



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**EFFECTO DE LA INHALACIÓN DE PENTÓXIDO DE VANADIO ( $V_2O_5$ ) SOBRE LA  
MEMORIA Y ALTERACIONES DEL CITOESQUELETO EN ESTRUCTURAS  
CEREBRALES RELACIONADAS CON LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

Claudia Dorado Martínez

Tutor principal:

Dra. María Rosa Avila Costa FES Iztacala, UNAM

Miembros del Comité Tutor:

Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda Instituto de Neurobiología, UNAM

Dr. José Luis Ordóñez Librado FES Iztacala, UNAM

Los Reyes Iztacala, EDOMEX, enero 2024



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Neuromorfología, FES Iztacala UNAM, apoyado por el proyecto PAPIIT-DGAPA-UNAM: IN216821.

## AGRADECIMIENTOS:

*A mi tutora la Dra. María Rosa Avila Costa por compartir sus ideas conmigo, por su cuidadoso y apasionado apoyo en la construcción de este trabajo.*

*A mis co-asesores la Dra. Sofía Díaz Miranda y el Dr. José Luis Ordóñez por brindarme su invaluable orientación y su opinión experta.*

*A la Dra. Nuri Aranda y a la Coordinación de la Maestría en Ciencias (Neurobiología) por todo el apoyo en la realización de mis estudios de maestría.*

*Por el apoyo económico a CONACYT.*

*A la UNAM, siempre tendré un puma en el corazón.*

## DEDICATORIA:

*A mi madre, por su mirada llena de amor que me ha abrazado toda la vida.*

*A mi padre, por enseñarme a disfrutar la vida y a estar presente.*

*A Alfredo, mi compañero de vida y de camino.*

*A Santiago, por compartir conmigo tu deseo constante de ir por caminos diferentes.*

*A Sebastián, por tu finísima lógica que te hace un interlocutor maravilloso.*

*A Alfonso y Rodolfo, por estar siempre cerca.*

*A Adriana y Connie, tenerlas es una de las mayores bendiciones de mi vida, gracias por tanto.*

*A mis sobrinos, que son sin duda, lo más brillante de lo Dorado.*

*A mis cuñados y a los Valero, por formar esta hermosa familia.*

*A mis compañeros de laboratorio, muchas gracias por todo el apoyo.*

*A mis amigos muchas gracias por todos los cafés, los sueños compartidos, la música, la solidaridad y las pláticas, pero sobre todo; el amor.*

*Muchas gracias a todos, me sé muy afortunada de tenerles en mi vida.*

## Índice

1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	ANTECEDENTES	1
	2.1 ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	3
	2.1.1. Desarrollo de la enfermedad	4
	2.1.2 Signos y síntomas	4
	2.1.3. Factores de riesgo	5
	2.1.4. Factores protectores	5
	2.1.5. Factores genéticos	
	2.2 CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS Y ESTUDIOS DE IMAGEN	7
	2.3 ESCALAS CLÍNICAS	9
	2.4 REDES Y NÚCLEOS NEURONALES AFECTADOS EN LA EA	11
	2.5 PRINCIPALES VÍAS ANATÓMICAS EN LA FORMACIÓN HIPOCAMPAL	12
	2.5.1 ESTRUCTURAS INVOLUCRADAS Y ANATOMÍA FUNCIONAL COMPARADA	13
	2.6. ALTERACIONES HISTOLÓGICAS Y MOLECULARES	15
	2.6.1. $\beta$ A	15
	2.6.2. CAA	16
	2.6.3. TAU	17
	2.6.4. NFTs	21
	2.6.5. Cuerpos de Hirano, activación de la glía, pérdida neuronal de sinapsis y espinas dendríticas	22
	2.7. TEORÍA COLINÉRGICA	23
	2.8. MODELOS ANIMALES	24
	2.9. PRUEBAS CONDUCTUALES	26
	2.10. CONTAMINACIÓN AMBIENTAL Y VANADIO	26
	2.11. VANADIO – UN EFECTO BIFÁSICO	27
	2.12. PENTÓXIDO DE VANADIO	30
	2.13. TOXICIDAD DE $V_2O_5$	30
	2.14. HIPERFOSFORILACIÓN (HIPERVANADILACIÓN) DE TAU	33
3.	JUSTIFICACIÓN	35
4.	HIPÓTESIS	35
5.	OBJETIVOS	35
6.	ESTRATEGIAS EXPERIMENTALES	36

7. RESULTADOS	42
7.1 CONDUCTA	42
7.2 ANÁLISIS MORFOMÉTRICO	45
7.2.1 HIPOCAMPO	45
7.2.2 SUBÍCULUM	50
7.2.3. CORTEZA ENTORRINAL	54
7.2.4. AMÍGDALA	59
7.2.5. CORTEZA FRONTAL	64
8. DISCUSIÓN	71
9. LIMITACIONES	74
10. CONCLUSIONES	74
11. PERSPECTIVAS	75
12. LITERATURA CITADA	76
13. ANEXO (Standard Operating Procedure)	87

## Abreviaturas

<i>BBB</i>	Barrera hematócerebral (en inglés brain blood barrier)
<i>CAA</i>	Angiopatia amiloide cerebral (en inglés Cerebral Amyloid Angiopathy)
<i>CDR</i>	Escala clínica de demencia (en inglés Clinical Dementia Rating)
<i>CERAD</i>	Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease
<i>DCL</i>	Deterioro cognitivo leve
<i>EA</i>	Enfermedad de Alzheimer
<i>EAe</i>	Enfermedad de Alzheimer de inicio tardío o esporádica (en inglés LOAD Late Onset Alzheimer Disease)
<i>EAf</i>	Enfermedad de Alzheimer de inicio temprano o familiar (en inglés EOAD Early Onset Alzheimer Disease)
<i>GSH</i>	Glutación
<i>ROS</i>	Especies reactivas de oxígeno
<i>NT</i>	Filamentos de neuropilo (en inglés Neuropil Threads)
<i>PHF</i>	Filamentos helicoidales pareados
<i>IRM</i>	Imágenes de resonancia magnética
<i>NFT</i>	Marañas neurofibrilares intracelulares (en inglés Neuro Fibrillary Tangles)
<i>V<sub>2</sub>O<sub>5</sub></i>	Pentóxido de vanadio
<i>PET</i>	Tomografía de emisión de positrones
<i>MTP</i>	Poro de transición de permeabilidad de la membrana mitocondrial
<i>βA</i>	Proteína beta-amiloide
<i>APP</i>	Proteína precursora amiloidea (en inglés Amyloid Precursor Protein)
<i>MAPs</i>	Proteínas de unión a microtúbulos o (en inglés Microtubule Associated Proteins)
<i>RMNf</i>	Resonancia magnética funcional
<i>SOP</i>	Standard Operating Procedure
<i>SOD</i>	Superóxido Dismutasa
<i>TDP43</i>	TAR DNA-binding protein 43
<i>V</i>	Vanadio



## Resumen

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la patología neurodegenerativa más común a nivel mundial, se ha reportado que aproximadamente 15 millones de personas padecen esta enfermedad, la incidencia anual aumenta 0.5% en personas de 65 años y 8% en personas de 85 años; aunque se describió hace más de 100 años y se están realizando muchas investigaciones sobre esta patología, ha sido difícil encontrar un modelo animal que replique todas las características del proceso neurodegenerativo del Alzheimer. Experimentos previos en nuestro laboratorio han demostrado que la exposición crónica al pentóxido de vanadio ( $V_2O_5$ ) en ratas causa cambios morfológicos y de comportamiento similares a los observados en la EA. El objetivo principal de este trabajo es caracterizar los cambios morfológicos y conductuales que se presenten en las ratas expuestas a la inhalación de  $V_2O_5$  como un posible modelo de la EA. Para ello, 40 ratas Wistar macho se dividieron aleatoriamente en dos grupos control y dos grupos experimentales ( $n = 10$ ) con un peso inicial de 180-200 gr. Los grupos experimentales fueron expuestos a  $V_2O_5$  0.02M durante 1 h, 3 veces a la semana, durante 6 meses, después de la exposición de 6 meses, un grupo experimental, y un grupo control fueron dejados en recuperación durante 6 meses. Para medir los cambios de comportamiento, los cuatro grupos fueron entrenados en la prueba del laberinto en T que evalúa la memoria espacial y una prueba de campo abierto durante 10 minutos. Todos los grupos fueron evaluados una vez al mes durante 6 o doce meses. Para medir las alteraciones histológicas en CA1, el subículum, la corteza entorrinal, la amígdala, y la corteza frontal, se hicieron la tinción de Rojo Congo y las impregnaciones de Bielschowsky y Golgi para realizar el análisis morfométrico. Los resultados de memoria muestran deterioro en el grupo expuesto a  $V_2O_5$ , que no se revierte después de los 6 meses de recuperación. Durante la prueba de campo abierto, se observaron diferencias en el patrón de locomoción del grupo experimental; la actividad motora disminuyó (menos líneas cruzadas) mientras que el estado de congelación aumentó. La tinción de rojo Congo y la impregnación de Bielschowsky mostraron que las neuronas afectadas tienen las mismas características morfológicas que las neuronas de los pacientes con EA, (es decir, las células afectadas tienen forma de "flama"), y se observan estructuras similares a las marañas neurofibrilares (NFT) y a las placas neuríticas. Al hacer una comparación entre las cinco estructuras de los datos obtenidos del análisis morfométrico, observamos que la estructura que sufrió mayor daño por la exposición a  $V_2O_5$  fue el hipocampo, las estructuras donde observamos mayor pérdida neuronal, fueron el hipocampo y la corteza frontal. En CA1 esta disminución en el número de neuronas, está asociada con la acumulación de NFT y con la disminución en la densidad de espinas dendríticas. En corteza frontal (CxFr) la disminución neuronal se asocia con NFT y con proteína beta-amiloide ( $\beta A$ ). En subículum encontramos daño relacionado con NFT y con  $\beta A$ . En corteza entorrinal y amígdala (CxEnt y Amg) se observó daño relacionado con  $\beta A$ . Las alteraciones observadas producto de la inhalación crónica a  $V_2O_5$  nos permiten proponer un modelo de la EA inducida que causa alteraciones de la memoria espacial y la conducta motora, acumulación de  $\beta A$  en endotelio vascular y en las neuronas piramidales de la corteza frontal y entorrinal y así como acumulación de NFT intraneuronal en neuronas piramidales en CA1 y subículum y pérdida de espinas dendríticas. También hay disminución en el número de neuronas en corteza y CA1, estas alteraciones no son reversibles después de 6 meses todo lo cual es compatible con un estadio Braak IV de la EA.

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Neuromorfología, FES Iztacala UNAM, apoyado por el proyecto PAPIIT-DGAPA-UNAM: IN216821.

## Abstract

Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative pathology worldwide, it has been reported that approximately 15 million people suffer from this disease, the incidence annually increases 0.5% in 65 year old people and 8% in 85 year olds; although it was described more than a 100 years ago and there is a lot of research being done about this pathology, it has been difficult to find an animal model that replicates all the characteristics of the neurodegenerative process of Alzheimer's. Previous experiments in our laboratory have shown that chronic exposure to vanadium pentoxide in rats causes morphological and behavioral changes like those seen in AD. The main objective of this work is to characterize the morphological and behavioral changes that occur in rats exposed to the inhalation of  $V_2O_5$  as a possible model of AD. To this end 40 male Wistar rats were randomly divided into two control and two experimental groups ( $n = 10$ ) with an initial weight of 180-200 gr. The experimental groups were exposed to  $V_2O_5$  0.02M for 1 h, 3 times a week, for 6 months, after 6-month exposure one experimental and one control groups were leaved in a 6-month recovery phase. To measure behavioral changes, the four groups were trained in the T-maze test that assesses spatial behavior and an open field test for 10 mins. All groups were evaluated once a month for 6 or twelve months. To measure the histological alterations in CA1, the subiculum, the entorhinal cortex, the amygdala, and the frontal cortex, the Congo Red stain and the Bielschowsky and Golgi impregnations were performed for morphometric analysis. Memory results show deterioration in the group exposed to  $V_2O_5$ , which does not recover after 6 months of recovery. To measure histological alterations, after 6 or 12 months of inhalation, frontal and entorhinal cortex, CA1, subiculum and amygdala, underwent Congo red or argentic Bielschowsky impregnation and were analyzed. Memory results in the T-maze show memory impairment since the group had been exposed for three months to  $V_2O_5$ . During the open field test, differences were observed in the locomotion pattern of the experimental group. Motor activity decreased (less lines crossed) while freezing increased. Congo red staining and Bielschowsky impregnation showed that the affected neurons have the same morphological characteristics as the neurons of AD patients, (i.e., the affected cells are "flame-shaped"), and structures similar to neurofibrillar tangles and neuritic plaques are observed. When making a comparison between the five structures of the data obtained from the morphometric analysis, we observed that the structure that suffered the greatest damage from exposure to V was the hippocampus, the structures where we observed the greatest neuronal loss were the hippocampus and the frontal cortex. In CA1 this decrease in the number of neurons is associated with the accumulation of NFT and with the decrease in the density of dendritic spines. In CxFr neuronal decline is associated with NFT and  $\beta A$ . In subiculum we found damage related to NFT and  $\beta A$ . In CxEnt and Amg we found damage related to  $\beta A$ . Our conclusions are that chronic inhalation of  $V_2O_5$  is a model of induced AD that causes alterations of spatial memory and motor behavior, accumulation of  $\beta A$  in vascular endothelium and pyramidal neurons of the frontal and entorhinal cortex and accumulation of intraneuronal NFT in pyramidal neurons in CA1 and subiculum and loss of dendritic spines. A decrease in the number of neurons in the cortex and CA1 is observed, these alterations are not reversible after 6 months all of which is compatible with a Braak IV stage of AD.

## 1. INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es la patología neurodegenerativa de mayor prevalencia a nivel mundial, se ha reportado que aproximadamente 15 millones de personas la presentan, la incidencia aumenta 0.5 % anual en personas de 65 años y 8 % en personas de 85 años (Iqbal & Grundke-Iqbal, 2007; Praticò D & Delanty, 2000). En México más de 350000 personas están afectadas por la EA y mueren por ella anualmente 2030 pacientes (INNN, 2017). Algunos de los síntomas clínicos más significativos son: pérdida de la memoria, desorientación en tiempo y espacio, colocar objetos en lugares erróneos, cambios de humor y/o comportamiento (Iqbal et al., 2005). La demencia es un síndrome clínico caracterizado por el deterioro progresivo de dos o más dominios cognitivos, incluyendo la memoria, el lenguaje, la función ejecutiva y viso espacial, la personalidad y el comportamiento, lo que provoca la pérdida de capacidades para realizar actividades instrumentales y/o básicas de la vida diaria. La EA es, con mucho, la causa más común de demencia y representa hasta el 80% de todos los diagnósticos de demencia. Esta enfermedad se caracteriza, patológicamente por la acumulación extraneuronal de proteína  $\beta$ A en forma de placas y la agregación intraneuronal de la proteína Tau en forma de marañas neurofibrilares.

## 2. ANTECEDENTES

Las principales características histológicas de esta patología se basan en la presencia de placas neuríticas, también llamadas placas seniles (difusas y clásicas) en el espacio extracelular; estas placas están compuestas principalmente por  $\beta$ A, proteoglicanos, apolipoproteína  $\epsilon$ 4, citocinas y derivados de la  $\alpha$ -sinucleína (Alonso et al., 1994), así mismo se presenta degeneración neurofibrilar intraneuronal de la proteína Tau (fosfoproteína que promueve el ensamblaje y mantiene la estructura del citoesqueleto). Se ha reportado que la hiperfosforilación de esta proteína altera la estructura de los microtúbulos, provocando que no se polimerice adecuadamente el citoesqueleto, lo que conlleva a que los sistemas celulares de transporte anterógrado y retrógrado se interrumpan, provocando que la proteína Tau se acumule de manera anormal en el citoplasma, originando los filamentos helicoidales pareados (PHF) (Iqbal et al., 2005). En tejido de pacientes que presentaron la EA, se ha mostrado la hiperfosforilación anormal de la proteína Tau, lo anterior es una de las principales causas de la muerte celular, por lo que la función de esta proteína está regulada por el grado de fosforilación (Alonso et al., 1994; Iqbal et al., 2005; Lindwall & Cole, 1984).

Ahora bien, los modelos animales que se han desarrollado para el estudio de la EA se basan principalmente en la administración estereotáxica de fármacos como el ácido iboténico, antagonistas colinérgicos como escopolamina, oligómeros de proteína  $\beta$ -amiloide, cultivo de células y animales transgénicos (LaFerla & Green, 2012; Neff, 2019). Sin embargo, ninguno de ellos replica las características neurodegenerativas crónicas y progresivas de la enfermedad en humanos.

Por otro lado, el vanadio (V) es un metal de transición que pertenece al grupo V de la tabla periódica, está ampliamente distribuido en la naturaleza; se encuentra en productos derivados del petróleo y se emplea para fabricar aleaciones, piezas para automóviles y pinturas (INCHEM, 2001). Químicamente presenta varios estados de oxidación ( $1^+$  a  $5^+$ ), reportándose que el pentóxido de vanadio ( $V_2O_5$ ) es el más tóxico para las células (Barceloux & Barceloux, 1999). El V puede entrar al organismo por ingestión, inhalación y por vía parenteral, siendo la ruta de la inhalación la mayor vía de entrada (Barceloux & Barceloux, 1999; Nechay, 1984). Una vez que el V se encuentra en la sangre se une a la transferrina y la albúmina para ser transportado hacia todos los tejidos, en el cerebro se acumula el 5 % (Nechay, 1984). Se ha reportado que el V entra a las células a través de receptores aniónicos, y ya en el interior celular reacciona con la NADPH-oxidasa para generar vanadato y, a través de la reacción de Fenton genera radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ) e ion hidroxilo ( $OH^{-1}$ ) (Liochev & Fridovich, 1990; Nechay, 1984; Stern et al., 1993), así mismo el vanadato puede reaccionar con el  $O_2$  molecular para generar (ion

peróxido)  $O_2^-$  y (peróxido de hidrógeno)  $H_2O_2$  (Liochev & Fridovich, 1990; Nechay, 1984). Se ha reportado que el V, por su estructura se comporta como fosforilasa Barceloux & Barceloux, 1999; Morinville et al., 1998; Mukherjee et al., 2004; Nechay, 1984). Además, se ha descrito que el vanadato inhibe la tirosina fosfatasa incrementando los residuos fosforilados de p-Tyr-Ser, la expresión de la proteína G p21 RAS relacionándose con el inicio del estrés oxidativo (Capella et al., 2002; Capella et al., 2007). Más aún, se ha reportado que ratones expuestos a la inhalación de  $V_2O_5$  presentan alteraciones en la polimerización de la tubulina alterando la estructura de los microtúbulos en el parénquima y mesénquima testicular. Parece que  $V_2O_5$  puede interactuar con proteínas citoesqueléticas, como los filamentos de actina, inhibiendo la polimerización (Mussali-Galante et al., 2005); fosforila a la tubulina modificando la polaridad por lo que altera el citoesqueleto (Ramírez et al., 1997). En ratas, la administración oral de V induce cambios en la actividad motora y el aprendizaje (Barth et al., 2002; Sánchez et al., 1998). La administración i.p. de V (5+) diariamente por una semana a ratas, aumenta los niveles de peroxidación de lípidos en cerebelo e hipocampo (García et al., 2004; Garcia et al., 2005). Nuestro grupo mostró que ratones expuestos a la inhalación de  $V_2O_5$  (0.02M) una hora, dos veces por semana presentan pérdida de espinas dendríticas, necrosis y alteraciones en el neuropilo de CA1, dichos cambios se correlacionan con alteraciones en la memoria espacial (Avila-Costa et al., 2006); más aún, nuestro grupo demostró que la inhalación de  $V_2O_5$  (0.02M) produce alteraciones de la barrera hematoencefal (BBB) (las alteraciones morfológicas incluyeron pérdida de cilios, desprendimiento de células y desprendimiento de la capa celular endotelial) permitiendo libre circulación del V hacia el tejido nervioso (Avila-Costa et al., 2005). Recientemente, en nuestro laboratorio realizamos un estudio piloto en donde se expusieron ratas a la inhalación de  $V_2O_5$  (0.02M), una hora dos veces por semana por seis meses, encontrándose que aumenta de manera significativa el número de neuronas hiperfosforiladas (Tau-Ser<sup>262</sup>) en el hipocampo CA1 con respecto al grupo control a las 16 y 32 inhalaciones, así mismo utilizando la tinción argéntica de Bielschowsky se encontraron células intensamente argirofílicas con forma de flama en neuronas del hipocampo semejantes a las reportadas en tejidos de pacientes con EA (fig. 1) (Montiel-Flores et al., 2021). Y, mediante la prueba conductual del tablero perforado encontramos evidencias de que hay alteración significativa de la memoria de trabajo (datos no publicados).

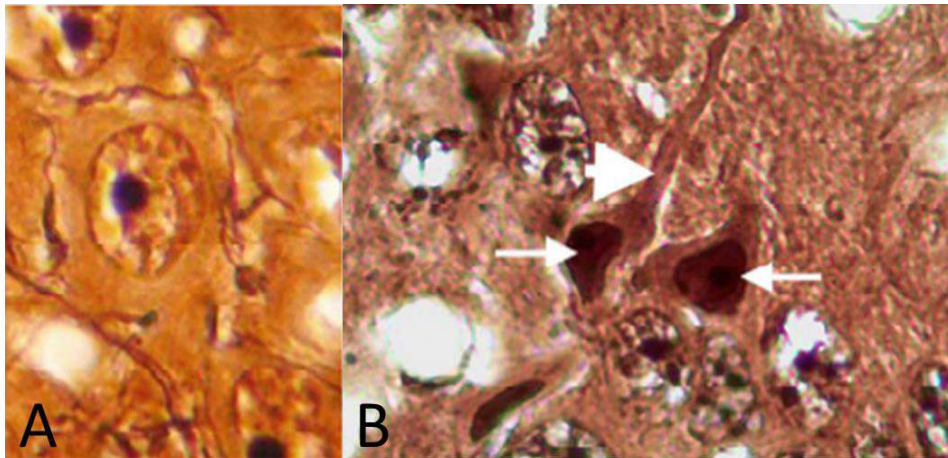


Figura 1. Fotomicrografías representativas con la tinción de Bielschowsky de CA1 del hipocampo a 100X, la figura A corresponde al grupo control, la figura B corresponde a los cambios observados en el grupo expuesto a  $V_2O_5$  durante 6 meses donde se observan células intensamente argirofílicas con la típica forma de flama (flechas), y NFT (cabeza de flecha) (Montiel-Flores et al. 2021).

El  $V_2O_5$  al interactuar con proteínas citoesqueléticas, altera la formación y función de microtúbulos. Lee (2015) reportó que la polimerización de la actina en la formación del citoesqueleto determina la morfología de las dendritas y las espinas (Lee, 2015). Por lo anteriormente expuesto consideramos que la inhalación de  $V_2O_5$  puede provocar alteraciones importantes en el citoesqueleto de las neuronas en estructuras cerebrales relacionadas con la EA, como el hipocampo, el subículo y la corteza entorrinal y que por lo tanto existan alteraciones de la memoria espacial. Por lo que hemos observado con la tinción de Bielschowsky, las neuronas afectadas presentan las

mismas características morfológicas que las neuronas de los pacientes con EA, es decir, las células afectadas tienen forma de "flama" y se observan estructuras parecidas a las marañas neurofibrilares, y a las placas seniles formadas por acúmulos de  $\beta$ A es probable que encontremos correlación entre los cambios de la memoria espacial y las alteraciones histopatológicas del hipocampo, subíulum, la corteza entorrinal, la amígdala y la corteza frontal.

## 2.1 ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Aunque el concepto de demencia ha existido durante siglos, es a principios del siglo pasado que se describió por primera vez un síndrome clínico particular y los cambios neurodegenerativos asociados al mismo. En 1907, el médico Alöis Alzheimer describió cuidadosamente los síntomas de una mujer de 51 años, Auguste Deter, que estaba bajo su cuidado en el asilo estatal en Frankfurt Alemania la descripción de Alzheimer es la primera caracterización neuropsicológica de la enfermedad:

*"Su memoria está seriamente deteriorada. Cuando se le muestran objetos, los nombra correctamente, pero casi inmediatamente después lo ha olvidado todo. Al hacer una lectura, salta de una línea a otra o lee deletreando las palabras individualmente, o pronunciándolas en forma que pierden sentido. Por escrito, repite sílabas separadas muchas veces, omite otras y descompone las frases. Al hablar, rellena huecos con algunas expresiones parafraseadas ("vertidor de leche" en lugar de taza); a veces es obvio que no puede seguir una conversación. Claramente, ella no entiende ciertas preguntas. Ella no recuerda el uso de algunos objetos."(Alzheimer, 1907).*

Cuando Auguste Deter murió, Alzheimer utilizó la recién descubierta técnica argéntica de Bielschowsky para examinar microscópicamente el cerebro, observando placas neuríticas, marañas neurofibrilares y angiopatía amiloidea que se convertirían en características de la enfermedad que ahora lleva su nombre (Bondi et al., 2017).

Aunque la demencia se asocia con más de 70 patologías que provocan disfunción cerebral, la EA es la causa de demencia más común y representa aproximadamente la mitad de todos los casos. En 1968 el grupo de Blessed mostró una correlación entre el grado de patología en el cerebro, con el rendimiento en pruebas cognitivas estandarizadas poco antes de la muerte de los pacientes (Blessed et al., 1968), este fue el primer estudio que vinculó fuertemente las características clínicas de la EA con los cambios cerebrales patológicos que Alzheimer había descrito (Bondi et al., 2017).

Los estudios neuropsicológicos de demencia y EA hasta los 70s se limitaron en gran medida a la demencia presenil (con inicio antes de los 65 años). Los estudios del grupo de Edgar Miller mostraron que la característica conductual principal de la EA presenil es un trastorno de la memoria reciente que no llega a integrarse en memoria de largo plazo (Miller, 1971; Miller, 1975), estos primeros estudios prepararon el escenario para innumerables estudios que examinaron la naturaleza del deterioro cognitivo Bondi et al., 2017).

Un cambio importante en el estudio de la demencia ocurrió en 1976 cuando Robert Katzman analizó datos que mostraban que la demencia tipo Alzheimer (DTA) senil y presenil eran histopatológicamente idénticas y sugirió que, basándose en datos epidemiológicos, la EA era la cuarta causa de muerte en los ancianos (Bondi et al., 2017). A partir de entonces, la DTA pasó de ser una condición relativamente rara a un problema de salud pública. En el DSM-III (Cooper & Michels, 1988), se afinaron los criterios diagnósticos para la demencia. Albert y colaboradores (1974) se refirieron al patrón de disfunción cognitiva, observado en pacientes con parálisis supranuclear progresiva, como "demencia subcortical" caracterizada por olvido, lentitud de los procesos de pensamiento, personalidad alterada con apatía o depresión, y capacidad deteriorada para manipular el conocimiento adquirido, cambios cognitivos similares se observaron en pacientes con enfermedad de

Huntington. Otros estudios delinearon más las diferencias cualitativas entre los déficits cognitivos asociados con demencias "corticales y subcorticales" (Bondi et al., 2017).

A nivel clínico, inicialmente la EA cursa con un deterioro cognitivo leve que se agrava con el progreso de la enfermedad hasta que llega un punto en el que el paciente no es capaz de hacerse cargo de sí mismo. La EA se caracteriza por un periodo preclínico asintomático muy largo, durante el cual se producen alteraciones a nivel molecular (DeTure & Dickson, 2019), por lo que uno de los retos con respecto a la EA es su diagnóstico temprano, antes de que esos signos preclínicos se hagan irreversibles. Las alteraciones neuropatológicas incluyen atrofia en la formación hipocampal, en áreas corticales temporal y frontal, y dilatación de los ventrículos laterales, a nivel microscópico se observan alteraciones en diversos núcleos, incluyendo el hipocampo, la neocorteza y algunas regiones subcorticales. Alois Alzheimer describió dos elementos neuropatológicos especialmente distintivos de la EA: placas neuríticas y marañas neurofibrilares intracelulares (NFT, del inglés neurofibrillary tangle) (Alzheimer, 1907). Existen otras alteraciones secundarias frecuentes, como restos de neuritas distróficas y los hilos o filamentos de neuropilo (NT del inglés neuropil threads), así como la microglía activada y los astrocitos reactivos, y otras menos frecuentes, como la aparición de los cuerpos de Hirano, la degeneración gránulo-vacuolar y la angiopatía amiloide. Además, la EA suele cursar con otras alteraciones moleculares, como alteraciones en las proteínas  $\alpha$ -sinucleína y TDP43 (TAR DNA-binding protein 43) (DeTure & Dickson, 2019).

#### Desarrollo de la enfermedad

Las sensaciones, movimientos, pensamientos, recuerdos y sentimientos son el resultado de señales electroquímicas que pasan a través de miles de millones de neuronas, que se comunican constantemente entre sí a través de impulsos eléctricos que viajan por los axones, causando la liberación de mensajeros químicos a las neuronas vecinas; astrocitos y microglía eliminan los desechos y ayudan a mantener las neuronas saludables (Holtzman et al., 2012). El proceso neurodegenerativo en la EA se establece por la acumulación de la proteína Tau hiperfosforilada que forma NFT y los  $\beta$ A que se acumulan formando placas en el tejido neural. La acumulación de NFT y placas  $\beta$ A no son los únicos factores implicados en la EA, el daño vascular altera la irrigación y nutrición del tejido neural, la inflamación crónica activa a la microglía, y los astrocitos reaccionan a la microglía activada. Se ha reportado una correlación inversa entre la gravedad de la demencia en la EA con una disminución en la neurotransmisión colinérgica, con el tiempo las neuronas pierden la capacidad de comunicarse (Hampel et al., 2018). A medida que las neuronas mueren, comenzando en el hipocampo, las personas pueden experimentar pérdida de la memoria, problemas en la toma de decisiones o problemas de lenguaje, gradualmente disminuye la capacidad de razonar, recordar, tomar decisiones y funcionar de forma independiente (Holtzman et al., 2012).

#### Signos y síntomas de la EA

Los problemas de memoria suelen ser uno de los primeros signos de deterioro cognitivo relacionado con la EA. Algunos pacientes desarrollan deterioro cognitivo leve (DCL), en el que las personas tienen más problemas de memoria de lo común para su edad, pero sus síntomas no interfieren con su vida cotidiana, el DCL también se ha relacionado con problemas de insomnio y anosmia. Se han hecho investigaciones sobre el uso de biomarcadores para detectar cambios tempranos en los cerebros de las personas con DCL y EA (Fig. 2) (Drew, 2018).

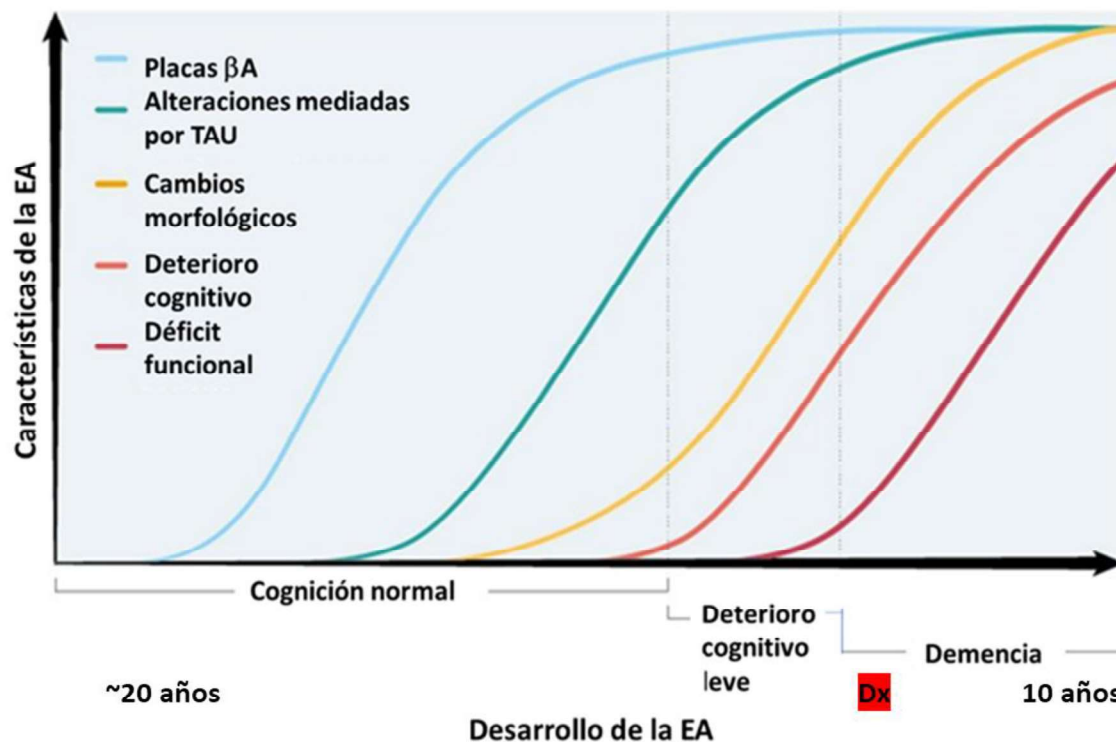


Figura 2. Esquema que muestra la progresión temporal de patología de la EA y su relación con algunos biomarcadores: las placas  $\beta$ A y NFT aparecen en un momento donde no hay deterioro cognitivo, más tarde hay deterioro cognitivo leve con cambios morfológicos en el cerebro y deterioro en la memoria, y al final demencia acompañada de deterioro funcional en aumento. El inicio del proceso fisiopatológico empieza alrededor de 20 años antes del diagnóstico (Tomado y modificado de Drew, 2018) [https://media.nature.com/w800/magazine-assets/d41586-018-05718-5/d41586-018-05718-5\\_15959722.jpg](https://media.nature.com/w800/magazine-assets/d41586-018-05718-5/d41586-018-05718-5_15959722.jpg)

### Factores de riesgo

La edad avanzada no causa la EA, pero es el factor de riesgo conocido más importante para el desarrollo de la patología, el número de personas con EA se duplica aproximadamente cada cinco años después de los 65, algunos cambios relacionados con la edad como atrofia de ciertas partes del cerebro, inflamación, daño vascular, producción de radicales libres y alteración del metabolismo energético intracelular pueden dañar las neuronas y afectar a otros tipos de células cerebrales para contribuir al daño presente en la EA (Mayeux & Stern, 2012). Los factores de riesgo incluyen principalmente enfermedades preexistentes como diabetes, cardiovasculares infecciones virales, estilos de vida poco saludables y exposiciones a contaminantes ambientales (fig. 3). La hipertensión y la diabetes aumentan el riesgo de padecer EA a través de un "doble impacto" que genera daño cerebrovascular añadido, (Mayeux & Stern, 2012).

### Factores protectores

Es fundamental aumentar la reserva cognitiva, principalmente a través de la educación formal y la interacción social. La evidencia epidemiológica sugiere que la educación y la actividad física protegen contra la EA, una dieta variada, balanceada, frugal y rica en antioxidantes (dieta MIND), sociabilizar, sueño suficiente y actividad intelectual son factores protectores que ayudan a las personas a mantenerse saludables a medida que envejecen disminuyendo el riesgo de deterioro cognitivo y EA (fig. 3.) (Mayeux & Stern, 2012).



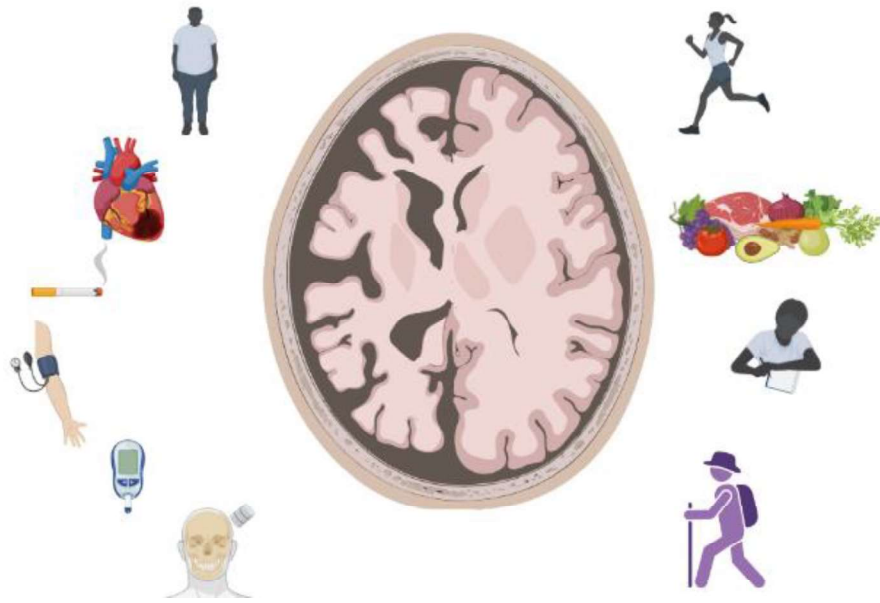


Figura 3. **Factores de riesgo** (izquierda) obesidad, enfermedad cardiovascular, tabaquismo, hipertensión, diabetes, traumatismo craneoencefálico y **factores protectores** (derecha) ejercicio, dieta antiinflamatoria y antioxidante, educación, actividades recreativas (hecho con BioRender), basado en Mayeux & Stern, 2012.

### Factores genéticos

Hay dos tipos principales de EA: la familiar (<5% de los casos diagnosticados) y la esporádica (>95% de los casos diagnosticados). La EA familiar (EAf o EOAD *Early Onset Alzheimer Disease*, en inglés) es hereditaria y aparece a una edad temprana (entre 40 y 57 años aproximadamente) (fig. 4). La esporádica (EAe o LOAD *Late Onset Alzheimer Disease*, en inglés) no tiene un componente hereditario dominante como la familiar y aparece generalmente a edades más avanzadas (después de 62 años) (fig. 4). Ambos tipos de EA comparten el mismo patrón anatómico-patológico y clínico (Bekris et al., 2010). Los estudios de asociación genética han identificado más de 20 genes de riesgo, estos genes, relativamente comunes confieren sólo un pequeño aumento en el riesgo, pero cuando se combinan casi pueden duplicar la frecuencia de casos. Hay otros genes de baja frecuencia que confieren un riesgo relativamente alto de EA y al conocer su función proporcionan información sobre la patogénesis. Tener una variante del gen de la apolipoproteína E (*ApoE*) en el cromosoma 19 aumenta el riesgo de una persona de padecer EAe. El gen *ApoE*  $\epsilon 2$  es relativamente raro y puede proporcionar cierta protección contra la enfermedad. *ApoE*  $\epsilon 3$ , el alelo más común, se cree que juega un papel neutro en la enfermedad, *ApoE*  $\epsilon 4$  aumenta el riesgo de padecer EA y también se asocia con una edad más temprana de aparición de la enfermedad (Tanzi, 2012). Tener uno o dos alelos *ApoE*  $\epsilon 4$  aumenta el riesgo de desarrollar EA. Las tres mutaciones de un solo gen asociadas con EAf son: Proteína precursora amiloidea (*APP*) en el cromosoma 21 (cromosoma triplicado en el síndrome de Down), Presenilina 1 (*PSEN1*) en el cromosoma 14 y Presenilina 2 (*PSEN2*) en el cromosoma 1. Estas mutaciones son parte de un proceso que genera acumulación de placas de  $\beta A$ , sello distintivo de la EA (fig. 4) (Tanzi, 2012).

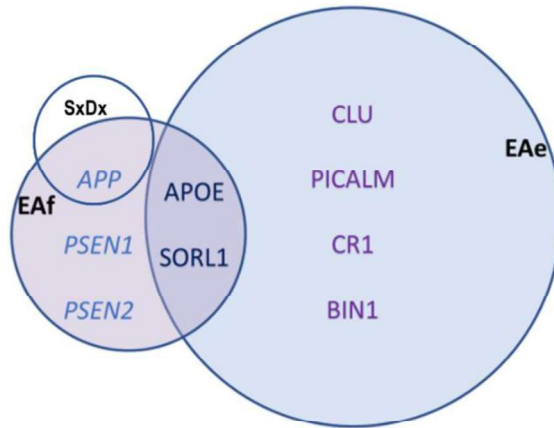


Figura 4. Diagrama que muestra las variantes genéticas asociadas con la EA. *APP*, *PSEN1* y *PSEN2* son mutaciones con un patrón autosómico dominante asociado con la EAf. *APOE* y *SORL1* son variantes asociadas con ambas, EAf y EAe. *APP* está localizada en el cromosoma 21, triplicado en síndrome de Down (SxDx). La clusterina (*CLU*), la proteína ensamblada a clatrina unida a fosfatidil inositol (*PICALM*), el receptor 1 del componente del complemento (*CR1*), y la proteína integradora de enlace 1 (*BIN1*) son variantes asociadas con EAe (Modificado de Tanzi, 2012).

## 2.2 CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS Y ESTUDIOS DE IMAGEN

Aunque el resultado imagenológico macroscópico del cerebro no es el “estándar de oro” para el diagnóstico de la EA, un patrón simétrico típico de atrofia cortical, que afecta predominantemente la parte medial de los lóbulos temporales respetando las cortezas motora primaria, sensorial y visual, se considera altamente sugestivo de EA, como resultado de este patrón de adelgazamiento cortical se observa dilatación de los ventrículos laterales (Whitwell, 2018). El hipocampo es una de las primeras regiones cerebrales afectadas en la EA, el hipocampo está relacionado con la memoria, la navegación espacial, la memoria espacial y la inhibición de algunas conductas; el daño del hipocampo puede provocar pérdida de memoria y dificultad para construir nuevas memorias (Whitwell, 2018). Los estudios de morfometría cerebral utilizando imágenes de resonancia magnética (IRM) se consideran un método válido para evaluar el estado de la enfermedad su progresión, muchos estudios de IRM se han basado en mediciones de volúmenes de regiones cerebrales particulares, específicamente del hipocampo (fig. 5) y la corteza entorrinal que muestran cambios histopatológicos en las etapas iniciales de la EA, este patrón es estereotípico y se puede reconocer temprano en el curso clínico de la enfermedad. El deterioro cerebrovascular, generalmente en forma de enfermedad oclusiva de vasos pequeños, causado por hipertensión crónica y otros factores de riesgo vascular es una afección que, con frecuencia acompaña el envejecimiento en general y a la EA en particular (Josephs et al., 2017; Serrano-Pozo et al., 2011).

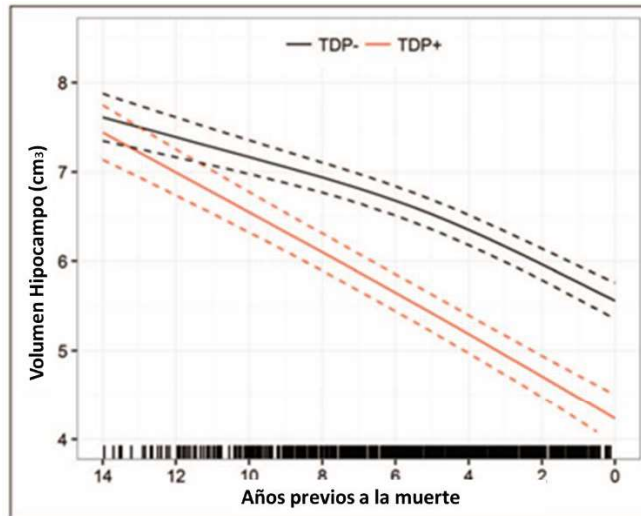


Figura 5. Curvas de pérdida de volumen del hipocampo a lo largo del tiempo para individuos con EA con y sin proteína TDP-43 en hipocampo. Las tasas de atrofia del hipocampo son más rápidas en individuos TDP-43+ (proteína nuclear crítica para la supervivencia de las células nerviosas) con mayores tasas de atrofia observadas aproximadamente una década antes de la muerte. Tomado de (Josephs et al., 2017).

Estudios de RMf (resonancia magnética funcional) muestran la relación entre atrofia e hipo metabolismo entre núcleos cerebrales involucrados en la EA (fig. 6) (Chételat, 2018). La aplicación de la “teoría de grafos”, (que consiste en el estudio de la actividad bioeléctrica cerebral mediante el registro electroencefalográfico realizado tanto a participantes sanos como enfermos (Salcines-Gómez, 2021)), a la investigación de la EA mediante RM estructural es prometedora porque la patología de Tau progresa en todo el cerebro de manera estereotipada, lo que sugiere que las propiedades de conectividad también pueden cambiar de manera ordenada en el transcurso de la enfermedad y pueden tener utilidad diagnóstica y pronóstica; las mediciones cuantitativas de la atrofia cerebral durante meses o años obtenidas de IRM estructurales seriadas (fig. 6) puede rastrear la progresión de la enfermedad y evaluar el efecto terapéutico de los tratamientos modificadores de la enfermedad que, potencialmente proporcionan una alternativa objetiva y más robusta que las medidas neuropsicológicas convencionales (Matsuda, 2016).

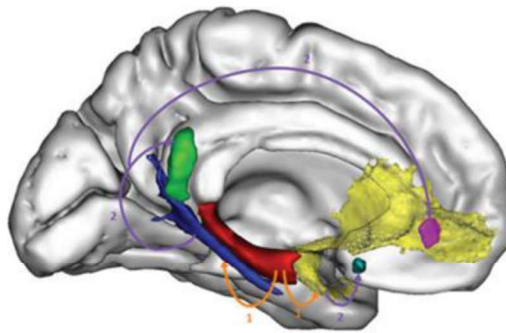


Figura 6. Esquema que muestra la relación entre atrofia e hipo metabolismo entre núcleos cerebrales involucrados en EA. Estudios de imagen que muestran que la atrofia en el hipocampo (rojo) es parcialmente responsable de la alteración de la sustancia blanca (la vía perforante en azul y el fascículo uncinado en amarillo) (1) responsables del hipo metabolismo en el cíngulo posterior (verde) y la corteza orbital frontal media (lila y verde claro) (2). Tomado de (Chételat, 2018).

Los estudios de neuroimagen molecular basados en ligandos de imágenes de tomografía por emisión de positrones (PET) que se unen con alta afinidad a las proteínas Tau y  $\beta$ A, indican que la degradación de Tau está estrechamente relacionada con los síntomas clínicos y los marcadores de neurodegeneración y conectividad funcional en la EA, los datos también confirman que la acumulación de  $\beta$ A precede a la deposición de Tau y

parece tener relación con su desarrollo. Sin embargo, estas relaciones están fuertemente modificadas por la edad, es probable que las personas con EAe tengan diferentes mecanismos fisiopatológicos en comparación con personas que sufren EAf (fig. 7) (Whitwell, 2018).

