



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

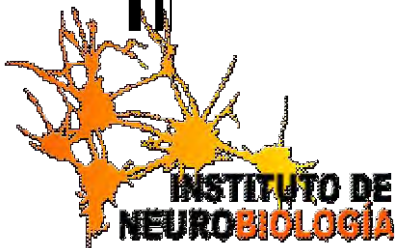
**CARACTERIZACIÓN DE LA DENSIDAD VASCULAR DEL  
HIPOCAMPO Y CORTEZA FRONTAL EN UN MODELO  
TRIPLE TRANSGÉNICO PARA LA ENFERMEDAD DE  
ALZHEIMER**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)**

PRESENTA  
**IRMA ANGÉLICA GONZÁLEZ LUNA**

DIRECTORA DE TESIS  
**DRA. SOFÍA YOLANDA DÍAZ MIRANDA**



Campus Juriquilla, Querétaro, Octubre 2010



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.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

Los miembros del Comité Tutorial certificamos que la tesis elaborada por: Irma Angélica González Luna, cuyo título es: —Caracterización de la densidad vascular del hipocampo y corteza frontal en un modelo triple transgénico para la Enfermedad de Alzheimer” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

**Presidente**

Dr. Manuel Salas Alvarado

**Secretaria (Tutora)**

Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda

**Vocal**

Dra. Esperanza Meléndez Herrera

**Suplente**

Dra. Elisa Hortensia Tamariz Domínguez

**Suplente**

Dr. Víctor Ramírez Amaya

Aprobado por el Comité Académico

---

Dra. María Teresa Morales Guzmán  
Coordinadora del Programa

## **AGRADECIMIENTOS**

---

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de este proyecto No: 221008.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM, Becario No: 94253342.

A la Universidad de Irving en California, EUA, por la donación del ratón triple transgénico (3xTg-AD) a través de la Dra. Hilda Martínez Coria, al Dr. Salvatore Oddo y al Dr. Frank LaFerla.

A la Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda por todo su apoyo, comprensión y sus palabras de aliento, por creer en mí, muchas gracias.

A la M. en C. Azucena Ruth Aguilar Vázquez por su asesoría y apoyo técnico, por la serenidad y paz que transmites. A la Lic. en Psic. Tonantzin V. Pineda Martínez por su apoyo técnico, por su exacerbado pesimismo, sonríte más cebolla, no es tan difícil.

A mi Comité Tutorial Dra. Elisa H. Tamáriz Domínguez y a la Dra. Magda Giordano Noyola por todo su apoyo, por sus claras y valiosas críticas, por sus aportaciones a este proyecto, muchas gracias.

Al Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina, Dra. Esperanza Meléndez Herrera y la Biomédica Danna Colín Castelán por el apoyo en el procesamiento de las muestras, por su gran paciencia y disposición siempre, muchas gracias.

Al Dr. Víctor Ramírez Amaya por permitir el uso del microscopio para la toma de las fotografías. A Jimena Sandoval y en especial a Edgar Morales por su enorme disposición siempre y por la asesoría en manejo de imágenes y estadística.

A la Dra. Anaid Antaramián y a la M. en C. Adriana González de la Unidad de Proteogenómica, por compartir su conocimiento en la realización de los PCR.

A Nancy Lorena Ortíz Martínez de la Unidad de Computo por su enorme apoyo y disposición en el mantenimiento del equipo de trabajo.

A Nidia Hernández Ríos de la Unidad de Microscopía por su apoyo en la toma de imágenes.

Al MVZ. Martín García por su gran trabajo y paciencia en el cuidado de los ratoncitos.

A la M en C. Leonor Casanova Rico porque siempre busca la manera de hacernos la vida más fácil en ese mundo engorroso de los trámites, muchas gracias.

Al MVZ. Román Pacheco Barrita por estar siempre dispuesto a ayudar, por recibirme siempre con una enorme sonrisa al entrar a la biblioteca.

A todos los miembros del laboratorio, Uri por toda la ayuda que siempre me diste y por transmitir tu amor por el conocimiento, por ser como eres. Vicentico gracias por estar siempre dispuesto a ayudar, por tus gruñidos. Diduchas por todos esos ratos de chal tan buenos pa'l espíritu. Doña Paty por tu constante sed de conocimiento. Memito por ser tan correctamente gracioso. Leslie, por tu hermosa sonrisa. Ivett, por tu disposición siempre. A Jaime, Alex, Piñita, la sobrina Yarel, los monstruos, Rodri, Margara. Michelle, Brenda, en fin... a todos por estos años de trabajo bañado de alegrías, tristezas, llantos, carcajadas, sonrisas y angustias, pero sobre todo porque aprendí mucho de cada uno de ustedes y todos dejaron algo en mí que permanecerá para siempre.

A mis amigas de la maestría, Candinaaa!!! Gracias por estar siempre dispuesta a ayudarme, por tus fabulosas nemotécnicas, por tus histerias, por tu lucha constante, porque nunca te das por vencida, por ser verde. Ximeniux!!! Por tu sentido del humor, ¡Ah cómo me rió contigo mujer! Por tu fuerza, brillo e independencia. Angèlic!!! Gracias por tu exquisito sentido del humor, por tu hermosa sonrisa, porque siempre, aún en las mejores situaciones tenías algún reproche. A las tres por esas noches de estudio tan divertidas, porque hicieron de esta etapa tan difícil para mi algo verdaderamente disfrutable, las voy a extrañar mucho y las quiero más! A Carito, por tu ejemplo de dedicación, por tu sencillez. A Deivid, George, Lalo, Pepe, Oli, Mariana, Ericka, Haidée, Lenin, Norma, Alberto, a todos gracias por compartir esta etapa conmigo.

***A mi hija Paula Fernanda,  
la luz que cambió mi vida y mi razón  
para seguir soñando.***

**DEDICATORIAS**

---

A mis padres, por inculcarme desde pequeña el gusto por aprender. Papá, gracias por enseñarme con el ejemplo que el poner lo mejor de nosotros en cada una de las cosas que hacemos por pequeñas que sean, hace la diferencia, porque con tus exigencias me has enseñado tanto. Mamá, por ese gusto enorme de prodigar amor en todo lo que haces, por tus palabras amorosas, por consentirme con tu deliciosa comida, por tu apoyo incondicional, por tu olorcito divino. A los dos porque siempre han estado conmigo dándome todo su apoyo, su amor y sus regaños que me han hecho lo que soy ahora, gracias por enseñarme con el ejemplo que el trabajo, la honestidad, la humildad y el respeto nos abren camino a dónde quiera que vayamos. Los amo mucho.

A Gerardo, mi bolillo. ¡Ay corazón, tengo tanto que agradecerte! En primera por aceptarme como soy, por traer tanta luz a mi vida, por apoyarme siempre en mis decisiones y en especial en este deseo mío aún a costa de tu tiempo y tu trabajo, sin ti esto habría sido un desastre. Porque siempre tienes la palabra correcta para hacerme reír en las peores situaciones, por tus hermosos ojos. Gracias amor, te amo.

A Paula mi cucharilla, te amo con todo mi corazón, gracias por ceder tu tiempo con mami para que yo lograra mi deseo. Por iluminar mis días con tu hermosa sonrisa y tus ojos de hormiga, por ser una humanita tan chistosa, por tu libertad y sed de conocer el mundo.

A mis hermanas, Andrea-mi gorda y Silvia-insecto palo porque siempre me apoyaron, por estar conmigo en las buenas y en las malas, porque sé que están ahí. Gracias por compartir la vida conmigo. Las amo mucho.

A la Pelona por dejarme ver esos ojitos de capulín todos los días, por enseñarme tanto con tu existencia. A Petu, por tu desapego, por ser tan burris y aún así darte tanto a querer. A la chapi. A mi Titi y Negra dónde quiera que estén ahora.

## **RESUMEN**

---

Debido a la relevancia de la enfermedad de Alzheimer (EA) en la salud pública mundial, se han desarrollado diversos modelos murínidos que intentan replicar la enfermedad. Tal es el caso del Modelo Triple Transgénico para la Enfermedad de Alzheimer (3xTg-AD, el cual es —knock-in” para PS1<sub>M146V</sub> APP<sub>Swe</sub> y tau<sub>P3001</sub>), diseñado por Oddo et al. (2003), siendo actualmente el modelo más parecido al desarrollo de la EA en humanos, presentando placas amiloides e hiperfosforilación de tau en regiones cerebrales relevantes para la EA, y correlacionándose conductualmente con deterioro cognitivo y pérdida de la memoria. La EA es una enfermedad multifactorial, en la que se relacionan alteraciones de origen genético, oxidativo, inflamatorio y vascular. En relación a la hipótesis vascular, diferentes reportes en cerebros humanos y de ratones transgénicos han demostrado anormalidades vasculares que consisten en adelgazamiento de la membrana basal, deposición de colágeno, degeneración de pericitos y distorsión del lumen vascular (De la Torre, 2000; Farkas E, 2001). La relevancia de este estudio radica en la determinación de los cambios en la densidad vascular en este modelo 3xTg-AD dados a través del tiempo y apoyar desde el punto de vista anatómico la hipótesis vascular. Así pues, el objetivo de este trabajo fue de caracterizar la densidad vascular de zonas relevantes para la integración de la memoria como el hipocampo y la corteza frontal mediante la técnica de Azul de Evans que evidencia la vasculatura por su afinidad a la albúmina sérica, para lo cual se compararon grupos de ratones machos 3xTg-AD de 2 y 10 meses de edad (c/u 5 individuos), con sus respectivos controles de la cepa 129/C57BL/6. Al realizar el análisis estadístico aplicando un ANOVA de 2 vías y la prueba *post-hoc* de Fisher se encontró disminución en la densidad vascular ( $P < 0.001$ ) en la corteza frontal en el grupo transgénico de 2 y 10 meses de edad en comparación con los silvestres. En el hipocampo a los 2 meses de edad hay disminución significativa ( $P = 0.0009$ ), mientras que en el hipocampo a los 10 meses de edad no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Estos resultados indican que el desarrollo de susceptibilidad vascular se da de manera temprana en áreas como la corteza frontal y el hipocampo, que funcionalmente se asocian a la pérdida de la memoria por el Alzheimer.

## **ABSTRACT**



Because the relevance of Alzheimer's disease (AD) in global public health, there have been developed several models to attempt replicate this disease. Such is the case of Alzheimer's Disease Triple Transgenic Model (3xTg-AD, which is "knock-in" to PS1M146V APPSwe and tauP3001), designed by Oddo et al. (2003), this model presents the amyloid plaques and tau hyperphosphorylation in brain regions relevant to AD, in addition to behaviorally correlated with cognitive impairment and memory loss. AD is a multifactorial disease, related with genetic alterations, oxidative, inflammatory and vascular, among others. In relation to the vascular hypothesis, several reports in human brains and transgenic mice have demonstrated vascular abnormalities consisting in a basement membrane thinning, deposition of collagen, degeneration of pericytes and vascular lumen distortion (De la Torre, 2000, Farkas E , 2001). The aim of this study was to characterize the vascular density in relevant areas of the memory integration as the hippocampus and frontal cortex in this model 3xTg-AD by Evans Blue technique that shows the vasculature by their affinity to serum albumin, for which groups of male mice compared 3xTg-AD 2 and 10 months of age (each five individuals) with their respective controls 129/C57BL/6 strain of the same age. The results of statistical analysis using a 2-way ANOVA and post-hoc test of Fisher shows a decreased vascular density ( $P < 0.001$ ) in the frontal cortex of the transgenic group 2 and 10 months of age compared with the wild. In the hippocampus at 2 months of age there is a significant decrease at  $P = 0.0009$ , while the hippocampus at 10 months of age showed no statistically significant differences. These results indicate the development of vascular susceptibility occurs in an early stage in areas such as cortex and hippocampus, which is functionally associated with memory loss of Alzheimer's.

## ÍNDICE

---

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	2
2.1 La enfermedad de Alzheimer.....	2
2.2 Clasificación de la enfermedad de Alzheimer.....	3
<b>3. ANATOMÍA DEL HIPOCAMPO Y CORTEZA FRONTAL</b> .....	4
3.1 Hipocampo.....	4
3.2 Corteza frontal.....	6
<b>4. VASCULATURA</b> .....	9
4.1 Vasculogénesis .....	9
4.2 Angiogénesis.....	10
4.3 Funciones y Anatomía del sistema vascular.....	11
4.4 Vasculatura cerebral del ratón.....	13
4.4.1 Arterias.....	13
4.4.2 Venas.....	16
4.4.3 Capilares.....	16
4.4.4 Barrera hematoencefálica.....	16
<b>5. ETIOPATOGENIA DE LA ENFERMEDAD</b> .....	18
5.1 Edad.....	18
5.2 Predisposición genética.....	19
<b>6. VASCULATURA Y ENFERMEDAD DE ALZHEIMER</b> .....	21
6.1 Disfunción vascular, cognición y Alzheimer.....	21
6.2 Angiopatía cerebral amiloide.....	24
<b>7. DESARROLLO DEL MODELO TRIPLE TRANSGÉNICO PARA LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER (3x-Tg-AD)</b> .....	25
7.1 Construcción del modelo 3xTg-AD.....	25
7.2 Neuropatología de la enfermedad en el modelo 3xTg-AD.....	26
<b>8. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO</b> .....	27
<b>9. HIPÓTESIS</b> .....	28
<b>10. OBJETIVOS</b> .....	28
<b>11. SUJETOS, MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	28
11.1 Sujetos.....	28

11.2 Genotipificación.....	30
11.2.1 Extracción de ADN.....	30
11.2.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	30
11.2.3 PCR para detectar la presencia del gen de la Proteína Precursora de Amiloide (APP) y de la proteína Tau y la mutación en gen de Presinilina 1 (PS1) .....	31
11.3 Inmunohistoquímica.....	32
11.3.1 Procedimiento.....	33
11.4 Azul de Evans.....	34
11.4.1 Procedimiento.....	34
<b>12. RESULTADOS.....</b>	<b>35</b>
12.1 Genotipificación.....	35
12.2 Inmunohistoquímica.....	37
12.2.1 Observaciones cualitativas.....	37
12.3 Azul de Evans.....	41
12.3.1 Observaciones cualitativas de la vascularidad.....	41
12.3.2 Análisis de características físicas.....	43
12.3.3. Análisis de la densidad vascular.....	48
<b>13. DISCUSIÓN.....</b>	<b>50</b>
<b>14. CONCLUSIONES.....</b>	<b>58</b>
<b>15. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>59</b>
<b>16. FIGURAS.....</b>	<b>68</b>
<b>17. ANEXO.....</b>	<b>69</b>



## 1. INTRODUCCIÓN

---

Actualmente, la Enfermedad de Alzheimer (EA) afecta a más de 20 millones de personas y dado el envejecimiento progresivo de la población, se estima que esta cifra llegará a los 40 millones de afectados en el año 2040 (Zacchigna et al., 2008). La EA se caracteriza por: formación de placas seniles compuestas por agregados del péptido  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ), redes neurofibrilares de proteína tau hiperfosforilada, degeneración neuronal, pérdida de sinapsis y gliosis reactiva, que se correlacionan con un deterioro cognitivo y pérdida de la memoria (Rogawski et al., 2003; Bojarzki et al., 2007). Oddo et al. (2003) desarrollaron el Modelo Triple Transgénico de la Enfermedad de Alzheimer (3xTg-AD, el cual es —knock-in” para  $PS1_{M146V}$   $APP_{Swe}$  y  $tau_{P3001}$ ), siendo este el primer modelo en desarrollar las placas amiloides y la hiperfosforilación de tau en regiones cerebrales relevantes para la EA como el hipocampo y la corteza cerebral entre otras. Dentro de las diversas hipótesis que han surgido para explicar el origen de la enfermedad, la hipótesis vascular ha cobrado importancia porque se ha sugerido que lesiones cerebrovasculares incrementan el riesgo de padecer la EA (Jellinger, 2002). Como la Angiopatía Cerebral Amiloide (CAA por sus siglas en inglés), la cual se presenta en casi el 98% de los casos de EA, provocando hemorragias cerebrales, microhemorragias, microinfartos o lagunas isquémicas. La relevancia del estudio es evaluar la relación existente entre la EA y las alteraciones vasculares en este modelo, siendo el objetivo caracterizar la densidad vascular del hipocampo y la corteza frontal de ratones 3xTg-AD en una etapa previa al establecimiento de los signos patológicos (2 meses) y otra cuando ya están establecidos (10 meses). Para lograr esto, los vasos sanguíneos en ambas edades fueron marcados mediante la inyección supravital del colorante Azul de Evans cuyos resultados fueron analizados estadísticamente aplicando un ANOVA de 2 vías y la prueba *post-hoc* de Fisher, en donde se encontró disminución significativa en la densidad vascular de la corteza frontal en los grupos transgénicos de 2 y 10 meses de edad y en el hipocampo a los 2 meses de edad en comparación con sus respectivos grupos control. Estos resultados indican el desarrollo de susceptibilidad temprana vascular en áreas como la corteza y el hipocampo, que funcionalmente se asocian a la pérdida de la memoria por la EA.

## 2. ANTECEDENTES

---

### 2.1 La Enfermedad de Alzheimer

La EA es la etiología más común de demencia siendo una patología dependiente de la edad, neurodegenerativa e irreversible. Afecta principalmente a personas de edad avanzada (por encima de los 65 años), siendo en su mayoría mujeres. La EA es considerada como la cuarta causa de muerte en países desarrollados, lo que ha desencadenado en la última década grandes esfuerzos orientados a determinar su etiopatogenia, diagnóstico y tratamiento (Guimerà et al., 2002).

En primera instancia la manifestación del deterioro cognitivo en la EA parece ser el resultado de la pérdida neuronal progresiva y ordenada en áreas cerebrales involucradas en la memoria como lo son el hipocampo, el *subiculum*, la amígdala y las áreas de asociación neocorticales como la corteza prefrontal, provocando esto, pérdida de la capacidad lingüística, deterioro en el razonamiento, cambios de personalidad, problemas con el pensamiento abstracto y trastornos del sueño entre otros (Varela et al., 2005). Finalmente, se ven afectadas muchas otras regiones cerebrales llevando a conductas erráticas como la incontinencia urinaria, agresividad, además de confinación en cama y aislamiento del mundo exterior. Su evolución es variable, pero, por término medio la supervivencia después del diagnóstico es de 8 a 10 años<sup>1</sup> (Guimerà et al., 2002).

Estudios histopatológicos realizados en cerebros de pacientes afectados por la EA muestran signos patognomónicos bien establecidos, como la formación de placas neuríticas difusas compuestas por  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) y la formación de redes neurofibrilares constituidas por agregados filamentosos de proteína tau hiperfosforilada; lo cual se correlaciona con la pérdida de la memoria y el deterioro cognitivo (Rogawski et al., 2003; Bojarzki et al., 2007). Además, pérdida neuronal, degeneración y pérdida

---

<sup>1</sup> <http://www.alzheimers.org>

de terminales pre y postsinápticas, y gliosis reactiva, los cuales revelan que la progresión del deterioro cognitivo en la EA se deben principalmente a la pérdida de sinapsis (Mattson et al., 1998).

## **2.2 Clasificación de la enfermedad de Alzheimer**

De acuerdo al DSM-IV (Manual Diagnóstico y Estadístico de Desórdenes Mentales – IV) los “desórdenes mentales orgánicos” han sido agrupados en tres secciones:

- 1) Delirio, Demencia, Amnesia y Otros Desórdenes Cognitivos
- 2) Desórdenes Mentales Debidos a Condiciones Médicas Generales
- 3) Desórdenes Relacionados con Sustancias

La EA está incluida en el primer punto de esta clasificación, la cual marca que las características esenciales de una demencia son: 1) El desarrollo de múltiples deficiencias cognitivas que incluyen deterioro de la memoria, y 2) La presencia de por lo menos uno de los siguientes disturbios: afasia, apraxia, agnosia o trastornos en la función ejecutiva. Las deficiencias cognitivas deben ser suficientemente severas para causar deterioro en las habilidades sociales y laborales y pueden incluir decremento de las funciones visoespaciales, pérdida de la memoria, motivación para emprender nuevas actividades, comportamiento violento, comportamiento desinhibido, indiferencia en la higiene personal, ansiedad, disturbios del sueño, pudiendo presentarse alucinaciones.

Dentro de este punto las demencias son también clasificadas por su etiología: Demencia tipo Alzheimer, Demencia Vascular, Demencia debido a otras Condiciones Médicas Generales (demencia por Virus de Inmunodeficiencia Humana, trauma craneoencefálico, Enfermedad de Parkinson, Enfermedad de Huntington, Enfermedad de Pick, Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob), Demencia persistente inducida por Sustancias (debida al abuso de drogas, medicación o exposición a toxinas), Demencia debida a Etiologías múltiples, o Demencia no específica (si la etiología es indeterminada).

### 3. ANATOMÍA DE HIPOCAMPO Y CORTEZA FRONTAL

---

#### 3.1 Hipocampo

Embriológicamente el hipocampo se desarrolla a partir de la pared media de la vesícula telencefálica. La formación hipocampal es desplazada medial y ventralmente dentro de la porción inferior del ventrículo lateral, llegando en los roedores a localizarse en el lóbulo temporal para ser una estructura elongada rostro-caudal en forma de —C que se ubica desde el núcleo septal sobre y por debajo del diencefalo. Con su gran eje corre en dirección septo-temporal (Paxinos & Watson, 2004; Andersen et al., 2007). El hipocampo se divide en tres campos diferentes según las células presentes y su tamaño: los cuernos de Ammón (*cornu ammonis*) CA1, CA2 y CA3.

En el hipocampo las neuronas de proyección (Golgi tipo I) son las piramidales y las células granulares localizadas en CA1, CA3 y área dentata (aunque estas últimas no salen de la estructura). Las interneuronas (Golgi tipo II) también están presentes en cada área o campo y en particular en la región del *hilus*, donde presentan diversidad de formas y son especialmente abundantes las neuronas GABAérgicas (Amaral & Witter, 1989). Sus células se organizan en capas laminares (*strata*) de fibras aferentes que establecen diversas conexiones. Estas van de la parte externa a la interna del hipocampo y son: 1) el *stratum alveole* (ALV), 2) *stratum oriens* o capa polimorfa (OR), 3) *stratum pyramidale* (P), 4) *stratum radiatum* (RAD) y, 5) *stratum lacunosum moleculare* (LAC-MOL) (Amaral & Witter, 1989). El giro dentado también tiene tres láminas y se distingue del hipocampo en que en lugar de tener células piramidales, existen en él células granulares (Figura 1).

