegend, San Diego, CA)	IgG de cabra anti-IgG <sub>1</sub> de ratón/AF 488 1:250 (Invitrogen, Waltham, MA)

Finalmente, se observaron las preparaciones en un microscopio de epifluorescencia Nikon Modelo i5 y las fotos fueron tomadas con una cámara Olympus DP71 utilizando el Software DP Controller 3.2.1.276.

El análisis de imagen se realizó por medio del software ImageJ, en el cual se seleccionó la región de interés (CA1, giro dentado o tálamo) y se obtuvo el valor denominado como IntDen, el cual es el producto del área por la intensidad de fluorescencia promedio y con dicho parámetro se realizó la cuantificación.

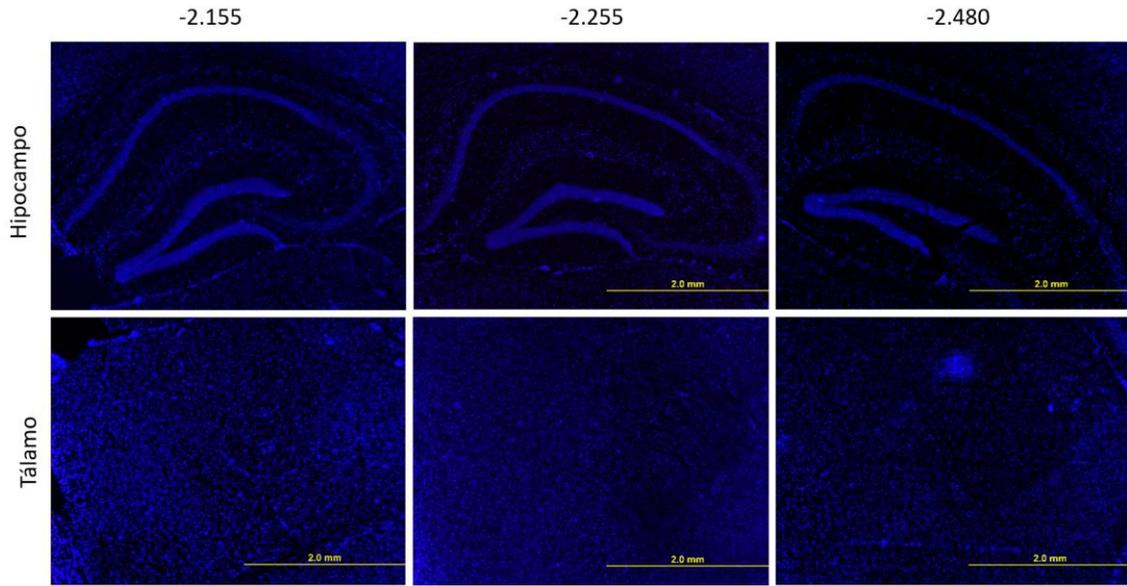
### Análisis estadístico

Se utilizó la prueba Mann Whitney para determinar la existencia o no, de diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) ya que la distribución de datos no es normal. Los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism versión 8.

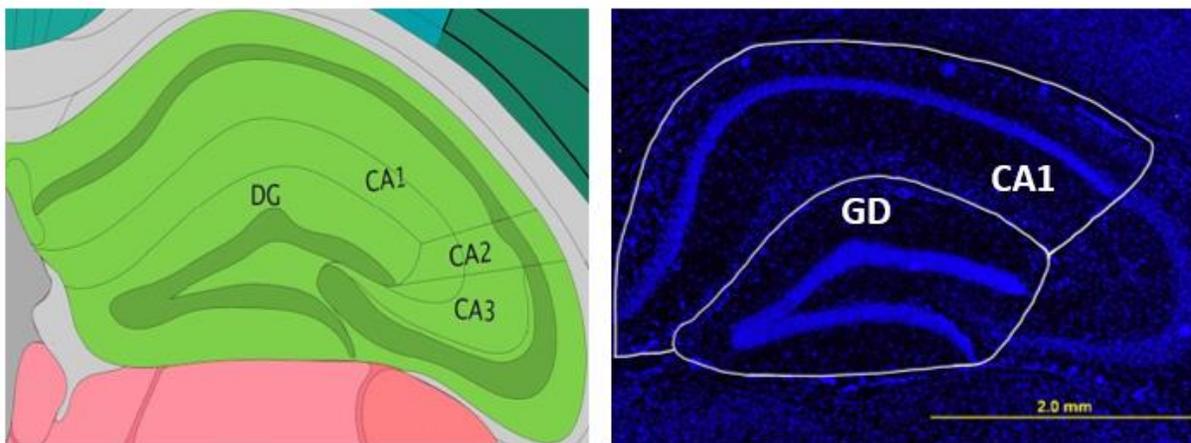
## **Resultados**

### Evaluación de la expresión de Iba-1 en microglía de ratones Tg-SwDI tratados con dexametasona y tratados con solución salina.

Con la finalidad de evaluar la expresión de Iba-1 en microglía, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia utilizando cerebros de ratones Tg-SwDI tratados previamente con dexametasona o con SSI. Se tomaron cortes coronales de -2.155 a -2.480 mm del bregma (Figura 13). Las regiones seleccionadas para dicho análisis fueron hipocampo, específicamente CA1 y giro dentado (Figura 14), así como el tálamo.

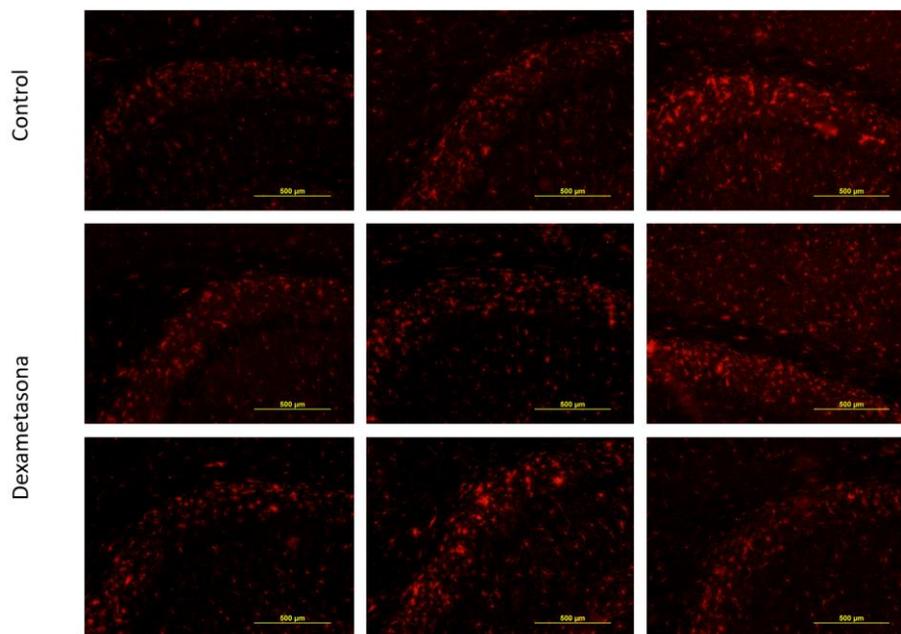


**Figura 13.** Imágenes representativas de los cortes coronales de -2.155 mm a -2.480 mm del bregma de cerebros de ratones Tg-SwDI utilizados en los experimentos. Se muestra en azul la tinción de núcleos con DAPI. La escala es de 2.0 mm.