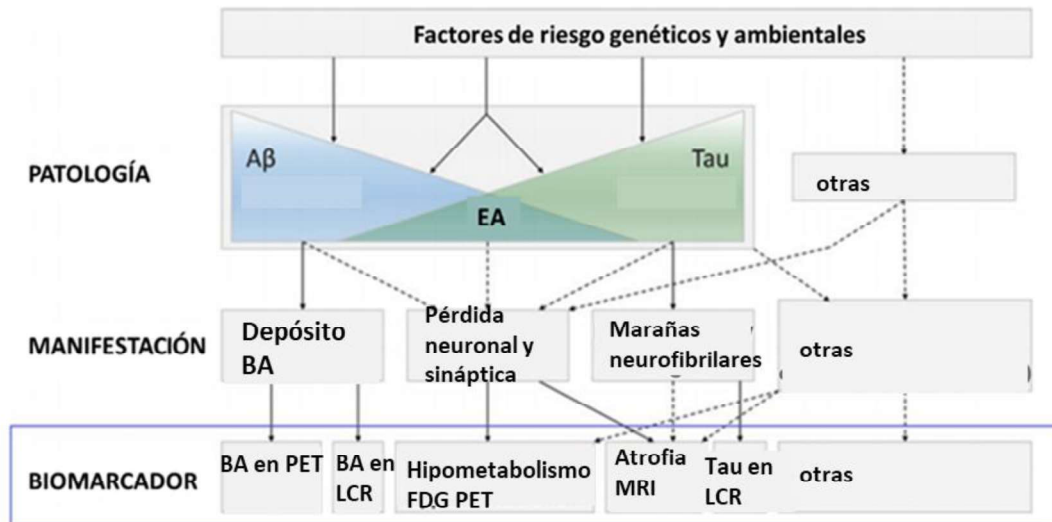
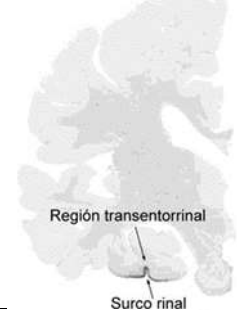
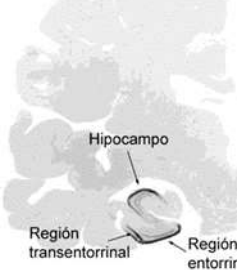
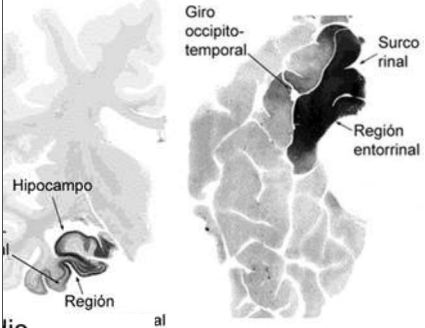
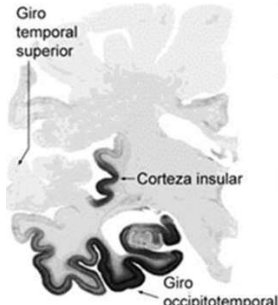


Figura 7. Modelo propuesto por Chetalat (2018) que muestra la relación entre las manifestaciones generadas por la alteración en el plegamiento de proteínas con la manifestación de la EA, y la relación de algunos biomarcadores con las manifestaciones neuromorfológicas de la EA. Tomado y modificado de Chételat, 2018.

### 2.3 ESCALAS HISTOPATOLÓGICAS Y CLÍNICAS

Escala Clínica de Braak. En la tabla 1 se observa la representación del avance de la patología de Tau según lo describieron Heiko y Eva Braak en 1991, quienes propusieron seis estadios que explican la progresión clínico-patológica de la EA (Braak & Braak, 1991) en función de la localización y densidad de NFTs, empleando el anticuerpo AT8 (*Phospho-Tau (Ser202, Thr205) Monoclonal Antibody*) ver Tabla I (adaptada de Braak et al., 2006).

**Tabla I. Escala Histopatológica-Clinica de Braak.**

<p style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">E II CORTEZA ENTORRINAL Y TRANSENTORRINAL</p>	 <p>Región transentorrinal Surco rinal</p>	<p>Estadio I: alteraciones en la región transentorrinal, donde comienzan a visualizarse neuronas inmunorreactivas para el anticuerpo AT8 (AT8-ir) que muestran dicho marcaje tanto en el soma como en las prolongaciones celulares.</p>
	 <p>Hipocampo Región transentorrinal Región entorrinal</p>	<p>Estadio II: alteraciones desde la región transentorrinal hasta la región entorrinal, especialmente afectando a las capas superficiales de la corteza. Además, neuronas AT8-ir comienzan a aparecer en áreas del hipocampo como CA1 y CA2</p> <p>Estadio I-II: Los pacientes presentan perfiles cognitivos y clínicos asintomáticos. Los casos de estadio II muestran numerosas NFT e hilos del neuropilo en la región transentorrinal, y algunos en la región entorrinal. La destrucción cortical en el estadio II no supera el umbral sobre el cual aparecen los síntomas clínicos iniciales.</p>
	 <p>Giro occipito-temporal Surco rinal Región entorrinal Hipocampo Región</p>	<p>Estadio III: la región entorrinal muestra mayor densidad de neuronas AT8-ir y éstas comienzan a alcanzar la corteza temporal. En cuanto al hipocampo, tanto las áreas CA1 y CA2 muestran mayor densidad de neuronas AT8-ir y comienzan a aparecer también en la región CA3</p> <p>Estadio III-IV: La destrucción cortical es ya severa, pero limitada a unas pocas regiones allocorticales y áreas adyacentes. Los protocolos clínicos de muchos individuos en el estadio III o IV registran deterioro de las funciones cognitivas y presencia de cambios sutiles de la personalidad. En otros individuos, la aparición de síntomas está todavía camuflada por capacidades de reserva del individuo, las cuales compensan la destrucción local. A causa de la expresión ocasional de los síntomas iniciales y las lesiones cerebrales características, los casos de estadios III y IV, se considera que representan la EA incipiente.</p>
<p style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">FASE III IV LÍMBICA</p>	 <p>Giro temporal superior Corteza insular Giro occipitotemporal</p>	<p>Estadio IV: aumenta la densidad de neuronas AT8-ir en las regiones ya afectadas. Además, comienzan a visualizarse neuronas AT8-ir en las regiones del subículo y CA4 del hipocampo, y la densidad de estas en el área CA3 del hipocampo aumenta considerablemente. La patología avanza hacia regiones de la neocorteza, observando un gran número de neuronas AT8-ir en la corteza temporal. La corteza occipital se mantiene intacta</p>

FASE V-VI ISOCORTICAL		<p>Estadio V: la patología avanza por el lóbulo temporal alcanzando ya otras regiones corticales de los lóbulos frontal, parietal y occipital. La corteza visual primaria muestra muy pocos signos de la patología, con escasos NPs y alguna neurona AT8-ir muy aislada</p>
		<p>Estadio VI: el último estadio, en el que la mayoría de las áreas de la neocorteza se ven afectadas por la patología, exhibiendo un gran número de neuronas AT8-ir. En la región occipital, la patología alcanza la zona del estriado.</p> <p>Estadio V-VI: Se asocia con un deterioro funcional y cognitivo significativo. Estos estadios corresponden a la EA completamente desarrollada. La secuencia y el patrón de destrucción son muy similares al progreso de mielinización cortical en el desarrollo inicial, pero en orden contrario.</p>

Abreviaciones Tabla I. AT-8 (anticuerpo monoclonal fosfo-Tau), NP (placas neurales).

Además de la Escala Histopatológica de Braak, existen otros métodos para evaluar el avance de la EA, como la de Thal (2002) que evalúa la fase de progresión en función de la proteína  $\beta$ A o la puntuación CERAD (del inglés Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease), que evalúa la progresión de la patología mediante una valoración semicuantitativa de las placas seniles (Brunnström & Englund, 2011), y la Evaluación Cognitiva de Montreal (MoCA), una prueba breve de 30 preguntas cuya aplicación lleva alrededor de 10 a 12 minutos y ayuda a evaluar las disfunciones cognitivas leves. El National Institute on Aging and Reagan Institute (NIA-RI) recomienda la combinación de las escalas de Braak y la CERAD para hacer un diagnóstico neuropatológico completo del estadio en el que se encuentra la EA (Brunnström & Englund, 2011).

El NPI (Neuropsychiatric inventory Questionnaire) o el NEUROPSI (<https://neuropsi.com.mx/>) se utilizan para evaluar los síntomas cognitivos de los pacientes con demencia y el desgaste de los cuidadores. Al analizar con IRM el volumen de la amígdala en pacientes con EA el grupo de Wang encontró que un 59.1% de los pacientes con EA presentaron síntomas neuropsiquiátricos; irritabilidad (22.73%), dificultades para dormir (22.73%), apatía (18.18%) y alucinaciones (13.64%), en pacientes con DCL (CDR (Clinical Dementia Rating) 4.5-9) 25% tenía síntomas cognitivos, manifestados como irritabilidad y agitación, el 60% de pacientes con demencia moderada (CDR 9.5-15.5) presentaban irritabilidad y delirio, el 75% de pacientes con demencia severa (CDR 16-18) tenía síntomas neuropsiquiátricos severos, principalmente irritabilidad y delirio (Wang et al., 2021).

Desde una perspectiva clínica, la EA se diagnostica clásicamente en la etapa de demencia cuando los déficits cognitivos ya afectan significativamente las actividades de la vida diaria, sin embargo, debido a la naturaleza progresiva del deterioro cognitivo y la patología subyacente, la enfermedad se caracteriza por una etapa asintomática o "preclínica", donde se desarrollan las características patológicas ( $\beta$ A y Tau) en individuos con cognición normal, seguida de una etapa pre-demencia o prodrómica, donde los síntomas son detectables pero no suficientes para cumplir los criterios de demencia (de Flores et al., 2015). Esta última etapa generalmente, pero no siempre corresponde al subtipo clínico definido como DCL que es una entidad heterogénea que puede deberse a diversas etiologías neurológicas o psiquiátricas, algunos desarrollan EA o demencia y otros permanecen estables o incluso vuelven a la cognición normal durante el período de seguimiento, esta variabilidad acentúa



la necesidad de desarrollar métodos y herramientas que permitan la identificación de los pacientes con DCL que tienen más probabilidades de progresar eventualmente a EA para su posible inclusión en los ensayos clínicos (de Flores et al., 2015).

## 2.4 REDES Y NÚCLEOS NEURONALES AFECTADOS EN LA EA

La distribución anatómica de los cambios patológicos en la EA es selectiva para ciertas áreas cerebrales. El hipocampo es particularmente sensible a desarrollar las afectaciones características de la EA, especialmente NFT y pérdida de neuronas y neuritas, las NFT primero se desarrollan en CA1, luego en el subículum, y después en CA2, CA3 y CA4/DG (Braak et al., 1993). En cuanto a la pérdida neuronal, el grupo de West reportó pérdida importante de neuronas en pacientes con EA en CA1 (68%), subículum (47%) e hilus (25%), en comparación con los individuos control de la misma edad (West et al., 1994). Relacionando estudios histopatológicos con estudios de neuroimagen se ha demostrado que el hipocampo ya está significativamente dañado en el momento del diagnóstico de la EA (demencia): en un metaanálisis de neuroimagen que incluye 700 pacientes con demencia de leve a moderada, la pérdida de volumen es de alrededor del 23-24% en comparación con los controles de la misma edad (Shi et al., 2009). Estudios longitudinales realizados en cohortes de ancianos, cognitivamente normales han reportado que la atrofia del hipocampo ya está presente en la etapa preclínica de DCL hasta 10 años antes del diagnóstico de demencia. Entre pacientes con DCL se ha identificado un patrón focal de atrofia restringido a la región lateral del hipocampo que corresponde a CA1, y a veces incluye al subículum. Medir el volumen del hipocampo, especialmente de CA1 o CA1/2 resulta en un biomarcador que indica la degeneración relacionada con la EA en diferentes etapas de la progresión de la enfermedad (Wirth et al., 2013). Esto es consistente con la descripción de que la patología de NFT, la pérdida sináptica, neuronal y volumétrica son focales en las primeras etapas fisiopatológicas y se extiende progresivamente a todo el hipocampo para llegar a ser globales en la etapa avanzada de la demencia (de Flores et al., 2015).

Típicamente, la degeneración neurofibrilar en la EA se origina en la corteza transentorrinal y progresa a través del hipocampo para dirigirse a las cortezas de asociación y finalmente, a las cortezas primarias; sin embargo, algunos estudios sugieren que este patrón de progresión patológica podría no ser el único patrón de degeneración neurofibrilar (Murray et al., 2011). El grupo de Murray identificó dos subtipos clínico-patológicos distintos de la EA típica: la EA que respeta hipocampo y la EA de predominio límbico (Murray et al., 2011).

## 2.5 PRINCIPALES VÍAS ANATÓMICAS EN LA FORMACIÓN HIPOCAMPAL

El hipocampo está involucrado, entre otras cosas, con la memoria asociativa y la memoria de localización espacial, el hipocampo integra diferentes aferencias de estímulos olfatorios, auditivos, y visuales que llegan a través de la corteza entorrinal entrando a CA1, CA3 y DG, que es el sitio de entrada de información al hipocampo, a través de células granulares excitatorias, que establecen contactos sinápticos con las células piramidales, esta información pasa por CA1 y vuelve a la corteza entorrinal, estos circuitos son muy plásticos, con abundantes ramificaciones y abundante remodelado de las conexiones (Hartley et al., 2014) (fig. 8). La comunicación entre la amígdala y el hipocampo se encarga de la recuperación de memorias cuando se desea (Phelps, 2004), los BLa y BLp del complejo amigdalino se proyectan directamente a la porción ventral del hipocampo CA1 (vCA1) y establecen circuitos monosinápticos glutamatérgicos (fig. 8) (Yang & Wang, 2017). La corteza frontal tiene una vía de comunicación con la corteza entorrinal medial.

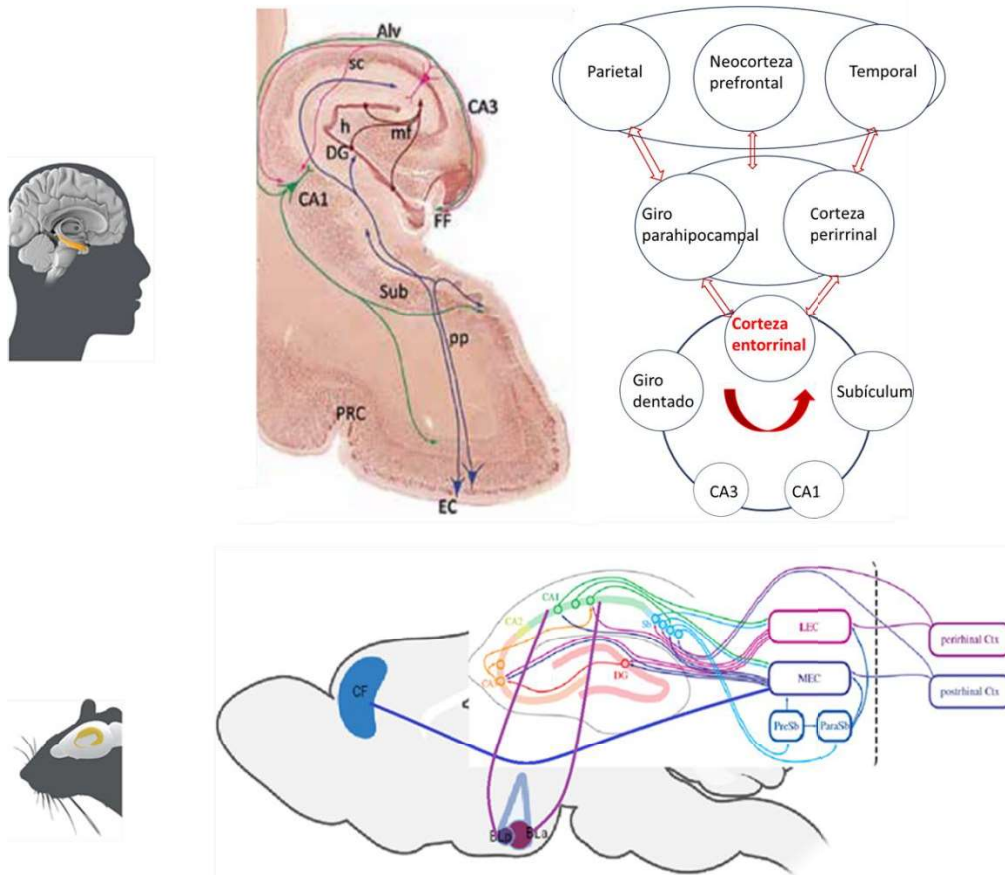


Figura 8. Principales vías anatómicas en la formación hipocampal del humano y de la rata. Esquema superior; Patrón de conectividad cortical e intrínseca de la formación hipocampal humana. Hay flujo recíproco de información cortical que converge a través de la circunvolución parahipocampal y la corteza peririnal sobre la corteza entorrinal. Esquema inferior; La vía trisináptica clásica consiste en la proyección desde la corteza entorrinal (LEC: corteza entorrinal lateral; MEC: corteza entorrinal medial) al giro dentado (DG), de DG a CA3, y de CA3 a CA1. La vía entorrinal también consta de proyecciones monosinápticas directas de LEC y MEC a CA3, a CA1 y al subiculum (Sb). La proyección de CA1 a Sb y a LEC/MEC, y proyecciones de Sb a LEC/MEC, completan el circuito. Otros circuitos implican proyecciones de subiculum a presubiculum (PreSb) y a parasubiculum (ParaSb), y proyecciones de PreSb a MEC, y ParaSb a LEC y MEC. La vía perforante es la vía entorrinal a DG, CA3, CA1 y Sb, la vía de proyección de fibra musgosa de DG a CA3, la vía colateral de Schaffer de CA3 a CA1. La corteza postrinal es un análogo de rata de la corteza parahipocampal de primates. También están representadas las vías de la corteza frontal (CF) a MEC y las conexiones de la amígdala basolateral posterior (BLp) y basolateral anterior (Bla) a CA1. Modificado de Hartley et al., 2014 y Schultz & Engelhardt, 2014.

## ESTRUCTURAS INVOLUCRADAS Y ANATOMÍA FUNCIONAL COMPARADA

El **hipocampo** es una estructura situada profundamente en los lóbulos temporales de ambos hemisferios en humanos y se considera parte de la arcuocorteza, en los mamíferos, el hipocampo está muy conservado (Anand & Dhikav, 2012). La formación hipocampal está involucrada en la consolidación y recuperación de memorias, así como en diversos sistemas emocionales, sensoriales y cognitivos. El deterioro en hipocampo se asocia con trastornos neurológicos como la EA, depresión, esquizofrenia y epilepsia (Anand & Dhikav, 2012). A nivel anatómico, consta de una serie de áreas involucradas en el circuito trisináptico (fig. 8) además, existe una zona de transición entre las áreas CA1 y CA3 denominada CA2 con funciones independientes a las otras áreas (Hartley et al., 2014). El hipocampo se compone en gran parte de neuronas piramidales dentro de las subregiones del Cuerno de Amón (CA1, CA2 y CA3), mientras que el giro dentado (GD) está compuesto por células granulares. Las neuronas piramidales de las diferentes subregiones CA1, CA2, CA3 presentan diferencias morfológicas y conectivas, además de que muestran vulnerabilidad selectiva al daño (Anand &



Dhikav, 2012), mientras que las neuronas piramidales de CA1 son muy vulnerables a la degeneración después del daño isquémico, las de CA3 pueden soportar la exposición prolongada a condiciones isquémicas dentro de CA1, las neuronas mediales (las más distantes de las subregiones CA2 y CA3) son más vulnerables al daño isquémico en relación con las neuronas en las subregiones laterales de CA1 (Anand & Dhikav, 2012). En ratones, el daño a CA1 afecta a la cognición espacial (Best et al., 2001).

El daño patológico del hipocampo es un marcador temprano en pacientes con EA, con una conectividad funcional reducida en redes las hipocampales al inicio de la EA (Anand & Dhikav, 2012; L. Wang et al., 2006). Las neuronas de CA1 son más vulnerables al daño durante el envejecimiento y a las enfermedades neurodegenerativas, como la EA (Anand & Dhikav, 2012). En ratas y ratones las células de CA1 contienen el mayor contenido de hierro, en comparación con CA2 y CA3, y se observa una tendencia latero medial en la concentración de hierro en toda la subregión CA1 (Hackett et al., 2019; Woodhams et al., 1993).

La **corteza cerebral** es el área más externa del cerebro, así como el área de mayor tamaño, en la que se lleva a cabo la integración de la información y juega un papel crucial en procesos como la memoria, el lenguaje, la percepción, pensamiento, atención y consciencia. En la mayoría de los mamíferos, la corteza cerebral se encuentra plegada, ampliando así la superficie y permitiendo un mayor número de conexiones dentro del mismo volumen craneal (Agirman et al., 2017). En cuanto a la organización cito arquitectónica de la corteza, ésta se puede dividir en capas horizontales, en función de la densidad de somas neuronales, fibras y tipos neuronales (Eickhoff et al., 2018). Se han establecido seis capas dentro de la corteza de los mamíferos. La capa V recibe el nombre de capa de grandes células piramidales profundas (Agirman et al., 2017; Eickhoff et al., 2018). En la sustancia innominada del prosencéfalo basal se localiza el **núcleo basal de Meynert** con neuronas que se proyectan por toda la corteza y la amígdala, las neuronas que forman el núcleo basal de Meynert sufren una extensa degeneración en la EA (Ferreira-Vieira, H et al., 2016).

La **corteza entorrinal** forma parte de la circunvolución parahipocampal en primates, está relacionada con el lóbulo temporal y con la formación hipocampal a través de la vía perforante (van Hoesen et al., 1991). La corteza entorrinal se atrofia notablemente en la EA, donde se observa el patrón característico de las NFT, aunque su densidad sea baja, la vía perforante se daña en la EA, estos cambios representan parte de la base estructural de la afectación temprana de la memoria en la EA (van Hoesen et al., 1991) (fig. 8).

El **complejo amigdalino** es un área implicada en el procesamiento de la información cognitiva y la regulación emocional (Wang et al., 2021) la amígdala es heterogénea y está compuesta por núcleos estructural y funcionalmente distintos, que pueden presentar diferentes patrones de conectividad y diferentes déficits cognitivos relevantes en la EA (Wang et al., 2021). El daño en la amígdala desempeña un papel importante en el deterioro cognitivo, la formación de placas de  $\beta$ A, las NFT, y la pérdida neuronal (Herzog & Kemper, 1980)(fig. 8). El complejo amigdalino se compone de varias subregiones nucleares que implican funciones multimodales, como regulación de las emociones, procesos cognitivos, etc. la investigación cito arquitectónica de la amígdala la divide en tres regiones: El núcleo basolateral (BL), el núcleo centromedial (CM) o basomedial (BM) y el núcleo superficial (SF) o lateral (L) (Yang & Wang, 2017) (fig. 8).

En estudios de RMf se identificaron patrones de activación y reposo distintos en las subregiones de la amígdala que sugieren diferencias funcionales; la región BL muestra conexión con las regiones temporal y frontal, mientras que la región del CM está ligada al núcleo estriado, la subdivisión del SF se conecta con el sistema límbico (Wang et al., 2021; Yang & Wang, 2017). Para considerar la heterogeneidad de la amígdala y su asociación con la neuropatología de la EA es importante comprobar los patrones intrínsecos del flujo regional cerebral de las subregiones de la amígdala (Roy et al., 2009). Comparando con controles de la misma edad, los pacientes con EA presentan patrones interrumpidos de la conectividad en el LB (Roy et al., 2009).

## 2.6 ALTERACIONES HISTOLÓGICAS Y MOLECULARES

En la EA, como en otras enfermedades neurodegenerativas se desarrolla una proteinopatía caracterizada por placas de  $\beta$ A y NFT, y asociada con neuritis distróficas, astrogliosis asociada, activación microglial, y angiopatía amiloide cerebral (CAA) (Šimić et al., 2016). El proceso neurodegenerativo incluye pérdida sináptica y neuronal que conduce a la atrofia macroscópica; la patología mixta incluye enfermedad vascular y cuerpos de Lewy, la presencia de TDP-43 alterada es una importante co-patología. Las placas de amiloide son acumulaciones extracelulares compuestas principalmente de  $\beta$ A anormalmente plegada con 40 o 42 aminoácidos ( $\beta$ A-40 y  $\beta$ A-42), dos subproductos del metabolismo de la proteína precursora amiloidea (APP), el  $\beta$ A-42 es más abundante debido a su mayor tasa de formación de fibras e insolubilidad (ver fig. 9) (Šimić et al., 2016).

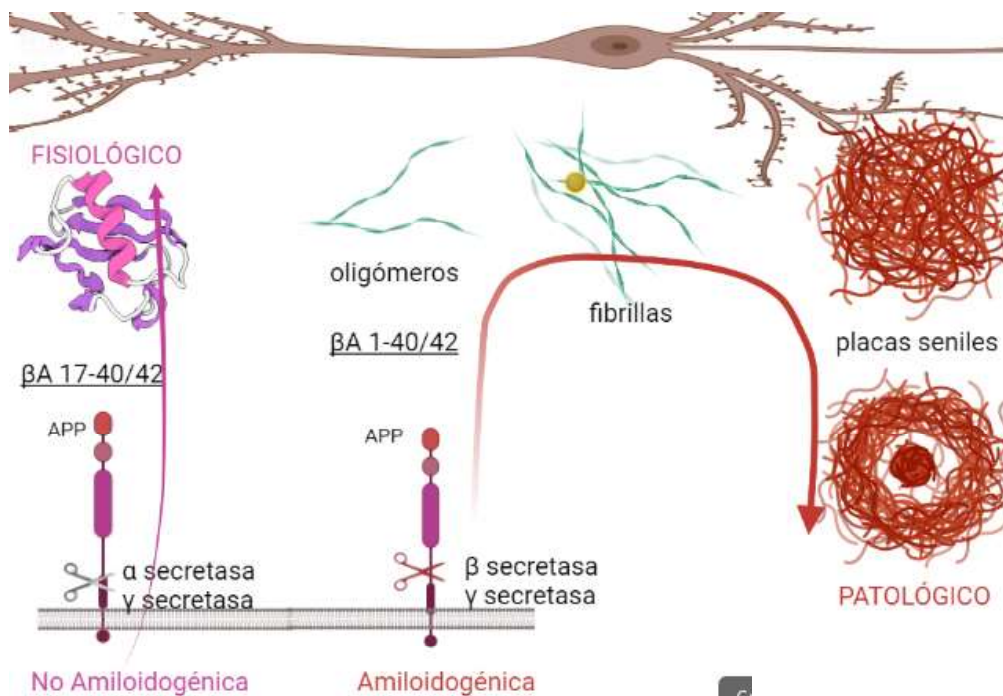


Figura 9. Vías amiloidogénica y no amiloidigénica del metabolismo de la PPA. En la vía no amiloidogénica, (flecha rosa) la APP es cortada primero por la  $\alpha$ -secretasa y luego por la  $\gamma$ -secretasa formando péptidos  $\beta$ A 17-40/42 truncados o por  $\beta$ -secretasa que conduce a la formación de  $\beta$ A 1-16. En la vía amiloidogénica, (flecha roja) la APP es cortada consecutivamente por las  $\beta$  y  $\gamma$ -secretasas que llevan a la formación de péptidos  $\beta$ A 1-40/42. De acuerdo con la hipótesis de la cascada amiloide (Hardy & Higgins, 1992), el péptido  $\beta$ A interactúa con los iones metálicos presentes en el cerebro y forma oligómeros y luego fibrillas que se encuentran en las placas seniles (hecho con BioRender).

## $\beta$ A

**Composición de las placas amiloides.** Las placas seniles descritas por Alois Alzheimer (fig. 13) son el resultado de la acumulación extracelular anormal y la deposición de las  $\beta$ A40 y  $\beta$ A42, dos subproductos normales del metabolismo de la APP después de su escisión secuencial por las enzimas  $\beta$ - y  $\gamma$ -secretasa en las neuronas (fig. 9). Debido a su mayor tasa de fibrilación e insolubilidad, la  $\beta$ A42 es más abundante que  $\beta$ A40 dentro de las placas (fig. 14. C y D) (Serrano-Pozo et al., 2011).

La acumulación a nivel extracelular del péptido  $\beta$ A se encuentra frecuentemente en el cerebro humano envejecido. Inicialmente se forman unas pocas placas en la región basal de la neocorteza, gradualmente va aumentando el número de depósitos, y finalmente se involucran la corteza entera y la sustancia blanca, se observa una relación inversa entre el grado de mielinización cortical y la densidad de los depósitos de  $\beta$ A, pero no hay una relación consistente entre la intensidad de los depósitos de amiloide y la severidad de la disfunción cortical

(Snowdon, 2003). La angiopatía amiloide ocurre generalmente en estadios más avanzados de la EA y es rara en individuos de mediana edad sin demencia, en los cuales se detectan solamente placas corticales difusas (Snowdon, 2003). El procesamiento anormal de la APP aumenta la producción de la proteína, aumentando la producción de fragmentos amiloidogénicos (Hardy & Higgins, 1992).

**Características morfológicas de los péptidos  $\beta$ A.** La clasificación morfológica más práctica y ampliamente utilizada distingue dos tipos de placas amiloides: placas difusas versus placas de núcleo denso, basadas en su tinción con colorantes específicos para la conformación  $\beta$  plegada, como rojo Congo y Tioflavina-S, esta clasificación simple es relevante porque se asocian a efectos deletéreos sobre el neuropilo, neuritis distróficas, pérdida sináptica, pérdida de la neurona, y reclutamiento y activación de astrocitos y microglía (Bloom, 2014; Thal et al., 2008). Las placas amiloides difusas ( $d\beta$ A) están comúnmente presentes en los cerebros de personas mayores sin deterioro cognitivo, mientras que las placas densas ( $Dc\beta$ A), se encuentran en pacientes con EA [caracterización en Tabla IV]. Sin embargo, mucha gente mayor cognitivamente normal tiene carga amiloidea substancial en sus cerebros (Serrano-Pozo et al., 2011).

**Distribución topográfica** A diferencia de las NFTs, las placas amiloides se acumulan principalmente en la isocorteza, y el patrón que siguen es poco predecible. En general, la corteza entorrinal, la formación hipocámpal, los núcleos basales, los núcleos de la médula oblonga y el cerebelo están poco afectados (Serrano-Pozo et al., 2011).

**Correlaciones clínico-patológicas** Los estudios clínico-patológicos han establecido que la carga amiloidea no se correlaciona con la severidad o la duración de la demencia, sin embargo, es posible que la cantidad de amiloide, sobre todo el manto cortical aumente durante el curso clínico de la enfermedad a medida que la distribución de los depósitos se extienda después de las etapas anteriores (Serrano-Pozo et al., 2011).

## CAA

Diversas investigaciones clínico-patológicas sobre memoria y envejecimiento demuestran que el deterioro cognitivo en el cerebro envejecido es típicamente impulsado por la superposición de patologías neurodegenerativas y cerebrovasculares, los ejemplos más claros de estas interacciones se observan entre la angiopatía amiloide cerebral (CAA del inglés) y la EA (Boyle et al., 2018). La CAA implica la deposición cerebrovascular de  $\beta$ A, que también es el constituyente primario de las placas neuríticas en la EA, patologías que a menudo se superponen debido al papel patogénico compartido de los  $\beta$ A (fig. 10), la CAA también contribuye a la patogénesis de la EA al afectar el drenaje perivascular, una vía importante de eliminación de  $\beta$ A desde el cerebro. Desde un punto de vista clínico, la presencia de CAA avanzada en la EA se asocia con mayor deterioro cognitivo. Los estudios neuropatológicos de cerebros de pacientes con EA han demostrado que la acumulación de  $\beta$ A alrededor de las arterias es cinco veces más común que alrededor de las venas y, que el  $\beta$ A se deposita primero en la periferia de las arteriolas (sitio de drenaje del líquido intersticial) (Greenberg et al., 2020).

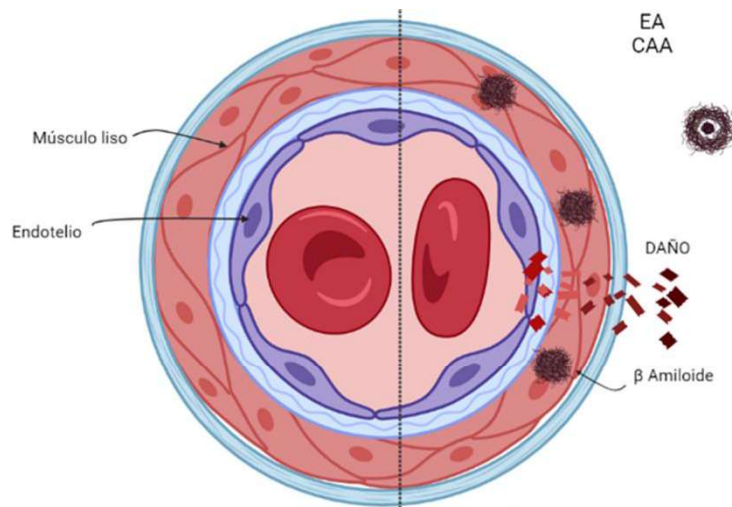


Figura 10. CAA, en la parte derecha el daño causado en las arteriolas por la acumulación de placas  $\beta A$  en la pared vascular presente en la EA (hecho con BioRender) basado en (Greenberg et al., 2020).

El péptido  $\beta A$  no solo se deposita en el parénquima cerebral en forma de placas amiloide, sino también en las paredes de los vasos originando la CAA, el péptido  $\beta A_{42}$  más insoluble y propenso a la agregación tiende a acumularse en el núcleo de las placas seniles, mientras que el péptido  $\beta A_{40}$  más soluble es el principal constituyente de CAA, acumulándose en la túnica intersticial del músculo liso. La CAA, es más común en el contexto de la EA, 80% de los pacientes con EA muestran algún grado, generalmente leve, de CAA en la autopsia (Serrano-Pozo et al., 2011).

### Tau

Las NFT se componen principalmente de filamentos helicoidales emparejados que consisten en Tau hiperfosforilada (fig. 11), la formación de NFT generalmente comienza en la corteza entorrinal e hipocampo antes de extenderse a la corteza asociativa. Las áreas sensoriales, motoras y visuales primarias tienden a estar parcialmente conservadas. Se han propuesto varios criterios para el diagnóstico patológico de la EA. Los primeros intentos de usar  $\beta A$  o NFTs estuvieron limitados por la baja especificidad o sensibilidad. Un diagnóstico de la EA sólo se puede hacer si se cumplen los criterios para la probabilidad alta o intermedia de EA junto con un diagnóstico de demencia (Šimić et al., 2016).

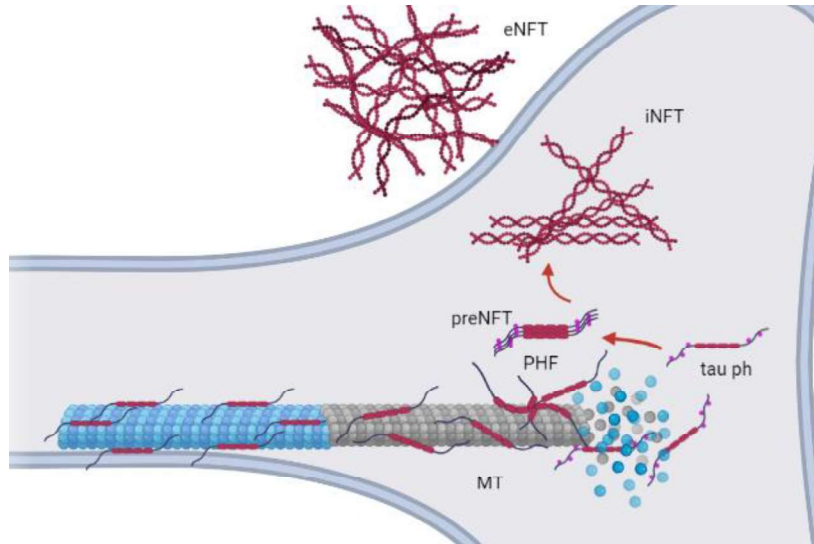


Figura 11. **Formación y acumulación de NFT.** Cuando la proteína Tau se hiperfosforila de manera anómala (Tau ph) comienza a desprenderse de los microtúbulos (MT) y a formar agregados, los llamados filamentos helicoidales pareados (PHF) durante la progresión de la patología los PHFs continúan el proceso de agregación hasta formar marañas neurofibrilares (NFT). La secuencia de cambios en el citoesqueleto, debido a la hiperfosforilación de la proteína Tau se divide en tres etapas: etapa pre-maraña (pre-NFT), etapa intraneuronal (iNFT) y etapa extraneuronal (eNFT) (hecho con BioRender) basado en (Šimić et al., 2016)

La proteína Tau, descubierta en 1975 y denominada así por Kirshner (Weingarten et al., 1975) pertenece a la familia de proteínas de unión a microtúbulos o MAPs (por sus siglas en inglés de microtubule associated proteins), está altamente conservada y puede encontrarse en diversas especies animales como, por ejemplo, *C. elegans*, *Drosophila melanogaster*, pez cebra, roedores y humanos (Weingarten et al., 1975). La Tau se expresa principalmente en el sistema nervioso, aunque también se ha encontrado en otros tejidos como riñón, pulmón y testículos (Gu et al., 1996). En el cerebro, la proteína Tau no se expresa de manera homogénea, sino que su expresión predomina en algunas áreas como la corteza o el globo pálido y es casi inexistente en otras como el cerebelo (Gu et al., 1996). En cuanto a las células que la expresan, la Tau se encuentra principalmente en las neuronas, pero se ha descrito que también está presente en bajas concentraciones en los oligodendrocitos (McMillan et al., 2008). Dentro de las neuronas, la Tau se localiza predominantemente en los axones (Hanger, Seereeram, et al., 2009) pero, bajo ciertas condiciones patológicas como la EA, esta localización puede variar. En el cerebro humano pueden sintetizarse seis isoformas de Tau por *splicing* alternativo del gen MAPT (que se localiza en el cromosoma 17q21) (Andreadis, 2006). Las diferentes isoformas se pueden categorizar por el número de inserciones del amino terminal (0N, 1N o 2N) y por el número de dominios repetidos en el carboxilo terminal (3R o 4R) (Fig. 12) (Y. Wang & Mandelkow, 2016), estos dominios repetidos son responsables de la unión de Tau a los microtúbulos, siendo 4R la isoforma con mayor afinidad (Goedert & Spillantini, 1990) y 3R la de menor afinidad. La isoforma más larga de Tau en el SNC contiene 441 residuos de aminoácidos, tras la traducción se obtiene una proteína con unos 80 residuos fosforilables, (Avila, Jiménez, et al., 2016)

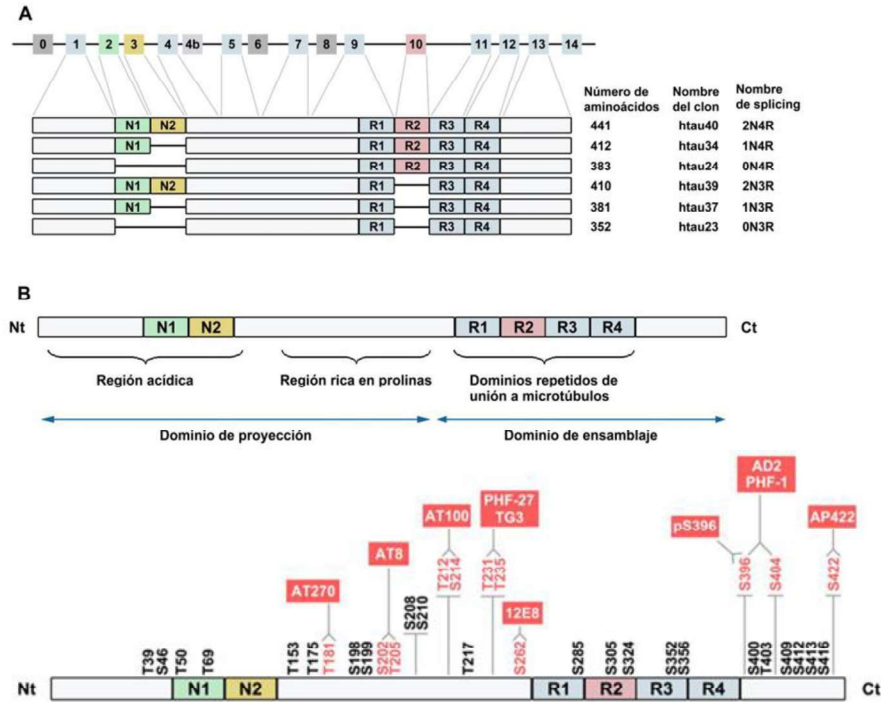


Figura 12. **Isoformas y estructura de la proteína Tau humana en el SNC.** (A) Gen MAPT y las 6 isoformas de la proteína Tau en el cerebro humano en función de los exones que se eliminan. (B) Dominios de la isoforma 2N4R de la proteína Tau humana. Regiones de la proteína Tau desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal: región acídica, región rica en prolina (dominio de proyección) y dominios repetidos Ct (dominio de ensamblaje) modificado de (Wang & Mandelkew, 2016). Representación esquemática de los sitios de fosforilación más relevantes de la proteína Tau y los anticuerpos específicos los detectan (rectángulos rojos).

El papel de Tau es la estabilización de los microtúbulos mediante su interacción con la tubulina, participando en los fenómenos de ensamblaje y des ensamblaje de éstos, contribuyendo así al mantenimiento de la forma de la célula (Avila, Jiménez et al., 2016). Además, se ha descrito la participación de Tau en el transporte axonal por medio de diversos mecanismos, como por ejemplo afectando al funcionamiento de las proteínas de transporte (Wang & Mandelkew, 2016). Sin embargo, la Tau no interacciona únicamente con los microtúbulos, pues se ha descrito también que podría unirse a diversas proteínas actuando en multitud de procesos celulares, más allá de su papel en el axón, la Tau desempeña un papel importante en la plasticidad sináptica (Avila, Pallas, et al., 2016). La interacción entre la tubulina y la proteína Tau se regula principalmente por modificaciones post-traduccionales, entre las que encontramos fosforilación, glicosilación, ubiquitinación, y oxidación (Avila, Jiménez, et al., 2016). La fosforilación afecta la conformación de Tau, hay dos grupos principales de cinasas que fosforilan Tau, de estas cinasas, la GSK3 (glucógeno sintasa cinasa 3) juega un papel importante en la regulación tanto fisiológica como patológica (Avila et al., 2004). De las fosfatasas, responsables de la eliminación de los grupos fosfato de Tau destaca PP2A (proteín fosfatasa 2 A) que se cree que actúa sobre la mayor parte de los sitios de fosforilación de Tau (Avila et al., 2004).

En la isoforma más larga de la proteína Tau existen 80 posibles sitios de fosforilación, de los cuales, algunos residuos de Thr o Ser (destacados en rojo en la Figura 12) son blancos para diversas cinasas y se han encontrado anormalmente fosforilados en enfermedades neurodegenerativas como la EA (Hanger, Seereeram, et al., 2009). Con el fin de estudiar los procesos de fosforilación de la proteína Tau, se utilizan anticuerpos específicos para la detección de la proteína Tau fosforilada en diversos residuos, el anticuerpo AT8 detecta el epítipo formado por los residuos Ser202 y Thr205 fosforilados, (Malia et al., 2016), Braak y colaboradores (2006) lo emplearon para establecer la escala para clasificar el grado de progreso en la EA (Tabla I). Otros anticuerpos muy utilizados son AT100, que detecta la fosforilación de Tau en los aminoácidos Thr212 y Ser214, y el anticuerpo pS396, que detecta la fosforilación de Tau en el aminoácido Ser396 (Wang & Mandelkew, 2016).



En la EA se produce la acumulación de la proteína Tau a nivel intracelular, los cambios más notables ocurren en el segmento distal de las dendritas, las cuales desarrollan apéndices cortos, los segmentos dendríticos distales alterados probablemente pierden su conexión a las partes proximales. Los cambios en los procesos celulares causan perturbaciones severas en la función neuronal, mucho antes de la desaparición final de los cuerpos celulares (Wang & Mandelkow, 2016). Las células piramidales normales muestran un núcleo central y sustancia de Nissl, en las células dañadas, la capacidad de tinción del material basófilo es menor, y el núcleo se localiza excéntricamente. Después del deterioro del soma celular, el material citoesquelético patológico se convierte en NFT (Serrano-Pozo et al., 2011).

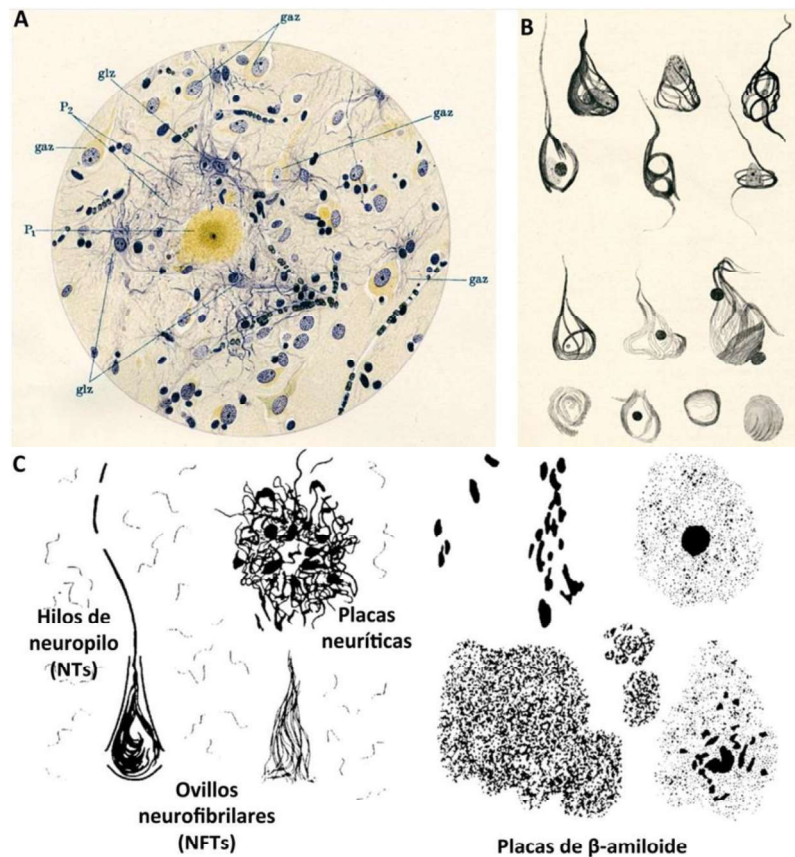


Figura 13. (A-B) Ilustraciones de Alois Alzheimer en las que muestra placas seniles y ovillos neurofibrilares (A) y distintas morfologías de NFT (B) (Alzheimer, 1907). (C) Ilustraciones de Braak y Del Tredici-Braak en las que se muestran los principales hitos neuropatológicos de la EA: hilos de neuropilo, NFT, placas neuríticas y placas seniles (Braak & del Tredici, 2015).