El hipocampo juega un papel importante en el procesamiento de información y subsecuente regulación de la conducta. Se sabe por experimentos con lesiones y tareas conductuales, que el hipocampo dorsal tiene un papel preferencial en el aprendizaje espacial y la memoria (Laberinto de Morris), y que el hipocampo ventral

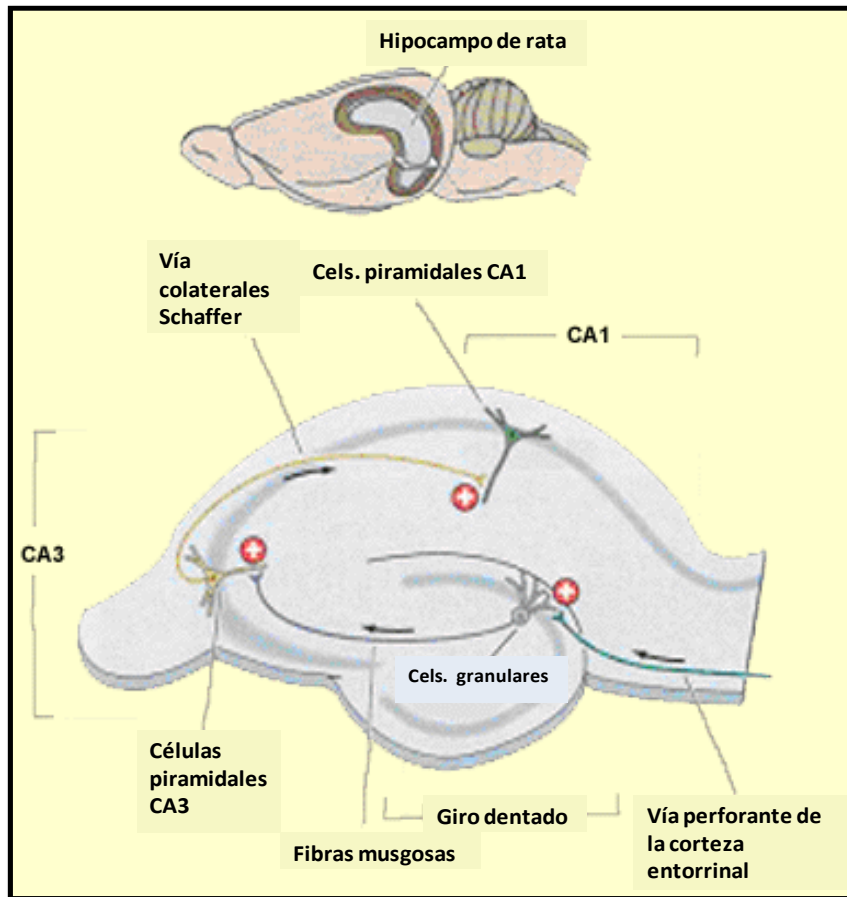


tiene preferencia en el comportamiento relacionado con la ansiedad y el miedo (evitación inhibitoria). Estos roles son enteramente consistente con las relaciones anatómicas del hipocampo puesto que la mayoría de la entrada de información visuoespacial que viene de áreas corticales sensoriales primarias, corteza de asociación y áreas entorrinal y perirrinal llega a la parte dorsal del hipocampo. La entrada sensorial (tal como la entrada olfativa) está más uniformemente distribuída a lo largo de la extensión dorsoventral del hipocampo. En constraste, la región ventral proyecta a la corteza prefrontal y está cercanamente conectado al núcleo de la cama de la estría terminal y a la amígdala, así como con estructuras subcorticales las cuales están asociadas con el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal. Esta fuerte conectividad entre el hipocampo ventral y ambos, el hipotálamo y la amígdala, llevan a proponer un papel importante de esta región en la ansiedad y/o el miedo por modulación en la transmisión dopaminérgica en la corteza prefrontal medial (Bannerman et al., 2004).

Sin embargo, el hipocampo cobra importancia en 1957 cuando Scoville & Milner describen su papel en la organización de la memoria con el caso HM<sup>2</sup>, al que después de una resección bilateral del hipocampo presentó pérdida de la capacidad de recordar acontecimientos recientes, conservando la memoria retrógrada, pero sin presentar déficit intelectual. Así también hay estudios clínicos en los cuales se demuestra que la isquemia del hipocampo conduce a profundo déficit de memoria; esas observaciones se han reproducido experimentalmente mediante lesiones en animales (Andersen et al., 2007).

---

<sup>2</sup> 1957 Scoville y Brenda Milner, describen los resultados de la destrucción quirúrgica del hipocampo (en el intento de aliviar los ataques epilépticos de Henry Gustav Molaison, conocido hasta su muerte como HM o H.M.



**Figura 1.** Anatomía de hipocampo. En el esquema se observan los distintos tipos celulares del hipocampo y la dirección en que la información se dirige una vez que llega a esta estructura.

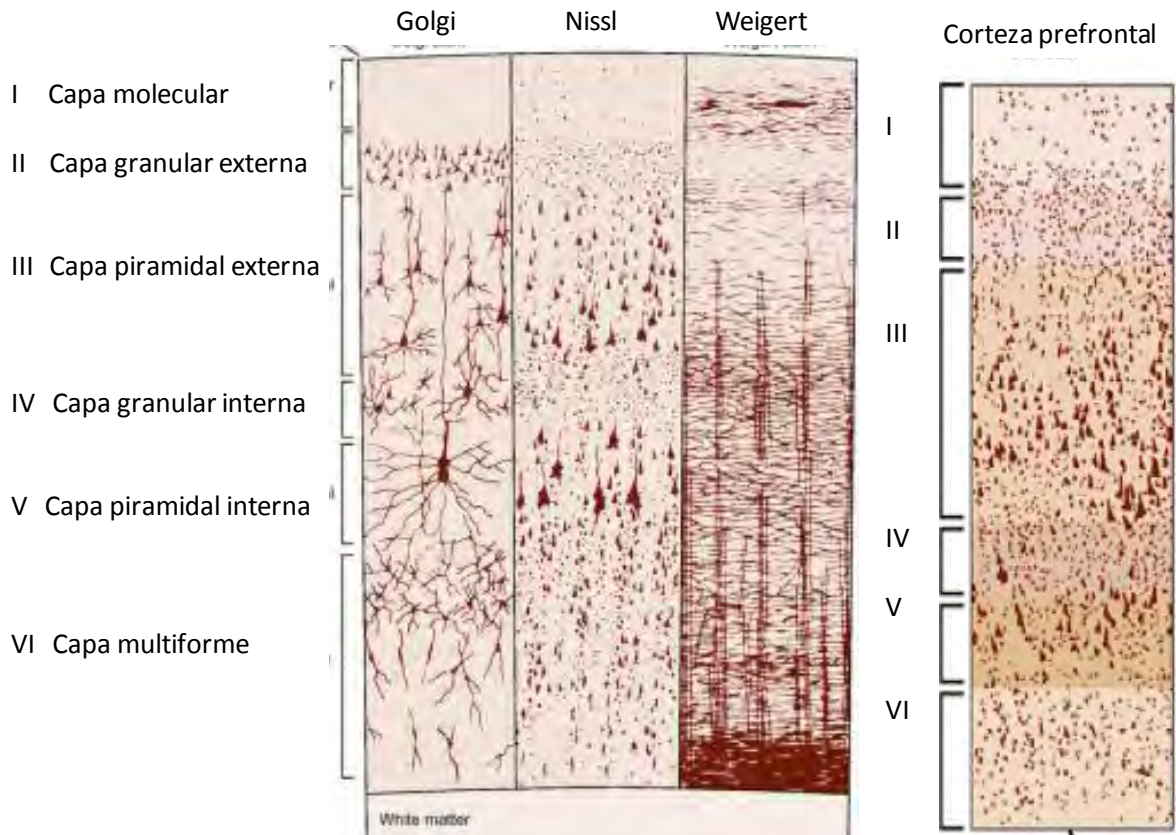
### 3.2 Corteza frontal

Embriológicamente la corteza deriva del telencéfalo, en su mayor parte de la región supraestriada de dicha vesícula. La corteza cerebral es una capa de sustancia gris que cubre los hemisferios cerebrales. Cuando se da la diferenciación celular de la corteza se inicia la estratificación característica y se originan fibras que parten de la corteza a otras regiones de la misma o a niveles subcorticales y comienzan a llegar las procedentes de otras regiones corticales o del tálamo. Un gran número de fibras de origen cortical establecen asociación entre ambos hemisferios cerebrales y forman las comisuras anterior, hipocámpica y la interhemisférica o cuerpo calloso (Paxinos & Watson, 2004).

La neocorteza en los mamíferos, está dividida en distintas áreas denominadas cortezas primarias y secundarias que son las responsables de recibir y procesar información unimodal proveniente de los órganos de los sentidos (i.e. visual, somestésica y auditiva). Y las cortezas multimodales o asociativas (corteza prefrontal) integran la información proveniente de distintas regiones cerebrales, incluyendo aquella transmitida desde las cortezas sensoriales primarias y secundarias, permitiendo la percepción y la consecuente modulación de las respuestas conductuales, motoras y cognitivas.

La corteza cerebral está organizada en 6 capas celulares (Figura 2), las cuales pueden ser identificadas en todas las áreas del isocórtex, pero con algunas diferencias entre regiones tanto en la densidad celular y tipos neuronales predominantes, como en el espesor de los estratos y disposición de fibras en ellos (López Antúnez, 1995).

- I. Capa molecular: hay células horizontales y axones de células de Martinotti.
- II. Capa granular externa: rica en células granulares o estrelladas, células de Martinotti y pequeñas piramidales.
- III. Capa de células piramidales: numerosas células piramidales de mediano tamaño y algunas grandes en la zona profunda.
- IV. Capa granular interna: abundan células granulares y se hacen escasas las piramidales que son pequeñas y medianas. Esta capa recibe la información sensorial específica que procede de los núcleos talámicos correspondientes.
- V. Capa ganglionar o grandes células piramidales: contiene células piramidales de gran tamaño y en el área motora se encuentran las células gigantes de Betz, cuyos axones se incorporan al sistema corticoespinal y conducen impulsos a las motoneuronas espinales.
- VI. Capa polimórfica o multiforme subcortical: formadas por células de diferentes formas, fusiformes, triangulares, redondeadas, etc., cuyos axones se dirigen a la sustancia blanca subcortical. Entre ellas se ven fibras radiadas o tangenciales que llegan a la corteza.



**Figura 2.** Estructura de la corteza prefrontal. Esquema modificado de Kandel et al., 2001. Principles of Neural Science, 4<sup>th</sup> Edition.

La corteza frontal integra la información perceptual compleja de las cortezas sensitivas, motoras y de las cortezas de asociación parietal y temporal. El resultado es una apreciación del propio individuo en relación con el mundo que permite planificar y ejecutar normalmente los comportamientos. Cuando esta capacidad resulta comprometida, el individuo afectado a menudo tiene dificultad para llevar a cabo los comportamientos que se van desarrollando a las demandas medio ambientales. Los efectos del daño en el lóbulo frontal abarcan una amplia gama de discapacidades cognitivas que incluyen el deterioro en la perseveración, en el establecimiento de límites necesarios para un comportamiento adecuado en un entorno social, un pensamiento desordenado, y la incapacidad de planificar una acción apropiadamente (Purves et al., 2004).

## **4. VASCULATURA**

---

El mantenimiento de la vida celular exige el intercambio de materia y energía con el medio; los organismos son capaces de captar las sustancias nutritivas y de eliminar las sustancias de desecho directamente desde o hacia el medio líquido extracelular que les rodea. Este proceso se realiza básicamente por procesos de difusión a través de múltiples capas de células.

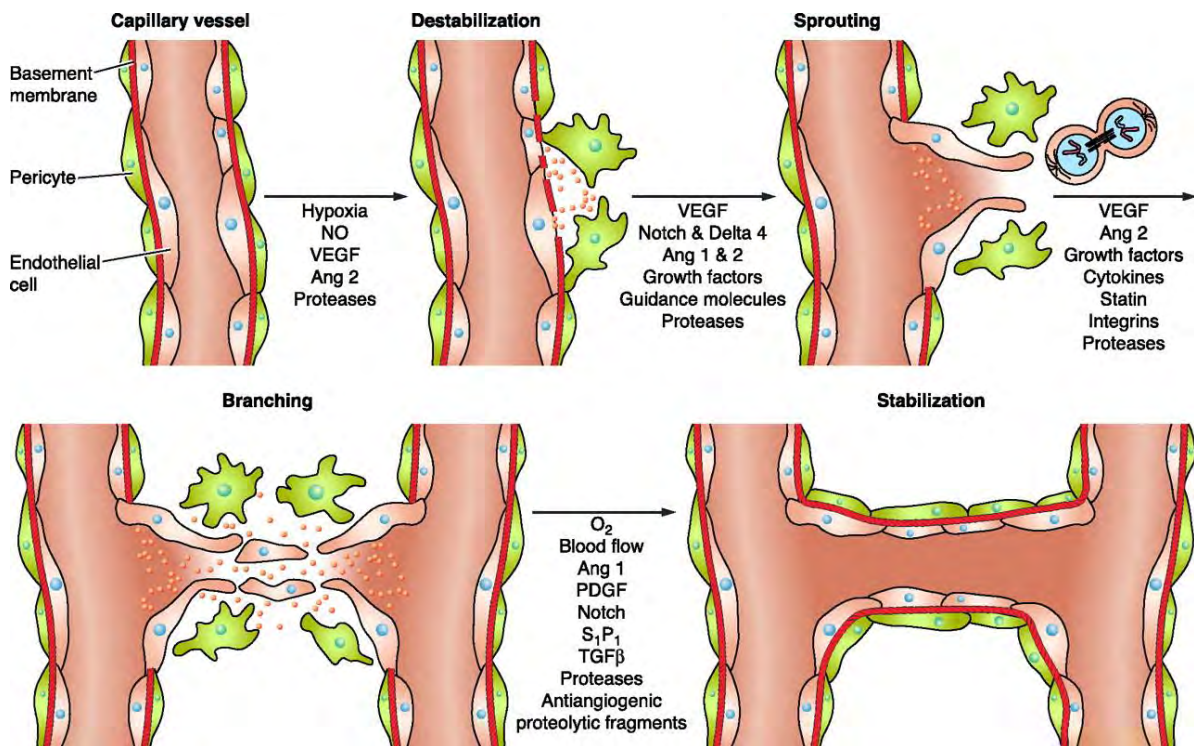
Por ello, los seres vivos pluricelulares, han desarrollado sistemas de transporte específicos como el sistema vascular. La formación de vasos sanguíneos está íntimamente conectada a la formación de células sanguíneas. En efecto, se cree que los vasos sanguíneos y las células sanguíneas comparten un precursor común, el hemangioblasto (Aird, 2008).

### **4.1 Vasculogénesis**

Los vasos sanguíneos son contruídos mediante dos procesos, vasculogénesis y angiogénesis. Durante la vasculogénesis, los vasos sanguíneos son creados de novo desde la lámina del mesodermo lateral. En la primera fase de la vasculogénesis, grupos de células del mesodermo esplácnico son especificadas para llegar a ser hemangioblastos. Estas células se condensan en agregaciones que son denominadas frecuentemente como islotes sanguíneos y se convierten en las células madre hematopoyéticas (células que generan todos los tipos celulares sanguíneos), mientras que las células externas llegan a ser angioblastos, las células progenitoras de los vasos sanguíneos. En la segunda fase de la vasculogénesis, los angioblastos se multiplican y diferencian en células endoteliales, que forman el revestimiento de los vasos sanguíneos. En la tercera fase, las células endoteliales forman tubos y se conectan para formar los plexos capilares primarios, una red de capilares (Gilbert 2005).

## 4.2 Angiogenesis

Mediante este proceso (Figura 3), son remodeladas las redes capilares primarias y se producen las venas y las arterias. La hipoxia induce la producción de óxido nítrico (ON) y la expresión del factor de crecimiento endotelial (VEGF) y angiopoyetina-1 y -2 (Ang 1 y Ang 2), sobre los capilares recién formados, los cuales interactúan con las proteasas de la matriz extracelular (MEC) para incrementar la permeabilidad de la pared de los capilares. La destabilización permite que las células endoteliales migren y proliferen para formar túbulos, principalmente por VEGF, angiopoyetinas, moléculas guía factores de crecimiento, citocinas y degradación de la MEC. Finalmente se forma la red capilar y se da la maduración y estabilización gracias a la expresión de factores antiangiogénicos como Factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ , que aumenta la matriz extracelular) Factor derivado de plaquetas (PDGF, necesario para el reclutamiento de las células periciticas que contribuyen a la flexibilidad mecánica de la pared capilar), esfingosina-1-fosfato-1 (S1P1) (Gilbert 2005; Clapp et al., 1999).



**Figura 3.** Pasos celulares involucrados en la Angiogenesis (Tomado de Clapp et al., 2009).

### 4.3 Funciones y anatomía del sistema vascular

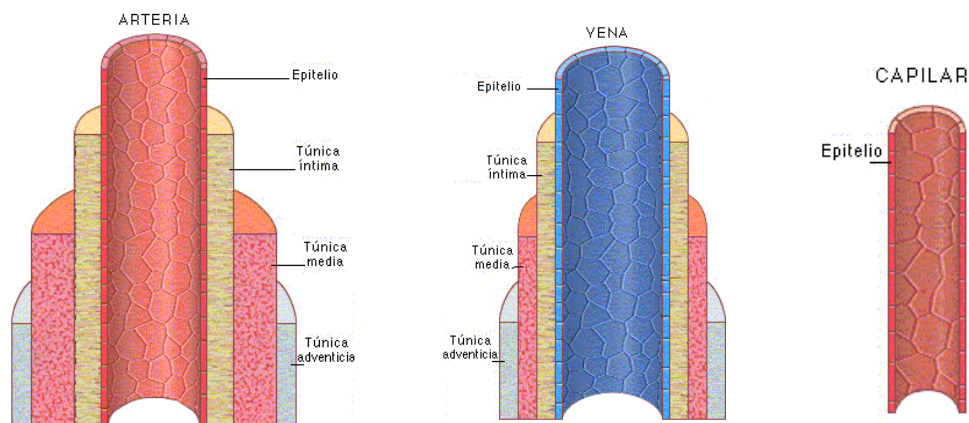
El sistema vascular tiene diversas funciones muy importantes para un organismo tal como: 1) El transporte de nutrientes, todas las células del organismo necesitan un aporte constante de nutrientes para mantenerse vivas y realizar sus funciones biológicas. Los nutrientes se transportan desde el aparato digestivo, donde son absorbidos tras la ingesta, hasta los órganos donde se necesitan o a los órganos de reserva (hígado y tejido graso), y desde éstos a las zonas que lo requieran. 2) El transporte de  $O_2$ , la respiración celular necesita constantemente aporte de  $O_2$  ya que éste elemento no se puede almacenar y es vital para el funcionamiento y sobrevivencia celular. 3) La eliminación de productos de desecho del catabolismo, este aspecto es fundamental ya que gracias a esto, los productos de desecho tóxicos para la célula, se envían a los órganos donde son eliminados o neutralizados (riñón, hígado, pulmón). 4) La comunicación intertisular, mediante el transporte de los mensajeros químicos y hormonas. 5) El transporte celular: en particular las células encargadas de la vigilancia inmunológica (leucocitos) y de la integridad del sistema circulatorio (plaquetas). 6) La regulación de la temperatura: mediante el movimiento de la sangre de zonas más calientes a otras más frías (Tresguerres, 2005)

El sistema circulatorio está integrado por el corazón (la bomba motora), los vasos (son los conductos de transporte) y la sangre (el fluido a transportar). Los vasos son conductos encargados del transporte de la sangre, su diámetro y su estructura son variables dependiendo de la localización y la función que desarrollan.

A excepción de los capilares que sólo presentan la túnica íntima, todos los vasos poseen tres capas: la túnica íntima, media y adventicia. Las diferencias estructurales entre los distintos tipos vasculares se basan en la presencia o ausencia de estas capas y en la distinta proporción de fibras extracelulares y de células musculares lisas (Tresguerres, 2005) (Figura 4).

- La túnica íntima es la capa más interna y contiene una monocapa de células endoteliales y, en los vasos de mayor calibre, una capa subendotelial.
- La túnica media contiene fundamentalmente una capa de células musculares lisas y fibras elásticas y de colágeno.
- La túnica adventicia está compuesta por fibras de colágena que protegen el vaso y lo fijan al tejido subyacente, fibroblastos y fibras nerviosas y, en los grandes vasos por una red de minúsculos vasos, los *vasa vasorum*, que la nutren.

Las arterias tienen como función conducir la sangre a alta presión hacia los tejidos. La proporción de fibras disminuye con el tamaño arterial mientras que la del músculo liso aumenta para conferirles la propiedad de elasticidad. Esta propiedad permite a las arterias amortiguar los cambios repentinos de presión. Los capilares presentan una estructura muy sencilla constituida por cordones de células endoteliales alineadas recubiertas por la lámina basal, carecen de fibras extracelulares y de musculatura lisa, su función es la de intercambio de sustancias entre la sangre y el tejido, y no intervienen en la regulación del flujo o la presión. Las venas contienen en su estructura menos fibras elásticas y menos células musculares, su pared es más fina y su diámetro mayor que de las arterias correspondientes ya que tienen que soportar presiones muy inferiores.



**Figura 4.** Estructura de los vasos sanguíneos<sup>3</sup>

<sup>3</sup> <http://www.bioapuntes.cl/imagesapuntes/imagenes/arteriasapuntes/vasos.htm>.



## 4.4 Vasculatura cerebral del ratón

Se usó la descripción de la vasculatura cerebral de ratón realizado por el grupo de Dorr (2007) mediante estudios de resonancia magnética, tomografía computarizada y tecnología volumétrica de alta resolución, mismos que aportaron datos de la vasculatura cerebral del ratón en tres dimensiones. Este grupo de investigadores se basó en la anatomía vascular de la rata para identificar las arterias mayores debido a la ausencia de literatura específica de anatomía vascular del ratón, justificando este hecho en que son especies similares filogenéticamente y pertenecen a la subfamilia *Murinea* de la suprafamilia *Muroidea*.

### 4.4.1 Arterias

Según Dorr et al. (2007) el mayor suministro de sangre al cerebro del ratón viene de dos fuentes: La arteria carótida interna y la arteria vertebral.

1) La arteria carótida interna (CI): Surge de la arteria carótida común. Suministra directamente a regiones corticales y subcorticales. Está localizada sobre el aspecto ventral del cerebro en el punto medio de la región parieto-temporal, cerca del hipotálamo. Da lugar a cuatro arterias mayores: I) Arteria comunicante posterior. II) Arteria cerebral media. III) Arteria cerebral anterior y IV) Arteria coroidal anterior:

- Arteria cerebral anterior (ACA): irriga a la mayoría del aspecto medial de la corteza cerebral. Corre a lo largo del aspecto ventral del cerebro en la trayectoria similar a la CI. Las dos ACAs inicialmente continúan hacia anterior pero giran rápidamente hacia medial y eventualmente se fusionan sobre el aspecto ventral del lóbulo frontal para formar la Azigos de la arteria cerebral anterior

- Azigos de la arteria cerebral anterior (azACA): se encuentra justo anterior al quiasma óptico y da lugar a:

- Arteria rostral septal

- Arteria anterior frontal interna

- Arteria cerebral media (ACM): sale de la CI sobre la convexidad ventral-lateral del cerebro, justo detrás de la formación de la arteria cerebral anterior, alrededor de la zona transicional de la región frontal a la región parieto-temporal. Irriga gran parte de la superficie lateral de la corteza cerebral.

- Arteria Rinal

- Arteria Rostral

2) La arteria vertebral (AV): Surge de la arteria subclavia dentro del foramen vertebral de la sexta vértebra cervical está localizada a nivel de la médula, terminando en la unión ponto-medular. La AV da lugar a: I) Arteria paraolivar, II) Ventral espinal y III) La arteria basilar.