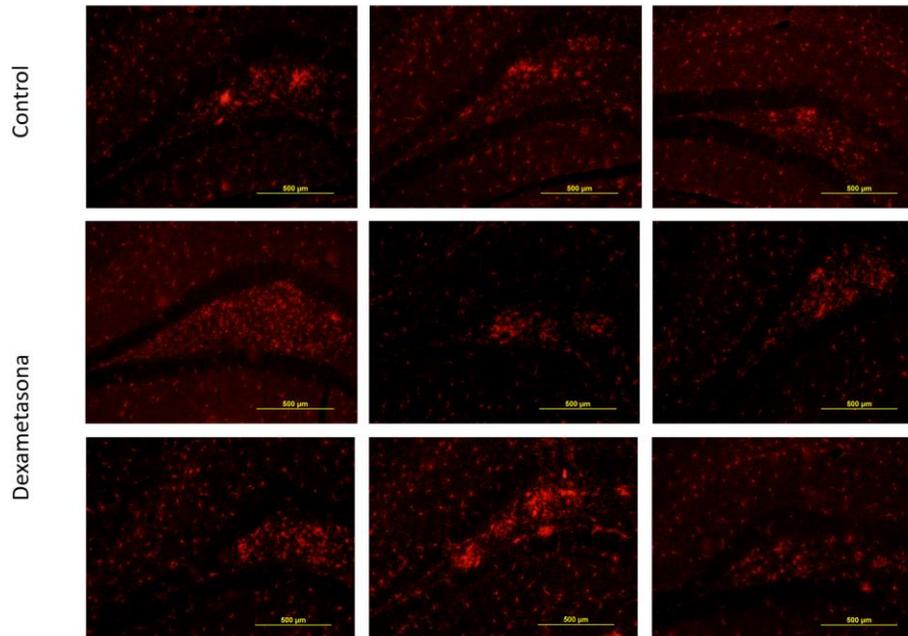


**Figura 14.** Regiones estudiadas del hipocampo. Del lado izquierdo se muestra la referencia del Allen Mouse Brain Atlas y del lado derecho la imagen representativa del corte coronal de cerebro de ratón Tg-SwDI de 6 meses de edad, a -2.255 del bregma a una escala de 2.0 mm. Se muestra en azul la tinción de núcleos con DAPI. Se delimitan en líneas blancas las zonas tomadas como GD y CA1 para posteriores análisis. GD: Giro dentado. Modificado de Allen Mouse Brain Atlas.

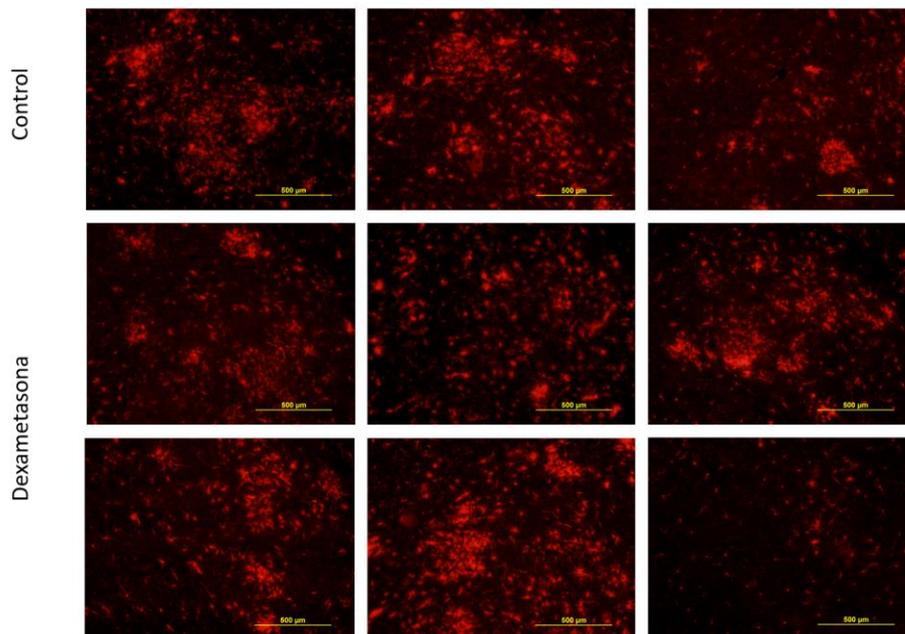
Como se ha mencionado en el apartado de métodos, en esta tinción se utilizó como anticuerpo primario un anticuerpo anti-Iba-1 producido en conejo y como anticuerpo secundario se utilizó anti-IgG de conejo AF594, por lo cual se observa el marcaje de Iba-1 en rojo. Por otro lado, en azul se observa la tinción de núcleos ya que el medio de montaje utilizado contiene DAPI. En el control negativo (no mostrado), que fue incubado únicamente con el anticuerpo secundario, no se observó fluorescencia por lo que confirma la especificidad del anticuerpo anti-Iba1. A continuación, se muestran imágenes representativas de lo observado en las diferentes regiones cerebrales analizadas.



**Figura 15.** Imágenes representativas de CA1 de ratones Tg-SwDI que recibieron tres dosis intranasales de dexametasona (0.25 mg/Kg) o de solución salina isotónica, cada una a los 3, 4 y 5 meses de edad. Se muestra la tinción de Iba-1 en rojo. La escala es de 500 µm.