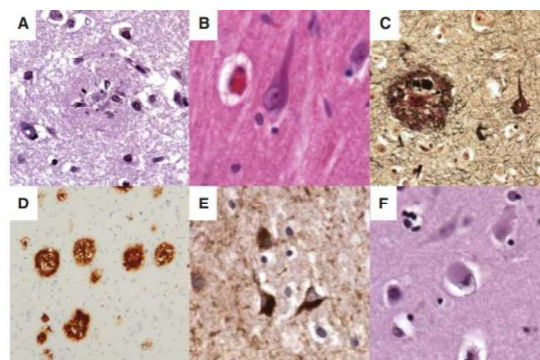


Figura 14. Fotomicrografía de las lesiones patológicas características de la EA y la enfermedad de cuerpos de Lewy. (A) Placas en cortes de corteza frontal con tinción H y E; (B) NFT en neuronas piramidales de hipocampo en cortes con tinción H y E. (C) Tinción argéntica que evidencia tanto NFT como placas  $\beta$ A; (D) Inmunohistoquímica contra  $\beta$ A marca las placas  $\beta$ A; (E) Inmunohistoquímica contra Tau marca las NFT; (F) Cuerpo de Lewy en neurona de la capa V en corte de corteza frontal teñido con HE. Tomado de (Serrano-Pozo et al., 2011).

## NFTs

Las **NFTs** primero fueron descritas por Alois Alzheimer en su informe original del caso de la autopsia (fig. 13), como inclusiones intraneuronales de neuronas piramidales. Los estudios ultraestructurales de EA revelaron que las NFT están compuestas principalmente de filamentos helicoidales emparejados (PHFs), es decir, fibrillas de 10 nm de diámetro con una conformación tridimensional helicoidal a una periodicidad regular de 65 nm, una pequeña proporción de fibrillas dentro de las NFTs no forma pares, sino que da el aspecto de filamentos rectos sin la periodicidad de PHFs. El componente principal de NFTs son proteínas Tau mal plegadas e hiperfosforiladas (Serrano-Pozo et al., 2011). Acompañando a los NFT están los hilos de neuropilo, que se cree que resultan de la descomposición de las dendritas y axones de las neuronas que presentan NFT (ver figura 14 A, B y C) (Serrano-Pozo et al., 2011).

**Características morfológicas de las NFT.** Las NFT son argirófilas y pueden ser marcadas por métodos de impregnación de plata como la técnica de Gallyas, un método alternativo para examinar las NFT es su tinción con colorantes fluorescentes como Tioflavina-S, que reconocen la estructura plegada de lámina  $\beta$  de los filamentos helicoidales pareados, o mediante inmunotinción con anticuerpos anti-Tau (Avila, 2006). Las NFT se describieron por primera vez bajo el término "neurofibrillas" que formaban agregados en el interior de las neuronas (fig. 14.) (Alzheimer, 1907b; Ryan & Kelly, 2016). Hoy sabemos que, cuando la proteína Tau se fosforila de manera anómala comienza a desprenderse de los microtúbulos y a formar agregados, los llamados filamentos helicoidales pareados (PHF que presentan un patrón periódico en forma de doble hélice en microscopía electrónica) (Avila et al., 2004), en la EA, además de estos filamentos se observan filamentos rectos en el interior de las neuronas (SF), que muestran menos periodicidad que los PHFs (Perl, 2010), durante la progresión de la patología, los PHFs continúan el proceso de agregación hasta formar NFT, los PHFs y los SFs se encuentran también en los hilos de neuropilo (Braak & del Tredici, 2015). La detección de los NFTs se ha hecho tradicionalmente mediante métodos de tinción histológica como la tinción de plata de Bielschowsky o la tioflavina-S (Augustinack et al., 2002; Serrano-Pozo et al., 2011).

Desde el punto de vista morfológico Augustinack (2002) y Serrano-Pozo (2011) han descrito tres estadios en la formación de las NFTs [caracterización en Tabla IV]:

1. **preNFT.** Premarañas o estructuras de tipo granular que contienen proteína Tau alterada, pero que aún no han llegado a formar fibras y no son detectables mediante los métodos de tinción específicos tradicionales, definidos por un patrón intracelular Tau difuso, algunas veces punteado, con las dendritas bien-conservadas y un núcleo centrado.
2. **iNFT.** NFT intraneuronales maduros o fibrilares (iNFTs) consisten en agregados Tau citoplásmáticos que desplazan el núcleo hacia la periferia del soma y alteran la morfología de las dendritas y el segmento próximo del axón; las NFTs se localizan en la zona del soma y las prolongaciones celulares proximales, son detectables con los métodos de marcaje tradicionales y pueden tener morfologías variadas.
3. **eNFT.** "Fantasma" neuronal (eNFTs) resulta de la muerte de las neuronas y es identificable por la ausencia de núcleo y de citoplasma). Se ubican en el soma celular que desplaza al núcleo y terminan por acabar con la viabilidad de la célula que lo contiene, formando así las "marañas fantasma" o NFTs extracelulares (ver figura 15 A, B y C) (Augustinack et al., 2002; Serrano-Pozo et al., 2011).

El **patrón espaciotemporal de la progresión de NFTs** es estereotipado y predecible, la degeneración neurofibrilar comienza en el allocorteza del lóbulo temporal medial (corteza entorrinal e hipocampo) y se extiende hasta la



isocorteza asociativa, respetando las áreas sensoriales, motoras y visuales primarias (Serrano-Pozo et al., 2011), la cantidad y distribución de las NFTs se correlaciona con la gravedad y duración de la demencia (fig. 14. A, B y C) (Serrano-Pozo et al., 2011).

Las formas solubles de  $\beta$ A y Tau funcionan juntas en el establecimiento del proceso neurodegenerativo. El procesamiento anómalo de APP genera la acumulación de  $\beta$ A 1-40/42 (fig. 9) en neuronas y arteriolas, los  $\beta$ A tóxicos estimulan la formación de Tau hiperfosforilada (patológica) por la modulación de las fosfatasa (PP2A, PP1) y las cinasas (GSK3b y fyn) que regulan la fosforilación e inducen la formación de NFT (fig. 11) (Bloom, 2014). Aunque la regulación de estas vías está poco clara, se cree que la sobreproducción (o degradación reducida) de  $\beta$ A (generalmente soluble), lo induce a autoensamblarse en oligómeros y en fibrillas amiloide que forman placas y que resultan tóxicos. Estos ensamblajes proteicos tóxicos inducen eventos como la hiperfosforilación de la proteína Tau (que conduce a la producción de NFT), inflamación, estrés oxidativo y excitotoxicidad que conduce a su vez, a muerte celular y déficits de neurotransmisores, especialmente en acetilcolina. Evidencia más reciente ha demostrado que ambos  $\beta$ A y Tau (así como  $\alpha$ -sinucleína) puede comportarse como priones, es decir, se someten a un "repliegue estocástico" esta partícula infecciosa actúa como una semilla para inducir plegamiento erróneo o "templado" (Soria Lopez et al., 2019).

### **Cuerpos de Hirano, activación de la glía, pérdida neuronal de sinapsis y espinas dendríticas**

**Degeneración Granulovacuolar y Cuerpos de Hirano.** La degeneración granulovacuolar (GVD) y los cuerpos de Hirano son lesiones presentes en el citoplasma de neuronas piramidales del hipocampo en pacientes con EA (Serrano-Pozo et al., 2011). Aunque también se observan en ancianos cognitivamente intactos, son más severas y frecuentes en pacientes de edad comparable con EA (Serrano-Pozo et al., 2011).

**Activación de la glía.** Existe evidencia de que la microglía protege contra la incidencia de la EA, ya que la actividad deteriorada de la microglía y la respuesta alterada a los  $\beta$ A se asocian con mayor riesgo de EA, la proliferación y activación de la microglía concentrada alrededor de las placas amiloides, es una característica prominente de la EA (Hansen et al., 2018). Los datos de genética humana apuntan a un papel clave para la microglía en la patogénesis de la EA, la mayoría de los genes de riesgo para la EA están altamente expresados por la microglía (Hansen et al., 2018). Los astrocitos y la microglía reactivos se asocian con formación y acumulación de  $\beta$ A, lo que indica que los  $\beta$ A desencadenan esta respuesta, también hay una correlación positiva entre astrocitosis y microgliosis y la cantidad de NFT (Serrano-Pozo et al., 2011).

**Pérdida neuronal.** La pérdida neuronal es el principal sustrato patológico de la atrofia cortical y, aunque generalmente se ve en secciones teñidas con hematoxilina-eosina, se puede demostrar más fácilmente con la tinción de Nissl o inmunohistoquímica anti NeuN (Serrano-Pozo et al., 2011).

**Pérdida de sinapsis.** Además de la pérdida neuronal, la pérdida de sinapsis es otro contribuyente a la atrofia cortical en la EA. La pérdida de la sinapsis se ha demostrado con estudios inmunohistoquímicos en distintas estructuras (Serrano-Pozo et al., 2011). En pacientes con EA, la pérdida masiva de neuronas y sinapsis en el hipocampo se atribuye a la acumulación de NFT y la proteína Tau, así como a la presencia de placas seniles causadas por la acumulación de  $\beta$ A (DeVos, 2018).

Las **espinas dendríticas** son pequeñas protuberancias que constituyen el elemento postsináptico para la mayoría de las sinapsis glutamatérgicas. La función principal de las espinas dendríticas es compartimentar vías de señalización sináptica local y restringen la difusión de moléculas postsinápticas (Rocheffort & Konnerth, 2012). Las espinas se clasifican comúnmente en filipoides, pequeñas, delgadas, en copa y fungiformes (Rocheffort & Konnerth, 2012). Existe relación entre las espinas dendríticas y los procesos relacionados con la memoria y el aprendizaje (Hotulainen & Hoogenraad, 2010), los cambios dinámicos en su estructura se han relacionado con procesos de memoria y aprendizaje que afectan la transmisión sináptica (Bourne & Harris, 2007; Hotulainen & Hoogenraad, 2010). Diversos estudios han demostrado la influencia de éstas en los procesos de potenciación a largo plazo (LTP) (Attardo 2015). La estimulación del hipocampo empleando parámetros similares a los que

se usan para promover la LTP genera aumento de la densidad de espinas dendríticas, así como cambios morfológicos que forman espinas “maduras” que robustecen la eficacia y la plasticidad sinápticas (Attardo et al., 2015).

La pérdida de espinas dendríticas está asociada con patologías como el estrés crónico, las adicciones o las enfermedades neurodegenerativas como la EA (Merino-Serrais et al., 2013). La degeneración dendrítica y la pérdida de espinas se han descrito principalmente en las cortezas perirrinal, entorrinal, en hipocampo, así como en la corteza auditiva; al inicio de la patología se ha reportado reducción significativa de la arborización dendrítica y de las espinas dendríticas en corteza visual y auditiva (Herms & Dorostkar, 2016). La hiperfosforilación de la proteína Tau resulta crucial en los procesos de pérdida y alteraciones morfológicas de las espinas dendríticas (Merino-Serrais et al., 2013). Debido a esto, el estudio de las espinas dendríticas en las células piramidales, así como su relación con la proteína Tau, representa un aspecto importante para una mejor comprensión de la EA.

## 2.7 Teoría Colinérgica (alteración en neurotransmisores)

La hipótesis colinérgica es la teoría más antigua sobre la patogénesis de la EA; la acetilcolina (ACh) es un neurotransmisor involucrado en el aprendizaje, la memoria y otros comportamientos, las neuronas colinérgicas del prosencéfalo son importantes en el aprendizaje, la memoria y la función cognitiva su permanencia y diferenciación dependen del factor de crecimiento nervioso (NGF) (Davies P & Maloney AJF, 1976). El hipocampo es una zona con abundantes receptores nicotínicos de ACh, los pacientes con EA presentan degeneración de las neuronas colinérgicas del prosencéfalo, los cerebros de los pacientes con EA muestran; neurodegeneración severa, pérdida de las neuronas colinérgicas y una deficiencia severa de ACh. La actividad de la acetilcolintransferasa disminuye significativamente. La acetilcolinesterasa se une directamente a la presenilina-1, (enzima importante en el proceso de producción de  $\beta A$ ), aumentando la producción de  $\beta A$ , lo que acelera el deterioro cognitivo (Francis et al., 1999). Además, las alteraciones en ACh pueden inducir la hiperfosforilación de la proteína Tau, neuroinflamación, apoptosis celular, desequilibrio entre los neurotransmisores y neurohormonas y otros fenómenos patológicos. (fig. 15) (Francis et al., 1985) Aunque hay cambios corticales en otros neurotransmisores como la dopamina, la norepinefrina, y la histamina, la lesión colinérgica es más temprana, más extendida, y más consistente que las alteraciones patológicas de otros sistemas de neurotransmisión (Hampel et al., 2018).

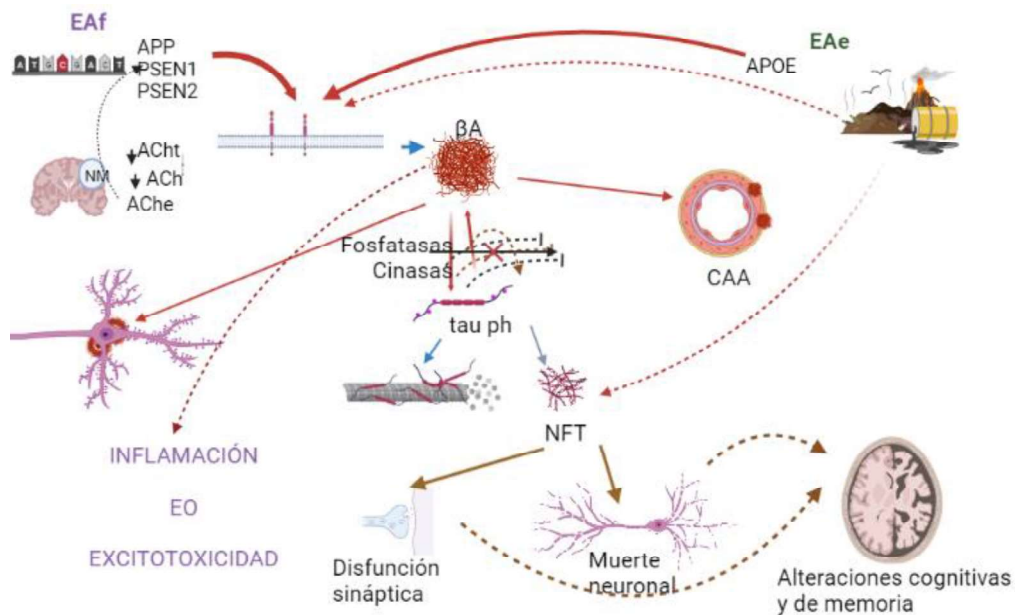


Figura 15. **Relación entre los factores relacionados con la aparición de la EA.** En la EA familiar (EAF) el principal generador del proceso neurodegenerativo son las mutaciones de proteína precursora de amiloide (APP), Presenilina 1 o Presenilina 2 (PSEN1 o PSEN2). En el caso de la EAe el proceso patológico es el resultado de la expresión de ApoE4 en combinación con factores ambientales. En ambos casos el procesamiento anómalo de APP genera la acumulación de  $\beta$ A 1-40/42 en neuronas y arteriolas, los  $\beta$ A tóxicos estimulan la formación de Tau hiperfosforilada (patológica) por la modulación de fosfatasas y cinasas que regulan la fosforilación e inducen la formación de marañas neurofibrilares (NFT). La presencia de NFT causan disfunción sináptica y muerte neuronal. En los núcleos de Meynert (NM) de los pacientes con EA hay una disminución de la actividad de la acetilcolintransferasa (AChT) y una disminución de la acetilcolina (ACh), la acetilcolinesterasa (AChE) "desocupada" se une a PSEN1 aumentando la producción y acumulación de  $\beta$ A y Tau, condiciones que llevan a alteraciones cognitivas y de memoria. Hecho con BioRender basado en (Greenberg et al., 2020; Hampel et al., 2018; Hardy & Higgins, 1992; Šimić et al., 2016).

## 2.8 MODELOS ANIMALES

La EA, la enfermedad de Parkinson, la demencia frontotemporal y la esclerosis lateral amiotrófica, enfermedades neurodegenerativas de aparición en la edad adulta, son patologías que progresan inexorablemente de discapacidad grave a la muerte (Liu et al., 2020). Actualmente no existe un modelo animal, *in vitro* o *in silico* que pueda simular de manera completa y total el curso y la fisiopatología de la EA. Los modelos murinos de EA recapitulan aspectos de la enfermedad, a menudo a través de mutaciones genéticas asociadas con la EAF que permiten dilucidar aspectos de la patogénesis (Drummond & Wisniewski, 2017; LaFerla & Green, 2012; Oddo et al., 2003). Aunque la EAF es menos frecuente, los fenotipos patológicos son similares a la EAe (Drummond & Wisniewski, 2017; LaFerla & Green, 2012; Oddo et al., 2003). Existen algunos modelos, como los transgénicos en ratón, que permiten estudiar los mecanismos moleculares de la proteinopatía inicial y otras características patológicas relacionadas con el trastorno humano, algunos desarrollan una cascada neurodegenerativa más completa (LaFerla & Green, 2012; Oddo et al., 2003), pero queda claro que no todos los eventos fisiopatológicos que ocurren en la enfermedad humana están representados.

Los modelos animales han desempeñado un papel fundamental en la definición de los mecanismos fisiopatológicos y preventivos; destacan, el modelo transgénico de ratón *APP/PS1*, que expresa un precursor de proteína amiloide quimérica (combinando el gen humano y el gen de ratón) así como el gen de la preselinina-1 humano mutado (Jankowsky et al., 2005), el modelo triple transgénico de ratón *APP/PS1/P301L* que expresa los dos genes anteriormente mencionados, así como un gen de proteína Tau humana con la mutación *P301L* que imita la fosforilación anómala de la misma, este modelo parece ser uno de los más completos pues los ratones desarrollan placas  $\beta$ A, así como alteraciones de la plasticidad sináptica y en la LTP (Oddo et al., 2003).

El modelo transgénico de ratón *P301S* expresa la proteína Tau humana con una mutación que imita la hiperfosforilación patológica. Estos ratones comienzan a manifestar pérdida neuronal y atrofia cerebral a partir de los 8 meses de edad, comenzando por el hipocampo y avanzando hacia otras regiones del cerebro. Además, desarrollan patología neurofibrilar similar a las NFTs en humanos en el hipocampo, la neocorteza y otras regiones como la amígdala, sumado a esas alteraciones muestran activación de la microglía, aunque no desarrollan placas seniles (Yoshiyama et al., 2007). Estudios morfológicos de este modelo describen disminución de la densidad de espinas dendríticas durante la progresión de la patología neurofibrilar en los penachos de las neuronas piramidales de la capa V y aumento en el tamaño (área y volumen) y longitud de éstas (Yoshiyama et al., 2007). Además, demuestran que la pérdida de espinas dendríticas tiene lugar por la presencia de proteína Tau anormalmente fosforilada, lo cual implica que las especies pre-fibrilares de la proteína Tau hiperfosforilada ya podrían ser tóxicas o causantes de alteraciones a nivel morfológico en las neuronas (Yoshiyama et al., 2013).

En la página de <http://www.alzforum.org/research-models/5xfad> se tiene el registro de 214 modelos animales, todos ellos basados en modificaciones genéticas. 197 en ratones y 17 en ratas. Estos modelos miden cambios en:

- Placas  $\beta$ A
- Marañas neurofibrilares
- Pérdida neuronal
- Gliosis
- Pérdida sináptica
- Cambios en la relación LTP/LTD
- Deterioro cognitivo

Los modelos transgénicos simulan un proceso fisiopatológico parecido a la EAF que se desarrolla por las alteraciones genéticas en individuos jóvenes.

Desde 1995, se han generado más de 100 modelos de ratón transgénico de la EA en los que se sobre expresa la APP o el DNAC de *APP/PS1* (modelos de 1ª generación), muchos de estos modelos recapitulan la sobreproducción y acumulación de  $\beta$ A y la neuroinflamación, pero han tenido algunos problemas como; letalidad temprana inducida por deficiencia de calpastatina, activación de calpaína, muerte celular neuronal sin patología Tau, estrés del retículo endoplásmico y activación del inflammasoma (Sasaguri et al., 2022). Después se desarrollaron modelos de ratón *knock-in* con las mutaciones *Sueca* y *Beyreuther/Ibérica* con o sin la mutación *Ártica* (*App<sup>NL-G-F</sup>* y *App<sup>NL-F</sup> mice*) (modelos de 2ª generación), estos modelos presentan patología  $\beta$ A, neuroinflamación y deterioro cognitivo de una manera dependiente de la edad, este modelo se utilizó con éxito en el modelamiento de la patología  $\beta$ A, en dilucidar los roles diferenciales de la neprilisina y la enzima degradadora de insulina en el metabolismo de los  $\beta$ A, y en la identificación de subtipos de receptores de somatostatina implicados en la degradación de los  $\beta$ A por neprilisina, la debilidad de este modelo es que la patología puede requerir hasta 18 meses para que sea evidente. Después, se generó una línea de doble *knock-in* portadora de las mutaciones *App<sup>NL-F</sup>* y *Psen<sup>1P117LWT</sup>* (modelo de 3ª generación), cuyo efecto patogénico es sinérgico y exhiben más patología de  $\beta$ A con núcleo denso y neuroinflamación (Sasaguri, 2022). Hay un modelo de ratones *knock-in* con Tau humana, usando estos ratones, se descubrió el ligando carboxiterminal PDZ de la óxidonítrico sintasa neuronal (CAPON), como un mediador que vincula la patología Tau con la neurodegeneración y mostró que la humanización de TAU promueve la propagación patológica de Tau (Sasaguri, 2022).

Existen también los modelos inducidos, en los que se inyecta o expone al animal en forma aguda o crónica a una sustancia que provoca daño neuronal específico y similar al que ocurre en la EA (LaFerla & Green, 2012; Oddo et al., 2003). Uno de los modelos murinos inducidos más importante y ampliamente utilizado de neuroinflamación y neurodegeneración inducida es la inyección periférica de lipopolisacáridos (LPS), el LPS inyectado periféricamente induce una variedad de efectos centrales mediados, en parte, por citocinas proinflamatorias liberadas principalmente de la microglía, sin embargo, a pesar de la abundante literatura disponible, los datos sobre la presencia de las principales citocinas proinflamatorias en el cerebro después del desafío con LPS difieren según los diferentes autores, las discrepancias en los resultados reportados podrían deberse a diferencias metodológicas: LPS o cepa de ratón utilizada, sitio de inyección, cantidad de LPS aplicada, tiempo después de que los ratones inducidos fueron sacrificados, etc. (Nava-Catorce & Gevorkian, 2016). El uso del modelo de LPS en la dilucidación del mecanismo fisiopatológico de la EA tiene la desventaja de ser inespecífico ya que representa todas las patologías que presentan neuroinflamación y neurodegeneración. El grupo de Sasaguri (2022) propuso un modelo de AD en tities comunes (*Callithrix jacchus*), los tities poseen funciones fisiológicas, estructuras cerebrales y comportamientos cognitivos y sociales complejos similares a los de los humanos, su pequeño tamaño corporal, fecundidad y altas funciones cognitivas suman ventajas al modelo, respecto a la investigación de la EA, la secuencia de aminoácidos de  $\beta$ A en tities es idéntica a la de los humanos, los tities *wild* envejecidos comienzan a acumular  $\beta$ A a partir de los 7 años de edad y los tities adolescentes presentan hiperfosforilación Tau, pero no formación de NFT (Sasaguri, 2022).

## 2.9 PRUEBAS CONDUCTUALES

Las tareas utilizadas en modelos murinos de EA incluyen el laberinto acuático de Morris, el laberinto de brazos radiales, el laberinto en T y la tarea de reconocimiento de objetos (fig. 16) (Ameen-Ali et al., 2017). El laberinto acuático de Morris se utiliza para evaluar memoria espacial, el deterioro de la memoria se demuestra si no hay disminución en la latencia de escape. En el laberinto radial se evalúa la memoria de trabajo espacial por el número de veces que los brazos sin recompensa son visitados. El laberinto en T evalúa la memoria espacial, el deterioro se demuestra si el animal no recuerda el brazo que tiene la recompensa. En el laberinto en Y, el deterioro se demuestra si el animal no muestra una tendencia a alternar entre los tres brazos. Reconocimiento de objeto familiar, el deterioro de la memoria espacial se evalúa a través de la exploración igual de ambos objetos (Ameen-Ali, 2017).

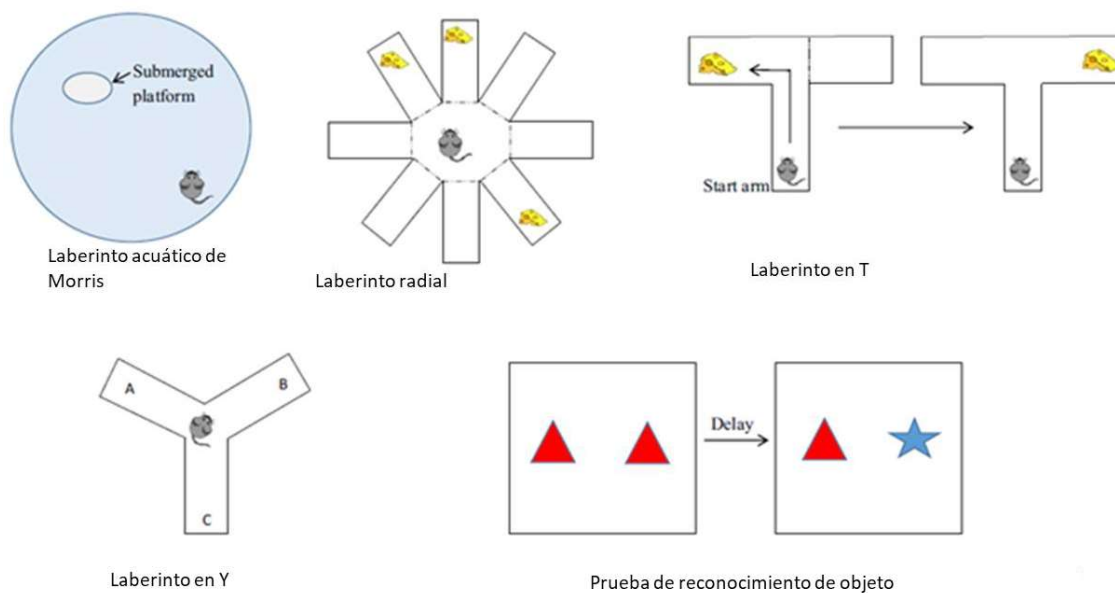


Figura 16. **Pruebas conductuales utilizadas en modelos de EA.** Laberinto acuático de Morris, Laberinto radial, Laberinto en T, Laberinto en Y, Reconocimiento de objetos. Tomado de Ameen-Ali et al., 2017.

### Modelado de trastornos neurodegenerativos en murinos

Al evaluar un modelo se analiza qué tan bien, y en qué aspectos, el modelo de la EA simula las alteraciones fisiológicas, cambios neuropatológicos y cognitivos asociados con la EA humana. El uso de modelos transgénicos ha ayudado a desarrollar la comprensión de la EA, no solo en términos de la patología de la enfermedad, sino también con las deficiencias cognitivas (LaFerla & Green, 2012; Neff, 2019). Un reto fundamental en el uso de estos modelos es que placas  $\beta A$  y las NFT a menudo se encuentran entre los cambios patológicos tardíos, después de la pérdida neuronal y la gliosis, momento en que la oportunidad de aplicar una terapia con éxito es menor (LaFerla & Green, 2012; Neff, 2019).

## 2.10 CONTAMINACIÓN AMBIENTAL Y VANADIO

La exposición a la contaminación ambiental está claramente asociada con el daño a los sistemas respiratorio y cardiovascular, sin embargo, los efectos neurológicos están poco claros. Algunos estudios han evaluado el papel de gases como  $O_3$ , partículas suspendidas o metales, en alteraciones del SNC, incluyendo migraña, cefalea, patología cerebrovascular, EA y enfermedad de Parkinson (Liu et al., 2020; Calderón-Garcidueñas et

al., 2019; Jellinger, 2013). El grupo de Calderón-Garcidueñas (Calderón-Garcidueñas et al., 2019) reportó que la exposición a la contaminación del aire se asocia con la neuroinflamación en niños y perros sanos en la Ciudad de México concluyendo que la exposición a la contaminación del aire debe considerarse un factor de riesgo para las enfermedades de Alzheimer y Parkinson, y los portadores del alelo *APOE 4* podrían tener un mayor riesgo de desarrollar la EA si residen en un ambiente contaminado.

El estrés oxidativo es un factor desencadenante de la EA, alteración que genera desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes con predominancia de oxidantes. Varios mecanismos pueden contribuir al estrés oxidativo, incluyendo disfunción mitocondrial, acumulación de  $\beta$ A, Tau hiperfosforilada y neuro inflamación (Calderón-Garcidueñas et al., 2019).

Los metales representan una categoría de contaminantes ampliamente distribuidos, tienen la tendencia de acumularse en los tejidos y son potencialmente tóxicos incluso a bajas concentraciones (Jellinger, 2013). El V pertenece al grupo de los metales de transición y está presente en los contaminantes del aire y del suelo en las ciudades debido a la combustión de materiales fósiles. Forma numerosos compuestos inorgánicos (sulfato de vanadil, metavanadato de sodio, ortovanadato de sodio y pentóxido de vanadio ( $V_2O_5$ )), así como complejos con compuestos orgánicos (BMOV, BEOV, METVAN) (Tracey, 2007).

## 2.11 VANADIO – UN EFECTO BIFÁSICO

Biológicamente, los compuestos de V tienen efectos duales; es esencial en cantidades traza ( $0.05 \mu\text{M}$ ) y tóxico en exceso ( $> 10 \mu\text{M}$ ) (Nielsen, 1991). A bajas concentraciones, se ha encontrado que el V ejerce un efecto benéfico sobre el crecimiento y las funciones fisiológicas de algunos microorganismos, plantas y hongos (ver fig. 17) (Ścibior et al., 2020). Se han descrito síntomas de deficiencia de V en aves, pollos, ratas, conejillos de indias y cabras (Nielsen, 1991). La toxicidad de los compuestos de V depende de; la especie, la vía de administración (ingestión < inhalación < parenteral), la valencia del V en el compuesto (los compuestos vanidil  $V^{+4}$  son menos tóxicos que los vanadatos  $V^{+5}$ ), la dosis, y duración de la exposición (ver fig. 18.) (Ścibior et al., 2020).

Tabla II. Efectos terapéuticos del vanadio (Ścibior et al., 2020)

Efecto	Mecanismos farmacológicos del vanadio
<b>Antiviral</b>	Inhibir la actividad de la transcriptasa inversa viral (RT). Unión de complejos V a molécula CD4 y co-receptor de quimiocina CXCR-4.
<b>Antibacteriano</b>	Inhibición de la Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPasa Generación de ROS. Impacto en el transporte de sustratos Inducción de la salida (K <sup>+</sup> ) de la célula Interacción con la topoisomerasa tipo II (girasa). Interacción con el DNA de manera alternada Interacción con componentes del citoesqueleto. Otros mecanismos de acción inespecíficos de los complejos V que permiten que el complejo penetre en la pared hidrofóbica.
<b>Antiparasitario</b>	Intercalación de complejos V en DNA. Inhibición de la actividad de las fosfatasa. Inhibición de la actividad de la fosfatasa ácida (SACP). Activación de la respuesta de macrófagos/tipo Th1 con la liberación de ROS y citoquinas proinflamatorias
<b>Antifúngico</b>	Interacciones con el DNA por intercalación. Inhibición de la biosíntesis de ergosterol.
<b>Antineoplásico</b>	Intensificación de la generación de ROS. Inhibición del ciclo celular por hiperactivación de la vía Ras-Raf-MEK-ERK. Participación de V en la supresión de la transformación neoplásica a través de la señalización apoptótica y/o la detención del ciclo celular. Interacciones de V con los componentes del huso, intercalación con DNA. Potenciación de la actividad anti proliferativa Inhibición de la actividad de la metástasis tumoral de la topoisomerasa IB
<b>Antidiabético</b>	Acción inhibitoria de la proteína tirosina fosfatasa (PTP). resultados del efecto del antagonismo relacionado con la similitud estructural de los aniones vanadato (VO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ) con los aniones fosfato (PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ). Inhibición de la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP-1B) responsable de la inactivación del receptor de insulina (INS-IR). Aumento en el número de transportadores de glucosa tipo 4 (GLUT-4) en la membrana celular. Afecta al receptor del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-IR) por inactivación de la PTP asociada. Activa las proteínas tirosina cinasas receptoras y no receptoras (PTK). Estimula la glucogenogénesis. Inhibe la glucogenólisis y la gluconeogénesis. La interacción con las membranas es importante en la estabilización de los complejos V, y los cambios estructurales en las proteínas de la membrana contribuyen con los mecanismos y las toxicidades insulino-miméticas.
<b>Cardioprotector</b>	El efecto inhibitor de ROS sobre la actividad de PTP-1B. Inhibición de la actividad de PTP y activación de la vía de señalización de la 3-fosfatidilinositol cinasa (PI3-K)/proteína cinasa Akt (PI3K-Akt). Akt, conocida como proteína cinasa B (PKB), es responsable de la fosforilación de muchas proteínas diferentes involucradas en procesos celulares como proliferación, crecimiento, migración y metabolismo y juega un papel importante en la regulación de hipertrofia miocárdica y en angiogénesis.
<b>Neuro protector</b>	Activa la vía de señalización PI3K-Akt (señales de supervivencia) inhibiendo a la pTP, inactivando así a los miembros de la familia FOXO (como FKHR, FKHL1, AFX) lo que resulta en la supresión de la expresión de factores inductores de apoptosis como los ligandos Bim y Fas (FasL). Activación de la cinasa regulada por la señal extracelular (ERK)
<b>Hipocolesterolémico</b>	El bloqueo de la utilización del mevalonato forma 3-HMG-CoA en una reacción catalizada por HMG-CoA reductasa que se transforma en isopentenil-5-pirofosfato (IPP) en reacciones de fosforilación/d Descarboxilación. Aumento del catabolismo del colesterol. Estimulación de la actividad de la lipoproteína lipasa (LPL).
<b>Anti-obesidad</b>	El aumento de la actividad de PTP-1B bloquea la tirosin cinasa 2 de Janus (JAK2), lo que resulta en el bloqueo de la señalización de leptina (JAK2/STAT3) y de la cascada de fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3-K) involucrada en la vía de señalización de la insulina (INS) y la leptina (LEP). Por lo tanto, la señal del INS y LEP está bloqueada. La inhibición de la actividad del vanadio PTP-1B lleva a la activación de la vía de señalización de la leptina JAK2/STAT3 y por lo tanto inhibe la síntesis del neuropéptido Y (NPY) y su liberación en el hipotálamo. En consecuencia, el apetito, la grasa y el peso corporales se reducen. También hay un aumento en la sensibilidad a la leptina (LEP-S) y a la insulina (INS-S) y una disminución en la resistencia a la insulina (INS-R) y la leptina (LEP-R).

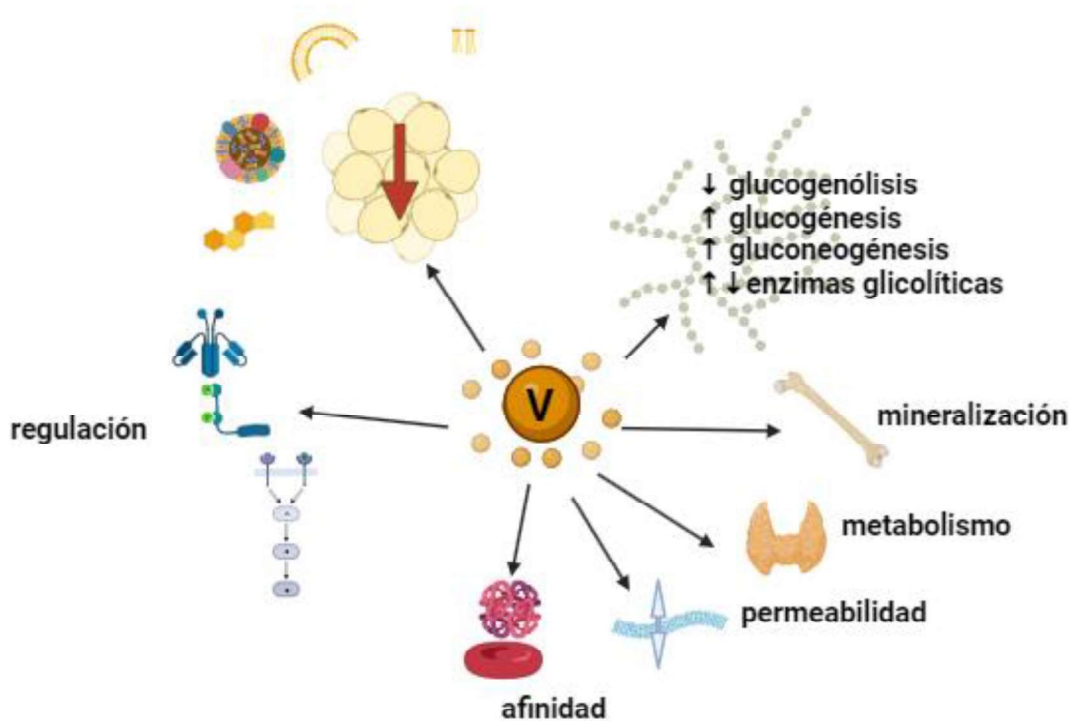


Figura 17. Efectos biológicos del Vanadio. El V tiene una serie de efectos metabólicos; inhibe la glucogenólisis y estimula glucogénesis y gluconeogénesis, además estimula o inhibe algunas enzimas glicolíticas. Participa en la mineralización ósea, el metabolismo tiroideo, la permeabilidad de la membrana, y la afinidad de la hemoglobina. Es importante en la regulación de fosfatasa y cinasas. Y disminuye la acción de las lipasas inhibiendo la producción de colesterol, triglicérido y otros lípidos (Hecho con BioRender basado en Ścibior et al., 2020).

Utilizando modelos animales se ha demostrado que el V cruza la barrera hematoencefálica (BHE) y se acumula en el cerebro generando lesiones inflamatorias y desmielinizantes (Ngwa et al., 2017). La absorción de compuestos de V depende de su solubilidad y del aclaramiento alveolar y mucociliar, que determinan la tasa de absorción en el tracto respiratorio (INCHEM, 2001). Alrededor del 25% de los compuestos solubles de V se absorben por vías respiratorias, el V absorbido a través del tracto gastrointestinal, los pulmones o las vías parenterales se transporta en la sangre principalmente como vanadilo, unido principalmente a transferrina y albúmina, la distribución del V es rápida, inicialmente se observan altas concentraciones en riñón, hígado y pulmones, se acumula en el hígado, riñón, bazo, músculos, cerebro, pulmones, y hueso (Rehder, 2013).

Existen estudios epidemiológicos que muestran asociación entre la exposición al V y el deterioro de la salud reproductiva en hombres, bajo peso al nacer y ruptura prematura de membranas fetales, psicosis maniaco-depresiva y déficits neuroconductuales (Cooper, 2007; Li et al., 2013; van Leeuwen, 2000). La vía respiratoria es la vía más probable de exposición ambiental y ocupacional al V. El vínculo entre el tracto respiratorio superior y el bulbo olfatorio, a través de las neuronas olfativas que atraviesan la placa cribiforme se propone como una ruta directa a través de la cual los contaminantes del aire pueden ingresar al cerebro (Calderon-Garciduenas et al., 2003). Por lo tanto, el cerebro es un blanco potencial para la toxicidad inducida por el V. En un estudio de trabajadores expuestos a  $V_2O_5$ , (Barth et al., 2002) reportaron déficits en el rendimiento visoespacial y la atención en relación con los individuos no expuestos.



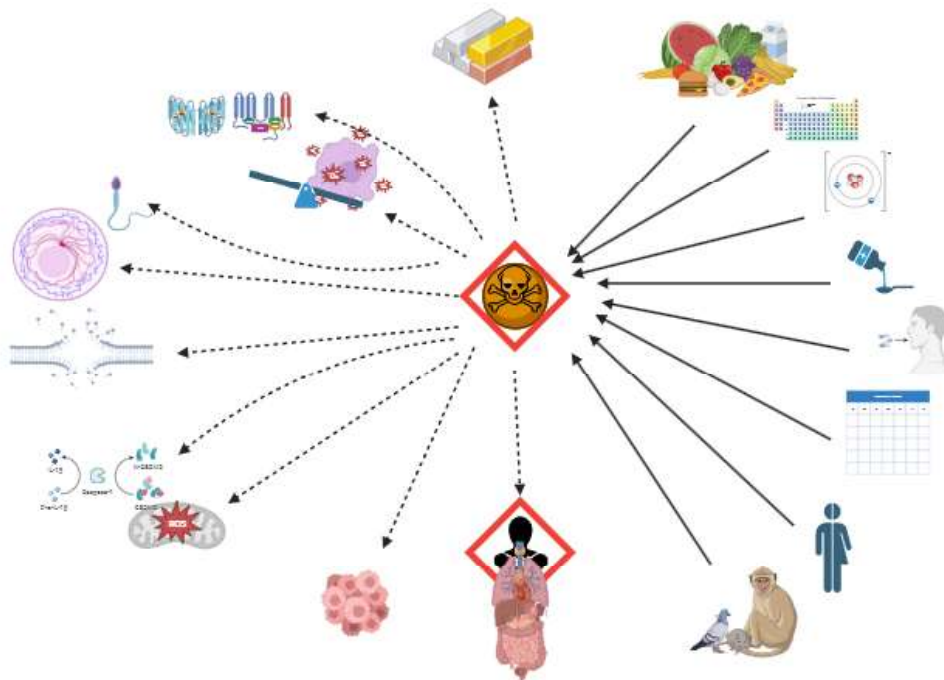


Figura 18. Resumen de los mecanismos de toxicidad y factores que participan en el efecto del Vanadio. En el lado derecho se esquematiza que la toxicidad depende de; dieta, compuestos, valencia, dosis, vía de exposición, tiempo de exposición sexo y especie. En el lado izquierdo se esquematiza algunos de los procesos alterados el vanadio; activación de metales de transición, disminución de las defensas antioxidantes, aumento de las ROS, alteración en el citoesqueleto y la formación de gametos, lipoperoxidación de membranas celulares, activación de la vía de las caspasas y producción de ROS en las mitocondrias, activación de oncogenes, y alteración en el funcionamiento de muchos órganos. Hecho con BioRender basado en (Ścibior et al., 2020).

## 2.12 PENTÓXIDO DE VANADIO

El  $V_2O_5$ , que contiene  $V^{+5}$  (el estado de oxidación más alto  $+5$ ) es la forma de vanadio más tóxica, llega fácilmente a la superficie alveolar, posteriormente entra en la circulación directamente y se difunde en todo el organismo induciendo diversas lesiones (fig. 19) (Avila-Costa, 2005; Tracey, 2007). El riesgo de envenenamiento con la forma  $V^{+5}$  está en constante crecimiento debido a su extensa liberación en el ambiente por parte de la industria metalúrgica, las plantas químicas, las refinerías de petróleo y las plantas de calefacción de carbón y mazut (van Leeuwen, 2000).

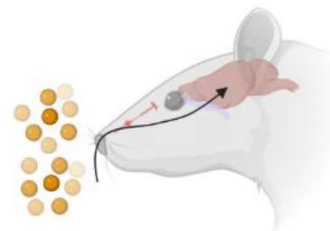


Figura 19. **Entrada del  $V_2O_5$  al SNC.** El  $V_2O_5$  inhalado entra al tracto respiratorio superior y al bulbo olfatorio a través de las neuronas olfativas que atraviesan la placa cribiforme se propone como una ruta directa al cerebro, haciéndolo un blanco potencial para la toxicidad inducida por V. Creado con BioRender (Avila-Costa et al., 2005).

## 2.13 TOXICIDAD DE $V_2O_5$

Los estudios de la toxicidad del V en animales se han realizado principalmente en murinos (Tabla III), la neurotoxicidad por V depende de la dosis acumulada, la velocidad a la que se administra la dosis, la vía de exposición y, los criterios de valoración seleccionados (Azeez et al., 2016; Folarin et al., 2017; Garcia et al., 2005). Estudios en ratones mostraron que el hipocampo, el cuerpo calloso y el cerebelo son las principales áreas afectadas por el estrés oxidativo inducido por V (por ROS (Reactive Oxygen Species) y lipoperoxidación), este daño conduce a

cambios morfológicos en neuronas, astrocitos, microglía y daño de la mielina, el daño oxidativo en hipocampo y cerebelo después de la exposición al V resulta del desequilibrio redox (Azeez et al., 2016; Folarin et al., 2017; Garcia et al., 2005; Olaolorun et al., 2021; Soazo & Garcia, 2007). La exposición a  $V_2O_5$  genera disminución en la deambulaci3n y aseo en ratones (Azeez et al., 2016); este grupo report3 recuperaci3n de la fuerza muscular pero no de la actividad motora despu3s de la exposici3n durante tres semanas al V. Folarin (2017) report3 d3ficit de memoria espacial medida en el laberinto de Morris despu3s de la exposici3n a V (Folarin et al., 2017).