- Arteria basilar (AB): justo antes de la fusión, en la superficie ventral

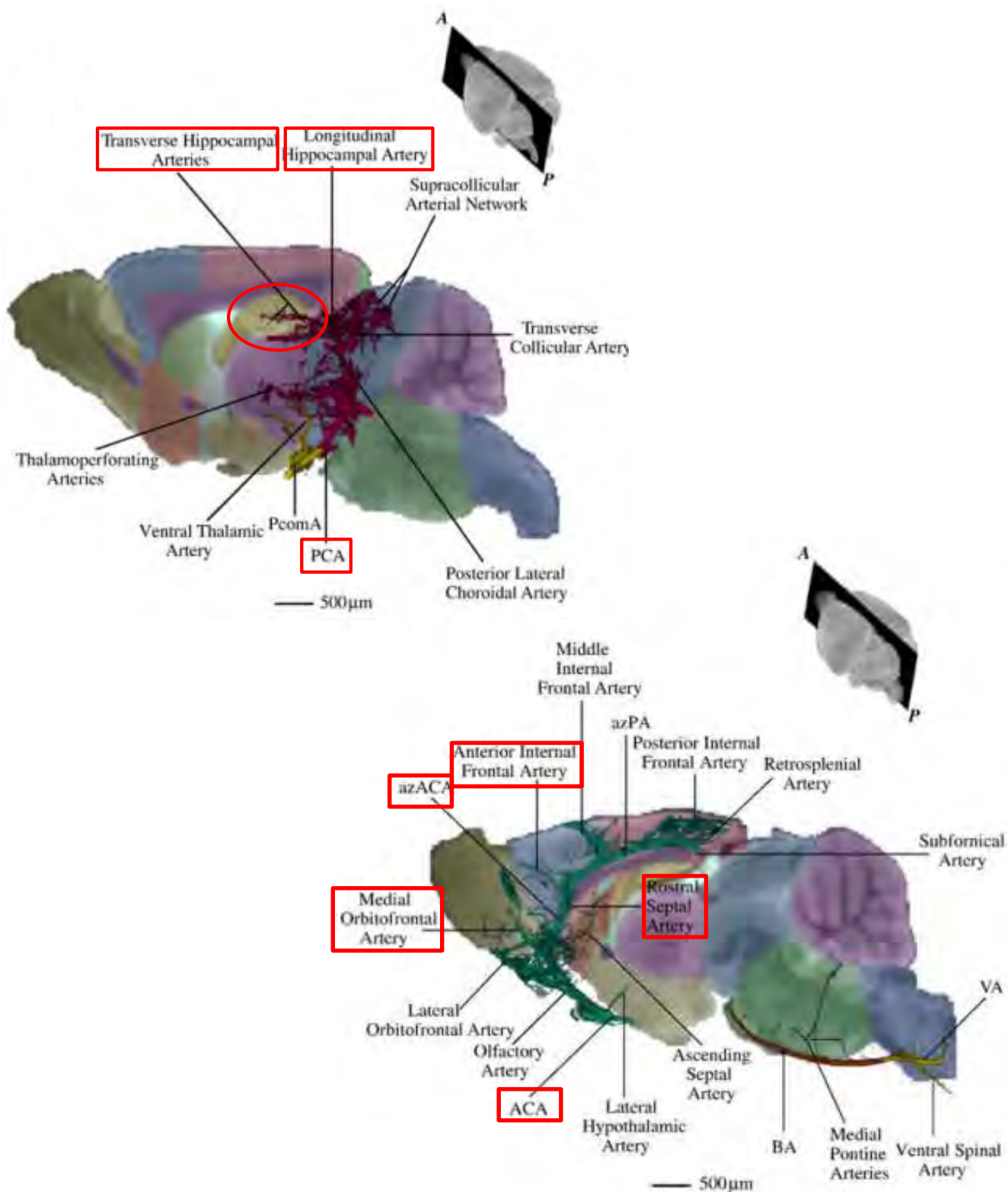
- Arteria cerebelar superior (ACS):

- Arteria cerebral posterior (ACP):

- Arteria longitudinal hipocampal: continúa con la dirección de la ACP. gira hacia la parte anterior para seguir la longitud del hipocampo. Da lugar a pequeñas arterias transversas hipocampales, las cuales infiltran al hipocampo a través de la fisura hipocampal

- Arteria transversa hipocampal

El sistema carotídeo es responsable de la circulación anterior del cerebro mientras que la arteria basilar suministra sangre a la circulación posterior del cerebro. Obviamente, el circuito anterior y posterior no son independientes, sino que están interconectados por arterias comunicantes que crean el círculo de Willis en la base del cerebro proporcionando un potencial acceso directo entre la circulación lateral y antero-posterior. Las arterias que emanan de la arteria posterior, predominantemente proporcionan flujo sanguíneo al cerebro medio y tallo cerebral con sangre limpia mientras los hemisferios son vascularizados por vasos anteriores y posteriores (Farkas & Luiten, 2001).



**Figura 5.** Vasculatura del hipocampo y corteza frontal. Hipocampo: su irrigación está cargo de las ramas de la Arteria cerebral posterior: la arteria longitudinal hipocampal que da lugar a la arteria transversa hipocampal. La corteza frontal es irrigada por los brazos de la ACA: la azigos de la ACA y sus derivaciones: la arteria rostral septal y la arteria anterior frontal interna.

#### **4.4.2 Venas**

Hay tres principales sistemas venosos: dorsal, ventral y caudal. Los sistemas dorsales son representados por la vena retroglóide, la cual no existe en seres humanos excepto como una anomalía rara. Este vaso puede ser considerado como la continuación extracraneal del sinus transversal. El sistema ventral es representado por el sinus cavernoso, el cual recibe la vena basal, la vena rinal arterial y las tributarias del sinus olfatorio inferior y superior. El sistema caudal está compuesto de la vena vertebral canal sinus y la vena yugular interna. Los tres sistemas venosos cerebrales están interconectados por un gran número de anastomosis intra y extracraneales (Paxinos & Watson, 2004).

#### **4.4.3 Capilares**

Los capilares representan los brazos más finos del árbol vascular y a diferencia de las arterias, ellas forman anastomosis y crean una red vascular tridimensional. La densidad de esta malla es altamente variable, encontrándose una correlación entre el número de capilares, aumento en el flujo sanguíneo local y mayor utilización de glucosa en regiones cerebrales metabólicamente más activas y con mayor número de sinapsis. Siendo los centros sensoriales y de asociación más densamente vascularizados que los centros motores. La estructura laminar de la corteza cerebral también muestra diferencias en la densidad vascular, siendo más vascularizadas las láminas I y IV (Farkas & Luiten, 2001).

#### **4.4.4 Barrera hematoencefálica (BHE)**

La Barrera hematoencefálica está constituida por una gran superficie de células endoteliales comunicadas por uniones estrechas, pericitos con propiedades de células musculares que se encuentran adyacentes a los capilares, y procesos astroglicales que rodean estos capilares. Esta particular disposición anatómica es lo que le confiere una alta selectividad al paso de sustancias que ingresan al SNC para mantener la

composición química neuronal, la cual es requerida para el apropiado funcionamiento de circuitos neuronales, transmisión sináptica, remodelamiento sináptico, angiogénesis y neurogénesis en el cerebro adulto. Esta gran superficie membranal permite el intercambio eficiente de gases liposolubles como el O<sub>2</sub> y el CO<sub>2</sub>, vitales para la supervivencia celular. Sin embargo, la mayoría de sustancias que deben cruzar la BHE no son liposolubles (como la glucosa) por lo que deben cruzar por sistemas de transporte especializados y dependientes de energía (Kandel et al., 2001).

Las células endoteliales juegan un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis cardiovascular y la regulación del flujo sanguíneo mediante la liberación de sustancias en respuesta a estímulos fisiológicos o patológicos (Bomboi et al., 2010). Las células endoteliales sintetizan endotelina-1 (ET-1, una proteína vasoconstrictora) y expresan la enzima óxido nítrico sintasa (eNOS) la cual produce óxido nítrico (ON, la molécula vasodilatadora más importante sintetizada por el endotelio). En condiciones fisiológicas el ON actúa sobre las células musculares lisas vasculares por inducción de la guanilato ciclasa para liberar monofosfato y promover la relajación. La ET-1 actúa sobre receptores ligados a proteínas G para generar IP<sub>3</sub>, DAG y, sobre todo, aumento del Ca iónico intracelular, segundos mensajeros que causarán el efecto (Donato et al., 2009).

Otra función importante de las células endoteliales es el mantenimiento de la permeabilidad de la BHE mediante sus complejas uniones estrechas o “tight junctions” (TJ), las cuales poseen moléculas adaptadoras (occludinas, claudinas), moléculas de adhesión (JAM-A, ESMA PECAM-1), proteínas de unión adherente (caderinas, cateninas, vinculinas), las cuales en conjunto, mantienen la permeabilidad de la BHE y unen las TJ al citoesqueleto. Son estas moléculas las que frecuentemente se ven afectadas durante procesos patológicos cerebrales (Zlokovic, 2008).

## 5. ETIOPATOGENIA DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

---

La EA es una enfermedad de etiología multifactorial, esta es la razón por la que el camino para establecer de manera precisa la patogenia de la enfermedad ha sido tan sinuoso. Se sabe por ejemplo, que la acumulación de A $\beta$  no constituye necesariamente una placa senil (Dickson, 1997). Además de que existen depósitos corticales extensos de A $\beta$  en ancianos cognitivamente preservados, sugiriendo que se requieren factores adicionales para que estos signos se hagan patológicos (Knopman et al., 2003). Estos hallazgos describen un panorama complicado y difícil de dilucidar aún después de que en los últimos años la EA ha sido uno de los tópicos de la investigación científica con mayor apoyo económico por su importancia en la salud pública mundial. Sin embargo, se han logrado avances importantes que establecen diversas teorías, todas ellas válidas para tratar de explicar una o varias causas de predisposición a la enfermedad como lo son la teoría del estrés oxidativo, el envejecimiento, la neuroinflamación, la predisposición genética y la disfunción vascular entre otras.

### 5.1 Edad

Diversos estudios epidemiológicos demuestran que la edad es uno de los principales factores de riesgo para la EA, cuya incidencia se dobla aproximadamente cada cinco años a partir de los 65 años de edad (Andersen et al., 1999; Hofman & Brayne, 1991), siendo la edad media de aparición de 80 años (Helmer et al., 2001). Gracias a este indicativo, se han podido distinguir dos presentaciones de la EA según la edad de inicio del cuadro clínico:

- Forma presenil o temprana (EA de inicio precoz): generalmente con un componente hereditario; comienza antes de los 65 años de edad y constituye del 6 al 7% de todos los casos de EA (Campion & Hannequin, 1999).
- Forma senil o tardía (EA de inicio tardío): apareciendo de forma esporádica después de los 65 años de edad, esta forma representa entre el 90 y 95% de todos los casos.

## 5.2 Predisposición genética

Actualmente se investigan una gran cantidad de genes implicados en el metabolismo de APP, en el corte y degradación del  $\beta$ -amiloide, en la disfunción de la proteína tau, en las deficiencias en el tráfico de proteínas colinérgicas y en metabolismo del colesterol. Sin embargo, en la forma familiar se han identificado 5 genes cuyas mutaciones conducen a la acumulación del péptido  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) y a la formación de marañas neurofibrilares de tau. Esto ha sido beneficioso para el desarrollo de modelos transgénicos de la EA que sobreexpresan o inhiben la producción de estas proteínas.

Los genes más importantes descritos hasta el momento asociados con la EA son:

- Gen de la proteína precursora amiloide (APP), en el cromosoma 21.
- Gen de la presenilina 1 (PS1), localizado en el cromosoma 14
- Gen de la presenilina 2 (PS2), localizado en el cromosoma 1.
- Gen de la proteína tau, ( $\tau$ ), localizado en el cromosoma 17.
- Alelo 4 de la Apolipoproteína E (ApoE), localizado en el cromosoma 19.

El **gen APP** en el cromosoma 21, es el que codifica para la síntesis de la proteína precursora del  $\beta$ -amiloide, principal componente de las placas seniles. Se sabe que la regulación de la expresión de APP está regulada por un elemento responsivo a hierro (IRE) e IL-1, pero en estadíos más tardíos del proceso de traducción (Rogers et al., 1999; Rogers et al., 2002). Sin embargo Vostrov et al., (2010) identificó un dominio de unión al factor nuclear designado como DAPB en el 5'-UTR del gen APP, y mostró que la eliminación del factor de unión correlaciona con un decline en la expresión del promotor de APP. Esto sugiere que la unión del factor puede tener una función en la regulación post-transcripcional, incluida la exportación nuclear de ARNm. La generación de  $A\beta$  ocurre en diversos compartimentos subcelulares, pero la principal localización es durante la re-entrada y reciclamiento de APP sobre la superficie celular por la vía de la endocitosis. Rogueva et al. (2007) demuestra que la APP es recuperada en presencia del receptor neuronal relacionado con sortilina (SORL1, juegan un papel fisiológico clave en el reciclaje de la APP). Por el contrario, depletando el gen SORL1, la proteína

se expresa de manera insuficiente y la APP es sometida a modificaciones que terminan con la indeseable generación de la proteína beta-amiloide.

La **presinilina-1** forma parte de un complejo de 4 proteínas que conforman a las enzimas  $\beta$ -secretasa y  $\gamma$ -secretasa, las cuales llevan a cabo los cortes seriales de la APP generando fragmentos amiloidogénicos (Bertram & Tanzi, 2008). Es una proteína multifuncional involucrada en el procesamiento de proteínas transmembranales tipo 1 (como APP), en el tráfico celular, en la regulación de la señalización de calcio, en la diferenciación celular, en la maduración sináptica y en la apoptosis. Lee & Das en el 2008 encontraron que la inhibición de la cinasa c-jun-NH2 terminal (JNK) evita la expresión del gen de PS1, impidiendo su fosforilación y aumentando los niveles de p53. Este último evita la transcripción del gen de PS1 ocupando el lugar del factor de transcripción Ets1/2 ( el cual se une al promotor de PS1 para activar su transcripción).

La **proteína tau**. Tau es una proteína asociada a microtúbulos, abundante en axones de neuronas maduras y en crecimiento, en oligodendrocitos y en algunos tejidos no neuronales. Formas aberrantes de la proteína son el mayor componente de la redes neurofibrilares, una característica de enfermedad neurodegenerativa. Tau está codificada por una sola copia del gen, lo que produce 3 transcritos de 2, 6 y 9 kilobases los cuales son diferencialmente expresados en el sistema nervioso dependiendo del estado de maduración neuronal y del tipo celular. Hay dos haplotipos identificados del gen de tau con polimorfismo en un solo nucleótido del promotor (H1 y H2). El haplotipo H1 promueve una expresión más alta del gen y está asociado a parálisis progresiva supranuclear, degeneración corticobasal y enfermedad de Parkinson. Se ha identificado el promotor de tau en el exón-1 no traducible río arriba, el cual es rico en GC y carece de caja TATA, permitiendo una transcripción heterogénea de la proteína (Gao et al., 2005). Un incremento en el número de sitios de fosforilación de la proteína tau reduce el grado de unión de ésta a los microtúbulos, de manera que hay una desestabilización que provoca la formación de las redes neurofibrilares características de la EA (Oddo & LaFerla, 2006). El splicing alternativo de los exones 2, 3 y 10 del gen de tau da lugar a 6 diferentes isoformas, tres de éstas contienen al exon 10 (4R) y las



otras tres carecen del exón 10 (3R). Diferencias funcionales han demostrado que 4R es más eficiente en la promoción del ensamblaje de microtúbulos que las isoformas 3R (Espinoza et al., 2008).

La **Apolipoproteína E** es una proteína polimorfa de 299aa que se expresa en hígado, cerebro y células no neuronales (principalmente astrocitos y microglia). El gen localizado en el cromosoma 19 codifica 3 alelos: apoE2 (5-10%), apoE3 (60-70%) y apoE4 (15-20%). Las isoformas difieren sólo en los residuos 112 y 158. ApoE3 tiene Cys-112 y Arg-158, mientras que apoE4 tiene arginina en ambos sitios y apoE2 tiene cisteínas. Su expresión en células neuronales está regulada por vías de señalización activadas por proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) (Mahley et al., 1999; Mahley et al., 2000). ApoE4 se une preferencialmente a lipoproteínas ricas en triglicéridos y a lipoproteínas de baja densidad mientras que las otras isoformas las cuales no tienen Arg-112 unen preferencialmente lipoproteínas de alta densidad (Mahley et al., 2000). La apoE4 es la mayor proteína transportadora del péptido A $\beta$ , lípidos y colesterol en el plasma y en el cerebro (Lukiw et al., 2005), y es una de las principales apoproteínas de los quilomicrones (lipoproteínas que recogen desde el intestino delgado los triglicéridos, los fosfolípidos y el colesterol ingeridos en la dieta llevándolos hacia los tejidos vía sanguínea) que se une a un receptor específico en las células hepáticas y periféricas para que se lleve a cabo el catabolismo normal de los constituyentes lipoproteínicos ricos en triglicéridos.

## **6. VASCULATURA Y ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

---

### **6.1 Disfunción vascular, cognición y Alzheimer.**

Si tomamos en cuenta las importantes funciones que desempeña el sistema vascular en un organismo (el transporte de O<sub>2</sub>, nutrientes y células del sistema inmune; la comunicación intertisular mediante el transporte de mensajeros químicos y hormonas,

la eliminación de productos de desecho del catabolismo y la regulación de la temperatura), las cuales contribuyen al mantenimiento del metabolismo neuronal y con esto el mantenimiento de las funciones cognitivas, es lógico pensar que cuando existe algún insulto sobre él, algunas o todas sus funciones se verán afectadas negativamente,

Cuando la actividad neuronal se ve incrementada (durante procesos cognitivos) el metabolismo neuronal se incrementa en un 100-150 %, esto es posible gracias a que el aporte de O<sub>2</sub> y glucosa al cerebro es constante. Sin embargo, cuando existen alteraciones en la vasculatura, el flujo sanguíneo cerebral disminuye, reduciendo crónicamente el aporte de glucosa y oxígeno al cerebro y, dando como resultado un metabolismo neuronal subóptimo. Tal crisis energética ocasiona daño neuronal y disminución en la capacidad cognitiva (Farckas et al., 2000).

Acorde con esto, durante los últimos años se ha promovido vigorosamente la idea de que las deficiencias cerebrovasculares (tal como reducción del suministro sanguíneo al cerebro e interrupción de la integridad microvascular en regiones corticales) provocadas por desórdenes de la barrera hematoencefálica, lesiones en materia blanca, microinfartos, hemorragias cerebrales y angiopatía cerebral amiloide (CAA por sus siglas en inglés) (Jellinger, 2002), pueden ocupar una posición inicial o intermedia en la cadena de eventos que finalizan en el deterioro cognitivo, característico de enfermedades neurodegenerativas, tal como la EA (de la Torre, 2000).

De la Torre (2000) propuso que, una edad avanzada acompañada de una condición comórbida, además de perfusión cerebral disminuida, promueven un CATCH (umbral crítico de hipoperfusión cerebral). Este estado crónico de hipoperfusión induce estímulos que provocan que las células endoteliales vasculares, neuronas y glía sean capaces de sintetizar, almacenar y liberar especies reactivas de oxígeno y sustancias vasoactivas (Aliev et al., 2008), provocando con el tiempo disfunción mitocondrial, estrés oxidativo, disminución en la producción de ATP e incremento en la entrada de calcio, síntesis de proteínas anormal, deficiencia de bombas iónicas celulares, defectos

en la transducción de señales y falla en la neurotransmisión. Todo esto trae como consecuencia desestabilización de neuronas, sinapsis, neurotransmisión y habilidad cognitiva deficiente. Estas disfuncionalidades provocan un estado de hipoxia crónica, que al paso de los años conduce al proceso neurodegenerativo como la formación de placas seniles, redes neurofibrilares y angiopatía cerebral amiloide, eventos que contribuyen aún más al decline cognitivo característico de enfermedades neurodegenerativas como la EA. (Aliev et al., 2008),

La EA tiene una cercanía espaciotemporal entre lesiones neuronales y vasculares en individuos con demencia. Diferentes reportes han demostrado anomalías vasculares en la EA, desde hipoperfusión, angiopatía e interrupción de la barrera hematoencefálica. Además, en modelos murinos de la EA se han reportado cambios en la microvasculatura que consisten en adelgazamiento de la membrana basal, deposición de colágeno, degeneración de pericitos y distorsión del lumen vascular en hipocampo y corteza entorrinal, zonas que revelan el inicio de la patología y el daño en los cerebros con la Enfermedad de Alzheimer (De la Torre, 2000; Farkas & Luiten, 2001). Ratones transgénicos para APP presentan células de la microvasculatura de la corteza frontal y del hipocampo más delgadas, hay protusiones en los vasos y una ocasional condensación de la cromatina (Wyss-Coray et al., 2000).

Kitaguchi et al. (2007) encontraron en cerebros humanos con la EA mediante inmunohistoquímica para  $\beta$ -amiloide, numerosos depósitos en las paredes vasculares y neuropilo perivascular, microvasculatura cortical más estrecha y separada, especialmente en la proximidad a las placas seniles, además de que la densidad estaba significativamente disminuida en comparación con cerebros con la enfermedad de Binswanger ( un tipo de demencia vascular). Brown y colaboradores en el 2007 también realizaron un estudio en el que encontraron una disminución de la densidad vascular en cerebros con la EA comparados con cerebros normales.

Un estudio realizado en el 2008 por Meyer y colaboradores demostró en la corteza cerebral de ratones transgénicos —knock-in” de APP23 (Proteína Precursora de

Amiloide) a largo de la vida (4-24 meses de edad) que la vasculatura termina abruptamente en placas amiloides, resultando en orificios en la misma vasculatura. Frecuentemente, los depósitos pequeños fueron asentados cerca o al final de vasos truncados. Entre tales orificios, la vasculatura que rodea parece más densa y muestra características típicas para angiogénesis. Por lo que los autores proponen que los pequeños agregados amiloides asociados con la microvasculatura permiten alteraciones morfológicas y de arquitectura de la vasculatura, resultando en alteración del flujo sanguíneo local.

Recientemente, Bourasset et al. (2009) encontró una reducción significativa del volumen cerebral en el hipocampo de ratones 3xTg-AD de 11 meses de edad, acompañada de adelgazamiento de la membrana basal en la corteza y de incremento del colágeno cerebral. De manera interesante no se encontraron alteraciones en la integridad de la barrera hematoencefálica. Los hallazgos de esta investigación son consistentes con la presencia de la patología cerebrovascular en la EA. Sin embargo, este estudio se realizó únicamente en una edad avanzada, a los 11 meses, cuando los signos patológicos ya están establecidos, por lo que sería bueno ahondar en el sentido de saber en qué momento de la vida de estos ratones comienza este deterioro vascular.

## **6.2. Angiopatía cerebral amiloide**

La CAA se define como un desorden que se caracteriza por una deposición de proteína amiloidogénica en las paredes de la vasculatura cerebral, por lo general arterias, arteriolas y menos frecuente en capilares, venas cerebrales y meníngeas (Rutgers et al., 2009). La prevalencia de la CAA en cerebros humanos con la EA es de 98%, afectando vasos con paredes delgadas, conteniendo depósitos amiloides amorfos, eosinofílicos y congofílicos en la túnica media y adventicia de los vasos (Jellinger, 2002). Tiene una incidencia de 82-98% frecuentemente asociada a la presencia de ApoE $\epsilon$ 4 y causa hemorragias cerebrales (alrededor del 70% principalmente en los lóbulos frontal y parietal), microhemorragias múltiples o recurrentes (15%) y microinfartos o lagunas isquémicas (alrededor del 20%). La

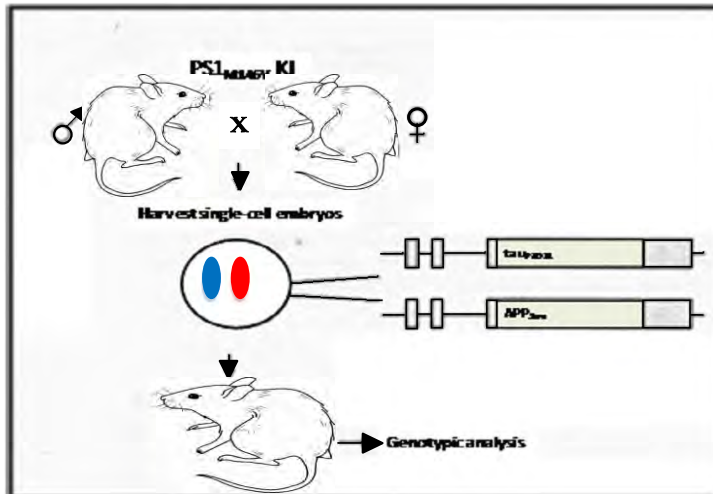
frecuencia de estas lesiones incrementa con la severidad de CAA, la cual es significativamente más frecuente en pacientes con hemorragias cerebrales o infartos que en controles seniles.