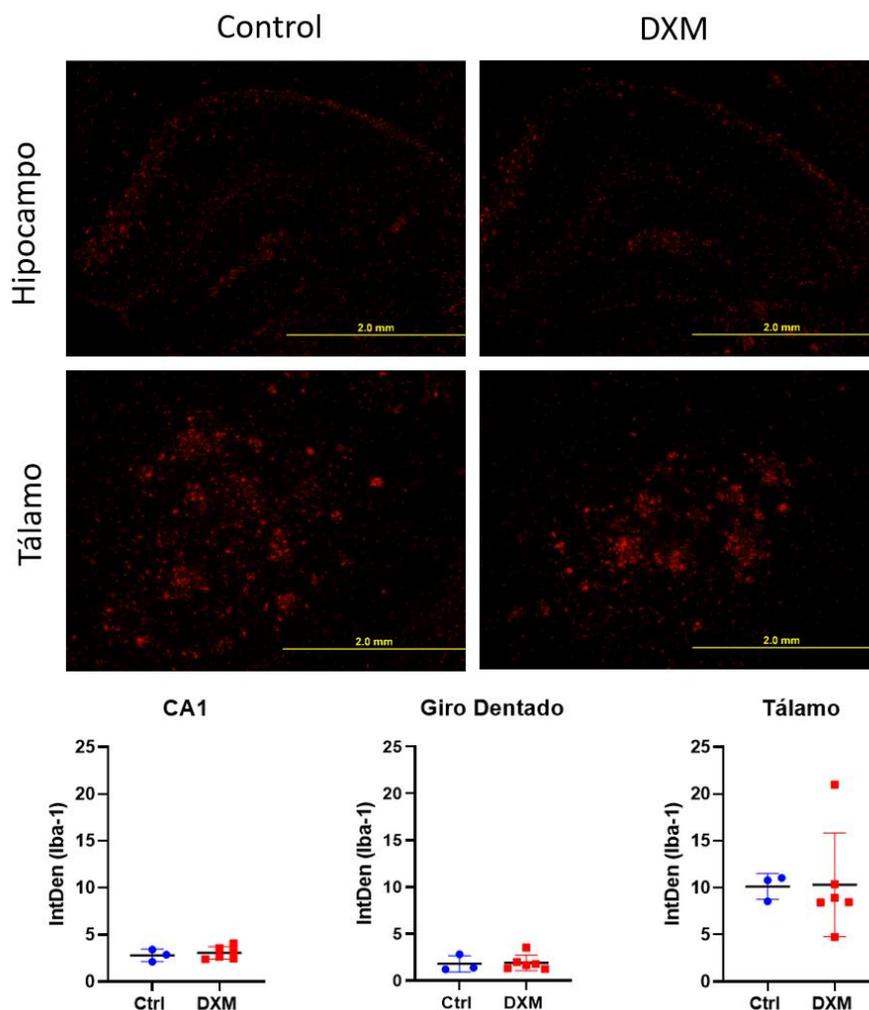


**Figura 16.** Imágenes representativas del giro dentado de ratones Tg-SwDI que recibieron tres dosis intranasales de dexametasona (0.25 mg/Kg) o de solución salina isotónica, cada una a los 3, 4 y 5 meses de edad. Se muestra la tinción de Iba-1 en rojo. La escala es de 500 µm.



**Figura 17.** Imágenes representativas del tálamo de ratones Tg-SwDI que recibieron tres dosis intranasales de dexametasona (0.25 mg/Kg) o de solución salina isotónica, cada una a los 3, 4 y 5 meses de edad. Se muestra la tinción de Iba-1 en rojo. La escala es de 500 µm.

En las Figuras 15, 16 y 17, se observa que la expresión de Iba-1 es muy parecida entre los ratones que recibieron el tratamiento con dexametasona y los ratones control. Para corroborar dicha información, se cuantificó la expresión de Iba-1 en las regiones de interés mediante el software Image-J, mientras que el análisis estadístico para determinar la existencia o no de diferencias significativas se realizó mediante una prueba de Mann Whitney ( $p \leq 0.05$ ) utilizando el software GraphPad Prism 8.0. Como se puede observar en la Figura 18, ninguna de las regiones analizadas (CA1, giro dentado y tálamo) mostró diferencias significativas al comparar los ratones que recibieron el tratamiento de dexametasona y los ratones control.

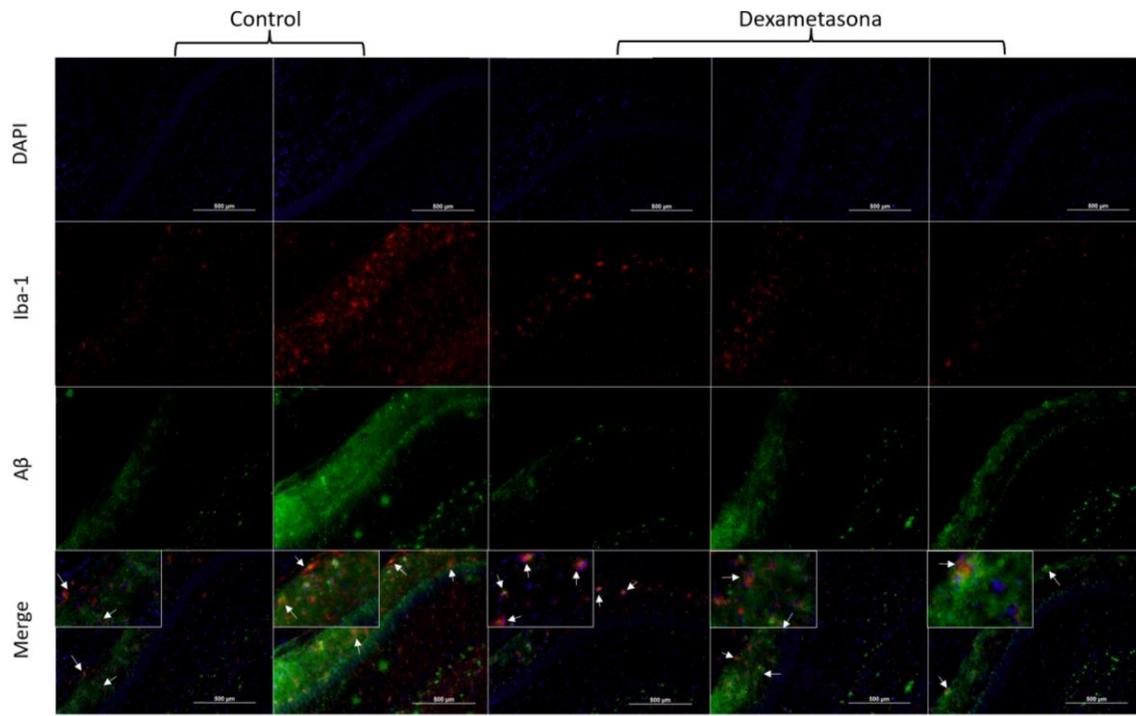


**Figura 18.** Cuantificación de la expresión de Iba-1 en microglía de ratones Tg-SwDI que recibieron tres dosis intranasales de dexametasona o de solución salina isotónica. Se muestran imágenes representativas del hipocampo y del tálamo a una escala de 2.0 mm, a partir de las cuales se cuantificaron las tres regiones por separado: CA1, giro dentado y tálamo. No se encontraron diferencias significativas en ninguno de los casos. Se muestran los promedios  $\pm$  DE. Para el análisis estadístico se realizó una prueba de Mann Whitney ( $p \leq 0.05$ ) mediante el software GraphPad Prism 8.0.

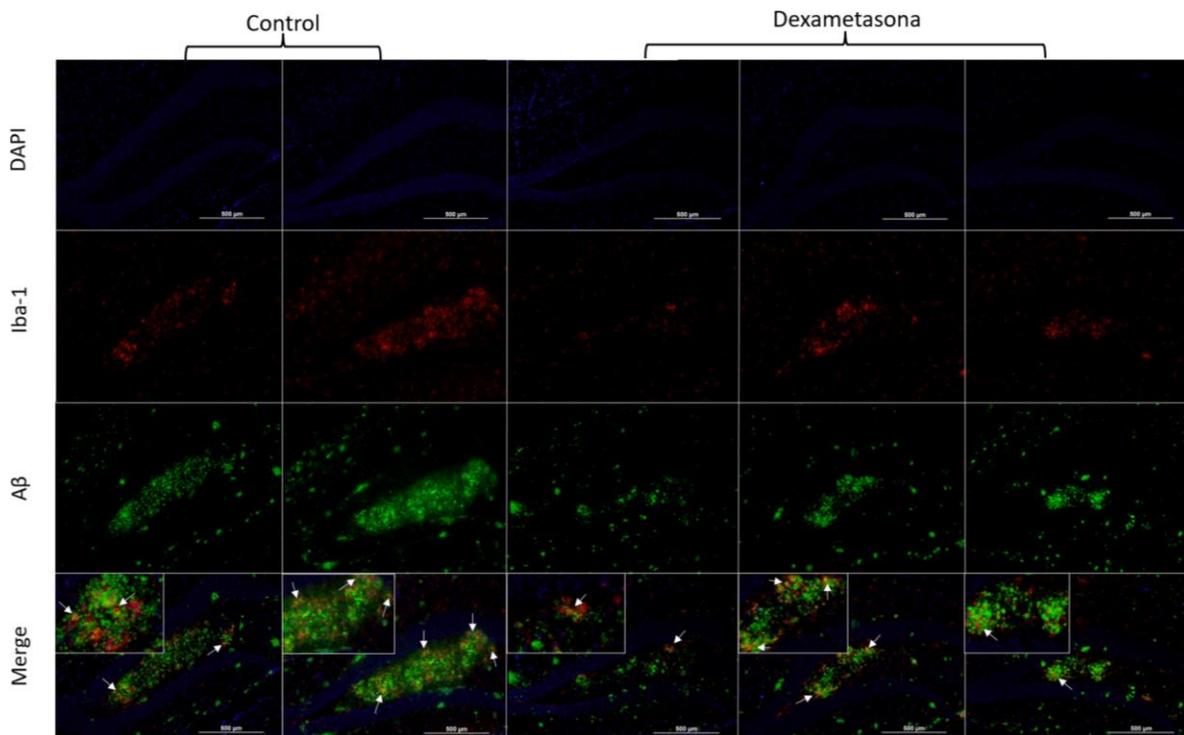
## Evaluación cualitativa de la asociación entre la microglía positiva a Iba-1 con la presencia de agregados amiloides.