Tabla III. Efectos t3xicos del  $V_2O_5$

<b>3rgano</b>	<b>Efecto adverso</b>
<b>Pulmones</b>	Aumento de citoquinas proinflamatorias IL-6 y TNF- $\alpha$ en el epitelio bronquial. Cambios inflamatorios en el pulm3n. La inhalaci3n de $V_2O_5$ puede dañar los pulmones y las v3as respiratorias, posiblemente involucrando neumonitis qu3mica aguda, edema pulmonar y / o traqueobronquitis aguda (Nemery, 1990). Los s3ntomas incluyen irritaci3n e inflamaci3n de las membranas mucosas, las fosas nasales y la faringe. (Rehder, 2013).
<b>Sistema circulatorio</b>	Trombocitosis Inflamaci3n e hiperfosforilaci3n. Alteraciones en el citoesqueleto por inhibici3n en la polimerizaci3n de actina y tubulina. Cr3nicamente, la exposici3n a metales en el aire, incluido el V, puede provocar alteraciones en la funci3n aut3noma card3aca. El V induce trombocitosis y puede estar asociado con diversas enfermedades tromboemb3licas (Gonz3lez-Villalba et al., 2007).
<b>H3gado</b>	Inflamaci3n cr3nica y megan3cleos en hepatocitos (20-30 $\mu$ m). Mayor n3mero de hepatocitos binucleados y trinucleados. Estr3s oxidativo (semana 6 de exposici3n a la inhalaci3n). La exposici3n aguda a V es un potente inhibidor de muchas enzimas, mientras que estimula la adenilato ciclasa. Cr3nicamente, los cambios histopatol3gicos observados incluyeron congesti3n de la vena central con pequeñas hemorragias dispersas y degeneraci3n granular de los hepatocitos (Cooper, 2007)
<b>SNC</b>	La exposici3n al $V_2O_5$ tiene manifestaciones fisiol3gicas importantes en el sistema nervioso. Produce la p3rdida dependiente del tiempo de las espinas dendr3ticas, muerte celular necr3tica y alteraciones considerables del neuropilo del hipocampo CA1, asociado con deterioro de la memoria espacial (Montiel-Flores et al., 2021). Adem3s, hay disminuci3n del n3mero de neuronas inmunorreactivas a la tirosina hidroxilasa en la substancia nigra pars compacta del 40% (en los modelos relacionado con Enfermedad de Parkinson hay una disminuci3n mayor al 60%) (Avila-Costa et al., 2004). Dentro del epitelio ependimal, la inhalaci3n de $V_2O_5$ provoca la p3rdida de cilios y el desprendimiento de la capa celular, el daño hace permeable al epitelio y promueve el acceso de mediadores inflamatorios al tejido neuronal subyacente, lo que causa lesiones y muerte neuronal (Avila-Costa et al., 2005). En los seres humanos, la exposici3n cr3nica da lugar a s3ntomas generales que incluyen alteraciones nerviosas, s3ntomas neurast3nicos o vegetativos (Cooper, 2007).
<b>Riñones</b>	Engrosamiento de la capa muscular de las arteriolas. Alteraciones en la morfolog3a de las c3lulas tubulares, aumento del estr3s oxidativo. El daño incluy3 una marcada degeneraci3n granular del epitelio de los t3bulos renales. Los cambios histol3gicos dosis-dependientes incluyeron focos microhemorr3gicos corticomedulares en los riñones (Domingo et al., 1985).
<b>Test3culos</b>	Necrosis y apoptosis en c3lulas espermatog3nicas. Reducci3n progresiva de actina en c3lulas testiculares. Reducci3n de $\gamma$ -tubulina en c3lulas germinales, de Sertoli y de Leydig. Los resultados incluyen alteraciones en la espermatog3nesis (necrosis de espermatozoides, espermatoцитos y c3lulas de Sertoli) (Mussali-Galante et al., 2005).

## Mecanismos de toxicidad del vanadio

Intracelularmente, el vanadato es reducido por los antioxidantes intracelulares (principalmente glutati3n (GSH) a vanadil, con la consecuente producci3n de EROS, en presencia de per3xido de hidr3geno ( $H_2O_2$ ), el vanadil se oxida a vanadato en una reacci3n tipo Fenton haciendo que el V tetravalente y pentavalente sea estable e interconvertible en un ciclo redox y generando radical hidroxilo ( $OH\cdot$ ) (fig. 20-2,4) (Beyersmann & Hartwig, 2008). El  $OH\cdot$  desencadena reacciones adicionales que generan super3xido que es dismutado espont3neamente por la super3xido dismutasa (SOD), a ox3geno y  $H_2O_2$  (fig. 20-2). El  $H_2O_2$  reacciona con vanadil para producir m3s  $OH\cdot$ . El vanadil tambi3n reacciona con  $O_2$  para generar an3n super3xido y vanadato (Evangelou, 2002). Otros mecanismos por los cuales el V produce ROS incluyen, liberaci3n de hierro de la ferritina y fuga de electrones de la cadena de transporte de electrones (Complejos II y III) en las mitocondrias (fig. 20-4)(Azeez et al., 2016).

La formación de EROS y la peroxidación de lípidos de las membranas celulares genera desmielinización, agregación de proteínas, activación de procesos mutagénicos de DNA, e inducción de apoptosis (fig. 20-3) (Fatola et al., 2019). Hosseini et al., (2013) reportaron reducción en los niveles de GSH activo en cultivos mitocondriales tratados con vanadato, además de daño en la membrana mitocondrial causando la apertura del poro de transición de permeabilidad de la membrana mitocondrial (MTP) que conduce a edema y liberación de citocromo C, seguido por la activación de la cascada de caspasas (y apoptosis). La apertura de los MTP también puede conducir a la depleción de ATP y necrosis. El vanadato reacciona con los grupos tiol de las enzimas antioxidantes y produce vanadil y radical tiilo, disminuyendo los niveles de antioxidantes (fig. 20-2) (Beyersmann & Hartwig, 2008). El vanadato inhibe y estimula varias enzimas involucradas en las vías de señalización como las ATPasas, las fosfatasas (por ejemplo, fosfotirosin fosfatasas (PTP)) y las cinasas. Debido a su homología estructural con el fosfato, el V se une reversiblemente a los sitios catalíticos de las enzimas, lo que resulta en su inactivación temporal (Crans et al., 2010). El V también puede unirse a los residuos de cisteína en las proteínas que a después reaccionan con  $H_2O_2$  para formar iones pervanadato que oxidan e inactivan irreversiblemente los residuos de cisteína, residuos necesarios para la actividad catalítica de las enzimas (Crans et al., 2010). Los compuestos de V también pueden estimular la fosforilación de la protein tirosin cinasa (PTK) y la activación de la cascada de MAPK activando la transducción de las señales responsables de la producción de citocinas inflamatorias (fig. 20-3)(Fatola et al., 2019).

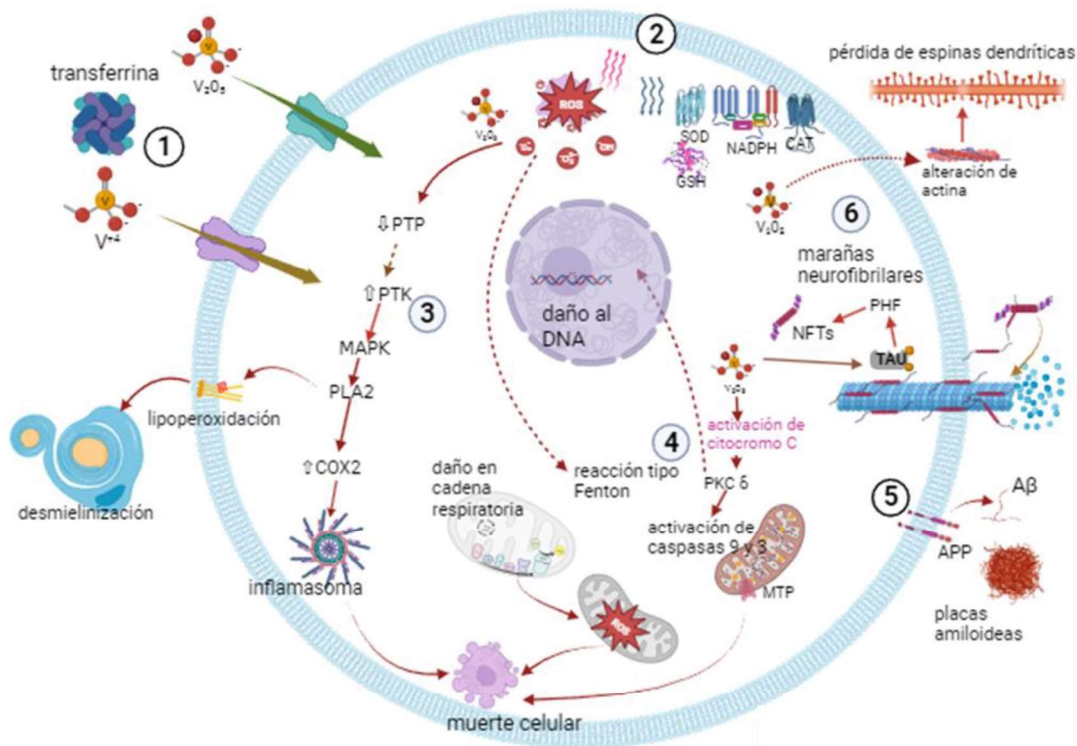


Figura 20. **Mecanismos de toxicidad del vanadio en el sistema neural** 1. **Entrada a la célula:** El V entra en la célula en forma de vanadio o como vanadato transportado por ferritina a través de transportadores activos o canales aniónicos; reacciona con el oxígeno para generar superóxido y vanadio pentavalente (vanadato) 2. **Estrés oxidativo.** Una vez en la célula, el vanadato reacciona con las enzimas antioxidantes celulares como la superóxido dismutasa (SOD) y la glutatión peroxidasa (GSH). La presencia de vanadato dentro de la célula genera un estado prooxidante y un aumento de ROS ( $H_2O_2$ ,  $O_2$ ,  $OH^\bullet$ ), lo que lleva a un estado de estrés oxidativo. 3. **Inflamación y peroxidación lipídica:**  $V_2O_5$  inhibe PTP (proteína-tirosin-fosfatasa) a través de residuos de cisteína, induciendo a la PTK (proteína-tirosina-quinasa) a aumentar la fosforilación de MAPK, lo que conduce a la hiperactividad de PLA2 (fosfolipasa A2) y, en consecuencia, aumenta la COX2 (ciclooxigenasa 2) estimulando el proceso de inflamación y gliosis. Del mismo modo, la hiperactividad de PLA2 causa lipoperoxidación y desmielinización. 4. **Daño mitocondrial:** La generación de ROS inducida por V es responsable de la liberación del citocromo C mitocondrial y la posterior activación de las caspasas 9 y 3, y la activación proteolítica dependiente de caspasa de la proteína

quinasa C  $\delta$ , que a su vez induce daño en el DNA y la apoptosis. **5. Acumulación de  $\beta$ A.** El estrés oxidativo,  $V_2O_5$  y Tau hiperfosforilada, desencadenan que la APP siga la ruta amiloidogénica generando acumulación de  $\beta$ A y formación de placa. Parece que  $V_2O_5$  podría inducir la enfermedad debido a su capacidad para generar ROS, dañar el tejido neural a través de la alteración del DNA y la oxidación de lípidos y proteínas. El exceso de ROS puede generarse a partir de mecanismos como la disfunción mitocondrial y/o la acumulación aberrante de metales de transición como V, mientras que la acumulación anormal de proteínas  $\beta$ A y Tau parece promover el desequilibrio redox. El estrés oxidativo resultante ha sido implicado en la neurotoxicidad inducida por  $\beta$ A o Tau. Además, la disfunción mitocondrial y la producción de ROS se han asociado con la EA. Todos estos son productos conocidos del estrés oxidativo activados por vanadio y ofrecen una base para que este compuesto tenga un papel en la EA. **6. Hiperfosforilación inducida por vanadio.** El  $V_2O_5$  induce la hiperfosforilación de la proteína Tau en los microtúbulos, causando inestabilidad del citoesqueleto y la formación de filamentos helicoidales pareados, que a su vez producen NFT; asimismo, el  $V_2O_5$  inhibe la polimerización de actina, causando pérdida de las espinas dendríticas. Hecho con BioRender.

Neurotoxicidad. En un estudio del efecto neurotóxico del  $V_2O_5$  en las neuronas dopaminérgicas, Ngwa et al., (2009) encontraron que la generación de ROS inducida por V es responsable de la liberación del citocromo C mitocondrial y la posterior activación de las caspasas 9 y 3, y de la activación proteolítica dependiente de caspasa de la proteína cinasa C  $\delta$  (PKCa), la inhibición de la PKCa atenúa el daño del DNA inducido por V y la apoptosis (fig. 20-4). En la neurotoxicidad por V existe más de un mecanismo de toxicidad: estrés oxidativo, pérdida de homeostasis de hierro, hipoxia y activación de la vía de señalización cinasa c-Jun N-terminal, (JNK) (Olaolorun et al., 2021).

Efecto neurotóxico de  $V_2O_5$  en humanos. Li y su grupo (2013) realizaron un estudio en humanos sobre exposición ocupacional a V analizando mediciones de NCTB (Neurobehavioral Core Test Battery) y la onda P300 (potencial evocado que puede ser registrado mediante EEG, asociado con una reducción en la amplitud en pacientes con EA (Hedges et al., 2016)), ellos reportaron cambios medibles en el rendimiento neuroconductual de los trabajadores; el V induce un estado de estrés oxidativo en el SNC, las principales áreas afectadas por la generación de ROS mediados por V fueron el hipocampo y el cerebelo (Li et al., 2013). La exposición crónica se asoció con el aumento de emociones como ira-hostilidad, depresión-abatimiento y fatiga-astenia, además de disminución de la coordinación motora, memoria de corto plazo y velocidad de reacción (Li et al., 2013). Los trabajadores expuestos a V tuvieron peores resultados en pruebas de memoria auditiva, percepción y velocidad de movimiento, coordinación precisión y velocidad de operación (Li et al., 2013). El tiempo de respuesta probado con el P300 de los trabajadores expuestos a V fue más largo (Li et al., 2013). Ya que el V es ampliamente utilizado en aplicaciones industriales, el aumento de la concentración de este elemento en la atmósfera debido al rápido desarrollo de la industria exige la evaluación de su toxicidad y mecanismos de acción relacionados.

## 2.14 HIPERFOSFORILACIÓN (HIPERVANADILACIÓN) DE Tau

Las NFT se componen principalmente de proteína Tau hiperfosforilada, aunque algunos mecanismos todavía no están claros, se ha reportado un desequilibrio entre cinasas y fosfatasa como la causa directa de la hiperfosforilación y la disfunción de la sinapsis en la EA (Hanger, Seereeram, et al., 2009), en los cerebros de pacientes con EA las actividad de cinasas están aumentada y la actividad de fosfatasa Tau reducida, (Yoshiyama et al., 2007), el vanadato es un inhibidor de la fosfatasa de amplio espectro que inhibe específicamente las proteínfosfatasa 2A (PP2A) y las proteín tirosínfosfatasa 1B (PTP1B), fosfatasa implicadas en la EA; el vanadato induce la hiperfosforilación de Tau y estrés oxidativo (Korbecki et al., 2015, por lo tanto, se observan daños similares a los encontrados en la EA (fig.21).

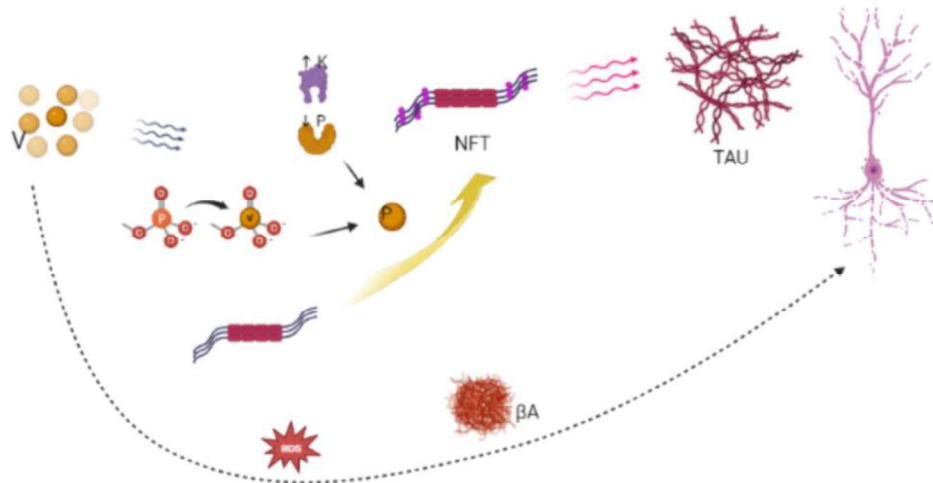


Figura 21. **Relación de la inhalación de  $V_2O_5$  con la hiperfosforilación de Tau.** El  $V_2O_5$  causa alteración en cinasas y fosfatasas, que junto con la sustitución de fosfato por vanadato lleva a la hiperfosforilación de Tau que genera la formación y acumulación de NFT y daño neuronal. Hecho con BioRender basado en (Hanger, Anderton, et al., 2009; Korbecki et al., 2015; Yoshiyama et al., 2007)

Importancia de Tau en la formación del citoesqueleto. El citoesqueleto de las neuronas y otras células consta de tres componentes: microtúbulos, filamentos intermedios, y microfilamentos. En las micrografías electrónicas, los microtúbulos aparecen como cilindros huecos con un diámetro exterior de unos 25 nm, la pared de estos cilindros está formada por 13 protofilamentos compuestos de subunidades globulares  $\alpha$  y  $\beta$  ensambladas por las proteínas asociadas a microtúbulos (MAP) entre las cuales se distinguen las de alto peso molecular (MAP 1, 2 etc.), y las de bajo peso molecular denominadas proteínas Tau (Ulrich, 1993), en la neurona normal, la proteína Tau se localizan principalmente en el axón y las MAPs 1 y 2 en las dendritas (Ulrich, 1993). Estos microtúbulos asociados a proteínas forman puentes cruzados entre los diversos elementos del citoesqueleto, junto con los filamentos neuronales, los microtúbulos son responsables del mantenimiento de la forma de la neurona, el transporte axonal y dendrítico, cambios de forma y extensión durante el crecimiento, la reparación y la adaptación a procesos patológicos, y la formación y funcionalidad de las espinas dendríticas (Ulrich, 1993). Los filamentos intermedios son ultraestructuralmente compactos con un diámetro de 8-10 nm, su función principal es el mantenimiento de la forma celular, los neurofilamentos están interconectados con otros neurofilamentos y microtúbulos, son particularmente prominentes en el axón, donde se organizan en haces y donde su número aumenta con el diámetro axonal, los neurofilamentos se extienden ininterrumpidamente por distancias considerables, constan de tres unidades, el componente ligero (68 kD), el componente medio (150 kD) y el componente pesado (200 kD), las proteínas de los neurofilamentos, como las proteínas MAP-tau, están fosforiladas en el axón, pero no en el pericarion o en las dendritas (Ulrich, 1993). Los microfilamentos o filamentos de actina son responsables del movimiento celular; ultraestructuralmente los filamentos tienen un grosor de aproximadamente de 6 nm y por lo general se encuentran adyacentes a la membrana citoplasmática, se ven mejor en los conos de crecimiento durante el desarrollo embrionario o durante los procesos de reparación (Ulrich, 1993).

### 3. JUSTIFICACIÓN

La investigación sobre la EA está en un momento complejo; a pesar de todos los recursos invertidos por más de 100 años en la comprensión de esta enfermedad, todavía no se encuentra la cura, hasta ahora solo existen fármacos que modifican, durante algún tiempo, el curso de la patología. La EA es neurodegenerativa y de mayor prevalencia, debido al envejecimiento de la población y, al aumento en la contaminación ambiental entre otros factores. La EA es un padecimiento que sólo afecta a los seres humanos por lo que se han elaborado modelos murinos humanizados que replican el origen genético de la patología la cual es solo el 10% y que por ello no replican del todo la enfermedad. Estos perfiles del problema hacen urgente el desarrollo de seguir en la búsqueda de modelos experimentales que representen de un modo cercano, el tipo esporádico de la EA y que desarrollen el curso temporal y de la fisiopatología de la EA. En el humano y en los modelos de murinos, los signos patognomónicos cerebrales son las placas beta amiloides y la hiperfosforilación de la proteína Tau que forma las redes neurofibrilares, ambos en áreas vulnerables que regulan la memoria. En este sentido contaminantes ambientales que provoquen esta hiperfosforilación, se proponen como candidatos para un modelo de la EA de tipo esporádico (que es la forma en que se presenta más del 95% de la EA), a nivel experimental. Es el caso del vanadio que compite con el fosforo y que probablemente cause alteraciones en el citoesqueleto de las neuronas localizadas en estas áreas cerebrales vulnerables.

### 4. HIPÓTESIS

La exposición crónica a  $V_2O_5$  induce la aparición de las marcas asociadas a la enfermedad de Alzheimer en un modelo murino.

### 5. OBJETIVOS

#### OBJETIVO GENERAL

Determinar si la inhalación de  $V_2O_5$  conlleva al desarrollo de un modelo esporádico de la enfermedad de Alzheimer

Objetivos particulares:

1. Determinar si la exposición al  $V_2O_5$  compromete la capacidad cognitiva (memoria) y motora en un modelo de rata.
2. Evaluar si el efecto del  $V_2O_5$  sobre capacidad cognitiva (memoria) y motora es transitorio.
3. Determinar las marcas asociadas a la EA en respuesta a la exposición al  $V_2O_5$  en un modelo de rata.

## 6. ESTRATEGIAS EXPERIMENTALES

Los experimentos se realizaron en ratas macho de la cepa Wistar con un peso inicial de  $180 \pm 20$  g. Se emplearon 40 ratas, de las cuales: 20 fueron para el grupo control y 20 para el grupo experimental. Fueron mantenidas en condiciones de laboratorio en periodos de 12:12 horas luz/oscuridad con libre acceso al alimento y agua (fig. 22). Los animales fueron mantenidos de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

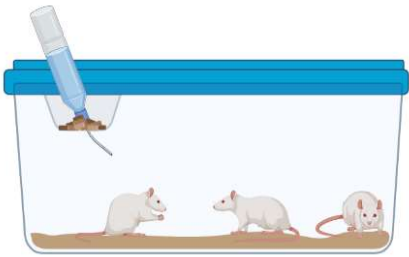


Figura 22. Alojamiento de animales de acuerdo con NOM, (realizado con BioRender).

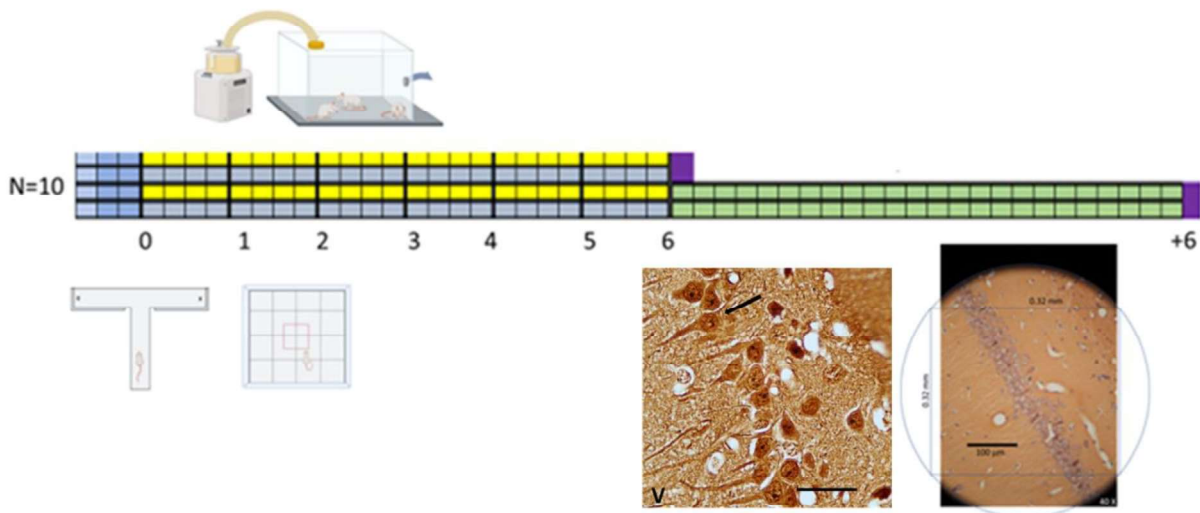


Figura 23. Estrategia experimental. Cámara de inhalación de  $V_2O_5$ , la cuadrícula representa el tiempo, los cuadros azules representan las semanas de habituación y entrenamiento, los cuadros amarillos representan las semanas de exposición a V, los cuadros grises representan las semanas de exposición a agua destilada, los cuadros lilas representan el momento de eutanasia, y los cuadros verdes representan las semanas de recuperación. Cada grupo estaba formado por diez ratas ( $4 \times 10$ ). Los números representan los tiempos de exposición y recuperación de los grupos control y experimental, y en la parte inferior se ejemplifican pruebas conductuales y técnicas histológicas. Creado con BioRender.

### Conducta

Antes del entrenamiento y la evaluación, todos los animales fueron privados de alimento por 12 horas, (para incrementar la búsqueda de alimento) controlando que no perdieran más del 10% de su peso inicial.

### Laberinto en T.

Tres semanas previas a la primera inhalación, los animales fueron entrenados en el Laberinto de "T" efectuando el procedimiento siempre a la misma hora (11:00 A.M) (Deacon & Rawlins, 2006), en la primera semana (habituación) cada rata se colocó en el laberinto (fig. 24) y permaneció por cinco minutos para que explorara libremente, cada rata repitió esta actividad cinco veces, este procedimiento se aplicó durante siete días. En la



segunda semana (adquisición fig. 24 A), se entrenó a los animales en el laberinto en T, la mitad de los animales ( $n=10$ ) hacia el brazo derecho y la mitad hacia el brazo izquierdo ( $n=10$ ), al final de cada brazo (derecha o izquierda según el grupo) se colocó una recompensa (pellet), cada rata se puso en el extremo largo del laberinto (inicio), se colocó una puerta bloqueando el brazo correspondiente al entrenamiento (derecha o izquierda), este proceso tuvo un lapso máximo de 2 minutos, cada rata repitió esta actividad 10 veces. En la tercera semana se evaluó la memoria espacial (fig. 24 B) (Deacon & Rawlins, 2006), se evaluó cada grupo (derecha e izquierda) de la siguiente manera, cada rata se colocó en el brazo largo (inicio) para dirigirse al brazo correspondiente, cada vez que la rata llegaba al brazo correspondiente y consumía la recompensa se contaba como acierto, si la rata se dirigía al brazo contrario se contaba como error, cada rata solo pasó una vez y tuvo máximo dos minutos para completar la prueba, una vez finalizada la evaluación, ambos grupos alcanzaron por lo menos el 80% de aciertos para proceder a la inhalación.

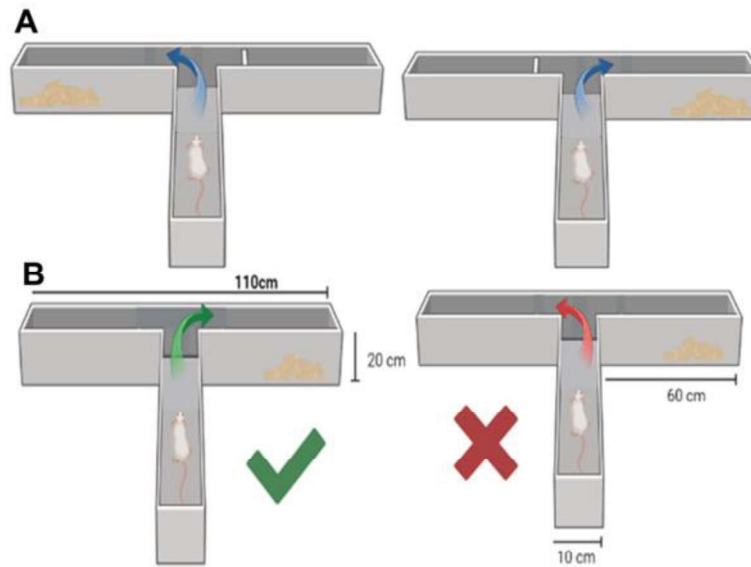
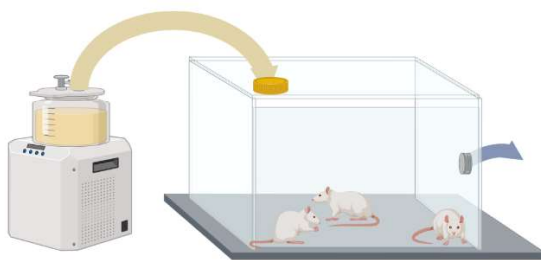


Figura 24. Laberinto en T. A Adquisición. La mitad de los animales son entrenados hacia la derecha y la otra mitad es entrenado hacia la izquierda. B. Evaluación. Cuando el animal va hacia el brazo donde recuerda que está el alimento se considera como acierto, si camina hacia el brazo contrario se considera error. Hecho con BioRender.

A partir de la tercera semana los animales se expusieron a la inhalación de  $V_2O_5$ . Posteriormente, cada mes se evaluó la memoria espacial con el protocolo de evaluación antes mencionado (fig. 24) (Deacon & Rawlins, 2006).



### Inhalación

Los animales del grupo control se expusieron a la inhalación de agua desionizada, mientras que los animales del grupo experimental inhalaban  $V_2O_5$  al 0.02M (fig. 25), ambos grupos una hora tres veces por semana durante seis meses. Seis meses x 4 semanas x 3 inhalaciones a la semana = 72 exposiciones de  $V_2O_5$  (Avila-Costa et al., 2004).

Figura 25. Cámara de inhalación de  $V_2O_5$  figura creada con BioRender.



## Campo Abierto

La prueba se realizó al final de cada mes y consistió en colocar a la rata durante 10 min sobre una superficie de 1.2 x 1.2 m con cuadros en el piso de .3 x .3 m (fig. 26), y se registraron las veces que la rata cruzaba las líneas de los cuadros, las veces que se erguía, el tiempo que ocupaba explorando, las veces que se acicalaba, el tiempo de freezing, y las veces que defecó durante los 10 min. También se registró el patrón de locomoción de la rata en la cuadrícula durante 10 min, el recuadro rojo indica los cuadros centrales.

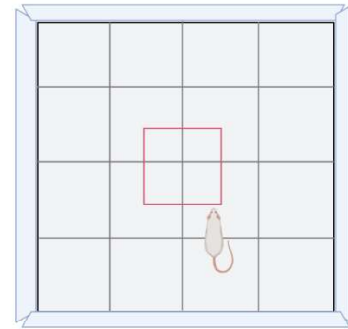


Figura 26. Campo abierto. (Creado con BioRender).

Al terminar el tiempo de exposición, 10 ratas del grupo control (10/20) y 10 ratas del grupo expuesto a  $V_2O_5$  (10/20) se dejaron en recuperación. Al terminar el periodo de exposición o recuperación y las pruebas conductuales se sacrificó a los animales y se realizaron las técnicas histológicas (fig. 23).

## Recuperación

Al terminar los 6 meses de exposición 20 animales (10 controles y 10 experimentales) fueron mantenidos durante 6 meses en las condiciones de laboratorio descritas anteriormente, para evaluar la recuperación una vez interrumpida la inhalación de  $V_2O_5$ , durante este periodo, cada mes se evaluó la memoria en el laberinto en T y la conducta motora en campo abierto (fig. 23).

## Eutanasia por Perfusión

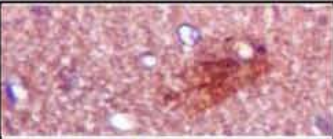
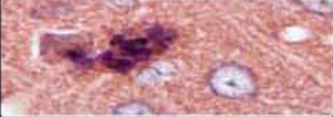






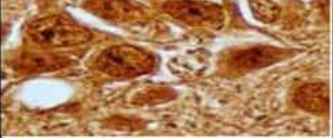

Las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (dosis letal 150mg/kg ip) y se perfundieron por vía intracardiaca con solución salina al 0.9% y, posteriormente se les administró el fijador formaldehído al 10%, se removieron los cerebros para procesarlos con la tinción de rojo Congo y las impregnaciones argénticas de Bielschowsky y Golgi.

## Análisis Morfométrico

Identificación y muestreo regional. Las regiones muestreadas se identificaron utilizando el atlas estereotáxico de rata (Paxinos & Watson, 2006) a partir de bregma -5.04 subiculum, -2.76 CA1 -6.0 corteza entorrinal, -2.04 amígdala y 2.28 corteza frontal.

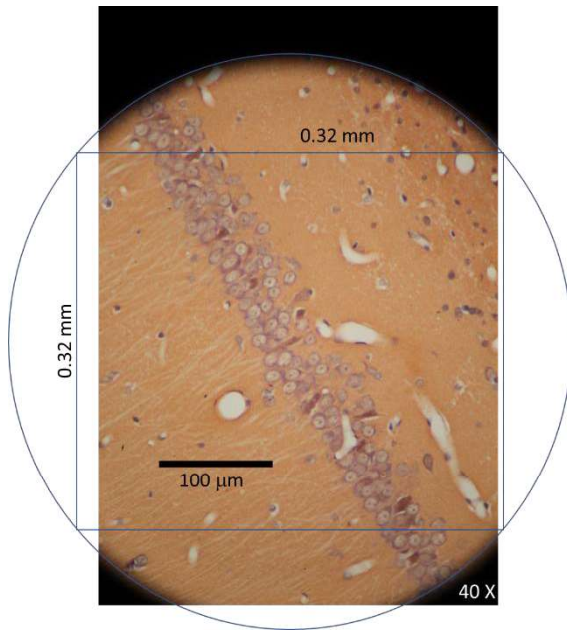
El análisis histológico cuantitativo se hizo en imágenes obtenidas con un microscopio Nikon equipado con una cámara digital Canon EOS rebel por un solo observador. El estudio definió la patología  $\beta A$  y Tau como se describió anteriormente (Augustinack et al., 2002; Serrano-Pozo et al., 2011). Placas  $\beta$  amiloide (marcadas con Rojo Congo) se analizaron en tres estructuras: en el mesénquima extracelular se cuantificaron las placas  $\beta$  amiloide, estas placas se distinguieron entre  $d\beta A$  y  $Dc\beta A$ . En los vasos se analizó la angiopatía amiloide, la CAA se clasificó por depósitos de  $\beta A$  en la túnica media de arterias y arteriolas y se cuantificó la presencia de vasculatura  $\beta A$ -positiva. En las neuronas piramidales se analizó la presencia de  $\beta A$  y distinguió entre  $nD$ ,  $pD$ , y  $gD$ , utilizando la tinción de rojo Congo. Las marañas neurofibrilares (marcadas con la técnica de Bielschowsky) clasificadas en  $preNFT$ ,  $iNFT$  y  $eNFT$ , (ver Tabla IV) (fotos representativas basadas en la descripción de Duyckaerts et al., 2009; Šimić et al., 2016; Thal et al., 2008).

Tabla IV. Definición de patología  $\beta$ A, AAC y Tau

<p style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);"> <math>\beta</math> AMILOIDE                 </p>	d $\beta$ A	Placas $\beta$ A difusas: zonas congofilicas extracelulares formadas principalmente por dimeros y oligómeros de $\beta$ A.	
	Dc $\beta$ A	Placas $\beta$ A de núcleo denso: zonas congofilicas extracelulares compuestas por un núcleo fibrilar rodeado por un halo difuso, no fibrilar.	
	CAA	El péptido $\beta$ A se deposita en las paredes de los vasos originando la CAA, $\beta$ A40 (más soluble) es el principal constituyente de CAA, acumulándose en la túnica intersticial del músculo liso.	
	nD	Sin daño. Neuronas con núcleo redondo que mantienen la relación núcleo citoplasma, el nucleolo se encuentra pericéntrico.	
	pD	Daño parcial. Algunas neuronas con daño en las que se pierde la relación núcleo citoplasma, se nota una retracción del citoplasma y se tiñe la dendrita apical.	
	gD	Daño generalizado. Neuronas en las que se pierde la delimitación del núcleo y el soma se ve como una mancha congofilica irregular, se nota una retracción del citoplasma.	
<p style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">                     NFT                 </p>	preNFT	Premarañas o estructuras de tipo granular que contienen proteína TAU alterada, pero que aún no han llegado a formar fibras y no son detectables mediante los métodos de tinción específicos tradicionales, definidos por un patrón intracelular tau difuso, algunas veces punteado, con las dendritas bien conservadas y un núcleo centrado.	
	iNFT	NFT intraneuronales maduros o fibrilares (iNFTs) consisten en agregados citoplásmáticos de tau hiperfosforilada que desplazan el núcleo hacia la periferia del soma y alteran la morfología de las dendritas y el segmento proximal del axón; las NFTs se localizan en la zona del soma y las prolongaciones celulares proximales, son detectables con métodos de marcaje específicos y pueden tener morfologías variadas.	
	eNFT	"Fantasma" neuronal (eNFTs) resulta de la muerte de las neuronas y es identificable por la ausencia de núcleo y de citoplasma). Se ubican en el soma celular que desplaza al núcleo, terminan por acabar con la viabilidad de la célula que lo contiene, formando así las "marañas fantasma" o NFTs extracelulares con grupos de neuritas distróficas, que presentan axones y dendritas edematizadas con tinción difusa y punteada.	
<p style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">                     Espinas Dendríticas                 </p>		Densidad de espinas dendríticas. Dendritas secundarias de neuronas piramidales de cada estructura.	

## Impregnación argéntica de Bielschowsky y tinción de Rojo Congo

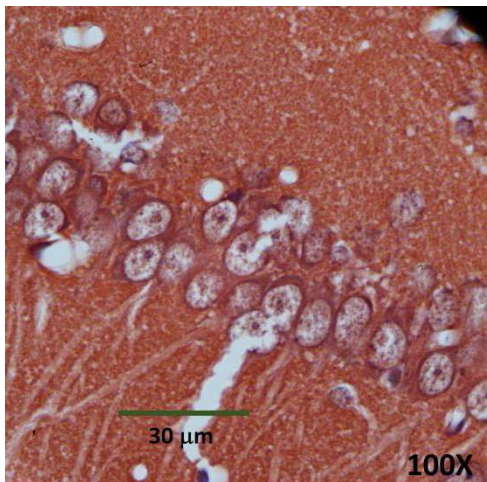
El tejido se procesó con la técnica de parafina, en un microtomo de deslizamiento se obtuvieron cortes coronales de 6  $\mu\text{m}$  de grosor donde se localiza CA1, el subículum dorsal, la corteza entorrinal, región basolateral del complejo amigdalino y la corteza frontal; posteriormente, se procesó con la impregnación argéntica de Bielschowsky (Schwab et al., 1998) y la tinción de Rojo Congo (Navarro et al., 1999). Se tomaron diez cortes al azar por cada estructura y se analizaron las características morfológicas intracelulares y extracelulares de los núcleos cerebrales antes mencionados.



### Análisis histológico.

Se analizaron áreas de 0.32x0.32 mm (320 x 320  $\mu\text{m}$ ) de 10 cortes diferentes de cada una de las 5 estructuras. Se calculó el porcentaje de neuronas piramidales que mostraban daño, del total de neuronas piramidales teñidas dentro del área (fig. 27)

Fig. 27. Fotomicrografía de CA1 con la tinción de Rojo Congo a un aumento de 40X. La barra negra representa 100  $\mu\text{m}$ .



Se analizaron las alteraciones morfológicas dentro de un área de 100x100  $\mu\text{m}$ , de las 5 estructuras seleccionadas, en todos los casos para hacer el análisis correspondiente se obtuvieron imágenes digitales de los campos de interés (fig. 28).

Figura. 28. Fotomicrografía de CA1 con la tinción de Rojo Congo a un aumento de 100X. La barra verde representa 30  $\mu\text{m}$ .

## Impregnación Argéntica de Golgi:

El tejido se procesó con la técnica de parafina, en un microtomo de deslizamiento se obtuvieron cortes coronales de 120  $\mu\text{m}$  de grosor a la altura de CA1, el subículum dorsal, la corteza entorrinal, la región basolateral del complejo amigdalino y la corteza frontal, los cuales se procesaron mediante la técnica de impregnación Argéntica de Golgi y se realizó el conteo de espinas dendríticas. Para el conteo se seleccionaron 5 dendritas secundarias de 10 neuronas y se contaron las espinas en una longitud de 10  $\mu\text{m}$  en cada estructura (fig. 29) (Rivas-Manzano et al, 2021).

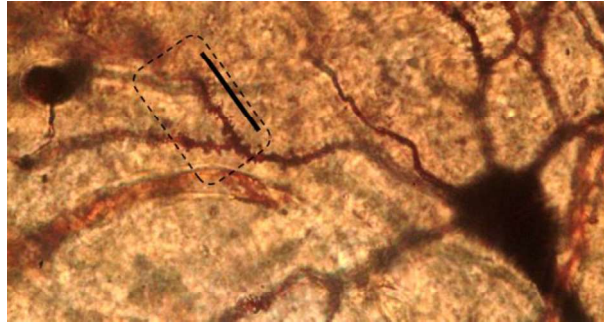


Figura 29. Fotomicrografía de una neurona piramidal con la tinción argéntica de Golgi. La barra muestra el área donde se hizo el conteo de espinas dendríticas (10  $\mu\text{m}$  en una dendrita secundaria de una neurona piramidal por estructura en cortes coronales de 120  $\mu\text{m}$ ).

## Estadística

Los valores están expresados como el promedio ( $\bar{X}$ )  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Para los análisis estadísticos de los resultados de las evaluaciones de memoria se utilizó la prueba de Kruskal Wallis, mientras que para el análisis morfométrico se utilizó ANOVA de una vía, seguido de la prueba *post hoc* de Tukey, verificando previamente el cumplimiento de los supuestos de normalidad de distribuciones e igualdad de varianzas. El criterio para el establecimiento de diferencias estadísticamente significativas fue de  $p < 0.05$ . El software utilizado para el análisis estadístico fue GraphPad Prism 8.



## 7. RESULTADOS

### 7.1 CONDUCTA

Laberinto en T. Los resultados de la prueba de laberinto en T (fig. 30) muestran que los dos grupos aprendieron la ubicación del brazo del laberinto donde estaba el alimento, después de una semana de entrenamiento (porcentaje de aciertos mayor a 80%). A partir de los 3 meses de exposición a  $V_2O_5$  hay diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos, notándose deterioro de la memoria en el grupo expuesto a  $V_2O_5$ , esta diferencia se mantiene a los 4 y 6 meses de exposición. En el periodo de recuperación (1R y 2R) no observamos recuperación en el deterioro de la memoria espacial. Prueba de Friedman  $\chi^2=5.4444$  (1, N=9)  $p=0.01963$ .

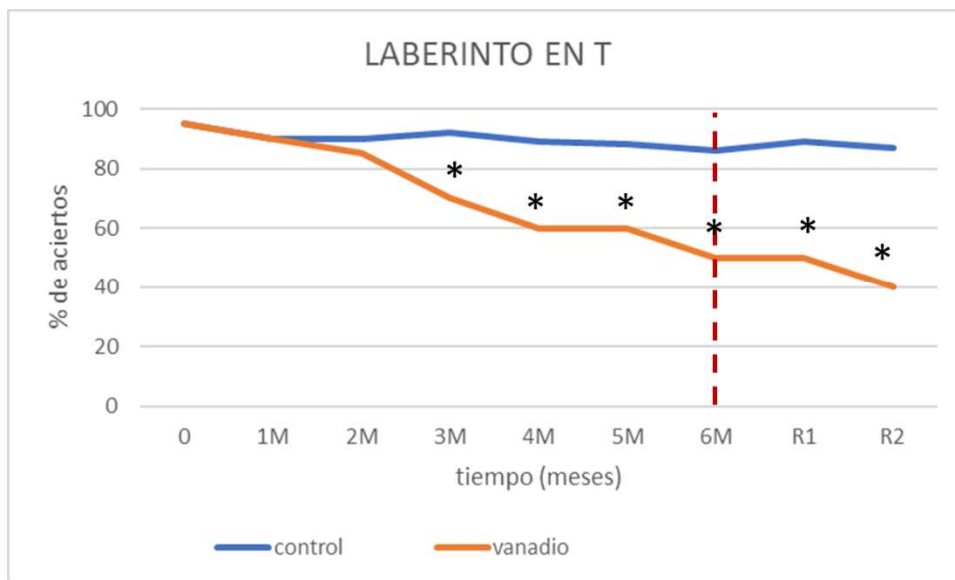


Figura 30. **Resultados de memoria en el laberinto en T**, en el eje de las abscisas el tiempo de exposición en meses y los meses en recuperación. En el eje de las ordenadas se muestra el porcentaje de aciertos (A). La línea punteada indica el momento en que se suspendió la exposición a vanadio. Prueba de Friedman  $*=p<0.05$   $n=10$ . NOTA la prueba se suspendió a los 8 meses (6 de exposición + 2 de recuperación) porque las ratas estaban muy grandes para el laberinto que usamos.

### Campo Abierto

Como un experimento preliminar se analizó la conducta de campo abierto en el grupo control y el grupo expuesto a  $V_2O_5$  (figs. 31 y 32). Los resultados de conducta en campo abierto durante 10 minutos (fig. 31) muestran disminución respecto al grupo control, entre los promedios de tiempo que el grupo de ratas expuestas a  $V_2O_5$  exploran (segmento azul), así como aumento respecto al grupo control entre los promedios de tiempo que el grupo de ratas expuestas a  $V_2O_5$  presentan freezing. Con base en estos resultados decidimos registrar y graficar las conductas de exploración (midiendo el número de líneas que cruzaba la rata) y freezing por 10 minutos, una vez durante cada uno de los seis meses de exposición a  $V_2O_5$  y durante cada uno de los seis meses de recuperación (Figs. 33 y 34).

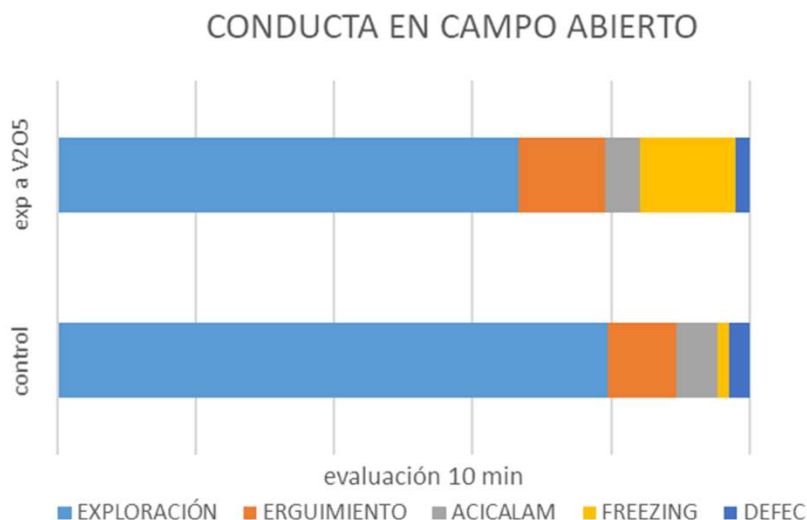


Figura 31. Promedio del tiempo durante el cual las ratas mostraron diferentes conductas en 10 minutos. Las actividades medidas fueron; exploración, erguimiento, acicalamiento, freezing, y defecación.