## **7. DESARROLLO DEL MODELO TRIPLE TRANSGÉNICO PARA LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER (3x-Tg-AD)**

---

### **7.1 Construcción del modelo 3xTg-AD**

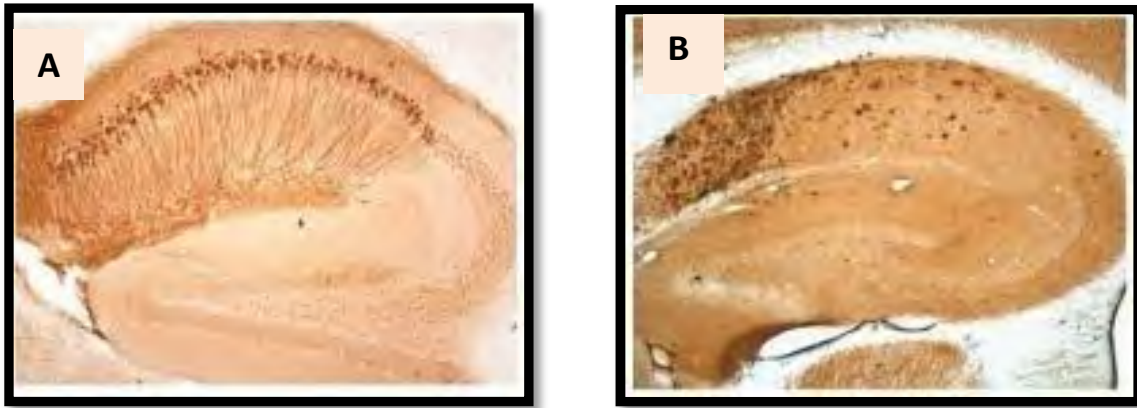
Los grandes intentos por descubrir la causa de la EA han llevado al desarrollo de modelos transgénicos que contribuyen de manera importante a aclarar el origen de las lesiones patognomónicas de manera aislada. Uno de estos modelos fue desarrollado por Oddo et al. (2003) en la Universidad de California, E.U.A., y se le llamó modelo Triple Transgénico para la Enfermedad de Alzheimer (3xTg-AD), el cual fue el primero en desarrollar las placas amiloides y la hiperfosforilación de la proteína tau en regiones cerebrales relevantes para la EA. Los autores derivaron su modelo transgénico mediante la introducción directa de dos transgenes adicionales ( $APP_{Swe}$  y  $tau_{P301L}$ ) dentro de la línea germinal de un ratón genéticamente modificado (mutante de  $PS1_{M146V}$ ), generaron 6 líneas, de las cuales 5 albergaron los tres transgenes. Por lo menos en 2 líneas (B1 y G6), el análisis de frecuencia de transmisión reveló que los transgenes cointegraron en el mismo locus, y que los transgenes aparecían independientemente en generaciones subsecuentes. Así pues, los autores cruzaron hemicígotos F1 para derivar el ratón —knock-in” homocigoto para los tres transgenes ( $PS1_{M146V} APP_{Swe} tau_{P301L}$ ), este homocigoto fue cruzado con ratones no transgénicos (NoTg) y resultó en el 100% de la transmisión de los transgenes en generaciones subsecuentes. Para saber si la presencia de estos transgenes están provocando los signos patológicos se realizan estudios de inmunohistoquímica para cada proteína implicada ( $\beta$ -amiloide y proteína tau hiperfosforilada).



**Figura 6.** Generación del ratón 3xTg-AD. Usando la técnica de microinyección pronuclear, se coinyectaron dos transgenes independientes que codifican para APP<sub>Swe</sub> y tau<sub>P301L</sub> (4R/0N) ambos bajo el elemento regulador Thy 1.2 dentro de una célula embrionaria de un ratón mutante para PS1<sub>M146V</sub> (Esquema modificado de Oddo, et al., 2003).

## 7.2 Neuropatología de la enfermedad en el modelo 3xTg-AD

Este modelo desarrolla primero las deposiciones extracelulares de A $\beta$ , consistente con la hipótesis de la cascada amiloidea, además de deficiencias en la plasticidad sináptica y LTP que ocurren antes de las lesiones descritas pero que está asociado con la inmunoreactividad intracelular a A $\beta$ , lo que sugiere un papel patofisiológico novedoso de éste y anterior a la aparición de placas amiloides. El desarrollo de la EA en estos ratones transgénicos es dependiente de la edad, por lo que Oddo et al. (2003) caracterizaron la secuencia de manifestaciones mediante técnicas de inmunohistoquímica con la utilización de anticuerpos contra A $\beta$ -42 (principalmente) y tau. Una de las primeras manifestaciones en el 3xTg-AD, es la inmunoreactividad para A $\beta$  intraneuronal a los 3-4 meses de edad en regiones neocorticales y subsecuentemente a los 6 meses en neuronas piramidales del CA1 del hipocampo. Los depósitos extracelulares de A $\beta$  son evidentes a los 6 meses en la corteza frontal, haciéndose más evidentes a los 12 meses, La taupatía se hace evidente entre 12-15 meses primero en hipocampo y más tarde se involucran estructuras corticales (Figura 7).



**Figura 7.** Expresión de la proteína Tau y beta amiloide en el hipocampo de ratones 3xTg-AD.. En A, se muestra inmunoreactividad para la proteína tau en el área CA1 en animales de 12 meses de edad del hipocampo del modelo 3xTg-AD a los 12 meses de edad. En B se muestran las placas reactivas de A $\beta$ 42 en el área del *subiculum* y CA1 del hipocampo a los 18 meses de edad. (Fotografías tomadas de Oddo et al., 2003).

## 8. JUSTIFICACIÓN DE PROYECTO

---

Actualmente existe una gran cantidad de literatura que expone el papel que juega la vasculatura en el desarrollo de la EA, sin embargo, en el modelo triple transgénico (3xTg-AD) en el cual se desarrolla el presente estudio, se pretende determinar la densidad vascular en dos áreas cerebrales comprometidas en el proceso neurodegenerativo como son la corteza frontal y el hipocampo, en una etapa presintomática (2 meses de edad) y en una edad sintomática (10 meses de edad), y determinar si esta densidad vascular sufre modificaciones de una edad a otra en un organismo cuyo genotipo está alterado para provocar la enfermedad. Este estudio, pretende proporcionar las bases suficientes para sustentar de manera más integral esta relación vascular con las etapas críticas en el desarrollo de la patología, y establecer de manera puntual la relación con el progreso de la enfermedad y los cambios en la vasculatura.

## 9. HIPÓTESIS

---

Un factor determinante en la EA es la alteración en la vasculatura cerebral, por lo tanto, en el modelo 3xTg-AD, se presentará disminución en la densidad vascular de zonas cerebrales susceptibles a la enfermedad conforme avanza la enfermedad.

## 10. OBJETIVOS

---

- 10.1. Genotipificar los ratones 3xTg-AD para verificar que sean homocigotos.
- 10.2 Realizar inmunohistoquímica para A $\beta$  y tau a los 2 y 10 meses de edad para determinar el curso de la enfermedad en los ratones 3xTg-AD comparándolos con sus respectivos controles.
- 10.3 Determinar la densidad vascular del hipocampo y de la corteza frontal de ratones 3xTg-AD y controles a los 2 y 10 meses de edad.

## 11. SUJETOS, MATERIAL Y MÉTODOS

---

### 11.1 Sujetos

El protocolo diseñado para este trabajo se realizó conforme a las normas internacionales para el manejo y uso de animales de experimentación establecidas por la National Institutes of Health (NIH) y la National Academy of Science (2003; [www.nih.gov](http://www.nih.gov)) y fue presentado y aprobado ante el Comité de Bioética del Instituto Nacional de Neurobiología (INB) de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los ratones que se utilizaron como control fueron de la cepa 129/C57BL/6 y a partir de esta se desarrolló el ratón transgénico (3xTg-AD) por el Dr. Salvatore Oddo y Frank LaFerla de la Universidad de California, EUA, quienes hicieron la donación al Instituto de





polimerasa (PCR). Una vez tipificados, se procedió a identificar la formación de las placas  $\beta$ -amiloides para verificar el estado de desarrollo de la enfermedad por inmunohistoquímica y por último se procedió a realizar la técnica del azul de Evans para evidenciar la vasculatura en dos áreas cerebrales (corteza frontal e hipocampo) en cortes parasagiales de 50 micrometros. Se analizaron cortes equidistantes en todos los grupos.

## **11.2 Genotipificación**

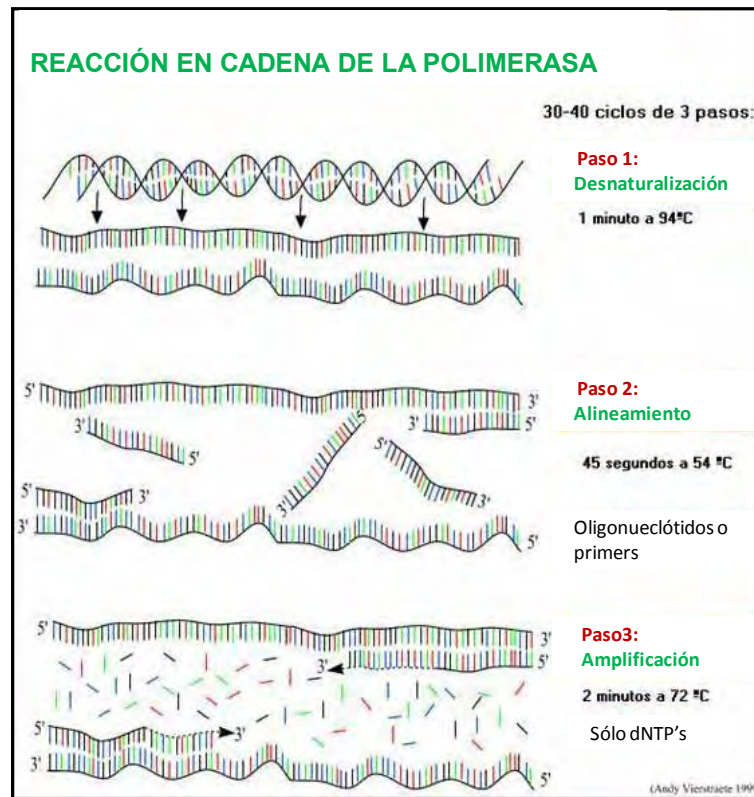
### **11.2.1 Extracción de ADN**

Para la obtención de ADN de los ratones transgénicos, se seccionó la parte más caudal de la cola, aproximadamente 0.5 cm de largo, se colocaron las colas en tubos eppendorf de 1ml y se les adicionó a cada uno 500  $\mu$ l de hidróxido de sodio NaOH 0.05 M, se incubaron a 95°C por 15 minutos, después se les adicionó 50  $\mu$ l de solución Stop (Tris 1 M 12.1 gr, EDTA 10 mM 0.372 gr y se aforó a 100 ml de agua destilada a un pH de 8) y se utilizó esta mezcla directamente en la PCR.

### **11.2.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es un técnica para la amplificación *in vitro* de ácidos nucleicos. Los protocolos de PCR estándar pueden amplificar secuencias de ADN de menos de 3,000 pb, mediante la extensión simultánea de dos —primers”, cada uno complementario a la hebra opuesta de la región de ADN que se quiere amplificar, la cual ha sido desnaturalizada por calor. La ADN polimerasa acarrea la síntesis de una hebra complementaria de ADN en dirección 5' a 3' usando una sola hebra como templado. La PCR se desarrolla en tres fases: en la primera (desnaturalización) se produce la separación de las dos cadenas que forman la molécula de ADN que se quiere amplificar, para lo cual se debe aumentar la temperatura (94°C), cada una de estas cadenas actuará como molde para fabricar su cadena complementaria. En la segunda fase (alineamiento) se baja la temperatura para

conseguir que cada —primer” se una a su región específica dentro de la cadena de ADN. Por último en la tercera fase (amplificación) se sintetiza la cadena de ADN complementaria por acción de la ADN polimerasa (72°C). Así, en un ciclo de reacción se pueden obtener aproximadamente 50,000 copias de una molécula de ADN, de manera que se logra una amplificación exponencial en la que se pueden obtener hasta un millón de copias (McPherson et al., 1994), ver Figura 9.



**Figura 9.** Reacción en cadena de la polimerasa.

### 11.2.3 PCR para detectar la presencia del gen de la Proteína Precursora de Amiloide (APP), de la proteína Tau y la mutación en el gen de Presinilina 1 (PS1).

Para tipificar los ratones 3xTg-AD es necesario realizar dos PCR con diferentes condiciones. Con el primer PCR se detectan las proteínas tau y APP, mientras que con el segundo se detecta la presinilina 1. Se utilizaron diferentes —primers” o iniciadores para cada reacción (ver Anexo).

El producto del primer PCR (para APP y tau) se corre un gel de agarosa 1%, añadiendo a cada muestra 3  $\mu$ L de azul de bromofenol (Cybergold). Se usa el marcador de peso molecular y se corre el gel a 90-100 V para posteriormente observarlo en luz UV. La lectura es la siguiente:

- Silvestre = ausencia de bandas
- 3xTg-AD = 2 bandas, una de 500 pb para APP y otra de 350 pb para Tau aprox.

Una vez realizado el segundo PCR (para PSN1) se transfieren 5  $\mu$ l del producto de PCR a un tubo de 0.5 ml, se añade la enzima de restricción BstEII (ver Anexo) y se deja incubando a 37°C por 2 hrs. Esta enzima corta el producto en el sitio de mutación, esto debido a que estos primers podrían también amplificar el gen endógeno de PS1. Posteriormente se corren las muestras en un gel de agarosa al 1% y se observa el gel con luz UV. La lectura es la siguiente:

- Silvestres: sin mutación, una sola banda (cerca de 550 pb).
- 3xTg-AD homocigotos: con mutación en el gen de PSN1, 2 bandas (300 y 250 pb).
- En caso de tener ratones 3xTG-AD heterocigotos se identifican por la presencia de 3 bandas (cerca de 550, 300 y 250 pb).

### **11.3 Inmunohistoquímica**

Los anticuerpos son proteínas producidas por el sistema inmunitario como defensa contra las infecciones y tienen una cualidad única: se producen en miles de millones de formas, cada una con un lugar de unión diferente que reconoce específicamente a una molécula diana (o antígeno). La exacta especificidad de los anticuerpos frente a los antígenos los convierte en poderosas herramientas para la biología celular. Por lo tanto la inmunohistoquímica es un estudio histopatológico que se basa en la utilización de un anticuerpo (previamente marcado con una enzima que transforma un sustrato para que sea visible) que reconoce un antígeno específica (proteína). El complejo antígeno-anticuerpo (formado, mediante técnicas específicas como peroxidasa o fluorescencia), permite ser localizado e identificado dentro de las muestras tisulares o citológicas a estudiar, logrando la identificación de marcadores antigénicos característicos de

distintas líneas de diferenciación y función celular, con lo que se determina el tipo de célula involucrado en la muestra (Alberts et al., 2004).

Bajo este principio se utilizó dicha técnica para la detección de la proteína  $\beta$ -amiloide y la proteína tau hiperfosforilada en zonas relevantes para la EA en el modelo triple transgénico. La inmunohistoquímica para la detección del péptido  $\beta$ -amiloide se realizó con un anticuerpo policlonal de conejo (anti-A $\beta$  PAN), el cual fue amablemente donado por el Dr. Vitaly Vasilevko de la Universidad de California (Irvine EUA) evidenciado con un anticuerpo secundario biotinilado anti-rabbit IgG hecho en caballo (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc). Además, para la identificación del producto del transgene Tau<sub>P301L</sub> humana se utilizó un anticuerpo monoclonal HT7 evidenciado con un anticuerpo secundario biotinilado anti-mouse IgG (Vector Laboratories, Inc).

### **11.3.1 Procedimiento**

Se anestesiaron los animales con una mezcla de xilacina-ketamina (50 mg/kg - 100 mg/kg) a una dosis de 0.01 ml/mg de peso, vía intraperitoneal, para perfundir vía intracardiaca con solución salina al 0.9% seguida por una solución fijadora de paraformaldehído al 4% en PB 0.1 M con pH 7.4, después, se extrajeron los cerebros y se post-fijaron dos horas en la misma solución. Una vez fijados, se hizo un bloque con la ayuda de una matriz para conseguir bordes planos y poder pegarlos en la platina del Vibratome 3000 Sectioning System, en el cual se obtuvieron rebanadas de 50  $\mu$ m de espesor, las cuales fueron colectadas en pozos con PB 0.1 M. La técnica se hizo en flotación.

Soluciones requeridas:

- PBS 0.1 M (Anhídrido Dibásico 11.5 gr, Monohidrato Monobásico 2.6 gr,
- NaCl 9 gr, en 1L).
- PBS-A: PBS + 0.1% Tritón X100.
- PBS-B: PBS + 0.1% Tritón X100 + 2% Suero Bovino.

Se hicieron dos lavados con PBS al 0.1 M de 5 min cada uno, se dejaron en ácido fórmico durante 7 min, se hicieron otros dos lavados, uno con PBS-A durante 15 min y otro con PBS-B durante 30 min; después se incubó el anticuerpo primario a una concentración de 1:1000 (anti-A $\beta$  PAN y/o HT7) en PBS-B y se dejó toda la noche, al otro día se hicieron dos lavados con PBS-A de 5 min cada uno y otro más con PBS-B de 15 min, se adicionó el anticuerpo secundario biotinilado a una concentración 1:1000 (anti-rabbit IgG hecho en caballo y/o anti-mouse IgG) en PBS-B durante 2 hrs, se lavó con PBS-A dos veces durante 5 min y uno más con PBS-B durante 15 min, al final se hicieron dos lavados con PBS durante 10 min. Se montaron las rebanadas en portaobjetos y se cubrieron con medio de montaje.

#### **11.4. Azul de Evans**

El Azul de Evans o T-1824 es un compuesto azoico (colorante que posee grupos cromóforos con funciones nitrogenadas), con fórmula química C<sub>34</sub> H<sub>24</sub> N<sub>6</sub> O<sub>14</sub> S<sub>4</sub> Na<sub>4</sub> y peso molecular de 960.842 g/mol, el cual tiene mucha afinidad por la albúmina sérica. Es hidrosoluble y fluoresce en el canal rojo, entre las longitudes de onda 510 y 560. La perfusión con Azul de Evans representa un método eficaz, sencillo y económico para evidenciar la vasculatura.

##### **11.4.1 Procedimiento**

Se anestesió a los ratones con una mezcla de xilacina-ketamina (50 mg/kg - 100 mg/kg) vía intraperitoneal, se ubicó una cánula intracardiaca y se cortó la aurícula derecha, se le administró heparina (178 U/mg–200  $\mu$ l) a través del ventrículo izquierdo, inmediatamente después se perfundió con Azul de Evans al 1% en solución salina fisiológica (Sharma et al., 1992) y se cambió la inclinación del ratón durante 2 minutos para facilitar la entrada mediante la gravedad. Se extrajo el encéfalo, se congeló con metilbutano en hielo seco y se procedió a cortar en un crióstato (marca Leica, modelo CM1510) rebanadas sagitales de 50  $\mu$ m de grosor, las cuales se pedgan directo en portaobjetos gelatinizados. Posteriormente, se observó al microscopio confocal Axio

Imager Z1 de Zeiss mediante el programa Axio Vision con el módulo MOSAIX con un objetivo 10x y un filtro para rodamina, se capturaron imágenes de 10 cortes por zona (hipocampo y corteza frontal), por animal y por condición experimental, de manera que al final se obtuvieron 400 imágenes en total.

El análisis de las imágenes se hizo con el programa ImageJ, mediante el método del valor umbral o “threshold” que considera un grupo de algoritmos cuya finalidad es segmentar gráficos, es decir, separa los objetos de interés de una imagen en particular. Esta imagen segmentada está compuesta por valores numéricos dados por el color para cada pixel (blanco=1, negro=0) la pertenencia de un pixel a un cierto segmento se decide mediante la comparación de su nivel de gris con un cierto valor umbral (Rodríguez, 2005). El nivel de gris de un pixel equivale a su nivel de luminosidad, por lo que las imágenes capturadas mantienen el valor de luminosidad constante. Para hacer este análisis se establece un valor umbral con los ratones silvestres por el día en el que fueron procesados, y es este valor el que será utilizado para analizar los grupos experimentales. Una vez obtenida la imagen se delimita el área a analizar y se aplica el “threshold”, de manera que se obtienen dos cifras, una correspondiente al área total delimitada y otra que corresponde al área ocupada por vasculatura, se divide la segunda cifra entre la primera y se obtiene un índice de densidad vascular, el cual se grafica y se somete a un análisis estadístico mediante un ANOVA de dos vías y *post-hoc* de Fisher.