Con la finalidad de evaluar de manera cualitativa si existe o no una asociación entre la microglía que expresa Iba-1 y la presencia de agregados amiloides, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia utilizando cerebros de ratones Tg-SwDI tratados con dexametasona y con solución salina. De igual manera, se tomaron cortes coronales de -2.155 a -2.480 mm del bregma y las regiones seleccionadas fueron CA1, giro dentado y tálamo.

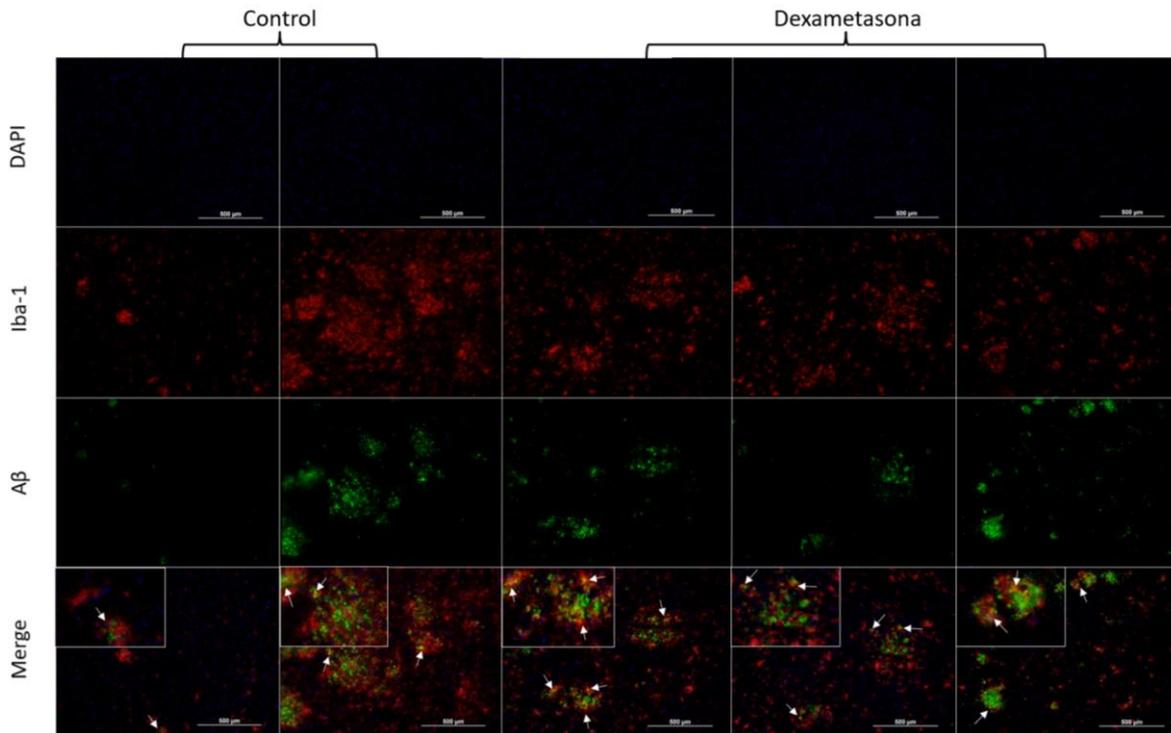
En esta tinción se utilizó como anticuerpo primario un anticuerpo anti-Iba-1 producido en conejo y un anticuerpo anti-A $\beta$  producido en ratón y como anticuerpos secundarios se utilizaron anti-IgG de conejo AF594 y anti-IgG1 de ratón AF488, por lo cual se observa Iba-1 en rojo y A $\beta$  extracelular en verde. Por otro lado, en azul se observa la tinción de núcleos realizado mediante la adición de DAPI en el medio de montaje. En el control negativo (no mostrado), que fue incubado únicamente con los anticuerpos secundarios, no se observó fluorescencia por lo que confirma la especificidad de los anticuerpos anti-Iba1 y 6E10. A continuación, se muestran imágenes representativas de lo observado en las regiones cerebrales correspondientes.



**Figura 19.** Imágenes representativas de la región CA1 del hipocampo de cerebros de ratones Tg-SwDI tratados intranasalmente con tres dosis de dexametasona (0.25 mg/Kg) o con solución salina isotónica en el caso del control, cada una a los 3, 4 y 5 meses de edad. Se muestra en azul la tinción de núcleos con DAPI, en rojo la expresión de Iba-1, en verde Aβ y finalmente el merge, Las flechas blancas señalan las zonas de colocalización de Iba-1 y Aβ. La escala es de 500 μm.



**Figura 20.** Imágenes representativas del giro dentado de cerebros de ratones Tg-SwDI tratados intranasalmente con tres dosis de dexametasona (0.25 mg/Kg) o con solución salina isotónica en el caso del control, cada una a los 3, 4 y 5 meses de edad. Se muestra en azul la tinción de núcleos con DAPI, en rojo la expresión de Iba-1, en verde A $\beta$  y finalmente el merge. Las flechas blancas señalan las zonas de colocalización de Iba-1 y A $\beta$ . La escala es de 500  $\mu$ m.



**Figura 21.** Imágenes representativas del tálamo de cerebros de ratones Tg-SwDI tratados intranasalmente con tres dosis de dexametasona (0.25 mg/Kg) o con solución salina isotónica en el caso del control, cada una a los 3, 4 y 5 meses de edad. Se muestra en azul la tinción de núcleos con DAPI, en rojo la expresión de Iba-1, en verde A $\beta$  y finalmente el merge. Las flechas blancas señalan las zonas de colocalización de Iba-1 y A $\beta$ . La escala es de 500  $\mu$ m.

En las Figuras 19, 20 y 21 se observa que la asociación entre la microglía positiva a Iba-1 y los agregados amiloides no cambia, puesto que, tanto en los ratones control que fueron administrados con solución salina isotónica como en los que recibieron el tratamiento con dexametasona, la microglía se encuentra contigua a los agregados amiloides e incluso hay ciertas zonas en las cuales existe colocalización de los marcadores utilizados.