Durante la prueba preliminar de campo abierto se observaron diferencias en las trayectorias del grupo control y del grupo experimental. Las ratas control atravesaron varias veces los cuadros centrales en forma diagonal y mostraron un patrón de locomoción más disperso. Las ratas expuestas tres veces a la semana durante dos meses al  $V_2O_5$  mostraron tigmotaxis, ya que permanecían en la periferia (Fig. 32).

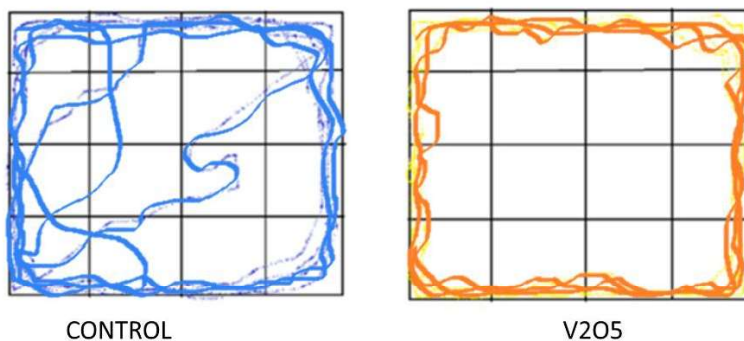


Figura 32. Esquema que muestra la diferencia en las trayectorias de la rata control (azul) y de la rata expuesta a  $V_2O_5$  (naranja) durante 10 min (trayectorias representativas). La cuadrícula representa una superficie de 1.2 x 1.2 m compuesta por 16 cuadros de .3x.3 m marcados en el piso, las líneas azul y naranja representan el patrón de locomoción seguido por las ratas del grupo control y del grupo experimental, respectivamente.

Los resultados de exploración (fig. 33) muestran disminución significativa en el promedio de líneas cruzadas por las ratas del grupo experimental a partir del segundo mes de exposición a  $V_2O_5$ , esta disminución se mantuvo aún seis meses después del cese de la exposición. Durante los dos primeros meses la disminución en la conducta de exploración fue acelerada. Durante el periodo de recuperación el promedio de la exploración permanece significativa y consistentemente por debajo del 80 %. ANOVA  $F = (1,12) = 120.4$ ;  $p = 0.0414$ .

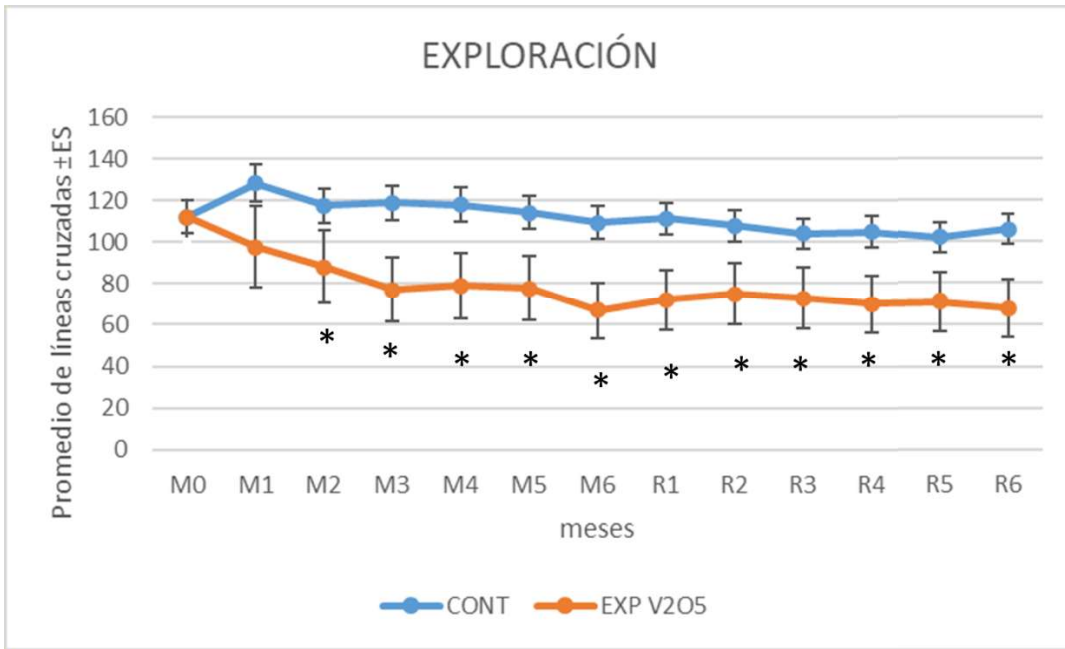


Figura 33. **Resultados de exploración en la prueba de campo abierto**, en el eje de las abscisas se encuentran los meses de exposición seguidos de los meses de recuperación. En el eje de las ordenadas está el promedio de las líneas cruzadas  $\pm$  el error estándar (\* =  $p < 0.05$ )  $n=10$ .

Los resultados de freezing (inmovilidad) (fig. 34) muestran aumento significativo de la conducta de freezing desde el primer mes de exposición, esta conducta aumenta durante el tiempo de exposición y disminuye durante el tiempo de recuperación, aunque no desaparece. ANOVA  $F = (1,12) = 29.02$ ;  $p = 0.0002$ .

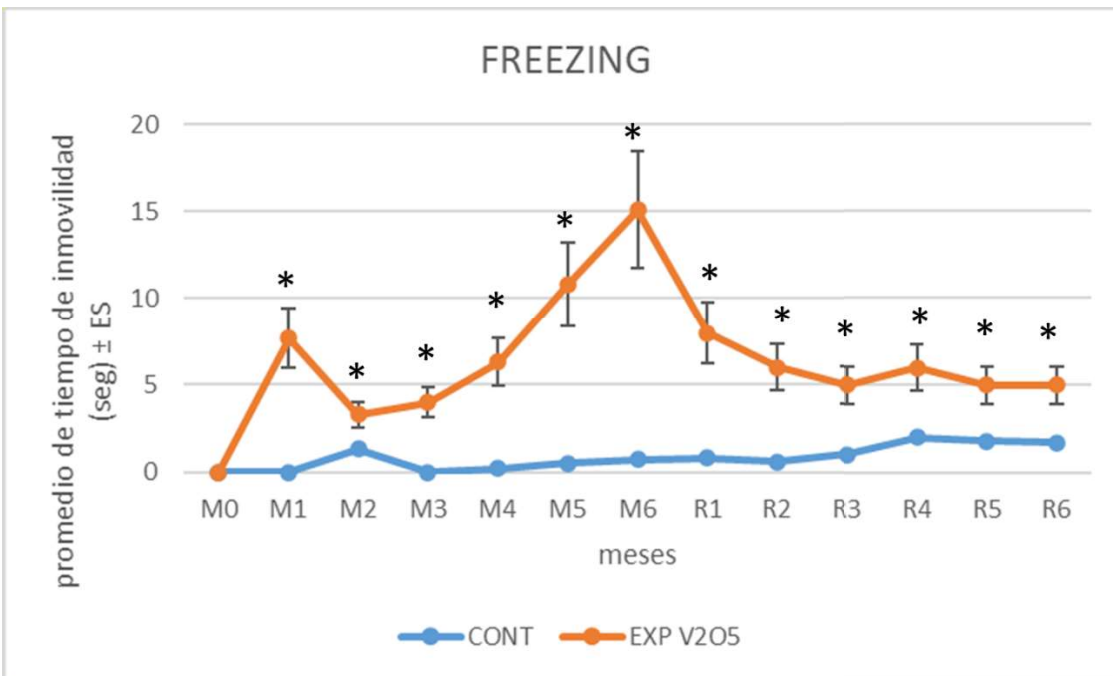


Figura 34. **Resultados de freezing en la prueba de campo abierto**, en el eje de las abscisas se encuentran los meses de exposición a V, seguidos de los meses de recuperación (R). En el eje de las ordenadas está el promedio del tiempo en segundos que las ratas expresaron freezing  $\pm$  SE. (\* =  $p < 0.05$ )  $n=10$ .

## 7.2 ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

A continuación, se presentan los resultados con la tinción de rojo Congo (placas extracelulares, vasos y neuronas piramidales), la impregnación de Bielschowsky (neuronas piramidales) y técnica de Golgi (espinas dendríticas) de: hipocampo, subíulum, corteza entorrinal, amígdala y corteza frontal (figs. 35-50).

### HIPOCAMPO

Los resultados de la cuantificación de placas  $\beta$ A en el hipocampo no mostraron placas en los animales control, por lo contrario, tras seis meses de exposición a  $V_2O_5$  (72 sesiones) se observó aumento significativo en el número de  $\beta$ A (d $\beta$ A y Dc $\beta$ A) ANOVA  $F = (3, 27) = 2.657$   $p < 0.05$  (figs. 35-1 y 35-P), después del periodo de recuperación el número de d $\beta$ A y de Dc $\beta$ A, aumenta (figs. 35-1 y 35-P). En la cuantificación de CAA ANOVA  $F = (2, 27) = 12.55$   $p = 0.0001$  (fig. 35-2) se encontraron niveles bajos en el grupo control, este valor aumenta más de tres veces después de la exposición ( $V_2O_5$ ), estos niveles disminuyen tras el periodo de recuperación, pero no alcanzan los niveles del grupo control (fig. 35-2). Los resultados cualitativos (fig. 35 P, C, V y R) muestran acumulación de placas  $\beta$ A (fig. 36) y daño en la membrana basal y en la túnica media de la vasculatura en el hipocampo de los animales expuestos (35 V y R).



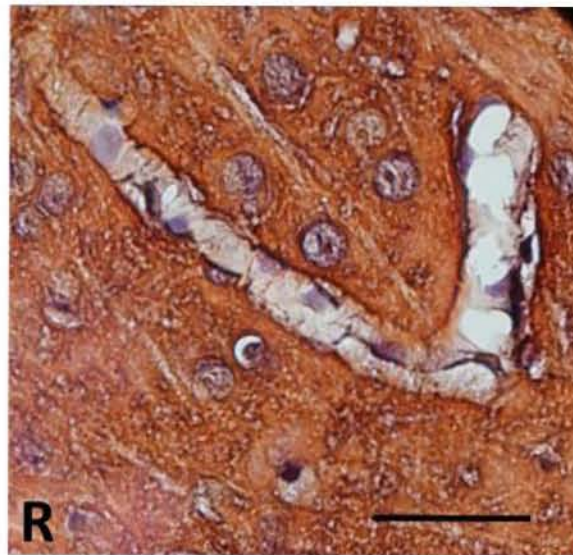
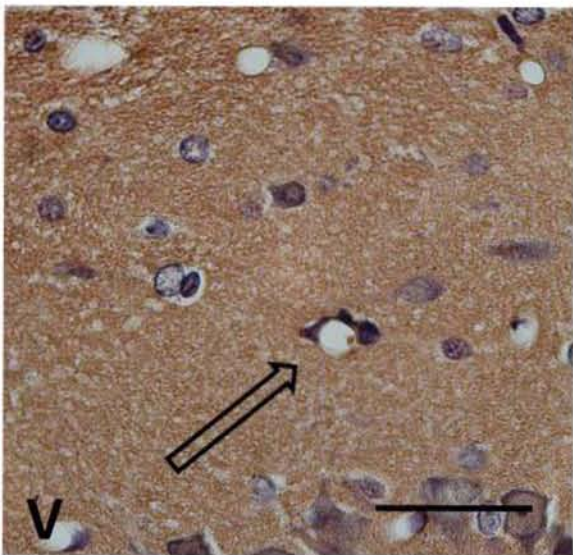
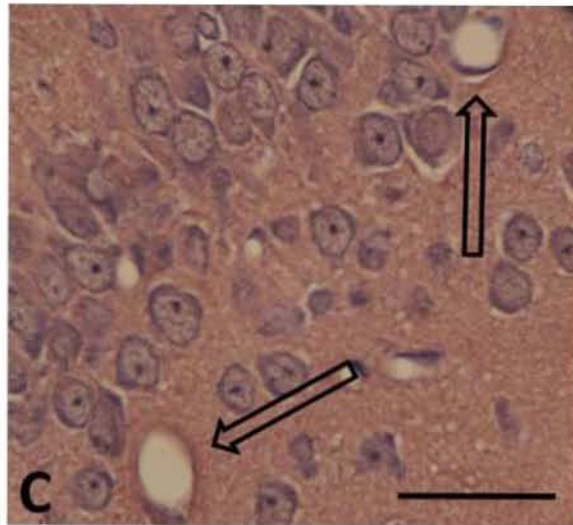
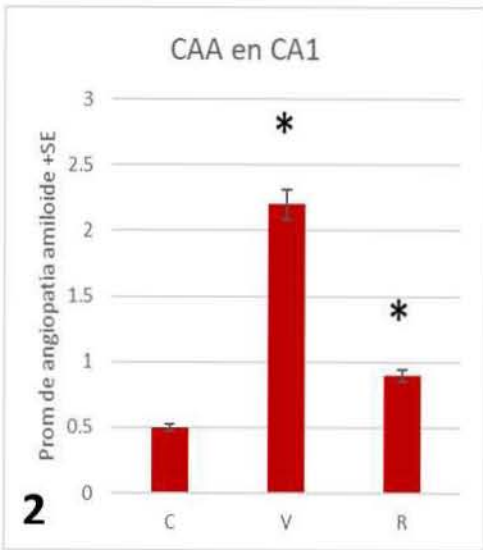
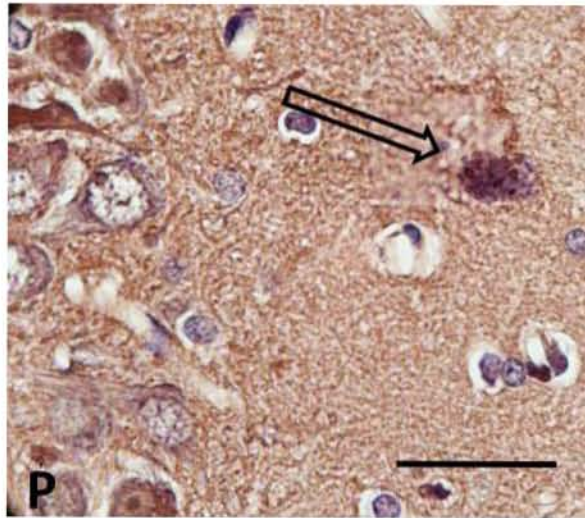
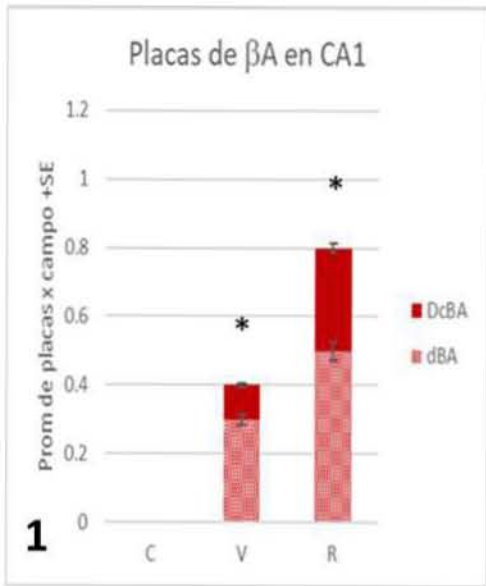


Figura 35. 1 gráfica con los resultados de  $\beta$ A en CA1; en el eje de las abscisas se encuentran: el grupo control (C), el grupo expuesto a  $V_2O_5$  (V) y el grupo de recuperación (R) y en el eje de las ordenadas el promedio por campo de las placas amiloide difusas (d $\beta$ A) y las placas amiloideas de núcleo denso (Dc $\beta$ A). **P** muestra una fotomicrografía representativa, la flecha señala una placa  $\beta$ A en hipocampo de animales expuestos a  $V_2O_5$  durante 6 meses. **2** gráfica que muestra la cuantificación de la angiopatía amiloide en el hipocampo de animales control, expuestos durante 6 meses a  $V_2O_5$  y después de 6 meses de recuperación, en el eje de las abscisas se muestra el promedio de angiopatía amiloide por campo. Fotomicrografías representativas de la angiopatía amiloide en el hipocampo de animales control **C** donde se muestra la estructura de los vasos del hipocampo, las flechas señalan capilares sin alteraciones, en **V** la flecha señala un capilar rodeado por células congofílicas (probablemente pericitos), y en **R** se muestra daño en la membrana basal y en la túnica del capilar. En gráficas (\*= $p < 0.05$ ). En las fotomicrografías se evidencian estructuras por la tinción de rojo Congo, barra= $30\mu\text{m}$  magnificación 100x.

La cuantificación de las neuronas piramidales de CA1 teñidas con rojo Congo, muestra que disminuyó el número de las neuronas sin alteraciones (nD); el 79% de las neuronas en el grupo expuesto (V) y el 18% de las del grupo de recuperación (R) no presentaron alteraciones (nD), mientras que en el grupo control no se observaron cambios en las neuronas piramidales. El daño parcial (pD) observado con esta técnica pasó de 0 en el grupo **C** a 5.3% en el grupo **V** y 9.7% en el grupo **R**, y el daño generalizado (gD) pasó de 0 en **C**, a 3.2% y 5.7% en **V** y **R**, respectivamente ANOVA  $F = (8, 81) = 320.0$   $p < 0.0001$  (fig. 36). Los resultados cualitativos en CA1 de animales control (fig. 36 C), muestran neuronas piramidales características con nucleolo central, núcleo redondo homogéneamente teñido, citoplasma alrededor del núcleo con una relación núcleo-citoplasma conservada. Las neuronas de los animales expuestos (V), presentan algunas neuronas con daño que presentan núcleo congofílico y amorfo, pérdida de la relación núcleo-citoplasma y se hace evidente la dendrita apical (fig. 36 V). Las neuronas de animales después del periodo de recuperación presentan mayor congofilia, se observan amorfas, no conservan la relación núcleo- citoplasma, se marca la dendrita apical y hay retracción citoplasmática (fig. 36 R). El promedio del número total de células piramidales de CA1 ( $\bar{X} = nD + pD + gD$ ) muestra una disminución mayor al 43% en el grupo R lo que indica una pérdida significativa de neuronas piramidales en CA1 (fig. 36).

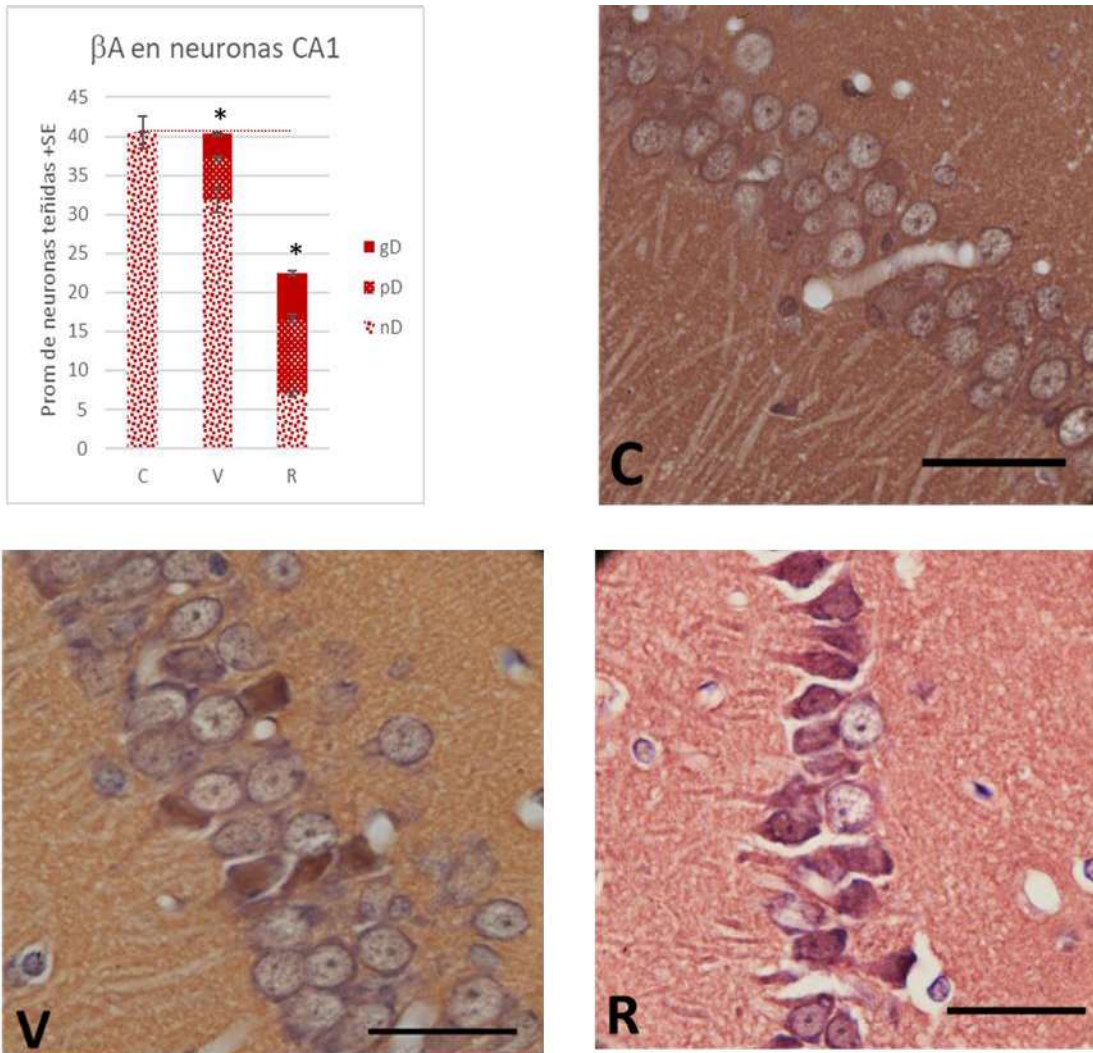


Figura 36. **Resultados de βA en neuronas piramidales de CA1.** En el eje de las abscisas se encuentran: el grupo control (C), el grupo expuesto a V2O5 (V) y el grupo de recuperación (R) y en el eje de las ordenadas la cuantificación del promedio de las neuronas sin daño (nD), las neuronas con daño parcial (pD) y las neuronas con daño generalizado (gD). La línea roja representa el promedio de neuronas piramidales en C. (\*= $P < 0.05$ ). **Fotomicrografías representativas del daño en neuronas piramidales de CA1** a 100X con la tinción de rojo Congo. En C (control), se muestran neuronas piramidales de CA1 de morfología característica (neuronas piramidales CA1 sin daño), la flecha en V (expuestas a vanadio) muestran algunas neuronas con daño generalizado en las que se pierde la delimitación del núcleo y el soma se ve como una mancha congofílica de forma irregular, en R (recuperación) se muestran neuronas con daño generalizado en las que se pierde la relación núcleo-citoplasma, se nota retracción del citoplasma y se tiñe la dendrita apical, barra=30μm.

Los resultados mostrados de la implementación de la impregnación argéntica de Bielschowsky en CA1 (figs. 37 1, C, V, R) muestran marcada disminución en el promedio de las neuronas piramidales sanas (sin marañas neurofibrilares acumuladas, identificadas como preNFT) = 35.6 en C, a 3.1 en el grupo expuesto (V) y 2.2 en el grupo dejado en recuperación después de la exposición (R), ANOVA  $F_{(8,81)}=992.2$   $p < 0.0001$  las neuronas que presentan marañas neurofibrilares internas o externas y con daño (iNFT + eNFT) pasaron de 0 en el grupo C, a 30.1 en el grupo V, y a 31.7 en R (fig. 37). Los resultados cualitativos en CA1 de animales control (fig. 37 C), muestran neuronas piramidales características (preNFT) con nucleolo central fuertemente impregnado y bien definido, núcleo redondo argentofílico, y citoplasma alrededor del núcleo poco impregnado. Las neuronas de los animales expuestos (V) presentan abundantes neuronas con daño, evidenciado por el núcleo y el citoplasma argentofílicos, la dendrita apical se marca por la impregnación del citoesqueleto (iNFT) que la conforma (fig. 37 V). Después del periodo de recuperación las neuronas se observan más impregnadas y amorfas y hay retracción del citoplasma (eNFT) (fig. 37 R).



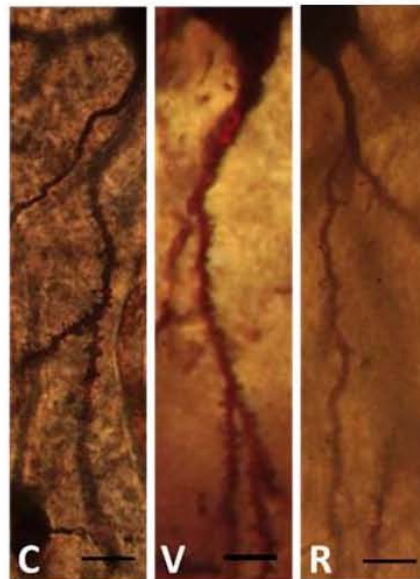
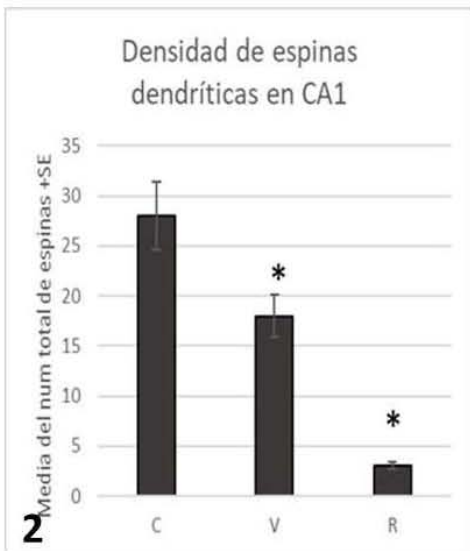
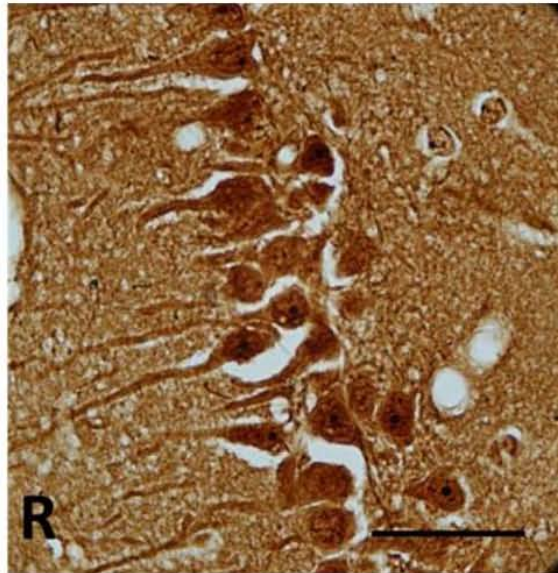
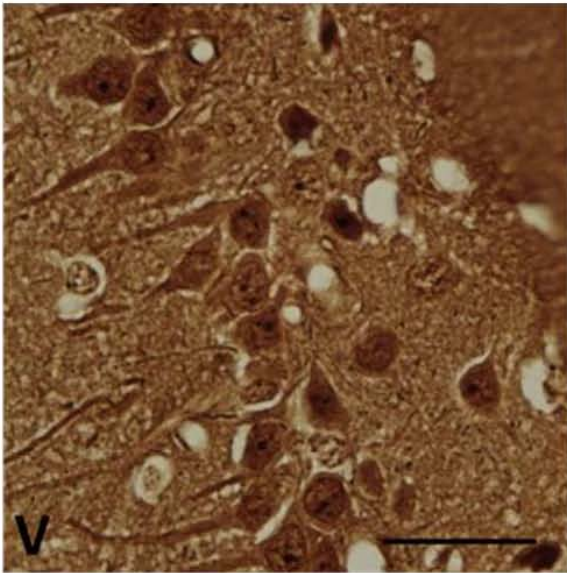
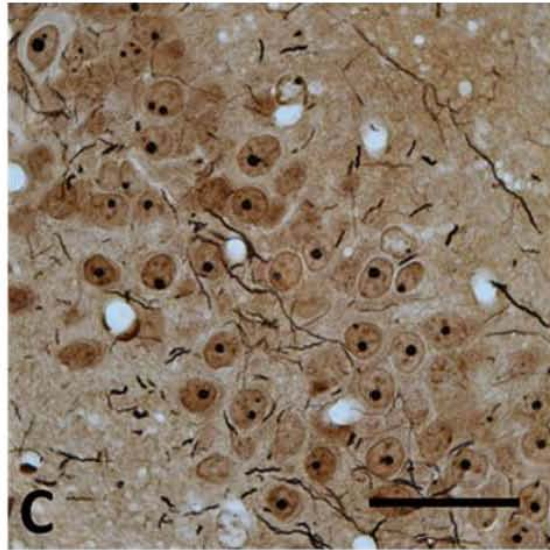
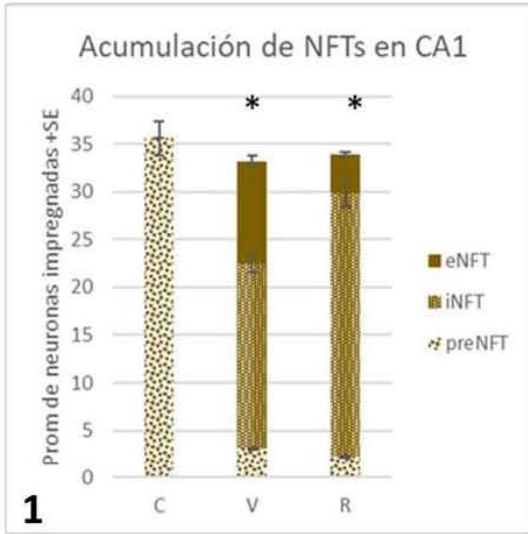


Figura 37. **1 gráfica que muestra la acumulación de NFTs** en neuronas piramidales de CA1 en las abscisas control, vanadio y recuperación y en el eje de las ordenadas el promedio de las neuronas sin daño (preNFT), las neuronas con marañas neurofibrilares internas (iNFT) y las neuronas con marañas neurofibrilares internas y externas (eNFT), (\*=P<0.05). **Fotomicrografías representativas del daño en el citoesqueleto de neuronas piramidales en CA1** con la impregnación argéntica de Bielschowsky, en **C** (control) se observan neuronas sin daño con núcleo redondo y nucleolo pericéntrico más impregnado, en **V** (expuestas a vanadio) se muestran neuronas con mayor impregnación en el núcleo y en la dendrita apical, en **R** (recuperación) se muestran neuronas argentofílicas, con la característica forma de flama descrita por Alzheimer. Barra=30µm. **2 densidad de espinas en dendritas secundarias** de neuronas piramidales en CA1, (\*=P<0.05). En la parte inferior derecha fotomicrografías representativas de espinas en una dendrita secundaria en una neurona de un animal del grupo control (C en blanco) y en una del grupo expuesto (V) y del grupo de recuperación (R). Tinción de Golgi. Barra =5µm

Al cuantificar la densidad de espinas dendríticas en las neuronas piramidales de CA1 se observó disminución importante en los animales expuestos a V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> durante seis meses, densidad que se redujo más tras el periodo de recuperación (fig. 37-2) ANOVA p<.05. Los resultados cualitativos muestran disminución en la densidad de espinas en el grupo expuesto y en el grupo recuperación al compararlas con el grupo Control (fig.37).

## SUBICULUM

En el grupo control no se identificaron placas βA en subiculum, mientras que en el grupo expuesto y en el de recuperación se observó aumento significativo en el número de dβA y DcβA (fig. 38-1) ANOVA p<.05. En la cuantificación de CAA se encontraron niveles bajos en el grupo control, este valor aumenta significativamente después de la exposición y disminuye tras el periodo de recuperación, pero no alcanzan los niveles del grupo control (fig. 38-2) ANOVA p<.05. El análisis cualitativo muestra dβA y cambios en el endotelio capilar (figs. 38 A y B).

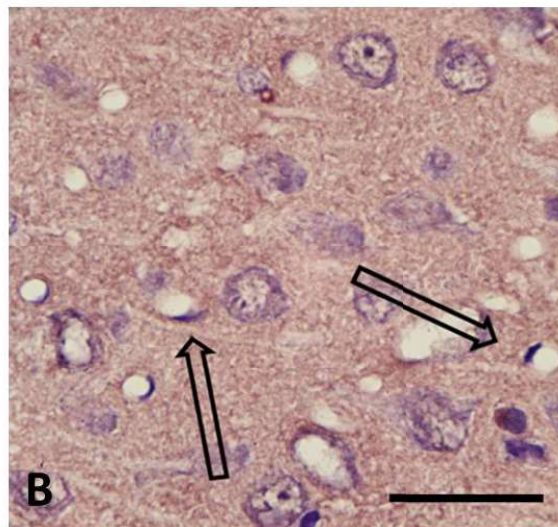
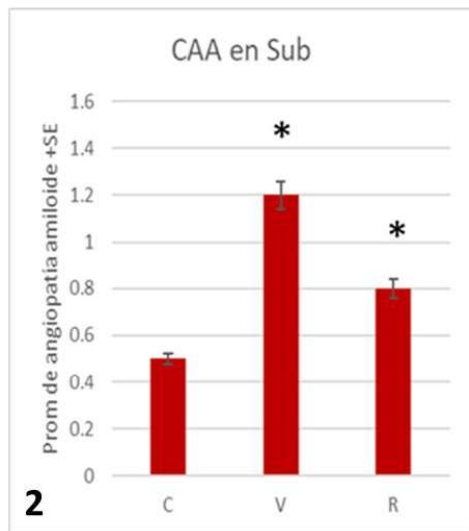
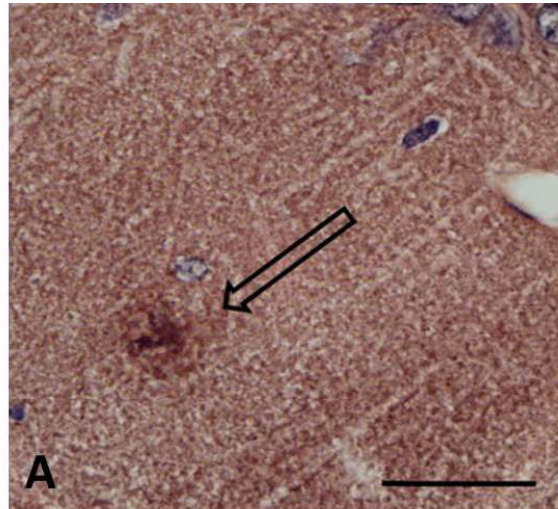
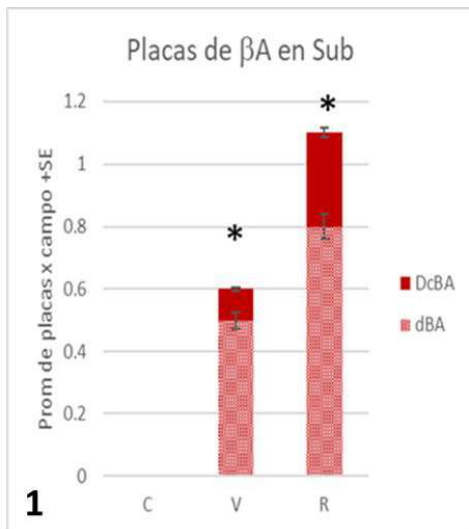


Figura 38.1 resultados de  $\beta A$  en el subiculum, control, vanadio y recuperación en las abscisas y promedio de placas por campo en las ordenadas, placas amiloide difusas (d $\beta A$ ) y placas amiloideas de núcleo denso (Dc $\beta A$ ). (\*= $p < 0.05$ ). A fotomicrografía del subiculum de animales expuestos a  $V_2O_5$  la flecha señala una d $\beta A$ . Barra=30  $\mu m$ . 2 resultados de la angiopatía amiloide en el subiculum de animales control (C), expuestos durante 6 meses (V) y después de 6 meses en recuperación. (\*= $p < 0.05$ ). B fotomicrografía representativa del subiculum en una rata expuesta a  $V_2O_5$ , las flechas señalan células endoteliales congófilicas. Barra=30  $\mu m$ .

Los resultados de la cuantificación de las neuronas piramidales en el subiculum teñidas con rojo Congo muestran que hubo disminución en las neuronas nD con el consecuente aumento en las neuronas pD y gD tras la exposición a  $V_2O_5$ , pero estas alteraciones fueron mucho mayores tras el periodo de recuperación (fig. 39)  $F_{(5,45)}=596.0$   $p < 0.0001$ . Los resultados cualitativos en el subiculum de animales control (fig. 39 C), muestran neuronas piramidales sin daño con núcleo redondo homogéneamente teñido, citoplasma alrededor del núcleo con una relación núcleo-citoplasma conservada. Las neuronas de los animales expuestos (V), presentan algunas neuronas con estructuras perinucleares o citoplasmáticas (fig. 39 V). Las neuronas de los animales después del periodo de recuperación presentan pérdida de la compartimentalización nuclear y citoplasmática (fig. 39 R).



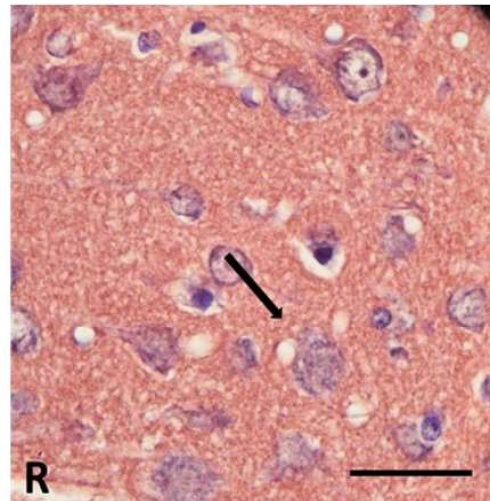
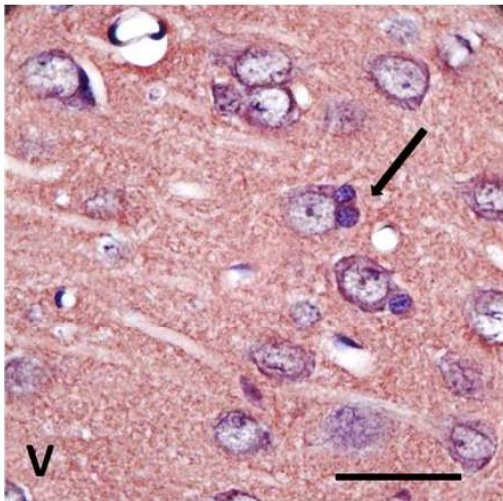
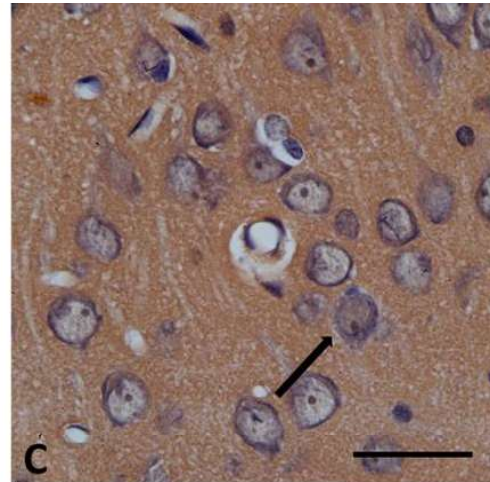
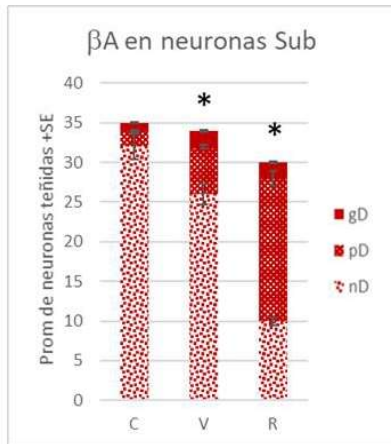


Figura-39. **Resultados de  $\beta$ A en neuronas piramidales del subículo.** En el eje de las abscisas se encuentran: el grupo control (C), el grupo expuesto a  $V_2O_5$  (V) y el grupo de recuperación (R) y en el eje de las ordenadas la cuantificación del promedio de las neuronas sin daño (nD) las neuronas con daño parcial (pD) y las neuronas con daño generalizado (gD). (\*= $P < 0.05$ ). **Fotomicrografías representativas del daño en neuronas piramidales del subículo a 100X con la tinción de rojo Congo.** En C, la flecha señala una neurona piramidal del subículo sin alteraciones, la flecha en V representa una neurona con daño parcial y estructuras perinucleares, la flecha en R señala una neurona con daño generalizado, y pérdida de compartimentalización (estructuras y compartimentos especializados dentro de la célula), barra= $30\mu m$ .

Los resultados obtenidos con la impregnación argéntica de Bielschowsky en el subículo muestran disminución de las neuronas sanas en el grupo de ratas expuesto a  $V_2O_5$ , esta pérdida de neuronas sanas es mayor en el grupo de recuperación, las neuronas con daño (iNFT y eNFT) aumentan en el grupo expuesto y más en el grupo R (fig. 40 1) ANOVA  $F_{(5,45)}=1068$   $p < 0.0001$ . Los resultados cualitativos en el subículo de animales control (fig. 40 C) muestran neuronas piramidales con nucleolo central, núcleo redondo argentofílico y citoplasma en forma de gota. Las neuronas de los animales expuestos (V) presentan daño, evidenciado por la pérdida de la compartimentalización y una larga dendrita apical argentofílica (fig. 40 V). Después del periodo de recuperación las neuronas se observan totalmente amorfas y presentan retracción citoplasmática (fig. 40 R). Al cuantificar la densidad de espinas dendríticas en las neuronas piramidales del subículo se observó disminución en los animales expuestos a  $V_2O_5$  durante seis meses y en el grupo de recuperación (fig. 40 2) ANOVA  $p < .05$ . Los resultados cualitativos muestran disminución en la densidad de espinas en el grupo expuesto a  $V_2O_5$  (figs. 40 C y 40 V).

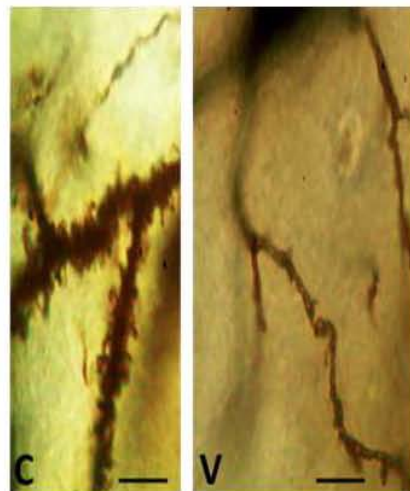
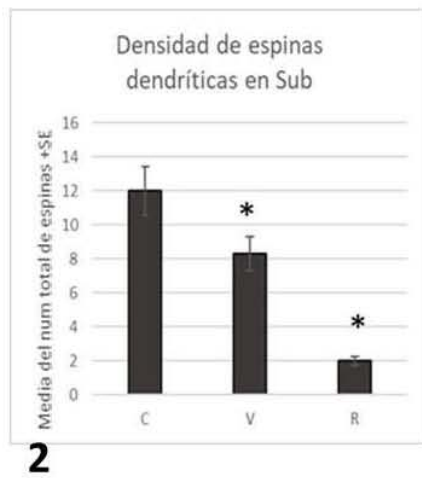
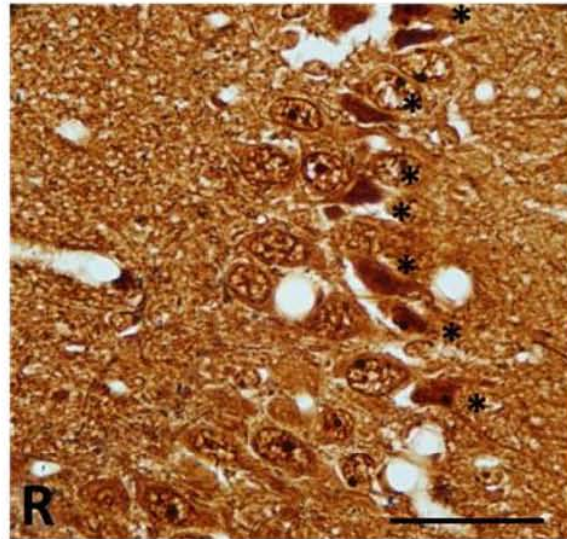
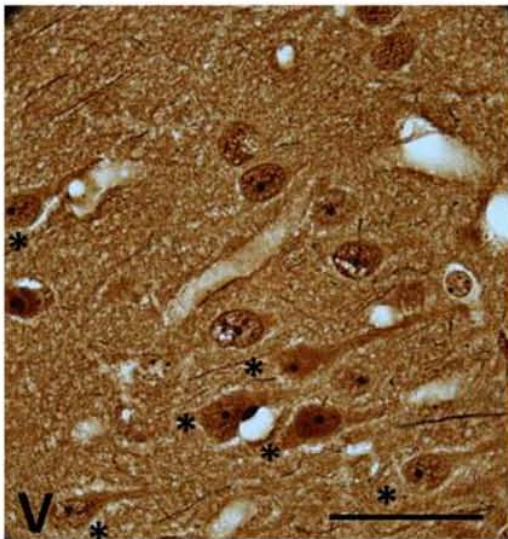
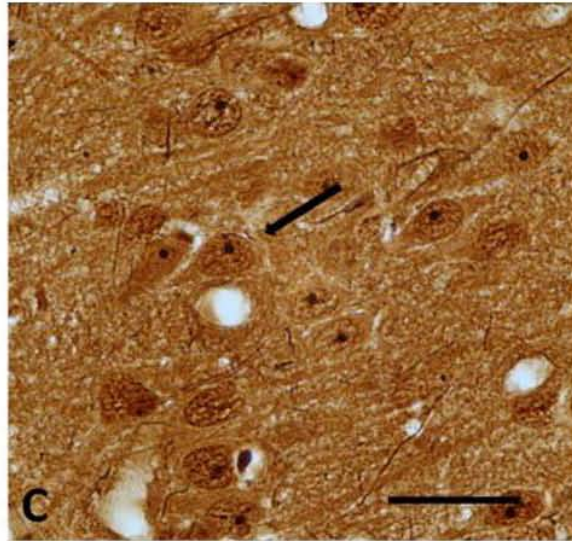
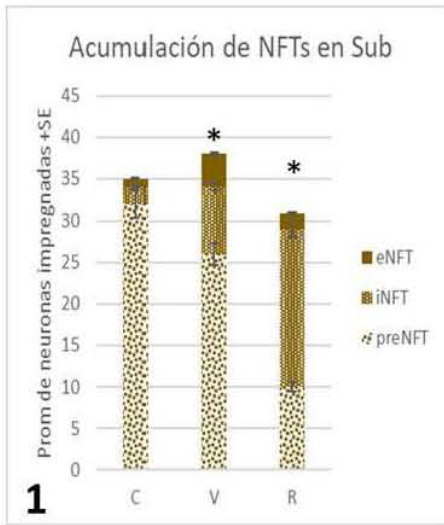




Figura 40. 1 **Gráfica que muestra la acumulación de NFTs** en neuronas piramidales del subículo. En el eje de las abscisas se encuentran: el grupo control (C), el grupo expuesto a  $V_2O_5$  (V) y el grupo de recuperación (R) y en el eje de las ordenadas la cuantificación del promedio de las neuronas sin daño (eNFT), con marañas neurofibrilares internas (iNFT) y con marañas neurofibrilares internas y externas (eNFT), (\*= $P<0.05$ ). **Fotomicrografías representativas del daño en el citoesqueleto de neuronas piramidales en el subículo** con la impregnación argéntica de Bielschowsky, la flecha en C (control) señala una neurona piramidal característica sin daño, los asteriscos en V indican neuronas con una larga dendrita apical y daño evidente, los asteriscos en R señalan una neurona con alteraciones morfológicas generalizadas (barra= $30\mu m$ ). 2 **Muestra la densidad de espinas en las dendritas secundarias** de neuronas piramidales del subículo, (\*= $P<0.05$ ). **Fotomicrografías representativas de espinas en una dendrita secundaria** en una neurona de un animal del grupo control (C) y en una del grupo expuesto (V). Técnica de Golgi. Barra = $5\mu m$

## CORTEZA ENTORRINAL

Los resultados cuantitativos de placas  $\beta A$  en la corteza entorrinal muestran un promedio de 0.1 placas por campo en C, aumento significativo en el número de  $d\beta A$  (1.2) y  $Dc\beta A$  (0.4) en V y  $d\beta A$  (0.6) y  $Dc\beta A$  (0.3) en R (fig. 41 1) ANOVA  $p<.05$ . En la cuantificación de CAA se encontraron niveles bajos en el grupo control, este valor aumenta significativamente después de la exposición a  $V_2O_5$  y disminuye tras el periodo de recuperación a valores cercanos a los del grupo control (fig. 41 2) ANOVA  $p<.05$ . El análisis cualitativo muestra  $d\beta A$  y cambios en el endotelio capilar (figs. 41 A y B).