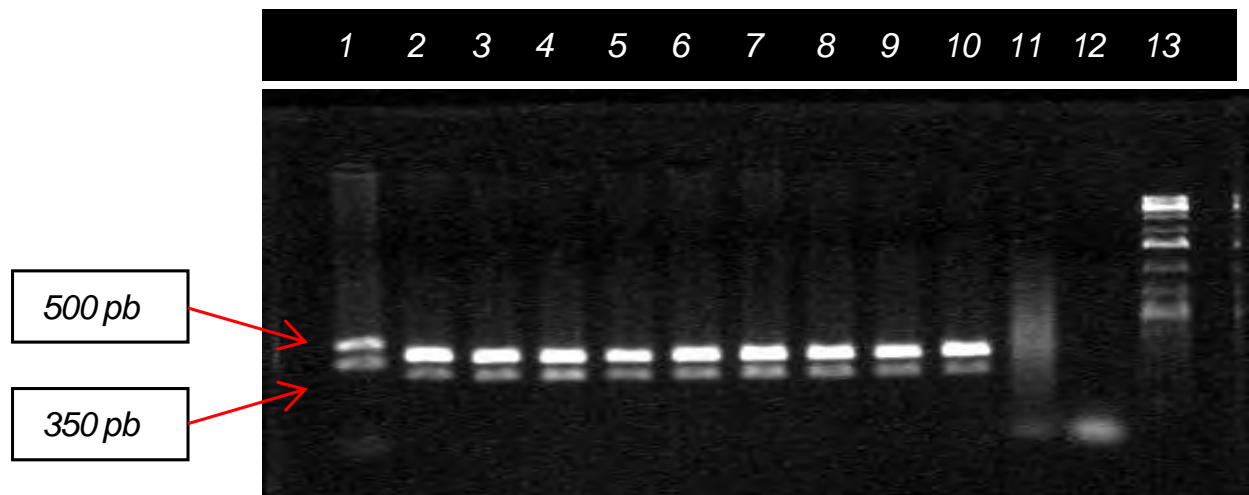
## 12. RESULTADOS

---

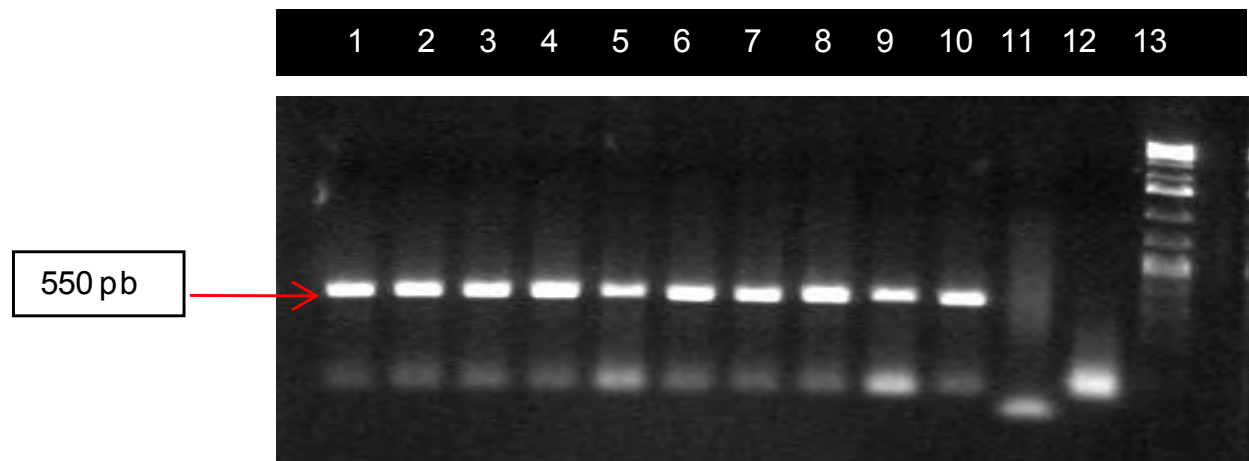
### 12.1 Genotipificación

Se realizó la identificación de los 3 genes del modelo triple transgénico mediante la técnica de PCR anteriormente descrita, la cual se llevó a cabo en la Unidad de Proteogenómica – INB, UNAM.

Como primer paso se realizó la PCR para la identificación del gen de APP que mide 500 pb y del gen de Tau de 350 pb (Fig. 10). Posteriormente, se realizó otra PCR para identificar el gen de PS1 de 500 pb (Fig. 11), una vez identificado, el producto de PCR se sometió a digestión mediante la incubación con la enzima de restricción BstI, la cual corta en el sitio de mutación en este último gen (Figura 12).

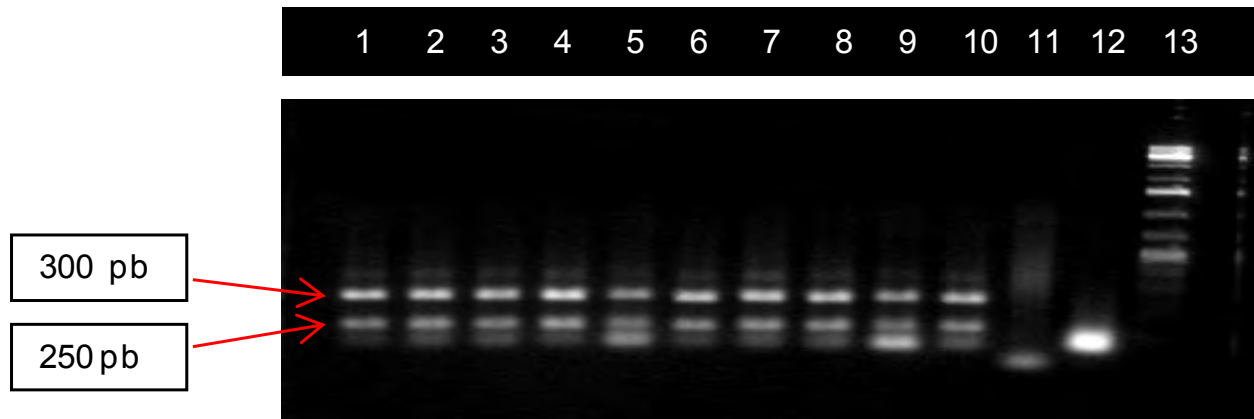


**Figura 10.** Detección del gen APP y Tau mediante PCR. Se muestra un gel de electroforesis, en donde del carril 1-10 se observan las dos bandas que corresponden a la detección de los genes de APP (500 pb) y tau (350 pb) del ratón 3xTg-AD homocigoto. Nótese la diferencia con el carril 11 que corresponde al ADN del ratón silvestre; con el 12 control negativo y el 13 escalera del marcador Gene ruler.



**Figura 11.** Detección del gen PSN1. Se muestra un gel de electroforesis, en donde, del carril 1-10 se observa la presencia del gen de presinilina del ratón 3xTg-AD homocigoto. Nótese la diferencia con el carril 11 que corresponde al ratón silvestre; con el 12 control negativo y el 13 el marcado Gene ruler.





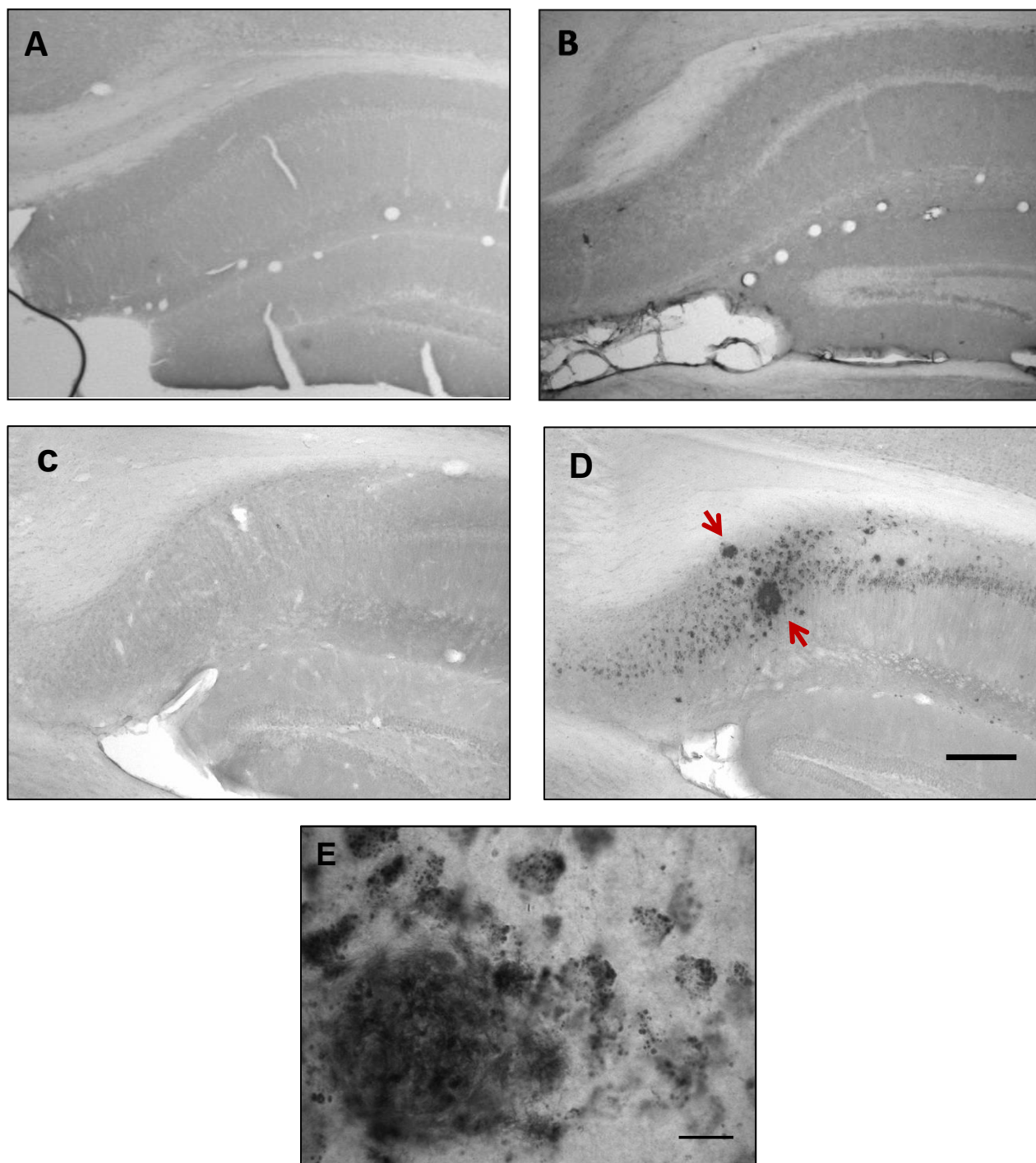
**Figura 12.** Detección de la mutación en el gen de PSN1. Se muestra un gel de electroforesis, en donde se ha detectado la mutación en el gen de presinilina en el ratón 3xTg, mediante el corte hecho por la enzima de restricción BstI en el sitio de mutación, generando 2 bandas una de 300 pb y la otra de 250 pb como se puede ver del carril 1 al 10, en el 11 se indica el silvestre y en el 12 el control negativo y el 13, el marcador de peso molecular Gene ruler.

## 12.2. Inmunohistoquímica

### 12.2.1 Observaciones cualitativas.

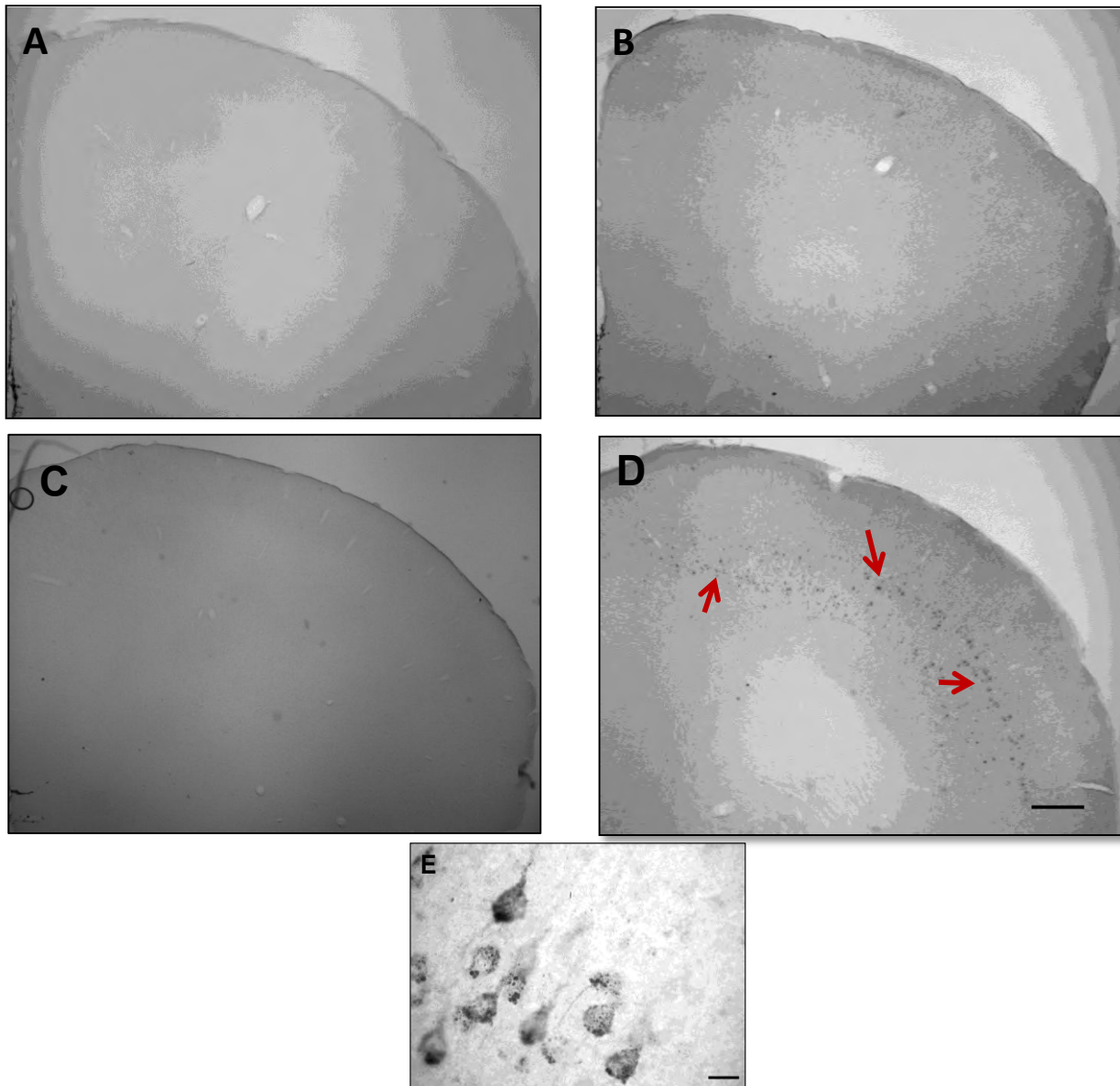
#### Inmunohistoquímica para el péptido $\beta$ -amiloide

Al realizar las inmunohistoquímicas para la detección del péptido  $\beta$ -amiloide, se encontró una ausencia de inmunoreactividad en el hipocampo de ambos grupos, silvestre (A) y transgénico (B) a los 2 meses de edad. En cambio, a los 10 meses de edad es evidente la diferencia de marca, ya que en los animales silvestres (C) no existe señal de inmunoreactividad y en los animales transgénicos (D) se puede observar la presencia de las características placas amiloides, principalmente en el área del *subículum* y CA1. Acercamiento a 100x de una placa amiloide (E) (Figura 13),



**Figura 13.** Inmunohistoquímica para Aβ en hipocampo. En un corte coronal en Bregma -2.06 mm, A) Ausencia de señal en un ratón silvestre de 2 meses de edad. B) Ausencia de señal en un ratón 3xTg-AD de 2 meses de edad. C) Ausencia de señal en un ratón silvestre de 10 meses de edad. D) Con las flechas rojas se señala la presencia de placa de péptido β-amiloide en un ratón 3xTg-AD de 10 meses de edad, Escala = 300 μm E) Acercamiento a 100x de la placa amiloide. Escala = 200 μm.

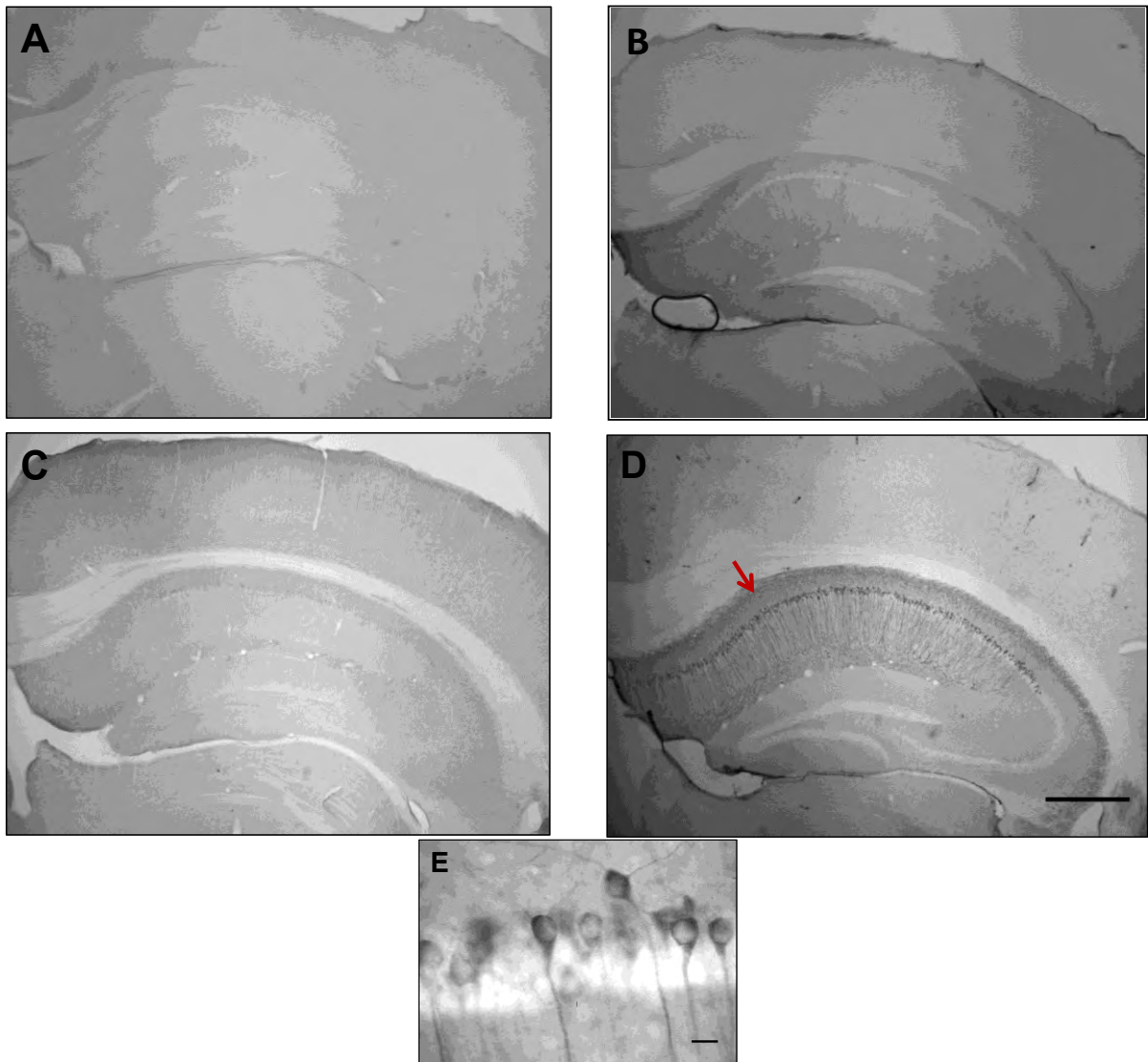
La Figura 14 muestra un resultado semejante en la corteza frontal, donde no se observa inmunoreactividad a la edad de 2 meses en los animales transgénicos (B) en comparación con los silvestres (A), pero a la edad de 10 meses se puede apreciar una gran cantidad de inmunoreactividad en los animales transgénicos (D) en comparación con los silvestres (C). Esta inmunoreactividad está intracelularmente como lo muestra el acercamiento a 100x (E).



**Figura 14.** Inmunohistoquímica para A $\beta$  en la corteza frontal. En Bregma 1.10 mm con un aumento de 10x. A) Ausencia de señal en un ratón silvestre de 2 meses de edad. B) Ausencia de señal en un ratón 3xTg-AD de 2 meses de edad. C) Ausencia de señal en un ratón silvestre de de 10 meses de edad. D) Con las flechas rojas se señala la presencia de péptido  $\beta$ -amiloide en un ratón 3xTg-AD de 10 meses de edad. Escala = 500  $\mu$ m. E) Acercamiento a 100x de la formación de placas amiloides. Escala = 20  $\mu$ m.

## Inmunohistoquímica para tau hiperfosforilada

Al realizar las inmunohistoquímicas para la detección de la proteína tau se encontró, que a la edad de 2 meses no se observan diferencias entre los animales controles (A) y los transgénicos (B), pero a los 10 meses de edad es evidente la inmunoreactividad en el hipocampo principalmente en *subículum* y CA1 de ratones transgénicos (D) en comparación con ratones silvestres (C). Acercamiento a 100x (E) (Figura 15).



**Figura 15.** Inmunohistoquímica para la proteína tau en hipocampo. Bregma -2.06 mm. A) Ausencia de señal en un ratón silvestre de 2 meses de edad. B) Ausencia de señal en un ratón 3xTg-AD de 2 meses de edad. C) Ausencia de señal en un ratón silvestre de 10 meses de edad. D) Con la flecha roja se señala la presencia de la proteína tau en un ratón 3xTg-AD de 10 meses de edad. Escala = 500 µm. E) Acercamiento a 100x. Escala = 20 µm.

## 12.3 Azul de Evans

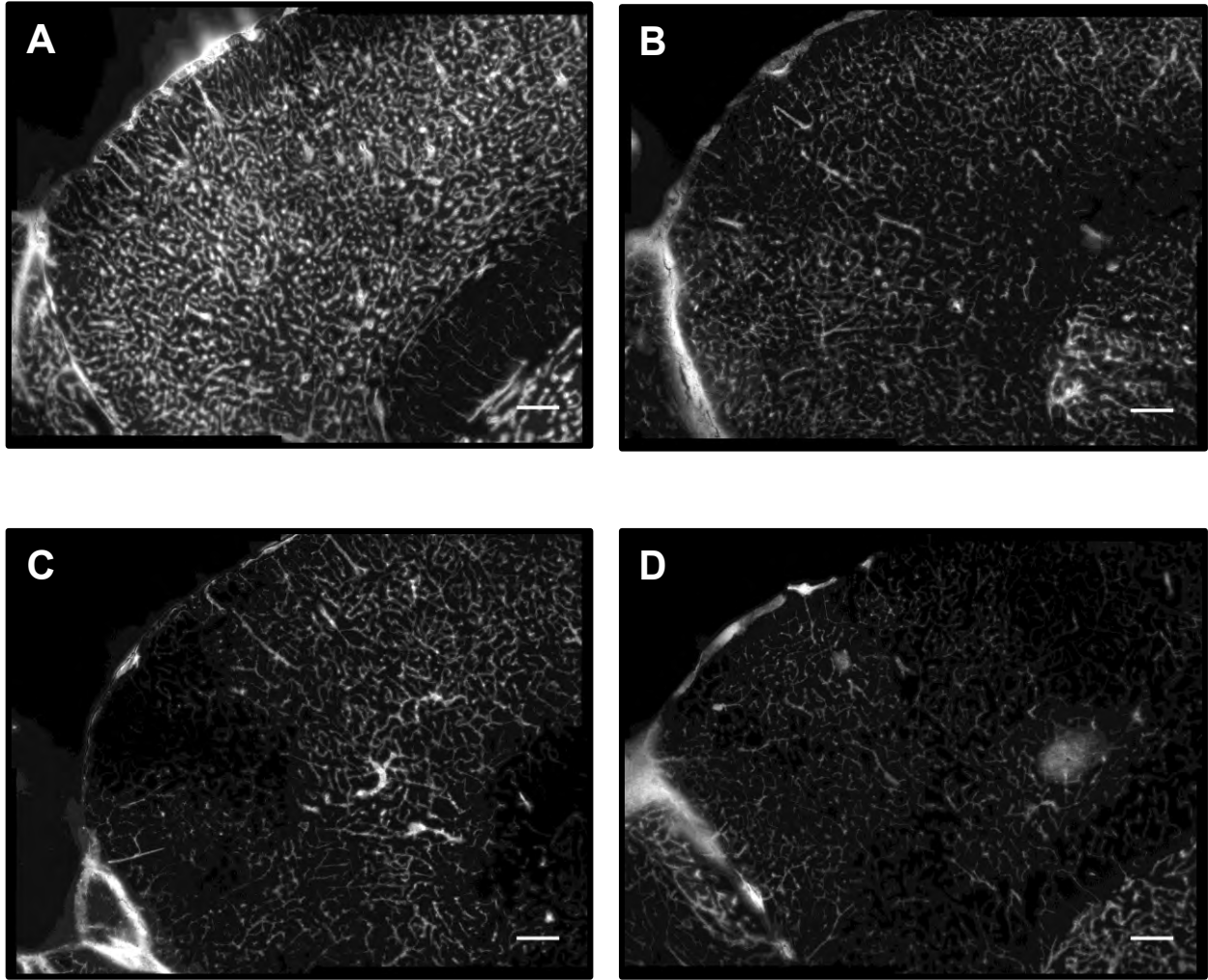
### 12.3.1 Observaciones cualitativas de la vascularidad

En la Figura 8 se puede observar la localización de las zonas evaluadas, la corteza frontal y el hipocampo a partir de cortes sagitales de 50  $\mu\text{m}$  de espesor.