En cuanto a la cantidad de A $\beta$ , pareciera que hay una disminución de los agregados amiloides en giro dentado y tálamo, sin embargo, se necesita un análisis cuantitativo para confirmar esta observación.

## **Discusión**

De acuerdo con la OMS, actualmente existen 55 millones de personas con demencia en el mundo, además de que se estima que la incidencia anual es de 10 millones, de los cuales la EA representa alrededor del 60% y 70% de los casos. Debido a que la población naturalmente está bajo un proceso de envejecimiento y a que la expectativa de vida del ser humano ha aumentado, es importante estudiar este tipo de enfermedades, pues su desarrollo es complejo y su entendimiento pudiera resultar en un mejoramiento de las herramientas de detección y de las estrategias terapéuticas, teniendo un impacto positivo en la calidad de vida de las personas que las padecen.

La EA y la AAC se caracterizan por la deposición de A $\beta$  en parénquima y en vasculatura cerebral respectivamente, y a menudo coexisten, probablemente por el papel patogénico que tiene A $\beta$  en ambas enfermedades. La acumulación amiloide va acompañada de neuroinflamación, la cual, si bien en un inicio es una respuesta protectora, al volverse crónica contribuye al daño en el tejido y a la sintomatología clínica (Greenberg, S. M., et. al., 2020).

En el presente estudio se utilizaron cerebros de ratones Tg-SwDI de 6 meses de edad que previamente habían sido administrados por vía IN con dexametasona o SSI en el caso de los controles. Se utilizó la técnica de inmunofluorescencia para cuantificar la expresión de Iba-1 en microglía, la cual es una proteína comúnmente utilizada como marcador de microglía activada (Shi, F. J., et. al., 2021), esto nos permite estudiar el efecto de la dexametasona sobre el proceso inflamatorio. Dicha expresión se evaluó en tres regiones del cerebro: CA1, giro dentado y tálamo.

La microglía tiene un papel importante en la inflamación al ser la población de macrófagos residentes del SNC. En la EA, la microglía se encuentra asociada a depósitos de A $\beta$  fibrilares, mostrando un fenotipo activado; sin embargo, aún no se sabe qué aspectos funcionales de la microglía juegan un papel benéfico o patogénico.

Existen propuestas que sugieren que, debido a su cercanía con estructuras axonales y a su capacidad de producir citocinas neurotóxicas y especies reactivas de oxígeno, la microglía pudiera contribuir a la formación de neuritas distróficas (Condello, C., et. al., 2015). Por otro lado, se ha observado que, en una etapa temprana de la enfermedad, la microglía se asocia alrededor de las placas amiloides, formando una barrera protectora entre los depósitos de A $\beta$  y los procesos neuronales. La proximidad física de los procesos de la microglía que se entrelazan con las fibrillas amiloides en crecimiento provoca que estas se compacten y evita su polimerización y expansión a otras zonas del cerebro; sin embargo, conforme la enfermedad avanza, la microglía pierde su actividad fagocítica, por lo que no funciona adecuadamente y contribuye a los procesos inflamatorios que ocasionan daño en el tejido y que favorecen aún más la progresión de la enfermedad (Condello, C., et. al., 2015; Bohlen, C. J., 2019).

Previamente en el laboratorio se realizó un estudio longitudinal de la expresión de Iba-1 en microglía de ratones Tg-SwDI, en el cual se determinó que hay un pico en la expresión de esta proteína a los 6 meses, mientras que a los 9 meses disminuye. Este antecedente se tomó en cuenta para la elección del esquema de administración del tratamiento y para la edad en la cual se sacrificarían los ratones. En cuanto al esquema de administración, el objetivo fue realizar una exposición aguda al fármaco, por lo que se realizaron administraciones intranasales a los 3, 4 y 5 meses de edad utilizando una dosis de 0.25 mg/kg, la cual fue utilizada anteriormente por Pérez-Osorio, et. al., 2021 en su estudio de biodistribución de dexametasona por administración IN. Asimismo, se optó por sacrificar a los ratones y efectuar los análisis correspondientes a los 6 meses de edad ya que, de esta manera, se puede evaluar si la administración de dexametasona previa a los 6

meses, en este caso iniciando el tratamiento los 3 meses de edad, puede disminuir el pico de expresión de Iba-1, lo cual se traduciría en una disminución de la microglía activada.

Los corticoesteroides son potentes antiinflamatorios, sin embargo, su uso en enfermedades del SNC no ha sido ampliamente explorado debido a que la administración sistémica de dosis altas en periodos agudos, o de manera crónica, provoca la aparición de una gran variedad de efectos adversos; además, la eficiencia con la que llegan al cerebro es muy baja puesto que los fármacos dirigidos al SNC deben atravesar la barrera hematoencefálica (Beerli, M. S., et. al., 2012). Debido a ello, la administración intranasal de glucocorticoides pudiera ser una alternativa interesante en el tratamiento de la EA y otras enfermedades del SNC, ya que además de tener diversas ventajas, permite la llegada directa del fármaco al cerebro por medio de los nervios trigémino y olfatorio, evadiendo la BHE. Esto a su vez permite que la llegada de los glucocorticoides sea más rápida, eficiente y también se evitarían los efectos adversos observados en otras vías de administración (Pérez-Osorio, I. N., 2021).

Contrario a lo esperado, no se observó una disminución de la expresión de Iba-1 en microglía de ratones tratados con dexametasona en comparación con los controles en ninguna de las regiones evaluadas. En la Figura 18, se puede observar tanto en las imágenes representativas como en la gráfica, que en el tálamo hay una ligera disminución de la expresión de Iba-1; sin embargo, al realizar la cuantificación, ésta no es significativa.

En el análisis de biodistribución de dexametasona administrada por vía IN en cerebros de ratones realizado por Pérez-Osorio, et. al., 2021, se reporta que la dexametasona se distribuye en regiones que comprenden desde 3.92 mm hasta -2.80 mm del bregma, lo cual incluye las regiones evaluadas en este estudio; también se menciona que la dexametasona se distribuye principalmente en las regiones 1.34, 0.62 y -0.22 mm del bregma. Sería interesante entonces realizar un análisis que confirme la presencia de la dexametasona en el cerebro de los ratones Tg-SwDI tras el tratamiento.

En cuanto a la falta de diferencias significativas, sería recomendable hacer un análisis más robusto utilizando otros marcadores de activación de microglía, ya que además de ser un proceso complejo, se ha descrito que existen diferentes fenotipos de microglía activada, en los cuales la expresión de genes es distinta (Rawlinson, C., et. al., 2020 & Davis, B. M., et. al., 2017). De acuerdo con los resultados obtenidos, probablemente Iba-1 no esté implicada en el mecanismo inducido por la dexametasona, sin embargo, un análisis más completo que incluya otros marcadores permitirá determinar qué vías o mecanismos pudieran estar involucrados y cómo es que contribuyen a la disminución de la neuroinflamación. Adicionalmente, la medición de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias en los cerebros de los ratones tras el tratamiento, podrían completar este estudio y así, tener una mejor idea del efecto de la dexametasona administrada por vía intranasal sobre microglía en el modelo Tg-SwDI.