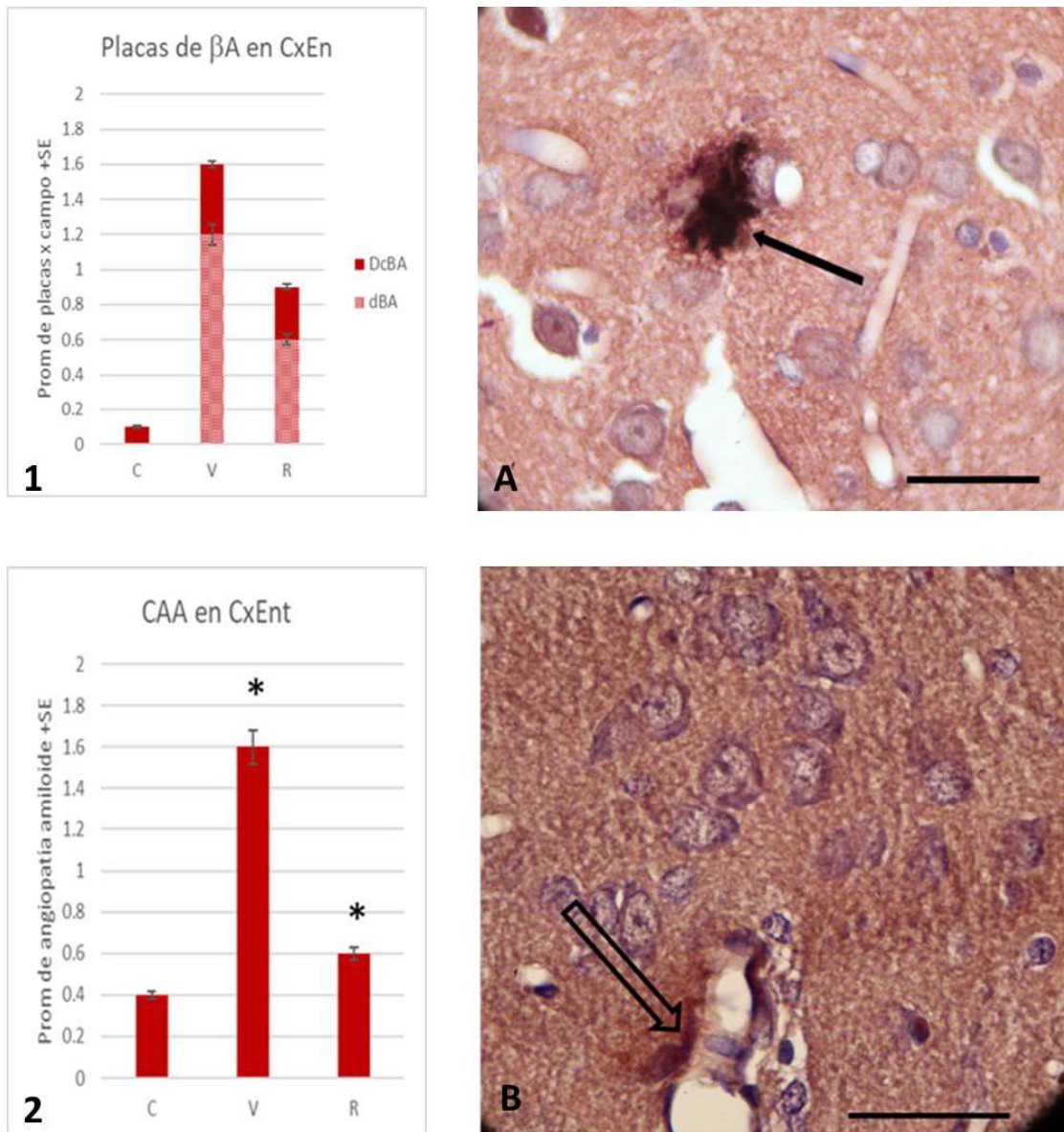


Figura 41.1 **Resultados de  $\beta$ A en la corteza entorrinal** en animales control (C), expuestos a V, y dejados en recuperación (R), en las ordenadas; las placas amiloides difusas (d $\beta$ A) y la parte sólida placas amiloides de núcleo denso (Dc $\beta$ A). (\*= $p < 0.05$ ). **A Fotomicrografía representativa de placas en la corteza entorrinal** con la tinción de rojo Congo a 100x, la flecha señala una placa d $\beta$ A en animales expuestos a V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, barra=30 $\mu$ m. **2 Resultados de angiopatía amiloide en la corteza entorrinal** en animales control (C), expuestos durante 6 meses (V) y después de 6 meses en recuperación. (\*= $p < 0.05$ ). **B CAA en corteza entorrinal.** Fotomicrografía representativa de corteza entorrinal en una rata expuesta a V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, la flecha señala células endoteliales congofilicas. Barra=30 $\mu$ m.

Los resultados de la cuantificación de las neuronas piramidales en la corteza entorrinal teñidas con rojo Congo, muestran que hubo disminución de al menos la mitad de las neuronas nD tras la exposición a V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, disminución que se mantuvo durante el tiempo de recuperación; los resultados muestran aumento significativo de las neuronas que mostraron daño parcial (pD) o generalizado (gD) tras la exposición a V, daño que aumentó tras el periodo de recuperación (fig. 42)  $F_{(5,45)}=670$   $p < 0.0001$ . Los resultados cualitativos de la corteza entorrinal de animales control (fig. 42 C), muestran neuronas piramidales características con núcleo redondo homogéneamente teñido, citoplasma alrededor del núcleo con una relación núcleo-citoplasma conservada. Las neuronas de los animales

expuestos presentan alteración de la relación núcleo-citoplasma e hiperpigmentación alrededor del núcleo (fig. 42 V), las neuronas de los animales, después del periodo de recuperación presentan alteración de la relación núcleo-citoplasma y retracción citoplasmática (fig. 42 R).

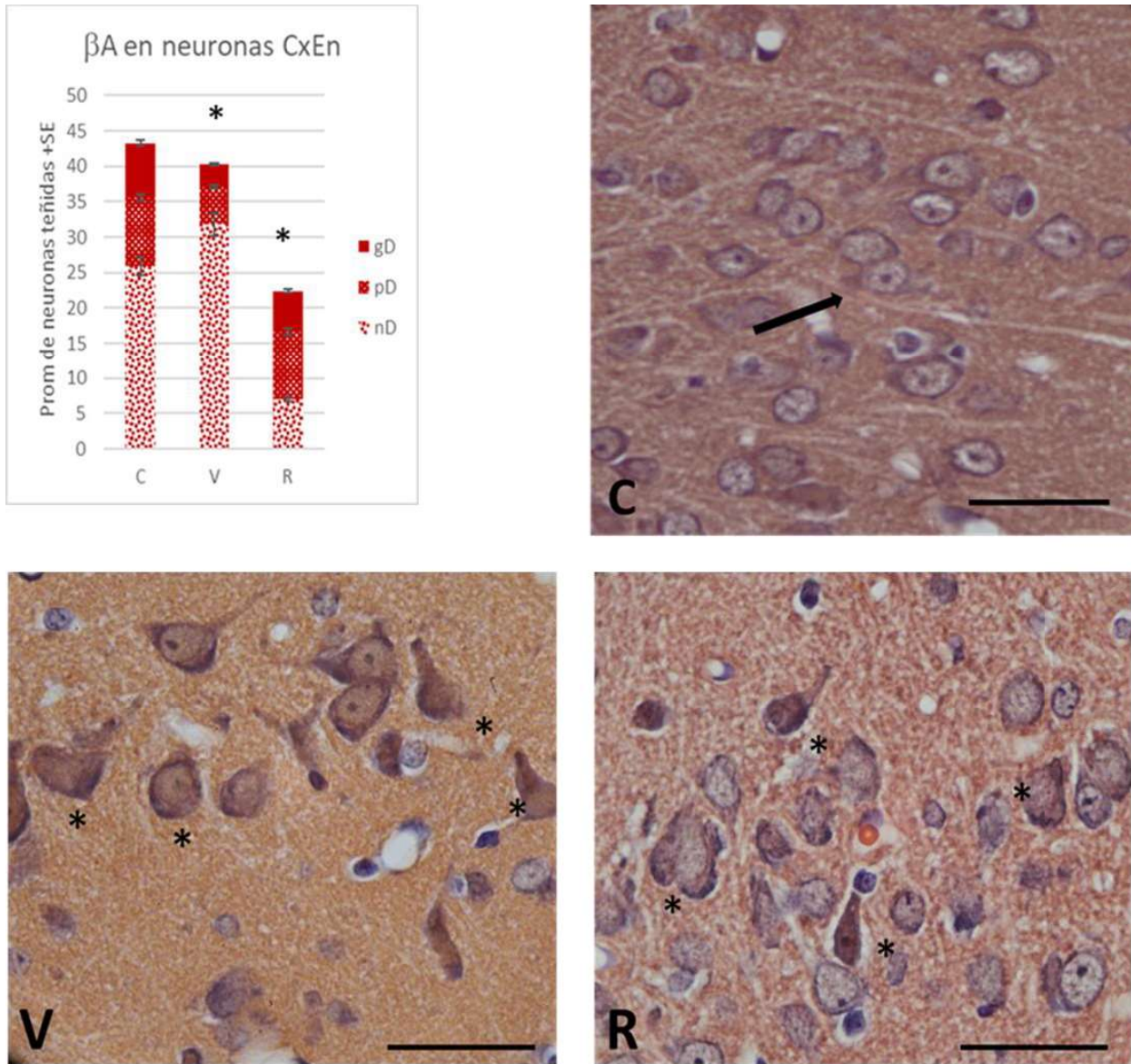


Figura 42. **Resultados de βA en neuronas piramidales** de la corteza entorrinal. En el eje de las ordenadas las neuronas sin daño (nD) neuronas con daño parcial (pD) y neuronas con daño generalizado (gD). (\*=P<0.05). **Fotomicrografías representativas del daño de las neuronas piramidales de la corteza entorrinal** a 100X con la tinción de rojo Congo. En C, la flecha señala una neurona piramidal característica, los asteriscos en V representan neuronas con daño parcial y citoplasma congófilico, los asteriscos en R señalan neuronas con daño generalizado, barra=30 μm.

En la corteza entorrinal, los resultados mostrados con la impregnación argéntica de Bielschowsky, muestran aumento significativo en el número de neuronas dañadas (iNFT + eNFT) en V y R (fig. 43 1)  $F_{(5,45)}=1122$  p <0.0001. Los resultados cualitativos en el grupo control en la corteza entorrinal (fig. 43 C), muestran neuronas piramidales con nucleolo central redondo, y relación núcleo-citoplasma conservada. Las neuronas de los animales expuestos (fig. 43 V), presentan neuronas con daño evidenciado por una fuerte impregnación que marca parte

del citoesqueleto incluyendo la dendrita apical. Después del periodo de recuperación varias neuronas se observan amorfas, con una larga dendrita apical y retracción citoplasmática (fig. 43 R). En la corteza entorrinal, al cuantificar la densidad de espinas dendríticas en las neuronas piramidales se observó disminución en los animales expuestos a  $V_2O_5$  durante seis meses y no aumentó la densidad de espinas en el grupo dejado en recuperación (fig. 43 2) ANOVA. Los resultados cualitativos muestran disminución en la densidad de espinas en el grupo expuesto a  $V_2O_5$  y en el grupo de recuperación al compararlos con el grupo Control (fig.43C, 43V y 43R).



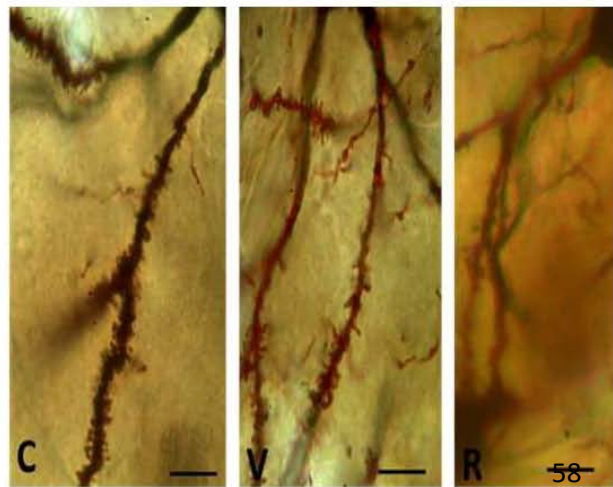
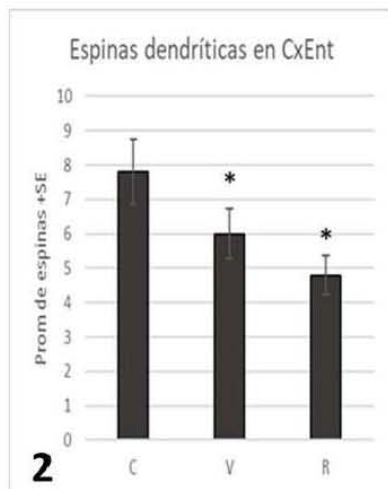
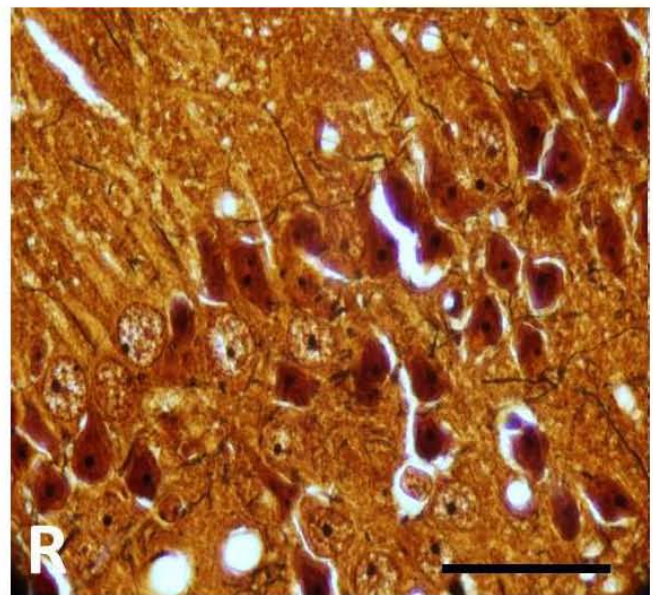
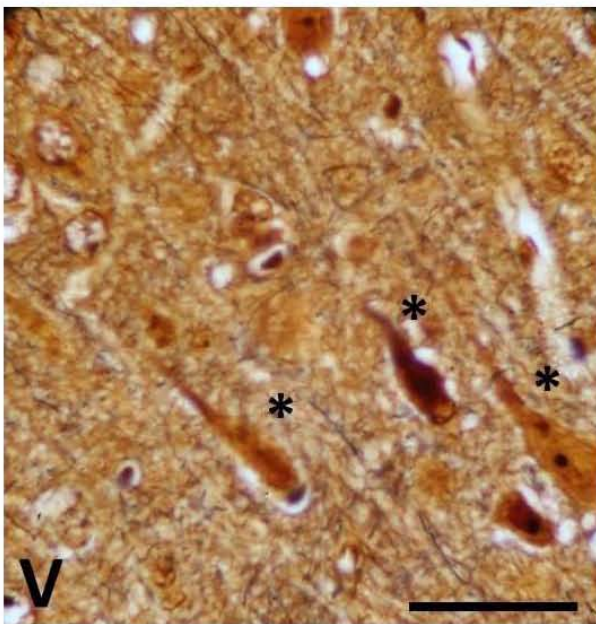
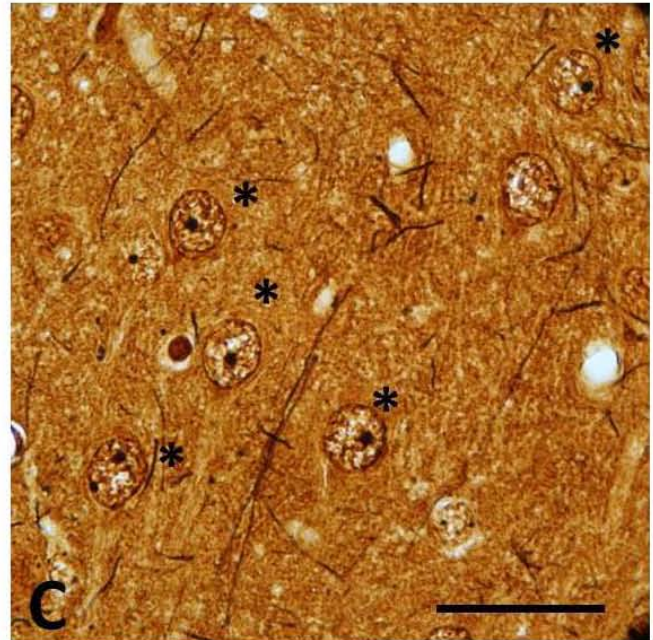
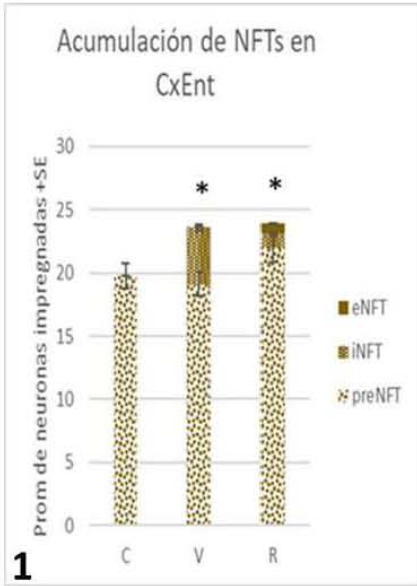


Figura 43 1 **Acumulación de NFTs en neuronas piramidales de la corteza entorrinal** En el eje de las abscisas se encuentran: el grupo control (C), el grupo expuesto a V2O5 (V) y el grupo de recuperación (R) y en el eje de las ordenadas la cuantificación del promedio de las neuronas sin daño (eNFT), entre las cuales no hay diferencia significativa (al comparar V vs C) las neuronas con maraña neurofibrilares internas (iNFT) y las neuronas con marañas neurofibrilares internas y externas (eNFT), (\*=P<0.05) **Fotomicrografías representativas del daño en citoesqueleto de neuronas piramidales en la corteza entorrinal** con impregnación argéntica de Bielschowsky, los asteriscos en C indican neuronas sin daño, los asteriscos en V indican neuronas altamente argirofílicas, en R neuronas con una larga dendrita apical y retracción del citoplasma, barra=30 μm. 2 **Densidad de espinas en dendritas secundarias** de neuronas piramidales de la corteza entorrinal (\*=P<0.05). **Fotomicrografías representativas de espinas** en una dendrita secundaria en una neurona de un animal del grupo C y grupos V y R. Técnica de Golgi. Barra =5 μm

## AMÍGDALA

Los resultados cuantitativos de placas βA en la amígdala muestran aumento significativo en el número de placas, tanto difusas (dβA) como de núcleo denso (DcβA) por la exposición a V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, este incremento se eleva tras los meses de recuperación (fig. 44 1) ANOVA p<.05. En la cuantificación de CAA se encontraron niveles bajos en el grupo control que aumenta más de tres veces después de la exposición (V) y se mantiene alto tras el periodo de recuperación (fig.44 2) ANOVA p<.05. Al hacer el análisis cualitativo en el parénquima de la amígdala encontramos placas dβA y DcβA en los animales expuestos a V (fig. 44 V) y en el grupo R, en los vasos encontramos capilares con zonas donde el diámetro está disminuido y con acumulación de células congofílicas en la túnica intersticial en el grupo de animales expuestos a V (fig. 44 V) y en el grupo R.



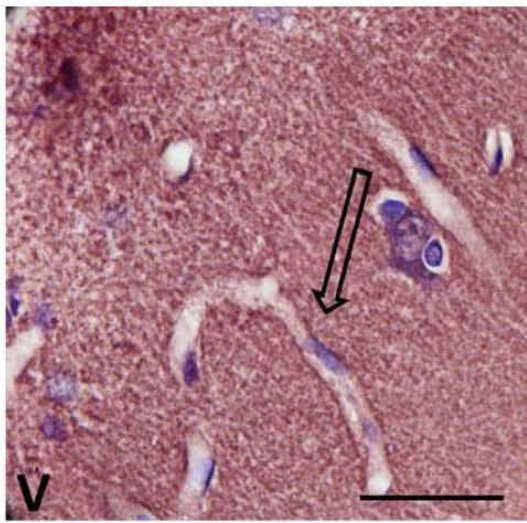
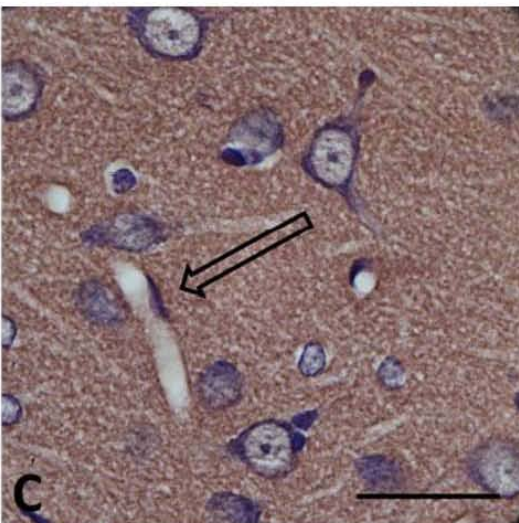
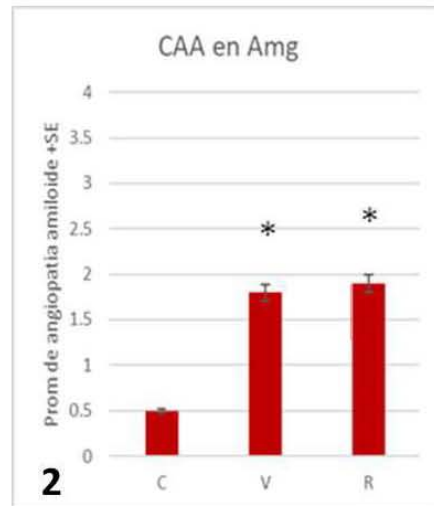
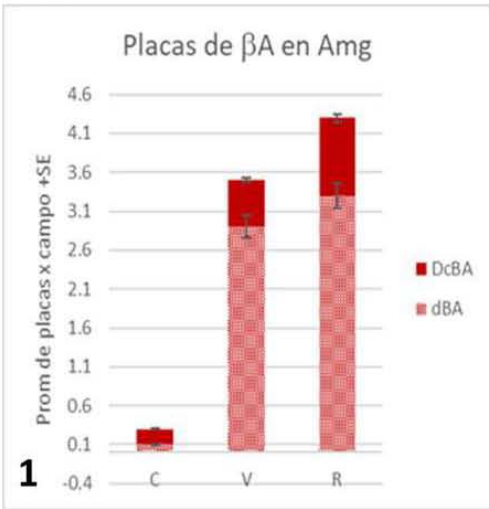
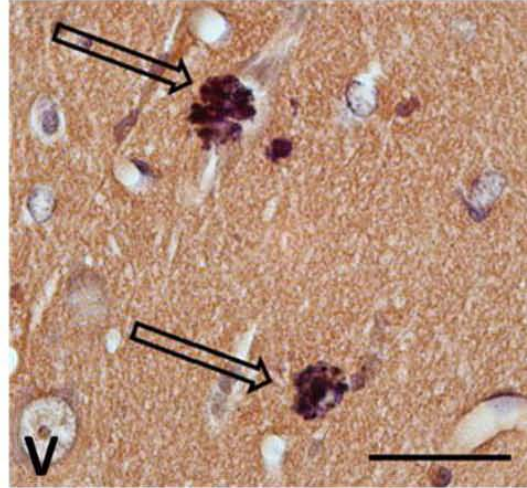
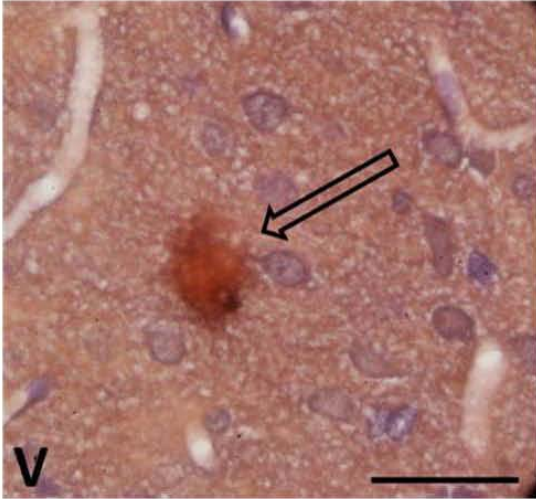


Figura 44. **Fotomicrografías representativas de placas en amígdala** con la tinción de rojo Congo a 100x en ratas expuestas a V, la flecha señala una placa dβA a la izquierda y dos placas nβA a la derecha, barra=30μm. **1 Resultados de placas βA en la amígdala** en las abscisas los animales C, expuestos a V, y dejados en R, en las ordenadas las placas amiloide difusas (dβA) y las placas amiloideas de núcleo denso (DcβA) (\*=p<0.05). **2 Resultados de angiopatía amiloide en la amígdala** de los animales control (C), expuestos durante 6 meses (V) y después de 6 meses en recuperación (R) (\*=p<0.05). Fotomicrografías representativas de CAA en C (control) la flecha indica un capilar característico en V (V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) la flecha señala un capilar con zonas donde el diámetro está disminuido y con acumulación de células congofílicas en la túnica intersticial. Barra=30μm.

En la amígdala los resultados de la cuantificación de las neuronas piramidales con rojo Congo, muestran disminución de las neuronas nD tras la exposición a V y disminución de más del 75% durante el tiempo de recuperación. Los resultados muestran aumento significativo en las neuronas que mostraron daño parcial (pD) o generalizado (gD) tras la exposición a V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, daño que se duplicó tras el periodo de recuperación (fig. 45) ANOVA F= (5, 45) =507.0 p< 0.0001. Los resultados cualitativos en la amígdala de los animales control (fig. 45 C) muestran neuronas piramidales características con núcleo redondo homogéneamente teñido, citoplasma alrededor del núcleo con una relación núcleo-citoplasma conservada. En los animales expuestos las neuronas muestran citoplasma congofílico, descompartimentalización y retracción del citoplasma, (fig. 45 V) en el grupo recuperación (fig. 45 R) se observan neuronas con daño generalizado y con una larga dendrita apical.

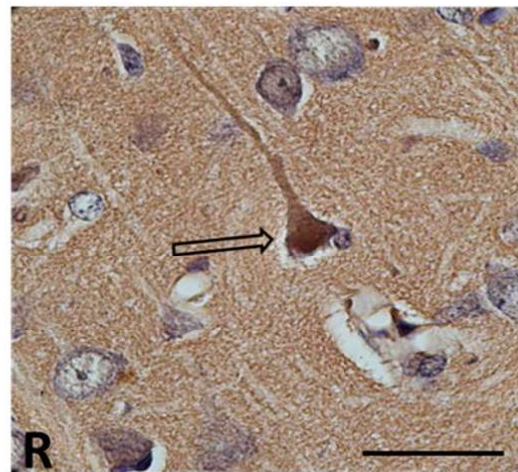
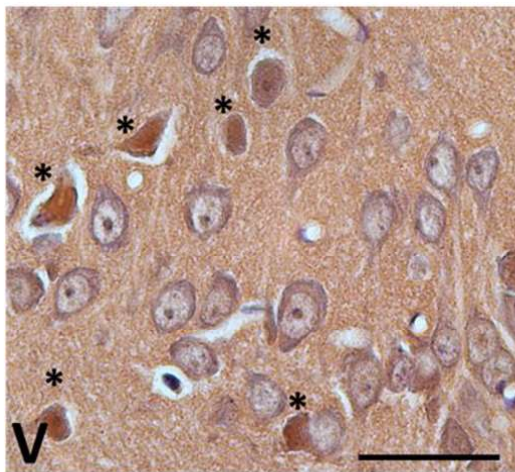
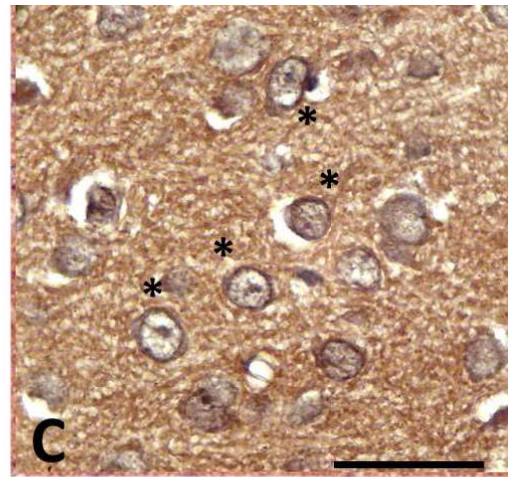
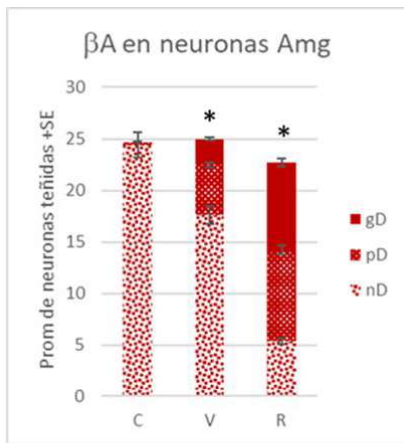




Figura 45. **Resultados de placas  $\beta$ A en neuronas piramidales de la amígdala.** En el eje de las abscisas se encuentran: el grupo control (C), el grupo expuesto a  $V_2O_5$  (V) y el grupo de recuperación (R) y en el eje de las ordenadas la cuantificación del promedio de las neuronas sin daño (nD) las neuronas con daño parcial (pD) y las neuronas con daño generalizado (gD). (\*= $P < 0.05$ ). **Fotomicrografías representativas del daño en las neuronas piramidales de la amígdala** con la tinción de rojo Congo. En C, los asteriscos indican neuronas piramidales característica, los asteriscos en V (expuestas a  $V_2O_5$ ) representa neuronas dañadas que muestran descompartimentalización y retracción del citoplasma, la flecha en R (recuperación) señala una neurona con daño generalizado con una larga dendrita apical, barra= $30\mu m$ .

En la amígdala, con la impregnación argéntica de Bielschowsky las neuronas piramidales muestran disminución de las neuronas sin daño (preNFT) tras la exposición a V y disminución de casi el 40% durante el tiempo de recuperación. Los resultados muestran aumento significativo en las neuronas con acumulación de iNFT y eNFT tras la exposición a  $V_2O_5$  y tras el periodo de recuperación (fig. 46 1) ANOVA  $F_{(5,45)}=1531$   $p < 0.0001$ . El análisis cualitativo de la amígdala de los animales control (fig. 46 C) muestra neuronas piramidales características con nucleolo pericéntrico impregnado, núcleo redondo, citoplasma alrededor del núcleo con una relación núcleo-citoplasma conservada. En los animales expuestos las neuronas muestran neuronas con daño evidenciado por una fuerte impregnación que marca parte del citoesqueleto y retracción del citoplasma (45 V) después del periodo de recuperación se observan neuronas con una larga dendrita apical y retracción citoplasmática (fig. 45 R). Al cuantificar la densidad de espinas dendríticas en las neuronas piramidales de la amígdala se observó disminución en los animales expuestos a  $V_2O_5$  durante seis meses y mayor disminución en la densidad de espinas en el grupo dejado en recuperación (fig. 46 2) ANOVA  $p < 0.05$ . Los resultados cualitativos muestran disminución en la densidad de espinas en el grupo expuesto a  $V_2O_5$  y en el grupo de recuperación al compararlos con el grupo Control (fig.46C, 46V y 46R).

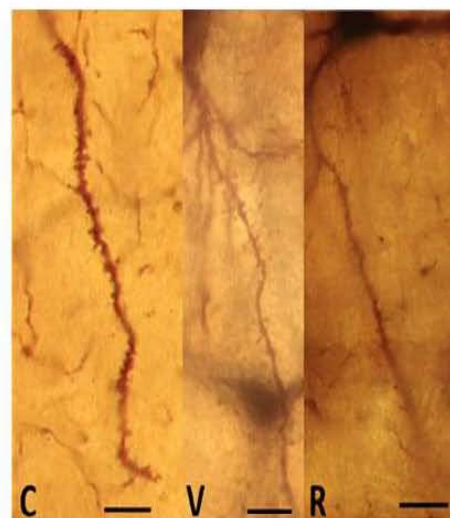
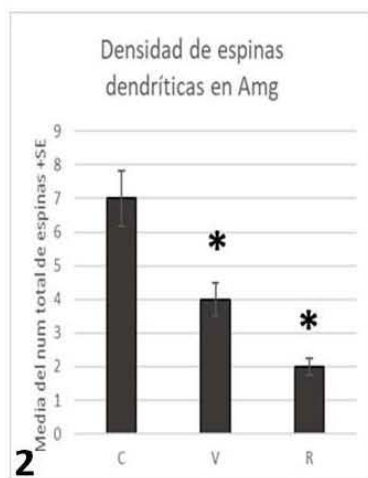
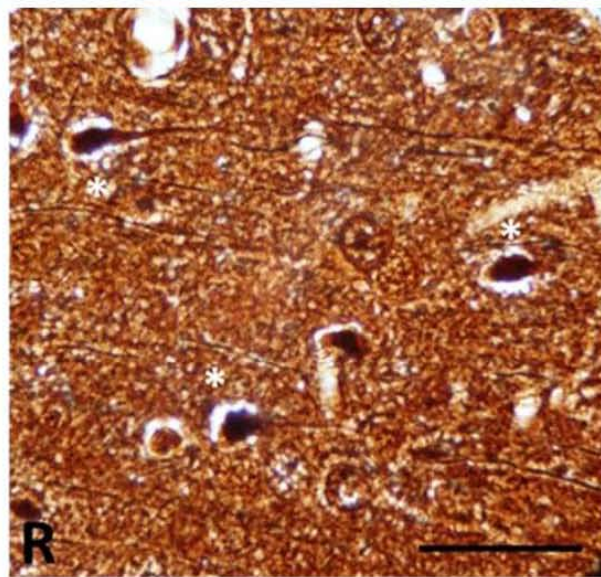
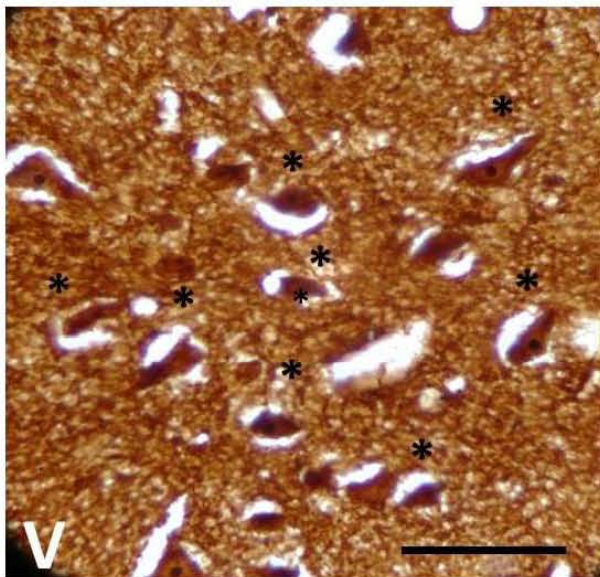
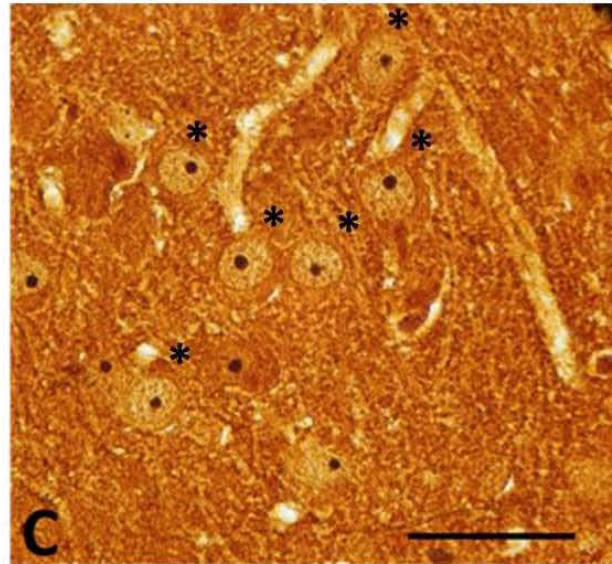
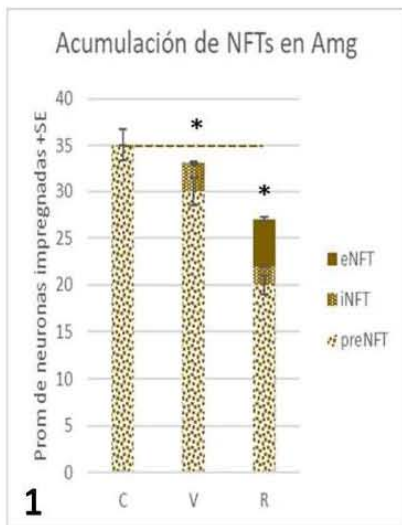


Figura 46. 1 **Acumulación de NFTs en neuronas piramidales de la amígdala.** En el eje de las abscisas se encuentran: el grupo control (C), el grupo expuesto a  $V_2O_5$  (V) y el grupo de recuperación (R) y en el eje de las ordenadas la cuantificación del promedio las neuronas sin daño (preNFT) las neuronas con maraña neurofibrilares internas (iNFT) y las neuronas con marañas neurofibrilares internas y externas (eNFT), la línea punteada indica el promedio de neuronas piramidales cuantificadas en el grupo control (\*= $P<0.05$ ). **Fotomicrografías representativas del daño en citoesqueleto de neuronas piramidales** en la amígdala con impregnación argéntica de Bielschowsky, en C los asteriscos indican neuronas sin daño, los asteriscos en V indican neuronas daño evidenciado por una fuerte impregnación y retracción del citoplasma, en R los asteriscos indican neuronas con una larga dendrita apical y retracción citoplasmática, barra= $30\mu m$ . 2 **Densidad de espinas en dendritas secundarias** de neuronas piramidales de la amígdala (\*= $P<0.05$ ). **Fotomicrografías representativas de espinas** en una dendrita secundaria en una neurona de amígdala de un animal del grupo C y grupos V y R. Técnica de Golgi. Barra = $5\mu m$

## CORTEZA FRONTAL

En la corteza frontal las placas  $\beta A$  aumentan de un promedio de 0.2 placas por campo en el grupo control, a 2.4  $d\beta A$  y  $Dc\beta A$  por campo en el grupo expuesto a V, este proceso de formación de placas sigue aún después de detenerse la exposición a  $V_2O_5$  a 3.3 (fig. 47 1) ANOVA  $p<.05$ . En el parénquima de la corteza frontal se observan placas amiloide difusas  $d\beta A$  (fig. 47 V) y placas amiloides de núcleo denso  $Dc\beta A$  (fig. 47 R). En la cuantificación de CAA se encontraron niveles bajos en el grupo control, este valor aumenta significativamente después de la exposición a  $V_2O_5$ , este incremento se duplica tras el periodo de recuperación (fig. 47 2) ANOVA  $p<.05$ . Al analizar los vasos de esta región cerebral, encontramos capilares con zonas donde el diámetro está disminuido y con acumulación de células congófilicas en la túnica intersticial en el grupo de animales expuestos a V (fig. 47 V).



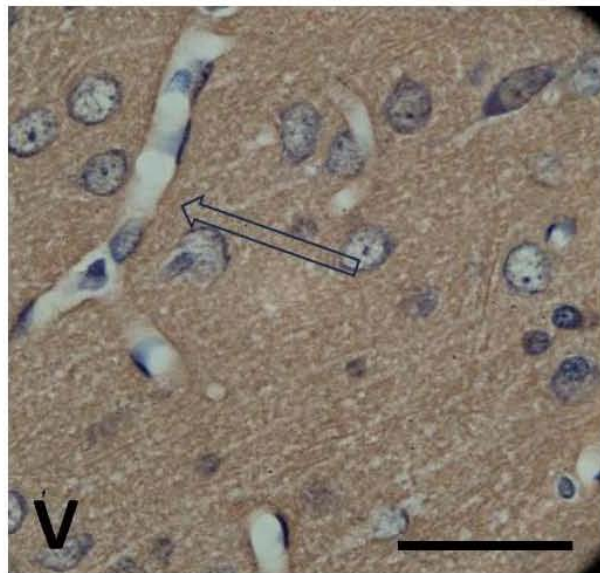
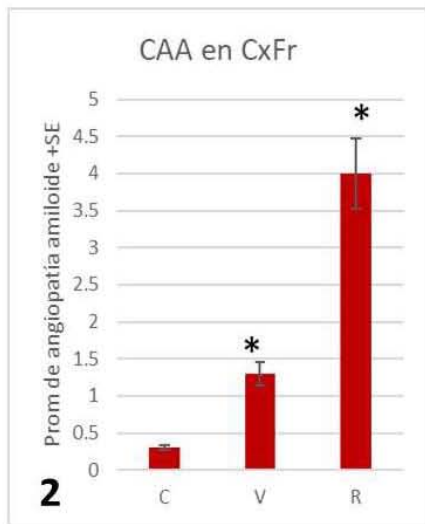
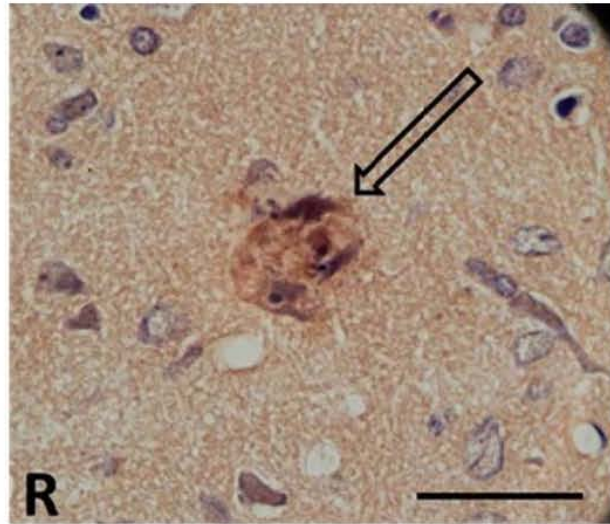
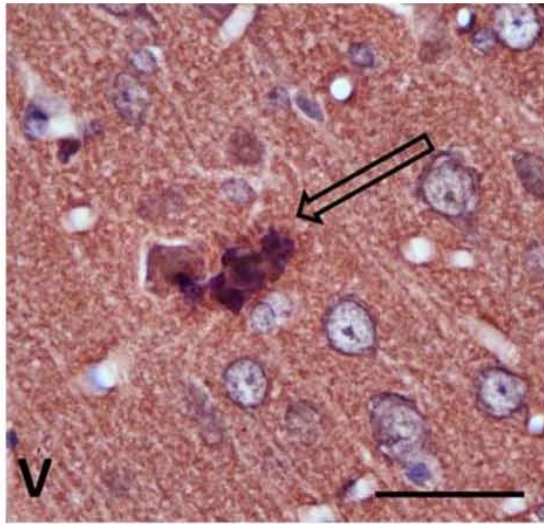
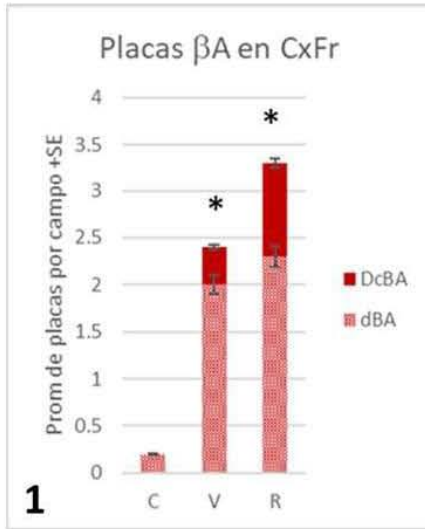


Figura 47. **Placas de  $\beta$ A en la corteza frontal**, en las abscisas los animales C, expuestos a V, y dejados en R, en las ordenadas las placas amiloide difusas ( $d\beta$ A) y las placas amiloideas de núcleo denso ( $Dc\beta$ A) ( $*=p<0.05$ ). **Placas  $\beta$ A en la corteza frontal con la tinción de rojo Congo** a 100x, las flechas en V ( $V_2O_5$ ) y R (recuperación) señalan placas de núcleo denso  $Dc\beta$ A. Barra= $30\mu$ m. **Resultados de angiopatía amiloide en la corteza frontal** en los grupos C, V y R ( $*=p<0.05$ ). **Fotomicrografía representativa de CAA** en la corteza frontal de ratas expuestas a  $V_2O_5$ , la flecha indica capilares con células congofílicas en la túnica intersticial. Barra= $30\mu$ m.