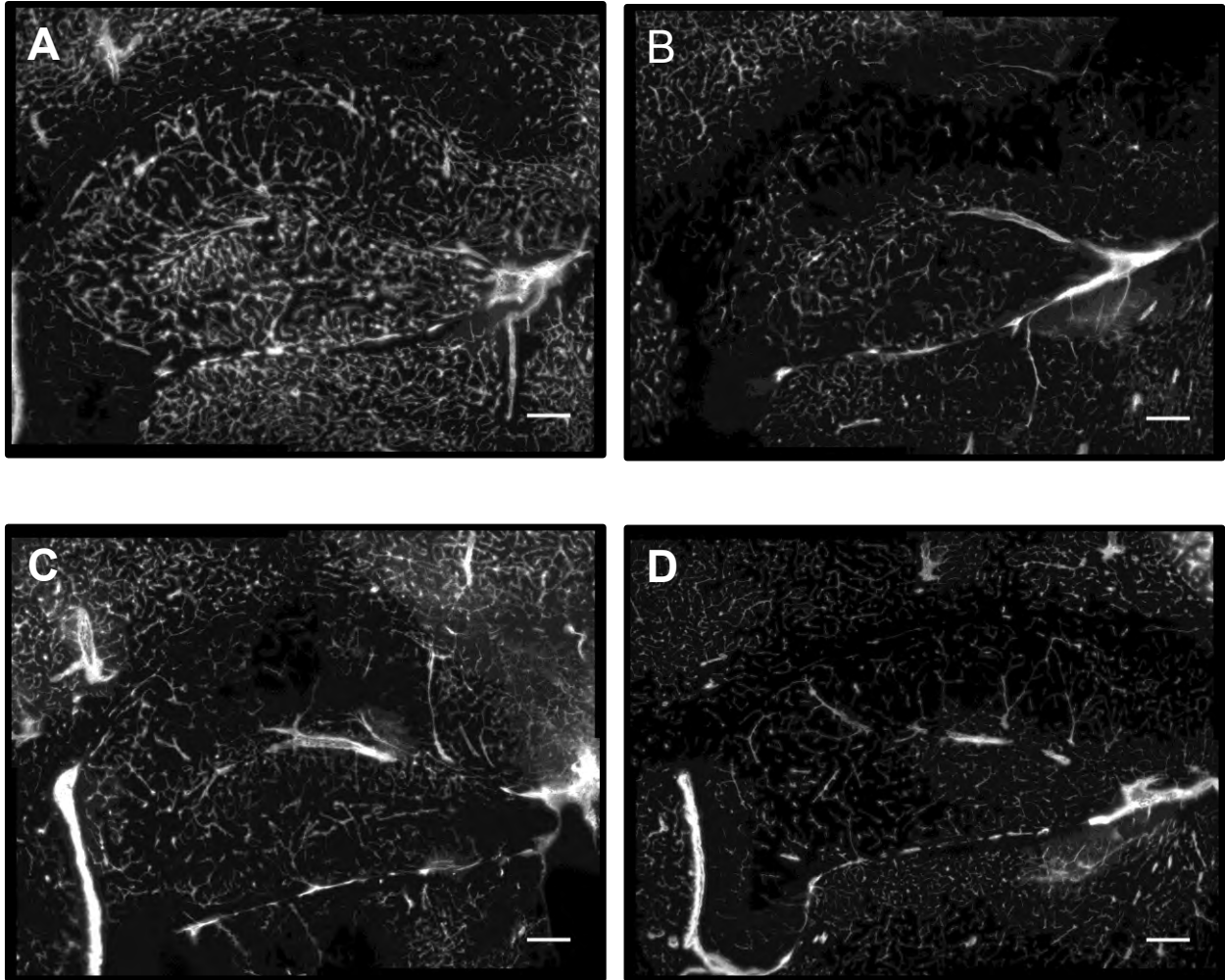
En las figuras 16 y 17 se muestran las imágenes digitalizadas tomadas de la vasculatura de la corteza frontal y del hipocampo en animales silvestres y transgénicos de 2 y 10 meses de edad. Cabe señalar que sólo se muestran las fotografías representativas de una localización correspondiente al plano lateral 1.32 mm según el atlas de Paxinos & Watson, 2004.

Cualitativamente no se pueden observar diferencias entre la corteza frontal de un ratón silvestre a los 2 meses (Fig. 16A) y la corteza frontal de un ratón 3xTg-AD también de 2 meses de edad (Fig. 16C), las diferencias son más evidentes cuando se compara la corteza frontal de un ratón silvestre de 10 meses (Fig. 16B) y un transgénico de 10 meses (Fig. 16D). También se puede ver una diferencia mayor comparando a un ratón transgénico de 2 meses con uno de igual condición a los 10 meses de edad, en donde se puede observar una disminución significativa de la señal del Azul de Evans en éste último.

En lo que respecta al hipocampo, se pueden observar en la Figura 17 una reducción en la señal del Azul de Evans en el hipocampo de un ratón silvestre de 2 meses (A) en comparación con un ratón transgénico de 2 meses (C), y estas diferencias se mantienen al comparar a un ratón silvestre de 10 meses (B) con un ratón transgénico de 10 meses de edad (D).



**Figura 16.** Vasculatura de la corteza frontal. En el ratón silvestre de 2 meses (A), de 10 meses (B) y del ratón 3xTg-AD 2 meses (C) y de 10 meses (D) de edad. Escala = 100 m $\mu$ .

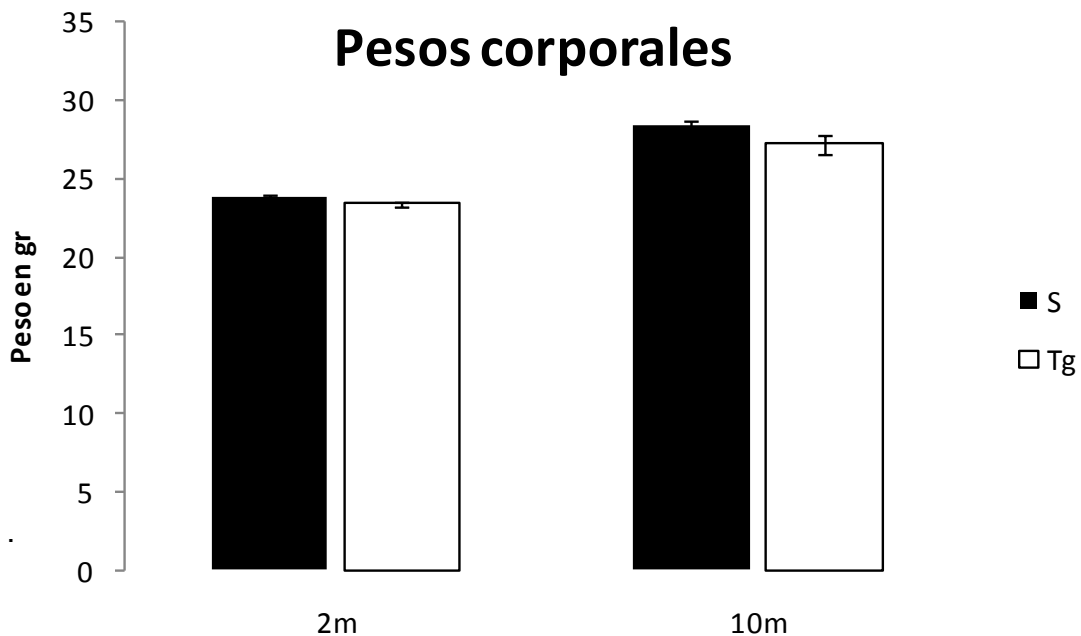


**Figura 17.** Vasculatura del Hipocampo. En el ratón silvestre de 2 meses (A), de 10 meses (B) en el ratón 3xTg-AD de 2 meses (C) y de 10 meses de edad (D) aumentos a 10X. Nótese la disminución cualitativa de la vasculatura del ratón transgénico. Escala = 100 m $\mu$ .

### 12.3.2 Análisis de características físicas

Previo al análisis de la densidad vascular se compararon las características físicas de los ratones tales como el peso corporal y el volumen cerebral.

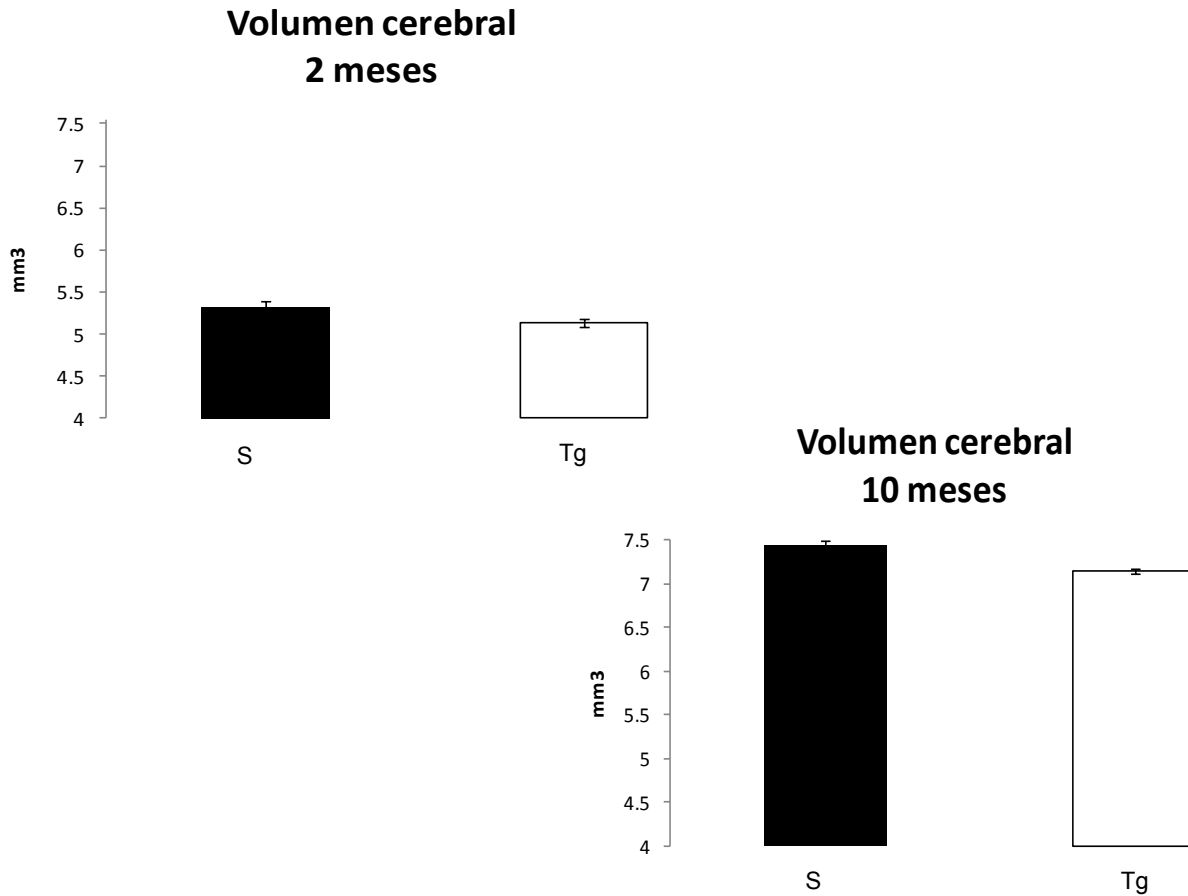
En lo que respecta al peso corporal al hacer una ANOVA no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las dos edades estudiadas como se puede apreciar en la Figura 18. Sin embargo, cuando se comparó la ganancia de peso de una edad a otra en los individuos de un mismo grupo con una “ $T$ -Student” se observó un incremento del 16.3% de ganancia significativa ( $P < 0.0001$ ) en el grupo silvestre, mientras que en el grupo de los transgénicos el incremento en el peso fue del 13.9% significativo ( $p < 0.0001$ ). Con estos datos se puede decir que la tasa de crecimiento de los ratones transgénicos fue un 2.4% menor a lo ganando por el grupo silvestre.



**Figura. 18.** Medias  $\pm$  EEM de pesos corporales del grupo silvestre (S) y del transgénico (Tg). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las dos edades estudiadas: 2 meses (2m) y 10 meses (10m) de edad.

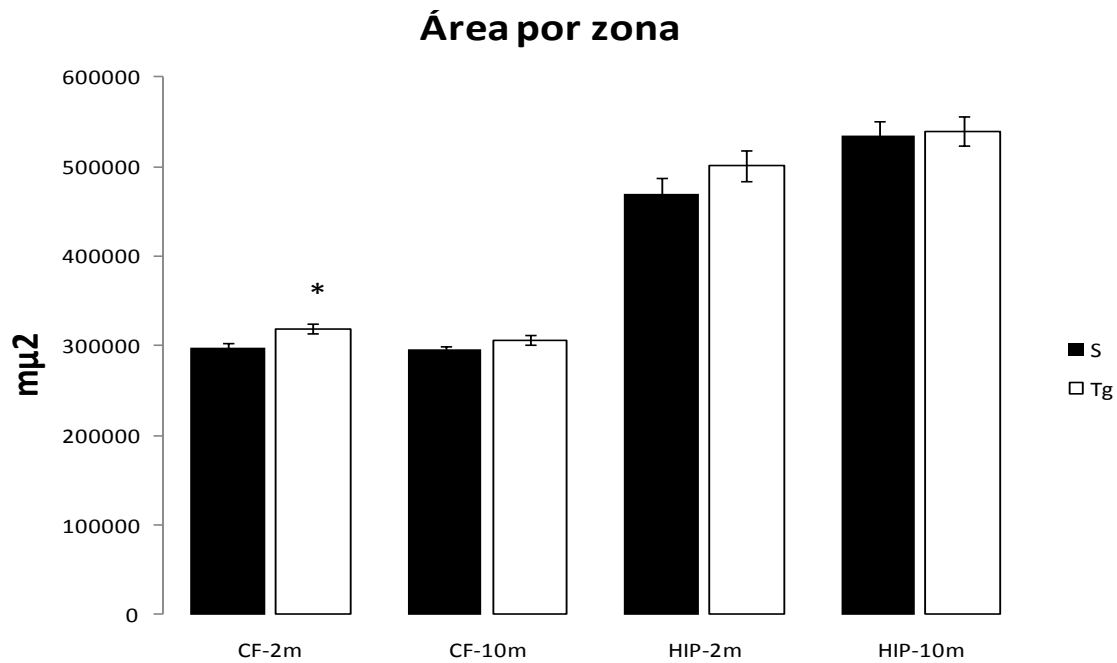
El volumen cerebral se obtuvo midiendo y multiplicando la longitud por el ancho y el grosor de cada cerebro, de manera que al realizar una “ $T$ -Student” para cada edad (2 y 10 meses), la comparación del volumen cerebral entre grupos (silvestre y transgénico) no arrojó diferencias estadísticamente significativas (Figurta 19).





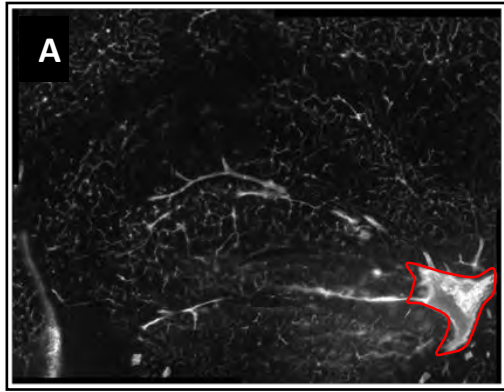
**Figura 19.** Media  $\pm$  EEM de los volúmenes cerebrales. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las dos edades en el grupo silvestres (S) y en el transgénico (Tg).

Una vez realizada la perfusión con Azul de Evans, se procedió a cortar los cerebros para obtener las fotografías, con las cuales se delimitaron las áreas de interés (corteza frontal e hipocampo) con el programa —Image J”. Se realizó una ANOVA de dos vías seguida de una prueba *post-hoc* de Fisher en la que se encontró aumento significativo en el área de la corteza frontal a los 2 meses de edad en el grupo transgénico ( $F_{1,98}=8.455$   $P<0.01$ ). En corteza frontal de 10 meses y el hipocampo de 2 y 10 meses no se encontraron diferencias estadísticamente significativas como lo muestra la Figura 20.

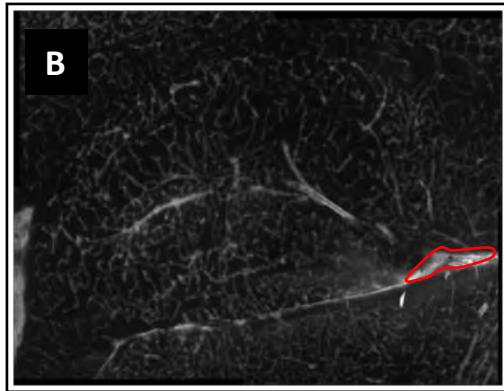
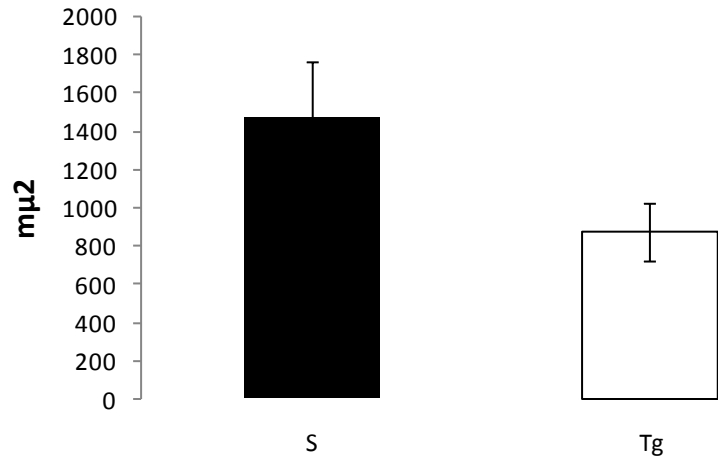


**Figura. 20.** Medias y  $\pm$  EEM del área total de las zonas estudiadas corteza frontal (CF) e hipocampo (HIP). En los grupos silvestres (S) y en los transgénicos (Tg), se encontró incremento significativo ( $P < 0.005$ ) en el área de la CF en los TG a los 2 meses (m) de edad. No se encontraron diferencias significativas en la CF a los 10m y en el HIP a los 2 y 10 m de edad.

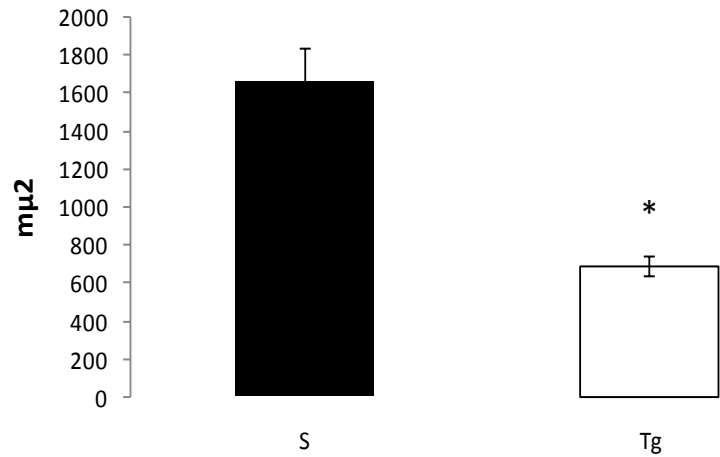
Se analizó también el área ocupada por la Arteria Transversa Hipocampal (la principal arteria del hipocampo) en un solo corte correspondiente a Lateral 1.32 mm y se analizó mediante una “Student”, con la cual se observó disminución significativa del área de la arteria en los ratones transgénicos a los 10 meses de edad con una  $P < 0.0001$ , en comparación con los silvestres. A los 2 meses de edad no se encontraron diferencias significativas ( $P = 0.0838$ ) (Fig. 21). Esto significa que a los 10 meses de edad los ratones transgénicos tuvieron un 58.56% menos área de la arteria hipocampal transversa comparados con los silvestres, y dentro del mismo grupo a los 2 y 10 meses de edad la arteria redujo su área en un 26.84%, mientras que la arteria del grupo silvestre tuvo un aumento en su área del 11.51%.



**Arteria hipocampal - 2m**



**Arteria hipocampal - 10 m**



**Figura 21.** Medias y  $\pm$  EEM de la arteria transversa hipocampal en un corte Lateral 1.32 mm (A y B). En las gráficas se muestra que hubo reducción significativa ( $P < 0.0001$ ) del área en los ratones transgénicos (Tg) a los 10 meses de en comparación con el grupo silvestre (S).

### 12.3.3. Análisis de la densidad vascular.

Para el análisis se utilizó el programa estadístico StatView, para lo cual se decidió considerar 10 imágenes de cada zona por animal haciendo un total de 400 imágenes. De manera que, se hizo el diseño estadístico con una ANOVA de dos vías (condición y edad) por cada área y edad, además de su respectiva prueba *post-hoc* de Fisher (Figura 22).

Así, el análisis estadístico de la densidad vascular mostró disminución significativa ( $F_{1,98} = 33.914$   $p < 0.0001$ ) en la corteza frontal en los ratones transgénicos de 2 meses de edad, reflejando un 38.54% menos área ocupada por vasculatura que los ratones silvestres en la misma área a la misma edad. Y que a los 10 meses de edad, en la misma área, también hubo una reducción significativa ( $F_{1,98} = 16.561$   $p < 0.0001$ ) de la densidad vascular y esta reflejó un 43.88% de área ocupada por vasculatura en los ratones transgénicos en comparación con sus controles silvestres.