En un estudio *in vitro* realizado por Park, M. J., et. al., 2019, los autores concluyen que el tratamiento de microglía de rata con dexametasona induce un fenotipo parecido al de la microglía senescente, ya que presenta un cambio en la morfología, una disminución de la capacidad de producción de citocinas tanto proinflamatorias como antiinflamatorias, así como una disminución de la actividad fagocítica (Park, M. J., et. al., 2019). Debido a la naturaleza de los glucocorticoides, estos tienen una enorme variedad de efectos sobre el cerebro, y, en particular, las células del hipocampo expresan altos niveles de receptores de glucocorticoides, los cuales, en una respuesta temprana a estrés, previenen la muerte neuronal en el giro dentado, mejoran la plasticidad sináptica, entre otros efectos. Sin embargo, los efectos de los glucocorticoides ante una exposición crónica no son antiinflamatorios y de hecho exacerban algunos aspectos de la inflamación, teniendo efectos nocivos que son producto de la alta ocupación de los receptores de glucocorticoides, por ejemplo, la alteración de la cognición y la plasticidad sináptica e inhibición de la neurogénesis (Sorrells, S. F., & Sapolsky, R. M. 2007). A su vez, esto explicaría por qué los glucocorticoides no han tenido la respuesta esperada en el tratamiento de condiciones como accidente cerebrovascular isquémico, hemorragia intracerebral y aneurisma subaracnoideo (Park, M. J., et. al., 2019).

Este antecedente remarca la necesidad de incluir la cuantificación de más marcadores y citocinas con el objetivo de analizar el efecto de la dexametasona sobre la microglía y determinar si realmente pudiera ser benéfico en enfermedades del SNC, en este caso concretamente de la EA y la AAC.

Adicionalmente, se utilizó la técnica de doble inmunofluorescencia para evaluar de manera cualitativa la asociación, si es que existe, de la microglía activada y la presencia de A $\beta$  en CA1, giro dentado y tálamo en cerebros de ratones Tg-SwDI tras la administración intranasal de dexametasona. En las Figuras 19, 20 y 21 se puede observar que la asociación entre los marcadores de interés no cambia, ya que tanto en los ratones control como en los del grupo de dexametasona, la microglía activada se encuentra contigua a los depósitos de A $\beta$  e incluso hay puntos de colocalización; además, pareciera que hay una disminución de las placas amiloides tanto en la región del giro dentado como del tálamo, sin embargo, no se puede afirmar que esta es significativa sin un análisis cuantitativo.

Actualmente las terapias para la EA son predominantemente dirigidas hacia A $\beta$  con el objetivo de reducir ya sea su producción, reducir la carga amiloide en placas o promover su eliminación; sin embargo, no han tenido el efecto esperado en las fases clínicas, probablemente debido a que en las etapas de la enfermedad en la que éstas se han aplicado, la amiloidosis ya está muy avanzada (Yiannopoulou, K. G., & Papageorgiou, S. G., 2020). Si bien se ha propuesto que entonces su aplicación sea en etapas más tempranas, el diagnóstico de la EA es complicado puesto que es una enfermedad que se desarrolla hasta 20 o 30 años antes del inicio de los primeros síntomas (Foidl, B. M. & Humpel, C., 2020); por ello, es importante estudiar otras alternativas para la terapéutica, como es la neuroinflamación, y observar si esto también induce cambios sobre A $\beta$ .

## Conclusiones

La administración intranasal de dosis de 0.25 mg/kg de dexametasona a los 3, 4 y 5 meses de edad no tuvo efecto sobre la expresión de Iba-1 en microglía de ratones Tg-SwDI de 6 meses de edad.

Además, no hay cambios en la distribución de la microglía activada respecto a A $\beta$ .

Se observó una tendencia en disminución de las placas amiloides en los ratones tratados con dexametasona en giro dentado y tálamo, sin embargo, se requeriría un análisis cuantitativo para determinar si esta diferencia es significativa. Para completar el estudio, se necesitan experimentos con más animales.

## Perspectivas

Se incluyen propuestas de los próximos pasos a realizar en la presente investigación:

- Determinación de la presencia de dexametasona en cerebros de ratones Tg-SwDI tras la administración intranasal del fármaco.
- Medición de la expresión de otros marcadores de microglia reactiva.
- Medición de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias en cerebros de ratones Tg-SwDI previamente tratados con dexametasona o SSI.
- Cuantificación de A $\beta$  en los ratones tratados con dexametasona y ratones control para evaluar si hay diferencias significativas.

## Referencias

1. Alvites, R. D., Caseiro, A. R., Pedrosa, S. S., Branquinho, M. E., Varejão, A. S. P., & Maurício, A. C. (2018). The Nasal Cavity of the Rat and Mouse—Source of Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Peripheral Nerve Injury. *Anatomical Record*, 301(10), 1678–1689. <https://doi.org/10.1002/ar.23844>
2. Alzheimer's Association. (2022). *2022 Alzheimer's Disease. Facts and Figures*. <https://www.alz.org/media/Documents/alzheimers-facts-and-figures.pdf>
3. Alzheimer's Association. (2022). *Dementia vs. Alzheimer's Disease: What is the Difference?* <https://www.alz.org/alzheimers-dementia/difference-between-dementia-and-alzheimer-s>
4. APP KM670/671NL (Swedish), Alzforum. (n.d.). Recuperado el 14 octubre, 2022, de <https://www.alzforum.org/mutations/app-km670671nl-swedish>
5. Armstrong, R. A. (2019). Risk factors for alzheimer disease. [Factores de riesgo para la enfermedad de Alzheimer]. *Brain and Nerve*, 57(2), 87–105.
6. Arvanitakis, Z., Leurgans, S. E., Wang, Z., Wilson, R. S., Bennett, D. A., & Schneider, J. A. (2011). Cerebral amyloid angiopathy pathology and cognitive domains in older persons. *Annals of Neurology*, 69(2), 320–327. <https://doi.org/10.1002/ana.22112>
7. Beeri, M. S., Schmeidler, J., Lesser, G. T., Maroukian, M., West, R., Leung, S., ... Haroutunian, V. (2012). Corticosteroids, but not NSAIDs, are associated with less Alzheimer neuropathology. *Neurobiology of Aging*, 33(7), 1258–1264. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.02.011>
8. Bitter, C., Suter-Zimmermann, K., & Surber, C. (2011). Nasal drug delivery in humans. *Current Problems in Dermatology*, 40, 20–35. <https://doi.org/10.1159/000321044>
9. Bohlen, C. J., Friedman, B. A., Dejanovic, B., & Sheng, M. (2019). Microglia in Brain Development, Homeostasis, and Neurodegeneration. *Annual Review of Genetics*. Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-112618-043515>
10. Borst, K., Dumas, A. A., & Prinz, M. (2021, October 12). Microglia: Immune and non-immune functions. *Immunity*. Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.09.014>
11. Brenowitz, W. D., Nelson, P. T., Besser, L. M., Heller, K. B., & Kukull, W. A. (2015). Cerebral amyloid angiopathy and its co-occurrence with Alzheimer's disease and other cerebrovascular neuropathologic changes. *Neurobiology of Aging*, 36(10), 2702–2708. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.06.028>
12. BrightFocus Foundation., (27 de septiembre de 2021). *Enfermedad de Alzheimer: Datos y Cifras*. <https://www.brightfocus.org/espanol/alzheimer/la-enfermedad-de-alzheimer-y-la-demencia/enfermedad-de-alzheimer-datos-y-cifras>
13. Campbell, C., Morimoto, B. H., Nenciu, D., & Fox, A. W. (2012). Drug development of intranasally delivered peptides. *Therapeutic delivery*, 3(4), 557–568. <https://doi.org/10.4155/tde.12.12>
14. Castellani, R. J., Rolston, R. K., & Smith, M. A. (2010). Alzheimer disease. *Disease-a-Month*. Mosby Inc. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2010.06.001>
15. Chapman, C. D., Frey, W. H., Craft, S., Danielyan, L., Hallschmid, M., Schiöth, H. B., & Benedict, C. (2013, October). Intranasal treatment of central nervous system dysfunction in humans. *Pharmaceutical Research*. <https://doi.org/10.1007/s11095-012-0915-1>