Los resultados de la cuantificación de las neuronas piramidales en la corteza frontal teñidas con rojo Congo, muestran que hubo disminución de un tercio en las neuronas nD tras la exposición a V, y casi 80% tras el tiempo de recuperación; los resultados muestran aumento significativo en las neuronas que mostraron daño parcial (pD) o generalizado (gD) tras la exposición a V. En la corteza frontal hubo disminución (>60%) en el número de neuronas (nD, pD y gD) después de los seis meses de exposición y los seis meses de recuperación. (fig. 48) ANOVA  $F= (5, 45) =712.4$   $p< 0.0001$ . Los resultados cualitativos en la corteza frontal de los animales control (fig. 48 C) muestran neuronas piramidales con núcleo redondo homogéneamente teñido, citoplasma alrededor del núcleo con una relación núcleo-citoplasma conservada. Las neuronas de los animales expuestos (V), presentan neuronas congofílicas con pérdida en la relación núcleo-citoplasma, dendrita apical alargada y retracción del citoplasma (fig. 48 V). Las neuronas de los animales después del periodo de recuperación se observan amorfas con daño generalizado y descompartimentalización (fig. 48 R). El número total de células piramidales de la CxFr (nD+pD+gD) muestra una disminución mayor al 50% (la suma pasa de 38 a 18 neuronas).

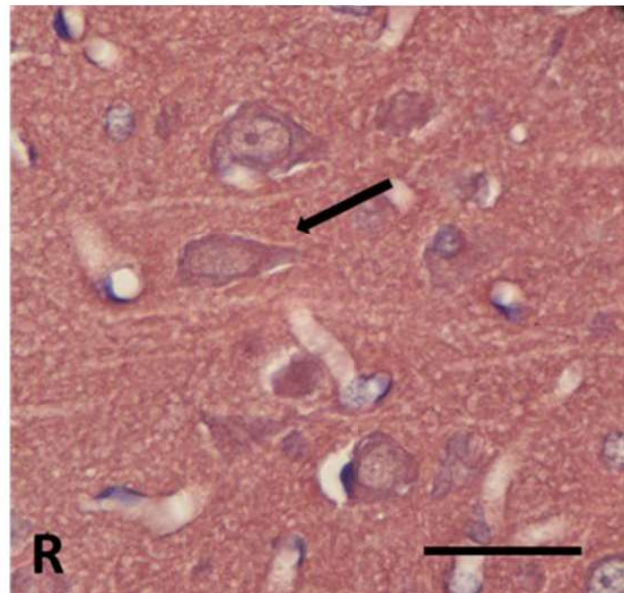
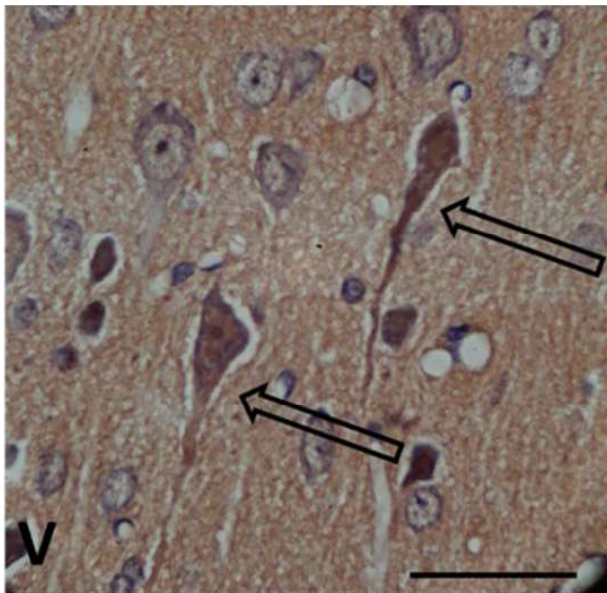
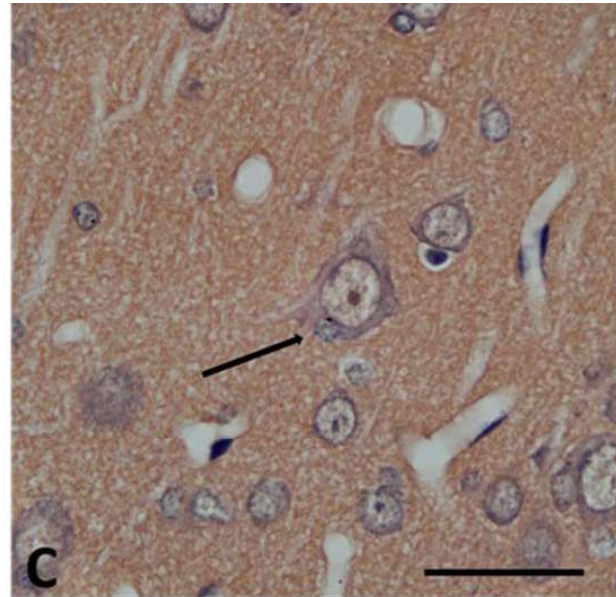
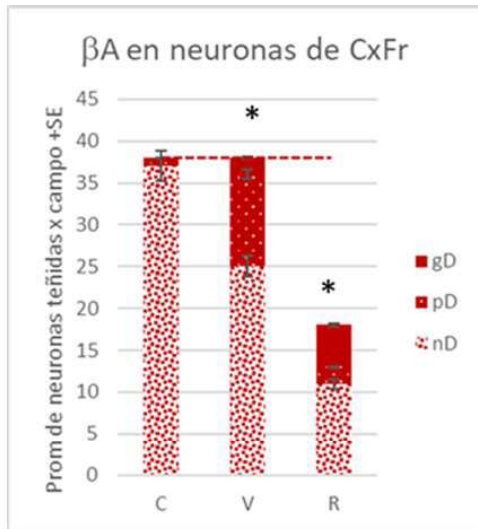
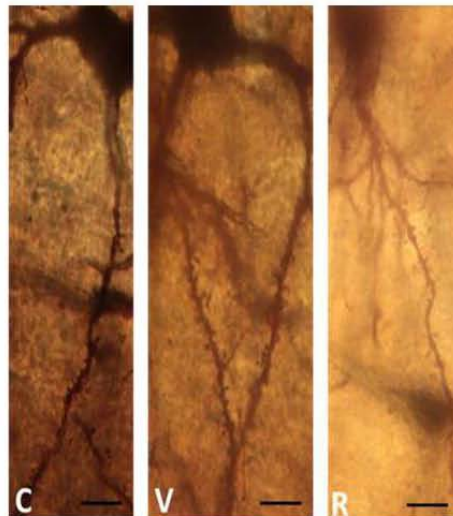
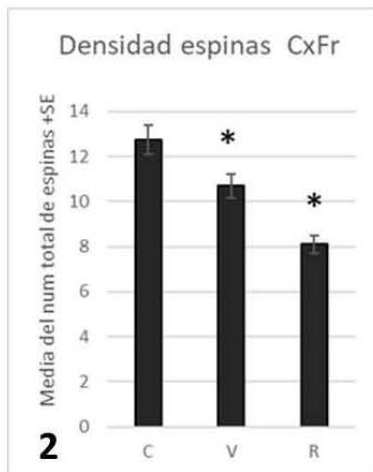
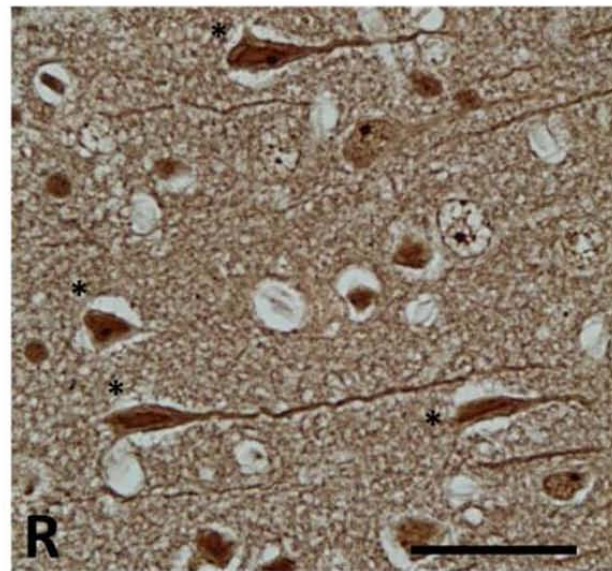
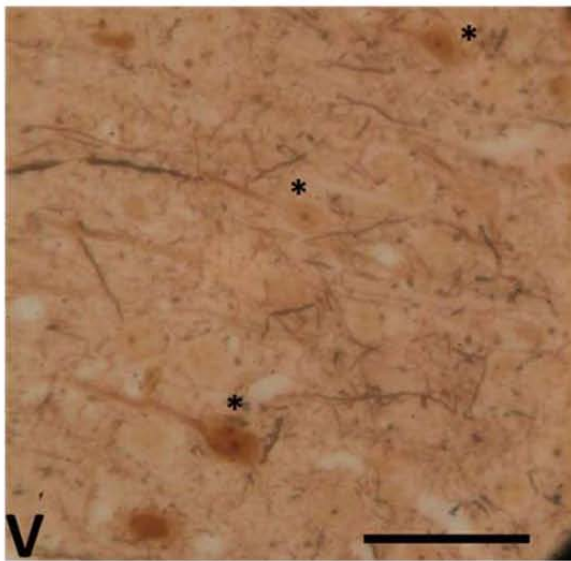
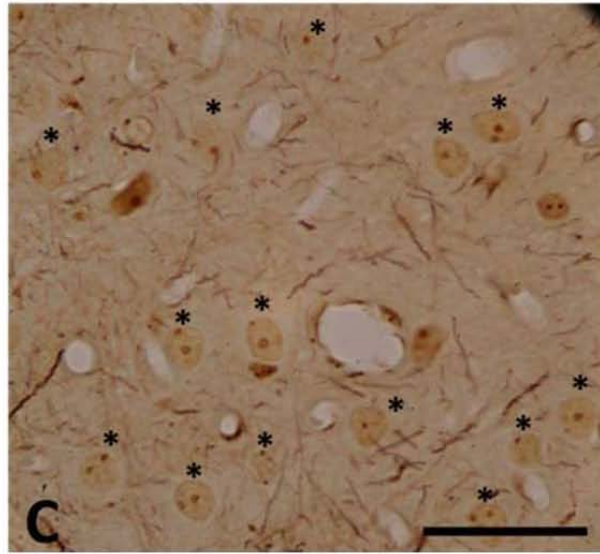
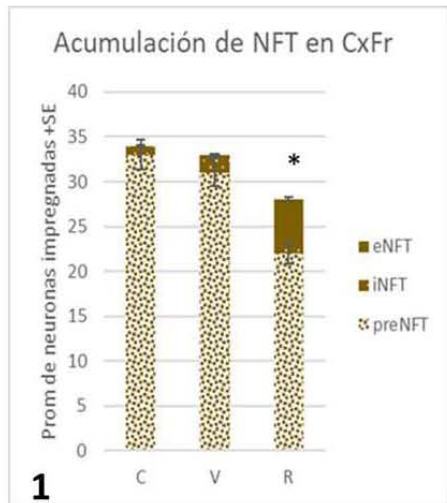


Figura 48. **Resultados de placas  $\beta A$**  en neuronas piramidales de la corteza frontal. En las abscisas los animales C, expuestos a V, y dejados en R, en las ordenadas las neuronas sin daño (nD) las neuronas con daño parcial (pD) y las neuronas con daño generalizado (gD). La línea punteada representa el promedio de neuronas piramidales presentes en el grupo control (\*=P<0.05). **Fotomicrografías representativas del daño en las neuronas piramidales de la corteza frontal** con la tinción de rojo Congo. En el control, la flecha señala una neurona piramidal sin daño, las flechas en V (expuestas a  $V_2O_5$ ) representan neuronas congofilicas con pérdida en la relación núcleo-citoplasma, dendrita apical alargada y retracción del citoplasma, la flecha en R (recuperación) señala una neurona amorfa con daño generalizado y descompartmentalización, barra=30 $\mu$ m.

En la corteza frontal, los resultados mostrados con la impregnación argéntica de Bielschowsky de los controles, no muestran disminución estadísticamente significativa de las neuronas sin daño (sin depósitos de marañas identificadas como preNFT) respecto al grupo expuesto (V), pero sí con el grupo de recuperación (R), ni entre las iNFT o las eNFT comparando C vs V, pero sí hay diferencia significativa entre C vs R (fig. 49 1) ANOVA  $F_{(5,45)}=1332$  p < 0.0001. Los resultados cualitativos en el grupo control en la corteza frontal (fig. 49 C), muestran neuronas piramidales con nucleolo central, núcleo redondo, y relación núcleo-citoplasma conservada. Las neuronas de los animales expuestos (V), presentan neuronas con iNFT, evidenciado por impregnación que marca parte del citoesqueleto incluyendo la dendrita apical, (fig. 49 V). Después del periodo de recuperación

algunas neuronas se observan amorfas, con una muy larga dendrita apical y retracción citoplasmática (fig. 49 R). En la corteza frontal al cuantificar la densidad de espinas dendríticas en las neuronas piramidales se observó disminución en los animales expuestos a V durante 6 meses y mayor disminución en R (fig. 49 2) ANOVA  $p < .05$ . Los resultados cualitativos muestran disminución en la densidad de espinas en el grupo expuesto a V y el grupo R al compararlas con el grupo control (fig. 49C, V y R).







Gráfica 49 1. **Daño en citoesqueleto de neuronas piramidales** de la corteza frontal. En las abscisas los grupos C, expuestos a V, y dejados en R, en las ordenadas las neuronas sin daño (eNFT), las neuronas con marañas neurofibrilares internas (iNFT) y las neuronas con marañas neurofibrilares internas y externas (eNFT), (\*=P<0.05). **Fotomicrografías representativas del daño en el citoesqueleto** de las neuronas piramidales de la corteza frontal con la impregnación argéntica de Bielschowsky. Los asteriscos en C señalan neuronas sin daño, con el núcleo redondo y el nucleolo más impregnado, rodeado de citoplasma claro, en V (V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) los asteriscos señalan neuronas con el núcleo y la dendrita apical fuertemente impregnados, los asteriscos en R (recuperación) señalan neuronas dañadas, el núcleo ha perdido la forma redonda, se observa una larga dendrita apical y retracción del citoplasma, barra=30µm. **Densidad de espinas en dendritas secundarias** de neuronas piramidales en corteza frontal, (\*=P<0.05). **Fotomicrografías representativas de espinas** en una dendrita secundaria de una neurona piramidal de la corteza frontal de un animal del grupo control (C) en una del grupo expuesto (V) y del grupo de recuperación (R). Técnica de Golgi. Barra =5µm.

Al hacer la comparación entre las cinco estructuras con los datos obtenidos del análisis histológico (fig. 50), observamos que la estructura que sufrió mayor daño por la exposición a V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> fue el hipocampo (CA1 línea azul), las estructuras donde observamos mayor pérdida neuronal (NΔ), fueron el hipocampo y la corteza frontal. En CA1 la disminución en el número de neuronas, está asociada con la acumulación de NFT y con la disminución en la densidad de espinas dendríticas. En la corteza frontal (CxFr línea verde) la disminución neuronal se asocia con NFT y βA. En el subiculum (Sub; línea naranja) encontramos daño relacionado con NFT y βA. En la CxEnt y Amg encontramos daño relacionado con βA.

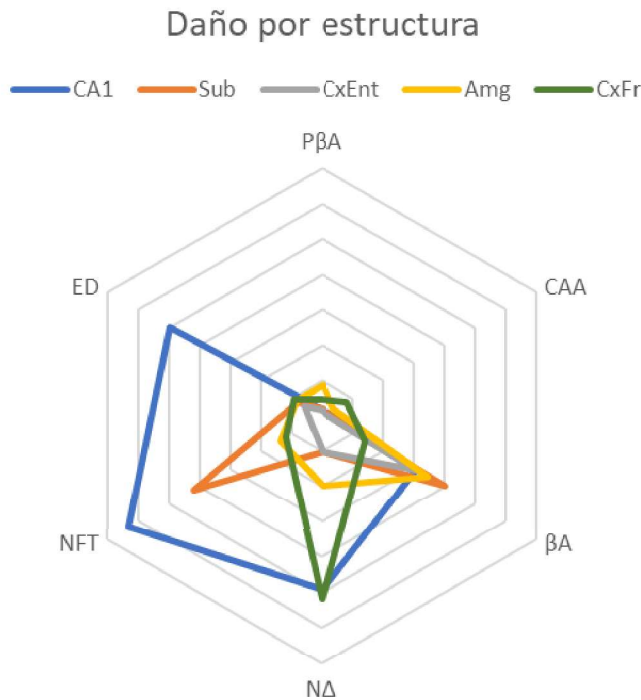
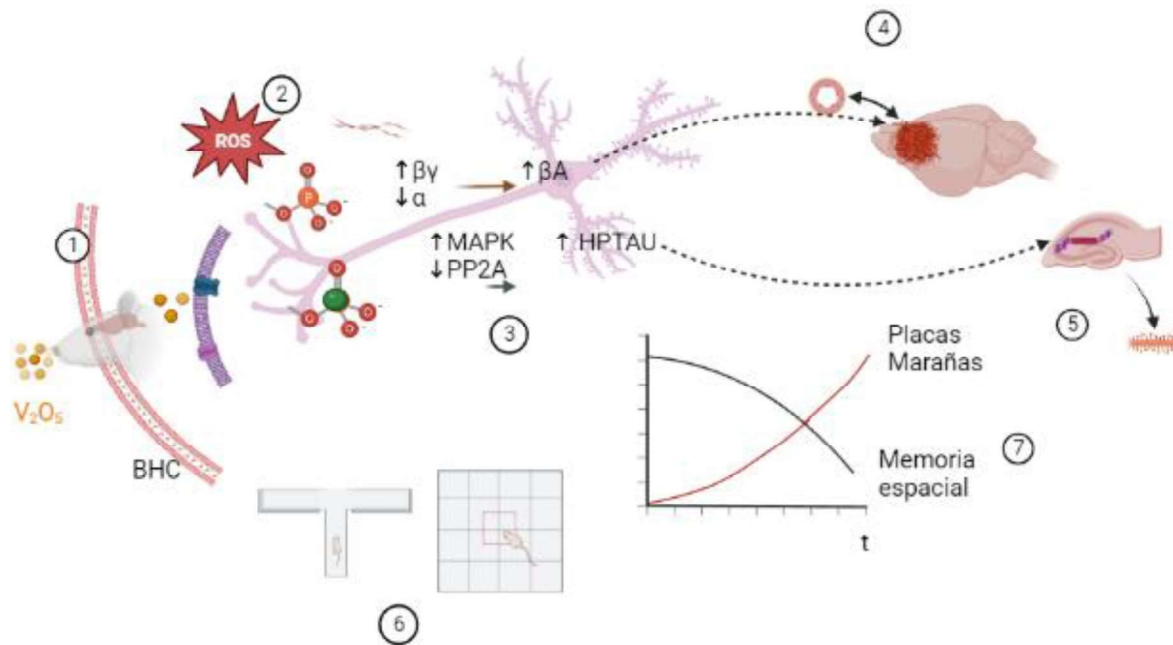


Figura 50. Gráfica que compara el daño cuantificado en las cinco estructuras analizadas comparando el grupo Control con el grupo Recuperación. PβA se refiere al número de placas (dβA +DcβA), CAA se refiere a la angiopatía amiloide cerebral, βA cuantifica la marca congofilica por la acumulación intraneuronal de βamiloide, NΔ se refiere a la disminución de neuronas piramidales, número obtenido de la suma de la diferencia del promedio de neuronas piramidales en C y en R [(sD+Dp+Dg)C - (sD+Dp+Dg)R + (preNFT+ iNFT + eNFT)C - (preNFT+ iNFT + eNFT)R]. NFT se refiere a la acumulación de NFT (iNFT + eNFT). Y ED se refiere a la diferencia en la densidad de espinas dendríticas en C y en R.

## 8. DISCUSIÓN

El propósito de este trabajo fue caracterizar los cambios conductuales y morfológicos que se presentan en las ratas expuestas a la inhalación de  $V_2O_5$  como un posible modelo esporádico de la Enfermedad de Alzheimer. En el modelo en ratas de EA inducido por la exposición crónica a  $V_2O_5$  se observaron cambios conductuales e histológicos compatibles con los observados en la EA (fig. 51) de tipo esporádico. El efecto tóxico del V afecta al sistema nervioso por varias vías, en este modelo utilizamos la inhalación crónica (72 sesiones) de  $V_2O_5$ . La inhalación es la vía de exposición a V más frecuente en entornos laborales y por contaminantes atmosféricos (Li et al., 2013), además es una vía de entrada directa al SN por el bulbo olfatorio. El daño ocurre primero en las mucosas respiratoria y olfatoria, evento que activa las defensas antiinflamatorias y antioxidantes, cuando la exposición repetida vence a las defensas antioxidantes se produce un estado de estrés oxidativo proinflamatorio (Avila-Costa et al., 2005). El V (principalmente en forma de vanadato) atraviesa el endotelio de la barrera hematoencefalal a través de transportadores activos o mediante receptores, causando las alteraciones asociadas con la patología de la EA, incluido el estrés oxidativo, la acumulación de los  $\beta A$  y la hiperfosforilación de la proteína TAU, así como la respuesta neuroinflamatoria, eventos que en su conjunto conducen a la disfunción cognitiva posterior (fig. 51) (Ngwa et al., 2017).



**Figura 51. Modelo de Alzheimer inducido por la inhalación crónica de  $V_2O_5$ .** 1. **Ingreso de  $V_2O_5$  al SN.** La inhalación de  $V_2O_5$  ingresa al sistema nervioso donde genera un estado de estrés oxidativo y un aumento de ROS, el V, en forma de vanadato atraviesa la BHC y las membranas celulares. 2. **Hipervanadilación y vía amiloidogénica.** El vanadato actúa en forma similar al fosfato causando hipervanadilación de proteínas, esto contribuye junto con la activación de las  $\beta$  y  $\gamma$  secretasas y la inactivación de la  $\alpha$  secretasa a que se siga la ruta amiloidogénica lo que lleva a la producción y acumulación de  $\beta A$ . 3. **Hiperfosforilación de TAU.** El vanadato compite con el fosfato (P) causando la hiperfosforilación (o hipervanadilación) de TAU, la activación de MAPK y la inactivación de PP2A, lo que lleva a la formación de marañas neurofibrilares. 4. **Acumulación de  $\beta A$ .** La acumulación de  $\beta A$  produce CAA y placas primero en corteza frontal y amígdala, y después en otras áreas del SN. 5. **Acumulación de NFTs.** La acumulación de NFTs se presenta primero en CA1 y subículo y se asocia con disminución de la densidad de espinas dendríticas en estas estructuras. 6. **Efecto de la exposición crónica a  $V_2O_5$ .** Conforme transcurre el tiempo, y las exposiciones a  $V_2O_5$  (72 exposiciones en 6 meses) aumenta la formación y acumulación de placas y marañas y disminuye la memoria espacial (medida en 6; laberinto en T y campo abierto) fenómenos asociados con el deterioro cognitivo.

La EA es el resultado de un proceso neuropatológico complejo y los modelos animales nos permiten tener una visión integral de la complejidad del proceso. Nuestro modelo de la EA inducido (causado por la inhalación crónica de una toxina) emula a la EA de tipo esporádico. Este subtipo de EA representa más del 96% en la especie humana; y que carece de modelos experimentales adecuados. Una aproximación experimental es, que los animales desarrollen la patología en la vejez como resultado de estresores externos, y no por la expresión de un transgén (fig. 51). De la base de datos de Alzforum sólo 4 de 214 modelos murinos se basan en modelos no genéticos (<https://www.alzforum.org/research-models>). Un modelo de EAe facilitaría la evaluación de terapias contra la EA. En este modelo, el grupo experimental, que se mantuvo seis meses en recuperación, después de los seis meses de exposición a  $V_2O_5$ , no presenta recuperación, ni conductual ni histológica, es decir, una vez establecido el proceso neurodegenerativo, el daño no es reversible, más aún, en algunos aspectos evaluados el daño aumentó en forma significativa tras los seis meses de reposo.

Como observamos, la exposición crónica a  $V_2O_5$  causó alteraciones en la memoria espacial y la conducta motora, disminuyendo la exploración y aumentando el freezing, ambas características de los modelos de la EA (fig. 51). La formación hipocampal, reguladora de la memoria de trabajo y declarativa; es una de las primeras regiones del cerebro afectadas por la EA, (Ameen-Ali et al., 2017). En nuestro trabajo, para determinar si ocurrían estas mismas alteraciones se utilizó el laberinto en T, que evalúa la memoria espacial. Encontrándose que este deterioro en la memoria concuerda con el daño neuronal observado en CA1 del hipocampo. Estos datos coinciden con los modelos murinos de la EA descritos en la base de datos de Alzforum, en los que mencionan la disminución en la memoria espacial, en el reconocimiento de objetos, en el deterioro cognitivo y en la memoria de trabajo (<https://www.alzforum.org/research-models>). Nuestros resultados son compatibles con la revisión del grupo de Ameen-Ali (2017) donde se analizaron los modelos animales que reportan alteración en la actividad motora, conducta altamente sensible a factores ambientales y se suprimen en circunstancias aversivas que provocan ansiedad, conducta que también se altera en la EA en humanos (Ameen-Ali et al., 2017). La relación que encontramos entre la disminución de la conducta de exploración y daño en CA1 es compatible con Gray y McNaughton (2003) quienes reportaron que la supresión del comportamiento exploratorio, en respuesta a condiciones que provocan ansiedad, está mediada por la formación hipocampal (Gray & McNaughton, 2003).

Las alteraciones cognitivas y conductuales de la EA son secundarias a las alteraciones histopatológicas. Dado que nuestros resultados muestran acumulación de  $\beta A$  y TAU resultante de la exposición a  $V_2O_5$ , es posible sugerir que esto fue causado por la generación de un estado de estrés oxidativo ya que el V ingresa a la célula como vanadato con lo que aumenta la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) generando un ambiente proinflamatorio que afecta al neuroendotelio vascular. Se ha demostrado que los ROS son generadores de lesión endotelial, y de activación enzimática (Ngwa et al., 2017). Así, la inflamación contribuye a la lesión endotelial, las células endoteliales activan la expresión de mediadores inflamatorios después del daño (Fisher, 2008).

El aumento en la formación y acumulación de placas  $\beta A$  afecta funcional y estructuralmente a las neuronas piramidales y a las células endoteliales del músculo liso de los vasos sanguíneos cerebrales (Greenberg et al., 2020); es probable que numerosos cambios neuronales sinápticos y no sinápticos ocurran simultáneamente a medida que el daño neuronal se desarrolla y progresa. En los vasos sanguíneos se observa daño por  $\beta A$  soluble que corresponde a dímeros (Dorostkar et al., 2015), en el modelo de V, este daño es mayor en la amígdala y la corteza frontal, además de que el daño aumenta, aunque se suspenda la exposición a  $V_2O_5$ . Después de una lesión cerebral, los niveles de SAA (amiloide sérico A, es una proteína de fase aguda altamente conservada, que se estimula como respuesta a inflamación o infección), aumentan varias veces en el plasma y pueden contribuir al proceso de la enfermedad (Chung et al., 2000). El SSA se acumula en el cerebro de pacientes con EA (Chung et al., 2000), y su aumento está relacionado con el desarrollo de amiloidosis (Jang et al., 2017). La activación del inflammasoma está implicada en el desarrollo y progresión de la EA, el SSA, uno de los principales reactantes de fase aguda y contribuye a la progresión de

la patología de la EA, (Bittner y cols. (2012). En consistencia con lo anterior, se han reportado mayores niveles de SSA en las regiones cerebrales frontal lateral, parietal superior, temporal posterior superior y temporal superior (Bittner y cols, 2012 citado en: Jang et al., 2017).

En nuestro modelo de inhalación de  $V_2O_5$ , la formación de placas es mayor en la amígdala y la corteza frontal, donde encontramos placas  $d\beta A$  y  $Dc\beta A$ , después del periodo de recuperación aumenta el número de placas  $Dc\beta A$  (fig. 51). Según lo reportado por Dorokstar (2015) cuando el daño por acumulación de  $\beta A$  inicia, son más abundantes las placas  $d\beta A$  (formadas principalmente por dímeros y oligómeros) y al intensificarse el daño, aumentan las placas  $Dc\beta A$  (formadas principalmente por oligómeros y fibras) (Dorostkar et al., 2015). La formación y acumulación de  $\beta A$  generada por la exposición a  $V_2O_5$  puede actuar por dos vías; la desregulación de las secretasas y la desregulación de las fosfatasa. Algunos metales como el Al, Fe, Cu y Zn (metales del periodo 4 como el V) en sus estados de oxidación más positivos, participan en la formación de placas. El mecanismo de acción consiste en generar una asimetría en la actividad de las secretasas (aumentando las  $\beta$  y  $\gamma$ , disminuyendo la  $\alpha$ ) lo que genera que el procesamiento de la APP siga la vía amiloidogénica provocando aumento y acumulación de los  $\beta A_{1-42}$  tóxicos (Jellinger, 2013). El vanadato causa la desregulación de las fosfatasa (lo que disminuye la actividad de la proteína fosfatasa A2) y activa la proteína cinasa (aumentando MAPK) (Ngwa et al., 2017).

La exposición a  $V_2O_5$  también generó la formación y acumulación de placas  $\beta A$  intracelulares en las neuronas piramidales de las estructuras cerebrales analizadas. En el 2015, se reportó que las placas  $\beta A$  se forman, tanto en el compartimento intracelular como en el extracelular, tanto en estado oligomérico (predomina  $\beta A_{40}$ ) como fibrilar (predomina  $\beta A_{42}$ ) (Dorostkar et al., 2015). La acumulación de  $\beta A$  intraneuronal se observa en el síndrome de Down y en las primeras etapas de la EA (Gouras et al., 2000). Entre las estructuras cerebrales analizadas de los animales expuestos, se identifica mayor acumulación de  $\beta A$  intracelular en la corteza entorrinal y en la amígdala, además, en la corteza frontal de los animales expuestos se observó disminución en el número de neuronas piramidales, esto concuerda con los reportes que indican que, en las primeras etapas de la EA, los  $\beta A$  se acumulan preferentemente en regiones neocorticales (Thal et al., 2008).

Después de seis meses de exposición a  $V_2O_5$  encontramos acumulación de NFT intracelular en las neuronas piramidales; principalmente en CA1 y en el subículo, además de la acumulación de NFT, se observó alteración del citoesqueleto. La neurona consta de microtúbulos, filamentos intermedios, y microfilamentos, los microtúbulos asociados a proteínas forman puentes cruzados entre los diversos elementos del citoesqueleto, junto con los filamentos neuronales, los microtúbulos son responsables del mantenimiento de la forma de la neurona, del transporte axonal y dendrítico, por lo que interviene en los cambios de forma y extensión durante el crecimiento, reparación y adaptación a procesos patológicos y formación y funcionalidad de las espinas dendríticas que son los sitios posinápticos de la neuronas de proyección o glutamatérgicas (Avila, Jiménez, et al., 2016; Šimić et al., 2016). Las proteínas TAU se localizan principalmente en el axón y las MAPs 1 y 2 en las dendritas (Avila, Pallas, et al., 2016). El vanadato es un análogo del fosfato, en el estado de oxidación +5, adopta una estructura tetraédrica similar a la del fosfato (Huyer et al., 1997), por lo que es probable que, en este estado de oxidación, el vanadato compita con el fosfato y "vanadile" a las proteínas generando una alteración semejante a la hiperfosforilación de TAU con la consecuente alteración en el citoesqueleto. La exposición crónica a  $V_2O_5$  causa hiperfosforilación (o "hipervanadilación") de TAU que aumenta la producción y acumulación de NFT, alteración que está relacionada con la fisiopatología neural y con la consecuente disminución de la memoria espacial y la alteración en el patrón de locomoción. Desde el 2003 se reportó que la patología de TAU se correlaciona con la progresión del deterioro cognitivo en la EA (Giannakopoulos et al., 2003).

Además, se encontró en este estudio que la disminución del número total de neuronas piramidales es mayor a 60% en la corteza frontal y del 40% en el hipocampo, esto concuerda con lo reportado por Akram (2008) quien encontró que, en la EA las neuronas piramidales de las capas III y V de la neocorteza y el estrato piramidal del hipocampo muestran pérdida extensa de neuronas y sinapsis, y la distribución de las placas  $\beta$ A y NFTs es más frecuente en estas capas corticales (Akram et al., 2008).

Asimismo, después de la exposición a  $V_2O_5$  observamos disminución significativa de la densidad de espinas dendríticas, disminución que empeora después del tiempo de recuperación. De acuerdo con Dorostkar y cols. (2015) la presencia de NFT se ha asociado con la pérdida de espinas dendríticas (Dorostkar et al., 2015), relación que también se observó en este estudio; por lo que es posible sugerir una relación inversamente proporcional entre la formación y acumulación de NFT y el número de espinas dendríticas, la inestabilidad en el citoesqueleto y en las espinas dendríticas está relacionada con la "hipervanadilación" de Tau. Durante los trastornos neurodegenerativos hay pérdida patológica de espinas dendríticas, la interrupción de la síntesis proteica puede alterar la densidad y morfología sináptica (Dorostkar et al., 2015).

Tomando en conjunto los hallazgos descritos anteriormente, proponemos que nuestro modelo de EA inducido por la inhalación de  $V_2O_5$  (fig. 51) en el murino, concuerda con un estadio IV de la escala de Braak en donde se reporta deterioro de las funciones cognitivas y daño considerable en las regiones del subículo e hipocampo, y avance de la patología hacia regiones de la neocorteza. Además, este modelo genera daño neurológico compatible con deterioro cognitivo y los cambios histopatológicos característicos de la EA. Después de la interrupción de la exposición a  $V_2O_5$ , no hay recuperación y el daño neurodegenerativo continúa. Por los resultados obtenidos, este modelo se posibilita como un buen candidato para el estudio de la EA de tipo esporádico en estadios intermedios de la enfermedad, por lo que además es posible probar tratamientos experimentales, ya que la degeneración no es tan extensa como en los estadios avanzados.

## 9. LIMITACIONES

En el presente estudio no podemos asegurar la identidad molecular de las marcas encontradas con la tinción de rojo Congo y con la impregnación argéntica de Bielschowsky, esto se puede resolver haciendo inmunohistología para  $\beta A_{1-42}$  y Tau hiperfosforilada. Para determinar si es un modelo de EA específico será importante analizar el daño ocasionado en estructuras que generalmente no se ven afectadas en la EA. Para medir la alteración de la memoria espacial es más adecuado hacer una prueba de reconocimiento de objeto. Sería importante hacer un análisis morfométrico en diferentes tiempos; dos, cuatro y seis meses de inhalación para entender mejor el desarrollo temporal de las alteraciones. Para hacer un análisis de la alteración en la sinapsis será importante hacer un examen ultraestructural.

## 10. CONCLUSIONES

La inhalación crónica de  $V_2O_5$  constituye un modelo de la EA inducida que causa alteraciones de la memoria espacial y la conducta motora, acumulación de  $\beta$ A en el endotelio vascular y en neuronas piramidales de la corteza frontal y entorrinal, así como la acumulación de NFT intraneuronal en neuronas piramidales de CA1 y subículo, lo que se acompaña de pérdida de espinas dendríticas. Lo anterior nos permite proponer un modelo que relaciona las manifestaciones clínicas con los cambios histológicos. Al ser un modelo inducido representa a la EA esporádica que, aunque representa más del 95% de casos en el humano, hay escasos modelos en animales. Este modelo representa cambios neurodegenerativos específicos de la EA en la que observamos producción y acumulación de amiloides y placas primero en corteza frontal y amígdala, producción y acumulación de NFTs en hipocampo y subículo, además de daño en la memoria espacial. Hay disminución en el número de neuronas en corteza y CA1 (aunque no se probaron marcadores de muerte neuronal),



pero los demás parámetros analizados no son reversibles después de seis meses, lo que indica que una vez que se establece el proceso neurodegenerativo y se rompe la homeostasis, el daño se multiplica. A partir de los resultados obtenidos proponemos que este modelo es análogo al estadio IV de Braak reportado en personas que padecen la enfermedad de Alzheimer. Además, representa una etapa en el desarrollo de la patología, en donde es factible proponer terapias que tengan un impacto positivo para detener el daño neuronal. Asimismo, estos datos deben fomentar los esfuerzos de investigación hacia los efectos en la salud ambiental, con el propósito final de intervenir en la disminución de la contaminación atmosférica de metales como el V. Tenemos que promover esquemas viables para salvaguardar el SNC de los tóxicos, que se han redoblado en la atmósfera durante las últimas décadas y representan un importante desafío para la salud ya que la contaminación por metales se ha relacionado con enfermedades neurodegenerativas.

## 11. PERSPECTIVAS

La EA, patología declarada por la FDA como potencialmente mortal e incurable, se encuentra entre las patologías que tienen la tasa más baja de éxito en el desarrollo de fármacos. Una de las razones de este problema es que, aunque se han propuesto diferentes modelos útiles para responder preguntas sobre aspectos específicos de la EA, ningún modelo proporciona una caracterización ideal y completa de la EA como se observa en humanos, por lo que proponer un modelo inducido en rata, que muestre deterioro cognitivo asociado a marcas histológicas características de la EA de tipo esporádico, en estructuras donde se desarrolla la EA, resulta un modelo factible. Futuros estudios podrían incluir la identificación y cuantificación de los biomarcadores tempranos de la EA, que junto con pruebas de imagen nos permitan entender mejor el desarrollo de la enfermedad. También se podría estudiar el efecto de intervenciones terapéuticas tempranas y probar el efecto de fármacos en el desarrollo de la enfermedad, así como buscar un efecto sinérgico con combinaciones de fármacos.

## 12. LITERATURA CITADA

- Agirman, G., Broix, L., & Nguyen, L. (2017). Cerebral cortex development: an outside-in perspective. *FEBS Letters*, 591(24), 3978–3992. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12924>
- Akram, A., Christoffel, D., Rocher, A. B., Bouras, C., Kövari, E., Perl, D. P., Morrison, J. H., Herrmann, F. R., Haroutunian, V., Giannakopoulos, P., & Hof, P. R. (2008). Stereologic estimates of total spinophilin-immunoreactive spine number in area 9 and the CA1 field: Relationship with the progression of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 29(9), 1296–1307. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.03.007>
- Alonso, A. C., Zaidi, T., Grundke-Iqbal, I., & Iqbal, K. (1994). Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(12), 5562–5566. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.12.5562>
- Alzheimer, A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *AllgZPsychiatr*, 64, 146–148.
- Ameen-Ali, K. E., Wharton, S. B., Simpson, J. E., Heath, P. R., Sharp, P., & Berwick, J. (2017). Review: Neuropathology and behavioural features of transgenic murine models of Alzheimer's disease. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 43(7), 553–570. <https://doi.org/10.1111/nan.12440>
- Anand, K., & Dhikav, V. (2012). Hippocampus in health and disease: An overview. *Annals of Indian Academy of Neurology*, 15(4), 239. <https://doi.org/10.4103/0972-2327.104323>
- Andreadis, A. (2006). *Misregulation of Tau Alternative Splicing in Neurodegeneration and Dementia* (pp. 89–107). [https://doi.org/10.1007/978-3-540-34449-0\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-540-34449-0_5)
- Attardo, A., Fitzgerald, J. E., & Schnitzer, M. J. (2015). Impermanence of dendritic spines in live adult CA1 hippocampus. *Nature*, 523(7562), 592–596. <https://doi.org/10.1038/nature14467>
- Augustinack, J. C., Schneider, A., Mandelkow, E.-M., & Hyman, B. T. (2002). Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, 103(1), 26–35. <https://doi.org/10.1007/s004010100423>
- Avila, J. (2006). Tau phosphorylation and aggregation in Alzheimer's disease pathology. *FEBS Letters*, 580(12), 2922–2927. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.02.067>
- Avila, J., Jiménez, J. S., Sayas, C. L., Bolós, M., Zabala, J. C., Rivas, G., & Hernández, F. (2016). Tau Structures. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 8. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2016.00262>
- Avila, J., Pallas, N., Bolós, M., Sayas, C. L., & Hernandez, F. (2016). Intracellular and extracellular microtubule associated protein tau as a therapeutic target in Alzheimer disease and other tauopathies. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 20(6), 653–661. <https://doi.org/10.1517/14728222.2016.1131269>
- Avila, J., Pérez, M., Lim, F., Gómez-Ramos, A., Hernández, F., & Lucas, J. J. (2004). Tau in neurodegenerative diseases: Tau phosphorylation and assembly. *Neurotoxicity Research*, 6(6), 477–482. <https://doi.org/10.1007/BF03033284>
- Avila-Costa, M. R., Colín-Barenque, L., Zepeda-Rodríguez, A., Antuna, S. B., Saldivar O, L., Espejel-Maya, G., Mussali-Galante, P., del Carmen Avila-Casado, M., Reyes-Olivera, A., Anaya-Martinez, V., & Fortoul, T. I.

- (2005). Ependymal epithelium disruption after vanadium pentoxide inhalation. *Neuroscience Letters*, 381(1–2), 21–25. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.01.072>
- Avila-Costa, M. R., Flores, E. M., Colin-Barenque, L., Ordoñez, J. L., Gutiérrez, A. L., Niño-Cabrera, H. G., Mussali-Galante, P., & Fortoul, T. I. (2004). Nigrostriatal Modifications After Vanadium Inhalation: An Immunocytochemical and Cytological Approach. *Neurochemical Research*, 29(7), 1365–1369. <https://doi.org/10.1023/B:NERE.0000026398.86113.7d>
- Avila-Costa, M. R., Fortoul, T. I., Niño-Cabrera, G., Colín-Barenque, L., Bizarro-Nevarés, P., Gutiérrez-Valdez, A. L., Ordóñez-Librado, J. L., Rodríguez-Lara, V., Mussali-Galante, P., Díaz-Bech, P., & Anaya-Martínez, V. (2006). Hippocampal cell alterations induced by the inhalation of vanadium pentoxide (V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) promote memory deterioration. *NeuroToxicology*, 27(6), 1007–1012. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2006.04.001>
- Azeez, I. A., Olopade, F., Laperchia, C., Andrioli, A., Scambi, I., Onwuka, S. K., Bentivoglio, M., & Olopade, J. O. (2016). Regional Myelin and Axon Damage and Neuroinflammation in the Adult Mouse Brain After Long-Term Postnatal Vanadium Exposure. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 75(9), 843–854. <https://doi.org/10.1093/jnen/nlw058>
- Barceloux, D. G., & Barceloux, D. (1999). Vanadium. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 37(2), 265–278. <https://doi.org/10.1081/CLT-100102425>
- Barth, A., Schaffer, A. W., Konnaris, C., Blauensteiner, R., Winker, R., Osterode, W., & Rüdiger, H. W. (2002). NEUROBEHAVIORAL EFFECTS OF VANADIUM. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 65(9), 677–683. <https://doi.org/10.1080/15287390252900377>
- Bekris, L. M., Yu, C.-E., Bird, T. D., & Tsuang, D. W. (2010). Review Article: Genetics of Alzheimer Disease. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology*, 23(4), 213–227. <https://doi.org/10.1177/0891988710383571>
- Best, P. J., White, A. M., & Minai, A. (2001). Spatial Processing in the Brain: The Activity of Hippocampal Place Cells. *Annual Review of Neuroscience*, 24(1), 459–486. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.459>
- Beyersmann, D., & Hartwig, A. (2008). Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Archives of Toxicology*, 82(8), 493–512. <https://doi.org/10.1007/s00204-008-0313-y>
- Bittner, T., Burgold, S., Dorostkar, M. M., Fuhrmann, M., Wegenast-Braun, B. M., Schmidt, B., Kretzschmar, H., & Herms, J. (2012). Amyloid plaque formation precedes dendritic spine loss. *Acta Neuropathologica*, 124(6), 797–807. <https://doi.org/10.1007/s00401-012-1047-8>
- Blessed, G., Tomlinson, B. E., & Roth, M. (1968). The Association Between Quantitative Measures of Dementia and of Senile Change in the Cerebral Grey Matter of Elderly Subjects. *British Journal of Psychiatry*, 114(512), 797–811. <https://doi.org/10.1192/bjp.114.512.797>
- Bloom, G. S. (2014). Amyloid- $\beta$  and Tau. *JAMA Neurology*, 71(4), 505. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2013.5847>
- Bondi, M. W., Edmonds, E. C., & Salmon, D. P. (2017). Alzheimer's Disease: Past, Present, and Future. *Journal of the International Neuropsychological Society*, 23(9–10), 818–831. <https://doi.org/10.1017/S135561771700100X>
- Bourne, J., & Harris, K. M. (2007). Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Current Opinion in Neurobiology*, 17(3), 381–386. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2007.04.009>
- Boyle, P. A., Yu, L., Wilson, R. S., Leurgans, S. E., Schneider, J. A., & Bennett, D. A. (2018). Person-specific contribution of neuropathologies to cognitive loss in old age. *Annals of Neurology*, 83(1), 74–83. <https://doi.org/10.1002/ana.25123>

- Braak, H., Alafuzoff, I., Arzberger, T., Kretschmar, H., & del Tredici, K. (2006). Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathologica*, 112(4), 389–404. <https://doi.org/10.1007/s00401-006-0127-z>
- Braak, H., & Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathologica*, 82(4), 239–259. <https://doi.org/10.1007/BF00308809>
- Braak, H., Braak, E., & Bohl, J. (1993). Staging of Alzheimer-Related Cortical Destruction. *European Neurology*, 33(6), 403–408. <https://doi.org/10.1159/000116984>
- Braak, H., & del Tredici, K. (2015). *Neuroanatomy and Pathology of Sporadic Alzheimer's Disease* (Vol. 215). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-12679-1>
- Brunnström, H., & Englund, E. (2011). Comparison of four neuropathological scales for Alzheimer's disease. *Clinical Neuropathology*, 30(03), 56–69. <https://doi.org/10.5414/NPP30056>
- Calderon-Garciduenas, L., Maronpot, R. R., Torres-Jardon, R., Henriquez-Roldan, C., Schoonhoven, R., Acuna-Ayala, H., Villarreal-Calderon, A., Nakamura, J., Fernando, R., Reed, W., Azzarelli, B., & Swenberg, J. A. (2003). DNA Damage in Nasal and Brain Tissues of Canines Exposed to Air Pollutants Is Associated with Evidence of Chronic Brain Inflammation and Neurodegeneration. *Toxicologic Pathology*, 31(5), 524–538. <https://doi.org/10.1080/01926230390226645>
- Calderón-Garcidueñas, L., Reynoso-Robles, R., & González-Maciel, A. (2019). Combustion and friction-derived nanoparticles and industrial-sourced nanoparticles: The culprit of Alzheimer and Parkinson's diseases. *Environmental Research*, 176, 108574. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108574>
- Capella, L. S., Gefé, M. R., Silva, E. F., Affonso-Mitidieri, O., Lopes, A. G., Rumjanek, V. M., & Capella, M. A. M. (2002). Mechanisms of vanadate-induced cellular toxicity: role of cellular glutathione and NADPH. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 406(1), 65–72. [https://doi.org/10.1016/S0003-9861\(02\)00408-3](https://doi.org/10.1016/S0003-9861(02)00408-3)
- Capella, M. A. M., Capella, L. S., Valente, R. C., Gefé, M., & Lopes, A. G. (2007). Vanadate-induced cell death is dissociated from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation. *Cell Biology and Toxicology*, 23(6), 413–420. <https://doi.org/10.1007/s10565-007-9003-4>
- Chételat, G. (2018). Multimodal Neuroimaging in Alzheimer's Disease: Early Diagnosis, Physiopathological Mechanisms, and Impact of Lifestyle. *Journal of Alzheimer's Disease*, 64(s1), S199–S211. <https://doi.org/10.3233/JAD-179920>
- Chung, T.-F., Liang, J.-S., Schreiber, B. M., Sipe, J. D., McKee, A., Fine, R. E., & Johnson, R. J. (2000). Serum amyloid A in Alzheimer's disease brain is predominantly localized to myelin sheaths and axonal membrane. *Amyloid*, 7(2), 105–110. <https://doi.org/10.3109/13506120009146246>
- COOPER, A. M., & MICHELS, R. (1988). Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 3rd ed., revised (DSM-III-R). *American Journal of Psychiatry*, 145(10), 1300–1301. <https://doi.org/10.1176/ajp.145.10.1300>
- Cooper, R. (2007). Vanadium pentoxide inhalation. *Indian Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 11(3), 97. <https://doi.org/10.4103/0019-5278.38457>
- Crans, D. C., Zhang, B., Gaidamauskas, E., Keramidas, A. D., Willsky, G. R., & Roberts, C. R. (2010). Is Vanadate Reduced by Thiols under Biological Conditions? Changing the Redox Potential of V(V)/V(IV) by Complexation in Aqueous Solution. *Inorganic Chemistry*, 49(9), 4245–4256. <https://doi.org/10.1021/ic100080k>

- DAVIES, P. (1976). SELECTIVE LOSS OF CENTRAL CHOLINERGIC NEURONS IN ALZHEIMER'S DISEASE. *The Lancet*, 308(8000), 1403. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(76\)91936-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(76)91936-X)
- de Flores, R., la Joie, R., & Chételat, G. (2015). Structural imaging of hippocampal subfields in healthy aging and Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 309, 29–50. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.08.033>
- Deacon, R. M. J., & Rawlins, J. N. P. (2006). T-maze alternation in the rodent. *Nature Protocols*, 1(1), 7–12. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.2>
- DeTure, M. A., & Dickson, D. W. (2019). The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 14(1), 32. <https://doi.org/10.1186/s13024-019-0333-5>
- Domingo, J. L., Llobet, J. M., Tomas, J. M., & Corbella, J. (1985). Short-term toxicity studies of vanadium in rats. *Journal of Applied Toxicology*, 5(6), 418–421. <https://doi.org/10.1002/jat.2550050616>
- Dorostkar, M. M., Zou, C., Blazquez-Llorca, L., & Herms, J. (2015). Analyzing dendritic spine pathology in Alzheimer's disease: problems and opportunities. *Acta Neuropathologica*, 130(1), 1–19. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1449-5>
- Drew, L. (2018). An age-old story of dementia. *Nature*, 559(7715), S2–S3. <https://doi.org/10.1038/d41586-018-05718-5>
- Drummond, E., & Wisniewski, T. (2017). Alzheimer's disease: experimental models and reality. *Acta Neuropathologica*, 133(2), 155–175. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1662-x>
- Duyckaerts, C., Delatour, B., & Potier, M.-C. (2009). Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathologica*, 118(1), 5–36. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0532-1>
- Eickhoff, S. B., Constable, R. T., & Yeo, B. T. T. (2018). Topographic organization of the cerebral cortex and brain cartography. *NeuroImage*, 170, 332–347. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2017.02.018>
- Evangelou, A. M. (2002). Vanadium in cancer treatment. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 42(3), 249–265. [https://doi.org/10.1016/S1040-8428\(01\)00221-9](https://doi.org/10.1016/S1040-8428(01)00221-9)
- Fatola, O. I., Olaolorun, F. A., Olopade, F. E., & Olopade, J. O. (2019). Trends in vanadium neurotoxicity. *Brain Research Bulletin*, 145, 75–80. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.03.010>
- Fisher M. (2008). Injuries to the vascular endothelium: vascular wall and endothelial dysfunction. *Reviews in Neurological Diseases*, 5(Suppl 1), 4–11.
- Folarin, O. R., Snyder, A. M., Peters, D. G., Olopade, F., Connor, J. R., & Olopade, J. O. (2017). Brain Metal Distribution and Neuro-Inflammatory Profiles after Chronic Vanadium Administration and Withdrawal in Mice. *Frontiers in Neuroanatomy*, 11. <https://doi.org/10.3389/fnana.2017.00058>
- Francis, P. T., Palmer, A. M., Snape, M., & Wilcock, G. K. (1999). The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 66(2), 137–147. <https://doi.org/10.1136/jnnp.66.2.137>
- Garcia, G. B., Biancardi, M. E., & Quiroga, A. D. (2005). Vanadium (V)-Induced Neurotoxicity in the Rat Central Nervous System: A Histo-Immunohistochemical Study. *Drug and Chemical Toxicology*, 28(3), 329–344. <https://doi.org/10.1081/DCT-200064496>
- García, G. B., Quiroga, A. D., Stürtz, N., Martínez, A. I., & Biancardi, M. E. (2004). Morphological Alterations of Central Nervous System (CNS) Myelin in Vanadium (V)-Exposed Adult Rats. *Drug and Chemical Toxicology*, 27(3), 281–293. <https://doi.org/10.1081/DCT-120037747>



- Giannakopoulos, P., Herrmann, F. R., Bussiere, T., Bouras, C., Kovari, E., Perl, D. P., Morrison, J. H., Gold, G., & Hof, P. R. (2003). Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurology*, *60*(9), 1495–1500. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000063311.58879.01>
- Goedert, M., & Spillantini, M. G. (1990). Molecular neuropathology of Alzheimer's disease: In situ hybridization studies. *Cellular and Molecular Neurobiology*, *10*(1), 159–174. <https://doi.org/10.1007/BF00733642>
- Gouras, G. K., Tsai, J., Naslund, J., Vincent, B., Edgar, M., Checler, F., Greenfield, J. P., Haroutunian, V., Buxbaum, J. D., Xu, H., Greengard, P., & Relkin, N. R. (2000). Intraneuronal A $\beta$ 42 Accumulation in Human Brain. *The American Journal of Pathology*, *156*(1), 15–20. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64700-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64700-1)
- Gray, J. A., & McNaughton, N. (2003). *The Neuropsychology of Anxiety*. Oxford Psychology Series.
- Greenberg, S. M., Bacskai, B. J., Hernandez-Guillamon, M., Pruzin, J., Sperling, R., & van Veluw, S. J. (2020). Cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer disease — one peptide, two pathways. *Nature Reviews Neurology*, *16*(1), 30–42. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0281-2>
- Gu, Y., Oyama, F., & Ihara, Y. (1996). TAU is Widely Expressed in Rat Tissues. *Journal of Neurochemistry*, *67*(3), 1235–1244. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1996.67031235.x>
- H. Ferreira-Vieira, T., M. Guimaraes, I., R. Silva, F., & M. Ribeiro, F. (2016). Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Current Neuropharmacology*, *14*(1), 101–115. <https://doi.org/10.2174/1570159X13666150716165726>
- Hackett, M. J., Hollings, A., Caine, S., Bewer, B. E., Alaverdashvili, M., Takechi, R., Mamo, J. C. L., Jones, M. W. M., de Jonge, M. D., Paterson, P. G., Pickering, I. J., & George, G. N. (2019). Elemental characterisation of the pyramidal neuron layer within the rat and mouse hippocampus. *Metallomics*, *11*(1), 151–165. <https://doi.org/10.1039/C8MT00230D>
- Hampel, H., Mesulam, M.-M., Cuellar, A. C., Khachaturian, A. S., Vergallo, A., Farlow, M. R., Snyder, P. J., Giacobini, E., & Khachaturian, Z. S. (2018). REVISITING THE CHOLINERGIC HYPOTHESIS IN ALZHEIMER'S DISEASE: EMERGING EVIDENCE FROM TRANSLATIONAL AND CLINICAL RESEARCH. *The Journal Of Prevention of Alzheimer's Disease*, 1–14. <https://doi.org/10.14283/jpad.2018.43>
- Hanger, D. P., Anderton, B. H., & Noble, W. (2009). Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends in Molecular Medicine*, *15*(3), 112–119. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2009.01.003>
- Hanger, D. P., Seereeram, A., & Noble, W. (2009). Mediators of tau phosphorylation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Expert Review of Neurotherapeutics*, *9*(11), 1647–1666. <https://doi.org/10.1586/ern.09.104>
- Hansen, D. v., Hanson, J. E., & Sheng, M. (2018). Microglia in Alzheimer's disease. *Journal of Cell Biology*, *217*(2), 459–472. <https://doi.org/10.1083/jcb.201709069>
- Hardy, J. A., & Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's Disease: The Amyloid Cascade Hypothesis. *Science*, *256*(5054), 184–185. <https://doi.org/10.1126/science.1566067>
- Hartley, T., Lever, C., Burgess, N., & O'Keefe, J. (2014). Space in the brain: how the hippocampal formation supports spatial cognition. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *369*(1635), 20120510. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0510>
- Hermes, J., & Dorostkar, M. M. (2016). Dendritic Spine Pathology in Neurodegenerative Diseases. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, *11*(1), 221–250. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012615-044216>

- Herzog, A. G., & Kemper, T. L. (1980). Amygdaloid Changes in Aging and Dementia. *Archives of Neurology*, 37(10), 625–629. <https://doi.org/10.1001/archneur.1980.00500590049006>
- Holtzman, D. M., Mandelkow, E., & Selkoe, D. J. (2012). Alzheimer Disease in 2020. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(11), a011585–a011585. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011585>
- Hosseini, M.-J., Shaki, F., Ghazi-Khansari, M., & Pourahmad, J. (2013). Toxicity of vanadium on isolated rat liver mitochondria: a new mechanistic approach. *Metallomics*, 5(2), 152. <https://doi.org/10.1039/c2mt20198d>
- Hotulainen, P., & Hoogenraad, C. C. (2010). Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *Journal of Cell Biology*, 189(4), 619–629. <https://doi.org/10.1083/jcb.201003008>
- Huyer, G., Liu, S., Kelly, J., Moffat, J., Payette, P., Kennedy, B., Tsapralis, G., Gresser, M. J., & Ramachandran, C. (1997). Mechanism of inhibition of protein-tyrosine phosphatases by vanadate and pervanadate. *The Journal of biological chemistry*, 272(2), 843–851. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.2.843>
- INCHEM. (2001). *VANADIUM PENTOXIDE AND OTHER INORGANIC VANADIUM COMPOUNDS*. <https://Inchem.Org/Documents/Cicads/Cicads/Cicad29.Htm>.
- Iqbal, K., del C. Alonso, A., Chen, S., Chohan, M. O., El-Akkad, E., Gong, C.-X., Khatoon, S., Li, B., Liu, F., Rahman, A., Tanimukai, H., & Grundke-Iqbal, I. (2005). Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1739(2–3), 198–210. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2004.09.008>
- Iqbal, K., & Grundke-Iqbal, I. (2007). Alzheimer Review Series: Alzheimer neurofibrillary degeneration: significance, etiopathogenesis, therapeutics and prevention. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 12(1), 38–55. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00225.x>
- Jang, W. Y., Lee, B.-R., Jeong, J., Sung, Y., Choi, M., Song, P., Kim, H., Jang, S., Kim, H., Joo, K.-I., Lee, J.-W., Choo, Y. S., Kim, E., & Ryoo, Z. Y. (2017). Overexpression of serum amyloid a 1 induces depressive-like behavior in mice. *Brain Research*, 1654, 55–65. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.09.003>
- Jankowsky, J. L., Slunt, H. H., Gonzales, V., Savonenko, A. v, Wen, J. C., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Younkin, L. H., Lester, H. A., Younkin, S. G., & Borchelt, D. R. (2005). Persistent Amyloidosis following Suppression of A $\beta$  Production in a Transgenic Model of Alzheimer Disease. *PLoS Medicine*, 2(12), e355. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0020355>
- Jellinger, K. A. (2013). *The Relevance of Metals in the Pathophysiology of Neurodegeneration, Pathological Considerations* (pp. 1–47). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410502-7.00002-8>
- Josephs, K. A., Dickson, D. W., Tosakulwong, N., Weigand, S. D., Murray, M. E., Petrucelli, L., Liesinger, A. M., Senjem, M. L., Sychalla, A. J., Knopman, D. S., Parisi, J. E., Petersen, R. C., Jack, C. R., & Whitwell, J. L. (2017). Rates of hippocampal atrophy and presence of post-mortem TDP-43 in patients with Alzheimer's disease: a longitudinal retrospective study. *The Lancet Neurology*, 16(11), 917–924. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30284-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30284-3)
- Korbecki, J., Baranowska-Bosiacka, I., Gutowska, I., & Chlubek, D. (2015). Vanadium Compounds as Pro-Inflammatory Agents: Effects on Cyclooxygenases. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), 12648–12668. <https://doi.org/10.3390/ijms160612648>
- LaFerla, F. M., & Green, K. N. (2012). Animal Models of Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(11), a006320–a006320. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006320>

- Lee, J.-R. (2015). Protein tyrosine phosphatase PTPRT as a regulator of synaptic formation and neuronal development. *BMB Reports*, 48(5), 249–255. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2015.48.5.037>
- Li, H., Zhou, D., Zhang, Q., Feng, C., Zheng, W., He, K., & Lan, Y. (2013). Vanadium exposure-induced neurobehavioral alterations among Chinese workers. *NeuroToxicology*, 36, 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2013.02.008>
- Lindwall, G., & Cole, R. D. (1984). Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. *The Journal of Biological Chemistry*, 259(8), 5301–5305.
- Liochev, S. I., & Fridovich, I. (1990). Vanadate-stimulated oxidation of NAD(P)H in the presence of biological membranes and other sources of O<sub>2</sub><sup>-</sup>. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 279(1), 1–7. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(90\)90454-7](https://doi.org/10.1016/0003-9861(90)90454-7)
- Liu, R.-M., Chong, Z., & Chen, J.-C. (2020). Ozone and Particulate Matter Exposure and Alzheimer's Disease: A Review of Human and Animal Studies. *Journal of Alzheimer's Disease*, 76(3), 807–824. <https://doi.org/10.3233/JAD-200435>
- Malia, T. J., Teplyakov, A., Ernst, R., Wu, S., Lacy, E. R., Liu, X., Vandermeeren, M., Mercken, M., Luo, J., Sweet, R. W., & Gilliland, G. L. (2016). Epitope mapping and structural basis for the recognition of phosphorylated tau by the anti-tau antibody AT8. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 84(4), 427–434. <https://doi.org/10.1002/prot.24988>
- Matsuda, H. (2016). MRI morphometry in Alzheimer's disease. *Ageing Research Reviews*, 30, 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.01.003>
- Mayeux, R., & Stern, Y. (2012). Epidemiology of Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(8), a006239–a006239. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006239>
- McMillan, P., Korvatska, E., Poorkaj, P., Evstafjeva, Z., Robinson, L., Greenup, L., Leverenz, J., Schellenberg, G. D., & D'Souza, I. (2008). Tau isoform regulation is region- and cell-specific in mouse brain. *The Journal of Comparative Neurology*, 511(6), 788–803. <https://doi.org/10.1002/cne.21867>
- Merino-Serrais, P., Benavides-Piccione, R., Blazquez-Llorca, L., Kastanauskaite, A., Rábano, A., Avila, J., & DeFelipe, J. (2013). The influence of phospho-tau on dendritic spines of cortical pyramidal neurons in patients with Alzheimer's disease. *Brain*, 136(6), 1913–1928. <https://doi.org/10.1093/brain/awt088>
- Miller, E. (1971). On the nature of the memory disorder in presenile dementia. *Neuropsychologia*, 9(1), 75–81. [https://doi.org/10.1016/0028-3932\(71\)90064-9](https://doi.org/10.1016/0028-3932(71)90064-9)
- MILLER, E. (1975). Impaired Recall and the Memory Disturbance in Presenile Dementia. *British Journal of Social and Clinical Psychology*, 14(1), 73–79. <https://doi.org/10.1111/j.2044-8260.1975.tb00151.x>
- Montiel-Flores, E., Mejía-García, O. A., Ordoñez-Librado, J. L., Gutierrez-Valdez, A. L., Espinosa-Villanueva, J., Dorado-Martínez, C., Reynoso-Erazo, L., Tron-Alvarez, R., Rodríguez-Lara, V., & Avila-Costa, M. R. (2021). Alzheimer-like cell death after vanadium pentoxide inhalation. *Heliyon*, 7(8), e07856. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07856>
- Morinville, A., Maysinger, D., & Shaver, A. (1998). From Vanadis to Atropos: vanadium compounds as pharmacological tools in cell death signalling. *Trends in Pharmacological Sciences*, 19(11), 452–460. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(98\)01257-7](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(98)01257-7)

- Mukherjee, B., Patra, B., Mahapatra, S., Banerjee, P., Tiwari, A., & Chatterjee, M. (2004). Vanadium—an element of atypical biological significance. *Toxicology Letters*, *150*(2), 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.01.009>
- Murray, M. E., Graff-Radford, N. R., Ross, O. A., Petersen, R. C., Duara, R., & Dickson, D. W. (2011). Neuropathologically defined subtypes of Alzheimer's disease with distinct clinical characteristics: a retrospective study. *The Lancet Neurology*, *10*(9), 785–796. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70156-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70156-9)
- Mussali-Galante, P., Rodríguez-Lara, V., Hernández-Tellez, B., Ávila-Costa, M. R., Colín-Barenque, L., Bizarro-Nevarez, P., Martínez-Levy, G., Rojas-Lemus, M., Piñón-Zarate, G., Saldivar-Osorio, L., Diaz-Beck, P., Herrera-Enríquez, M. A., Tovar-Sánchez, E., & Fortoul, T. I. (2005). Inhaled vanadium pentoxide decrease gamma-tubulin of mouse testes at different exposure times. *Toxicology and Industrial Health*, *21*(7–8), 215–222. <https://doi.org/10.1191/0748233705th232oa>
- Nava Catorce, M., & Gevorkian, G. (2016). LPS-induced Murine Neuroinflammation Model: Main Features and Suitability for Pre-clinical Assessment of Nutraceuticals. *Current Neuropharmacology*, *14*(2), 155–164. <https://doi.org/10.2174/1570159X14666151204122017>
- Navarro, A., Tolivia, J., & Valle, E. del. (1999). Congo Red Method for Demonstrating Amyloid in Paraffin Sections. *Journal of Histotechnology*, *22*(4), 305–308. <https://doi.org/10.1179/his.1999.22.4.305>
- Nechay, B. R. (1984). Mechanisms of Action of Vanadium. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *24*(1), 501–524. <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.24.040184.002441>
- Neff, E. P. (2019). Animal models of Alzheimer's disease embrace diversity. *Lab Animal*, *48*(9), 255–259. <https://doi.org/10.1038/s41684-019-0377-8>
- Ngwa, H. A., Ay, M., Jin, H., Anantharam, V., Kanthasamy, A., & Kanthasamy, A. G. (2017). *Neurotoxicity of Vanadium* (pp. 287–301). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-60189-2\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-319-60189-2_14)
- Ngwa, H., Kanthasamy, A., Anantharam, V., Song, C., Witte, T., Houk, R., & Kanthasamy, A. G. (2009). Vanadium induces dopaminergic neurotoxicity via protein kinase Cdelta dependent oxidative signaling mechanisms: Relevance to etiopathogenesis of Parkinson's disease. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *240*(2), 273–285. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.07.025>
- Nielsen, F. H. (1991). Nutritional requirements for boron, silicon, vanadium, nickel, and arsenic: current knowledge and speculation. *The FASEB Journal*, *5*(12), 2661–2667. <https://doi.org/10.1096/fasebj.5.12.1916090>
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M. P., Golde, T. E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M. P., Akbari, Y., & LaFerla, F. M. (2003a). Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles. *Neuron*, *39*(3), 409–421. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00434-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00434-3)
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M. P., Golde, T. E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M. P., Akbari, Y., & LaFerla, F. M. (2003b). Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles. *Neuron*, *39*(3), 409–421. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00434-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00434-3)
- Olaolorun, F. A., Olopade, F. E., Usende, I. L., Lijoka, A. D., Ladagu, A. D., & Olopade, J. O. (2021). Neurotoxicity of vanadium. In Elsevier Inc. (Ed.), *Advances in Neurotoxicology* (Vol. 5, pp. 299–327). <https://doi.org/10.1016/bs.ant.2021.01.002>
- Paxinos, G., & Watson, C. (2006). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (6th Edition). Elsevier.

- Perl, D. P. (2010). Neuropathology of Alzheimer's Disease. *Mount Sinai Journal of Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine*, 77(1), 32–42. <https://doi.org/10.1002/msj.20157>
- Phelps, E. A. (2004). Human emotion and memory: interactions of the amygdala and hippocampal complex. *Current Opinion in Neurobiology*, 14(2), 198–202. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2004.03.015>
- Praticò D, & Delanty, N. (2000). Oxidative injury in diseases of the central nervous system: focus on Alzheimer's disease. *Am J Med.*, 109(7), 577–585. [https://doi.org/10.1016/s0002-9343\(00\)00547-7](https://doi.org/10.1016/s0002-9343(00)00547-7)
- Ramírez, P., Eastmond, D. A., Laclette, J. P., & Ostrosky-Wegman, P. (1997). Disruption of microtubule assembly and spindle formation as a mechanism for the induction of aneuploid cells by sodium arsenite and vanadium pentoxide. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 386(3), 291–298. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(97\)00018-5](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(97)00018-5)
- Rehder, D. . (2013). Vanadium. Its role for humans.. In D. . Interrelations Between Essential Metal Ions and Human Diseases. Springer (Ed.), *Vanadium. Its role for humans. In: Interrelations Between Essential Metal Ions and Human Diseases*. (pp. 139–169). Rehder, D., 2013. Vanadium. Its role for humans. In: Sigel, A, Sigel, H, Sigel, R (Eds.), *Interrelations Between Essential Metal Ions and Human Diseases*. Springer, Dordrecht, pp. 139–169.
- Rivas-Manzano, P., R.-E. M. M., D. la R.-R. C., R.-V. C., O.-H. R., & T.-R. N. (2021). Argentic staining reveals changes in cerebellar tissue organisation by prenatal glucocorticoid administration in rats. *Histology and Histopathology*, 195–205.
- Rocheffort, N. L., & Konnerth, A. (2012). Dendritic spines: from structure to *in vivo* function. *EMBO Reports*, 13(8), 699–708. <https://doi.org/10.1038/embor.2012.102>
- Roy, A. K., Shehzad, Z., Margulies, D. S., Kelly, A. M. C., Uddin, L. Q., Gotimer, K., Biswal, B. B., Castellanos, F. X., & Milham, M. P. (2009). Functional connectivity of the human amygdala using resting state fMRI. *NeuroImage*, 45(2), 614–626. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2008.11.030>
- Ryan, S. M., & Kelly, Á. M. (2016). Exercise as a pro-cognitive, pro-neurogenic and anti-inflammatory intervention in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Ageing Research Reviews*, 27, 77–92. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.03.007>
- Salcines Gómez, D., & Diego. (2021). *Aplicación de la teoría de grafos al estudio de la enfermedad de Alzheimer*. <http://hdl.handle.net/10902/22756>
- Sanchez, D. J., Colomina, M. T., & Domingo, J. L. (1998). Effects of Vanadium on Activity and Learning in Rats. *Physiology & Behavior*, 63(3), 345–350. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(97\)00433-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(97)00433-2)
- Sasaguri, H., Hashimoto, S., Watamura, N., Sato, K., Takamura, R., Nagata, K., Tsubuki, S., Ohshima, T., Yoshiki, A., Sato, K., Kumita, W., Sasaki, E., Kitazume, S., Nilsson, P., Winblad, B., Saito, T., Iwata, N., & Saido, T. C. (2022). Recent Advances in the Modeling of Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neuroscience*, 16. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.807473>
- Schultz, C., & Engelhardt, M. (2014). *Anatomy of the Hippocampal Formation* (pp. 6–17). <https://doi.org/10.1159/000360925>
- Schwab, C., Steele, J. C., & McGeer, P. L. (1998). Pyramidal neuron loss is matched by ghost tangle increase in Guam parkinsonism-dementia hippocampus. *Acta Neuropathologica*, 96(4), 409–416. <https://doi.org/10.1007/s004010050912>

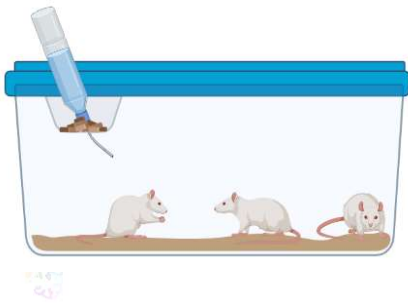


- Ścibior, A., Pietrzyk, Ł., Plewa, Z., & Skiba, A. (2020). Vanadium: Risks and possible benefits in the light of a comprehensive overview of its pharmacotoxicological mechanisms and multi-applications with a summary of further research trends. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 61, 126508. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2020.126508>
- 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>
- Shi, F., Liu, B., Zhou, Y., Yu, C., & Jiang, T. (2009). Hippocampal volume and asymmetry in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: Meta-analyses of MRI studies. *Hippocampus*, 19(11), 1055–1064. <https://doi.org/10.1002/hipo.20573>
- Šimić, G., Babić Leko, M., Wray, S., Harrington, C., Delalle, I., Jovanov-Milošević, N., Bažadona, D., Buée, L., de Silva, R., di Giovanni, G., Wischik, C., & Hof, P. (2016). Tau Protein Hyperphosphorylation and Aggregation in Alzheimer's Disease and Other Tauopathies, and Possible Neuroprotective Strategies. *Biomolecules*, 6(1), 6. <https://doi.org/10.3390/biom6010006>
- Snowdon, D. A. (2003). Healthy Aging and Dementia: Findings from the Nun Study. *Annals of Internal Medicine*, 139(5\_Part\_2), 450. [https://doi.org/10.7326/0003-4819-139-5\\_Part\\_2-200309021-00014](https://doi.org/10.7326/0003-4819-139-5_Part_2-200309021-00014)
- Soazo, M., & Garcia, G. B. (2007). Vanadium exposure through lactation produces behavioral alterations and CNS myelin deficit in neonatal rats. *Neurotoxicology and Teratology*, 29(4), 503–510. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2007.03.001>
- Soria Lopez, J. A., González, H. M., & Léger, G. C. (2019). Alzheimer's disease. In *Handbook of clinical neurology* (Vol. 167, pp. 231–255). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804766-8.00013-3>
- Stern, A., Yin, X., Tsang, S.-S., Davison, A., & Moon, J. (1993). Vanadium as a modulator of cellular regulatory cascades and oncogene expression. *Biochemistry and Cell Biology*, 71(3–4), 103–112. <https://doi.org/10.1139/o93-018>
- Tanzi, R. E. (2012). The Genetics of Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(10), a006296–a006296. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006296>
- Thal, D. R., Griffin, W. S. T., de Vos, R. A. I., & Ghebremedhin, E. (2008). Cerebral amyloid angiopathy and its relationship to Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, 115(6), 599–609. <https://doi.org/10.1007/s00401-008-0366-2>
- Tracey, A. S., W. G. R., & T. E. S. (2007). *Vanadium: chemistry, biochemistry, pharmacology and practical applications*. (CRC press.).
- Ulrich, J. (1993). Histochemistry and Immunohistochemistry of Alzheimer's Disease. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 27(1), IV–63. [https://doi.org/10.1016/S0079-6336\(11\)80065-3](https://doi.org/10.1016/S0079-6336(11)80065-3)
- van Hoesen, G. W., Hyman, B. T., & Damasio, A. R. (1991). Entorhinal cortex pathology in Alzheimer's disease. *Hippocampus*, 1(1), 1–8. <https://doi.org/10.1002/hipo.450010102>
- van Leeuwen, R., & K. M. (2000). Inorganic air pollutants: vanadium. . In R., K. M. van Leeuwen (Ed.), *Inorganic air pollutants: vanadium*. In: Van Leeuwen, R., Krzyzanowski, M. (Eds.), *Air Quality Guidelines for Europe, 2nd. World Health Organization Regional Office for Europe, Copenhagen*, pp. 170–172. WHO Regional Publications. European Series No. 91. (WHORegPubEurSer No91, Vol. 91, pp. 170–172).

- Wang, D.-W., Ding, S.-L., Bian, X.-L., Zhou, S.-Y., Yang, H., & Wang, P. (2021). Diagnostic value of amygdala volume on structural magnetic resonance imaging in Alzheimer's disease. *World Journal of Clinical Cases*, 9(18), 4627–4636. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v9.i18.4627>
- Wang, L., Zang, Y., He, Y., Liang, M., Zhang, X., Tian, L., Wu, T., Jiang, T., & Li, K. (2006). Changes in hippocampal connectivity in the early stages of Alzheimer's disease: Evidence from resting state fMRI. *NeuroImage*, 31(2), 496–504. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2005.12.033>
- Wang, Y., & Mandelkow, E. (2016). Tau in physiology and pathology. *Nature Reviews Neuroscience*, 17(1), 22–35. <https://doi.org/10.1038/nrn.2015.1>
- Weingarten, M. D., Lockwood, A. H., Hwo, S. Y., & Kirschner, M. W. (1975). A protein factor essential for microtubule assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72(5), 1858–1862. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.5.1858>
- West, M. J., Coleman, P. D., Flood, D. G., & Troncoso, J. C. (1994). Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *The Lancet*, 344(8925), 769–772. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(94\)92338-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(94)92338-8)
- Whitwell, J. L. (2018). Alzheimer's disease neuroimaging. *Current Opinion in Neurology*, 31(4), 396–404. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000570>
- Wirth, M., Villeneuve, S., Haase, C. M., Madison, C. M., Oh, H., Landau, S. M., Rabinovici, G. D., & Jagust, W. J. (2013). Associations Between Alzheimer Disease Biomarkers, Neurodegeneration, and Cognition in Cognitively Normal Older People. *JAMA Neurology*. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2013.4013>
- Woodhams, P. L., Celio, M. R., Ulfing, N., & Witter, M. P. (1993). Morphological and functional correlates of borders in the entorhinal cortex and hippocampus. *Hippocampus*, 303–311.
- Yang, Y., & Wang, J.-Z. (2017). From Structure to Behavior in Basolateral Amygdala-Hippocampus Circuits. *Frontiers in Neural Circuits*, 11. <https://doi.org/10.3389/fncir.2017.00086>
- Yoshiyama, Y., Higuchi, M., Zhang, B., Huang, S.-M., Iwata, N., Saido, T. C., Maeda, J., Suhara, T., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M.-Y. (2007). Synapse Loss and Microglial Activation Precede Tangles in a P301S Tauopathy Mouse Model. *Neuron*, 53(3), 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.01.010>
- Yoshiyama, Y., Lee, V. M. Y., & Trojanowski, J. Q. (2013). Therapeutic strategies for tau mediated neurodegeneration. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 84(7), 784–795. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2012-303144>

		
	<p>Standard Operating Procedures Laboratorio de Neuromorfología Claudia Dorado Martínez</p>	

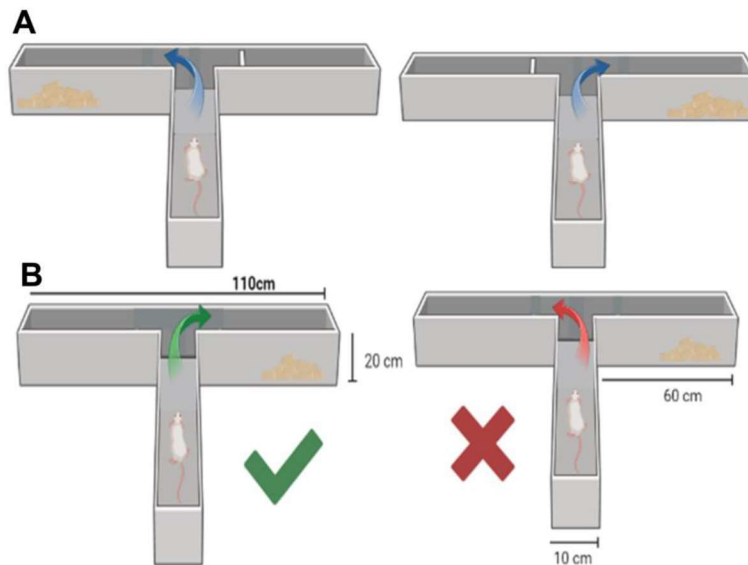
## ALOJAMIENTO DE ANIMALES



Los experimentos se realizaron en ratos macho de la cepa Wistar con un peso inicial de  $180 \pm 20$  g. Fueron mantenidas en condiciones de laboratorio en periodos de 12:12 horas luz/oscuridad con libre acceso al alimento y agua. Los animales fueron mantenidos de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

## CONDUCTA: Laberinto en T para medir memoria espacial.

Equipo. El laberinto está fabricado de PVC gris (la razón para pintar el laberinto gris o negro es que los roedores evitan los lugares brillantes, como los pisos pintados de blanco, un laberinto blanco provocaría ansiedad y la habituación sería más lenta).



Procedimiento

		
	<p>Standard Operating Procedures Laboratorio de Neuromorfología Claudia Dorado Martínez</p>	

1. Tres semanas previas a la primera inhalación, los animales serán entrenados en el Laberinto de "T" efectuado siempre a la misma hora (11:00 A.M) (Deacon y Rawlins, 2006);
2. Habitación. Ponga las manos en el contenedor y acostumbre lentamente a los animales al contacto, coloque sus manos sobre ellos y restrinja el movimiento suavemente. Acostumbre a los animales al alimento. Los roedores desconfían de comer cualquier cosa nueva. A partir de entonces, alimento suficiente para mantener a cada animal al 90-95% de su peso ideal.

▲ **PASO CRÍTICO** Cuanto mejor sea la habitación, menos racionamiento se necesita para que los animales corran bien por el laberinto. Los animales bien entrenados recorrerán el laberinto por recompensa incluso si están saciados con comida de laboratorio.

▲ **PASO CRÍTICO** Si el experimento dura más de una semana y los animales no están completamente desarrollados, asegúrese de que el peso corporal aumenta regularmente, siguiendo una curva de crecimiento normal.

3. Como en cualquier trabajo de conducta, los animales deben estar en un estado óptimo de alerta para las pruebas; déjelos durante 5-10 minutos en el cuarto donde se harán las pruebas. Si realiza la prueba de inmediato, estarán sobreexcitados y no se concentrarán, por el contrario, si se dejan mucho tiempo se irán a dormir y cometerán errores porque solo están medio despiertos.
4. Antes del entrenamiento, los animales deben estar habituados al laberinto en T, esto se hace mejor con las puertas de los brazos abiertas (en un laberinto cerrado), y poniendo un trozo de comida-premio en uno de los brazos. En la primera semana (habitación) cada rata se colocará en el laberinto y permanecerá por cinco minutos, para que el animal explore libremente, cada rata repetirá esta actividad cinco veces, este procedimiento se aplicará con intervalos entre exposiciones de al menos 10 minutos, durante siete días.
5. Entrenamiento. Antes del entrenamiento y la evaluación, todos los animales fueron privados de alimento por 12 horas, intentando que no perdieran más del 10% de su peso inicial.
6. En la segunda semana (adquisición), se entrenó a los animales en el laberinto en T. Cada rata se puso en el extremo largo del laberinto (inicio) y se colocó una puerta bloqueando el brazo opuesto al del entrenamiento (derecha o izquierda). Al 50% de los animales se les puso la comida-premio al final del brazo derecho del laberinto y al otro 50% hacia el final del brazo izquierdo. Cuando el animal hubo consumido toda la recompensa, se le devuelve al brazo de salida y se retira el bloqueo de la puerta, de esta manera la rata pudo elegir alguno de los brazos, si eligió el brazo correcto dele el tiempo necesario para consumir la recompensa, si eligió incorrectamente, asegurarse de que ha descubierto que ese brazo no tiene recompensa. Este proceso tuvo un lapso máximo de 2 minutos, cada rata repitió esta actividad 10 veces, con un intervalo de al menos 10 minutos entre cada intento.

▲ **PASO CRÍTICO** Limpie el laberinto entre ensayos con agua jabonosa, solución de alcohol (10% es común).

7. En la tercera semana se evaluará la memoria espacial (Deacon y Rawlins, 2006), se evaluará cada grupo (derecha e izquierda), cada rata se colocará en el brazo largo (inicio) para dirigirse al brazo

		
	<p>Standard Operating Procedures Laboratorio de Neuromorfología Claudia Dorado Martínez</p>	

correspondiente, cada vez que la rata llegue y consuma la recompensa se contará como acierto, si la rata pone las dos patas delanteras en el brazo correcto se contará como acierto, si se dirige al brazo contrario se contará como error, cada rata tendrá máximo dos minutos para completar la prueba, una vez finalizado el entrenamiento (típicamente dentro de los 4 días del entrenamiento), ambos grupos deberán tener por lo menos el 80% de aciertos para proceder al inicio de la inhalación.

▲ **PASO CRÍTICO** Cada ensayo no debe durar más de 2 minutos. Si los animales no consumen la recompensa rápidamente, no están suficientemente habituados/entrenados/motivados, y el significado de los resultados, será difícil de dilucidar.

▲ **PASO CRÍTICO** Es muy útil medir el tiempo que tarda el animal en correr por el laberinto, como control de posibles efectos sensoriomotores de un tratamiento. La medida más simple es el tiempo desde que el animal se coloca en el área de inicio hasta el criterio seleccionado (ambas patas delanteras) se alcanza.

▲ **PASO CRÍTICO** Durante el entrenamiento, es decir, antes de administrar cualquier tratamiento, si un animal no corre dentro de los 90 s, retírelo e inténtalo de nuevo más tarde.

▲ **PASO CRÍTICO** Para evitar el sesgo del experimentador, es deseable que el experimentador trabaje a ciegas en cuanto a el grupo y la identidad del animal.

8. La primera evaluación se considera el tiempo cero y a partir de ese momento se evalúa cada cuatro semanas cada grupo (control o expuesto a V). Cada animal realizó la prueba 5 veces con un intervalo mínimo de 10 min entre cada prueba.

#### Bibliografía

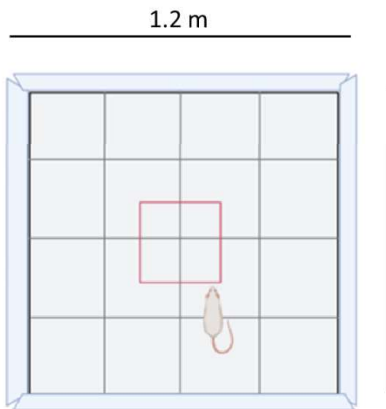
Deacon, R. M., & Rawlins, J. N. (2006). T-maze alternation in the rodent. *Nature protocols*, 1(1), 7–12. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.2>

#### CONDUCTA: Campo Abierto

Equipo



		
	<p>Standard Operating Procedures Laboratorio de Neuromorfología Claudia Dorado Martínez</p>	



#### Procedimiento

1. La prueba se realiza cada mes y consiste en colocar a la rata durante 10 min sobre una superficie de 1.2 x 1.2 m con cuadros en el piso de .3 x .3 m, y se registra las veces que la rata cruza las líneas de los cuadros (exploración), las veces que se yergue, el tiempo que ocupa explorando, las veces que se acicale, el tiempo de freezing, y las veces que defeca en los 10 min. También se registró el patrón de locomoción de la rata en la cuadrícula durante 10 min, el recuadro rojo indica los cuadros centrales.

▲ **PASO CRÍTICO** Es muy importante no alterar la conducta del animal con estresores externos o estímulos novedosos.

#### Bibliografía

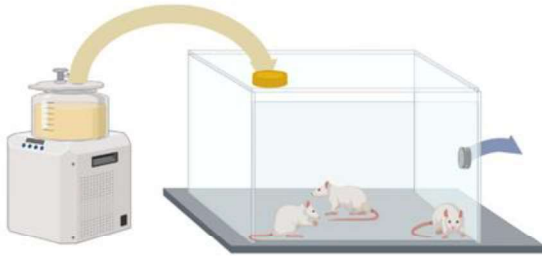
Walsh, R. N., & Cummins, R. A. (1976). The Open-Field Test: a critical review. *Psychological bulletin*, 83(3), 482–504.

#### Inhalación de V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

##### Material

Equipo. Nebulizador ultrasónico tipo hospitalario YUEHUA WH-802.

		
	<p>Standard Operating Procedures Laboratorio de Neuromorfología Claudia Dorado Martínez</p>	



### Procedimiento

Previo a la inhalación en  $V_2O_5$ , la mezcla se deja disolviendo durante 24h.

1. Inhalación  $V_2O_5$  al 0.02M, dentro de una cámara (55 x 40 x 30 cm) de flujo controlado conectada a un nebulizador.
2. Mist volume: médium (2ml/min). Timer 60 min

### Bibliografía

Avila-Costa, M. R., Flores, E. M., Colin-Barenque, L., Ordoñez, J. L., Gutiérrez, A. L., Niño-Cabrera, H. G., Mussali-Galante, P., & Fortoul, T. I. (2004). Nigrostriatal Modifications After Vanadium Inhalation: An Immunocytochemical and Cytological Approach. *Neurochemical Research*, 29(7), 1365–1369. <https://doi.org/10.1023/B:NERE.0000026398.86113.7d>

### Eutanasia por Perfusión

1. Perfusión por vía intracardiaca con solución salina al 0.9% y, posteriormente se les administrará el fijador formaldehído al 10%, se removerán los cerebros para procesarlos con las tinciones argénticas de Bielschowsky, rojo Congo y Golgi.

Solución A) agua destilada 150 ml  
 fosfato monobásico 0.612 g  
 fosfato dibásico 3.534 g  
 cloruro de sodio 0.208 g

### Histología

		
	<p>Standard Operating Procedures Laboratorio de Neuromorfología Claudia Dorado Martínez</p>	



Rojo Congo

Método para la demostración de amiloide en cortes de parafina

Fijación formol buffered

Lavado en agua destilada

Deshidratación con alcoholes, etanol, 30%-100%

Aclaramiento en dos cambios de butil acetato (2-6 hr cada uno)

Infiltrar en mezcla de parafina acetato (1:3, 1:1, 3:1 2 hr y 6 c/u)

3 cambios de parafina pura (2hr y 6 c/u)

Corte a 5-15 m

Montarlos en portas cubiertos en gelatina secados a 36°C x24h

Desparafinado en xileno

Parcialmente hidratados en alcoholes xileno hasta 96% 2 cambios de 2' c/u

Sol A de tinción

Rojo Congo	0.2 gr
Isopropanol	70 ml
Agua destilada	30 ml

Sol B contraste

Treonina	0.01 gr
Cresyl violet	0.01 gr
Methyl green	0.05 gr
Formaldehyde 85%	10 ml
Agua destilada	89.5 ml

		
	<p>Standard Operating Procedures Laboratorio de Neuromorfología Claudia Dorado Martínez</p>	

### Procedimiento

1. Sol A ..... 10 min
2. Lavar bien con agua destilada..... 1 min
3. Sol B..... 1 min
4. Lavado agua destilada..... 9'
5. Lavar bien en etanol al 96%..... 1'
6. deshidratar bien en etanol al 100% ..... 1'
7. Aclarar bien en eucaliptol..... 3'
8. montar

30 min rojo 15 en contraste.

### Tinción argéntica de Bielschowsky

1. El tejido se procesará con la técnica de parafina, en un microtomo de deslizamiento se obtendrán cortes coronales de 6  $\mu\text{m}$  de grosor donde se localicen la región CA1 del hipocampo, el subíulum, la corteza entorrinal, la amígdala y la corteza frontal, posteriormente, se procesarán con la tinción argéntica de Bielschowsky (Rivas-Manzano et al. 2014).
2. Se tomarán diez cortes al azar por cada estructura y se analizarán las características morfológicas intracelulares y extracelulares de las diferentes estructuras cerebrales.

### Impregnación Argéntica de Golgi:

1. El tejido se procesará con la técnica de parafina, en un microtomo de deslizamiento se obtendrán cortes coronales de 120  $\mu\text{m}$  de grosor donde se localicen la región CA1 del hipocampo, el subíulum, la corteza entorrinal, la amígdala y la corteza frontal, los cuales se procesarán mediante la técnica de impregnación Argéntica de Golgi y se realizará el conteo de espinas dendríticas; para el conteo se seleccionarán 5 dendritas secundarias de 10 neuronas y se contarán las espinas en una longitud de 10  $\mu\text{m}$  en cada estructura.

### GELATINIZACIÓN

1. Incluir los portaobjetos en solución etanol ácido acético por dos horas
2. lavar en agua bidestilada tres cambios

		
	<p>Standard Operating Procedures Laboratorio de Neuromorfología Claudia Dorado Martínez</p>	

3. incluir en solución de gelatina una hora dentro del estufa
4. se secan y ponen escurrir luego se meten en la estufa una hora se sacan y se dejan al aire libre hasta que se sequen

### Estadística

Los datos se expresarán como la media más/menos el error estándar; para el análisis conductual se empleará la prueba de Medidas Repetidas y ANOVA. Para los análisis morfológico y bioquímico se empleará ANOVA y la prueba *post hoc* de Tukey, con un valor de significancia de  $p < 0.05$ .