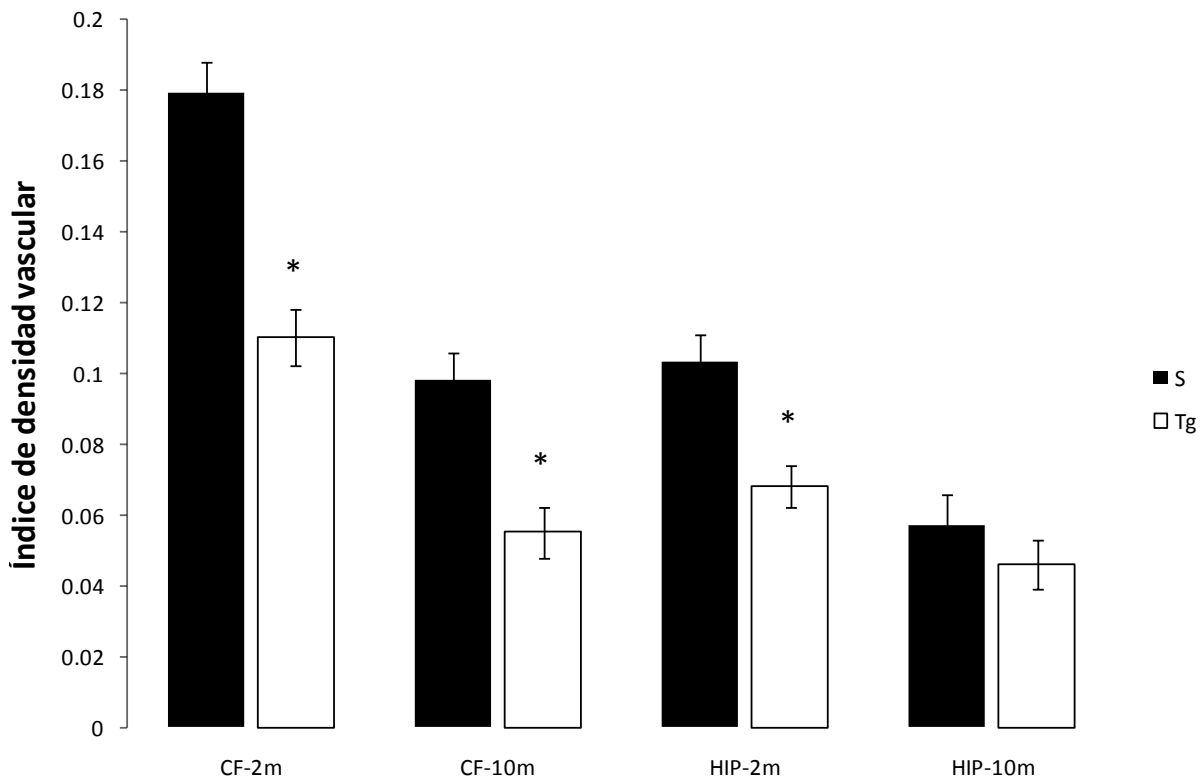
En los que respecta al hipocampo, en los ratones transgénicos de 2 meses de edad hubo disminución significativa de la densidad vascular ( $F_{1,98} = 11.837$   $p < 0.0009$ ), reflejando un 33.99% menos área ocupada por vasculatura que los ratones silvestres. A los 10 meses de edad, esta disminución no se hace evidente ya que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $F_{1,98} = 0.802$   $p = 0.3728$ ) (Fig. 22).

Por otra parte, se hizo una comparación entre las dos edades de un mismo grupo para saber cuánto se disminuye la vasculatura a lo largo de la vida, y se encontró que la corteza frontal de los ratones silvestres de 10 meses de edad presenta una disminución en la densidad vascular del 54.7%, mientras que en el ratón transgénico esta disminución es del 50%.

En el hipocampo de los ratones silvestres esta disminución es del 55.33%, mientras que en los ratones transgénicos es más evidente siendo del 67.64%, lo que

sugiere que de las dos estructuras que se analizaron en este trabajo, el hipocampo es la estructura más dañada por la Enfermedad de Alzheimer.

## Densidad vascular



**Figura 22.** Medias y  $\pm$  EEM de la densidad vascular en la corteza frontal (CF) y en el hipocampo (HIP). En los grupos silvestres (S) y transgénico (Tg) de 2 y 10 meses (m), se pueden observar las diferencias significativas ( $P < 0.0001$ ) entre ambos grupos (S y Tg) a los 2 y 10 m de edad en la CF y en el HIP a los 2 m de edad en donde se encontró diferencia significativa ( $P = 0.0009$ ) entre ambos grupos. En todos los casos las medias fueron menores en los animales Tg. En el HIP a los 10 m no se observaron diferencias significativas entre los grupos S y Tg.

### 13. DISCUSIÓN

---

En resumen, la EA es considerada una enfermedad multifactorial por la interacción de diversos aspectos: la edad (Dickstein et al., 2007), genética (Thomas & Fenech, 2007), la toxicidad del péptido  $\beta$ -amiloide (Fiala, 2007), la presencia del alelo ApoE4 (Kim, et al., 2009; Mortimer et al., 2009), el metabolismo del colesterol (Raffai & Weisgraber, 2003), las mutaciones en los genes de Presinilinas 1 y 2 (Tandon & Fraser, 2002), el desbalance en el proceso de fosforilaciones y desfosforilaciones de la proteína tau (Gong & Iqbal, 2008), procesos alterados de autofagia (Funderburk et al., 2010), desbalance de la dinámica del  $\text{Ca}^{2+}$  (Bojarzky, et al., 2007), el desencadenamiento de estrés oxidativo (Butterfield, et al., 2001), la disfunción mitocondrial (Müller, et al., 2010), la activación microglial (Chern et al., 2010), la disfunción de la barrera hematoencefálica (Deane et al. 2009), la citotoxicidad por glutamato (Gazulla & Cavero-Nagore, 2006), influencias hormonales (Bozzo et al., 2010) y por supuesto los aspectos vasculares (Kalaria, 2000; Farkas & Luiten, 2001; Iadecola, 2004; Zlokovic, 2005; Zlokovic, 2008; Zacchigna et al., 2008; Dickstein et al., 2010).

Como se puede apreciar, es tal la cantidad de información acerca de la EA y son tantos los tópicos implicados en la patología, que aún con toda la investigación realizada a nivel mundial, ha sido verdaderamente complicado llegar a establecer una causa bien definida de la enfermedad. Es por eso que, el presente trabajo de investigación se limitó a estudiar la densidad vascular de zonas cerebrales que regulan procesos cognitivos (corteza frontal e hipocampo) y que se sabe se ven comprometidas en el proceso neurodegenerativo de la EA en el modelo triple transgénico para la EA. Se tomaron dos etapas, una etapa previa al establecimiento de los signos patológicos de la EA (2 meses) y en una etapa en el que ya están establecidas las placas amiloides y la fosforilación de la proteína tau (10 meses). De esta manera, se pudo observar primero si existe una reducción en la densidad vascular bajo una alteración genética (como sucede en la forma familiar del Alzheimer), y

también si esta densidad vascular se ve modificada por el factor edad correlacionada con el establecimiento de las placas amiloides.

Para lograr ésto, como primer paso se genotipificaron los ratones para corroborar que fueran triples transgénicos homocigotos para la EA, esto se hizo mediante PCR, y se pudo observar en los geles de agarosa la presencia de las 3 bandas que corresponden a los tres transgenes mutados y/o sobreexpresados en este modelo (PS1<sub>M146V</sub> APP<sub>Swe</sub> y tau<sub>P3001</sub>). Los animales silvestres no presentan las bandas debido a que no sobreexpresan dichas proteínas y los controles negativos carecen de ADN para verificar que la muestra no esté contaminada.

El estado de la patología se evidenció mediante la realización de inmunohistoquímicas para la proteína  $\beta$ -amiloide y para la proteína tau fosforilada, se determinó con esto que la edad de 2 meses es una etapa previa a la aparición de los signos patológicos de la EA debido a que no hubo inmunoreactividad a ambas proteínas, y que a los 10 meses de edad estos signos ya están bien establecidos. Con esto se sustenta que ambas edades evaluadas en el presente trabajo corresponden a diferentes estadios de la EA.

En primera instancia se hizo una comparación de los pesos corporales en los grupos estudiados, esto mostró que dentro de un mismo grupo, el incremento de peso (de los 2 a los 10 meses de edad) se da de manera normal. Es decir, el grupo transgénico se comportó de igual manera que el grupo silvestre, lo que indica que la manipulación genética no está afectando el crecimiento corporal en esta cepa transgénica.

En cuanto al volumen cerebral no se encontraron diferencias entre ambos grupos, transgénico y silvestre, esto hace pensar que la manipulación genética hecha en este modelo para intentar replicar el desarrollo de la EA, no está afectando este parámetro. Estos resultados son contrarios a lo reportado en humanos, donde se ha visto mediante Resonancia Magnética una pérdida de volumen cerebral global en pacientes con la EA (Pedrosa et al., 2010), ésta discrepancia con la literatura tal vez se

deba a la diferencia en técnicas utilizadas, ya que la mayoría de los reportes que apoyan esto son estudios realizados con técnicas de imagen (RM, PET).

Las áreas cerebrales estudiadas (corteza frontal e hipocampo) en ambos grupos, no presentaron diferencia alguna, exceptuando la corteza frontal a los 2 meses de edad, en la que hay un aumento del área en comparación con el grupo silvestre. Este resultado es inconsistente con los hallazgos en humanos, ya que en pacientes con la EA se observa una atrofia cortical en áreas prefrontales y parietales especialmente (Pedrosa et al., 2010; Rabinovici, 2007), al igual que en hipocampo (Scarmeas & Stern, 2004; Rabinovici, 2007). Sin embargo, nuestros resultados difieren con estos reportes debido quizá, a la metodología utilizada en el presente trabajo, donde únicamente se midió el área ocupada por cada región cerebral (corteza frontal e hipocampo), lo cual no habla de volumen, ya que para eso se tendría que haber realizado algún método de estereología (Granados-Rojas et al., 2004). Aún así, nuestros resultados hablan quizá de que en primera instancia, la manipulación genética sobre el modelo 3xTg-AD, está influyendo en el desarrollo de la corteza frontal debido a que este aumento en el área de la corteza frontal se da a la edad de 2 meses, es decir una etapa muy temprana en el desarrollo del animal.

Cuando se analizó el área de la arteria hipocampal transversa, que es la principal arteria que irriga al hipocampo (la cual emerge de la Arteria Posterior Cerebral, y ésta a su vez de la Arteria basilar), se encontró que dicha área estuvo disminuída en un 58.56% en los animales transgénicos a los 10 meses de edad en comparación con sus controles. Esto sugeriría entonces, que dicha arteria estaría cursando con algún proceso de estenosis en el que la luz (en este caso se asume que el área corresponde a la luz de la arteria) se ve disminuída, quizá por la presencia de ACA activando un proceso inflamatorio como respuesta a la existencia de condiciones irritantes de manera crónica, como pudiera ser la deposición del A $\beta$  y la consecuente activación microglial que tiene un rol fundamental en la patogénesis inflamatoria de la EA. Derivando esto en la producción y liberación de ROS, interleucinas, proteínas del complemento, activación de la COX-2 (Candore et al., 2006; McNaull et al., 2008; Sastre et al., 2010).



En lo que respecta a la disminución de la densidad vascular que se presenta en los ratones silvestres cuando se comparan las dos edades, sugiere que el proceso de envejecimiento por sí mismo está teniendo una influencia negativa en ambas estructuras, siendo más significativa esta diferencia en la corteza frontal. Esta idea de que el proceso de envejecimiento por sí mismo causa disminución de la densidad vascular es apoyada por diversos autores como Abernethy et al. (1993) en donde estudia la microdensidad vascular en el núcleo paraventricular del hipotálamo y encuentra que dicha densidad se halla disminuída en el grupo de ratas seniles. Bullitt et al. (2010) realizó un estudio de alta resolución mediante angiograma con Resonancia Magnética con voluntarios sanos seniles y jóvenes, en donde también encontró disminución significativa en el número de vasos en la corteza cerebral anterior en los voluntarios seniles.

Con respecto a la comparación de la densidad vascular entre grupos (silvestre y transgénico), los resultados indican que la manipulación genética hecha en el modelo triple transgénico que intenta replicar la EA, tiene una influencia negativa, es decir, disminuye la densidad vascular de zonas relevantes para procesos cognitivos (corteza frontal e hipocampo) tanto en una etapa previa al establecimiento de los signos patológicos (2 meses) como en una etapa donde ya están presentes (10 meses). Así pues, hay diversos trabajos que destacan a la influencia de la EA sobre la densidad vascular cerebral, tal como el publicado recientemente por Gama-Sosa y colaboradores en el 2010 en el que estudian la patología vascular relacionada con la EA sobre un modelo transgénico para el gen de Presenilina-1, encontrando reducción de la vasculatura en el hipocampo, acompañada de atrofia de la misma estructura, además de una apariencia irregular y adelgazamiento de la membrana basal. De igual manera Kitaguchi y colaboradores (2007) reportan disminución en la cama vascular en cerebros de pacientes con EA y Bourasset et al. (2009) abordó este tema trabajando con el ratón 3xTg-AD de 11 meses de edad encontraron reducción significativa en el volumen cerebrovascular del hipocampo pero no en la corteza frontal ni en el cerebelo, un

incremento del 32% en la delgadez de la membrana basal en la vasculatura cortical en los 3xTg y un 20% de incremento del colágeno cerebral.

Es entonces importante decir que, estos hallazgos en la densidad vascular están hablando de un proceso degenerativo, en el que la integridad de estructuras vasculares se está viendo afectada por efecto de la EA y que en la actualidad hay diversas teorías que tratan de explicar este desbalance en la salud vascular. En la literatura existen las que están implicadas con procesos como la Angiopatía cerebral amiloide (degeneración de células musculares lisas, procesos isquémicos), genotipo Apo E (deficiencias en el mecanismo de transporte y eliminación de colesterol), colesterolemia, deficiencias en la eliminación del péptido A $\beta$ , procesos de hipertensión, hipotensión, diabetes mellitus, tabaquismo, lo que desencadena estrés oxidativo y afecta el funcionamiento de la barrera hematoencefálica y la estabilidad endotelial. En lo que respecta a estos resultados sería necesario

Sin embargo, queda un punto que no se ha tocado hasta el momento y que vale la pena retomar, y es el hecho de que nuestra hipótesis se ha confirmado parcialmente, ya que el análisis sobre el área de la arteria hipocampal transversa en el grupo transgénico a los 10 meses de edad estableció una diferencia significativa en comparación con el grupo silvestre, y en el análisis de la densidad vascular en el hipocampo a los 10 meses de edad no se encontraron diferencias significativas. Entonces, surge una pregunta: ¿Qué está sucediendo en la dinámica vascular que aún cuando la principal fuente de irrigación del hipocampo se encuentra alterada, la densidad vascular se mantiene en los mismos rangos que en el grupo silvestre? Pues bien, la literatura habla acerca de que el péptido  $\beta$ -amiloide puede ser tanto angiogénico como anti-angiogénico (Desai et al., 2009), lo que es cierto es que cuando existe un proceso de estenosis vascular, se provoca un proceso isquémico-hipóxico el cual es un estímulo importante para el crecimiento ya sea fisiológico o patológico de vasos sanguíneos. Esta angiogénesis es un elemento crítico para la adaptación cuando hay bajos niveles de oxígeno (Ward et al., 2007). Esto sucede a través de la señalización

de factores de transcripción inducibles por hipoxia, los cuales regulan a la alta la expresión de factores angiogénicos y a la baja la expresión de factores anti-angiogénicos.

Los vasos dilatados responden al óxido nítrico (ON), y al VEGF interrumpiendo los contactos celulares endoteliales causando vasopermeabilidad. Las células endoteliales son después liberadas para migrar fuera de la membrana basal a través del espacio perivascular usando el filtrado de proteínas plasmáticas como una matriz provisional. Después, un subconjunto de células endoteliales es seleccionada para responder a señales proangiogénicas por mecanismos que involucran receptores Notch. La dirección de la migración de las células endoteliales es primero manejada por VEGF, angiopoyetina-1 y angiopoyetina-2 y Factor de crecimiento de fibroblastos clásico (bFGF). Las proteasas facilitan el brote de vasos por liberación de activadores angiogénicos unidos a la Matriz extracelular (ECM) (Factor de crecimiento derivado de plaquetas-PDGF, factor de crecimiento epidermal-EGF, factor de crecimiento transformante- $\beta$  TGF- $\beta$ ) y la activación de citocinas angiogénicas como interleucinas (IL-1- $\beta$ ). La degradación de la ECM permite la adhesión de células endoteliales mediadas por integrinas (efrinas, semaforinas y netrinas) y la señalización de estas integrinas como  $\alpha_V\beta_3$  y  $\alpha_V\beta_5$  que participan en conjunto con VEGF y bFGF para promover o inhibir la proliferación celular endotelial (Clapp et al., 2009).

De esta manera, los resultados encontrados en el presente trabajo en el modelo 3xTg-AD nos marcan una evidente reducción en la densidad vascular en la corteza frontal y el hipocampo previa al establecimiento de los signos patológicos propios de la enfermedad, es decir a la edad de 2 meses. Esto apoya entonces la teoría vascular de la EA, que dice que, debido a un proceso de senescencia y/o disfunción endotelial, se pueden incrementar las concentraciones del  $\beta$ -amiloide en el cerebro y en la vasculatura, provocando ésto una hipoperfusión cerebral crónica, la activación de una respuesta inflamatoria, reducción de la capacidad angiogénica, estrés oxidativo y apoptosis neuronal. Sin embargo, no hay que olvidar la ausencia de diferencias en la

densidad vascular en el hipocampo a los 10 meses de edad, lo que estaría sugiriendo que mecanismos vasculares tanto deletereos como adaptativos resultado de un insulto tan fuerte como la presencia de la EA están co-existiendo en este modelo 3xTg-AD. Sin embargo, para decir esto con plena seguridad habría que realizar más estudios de índole molecular que permitieran demostrar objetivamente esta hipótesis.

Este estado crónico de hipoperfusión induce estímulos que provocan que las células endoteliales vasculares, neuronas y glía sean capaces de sintetizar, almacenar y liberar especies reactivas de oxígeno y sustancias vasoactivas (Aliev et al., 2008), provocando con el tiempo disfunción mitocondrial, estrés oxidativo, disminución en la producción de ATP e incremento en la entrada de calcio, síntesis de proteínas anormal, deficiencia de bombas iónicas celulares, defectos en la transducción de señales y falla en la neurotransmisión. Todo esto trae como consecuencia desestabilización de neuronas, sinapsis, neurotransmisión y habilidad cognitiva deficiente. Estas disfuncionalidades provocan un estado de hipoxia crónica, que al paso de los años conduce al proceso neurodegenerativo como la formación de placas seniles, redes neurofibrilares y angiopatía cerebral amiloide, eventos que contribuyen aún más al decline cognitivo característico de enfermedades neurodegenerativas como la EA. (Aliev et al., 2008),

Pero entonces, al margen de los resultados obtenidos en el presente estudio, es imposible no hacerse la siguiente pregunta, ¿Este deterioro vascular en el presente modelo tiene un trasfondo genético unido a la Enfermedad de Alzheimer? Existen algunos antecedentes que muestran que hay una regulación genética del aspecto vascular que está influenciando el desarrollo de la EA, tal es el caso de un trabajo del 2005 de Wu y colaboradores, en el que muestran que el gen homeobox MEOX2 está unido a una disfunción de la vasculatura cerebral en pacientes con la EA. Los genes homeobox son factores transcripcionales que tienen un papel esencial en la embriogénesis, el desarrollo, la diferenciación celular entre otros numerosos procesos celulares. El gen MEOX2 parece tener un papel en la angiogénesis y la migración de células musculares lisas de la vasculatura y se ha reportado baja expresión en las

células endoteliales cerebrales (BEC) de pacientes con la EA, de manera que la habilidad para la angiogénesis está reducida, condición que puede ser revertida cuando la expresión de MEOX2 es restaurada en los cultivos de estas células. Aunado a esta baja en la expresión de MEOX2 se encontró desregulación en la expresión de AFX-1, un factor de transcripción proapoptótico que está a su vez disminuyendo los niveles de expresión de LRP (proteína relacionada al receptor de lipoproteína) de manera que el aclaramiento del péptido  $\beta$ -amiloide está disminuído, y de Bcl-X (proteína antiapoptótica), lo que provoca disfunción mitocondrial en las BEC, la liberación de vasoconstrictores como la endotelina-1, la acumulación de  $A\beta$  en los vasos, la reducción de la glucosa y del transporte de oxígeno a través de la barrera hematoencefálica por una disminución en el flujo sanguíneo en ratones deficientes del homeobox MEOX2, los cuales también presentan una disminución de la densidad vascular.

Quizá estudios futuros dónde los experimentos estén encaminados a la manipulación genética sobre tipos celulares específicos del sistema cerebrovascular, y tales manipulaciones puedan provocar un fenotipo de demencia, logren apoyar con más fuerza la hipótesis vascular de la EA.

## 14. CONCLUSIONES

---

- La edad por si misma tiene una influencia negativa sobre la densidad de la vasculatura tanto en la corteza frontal como en el hipocampo, ya que se puede observar disminución a través del tiempo aún en los ratones que no sufren la enfermedad (silvestres).
- Esta disminución vascular se ve incrementada por efecto de la EA en los ratones 3xTg-AD jóvenes de apenas 2 meses de edad siendo del 45% en comparación con sus respectivos controles silvestres.
- La susceptibilidad temprana encontrada en la vasculatura de áreas específicas (corteza frontal e hipocampo) puede indicar que aún y cuando la manipulación genética en el modelo 3xTg-AD (que no es específica para el desarrollo vascular), si produce alteración en el aspecto vascular manifestada como reducción en la densidad de manera significativa en ambas estructuras a los dos meses de edad.
- El efecto sobre la corteza frontal que persiste hasta los 10 meses de edad, la hace más susceptible a la disminución vascular que la encontrada en el hipocampo, probablemente por la presencia de mecanismos angiogénicos que son más fuertes en esta estructura.

## 14. BIBLIOGRAFÍA

---

- Abernethy WB, Bell MA, Morris M, Moody DM. (1993). Microvascular density of the human paraventricular nucleus decreases with aging but not hypertension. *Exp Neurol.* 121, 270-274.
- Aird WC. (2008). Endothelium in health and disease. *Pharmacol Reports.* 60, 139-143.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. (2004). *Molecular Biology of the Cell*, New York: 3er ed. Edit Garland Publishing.
- Aliev G, Gasimov E, Obrenovich ME, Fischbach K, Shenk JC, Smith MA, Perry G. (2008). Atherosclerotic lesions and mitochondria DNA deletions in brain microvessels: implication in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Vasc Health Risk Manag.* 4, 721-730.
- Aliev G, Smith MA, de la Torre JC, Perry G. (2004). Mitochondria as a primary target for vascular hypoperfusion and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Mitochondrion.* 4, 649-663.
- Amaral DG, Witter MP. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience.* 31, 571-591.
- Andersen K, Lolk A, Andersen J, Becker I, Kragh-Sorensen P. (1999). Incidence of very mild to severe dementia and Alzheimer's disease in Denmark. The Odense Study. *Neurology.* 52, 85-90.
- Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe. (2007). *The hippocampus book*. New York, Oxford University Press.
- Bannerman DM, Rawlins JNP, McHugh SB, Deacon RMJ, Yee BK, Bast T, Zhang WN, Pothuizen HHJ, Feldon J. (2004). Regional dissociations within the hippocampus—memory and anxiety. *Neuroscience and Biobehavioral.* 28, 273–283.
- Bertram L, Tanzi RE. (2008). Thirty years of Alzheimer's disease genetics: the implications of systematic meta-analyses. *Nat Rev Neurosci.* 10, 768-778.
- Bojarzki L, Herms J, Kuznicki J. (2007). Calcium dysregulation in Alzheimer's disease *Neurochem. Int.* 52, 621-633.