16. Chen, J., Zheng, Z. V., Lu, G., Chan, W. Y., Zhang, Y., & Wong, G. K. C. (2022, July 1). Microglia activation, classification and microglia-mediated neuroinflammatory modulators in subarachnoid hemorrhage. *Neural Regeneration Research*. Wolters Kluwer Medknow Publications. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.330589>
17. Chow, V. W., Mattson, M. P., Wong, P. C., & Gleichmann, M. (2010). An overview of APP processing enzymes and products. *Neuromolecular Medicine*. <https://doi.org/10.1007/s12017-009-8104-z>
18. Condello, C., Yuan, P., Schain, A., & Grutzendler, J. (2015). Microglia constitute a barrier that prevents neurotoxic protofibrillar A $\beta$ 42 hotspots around plaques. *Nature Communications*, 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms7176>
19. Coronel, R., Palmer, C., Bernabeu-Zornoza, A., Monteagudo, M., Rosca, A., Zambrano, A., & Liste, I. (2019, October 1). Physiological effects of amyloid precursor protein and its derivatives on neural stem cell biology and signaling pathways involved. *Neural Regeneration Research*. Wolters Kluwer Medknow Publications. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.257511>
21. Crowe, T. P., Greenlee, M. H. W., Kanthasamy, A. G., & Hsu, W. H. (2018, February 15). Mechanism of intranasal drug delivery directly to the brain. *Life Sciences*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.12.025>
22. Davis, B. M., Salinas-Navarro, M., Cordeiro, M. F., Moons, L., & Groef, L. D. (2017). Characterizing microglia activation: A spatial statistics approach to maximize information extraction. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01747-8>
23. Davis, J., Xu, F., Deane, R., Romanov, G., Previti, M. L., Zeigler, K., ... & Van Nostrand, W. E. (2004). Early-onset and robust cerebral microvascular accumulation of amyloid  $\beta$ -protein in transgenic mice expressing low levels of a vasculotropic Dutch/Iowa mutant form of amyloid  $\beta$ -protein precursor. *Journal of Biological Chemistry*, 279(19), 20296-20306.
24. 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>
25. DrugBank., (06 de septiembre de 2022). *Dexamethasone*. <https://go.drugbank.com/drugs/DB01234>
26. Erdő, F., Bors, L. A., Farkas, D., Bajza, Á., & Gizurarson, S. (2018, October 1). Evaluation of intranasal delivery route of drug administration for brain targeting. *Brain Research Bulletin*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.10.009>
27. Escartin, C., Galea, E., Lakatos, A., O'Callaghan, J. P., Petzold, G. C., Serrano-Pozo, A., ... Verkhratsky, A. (2021, March 1). Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nature Neuroscience*. Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00783-4>
28. Foidl, B. M., & Humpel, C. (2020). Can mouse models mimic sporadic Alzheimer's disease?. *Neural regeneration research*, 15(3), 401–406. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.266046>
29. Gänger, S., & Schindowski, K. (2018, September 1). Tailoring formulations for intranasal nose-to-brain delivery: A review on architecture, physico-chemical characteristics and mucociliary clearance of the nasal olfactory mucosa. *Pharmaceutics*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10030116>

30. Gobierno de México., (05 de octubre de 2021). *Enfermedad de Alzheimer, demencia más común que afecta a personas adultas mayores*. <https://www.gob.mx/salud/es/articulos/enfermedad-de-alzheimer-demencia-mas-comun-que-afecta-a-personas-adultas-mayores?idiom=es>
31. Grassin-Delyle, S., Buenestado, A., Naline, E., Faisy, C., Blouquit-Laye, S., Couderc, L. J., ... Devillier, P. (2012, June). Intranasal drug delivery: An efficient and non-invasive route for systemic administration - Focus on opioids. *Pharmacology and Therapeutics*. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.03.003>
32. Greenberg, S. M., Bacskai, B. J., Hernandez-Guillamon, M., Pruzin, J., Sperling, R., & van Veluw, S. J. (2020, January 1). Cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer disease — one peptide, two pathways. *Nature Reviews Neurology*. Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0281-2>
33. Hampel, H., Hardy, J., Blennow, K., Chen, C., Perry, G., Kim, S. H., ... Vergallo, A. (2021, October 1). The Amyloid- $\beta$  Pathway in Alzheimer's Disease. *Molecular Psychiatry*. Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01249-0>
34. Hansen, D. V., Hanson, J. E., & Sheng, M. (2018, February 1). Microglia in Alzheimer's disease. *Journal of Cell Biology*. Rockefeller University Press. <https://doi.org/10.1083/jcb.201709069>
35. Hui, Z., Zhijun, Y., Yushan, Y., Liping, C., Yiyang, Z., Difan, Z., ... 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>
36. 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>
37. Kabir, M. T., Uddin, M. S., Setu, J. R., Ashraf, G. M., Bin-Jumah, M. N., & Abdel-Daim, M. M. (2020, December 1). Exploring the Role of PSEN Mutations in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Neurotoxicity Research*. Springer. <https://doi.org/10.1007/s12640-020-00232-x>
38. Knopman, D. S., Amieva, H., Petersen, R. C., Chételat, G., Holtzman, D. M., Hyman, B. T., ... Jones, D. T. (2021). Alzheimer disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00269-y>
39. Korzhevskii, D. E., & Kirik, O. V. (2016). Brain Microglia and Microglial Markers. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 46(3), 284–290. <https://doi.org/10.1007/s11055-016-0231->
40. Kuhn J, Sharman T. Cerebral Amyloid Angiopathy. [Updated 2022 Jun 6]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556105/>
41. Lee, C. Y. D., & Landreth, G. E. (2010, August). The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain. *Journal of Neural Transmission*. <https://doi.org/10.1007/s00702-010-0433-4>
42. Li, Q., & Barres, B. A. (2018, April 1). Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.125>
43. Lyman, M., Lloyd, D. G., Ji, X., Vizcaychipi, M. P., & Ma, D. (2014). Neuroinflammation: The role and consequences. *Neuroscience Research*. Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2013.10.004>

44. Meneses, G., Gevorkian, G., Florentino, A., Bautista, M. A., Espinosa, A., Acero, G., ... 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>
45. Müller, Ulrike C.; Deller, Thomas; Korte, Martin (2017). Not just amyloid: physiological functions of the amyloid precursor protein family. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(5), 281–298. doi:10.1038/nrn.2017.29
46. National Institute of Aging. (08 de julio de 2021). *What is Alzheimer's Disease?* <https://www.nia.nih.gov/health/what-alzheimers-disease#:~:text=Alzheimer's%20disease%20is%20a%20brain,appear%20in%20their%20mid%2D60s>.
47. Ohsawa, K., Imai, Y., Sasaki, Y., & Kohsaka, S. (2004). Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. *Journal of Neurochemistry*, 88(4), 844–856. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02213.x>
48. Oray, M., Abu Samra, K., Ebrahimiadib, N., Meese, H., & Foster, C. S. (2016, April 2). Long-term side effects of glucocorticoids. *Expert Opinion on Drug Safety*. Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1517/14740338.2016.1140743>
49. Organización Mundial de la salud. (21 de septiembre de 2020). *Demencia*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
50. Paredes Mogollo, A. (2015). Importance of the nasal route in opioid administration. *Medicina Paliativa*, 22, 33–45. [https://doi.org/10.1016/S1134-248X\(15\)30007-0](https://doi.org/10.1016/S1134-248X(15)30007-0)
51. Park, M. J., Park, H. S., You, M. J., Yoo, J., Kim, S. H., & Kwon, M. S. (2019). Dexamethasone Induces a Specific Form of Ramified Dysfunctional Microglia. *Molecular Neurobiology*, 56(2), 1421–1436. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1156-z>
52. Pérez-Osorio, I. N., Espinosa, A., Velázquez, M. G., Padilla, P., Bárcena, B., Fragoso, G., ... Conde, E. L. S. (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>
53. Perry, V. H., Nicoll, J. A. R., & Holmes, C. (2010, April). Microglia in neurodegenerative disease. *Nature Reviews Neurology*. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2010.17>
54. Piaceri, I., Nacmias, B., & Sorbi, S. (2013). Genetics of familial and sporadic Alzheimer's disease. *Frontiers in bioscience (Elite edition)*, 5(1), 167–177. <https://doi.org/10.2741/e605>
55. Pires, A., Fortuna, A., Alves, G., & Falcão, A. (2009). Intranasal drug delivery: How, why and what for? *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. Canadian Society for Pharmaceutical Sciences. <https://doi.org/10.18433/j3nc79>
56. Previti, M. L., Zhang, W., & Van Nostrand, W. E. (2006). Dexamethasone diminishes the pro-inflammatory and cytotoxic effects of amyloid  $\beta$ -protein in cerebrovascular smooth muscle cells. *Journal of Neuroinflammation*, 3. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-3-18>
57. Rawlinson, C., Jenkins, S., Thei, L., Dallas, M. L., & Chen, R. (2020, March 1). Post-ischaemic immunological response in the brain: Targeting microglia in ischaemic stroke therapy. *Brain Sciences*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/brainsci10030159>

58. Reyna, M., Vinicio, M., López, F. & González, G. (2014). Demencias, una visión panorámica. *Simposio de Medicina Geriátrica, Universidad Autónoma de San Luis Potosí*.
59. Rukmangadachar, L. A., & Bollu, P. C. (2022). Amyloid Beta Peptide. In StatPearls. StatPearls Publishing.
60. Saido, T., Sasaguri, H., Hashimoto, S., Watamura, N., Sato, K., Takamura, R., ... & Iwata, N. (2022). Recent advances in the modeling of Alzheimer's disease. *Frontiers in Neuroscience*, 334.
61. Serrano-Pozo, A., Frosch, M. P., Masliah, E., & Hyman, B. T. (2011). Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006189>
62. Shabab, T., Khanabdali, R., Moghadamtousi, S. Z., Kadir, H. A., & Mohan, G. (2017, July 3). Neuroinflammation pathways: a general review. *International Journal of Neuroscience*. Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/00207454.2016.1212854>
63. Sorrells, S. F., & Sapolsky, R. M. (2007). An inflammatory review of glucocorticoid actions in the CNS. *Brain, Behavior, and Immunity*. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2006.11.006>
64. Shi, F. J., Xie, H., Zhang, C. Y., Qin, H. F., Zeng, X. W., Lou, H., ... Xu, G. X. (2021). Is Iba-1 protein expression a sensitive marker for microglia activation in experimental diabetic retinopathy? *International Journal of Ophthalmology*, 14(2), 200–208. <https://doi.org/10.18240/IJO.2021.02.04>
65. Sibila, O., Suarez-Cuartin, G., Rodrigo-Troyano, A., & Anzueto, A. (2015). Corticosteroids and Pneumonia in COPD: A Dual Effect? *Barcelona Respiratory Network*, 1(2). <https://doi.org/10.23866/brnrev:2015-m0010>
66. Tarasoff-Conway, J. M., Carare, R. O., Osorio, R. S., Glodzik, L., Butler, T., Fieremans, E., ... De Leon, M. J. (2015, August 8). Clearance systems in the brain - Implications for Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2015.119>
67. Tellechea, P., Pujol, N., Esteve-Belloch, P., Echeveste, B., García-Eulate, M. R., Arbizu, J., & Riverol, M. (2018). Enfermedad de Alzheimer de inicio precoz y de inicio tardío: ¿son la misma entidad?. *Neurología*, 33(4), 244-253.
68. Thal, D. R., Rüb, U., Orantes, M., & Braak, H. (2002). Phases of A $\beta$ -deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology*, 58(12), 1791–1800. <https://doi.org/10.1212/WNL.58.12.1791>
69. Tharp, W. G., & Sarkar, I. N. (2013). Origins of amyloid- $\beta$ . *BMC Genomics*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-290>
70. Vademecum., (16 de diciembre de 2021). *Dexametasona*. <https://www.vademecum.es/principios-activos-dexametasona-h02ab02>
71. van Rossum, D., & Hanisch, U. K. (2004). Microglia. *Metabolic brain disease*, 19(3), 393-411.
72. 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>
73. Yamada, M. (2000). Cerebral amyloid angiopathy: An overview. *Neuropathology*. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1789.2000.00268.x>

74. Yamada, M. (2015, January 1). Cerebral amyloid angiopathy: Emerging concepts. *Journal of Stroke. Korean Stroke Society*. <https://doi.org/10.5853/jos.2015.17.1.17>
75. Yasir M, Goyal A, Sonthalia S. Corticosteroid Adverse Effects. [Updated 2022 Jul 4]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531462/>
76. Yiannopoulou, K. G., & Papageorgiou, S. G. (2020). Current and Future Treatments in Alzheimer Disease: An Update. *Journal of Central Nervous System Disease*, 12, 117957352090739. <https://doi.org/10.1177/1179573520907397>
77. Yoon, S. S., & Jo, S. A. (2012, May). Mechanisms of amyloid- $\beta$  peptide clearance: Potential therapeutic targets for Alzheimer's disease. *Biomolecules and Therapeutics*. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2012.20.3.245>
78. Yu, Y., & Ye, R. D. (2015, January 1). Microglial A $\beta$  Receptors in Alzheimer's Disease. *Cellular and Molecular Neurobiology*. Springer Science and Business Media, LLC. <https://doi.org/10.1007/s10571-014-0101-6>
79. Zhao, Y., Wu, X., Li, X., Jiang, L. L., Gui, X., Liu, Y., Sun, Y., Zhu, B., Piña-Crespo, J. C., Zhang, M., Zhang, N., Chen, X., Bu, G., An, Z., Huang, T. Y., & Xu, H. (2018). TREM2 Is a Receptor for  $\beta$ -Amyloid that Mediates Microglial Function. *Neuron*, 97(5), 1023–1031.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.01.031>