- Bourasset F, Mélissa O, Tremblay C, Julien C, Do TM, Oddo S, LaFerla F, Calon F. (2009). Reduction of the cerebrovascular volume in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*. 56, 808-813.
- Bozzo C, Graziola F, Chiocchetti A, Canonico PC. (2010). Estrogen and  $\beta$ -amyloid toxicity: Role of integrin and PI3-K. *Mol. Cell. Neurosci*. 45, 85-91.
- Brown WR, Moodya DM, Thorea TR, Challab VR, Anstroma JA. (2007). Vascular dementia in leukoaraiosis may be a consequence of capillary loss not only in the lesions, but in normal-appearing white matter and cortex as well. *J Neurol Sci*. 257, 62–66.
- Bullitt E, Zeng D, Mortamet B, Ghosh A, Aylward FR, Lin W, Marks BLf, Smith K. (2010). The effects of healthy aging on intracerebral blood vessels visualized by magnetic resonance angiography. *Neurobiol Aging*. 31, 290-300.
- Butterfield DA, Drake J, Pocernich Chava, Castegna A. (2001). Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid  $\beta$ -peptide. *Trends Mol Med*. 7, 548-554.
- Campion D, Hannequin D. (1999). Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. *Am J Hum Genet*. 65, 664-670.
- Candore G, Balistreri CR, Grimaldi MP, Vasto S, Listi F, Chiappelli M, Licastro F, Lio D, Caruso C. (2006). Age-Related inflammatory diseases. Role of genetics and gender in the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Ann NY Acad Sci*. 1089, 472–486.
- Chern JH, Hsu PC, Wang LW, Tsay HJ, Kang IJ, Shie FS. (2010). Modulation of microglial immune responses by a novel thiourea derivative. *Chem Biol Interact*. 188, 228-236.
- Clapp C, Thebault S, Jeziorski MC, Martínez de la Escalera G. (2009). Peptide Hormone Regulation of Angiogenesis. *Physiol Rev* 89, 1177–1215.
- De la Torre JC. (2008). Pathophysiology of neuronal energy crisis in Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis*. 5, 126-132.
- De la Torre JC. (2000). Review. Critically attained threshold of cerebral hypoperfusion: can it cause Alzheimer's disease? *Ann N Y Acad Sci*. 903, 424-436.



- Deane R, Bell DR, Sagare A, Zlokovic BV. (2009). Clearance of amyloid- $\beta$  peptide across the blood-brain barrier: Implication for therapies in Alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 8, 16–30.
- Desai BS, Schneider JA, Li JL, Carvey PM, Hendey B. (2009). Evidence of angiogenic vessels in Alzheimer's disease. *J Neural Transm*. 116, 587–597.
- Dickson DW. (1997). The pathogenesis of senile plaques. *J. Neuropathol Exp Neurol*. 56, 321-339.
- Dickstein DL, Kabaso D, Rocher AB, Luebke HI, Wearne SL, Hof PR. (2007). Changes in the structural complexity of the aged brain. *Aging Cell*. 6, 275–284.
- Dickstein DL, Walsh J, Brautigam H, Stockton SD, Gandy S, Hof PR. (2010). Role of Vascular Risk Factors and Vascular Dysfunction in Alzheimer's Disease. *Mt Sinai J Med*. 77, 82–102.
- Donato AJ, Gano LB, Eskurza I, Silver AE, Gates PE, Jablonski K, Seals DR. (2009). Vascular endothelial dysfunction with aging: endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 297, H425–H432.
- Dorr A, Sled JG, Kabania N. (2007). Three-dimensional cerebral vasculature of the CBA mouse brain: A magnetic resonance imaging and micro computed tomography study. *NeuroImage* 35, 1409–1423.
- Espinoza M, de Silva R, Dickson WD, Davies P. (2008). Differential Incorporation of Tau Isoforms in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 14, 1–16.
- Farkas E, De Vos RAI, Jansen Steur ENH, Luiten PGM. (2000). Are Alzheimer's disease, hypertension, and cerebrocapillary damage related? *Neurobiol of Aging* 21, 235-243.
- Farkas E, Luiten PGM. (2001). Cerebral microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol*. 64, 575-611.
- Fiala JC. (2007). Mechanisms of amyloid plaque pathogenesis. *Acta Neuropathol*. 114, 551–571.
- Funderburk SK, Marcellino BK, Zhenyu Yue. (2010). Cell “Self-Eating” (Autophagy) Mechanism in Alzheimer's Disease. *Mt Sinai J Med*. 77, 59–68.

- Gama-Sosa Ma, De Gasperi R, Rocher AB, Ching-Jung Wang A, Janssen WG, Flores T, Perez GM, Schmeidler J, Dickstein DL, Hof PL, Elder GA. (2010). Age-related vascular pathology in transgenic mice expressing presenilin 1-associated familial Alzheimer's disease mutations. *Am J Pathol.* 176, 353-368.
- Gao L, Tucker KL, Andreadis A. (2005). Transcriptional regulation of the mouse microtubule-associated protein tau. *Biochimica et Biophysica Acta* 1681, 175–181.
- Gazulla J, Cavero-Nagore M. (2006). Glutamato y enfermedad de Alzheimer. *Rev. Neurol.* 42, 427-432.
- Gilbert SF. (2005). *Biología del Desarrollo*, 7<sup>o</sup> edición, México-España: Ed. Panamericana,
- Gong CX, Iqbal K. (2008). Hyperphosphorylation of Microtubule-Associated Protein Tau: A Promising Therapeutic Target for Alzheimer Disease. *Curr Med Chem.*15, 2321–2328.
- Granados-Rojas L, Aguilar A, Díaz-Cintra S. (2004). The mossy fiber system of the hippocampal formation is decreased by chronic and postnatal but not by prenatal protein malnutrition in rats. *Nutr Neurosci.* 7, 301-8.
- Guimerà A, Girones X, Sánchez-Cruz FF. (2002). Actualización sobre la patología de la enfermedad de Alzheimer, *Rev Esp Patol.* 35, 21-48.
- Helmer C, JP, Letenneur L, Commenges D, Dartigues JF. (2001). Mortality with dementia: results from a French prospective community-based cohort. *Am J Epidemiol.* 154, 642-648.
- Hofman ARW, Brayne C. (1991). The prevalence of dementia in Europa: a collaborative study of 1980-1990 findings. *Int J Epidemiol* 20, 736-748.
- Iadecola C. (2004). Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.* 5, 347-360.
- Jellinger KA. (2002). Alzheimer disease and cerebrovascular pathology: an update. *J Neural Transm.* 109, 813–836.
- Kalaria RN. (2000). The role of cerebral ischemia in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 21, 321-330.

- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. (2001). Cellular mechanisms of learning and the biological basis of individuality. En E.R. Kandel, J.H. Schwartz, T.M. Jessell (Eds.), Principles of Neural Science. New York: McGraw Hill.
- Kim J, Basak JM, Holtzman DM. (2009). The Role of Apolipoprotein E in Alzheimer 's disease. *Neuron* 63, 287-303.
- Kitaguchi H, Ihara M, Saiki H, Takahashi R, Tomimoto H. (2007). Capillary beds are decreased in Alzheimer's disease, but not in Binswanger's disease. *Neurosci Lett.* 417, 128–131.
- Knopman DS, Parisi JE, Salviati A, Floriach-Robert M, Boeve BF. (2003). Neuropathology of cognitively normal elderly. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 62, 1087-1095.
- Lee S & Das HK. (2008) Inhibition of basal activity of c-jun-NH2-terminal kinase (JNK) represses the expression of presenilin-1 by a p53-dependent mechanism. *Brain Res.* 1207, 19-31.
- López Antúnez L. (1995). Anatomía funcional del Sistema Nervioso, México: ed. Limusa.
- Lukiw WJ, Pappolla M, Palacios Pelaez R, Bazan NG. (2005). Alzheimer's Disease A Dysfunction in Cholesterol and Lipid. *Cell Mol Neurobiol.* 25, 475-483.
- Mahley RW, Stanley C. Rall Jr. (1999). Is e4 the ancestral human apoE allele? *Neurobiol of Aging* 20, 429-430
- Mahley RW, Weisgraber KH, Huang Y. (2006) Apolipoprotein E4: A causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *PNAS.* 15, 5644–5651.
- Mattson MP, Partin J, Begley JG. (1998). Amyloid b-peptide induces apoptosis-related events in synapses and dendrites. *Brain Research* 807,167–176.
- McNaull BBA, Todd S, McGuinness B, Passmore AP. (2010). Inflammation and anti-inflammatory strategies for Alzheimer's disease – A Mini-Review. *Gerontology* 56, 3–14.
- McPherson MJ, Quirke P, Taylor GR. (1994). PCR a practical approach. Volume 1, Inglaterra: Series editors: D. Rickwood y BD Hames.

- Meyer EP, Ulmann-Schuler A, Staufenbiel M, Krucker T. (2008). Altered morphology and 3D architecture of brain vasculature in a mouse model for Alzheimer's disease Proc Natl Acad Sci USA. 105, 3587-3592.
- Mortimer JA, Snowden SA, Markesbery WR. (2009). The effect of APOE- $\epsilon$ 4 on dementia is mediated by Alzheimer neuropathology. Alzheimer Dis Assoc Disord. 23, 152–157.
- Müller WE, Eckert A, Kurz C, Eckert GP, Leuner K. (2010). Mitochondrial Dysfunction: Common Final Pathway in Brain Aging and Alzheimer's Disease - Therapeutic Aspects. Mol Neurobiol. 41,159–171.
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla F. (2003). Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: Intracellular A $\beta$  and synaptic dysfunction. Neuron. 39, 409-421.
- Oddo S, LaFerla FM. (2006). The role of nicotinic acetylcholine receptors in Alzheimer's disease. J Physiol Paris. 99, 172-179.
- Paxinos G, Franklin KBJ. (2001). The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. Second edition. San Diego, California. Academic Press.
- Paxinos G, Watson CH. (2004). The rat nervous system. Third edition. New York: Elsevier Academic Press.
- Pedrosa R, Teixeira-Sousa V, Fonseca S, Bastos-Leite AJ. (2010). Early-onset Alzheimer disease: The contribution of neuroimaging for the diagnosis. 182, 287-8.
- Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick, Hall WC, Lamantia AS, McNamara JO, Williams SM. (2004). Neuroscience, 3th edition, Sinauer Associates Inc, Publishers, USA.
- Raffai RL, Weisgraber KH. (2003). Cholesterol: from heart attacks to Alzheimer's disease. J Lipid Res. 44, 1423-1430.
- Rabinovici GD, Seeley WW, Kim EJ, Gorno-Tempini ML, Rascovsky K, Pagliaro TA, Allison SC, Halabi C, Kramer JH, Johnson K, Weiner MW, Forman MS, Trojanowski JQ, DeArmond SJ, Miller BL, Rosen HJ. (2007) Distinct MRI Atrophy Patterns in Autopsy-Proven Alzheimer's Disease and Frontotemporal Lobar Degeneration. Am J Alzheimers Dis Other Demen. 22, 474–488.

- Rodríguez R. (2005). Segmentation of Blood Vessels Based on a Threshold that Combines Statistical and Scale Space Filters. *Computación y Sistemas Mex.* 9, 093-103.
- Rogaeva E, Meng Yan, Lee JH, Gu Y, Kawarai T, Zou F, Katayama T, Baldwin CT, Cheng R, Hasegawa H, Chen F, et al. (2007). The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 39, 168–177.
- Rogawski MA, Gary L, Wenk C. (2003). The neuropharmacological basis for the use of memantine in the treatment of Alzheimer's disease. *CNS Drug Rev.* 9, 275–308.
- Rogers JT, Leiter LM, McPhee J, Cahill CM, Zhan SS, Potter H, Nilsson LN. (1999). Translation of the alzheimer amyloid precursor protein mRNA is up-regulated by interleukin-1 through 5'-untranslated region sequences. *JBiol Chem*, 274, 6421-6431.
- Rogers JT, Randall JD, Cahill CM, Eder PS, Huang X, Gunshin H, Leiter L, McPhee J, Sarang SS, Utsuki T, Greig NH, Lahiri DK, Tanzi RE, Bush AI, Giordano T, Gullans SR. (2002). An iron-responsive element type II in the 5'-untranslated region of the Alzheimer's amyloid precursor protein transcript. *J Biol Chem*, 277, 45518-45528.
- Rutgers KS, van Remoortere A, van Buchem MA, Verrips T, Greenberg SM, Bacskai BJ, Frosch MP, van Duinen SG, Maat-Schieman ML, van der Maarel SM. (2009). Differential recognition of vascular and parenchymal beta amyloid deposition. *Neurobiol Aging*. DOI:10.1016/J.Neurobiolaging.2009.11.012.
- Sastre M, Klockgether T, Heneka MT. (2006). Contribution of inflammatory processes to Alzheimer's disease: molecular mechanisms. *J Devl Neuroscience* 24, 167–176.
- Scarmeas N, Stern Y. (2004) Cognitive reserve: implications for diagnosis and prevention of Alzheimer's disease. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 4, 374–380.
- Scoville WB, Milner B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 20, 11-21.

- Sharma MC, Tripathi LM, Rastogi M, Maitra SC, Sagar P, Dutta GP, Pandey VC. (1992). Aberrations in cerebral vascular functions due to *Plasmodium yoelii nigeriensis* Infection in mice. *Exp Mol Pathol.* 57, 62-69.
- Tandon A, Fraser P. (2002). The presenilins. *Genome Biol.* 3, Reviews 3014.
- Thomas P, Fenech M. (2007). A review of genome mutation and Alzheimer's disease, *Mutagenesis.* 22, 15–33.
- Tresguerres JAF. (2005). *Fisiología Humana*, Madrid, España: Ed. McGraw-Hill-Interamericana.
- Varela RM, Ávila CM, Fritoul van der GT. (2005). *La memoria: definición, función y juego para la enseñanza de la medicina.* México: Ed. Médica Panamericana.
- Vostrov A, Taheny MJ, Izkhakov N, Quitschke WW. (2010). A nuclear factor-binding domain in the 5'-untranslated region of the amyloid precursor protein promoter: Implications for the regulation of gene expression *BMC Research Notes.* 12, 3-4.
- Ward NL, Moore E, Noon K, Spassil N, Keenan E, Ivanco TL, LaManna JC. (2007). Cerebral angiogenic factors, angiogenesis, and physiological response to chronic hypoxia differ among four commonly used mouse strains. *J Appl Physiol.* 102, 1927-1935.
- Wu Z, Guo H, Chow N, Sallstrom J, Bell RD, Deane R, Brooks AI, Kanagala S, Rubio A, Sagare A, Liu D, Li F, Armstrong D, Gasiewicz T, Zidovetzki R, Song X, Hofman F, Zlokovic BV. (2005). Role of the MEOX2 homeobox gene in neurovascular dysfunction in Alzheimer disease. *Nat Med.* 11, 959-965.
- Wyss-Coray T, Lin C, Sanan DA, Mucke L, Masliah E. (2000). Chronic Overproduction of Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 by Astrocytes Promotes Alzheimer's Disease-Like Microvascular Degeneration in Transgenic Mice. *Am J Pathol.* 156, 139-150.
- Zacchigna S, Lambrechts D, Carmelie. (2008). Neurovascular signalling defects in neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci.* 9, 169-181.
- Zlokovic BV. (2005). Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration. *Trends Neurosci.* 28, 202-208.

Zlokovic BV. (2008). New Therapeutic Targets in the Neurovascular Pathway in Alzheimer's Disease. *Neurotherapeutics*. 5, 409–414.

Zlokovic BV. (2008). The Blood-Brain Barrier in Health and Chronic Neurodegenerative Disorders. *Neuron* 57, 178-201.

## 16. FIGURAS

---

Figura 1. Anatomía del hipocampo.	6 pp
Figura 2. Estructura de la corteza cerebral.	8 pp
Figura 3. Pasos celulares involucrados en la Angiogénesis.	10 pp
Figura 4. Estructura de los vasos sanguíneos	12 pp
Figura 5. Vasculatura del hipocampo y corteza frontal	15 pp
Figura 6. Generación del ratón 3xTg-AD.	26 pp
Figura 7. Expresión de la proteína tau y $\beta$ -amiloide.	27 pp
Figura 8. Ubicación del hipocampo y corteza frontal.	29 pp
Figura 9. Reacción en Cadena de la Polimerasa.	31 pp
Figura 10. Detección del gen de APP y Tau mediante PCR.	36 pp
Figura 11. Detección del gen de PSN1.	36 pp
Figura 12. Detección de la mutación en el gen de PSN1.	37 pp
Figura 13. Inmunohistoquímica para A $\beta$ en hipocampo.	38 pp
Figura 14. Inmunohistoquímica para A $\beta$ corteza frontal.	39 pp
Figura 15. Inmunohistoquímica para tau en hipocampo.	40 pp
Figura 16. Vasculatura de la corteza frontal.	42 pp
Figura 17. Vasculatura del hipocampo.	43 pp
Figura 18. Medias $\pm$ EEM de pesos corporales del grupo silvestres (S) y del transgénico (Tg).	44 pp
Figura 19. Media $\pm$ EEM de los volúmenes cerebrales.	45 pp
Figura 20. Medias y $\pm$ EEM del área total de las zonas estudiadas corteza frontal (CF) e hipocampo (HIP).	46 pp
Figura 21. Medias y $\pm$ EEM de la arteria hipocampal transversa.	47 pp
Figura 22. Medias y $\pm$ EEM de la densidad vascular.	49 pp



## 17. ANEXO

---

### Primers para PCR – APP y Tau

#### 5tauRev 5' TCCAAAGTTCACCTGATAGT 3'

Homo sapiens cDNA FLJ60852 complete cds, highly similar to Homo sapiens microtubule-associated protein tau (MAPT), transcript variant 4, mRNA  
Length=1465

Query 3 CAAAGTTCACCTGATAGT 20

|||||

Sbjct 131 CAAAGTTCACCTGATAGT 114

ORIGIN

```
1 acccaccagc tccggcacca acagcagcgc cgctgccacc gccaccttc tgccgcccgc
61 accacagcca cttctctc ctcgctgtc ctctcccgtc ctgcctctg tgcactatca
121 ggtgaacttt gaaccaggat ggctgagccc cgccaggagt tcgaagtgat ggaagatcac
181 gctgggacgt acgggttggg ggacaggaaa gatcaggggg gctacacat gcaccaagac
241 caagagggtg acacggacgc tggcctgaaa gctgaagaag caggcattgg agacaccccc*
```

#### APPinternal 5' GCTTGCACCAGTTCTGGATGG 3'

Synthetic construct Homo sapiens clone HAIB:100068486; DKFZo004D0434 amyloid beta (A4) precursor protein (peptidase nexin-II, Alzheimer disease) protein (APP) gene, partial cds. Length=2299

Query 1 GCTTGCACCAGTTCTGGATGG 21

|||||

Sbjct 320 GCTTGCACCAGTTCTGGATGG 300

ORIGIN

```
121 gattgccatg ttctgtggca gactgaacat gcacatgaat gtccagaatg ggaagtggga
181 ttcagatcca tcagggacca aacctgcat tgataccaag gaaggcatcc tgcagtattg
241 ccaagaagtc taccctgaac tgcagatcac caatgtggta gaagccaacc aaccagtgac
301 catccagaac tgggtgcaagc ggggccgcaa gcagtgcaag acctatcccc actttgtgat
361 tccctaccgc tgcttagttg gtgagtttgt aagtgatgcc cttctcgttc ctgacaagtg
421 caaattctta caccaggaga ggatggatgt ttgcgaaact catcttact ggcacaccgt*
```

## Thy12.4 5' GAGGTATTCAGTCATGTGCT 3'

Mouse Thy-1.2 glycoprotein gene, complete cds. Length=5572

Query 1 GAGGTATTCAGTCATGTGCT 20

|||||

Sbjct 2478 GAGGTATTCAGTCATGTGCT 2497

ORIGIN

2341 caccagcag gaggtgctca gggacagcaa gacacacaca cccaggacac taggctcca  
2401 cttccttggc tttctctgag tggcaaagga ccttaggcag tgtcactccc taagagaagg  
2461 ggataaagag aggggct **gag gtattcagtc atgtgct** ccg tggatctcaa gccctcaagg  
2521 taaatgggga cccacctgtc ctaccagctg gctgacctgt agctttcccc accacagaat  
2581 ccaagtcgga actcttggca ccatgaacct agccatcagc gtcgctctcc tgctctcagg\*

Buffer 2.5 µl x tubo

Mg 1 mM x tubo

Thy 1 µl x tubo

Tau 0.5 µl x tubo

APP 0.5 µl x tubo

Taq 0.4 µl x tubo

dNTP's 0.5 µl x tubo

Aforar a 22 µl x tubo

ADN 3 µl x tubo

Vol final 25 µl x tubo

**Condiciones de PCR**  
**25 ciclos**

94° C 5 min

94° C 30 seg

53° C 30 seg

72° C 1 min

72° C 3 min

4° C ∞

## Primers para PCR – PS1

### PS1-K13 5' CACACGCACACTCTGACATGCACAGGC 3'

Mus musculus presenilin-1 gene, alternatively spliced transcripts, complete cds. Length=48974

Query 1 CACACGCACACTCTGACATGCACAGGC 27

|||||

Sbjct 28820 CACACGCACACTCTGACATGCACAGGC 28794

ORIGIN

28621 tgatcagtgt cattgtcatt atgaccatcc tcctggtggt cctgtataaa tacaggtgct  
28681 acaaggtgag cacgaggcag tctgctgtcc gccttgacct gcctatgggt tgccttgtg  
28741 tgtgtgggag ggggaaggtg ggagagttgg gggcggggga gatgtgtatg caggcctgtg  
28801 catgtcagag tgtgcgtgtg cagttggtan gaccactttg tggaatgcat cttttccttc  
28861 catctttgct tgggttttgg atatcaaatc tccaagcttg taagcgtcac gttctgagcc  
28921 ccttcacagc ctccttgtct tgacttggtc taacaaagag gaagtgtctt atattttgga\*

### PS1-K15 5' AGGCAGGAAGATCACGTGTTCCAAGTAC 3'

Mus musculus presenilin-1 gene, alternatively spliced transcripts, complete cds. Length=48974

Query 1 AGGCAGGAAGATCACGTGTTTC 21

|||||

Sbjct 28293 AGGCAGGAAGATCACGTGTTTC 28313

ORIGIN

28141 ctctctccac atggccatgg ccggcctctc tctctctttc taccttctct ctttcccctg  
28201 catttctaca acaaagctct aaaaccattt aaaaaaaaaat attacctaga gctaggggtg  
28261 tacagaccac aatctccaca cttggaattc aaaggcagga agatcacgtg ttcaagtaca  
28321 gcctgggcta catggtgagt tccaagctag cttgggggtt cttattagat tctgtgtcaa  
28381 aaactaacca accaaataaa aatatacttg gttgactgat gacctgcaa aggcaccttc  
28441 taaaagactc attaaaccgc agacctcaca gtgaattaca gttttaagag ttgtgctgtt\*

\*[http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST\\_PROGRAMS=megaBlast&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&SHOW\\_DEFAULTS=on&LINK\\_LOC=blasthome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome)

Buffer	2.5 µl x tubo	<b>Condiciones de PCR</b> <b>25 ciclos</b>
Mg	0.5 mM x tubo	
PSK13	2 µl x tubo	
PSK15	2 µl x tubo	
Taq	0.4 µl x tubo	
dNTP's	1 µl x tubo	
Aforar a	22 µl x tubo	
ADN	3 µl x tubo	
Vol final	25 µl x tubo	
		94° C 30 seg
		53° C 30 seg
		72° C 1 min
		72° C 3 min
		4° C ∞

Una vez obtenido el producto de PCR se realiza la incubación con la enzima de restricción BstII para la identificación de la mutación en PS1.

### Digestión con BstII

Producto de PCR	5 µl
Buffer 10x (NEB)	1.5 µl
Enzima BstII (NEB)	0.6 µl
H <sub>2</sub> O	8 µl
Vol. Final	15 µl

Esta enzima tiene un sitio de reconocimiento:

